



ulm university

universität
uulm

**Mesoporöse Silikananopartikel als
Transportsysteme für miRNA und Wirkstoffmoleküle
für die Therapie von Krebsstammzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)

2017

eingereicht von
Michaela Beck
geboren in Laupheim

Universität Ulm »Fakultät für Naturwissenschaften«
Institut für Anorganische Chemie II

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Peter Dürre

Erstgutachter: Prof. Dr. Mika Lindén
Zweitgutachter: Prof. Dr. Tanja Weil
Drittgutachter (extern): Prof. Dr. Peter Behrens

Tag der Promotion: 28.06.2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2013 bis Februar 2017 am Institut für Anorganische Chemie II der Universität Ulm unter Leitung von Prof. Dr. Mika Lindén angefertigt.

Für meine Familie

Kurzfassung der Dissertation

Durch den selektiven Transport biologisch relevanter Substanzen in Krebs(stamm)zellen können Nebenwirkungen reduziert und die Effizienz von Therapien erhöht werden. Mesoporöse Silikananopartikel (MSN) sind aufgrund ihrer Eigenschaften eine ideale Plattform für die Entwicklung solcher partikulären Systeme. Durch Variation der Partikelmorphologie und -größe sowie Porengröße und Oberflächenfunktionalisierung kann das biologische Verhalten der MSN sowie die Interaktion mit Wirkstoffmolekülen gesteuert werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von MSN-basierten Transportsystemen für Wirkstoffe und miRNA in Krebsstammzellen.

MSN wurden durch die Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit dem Endotemplatverfahren hergestellt. Durch Variation der Syntheseparameter gelang es, sphärische nichtporöse und mesoporöse Silikananopartikel unterschiedlicher Porengröße zu synthetisieren. Zudem konnte durch Änderung der Reaktionsbedingungen, wie Tensid- und Präkursorkonzentration, Temperatur sowie Ethylenglykol-Konzentration die Morphologie und Größe der resultierenden MSN beeinflusst werden.

Der Einfluss der Ladung und der daraus resultierenden Proteinadsorption auf die gezielte Aufnahme antikörperfunktionalisierter MSN wurde durch die Aufnahme in leukämischen Stammzellen untersucht. Die Funktionalisierung aminofunktionalisierter MSN (MSN-NH₂) mit unterschiedlichen Mengen Bernsteinsäureanhydrid ermöglichte die sukzessive Veränderung der Oberflächenladung. Der Einfluss der Oberflächenladung auf Partikeleigenschaften bzw. -stabilität unter physiologischen Bedingungen wurde mittels SDS-PAGE, STORM, DLS und ICP-OES untersucht. Die biologische Evaluation erfolgte anhand muriner B220-positiver CALM/AF10-Zellen. Hierbei zeigten MSN-NH₂, die mit 0,4 mmol/g Bernsteinsäureanhydrid (MSN_c3) und dem Antikörper anti-B220 funktionalisiert wurden, die höchste spezifische Aufnahme. Die Präinkubation der Partikel in Serum verminderte, bedingt durch steigende Proteinadsorption und Ablösung der Antikörpermoleküle, die selektive Aufnahme der Partikel. Durch den Transport des Zytostatikums Daunorubicin mittels antikörperfunktionalisierter MSN_c3 konnten *in vitro* selektiv CALM/AF10-Zellen getötet und deren Auswirkungen in Mäusen beeinflusst werden.

Die Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten kann die gezielte Aufnahme von MSN in Krebs(stamm)zellen mit höherer glykolytischer Aktivität steigern. Durch die Funktionalisierung unterschiedlich modifizierter MSN mit Glucosederivaten gelang es, Einfluss

auf die resultierende unspezifische Proteinadsorption zunehmen. Hierbei zeigten Glucuronsäure-funktionalisierte MSN-NH₂ die geringste Menge an adsorbierten Proteinen, wobei die Morphologie der Partikel keinen Einfluss hatte.

Eine erhöhte Aktivität des Notch-Signalweges wird in Brustkrebsstammzellen mit einer aggressiven Metastasenbildung und Therapieresistenz assoziiert. Durch den Einsatz von Glucosederivat-funktionalisierten MSN, welche mit dem Notch-inhibierenden γ -Sekretase-Inhibitor DAPT beladen wurden, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der Krebsstammzellpool reduziert und das Tumorwachstum inhibiert werden.

Die Beladung von MSN mit Oligonukleotiden sowie deren Freisetzung wurde in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung und der Porengröße bzw. spezifischen Oberfläche untersucht. Hierbei zeigte sich deutlich, dass die Wechselwirkung zwischen negativ geladener DNA und den Partikeln von deren Oberflächenladung unter den jeweiligen Bedingungen abhing. Durch die Beladung von nichtporösen und mesoporösen Silikananopartikeln konnte gezeigt werden, dass sich die adsorbierte DNA in den Poren der Partikel befand und daraus eine geringere Freisetzung im Vergleich zu nichtporösen Partikeln resultierte.

Durch den Transport der therapeutisch relevanten miR-193a-3p konnte *in vitro* in leukämischen Hoxa9/Meis1-Zellen Einfluss auf deren Gen-Expression genommen werden. Dies zeigte sich durch eine verminderte c-Kit-Expression der Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich MSN aufgrund der hohen Biokompatibilität sowie spezifischen Oberflächen hervorragend für den Einsatz als Transportsysteme in biologischen Systemen eignen. Durch die hohe Variabilität der Oberflächenfunktionalisierung der MSN gelang es, das Material an die für die jeweilige Applikation erforderlichen Bedingungen anzupassen. Der erfolgreiche Transport von Medikamenten sowie miRNA mithilfe von MSN in Krebs(stamm)zellen konnte *in vitro* und *in vivo* anhand von Modellsystemen demonstriert werden. Die Verwendung solcher Transportsysteme in der Krebstherapie ist ein vielversprechender Ansatz zur Minimierung von Nebenwirkungen und Erhöhung von Therapieerfolgen.

Abstract

The selective delivery of biochemical cues to cancer (stem) cells can reduce side effects and increase the efficiency of therapies. Mesoporous silica nanoparticles (MSN) are an ideal platform for the development of such transport systems due to their unique properties. The biological behaviour of MSN and their interaction with drug molecules can be influenced by modifying their morphology and size as well as their pore size and surface functionalisation. The present work is dealing with the development of MSN based transport systems for drugs and miRNA into cancer stem cells.

MSN were produced by endo-templated sol-gel processing. Spherical non-porous and mesoporous silica nanoparticles with different pore sizes could be obtained by changing synthesis parameters. Furthermore, the variation of surfactant and precursor concentration, temperature as well as ethylene glycol concentration led to a change in morphology and size of the resulting MSN.

The influence of surface charge and the resulting protein adsorption on targeted uptake of antibody functionalised MSN was evaluated in leukaemic stem cells. Successive alteration of surface charge was enabled by the reaction of amino functionalised MSN (MSN-NH₂) with different amounts of succinic anhydride. The influence of surface charge on particle properties and stability under physiological conditions was analysed with SDS-PAGE, STORM, DLS and ICP-OES. This was subsequently followed by the evaluation of the biological response in B220-positive *CALM/AF10* cells. MSN-NH₂, functionalised with 0.4 mmol/g succinic anhydride (MSN-c3) and the antibody anti-B220, showed the highest specific uptake. Preincubation of particles in serum led to a reduced specific uptake due to increasing protein adsorption and detachment of antibody molecules from the particle surface. Targeted drug delivery of the cytostatic drug daunorubicin with antibody functionalised MSN-c3 showed selective cytotoxic effects on *CALM/AF10* cells *in vitro* and influenced their impact on mice *in vivo*.

The attachment of glucose derivatives to the surface of MSN can increase their uptake in cancer (stem) cells with an enhanced glycolytic activity. By modifying differently functionalised MSN with glucose derivatives the resulting unspecific protein adsorption could be influenced. The lowest level of protein adsorption was detected for glucuronic acid modified MSN-NH₂ whereas particle morphology had no influence on protein adsorption.

An increased activity of the Notch signalling pathway is associated with aggressive metastasis and therapy resistance in breast cancer. MSN which were functionalised with glucose

derivatives and loaded with the notch-inhibiting γ -secretase-inhibitor DAPT could reduce the stem cell pool and inhibit tumour growth *in vitro* and *in vivo*.

To analyse the interaction of oligonucleotides with silica nanoparticles, short DNA strands were loaded onto particles with varying surface functionalities, followed by the analysis of the DNA release behaviour in buffer solution. The results indicate that the interaction of the negatively charged DNA with the MSN was mainly influenced by the surface charge of the particles. Loading of DNA on aminofunctionalised non-porous and mesoporous silica nanoparticles revealed that DNA adsorbed in the pores of the mesoporous particles resulting in a reduced release in comparison to non-porous silica particles.

The transport of the therapeutic relevant miR-193a-3p in leukaemic Hoxa9/Meis1 cells could influence the gene expression *in vitro* resulting in a reduced c-Kit expression.

The present work shows that MSN are excellent delivery vehicles in biological systems due to their high biocompatibility and specific surface area. The high variability in surface functionalisation of MSN enabled a tailored adjustment of the material with regard to the required properties for a particular application. MSN based transport of drugs and miRNA in cancer (stem) cells could be shown *in vitro* and *in vivo*. The application of such transport systems in cancer therapy is a promising strategy for minimizing side effects and enhancing the outcome of therapies.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung der Dissertation	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Erläuterungen	X
Nomenklatur	XIV
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XXVI
I. Einleitung	1
1. Nanopartikel in biologischen Anwendungen	1
2. Mesoporöse Silikananopartikel.....	2
2.1 Herstellung von mesoporösen Silikananopartikeln	2
2.2 Funktionalisierung von Silika-basierten Materialien	6
3. MSN unter biologisch relevanten Bedingungen	7
3.1 Hydrolytische Stabilität.....	7
3.2 Stabilität von Partikeldispersionen unter physiologischen Bedingungen.....	9
3.3 Adsorption von Proteinen auf MSN	10
4. MSN in Biomedizinischen Anwendungen	13
4.1 Interaktion von Silikananopartikeln mit biologischen Systemen.....	13
4.1.1 Einfluss der Partikelgröße	13
4.1.2 Einfluss der Partikelform	15
4.1.3 Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung.....	17
4.2 Gezielte Aufnahme in bestimmten Zellen	18
4.3 Gezielter Medikamententransport	20
4.4 Transport von kurzen Oligonukleotiden	23
II. Motivation.....	26
III. Resultate und Diskussion	30
1. Synthese von Silikananopartikeln.....	30

1.1	Synthese sphärischer Silikananopartikel	30
1.2	Synthese von MSN unterschiedlicher Form.....	35
1.2.1	Partikel mit unterschiedlichem AR.....	35
1.2.2	Variation der Reaktionstemperatur	40
1.2.3	Einfluss der Zugabe von Ethylenglykol.....	43
2.	Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen	46
2.1	Partikelfunktionalisierung	47
2.2	Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen	54
2.3	Biokompatibilität und zelluläre Aufnahme.....	64
2.4	Stabilität in Serum und Einfluss auf die gezielte Aufnahme in B220-positive Leukämienstammzellen	68
2.5	Gezielter Medikamententransport	72
2.5.1	Transport eines Fluoreszenzfarbstoffes (DiR)	72
2.5.2	Transport des Zytostatikums Daunorubicin	75
3.	Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten	81
3.1	Synthese und Charakterisierung von MSN mit Glucosederivat-Funktionalisierung. 81	
3.1.1	MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen	81
3.1.2	Einfluss der Form auf die Proteinadsorption und Dispergierbarkeit	89
3.2	Gezielter Medikamententransport in Brustkrebsstammzellen	94
4.	Transport von kurzen Oligonukleotid-Sequenzen mittels MSN in der Therapie von leukämischen Stammzellen	103
4.1	Partikelfunktionalisierung	103
4.2	Beladung und Freisetungsverhalten von MSN mit kurzen DNA-Sequenzen	107
4.2.1	Beladung von Silikapartikeln mit kurzen DNA-Strängen	107
4.2.2	Freisetzung von kurzen DNA-Strängen von Silikapartikeln.....	111
4.3	Beladung und Transport von miRNA Sequenzen <i>in vitro</i>	114
4.3.1	Beladung von aminofunktionalisierten MSN mit miRNA	115
4.3.2	Transport von miRNA mittels MSN in leukämische Hoxa9/Meis1-Zellen ...	115
IV.	Zusammenfassung und Ausblick.....	118
V.	Experimentalteil.....	125

1.	Material und Methoden.....	125
1.1	Verwendete Messgeräte	125
1.2	Materialien	127
1.3	Verwendete (Puffer-)Lösungen	130
2.	Partikelsynthese.....	132
2.1	Synthese von nichtporösen Silikananopartikeln (SN)	132
2.2	Synthese von sphärischen MSN (MSN, MSN_NH ₂)	132
2.3	Synthese von MSN mit erweiterten Poren (MSNe).....	133
2.4	Synthese von Partikeln mit unterschiedlicher Morphologie (MSN1, MSN2, MSN4)	133
3.	Postsynthetische Modifizierung und Beladung der Partikel.....	135
3.1	Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen ...	135
3.1.1	Funktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid (MSN_c1-c5)	135
3.1.2	Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff	135
3.1.3	Beladung des Fluoreszenzfarbstoffes DiR	136
3.1.4	Beladung des Zytostatikums Daunorubicin (MSN_c3_D)	136
3.1.5	Antikörperfunktionalisierung (MSN_c1-5-B220, MSN_c3-CD9).....	136
3.1.6	Freisetzung von Daunorubicin.....	137
3.1.7	Stabilität antikörperfunktionalisierter Partikel in Serum.....	137
3.2	Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten	138
3.2.1	Carboxyfunktionalisierung (MSN_COOH)	138
3.2.2	Postsynthetische Aminofunktionalisierung (MSN1_NH ₂ , MSN2_NH ₂ , MSN4_NH ₂)	138
3.2.3	PEI-Funktionalisierung (MSN_PEI)	138
3.2.4	Funktionalisierung mit Glucosederivaten.....	139
3.2.4.1	Simultane Fluoreszenzmarkierung und Glucosaminfunktionalisierung (MSN_COOH_GA).....	139
3.2.4.2	Glucosaminfunktionalisierung (MSN_COOH_GA1-3).....	139
3.2.4.3	Glucuronsäurefunktionalisierung (MSN1_GS, MSN2_GS, MSN4_GS, MSN_NH ₂ _GS1-3, MSN_PEI_GS1-3).....	139
3.2.5	Beladung des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT	140

3.3	Transport von kurzen Nukleotid-Sequenzen mittels MSN.....	140
3.3.1	Carboxyfunktionalisierung (MSN_COOH)	140
3.3.2	Postsynthetische Aminofunktionalisierung (SN_NH ₂ , MSNe_NH ₂).....	140
3.3.3	Bernsteinsäureanhydridfunktionalisierung (MSN_c1-c5)	141
3.3.4	Glucuronsäurefunktionalisierung	141
3.3.5	PEI Funktionalisierung	141
3.3.6	Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff	141
3.3.7	Beladung mit Oligonukleotiden.....	141
3.3.8	Freisetzung von Oligonukleotiden	142
4.	Charakterisierung mesoporöser Silikananopartikel.....	143
4.1	Dispersionsstabilität	143
4.2	Auflösungsversuche.....	143
4.3	Proteinadsorption.....	143
4.3.1	Proteinadsorption zur Analyse mittels SDS-PAGE	143
4.3.2	Proteinadsorption zur Analyse mittels STORM.....	144
5.	Biologische Evaluation	145
5.1	Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen ...	145
5.1.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen	145
5.2	Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten	145
5.2.1	Gezielter Medikamententransport in Brustkrebsstammzellen	145
5.3	Transport von kurzen Nukleotid-Sequenzen mittels MSN.....	145
5.3.1	Transport von miRNA in Hoxa9/Meis1-Zellen.....	145
VI.	Anhang.....	147
1.	Synthese von Silikananopartikeln.....	147
1.1	Synthese von MSN unterschiedlicher Form.....	147
1.1.1	Variation der Reaktionstemperatur.....	147
1.1.2	Einfluss der Zugabe von Ethylenglykol.....	148
2.	Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen	149
2.1	Partikelfunktionalisierung	149
2.2	Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen	150

2.3 Biokompatibilität und zelluläre Aufnahme	152
2.4 Stabilität in Serum und Einfluss auf die gezielte Aufnahme in B220-positive Leukämienstammzellen	153
2.5 Gezielter Medikamententransport	153
3. Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten	155
3.1 Synthese und Charakterisierung von MSN mit Glucosederivat-Funktionalisierung.....	155
3.1.1 MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen	155
3.1.2 Einfluss der Form auf die Proteinadsorption und Dispergierbarkeit	155
3.2 Gezielter Medikamententransport in Brustkrebsstammzellen	156
Literaturverzeichnis.....	157
Danksagung	168
Curriculum Vitae	170
Publikationen	171
Erklärung	173

Erläuterungen

- Hochgestellte arabische Zahlen in eckigen Klammern im Text verweisen auf das Literaturverzeichnis am Ende der Arbeit.
- Die folgenden Abkürzungen und Symbole wurden im Text, in den Abbildungen und den Tabellen verwendet:

Abkürzungen

a.u.	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
AF	<u>A</u> lexa <u>F</u> luor
ALDH	<u>A</u> ldehyd- <u>D</u> ehydrogenase
AML	<u>a</u> kute <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
anti-B220	Antikörper <i>anti-human/mouse CD45R (B220)</i>
anti-CD9	Antikörper <i>anti-human CD9</i>
APTES	(3- <u>A</u> minopropyl) <u>t</u> riethoxysilan
APTMS	(3- <u>A</u> minopropyl) <u>t</u> rimethoxysilan
AR	Längen-Breiten-Verhältnis (<i>aspect ratio</i>)
BA	<u>B</u> ernsteinsäure <u>a</u> nhydrid
Bcl2	B-Zellen-Lymphom 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
BET	Methode nach <u>B</u> runauer, <u>E</u> mmet und <u>T</u> eller
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare der DNA
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
C ₁₆ TAB	<u>C</u> etyl <u>t</u> rimethyl <u>a</u> mmonium <u>b</u> romid
C ₁₆ TAC	<u>C</u> etyl <u>t</u> rimethyl <u>a</u> mmonium <u>c</u> hlorid
CAM	<u>C</u> horion- <u>A</u> llantois- <u>M</u> embran
c ₀	Ausgangskonzentration
DAPT	<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5- <u>D</u> ifluorophen <u>a</u> cetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycin- <u>t</u> ert-butylester
Dauno	<u>D</u> aun <u>r</u> ubicin
DEPC	Diethyldicarbonat (<i>Diethylpyrocarbonat</i>)
DiR	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindotricarbocyaniniodid
DLS	<u>D</u> ynamische <u>L</u> icht <u>s</u> treuung
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>e</u> agle <u>m</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige <u>DNA</u> (<i>double-stranded</i>)

EDC	1- <u>E</u> thyl-3-(3- <u>d</u> imethylaminopropyl) <u>c</u> arbodiimid
EG	<u>E</u> thylenglykol
em	<u>E</u> mission
EPR	erhöhte <u>P</u> ermeabilität und <u>R</u> etention
exc	Anregung (<u>exc</u> itation)
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers (<u>fragment antigen binding</u>)
FACS	Durchflusszytometrie (<u>fluorescence activated cell sorting</u>)
FBS	fötales Rinderserum (<u>fetal bovine serum</u>)
Fc	<u>F</u> ragment <u>c</u> rystallizable
FCS	fötales Kälberserum (<u>fetal calf serum</u>)
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyanat
GA	<u>G</u> lucosamin
Gew. %	<u>G</u> ewichtsprozent
GFP	grün <u>f</u> luoreszierendes <u>P</u> rotein
GS	<u>G</u> lucuronsäure
HEPES	2-[4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-1- <u>p</u> iperazinyl]- <u>e</u> thansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<u>high performance liquid chromatography</u>)
HSA	<u>h</u> umanes <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
HSCs	hämatopoetische Stammzellen (<u>hematopoietic stem cells</u>)
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma (<u>inductively coupled plasma</u>)
IEP	<u>I</u> soelektrischer <u>P</u> unkt
IgG	<u>I</u> mmunoglobulin <u>G</u>
IgM	<u>I</u> mmunoglobulin <u>M</u>
IUPAC	<u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>P</u> ure and <u>A</u> ppplied <u>C</u> hemistry
LSCs	leukämische Stammzellen (<u>leukemic stem cells</u>)
MCM-41	<u>M</u> obil <u>C</u> omposition of <u>M</u> atter no. 41
MDR	Resistenz gegenüber Medikamenten (<u>multidrug resistance</u>)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<u>mean fluorescence intensity</u>)
min	<u>M</u> inute
miR-193a-3p	<u>mi</u> RNA (hsa-miR- <u>193a-3p</u>)
miR-ctr	Kontroll- <u>mi</u> RNA (CONmiR Negative <u>C</u> ontrol-N1)
miRNA	<u>micro RNA</u>
MRI	Magnetresonanztomographie (<u>magnetic resonance imaging</u>)
MSN	<u>mes</u> oporöse <u>S</u> ilika <u>n</u> anopartikel
NHS	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxysuccinimid
NL-DFT	<u>n</u> icht- <u>l</u> okale <u>D</u> ichtefunktion <u>a</u> therorie

OES	<u>optical emission spectrometry</u>
PAMAM	<u>Polyamidoamin</u>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<u>phosphate buffered saline</u>)
PDMAEMA	<u>Poly(2-dimethylaminoethylmethacrylat)</u>
PEG	<u>Polyethylenglycol</u>
PEI	<u>Polyethylenimin</u>
PET	<u>Positronen-Emissions-Tomographie</u>
Pgp	<u>P-Glycoprotein</u>
ps	<u>postsynthetisch</u>
PZC	<u>point of zero charge</u>
RES	<u>retikuloendotheliales System</u>
RGD	Tripeptidsequenz (Arginin (<u>R</u>) - Glycin (<u>G</u>) - Asparaginsäure (<u>D</u>))
RISC	<u>RNA-induced silencing complex</u>
RNA	Ribonukleinsäure (<u>ribonucleic acid</u>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<u>revolutions per minute</u>)
RT	<u>Raumtemperatur</u>
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (<u>small angle X-ray scattering</u>)
SBA-14	<u>Santa Barbara Amorphous no. 14</u>
SBF	simulierte Körperflüssigkeit (<u>simulated body fluid</u>)
SDA	<u>strukturdirigierendes Agens</u>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>sodium dodecyl sulfate</u>)
SDS-PAGE	<u>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</u>
siRNA	<u>small interfering RNA</u>
SN	(nichtporöse) <u>Silikananopartikel</u>
ssDNA	einsträngige <u>DNA</u> (<u>single-stranded</u>)
StAbw.	<u>Standardabweichung</u>
STORM	<u>Stochastic optical reconstruction microscopy</u>
TEM	<u>Transmissionselektronenmikroskopie</u>
TEOS	<u>Tetraethylorthosilikat</u>
TFP	<u>Tetrafluorophenyl-</u>
TG	<u>Thermogravimetrie</u>
TLCT	echter Flüssigkristall-Templat (<u>true liquid crystal templating</u>)
TMOS	<u>Tetramethylorthosilikat</u>
TOPO	<u>Trioctylphosphinoxid</u>
Tris	<u>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</u>
Ü	<u>Überstand</u>
UV	<u>Ultraviolettstrahlung</u>

VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>v</i> ascular <i>e</i> ndothelial <i>g</i> rowth <i>f</i> actor)
vis	Licht des sichtbaren (<i>v</i> isible) Bereiches
WW	<u>W</u> asch <u>w</u> asser
XRD	Röntgendiffraktometrie (<i>X</i> - <i>r</i> ay <i>d</i> iffraction)

Symbole

2D	zweidimensional
a	Gitterkonstante
A260	Absorption bei $\lambda = 260$ nm
d_{10}	Wiederholungseinheit
d_{DLS}	Partikeldurchmesser bestimmt durch DLS-Messungen
$d_{Pore, NL-DFT}$	Porendurchmesser bestimmt basierend auf der NL-DFT Theorie
$d_{Porenwand}$	Porenwanddicke
d_{TEM}	Partikeldurchmesser bestimmt aus TEM-Aufnahmen
γ_{SL}	Energie an der Grenzfläche fest-flüssig
h	Stunde
l_{TEM}	Partikellänge bestimmt aus TEM-Aufnahmen
O	Oberfläche
p/p_0	Relativdruck
q	Streuvektor
R	ideale Gaskonstante
r	Radius
r_n	negativer Radius
r_p	positiver Radius
S_0	Löslichkeit eines flachen Körpers der festen Phase
S_{BET}	spezifische Oberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller
T	Temperatur
t	Zeit
V_m	molares Volumen der festen Phase
ζ -Pot.	Zetapotential
Θ	Bragg-Winkel (XDR)
λ	Wellenlänge

Nomenklatur

MSN	<u>mesoporöse Silikananopartikel (MSN) ($\varnothing \sim 200$ nm)</u>
MSN_NH ₂	<u>aminofunktionalisierte MSN ($\varnothing \sim 200$ nm)</u>
MSN _e	<u>MSN mit erweiterten Poren</u>
MSN ₁	<u>MSN ($\varnothing \sim 100$ nm)</u>
MSN ₂	<u>stäbchenförmige MSN mit einem Längen-Breiten-Verhältnis (<i>aspect ratio</i> (AR)) von <u>2</u> ($\varnothing \sim 100$ nm; l ~ 200 nm)</u>
MSN ₄	<u>stäbchenförmige MSN mit AR<u>4</u> ($\varnothing \sim 100$ nm; l ~ 400 nm)</u>
SN	<u>nicht-poröse Silikananopartikel ($\varnothing \sim 200$ nm)</u>
MSN_c1-5	<u>MSN_NH₂, die mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid (4 (<u>c1</u>), 2 (<u>c2</u>), 0,4 (<u>c3</u>), 0,1 (<u>c4</u>) bzw. 0,02 (<u>c5</u>) mmol/g) funktionalisiert wurden</u>
MSN_COOH	<u>carboxyfunktionalisierte MSN ($\varnothing \sim 200$ nm)</u>
MSN_PEI	<u>Polyethylenimin-funktionalisierte MSN ($\varnothing \sim 200$ nm)</u>
MSN_NH ₂ _GS1-3	<u>MSN_NH₂, die mit Glucuronsäure funktionalisiert wurden (0,28 (<u>GS1</u>), 0,07 (<u>GS2</u>) bzw. 0,007 (<u>GS3</u>) mmol/g)</u>
MSN_PEI_GS1-3	<u>MSN_PEI, die mit Glucuronsäure funktionalisiert wurden (0,28 (<u>GS1</u>), 0,07 (<u>GS2</u>) bzw. 0,007 (<u>GS3</u>) mmol/g)</u>
MSN_COOH_GA1-3	<u>MSN_COOH, die mit Glucosamin funktionalisiert wurden (0,28 (<u>GA1</u>), 0,07 (<u>GA2</u>) bzw. 0,007 (<u>GA3</u>) mmol/g)</u>
...NH ₂	Partikel, die (postsynthetisch) <u>aminofunktionalisiert</u> wurden
...GS	aminofunktionalisierte Partikel, die mit <u>Glucuronsäure</u> funktionalisiert wurden (0,28 mmol/g)
MSN_c1-5-B220	<u>MSN_c1-5, die mit dem Antikörper <i>anti-human/mouse CD45R (B220)</i> funktionalisiert wurden</u>
MSN_c3-CD9	<u>MSN_c3, die mit dem Antikörper <i>anti-human CD9</i> funktionalisiert wurden</u>
..._D	Partikel, die mit Daunorubicin beladen wurden
..._miR-193-3p	Partikel, die mit CONmiR mimic (hsa-miR-193-3p) beladen wurden
..._miR-ctr	Partikel, die mit CONmiR NegativControl-N1 beladen wurden

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Übersicht über die Möglichkeiten der Modifizierung bzw. Beladung von MSN für biologische Zwecke. (Adaptiert von Lindén <i>et al.</i> ^[6] mit Genehmigung der <i>Royal Society of Chemistry</i> (http://dx.doi.org/10.1039/C0NR00156B)).....	1
Abbildung 2:	(A) Sauer oder (B) basisch katalysierte Hydrolyse und Kondensationsreaktion eines Alkoxysilans zur Bildung des Silikanetzwerkes. ^[13]	3
Abbildung 3:	Relative Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse und Kondensation von Silika-Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert. (Aus D. Schaefer „ <i>Polymers Fractals, and Ceramic Materials</i> “ <i>Science</i> 1989, 234, 1023-1027 mit freundlicher Genehmigung der AAAS & D. Schaefer) ^[16]	4
Abbildung 4:	Mechanismen, die für die Herstellung von mesoporösem Silika über das Endotemplatverfahren angenommen werden. (A) TLCT-Mechanismus und (B) kooperativer Mechanismus. (in Analogie zu Schubert und Hüsing ^[13]).....	5
Abbildung 5:	Löslichkeit von amorphem Silika in Abhängigkeit des pH-Wertes bei unterschiedlichen Temperaturen. (Wiederverwendet aus G. Okamoto, T. Okuram, K. Goto „ <i>Properties of silica in water</i> “ <i>Geochim. Cosmochim. Acta</i> 1957, 12, 123-132 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) ^[14,31]	8
Abbildung 6:	Einfluss der Proteinadsorption auf die Interaktion von funktionalisierten Nanopartikeln mit biologischen Systemen <i>in vitro</i> sowie <i>in vivo</i> . (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[10] , Copyright 2014, Wiley-VCH).....	11
Abbildung 7:	Zelluläre Aufnahme von Partikeln durch Einstülpung der Zellmembran. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung von <i>Macmillan Publishers Ltd: Nature Materials</i> 2009, 8, 543-557) ^[45]	15
Abbildung 8:	Biogenese und Mechanismus der RNA-Interferenz durch siRNA (A) und miRNA (B). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung von <i>Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology</i> 2003, 4, 457-467) ^[130]	23
Abbildung 9:	Schematische Übersicht der in dieser Arbeit für den Transport von miRNA und Wirkstoffmolekülen eingesetzten MSN-basierten Systeme.....	29
Abbildung 10:	TEM-Aufnahmen von sphärischen nichtporösen (SN), calcinierten (MSN), extrahierten (aminofunktionalisierten) (MSN-NH ₂) und porenerweiterten (MSNe) Silikananopartikel im Vergleich. Aufnahmen der Partikel (A) sowie von Ultradünnschnitten der Partikel (B).	30

Abbildung 11:	(A) Stickstoffsorptionsisothermen und (B) NL-DFT Porendurchmesser-Verteilung sphärischer Partikel ermittelt aus dem Desorptionszweig der Stickstoffsorptionsisothermen. Für die MSNe ist sowohl die Porendurchmesser-Verteilung des Desorptions- (des) als auch des Adsorptionszweiges (ads) dargestellt.	32
Abbildung 12:	Zetapotentialverteilung (A) und TG-Analyse (B) der extrahierten (MSN_NH ₂) im Vergleich zu den calcinierten Partikeln (MSN).	34
Abbildung 13:	Untersuchung der Größe und Morphologie (A) sowie der Porenstruktur (B) der Partikel MSN1, MSN2 und MSN4 mit AR von 1,1, 2,5 und 3,5 mittels TEM.	35
Abbildung 14:	Stickstoffsorptionsmessung (A), NL-DFT Porendurchmesser-Verteilung (B) und Röntgendiffraktometrie der calcinierten Partikel mit AR1, 2 und 4 im Vergleich.	37
Abbildung 15:	Analyse des Bildungsmechanismus von (A) MSN1 und (B) MSN2. Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit der Reaktionszeit bestimmt durch DLS-Messungen der verdünnten Syntheselösung. ^[171]	38
Abbildung 16:	Bildungsmechanismus der MSN1 (obere Reihe) und MSN2 (untere Reihe) analysiert mittels TEM der Reaktionslösung nach 1, 2, 3 und 5 min sowie Aufnahmen der MSN, die nach Abschluss der Reaktionszeit von 4 h aufgearbeitet und calciniert wurden. ^[171]	39
Abbildung 17:	Möglicher Bildungsmechanismus stäbchenförmiger Partikel durch die Zusammenlagerung zweier sphärischer Kugeln. (teilweise wiederverwendet aus C. J. Brinker, G. W. Scherer „ <i>Sol-Gel Science</i> “ <i>Academic Press Inc.</i> , New York, 1990, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) ^[15]	39
Abbildung 18:	Schematische Übersicht der bei der Agglomeration von mehr als zwei Partikeln resultierenden repulsiven Kräfte. (↔ repulsive Kräfte).....	40
Abbildung 19:	Einfluss der Temperatur auf die Morphologie der resultierenden Partikel analysiert mittels TEM.	41
Abbildung 20:	Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Porosität der Partikel. (A) Stickstoffsorptionsisotherme der Partikel, die bei 55 °C hergestellt wurden und (B) Strukturierung der Poren der Partikel die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen hergestellt wurden ermittelt durch Röntgendiffraktometrie.	42
Abbildung 21:	Einfluss von Ethylenglykol (0, 40, 50, 60, 80 und 100 g) auf die Synthese von stäbchenförmigen Partikeln. Die Partikelform wurde mittels TEM analysiert.	43

- Abbildung 22: Einfluss von Ethylenglykol auf die Porosität der Partikel. (A) Exemplarische Stickstoffsorption der Partikel, die mit 50 g Ethylenglykol hergestellt wurden. (B) Strukturierung der Poren der Partikel ermittelt durch Röntgendiffraktometrie. 45
- Abbildung 23: Schematische Übersicht der Funktionalisierung aminofunktionalisierter mesoporöser Silikanopartikel (MSN_{NH₂}) mit Bernsteinsäureanhydrid (MSN_{c1-5}) und folgender Modifizierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO 594) und/oder Antikörper (anti-B220 bzw. anti-CD9). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung^[56,177])..... 47
- Abbildung 24: (A) Verlauf des Zetapotentials in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) (Mittelwert ± St.Abw.) und des isoelektrischen Punkts sowie (B) thermogravimetrische Analyse (normiert auf 150 °C) in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)..... 48
- Abbildung 25: (A) Stickstoffsorptionsisotherme und (B) NL-DFT Porenradienverteilung der Partikel MSN_{NH₂} und MSN_{c3}.^[56]..... 49
- Abbildung 26: (A) Zeitabhängigkeit sowie (B) Konzentrationsabhängigkeit der Antikörperanbindung mit fluoreszenzmarkiertem anti-B220v450 bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$) (Mittelwert ± St.Abw.). 51
- Abbildung 27: Quantifizierung der an den Partikeln angebondenen Antikörper, bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$) (Mittelwert ± St.Abw.). (A) Vergleich der Anbindungseffizienz an Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert wurden und (B) Vergleich von kovalent angebondenem (mit EDC/NHS) und rein adsorptiv gebundenem Antikörper (ohne EDC/NHS) an MSN_{c3}. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society) 52
- Abbildung 28: (A) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{exc} = 590 \text{ nm}$) und (B) Fluoreszenzintensität sowie das relative Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen ATTO 594-markierten und anti-B220-funktionalisierten Partikel ($\lambda_{exc} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 626 \text{ nm}$). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society) 53
- Abbildung 29: Hydrolytische Stabilität der verschiedenen Partikel in DMEM mit 15 % FCS bei 37 °C bestimmt durch ICP-OES Analyse des Überstandes. (A) Auflösungsverhalten in Abhängigkeit der Zeit für MSN_{c3} mit und ohne

- anti-B220-Funktionalisierung sowie (B) TEM-Aufnahmen nach 24 h Inkubation in DMEM mit 15 % FCS. (C) Gelöste Konzentration an Silika-Spezies der verschiedenen Partikel nach 24 h. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56,176], Copyright 2017, American Chemical Society und Wiley-VCH)..... 54
- Abbildung 30: Bestimmung der Dispersionsstabilität in Medium mit 15 % FCS durch DLS-Messungen bei 37 °C und einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL. (A) Hydrodynamischer Durchmesser der MSN_c3 in Abhängigkeit der Zeit und (B) Übersicht der Partikelgröße der verschiedenen Partikel in Dispersion nach 24 h Inkubation. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)..... 56
- Abbildung 31: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona von Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten MSN_NH₂ (MSN_c1-5) nach Adsorptionsversuchen für 24 h bei 37 °C in PBS mit 15 % FCS. Gele der Auftrennung mittels SDS-PAGE von (A) Partikel ohne Antikörper und (B) Partikel mit anti-B220 Modifizierung in Abhängigkeit der Funktionalisierung. (je ein repräsentatives Gel aus drei) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)..... 57
- Abbildung 32: Bildliche Darstellung der Proteincorona von MSN_NH₂ mittels STORM nach 1 min Inkubation. Die Partikel wurden mit Alexa Fluor 488 (grün) und die BSA-Moleküle mit Cy5 (10 % BSA-Cy5 in Serum) (rot) fluoreszenzmarkiert. (A) Repräsentatives STORM-Bild und (B) vergrößerter Ausschnitt des weiß markierten Bereiches von A. (C) Die Rekonstruktion der Proteincorona von verschiedenen MSN_NH₂-Partikeln zeigt eine große Heterogenität der Menge an adsorbierten Proteinen auf (n_{BSA} = Anzahl an BSA-Molekülen auf der Oberfläche der einzelnen Partikel). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH) 58
- Abbildung 33: Kinetische Entwicklung der BSA-Proteincorona auf MSN_NH₂ bestimmt durch STORM nach 1 min, 15 min, 1 h und 12 h (1 mol% BSA-Cy5 in einer 10 mg/mL BSA Lösung). (A) Repräsentative Bilder der Proteincorona, (B) Verteilung der Anzahl an fluoreszenzmarkierten BSA-Moleküle pro Nanopartikel, (C) Partikelradienverteilung und (D) Größenverteilung der MSN_NH₂-Protein-Komplexe. (Mittelwerte ± St.Abw. für B, C und D sind angegeben) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)..... 59
- Abbildung 34: BSA-Adsorption (3 mol% BSA-Cy5 in einer 10 mg/mL BSA Lösung) auf MSN_NH₂ und anschließende Analyse mittels STORM mit (*hard corona*) und

- ohne (*hard* und *soft corona*) Aufarbeitungsschritt. (A) Rekonstruierte Bilder der BSA-Proteincorona, (B) Median der Anzahl an fluoreszenzmarkierten BSA-Molekülen pro Partikel und (C) Größe des Protein-Partikel-Komplexes. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH) 61
- Abbildung 35: BSA-Adsorption in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung auf MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 nach einstündiger Inkubation in einer BSA-Lösung (10 mg/mL; 1 mol% BSA-Cy5). (A) Repräsentative STORM-Bilder und (B) aus STORM-Bilder rekonstruierte BSA-Schicht auf den Partikeln. Zetapotentiale wurden in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) gemessen. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)..... 62
- Abbildung 36: Analyse der Proteinadsorption in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung auf MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 nach 1 min, 1 h und 12 h mittels STORM. (A) Verteilung der Anzahl an fluoreszenzmarkierten BSA-Molekülen pro Partikel und (B) zeitlicher Verlauf der Bildung der Proteincorona für MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 (Mittelwert ± Standardfehler). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH) 62
- Abbildung 37: Veränderung des Zetapotentials von MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 in HEPES-Puffer (pH 7,2, 25 mM) in Abhängigkeit der Inkubationszeit (Mittelwert ± St.Abw.). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)..... 63
- Abbildung 38: Untersuchung der Biokompatibilität von anti-B220-funktionalisierten Partikeln (MSN_c1-5-B220 und MSN_NH₂-B220) auf (A) CALM/AF10- und (B) BM3997-Zellen. Die relative Anzahl lebender Zellen wurde durch SytoxBlue-Färbung und anschließende FACS-Messung der Zellen, die mit Partikeln der Konzentration 10, 50 und 100 µg/mL für 24 h inkubiert wurden, bestimmt. (Mittelwert ± St.Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)..... 64
- Abbildung 39: Aufnahme der anti-B220-funktionalisierten Partikel (10 µg/mL) nach 4 (A und B) und 24 h (C und D) in B220-positiven CALM/AF10-Zellen und B220-negativen BM3997-Zellen. Anteil an ATTO 594 positiven Zellen (A und C) und normierte *mean fluorescence intensity* (MFI) (B und D) sowie das Verhältnis der Aufnahme in CALM/AF10- und BM3997-Zellen, welches als Maß für die erfolgreiche gezielte Aufnahme gilt. (Mittelwert ± St.Abw.)

	(Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56] , Copyright 2017, American Chemical Society)	65
Abbildung 40:	Zelluläre Aufnahme antikörperfunktionalisierter MSN_c3 in B220-positiven CALM/AF10-Zellen bestimmt durch FACS-Analyse. MSN_c3 funktionalisiert mit (●) anti-B220 und (▲) anti-CD9, als Negativkontrolle. (Mittelwert ± St.Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56] , Copyright 2017, American Chemical Society) ^[56]	67
Abbildung 41:	(A) Stabilität der Antikörper-MSN_c3 Konjugate (MSN_c3-B220-AF488) bestimmt durch STORM Mikroskopie in Abhängigkeit der Inkubationszeit in 100 % FBS (37 °C). (B) Analyse der BSA-Proteincorona nach 1 h Inkubation auf MSN_c3 mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung (10 % BSA-Cy5 in FBS). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176] , Copyright 2017, Wiley-VCH)	68
Abbildung 42:	Proteinadsorption in 100 %FCS auf MSN_c3-B220 in Abhängigkeit der Inkubationszeit bestimmt mittels SDS-PAGE. (ein repräsentatives Gel aus drei).....	69
Abbildung 43:	Aufnahme von MSN_c3-B220 versus MSN_c3-CD9, sowie das Verhältnis der Aufnahme von anti-B220 (spezifisch) zu anti-CD9 (nicht spezifisch) in CALM/AF10-Zellen. Prozentualer Anteil an ATTO 594-positiven Zellen (A, C) und MFI (B, D) nach 4 (A, B) bzw. 24 h (C, D). (Mittelwert ± St.Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176] , Copyright 2017, Wiley-VCH)	70
Abbildung 44:	UV/vis-spektroskopische Analyse der Ausgangslösung, des Überstandes sowie des Waschwassers der DiR Beladung auf MSN_c3 in Pentan. Anschließende zweistündige Inkubation in HEPES-Puffer bei RT (Überstand_HEPES) zeigt keine nennenswerte DiR-Freisetzung.....	73
Abbildung 45:	Zelluläre Aufnahme von DiR-beladenen und ATTO 594 modifizierten MSN_c3 ohne (A und B) und mit anti-B220 (C und D) bzw. anti-CD9 (E und F)-Funktionalisierung. Die relative Anzahl an ATTO 594- (A, C und E) sowie DiR-positiven (B, D und F) CALM/AF10- bzw. BM3997-Zellen wurde mittels FACS-Messung nach 24 h bestimmt. Das Verhältnis der Anzahl positiver CALM/AF10- versus BM3997-Zellen ist violett dargestellt (auf das Verhältnis an DiR-positiven Zellen für eine Konzentration von 10 µg/mL wurde aufgrund der hohen Werte (MSN_c3: 6,2; MSN_c3-B220: 110,5; MSN_c3-CD9: 50,3) verzichtet). (Mittelwert ± St.Abw.) ^[56]	74
Abbildung 46:	(A) Daunorubicin Beladung auf MSN_c3 in Dichlormethan in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Daunorubicin und Struktur von Daunorubicin. (B)	

	Freisetungsverhalten von anti-B220-funktionalisierten sowie Daunorubicin beladenen MSN_c3 in PBS (pH 7) bei 37 °C in Abhängigkeit des Beladungsgrades der Partikel.....	75
Abbildung 47:	Zytotoxizität Daunorubicin-beladener MSN_c3 mit anti-B220- und anti-CD9-Funktionalisierung im Vergleich. Die Anzahl toter Zellen in Abhängigkeit der (A) Partikelkonzentration sowie (B) der eingesetzten Daunorubicin-Menge wurde mittels <i>SytoxBlue</i> -Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt. (Daunorubicin-Beladungsgrad: MSN_c3-B220_D: 8,1 nmol/mg (4,3 µg/mg), MSN_c3-CD9_D: 6,0 nmol/mg (3,2 µg/mg)) (Mittelwert ± St.Abw.) (verändert nach ^[177]).....	77
Abbildung 48:	Zytotoxizität der MSN_c3-B220_D (Beladungsgrad: 8,9 nmol/mg (4,7 µg/mg)) auf <i>CALM/AF10</i> -Zellen vor und nach Blockierung der B220-Antigene mittels freiem anti-B220. Die Anzahl toter Zellen wurde durch <i>SytoxBlue</i> -Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt. (Mittelwert ± St.Abw.) (verändert nach ^[177]).....	78
Abbildung 49:	Überlebenskurve (Kaplan-Meier Kurve) der mit unterschiedlichen Partikeln behandelten <i>CALM/AF10</i> -Zellen transplantierten Mäuse. (Anzahl an Mäusen pro Behandlung (n)) (verändert nach ^[177]).....	80
Abbildung 50:	Schematische Übersicht der Synthese und Funktionalisierung von carboxy-, amino- und PEI-funktionalisierter MSN mit Glucosamin bzw. Glucuronsäure.	82
Abbildung 51:	Stickstoffsorptionsmessungen der Partikel, die mit Glucosederivaten funktionalisiert wurden ^[203] . (A) Amino- und Glucuronsäure-funktionalisierte, (B) Silika, PEI- und Glucuronsäure-funktionalisierte sowie (C) Silika, carboxy- und Glucosamin-funktionalisierte Partikel.....	83
Abbildung 52:	Thermogravimetrische Analyse der (A) MSN_NH ₂ , (B) MSN_PEI, (C) MSN_COOH, sowie der jeweiligen Glucosederivat-funktionalisierten MSN. Alle Partikel wurden mit 7 (GS3 bzw. GA3), 70 (GS2 bzw. GA2), 280 (GS1 bzw. GA1) µmol/g Glucuronsäure (GS) bzw. Glucosamin (GA) funktionalisiert. ^[203]	85
Abbildung 53:	Dispersionsstabilität der Glucosederivat-funktionalisierten MSN in DMEM + 10 % FCS bei 37 °C. (A) Messung des hydrodynamischen Radius über einen Zeitraum von 24 h der MSN_NH ₂ und MSN_NH ₂ _GS1 sowie (B) hydrodynamischer Radius der Partikel nach Inkubation in DMEM + 10 % FCS nach 24 h. ^[203]	85

Abbildung 54:	Proteincorona der Glucosederivat-funktionalisierten MSN, aufgetrennt durch SDS-PAGE nach 24-stündiger Inkubation in PBS + 10 % FCS bei 37 °C. (je ein repräsentatives Gel aus drei) ^[203]	86
Abbildung 55:	Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel mit unterschiedlichen AR (MSN1, MSN2 bzw. MSN4). Reine Silikapartikel, aminofunktionalisierte (NH ₂) und Glucuronsäure(GS)-funktionalisierte Partikel. ^[171]	89
Abbildung 56:	TG-Analyse der Silika, amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN mit Längen-Breiten-Verhältnissen von (A) 1,1, (B) 2,6 und (C) 3,4. ^[171]	91
Abbildung 57:	Untersuchung der Dispersionsstabilität von amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN1, MSN2 und MSN4 in DMEM + 10 % FCS bei 37 °C mittels DLS.	91
Abbildung 58:	Auftrennung der Proteincorona der MSN unterschiedlicher Länge mit und ohne Glucuronsäure-Funktionalisierung nach Inkubation in PBS + 10 % FCS für 24 h. (je ein repräsentatives Gel aus drei)	92
Abbildung 59:	(A) Zetapotentialmessungen und (B) TG-Analyse der Silikananopartikel (MSN) im Vergleich zu den carboxy- (MSN_COOH) und Glucosamin- (MSN_COOH_GA) funktionalisierten Partikeln. ^[152]	96
Abbildung 60:	Aufnahme der (A) PEI- und (B) carboxyfunktionalisierten Partikel mit und ohne Glucuronsäure- bzw. Glucosamin-Funktionalisierung in MDA-MB-231 Brustkrebszellen. (o. FF = ohne Fluoreszenzfarbstoff) (Mittelwert ± St.Abw.) (verändert nach ^[152])	97
Abbildung 61:	Aufnahme der (A) PEI- und (B) carboxyfunktionalisierten Partikel mit und ohne Glucosederivat-Funktionalisierung in MCF10 (gesunde Epithelzellen der Brust) und MDA-MB-231 (Brustkrebszellen). (Mittelwert ± St.Abw.)(verändert nach ^[152])	98
Abbildung 62:	Unterschiede in der zellulären Aufnahme verschiedener fluoreszenzmarkierter Partikel in Krebs- versus Krebsstammzellen. (A) Aufnahme von MSN-PEI mit und ohne Glucuronsäure-funktionalisierung und (B) von MSN_COOH_GA in MDA-MB231 sowie (C) MSN_COOH_GA in MCF-7 Krebs- und Krebsstammzellen. Krebsstammzellen wurden durch die ALDH1-Aktivität in FACS-Messungen identifiziert. (Mittelwert ± St.Abw.) (verändert nach ^[152])	99
Abbildung 63:	Aufnahme der MSN_COOH und MSN_COOH_GA in MDA-MB-231-Tumoren in weiblichen Mäusen <i>in vivo</i> . (A) Fluoreszenztomographie von je zwei Mäusen, die entweder mit ATTO 647N funktionalisierten MSN_COOH (oben) oder MSN_COOH_GA (unten) behandelt wurden (HG = Hintergrund). (B)	

	Quantifizierung des Fluoreszenzsignals der Mäuse. (Mittelwert \pm St.Abw.) (verändert nach ^[152])	99
Abbildung 64:	(A) ALDH-Aktivität von adhärenen und sphäroidischen MDA-MB-231 Zellen und Einfluss von freiem DAPT und DAPT-beladenen MSN auf die ALDH-Aktivität dieser Zellen. (B) Struktur des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT. (Mittelwert \pm St.Abw.)(verändert nach ^[152])	100
Abbildung 65:	Anzahl an Krebszellen (A und C) und Krebsstammzellen (B und D) pro mg Tumorgewebe in MDA-MB-231 Tumoren des CAM-Modells nach Behandlung mit freiem DAPT und DAPT-beladenen MSN unterschiedlicher Funktionalisierung. (Mittelwert \pm St.Abw.) (*p \leq 0,05) (verändert nach ^[152])	101
Abbildung 66:	Schematische Übersicht der Funktionalisierung von Silikananopartikeln zur Beladung mit kurzen Oligonukleotiden.	104
Abbildung 67:	(A) Stickstoffsorptionsisothermen und (B) Verteilung des NL-DFT-Porendurchmessers der aminofunktionalisierten Silikananopartikel mit unterschiedlichem Porendurchmesser ermittelt aus dem Desorptionszweig der Stickstoffsorptionsisothermen. Für die MSNe_NH ₂ ist sowohl die Porendurchmesser-Verteilung des Desorptions- (des) als auch des Adsorptionszweiges (ads) dargestellt.....	106
Abbildung 68:	Beladung (A) mesoporöser Silikananopartikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung und (B) aminofunktionalisierter Silikapartikel unterschiedlicher BET-Oberfläche mit kurzen DNA Strängen. (Mittelwert \pm St.Abw.)	107
Abbildung 69:	Beladung von (A) MSN_COOH und (B, C) MSN mit kurzen DNA-Strängen unter Zusatz des chaotropen Salzes Guanidin-Hydrochlorid in einer wässrigen ethanolischen Lösung. Die Partikel wurden mit (A, B) MilliQ- Wasser und (C) PBS gewaschen. Absorptionsspektren der Ausgangslösung (c0), des Überstandes und des Waschwassers zur Bestimmung des Beladungsgrades gemessen durch UV/vis-Spektroskopie.....	108
Abbildung 70:	Freisetzung kurzer DNA-Stränge von mesoporösen Silikananopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. Freisetzung in PBS (pH 7,4) und MilliQ-Wasser (pH 5) in Abhängigkeit (A) der Oberflächenfunktionalisierung und (B) des Zetapotentials in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2). (Mittelwert \pm St.Abw.)	111
Abbildung 71:	Freisetzung kurzer DNA-Stränge von aminofunktionalisierten Partikeln mit unterschiedlicher spezifischer Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes und des Beladungsgrades. Freisetzung von DNA-beladenen (A) nicht-porösen	

	aminofunktionalisierten Silikananopartikeln sowie von aminofunktionalisierten mesoporösen Silikananopartikeln mit durchschnittlichen Porengrößen von (B) 3 und (C) 5 nm. (D) Übersicht des Freisetzungsverhaltens der SN_NH ₂ , MSN_NH ₂ und MSNe_NH ₂ bei pH 7,4 in Abhängigkeit des Beladungsgrades. (Mittelwert ± St.Abw.)	112
Abbildung 72:	Beladung von miR-193a-3p (A) sowie miR-ctr auf MSN_NH ₂ in Wasser (pH 5). Absorptionsspektren der Ausgangslösung (c0), des Überstandes und des Waschwassers bestimmt durch UV/vis-Spektroskopie zur Bestimmung des Beladungsgrades.	115
Abbildung 73:	Zelluläre Aufnahme von aminofunktionalisierten MSN mit und ohne miRNA Beladung (miR-193a-3p bzw. miR-ctr) in Hoxa9/Meis1-Zellen nach 48 (A) und 72 h (B) Inkubation in Abhängigkeit der eingesetzten Partikelmenge.	116
Abbildung 74:	C-Kit-Expression in Hoxa9/Meis1-Zellen nach Behandlung mit 200 µg/mL MSN_NH ₂ mit und ohne Beladung von miR-193a-3p bzw. miR-ctr an Tag 5. C-Kit-Expression (A) der Gesamtpopulation sowie (B) der Teilpopulation der im FACS für die Partikelaufnahme (ATTO 594) positiven Zellen.	117
Abbildung 75:	Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel, die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen synthetisiert wurden.	147
Abbildung 76:	Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel, die mit 0, 40, 50, 60, 80 und 100 g an Ethylenglykol hergestellt wurden.	148
Abbildung 77:	Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid (0,02 (MSN_c5), 0,1 (MSN_c4), 0,4 (MSN_c3), 2 (MSN_c2) und 4 mmol (MSN_c1) /g MSN_NH ₂) funktionalisiert wurden.	149
Abbildung 78:	Zetapotentialtitrationen der Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten Partikel (B) mit und (A) ohne anti-B220-Funktionalisierung. ^[56]	149
Abbildung 79:	Untersuchung der Auflösungskinetik von MSN_NH ₂ welche mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid (MSN_c1-5) funktionalisiert wurden. Partikel (A) ohne und (B) mit anti-B220-Funktionalisierung wurden in DMEM mit 15 % FCS inkubiert und resultierende Siliziumkonzentration im Überstand mittels ICP-OES bestimmt. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56,176] , Copyright 2017, American Chemical Society und Wiley-VCH)	150
Abbildung 80:	Untersuchung der Dispersionsstabilität von Bernsteinsäureanhydrid-modifizierten Partikeln mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung. Der hydrodynamische Durchmesser wurde in DMEM mit 15 % FCS über einen Zeitraum von 24 h bestimmt.	

	(Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56] , Copyright 2017, American Chemical Society)	151
Abbildung 81:	Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$) der Alexa Fluor 488-funktionalisierten (A) MSN_NH ₂ , (B) MSN_c3 und (C) MSN_c1 bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie.	151
Abbildung 82:	Färbung der CD9- und B220-Epitope auf murinen <i>CALM/AF10</i> -Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (<i>anti-human/mouse CD45 R (B220) PE</i> bzw. <i>anti-human CD9 PE</i>) und anschließende FACS-Analyse. ^[177]	152
Abbildung 83:	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-B220-AF488) funktionalisierten MSN_c3 ($\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$).	153
Abbildung 84:	Blockierung des B220-Antigens auf <i>CALM/AF10</i> -Zellen mit freiem anti-B220 für 4 h und anschließende Bestimmung der freien Epitope mit dem fluoreszenzmarkierten anti-B220 (<i>anti-human/mouse CD45 R (B220) PE</i>). ^[177]	153
Abbildung 85:	Hydrodynamischer Durchmesser der MSN_COOH und MSN_COOH_GA1 sowie der MSN_PEI und MSN_PEI_GS1 in DMEM mit 10 % FCS in Abhängigkeit der Inkubationszeit. ^[203]	155
Abbildung 86:	Hydrodynamischer Durchmesser stäbchenförmiger amino- und Glucuronsäure-funktionalisierter MSN mit AR von 1,1 und 3,4 in DMEM mit 10 %FCS.	155
Abbildung 87:	Emissionsspektren der ATTO 647N-funktionalisierten MSN_COOH und MSN_COOH_GA bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie ($\lambda_{exc} = 644 \text{ nm}$). ^[152]	156
Abbildung 88:	Aufnahme von fluoreszenzmarkierter Deoxyglucose (2NBDG) in Brustkrebszellen (adhärente Platte) und Brustkrebsstammzell-Sphäroiden (sphäroide Platte) der Zelllinien (A) MDA-MB-231 und (B) MCF-7, bestimmt mittels FACS. (repräsentativer Graph von einem aus drei Experimenten). (verändert nach ^[152])	156

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Charakterisierungsergebnisse aus TEM, DLS- und Stickstoffsorptionsmessungen sphärischer Silikananopartikel (Mittelwert \pm Standardabweichung (St.Abw.)). DLS und Zetapotentialmessungen wurden in 1 mM KCl (pH 5) durchgeführt. (#Ergebnisse der Proben SN und MSNe bestimmt durch Vermessung von Einzelproben).....	31
Tabelle 2:	Netzebenenabstand (d_{10}), Gitterkonstante (a) und Porenwanddicke der MSN1, MSN2 und MSN4 kalkuliert basierend auf XRD-Messungen.....	36
Tabelle 3:	Charakterisierungsübersicht der Partikel MSN1, MSN2 und MSN4 mit unterschiedlichem AR (Mittelwert \pm St.Abw.). Zetapotential und DLS wurden in 1 mM KCl (pH 5) vermessen.....	37
Tabelle 4:	Exemplarische Ergebnisse der Stickstoffsorptionsmessungen, Röntgendiffraktometrie und TEM-Messungen der Partikel, die bei Temperaturen von 12-80 °C hergestellt wurden.	42
Tabelle 5:	Exemplarische Ergebnisse der Stickstoffsorptionsmessungen, Röntgendiffraktometrie und TEM-Messungen der Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Ethylenglykol hergestellt wurden.	44
Tabelle 6:	Charakterisierungsergebnisse aus DLS und Stickstoffsorptionsmessungen der Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen Bernsteinsäureanhydrid (BA) funktionalisiert wurden (Mittelwert \pm St.Abw.). DLS und Zetapotentialmessungen wurden für Partikel ohne Antikörperfunktionalisierung in 1 mM KCl (pH 5) (*) und HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) (**) sowie für anti-B220 funktionalisierte Partikel in DMEM mit 15 % FCS (***) durchgeführt. IEP der Partikel wurden durch Zetapotentialtitrationen bestimmt. ^[56,177]	50
Tabelle 7:	Beladungsgrade von Daunorubicin-beladenen MSN_c3 vor und nach der anti-B220-Funktionalisierung in Abhängigkeit des Beladungsgrades. (*Partikel mit diesen Beladungsgraden wurden aufgrund desselben Beladungsgrades nach der der anti-B220-Funktionalisierung wie die Partikel mit anfänglichen 11 Gew.% nicht für Freisetzungsuntersuchungen verwendet.)	76
Tabelle 8:	Charakterisierungsergebnisse der Stickstoffsorptions-, DLS- und Zetapotentialmessungen der Glucosederivat-funktionalisierten MSN in Abhängigkeit der eingesetzten Mengen an Glucuronsäure bzw. Glucosamin (Mittelwert \pm St.Abw.). DLS- und Zetapotential-Messungen wurden in 1 mM KCl (pH 5) durchgeführt. ^[203]	84

Tabelle 9:	Charakterisierungsdaten aus DLS- und Stickstoffsorptionsmessungen der Glucosederivat-funktionalisierten MSN unterschiedlicher Länge (Mittelwert \pm St.Abw.). DLS und Zetapotential wurden in 1 mM KCl (pH 5) gemessen. ^[171]	90
Tabelle 10:	Übersicht über die TEM-, DLS-Messungen und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Glucuronsäure- und Glucosamin-funktionalisierten Partikel sowie die Menge an DAPT auf den Partikeln, bestimmt durch HPLC-Messungen ($\lambda = 222$ nm). (**gemessen in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM); ^a Charakterisierungsdaten dieser Proben (d_{DLS} , Zetapotential, Menge an DAPT [Gew.%], Fluoreszenzintensität übernommen aus ^[26,152] ; ^b FITC, $\lambda_{exc} = 492$ nm , $\lambda_{em} = 520$ nm (1 mg/mL in HEPES); ^c ATTO 647N, $\lambda_{exc} = 644$ nm , $\lambda_{em} = 664$ nm (1 mg/mL in Ethanol))	95
Tabelle 11:	Charakterisierungsdaten unterschiedlich funktionalisierter Silikananopartikel aus DLS-, Zetapotential- sowie Stickstoffsorptionsmessungen (Mittelwert \pm St.Abw.). Hydrodynamischer Durchmesser und Zetapotential (*) wurden in 1 mM KCl (pH 5) und Zetapotential (**) in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) gemessen. (#Ergebnisse der Proben SN _{NH₂} und MSNe _{NH₂} bestimmt durch Vermessung von Einzelproben).....	105
Tabelle 12:	Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.	127
Tabelle 13:	Übersicht der verwendeten Chemikalien.	127
Tabelle 14:	Eingesetzte Mengen an C ₁₆ TAB, TEOS und Ethylenglykol für die Synthese von Partikel mit unterschiedlichen Längen-Breiten-Verhältnissen.....	134
Tabelle 15:	Mengen an Bernsteinsäureanhydrid, die zur Funktionalisierung der Partikel verwendet wurden.	135
Tabelle 16:	Eingesetzte Mengen an Glucosamin-Hydrochlorid zur Funktionalisierung von MSN _{COOH}	139
Tabelle 17:	Glucuronsäuremengen, die zur Funktionalisierung der amino- und PEI-funktionalisierten Partikel eingesetzt wurden.	140
Tabelle 18:	Beladungsgrade, Partikelkonzentrationen und die Menge an Daunorubicin der Partikel, welche für die Behandlung der CALM/AF10-Zellen <i>in vitro</i> und anschließende intravenöse Injektion in Mäuse verwendet wurden. ^[177]	154

I. Einleitung

1. Nanopartikel in biologischen Anwendungen

Das wissenschaftliche Interesse an Nanomaterialien ist aufgrund des großen Potentials für biologische bzw. medizinische Anwendungen in den letzten zwei Jahrzehnten enorm angestiegen.^[1] Nanopartikel sind ideale Transportsysteme für Medikamente, Kontrastmittel, Oligonukleotide, Impfstoffe, usw., im Bereich der Prävention, Therapie und Diagnose von zahlreichen Krankheiten.^[1–5] Die Beladung dieser Partikel mit Medikamenten, Oligonukleotiden, MRI- oder PET-aktiven Substanzen sowie die Anbringung von Liganden zur gezielten Aufnahme in bestimmte Zellen eröffnet neue Therapie- und Diagnose-Ansätze. Im Vergleich zu herkömmlichen Anwendungen von Medikamenten können hierdurch Nebenwirkungen vermindert, Wirkstoffmengen herabgesenkt und die Administration von Medikamenten erleichtert werden.^[6]

In der Literatur wird von der Verwendung zahlreicher verschiedener organischer sowie anorganischer Nanopartikel mit deutlich unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften berichtet. Unter anderem finden Proteine, Liposomen, viralbasierte Nanopartikel, polymerbasierte Nanopartikel (Mizellen, Dendrimere), Kohlenstoff-Nanoröhrchen, Fullerene, Metalloxide (Titandioxid, Zinkoxid, Eisenoxid, Aluminiumoxid, Silika) sowie *Quantum Dots* Anwendung.^[7–11]

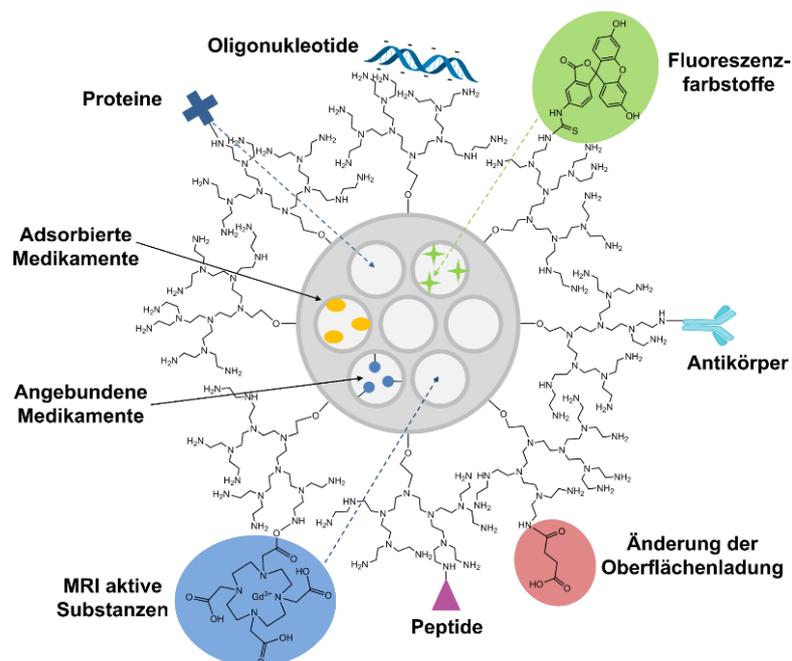


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Möglichkeiten der Modifizierung bzw. Beladung von MSN für biologische Zwecke. (Adaptiert von Lindén *et al.*^[6] mit Genehmigung der *Royal Society of Chemistry* (<http://dx.doi.org/10.1039/C0NR00156B>))

Anorganische Nanopartikel weisen eine deutlich höhere mechanische Stabilität im Vergleich zu Polymer- oder Protein-basierten Nanopartikeln auf. Werden Poren in diese Materialien eingebracht, stellen sie ideale Trägerstoffe für Medikamente, Oligonukleotide oder Kontrastmittel dar. Vor allem die mesoporösen Silikananopartikel (MSN) sind hier aufgrund ihrer einzigartigen und vielfältigen Eigenschaften, wie hohen spezifischen Oberflächen, einfach realisierbaren Oberflächenfunktionalisierungen mit hoher Variabilität, unterschiedlich einstellbaren Partikelgrößen und -morphologien sowie anpassbaren Porengrößen, von großem Interesse. Zudem weist dieses Material eine hohe Biokompatibilität und mechanische sowie hydrolytische Stabilität für den Transport in die Zelle auf. Der Körper ist dennoch in der Lage das Silika auf lange Sicht abzubauen und auszuscheiden, was die Voraussetzung für den Einsatz in biologischen Systemen darstellt.^[1,12] Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick der Möglichkeiten zur Funktionalisierung und Beladung von MSN.^[6]

2. Mesoporöse Silikananopartikel

2.1 Herstellung von mesoporösen Silikananopartikeln

Die Herstellung von Silika-basierten Materialien mit kontrollierter Morphologie und Struktur erfolgt hauptsächlich über den Sol-Gel-Prozess. Im Allgemeinen versteht man unter dem Sol-Gel-Prozess die Entstehung eines oxidischen Netzwerkes durch stetige Polykondensation eines Präkursors in wässriger Lösung.^[13]

Dieser Vorgang verläuft gemäß Iller nach einem dreistufigen Prozess. Im ersten Schritt kommt es durch Polymerisation der vorhydrolysierten Monomere zur Partikelbildung, gefolgt vom zweiten Schritt, dem Partikelwachstum. Die Verknüpfung dieser Partikel zu einem dreidimensionalen Netzwerk bzw. Gel wird als dritter Schritt bezeichnet.^[14]

Für Materialien auf Silika-Basis werden für diesen Prozess meist Alkoxysilane wie Tetramethylorthosilikat (TMOS) oder Tetraethylorthosilikat (TEOS) eingesetzt. Die Ausbildung des Netzwerkes erfolgt entweder durch sauer oder basisch katalysierte Hydrolyse und Kondensationsreaktionen. Da der *point of zero charge* (PZC), der pH-Wert an dem die Spezies ungeladen vorliegt, für Silika je nach Kondensationsgrad bei pH 2-3 liegt, spricht man bei pH-Werten unterhalb des PZC von einer sauer katalysierten und bei pH-Werten oberhalb des PZC von einer basisch katalysierten Reaktion.^[13,15]

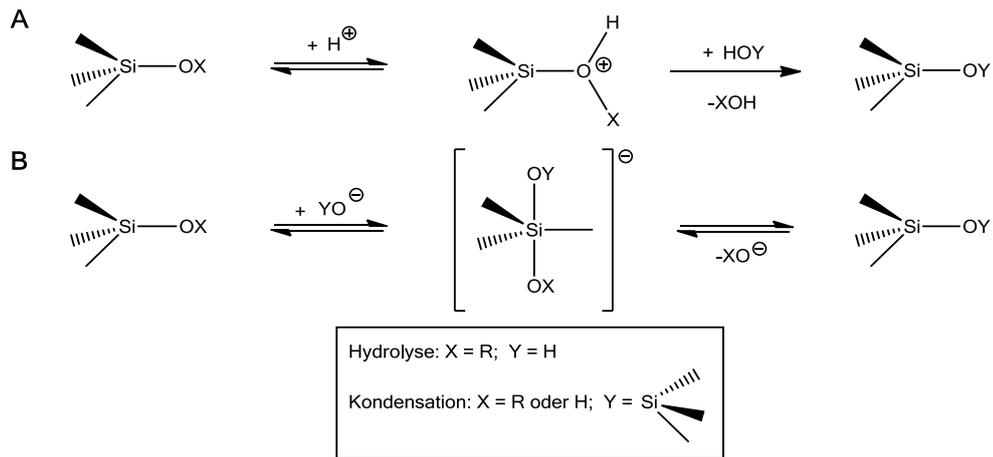


Abbildung 2: (A) Sauer oder (B) basisch katalysierte Hydrolyse und Kondensationsreaktion eines Alkoxysilans zur Bildung des Silikanetzwerkes.^[13]

Im Säuren (pH < 2) findet die Generierung einer guten Abgangsgruppe durch die Protonierung der Alkoxy- bzw. Hydroxygruppe der Silika-Spezies statt. Dadurch vermindert sich die Elektronendichte am Si-Atom und es kommt zu einem nukleophilen Angriff von Wasser (Hydrolyse) bzw. der Silanolgruppe (Kondensation) (vgl. Abbildung 2 A). Die basische Katalyse (pH > 3) läuft über einen S_N2-Mechanismus ab (vgl. Abbildung 2 B). Hierbei kommt es zu einem nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe (Hydrolyse) bzw. SiO⁻-Spezies (Kondensation) am Siliziumatom unter Bildung eines fünffach koordinierten Übergangszustandes und anschließender Abspaltung von Wasser bzw. Alkohol.^[13,15]

Der pH-Wert hat zudem einen großen Einfluss auf die relative Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse sowie Kondensationsreaktion (vgl. Abbildung 3). Die Kondensationsgeschwindigkeit hat ihr Minimum bei einem pH-Wert von 2-3, welcher dem isoelektrischen Punkt von Silika entspricht. Für die Hydrolyse findet sich das Minimum der Reaktionsgeschwindigkeit hingegen bei pH 7.^[13,15]

Im Bereich von pH < 5 ist die Hydrolysereaktion begünstigt und die Kondensation stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Des Weiteren kommt es, bedingt durch induktive Effekte (+I) der Substituenten (-OR > -OH > -OSi), bevorzugt zur Reaktion an terminalen Siliziumatomen. Dadurch entstehen im Säuren eher polymerartige Netzwerke mit geringem Kondensationsgrad. Bei pH-Werten über pH 5 hingegen werden hydrolysierte Spezies umgehend in das Netzwerk eingebaut, da die Hydrolyse hier den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt. Dabei ist die Reaktion an zentralen hochkondensierten Siliziumatomen begünstigt, was zur Bildung von kompakten, partikulären Netzwerken führt.^[13,15]

Die resultierende Partikelgröße wird im Laufe der Synthese durch Ostwald-Reifung bestimmt, welche die Bildung von größeren Partikeln durch Auflösung kleinerer Partikel beschreibt. Da die Löslichkeit von Silika oberhalb von pH 7 deutlich ansteigt, kommt es im Alkalischen zur Bildung von größeren Partikeln als im Sauren.^[13,15]

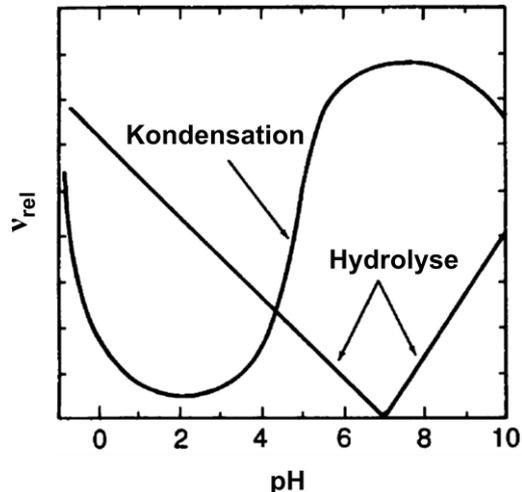


Abbildung 3: Relative Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse und Kondensation von Silika-Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert. (Aus D. Schaefer „*Polymers Fractals, and Ceramic Materials*“ *Science* **1989**, 234, 1023-1027 mit freundlicher Genehmigung der AAAS & D. Schaefer)^[16]

Durch die Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit dem Endotemplatverfahren lassen sich mesoporöse Silika-basierte Materialien unter relativ milden Bedingungen herstellen. Das Endotemplatverfahren beschreibt die Ausbildung eines Festkörpers um ein Templat. Nach der Entfernung des Templates wird ein poröser Festkörper erhalten.^[17]

Für die Synthese von mesoporösem Silika werden hauptsächlich Tenside als Template bzw. strukturdirigierende Agenzien (SDA) eingesetzt. Die Entfernung des Tensids erfolgt hierbei meist durch Calcinierung oder Extraktion.^[13,18]

Je nach Konzentration des eingesetzten Tensids wurden zwei unterschiedliche Grenzmechanismen postuliert. Bei höheren Tensidkonzentrationen kommt es zur Ausbildung einer flüssigkristallinen Phase und die Templatierung wird durch den echten Flüssigkristall-Templat (TLCT - *true liquid cristal templating*) - Mechanismus beschrieben. Bei geringen Tensidkonzentrationen hingegen, werden die Vorgänge eher durch den kooperativen Mechanismus beschrieben.^[13,18]

Beim TLCT-Mechanismus kommt es aufgrund der hohen Tensidkonzentrationen zur Ausbildung einer lyotropen flüssigkristallinen Phase, um die sich in einem zweiten Schritt das Silikanetzwerk durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktion ausbildet (vgl. Abbildung 4 A). Der kooperative Mechanismus hingegen beschreibt die Wechselwirkung der Tensidmoleküle

mit den vorliegenden Silika-Spezies und der dadurch resultierenden Ausbildung einer flüssigkristallinen Phase (vgl. Abbildung 4 B).^[13,18]

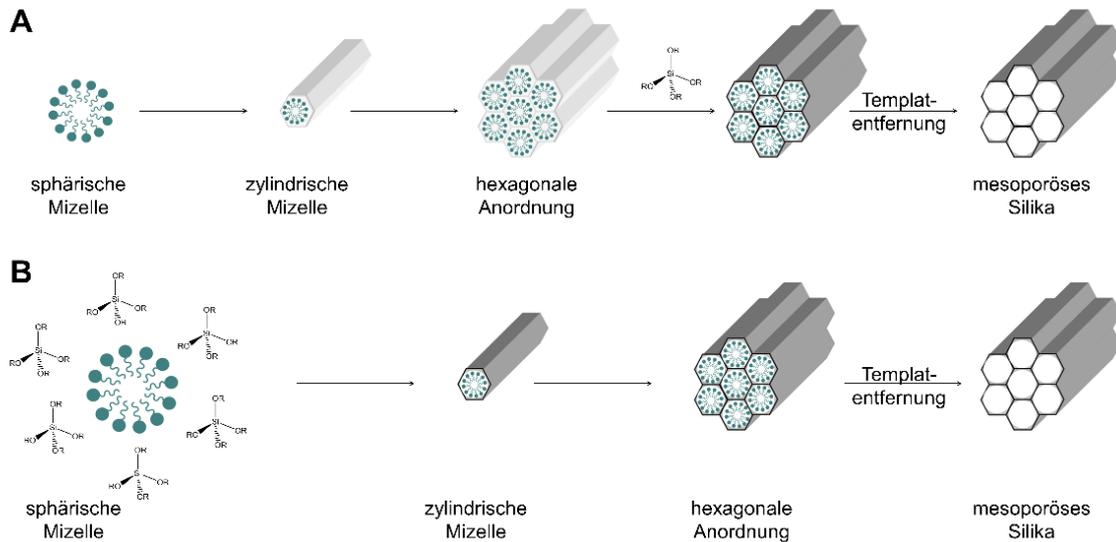


Abbildung 4: Mechanismen, die für die Herstellung von mesoporösem Silika über das Endotemplatverfahren angenommen werden. (A) TLCT-Mechanismus und (B) kooperativer Mechanismus. (in Analogie zu Schubert und Hüsing^[13])

Für den Verlauf der Templatierung ist die Wechselwirkung zwischen Templat und entstehendem Material von Bedeutung. Deshalb werden für die Templatierung von Silika-basierten Materialien je nach pH-Wert unterschiedliche Tenside eingesetzt.^[18] Unter basischen Bedingungen liegen die Silika-Spezies negativ geladen vor (S^-), weshalb sich hier der Einsatz von kationischen Tensiden (I^+) wie z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid ($C_{16}TAB$) eignet (S^+I^+). Im Sauren hingegen sind die Silika-Spezies positiv geladen (S^+) und die Verwendung von anionischen Tensiden (I^-) wie Natriumdodecylsulfat (SDS) wird bevorzugt (S^+I^-). Im pH-Bereich des PZC von Silika (pH ~ 2-3) (S^0) werden hauptsächlich nicht-ionische Tenside (S^0), beispielsweise Blockcopolymere wie Pluronic® P123, verwendet (S^0I^0). Der Einsatz von kationischen Tensiden im Sauren bzw. anionischen Tensiden im Basischen kann über die Gegenion-vermittelte-Wechselwirkung erklärt werden. Hierbei kommt es durch den „vermittelnden“ Einsatz von Alkalimetallionen (M^+) oder Halogenen (X^-) zur Wechselwirkung der negativ bzw. positiv geladenen Silika-Spezies mit dem negativ bzw. positiv geladenen Tensid ($S^-M^+I^-$ bzw. $S^+X^-I^+$).^[13,18,19]

2.2 Funktionalisierung von Silika-basierten Materialien

Da es sich bei Silika um ein chemisch relativ inertes Material handelt, eröffnet die Funktionalisierung mit organischen Gruppen die Zugänglichkeit des Materials für viele Anwendungen. Vor allem im Bereich der Katalyse, Chromatographie oder als Trägermaterial für biologische Systeme stellt die Modifizierung des Silika-Grundgerüsts die Grundlage für zahlreiche Möglichkeiten dar.^[20–23] Hierbei ist die Kombination des thermisch und mechanisch stabilen Grundgerüsts mit der Variabilität und Flexibilität von organischen Gruppen ein entscheidender Vorteil.^[18]

Die Vielzahl an Funktionalisierungsmöglichkeiten, beispielsweise durch Amino-, Carboxy-, Alkyl- oder aromatische Gruppen, ermöglicht eine genaue Anpassung an die geforderten Eigenschaften des entstehenden Materials, wie zum Beispiel die Interaktion mit einem gewünschten Medikament oder die Anbindung eines Liganden zur gezielten Aufnahme in bestimmte Zellen.^[18,24]

Die Funktionalisierung von Silika erfolgt hauptsächlich über zwei prinzipielle Vorgehensweisen. Zum einen können bereits während der Synthese durch die Verwendung von Organoalkoxysilanen über die sogenannte Co-Kondensation *in situ* Funktionalitäten in das Silikanetzwerk eingebracht werden. Dieses Herstellungsverfahren beruht auf der simultanen Verwendung von Tetraalkoxysilanen mit Organoalkoxysilanen während der Synthese. Die Verwendung von Vorstufen mit ähnlicher Hydrolyse- und Kondensationsgeschwindigkeit resultiert meist in einer homogenen Verteilung der organischen Gruppen im gesamten Material. Jedoch kommt es zum Einschluss einer Vielzahl an Funktionalitäten im Netzwerk, was die Zugänglichkeit dieser Gruppen vermindert. Die fehlenden Verknüpfungsstellen der Organoalkoxysilane können zum Einbruch der Strukturierung des resultierenden Materials führen. Dies bedingt die Limitation des Beladungsgrades der so funktionalisierten Materialien, da mit einem steigenden Verhältnis von Organoalkoxysilanen zu Tetraalkoxysilanen die Wahrscheinlichkeit des Strukturverlustes zunimmt. Außerdem haben die Eigenschaften der einzubringenden Reste, wie z.B. die Basizität von Aminofunktionen, aufgrund der katalytischen Wirkung einen großen Einfluss auf die Struktur des resultierenden Netzwerkes. Die Entfernung des SDA sollte unter Erhalt der organischen Funktion durchgeführt werden, was durch Extraktion, nicht aber durch Calcinierung realisiert werden kann.^[13,15,18,25]

Zum anderen kann das bereits bestehende Silikanetzwerk nach der Synthese durch die postsynthetische Funktionalisierung modifiziert werden. Die Einbringung der organischen Funktionen erfolgt hierbei in den meisten Fällen durch die Verwendung von Organoalkoxysilanen, in seltenen Fällen auch durch Chlorsilane oder Silazane.^[18]

Ein Vorteil dieser Methode ist es, dass das Silikanetzwerk in seiner Struktur weitestgehend erhalten bleibt. Jedoch kommt es diffusionsbedingt vermehrt zur Kondensation an den Poreneingängen, was zur inhomogenen Verteilung der organischen Funktionen auf der Partikeloberfläche und zur Verminderung bis hin zum Verlust der Porosität führen kann. Die maximale Größe des einzubringenden Restes wird in diesem Fall durch die Porengröße des Netzwerkes limitiert.^[13,15,18]

Anstelle der Organoalkoxysilane können auch hochreaktive Monomere, wie Ethylenimin, verwendet werden, bei denen es durch Polymerisation auf der Oberfläche zu einer Polymerschicht auf den Partikeln kommt. Auch die Anbringung von Zuckern oder Biomolekülen (Antikörpern, Enzymen, Peptiden, ...) wird meist auf diesem Weg realisiert.^[26-28]

3. MSN unter biologisch relevanten Bedingungen

Die Stabilität der Partikel unter biologisch relevanten Bedingungen ist sehr wichtig, da sie die Eigenschaften der Partikel im jeweiligen Anwendungsbereich bestimmen. Unter biologischen Bedingungen spielen die hydrolytische Stabilität der Partikel, die Stabilität von Partikeldispersionen sowie die Proteinadsorption auf der Oberfläche eine große Rolle. Im Folgenden werden die Einflüsse der einzelnen Parameter und deren Auswirkungen auf das Partikelsystem beschrieben.

3.1 Hydrolytische Stabilität

Die Partikel werden häufig als Trägermaterialien für Medikamente oder Kontrastmittel eingesetzt, die unter anderem auch Liganden für die gezielte Aufnahme auf der Partikeloberfläche tragen. Die hydrolytische Stabilität sollte insoweit gegeben sein, dass die Partikel intakt und ohne große Verluste des Medikaments bzw. Kontrastmittels sowie der Liganden an den jeweiligen Wirkungsort gelangen können.^[6]

Die Löslichkeit von amorphem Silika hängt unter anderem von der Temperatur, dem pH-Wert, der Salzkonzentration, der Silikakonzentration sowie dem Druck ab. In Abbildung 5 ist die Abhängigkeit der Löslichkeit von amorphem Silika bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Es ist klar erkennbar, dass die Löslichkeit oberhalb eines pH-Wertes von 7 deutlich ansteigt, was aus dem Anstieg der relativen Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber der Kondensationsgeschwindigkeit im Alkalischen resultiert (vgl. Abbildung 3, Abschnitt I.2.1). Mit zunehmender Temperatur steigt auch die Löslichkeit. Die Anwesenheit von Salzen hingegen

führt zur Abnahme der Löslichkeit, die in ihrer Stärke vom jeweiligen Salz und dessen Konzentration abhängt.^[14,29,30]

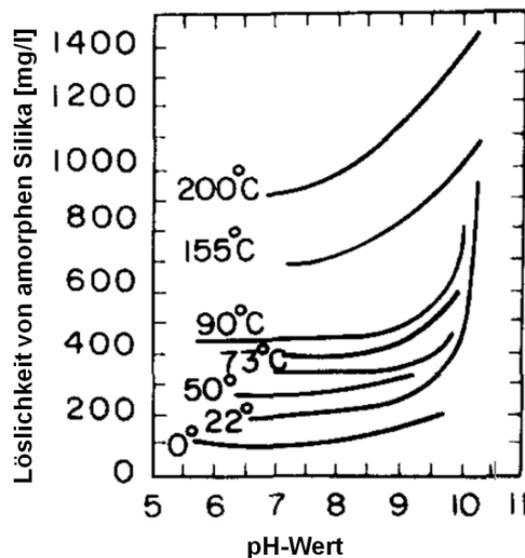


Abbildung 5: Löslichkeit von amorphem Silika in Abhängigkeit des pH-Wertes bei unterschiedlichen Temperaturen. (Wiederverwendet aus G. Okamoto, T. Okuram, K. Goto „*Properties of silica in water*“ *Geochim. Cosmochim. Acta* **1957**, 12, 123-132 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)^[14,31]

Die Auflösung von Silikananopartikeln wurde von Vogelsberger *et al.*^[32] untersucht. Es wird beschrieben, dass es zu einem schnellen initialen Anstieg der Silikakonzentration in der Lösung kommt, die die Sättigungsgrenze von 120 ppm (25 °C, pH 7,6) durch das schnelle Ablösen von Monomeren kurzzeitig überschreitet. Durch anschließende Wiederanlagerung der Monomere durch Kondensationsreaktionen sinkt die Silikakonzentration auf das Sättigungsniveau ab. Dieser Vorgang entspricht der Ostwaldreifung.^[32]

Für mesoporöse Silikananopartikel kommt es aufgrund des höheren Oberflächen zu Volumen-Verhältnisses zur schnelleren Auflösung im Vergleich zu nichtporösen Partikeln. Dies konnte von der Gruppe um Lindén^[33] durch Analyse des Auflösungsverhaltens von nicht- und mesoporösen Partikeln gleicher Größe in PBS-Puffer sowie simulierter Körperflüssigkeit (SBF - *simulated body fluid*) nachgewiesen werden.^[33] Die Arbeit von He *et al.*^[34] verdeutlicht zudem, dass mit steigender spezifischer Oberfläche die Auflösung von mesoporösen Silikananopartikeln in SBF beschleunigt wird. Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass es zum Einbruch der hexagonalen Porenstruktur nach 24 h Inkubation in SBF kam, einhergehend mit der (partiellen) Zerstörung der Porenwände. Die sphärische Morphologie der Partikel blieb auch nach der Inkubation erhalten, was zum Schluss führt, dass es zu einer Restrukturierung der Partikel kommt. Das in den Poren gelöste Silika lagert sich an der äußeren Oberfläche der Partikel wieder ab.^[6,34]

Trotz dieser umfangreichen Studien ist es nicht möglich, die Ergebnisse aus „statischen“ *ex vivo* Experimenten exakt auf die Bedingungen *in vivo* zu übertragen. Unter physiologischen Bedingungen sind die Partikel in Kontakt mit verschiedenen Körperflüssigkeiten, welche unter ständiger Bewegung die lokale Silikakonzentration beeinflussen. Die gelösten Silika-Spezies werden entweder vom Organismus aufgenommen oder über den Urin ausgeschieden.^[6,35]

Durch die Analyse von Mäuseurin und -kot konnte jedoch der Erhalt der Partikelmorphologie auch *in vivo* bestätigt werden.^[35] Die Gruppe um Tamanoi^[36] konnte im Urin intakte sphärische MSN in ihrer nahezu ursprünglichen Form ($\varnothing = 100-130$ nm) nach intraperitonealer Injektion mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nachweisen.^[36] Auch Huang *et al.*^[37] bestätigten dies durch TEM-Aufnahmen des Urins bzw. Kots 24 h nach intravenöser Injektion von stäbchenförmigen MSN mit einem Längen-Breiten-Verhältnis (AR - *aspect ratio*) von 1,5 ($d = 120$ nm) und 5 ($d = 140$ nm).^[37]

3.2 Stabilität von Partikeldispersionen unter physiologischen Bedingungen

Für die Interaktion mit Zellen ist das Vorliegen einzelner Partikel in wässrigen Lösungen unter physiologischen Bedingungen ein entscheidender Faktor. Es zeigte sich, dass Partikelagglomerate im Vergleich zu den entsprechenden stabilen Dispersionen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer biologischen Effekte wie Toxizität und zelluläre Aufnahme aufweisen.^[38,39]

Die Stabilität einer Dispersion hängt von den physikalischen Kräften ab, die zwischen den Partikeln wirken. Überwiegen attraktive Wechselwirkungen wie die Van-der-Waals-Kräfte, kommt es zur Agglomeration der Partikel und somit zur Destabilisierung der Dispersion. Da die attraktiven Wechselwirkungen für Partikel im Nanometerbereich liegen, kann die Stabilisierung von Dispersionen durch eine Barriere in dieser Größenordnung realisiert werden.^[15] Hierfür gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten oder die Kombination aus beiden.^[13,15,40] Zum einen die elektrostatische Stabilisierung, die aus der Repulsion der elektrostatischen Doppelschicht resultiert. Diese Doppelschicht besteht aus Ionen auf der Partikeloberfläche und deren Gegenionen in Lösung, die sich in der näheren Umgebung befinden und ist somit vom pH-Wert bzw. dem Oberflächenpotential der Partikel und der Elektrolytkonzentration in der Lösung abhängig.^[15,40] Zum anderen kann die Annäherung der Partikel durch eine räumliche Barriere unterbunden werden, hier spricht man von der sterischen Stabilisierung. Dies wird meist durch die Adsorption einer dicken Schicht (normalerweise >3 nm) aus Makromolekülen auf der Partikeloberfläche realisiert.^[13,15]

Die Herstellung stabiler Partikeldispersionen unter physiologischen Bedingungen ist oftmals problematisch. Aufgrund der hohen Elektrolytgehalte kann es zur Verminderung der repulsiven Kräfte der Doppelschicht und somit zur Agglomeration der Partikel kommen.^[15]

Oft werden Partikel unter diesen Bedingungen durch die Anbringung von Polymeren oder Peptiden in Lösung stabilisiert. Die Gruppen um González-Fernández^[7] und Haynes^[41] konnten durch Modifizierung von Partikeln mit Polyethylenglykol (PEG) die Stabilität der Partikeldispersionen gegenüber unfunktionalisierten Silikapartikeln deutlich steigern. Auch die Zugabe von Proteinen, wie humanem, bovinem oder murinem Serumalbumin, steigerte die Dispergierbarkeit von TiO₂, Silika, Silber und C₆₀-Nanopartikeln.^[6,7,38,41,42]

Aber auch die Anzahl der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche kann eine entscheidende Rolle spielen. Durch die Funktionalisierung mit Polyethylenimin zum Beispiel kommt es zu einer hochverzweigten Schicht an Aminofunktionen auf der Partikeloberfläche, was die Dispergierbarkeit im Vergleich zu co-kondensierten aminofunktionalisierten Partikeln deutlich vereinfacht.^[6]

3.3 Adsorption von Proteinen auf MSN

Um die Interaktion von Nanopartikeln mit biologischen Systemen zu verstehen, muss berücksichtigt werden, dass Proteine auf der Partikeloberfläche adsorbieren, sobald Partikel mit biologischen Flüssigkeiten wie proteinhaltigen Nährmedien (*in vitro*), Blut oder Plasma (*in vivo*) in Kontakt treten.^[43] Die „Erkennung“ der Partikel bzw. der darauf adsorbierten Proteine durch das biologische System und die daraus folgenden Interaktionen wie zelluläre Aufnahme, Toxizität, Hämolyse oder Dauer der Blutzirkulation, werden maßgeblich von der Zusammensetzung und Dicke dieser Schicht aus Proteinen bzw. Biomolekülen bestimmt. Daher ist es unerlässlich, Vorgänge an der Grenzschicht zwischen Material und proteinhaltiger Lösung zu verstehen, um das Verhalten von Nanopartikeln und deren Risiko *in vivo* abschätzen zu können.^[43–46]

Bereits in den 1960ern konnten Vroman und Adams^[47] zeigen, dass es sich bei dieser Proteinschicht, auch Proteincorona genannt, um eine dynamische Schicht handelt. In ihrer Arbeit demonstrierten sie, dass die Proteinadsorption aus Blutserum zu zahlreichen Adsorptions- und Desorptionsschritten mit steigender Inkubationszeit führt. Zuerst kommt es zur schnellen, meist schwachen Adsorption von Proteinen, die in hoher Konzentration vorhanden sind, welche anschließend sukzessive durch Proteine mit höherer Bindungsaffinität ersetzt werden. Dies wird als der Vroman-Effekt bezeichnet.^[47–51] Die Proteinschicht besteht aus der harten Corona (*hard corona*) mit stark gebundenen Proteinen sowie hohen

Austauschzeiten und der weichen Corona (*soft corona*) mit lose gebundenen Proteinen, die schnell ausgetauscht werden können.^[43,51]

Die unspezifische Proteinadsorption hängt sehr stark von den Eigenschaften der eingesetzten Materialien ab. Unter anderem sind chemische Zusammensetzung (Funktionalisierung), Größe, Form, Ladungsdichte sowie Hydrophilie/Hydrophobizität entscheidende Faktoren für die resultierende Proteinschicht.^[45,49,50,52,53] Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass mit steigender Hydrophobizität und Ladung die Gesamtmenge an unspezifisch adsorbierten Proteinen steigt.^[52,54–56]

Durch die Adsorption von Proteinen auf der Partikeloberfläche kann es zu Konformationsänderungen der Proteine kommen. Diese Strukturänderungen sind teilweise irreversibel, also auch nach der Desorption von der Partikeloberfläche noch vorhanden. Hieraus können veränderte Funktionen bzw. Eigenschaften der Proteine und der mit diesen Proteinen umhüllten Partikel resultieren. Die Funktionalität der adsorbierten Proteine hängt wiederum sehr stark von der chemischen Zusammensetzung und Oberflächenkrümmung der Partikel ab, weshalb auch hier Größen- und Formeffekte zum Tragen kommen können.^[45,46,49,55–57]

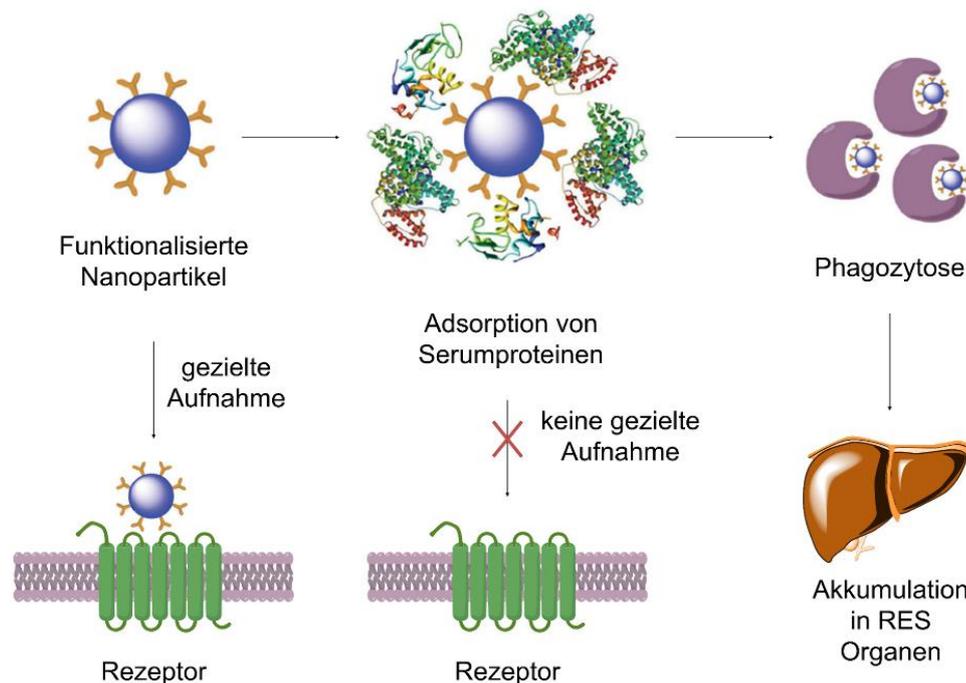


Abbildung 6: Einfluss der Proteinadsorption auf die Interaktion von funktionalisierten Nanopartikeln mit biologischen Systemen *in vitro* sowie *in vivo*. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[10], Copyright 2014, Wiley-VCH)

Die Adsorption von großen Proteinmengen auf der Oberfläche der Partikel kann zu einigen unerwünschten Effekten führen. Die Erkennung durch das retikuloendotheliale System (RES) kann mit steigender Menge an Protein zunehmen. Dies führt zur schnellen Entfernung der

Partikel aus dem Blutstrom und somit zur Ineffizienz der Therapie.^[6] Außerdem muss gewährleistet sein, dass Oberflächenliganden, die für die gezielte Aufnahme der Partikel in bestimmten Zelllinien verantwortlich sind, trotz der adsorbierten Proteinschicht für die Zellen zugänglich sind. Andernfalls kommt es zum Verlust der selektiven Eigenschaften dieser Partikel und somit zu unerwünschten Nebenwirkungen (vgl. Abbildung 6).^[6,10] Salvati *et al.*^[58] stellten zum Beispiel fest, dass es durch die Anwesenheit von Serumproteinen zum Verlust der selektiven Aufnahmeeigenschaften von Transferrin-funktionalisierten Silikananopartikeln kommt.^[58]

Aufgrund der oben genannten Probleme, die durch eine adsorbierte Proteinschicht verursacht werden können, ist es von großem Interesse, sogenannte *stealth* Partikel einzusetzen, die kaum Proteine auf der Oberfläche adsorbieren. Die häufigste Methode um die unspezifische Proteinadsorption auf mesoporösen Silikananopartikeln zu unterbinden ist die Funktionalisierung der Partikeloberflächen mit PEG. Die hydrophilen PEG-Ketten lagern durch Wasserstoffbrückenbindungen eine große Menge an Wasser ein, welches als hydrophile Barriere die Proteine von der Oberfläche abschirmt.^[6,10]

He *et al.*^[59] berichteten, dass durch die Funktionalisierung von MSN ($\varnothing = 150$ nm) mit PEG unterschiedlichen Molekulargewichts (10 und 20 kDa) die Adsorption von humanem Serumalbumin von 20 % der eingesetzten Menge auf ca. 3 % herabgesenkt werden konnte. Außerdem zeigte sich eine verminderte Aufnahme in Makrophagen und eine geringere Hämolyse von roten Blutkörperchen.^[59] Dies konnte durch die Gruppe um Bayindir^[60] bestätigt werden. Die Adsorption von humanem Serumalbumin (HSA) konnte durch die PEGylierung (10 kDa) von Silikapartikeln ($\varnothing = 80$ nm) von 7 nmol HSA/mg auf 1,2 nmol HSA/mg gesenkt werden, auch hier wurde die hämolytische Aktivität der Partikel durch die PEG-Funktionalisierung deutlich abgesenkt.^[60] Ebenso kann bei aminofunktionalisierten Partikeln eine PEG-Schicht die Adsorption von Proteinen unterbinden. Im Vergleich zu aminofunktionalisierten MSN (14 Gew.%) zeigten die mit PEG funktionalisierten Partikel keine signifikante Proteinadsorption von fötalem Rinderserum (FBS - *fetal bovine serum*) (10 % in DMEM).^[53]

Inzwischen ist jedoch bekannt, dass es *in vivo* in Mäusen, Ratten, Hasen und Affen durch die Verwendung von PEG-haltigen Substanzen, wie Polymernanopartikeln, Liposomen, Proteinen und Mikroemulsionen zu starken Immunantworten kommen kann. Es wird vom sogenannten *accelerated blood clearance* Phänomen gesprochen. Verursacht wird dieses durch die Bildung des Antikörpers anti-PEG IgM und resultiert in der schnellen Entfernung der zweiten Dosis an PEG-haltigen Substanzen aus dem Blutstrom.^[61,62]

Dies führt dazu, dass intensiv an Alternativen zur Verwendung von PEGylierten Substanzen in der Synthese von *stealth* Partikeln gesucht wird. Unter anderem finden die

Funktionalisierungen mit Monosacchariden wie Glucose oder Galactose, Polysacchariden wie Dextran und Methylphosphonat Anwendung.^[60,63–66] Auch die Verwendung von zwitterionischen Gruppen ist ein häufig verwendeter Ansatz um die Proteinadsorption zu vermindern.^[10] Hierfür werden unter anderem niedermolekulare Spezies wie Aminosäuren, Sulfobetain-Derivate oder Phospholipid-Derivate eingesetzt. Zwitterionische Oberflächen bilden durch elektrostatische Wechselwirkungen eine starke Hydrathülle aus, welche die Adsorption von Proteinen unterbindet.^[67,68] Außerdem ist die neutrale Gesamtladung der Oberfläche dafür verantwortlich, dass kaum Ladungs-Wechselwirkungen mit Proteinen stattfinden können.^[10,67,69]

4. MSN in Biomedizinischen Anwendungen

4.1 Interaktion von Silikananopartikeln mit biologischen Systemen

Die Zelluläre Aufnahme und Biokompatibilität *in vitro* sowie die Dauer der Blutzirkulation und Biodistribution *in vivo* sind sehr komplexe Vorgänge. Sie hängen unter anderem sehr stark von Partikeleigenschaften wie Größe, Form, Oberflächenfunktionalisierung und -ladung ab.^[1,37] Trotz zahlreicher Studien ist es immer noch schwierig, einen allgemeinen Zusammenhang zwischen Partikelgröße, -form sowie -funktionalisierung und zellulärer Antwort zu finden.^[70] Im Folgenden soll ein Überblick der Literatur zum Einfluss dieser Eigenschaften auf biologische Systeme dargestellt werden.

4.1.1 Einfluss der Partikelgröße

Der Einfluss der Größe auf die Toxizität von humanen Endothelzellen wurde von Napierska *et al.* untersucht.^[71] Mit steigender Partikelgröße (16, 19, 60, 104 und 334 nm) nahm die Toxizität von nichtporösen Silikananopartikeln hinsichtlich der eingesetzten Massenkonzentration ab.^[71] Zu beachten ist, dass bei gleicher Massenkonzentration die Partikelanzahl mit steigender Partikelgröße sinkt. Die Gruppe um Hussain konnte die abnehmende Vitalität von murinen Epidermalzellen mit sinkender Partikelgröße nach Inkubation mit Silikananopartikeln der Größen 30, 48, 118 und 535 nm bestätigen.^[72] Auch die hämolytische Aktivität von Silikananopartikeln zeigte eine Größenabhängigkeit. Lin *et al.* beobachteten, dass mit steigender Partikelgröße von nichtporösen (24, 37, 142 und 263 nm) und mesoporösen (25, 42, 93, 155 und 225 nm) Silikananopartikeln gleicher Massenkonzentration die Hämolyse von humanen roten Blutkörperchen abnahm. Eine

Ausnahme stellten die kleinsten MSN mit 25 nm dar. Diese lagen mit ihrer hämolytischen Aktivität zwischen den 93 und 155 nm großen MSN. Allgemein konnte eine geringere hämolytische Aktivität für die mesoporösen Partikel im Vergleich zu den entsprechenden nichtporösen Partikeln festgestellt werden. Dies resultiert aus der geringeren Anzahl an Silanol-Gruppen auf der Oberfläche der MSN im Vergleich zu den soliden Silikananopartikeln. Für die mesoporösen Partikel, ausgenommen der 42 nm großen Partikel, konnte bis zu einer Konzentration von 150 µg/mL keine merkliche hämolytische Aktivität beobachtet werden.^[73] Auch die zelluläre Aufnahme der Partikel ist größenabhängig. Zhang *et al.* konnten anhand von humanen dermalen Fibroblasten zeigen, dass die Aufnahme von 500 nm gegenüber 80 nm großen Partikel bevorzugt war.^[74] Die Gruppe um Mou untersuchte die zelluläre Aufnahme von MSN unterschiedlicher Größe in HeLa-Zellen. Die zelluläre Aufnahme stieg in folgender Reihenfolge an: 50 > 30 > 110 > 280 > 170 nm. Die höchste Aufnahme zeigten die Partikel mit einer Größe von 50 nm, wobei hierbei keine merkliche Reduzierung der Zellvitalität bis zu einer Konzentration von 100 µg/mL auftrat.^[75] Weitere Arbeiten bestätigen die maximale Aufnahme für Partikel unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung mit einer Größe von 30-50 nm. So zeigten Chithrani *et al.* für 50 nm große Goldnanopartikel in HeLa-Zellen, Varela *et al.* für 40 nm große Polystyrolpartikel in 1321N1 und A549 Zellen sowie Huang *et al.* für 37 nm große mit Polyvinylpyrrolidon beschichtete Eisenoxid Nanopartikel in RAW264.7 Zellen eine erhöhte Aufnahme gegenüber vergleichbaren, größeren und kleineren Partikel.^[70,76-78]

Studien zeigen, dass viele MSN durch Rezeptor-vermittelte Endozytose und Pinozytose aufgenommen werden.^[21,79] Der Effekt der Partikelgröße kann am wahrscheinlichsten durch die Einstülpung der Zellmembran erklärt werden, welche die Rezeptor-stimulierte Endozytose einleitet.^[70] Hierfür müssen genügend Nanopartikel-Zell-Interaktionen mit Liganden auf der Partikeloberfläche ausgebildet werden.^[70] Diese Liganden können chemische oder biologische Einheiten umfassen, welche die Bindungsaffinität fördern, wie zum Beispiel Polymere, Oberflächengruppen oder unspezifisch adsorbierte Proteine, aber auch spezielle Liganden, wie zum Beispiel Transferrin, die die Aufnahme in bestimmten Zellen verstärken sollen (vgl. Abschnitt 1.4.2).^[45] Der optimale Radius resultiert aus der Konkurrenz zwischen thermodynamischer Triebkraft und Kinetik der Rezeptordiffusion (vgl. Abbildung 7). Für Partikel kleiner als die optimale Größe, führt die höhere elastische Energie verbunden mit der Beugung der Membran zur reduzierten Triebkraft der Einstülpung der Zellmembran. Bei Partikeln oberhalb der optimalen Partikelgröße hindert die Rezeptordiffusion über einen weiteren Bereich die Dauer der Einstülpung und führt somit zu einer verminderten Aufnahmeeffizienz.^[80] Einige theoretische Berechnungen des optimalen Radius liegen je nach Berücksichtigung unterschiedlicher Faktoren im Bereich von 25-30 nm.^[80,81]

Thermodynamisch gesehen kann ein 50-60 nm großer Partikel mit genügend benachbarten Rezeptoren interagieren, um somit die Aufnahme zu induzieren.^[70]

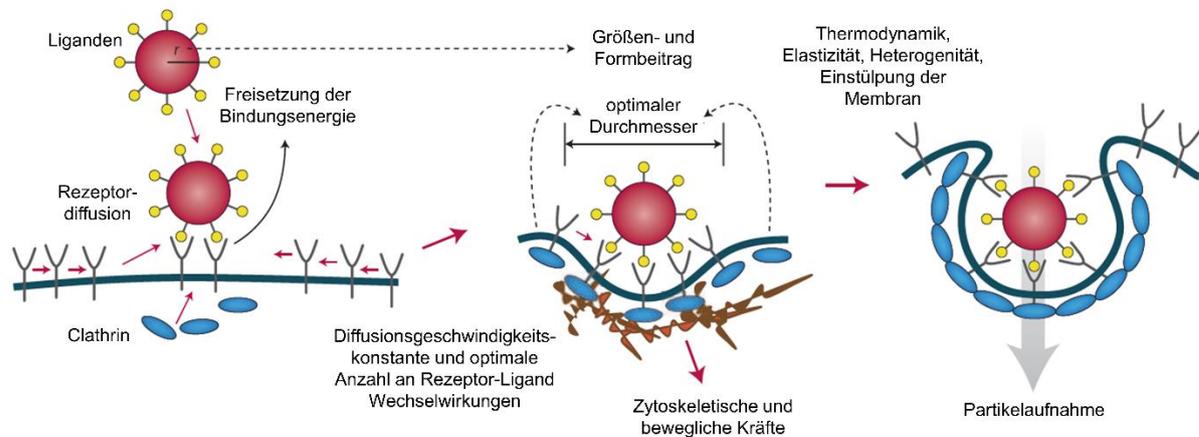


Abbildung 7: Zelluläre Aufnahme von Partikeln durch Einstülpung der Zellmembran. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung von *Macmillan Publishers Ltd: Nature Materials* 2009, 8, 543-557)^[45]

Auch *in vivo* wurde der Einfluss der Größe von MSN untersucht. He *et al.* untersuchten die Biokompatibilität und Biodistribution von 80, 120, 200 und 360 nm großen MSN an Mäusen (20 mg/kg; intravenös in die Schwanzvene). Es zeigte sich, dass mit steigender Partikelgröße die Gesamtmenge der Partikel in Leber sowie Milz 30 min nach der Injektion zunahm. Zugleich nahm die Menge an Partikeln im Blut mit steigender Größe ab, d.h. die kleineren Partikel hatten eine höhere Zirkulationsdauer im Blut. Die Quantifizierung von Abbauprodukten der Partikel im Urin verdeutlichte, dass die kleineren Partikel langsamer vom Organismus abgebaut bzw. ausgeschieden wurden. Die Mäuse zeigten 1 Monat nach der Injektion keinerlei pathologische Abnormalitäten, was belegte, dass alle Partikel *in vivo* eine hohe Biokompatibilität aufwiesen.^[82] Auch Lu *et al.* konnten die Biokompatibilität von MSN mit einer Größe von ca. 100-130 nm *in vivo* bestätigen. Die zweimalige intravenöse Injektionen pro Woche über einen Zeitraum von 2 Monaten (gesamt: 18 Injektionen) mit 50 mg/kg hatte keinerlei toxische Effekte auf die Mäuse.^[83]

4.1.2 Einfluss der Partikelform

Die Form der Partikel spielt eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von Nanopartikeln mit Zellen. Hierbei kommt es mit steigendem AR zu einer höheren Kontaktfläche zwischen Partikel und Zelle.^[84] Anhand des Modells der Rezeptor-stimulierten Endozytose (vgl. Abschnitt I.4.1.1) würde die höhere thermodynamische Kraft, die für die Einstülpung der Zellmembran um die zylindrischen Partikel benötigt werden würde, dafür sprechen, dass diese langsamer aufgenommen werden als sphärische Partikel.^[45,80] Jedoch finden sich in der

Literatur zahlreiche Beispiele, die beschreiben, dass scheibenartige, zylindrische oder halbkugelförmige Partikel eine höhere Aufnahme zeigen als sphärische Partikel. Daraus lässt sich schließen, dass die Kontaktfläche zwischen Partikel und Zelle einen entscheidenden Einfluss auf den Aufnahmemechanismus der Partikel hat.^[84,85]

Die Aufnahme von MSN mit unterschiedlichen Längen-Breiten-Verhältnissen wurde von Huang *et al.* untersucht. Die Partikel hatten alle denselben Durchmesser (~100 nm), aber unterschiedliche Längen (100 nm (AR1), 240 nm (AR2) und 450 nm (AR4)). Es zeigte sich, dass die Aufnahme in A375 Zellen mit dem AR der Partikel steigt. Sie korrelierten dies mit der steigenden Kontaktfläche zwischen Zellmembran und Partikel. Die Vitalität der Zellen wurde bis zu einer Konzentration von 1 mg/mL nur minimal reduziert, jedoch stieg die Anzahl an apoptotischen Zellen mit steigender Konzentration und zunehmendem AR.^[84]

Die Gruppe um Rosenholm untersuchte den Einfluss der Form *in vitro*. Sie analysierten die Aufnahme von sphärischen und stäbchenförmigen (AR3-4) MSN mit ähnlichem hydrodynamischem Radius ($d_{DLS} = 500-600$ nm) mit und ohne Polyethylenimin (PEI)-Funktionalisierung in HeLa und Caco-2 Zellen. Die stäbchenförmigen Partikel wurden im Vergleich zu den sphärischen Partikeln in beiden Zelllinien vermehrt aufgenommen. Dieser Effekt war sowohl für die reinen als auch für die PEI-funktionalisierten Partikel vorhanden. Darüber hinaus erhöht die PEI-Funktionalisierung die generelle Aufnahme der sphärischen sowie stäbchenförmigen Partikel. Die Inkubation der HeLa-Zellen mit den Partikeln (10 und 25 $\mu\text{g/mL}$) führte zu keinerlei Reduktion der Zellvitalität (keine Angaben für Caco-2 Zellen).^[86] Trewyn *et al.* konnten die steigende Aufnahme der Partikel mit größerem AR für Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) und Fibroblasten bestätigen. Sie zeigten jedoch, dass die Aufnahme von sphärischen Partikeln ($d = 80-150$ nm) in Fibroblasten deutlich schneller das Maximum erreichte, als längere Stäbchen ($d = 80-150$ nm; $l = 400-1000$ nm; AR5-6). In CHO-Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.^[87]

Die Gruppe um Nel konnte belegen, dass die Aufnahme von zylindrischen (AR2,1-2,5 (160-190/60-90 nm); AR1,5-1,7 (110-130/60-80 nm) bzw. AR4,0-4,5 (260-300/50-70 nm)) im Vergleich zu sphärischen (AR1,0-1,2 (110 nm)) MSN in HeLa- und A549-Zellen bevorzugt ist. Jedoch hatten hier zylindrische MSN mit einem AR von 2,1-2,5 eine deutlich höhere Aufnahme als MSN mit einem AR von 1,5-1,7 bzw. 4,0-4,5.^[85]

Den Effekt der Größe konnte von Huang *et al.* *in vivo* durch die Verwendung von mesoporösen Silikananopartikeln mit einem AR von 1,5 ($d = 133$ nm; $l = 185$ nm) und 5 ($d = 133$ nm; $l = 720$ nm) gezeigt werden. Im Zeitraum von 2-24 h nach intravenöser Injektion der Partikel (20 mg/kg) blieb die Konzentration der längeren Stäbchen im Blut nahezu unverändert, wohingegen die Konzentration der kürzeren Stäbchen deutlich abnahm. Hierauf basierend

postulierten sie, dass Partikel mit einem größeren AR eine längere Blutzirkulationsdauer aufweisen. Für alle partikelbehandelten Mäuse konnten, abgesehen von der Störung der Gallenabsonderung und der glomerulären Funktion, keinerlei toxische Effekte beobachtet werden.^[37]

4.1.3 Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung

Neben der Größe und Form von mesoporösen Silikananopartikeln spielt deren Oberflächenfunktionalisierung bzw. -ladung eine entscheidende Rolle in der zellulären Aufnahme, Biokompatibilität und Biodistribution. So konnten Tao *et al.* zeigen, dass durch die Funktionalisierung von unregelmäßig geformten SBA-15 und sphärischen MCM-41 (d = 300-350 nm) Partikeln mit quartären Ammoniumgruppen die Vitalität von partikelbehandelten menschlichen Neuroblastom- (adhärente Zellen) und Jurkat- (Suspensionszellen) Zellen stieg.^[88] Auch die Gruppe um Asefa konnten die Steigerung der Biokompatibilität von MSN durch Funktionalisierung mit organischen Gruppen nachweisen. Sie untersuchten die Auswirkung von unfunktionalisierten, thiol- und aminofunktionalisierten stäbchenförmigen MCM-41 Partikeln (d = 166 nm; l = 320 nm; AR1,9) auf das Wachstum von menschlichen Neuroblastom-Zellen. Es zeigte sich, dass sich der Q₅₀-Wert (Partikelzahl, die das normale Zellwachstum um 50 % herabsetzt) von unfunktionalisierten Partikeln durch die Funktionalisierung mit Thiol- sowie Aminogruppen erhöht.^[89]

Um den Einfluss der Ladung auf die zelluläre Aufnahme *in vitro* zu analysieren, muss im Allgemeinen zwischen Experimenten mit und ohne Proteinzusatz, z.B. fötalem Kälberserum (FCS - *fetal calf serum*) unterschieden werden, da sich durch die resultierende Proteinadsorption die Oberflächenladung drastisch ändern kann (vgl. Abschnitt I.3.3). *In vivo* kann der Einfluss von Proteinen nicht ignoriert werden, weshalb Versuche mit Serumzusatz weitaus mehr Aussagekraft haben als Experimente ohne Serumzusatz.

Unter serumfreien Bedingungen ist die passive Aufnahme von positiv geladenen Partikeln aufgrund der höheren Wechselwirkungen mit der negativen Zellmembran deutlich begünstigt. In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Aufnahme von Partikeln mit zunehmendem Zetapotential steigt.^[79,90] Shahabi *et al.* konnten durch die Verwendung von MSN mit unterschiedlichen Verhältnissen von Amino- zu Sulfonatgruppen, resultierend in unterschiedlichen Oberflächenladungen, bestätigen, dass unter serumfreien Bedingungen positiv geladene MSN bevorzugt aufgenommen wurden. In Zellkulturmedium mit 10 % FCS hingegen wurde die Aufnahme der negativen Partikel begünstigt.^[91] Diese Arbeit spiegelt sehr deutlich wider, welchen großen Einfluss die Proteinadsorption auf das Verhalten der Partikel hat (siehe auch Abschnitt I.3.3).

In vivo wurde der Einfluss der Funktionalisierung von nichtporösen Silikananopartikel untersucht. He *et al.* beobachteten, dass sich die Zirkulationsdauer von 45 nm großen PEG-, carboxy- und unfunktionalisierten Silikananopartikeln unterscheidet. Die PEGylierten Partikel hatten eine längere Verweildauer im Blut als carboxy- und unfunktionalisierte Partikel.^[92] Einige weitere Untersuchungen bestätigen, dass sich die Zirkulationsdauer von MSN unterschiedlicher Formen durch die Funktionalisierung mit PEG verlängert.^[37,82,93] Die Verwendung von PEG ist jedoch aufgrund des *accelerated blood clearance* Phänomens limitiert (vgl. Abschnitt I.3.3).

Zusammenfassend ergibt sich, dass die optimale Partikelgröße für die zelluläre Aufnahme zwar unabhängig von der Zusammensetzung der Partikel ist, nicht aber von deren Oberflächeneigenschaften und des verwendeten Zelltyps. Kleinere Partikel werden im Vergleich zu größeren vermehrt aufgenommen, richten aber meist auch mehr Schaden in der Zelle an.^[1,70] Die Aufnahme von stäbchenförmigen Partikeln ist häufig gegenüber der von sphärischen Partikeln begünstigt. Die erfolgreiche zelluläre Aufnahme und hohe Biokompatibilität (bis ca. 100 µg/mL) der MSN sind Grundlage für die erfolgreiche Anwendung als Trägermaterialien in biologischen Systemen.^[1,21]

4.2 Gezielte Aufnahme in bestimmten Zellen

Um die Effizienz von Therapien zu erhöhen und Nebenwirkungen zu minimieren, müssen die eingesetzten Therapeutika, wie Medikamente, Proteine oder Oligonukleotide, selektiv an den Wirkungsort gelangen ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen.^[6] Die passive Anreicherung von Partikeln in soliden Tumoren erfolgt durch den sogenannten EPR (erhöhte Permeabilität und Retention)-Effekt. Solides Tumorgewebe weist deutliche Unterschiede zu gesundem Gewebe auf. Hierzu gehört beispielsweise die erhöhte vaskuläre Permeabilität, die dazu führt, dass Partikel oder andere Makromoleküle leichter in das Gewebe diffundieren können. Zusätzlich ist die Auswaschung durch Blutgefäße und anschließende Entfernung durch das lymphatische System in Tumorgewebe langsamer als in normalem Gewebe.^[94,95] Aufgrund der maximalen vaskulären Porengröße, die für die meisten Tumore im Bereich von 380-780 nm liegt, und der schnellen Auswaschung von kleinen Partikeln (< 80 nm), ist die optimale Partikelgröße für die passive Akkumulation im Tumor im Bereich von 80-200 nm.^[96,97] Für die Therapie von Leukämien oder metastasierten Zellen hat der EPR-Effekt keine Auswirkungen auf die Anreicherung in den Tumorzellen, da hier einzelne zirkulierende Zellen erreicht werden müssen. In diesen Fällen kann die Menge an Partikeln in den Zellen durch aktive Aufnahmestrategien erhöht werden. Auch die Behandlung von soliden Tumoren profitiert von dieser Strategie, da trotz der Gefäßdurchlässigkeit die homogene Verteilung der

Partikel im Tumorgewebe nicht immer gewährleistet ist und nicht jeder Tumor, je nach Art oder Entwicklungsstadium, diese durchlässigen Strukturen aufweist.^[98] Kranke Zellen können sich von gesunden Zellen unter anderem in der Art und Anzahl von Oberflächenrezeptoren unterscheiden. Beispielsweise haben Krebszellen aufgrund der hohen Proliferationstendenz einen erhöhten Energiebedarf und somit eine höhere Anzahl an Glucose- bzw. Folatrezeptoren auf der Zelloberfläche.^[99–102] Durch Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Oberflächenliganden, wie Zuckermolekülen^[102,103], Folsäure^[28,104,105], Aptameren^[106,107], Peptiden^[108,109] und Antikörpern^[110,111], die an diese Rezeptoren binden, kann die Interaktion mit bestimmten Zellen verstärkt und somit eine höhere Selektivität erreicht werden.

Mannose-funktionalisierte MSN (d ~ 100 nm), die mit einem Porphyrin-Derivat für die photodynamische Therapie modifiziert wurden, zeigten unter Bestrahlung eine höhere Zelltoxizität von Brustkrebszellen (MDA-MD-231) als MSN ohne Mannose-Funktionalisierung. Unter serumfreien Bedingungen und Bestrahlung erhöhte die Zugabe von Mannose in freier Form die Vitalität von Zellen nach Behandlung mit Mannose-funktionalisierten und Porphyrin-modifizierten Partikeln deutlich. Dies lässt darauf schließen, dass die Aufnahme der Partikel über aktive Endozytose durch Mannose-Rezeptoren erfolgt.^[102]

Die Gruppe um Trewyn beobachtete, dass die Aufnahme von sphärischen MSN (d = 100-200 nm) in Krebszellen nach 12 h unter serumfreien Bedingungen durch die Funktionalisierung mit einer Tripeptid-Sequenz (RGD - Arginin-Glycin-Asparaginsäure) erhöht werden konnte.^[108] Neben Peptidfunktionalisierungen können auch Antikörper für die selektive Aufnahme verwendet werden. Die Gruppe um Mustelin untersuchte die Aufnahme von Ruthenium-dotierten Silikananobeads (d = 20 nm) in menschlichen leukämischen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Die gleichzeitige Funktionalisierung mit zwei Antikörpern gegen T-Zell-Rezeptoren (*anti-human CD3* und *anti-human CD28*) resultierte in einer Steigerung der zellulären Aufnahme in T-Lymphozyten, nicht aber in B-Lymphozyten nach 6 h (unter FBS-Zusatz).^[111] Die erfolgreiche selektive Aufnahme von Antikörper- (anti-HER2/neu) und PEG-funktionalisierten MSN (d ~ 100 nm) konnte von Tsai *et al.* gezeigt werden. Nach der Antikörperfunktionalisierung war die Aufnahme in Zellen mit überexprimiertem Rezeptor HER2/neu deutlich höher als in HER2/neu negativen Zellen. Durch Verminderung des PEG-anti-HER2/neu-Gehalts auf den Partikeln und durch Zugabe von freiem Antikörper, welcher mit den antiHER2/neu-funktionalisierten Partikeln konkurriert, wurde die selektive Aufnahme dieser Partikel in den HER2/neu positiven Zellen deutlich reduziert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass hier eine aktive Aufnahme der Partikel mit Hilfe des HER2/neu-Rezeptors stattfindet.^[110]

Die Verwendung von PEGylierten, ^{64}Cu -radiomarkierten und antikörperfunktionalisierten (TRC105 - spezifisch gegen CD105) MSN (d ~ 80 nm) wurde *in vitro* und *in vivo* von der Gruppe um Cai untersucht. Durch die Antikörperfunktionalisierung konnte eine Steigerung der zellulären Aufnahme in CD105 positiven Zellen gegenüber MSN ohne Antikörper erreicht werden. Die höhere Aufnahme der TRC105-funktionalisierten MSN in CD105 positiven im Vergleich zu CD105 negativen Zellen geben Hinweise darauf, dass es sich hierbei um eine aktive Aufnahme *via* des CD105 Rezeptors handelt. *In vivo* untersuchten sie die Biodistribution durch Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nach intravenöser Injektion in tumortragende Mäuse. 5 h nach der Injektion konnte eine höhere Aufnahme durch die TRC105 Funktionalisierung der Partikel beobachtet werden. Durch Injektion von freiem TRC105 und daraus resultierender Blockierung der CD105 Rezeptoren, konnte die Aufnahme der antikörperfunktionalisierten Partikel vermindert werden. Somit konnte auch *in vivo* die aktive Aufnahme dieser Partikel bestätigt werden.^[112] Mit einem ähnlichen System basierend auf MSN konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass allein durch die Funktionalisierung der Partikel mit dem Antigen-bindenden Fragment (Fab) des Antikörpers TRC105 (TRC105(Fab)) die Aufnahme im Tumor gesteigert werden konnte.^[113]

Diese Beispiele belegen das große Potential von MSN als geeignete Transportsysteme für die gezielte aktive Aufnahme in Krebszellen. Durch die Funktionalisierung dieser Partikel mit Zuckern, Antikörpern, Peptiden, usw. kommt es zu einer Anreicherung der Partikel in Krebszellen *in vitro* sowie *in vivo*.

4.3 Gezielter Medikamententransport

Der Einsatz vieler Medikamente ist durch deren Löslichkeit und Stabilität und der daraus resultierenden verminderten Bioverfügbarkeit eingeschränkt. Durch Einbringung in eine Matrix können hydrophobe Medikamente in eine „lösliche“ Form gebracht und zudem vor metabolischem Abbau geschützt werden.^[24,114] Die Kombination von Medikamententransport *via* Nanopartikeln und gezielter Aufnahme in bestimmten Zellen (vgl. Abschnitt I.4.2) eröffnet neue Therapieansätze, die gegenüber herkömmlichen Methoden Nebenwirkungen reduzieren und den Therapieerfolg erhöhen könnten.^[115]

Mesoporöse Silikananopartikel ermöglichen durch die hohe Variabilität der Oberflächenfunktionalisierung sowie der hohen spezifischen Oberflächen und einstellbaren Porengrößen eine genaue Anpassung an das jeweilige Medikament. Diese Eigenschaften des Partikels beeinflussen die resultierende Beladungskapazität sowie das Freisetzungsverhalten des Wirkstoffes.^[98] Die Beladung der Partikel kann durch *in situ* Einschluss der Wirkstoffe während der Partikelsynthese oder durch postsynthetische Beladung in Lösung durch Chemi- oder Physisorption erfolgen. Durch die postsynthetische Beladung können Beladungsgrade

von bis zu 35 Gew.% erreicht werden, jedoch werden für biologische Anwendungen meist Beladungen weit unterhalb der maximal möglichen Menge verwendet.^[24] Die Freisetzung erfolgt hauptsächlich durch diffusionsbedingte Vorgänge, die maßgeblich von der Stärke der Interaktion zwischen Wirkstoff und Partikel abhängen.^[5] Diese partikelbasierten Transportsysteme werden hauptsächlich im Bereich der Krebstherapie, zum Beispiel für den Transport von Zytostatika, wie Doxorubicin, Daunorubicin, Paclitaxel oder Camptothecin angewendet, finden sich aber auch im Bereich der Therapie von HIV, Tuberkulose und Hepatitis.^[6,24]

In der Literatur werden zahlreiche Beispiele für den gerichteten Medikamententransport *in vitro* als auch *in vivo* unter anderem durch Funktionalisierung von MSN mit Zuckern^[26,116], Folsäure^[83,117], Peptiden^[118–120] und Antikörpern^[121–123] beschrieben.

Gao *et al.* untersuchten die Beladung, Freisetzung und biologische Anwendung von Antikörper-modifizierten carboxyfunktionalisierten MSN mit dem Wirkstoff Mifepristone, welcher eine anti-proliferative Wirkung auf viele Krebszelllinien hat. Es zeigte sich, dass das Freisetzungsverhalten des elektrostatisch gebundenen Mifepristone pH-abhängig ist. Bei pH 5,5 wurde deutlich mehr Wirkstoff freigesetzt als bei pH 7,4. Der Antikörper hat außerdem eine Art schützende Wirkung, die relative freigesetzte Menge von aEpCAM modifizierten Partikeln (aEpCAM-MSN) ist deutlich geringer als von MSN ohne Antikörper (MSN-COOH). Die Aufnahme der aEpCAM-MSN *in vitro* in EpCAM positive Zellen ist deutlich höher im Vergleich zu MSN-COOH und im Vergleich zu EpCAM negativen Zellen. In den EpCAM negativen Zellen ist außerdem kein Unterschied in der Aufnahme zwischen den MSN mit und ohne Antikörper erkennbar. Der Transport von Mifepristone wurde durch die relative Adhäsionsstärke von suspendierten EpCAM positiven Zellen auf Endothelzellen *in vitro* untersucht. Für die mit Mifepristone-beladenen aEpCAM-MSN zeigte sich die geringste relative Adhäsion verglichen mit freiem Wirkstoff und unbeladenen aEpCAM-MSN. *In vivo* wurde die Tumorbildung von aEpCAM positiven Zellen in der Lunge von Mäusen 3 Wochen nach simultaner, intravenöser Injektion von Zellen und Partikeln untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die Mäuse, die mit den Mifepristone beladenen aEpCAM-MSN behandelt wurden, im Vergleich zu den mit unbeladenen Partikeln und freiem Mifepristone behandelten Mäusen, keine nennenswerten Tumorknötchen oder -zellen aufwiesen.^[122]

Die selektive Aufnahme von Celastrol, welches den Zelltod induzieren kann, durch Glucose und PEI-funktionalisierte MSN (d = 250-300 nm) wurde von Niemälä *et al.* untersucht. *In vitro* zeigte sich eine höhere Aufnahme der Glucose-funktionalisierten PEI-Partikel (MSN-PEI-GS_{org}) in Krebszellen mit höherem Energieverbrauch (HeLa- und A549-Zellen) im Vergleich zu primären Zellen aus Mausembryonen mit normalen Energiebedarf. Es konnte

eine deutliche Steigerung der Zahl an apoptotischen HeLa-Zellen durch die Verwendung von Celastrol beladenen MSN im Vergleich zu freiem Celastrol erreicht werden. Ein Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen zwischen MSN-PEI und MSN-PEI-GS_{org} war nicht erkennbar. Die Freisetzung des Wirkstoffes in HEPES-Puffer unter denselben Bedingungen (pH 7,2; 37 °C) lag nach 48 h nur bei ca. 3 % für MSN-PEI und MSN-PEI-GS_{org}.^[26]

Die Resistenz gegenüber Medikamenten (*MDR-multidrug resistance*) kann in der Therapie von Krankheiten wie Krebs oder Tuberkulose zum Versagen der Behandlung führen.^[24] Durch Überexpression des P-Glykoproteins (MDR1) kommt es zur erhöhten Entfernung der Wirkstoffmoleküle aus dem Zytoplasma. Zudem kann es bei Zellen mit MDR zur Akkumulation der Wirkstoffe in den Lysozymen kommen. Nanopartikel, die Medikamente in die Zelle schleusen, können die Wirkstoffe „tarnen“, so dass diese nicht durch Effluxpumpen aus der Zelle ausgeschleust und von destruktiven intrazellulären Kompartimenten ferngehalten werden.^[124] Zudem können Partikel gleichzeitig mit Chemotherapeutika und Oligonukleotiden (Plasmid DNA, miRNA und siRNA) beladen werden, die die MDR in der Zelle ausschalten, was zur Überwindung der MDR führen kann (vgl. Abschnitt I.4.4).^[125]

Wang *et al.* konnten durch die Verwendung von anti-CD44-funktionalisierten und Doxorubicin beladenen MSN (d ~ 60 nm) die MDR in menschlichen Brustkrebszellen umgehen. Es zeigte sich, dass auch die Freisetzung von Doxorubicin pH-abhängig ist. Bei pH 5,6 wird weitaus mehr Doxorubicin freigesetzt im Vergleich zu pH 7,4. Die Antikörperfunktionalisierung auf der Oberfläche kann die relative Menge an freigesetztem Wirkstoff bei beiden pH-Werten herabsetzen. Der Rezeptor CD44 wird mit antiapoptotischen Eigenschaften und Krebsresistenz in Verbindung gebracht. Durch die Gabe von löslichem CD44 Antikörper konnte die Überexpression des MDR1 heruntergesetzt werden. Doxorubicin-beladene, anti-CD44-modifizierte Partikel wiesen eine deutlich höhere Toxizität *in vitro* sowie *in vivo* auf im Vergleich zu freiem Doxorubicin oder Doxorubicin beladenen Partikeln mit Zusatz von freiem anti-CD44.^[123]

Um die Freisetzung der Medikamente außerhalb des gewünschten Wirkungsortes zu unterbinden, können die Poreneingänge der Partikel durch Nanopartikel, organische Moleküle oder supramolekulare Aggregate blockiert werden.^[21] Erst durch externe Stimuli wie Änderung des pH-Wertes, Temperatur oder Redox-Bedingungen wird der Poreneingang geöffnet und somit das Medikament freigesetzt.^[24] Alternativ können die Wirkstoffe über pH- oder Redox-sensitive Linker kovalent an die Porenwände gebunden werden.^[24]

4.4 Transport von kurzen Oligonukleotiden

Neben molekularen Wirkstoffen können auch Oligonukleotide als Therapeutika in Zellen transportiert werden. Durch die Einbringung von kurzen siRNA- (*small interfering RNA*) oder miRNA- (*micro RNA*) Strängen kann Einfluss auf die Genexpression in der Zelle genommen werden. RNA-Interferenz ist ein natürlicher Prozess, der durch RNA (exogene siRNA oder endogene miRNA) mit der des stillzulegenden Gens homologen Sequenz ausgelöst wird (vgl. Abbildung 8).^[126–128] Die exogene doppelsträngige RNA (dsRNA) wird mit Hilfe der Endonuklease Dicer in kleinere RNA-Fragmente (19-23 Basenpaare) abgebaut. Eine Helikase spaltet die Doppelstränge in Einzelstränge auf, die mit anderen Proteinen (unter anderem Argonaut) den *RNA-induced silencing complex* (RISC) ausbilden. Die siRNA (*antisense*) im RISC bindet an die komplementäre mRNA im Zytoplasma, der RISC baut diese ab und verhindert dadurch die Expression dieses Gens.^[125,129,130] Die Gene für die miRNA befinden sich im Genom. Durch Transkription dieser Gene entstehen Vorläufer miRNAs (pri-miRNA) mit charakteristischer Haarnadel-Struktur. Durch Entfernung der beiden einsträngigen Enden mittels der Endonuklease Drosha entsteht die pre-miRNA. Diese wird ins Zytoplasma transportiert und analog zur siRNA-Biogenese zur miRNA prozessiert. Die Ausbildung des RISC und anschließende Anlagerung an homologe mRNA-Abschnitte unterbindet die Translation. Je nachdem wie komplementär die Stränge sind, kommt es zur Degradation der mRNA oder zur Blockierung der Translation.^[129,131]

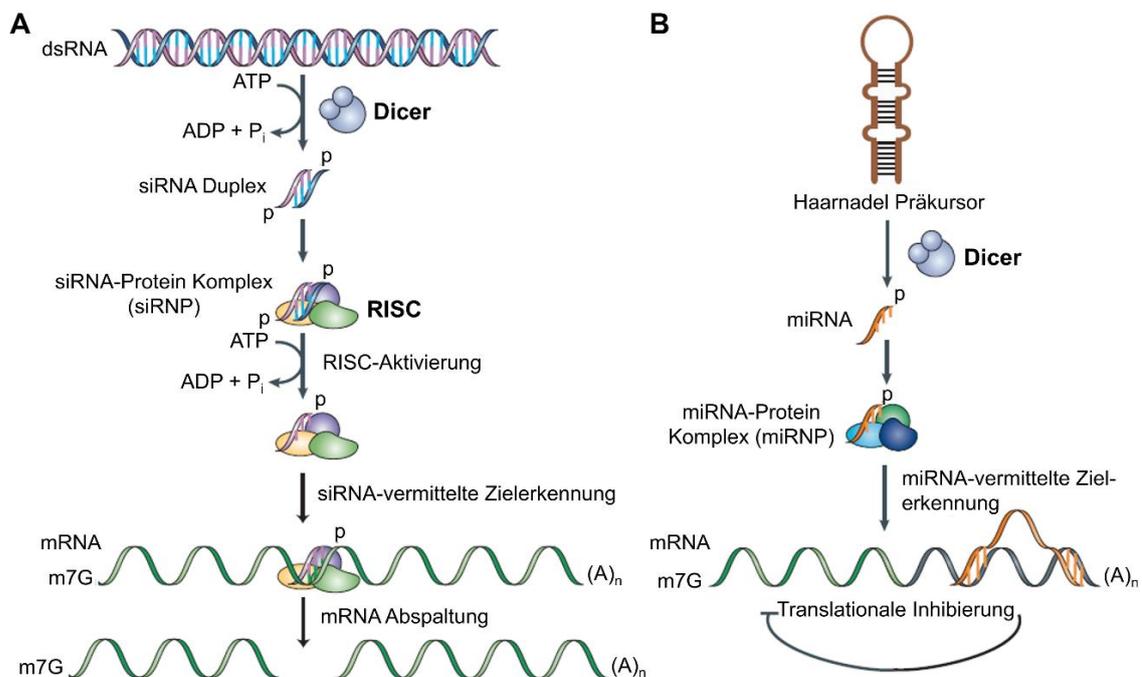


Abbildung 8: Biogenese und Mechanismus der RNA-Interferenz durch siRNA (A) und miRNA (B). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung von *Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003, 4, 457-467)^[130]

Den Prozess der RNA-Interferenz kann man sich in der Therapie vieler Krankheiten zu Nutze machen um spezifische Genfunktionen zu inhibieren.^[132] In der Behandlung zahlreicher Krankheiten, wie Leberzirrhose, Hepatitis B, Knochen- und Eierstockkrebs, konnten synthetische siRNA-Stränge erfolgreich *in vivo* eingesetzt werden.^[124]

Die Anwendung dieser RNA-Stränge ist jedoch auf Transportsysteme begrenzt, da die reinen RNA-Stränge aufgrund der negativen Ladung die Zellmembran nur schwer passieren können. Außerdem werden sie sehr schnell von Nukleasen abgebaut.^[24,133] Häufig werden viral basierte Transportsysteme verwendet, da sie hohe Transfektionsraten aufweisen. Jedoch kann es durch die Verwendung von Viren zu zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen wie Immunantworten, onkogenen Effekten oder Entzündungen kommen. Deshalb legen neuere Forschungen den Fokus auf nanopartikelbasierte Transportsysteme. Neben Polymernanopartikeln und Liposomen werden häufig auch mesoporöse Silikananopartikel eingesetzt.^[24,127,134]

Um die RNA-Moleküle effektiv auf oder in die Partikel zu laden, werden die MSN meist mit positiv geladenen funktionellen Gruppen modifiziert, die durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen RNA interagieren. Unter anderem können Polymerschichten beispielsweise aus PEI^[135–138] oder Poly(2-dimethylaminoethylmethacrylat) (PDMAEMA)^[139] auf die Partikeloberfläche aufgebracht werden, in die sich die siRNA einlagert.

Die Gruppe um Shen konnte durch Kopplung eines Cyclodextrin-PEI(1,8 kDa)-Konjugats an MSN und anschließende Beladung mit siRNA die Expression des PKM2 Gens *in vitro* und *in vivo* reduzieren.^[137] Der Einfluss des Molekulargewichts der adsorbierten PEI-Schicht auf MSN wurde von Xia *et al.* untersucht. Es zeigte sich, dass die Beladungskapazität (Partikel zu RNA Verhältnis: 10-100) unabhängig von der Größe des eingesetzten PEI-Polymers war. Die *Knockdown*-Effizienz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) *in vitro* für Partikel, die mit siRNA beladen und mit PEI des Molekulargewichts 10 bzw. 25 kDa funktionalisiert wurden, lag bei 55 bzw. 60 %. Für dieselben Partikel, die mit niedermolekularem PEI modifiziert wurden (0,6, 1,2 bzw. 1,8 kDa), konnte kaum ein Effekt beobachtet werden.^[136]

Trotz der erfolgreichen Anwendung dieser oberflächlich gebundenen siRNA ist nicht gewährleistet, dass diese gänzlich vor enzymatischem Abbau geschützt ist. Daher kann es von Vorteil sein, die RNA in das Porensystem der Partikel einzulagern.^[24]

Li *et al.* zeigten die Beladung von reinen Silikapartikeln unter dehydratisierten Bedingungen (Guanidin-Hydrochlorid in 67 %igem Ethanol) durch Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Im Anschluss an die Beladung wurden die Poren durch Adsorption von PEI verschlossen. Der erfolgreiche *Knockdown* der Expression des GFP bzw.

des Proteins des B-Zellen-Lymphoms (Bcl2) konnte durch die so verkapselte siRNA *in vitro* erfolgreich nachgewiesen werden.^[132,140]

Der Einfluss der Porengröße von aminofunktionalisierten MSN ($d_{\text{Pore}} = 2, 4, 7, 10$ und 23 nm) auf die Beladung mit kurzen siRNA Sequenzen und deren Stabilität wurde von der Gruppe um Min untersucht.^[141] Für die Partikel mit großen Poren ($7, 10$ und 23 nm) konnte kein Unterschied im Beladungsgrad festgestellt werden. Die Partikel mit 2 bzw. 4 nm großen Poren konnten nur die $0,4$ bzw. $0,6$ fache Menge an siRNA aufnehmen. Dies spiegelte sich auch in der Effizienz des *Knockdowns* von GFP und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) *in vitro* wider. Nach 48 h nahm der Einfluss auf die Expression mit der Porengröße zu. Nach 96 h erreichten die Partikel mit 7 und 10 nm großen Poren eine minimal höhere Reduktion der Expression im Vergleich zu Partikeln mit 23 nm. Für die Partikel mit kleinen Poren konnten nur minimale Effekte beobachtet werden. Kleine Poren (2 und 4 nm) führten dazu, dass große Mengen der siRNA auf der Partikeloberfläche adsorbierten und somit nicht mehr vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt waren.^[141,142]

Die Kombination von siRNA und Chemotherapeutika kann zur Überwindung des *multi drug resistance* in Tumorzellen führen. Die Resistenz gegenüber Krebsmedikamenten resultiert hauptsächlich aus der *pump*- und der *nonpump*-Resistenz. Die *pump*-Resistenz sorgt durch Überexpression von Efflux-Pumpen (z.B. P-Glycoprotein (Pgp)) für eine schnelle Entfernung des Zytostatikums aus der Zelle und somit für eine ineffektive Zerstörung der Tumorzelle. Durch die erhöhte Expression von anti-apoptotischen Proteinen (z.B. Bcl-2) hingegen kann durch die *nonpump*-Resistenz der Tod der Zelle unterbunden werden.^[125] Wird nun gleichzeitig eine siRNA transportiert, die die Überexpression der Effluxpumpe oder der anti-apoptotischen Proteine abschaltet, bleibt der Wirkstoff wiederum in der Zelle und kann dort aktiv werden. Meng *et al.* untersuchten den simultanen Transport von Doxorubicin und Pgp-siRNA auf PEI beschichteten MSN in eine MDR resistente Zelllinie mit P-Glycoprotein-Überexpression. Es zeigte sich, dass durch die siRNA die intrazelluläre Doxorubicin-Konzentration und die Apoptoserate gesteigert werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass die P-Glycoprotein-Expression durch die siRNA erfolgreich unterbunden wurde.^[135] Durch den gemeinsamen Transport von Doxorubicin und Bcl-2 siRNA auf G2-Polyamidoamin (PAMAM) MSN konnten Chen *et al.* die Effizienz der Chemotherapie in resistenten Krebszellen erhöhen. Dies ist ein Beispiel, in dem die *nonpump*-Resistenz durch Inhibierung der Bcl-2 Expression mit Hilfe der siRNA überwunden werden konnte.^[143]

Diese Beispiele zeigen, dass MSN erfolgreich RNA in Zellen transportieren und in Kombination mit dem Transport eines Zytostatikums die Effizienz von Krebstherapien erhöhen können.^[24]

II. Motivation

Mesoporöse Silikananopartikel (MSN) werden aufgrund ihrer Eigenschaften wie mechanischer Stabilität, variabler Oberflächenfunktionalisierungen, kontrollierbarer Partikelmorphologie und hoher spezifischer Oberfläche in unterschiedlichen Gebieten eingesetzt.^[20,144] Durch ihre Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und die Fähigkeit biologische Barrieren zu überwinden haben sie insbesondere in biomedizinischen Anwendungen als Transportsysteme für Medikamente, Radionuklide, Peptide oder Oligonukleotide an Bedeutung gewonnen.^[22,133,144] Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Entwicklung und Charakterisierung von MSN-basierten Transportsystemen für Wirkstoffmoleküle in Krebsstammzellen erfolgen.

Die Synthese von MSN erfolgt in erster Linie über den Sol-Gel-Prozess, welcher es in Kombination mit dem Endotemplatverfahren ermöglicht, Poren in das resultierende Netzwerk einzubringen. Partikeleigenschaften wie Morphologie und Größe haben einen großen Einfluss auf die unspezifische Proteinadsorption oder Dispergierbarkeit ebenso wie die Porengröße auf die Interaktion mit Oligonukleotiden. Durch Syntheseparameter sollte deshalb Einfluss auf die Form und Größe der entstehenden MSN, sowie deren Porengrößen genommen werden.^[145–147]

Die Synthese von sphärischen und stäbchenförmigen Silikananopartikel sollte basierend auf literaturbekannten Systemen über den Sol-Gel-Prozess realisiert werden. Durch Variation der Reaktionstemperatur und Ethylenglykol-Konzentration sollte Einfluss auf die Morphologie sowie die Größe der entstehenden MSN genommen werden. Die physikochemische Untersuchung der MSN erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Stickstoffsorptionsmessungen, dynamischer Lichtstreuung (DLS), Zetapotentialmessungen und Röntgendiffraktometrie (XRD). Die auf diesem Weg synthetisierten MSN dienen als Basis für die weitere Entwicklung von Wirkstoff- und miRNA-Transportsystemen.

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist durch einen rapiden Verlauf gekennzeichnet und führt trotz intensiver Chemotherapien oft zum Tod der Patienten.^[148] Hohe Rezidivraten vermindern zudem die Überlebenschancen.^[149] Leukämische Stammzellen (LSCs) stehen in engem Zusammenhang mit der Initiierung und Entwicklung der AML sowie dem Auftreten von Rezidiven.^[150] Die selektive Entfernung dieser LSCs könnte zur Reduzierung von Nebenwirkungen, Erhöhung der Therapieeffizienz und der Verminderung von Rückfallquoten führen.^[151] Eine Untergruppe von LSCs, welche für die Entstehung und Entwicklung der AML verantwortlich sein kann, unterscheidet sich von gesunden hämatopoetischen Stammzellen durch die Expression des Antigens B220.^[150] Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein

antikörperfunktionalisiertes (anti-B220) MSN-basiertes System für den gezielten Medikamententransport in diese B220-positiven Zellen entwickelt werden.

Trotz zahlreicher Arbeiten, die bereits den Einsatz von MSN als Wirkstofftransportsysteme beschreiben, besteht noch immer ein großer Bedarf, den Einfluss von Partikeleigenschaften, wie Ladung bzw. Funktionalisierung oder der daraus resultierenden unspezifischen Proteinadsorption, auf die Partikel-Zellinteraktion zu verstehen. In der Literatur wird der Einfluss der Oberflächenladung auf die passive Aufnahme der Partikel beschrieben. Bezüglich des Einflusses auf die selektive Aufnahme finden sich allerdings nur sehr wenige Untersuchungen.

Durch die Funktionalisierung aminofunktionalisierter MSN mit unterschiedlichen Mengen Bernsteinsäureanhydrid sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Oberflächenladung auf die selektive Aufnahme von antikörperfunktionalisierten MSN in B220-positive leukämische Stammzellen untersucht werden. Hierbei kann die unspezifische Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche maßgeblich von der Partikelladung bzw. -funktionalisierung bestimmt werden und somit einen großen Einfluss auf die Selektivität der Partikelaufnahme haben. Die Proteinadsorption auf MSN in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung sollte deshalb mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate* - Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und STORM- (*stochastic optical reconstruction microscopy*) Untersuchungen bestimmt werden. Basierend auf den resultierenden Daten erfolgte die Auswahl eines geeigneten Partikelsystems für weitere detaillierte Studien und den gezielten Wirkstofftransport. Die Partikelstabilität unter biologisch relevanten Bedingungen kann das Verhalten *in vitro* und *in vivo* maßgeblich bestimmen, weshalb die Stabilität der MSN und MSN-Antikörperkonjugate in Serum und deren Einfluss auf die selektive Aufnahme *in vitro* analysiert werden sollten. Die Einlagerung des Zytostatikums Daunorubicin in die anorganische Matrix schützt dieses vor metabolischem Abbau und kann dadurch dessen Bioverfügbarkeit verbessern. Der Transport des Daunorubicins mittels MSN in B220-positive Stammzellen und deren Auswirkungen sollte durch *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden.

Nicht nur in Leukämien sind Stammzellen für die Entstehung und Entwicklung sowie das Auftreten von Rezidiven von großer Bedeutung, sondern auch in soliden Tumoren, unter anderem in Brustkrebs.^[152] Da diese Stammzellen aufgrund des schnellen Wachstums einen erhöhten Glucosebedarf aufweisen, können Glucosederivate als Liganden für die selektive Aufnahme in Brustkrebsstammzellen dienen. Zudem wird in der Literatur eine deutliche Verminderung der unspezifischen Proteinadsorption nach Funktionalisierung von Partikeln mit Glucosederivaten beschrieben.^[65,66,153]

Um den Einfluss der Glucosederivat-Funktionalisierung auf unterschiedlich funktionalisierte Partikel zu untersuchen, sollten carboxy-, PEI- und aminofunktionalisierte MSN mit

Glucosamin- bzw. Glucuronsäure modifiziert sowie der Einfluss der Glucosederivat-Funktionalisierung auf die Proteinadsorption und Dispersionsstabilität untersucht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Auswahl des Funktionalisierungskonzeptes für Partikel mit unterschiedlichem Längen-Breiten-Verhältnis (*AR – aspect ratio*) zur Analyse des Einflusses der Morphologie und Größe auf die Dispersionsstabilität und Adsorption von Proteinen.

Die gesteigerte Aktivität des Signaltransduktionsweges Notch steht in Brustkrebs in enger Verbindung mit aggressiver Metastasenbildung und Therapieresistenz.^[152,154] Der Einsatz, der in der Therapie zur Reduktion der Notch-Aktivität eingesetzten γ -Sekretase-Inhibitoren, ist durch ihre hohen Nebenwirkungen limitiert.^[155] Durch Einbringung in MSN und selektiven Transport mittels Glucosederivat-Funktionalisierung lassen sich diese Nebenwirkungen minimieren. Anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Modellen sollte deshalb der selektive Transport des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT mittels Glucosederivat-funktionalisierten MSN unterschiedlicher Ladungen untersucht werden.

Durch die Einbringung von artifizieller miRNA in die Zelle lässt sich durch miRNA-Interferenz gezielt Einfluss auf die Genexpression von Zellen nehmen.^[127] In der Therapie von malignen Zellen können durch den Einsatz von miRNA die Apoptoserate beeinflusst und somit das unkontrollierte Wachstum dieser Zellen reduziert werden.^[156,157] Der Einsatz von miRNA-Strängen ist jedoch aufgrund der negativen Ladung der Oligonukleotide und dem schnellen Abbau durch Nukleasen auf Transportsysteme beschränkt.^[24] MSN weisen eine höhere Biokompatibilität im Vergleich zu den häufig verwendeten viralen Systemen auf und stellen somit eine ideale Plattform für den miRNA-Transport in Zellen dar.^[24]

Um die Interaktion von Oligonukleotiden mit MSN besser verstehen zu können, sollte die Beladung von Modell-DNA-Sequenzen in Abhängigkeit der Oberflächenladung und Porengröße von MSN untersucht werden. Die Freisetzung erfolgte in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Anhand dieser Ergebnisse wurde ein System für den Transport von therapeutisch relevanten miRNA-Strängen in leukämische Stammzellen ausgewählt. Durch den Transport dieser miRNA sollte *in vitro* Einfluss auf das Zellwachstum dieser Zellen genommen werden.

Abbildung 9 gibt eine schematische Übersicht der MSN-basierten Systeme, die im Rahmen dieser Arbeit für den Transport von Wirkstoffmolekülen und miRNA in Krebsstammzellen entwickelt und untersucht wurden.

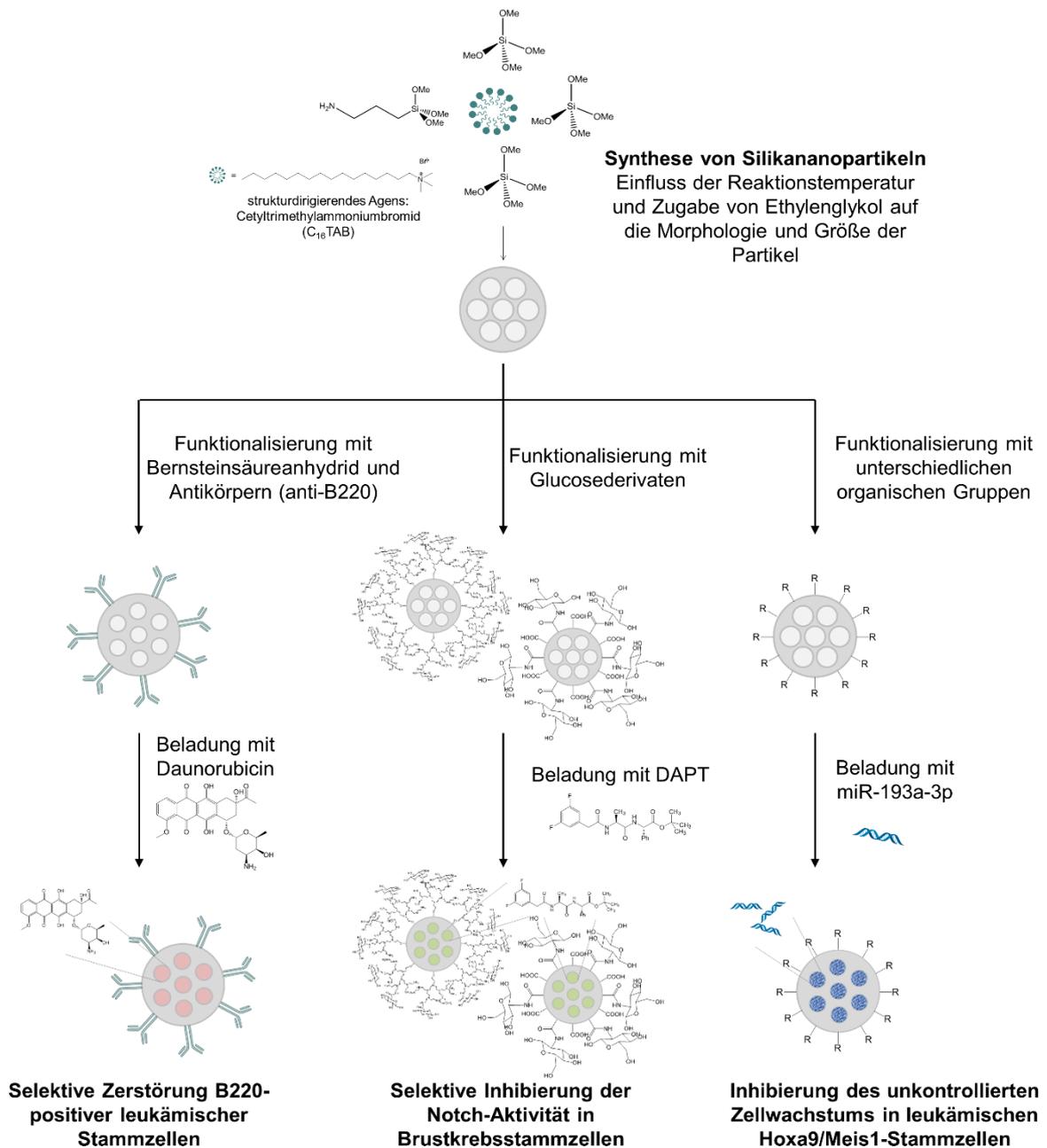


Abbildung 9: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit für den Transport von miRNA und Wirkstoffmolekülen eingesetzten MSN-basierten Systeme.

III. Resultate und Diskussion

1. Synthese von Silikananopartikeln

1.1 Synthese sphärischer Silikananopartikel

Über den Sol-Gel-Prozess können Silika-basierte Materialien unter relativ milden Bedingungen hergestellt werden.^[17] Partikuläre Strukturen entstehen bevorzugt unter basischen Bedingungen. Deshalb erfolgte die Synthese von nicht-porösen und mesoporösen Silikananopartikeln in dieser Arbeit unter Basenkatalyse.

Nicht-poröse, stöberartige Silikananopartikel (SN) wurden nach einer Vorschrift von Sato-Berrú *et al.* durch Verwendung von Tetraethylorthosilikat (TEOS) als Präkursor in einer ammoniakalischen Lösung aus Wasser und Ethanol synthetisiert.^[158] Die partikuläre sphärische Form in der Größenordnung von 170 nm konnte durch transmissionselektronische (TEM) Aufnahmen bestimmt werden (vgl. Abbildung 10). Übereinstimmend damit ist der hydrodynamischen Durchmesser der Partikel von 190 nm, welcher durch dynamische Lichtstreuung in 1 mM KCl bestimmt wurde.

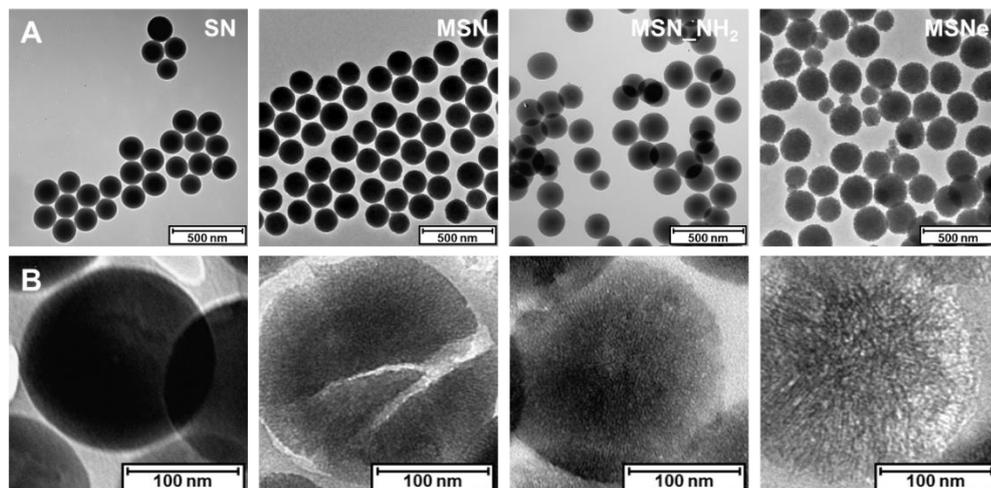


Abbildung 10: TEM-Aufnahmen von sphärischen nichtporösen (SN), calcinierten (MSN), extrahierten (aminofunktionalisierten) (MSN-NH₂) und porenerweiterten (MSNe) Silikananopartikel im Vergleich. Aufnahmen der Partikel (A) sowie von Ultradünnschnitten der Partikel (B).

Durch die Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit dem Endotemplatverfahren können Poren *in situ* in das entstehende Netzwerk eingebracht werden. Die Wechselwirkung zwischen der Silika-Kopfgruppe und dem Templat ist entscheidend für den Erfolg der Templatierung. Die im Basischen vorliegenden, negativ geladenen Silika-Oligomere wechselwirken sehr gut mit kationischen Tensiden (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.2.1). Die Synthese von mesoporösen

Silikananopartikeln (MSN) erfolgte unter Templatierung des kationischen Tensids Cetyltrimethylammoniumbromid (C₁₆TAB) nach einer Vorschrift von Rosenholm *et al.* mit Tetramethoxysilan (TMOS) und (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) in einer alkalischen Lösung von Wasser und Methanol.^[28] Die negativ geladenen Silika-Oligomere bilden mit den C₁₆TAB-Molekülen die Mesophase aus, um die sich das Silikanetzwerk ausbildet (vgl. Einleitung, Abschnitt I.2.1). Durch die Co-Kondensation von TMOS und APTMS konnten *in situ* Aminofunktionen in das entstehende poröse Netzwerk eingebracht werden. Die Entfernung des Templats erfolgte durch Verbrennung aller organischen Gruppen (Calcinierung) (MSN) oder unter Erhalt der Aminofunktionen durch Extraktion in ethanolischer Ammoniumnitratlösung (MSN_{NH₂}). Die durch C₁₆TAB über den Sol-Gel-Prozess templatierten Poren in der Literatur weisen einen Durchmesser von 2-4 nm auf.^[28,87,138,159] Größere Poren können unter Erhalt der Partikelgröße durch nachträgliche hydrothermale Behandlung der Partikel in Anwesenheit eines hydrophoben Quellmittels generiert werden, welches sich in die hydrophoben Teile der Mizellen des strukturdirigierenden Agens (SDA) in den Mesoporen einlagert.^[147] Hierfür wurden die nach Rosenholm *et al.* synthetisierten Partikel (ohne Zusatz von APTMS) in einem Gemisch aus Ethanol, Wasser und dem Quellmittel Trioctylphosphinoxid (TOPO) für 4 Tage bei 125 °C nach einer Vorschrift von Miller *et al.* hydrothermal behandelt.^[160] Im Anschluss an die Porenerweiterung wurde das Tensid durch Extraktion entfernt.

Tabelle 1: Übersicht der Charakterisierungsergebnisse aus TEM, DLS- und Stickstoffsorptionsmessungen sphärischer Silikananopartikel (Mittelwert ± Standardabweichung (St.Abw.)). DLS und Zetapotentialmessungen wurden in 1 mM KCl (pH 5) durchgeführt. (#Ergebnisse der Proben SN und MSNe bestimmt durch Vermessung von Einzelproben)

	Templat- entfernung	d _{TEM} [nm]	d _{DLS} [nm]	ζ-Pot [mV]	S _{BET} [m ² /g]	d _{Pore, NL-DFT} [nm]
SN#	-	170	190	-20	20	-
MSN	Calcinierung	170±20	250±30	-16±3	990±80	3,1±0,2
MSNe#	Extraktion	220	240	-10	680	3-7
MSN _{NH₂}	Extraktion	190±15	260±20	+26±3	860±30	3,4±0,2

Die Partikelgröße wurde durch dynamische Lichtstreuung (DLS) in 1 mM KCl untersucht. Die mesoporösen Partikel zeigten hydrodynamische Durchmesser im Bereich von 240-260 nm (vgl. Tabelle 1) auf. Diese Ergebnisse bestätigten sich durch transmissionselektronenmikroskopischen (TEM)-Aufnahmen (vgl. Abbildung 10 A). Alle Partikel wiesen eine sphärische Struktur mit relativ enger Partikelgrößenverteilung von 170-220 nm auf. Erwartungsgemäß war der durch TEM-Aufnahmen bestimmte Durchmesser etwas kleiner als der durch DLS-Messungen bestimmte hydrodynamische Durchmesser, der

die elektrische Doppelschicht mit berücksichtigt. Auch nach hydrothormaler Behandlung blieb die Partikelmorphologie und -größe erhalten. Zudem konnte durch TEM-Aufnahmen ausgeschlossen werden, dass überbrückte Partikel vorhanden waren, was bei späteren biologischen Anwendungen für die Dispergierbarkeit von enormer Wichtigkeit ist.

Durch TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten (vgl. Abbildung 10 B) gelang es, die lokale Mesostruktur der Partikel abzubilden. Für die Partikel mit 3,0-3,5 nm großen Poren, ließen sich radial nach innen verlaufende Porenkanäle beobachten. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Yano *et al.*, welche diese Porenstrukturierung für Cetyltrimethylammoniumchlorid (C₁₆TAC) templatierte Partikel beobachten konnten.^[161] Die aus der postsynthetischen hydrothermalen Behandlung resultierende Porenerweiterung ist in den TEM-Aufnahmen der Querschnitte deutlich erkennbar.

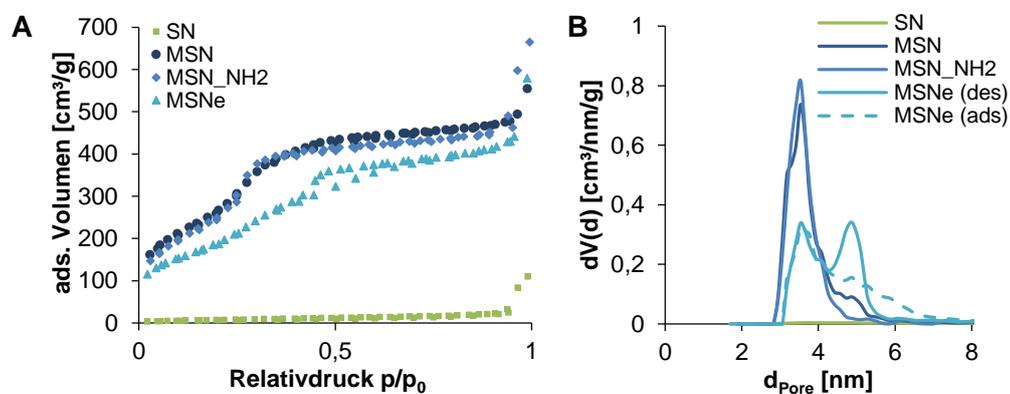


Abbildung 11: (A) Stickstoffsorptionsisothermen und (B) NL-DFT Porendurchmesser-Verteilung sphärischer Partikel ermittelt aus dem Desorptionszweig der Stickstoffsorptionsisothermen. Für die MSNe ist sowohl die Porendurchmesser-Verteilung des Desorptions- (des) als auch des Adsorptionszweiges (ads) dargestellt.

Bestätigt werden konnte dies durch Stickstoffsorptionsmessungen (vgl. Abbildung 11 A). Die mesoporösen Partikel wiesen im Vergleich zu den SN (Typ II Isotherme) eine Isotherme des Typs IV nach IUPAC^[162] auf, was darauf schließen lässt, dass Mesoporen vorlagen. Jedoch wiesen nur die MSNe eine Hysterese auf. Aufgrund der Kapillarkondensation in den Poren bildet sich eine Hystereseschleife bei mesoporösen Materialien aus. Für Stickstoff bei 77 K kann die Kapillarkondensation nur bei Drücken oberhalb von $p/p_0 > 0,42$ auftreten.^[163] Die Form der Hystereseschleife gibt Auskunft über die Porenform. Der Verlauf der Hysterese der MSNe entspricht einer Typ H2 Hysterese nach IUPAC^[162] und lässt darauf schließen, dass Flaschenhalsporen vorlagen. Der relativ steile Verlauf der Porenfüllung für die MSN und MSN_NH₂ im Bereich von 0,2-0,4 p/p_0 weist auf eine enge Porengrößenverteilung hin. Die MSNe zeigten hierbei einen deutlich flacheren Verlauf, was aus einer breiten Porengrößenverteilung resultiert.

Der Porendurchmesser der MSN und MSN-NH₂ wurde durch die nicht-lokale Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT) unter Verwendung des *equilibrium* Kernels für Silika-basierte Materialien mit zylindrischen Poren bestimmt. Diese wiesen eine relativ enge Porenradienverteilung auf (vgl. Abbildung 11 B). Der gemittelte Porendurchmesser liegt mit 3-4 nm im Bereich der für C₁₆TAB über den Sol-Gel-Prozess generierten Poren in der Literatur.^[28,87,138,159] Der Durchmesser der calcinierten war minimal geringer als der für die extrahierten Partikel. Dies liegt am höheren Kondensationsgrad, der aus dem Calciniierungsschritt resultiert. Die hydrothermale Behandlung der Partikel führte zu einer Verbreiterung der NL-DFT-Porendurchmesser-Verteilung. Aufgrund des Vorliegens von Flaschenhalsporen, wurde die Porenradienverteilung für diese Partikel sowohl basierend auf dem Desorptions- als auch auf dem Adsorptionszweig bestimmt (vgl. Abbildung 11 B, MSNe (des) bzw. MSNe (ads)). Sobald der Flaschenhals unterhalb einer kritischen Größe von 5 nm (N₂, 77 K) liegt, wird die Desorption des Stickstoffes im Porenhohlraum durch Kavitation, d.h. die spontane Nukleation einer Blase, beschrieben. Dadurch kann der Hohlraum durch Diffusion geleert werden, während der Flaschenhals gefüllt bleibt.^[164,165] In diesem Fall ist die Auswertung der Porendurchmesser-Verteilung über den Adsorptionszweig aussagekräftiger. Die Porendurchmesser der MSNe liegen somit nach der hydrothermalen Behandlung im Bereich von 3-7 nm. Die veränderte Mesostruktur resultiert aus der Einlagerung des TOPOs in die Mesoporen und anschließender Reorganisation durch Auflösung und Wiederabscheidung des Silikas während der hydrothermalen Behandlung.^[147,160] In der Literatur wird eine Vergrößerung der Poren auf 8 nm mit Verminderung der spezifischen Oberfläche auf ca. 410 m²/g beschrieben.^[160] Der Effekt der Porenerweiterung ist in dieser Arbeit somit geringer als in der Literatur beschrieben.

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche wurde nach der Methode von Brunauer, Emmet und Teller (BET-Methode) auf Grundlage des linearen Anfangsbereichs der Stickstoffsorptionsisothermen $0,05 \leq p/p_0 \leq 0,35$ durchgeführt (vgl. Tabelle 1).^[166] Der Unterschied der spezifischen Oberfläche der nicht-porösen SN von 20 m²/g (theoretisch zu erwartende Oberfläche: 13 m²/g (mittels $d_{\text{Partikel, TEM}} = 190$ nm berechnet)) im Vergleich zu den mesoporösen MSN und MSN-NH₂ von 860-990 m²/g zeigt, dass die Templatierung des C₁₆TABs erfolgreich durchgeführt wurde. Die hydrothermale Behandlung führte zu einer Verminderung der spezifischen Oberfläche auf 680 m²/g, welche aus der steigenden Porengröße und der Verdichtung des Netzwerkes resultiert.

Die erfolgreiche Einbringung von Aminofunktionen durch die simultane Kondensation von APTMS und TMOS konnte qualitativ durch Zetapotentialmessungen in 1 mM KCl nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 12 A). Im Vergleich zu calcinierten MSN, welche mit einem Zetapotential von -16 mV im Bereich für unfunktionalisierte Silikapartikel liegen, hatten

die extrahierten MSN_NH₂ ein Zetapotential von +26 mV. Dies weist auf das Vorliegen von positiv geladenen Funktionen auf der Oberfläche hin.

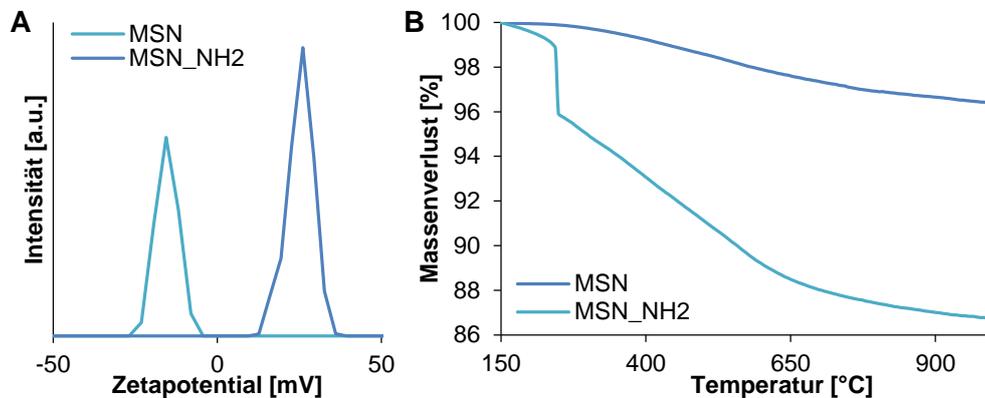


Abbildung 12: Zetapotentialverteilung (A) und TG-Analyse (B) der extrahierten (MSN_NH₂) im Vergleich zu den calcinierten Partikeln (MSN).

Auch quantitativ konnte durch thermogravimetrische (TG) Analyse nachgewiesen werden, dass Aminofunktionen vorliegen. Abbildung 12 B zeigt den typischen Verlauf einer auf 150 °C normierten TG-Analyse für MSN und MSN_NH₂. Bis zu einer Temperatur von 150 °C kommt es zum Verlust von Wasser, das auf der Oberfläche adsorbiert vorliegt. Für die MSN kommt es ab einer Temperatur von ca. 300 °C zu einem Massenverlust von 4 %. Durch Kondensationsvorgänge wird das Silikanetzwerk verdichtet. Dabei kommt es zur Abspaltung von Wasser, welches zum Massenverlust in der TG-Analyse führt. Bei den MSN_NH₂ resultiert der Massenverlust von 12 % im Temperaturbereich von 150-650 °C aus der Zersetzung der kovalent gebundenen organischen Aminofunktionen und aus dem durch Kondensationsvorgängen freigesetzten Wasser. Auch der Massenverlust von 2 % im Bereich von 650-1000 °C geht auf die Verdichtung des Netzwerkes durch Kondensationsreaktionen zurück. Eine exakte quantitative Bestimmung der Aminogruppen aus der TG-Analyse von MSN_NH₂ und MSN ist aufgrund des unterschiedlichen Kondensationsgrades der MSN_NH₂ und der bei 550 °C calcinierten MSN nicht möglich.

1.2 Synthese von MSN unterschiedlicher Form

1.2.1 Partikel mit unterschiedlichem AR

Im Sol-Gel-Prozess lassen sich die Form und Größe der entstehenden Partikel beeinflussen, in dem Parameter wie Temperatur, Rührgeschwindigkeit oder Konzentration der eingesetzten Reaktanden variiert werden.^[145,146,167] Durch Erhöhung des Wasser- und Ammoniakgehalts konnten Cai *et al.* die Morphologie sphärischer zu zylindrischen MSN ändern.^[168] Durch Veränderung der Konzentration von C₁₆TAB und TEOS gelang es Huang *et al.* das Längen-Breiten-Verhältnis (AR – *aspect ratio*) stäbchenförmiger Partikel von AR2 auf AR4 zu ändern. Zudem zeigten sie, dass durch Erhöhung des Lösungsmittelgehaltes sphärische Partikel entstehen.^[84]

Auf Grundlage der Synthese von Huang *et al.*^[84] wurden in dieser Arbeit MSN mit einem Längen-Breiten-Verhältnis von 2 (MSN2) und 4 (MSN4) hergestellt. Außerdem konnten durch Zusatz einer definierten Menge Ethylenglykol (EG) zur Synthese der MSN2 sphärische Partikel (MSN1) hergestellt werden (vgl. Abschnitt III.1.2.3). Die Ausbildung des Netzwerks erfolgte durch C₁₆TAB Templatierung in Wasser unter ammoniakalischer Katalyse mit oder ohne Zugabe von Ethylenglykol. Als Silika-Quelle wurde TEOS eingesetzt.

Die Untersuchung der Form und Größe wurde ausschließlich basierend auf TEM-Aufnahmen durchgeführt, da die Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung für stäbchenförmige Partikel wenig Aussagekraft hat. Der ermittelte hydrodynamische Radius entspricht dem Radius einer Kugel mit ähnlichen Eigenschaften der Stäbchen in Lösung und lässt somit kaum Rückschlüsse auf die tatsächliche Länge und Breite der Partikel zu. Abbildung 13 zeigt die Morphologie der Partikel (A) und deren Mesostruktur (B) anhand von TEM-Aufnahmen.

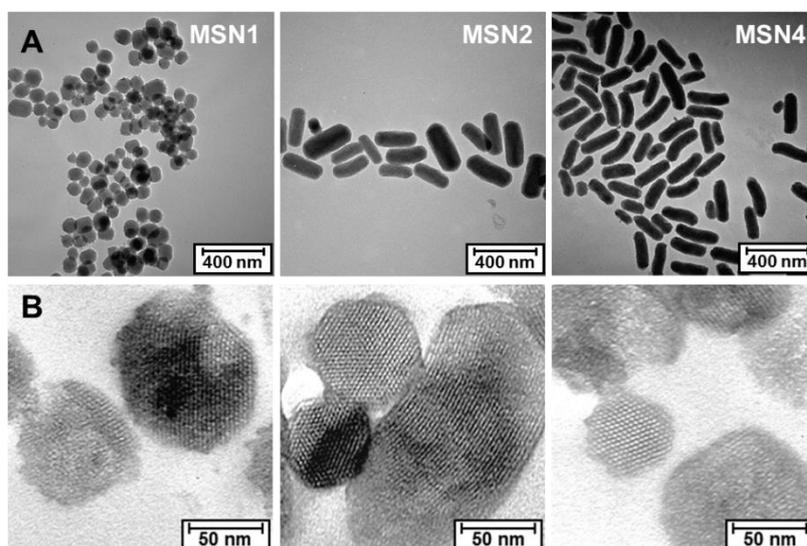


Abbildung 13: Untersuchung der Größe und Morphologie (A) sowie der Porenstruktur (B) der Partikel MSN1, MSN2 und MSN4 mit AR von 1,1, 2,5 und 3,5 mittels TEM.

Die Partikel hatten je nach Menge und Art der eingesetzten Reaktanden ein durchschnittliches AR von 1,1, 2,5 und 3,5 und eine deutlich größere Partikelgrößenverteilung als die sphärischen Partikel (vgl. Abschnitt III.1.1). Durch TEM-Aufnahmen von Partikelquerschnitten konnte lokal eine hochstrukturierte 2D-hexagonale Porenanordnung für die MSN1, MSN2 und MSN4 beobachtet werden.

Durch Röntgendiffraktometrie (XRD) bestätigte sich die Strukturierung der Partikel (vgl. Abbildung 14 C). Die relative Lage der Reflexe entsprach der eines 2D-hexagonal geordneten Porensystems (Raumgruppe $p6mm$) ($1 : \sqrt{3} : 2 : \sqrt{7} \dots$), wodurch die Berechnung der Gitterkonstante a und der Porenwanddicke möglich ist. Für ein 2D-hexagonales Porensystem ist die Gitterkonstante direkt proportional zum Netzebenenabstand d_{10} (vgl. Gleichung 1).^[169]

$$a = \frac{2}{\sqrt{3}} \cdot d_{10} \quad (1)$$

$$d_{\text{Porenwand}} = a - d_{\text{Pore, NL-DFT}} \quad (2)$$

Tabelle 2: Netzebenenabstand (d_{10}), Gitterkonstante (a) und Porenwanddicke der MSN1, MSN2 und MSN4 kalkuliert basierend auf XRD-Messungen.

	d_{10} [nm]	a [nm]	$d_{\text{Porenwand}}$ [nm]
MSN1	3,9	4,5	0,8
MSN2	3,8	4,4	0,7
MSN4	4,0	4,6	0,9

Die Gitterkonstante, welche aus Röntgendiffraktogrammen durch die Beugung an der Netzebenenchar (10) bestimmt wurde, liegt für alle Partikel im Bereich von 3,8-4,0 nm (vgl. Tabelle 2). Aus der Differenz des Porendurchmessers der Partikel und der Gitterkonstante konnte die Porenwanddicke berechnet werden (vgl. Gleichung 2). Die durchschnittlichen NL-DFT-Porendurchmesser der MSN1, MSN2 und MSN4, die aus Stickstoffsorptionsmessungen bestimmt wurden, lagen im Bereich von 3,4-3,7 nm. Somit ergeben sich für die MSN2 und MSN4 Porenwanddicken im Bereich von 0,7-0,9 nm. Der Zusatz von Ethylenglykol führte zu etwas schärferen Reflexen, was aus einer stärker ausgeprägten Strukturierung der Poren resultiert. Durch die Zugabe von Ethylenglykol wird das Reaktionsvolumen vergrößert wodurch der relative Anteil an Wasser, bei gleichbleibendem Wasser zu TEOS Verhältnis, abnimmt und somit die Hydrophobizität der Lösung steigt. Dies kann zur langsameren Hydrolyse des TEOS führen, wodurch mehr Zeit für den Selbstanordnungsprozess der Tensidmoleküle und Silikaspezies bleibt. Dadurch kann eine höhere Strukturierung der Partikel folgen.^[170] Die etwas langsamere

Hydrolysegeschwindigkeit des TEOS konnte auch durch TEM-Aufnahmen zur Untersuchung des Bildungsmechanismus der Partikel beobachtet werden (vgl. Abbildung 16).

Tabelle 3: Charakterisierungsübersicht der Partikel MSN1, MSN2 und MSN4 mit unterschiedlichem AR (Mittelwert \pm St.Abw.). Zetapotential und DLS wurden in 1 mM KCl (pH 5) vermessen.

	d_{TEM} [nm]	l_{TEM} [nm]	AR	d_{DLS} [nm]	ζ -Pot [mV]	S_{BET} [m ² /g]	$d_{Pore, NL-DFT}$ [nm]
MSN1	100 \pm 20	110 \pm 20	1,1 \pm 0,1	270 \pm 70	-9 \pm 2	840 \pm 180	3,4 \pm 0,2
MSN2	100 \pm 20	250 \pm 50	2,5 \pm 0,2	440 \pm 110	-7 \pm 2	1080 \pm 30	3,7 \pm 0,1
MSN4	80 \pm 4	280 \pm 40	3,5 \pm 0,3	480 \pm 150	-9 \pm 6	1030 \pm 70	3,7 \pm 0,0

Abbildung 14 zeigt die Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel unterschiedlicher Morphologie, die alle nach einer Typ IV Isotherme^[162] ohne ausgeprägte Hysterese verlaufen, weshalb keinerlei Aussage über die Porenform möglich ist. Der starke Anstieg der Isotherme bei Relativdrücken von 0,25-0,35 p/p_0 lässt auf eine enge Porengrößenverteilung schließen, die durch die NL-DFT-Methode bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 14 B). Die spezifische Oberfläche nach BET^[166] der MSN1 war mit durchschnittlich 840 m²/g etwas geringer als die der MSN2 und MSN4 im Bereich von 1030-1080 m²/g.

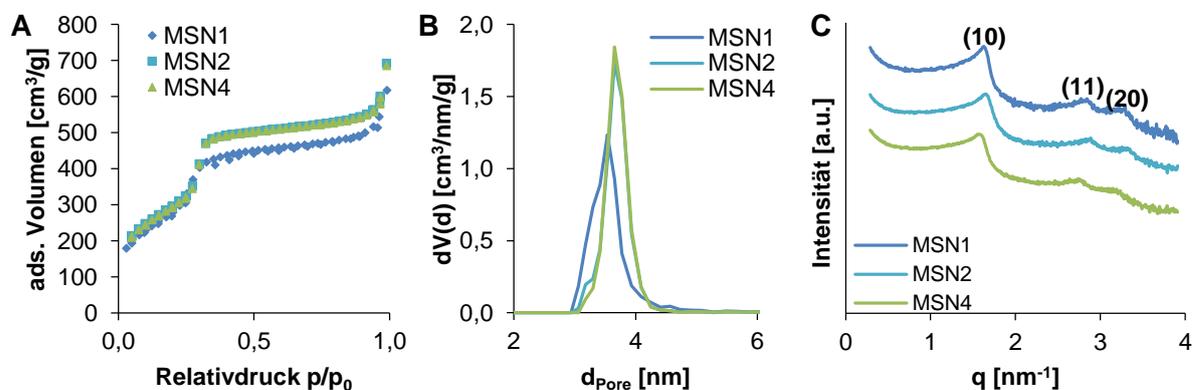


Abbildung 14: Stickstoffsorptionsmessung (A), NL-DFT Porendurchmesser-Verteilung (B) und Röntgendiffraktometrie der calcinierten Partikel mit AR1, 2 und 4 im Vergleich.

Der Bildungsmechanismus der Partikel wurde anhand der MSN1 und MSN2 im Rahmen der Bachelorarbeit von Pascal Piller mit Hilfe von TEM-Aufnahmen und DLS-Messungen untersucht. Während der Reaktion wurden Synthesequoten entnommen und direkt auf Probenträger für TEM-Analysen aufgegeben bzw. unverzüglich am DLS vermessen.

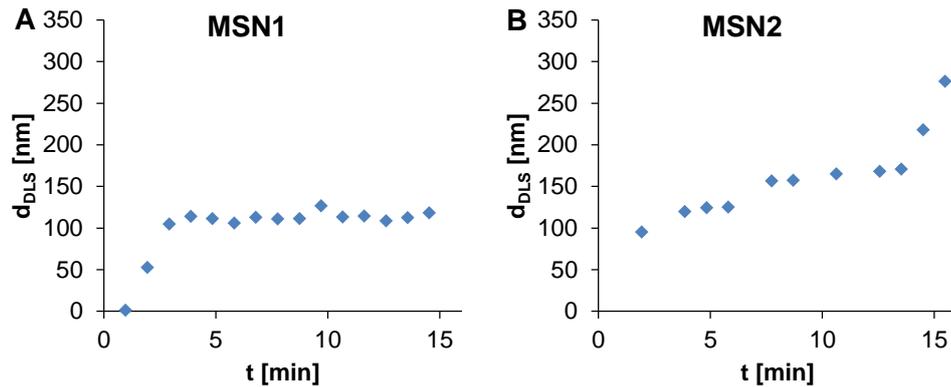


Abbildung 15: Analyse des Bildungsmechanismus von (A) MSN1 und (B) MSN2. Hydrodynamischer Radius in Abhängigkeit der Reaktionszeit bestimmt durch DLS-Messungen der verdünnten Syntheselösung.^[171]

Abbildung 15 zeigt die hydrodynamischen Durchmesser der MSN1 und MSN2 in Abhängigkeit der Reaktionszeit. Der schnelle Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers der MSN1 in den ersten Minuten ist auf die Nukleation und das anschließende Wachstum der sphärischen Partikel zurückzuführen. Bereits nach 3-4 min war die maximale Größe der Partikel erreicht. Diese Beobachtung konnte durch TEM-Aufnahmen bestätigt werden (vgl. Abbildung 16). Während 2 min nach TEOS-Zugabe noch undefinierbare Strukturen vorlagen, die durch die Kondensation von nicht hydrolysiertem TEOS in der Syntheselösung auf dem Probenträger resultieren, sind nach 3 min bereits sphärische Partikel mit finaler Größe sichtbar. Für die MSN2 war ein langsamer Anstieg des hydrodynamischen Radius erkennbar, der relativ konstant im Bereich von ~120-170 nm blieb. Nach ca. 14 min kam es aufgrund der abnehmenden repulsiven Wechselwirkungen zur Agglomeration der Partikel und zu einem Anstieg des hydrodynamischen Radius. Weitere Messungen waren somit nicht mehr sinnvoll. Anhand von TEM-Bildern konnte bestätigt werden, dass es im Gegensatz zu den MSN1 schon nach 2 min zur Ausbildung sphärischer Partikel mit einer Größe von ~ 100 nm kam. Dies ist durch die zunehmende Hydrophobizität der Lösung durch den Zusatz von Ethylenglykol zur Synthese der MSN1 und die damit verbundene reduzierte Hydrolysegeschwindigkeit des TEOS bedingt.^[170] Bereits nach 3 min sind stäbchenförmige Partikel erkennbar. Die Größe dieser Stäbchen unterschied sich nach 5 min nicht mehr von der der Endpartikel.

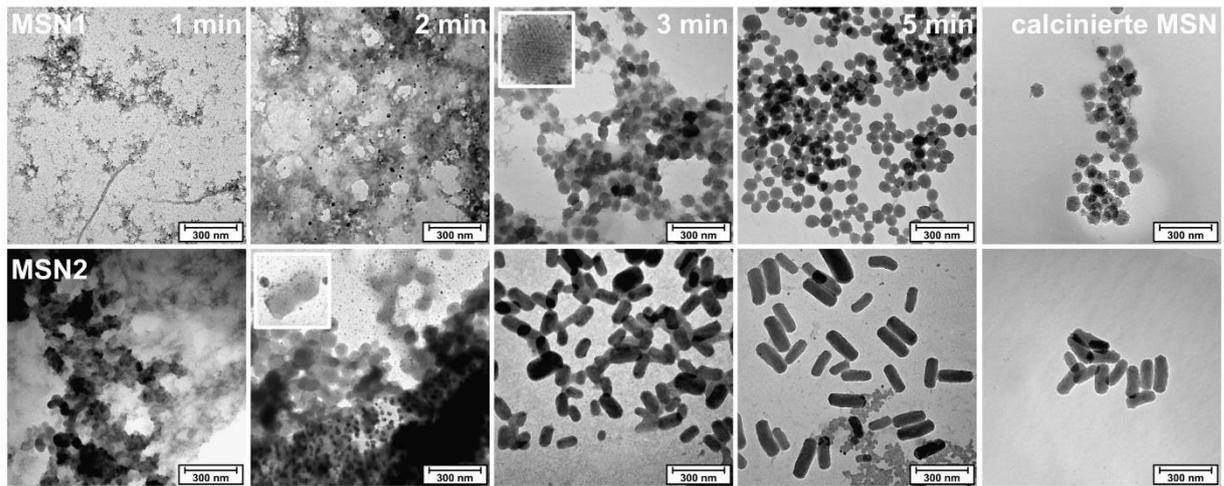


Abbildung 16: Bildungsmechanismus der MSN1 (obere Reihe) und MSN2 (untere Reihe) analysiert mittels TEM der Reaktionslösung nach 1, 2, 3 und 5 min sowie Aufnahmen der MSN, die nach Abschluss der Reaktionszeit von 4 h aufgearbeitet und calciniert wurden.^[171]

Die Zusammenlagerung der sphärischen Partikel zur Ausbildung der stäbchenförmigen Morphologie könnte analog zum Versteifungsprozess von Gelen verstanden werden. Die Ostwald-Freundlich-Gleichung beschreibt die Löslichkeit eines Festkörpers in Abhängigkeit des Radius und der Temperatur (vgl. Gleichung 3).

$$S = S_0 \cdot e^{\frac{2 \cdot \gamma_{SL} \cdot V_m}{R \cdot r \cdot T}} \quad (3)$$

S_0 = Löslichkeit eines flachen Körpers der festen Phase

R = ideale Gaskonstante

V_m = molares Volumen der festen Phase

T = Temperatur

γ_{SL} = Energie an der Grenzfläche fest-flüssig

r = Radius

Die Löslichkeit ist an Stellen mit positivem Radius (r_p) deutlich höher als an weniger stark gekrümmten Flächen. Silika löst sich und lagert sich an Stellen mit negativem Radius wieder an (siehe Abbildung 17).^[15]

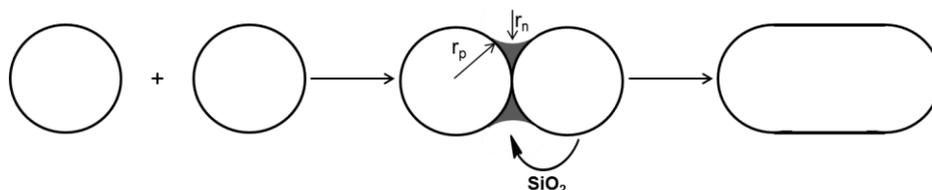


Abbildung 17: Möglicher Bildungsmechanismus stäbchenförmiger Partikel durch die Zusammenlagerung zweier sphärischer Kugeln. (teilweise wiederverwendet aus C. J. Brinker, G. W. Scherer „Sol-Gel Science“ Academic Press Inc., New York, 1990, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)^[15]

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Bildungsmechanismus der stäbchenförmigen Partikel unter diesen Bedingungen in einem ersten Schritt über die Bildung sphärischer Partikel verläuft und nicht wie in der Literatur von Cai *et al.* beschrieben, durch die Ausbildung zylindrischer Silikat-Mizellen, durch die sich das Netzwerk in zylindrischer Form ausbildet.^[168] Die Agglomeration der sphärischen Partikel ist hierbei richtungsabhängig. Durch die ausgebildete 2D-hexagonale Porenstruktur kommt es bevorzugt zur Anlagerung der Partikel, die in durchgehenden Porenkanälen entlang der Partikellänge resultiert und anhand von TEM-Aufnahmen beobachtet werden konnten (vgl. Abbildung 13, MSN_2 (B)). Dies könnte durch die Anisotropie der Oberflächenenergie der sphärischen Partikel erklärt werden. Zudem ist eine lineare Anordnung aufgrund der geringeren resultierenden repulsiven Kräfte bei der Agglomeration von mehr als zwei Kugeln favorisiert (vgl. Abbildung 18). Um jedoch genauere Aussagen treffen zu können und die Annahme, dass der Bildungsmechanismus über sphärische Teilchen abläuft, zu verifizieren, müssten weitere Untersuchungen wie beispielsweise *in situ* SAXS-Messungen durchgeführt werden.

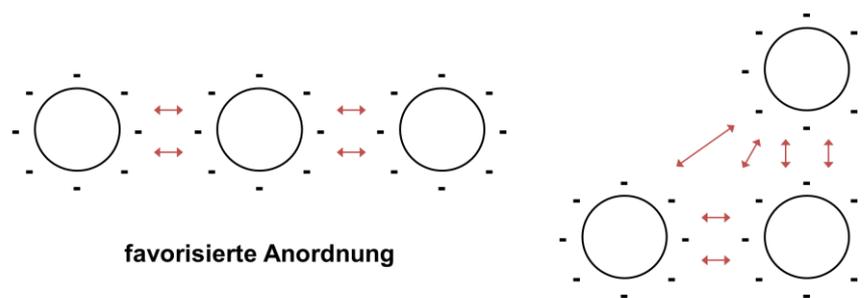


Abbildung 18: Schematische Übersicht der bei der Agglomeration von mehr als zwei Partikeln resultierenden repulsiven Kräfte. (↔ repulsive Kräfte)

1.2.2 Variation der Reaktionstemperatur

Der Einfluss der Reaktionstemperatur wurde anhand der Synthese für stäbchenförmige Partikel mit AR2 nach Huang *et al.*^[84] untersucht. Hierfür wurde die ammoniakalische C₁₆TAB-Lösung jeweils auf 12, 26, 40, 50, 55, 60, 70 bzw. 80 °C temperiert und anschließend unter Rühren die Silika-Vorstufe TEOS hinzugegeben. Die Reaktion wurde über den gesamten Zeitraum von 4 h konstant bei der jeweiligen Temperatur durchgeführt.

Mittels TEM wurde die Änderung der Morphologie der Partikel untersucht. Abbildung 19 zeigt, dass mit steigender Temperatur sowohl das AR, als auch die Partikelgröße deutlich abnahmen (vgl. Tabelle 4). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Yano überein, welcher die Abnahme der Größe von sphärischen MSN mit steigender Reaktionstemperatur beobachten konnte.^[167] Mit steigender Temperatur steigt die Anzahl an Nukleationskeimen in

der Lösung bzw. die Partikelanzahl, was eine Verminderung der Partikelgröße zur Folge hat.^[167,172,173]

In der Literatur wird von der Erhöhung des Betrags des Zetapotentials von Silikananopartikeln mit zunehmender Temperatur berichtet, welche in erster Linie durch die Oberflächenladungsdichte kontrolliert wird.^[174,175] Durch den mit der Temperatur steigenden Kondensationsgrad der entstehenden Silikananopartikel sowie die höhere Löslichkeit kann die Oberflächenladung und somit die repulsiven Kräfte zwischen den Partikeln zunehmen. Dies deutet darauf hin, dass die Dispersionen der entstehenden Partikel mit zunehmender Temperatur stabiler werden und somit die Partikelagglomeration, die zur Ausbildung von stäbchenförmigen Partikeln notwendig ist, unwahrscheinlicher wird.

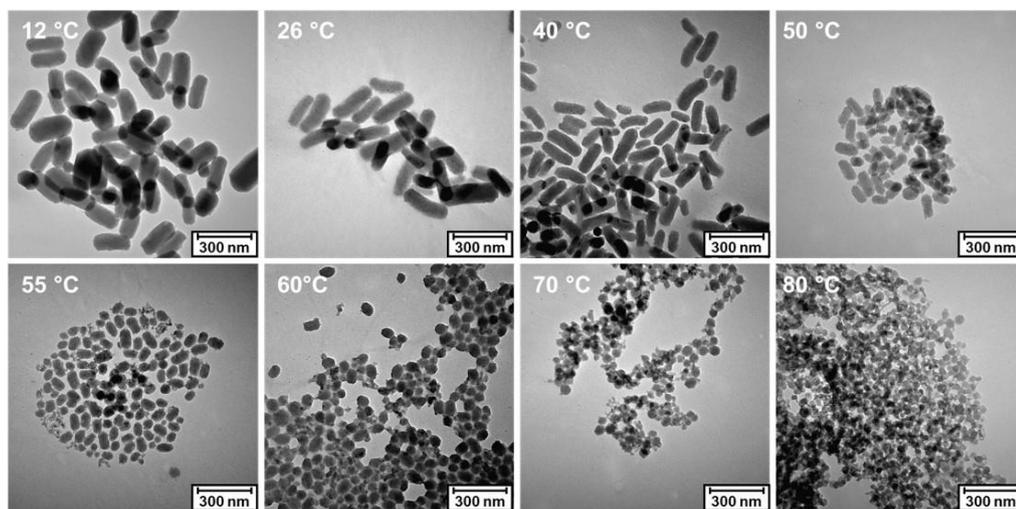


Abbildung 19: Einfluss der Temperatur auf die Morphologie der resultierenden Partikel analysiert mittels TEM.

Die Lage der (10), (11) und (20) Reflexe in Röntgendiffraktogrammen der Partikel mit Reaktionstemperaturen im Bereich von 12 bis ca. 50 °C entsprechen der von 2D-hexagonalen strukturierten Materialien (Raumgruppe $p6mm$) (vgl. Abbildung 20 B). Mit steigender Temperatur nahm die Strukturierung der Partikel deutlich ab. Der (10)-Reflex wird merklich breiter und die Reflexe höherer Ordnung ((11) und (20)) sind kaum mehr vorhanden. Durch die Zunahme der Temperatur steigt die Hydrolyse- und Kondensationsgeschwindigkeit an. Dadurch verbleibt weniger Zeit für den Selbstanordnungsprozess von TEOS und $C_{16}TAB$, was eine verminderte Strukturierung des Porensystems zur Folge haben kann.^[170]

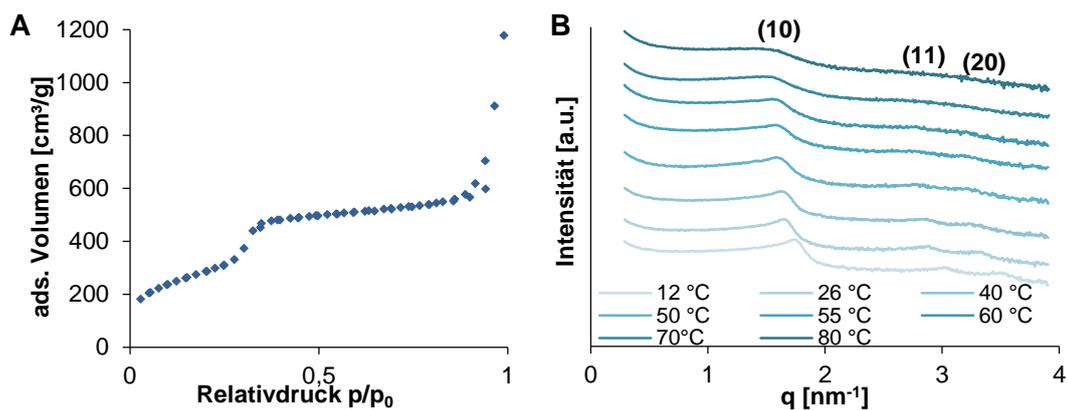


Abbildung 20: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Porosität der Partikel. (A) Stickstoffsorptionsisotherme der Partikel, die bei 55 °C hergestellt wurden und (B) Strukturierung der Poren der Partikel die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen hergestellt wurden ermittelt durch Röntgendiffraktometrie.

Abbildung 20 A zeigt exemplarisch die Stickstoffsorptionsisotherme der Partikel, die bei einer Temperatur von 55 °C synthetisiert wurden (Stickstoffsorptionsisothermen der restlichen Partikel finden sich im Anhang, Abbildung 75). Alle Isothermen zeigen den für mesoporöse Materialien typischen Verlauf einer Typ IV Isotherme nach IUPAC^[162], jedoch ohne ausgeprägte Hysterese. Die spezifische Oberfläche der Partikel zeigte keinerlei Veränderung durch die Variation der Reaktionstemperatur und lag für alle Partikel im Bereich von 960-1120 m²/g. Der Porendurchmesser, kalkuliert nach der NL-DFT-Methode, lag für alle Partikel unabhängig von der Reaktionstemperatur im Bereich von 3,5-3,8 nm. Die Netzebenenabstände, kalkuliert auf Grundlage des (10)-Reflexes, lagen im Bereich von 3,6-4,1 nm, weshalb sich für die Partikel eine Porenwanddicke im Bereich von 0,7-1,0 nm ergab.

Tabelle 4: Exemplarische Ergebnisse der Stickstoffsorptionsmessungen, Röntgendiffraktometrie und TEM-Messungen der Partikel, die bei Temperaturen von 12-80 °C hergestellt wurden.

T [°C]	12	26	40	50	55	60	70	80
S_{BET} [m²/g]	1100	1080	1050	1070	1050	980	960	1120
d_{Pore, NL-DFT} [nm]	3,5	3,7	3,7	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
d_{TEM} [nm]	90	80	60	80	80	60	50	40
l_{TEM} [nm]	210	240	170	170	130	70	-	-
AR	2,3	3,0	2,8	2,1	1,6	1,2	1,0	1,0
d₁₀ [nm]	3,6	3,8	3,9	4,0	4,0	4,1	4,1	4,1
a [nm]	4,2	4,4	4,5	4,6	4,6	4,7	4,7	4,8
d_{Porenwand} [nm]	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl die Partikelgröße als auch das AR mit steigender Temperatur aufgrund der steigenden Anzahl an Nukleationskeimen sank. Zudem konnte eine Abnahme der Strukturierung der Partikel bei nahezu gleichbleibender spezifischer Oberfläche bei höheren Temperaturen beobachtet werden. Auch die Porenwanddicke, kalkuliert auf der Basis eines 2D-hexagonalen Porensystems, war nahezu unabhängig von der Temperatur. Die abnehmende Strukturierung könnte durch die mit der Temperatur ansteigende Kondensations- und Hydrolysegeschwindigkeit begründet werden.

1.2.3 Einfluss der Zugabe von Ethylenglykol

Da Tetraalkoxysilane mit Wasser nicht mischbar sind, werden Co-Solvenzien wie Alkohole oft zur Homogenisierung der Syntheselösungen eingesetzt. Zudem lassen sich dadurch auch die polaren Eigenschaften der Reaktionslösung beeinflussen.^[15] Im Folgenden soll der Einfluss der Zugabe von Ethylenglykol auf die entstehenden Partikel untersucht werden. Als Ausgangssynthese wurde, wie in Abschnitt III.1.2.2, die Synthese von MSN mit einem AR2 nach Huang *et al.*^[84] verwendet.

Die Untersuchung der Morphologie mittels TEM (vgl. Abbildung 21) zeigte, dass mit steigender Menge an Ethylenglykol in der Lösung das AR der Partikel von 2,5 auf 1,1, bei nahezu gleichbleibender Breite absank. Die Gruppe um Okubo beschreibt, dass sich zum einen die hydrophoben Eigenschaften der Syntheselösung durch die Zugabe von Ethylenglykol erhöhen und zum anderen die Viskosität der Lösung ansteigt.^[170] Dies bedingt eine langsamere Hydrolyse- und Kondensationsgeschwindigkeit. Generell wird die Bildung von sphärischen Partikeln bevorzugt, wenn dadurch die Oberflächenenergie eines Partikels verringert werden kann.^[167] Daher sind langsamer ablaufende Bildungsreaktionen essentiell für die Herstellung sphärischer Partikel.^[167]

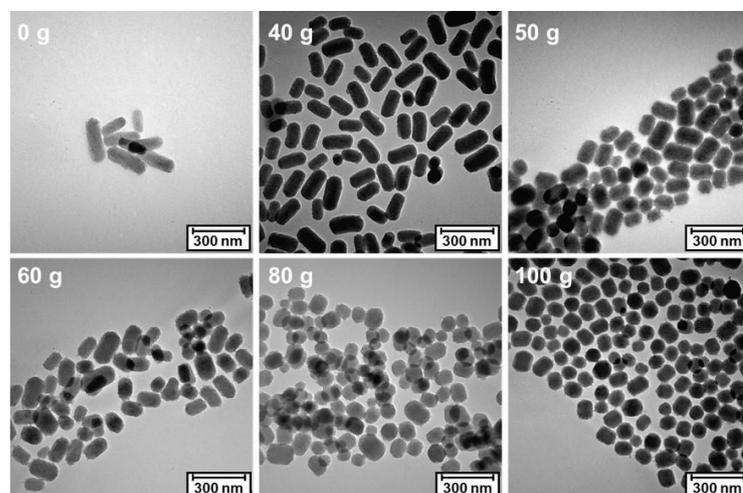


Abbildung 21: Einfluss von Ethylenglykol (0, 40, 50, 60, 80 und 100 g) auf die Synthese von stäbchenförmigen Partikeln. Die Partikelform wurde mittels TEM analysiert.

Die spezifische Oberfläche der Partikel wurde durch die Zugabe von Ethylenglykol nicht stark beeinflusst. Alle Partikel wiesen eine nach Typ IV^[162] verlaufende Stickstoffsorptionsisotherme mit spezifischen BET-Oberflächen im Bereich von 960-1080 m²/g auf. Abbildung 22 A zeigt exemplarisch die Stickstoffsorptionsisotherme der Partikel, die unter Zusatz von 50 g Ethylenglykol hergestellt wurden (die Stickstoffsorptionsisothermen der anderen Partikel finden sich im Anhang, Abbildung 76). Der NL-DFT-Porendurchmesser lag für alle Partikel im Bereich von 3,5-3,7 nm.

Tabelle 5: Exemplarische Ergebnisse der Stickstoffsorptionsmessungen, Röntgendiffraktometrie und TEM-Messungen der Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Ethylenglykol hergestellt wurden.

m_{Ethylenglykol} [g]	0	40	50	60	80	100
S_{BET} [m²/g]	1080	1080	990	960	1060	1040
d_{Pore,NL-DFT} [nm]	3,5	3,5	3,7	3,7	3,7	3,7
d_{TEM} [nm]	130	80	80	90	90	80
l_{TEM} [nm]	340	170	130	140	110	100
AR	2,5	2,1	1,6	1,6	1,2	1,2
d₁₀ [nm]	3,7	3,7	3,9	3,9	3,9	3,9
a [nm]	4,3	4,3	4,5	4,6	4,5	4,5
d_{Porenwand} [nm]	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8

Die Zugabe von Ethylenglykol hatte keinen großen Einfluss auf die Strukturierung der Partikel. Die Reflexe in den Röntgendiffraktogrammen (vgl. Abbildung 22) sind mit steigender Menge an Ethylenglykol minimal schärfer ausgeprägt. Wie in Abschnitt III.1.2.1 beschrieben, vermindert sich die Hydrolysegeschwindigkeit des TEOS durch die Zugabe von Ethylenglykol und es kann dadurch zu einer höheren Strukturierung der Partikel kommen.^[170] Alle Partikel wiesen eine 2D-hexagonale Strukturierung auf, bestimmt durch die relative Reflexlage des (10), (11) und (20) Reflexes in Röntgendiffraktogrammen. Die Netzebenenabstände lagen im Bereich von 3,7-3,9 nm. Die Wanddicke der Poren lag für alle Partikel, unabhängig von der eingesetzten Menge an Ethylenglykol, im Bereich von 0,8-0,9 nm.

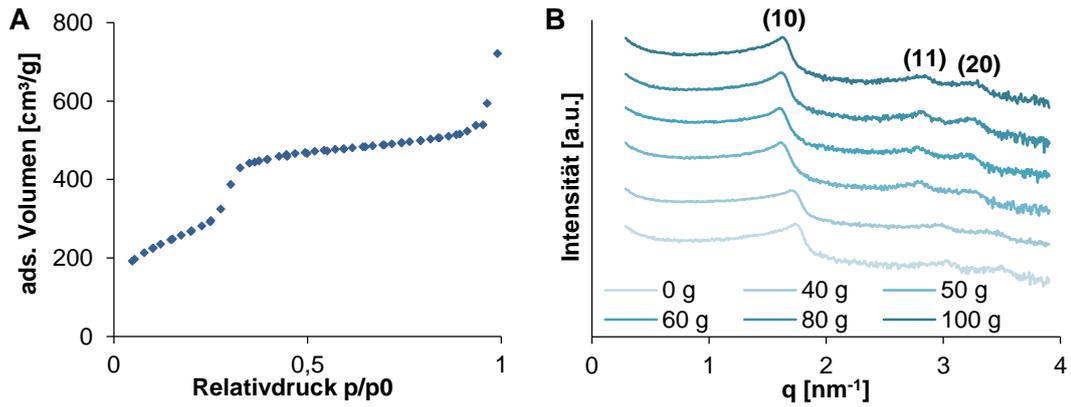


Abbildung 22: Einfluss von Ethylenglykol auf die Porosität der Partikel. (A) Exemplarische Stickstoffsorption der Partikel, die mit 50 g Ethylenglykol hergestellt wurden. (B) Strukturierung der Poren der Partikel ermittelt durch Röntgendiffraktometrie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zugabe von Ethylenglykol zu einer Verringerung des AR bei nahezu gleichbleibender Partikelbreite führte. Die spezifische Oberfläche sowie die Strukturierung der Partikel blieben nahezu unverändert.

2. Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen

Die folgenden Ergebnisse wurden in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Christian Buske (Experimentelle Tumorforschung, Universitätsklinikum Ulm) und Herrn Dr. Lorenzo Albertazzi (Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona (Spanien)) erarbeitet. Die Untersuchung der Partikel in vitro wurde von Tamoghna Mandal und die Analyse der Proteinadsorption mittels STORM von Natalia Feiner-Gracia durchgeführt. Die Resultate wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht: „Serum protein adsorption enhances active leukemia stem cell targeting of mesoporous silica nanoparticles“^[56], „Super-resolution microscopy unveils dynamic heterogeneities in nanoparticle protein corona“^[176] und „Targeting murine leukemic stem cells by antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles“^[177]. Letzteres wurde im Rahmen der Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) publiziert.^[177]

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, in der durch die Entartung bzw. unkontrollierte Vermehrung von hämatopoetischen Progenitorzellen die Anzahl myeloider Zellen im Knochenmark und häufig auch im Blut (Leukozytose) deutlich ansteigt.^[178,179] Diese Erkrankung zeichnet sich durch einen rapiden Verlauf aus und führt unbehandelt innerhalb von wenigen Monaten zum Tod.^[148]

Standardtherapien bestehen aus intensiven Chemotherapien und einer sich eventuell anschließenden Stammzellentransplantation. Die hierbei verwendeten Zytostatika wie Daunorubicin, Idarubicin und Cytarabin weisen jedoch sehr starke Nebenwirkungen auf, da bei systemischer Applikation sowohl gesunde als auch entartete Zellen des hämatopoetischen Systems zerstört werden.^[148,180] Zudem vermindern hohe Rückfallquoten trotz initialer vollständiger Remission die Überlebenschancen der Patienten.^[149] Nach einer Standardtherapie liegen die Heilungschancen der Patienten im Alter von 18-60 Jahren bei 40-45 % und sinken für über 60-jährige drastisch auf 15-20 % ab.^[148] Aus den genannten Gründen ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien ein essentieller Ansatz in der Therapie der AML um die Überlebenschancen der Patienten zu erhöhen.

Leukämische Stammzellen (LSCs – *leukemic stem cells*) können die Entstehung von Leukämien initiieren und werden für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich gemacht.^[150] Durch selektive Entfernung der LSCs aus dem Organismus könnten Nebenwirkungen reduziert, die Effizienz von Standardchemotherapien deutlich erhöht und Rückfallquoten minimiert werden.^[151] Jedoch stellt die hohe Ähnlichkeit von LSCs und gesunden hämatopoetischen Stammzellen (HSCs – *hematopoietic stem cells*) eine Herausforderung für die erfolgreiche Anwendung dar.

Der Gruppe um Buske ist es in einem murinen Modell gelungen, LSCs zu identifizieren, die sich durch die Expression des Antigens B220 von den HSCs unterscheiden und die im murinen Organismus zur Entstehung der AML führen können. Auch Patienten mit der *CALM/AF10*-positiven Form der AML weisen dieses Oberflächenprotein auf.^[150]

Im folgenden Teil dieser Arbeit soll die Entwicklung eines auf MSN basierenden Wirkstofftransportsystems für die gezielte selektive Aufnahme in B220-positive leukämische Stammzellen vorgestellt werden. Durch den Einsatz von Daunorubicin-beladenen MSN wurde die Effizienz anhand eines murinen Modells *in vitro* analysiert.

2.1 Partikelfunktionalisierung

Die Synthese aminofunktionalisierter mesoporöser Silikananopartikel (MSN_{NH_2}) erfolgte wie in Abschnitt III.1.1 beschrieben durch die Co-Kondensation von TMOS und APTMS in einem Gemisch aus Wasser und Methanol unter alkalischer Katalyse und dem Einsatz von C_{16}TAB als SDA. Nach extraktiver Entfernung des Tensids wurden sphärische Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von ~190 nm erhalten.

Durch postsynthetische Funktionalisierung der MSN_{NH_2} mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid (0,02 ($\text{MSN}_{\text{c}5}$), 0,1 ($\text{MSN}_{\text{c}4}$), 0,4 ($\text{MSN}_{\text{c}3}$), 2 ($\text{MSN}_{\text{c}2}$) und 4 mmol ($\text{MSN}_{\text{c}1}$) /g MSN_{NH_2}) lässt sich die Ladung der Partikel variieren. Die Aminogruppen der MSN_{NH_2} werden partiell in Carboxygruppen umgewandelt (vgl. Abbildung 23), was mit steigender Menge an Bernsteinsäureanhydrid zu einer sukzessiven Abnahme der Partikelladung führen soll.

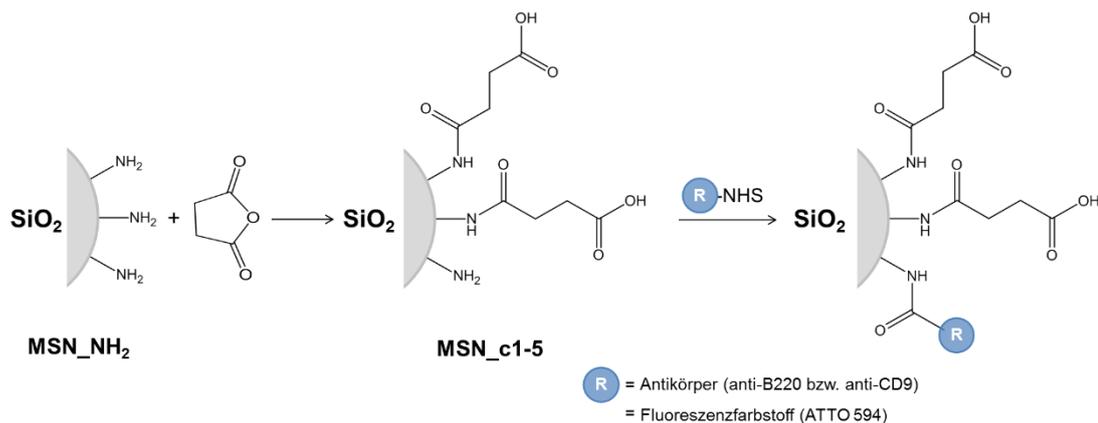


Abbildung 23: Schematische Übersicht der Funktionalisierung aminofunktionalisierter mesoporöser Silikananopartikel (MSN_{NH_2}) mit Bernsteinsäureanhydrid ($\text{MSN}_{\text{c}1-5}$) und folgender Modifizierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO 594) und/oder Antikörper (anti-B220 bzw. anti-CD9). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung^[56,177])

Um die Hydrolyse des Bernsteinsäureanhydrids vor der Funktionalisierung zu unterbinden, wurde adsorptiv gebundenes Wasser auf der Oberfläche und in den Poren der Partikel durch

Trocknung im Vakuum entfernt. Der anschließende Modifizierungsschritt der MSN-NH₂ wurde über einen Zeitraum von 24 h bei Raumtemperatur in trockenem Ethanol unter ständiger Bewegung durchgeführt.

Die Veränderung der Partikelladung mit zunehmender Menge an eingesetztem Bernsteinsäureanhydrid konnte qualitativ durch Zetapotentialmessungen verfolgt werden. In Abbildung 24 A sind die Zetapotentiale in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) und die durch Zetapotentialtitrationen bestimmten isoelektrischen Punkte (IEP) (vgl. Anhang, Abbildung 78 A) in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid dargestellt. Die Abnahme des Zetapotentials und des IEP mit steigender Menge an eingesetztem Bernsteinsäureanhydrid deutet auf eine erfolgreiche Funktionalisierung hin. Ab einer eingesetzten Menge von 2 mmol/g MSN-NH₂ wurde ein Minimalwert sowohl für das Zetapotential, als auch für den IEP erreicht, der auch durch die Funktionalisierung mit 4 mmol/g nicht weiter absank. Dies lässt darauf schließen, dass bereits durch die Verwendung von 2 mmol/g Bernsteinsäureanhydrid der maximale Funktionalisierungsgrad erreicht ist. Die Messung des Zetapotentials in 1 mM KCl-Lösung ist aufgrund der hohen Streubreiten der Messungen nicht aussagekräftig (vgl. Tabelle 6). Minimale Rückstände an Bernsteinsäureanhydrid auf der Partikeloberfläche können aufgrund der fehlenden Pufferwirkung in einer 1 mM KCl-Lösung eine starke Veränderung des pH-Wertes und somit des Zetapotentials zur Folge haben.

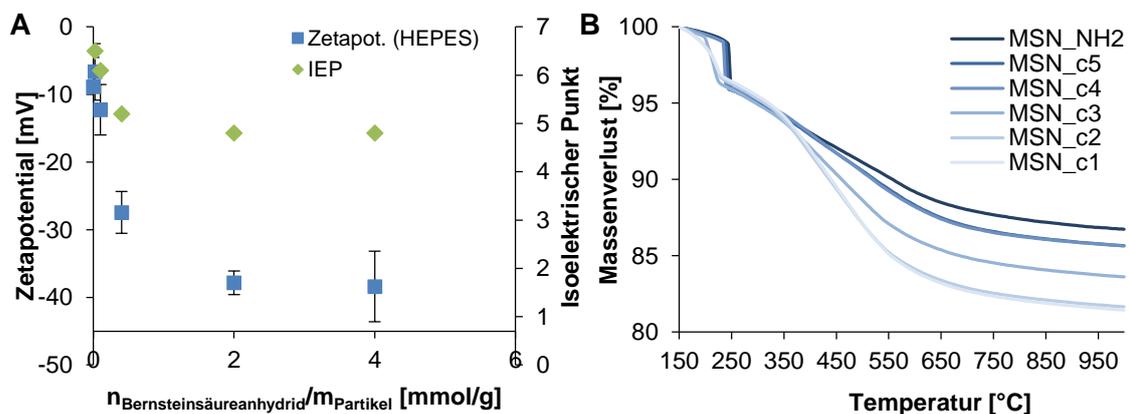


Abbildung 24: (A) Verlauf des Zetapotentials in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) (Mittelwert \pm St.Abw.) und des isoelektrischen Punkts sowie (B) thermogravimetrische Analyse (normiert auf 150 °C) in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Die Partikelfunktionalisierung konnte semi-quantitativ mittels TG analysiert werden. In Abbildung 24 B ist der auf 150 °C normierte Massenverlust in Abhängigkeit der Temperatur für die jeweiligen Partikel dargestellt. Mit steigender Menge an eingesetztem Bernsteinsäureanhydrid nahm der Massenverlust im Temperaturbereich von 150-650 °C zu,

der dem Verlust von organischen Gruppen entspricht. Auf eine quantitative Bestimmung des Funktionalisierungsgrades wurde aufgrund des hohen relativen Fehlers dieser Methode verzichtet.

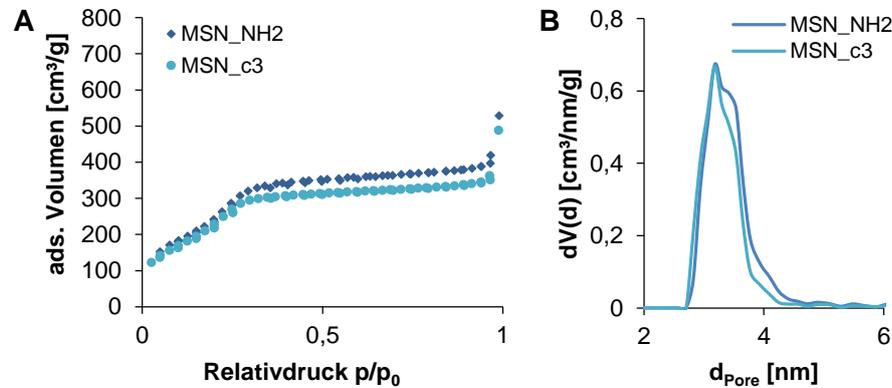


Abbildung 25: (A) Stickstoffsorptionsisotherme und (B) NL-DFT Porenradienverteilung der Partikel MSN_NH₂ und MSN_c3.^[56]

Die Analyse der spezifischen Oberfläche und des Porendurchmessers erfolgte anhand von Stickstoffsorptionsmessungen. In Abbildung 25 A sind die Stickstoffsorptionsisothermen der MSN_NH₂ und MSN_c3 exemplarisch dargestellt (die Isothermen der restlichen Partikel finden sich im Anhang, Abbildung 77). Alle Partikel wiesen, unabhängig von der eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid, Stickstoffsorptionsisothermen mit dem für mesoporöse Materialien charakteristischen Verlauf einer Typ IV-Isotherme nach IUPAC^[162] auf. Die spezifische Oberfläche wurde nach der BET-Methode bestimmt (vgl. Tabelle 6). Durch die Funktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid sank die durchschnittliche spezifische Oberfläche der MSN_NH₂ von 860 m²/g auf 700-730 m²/g ab. Der Porendurchmesser wurde mit Hilfe der NL-DFT-Methode bestimmt (vgl. Tabelle 6). Analog zur Abnahme der spezifischen Oberfläche verringerte sich der durchschnittliche Porendurchmesser durch den Modifizierungsschritt von 3,4 nm (MSN_NH₂) auf 3,1-3,3 nm. Abbildung 25 B gibt die Verteilung des Porendurchmessers exemplarisch für die MSN_NH₂ und MSN_c3 wieder. Beide Partikel wiesen eine relativ enge Porengrößenverteilung auf.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen stellen die Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten MSN eine zuverlässige Plattform für die Entwicklung eines Transportsystems für die gezielte Aufnahme dar. Durch die Anbindung des Immunglobulin G (IgG)-Antikörpers *anti-human/mouse CD45R (B220)* (anti-B220) soll die gezielte Aufnahme in B220-positive leukämische Stammzellen ermöglicht werden.

IgG-Antikörper bestehen aus zwei identischen kurzen („leichten“) und zwei identischen langen („schweren“) Polypeptidketten, die eine flexible Y-Struktur ausbilden. Am N-Terminus dieser

vier Ketten befinden sich die variablen Regionen, die den Antigen-Bindungsstellen zugeordnet werden können. Der Stamm der Y-Struktur, das sogenannten Fc- (*fragment crystallizable*) Fragment, besteht aus der C-terminierten Domäne der schweren Ketten.^[181] Durch Anbindung der Carboxygruppen der C-terminierten Domäne sollen die Antikörpermoleküle unter Erhalt der Zugänglichkeit der Antigen-Bindungsstellen an die Partikel angebunden werden. Die Aktivierung der COOH-Gruppe erfolgte mittels EDC und NHS, um die kovalente Anbindung an die Aminogruppen der Partikel unter relativ milden Bedingungen (RT, physiologische pH-Werte) zu ermöglichen, welche für den Erhalt der Aktivität bzw. der Struktur des Antikörpers erforderlich sind.^[5,182]

Tabelle 6: Charakterisierungsergebnisse aus DLS und Stickstoffsorptionsmessungen der Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen Bernsteinsäureanhydrid (BA) funktionalisiert wurden (Mittelwert \pm St.Abw.). DLS und Zetapotentialmessungen wurden für Partikel ohne Antikörperfunktionalisierung in 1 mM KCl (pH 5) (*) und HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) (**) sowie für anti-B220 funktionalisierte Partikel in DMEM mit 15 % FCS (***) durchgeführt. IEP der Partikel wurden durch Zetapotentialtitrationen bestimmt.^[56,177]

Partikel	$n_{BA}/m_{Partikel}$ [mmol/g]	d_{DLS} [nm]*	S_{BET} [m ² /g]	$d_{Pore, DFT}$ [nm]	ζ -Pot [mV] *	ζ -Pot [mV] **	IEP ohne anti-B220	IEP mit anti-B220 (anti-CD9)	ζ -Pot [mV] *** (anti-B220)
MSN_NH ₂	0	260 \pm 20	860 \pm 30	3,4 \pm 0,2	+26 \pm 3	-9 \pm 4	6,7	8,0	-8
MSN_c5	0,02	250 \pm 130	700 \pm 140	3,2 \pm 0,1	+29 \pm 4	-7 \pm 4	6,5	7,9	-9
MSN_c4	0,1	270 \pm 30	730 \pm 140	3,1 \pm 0,2	+27 \pm 9	-12 \pm 4	6,1	7,3	-9
MSN_c3	0,4	320 \pm 90	710 \pm 150	3,3 \pm 0,2	+13 \pm 18	-27 \pm 3	5,2	7,2 (6,9)	-10
MSN_c2	2	270 \pm 40	730 \pm 120	3,2 \pm 0,2	-6 \pm 22	-38 \pm 2	4,8	6,2	-10
MSN_c1	4	240 \pm 10	710 \pm 140	3,2 \pm 0,2	-17 \pm 10	-38 \pm 5	4,8	5,8	-9

Durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers (*anti-human/mouse CD45R (B220) eFluor® 450* (anti-B220-v450)), konnte die Effizienz der Antikörperanbindung mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Die Menge des Antikörpers auf den Partikeln wurde aus der Differenz der Fluoreszenzemission der Ausgangslösung und der Summe des Überstandes sowie der Waschwasser durch *in situ* Kalibrierung mittels ungebundenem, fluoreszenzmarkiertem Antikörper ($\lambda_{exc} = 405$ nm, $\lambda_{em} = 444$ nm) bestimmt. Um den Einfluss der Reaktionszeit, der eingesetzten Menge an Antikörper sowie der NHS-Aktivierung des Antikörpers zu untersuchen, wurden exemplarisch die MSN_c3 verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Carboxygruppen der Antikörpermoleküle (10 μ g anti-B220-v450/mg Partikel) für 30 min mit EDC und NHS aktiviert und anschließend in einem Zeitraum von 90 min kovalent an die Aminogruppen der Partikel angebunden. Sowohl die Antikörperaktivierung als

auch die Kopplungsreaktion wurden unter ständiger Bewegung bei RT in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,2) durchgeführt.

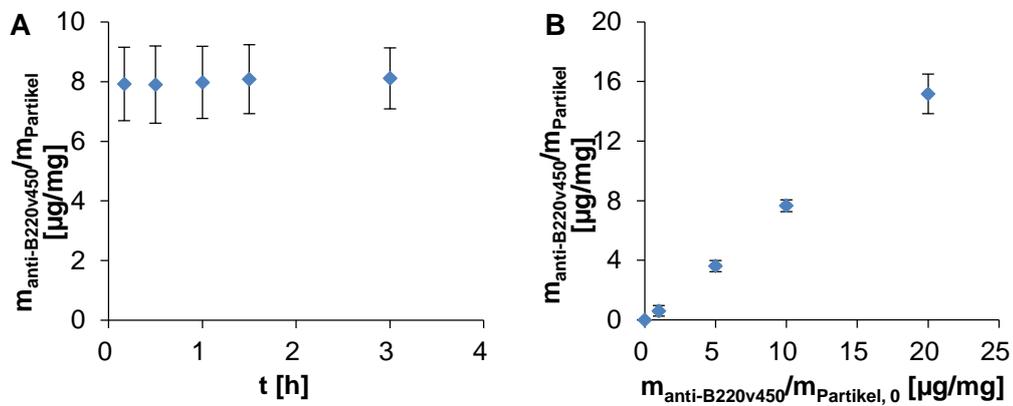


Abbildung 26: (A) Zeitabhängigkeit sowie (B) Konzentrationsabhängigkeit der Antikörperanbindung mit fluoreszenzmarkiertem anti-B220v450 bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 444 \text{ nm}$) (Mittelwert \pm St.Abw.).

Um den Einfluss der Reaktionszeit zu untersuchen wurden die Antikörper für 10, 30, 60, 90 bzw. 180 min an die MSN_c3 angebunden. Die resultierenden Mengen an anti-B220-v450 sind in Abbildung 26 A in Abhängigkeit der Reaktionszeit dargestellt. Es zeigte sich, dass sich bereits nach 10 min zwischen 70 und 90 % der eingesetzten Menge an anti-B220-v450 auf den Partikeln befanden, was sich durch Steigerung der Reaktionszeit nicht erhöhen ließ. Die hohe Streuung der Werte ergibt sich aus der Bestimmungsmethode. Trotz zweifacher Abtrennung mittels Zentrifugation können nicht abgetrennte Partikel die Fluoreszenzintensität im Überstand oder Waschwasser erhöhen und somit zu einer vermeintlichen Verminderung des bestimmten Beladungsgrades führen.

Abbildung 26 B zeigt die kalkulierten Beladungsgrade von MSN_c3-B220 nach Einsatz unterschiedlicher Mengen an anti-B220-v450. Die eingesetzten Mengen von 1, 5, 10 und 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ hatten keinen Einfluss auf die prozentuale Beladung. Unabhängig von der eingesetzten Menge konnten zwischen 62-76 % der Ausgangskonzentration von anti-B220-v450 an die MSN_c3 angebunden werden.

Da die Anbindung des Antikörpers über die Aminogruppen der Partikel erfolgte, könnte die Menge an angebundenem Antikörper von der bei der Funktionalisierung der Partikel eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid abhängen. Mit steigender Menge an Bernsteinsäureanhydrid nimmt die Zahl freier Aminogruppen auf der Partikeloberfläche ab. Die Beladungsgrade der MSN_NH₂ und MSN_c1-5 sind in Abbildung 27 A dargestellt. Es zeigte sich, dass alle Partikel unabhängig von der Funktionalisierung, mit nahezu denselben Mengen an anti-B220-v450 (durchschnittlich 7-9 $\mu\text{g}/\text{mg}$) funktionalisiert werden konnten. Da es sich um relativ geringe Konzentrationen des Antikörpers handelt, sind trotz der Funktionalisierung von

aminofunktionalisierten MSN mit unterschiedlichen Mengen Bernsteinsäureanhydrid, genügend Aminogruppen auf der Partikeloberfläche vorhanden, um den Antikörper anzubinden.

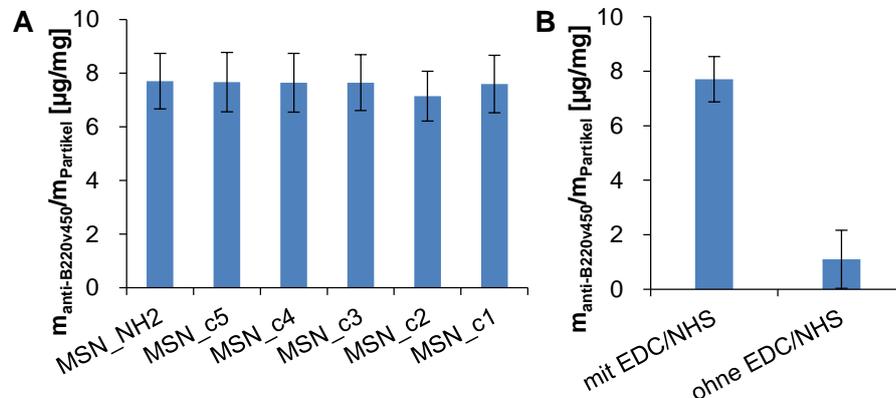


Abbildung 27: Quantifizierung der an den Partikeln angebotenen Antikörper, bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 444 \text{ nm}$) (Mittelwert \pm St.Abw.). (A) Vergleich der Anbindungseffizienz an Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert wurden und (B) Vergleich von kovalent angebotenen (mit EDC/NHS) und rein adsorptiv gebundenem Antikörper (ohne EDC/NHS) an MSN_c3. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Um auszuschließen, dass die Antikörpermoleküle nicht adsorptiv, sondern kovalent auf der Partikeloberfläche der Partikel angebunden sind, wurden MSN_c3 ohne und mit vorhergehender NHS-Aktivierung der Carboxygruppe des Antikörpers funktionalisiert. Wie in Abbildung 27 B dargestellt, sank der Beladungsgrad ohne Aktivierung auf durchschnittlich 11 % der eingesetzten Menge ab. Daraus kann geschlossen werden, dass die Anbindung der Antikörper mit aktivierter Carboxygruppe auf der Partikeloberfläche durch kovalente Wechselwirkungen stattfindet. Die kovalente Anbindung des Antikörpers an die Partikeloberfläche ist favorisiert, da die Desorption vermindert und die Orientierung der Antikörpermoleküle definierter ist. Dadurch ist eine höhere Zugänglichkeit der Antigen-Bindungsstellen gewährleistet.^[182]

Durch Zetapotentialtitrationen wurden die IEP der antikörperfunktionalisierten Partikel bestimmt (vgl. Tabelle 6 und Anhang, Abbildung 78 B). Diese waren gegenüber den Partikeln ohne Antikörper erhöht. Das spricht dafür, dass der Antikörper die positive Ladung aller Partikel erhöht. Für die MSN_c3 wurde das Zetapotential der Partikel nach der Funktionalisierung mit dem spezifischen anti-B220 und dem unspezifischen anti-CD9 (*anti-human CD9* (*anti-CD9*)) in HEPES-Puffer bestimmt. Die MSN_c3-B220 wiesen ein Zetapotential von -18 mV und die MSN_c3-CD9 ein Zetapotential von -19 mV auf. Diese sind im Vergleich zu den unfunktionalisierten MSN_c3 (ζ -Pot. = -27 mV) etwas erhöht. Das Zetapotential in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit 15 % fötalem Kälberserum

(FCS) lag für alle anti-B220-funktionalisierten Partikel, unabhängig vom IEP, im Bereich von -8 bis -10 mV. Dies deutet darauf hin, dass unspezifische Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche stattfindet, die das Zetapotential aller Partikel angleicht.

Um die Partikel in biologischen Systemen beispielsweise durch konfokale Lasermikroskopie oder Durchflusszytometrie (FACS) detektieren zu können, wurden die Partikel vor der Anbindung des Antikörpers mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 594 modifiziert. Die Anbindung erfolgte an die Aminogruppen der Partikel über NHS-Ester der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle und konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie durch Messung der Emission bei $\lambda_{em} = 626$ nm nach Anregung bei $\lambda_{exc} = 590$ nm quantifiziert werden. Abbildung 28 A zeigt die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten und antikörperfunktionalisierten Partikel MSN_NH₂ und MSN_c1-5 und Abbildung 28 B die Emissionsintensitäten bei einer Wellenlänge von 626 nm sowie die relativen Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der Partikel zueinander.

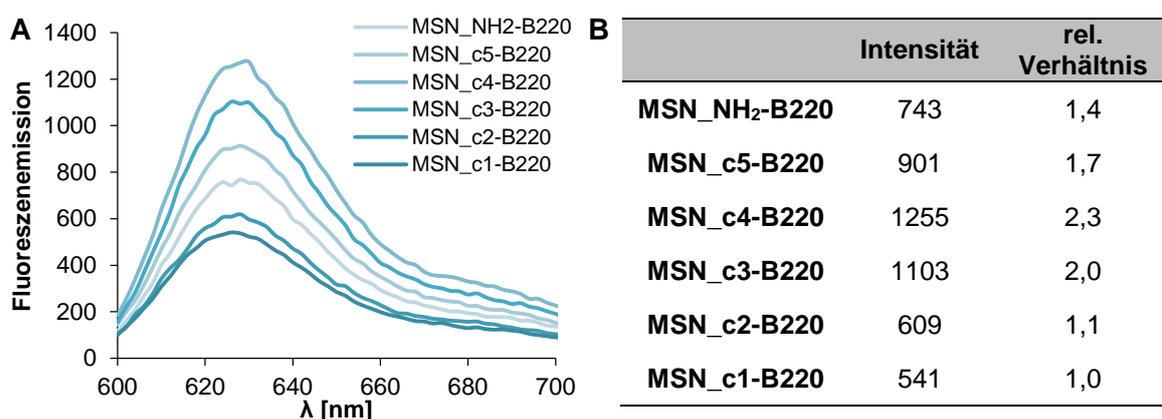


Abbildung 28: (A) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{exc} = 590$ nm) und (B) Fluoreszenzintensität sowie das relative Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen ATTO 594-markierten und anti-B220-funktionalisierten Partikel ($\lambda_{exc} = 590$ nm; $\lambda_{em} = 626$ nm). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Partikel unterschiedlicher Ladung durch die postsynthetische Funktionalisierung aminofunktionalisierter MSN mit Bernsteinsäureanhydrid hergestellt werden konnten. Die Antikörperfunktionalisierung dieser Partikel konnte erfolgreich nachgewiesen werden und positiverte die Oberflächenladung im Vergleich zu den unfunktionalisierten Partikeln minimal. Zetapotentialmessungen in DMEM mit FCS-Zusatz zeigten eine Angleichung der Partikelladung.

2.2 Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen

Biologische Medien können unter physiologischen Bedingungen einen enormen Einfluss auf die Eigenschaften von Partikeln bzw. deren Dispersionen haben und deren Verhalten in biologischen Anwendungen maßgeblich bestimmen.^[43,183] Die Untersuchung von Eigenschaften wie hydrolytischer Stabilität, Stabilität von Partikeldispersionen in biologischen Medien und unspezifischer Proteinadsorption ermöglicht es, Aussagen über das Verhalten der Partikel in biologischen Systemen zu treffen.

Damit Partikel als Trägermaterialien für den gezielten Wirkstofftransport eingesetzt werden können, sollten diese den Wirkungsort ohne größere Verluste der beladenen Medikamente sowie Oberflächenliganden für die gezielte Aufnahme erreichen. Hierbei ist die hydrolytische Stabilität der Partikel von großer Bedeutung. Am Wirkungsort kann die Auflösung der Partikel von Vorteil sein, da die Freisetzung von Medikamenten durch die Kombination von Diffusions- und Auflösungsprozessen erfolgt.^[184]

Die hydrolytische Stabilität der Partikel mit und ohne Antikörper wurde in DMEM mit 15 % FCS mit optischer Emissionsspektroskopie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP – *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*) untersucht. Um die Vergleichbarkeit der Partikel vor und nach der Antikörperfunktionalisierung zu gewährleisten, wurden die Partikel ohne Antikörper simultan zum Modifizierungsschritt mit anti-B220 für 90 min in HEPES-Puffer bei RT inkubiert.

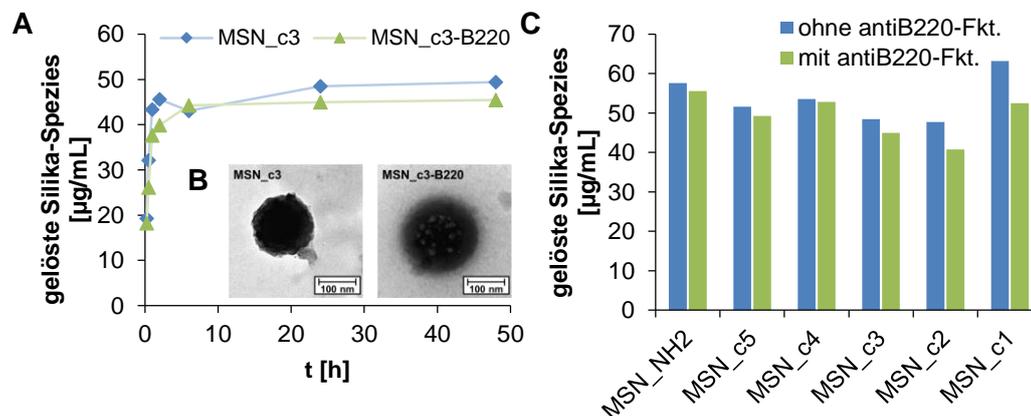


Abbildung 29: Hydrolytische Stabilität der verschiedenen Partikel in DMEM mit 15 % FCS bei 37 °C bestimmt durch ICP-OES Analyse des Überstandes. (A) Auflösungsverhalten in Abhängigkeit der Zeit für MSN_c3 mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung sowie (B) TEM-Aufnahmen nach 24 h Inkubation in DMEM mit 15 % FCS. (C) Gelöste Konzentration an Silika-Spezies der verschiedenen Partikel nach 24 h. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56,176], Copyright 2017, American Chemical Society und Wiley-VCH)

Dispersionen der Partikel in DMEM mit 15 % FCS (0,1 mg/mL) wurden für 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24 und 48 h bei 37 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach Abtrennung der Partikel

wurde die Siliziumkonzentration durch ICP-OES-Analyse im Überstand bestimmt. Abbildung 29 A zeigt den kinetischen Verlauf der aus der Silicium-Konzentration berechneten Konzentration gelöster Silika-Spezies im Überstand bzw. des Auflösungsprozesses exemplarisch für die MSN_c3 und MSN_c3-B220 (die Schaubilder der restlichen Partikel finden sich im Anhang, Abbildung 79). Es kam zu einem schnellen initialen Anstieg der Silikakonzentration und bereits nach 1 h war die maximale Silikakonzentration erreicht. Dies entspricht den Ergebnissen von Mortera *et al.*, welche die Auflösung von calcinierten MCM-41-Partikeln in simulierter Körperflüssigkeit (SBF - *simulated body fluid*) untersuchten.^[185] Auch Braun *et al.* beschreiben ein ähnliches Verhalten für calcinierte MSN jedoch mit einer deutlich langsameren Auflösungskinetik, bedingt durch den höheren Kondensationsgrad der calcinierten Partikel.^[33]

In Abbildung 29 C ist die Konzentration der gelösten Silika-Spezies nach einer Inkubationszeit von 24 h in Abhängigkeit der Funktionalisierung dargestellt. Die Partikel zeigten eine maximale Löslichkeit von 50-60 µg/mL und liegen somit unterhalb der in der Literatur beschriebenen maximalen Löslichkeit von ca. 80 µg/mL für MSN mit gleicher Partikelkonzentration (100 µg/mL) in simulierter Lungenflüssigkeit, PBS und SBF bei 37 °C.^[33] Die geringere Löslichkeit von 50-60 µg/mL im Vergleich zur Literatur könnte durch die Anwesenheit von Proteinen (15 % FCS) bedingt sein. Für alle Partikel ließ sich zudem eine minimal geringere maximale Löslichkeit der Partikel mit Antikörpern im Vergleich zu denselben Partikeln ohne Antikörperfunktionalisierung bestimmen (50-60 µg/mL bzw. 40-60 µg/mL). Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch die Anwesenheit von Proteinen (FCS) bzw. den Antikörper die Sättigungskonzentration vermindert wird. Um hierbei genauere Aussagen treffen zu können, müssten im Rahmen folgender Forschungsarbeiten jedoch zusätzliche Analysen durchgeführt werden. Durch TEM-Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubation konnten trotz der relativ hohen Auflösung Partikel in ihrer ursprünglichen Form lokalisiert werden (vgl. Abbildung 29 B). Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen.^[6,34] Selbst nach *in vivo*-Anwendungen gelang es hierbei, im Stuhlgang und Urin von Mäusen Partikel in ihrer initialen Form und Größe zu visualisieren.^[36,37]

Eine weitere grundlegende Voraussetzung für die biologische Anwendung von Partikeln ist das Vorliegen stabiler Partikeldispersionen unter physiologischen Salzkonzentrationen und pH-Werten. Die hohen Salzgehalte führen oft zur Kompression der elektrischen Doppelschicht, welche durch Verminderung der elektrostatischen Repulsion die Agglomeration der Partikel zur Folge haben kann.^[15] Durch den Zusatz von Proteinen lässt sich die Dispergierbarkeit von Partikeln unter diesen Bedingungen jedoch durch sterische Stabilisierung verbessern (vgl. Einleitung, Abschnitt I.3.2).^[38,91,121,186] Um die Dispersionsstabilität der MSN_NH₂ und MSN_c1-5 zu untersuchen, wurden die Partikel in DMEM mit 15 % FCS dispergiert und die

Partikelgröße mittels DLS über einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C in der statischen Lösung verfolgt. In Abbildung 30 A ist exemplarisch der zeitliche Verlauf des hydrodynamischen Durchmessers der MSN_c3 mit und ohne Antikörperfunktionalisierung dargestellt (der Verlauf der restlichen Partikel findet sich im Anhang, Abbildung 80). Über den gesamten Zeitraum konnte ein stabiler hydrodynamischer Durchmesser detektiert werden. Anfängliche Schwankungen können durch Adsorptions- bzw. Desorptionsvorgänge von Proteinen auf der Partikeloberfläche erklärt werden.^[50] Abbildung 30 gibt die nach 24 h bestimmten hydrodynamischen Durchmesser der unterschiedlichen Partikel an. Es zeigte sich, dass für alle Partikel, unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung, über einen Zeitraum von 24 h in DMEM mit 15 % FCS stabile Dispersionen hergestellt werden konnten. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Shahabi *et al.* überein, die Dispersionen von unterschiedlich geladenen MSN durch den Zusatz von 10 % FCS in DMEM über einen Zeitraum von 6 h stabilisieren konnten.^[91]

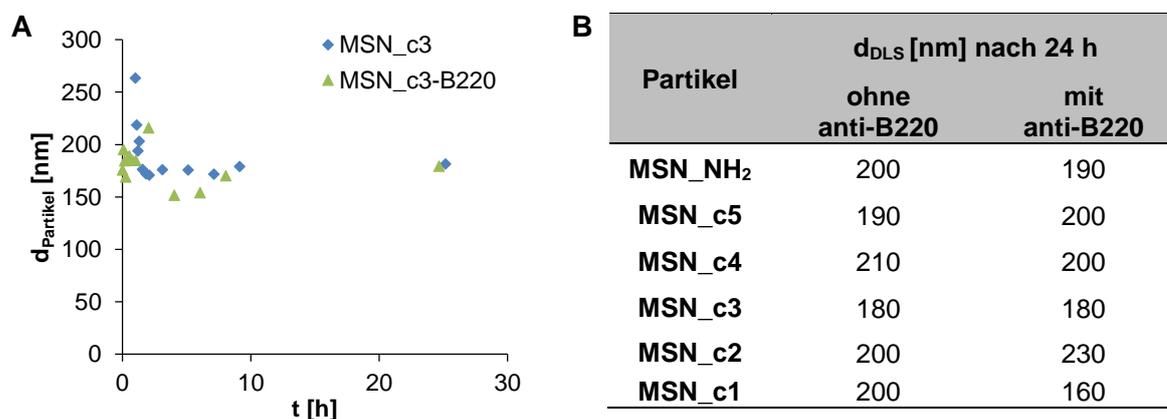


Abbildung 30: Bestimmung der Dispersionsstabilität in Medium mit 15 % FCS durch DLS-Messungen bei 37 °C und einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL. (A) Hydrodynamischer Durchmesser der MSN_c3 in Abhängigkeit der Zeit und (B) Übersicht der Partikelgröße der verschiedenen Partikel in Dispersion nach 24 h Inkubation. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Proteine sind *in vivo* ubiquitär, so dass Partikel, unabhängig von der Applikation, mit diversen Proteinzusammensetzungen in Abhängigkeit vom biologischen Milieu in Kontakt kommen können. Durch unspezifische Adsorption dieser Proteine auf der Partikeloberfläche wird der weitere Weg der Partikel *in vitro* und *in vivo* maßgeblich bestimmt (vgl. Einleitung, Abschnitt I.3.3).^[183,187] Deshalb ist es ein wesentlicher Bestandteil der Analyse des Verhaltens von Partikeln in biologischen Anwendungen, die Zusammensetzung dieser Proteinschicht zu untersuchen.

Um die Zusammensetzung der stark gebundenen Proteine, der *hard corona*, in Abhängigkeit der Funktionalisierung mit und ohne Antikörper-Modifizierung zu untersuchen, wurden die Partikel in PBS mit 15 % FCS dispergiert und für 24 h bei 37 °C unter Rotation inkubiert. Die

Entfernung schwach gebundener Proteine (*soft corona*) durch mehrmaliges Waschen erfolgte vor der Abtrennung der *hard corona* durch Denaturierung mit Natriumdodecylsulfat (SDS - *sodium dodecyl sulfate*). Im Anschluss wurde die *hard corona* mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. In Abbildung 31 finden sich die mit Coomassie nach Kang *et al.*^[188] angefärbten Gele (12%ig) nach der Analyse der adsorbierten Proteine mittels SDS-PAGE, in Abhängigkeit der Menge an Bernsteinsäureanhydrid-Funktionalisierung (MSN_c1-5 und MSN_NH₂) ohne (A) und mit (B) anti-B220-Modifizierung. Aufgrund des hohen Fehlers der inhomogenen Hintergrundfärbung wurde auf die Quantifizierung einzelner Banden verzichtet. Die Auswertung der Gele hinsichtlich des Molekulargewichts erfolgte durch Verwendung der *image lab software* (Bio-Rad Laboratories). Die Zuordnung der Proteine wurde mit Hilfe der Uni-ProtKB-Datenbank^[189] und der Identifizierung adsorbierter Proteine auf MSN durch Mortensen *et al.*^[49] und Pochert *et al.*^[190] durchgeführt.

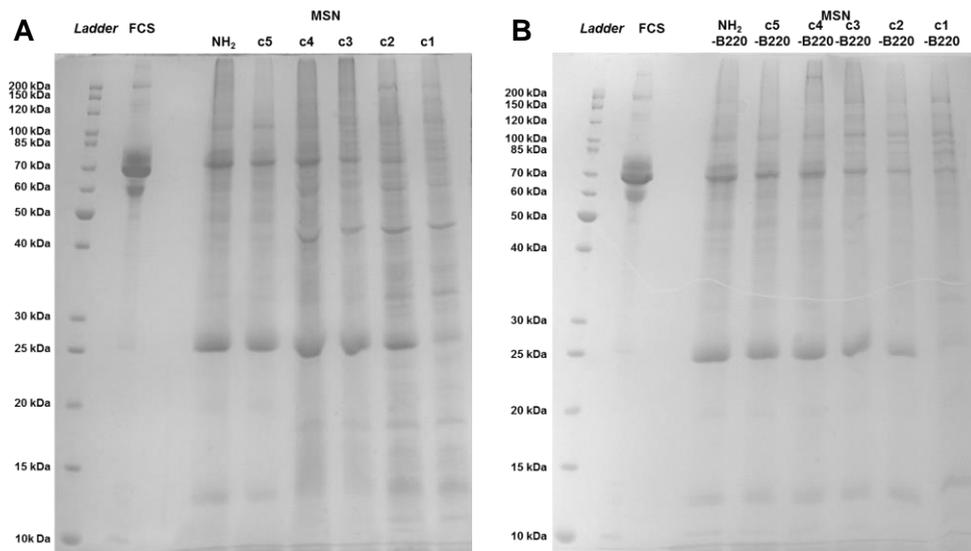


Abbildung 31: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona von Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten MSN_NH₂ (MSN_c1-5) nach Adsorptionsversuchen für 24 h bei 37 °C in PBS mit 15 % FCS. Gele der Auftrennung mittels SDS-PAGE von (A) Partikel ohne Antikörper und (B) Partikel mit anti-B220 Modifizierung in Abhängigkeit der Funktionalisierung. (je ein repräsentatives Gel aus drei) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Die Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen in Abhängigkeit der Bernsteinsäureanhydrid-Funktionalisierung nahm mit steigender Menge an Bernsteinsäureanhydrid bzw. mit abnehmendem Zetapotential der Partikel ab. Für die Partikel ohne Antikörperfunktionalisierung (vgl. Abbildung 31 A) waren ausgeprägte Banden bei 69, 45 und 25 kDa detektierbar, welche den Proteinen bovines Serumalbumin (BSA) (69 kDa), Fetuin B (43 kDa) und Apolipoprotein A-I (30 kDa) zugeordnet werden könnten. Die schwachen Banden bei 110, 60, 19, 13 und 10 kDa könnten aus Faktor XIIa Inhibitor (56 kDa), Hämoglobinuntereinheiten (15-16 kDa) sowie dem Apolipoprotein A-II (11 kDa) resultieren. Mit

steigender Menge an Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche nahm die Menge an adsorbierten Proteinen mit einem Molekulargewicht von 69 und 25 kDa ab, wohingegen die Menge der Proteine mit 19 und 45 kDa in der *hard corona* zunahm. Für die anti-B220-funktionalisierten Partikel konnte abgesehen von der Abwesenheit der Proteinbanden bei 19, 45 und 60 kDa dieselbe Zusammensetzung der Proteincorona detektiert werden. Auch Shahabi *et al.* konnten durch die Funktionalisierung aminofunktionalisierter MSN mit unterschiedlicher Anzahl an Sulfonatgruppen die Adsorption von BSA mit steigender negativer Ladung minimieren.^[91]

Da bis jetzt noch nicht geklärt ist, in welcher Form die Proteincorona unter physiologischen Bedingungen vorliegt, kann es, neben der Analyse der *hard corona*, von Vorteil sein, zusätzlich die Entwicklung der Gesamcorona (*soft und hard corona*) zu untersuchen.^[191] Studien zeigen, dass die *hard corona* für die Interaktion mit biologischen Systemen verantwortlich ist, jedoch bleibt die Rolle der *soft corona* meist unbeachtet.^[191,192] Die Untersuchung der *soft corona* erfordert die Detektion schwach gebundener Proteine, die durch Aufarbeitungsschritte wie Zentrifugation und Waschen, welche für die meisten Analysemethoden essentiell sind, von der Partikeloberfläche entfernt werden.^[191]

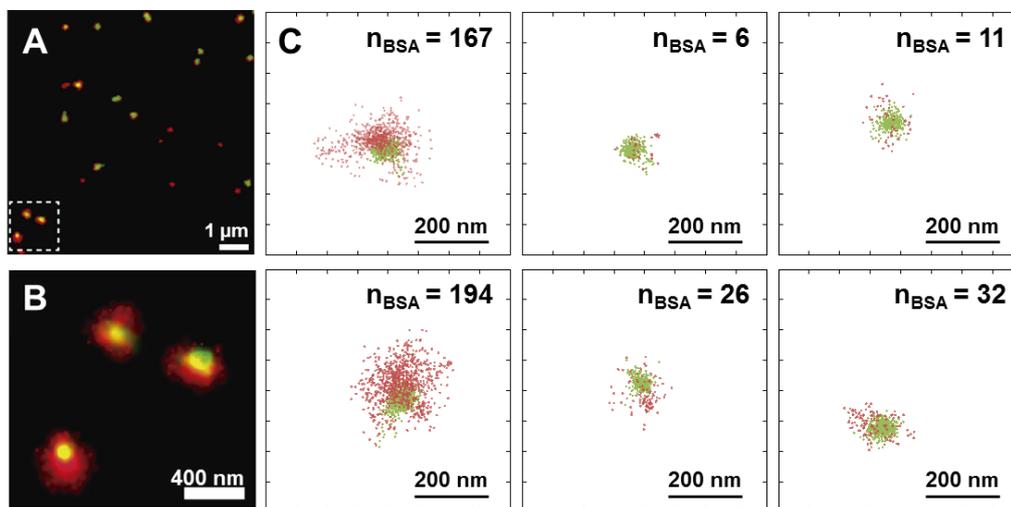


Abbildung 32: Bildliche Darstellung der Proteincorona von MSN_{NH₂} mittels STORM nach 1 min Inkubation. Die Partikel wurden mit Alexa Fluor 488 (grün) und die BSA-Moleküle mit Cy5 (10 % BSA-Cy5 in Serum) (rot) fluoreszenzmarkiert. (A) Repräsentatives STORM-Bild und (B) vergrößerter Ausschnitt des weiß markierten Bereiches von A. (C) Die Rekonstruktion der Proteincorona von verschiedenen MSN_{NH₂}-Partikeln zeigt eine große Heterogenität der Menge an adsorbierten Proteinen auf (n_{BSA} = Anzahl an BSA-Molekülen auf der Oberfläche der einzelnen Partikel). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie (*stochastic optical reconstruction microscopy* - STORM) mit einer Auflösung von 20 nm kann nicht-invasiv die Entwicklung der Schicht aus stark und schwach gebundenen fluoreszenzmarkierten Proteinen auf den Partikeln visualisiert

und quantifiziert werden.^[176,193,194] Durch die Verwendung der spektral voneinander getrennten Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor 488 und Cy5 können einzelne fluoreszenzmarkierte Partikel und Proteine selektiv detektiert werden.

Die Proteinadsorption wurde entweder in Vollserum oder in Einzelproteinlösungen mit einem kleinen Anteil (1-10 %) eines fluoreszenzmarkierten (Cy5) Proteins, beispielsweise BSA, und anschließender STORM-Bildgebung analysiert.^[176] Die Funktionalisierung der Partikel erfolgte analog zu Abschnitt III.2.1 mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488-Tetrafluorophenyl- (TFP) Ester in HEPES-Puffer. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte die erfolgreiche Anbindung des Farbstoffes nachgewiesen werden (vgl. Anhang, Abbildung 81).

In Abbildung 32 ist die Proteincorona von Cy5-markiertem BSA (rot) in Serum der mit Alexa Fluor 488-fluoreszenzmarkierten Partikel (grün) bildlich dargestellt. Abbildung 32 A sowie B zeigen STORM-Bilder und Abbildung 32 C die Rekonstruktionen der BSA-Proteincorona einzelner Partikel. Die BSA-Proteincorona der MSN_NH₂ wies eine hohe Heterogenität auf, welche sich in der durchschnittlichen Anzahl an BSA-Molekülen auf der Oberfläche einzelner Partikel (n_{BSA}) widerspiegelte.

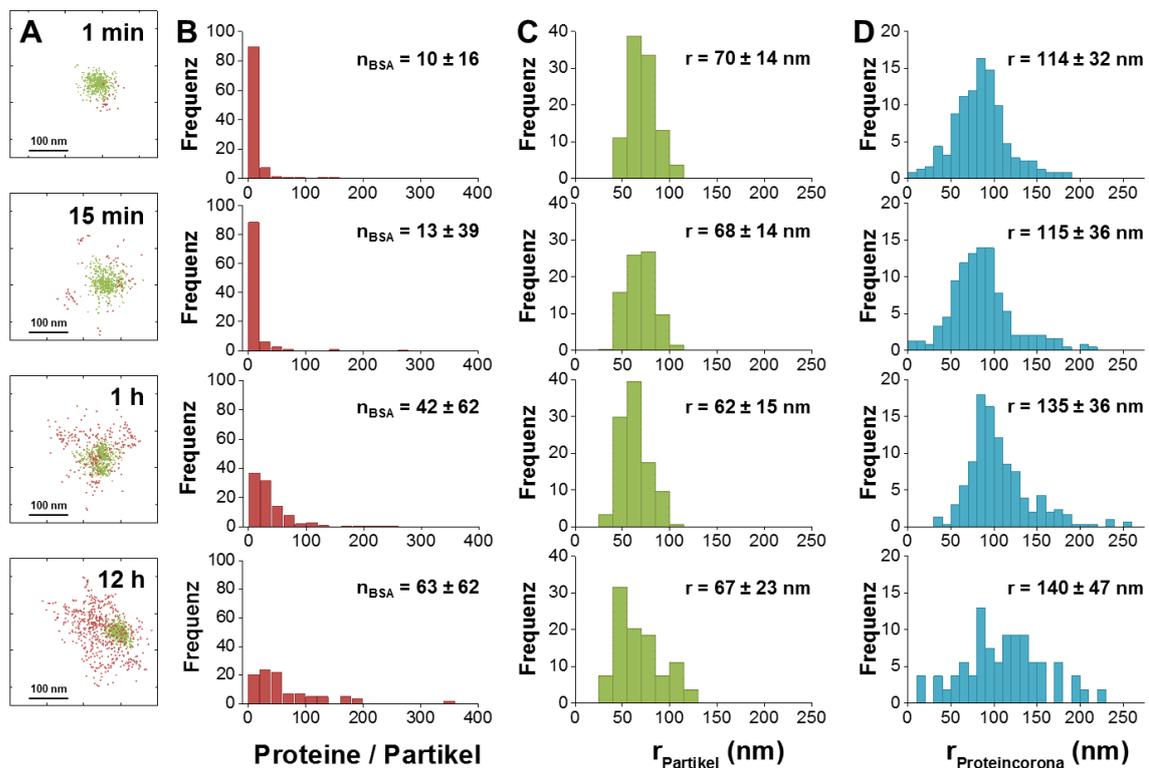


Abbildung 33: Kinetische Entwicklung der BSA-Proteincorona auf MSN_NH₂ bestimmt durch STORM nach 1 min, 15 min, 1 h und 12 h (1 mol% BSA-Cy5 in einer 10 mg/mL BSA Lösung). (A) Repräsentative Bilder der Proteincorona, (B) Verteilung der Anzahl an fluoreszenzmarkierten BSA-Moleküle pro Nanopartikel, (C) Partikelradienverteilung und (D) Größenverteilung der MSN_NH₂-Protein-Komplexe. (Mittelwerte \pm St.Abw. für B, C und D sind angegeben) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Um die Entwicklung der Proteincorona über die Zeit zu analysieren, wurden die MSN-NH₂ in einer BSA-Lösung (10 mg/mL; 1 mol% BSA,-Cy5) bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels STORM nach 1 min, 15 min, 1 h und 12 h analysiert.

In Abbildung 33 sind repräsentative Bilder der BSA-Corona (A), die Anzahl an fluoreszierenden BSA-Molekülen pro Partikel (B), der Radius der Partikel und der Radius der Protein-Partikel-Komplexe der MSN-NH₂ in Abhängigkeit der Inkubationszeit dargestellt. Es wird deutlich, dass die Menge an adsorbierten Proteinen mit der Zeit zunahm. Zwischen dem 1 und 15 min Zeitpunkt sind kaum Änderungen der Anzahl an Proteinen bzw. im Radius des Protein-Partikel-Komplexes sichtbar, welche aber nach 1 und 12 h deutlich anstiegen.

Mit Hilfe des Verhältnisses fluoreszenzmarkierter zu unfunktionalisierter BSA-Molekülen kann die Gesamtmenge an BSA auf der Oberfläche jedes Partikels berechnet werden. Nach 1 h befanden sich pro Partikel bereits 4200 BSA-Moleküle/Partikel. Berechnet man mit der Oberfläche des BSA-Moleküls (28 nm² bzw. 32 nm² (rechteckiger bzw. dreieckiger Querschnitt))^[195] die Anzahl der BSA-Moleküle, die zur Ausbildung einer Monolage nötig wären, so werden pro Partikel (d = 170 nm; O = 90792 nm²/Partikel) ca. 3000 BSA-Moleküle benötigt. Deshalb kann basierend auf den Messdaten schon nach 1 h von der Ausbildung einer mehrlagigen Proteinschicht ausgegangen werden.

Bereits nach 1 h verbreiterte sich die Verteilung der BSA-Moleküle pro Partikel, welche während der weiteren Inkubationszeit von 11 h deutlich zunahm. Es waren sowohl Partikel mit einer sehr geringen (<20 BSA/Partikel), als auch mit einer höheren Anzahl (>200 BSA/Partikel) an BSA-Molekülen vorhanden. Auch die Verteilung der Dicke der Proteincorona wurde deutlich breiter. Durch unterschiedliche Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit einzelner Partikel, beispielsweise durch Hydrolyse, kann die Proteinschicht unterschiedlich beeinflusst werden. Dies kann zur Heterogenität in der Proteinadsorption führen, welche nur durch den Einsatz von nicht-invasiven Analysen einzelner Partikel detektiert werden kann.

Damit sich zwischen *hard* und *soft corona* der BSA-Moleküle differenzieren lässt, wurde die STORM-Analyse mit (*hard corona*) und ohne (*soft* und *hard corona*) vorhergehende Aufarbeitungsschritte (Zentrifugation und dreimaliges Waschen der Partikel) durchgeführt. Wie zu erwarten, fanden sich mehr Proteine in der Gesamtproteinschicht als in der *hard corona* (vgl. Abbildung 34 A). Der Median der BSA-Moleküle pro Partikel (vgl. Abbildung 34 B) und der Größe des BSA-Partikel-Komplexes (Abbildung 34 C) sowohl der Gesamtproteinmenge, als auch der *hard corona* stieg stetig mit der Inkubationszeit an. Das lässt darauf schließen, dass die Anzahl der Proteine der *soft corona* unabhängig von der Inkubationszeit konstant bleibt.

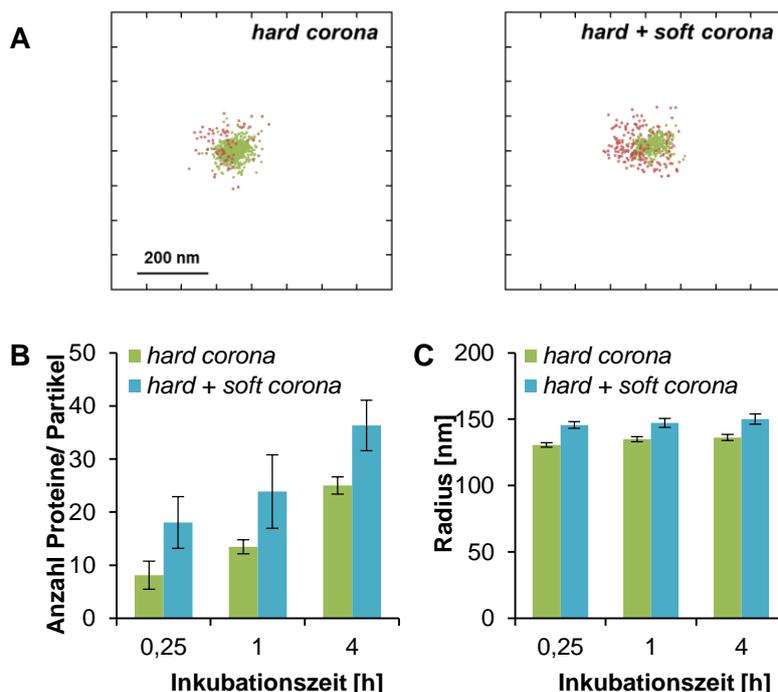


Abbildung 34: BSA-Adsorption (3 mol% BSA-Cy5 in einer 10 mg/mL BSA Lösung) auf MSN_{NH₂} und anschließende Analyse mittels STORM mit (*hard corona*) und ohne (*hard* und *soft corona*) Aufarbeitungsschritt. (A) Rekonstruierte Bilder der BSA-Proteincorona, (B) Median der Anzahl an fluoreszenzmarkierten BSA-Molekülen pro Partikel und (C) Größe des Protein-Partikel-Komplexes. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Um den Einfluss des Modifikationsgrades mit Bernsteinsäureanhydrid auf die resultierende adsorbierte BSA *soft* und *hard corona* der Partikel zu untersuchen, wurden die Partikel MSN_{NH₂}, MSN_{c3} und MSN_{c1} in einer BSA-Lösung (10 mg/mL; 1 mol% BSA-Cy5) bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels STORM analysiert. In Abbildung 35 sind repräsentative STORM-Bilder (A) sowie die rekonstruierten Bilder (B) nach einstündiger Inkubation dargestellt.

Es wird deutlich, dass mit steigendem negativem Zetapotential die Anzahl adsorbierter BSA-Moleküle pro Partikel abnahm. Dieser Trend konnte analog durch Proteinadsorptionsuntersuchungen in PBS mit 15 % FCS durch SDS-PAGE nach 24-stündiger Inkubation bestätigt werden (vgl. Abbildung 31 A). Die zeitliche Entwicklung der Proteincorona der unterschiedlichen Partikel ist in Abbildung 36 dargestellt.

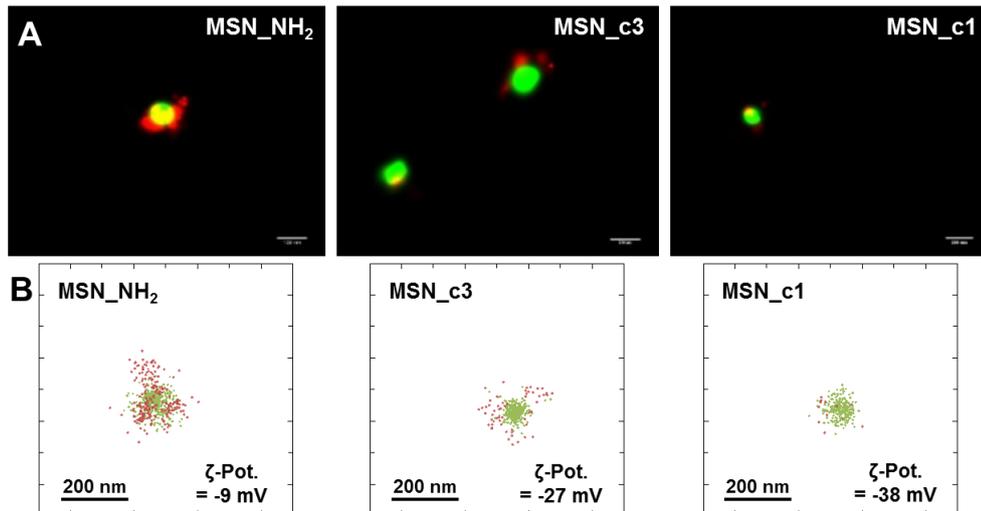


Abbildung 35: BSA-Adsorption in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung auf MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 nach einstündiger Inkubation in einer BSA-Lösung (10 mg/mL; 1 mol% BSA-Cy5). (A) Repräsentative STORM-Bilder und (B) aus STORM-Bilder rekonstruierte BSA-Schicht auf den Partikeln. Zetapotentiale wurden in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) gemessen. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Die MSN_NH₂ und MSN_c3 zeigten einen Anstieg in der adsorbierten Proteinmenge mit zunehmender Zeit, wohingegen die Menge auf den MSN_c1 nahezu konstant blieb. Jedoch zeigten die MSN_NH₂ im Vergleich zu den MSN_c3 eine schnellere BSA-Adsorption innerhalb der ersten Stunde und eine deutlich breitere Verteilung der Anzahl an BSA-Molekülen pro Partikel. Nach 12 h war die Menge an BSA auf den MSN_c3 höher als auf den MSN_NH₂ und beide Partikel zeigten eine hohe Streubreite der Anzahl an BSA-Molekülen pro Partikel.

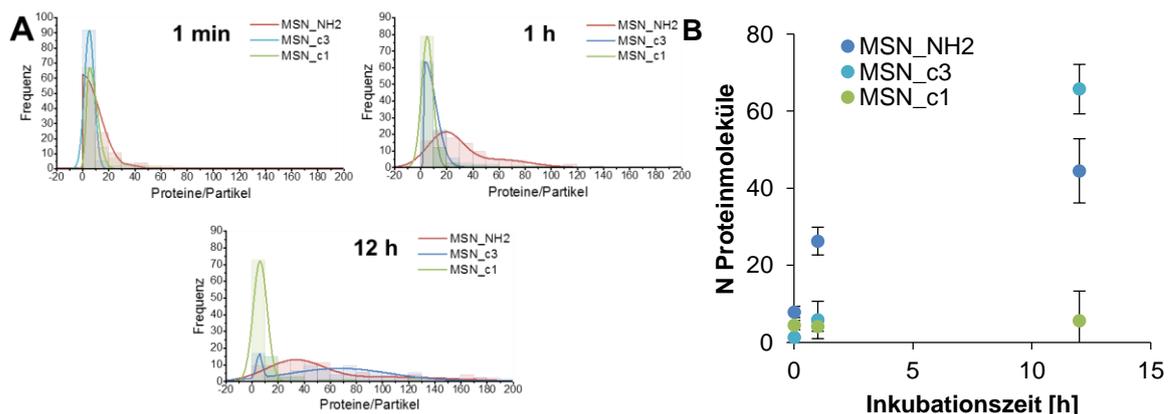


Abbildung 36: Analyse der Proteinadsorption in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung auf MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 nach 1 min, 1 h und 12 h mittels STORM. (A) Verteilung der Anzahl an fluoreszenzmarkierten BSA-Molekülen pro Partikel und (B) zeitlicher Verlauf der Bildung der Proteincorona für MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 (Mittelwert \pm Standardfehler). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Es ist naheliegend, dass die Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung der Proteinschicht der verschiedenen Partikel aus Veränderungen der Partikeloberfläche resultieren. Deshalb wurde

die Veränderung des Zetapotentials in serumfreiem HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) in Abhängigkeit der Inkubationszeit bestimmt (vgl. Abbildung 37).

Alle Partikel zeigten eine Veränderung hinsichtlich weniger negativer Zetapotentiale mit steigender Inkubationszeit, wobei die Veränderung des Zetapotentials der MSN_c3 am stärksten war. Bereits nach 24 h glich sich das Zetapotential der MSN_c3 und der MSN_NH₂ an. Die Veränderung des Zetapotentials kann auf die Ablösung von Silika-Spezies oder durch Änderung der Gegenion-Adsorption zurückgeführt werden. Aufgrund der geringen hydrolytischen Stabilität der Partikel (vgl. Abbildung 29) kann es zur Ablösung von Silika-Spezies und der an dieser Stelle gebundenen organischen Gruppen kommen, was eine Änderung der Oberflächenladung zur Folge hat.

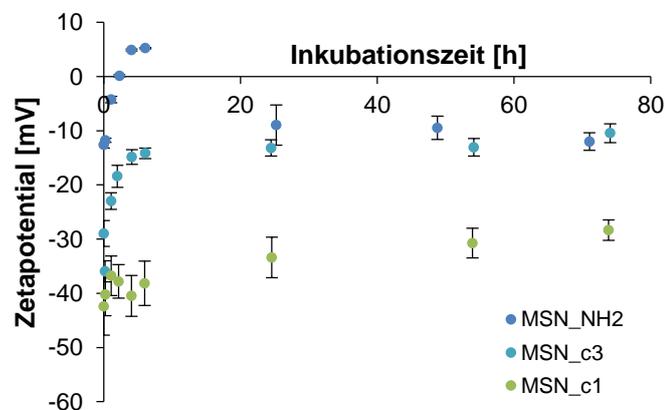


Abbildung 37: Veränderung des Zetapotentials von MSN_NH₂, MSN_c3 und MSN_c1 in HEPES-Puffer (pH 7,2, 25 mM) in Abhängigkeit der Inkubationszeit (Mittelwert ± St.Abw.). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Da der zeitliche Verlauf des Zetapotentials einen ähnlichen Trend zeigte wie der Verlauf der BSA-Adsorption, könnten die Unterschiede in der Proteinadsorption aus der Änderung der Partikeloberfläche resultieren. Nicht nur die Anzahl der Proteine kann dadurch stark beeinflusst werden, sondern auch die Affinität einzelner adsorbierter Proteinmoleküle.

2.3 Biokompatibilität und zelluläre Aufnahme

Die im murinen Modell von der Gruppe um Buske in der *CALM/AF10*-positiven AML identifizierte Untergruppe an B220-positiven LSCs kann für den Ausbruch der AML verantwortlich sein (vgl. Abschnitt III.2, S. 46). Die Transplantation von Knochenmarkzellen leukämischer Mäuse in einen sekundären murinen Organismus führt innerhalb weniger Tage (14-21 Tage) zum Ausbruch der AML. Durch Entfernung der B220-positiven Zellen aus dem Knochenmark-Transplantat konnte der Ausbruch der AML verhindert werden. Dies zeigt das große Potential des Therapieansatzes, der auf der selektiven Zerstörung dieser B220-positiven LSCs basiert.^[150]

Durch den Einsatz von anti-B220-funktionalisierten mesoporösen Silikananopartikeln wurde die gezielte Aufnahme der Partikel in B220-positiven murinen AML-Zellen (*CALM/AF10*-Zellen) in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung untersucht. Die Partikelaufnahme im Vergleich zu B220-negativen murinen AML-Zellen (BM3997-Zellen) diente als Maß für die Selektivität der Aufnahme. Der Einfluss der Partikel auf die Zytotoxizität von *CALM/AF10*- und BM3997-Zellen nach 24-stündiger Inkubation wurde mittels *SytoxBlue*-Färbung und anschließender FACS-Analyse in Abhängigkeit der eingesetzten Partikelkonzentration untersucht.

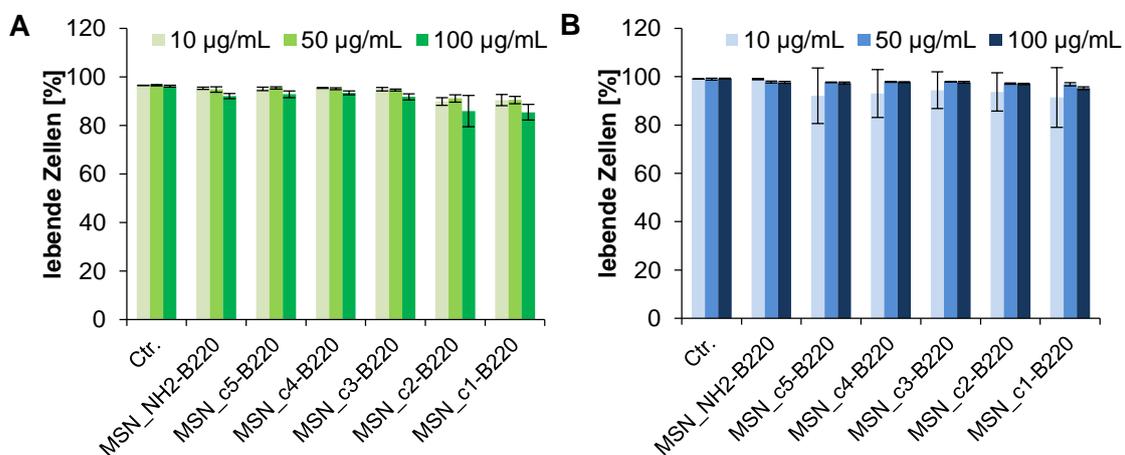


Abbildung 38: Untersuchung der Biokompatibilität von anti-B220-funktionalisierten Partikeln (MSN_c1-5-B220 und MSN_NH₂-B220) auf (A) *CALM/AF10*- und (B) BM3997-Zellen. Die relative Anzahl lebender Zellen wurde durch *SytoxBlue*-Färbung und anschließende FACS-Messung der Zellen, die mit Partikeln der Konzentration 10, 50 und 100 µg/mL für 24 h inkubiert wurden, bestimmt. (Mittelwert ± St.Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Die Oberflächenfunktionalisierung hatte keinen merklichen Einfluss auf die Toxizität der Partikel (vgl. Abbildung 38). Lediglich die MSN_c2-B220 und MSN_c1-B220 zeigten ab einer Konzentration von 100 µg/mL eine Absenkung der Anzahl an lebenden *CALM/AF10*-Zellen um 14 %.

Um die optimale Oberflächenfunktionalisierung für die gezielte Aufnahme anti-B220-funktionalisierter MSN in B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen zu analysieren, wurde die Partikelaufnahme in Abhängigkeit der zur Funktionalisierung eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid untersucht. Aus der Literatur geht hervor, dass oft serumfreie Bedingungen zur Analyse der gezielten Aufnahme gewählt werden, um die Zugänglichkeit der Liganden auf der Partikeloberfläche zu gewährleisten.^[10,102,108] Die folgenden Untersuchungen wurden bewusst unter Zusatz von Serum durchgeführt, da diese Bedingungen repräsentativer für spätere *in vivo* Anwendungen sind.^[58] Die zelluläre Aufnahme der anti-B220- und ATTO 594-funktionalisierten MSN_{NH₂}-B220 bzw. MSN_{c1-5}-B220 in B220-positiven *CALM/AF10* und B220-negativen BM3997-Zellen wurde mittels FACS nach 4 (Abbildung 39 A und B) und 24 h (Abbildung 39 C und D) analysiert. Abbildung 39 A und C geben die relative Anzahl an positiven Zellen und B und D die auf die relative Partikelfluoreszenz (vgl. Abschnitt III.2.1, Abbildung 28 B) normierte *mean fluorescence intensity* (MFI) nach Inkubation mit Partikeldispersionen der Konzentration 10 µg/mL wieder.

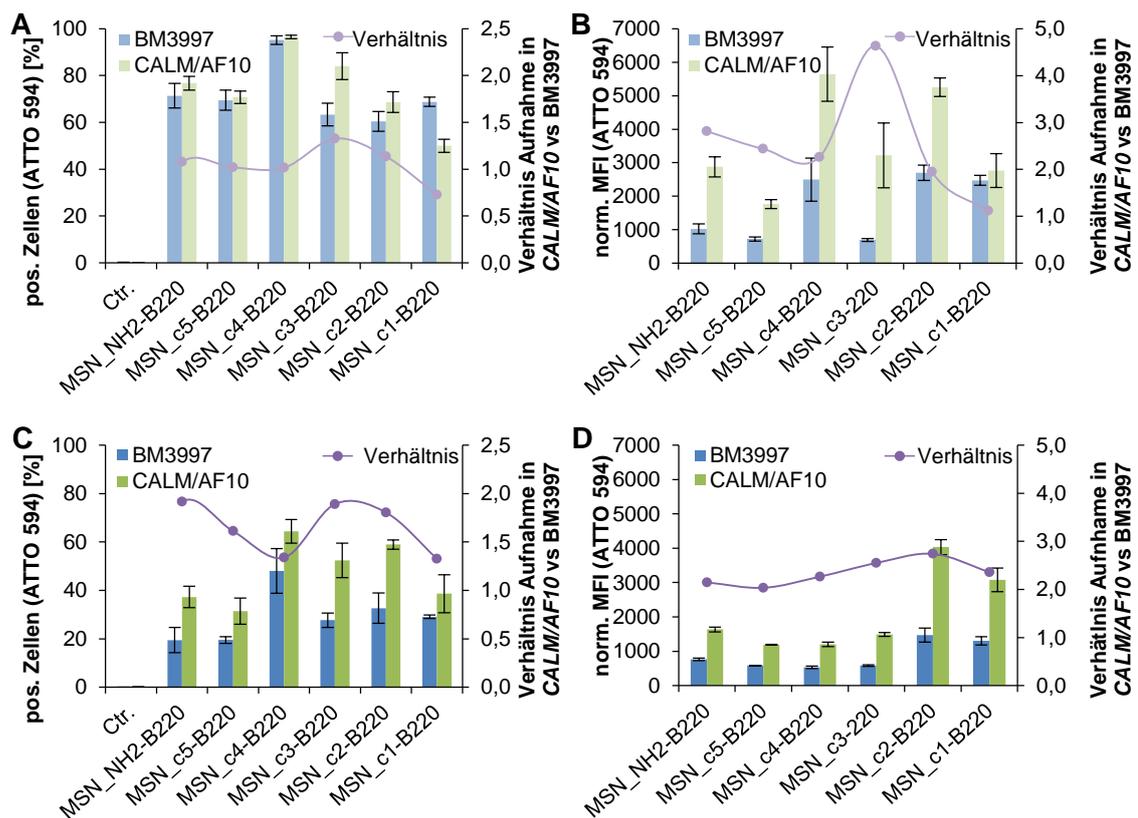


Abbildung 39: Aufnahme der anti-B220-funktionalisierten Partikel (10 µg/mL) nach 4 (A und B) und 24 h (C und D) in B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen und B220-negativen BM3997-Zellen. Anteil an ATTO 594 positiven Zellen (A und C) und normierte *mean fluorescence intensity* (MFI) (B und D) sowie das Verhältnis der Aufnahme in *CALM/AF10*- und BM3997-Zellen, welches als Maß für die erfolgreiche gezielte Aufnahme gilt. (Mittelwert ± St. Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Es wird deutlich, dass die relative Anzahl der ATTO 594-positiven Zellen für alle Partikel nach 24 h deutlich geringer war als nach 4 h. Hierfür kann die natürliche Proliferationsrate der Zellen verantwortlich gemacht werden, da dadurch nach 24 h relativ zur Partikelanzahl die Zellzahl erhöht ist. Dementsprechend ist auch die MFI nach 24 h im Vergleich zu 4 h vermindert.

Unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung und der Inkubationszeit wurden die Partikel vermehrt von den B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen aufgenommen. Nach 24 h verstärkte sich dieser Effekt im Vergleich zum 4 h Zeitpunkt. Hierbei zeigten die MSN_c3-B220 nach 4 h das höchste Verhältnis der gewünschten Aufnahme in den *CALM/AF10* im Vergleich zur Aufnahme in BM3997-Zellen. Auch nach 24 h war das Verhältnis der Anzahl an ATTO 594-positiven Zellen von *CALM/AF10*- versus BM3997-Zellen für diese Partikel am höchsten, wohingegen die MSN_c2-B220 ein minimal höheres Verhältnis der MFI nach 24 h aufwiesen.

Nach 24 h war die höchste Aufnahme in den *CALM/AF10*-Zellen für die Partikel MSN_c2-4-B220 erkennbar. Für Partikel, die mit weniger oder ohne Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert wurden (MSN_c5-B220 bzw. MSN_NH₂-B220), sank die Anzahl an ATTO 594-positiven Zellen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Shahabi *et al.*, welche die begünstigte Aufnahme negativ geladener MSN in serumhaltigem Medium beobachten konnten.^[91] Betrachtet man die Oberflächenladung in DMEM mit 15 % FCS, so wiesen alle Partikel ein nahezu gleiches Zetapotential im Bereich von -8 bis -10 mV auf (vgl. Abschnitt III.2.1, Tabelle 6). Dies deutet darauf hin, dass die in Abwesenheit von Proteinen gemessenen (HEPES-Puffer, vgl. Abschnitt III.2.1, Tabelle 6), unterschiedlichen Zetapotentiale nicht direkt für die Unterschiede in der zellulären Aufnahme verantwortlich gemacht werden können. Durch die Anwesenheit von Proteinen kommt es zur unspezifischen Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche, was unter anderem zur Angleichung des Zetapotentials führt. Die Interaktion der Partikel mit den Zellen wird nun maßgeblich von der Proteinschicht auf der Oberfläche bestimmt.^[43,45,183] Mit steigender Menge an Bernsteinsäureanhydrid sank die Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen auf der Oberfläche (vgl. Abschnitt III.2.2, Abbildung 31), wodurch die Zugänglichkeit des Antikörpers auf der Oberfläche verbessert werden sollte.^[6,10,58] Demnach würde man erwarten, dass das Verhältnis der Aufnahme in *CALM/AF10*- versus BM3997-Zellen mit steigender Anzahl an Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche zunimmt. Das Maximum der selektiven Aufnahme lag jedoch bei den MSN_c3-B220 bzw. MSN_c2-B220. Somit könnte die gezielte Aufnahme der Partikel durch ein gewisses Maß an Proteinadsorption begünstigt werden. Da es sich bei B220 um ein Antigen auf der Zelloberfläche handelt, könnten adsorbierte Proteine die Endozytoserate der daran gebundenen Partikel begünstigen. Zudem ist es möglich, dass sich die Orientierung des Antikörpers auf der Partikeloberfläche in Anwesenheit von Proteinen ändert und somit die gezielte Aufnahme steigt. Dennoch ist eine zu hohe Menge an

adsorbierten Proteinen für die Zugänglichkeit des Antikörpers nicht wünschenswert. Die MSN_c3-B220 wurden aufgrund einer hohen selektiven Aufnahme in CALM/AF10-Zellen, sowie einer geringen Aufnahme in den BM3997-Zellen als vielversprechendstes Partikelsystem für weitere Versuche ausgewählt.

Um zu analysieren, ob die Anbindung des Antikörpers an die Zelloberfläche oder die Unterschiede in der Proteinadsorption bedingt durch die unterschiedliche Oberflächenladung für die gezielte Aufnahme verantwortlich sind, wurden die Partikel mit der gleichen Menge des unspezifischen Antikörpers *anti-human CD9* funktionalisiert. Um die relative Anzahl der, für den anti-B220 bzw. anti-CD9 positiven, murinen AML-Stammzellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper (*anti-human/mouse CD45 R (B220) PE* bzw. *anti-human CD9 PE*) inkubiert und anschließend mittels FACS analysiert. Es zeigte sich, dass ca. 60 % der CALM/AF10-Zellen positiv für den fluoreszenzmarkierten Antikörper anti-B220 und nur 10 % für den anti-CD9 waren (vgl. Anhang, Abbildung 82). Somit kann der anti-CD9 als Negativkontrolle verwendet werden. In Abbildung 40 ist die zelluläre Aufnahme der anti-B220- und anti-CD9-funktionalisierten MSN_c3 in CALM/AF10-Zellen nach 24-stündiger Inkubation im Vergleich dargestellt. Es wird deutlich, dass die MSN_c3-B220, unabhängig von der Partikelkonzentration, eine höhere zelluläre Aufnahme zeigten als die MSN_c3-CD9. Basierend auf diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper spezifisch an die B220-Antigene bindet und dies zur selektiveren Aufnahme in den CALM/AF10-Zellen führt.

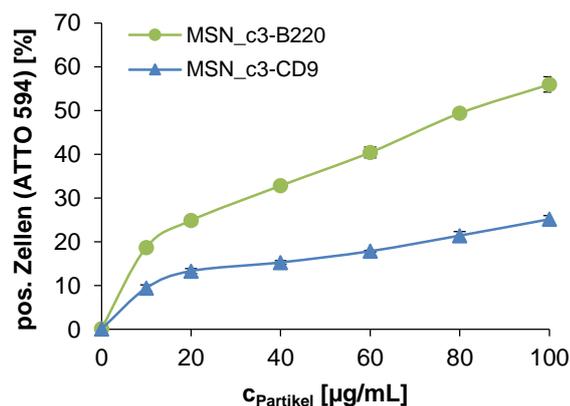


Abbildung 40: Zelluläre Aufnahme antikörperfunktionalisierter MSN_c3 in B220-positiven CALM/AF10-Zellen bestimmt durch FACS-Analyse. MSN_c3 funktionalisiert mit (●) anti-B220 und (▲) anti-CD9, als Negativkontrolle. (Mittelwert \pm St.Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)^[56]

2.4 Stabilität in Serum und Einfluss auf die gezielte Aufnahme in B220-positive Leukämienstammzellen

Wie in Abschnitt III.2.3 beschrieben, kann die unspezifische Proteinadsorption, welche stattfindet, sobald Nanopartikel mit biologischen bzw. proteinhaltigen Lösungen in Kontakt treten, einen großen Einfluss auf die Selektivität von Liganden zur gezielten Aufnahme in bestimmten Zellen haben.^[43,196] Durch die Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche kann es zur Abschirmung der Liganden auf der Partikeloberfläche kommen, wodurch die Anbindung an Zellrezeptoren bzw. -proteine unterbunden werden kann. Dies kann zur Verminderung bzw. zum Verlust der gezielten Aufnahmefähigkeit der Partikel in den gewünschten Zellen führen.^[58] Der Einfluss der Inkubation von antikörperfunktionalisierten MSN_c3 in Serum bei 37 °C auf die Stabilität der Antikörper-Partikel-Konjugate, die Proteinadsorption und die gezielte Aufnahme in B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen wurde in Abhängigkeit der Inkubationszeit untersucht.

Die Untersuchung der Stabilität der Antikörper-Partikel-Konjugate erfolgte mittels STORM. Die MSN_c3 wurden mit dem fluoreszenzmarkierten *anti-human/mouse CD45R (B220) Alexa Fluor 488* (anti-B220-AF488) funktionalisiert und die Anzahl an anti-B220-AF488-Molekülen pro Partikel mittels STORM-Untersuchungen bestimmt. Die Anbindung des Antikörpers erfolgte analog zu Abschnitt III.2.1 und wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie bestätigt (vgl. Anhang, Abbildung 83).

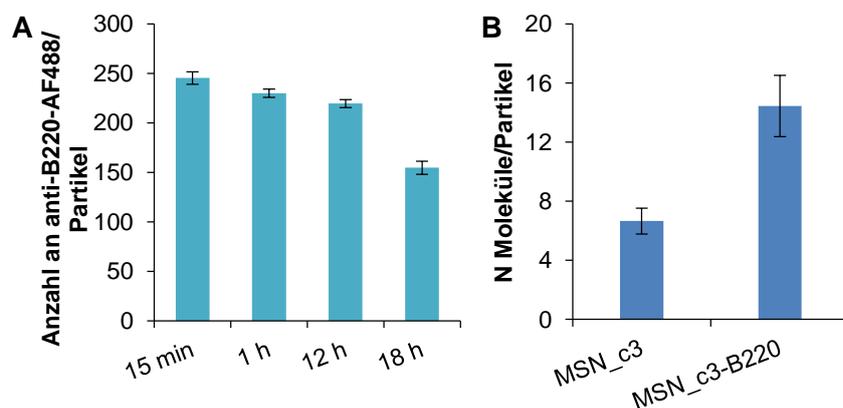


Abbildung 41: (A) Stabilität der Antikörper-MSN_c3 Konjugate (MSN_c3-B220-AF488) bestimmt durch STORM Mikroskopie in Abhängigkeit der Inkubationszeit in 100 % FBS (37 °C). (B) Analyse der BSA-Proteincorona nach 1 h Inkubation auf MSN_c3 mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung (10 % BSA-Cy5 in FBS). (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

Abbildung 41 A zeigt die Anzahl der fluoreszenzmarkierten anti-B220-Moleküle pro Partikel in Abhängigkeit der Inkubationszeit in fötalem bovinem Serum (*fetal bovine serum* – FBS). Mit steigender Inkubationszeit sank die Menge an Antikörpern auf der Partikeloberfläche. Bis zu

einer Inkubationszeit von 12 h war eine geringe Abnahme von ca. 10 % detektierbar, nach 18 h stieg diese auf ca. 40 % an. Durch hydrolytische Abspaltung von Silika-Spezies (vgl. Abschnitt III.2.2, Abbildung 29) bzw. Veränderungen der Partikeloberfläche (vgl. Abschnitt III.2.4, Abbildung 37) könnten die daran gebundenen anti-B220-Moleküle vom Partikel abgetrennt werden.

Die Untersuchung der BSA-Adsorption in Serum auf MSN_c3 mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung erfolgte mittels STORM-Analyse nach einstündiger Inkubation in Serum mit 10 % BSA-Cy5. Es zeigte sich, dass die MSN_c3-B220 nach 1 h deutlich mehr fluoreszenzmarkierte BSA-Moleküle adsorbierten als die unfunktionalisierten MSN_c3 (vgl. Abbildung 41 B). Die Zetapotentiale der unterschiedlich funktionalisierten Partikel in HEPES-Puffer waren mit und ohne Antikörperfunktionalisierung deutlich unterschiedlich. Die MSN_c3 mit einem Zetapotential von -27 mV divergieren von den antikörperfunktionalisierten MSN_c3 mit einem Zetapotential von -18 mV (MSN_c3-B220) und könnten für die unterschiedliche Proteinadsorption nach 1 h verantwortlich sein.

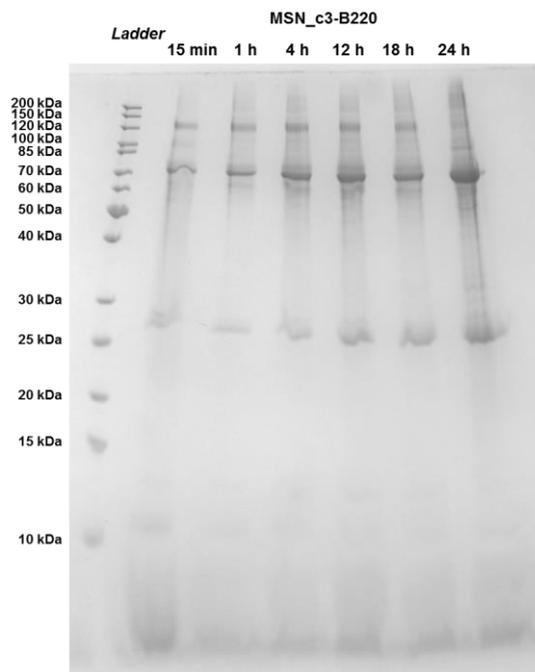


Abbildung 42: Proteinadsorption in 100 %FCS auf MSN_c3-B220 in Abhängigkeit der Inkubationszeit bestimmt mittels SDS-PAGE. (ein repräsentatives Gel aus drei)

Die Proteinadsorption von MSN_c3-B220 in Abhängigkeit der Inkubationszeit in 100 % FCS wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die mit Coomassie nach Kang *et al.*^[188] angefärbten Gele sind in Abbildung 42 B dargestellt. Mit steigender Inkubationszeit nahm die Adsorption von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 69 und 25 kDa stetig zu, welche den Proteinen BSA (69 kDa) und Apolipoprotein A-I (30 kDa) entsprechen könnten. Die Bande bei 123 kDa schien jedoch unabhängig von der Inkubationszeit konstant zu bleiben.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die mit der Inkubationszeit in Serum steigende Ablösung des Antikörpers und die zunehmende Proteinadsorption auf die gezielte zelluläre Aufnahme in B220-positive *CALM/AF10*-Zellen hat, wurden die ATTO 594-funktionalisierten MSN_c3-B220 bzw. MSN_c3-CD9 in Serum bei 37 °C präinkubiert (1 mg/mL). Nach 0,25, 1, 4, 12, 18 und 24 h wurden die Partikeldispersionen in Serum mit DMEM und FCS verdünnt (resultierende Partikelkonzentration: 100 µg/mL, 15 % FCS) und zu den Zellen gegeben. Die zelluläre Aufnahme der MSN_c3-B220 im Vergleich zu den MSN_c3-CD9 wurde nach 4 und 24 h mittels FACS analysiert.

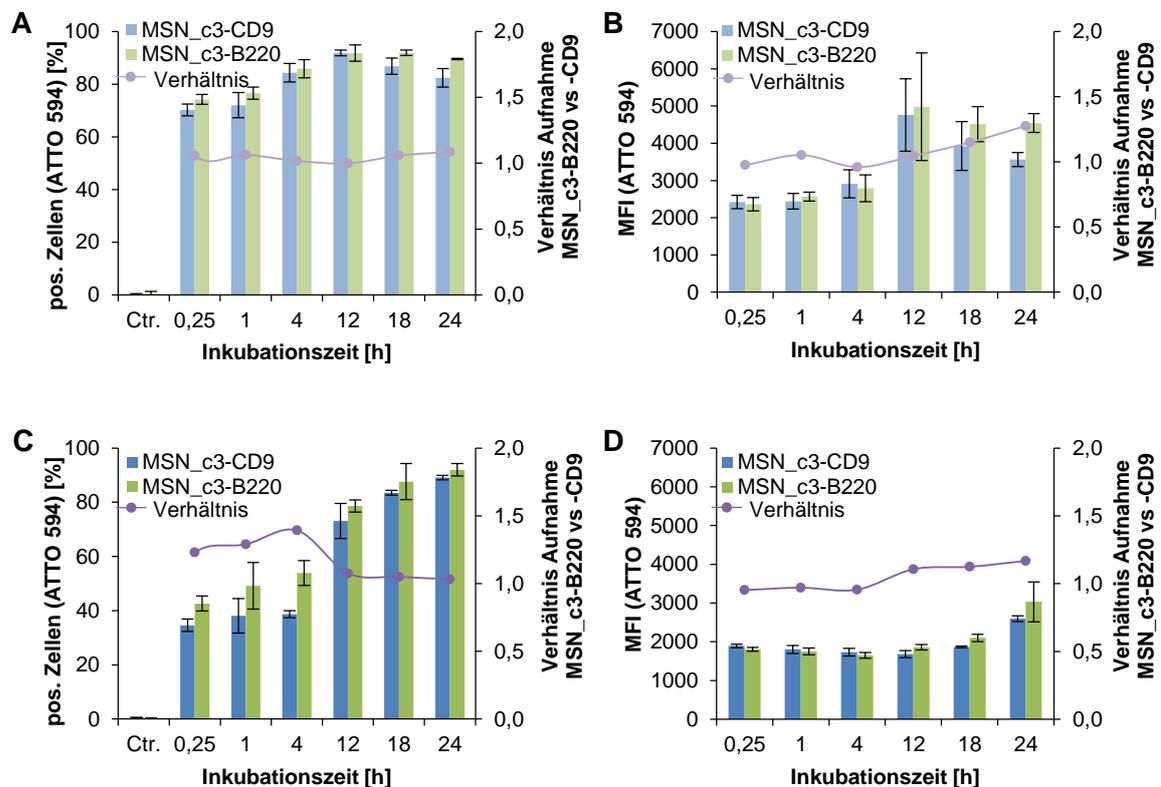


Abbildung 43: Aufnahme von MSN_c3-B220 versus MSN_c3-CD9, sowie das Verhältnis der Aufnahme von anti-B220 (spezifisch) zu anti-CD9 (nicht spezifisch) in *CALM/AF10*-Zellen. Prozentualer Anteil an ATTO 594-positiven Zellen (A, C) und MFI (B, D) nach 4 (A, B) bzw. 24 h (C, D). (Mittelwert ± St.Abw.) (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[176], Copyright 2017, Wiley-VCH)

In Abbildung 43 sind die Anzahl an ATTO 594-positiven Zellen (A und C) und die MFI (B und D) nach 4 (A und B) und 24 h (C und D) Inkubation mit 100 µg/mL MSN_c3-B220 bzw. MSN_c3-CD9 dargestellt. Wie in Abschnitt III.2.3 beschrieben, war die Anzahl der ATTO 594-positiven Zellen und die MFI aufgrund der Proliferation der Zellen nach 24 h geringer als nach 4 h. Mit steigender Präinkubation bzw. Anzahl adsorbierter Proteine stieg die Aufnahme beider Partikel (Anzahl der ATTO 594-positiven Zellen und MFI) in den Zellen. Das Aufnahmeverhältnis von MSN_c3-B220 versus MSN_c3-CD9 sank jedoch mit steigender

Präinkubationszeit, was auf einen Verlust der gezielten selektiven Aufnahmefähigkeit der Partikel in den *CALM/AF10*-Zellen hindeutet. Bis zu einer Präinkubationszeit von 4 h wurden die MSN_c3-B220 gegenüber den MSN_c3-CD9 vermehrt aufgenommen, was aus der Aufnahme nach selektiver Bindung an B220-Antigene auf der Zelloberfläche resultiert. Die 12-stündige Präinkubation in Serum führte jedoch dazu, dass sich die passive zelluläre Aufnahme beider Partikel anglich und die Selektivität verloren ging. Auch nach 12 h kam es zu einem deutlichen Anstieg in der Proteinadsorption (vgl. Abbildung 36 und Abbildung 42 B) und zum Verlust der Antikörpermoleküle auf der Partikeloberfläche (vgl. Abbildung 41 A). Durch die sinkende Menge gebundener Antikörpermoleküle und die steigende Anzahl adsorbierter Proteine auf der Partikeloberfläche war die Verfügbarkeit bzw. Zugänglichkeit der Antikörper nicht mehr gewährleistet. Dadurch verminderte sich die selektive Aufnahme der Partikel über die Bindung an die B220-Antigene.

Die Gruppe um Dawson beschreibt den Verlust der gezielten Aufnahme von Transferrin-funktionalisierten Silikananopartikeln durch den Einsatz von FCS in *in vitro* Studien ohne Präinkubation.^[58] Dennoch sind in der Literatur zahlreiche Studien beschrieben, in denen die erfolgreiche gezielte Aufnahme *in vitro* oder sogar *in vivo* unter Serumzusatz bestätigt wurden^[110,112,122] (vgl. Einleitung, Abschnitte I.4.2 und I.4.3). Auch in dieser Arbeit konnte durch Funktionalisierung von MSN_c3 mit anti-B220 eine selektivere Aufnahme in B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen in Anwesenheit von Serum erreicht werden (vgl. Abschnitt III.2.3, Abbildung 39 und Abbildung 40). Durch Präinkubation in Serum (>12 h) kam es zum Verlust dieser selektiven Eigenschaften, der sich in der gleichen Aufnahme von anti-B220 und anti-CD9 modifizierten MSN_c3 widerspiegelte. Hierdurch verdeutlicht sich der große Einfluss, den die hydrolytische Stabilität und die unspezifische Proteinadsorption auf Partikel haben, welche mit Liganden zur gezielten Aufnahme funktionalisiert wurden. Durch längere Zirkulationszeit im Blut könnten die Partikel somit ihre initiale selektive Aufnahmefähigkeit verlieren. Allerdings ist es hierbei schwierig, aus dem Verhalten unter *ex vivo* Bedingungen auf das Verhalten unter *in vivo* Bedingungen zu schließen.

2.5 Gezielter Medikamententransport

Der Einsatz von Nanopartikeln als Transportsysteme in der Krebstherapie eröffnet neue, sicherere und effizientere Anwendungen von Chemotherapeutika.^[35] Die gezielte Aufnahme wirkstoffbeladener Partikel in Zielzellen ermöglicht die Reduktion von Nebenwirkungen, die Verwendung geringerer Wirkstoffmengen und eine effizientere Therapie.^[115] Zudem können Medikamente durch Einbringung in eine Matrix vor metabolischem Abbau geschützt und die Löslichkeit von hydrophoben Therapeutika erhöht werden.^[24,114]

In der Behandlung von Leukämien wird versucht maligne zirkulierende Zellen zu zerstören. Die AML ist mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren eine Erkrankung überwiegend älterer Menschen. Konventionelle Chemotherapien können jedoch bei diesen Patienten (> 60 Jahre) aufgrund erhöhter Resistenz (Überexpression des MDR1-Gens), vorliegender Begleiterkrankungen und therapiebedingter Mortalität meist nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden.^[180,197] Dies führt zur Verminderung der Heilungschancen bzw. Überlebensraten im Vergleich zu jüngeren Patienten.^[148] Durch partikelbasierte Wirkstofftransportsysteme, welche die gezielte Zerstörung von LSCs unter Erhalt von HSCs bewirken, könnten hier neue Therapieansätze mit höheren Erfolgschancen und geringeren Remissionsraten, nicht nur für ältere Patienten, geschaffen werden.^[151]

Im Folgenden wird, basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt III.2.3, ein auf antikörperfunktionalisierten MSN-basierendes System für den gezielten Transport eines Anthracyclins vorgestellt. Als Zielzellen wurden B220-positive *CALM/AF10*-Zellen gewählt, welche für die Entstehung und Entwicklung der AML verantwortlich gemacht werden können.^[150] Aufgrund der *in vitro* Evaluierung der Aufnahme in B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen versus B220-negativen BM3997-Zellen (vgl. Abschnitt III.2.3), wurden die MSN_c3-B220 als vielversprechendstes Partikelsystem ausgewählt.

2.5.1 Transport eines Fluoreszenzfarbstoffes (DiR)

Um das Potential der MSN_c3-B220 als Wirkstofftransportsystem zu untersuchen, wurde der Transport des hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffes 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyaniniodid (DiR) in B220-positive *CALM/AF10*-Zellen untersucht.

Die Beladung der Partikel erfolgte nach vorheriger Entfernung von adsorbiertem Wasser auf der Partikeloberfläche im Vakuum bei 80 °C in Pentan. Hierfür wurde zu einer Partikeldispersion in Pentan eine DiR-Pentan-Lösung gegeben. Nach 10 min Rotation bei Raumtemperatur wurden die beladenen Partikel durch Zentrifugation abgetrennt, einmal mit Pentan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Analyse der Beladung erfolgte mittels UV/vis-Spektroskopie der Ausgangslösung, des Überstandes und des Waschwassers (vgl.

Abbildung 44). Es zeigte sich, dass nahezu die gesamte DiR-Menge der Ausgangslösung auf die Partikel beladen werden konnte. Im Anschluss an die Beladung erfolgte die Markierung der Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 594 und die Antikörperfunktionalisierung wie in Abschnitt III.2.1 beschrieben in HEPES-Puffer. Die Inkubation der Partikel in HEPES-Puffer während des Modifizierungsschritts bei Raumtemperatur für 2 h zeigte keine merkliche Freisetzung des auf den Partikeln befindlichen lipophilen DiRs (vgl. Abbildung 44, Überstand (HEPES)).

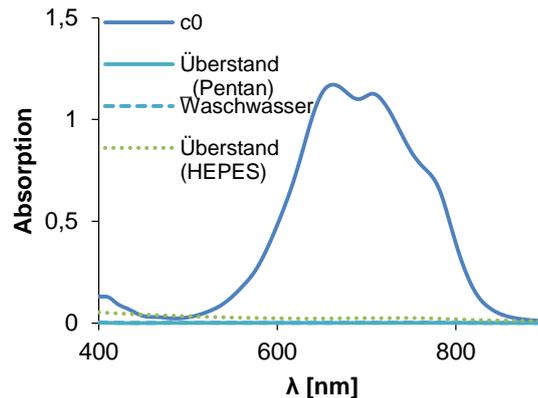


Abbildung 44: UV/vis-spektroskopische Analyse der Ausgangslösung, des Überstandes sowie des Waschwassers der DiR Beladung auf MSN_c3 in Pentan. Anschließende zweistündige Inkubation in HEPES-Puffer bei RT (Überstand_HEPES) zeigt keine nennenswerte DiR-Freisetzung.

In Abbildung 45 ist die Anzahl an ATTO 594- (A, C und E) und DiR-positiven (B, D und E) CALM/AF10- und BM3997-Zellen nach 24 h Inkubation mit MSN_c3 ohne (A und B) und mit anti-B220- (C und D) bzw. anti-CD9-Funktionalisierung (E und F) in Abhängigkeit der eingesetzten Partikelkonzentration dargestellt.

Für alle DiR-beladenen MSN_c3 zeigte sich unabhängig von der eingesetzten Konzentration (10, 50 bzw. 100 µg/mL) und Funktionalisierung eine höhere Aufnahme in den B220-positiven CALM/AF10-Zellen. Jedoch konnten Unterschiede im Verhältnis der Anzahl ATTO 594-positiver CALM/AF10- versus BM3997-Zellen für die unterschiedlich funktionalisierten MSN_c3 detektiert werden. Die MSN_c3 ohne Antikörper resultierten in Aufnahmeverhältnissen (Aufnahme CALM/AF10 im Vergleich zu BM3997) von 1,8, 1,6 und 1,1, welche durch die anti-CD9-Funktionalisierung der Partikel auf 3,7, 1,9 und 1,3 anstiegen. Die höchste Selektivität konnte für die MSN_c3-B220 mit Verhältnissen von 10,6, 3,6 und 1,4 beobachtet werden. 10 % der CALM/AF10-Zellen waren positiv für den freien fluoreszenzmarkierten anti-CD9 und 60 % für den freien fluoreszenzmarkierten anti-B220. Der Vergleich des Aufnahmeverhältnisses der MSN_c3-B220 und MSN_c3-CD9 zeigt somit den selektiven Anteil der Aufnahme innerhalb der CALM/AF10-Zellen. Für alle Partikel sank mit steigender Konzentration das selektive Aufnahmeverhältnis. Durch die höhere Partikelkonzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit der passiven Aufnahme der Partikel zu.

Die MSN_c3 ohne Antikörperfunktionalisierung hatten relativ gesehen die höchste Aufnahme in beiden Zellarten, diese könnten aus Unterschieden in der Proteinadsorption zwischen MSN_c3 mit und ohne Antikörperfunktionalisierung resultieren (vgl. Abschnitt III.2.2, Abbildung 31 und Abschnitt III.2.4, Abbildung 41 B).

Zusammenfassend ergibt sich, dass die MSN_c3-B220 die höchste selektive Aufnahme in den B220-positiven CALM/AF10-Zellen aufwies, sowohl im Vergleich zu den B220-negativen BM3997-Zellen als auch im Vergleich zu den MSN_c3, welche mit dem nicht-selektiven anti-CD9 funktionalisiert wurden. Diese Ergebnisse deuten auf die antikörperbedingte selektive Aufnahme der MSN_c3-B220 in CALM/AF10-Zellen hin.

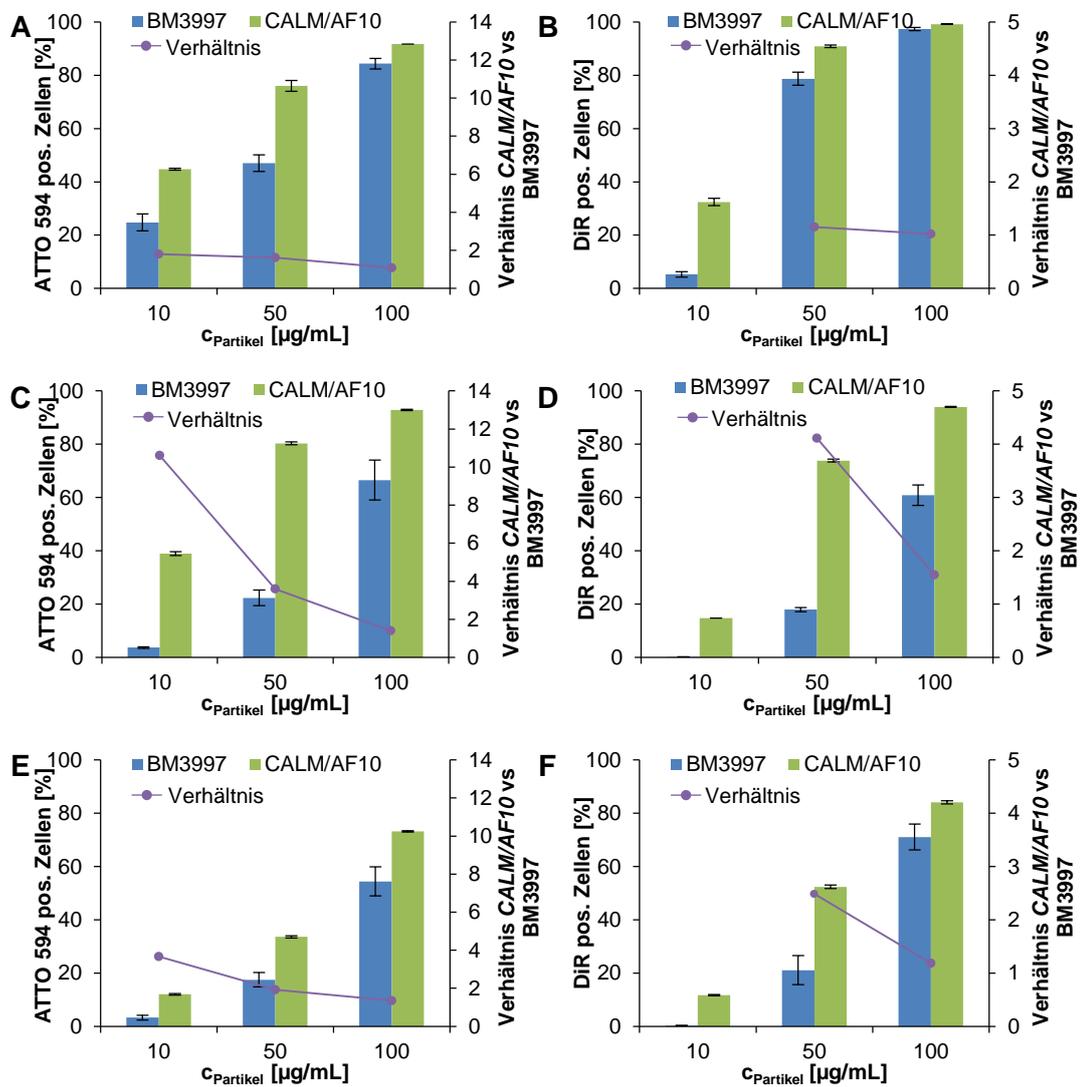


Abbildung 45: Zelluläre Aufnahme von DiR-beladenen und ATTO 594 modifizierten MSN_c3 ohne (A und B) und mit anti-B220 (C und D) bzw. anti-CD9 (E und F)-Funktionalisierung. Die relative Anzahl an ATTO 594- (A, C und E) sowie DiR-positiven (B, D und F) CALM/AF10- bzw. BM3997-Zellen wurde mittels FACS-Messung nach 24 h bestimmt. Das Verhältnis der Anzahl positiver CALM/AF10- versus BM3997-Zellen ist violett dargestellt (auf das Verhältnis an DiR-positiven Zellen für eine Konzentration von 10 µg/mL wurde aufgrund der hohen Werte (MSN_c3: 6,2; MSN_c3-B220: 110,5; MSN_c3-CD9: 50,3) verzichtet). (Mittelwert ± St.Abw.)^[56]

Die Betrachtung der Anzahl an DiR-positiven *CALM/AF10*- und *BM3997*-Zellen zeigte die nahezu gleichen Verhältnisse wie die Anzahl an *ATTO 594*-positiven Zellen für alle drei Partikel. Dies lässt darauf schließen, dass die Aufnahme des DiRs durch die Partikel bedingt ist. Für die Freisetzung des DiRs in das Zellkulturmedium und die anschließende diffusionsbedingte Aufnahme in die Zelle, wäre keine selektive Aufnahme bzw. Unterschiede in der Aufnahme der beiden Zellarten für die unterschiedlich funktionalisierten Partikel zu erwarten.

2.5.2 Transport des Zytostatikums Daunorubicin

Seit Jahrzehnten wird die Kombination eines Anthracyclins, häufig Daunorubicin, mit Cytarabin, in der Induktivtherapie der AML eingesetzt.^[148,198] Aufgrund der hohen Relevanz in der AML-Therapie wurde Daunorubicin als Wirkstoffmolekül für den gezielten Medikamententransport ausgewählt. Die zytotoxische Wirkung von Daunorubicin beruht hauptsächlich auf der Interkalation zwischen die Basenpaare der DNA und der daraus resultierenden Blockierung der DNA-Replikation, was zum Zelltod führt.^[199]

Die Beladung der Partikel wurde zur Erhöhung der Beladungseffizienz in trockenem Dichlormethan durchgeführt und nicht wie in der Literatur angegeben in Pufferlösungen (pH ~7).^[118,121,123,200] Um die Wasserlöslichkeit des kommerziell erhältlichen Daunorubicin-Hydrochlorids zusätzlich zu vermindern und somit die Beladung zu erhöhen sowie die extrazelluläre Freisetzung zu minimieren, wurde vor der Beladung die Neutralisation mit Triethylamin durchgeführt.

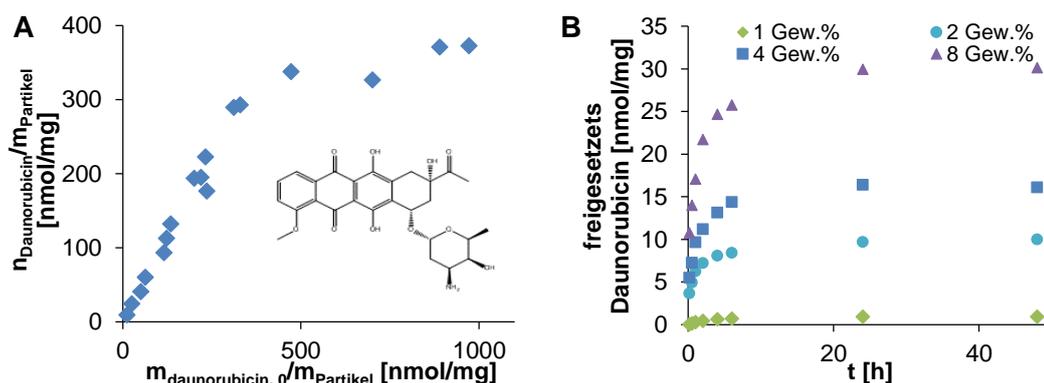


Abbildung 46: (A) Daunorubicin Beladung auf MSN_c3 in Dichlormethan in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Daunorubicin und Struktur von Daunorubicin. (B) Freisetungsverhalten von anti-B220-funktionalisierten sowie Daunorubicin beladenen MSN_c3 in PBS (pH 7) bei 37 °C in Abhängigkeit des Beladungsgrades der Partikel.

Nach 24-stündiger Beladung bei Raumtemperatur wurden die Partikel abgetrennt und durch dreimaliges Waschen mit Dichlormethan von nicht-beladenem Daunorubicin befreit. Die

resultierenden Beladungsgrade der im Vakuum getrockneten Partikel wurden durch UV/vis-spektroskopische Analyse ($\lambda = 499 \text{ nm}$) der Ausgangslösung, des Überstandes sowie der Waschwasser kalkuliert.

In Abbildung 46 A sind die Beladungsgrade der Daunorubicin-beladenen MSN_c3 (MSN_c3_D) in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Daunorubicin dargestellt. Der Beladungsgrad stieg anfänglich mit der eingesetzten Menge an Daunorubicin bis der maximale Beladungsgrad von 15-18 Gew.% (340-400 nmol/ μg) erreicht war.

Im Anschluss an die Daunorubicin-Beladung erfolgte die Antikörperfunktionalisierung in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) (vgl. Abschnitt III.2.1). Durch UV/vis-Spektroskopie wurde die dabei freigesetzte Menge an Daunorubicin bestimmt und die daraus folgende Minimierung des Beladungsgrades kalkuliert. Tabelle 7 zeigt die Beladungsgrade der Daunorubicin-beladenen Partikel vor und nach der anti-B220-Funktionalisierung.

Tabelle 7: Beladungsgrade von Daunorubicin-beladenen MSN_c3 vor und nach der anti-B220-Funktionalisierung in Abhängigkeit des Beladungsgrades. (*Partikel mit diesen Beladungsgraden wurden aufgrund desselben Beladungsgrades nach der anti-B220-Funktionalisierung wie die Partikel mit anfänglichen 11 Gew.% nicht für Freisetzungstudien verwendet.)

	anti-B220-Funktionalisierung									
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor*	nach*
$m_{\text{dauno}}/m_{\text{Partikel}}$ [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	13	9	31	18	60	38	118	82	197*	85*
$n_{\text{dauno}}/m_{\text{Partikel}}$ [nmol/mg]	25	17	58	35	113	71	223	155	373*	162*
Beladungsgrad [Gew.%]	1	1	3	2	6	4	11	8	16*	8*
Verlust [%]	32		40		37		30		57*	

Es zeigte sich, dass durch die 90-minütige Funktionalisierung in HEPES-Puffer und den anschließenden Waschschrift für MSN_c3-B220_D mit Beladungsgraden bis ca. 11 Gew.% (vor der Beladung), zwischen 30-40 % der anfänglich auf den Partikeln befindlichen Menge an Daunorubicin abgewaschen wurde. Für Partikel mit Beladungsgraden von 16 Gew.% wurde ca. 60 % des Daunorubicins entfernt, wodurch sich nach der anti-B220-Funktionalisierung der nahezu gleiche Beladungsgrad wie für die Teilchen mit anfänglichen 11 Gew.% ergab. Daraus folgernd liegt die maximale Menge des nach Inkubation in wässriger Lösung auf den Partikeln adsorbierten Daunorubicins für diese Partikel bei ca. 8 Gew.%. Die Interaktion zwischen Daunorubicin und den Partikeln ist hauptsächlich durch elektrostatische Interaktionen bedingt.^[200] Durch den Kontakt der Daunorubicin-beladenen Partikel mit protischen Lösungsmitteln (HEPES-Puffer) kommt es in Abhängigkeit des pH-Wertes zur Protonierung der Daunorubicin-Moleküle (pK_S -Wert = 8,5^[201]). Dadurch wird die Löslichkeit des Daunorubicins erhöht, was zur vermehrten Freisetzung der Daunorubicin-Moleküle führt.^[121]

Die Daunorubicin-Freisetzung in Abhängigkeit der Inkubationszeit wurde durch Dispergieren der MSN_c3-B220_D in PBS (pH 7,4) und anschließender Inkubation bei 37 °C analysiert. Nach Abtrennung der Partikel durch Zentrifugation wurde die freigesetzte Menge an Daunorubicin im Überstand mittels UV/vis-Spektroskopie bestimmt. Die Beladungsgrade der hierfür verwendeten Partikel sind in Tabelle 7 dargestellt. Die freigesetzte Menge an Daunorubicin in Abhängigkeit des Beladungsgrades der Partikel nach der Antikörperfunktionalisierung (vgl. Tabelle 7) ist in Abbildung 46 B dargestellt. Für alle Partikel stieg die Menge an freigesetztem Daunorubicin innerhalb der ersten 6 h an und erreichte dann nach ca. 24 h ihr Maximum. Mit Ausnahme der Partikel mit einem Beladungsgrad von 1 Gew.% wurden ca. 20 % der sich nach der Antikörperfunktionalisierung auf den Partikel befindlichen Menge an Daunorubicin nach 24 bzw. 48 h freigesetzt. Die Partikel mit 1 Gew.% setzen mit ca. 5 % der anfänglichen Daunorubicin-Menge prozentual deutlich weniger Wirkstoff frei. Auch in der Literatur wurde die maximal freigesetzte Menge des strukturverwandten Anthracyclins Doxorubicin von MSN innerhalb der ersten 6-8 h erreicht.^[118,123,200] Die Gruppe um Rezwan beschreibt, dass der Zusatz von FCS und die daraus resultierende adsorbierte Proteinschicht zu einer reduzierten Freisetzung führt.^[121] Deshalb könnte die Menge an freigesetztem Daunorubicin in den folgenden *in vitro* Versuchen geringer sein als in Abbildung 46 B dargestellt.

In vitro wurde der Transport des Daunorubicins mittels anti-B220-funktionalisierten MSN_c3 untersucht. Die zytotoxische Wirkung von anti-B220- und anti-CD9-funktionalisierten MSN_c3_D auf die B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen wurde mittels *SytoxBlue*-Färbung und anschließender FACS-Messung analysiert. In Abbildung 47 ist die Anzahl toter Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Partikeln (A) bzw. der daraus resultierenden Daunorubicin-Konzentration (B) dargestellt.

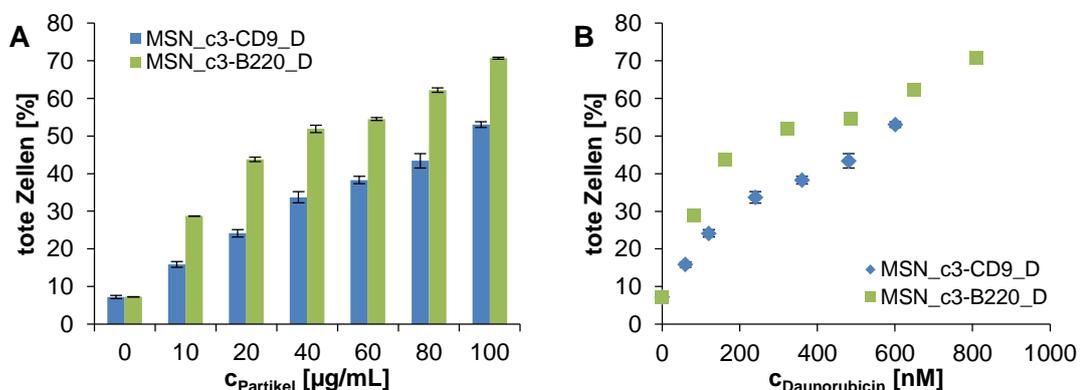


Abbildung 47: Zytotoxizität Daunorubicin-beladener MSN_c3 mit anti-B220- und anti-CD9-Funktionalisierung im Vergleich. Die Anzahl toter Zellen in Abhängigkeit der (A) Partikelkonzentration sowie (B) der eingesetzten Daunorubicin-Menge wurde mittels *SytoxBlue*-Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt. (Daunorubicin-Beladungsgrad: MSN_c3-B220_D: 8,1 nmol/mg (4,3 µg/mg), MSN_c3-CD9_D: 6,0 nmol/mg (3,2 µg/mg)) (Mittelwert ± St.Abw.) (verändert nach ^[177])

Aufgrund der geringen relativen Freisetzung an Daunorubicin von Partikeln mit kleinem Beladungsgrad wurden für die *in vitro* Analyse Partikel mit geringen Daunorubicin-Mengen ausgewählt. Die nach der Antikörperfunktionalisierung bestimmten Beladungsgrade der MSN_c3-B220_D (8,1 nmol/mg) und MSN_c3-CD9_D (6,0 nmol/mg) unterscheiden sich minimal voneinander. Jedoch trat sowohl in Abhängigkeit der eingesetzten Partikelkonzentration (vgl. Abbildung 47 A) als auch in Abhängigkeit der daraus resultierenden eingesetzten Menge an Daunorubicin (vgl. Abbildung 47 B) ein höherer Zelltod für die CALM/AF10-Zellen ein, die mit den MSN_c3-B220_D behandelt wurden. Dies deutet darauf hin, dass trotz der passiven Aufnahme, MSN_c3-B220 selektiv an die B220-Antigene binden und aufgenommen werden. Zudem kann von einer intrazellulären Daunorubicin-Freisetzung ausgegangen werden.

Um den Einfluss des B220-Antigens auf den selektiven Transport des Daunorubicins mit den MSN_c3-B220 zu analysieren, wurden die B220-Antigene auf den CALM/AF10-Zellen durch vierstündige Inkubation mit freiem Antikörper blockiert. Somit konnten die freien Bindungsstellen von 60 % auf 11 % (Anzahl an anti-B220-PE positiven Zellen) reduziert werden (vgl. Anhang, Abbildung 84).

Die anschließende Aufnahme der MSN_c3-B220_D (8,9 nmol/mg) zeigte deutlich weniger tote Zellen für die geblockten CALM/AF10-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten. Dies deutet auf eine geringere Aufnahme der Partikel, bedingt durch die Blockierung des B220-Antigens, hin.

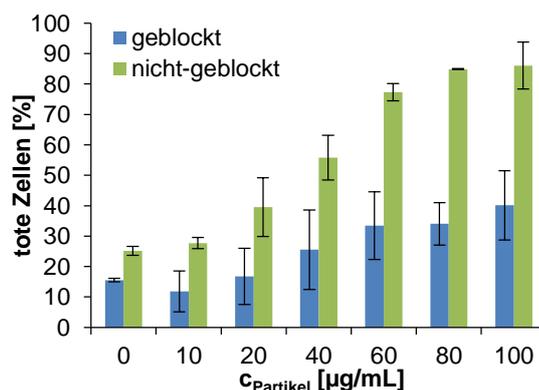


Abbildung 48: Zytotoxizität der MSN_c3-B220_D (Beladungsgrad: 8,9 nmol/mg (4,7 µg/mg)) auf CALM/AF10-Zellen vor und nach Blockierung der B220-Antigene mittels freiem anti-B220. Die Anzahl toter Zellen wurde durch SytoxBlue-Färbung und anschließender FACS-Analyse bestimmt. (Mittelwert ± St.Abw.) (verändert nach ^[177])

Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte *in vitro* der selektive Transport des Daunorubicins durch anti-B220-funktionalisierte MSN_c3 in B220-positive CALM/AF10-Zellen realisiert werden. Die Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen MSN_c3 funktionalisiert mit

spezifischem (anti-B220) und nicht-spezifischem (anti-CD9) Antikörper sowie mit und ohne Blockierung der B220-Antigene lassen, analog zum Transport von DiR, auf eine partikelbedingte Aufnahme der Daunorubicins schließen. Für extrazelluläre, diffusionsbedingte Freisetzung und anschließende Aufnahme des Daunorubicins würde keinerlei Selektivität in der Zytotoxizität erwartet werden.

Erreichen die Partikel die aziden lysosomalen Kompartimente der Zelle ($\text{pH} < 5$)^[202], werden die Aminogruppen der MSN_c3 (IEP 5,2) protoniert, was eine Erhöhung der freigesetzten Menge an Daunorubicin zur Folge haben kann. Unterhalb eines pH-Wertes von 5,2 liegen die MSN_c3 teilweise positiv geladen vor, wodurch es zur elektrostatischen Repulsion und somit zur Freisetzung des ebenso positiv geladenen Daunorubicins kommt. Die durch die Minimierung des pH-Wertes ansteigende Freisetzungsmenge wurde zahlreich für Doxorubicin beladene MSN in der Literatur beschrieben.^[118,121,123,135,200]

CALM/AF10-Zellen können durch intravenöse Injektion in den murinen Organismus zur Entstehung und zum Ausbruch der AML führen.^[150] Unbehandelt führt dies in wenigen Tagen zum Tod dieser Mäuse. Um die Auswirkungen des gezielten Daunorubicin-Transports und die damit verbundene Zerstörung bzw. Entfernung der B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen *in vitro* auf den murinen Organismus *in vivo* zu untersuchen, wurden partikelbehandelte Zellen intravenös in tödlich bestrahlte BL6-Mäuse injiziert.

Hierfür wurden *CALM/AF10*-Zellen mit freiem Daunorubicin, MSN_c3-B220 mit und ohne Daunorubicin-Beladung sowie MSN_c3-CD9 mit Daunorubicin-Beladung für 24 h inkubiert und anschließend intravenös in Mäuse injiziert. Die Menge an freiem Daunorubicin entsprach einer Konzentration von 0,5-0,6 nmol/mL. Die Partikelkonzentration wurde basierend auf dem Beladungsgrad nach der Antikörperfunktionalisierung an diese Daunorubicin-Konzentration angepasst (vgl. Anhang, Tabelle 18).

In Abbildung 49 ist die Überlebensrate (Kaplan-Meier-Kurve) der Mäuse, welche mit partikelbehandelten *CALM/AF10*-Zellen transplantiert wurden, über einen Zeitraum von 160 Tagen dargestellt. Alle Mäuse, in welche unbehandelte und mit MSN_c3, MSN_c3-CD9_D sowie freiem Daunorubicin behandelte Zellen injiziert wurden, zeigten keine merklichen Unterschiede in der Überlebensdauer. Innerhalb von 20-30 Tagen erlagen diese ihren Erkrankungen. Die Behandlung der injizierten Zellen mit freiem Daunorubicin zeigte keinerlei Einfluss auf die Überlebensdauer der Mäuse. Dies liegt an der geringen Menge an Daunorubicin, die zur Behandlung der Zellen eingesetzt wurde.

Werden MSN_c3-B220_D-behandelte Zellen in die Mäuse injiziert, verlängerte sich die Überlebensdauer auf bis zu 160 Tage. Die Behandlung der Zellen mit den MSN_c3-B220_D führen zur Zerstörung der hochaggressiven B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen, welche ca.

60 % der Zellpopulation ausmachen (vgl. Anhang, Abbildung 84 A). Dadurch wurde der Ausbruch der AML *in vivo* trotz der geringen Menge an Daunorubicin deutlich verzögert.

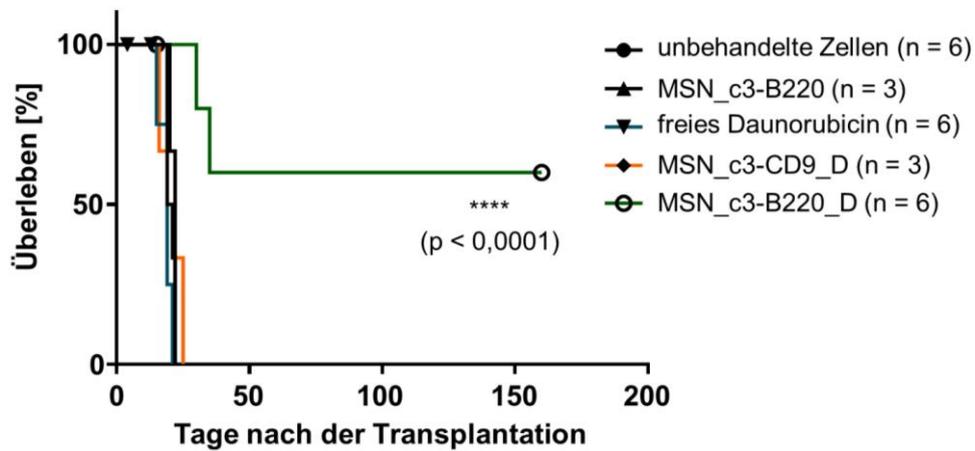


Abbildung 49: Überlebenskurve (Kaplan-Meier Kurve) der mit unterschiedlichen Partikeln behandelten *CALM/AF10*-Zellen transplantierten Mäuse. (Anzahl an Mäusen pro Behandlung (n)) (verändert nach ^[177])

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die gezielte Aufnahme von antikörperfunktionalisierten MSN *in vitro* in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung und Proteinadsorption analysiert wurde. Die optimalen Eigenschaften wiesen die MSN_c3 auf, die mit 0,4 mmol/g Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert wurden. Der Einfluss der Proteinadsorption sowie der Stabilität der Antikörper-Partikel-Konjugate dieser Partikel wurde auf die selektive Aufnahme *in vitro* in B220-positive leukämische *CALM/AF10*-Zellen untersucht. Der selektive Wirkstofftransport des lipophilen Farbstoffes DiR und des therapielevanten Anthracyclins Daunorubicin konnte erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden. Die 24-stündige Behandlung dieser Zellen mit MSN_c3-B220_D im Vergleich zu freiem Daunorubicin, MSN_c3-B220 oder MSN_c3-CD9_D verlängerte, nach anschließender intravenöser Injektion, die Überlebensdauer von Mäusen deutlich.

3. Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten

Wie in Abschnitt III.2 beschrieben, ist der Einsatz von MSN als Wirkstofftransportsysteme ein vielversprechender Ansatz in der Therapie von Krebs. Die gezielte Aufnahme der Partikel ermöglicht hierbei die Reduktion von Nebenwirkungen und die Steigerung der Therapieeffizienz. Da Krebszellen aufgrund des schnellen Zellwachstums einen erhöhten Metabolismus und somit einen gesteigerten Energiebedarf haben, können anstelle von Antikörpern (vgl. Abschnitt III.2) deshalb auch Glucosederivate als Liganden für die gezielte Aufnahme verwendet werden (vgl. Einleitung, Abschnitt I.4.2).^[26]

Neben der Funktion der Glucosederivate als Liganden für die gezielte Aufnahme in Krebszellen können diese zudem die Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche minimieren (siehe auch Einleitung, Abschnitt I.3.3). Im Vergleich zur herkömmlichen Strategie, der Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit einer PEG-Schicht, weisen Monosaccharide einige Vorteile, wie einfache Handhabung und geringe Kosten, auf. Zudem werden andere Liganden auf der Partikeloberfläche aufgrund der kleinen Größe der Zuckermoleküle nicht abgeschirmt, wie das für PEG meist der Fall ist.^[65,153] Da die Verwendung von PEGylierten Substanzen oft starke Immunantworten (vgl. Einleitung, Abschnitt I.3.3) hervorruft, ist die Suche nach Alternativen von großer Bedeutung. Monosaccharide könnten hierbei eine interessante Möglichkeit darstellen, da sie in Kombination mit der Verminderung der Proteinadsorption simultan als Liganden für die gezielte Aufnahme in Zellen mit erhöhter glykolytischer Aktivität dienen.

3.1 Synthese und Charakterisierung von MSN mit Glucosederivat-Funktionalisierung

3.1.1 MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen

Um den Einfluss der Glucosederivat-Funktionalisierung auf die Dispersionsstabilität und Proteinadsorption zu untersuchen, wurden MSN mit unterschiedlicher Oberflächenladung mit Glucosamin bzw. Glucuronsäure funktionalisiert. Die Synthese, Funktionalisierung und Charakterisierung der sphärischen Partikel wurde im Rahmen der Masterarbeit von Anna Mutschler^[203] durchgeführt.

Wie in Abschnitt III.1.1 beschrieben, können durch die Co-Kondensation von TEOS und APTMS ca. 170-190 nm große Partikel hergestellt werden. Die Entfernung des Tensids erfolgte über Calcinierung, wodurch reine mesoporöse Silikananopartikel (MSN) entstanden oder durch Extraktion, wodurch die Aminofunktionen erhalten werden konnten (MSN_{NH₂}).

III. Resultate und Diskussion

Durch Ethylenimin oder ein Carboxyethylsilan gelang es, postsynthetisch organische Funktionen auf die Partikeloberfläche anzubringen (vgl. Abbildung 50).

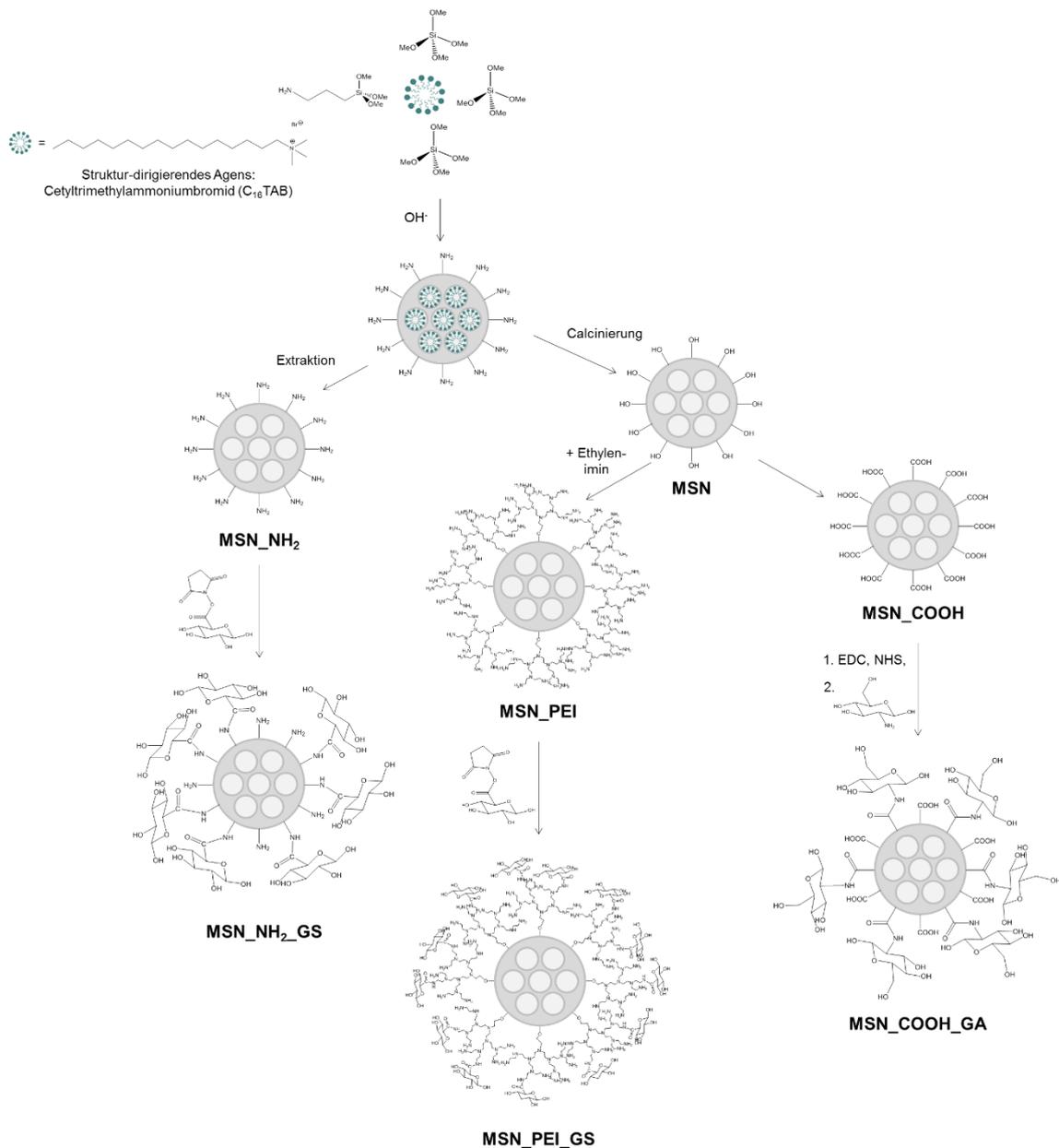


Abbildung 50: Schematische Übersicht der Synthese und Funktionalisierung von carboxy-, amino- und PEI-funktionalisierter MSN mit Glucosamin bzw. Glucuronsäure.

Die Funktionalisierung mittels Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz wurde in HEPES-Puffer für 4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die resultierenden Partikel (MSN_COOH) hatten in 1 mM KCl im Durchschnitt ein Zetapotential von -28 mV, was den in der Literatur beschriebenen Zetapotentialen für carboxy-funktionalisierte Partikel entspricht.^[204,205] Die Stickstoffsorptionsisothermen der MSN und MSN_COOH sind in Abbildung 51 B dargestellt. Beide Isothermen entsprechen Typ IV Isothermen nach IUPAC^[162]. Die spezifische

BET-Oberfläche nahm, bei gleichbleibendem Porendurchmesser von 3,1 nm bestimmt durch die NL-DFT Methode, im Durchschnitt im Vergleich zu den MSN von 990 auf 810 m²/g ab.

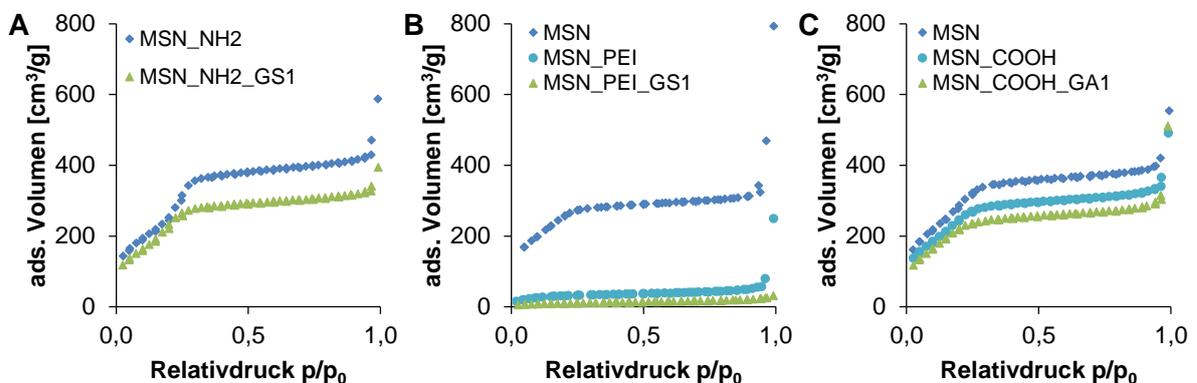


Abbildung 51: Stickstoffsorptionsmessungen der Partikel, die mit Glucosederivaten funktionalisiert wurden^[203]. (A) Amino- und Glucuronsäure-funktionalisierte, (B) Silika, PEI- und Glucuronsäure-funktionalisierte sowie (C) Silika, carboxy- und Glucosamin-funktionalisierte Partikel.

Durch essigsauer katalysierte Oberflächenpolymerisation von Ethylenimin auf calcinierten Partikeln (MSN) in Toluol bei 80 °C konnte eine PEI-Schicht auf die Partikel aufgebracht werden (MSN_PEI). Dies zeigte sich im Zetapotential, welches durchschnittlich von -16 mV (MSN) auf +38 mV (MSN_PEI) anstieg, was auf das Vorliegen von zahlreichen positiven Ladungen auf der Oberfläche hindeutet. Zudem kam es durch die PEI-Schicht auf der Partikeloberfläche zum sogenannten *pore blocking*. Abbildung 51 C zeigt die Stickstoffsorptionsisotherme vor und nach der PEI-Funktionalisierung. Beide Isothermen entsprechen dem Typ IV nach IUPAC.^[162] Es wird deutlich, dass die adsorbierte Menge an Stickstoff nach der PEI-Funktionalisierung drastisch absank. Dies spiegelt sich in der spezifischen BET-Oberfläche der Partikel wider. Diese sank im Durchschnitt von 990 m²/g auf 190 m²/g nach der PEI-Funktionalisierung. Auch der durchschnittliche NL-DFT Porendurchmesser sank von 3,1 nm auf 2,6 nm ab. Die PEI-Schicht lagert sich an den Porenwänden an, was zur Verminderung des Porendurchmessers führt. Diffusionsbedingt kommt es bevorzugt zur Polymerisation an den Poreneingängen, was zum Verschluss der Poren und der drastischen Reduktion der spezifischen Oberfläche führt (vgl. Einleitung, Abschnitt I.2.2).

Die Funktionalisierung der MSN_NH₂ und MSN_PEI mit Glucuronsäure wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Niemelä *et al.*^[26] durchgeführt. Die Aktivierung der Carboxygruppe an der Glucuronsäure erfolgte durch EDC und NHS unter wässrigen Bedingungen, gefolgt von der Anbindung an die Aminogruppen der Partikel bzw. des PEIs auf der Partikeloberfläche in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2). Glucosamin-funktionalisierte Partikel wurden durch Aktivierung der Carboxygruppe am Partikel (MSN_COOH) und anschließender Anbindung der Aminogruppe des Glucosamins synthetisiert. Um den Einfluss der Menge an Glucosederivaten

auf der Oberfläche zu analysieren, wurden die Partikel jeweils mit 7, 70 und 280 $\mu\text{mol/g}$ Glucuronsäure bzw. Glucosamin funktionalisiert.

Tabelle 8: Charakterisierungsergebnisse der Stickstoffsorptions-, DLS- und Zetapotentialmessungen der Glucosederivat-funktionalisierten MSN in Abhängigkeit der eingesetzten Mengen an Glucuronsäure bzw. Glucosamin (Mittelwert \pm St.Abw.). DLS- und Zetapotential-Messungen wurden in 1 mM KCl (pH 5) durchgeführt.^[203]

	$n_{\text{GS, 0}}$ bzw. $n_{\text{GA, 0}}$ /mPartikel [$\mu\text{mol/g}$]	d_{DLS} [nm]	ζ -Pot [mV]	S_{BET} [m^2/g]	$d_{\text{Pore, DFT}}$ [nm]
MSN_NH ₂	-	260 \pm 20	+26 \pm 3	860 \pm 30	3,4 \pm 0,2
MSN_NH ₂ _GS3	7	260 \pm 40	+30 \pm 2	720 \pm 50	2,9 \pm 0,2
MSN_NH ₂ _GS2	70	260 \pm 40	+28 \pm 2	750 \pm 70	2,9 \pm 0,3
MSN_NH ₂ _GS1	280	270 \pm 30	+29 \pm 2	750 \pm 20	3,0 \pm 0,2
MSN	-	250 \pm 30	-16 \pm 8	990 \pm 80	3,1 \pm 0,2
MSN_PEI	-	240 \pm 20	+38 \pm 1	190 \pm 70	2,6 \pm 0,0
MSN_PEI_GS3	7	230 \pm 30	+34 \pm 2	190 \pm 140	2,6 \pm 0,0
MSN_PEI_GS2	70	210 \pm 20	+35 \pm 1	160 \pm 110	2,6 \pm 0,0
MSN_PEI_GS1	280	210 \pm 10	+36 \pm 1	130 \pm 90	2,6 \pm 0,0
MSN	-	250 \pm 30	-16 \pm 8	990 \pm 80	3,1 \pm 0,2
MSN-COOH	-	230 \pm 50	-28 \pm 5	810 \pm 70	3,1 \pm 0,3
MSN_COOH_GA3	7	230 \pm 20	-28 \pm 5	790 \pm 10	2,9 \pm 0,1
MSN_COOH_GA2	70	230 \pm 10	-30 \pm 2	790 \pm 20	2,9 \pm 0,1
MSN_COOH_GA1	280	220 \pm 20	-26 \pm 3	810 \pm 20	2,9 \pm 0,1

Die Funktionalisierung und die Menge an eingesetzter Glucuronsäure bzw. Glucosamin hatten keine signifikanten Auswirkungen auf die spezifische Oberfläche, den NL-DFT Porendurchmesser, sowie den hydrodynamischen Durchmesser und das Zetapotential in 1 mM KCl mit einem pH-Wert von 5 (vgl. Tabelle 8). Durch TG-Analysen konnte die erfolgreiche Funktionalisierung der MSN_NH₂, MSN_PEI und MSN_COOH bestimmt werden. In Abbildung 52 ist der Massenverlust der Partikel in Abhängigkeit der Temperatur und normiert auf 150 °C dargestellt. Für alle Partikel zeigte sich der höchste Massenverlust für die Partikel GS1 bzw. GA1, die mit 280 $\mu\text{mol/g}$ an Glucosederivat-funktionalisiert wurden. Der Unterschied im Massenverlust bzw. in der Restmasse ($T = 1000$ °C) zwischen den mit 7 und 70 $\mu\text{mol/g}$ funktionalisierten Partikeln GS3 bzw. GA3 und GS2 bzw. GA2 war hingegen minimal. Abschließend kann gesagt werden, dass MSN_NH₂, MSN_PEI und MSN_COOH ohne große Veränderung der physikalischen Eigenschaften, wie spezifischer Oberfläche,

Porendurchmesser, hydrodynamischer Radius und Zetapotential, erfolgreich mit Glucuronsäure bzw. Glucosamin modifiziert werden konnten.

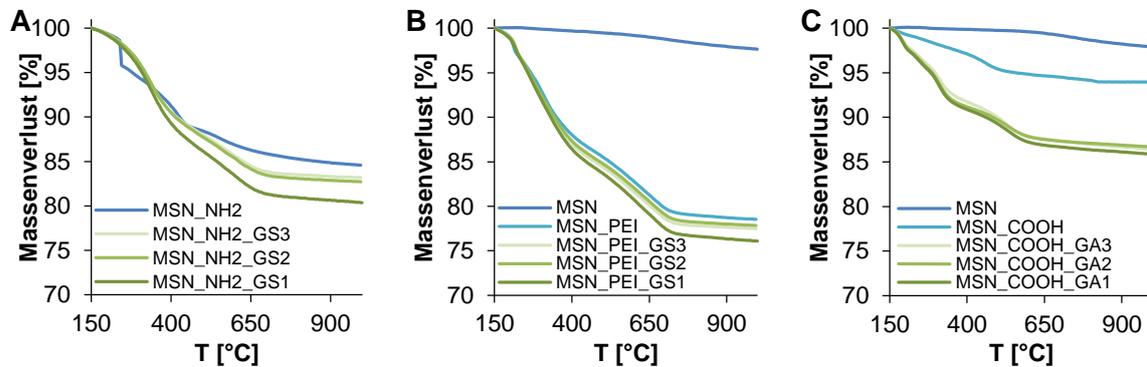


Abbildung 52: Thermogravimetrische Analyse der (A) MSN_NH₂, (B) MSN_PEI, (C) MSN_COOH, sowie der jeweiligen Glucosederivat-funktionalisierten MSN. Alle Partikel wurden mit 7 (GS3 bzw. GA3), 70 (GS2 bzw. GA2), 280 (GS1 bzw. GA1) $\mu\text{mol/g}$ Glucuronsäure (GS) bzw. Glucosamin (GA) funktionalisiert.^[203]

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche biologische Anwendung sind stabile Partikeldispersionen unter physiologisch relevanten Bedingungen, da Partikelagglomerate im Vergleich zu ihren gut dispergierten Pendanten unterschiedliche Effekte auf Zellen haben können. Aufgrund des geringeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses kann es zur verminderten Toxizität und/oder geringeren zellulären Aufnahme im Falle von instabilen Dispersionen bzw. Partikelagglomeraten kommen.^[206] Um die Stabilität von Glucosederivat-funktionalisierten MSN zu untersuchen, wurden diese in DMEM mit 10 % FCS dispergiert und bei 37 °C statisch inkubiert. Der hydrodynamische Durchmesser wurde über einen Zeitraum von 24 h mittels DLS-Messung untersucht. Der Verlauf über die Zeit ist in Abbildung 53 A exemplarisch für die MSN_NH₂ und MSN_NH₂_GS1 dargestellt (die Schaubilder der restlichen Partikel finden sich im Anhang, Abbildung 85).

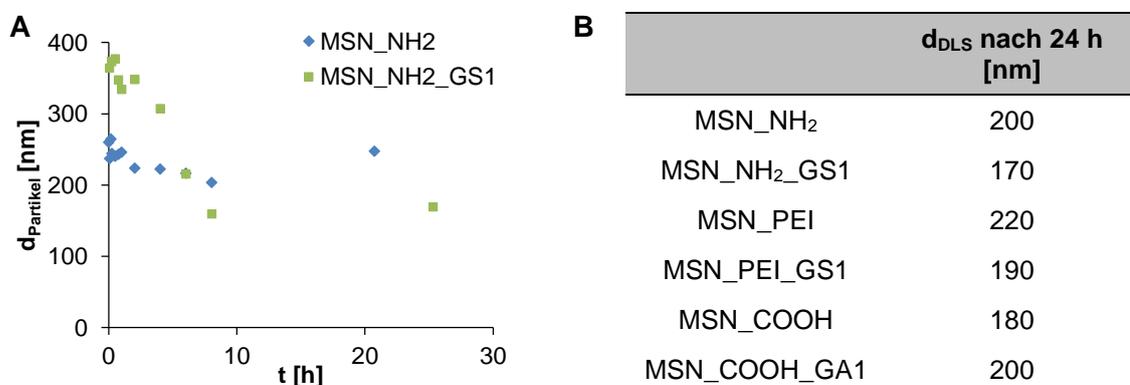


Abbildung 53: Dispersionsstabilität der Glucosederivat-funktionalisierten MSN in DMEM + 10 % FCS bei 37 °C. (A) Messung des hydrodynamischen Radius über einen Zeitraum von 24 h der MSN_NH₂ und MSN_NH₂_GS1 sowie (B) hydrodynamischer Radius der Partikel nach Inkubation in DMEM + 10 % FCS nach 24 h.^[203]

Schwankungen zu Beginn des Messzeitraums resultierten aus Adsorptions- und Desorptionsvorgängen von Proteinen auf der Partikeloberfläche. Ein stabiler hydrodynamischer Durchmesser konnte über den gesamten Messzeitraum beobachtet werden. Für alle Partikel konnte nach 24 h ein hydrodynamischer Durchmesser in der Größenordnung von 170-220 nm nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 53 B). Dies zeigt, dass Dispersionen, welche über einen Zeitraum von 24 h stabil sind, hergestellt werden konnten und diese somit die Grundvoraussetzung für eine spätere *in vitro* oder *in vivo* Applikation erfüllen.

Ein weiterer Schlüsselfaktor für die Anwendung und Risikoabschätzung von Partikeln in biologischen Systemen, ist die Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche. Adsorbierte Proteine beeinflussen die Eigenschaften der Partikel maßgeblich und erhöhen die Erkennung durch das retikuloendotheliale System (RES). Dies hat die Entfernung der Partikel aus dem Blutstrom und somit aus dem Körper zur Folge.^[6] Nachfolgend wurde der Einfluss der Glucosederivat-Funktionalisierung auf die Proteinadsorption unterschiedlich geladener MSN untersucht. Um die Vergleichbarkeit mit *in vitro* Studien zu gewährleisten, wurden die Partikel (1 mg/mL) hierbei in PBS mit einem Zusatz von 10 % FCS dispergiert und für 24 h unter physiologisch relevanten Bedingungen bei 37 °C rotiert. Nach der Entfernung von lose gebundenen Proteinen durch mehrmaliges Waschen, wurden die stark gebundenen Proteine von der Partikeloberfläche abgelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

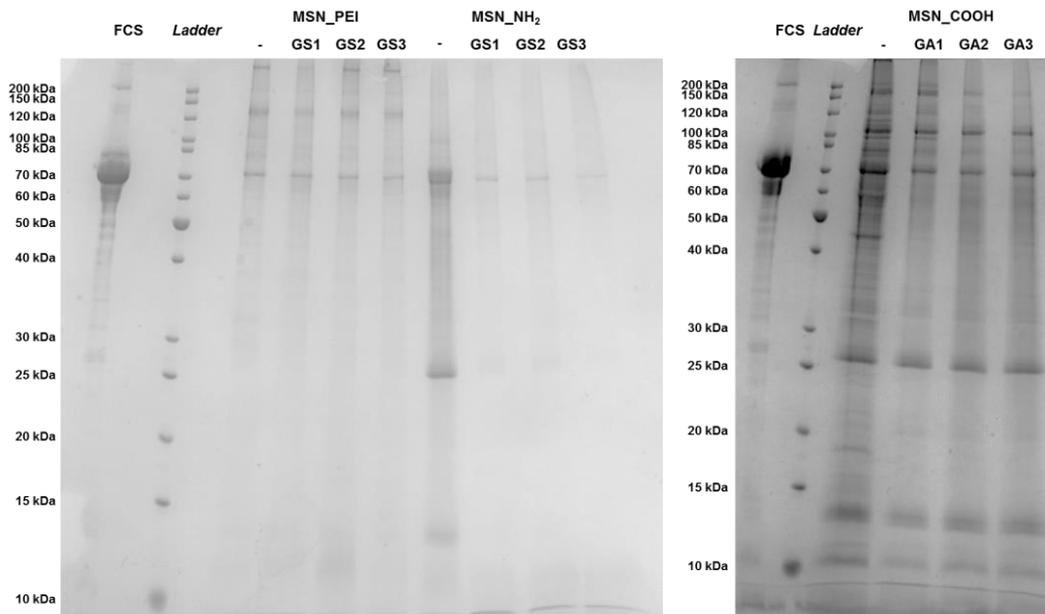


Abbildung 54: Proteincorona der Glucosederivat-funktionalisierten MSN, aufgetrennt durch SDS-PAGE nach 24-stündiger Inkubation in PBS + 10 % FCS bei 37 °C. (je ein repräsentatives Gel aus drei)^[203]

Abbildung 54 zeigt die mit Coomassie nach Kang *et al.*^[188] angefärbten Gele (12%ig) nach der Auftrennung der Proteincorona der MSN_NH₂, MSN_COOH und MSN_PEI, die mit 0, 7, 70 und 280 µmol/g Glucosederivat funktionalisiert wurden. Die Auswertung der Gele und die Zuordnung der Proteine erfolgten analog zu Abschnitt III.2.2. Auf eine Quantifizierung der Intensität einzelner Banden wurde auch in diesem Teil aufgrund des hohen Fehlers der inhomogenen Hintergrundfärbung der Gele verzichtet.

Vergleicht man die unterschiedlich geladenen MSN_NH₂ (ζ -Pot. = 26 mV), MSN_PEI (ζ -Pot. = 38 mV) und MSN_COOH (ζ -Pot. = -28 mV) hinsichtlich der Gesamtmenge und Zusammensetzung der Proteincorona, so sind deutliche Unterschiede erkennbar. Die Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen war für die MSN_COOH höher als für die MSN_NH₂. Die MSN_PEI zeigten die geringste Proteinadsorption. Für alle Partikel war eine deutlich ausgeprägte Bande bei ca. 70 kDa vorhanden, die hauptsächlich BSA mit einem Molekulargewicht von 69 kDa zugeordnet werden kann. Für die MSN_NH₂ wurde eine zweite Bande bei ca. 25 kDa sichtbar und eine etwas schwächere Bande im Bereich von 13 kDa, die von adsorbiertem Apolipoprotein A-I (30 kDa) und Apolipoprotein A-II (11 kDa) stammen könnten. Die MSN_PEI wiesen eine etwas unschärfere Bande im Bereich von 130 kDa auf, was Thrombospondin-1 (130 kDa) entsprechen könnte. Weitere Banden waren aufgrund der geringen Proteinmenge der *hard corona* nicht sichtbar. Die Anzahl an Proteinen, die auf der Oberfläche adsorbieren, war für die MSN_COOH am höchsten. Es waren definierte Banden in der Größenordnung von 100, 82, 70, 44 und 25 kDa sowie breitere Banden bei 170, 60, 18, 13 und 11 kDa detektierbar. Diese können unter anderem den Proteinen α -2-Makroglobulin (168 kDa), Inter- α -trypsininhibitoren (1,3 und/oder 4) (100-102 kDa), Serotransferrin (78 kDa), Faktor XIIIa Inhibitor (56 kDa), Fetuin B (43 kDa), Apolipoprotein A-I (30 kDa), Hämoglobinuntereinheiten (15-16 kDa) sowie dem Apolipoprotein A-II (11 kDa) zugeordnet werden. Viele Banden bestehen nicht nur aus Einzelproteinen, sondern vielmehr aus Proteinmischungen, welche basierend auf diesen Untersuchungen nicht genauer spezifiziert werden können. Hierfür könnte eine zusätzliche Auftrennung in Abhängigkeit des isoelektrischen Punktes (2D-Gelelektrophorese) und anschließende Analyse mittels Massenspektrometrie genauere Erkenntnisse liefern.

Für die MSN_NH₂ und MSN_COOH konnte die Proteinadsorption durch die Funktionalisierung mit Glucuronsäure bzw. Glucosamin drastisch reduziert werden. Die MSN_PEI_GS hingegen zeigten keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Proteinadsorption zu den MSN_PEI.

Für die MSN_NH₂_GS im Vergleich zu den MSN_NH₂ wurde die BSA-Bande bei 70 kDa deutlich abgeschwächt und die Banden bei 25 und 13 kDa waren nicht mehr sichtbar. Für die MSN_COOH_GA1-3 nimmt die Gesamtmenge an adsorbiertem Protein ab. Die adsorbierten Proteine der MSN_COOH bei 82, 60, 44 sowie 18 kDa waren in der Proteincorona der

MSN_COOH_GA1-3 nicht mehr vorhanden. Zudem nahm die adsorbierte Menge an Serumalbumin durch die Glucosamin- bzw. Glucuronsäure-Funktionalisierung ab.

Die formal neutrale Ladung und hohe Hydrophilie der Zuckermoleküle auf der Partikeloberfläche sorgen für eine geringe Proteinadsorption auf den MSN_NH₂_GS1-3 und MSN_COOH_GA1-3. Für die MSN_PEI_GS1-3 könnte die Menge an eingesetzter Glucuronsäure nicht ausreichen, um die zahlreichen Aminogruppen der PEI-Schicht effektiv abzuschirmen und somit in der Reduzierung der *hard corona* resultieren.^[65] Da die Glucosederivate zusätzlich als Liganden für die gezielte Aufnahme in bestimmten Zellen dienen können, ist es denkbar, dass die verminderte Proteinadsorption die Zugänglichkeit der Glucosederivate deutlich verbessert und sich positiv auf die selektive Aufnahme dieser Partikel auswirkt.

Abschließend ergibt sich, dass MSN_NH₂, MSN_PEI und MSN_COOH erfolgreich mit Glucosederivaten funktionalisiert werden konnten. Durch die Modifizierung mit Glucuronsäure bzw. Glucosamin wurde keine Veränderung der Oberflächenladung und nur eine geringe Abnahme der spezifischen Oberfläche sowie des Porendurchmessers im Vergleich zu den MSN_NH₂, MSN_PEI bzw. MSN_COOH beobachtet. Partikeldispersionen konnten sowohl mit als auch ohne Glucosederivat-Funktionalisierung über einen Zeitraum von 24 h in DMEM mit 10 % FCS stabilisiert werden und stellen somit die Grundvoraussetzung für eine spätere biologische Applikationen dar. Die Untersuchung der Proteinadsorption mittels SDS-PAGE zeigte eine deutliche Reduzierung der Gesamtmenge an adsorbiertem Protein für die MSN_NH₂_GS1-3 und MSN_COOH_GA1-3 im Vergleich zu den MSN_NH₂ und MSN_COOH unabhängig von der eingesetzten Menge an Glucuronsäure bzw. Glucosamin. Für die MSN_PEI und MSN_PEI_GS1-3 war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die MSN_NH₂_GS1-3 resultierten in der geringsten Menge an adsorbierten Proteinen. Eine geringe Proteinadsorption soll die Zugänglichkeit der Glucosederivate als Liganden für die gezielte Aufnahme *in vitro* und *in vivo* gewährleisten.

3.1.2 Einfluss der Form auf die Proteinadsorption und Dispergierbarkeit

Untersuchungen zeigten, dass die Oberflächenkrümmung und somit die Größe und Form von Partikeln die unspezifische Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche beeinflussen können.^[207] Clemments *et al.* gelang es zu zeigen, dass sich kleinere Proteine vermehrt auf kleineren nicht-porösen und mesoporösen Silikananopartikeln mit einer höheren Krümmung anreichern.^[208] Die Gruppe um Dawson beschrieb, dass sich die Proteincorona von 50 und 100 nm großen Polystyrolpartikeln unterschiedlicher Funktionalisierung unterscheiden. Je nach biologischer Funktionalität der adsorbierten Proteine können diese in unterschiedlichen biologischen Effekten resultieren.^[209]

Um den Einfluss der Morphologie von MSN auf die unspezifische Proteinadsorption zu untersuchen, wurden sphärische und stäbchenförmige Partikel, wie in Abschnitt III.1.2.1 beschrieben, über den Sol-Gel-Prozess mit C_{16} TAB als SDA hergestellt. Durch TEM-Aufnahmen konnte das AR der Partikel auf durchschnittlich 1,1 (MSN1), 2,5 (MSN2) und 3,5 (MSN4) bestimmt werden (vgl. Tabelle 9 bzw. Abbildung 13).

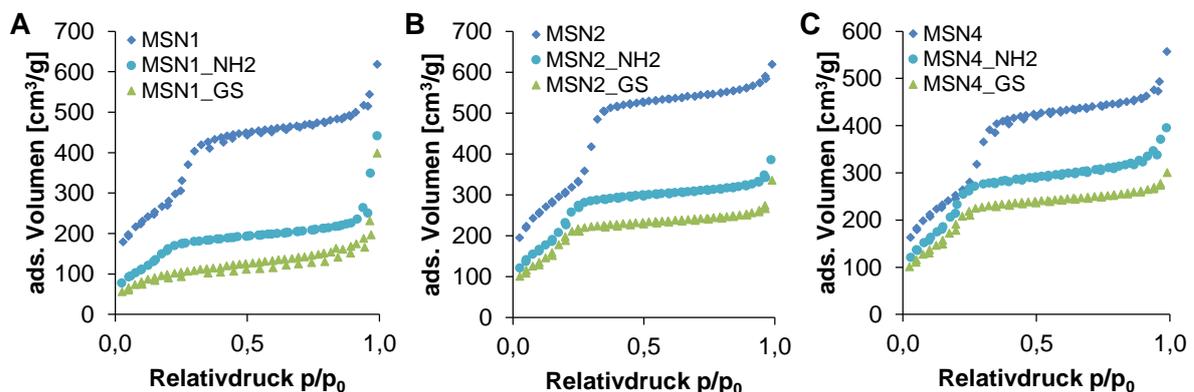


Abbildung 55: Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel mit unterschiedlichen AR (MSN1, MSN2 bzw. MSN4). Reine Silikapartikel, aminofunktionalisierte (NH₂) und Glucuronsäure(GS)-funktionalisierte Partikel.^[171]

Aufgrund der geringen Menge an adsorbierten Proteinen auf den MSN_NH₂_GS1-3 (vgl. Abschnitt III.3.1.1) erfolgte die Aminofunktionalisierung der MSN_1, MSN2 und MSN4 durch postsynthetische Modifizierung mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) in Toluol (MSN1_NH₂, MSN2_NH₂ bzw. MSN4_NH₂). Im Anschluss daran wurde die Anbindung von Glucuronsäure (280 $\mu\text{mol}/\text{g}$) analog zu Abschnitt III.3.1.1 durchgeführt. Die Funktionalisierung und chemische Charakterisierung der Partikel wurde von Pascal Piller im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.^[171]

Die Stickstoffsorptionsisothermen der Silika, amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten Partikel unterschiedlicher Länge sind in Abbildung 55 dargestellt. Alle Partikel wiesen den für

mesoporöse Materialien typischen Verlauf einer Typ IV^[162] Isotherme auf. Die spezifische Oberfläche der Partikel lag durchschnittlich bei 840 m²/g für die MSN1 und im Bereich von 1030-1080 m²/g für die MSN2 und MSN4. Der Porendurchmesser, welcher nach der NL-DFT-Methode bestimmt wurde, lag zwischen 3,4-3,7 nm. Durch die postsynthetische Modifizierung der Partikel mit APTES wurde die spezifische Oberfläche um ca. 30-40 % und der Porendurchmesser um 12-14 % vermindert. Die anschließende Funktionalisierung mit Glucuronsäure führte zu einer weiteren Verminderung der BET-Oberfläche um 17-21 % sowie des NL-DFT-Porendurchmessers der MSN1 um ca. 10 %. Der Porendurchmesser für die MSN2 und MSN4 änderte sich durch die Glucuronsäure-Funktionalisierung nicht merklich. Die Abnahme der spezifischen Oberfläche und des Porendurchmessers resultiert aus dem Platzbedarf der organischen Funktionen in den Porenkanälen.

Tabelle 9: Charakterisierungsdaten aus DLS- und Stickstoffsorptionsmessungen der Glucosederivat-funktionalisierten MSN unterschiedlicher Länge (Mittelwert ± St.Abw.). DLS und Zetapotential wurden in 1 mM KCl (pH 5) gemessen.^[171]

	AR	d _{DLS} [nm]	ζ-Pot [mV]	S _{BET} [m ² /g]	d _{Pore, DFT} [nm]
MSN1		270±70	-9±2	840±180	3,4±0,2
MSN1_NH ₂	1,1±0,1	230±30	+29±6	530±20	3,0±0,1
MSN1_GS		220±30	+19±6	440±70	2,7±0,1
MSN2		440±110	-7±2	1080±30	3,7±0,1
MSN2_NH ₂	2,6±0,2	500±50	+28±6	760±10	3,2±0,0
MSN2_GS		490±160	+21±3	630±10	3,1±0,0
MSN4		480±150	-9±6	1030±70	3,7±0,0
MSN4_NH ₂	3,4±0,3	380±50	+27±2	760±10	3,2±0,0
MSN4_GS		280±20	+29±2	600±10	3,2±0,0

Die Aminofunktionalisierung der Partikel konnte qualitativ über Zetapotentialmessungen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 9). Dieses veränderte sich für die MSN1, MSN2 und MSN4 durch die postsynthetische Modifizierung im Durchschnitt von -7 bis -9 mV auf +27 bis +29 mV. Durch die Reaktion der Silanolgruppen mit dem APTES änderte sich, bedingt durch die Aminogruppen, die Partikelladung in 1 mM KCl (pH 5). Die weitere Funktionalisierung mit Glucuronsäure zeigte keine merkliche Änderung des Zetapotentials.

Die Funktionalisierung der Partikel konnte über TG-Analyse bestimmt werden (vgl. Abbildung 56). Um den Einfluss von adsorbiertem Wasser auf der Partikeloberfläche auf den Verlauf der TG-Kurve zu minimieren, wurde die TG-Kurve auf 150 °C normiert. Der Massenverlust im Temperaturbereich von ca. 150-650 °C entspricht der Verbrennung der organischen Funktionen der MSN. Unabhängig von der Form zeigten die Glucuronsäure-funktionalisierten

MSN einen höheren Massenverlust als die aminofunktionalisierten MSN, was auf eine Funktionalisierung der Partikel mit Glucuronsäure hinweist.

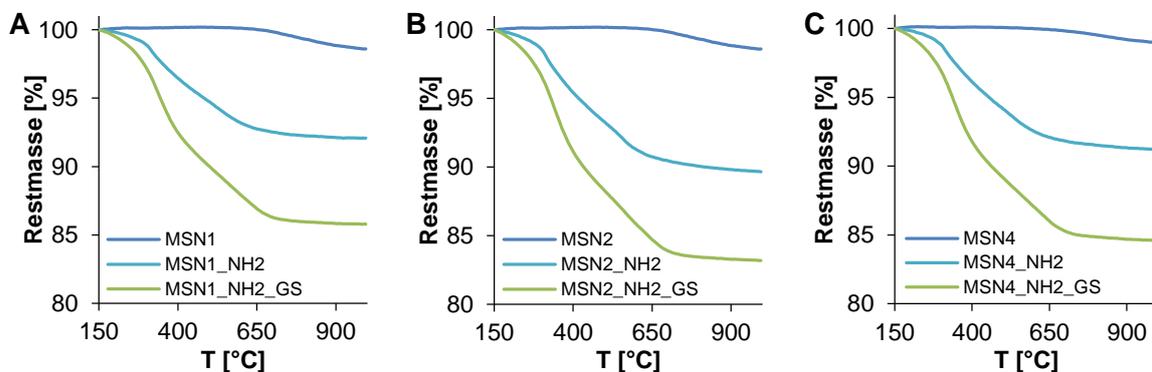


Abbildung 56: TG-Analyse der Silika, amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN mit Längen-Breiten-Verhältnissen von (A) 1,1, (B) 2,6 und (C) 3,4.^[171]

Die Stabilität der stäbchenförmigen Partikel wurde in DMEM mit 10 % FCS mittels DLS-Messungen bei 37 °C untersucht (analog zu Abschnitt III.3.1.1). Der Verlauf des hydrodynamischen Radius ist exemplarisch für die amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN2 dargestellt. Über den gesamten Zeitraum von 24 h war ein stabiler hydrodynamischer Durchmesser im Bereich von 200-400 nm detektierbar (vgl. Abbildung 57 (die Schaubilder der restlichen Partikel finden sich im Anhang, Abbildung 86)). Für stäbchenförmige Partikel ist keine Aussage über die tatsächliche Partikelgröße mittels DLS möglich, jedoch weist der stabile hydrodynamische Durchmesser auf eine stabile Partikeldispersion hin. Für alle Partikel waren hydrodynamische Durchmesser von 170-240 nm nach 24 h statischer Inkubation messbar. Somit hat die Form keinerlei Einfluss auf die Dispersionsstabilität von amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN.

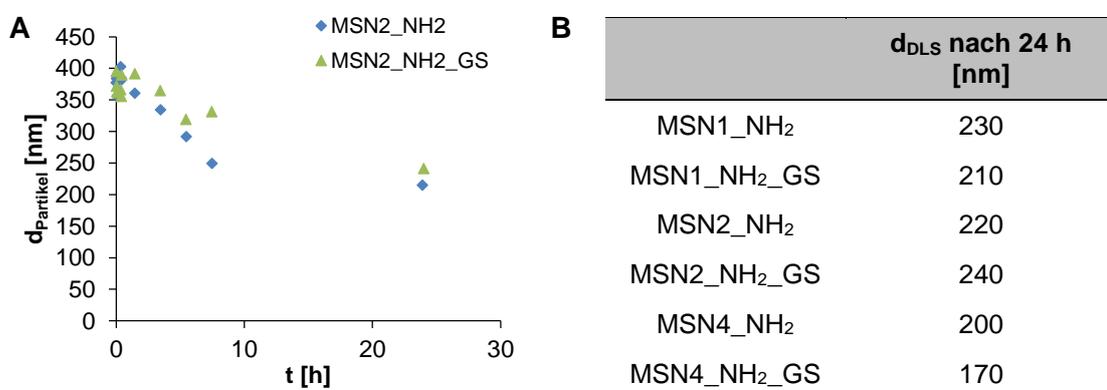


Abbildung 57: Untersuchung der Dispersionsstabilität von amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN1, MSN2 und MSN4 in DMEM + 10 % FCS bei 37 °C mittels DLS.

Um den Einfluss der Form auf die Proteinadsorption von amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN zu analysieren, wurden die Partikel in PBS mit 10 % FCS bei 37 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die entstandene *hard corona* analog zu den Abschnitten III.2.2 und III.3.1.1 mittels SDS-PAGE untersucht.

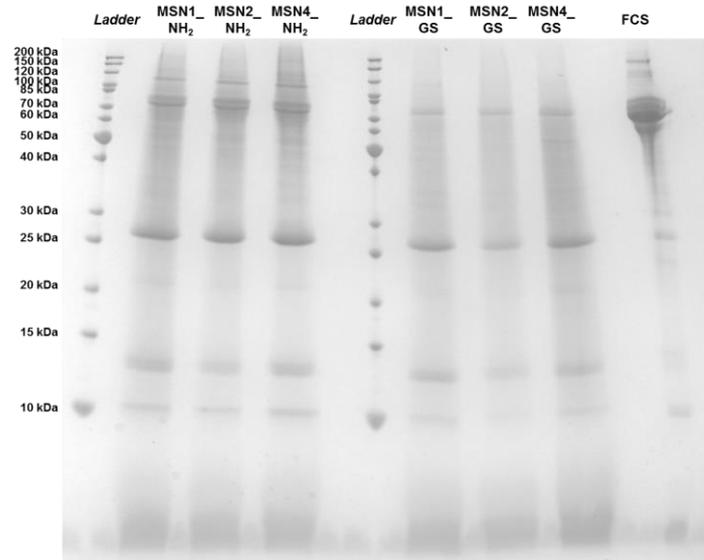


Abbildung 58: Auftrennung der Proteincorona der MSN unterschiedlicher Länge mit und ohne Glucuronsäure-Funktionalisierung nach Inkubation in PBS + 10 % FCS für 24 h. (je ein repräsentatives Gel aus drei)

Für die aminofunktionalisierten Partikel konnten insgesamt 5 Banden nach Anfärben der Gele mit Coomassie nach Kang *et al.*^[188] detektiert werden. Im Unterschied zu den Beobachtungen in der Literatur^[207–209], zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede in Abhängigkeit der Form oder Größe (vgl. Abschnitt III.3.1.2, S. 89). Für die aminofunktionalisierten MSN konnten Proteine mit Molekulargewichten im Bereich von 110, 75, 27, 13 sowie 10 kDa detektiert werden, welche dem Inter- α -trypsininhibitoren (1,3 und/oder 4) (100-102 kDa), dem Serum Albumin, (69 kDa), dem Apolipoprotein A-I (30 kDa) und dem Apolipoprotein A-II (11 kDa) entsprechen könnten. Analog zu den sphärischen MSN in Abschnitt III.3.1.1 gelang es, die Proteinadsorption durch die Funktionalisierung mit Glucuronsäure zu vermindern. Die Adsorption der Proteine mit einem Molekulargewicht von 110 kDa konnte nach der Funktionalisierung nicht mehr nachgewiesen werden, wohingegen die Adsorption der Proteine bei 75, 27, 13 und 10 kDa abgeschwächt wurden. Die Reduzierung der Proteinadsorption durch die Glucuronsäure-Funktionalisierung erfolgte nicht in gleichem Maß wie für die Co-kondensierten Glucuronsäure-funktionalisierten MSN_NH₂ (Abschnitt III.3.1.1, Abbildung 54). Denkbar ist, dass dies aus der erhöhten Zugänglichkeit der Aminofunktionen auf der Oberfläche durch die postsynthetische Funktionalisierung resultiert (vgl. Einleitung, Abschnitt I.2.2). Die Abschirmung durch die anschließende Glucuronsäure-Modifizierung ist in diesem Fall weniger effizient, verglichen mit Partikeln, die über die Co-Kondensationsmethode

hergestellt wurden. Die aminofunktionalisierten sphärischen Partikel mit einer Größe von 100 nm und die stäbchenförmigen Partikel MSN2 und MSN4 hingegen unterschieden sich nicht in der Art und Menge der adsorbierten Proteine.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass amino- und Glucuronsäure-funktionalisierte MSN mit unterschiedlichem Längen-Breiten-Verhältnis sowie nahezu gleicher spezifischer Oberfläche und gleichem Zetapotential hergestellt werden konnten. Die Stabilität der Dispersionen der Partikel in Zellkulturmedium unter FCS-Zusatz konnte über einen Zeitraum von 24 h bestätigt werden. Es zeigte sich kein Einfluss des Längen-Breiten-Verhältnisses auf die Proteincorona der Partikel, bestimmt durch SDS-PAGE.

3.2 Gezielter Medikamententransport in Brustkrebsstammzellen

Der Inhalt dieses Abschnitts wurde zusammen mit den Arbeitsgruppen um Jessica Rosenholm (Synthese und Charakterisierung der MSN-NH₂, MSN-PEI und MSN-PEI-GS_{org}) sowie Cecilia Sahlgren (in vitro und in vivo Analyse der Partikel) in Turku (Finnland) erarbeitet und 2016 in *Molecular Therapy* unter dem Titel „Inhibiting notch activity in breast cancer stem cells by glucose functionalised nanoparticles carrying γ -inhibitors“ veröffentlicht. (<http://dx.doi.org/10.1038/mt.2016.42>) (Publiziert im Rahmen der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike License: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)^[152]

Analog zu Leukämien (vgl. Abschnitt III.2) konnten in manchen soliden Tumoren, wie Brust- oder Hirntumoren, Krebsstammzellen identifiziert werden.^[152,210] Aufgrund der hohen Tumorigenität und der Fähigkeit der Selbsterneuerung bzw. Differenzierung spielen diese Krebsstammzellen nicht nur in der initialen Tumorbildung, sondern auch in Vorgängen wie Tumorwachstum, Metastasierung, Resistenz von Therapien und dem Auftreten von Rezidiven eine große Rolle.^[152,210,211]

Störungen in Signalwegen wie dem Wnt-, Hedgehog- oder Notch-Signalweg, welche für die Funktion von Stammzellen während der Entwicklung verantwortlich sind, treten häufig in Tumoren auf.^[152,212] Sowohl in soliden Tumoren als auch in Leukämien kann Notch, abhängig von der Krebsart und dem Subtyp, entweder als Tumor-Suppressor oder als onkogener Faktor eine Rolle spielen.^[152,212,213] Auch in Brustkrebs steht Notch in enger Verbindung mit der Bildung von aggressiven Metastasen und Resistenz gegenüber Therapien.^[152,214–216]

Die Gruppe um Sahlgren konnte zeigen, dass die Selbsterneuerung, das Östrogen-unabhängige Wachstum von Brustkrebsstammzellen, das Tumorwachstum und der Glucosebedarf in MCF-7 Zellen *in vitro* und *in vivo* mit gesteigerter Notch-Aktivität deutlich erhöht sind.^[152,217] Zudem wiesen sie nach, dass Brustkrebsstammzellen eine deutlich höhere glykolytische Aktivität haben als normale Brustkrebszellen.^[152,217]

Um die Notch-Aktivität zu reduzieren, werden in der Therapie γ -Sekretase-Inhibitoren, Antikörper oder Peptide eingesetzt. In den meisten Fällen limitieren allerdings starke Nebenwirkungen deren Einsatz.^[154,155] Durch den selektiven Transport dieser Wirkstoffe in Krebsstammzellen könnten diese bevorzugt an den jeweiligen Wirkungsort gelangen, womit sich Nebenwirkungen reduzieren und der Therapieerfolg erhöhen ließen (vgl. Einleitung, Abschnitt I.4.3).^[152]

Glucosederivat-funktionalisierte MSN wurden aufgrund der erhöhten glykolytischen Aktivität von Brustkrebsstammzellen als Transportsysteme des γ -Sekretase-Inhibitors *N*-[*N*-(3,5-Difluorphenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycyl-*tert*-butylester (DAPT) *in vitro* und *in vivo* eingesetzt. Da die Proteinadsorption unabhängig von der Form der Partikel sowie der Menge an Glucuronsäure bzw. Glucosamin ist (vgl. Abschnitt III.3.1.2), wurden analog zu den Abschnitten III.2 und III.4 die auf der Synthese von Rosenholm *et al.*^[28] basierenden MSN (vgl. Abschnitt III.1.1) verwendet sowie eine größere Menge an Glucose-Derivat zur Funktionalisierung eingesetzt. Basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt III.3.1 und der Literatur^[26], wurden die kationischen MSN-PEI und die anionischen MSN-COOH mit Glucosederivat- (Glucuronsäure- bzw. Glucosamin-)Funktionalisierung für diese Untersuchungen ausgewählt. Die Synthese der MSN-PEI und anschließende Funktionalisierung mit Glucuronsäure (MSN-PEI-GS_{org}) führte die Gruppe um Jessica Rosenholm durch.^[26] Die Synthese der MSN-COOH_GA erfolgte analog zu Abschnitt III.3.1.1.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Charakterisierung der unterschiedlich funktionalisierten Partikel, die für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen eingesetzt wurden. Die Partikelgröße, bestimmt durch TEM, der MSN-NH₂, lag im Bereich von 250-300 nm, wohingegen die calcinierten MSN eine Größe von ca. 180 nm aufwiesen. Durch DLS konnte der hydrodynamische Radius in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) bestimmt werden. Auch hier zeigte sich, dass die MSN-NH₂ mit einer Größe von ca. 490 nm deutlich größer waren als die MSN mit 230 nm. Der deutlich höhere Durchmesser der MSN-NH₂ in DLS-Messung im Vergleich zu TEM-Aufnahmen weist jedoch auf das Vorliegen von Agglomeraten während der DLS-Messung hin.

Tabelle 10: Übersicht über die TEM-, DLS-Messungen und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Glucuronsäure- und Glucosamin-funktionalisierten Partikel sowie die Menge an DAPT auf den Partikeln, bestimmt durch HPLC-Messungen ($\lambda = 222$ nm). (**gemessen in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM); ^aCharakterisierungsdaten dieser Proben (d_{DLS} , Zetapotential, Menge an DAPT [Gew.%], Fluoreszenzintensität übernommen aus^[26,152]; ^bFITC, $\lambda_{exc} = 492$ nm , $\lambda_{em} = 520$ nm (1 mg/mL in HEPES); ^cATTO 647N, $\lambda_{exc} = 644$ nm , $\lambda_{em} = 664$ nm (1 mg/mL in Ethanol))

	Partikel	d_{TEM} [nm]	d_{DLS} [nm]**	Zetapotential [mV]**	DAPT [wt%]	Fluoreszenz- intensität
	MSN-NH ₂ ^{a, [26,152]}	250-300	494	+10	-	840 ^b
Turku	MSN-PEI ^{a, [26,152]}	-	472	+54	7,37	439 ^b
	MSN-PEI-GS _{org} ^{a, [26,152]}	-	216	+28	3,76	385 ^b
	MSN	~180	230	-35	-	-
Ulm	MSN-COOH	-	180	-31	1,32	1831 ^c
	MSN-COOH_GA	-	190	-34	1,51	2279 ^c

Die erfolgreiche PEI- und Glucuronsäure-Funktionalisierung der aminofunktionalisierten MSN-NH₂ mit einem Zetapotential von +10 mV konnte durch die Veränderung des Zetapotentials der Partikel nachverfolgt werden. Durch die Oberflächenpolymerisation von Ethylenimin wurde die Anzahl an positiven Gruppen auf der Oberfläche deutlich vermehrt, einhergehend mit der Erhöhung des Zetapotentials auf +54 mV. Die Anbindung der Glucuronsäure an die PEI-Schicht auf der Oberfläche resultierte in einer leichten Verminderung der positiven Ladung, das Zetapotential sank auf +28 mV ab.

Die Funktionalisierung der calcinierten Partikel mit dem Carboxyethylsilan sowie die weitere Funktionalisierung mit Glucosamin hatten analog zu Abschnitt III.3.1.1 keine großen Auswirkungen auf das Zetapotential in HEPES-Puffer. Alle Partikel wiesen ein Zetapotential im Bereich von -31 bis -35 mV auf und lagen somit unter diesen Bedingungen negativ geladen vor (vgl. Abbildung 59 A). Anhand der TG-Analyse konnte die erfolgreiche Carboxy- bzw. Glucosamin-Funktionalisierung nachgewiesen werden. Abbildung 59 B zeigt den auf 150 °C normierten Massenverlust der Partikel aus der TG-Analyse. Der gesamte Massenverlust bis 1000 °C nahm mit der Anzahl der Funktionalitäten auf der Oberfläche zu. Der Massenverlust der calcinierten MSN beruht auf freigesetztem Wasser, bedingt durch intra- und interpartikuläre Kondensationsreaktionen. Bei den MSN_COOH und MSN_COOH_GA kommt es mit steigender Temperatur, neben der Verdichtung des Netzwerks durch Kondensationsreaktionen, zum Verlust der organischen Funktionalitäten.

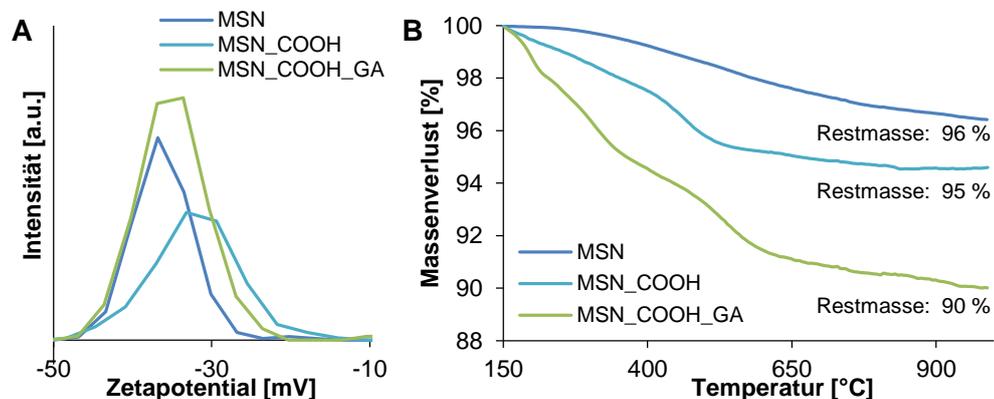


Abbildung 59: (A) Zetapotentialmessungen und (B) TG-Analyse der Silikananopartikel (MSN) im Vergleich zu den carboxy- (MSN_COOH) und Glucosamin- (MSN_COOH_GA) funktionalisierten Partikeln.^[152]

Um die Partikel in biologischen Anwendungen detektieren zu können, wurden diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. MSN_COOH und MSN_COOH_GA wurden durch die Anbindung des Farbstoffes ATTO 647N an die Carboxygruppen und die MSN-PEI und MSN-PEI-GS_{org} durch die Anbindung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an die Aminogruppen markiert. Für alle Partikel konnte eine erfolgreiche Funktionalisierung mittels Fluoreszenzspektroskopie bestätigt werden. Die Fluoreszenzintensitäten ($\lambda_{em, FITC} = 520$ nm

bzw. $\lambda_{em, ATTO\ 647N} = 664\text{ nm}$) der unterschiedlichen Partikel nach Anregung ($\lambda_{exc, FITC} = 492\text{ nm}$ bzw. $\lambda_{exc, ATTO\ 647N} = 644\text{ nm}$) finden sich in Tabelle 10. Fluoreszenzspektren der ATTO 647N-funktionalisierten Partikel sind im Anhang in Abbildung 87 dargestellt.

In einem ersten Schritt wurde die Partikelaufnahme in Brustkrebszellen (MDA-MB-231-Zellen) mittels FACS nach 4 h Inkubation untersucht (vgl. Abbildung 60). Es zeigte sich, dass die Funktionalisierung mit Glucosederivaten in beiden Fällen zu einer gesteigerten zellulären Aufnahme führte. Die Aufnahme der MSN-PEI-GS_{org} war hierbei gegenüber den MSN-PEI signifikant erhöht (vgl. Abbildung 60 A), im Gegenteil zu den MSN_COOH und MSN_COOH_GA (vgl. Abbildung 60 B). Auch die Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen auf den Glucuronsäure-funktionalisierten MSN-PEI war deutlich geringer als auf den MSN_COOH_GA (vgl. Abschnitt III.3.1.1, Abbildung 54 A und B), wodurch die Zugänglichkeit der Glucosederivat-Liganden auf den MSN-PEI-GS_{org} erhöht und somit die Aufnahme durch die Glucose-Rezeptoren der MDA-MB-231-Zellen verbessert werden kann.

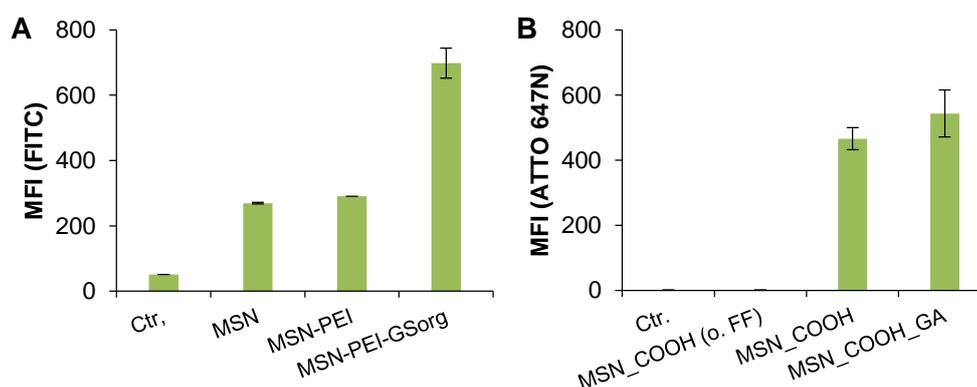


Abbildung 60: Aufnahme der (A) PEI- und (B) carboxyfunktionalisierten Partikel mit und ohne Glucuronsäure- bzw. Glucosamin-Funktionalisierung in MDA-MB-231 Brustkrebszellen. (o. FF = ohne Fluoreszenzfarbstoff) (Mittelwert \pm St.Abw.) (verändert nach ^[152])

In einem weiteren Experiment wurde die Aufnahme der Partikel in gesunden Epithelzellen der Brust (MCF-10-Zellen) im Vergleich zur Aufnahme in Brustkrebszellen (MDA-MB-231-Zellen) untersucht. In Abbildung 61 sind die MFI der Zellen dargestellt, die mit den (A) FITC- bzw. (B) ATTO 647N-markierten Partikel inkubiert wurden.

Es zeigte sich eine höhere Präferenz der Glucosederivat-funktionalisierten Partikel für die Krebszellen. Während die MSN-PEI denselben Trend aufwiesen wie die MSN-PEI-GS_{org}, konnte für die MSN_COOH, im Gegensatz zu den MSN_COOH_GA, kein großer Unterschied in der Aufnahme in den beiden Zellarten beobachtet werden. Hierbei könnte die unspezifische Proteinadsorption das Aufnahmeverhalten der Partikel beeinflussen. Durch die Glucosamin-Funktionalisierung wurde die Proteinadsorption auf den MSN_COOH vermindert (vgl. Abschnitt III.3.1.1, Abbildung 54 B), wohingegen die MSN-PEI mit und ohne Glucuronsäure-Funktionalisierung kaum Unterschiede in der Menge und Zusammensetzung der

Proteincorona aufwiesen (vgl. Abbildung 54 A). Die gleiche Proteinschicht auf den MSN-PEI mit und ohne Glucuronsäure-Funktionalisierung könnte für denselben Trend der Aufnahme in den beiden Zellen verantwortlich sein. Durch die geringe Menge an adsorbierten Proteinen ist die Zugänglichkeit der Glucuronsäure gegeben und führte zu einer gesteigerten Aufnahme der MSN-PEI-GS_{org}. Demgegenüber wiesen die MSN_COOH und MSN_COOH_GA deutliche Unterschiede in der Menge an adsorbierten Proteinen auf, welche in einem deutlichen Unterschied des Aufnahmeverhältnisses (Aufnahme in MDA-MB-231- versus MCF-10-Zellen) der beiden Partikel resultierten. Dennoch zeigten sowohl die MSN-PEI-GS_{org}, als auch die MSN_COOH_GA eine höhere Aufnahme in den MDA-MB-231-Brustkrebszellen mit höherer glykolytischer Aktivität im Vergleich zu den gesunden MCF-10-Zellen. Die gezielte Aufnahme in Brustkrebszellen konnte somit für beide Partikelsysteme *in vitro* bestätigt werden.

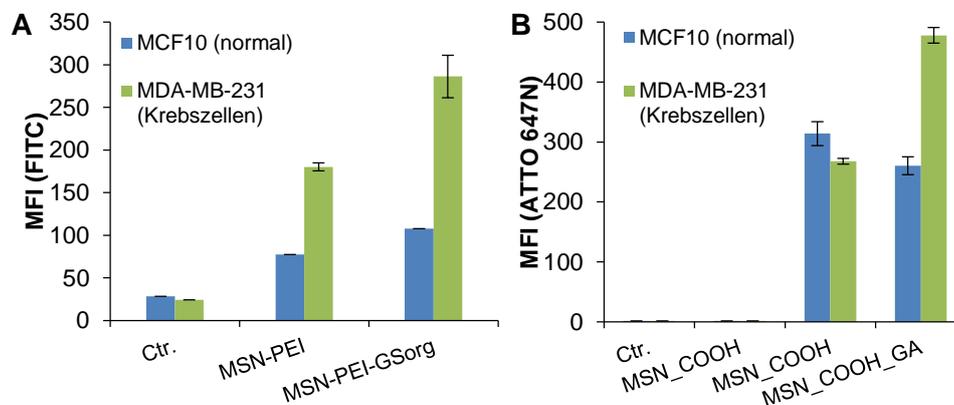


Abbildung 61: Aufnahme der (A) PEI- und (B) carboxy-funktionalisierten Partikel mit und ohne Glucosederivat-Funktionalisierung in MCF10 (gesunde Epithelzellen der Brust) und MDA-MB-231 (Brustkrebszellen). (Mittelwert \pm St.Abw.)(verändert nach ^[152])

Krebsstammzellen zeichnen sich durch eine erhöhte intrazelluläre Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) aus,^[211] weshalb Krebsstammzellen durch die Aktivität des Enzyms ALDH1 mittels ALDEFLUOR-Kit am FACS von Krebszellen differenziert werden können. Im Folgenden wird die zelluläre Aufnahme der Partikel in Krebszellen im Vergleich zu Krebsstammzellen von MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen analysiert (vgl. Abbildung 62).

Für die MSN-PEI und MSN-PEI-GS_{org} zeigte sich eine erhöhte Aufnahme in den MDA-MB-231-Krebsstammzellen im Vergleich zu den MDA-MB-231-Krebszellen (vgl. Abbildung 62 A). Hierbei war in beiden Zellarten die Aufnahme der Glucuronsäure-funktionalisierten Partikel bevorzugt. Der Unterschied zwischen der passiven (MSN-PEI) und der gezielten (MSN-PEI-GS_{org}) Aufnahme war jedoch für die Krebszellen höher. Eine Präferenz der MSN_COOH_GA für die MDA-MB-231-Krebsstammzellen ließ sich nicht erkennen (vgl. Abbildung 62 B). In den weniger glykolytisch aktiven MCF-7-Zellen war der Unterschied der glykolytischen Aktivität zwischen den Krebsstamm- und Krebszellen höher, weshalb die MSN_COOH_GA hier eine erhöhte Aufnahme in den Krebsstammzellen zeigten (vgl.

Abbildung 62 C). Jedoch war die Menge an Glucosamin-funktionalisierten Partikeln aufgrund des geringeren Glucosebedarfs sowohl in den Krebszellen als auch in den Krebsstammzellen der MCF7-Zellen vermindert. Da Krebsstammzellen einen höheren Energiebedarf haben als Krebszellen, ist eine höhere Aufnahme in Krebsstammzellen zu erwarten (vgl. Anhang, Abbildung 88).

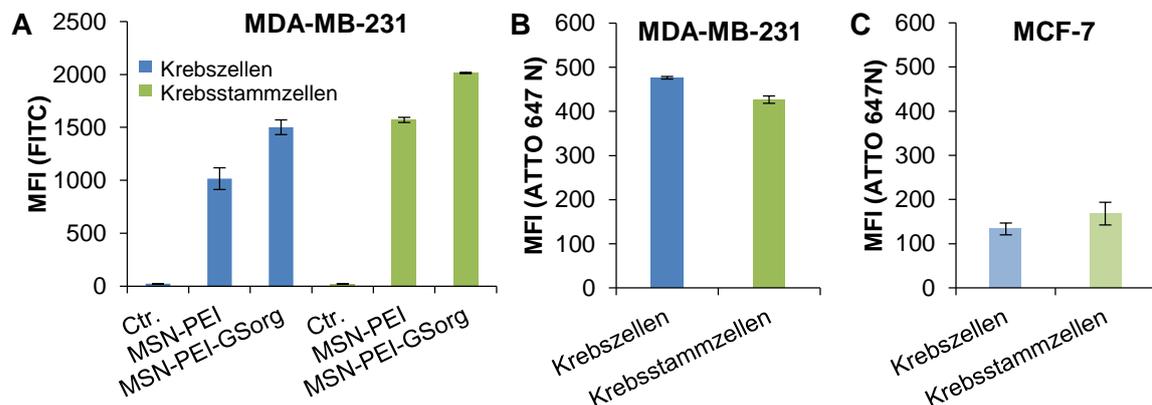


Abbildung 62: Unterschiede in der zellulären Aufnahme verschiedener fluoreszenzmarkierter Partikel in Krebs- versus Krebsstammzellen. (A) Aufnahme von MSN-PEI mit und ohne Glucuronsäure-funktionalisierung und (B) von MSN_COOH_GA in MDA-MB231 sowie (C) MSN_COOH_GA in MCF-7 Krebs- und Krebsstammzellen. Krebsstammzellen wurden durch die ALDH1-Aktivität in FACS-Messungen identifiziert. (Mittelwert \pm St.Abw.) (verändert nach [152])

Um die gezielte Aufnahme *in vivo* zu untersuchen, wurde das Tumorstadium durch Injektion von MDA-MB-231-Zellen in das Brustdrüsengewebe von NSG Mäusen initiiert. Partikeldispersionen (MSN_COOH und MSN_COOH_GA) (20 mg/kg) wurden in die Schwanzvene injiziert und durch Fluoreszenztomographie im Tumor lokalisiert sowie quantifiziert.

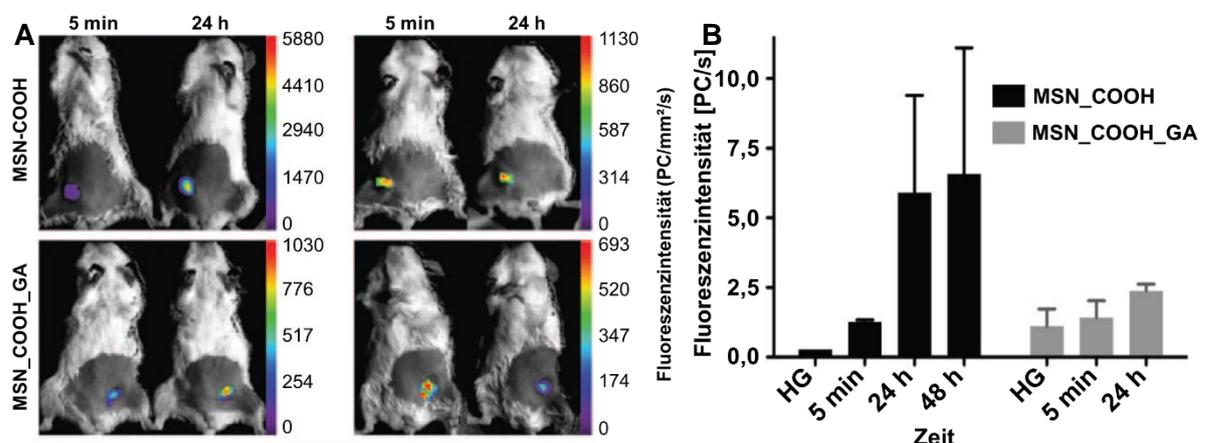


Abbildung 63: Aufnahme der MSN_COOH und MSN_COOH_GA in MDA-MB-231-Tumoren in weiblichen Mäusen *in vivo*. (A) Fluoreszenztomographie von je zwei Mäusen, die entweder mit ATTO 647N funktionalisierten MSN_COOH (oben) oder MSN_COOH_GA (unten) behandelt wurden (HG = Hintergrund). (B) Quantifizierung des Fluoreszenzsignals der Mäuse. (Mittelwert \pm St.Abw.) (verändert nach [152])

Es zeigte sich für beide Partikel eine Akkumulation im Tumorgewebe, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (vgl. Abbildung 63). Bereits nach 5 min konnten Partikel im Tumorgewebe lokalisiert werden. Innerhalb von 24 h kam es zu einer deutlichen Steigerung des Fluoreszenzsignals respektive der Partikelmenge. Die Glucosamin-funktionalisierten Partikel wurden deutlich weniger im Tumor angereichert als die MSN_COOH. Somit konnte, basierend auf diesen Untersuchungen, *in vivo* keine gezielte Aufnahme im Tumorgewebe durch die Funktionalisierung mittels Glucosamin festgestellt werden.

Die Inhibierung des Notch-Signalweges, welcher mit Metastasen-Bildung und Therapieresistenz in Korrelation gebracht wird, wurde mit Hilfe des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT (Struktur vgl. Abbildung 64 B) realisiert. Die Beladung der Partikel erfolgte durch adsorptive Wechselwirkungen in Cyclohexan. Durch Freisetzungsexperimente beladener Partikel in Ethanol und anschließender HPLC-Aufreinigung konnte die Menge an DAPT auf den jeweiligen Partikeln quantifiziert werden. Die positiv geladenen PEI-beschichteten Partikel mit und ohne Glucuronsäure-Funktionalisierung zeigten höhere Beladungsgrade von 3,8-7,4 Gew.%, als die negativ geladenen carboxy-funktionalisierten Partikel mit und ohne Glucosamin-Funktionalisierung mit 1,3-2,5 Gew.% (vgl. Tabelle 10).

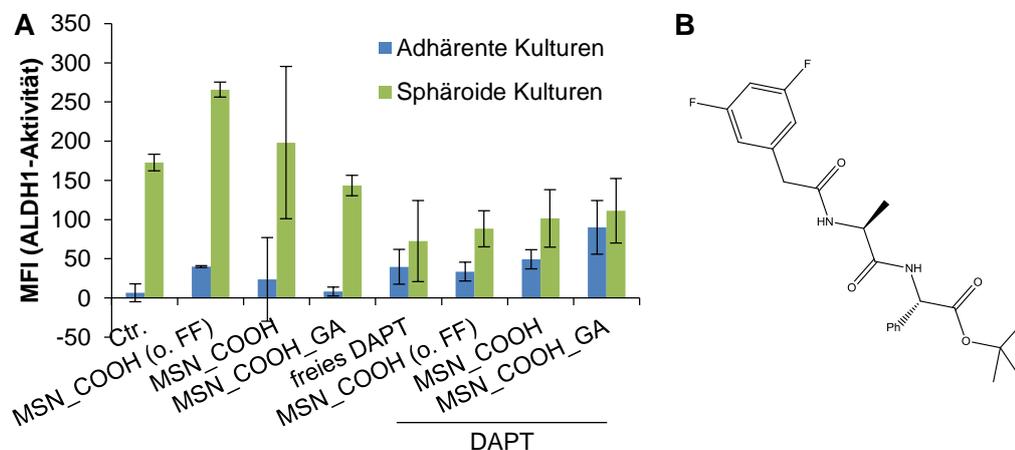


Abbildung 64: (A) ALDH-Aktivität von adhärenenten und sphäroidischen MDA-MB-231 Zellen und Einfluss von freiem DAPT und DAPT-beladenen MSN auf die ALDH-Aktivität dieser Zellen. (B) Struktur des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT. (Mittelwert \pm St.Abw.)(verändert nach ^[152])

Der erfolgreiche Transport von DAPT mit MSN unterschiedlicher Funktionalisierung in die Zellen, wurde *in vitro* sowie *in vivo* untersucht. Hierfür wurden MDA-MB-231 als adhärenente Zellen und Sphäroide kultiviert und die ALDH1-Aktivität mittels FACS quantifiziert. In Zellen, die ohne Partikel kultiviert wurden, zeigte sich eine deutlich höhere ALDH1-Aktivität für die Sphäroide. Da die ALDH-Aktivität in Krebsstammzellen im Vergleich zu Krebszellen erhöht ist, lässt sich daraus schließen, dass die Anzahl an Krebsstammzellen in Sphäroiden höher war

als in adhärennten MDA-MB-231. Durch die Behandlung der Zellen mit DAPT-beladenen MSN und freiem DAPT (5 µg/mL) für 24 h reduzierte sich die ALDH1-Aktivität in Sphäroiden, wohingegen diese in adhärennten Kulturen leicht anstieg (vgl. Abbildung 64). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Effekt der MSN_COOH_GA und den MSN_COOH. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen kann nicht geklärt werden, ob dies aufgrund gleicher Aufnahme der Partikel oder durch extrazelluläre Auswaschungseffekte des DAPTs begründet ist.

In vivo Untersuchungen wurden an MDA-MB-231-Tumoren an der Chorion-Allantois-Membran (CAM) eines Hühnerembryos durchgeführt. Die DAPT beladenen Partikel wurden täglich topisch appliziert. Die Partikelmenge wurde so angepasst, dass in allen Experimenten eine DAPT-Konzentration von 1 µg/Tumor/Tag verabreicht wurde. Nach 5 Tagen wurden die Tumore hinsichtlich der Anzahl an Krebsstammzellen und Krebszellen mittels ALDH1-Aktivität untersucht (vgl. Abbildung 65).

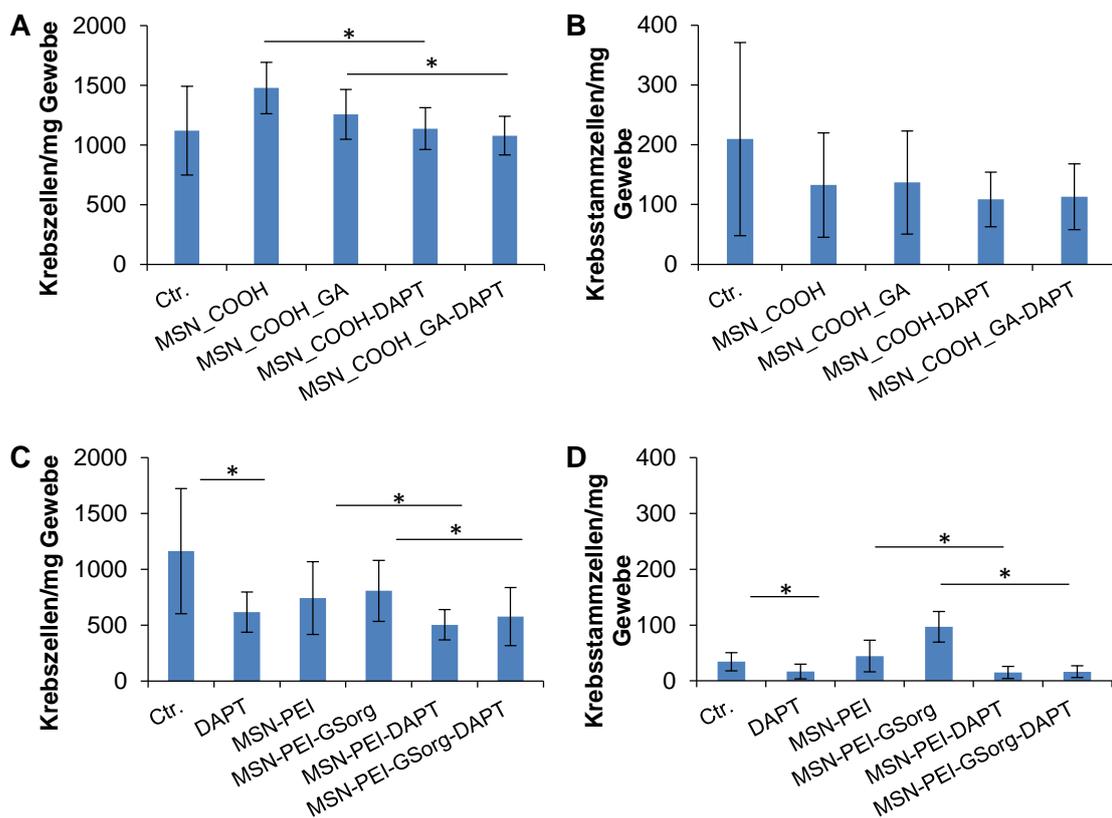


Abbildung 65: Anzahl an Krebszellen (A und C) und Krebsstammzellen (B und D) pro mg Tumorgewebe in MDA-MB-231 Tumoren des CAM-Modells nach Behandlung mit freiem DAPT und DAPT-beladenen MSN unterschiedlicher Funktionalisierung. (Mittelwert ± St. Abw.) (*p ≤ 0,05) (verändert nach ^[152])

Für die DAPT-beladenen carboxy-funktionalisierten und Glucosamin-funktionalisierten Partikel zeigte sich eine kleine, aber signifikante Änderung der Krebszellzahl im Vergleich zu unbeladenen Partikeln. Die Anzahl an Krebsstammzellen änderte sich jedoch kaum (vgl.

Abbildung 65 A und B). Die DAPT beladenen mit und ohne Glucuronsäure-funktionalisierten PEI-Partikel zeigten sowohl eine signifikante Reduzierung der Krebszellzahl, als auch der Krebsstammzellzahl im Vergleich zu den leeren Partikeln (vgl. Abbildung 65 C und D). Jedoch stieg die Anzahl an Krebsstammzellen durch Behandlung mit den unbeladenen MSN-PEI-GS_{org} sehr stark an, was darauf schließen lässt, dass die Proliferation durch die Anwesenheit der Partikel gefördert wird. Auch die in der Literatur dargelegten Ergebnisse bestätigen, den Anstieg der Notch-Aktivität und des Tumorwachstums nach Applikation von PEI-funktionalisierten MSN sowie die erhöhte Proliferationsrate von mesenchymalen Stammzellen nach Inkubation mit stark positiv geladenen MSN (+19 mV; PBS pH 7,4).^[90,218]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MSN-PEI-GS_{org} effiziente Transporter für Wirkstoffe in Krebsstammzellen sind, wohingegen die MSN-COOH-GA nur moderaten Erfolg aufzeigten. Durch die Applikation von unbeladenen MSN-PEI-GS_{org} wurde die Anzahl an Krebsstammzellen im Tumor deutlich erhöht, weshalb diese Partikel für die Anwendung in der gezielten Krebstherapie ungeeignet sind. Die hohe positive Ladung der Partikel hatte einen enormen Effekt auf die Proliferationsrate der Krebsstammzellen. Für weitere Untersuchungen könnten moderat geladene MSN-NH₂-GS₁₋₃ die ideale Basis darstellen. Trotz der Ergebnisse von Niemelä *et al.*^[26], die nur eine minimale Steigerung der zellulären Aufnahme (50 auf 55 % der MSN-positiven Zellen) in HeLa-Zellen nach der Glucuronsäure-Funktionalisierung von aminofunktionalisierten MSN beschreiben, könnte die Verwendung dieser Partikel für andere Systeme von Vorteil sein. Die sehr geringe Menge an adsorbierten Proteinen auf der Oberfläche der MSN-NH₂-GS₁₋₃ zeigt eine ideale Alternative für die Verwendung von PEGylierten Partikeln. Durch die Einbringung weiterer Oberflächenliganden für die gezielte Aufnahme, wie z.B. Antikörper oder Peptide, ließe sich die zelluläre Aufnahme in den Zielzellen weiter steigern.

4. Transport von kurzen Oligonukleotid-Sequenzen mittels MSN in der Therapie von leukämischen Stammzellen

Der Einsatz von kurzen siRNA- (*small interfering RNA*) oder miRNA (*micro RNA*)-Strängen ist ein vielversprechender Ansatz in der Therapie zahlreicher Krankheiten.^[127] Durch die Einbringung von siRNA oder miRNA in die Zelle lässt sich mittels RNA-Interferenz gezielt Einfluss auf die Genexpression in der Zelle nehmen (vgl. Einleitung, Abschnitt I.4.4). Um die negative Ladung der RNA-Stränge abzuschirmen und diese vor enzymatischem Abbau zu schützen, ist die Anwendung mittels Transportsystemen von Vorteil.^[24] Mesoporöse Silikananopartikel ermöglichen hierbei aufgrund der Vielseitigkeit der Oberflächenfunktionalisierung, die eine gezielte Einstellung der Partikeleigenschaften für die Interaktion mit den Oligonukleotiden ermöglicht, ein ideales Transportsystem. Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion von Modell-DNA-Sequenzen mit Silikananopartikeln unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung bzw. -ladung genauer untersucht. Zudem wurde der Einfluss der spezifischen Oberfläche und Porengröße von aminofunktionalisierten Silikananopartikeln auf die Beladung und Freisetzung von DNA-Molekülen analysiert. Der Transport von miRNA mittels mesoporösen Silikananopartikeln in leukämische Vorläuferzellen (Hoxa9/Meis1-Zellen) und deren Einfluss auf die Expression des Oberflächenrezeptors c-Kit wurde *in vitro* analysiert.

4.1 Partikelfunktionalisierung

Um die grundlegende Interaktion mesoporöser Silikananopartikel mit kurzen Oligonukleotiden zu untersuchen, wurden Silikananopartikel unterschiedlicher Funktionalisierung, spezifischer Oberfläche oder Porengröße mit kurzen einsträngigen (ss – *single-stranded*) DNA-Strängen (19 Nukleotide) beladen. Abbildung 66 gibt eine schematische Übersicht der Synthese und Funktionalisierung der unterschiedlichen Silikananopartikel. Die Synthese von sphärischen nicht-porösen Silikananopartikeln (SN) erfolgte mittels basischer Katalyse von TEOS über den Sol-Gel-Prozess. Wie in Abschnitt III.1.1 beschrieben, konnten durch den Einsatz von C₁₆TAB mesoporöse Silikananopartikel mit einer Porengröße von ~3-4 nm generiert werden, die sich durch hydrothermale Behandlung mit TOPO auf ~3-7 nm vergrößern ließen (MSNe). Durch Co-Kondensation von TMOS mit APTMS und C₁₆TAB als strukturdirigierendes Agens konnten nach Extraktion des Tensids aminofunktionalisierte (MSN-NH₂) und nach Calcinierung unfunktionalisierte mesoporöse Silikananopartikel (MSN) mit Porengrößen von ~3-4 nm synthetisiert werden (vgl. Abschnitt III.1.1). Durch postsynthetische Modifizierung der MSN mit

vermeiden, wurden die Partikel vor dem Funktionalisierungsschritt im Vakuum bei 100 °C getrocknet. Die Funktionalisierung erfolgte anschließend in Toluol bei 80 °C.

Die Ergebnisse aus Stickstoffsorptions-, Zetapotential- und DLS-Messungen finden sich in Tabelle 11. Mit Ausnahme der MSN_PEI und MSNe_NH₂ mit einer spezifischen Oberfläche von 190 bzw. 470 m²/g und Porendurchmesser im Bereich von 3-4 bzw. 3-7 nm wiesen alle mesoporösen Partikel eine relative große spezifische BET-Oberfläche im Bereich von 700-990 m²/g und NL-DFT-Porendurchmesser von 3-4 nm auf. Die hydrodynamischen Durchmesser aller mesoporösen Partikel, unabhängig von der Funktionalisierung, in 1 mM KCl, lagen bei 230-320 nm.

Tabelle 11: Charakterisierungsdaten unterschiedlich funktionalisierter Silikananopartikel aus DLS-, Zetapotential- sowie Stickstoffsorptionsmessungen (Mittelwert ± St.Abw.). Hydrodynamischer Durchmesser und Zetapotential (*) wurden in 1 mM KCl (pH 5) und Zetapotential (**) in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) gemessen. (#Ergebnisse der Proben SN_NH₂ und MSNe_NH₂ bestimmt durch Vermessung von Einzelproben)

	d_{DLS} [nm]*	ζ-Pot [mV]*	ζ-Pot [mV]**	S_{BET} [m²/g]	d_{DFT} [nm]
SN_NH₂#	190	+40	-14	20	-
MSNe_NH₂#	230	+33	+2	470	3-7
MSN_NH₂	260±20	+26±3	-9±4	860±30	3,4±0,2
MSN_PEI	240±20	+38±1	+35±6	190±70	2,6±0,0
MSN_NH₂_GS1	270±30	+29±2	-15±3	750±20	3,0±0,2
MSN_c5	250±130	+29±4	-7±4	700±140	3,2±0,1
MSN_c4	270±30	+27±9	-12±4	730±140	3,1±0,2
MSN_c3	320±90	+13±20	-27±3	710±150	3,3±0,2
MSN_c2	270±40	-6±22	-38±2	730±120	3,2±0,2
MSN_c1	240±10	-17±10	-38±5	710±140	3,2±0,2
MSN	250±30	-16±8	-35±3	990±80	3,1±0,2
MSN_COOH	230±50	-28±5	-31±2	810±70	3,1±0,3

In Abbildung 67 sind die Stickstoffsorptionsisothermen (A) und die Verteilung der NL-DFT-Porendurchmesser (A) der SN_NH₂, MSN_NH₂ und MSNe_NH₂ dargestellt. Die SN_NH₂ zeigten den für nicht-poröse Materialien typischen Verlauf einer Typ II Isotherme nach IUPAC^[162] und wiesen eine BET-Oberfläche^[166] von 20 m²/g auf. Die MSN_NH₂ und MSNe_NH₂ zeigten einen Verlauf nach Typ IV auf, welcher für mesoporöse Materialien zu erwarten ist. Für die MSNe_NH₂ war eine Hysterese mit H2-Form nach IUPAC im Bereich von 0,4-0,6 p/p₀ erkennbar, die auf das Vorliegen von Flaschenhalsporen schließen lässt. Die MSN_NH₂ zeigten eine enge Verteilung der Porendurchmesser im Bereich von 3-4 nm, wohingegen die MSNe_NH₂ eine breite Verteilung im Bereich von 3-7 nm aufwiesen.

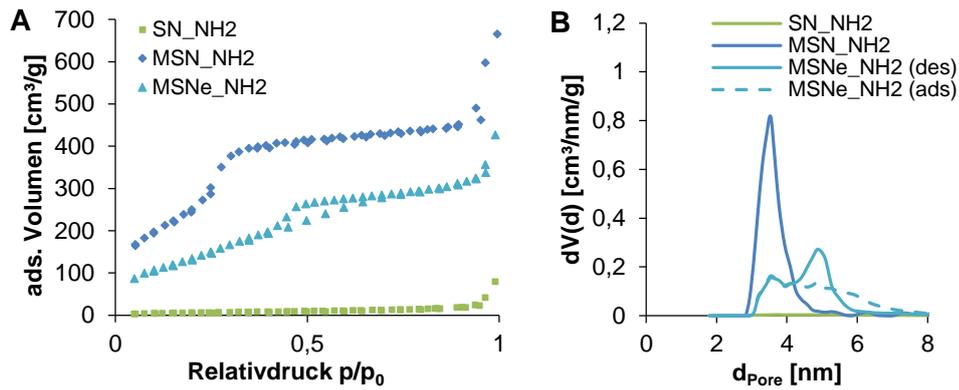


Abbildung 67: (A) Stickstoffsorptionsisothermen und (B) Verteilung des NL-DFT-Porendurchmessers der aminofunktionalisierten Silikananopartikel mit unterschiedlichem Porendurchmesser ermittelt aus dem Desorptionszweig der Stickstoffsorptionsisothermen. Für die MSNe_NH₂ ist sowohl die Porendurchmesser-Verteilung des Desorptions- (des) als auch des Adsorptionszweiges (ads) dargestellt.

Die Zetapotentialen wurden in HEPES-Puffer bei pH 7,2 und 1 mM KCl bei pH 5 bestimmt. Mit Ausnahme der MSN_PEI und MSNe_NH₂ lagen die Zetapotentialen bei pH 7,2 (HEPES-Puffer) im negativen Bereich, was auf eine negative Ladung der Partikel unter diesen Bedingungen hindeutet. Mit steigender negativer Oberflächenladung stieg der Betrag des Zetapotentials. Bei pH 5 (1 mM KCl) waren die aminofunktionalisierten MSN, unabhängig von der spezifischen Oberfläche und Porengröße, sowie die MSN_PEI und MSN_NH₂_GS1 positiv und die MSN und MSN_COOH negativ geladen. Das Zetapotentiale der MSN_c1-5 bei pH 5 sank mit steigender Menge an eingesetztem Bernsteinsäureanhydrid von +29 auf -17 mV ab. Die gemessenen Zetapotentialen aller Partikel stimmen sehr gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[26,75,79,91,219] Die Ladung der Partikel hat einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion mit den Oligonukleotiden, da diese durch elektrostatische Kräfte mit der Partikeloberfläche wechselwirken (vgl. Abschnitt III.4.2.1).

4.2 Beladung und Freisetzungsverhalten von MSN mit kurzen DNA-Sequenzen

4.2.1 Beladung von Silikapartikeln mit kurzen DNA-Strängen

Um die grundsätzliche Wechselwirkung von kurzen Oligonukleotiden mit Silikananopartikeln unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen und Porengröße zu untersuchen, wurden aus Kostengründen kurze ssDNA-Moleküle als Modellsystem verwendet. Diese DNA-Stränge bestehen aus 19 Nukleotiden (Sequenz: 5' CGC TGA CCC TGA AGT TCA T '3). Die Beladung der Partikel mit den DNA-Strängen erfolgte durch Inkubation der Partikel in MilliQ-Wasser (pH 5). Die Menge an DNA auf den Partikeln ließ sich durch UV/vis-spektroskopische Untersuchungen ($\lambda = 260$ nm) des Überstandes vor und nach der Beladung der Partikel bestimmen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Oberflächenladung wurden Partikel mit deutlich unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung mit einer Ausgangskonzentration von 3,7 nmol DNA/mg Partikel beladen und die resultierenden Beladungsgrade bestimmt (vgl. Abbildung 68 A).

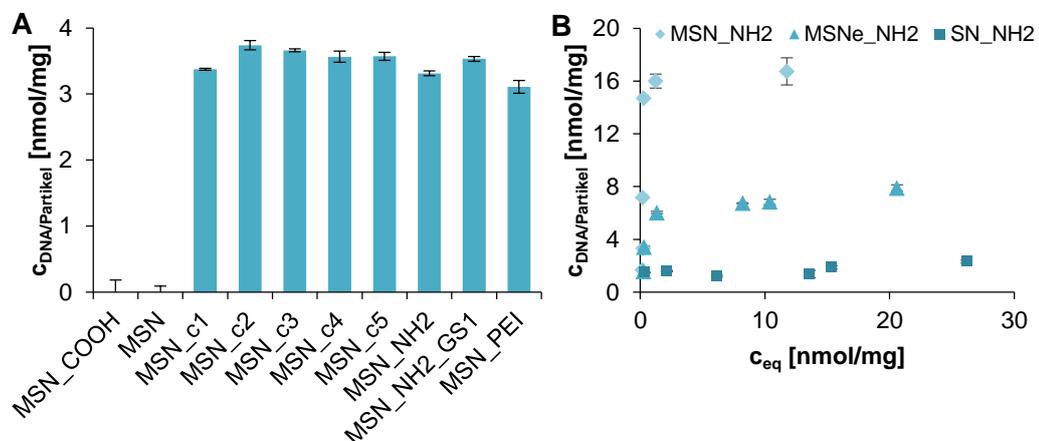


Abbildung 68: Beladung (A) mesoporöser Silikananopartikel unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung und (B) aminofunktionalisierter Silikapartikel unterschiedlicher BET-Oberfläche mit kurzen DNA Strängen. (Mittelwert \pm St.Abw.)

Aus der Literatur geht hervor, dass hauptsächlich PEI- und aminofunktionalisierte, also kationische MSN eingesetzt werden, an die sich die negativ geladenen Oligonukleotide durch elektrostatische Wechselwirkung adsorptiv anlagern können. Negativ geladene Partikel, wie unfunktionalisierte Silikananopartikel, können nur unter speziellen Bedingungen mit Oligonukleotiden beladen werden, wie beispielsweise durch den Einsatz chaotroper Salzlösungen.^[219–221] Dieser Trend konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Beladung negativ geladener MSN (ζ -Pot. = -16 mV) und MSN_COOH (ζ -Pot. = -28 mV) zeigte

keinen Erfolg, wohingegen es auf positiv geladenen MSN_NH₂ (ζ -Pot. = 26 mV) und MSN_PEI (ζ -Pot. = 38 mV) gelang, zwischen 83-93 % (3,1-3,3 nmol/mg) der eingesetzten DNA zu beladen. Durch den Einsatz des chaotropen Salzes Guanidin-Hydrochlorid nach der Vorschrift der Gruppe um Gu^[220], wurden die DNA-Stränge auf unfunktionalisierte und carboxyfunctionalisierte mesoporöse Silikananopartikel beladen. In Abbildung 69 sind die Absorptionsspektren der Ausgangslösung, des Überstandes sowie des Waschwassers (MilliQ-Wasser (pH 5) bzw. PBS (pH 7,4)) der Beladung von MSN und MSN_COOH dargestellt. Die Beladung von MSN_COOH war unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich, wohingegen die Beladung der MSN Erfolg zeigte. Durch die hohe Ionenkonzentration wird die Debye-Länge vermindert und somit die negativen Ladungen effektiv abgeschirmt, was zu einer Verminderung der repulsiven Kräfte zwischen Silika und DNA führt. Zudem können die Guanidin-Kationen effektiv die Wasserionen binden, was einen dehydratisierenden Effekt auf die DNA und die Silikaoberfläche hat.^[220,222]

Ein Großteil der sich auf den Partikeln befindlichen DNA-Stränge wurden jedoch durch den Waschschriff mit PBS (65 %) bzw. MilliQ-Wasser (77 %) bei Raumtemperatur wieder freigesetzt, weshalb diese Beladungsmethode ohne Blockierung der Poren kein großes Anwendungspotential für die in dieser Arbeit verwendeten Partikel hat. Auch die Gruppe um Gu untersuchte die Freisetzung in Abhängigkeit der Temperatur. Hierbei stellten sie fest, dass durch Inkubation der Lösung für 60 min bei 25 °C ca. 22 % und anschließender Erhöhung der Temperatur auf 37 °C sowie erneuter 60-minütiger Inkubation ca. 88 % der beladenen DNA wieder freigesetzt wurde.^[220]

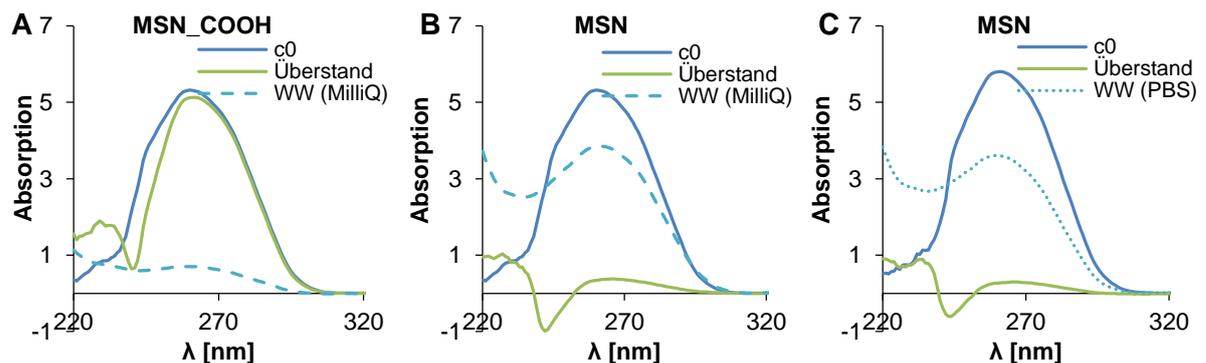


Abbildung 69: Beladung von (A) MSN_COOH und (B, C) MSN mit kurzen DNA-Strängen unter Zusatz des chaotropen Salzes Guanidin-Hydrochlorid in einer wässrigen ethanolischen Lösung. Die Partikel wurden mit (A, B) MilliQ-Wasser und (C) PBS gewaschen. Absorptionsspektren der Ausgangslösung (c0), des Überstandes und des Waschwassers zur Bestimmung des Beladungsgrades gemessen durch UV/vis-Spektroskopie.

Durch partielle Succinylierung der Aminogruppen der MSN_NH₂ konnten Partikel mit unterschiedlicher Ladung und ähnlicher Oberflächenfunktionalisierung hergestellt werden (MSN_c1-5). Durch die Funktionalisierung mit 0,02 (MSN_c5), 0,1 (MSN_c4), 0,2 (MSN_c3),

2 (MSN_c2) und 4 (MSN_c1) mmol Bernsteinsäureanhydrid/g MSN_NH₂ konnte das Zetapotential in 1 mM KCl im Bereich von +29 bis -17 mV variiert werden (vgl. Tabelle 11 und Abschnitt III.2.1). Trotz des deutlich unterschiedlichen Zetapotentials und der negativen Ladung der MSN_c2 und MSN_c1 ließen sich alle Partikel ohne nennenswerten Unterschiede mit kurzen DNA-Segmenten beladen. Ungeachtet der negativen Gesamtladung wäre es denkbar, dass lokal einige positiv geladene Aminogruppen auf der Partikeloberfläche vorhanden sind, an die sich die negativ geladene DNA anlagern kann. Die Beladungsgrade lagen im Bereich von 3,4-3,7 nmol/mg.

Auch die Glucuronsäure-funktionalisierten MSN_NH₂ (MSN_NH₂_GS1; 280 µmol Glucuronsäure/g) wurden mit DNA beladen, da sie aufgrund der geringen unspezifischen Proteinadsorption (vgl. Abschnitt III.3.1.1) sehr interessant für biologische Anwendungen sind. Der Beladungsgrad der MSN_NH₂_GS1 lag mit 3,5 nmol/mg im Bereich der MSN_NH₂ und MSN_PEI (vgl. Abbildung 68 A).

Um zu untersuchen, ob sich die DNA auch in den Poren der mesoporösen Partikel anlagert und nicht nur auf der äußeren Oberfläche der Partikel, wurden aminofunktionalisierte, nicht-poröse Silikananopartikel vergleichbarer Größe eingesetzt. Zudem wurde der Einfluss der Porengröße durch Verwendung aminofunktionalisierter, porenerweiterter MSN (MSNe_NH₂) mit einer Porengröße im Bereich von 3-7 nm untersucht. Um den maximalen Beladungsgrad der Partikel zu bestimmen, wurden unterschiedliche Mengen an DNA zur Beladung eingesetzt und die resultierenden Beladungsgrade mittels UV/vis-Spektroskopie bestimmt (vgl. Abbildung 68 B). Es zeigte sich, dass mit steigender spezifischer Oberfläche SN_NH₂ (20 m²/g), MSNe_NH₂ (470 m²/g) und MSN_NH₂ (860 m²/g) die maximal adsorbierte Menge an DNA auf den Partikeln stieg. Für die MSN_NH₂ mit der höchsten spezifischen Oberfläche ergab sich ein maximaler Beladungsgrad von 16,7 nmol/mg (96,5 µg/mg), gefolgt von den MSNe_NH₂ mit 7,9 nmol/mg (45,5 µg/mg). Die nicht-porösen SN_NH₂ konnten mit nur 2,3 nmol/mg (13,3 µg/mg) DNA beladen werden. Die DNA pro Partikel war somit, trotz der Dichteunterschiede, für mesoporöse Partikel deutlich höher als für nichtporöse Partikel. Dies deutet darauf hin, dass die DNA in die Poren der mesoporösen Partikel eingelagert wird. Der Porendurchmesser hatte keinen Einfluss auf den Beladungsgrad, vielmehr determinierte die spezifische Oberfläche der Partikel die maximale Menge an adsorbierter DNA (MSN_NH₂: 11338 ± 690 DNA-Moleküle/µm²; MSNe_NH₂: 10112 ± 302 DNA-Moleküle/µm²). Betrachtet man eine doppelsträngige (ds – *double-stranded*) DNA Doppelhelix (A-Form) mit 19 Basenpaaren (bp), so weist diese eine rigide Struktur mit einem Durchmesser von ~2,3 nm und eine Länge von ~4,6 nm auf. Die ssDNA hat aufgrund der höheren Flexibilität eine deutlich kompaktere Struktur, weshalb der Unterschied der Porengrößen von 3-4 (MSN_NH₂) und 3-7 nm (MSNe_NH₂) die Beladungskapazität nicht beeinflusst.^[223]

Auch in der Literatur finden sich vergleichbare Werte für die Beladungsgrade von MSN. So konnte die Gruppe um Gu den maximalen Beladungsgrad von magnetischen MSN ($d \sim 70$ nm; $d_{\text{Pore}} = 2-3$ nm; $S_{\text{BET}} = 670$ m²/g) mit 121,6 µg/mg und nicht-poröse Silikananopartikel ($d \sim 80$ nm) mit 48,3 µg/mg DNA (dsDNA, 20-250 bp) bestimmen. Jedoch wurde die Beladung hierbei in einer chaotropen Salzlösung durchgeführt.^[220] Der Einfluss der Porengröße wurde von mehreren Gruppen untersucht. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen in dieser Arbeit. Die Gruppe um Kim *et al.* untersuchte die Beladung von siRNA gegen GFP in aminofunktionalisierte MSN mit 2 ($S_{\text{BET}} = 1337$ m²/g), 4 ($S_{\text{BET}} = 630$ m²/g), 7 ($S_{\text{BET}} = 524$ m²/g), 10 ($S_{\text{BET}} = 586$ m²/g) und 23 nm ($S_{\text{BET}} = 395$ m²/g). Ihnen gelang der Nachweis, dass der Beladungsgrad der Partikel mit Porendurchmessern von 2 und 4 nm um das 0,4 bzw. 0,6fache gegenüber dem Beladungsgrad der MSN mit 7, 10 und 23 nm von 1,25 nmol/mg (16 µg/mg) vermindert war, obwohl die spezifische Oberfläche mit steigendem Porendurchmesser deutlich abnahm.^[142] Diese Ergebnisse konnten von Solberg *et al.* durch die Beladung von aminofunktionalisierten MSN der Porengrößen 2,8, 4,7 und 8,4 nm mit spezifischen Oberflächen von 854, 473 bzw. 357 m²/g mit DNA (dsDNA, 2000 bp) bestätigt werden.^[224] Jedoch wurden hier in beiden Fällen nur maximale Beladungsgrade von 16 µg/mg für die MSN mit Poren größer 7 nm erreicht. Auch die Gruppe um Rosenholm untersuchte die Beladung von MSN mit Redox-responsiven Oberflächenliganden und unterschiedlichen Porengrößen (3,5 nm ($S_{\text{BET}} = 545$ m²/g), 4,5 nm ($S_{\text{BET}} = 543$ m²/g) und 5,0 nm ($S_{\text{BET}} = 638$ m²/g)). Die Partikel mit einer Porengröße von 4,5 nm adsorbierten die höchste Menge an DNA (182 µg/mg) (dsDNA, 21 bp), gefolgt von den MSN mit 5,0 nm (170 µg/mg). Die Partikel mit den kleinsten Poren zeigten den geringsten maximalen Beladungsgrad von 130 µg/mg. Die spezifische Oberfläche der Partikel lag hierbei für alle Partikel im Bereich von 540-640 m²/g.^[225] Die Verwendung von längerer dsDNA (> 21 bp) in der Literatur und ssDNA (19 Nukleotide) in dieser Arbeit könnten zu den hier erwähnten Unterschieden in der Beladung führen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass bei pH 5 positiv oder neutral geladene mesoporöse Silikananopartikel erfolgreich mit kurzen DNA-Segmenten beladen werden konnten. Nur unter Verwendung chaotroper Salze gelang die Beladung von Silikananopartikeln. Ein Großteil der adsorbierten DNA wurde jedoch bereits durch das Waschen mit PBS (pH 7,4) oder MilliQ-Wasser (pH 5) wieder entfernt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die spezifische Oberfläche einen großen Einfluss auf den Beladungsgrad von aminofunktionalisierten Silikananopartikeln hatte.

4.2.2 Freisetzung von kurzen DNA-Strängen von Silikapartikeln

Ein weiterer entscheidender Faktor für die biologische Anwendbarkeit von Oligonukleotid-beladenen MSN ist das Freisetzungsverhalten in wässrigen Medien unter physiologischen Bedingungen. Hierfür wurden die in Abschnitt III.4.2.1 mit DNA-beladenen Silikananopartikel unterschiedlicher Funktionalisierung 24 h bei 37 °C in PBS-Puffer bei pH 5, welcher dem pH-Wert der Lysosomen und Endosomen entspricht und bei pH 7,4, welcher dem pH-Wert des Blutes und des Zytoplasmas entspricht, inkubiert.^[200,202,226] Die Menge an freigesetzter DNA wurde mittels UV/vis-Spektroskopie ($\lambda = 260 \text{ nm}$) bestimmt.

Abbildung 70 gibt die prozentual freigesetzte Menge der beladenen DNA in Abhängigkeit der Funktionalisierung (A) und des Zetapotentials in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2) (B) wieder. Das Zetapotential und somit die Oberflächenladung der Partikel lagen bei pH 5 mit Ausnahme der MSN_c1 (-17 mV) und MSN_c2 (-6 mV) im positiven Bereich. Dies spiegelte sich im Freisetzungsverhalten der DNA in PBS bei pH 5 wider. Alle Partikel, mit Ausnahme der MSN_c1, setzten in 24 h weniger als 5 % der beladenen DNA frei. Die MSN_c1 mit deutlich größerer negativer Ladung hingegen setzten 31 % der sich auf den Partikeln befindlichen DNA frei. Die Menge an freigesetzter DNA in PBS mit einem pH-Wert von 7,4 war deutlich höher als bei pH 5. Mit zunehmendem Betrag des negativen Zetapotentials bei pH 7,2 nahm die Menge an freigesetzter DNA zu. Für die MSN_c1-5 nahm mit steigender Menge an Bernsteinsäureanhydrid-Funktionalisierung die Anzahl der Aminogruppen ab. Dadurch erhöhen sich die repulsiven Wechselwirkungen zwischen Partikeloberfläche und den adsorbierten DNA-Molekülen, wodurch die Freisetzung der DNA ansteigt.

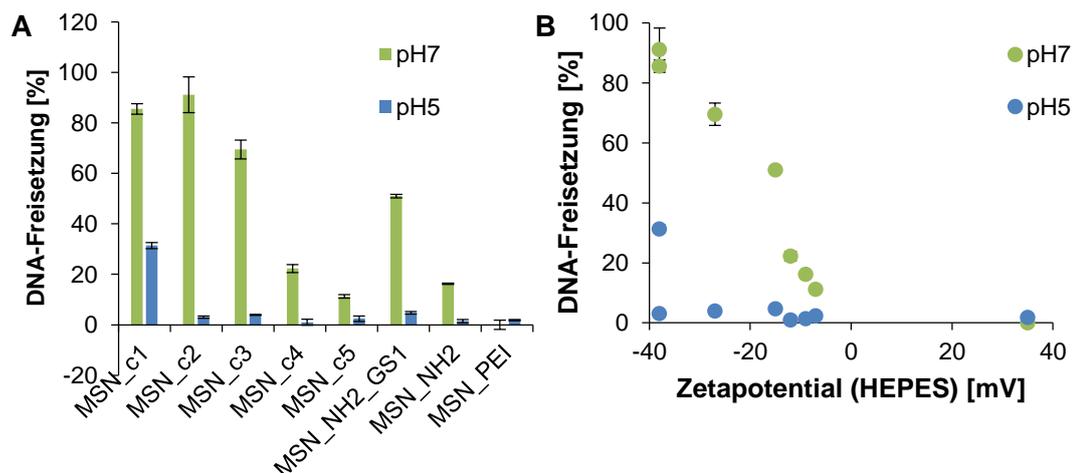


Abbildung 70: Freisetzung kurzer DNA-Stränge von mesoporösen Silikananopartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung. Freisetzung in PBS (pH 7,4) und MilliQ-Wasser (pH 5) in Abhängigkeit (A) der Oberflächenfunktionalisierung und (B) des Zetapotentials in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2). (Mittelwert \pm St.Abw.)

Die Freisetzung adsorbierter DNA auf aminofunktionalisierten nicht- und mesoporösen Silikananopartikeln unterschiedlicher Porengröße in Abhängigkeit des pH-Wertes und des Beladungsgrades ist in Abbildung 71 dargestellt. In PBS mit pH 5 lag die Freisetzung der DNA für die SN_NH₂ unterhalb von 20 % und für die MSNe_NH₂ sowie MSN_NH₂ unterhalb von 5 % der initial auf den Partikeln befindlichen Menge an DNA. Die aminofunktionalisierten Partikel sind unabhängig von der spezifischen Oberfläche bzw. des Porendurchmessers unter diesen Bedingungen positiv geladen und können somit hervorragend mit der negativ geladenen DNA über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren. Bei pH 7,2 in HEPES-Puffer haben aminofunktionalisierte Silikapartikel normalerweise ein neutrales oder leicht negatives Zetapotential, weshalb die DNA freigesetzt wird. Auch die SN_NH₂, MSN_NH₂, und die MSNe_NH₂ liegen mit Zetapotentialen von -14, -9 bzw. +2 mV in diesem Bereich, was die erhöhte Freisetzung der DNA bei pH 7,4 zur Folge hat. Mit steigender Menge an DNA auf den SN_NH₂ nahm die prozentuale Menge an freigesetzter DNA ab (vgl. Abbildung 71 A). Für die MSN_NH₂ und MSNe_NH₂ stieg die prozentuale Menge an freigesetzter DNA minimal mit dem Beladungsgrad im Bereich von 1-32 % an (vgl. Abbildung 71 B und C). Hierbei ließ sich kein Einfluss der Porengröße (3 versus 5 nm) beobachten (vgl. Abbildung 71 D).

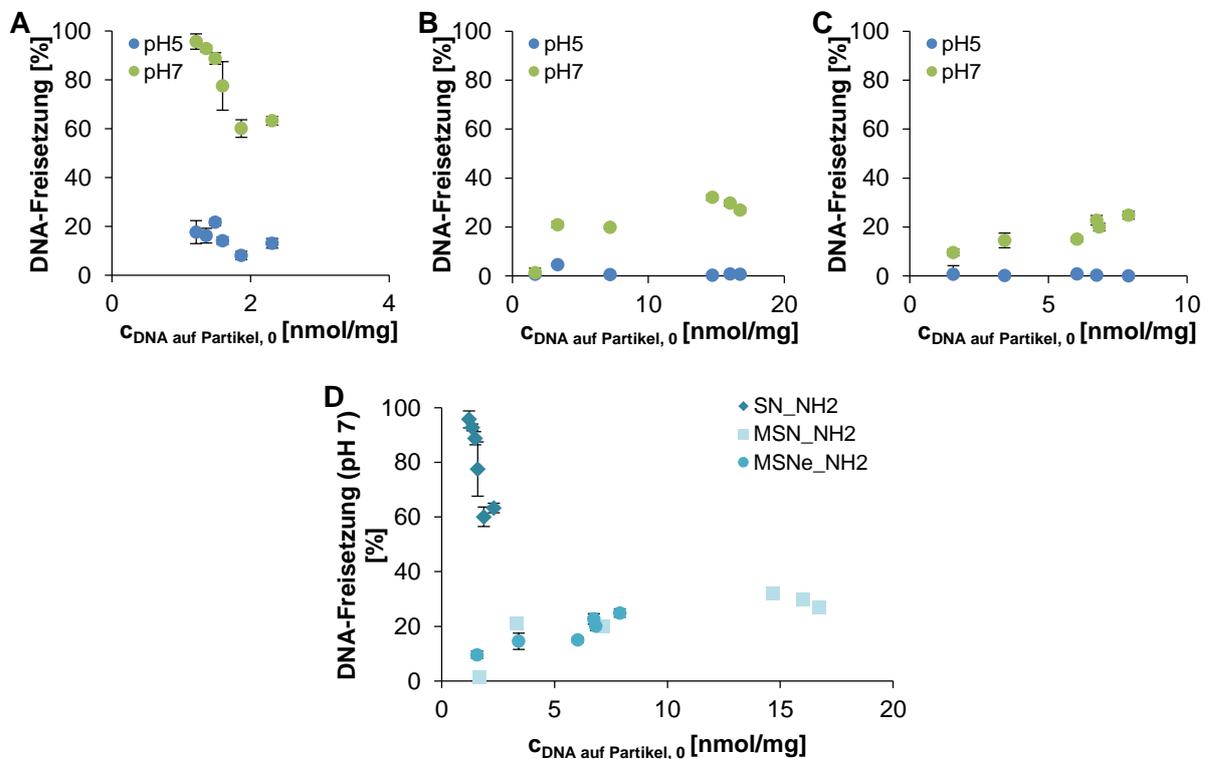


Abbildung 71: Freisetzung kurzer DNA-Stränge von aminofunktionalisierten Partikeln mit unterschiedlicher spezifischer Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes und des Beladungsgrades. Freisetzung von DNA-beladenen (A) nicht-porösen aminofunktionalisierten Silikananopartikeln sowie von aminofunktionalisierten mesoporösen Silikananopartikeln mit durchschnittlichen Porengrößen von (B) 3 und (C) 5 nm. (D) Übersicht des Freisetzungsverhaltens der SN_NH₂, MSN_NH₂ und MSNe_NH₂ bei pH 7,4 in Abhängigkeit des Beladungsgrades. (Mittelwert \pm St.Abw.)

Die DNA-Freisetzung von nicht-porösen, aminofunktionalisierten Silikananopartikeln mit 60-78 % der sich zu Beginn auf den Partikeln befindlichen DNA (1,6-2,3 nmol/mg) (vgl. Abbildung 71 D) war deutlich höher als die Freisetzung von mesoporösen, aminofunktionalisierten Silikananopartikeln mit vergleichbarer beladener Menge an DNA (MSN_{NH₂}: 1,7 nmol/mg; MSNe_{NH₂}: 1,6 nmol/mg) im Bereich von 1-10 %. Der Unterschied im Freisetzungsverhalten der nicht-porösen im Vergleich zu den mesoporösen aminofunktionalisierten Silikananopartikeln könnte ein Hinweis darauf sein, dass die DNA-Stränge in den Poren der mesoporösen Partikel und nicht nur auf der äußeren Oberfläche der Partikel adsorbieren.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Freisetzung der DNA von mesoporösen Silikananopartikeln in erster Linie von der Oberflächenladung der Partikel und somit vom pH-Wert der Lösung abhing. Bei pH 5 waren die meisten Partikel neutral bzw. positiv geladen, wohingegen bei pH 7,2 eher negativ bzw. neutral geladene Partikel vorlagen und sich die Menge an freigesetzter DNA im Zeitraum von 24 h bei 37 °C im Vergleich zu PBS mit pH 5 erhöhte. Nicht-poröse, aminofunktionalisierte Silikananopartikel setzten deutlich mehr DNA als mesoporöse aminofunktionalisierte Silikananopartikel bei pH 7,4 frei. Die Porengröße der Partikel schien hierbei die Menge an freigesetzter DNA nicht zu beeinflussen.

4.3 Beladung und Transport von miRNA Sequenzen *in vitro*

Der in diesem Abschnitt untersuchte miRNA-Transport in Hoxa9/Meis1-Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Florian Kuchenbauer. Alle *in vitro* Untersuchungen führte Angelika Vollmer am Institut für Experimentelle Tumorforschung durch.

Die Hämatopoese ist ein ausgeglichener Prozess aus Selbsterneuerung, Proliferation, Zelltod und Differenzierung. Störungen dieses Gleichgewichts können unter anderem zur Entstehung von Leukämie führen. Neben Genmutationen und chromosomalen Abweichungen kann die Fehlregulierung der miRNA-Expression eine große Rolle in der Leukämogenese spielen.^[227,228]

Die Entwicklung abnormalen Wachstums oder der Verlust der Apoptose-Funktion resultiert normalerweise in der Entstehung von Krebs. Zahlreiche Studien zeigen, dass das Zellwachstum und die Apoptose häufig durch miRNAs reguliert werden. Wird nun die Expression dieser miRNAs beispielsweise durch Mutationen hoch- oder herunterreguliert, wird das kontrollierte Zellwachstum gestört und es kann zur Entstehung von Krebs kommen.^[229]

Das Expressionsprofil bestimmter miRNAs in Krebszellen kann charakteristisch sein und unterscheidet sich oft von gesundem Gewebe. Die Identifizierung von Tumorgewebe sowie die Unterscheidung von geringfügig differenzierten Tumoren kann somit durch die Charakterisierung der miRNA-Expressionsprofile erfolgen.^[229,230] Außerdem könnte durch Regulation der miRNA-Expression und/oder durch den Einsatz von artifiziellen miRNAs therapeutisch die Entstehung bzw. Entwicklung von Tumoren inhibiert werden.^[229]

Den Gruppen um Klusmann und Kuchenbauer gelang es, die Mitglieder der miR-193 Familie (miR-193a und 193b) als potente Tumorsuppressoren in der akuten myeloischen Leukämie (AML) zu identifizieren.^[156,231] Es zeigte sich, dass die miR-193a und miR-193b in zahlreichen Untergruppen der pädiatrischen und adulten AML herunterreguliert sind.^[156] In Zellen verschiedener AML-Untergruppen konnte durch miR-193-Expression das Zellwachstum *in vitro* reduziert und das Überleben von Mäusen mit Hoxa9/Meis1-induzierter Leukämie verlängert werden.^[156,231]

Die Aufnahme von miRNA ist aufgrund der negativen Ladung sowie dem Schutz vor enzymatischem Abbau auf Transportsysteme begrenzt. Durch die Beladung mesoporöser Silikananopartikel mit miR-193a-3p und anschließendem Transport in leukämische Hoxa9/Meis1-Zellen wurde der Einfluss auf das Zellwachstum untersucht. Durch die Einbringung in die Mesoporen der Silikananopartikel soll die miRNA vor enzymatischem Abbau geschützt werden.

4.3.1 Beladung von aminofunktionalisierten MSN mit miRNA

Basierend auf den Untersuchungen aus Abschnitt III.4.2.1 und III.4.2.2 wurden MSN_{NH₂} als die vielversprechendsten Partikelsysteme ausgewählt, um den Transport von Oligonukleotiden *in vitro* in Hoxa9/Meis1-Zellen zu untersuchen. Um die miRNA vor enzymatischem Abbau zu schützen, wurden die Partikel in Nuklease-freiem Wasser (pH 5) mit miR-193a-3p mimic und einer „negativ“-Kontrolle (miR-ctr) beladen.

Durch die Differenz der miRNA-Menge in der Ausgangslösung im Vergleich zum Überstand und Waschwasser, bestimmt durch UV/vis-spektroskopische Analyse ($\lambda = 260$ nm), ließ sich die Menge an miRNA auf den MSN_{NH₂} bestimmen. Abbildung 72 zeigt die Absorptionsspektren der Ausgangslösung (c0), des Überstandes sowie des Waschwassers.

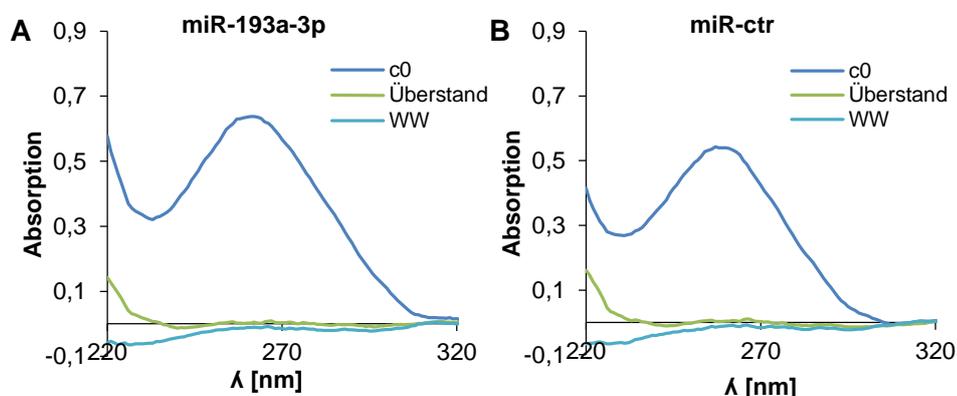


Abbildung 72: Beladung von miR-193a-3p (A) sowie miR-ctr auf MSN_{NH₂} in Wasser (pH 5). Absorptionsspektren der Ausgangslösung (c0), des Überstandes und des Waschwassers bestimmt durch UV/vis-Spektroskopie zur Bestimmung des Beladungsgrades.

Die Beladungsgrade der mit miR-193a-3p beladenen Partikel, lagen im Bereich von 2,8-3,5 nmol/mg und für die Beladung mit miR-ctr im Bereich von 2,7-3,5 nmol/mg. Somit konnte die Beladung von aminofunktionalisierten MSN mit biologisch relevanten miRNA-Strängen analog zu Abschnitt III.4.2.1 erfolgreich durchgeführt werden.

4.3.2 Transport von miRNA mittels MSN in leukämische Hoxa9/Meis1-Zellen

Die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten (ATTO 594) MSN_{NH₂} mit und ohne miRNA-Beladung wurde *in vitro* in Hoxa9/Meis1-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) nach 48 und 72 h (vgl. Abbildung 73 A und B) Inkubationszeit analysiert. Mit zunehmender eingesetzter Partikelmenge stieg, sowohl nach 48 h als auch nach 72 h, erwartungsgemäß die Anzahl der Partikel in der Zelle. Die aufgenommene Partikelmenge pro Zelle sank mit

steigender Inkubationszeit (72 h). Durch Proliferation nimmt die Anzahl der Zellen mit steigender Inkubationszeit zu, wodurch die relative Zahl der Partikel pro Zelle abnimmt. Des Weiteren können die Partikel aus der Zelle ausgeschleust werden, was die Partikelzahl pro Zelle vermindert.

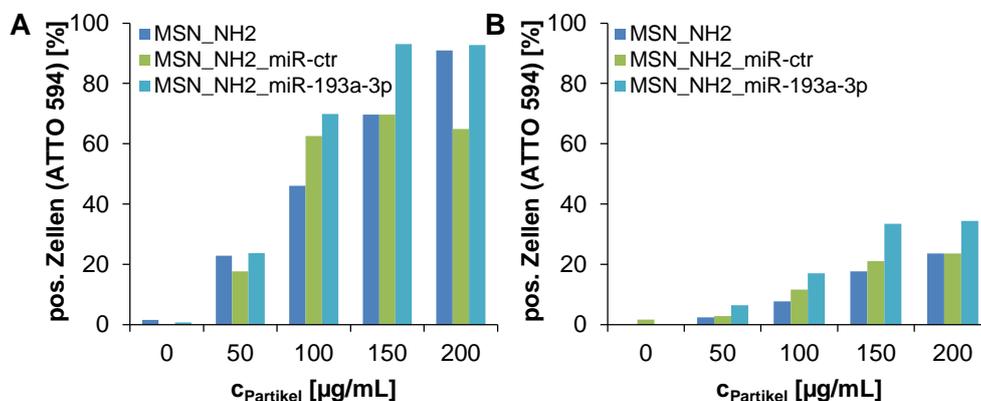


Abbildung 73: Zelluläre Aufnahme von aminofunktionalisierten MSN mit und ohne miRNA Beladung (miR-193a-3p bzw. miR-ctr) in Hoxa9/Meis1-Zellen nach 48 (A) und 72 h (B) Inkubation in Abhängigkeit der eingesetzten Partikelmenge.

Der Einfluss der auf die MSN_NH₂ beladenen miR-193a-3p *in vitro* wurde anhand der Expression von c-Kit in Hoxa9/Meis1-Zellen analysiert. Gao *et al.* beschreiben, dass das Level der miR-193a in der Zelle invers mit der c-Kit-Expression in leukämischen Zelllinien korreliert.^[232] Das c-Kit Protoonkogen codiert ein Transmembran Glycoprotein der Typ III Rezeptorprotein-Tyrosinkinase-Familie, das eine entscheidende Rolle in der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen spielt.^[232] Bei 60-80 % aller AML Patienten wird von einer c-Kit Überexpression berichtet.^[232-234] Diese Veränderungen bringen eine wesentliche und Ligand-unabhängige c-Kit-Aktivierung mit sich.^[232] Die daraus resultierenden abweichenden Signale gelten als entscheidende Faktoren in der Entstehung der Leukämie und werden mit einer schlechten Prognose in der AML in Verbindung gebracht.^[232,235-238] Deshalb wäre es ein vielversprechender Ansatz in der Therapie der AML, die c-Kit-Expression herunterzuregulieren, was durch den Anstieg der zellulären Konzentration an miR-193a realisiert werden könnte.^[156,231,232]

In Abbildung 74 ist die c-Kit-Expression in Hoxa9/Meis1-Zellen nach Behandlung mit MSN_NH₂ mit und ohne miR-193a-3p- bzw. miR-ctr-Beladung dargestellt. Die Zellen wurden für den Zeitraum von 4 Tagen mit den Partikeln (200 µg/mL) inkubiert und anschließend mittels FACS hinsichtlich der c-Kit-Expression untersucht. Abbildung 74 A zeigt die c-Kit-Expression der Gesamtpopulation an lebenden Zellen, wohingegen in Abbildung 74 B nur die Teilpopulation der im FACS für die Partikelaufnahme positiven, lebenden Zellen in Betracht gezogen wurde.

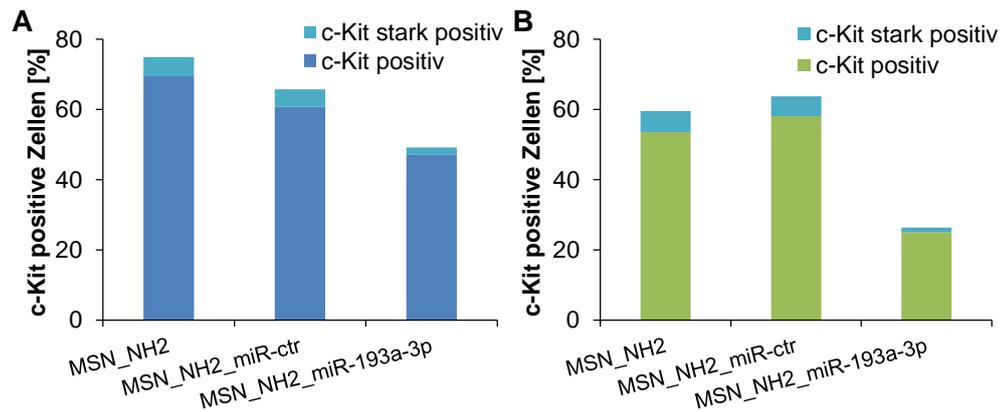


Abbildung 74: C-Kit-Expression in Hoxa9/Meis1-Zellen nach Behandlung mit 200 µg/mL MSN_NH₂ mit und ohne Beladung von miR-193a-3p bzw. miR-ctr an Tag 5. C-Kit-Expression (A) der Gesamtpopulation sowie (B) der Teilpopulation der im FACS für die Partikelaufnahme (ATTO 594) positiven Zellen.

Es wird deutlich, dass die c-Kit-Expression durch den Einsatz von miR-193a-3p beladenen Partikeln im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit unbeladenen bzw. miR-ctr-beladenen MSN_NH₂ deutlich vermindert war. Die Betrachtung der für Partikel positiven Teilpopulation zeigt, dass der Effekt in diesem Fall deutlich verstärkt war (Abbildung 74 B). Dies deutet darauf hin, dass die Verminderung der c-Kit-Expression durch die auf den Partikeln befindlichen miR-139a-3p hervorgerufen wird. Auch die Anzahl der Zellen, die eine hohe Positivität für die c-Kit-Expression zeigten, ließ sich durch den Einsatz von MSN_NH₂_miR-193a-3p deutlich vermindern.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen zeigen mesoporöse Silikananopartikel ein großes Potential für den Transport von miRNAs in Leukämie- bzw. Krebszellen. Durch das Verständnis der Rolle von miRNAs in der Ausbildung und Entwicklung von Tumoren in Kombination mit dem gezielten Transport dieser Oligonukleotide in Krebszellen können neuartige, vielversprechende Therapiestrategien entwickelt werden.

IV. Zusammenfassung und Ausblick

Mesoporöse Silikananopartikel (MSN) sind aufgrund der hohen Biokompatibilität ideale Transportsysteme für therapeutisch oder diagnostisch relevante Moleküle. Hierbei bestimmen Partikeleigenschaften, wie Partikelmorphologie und –größe sowie Oberflächenladung bzw. –funktionalisierung die Interaktion mit dem jeweiligen biologischen System. Im Rahmen dieser Arbeit wurden MSN-basierte Transportsysteme für Wirkstoffmoleküle in Krebsstammzellen entwickelt. Hierbei wurde der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf Eigenschaften wie Proteinadsorption, hydrolytische Stabilität, Dispersionsstabilität sowie Beladungs- und Freisetzungverhalten der eingesetzten Medikamente bzw. Oligonukleotide untersucht. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden geeignete Transportsysteme für die jeweilige biologische Anwendung ausgewählt und anhand von *in vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen evaluiert.

Die Synthese der nichtporösen und mesoporösen Silikananopartikel erfolgte über den Sol-Gel-Prozess. Die Partikel wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), dynamischer Lichtstreuung (DLS), Stickstoffsorptionsmessungen, thermogravimetrischer Analyse (TG-Analyse), Röntgendiffraktometrie (XRD) und Zetapotentialmessungen untersucht.

Durch den Zusatz von Tensiden in Kombination mit Agenzien zur Porenerweiterung gelang es, 200 nm große, nichtporöse und mesoporöse Silikananopartikel mit Porengrößen von 3-4 und 3-7 nm herzustellen. Die Entfernung des Tensides mittels Extraktion bzw. Calcinierung resultierte in amino- oder unfunktionalisierten MSN mit hohen spezifischen Oberflächen von 860-990 m²/g.

Zudem konnten MSN unterschiedlicher Morphologie und Größe durch die Variation von Syntheseparametern wie Tensid- und Präkursorkonzentration, Temperatur sowie Ethylenglykol-Zusatz hergestellt werden. Die Ausgangssynthese erfolgte nach einer Vorschrift von Huang *et al.*^[84] und lieferte 2D-hexagonal-strukturierte MSN mit einem Längen-Breiten-Verhältnis (AR – *aspect ratio*) von 2. Hierbei konnte basierend auf TEM- und DLS-Untersuchungen die initiale Bildung sphärischer Partikel gezeigt werden, die sich anschließend zu zylindrischen Partikeln zusammenlagern.

Durch die Erhöhung der Tensid- und Präkursorkonzentration konnte die Partikellänge um das doppelte vergrößert werden (AR 4). Mit steigender Menge an zugegebenem Ethylenglykol hingegen verkürzte sich die Länge der Partikel bei nahezu konstantem Durchmesser und resultierte letztendlich durch Zugabe von 100 g Ethylenglykol in sphärischen Partikeln. Auch mit zunehmender Reaktionstemperatur wurden Partikel mit abnehmendem AR erhalten, die

aufgrund der steigenden Anzahl an Nukleationskeimen deutlich an Größe verloren. Zudem verminderte sich die Porenstrukturierung aufgrund der mit der Temperatur steigenden Hydrolyse- und Kondensationsgeschwindigkeit. Die spezifischen Oberflächen der Partikel wurden weder durch die Ethylenglykol-Zugabe noch durch die Temperaturänderungen beeinflusst. Um die Effekte der einzelnen Syntheseparameter sowie den genauen Bildungsmechanismus besser verstehen zu können, wäre es unumgänglich weitere Untersuchungen wie beispielsweise *in situ* SAXS-Messungen durchzuführen.

Die selektive Zerstörung zirkulierender maligner Zellen ist das Ziel in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML). Für die Langzeitüberlebenschancen der Patienten ist hierbei die Entfernung von Krebsstammzellen, die hauptsächlich für die Entstehung und Entwicklung der Leukämie sowie das Auftreten von Rezidiven verantwortlich sind, von großer Bedeutung. Anhand eines murinen Modells B220-positiver Stammzellen, welches durch die Gruppe um Buske beschrieben wurde^[150], wurde der selektive Transport des Zytostatikums Daunorubicin mittels antikörperfunktionalisierter MSN entwickelt und analysiert.

Die Interaktion mit Zellen wird sehr stark von der Oberflächenladung der Partikel und der daraus resultierenden Proteinadsorption beeinflusst. Um diesen Aspekt detaillierter zu untersuchen, wurden aminofunktionalisierte MSN mit einer Größe von 200 nm mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert. Die resultierenden Partikel variierten in ihrer Oberflächenladung, welche sich in den Zetapotentialen (HEPES-Puffer; pH 7,2; 25 mM) im Bereich von -7 bis -38 mV widerspiegeln. Für die selektive Aufnahme in B220-positiven leukämischen Stammzellen, wurden die Partikel mit einem Antikörper (anti-B220) funktionalisiert. Die Kopplungseffizienz ließ sich mithilfe des fluoreszenzmarkierten Antikörpers anti-B220-v450 durch Fluoreszenzspektroskopie bestimmen und war für alle Partikel unabhängig von der eingesetzten Menge an Bernsteinsäureanhydrid im Bereich von 70-90 % der eingesetzten Menge an anti-B220-v450. Um die Eigenschaften der Partikel mit und ohne Antikörperfunktionalisierung unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden diese hinsichtlich ihrer hydrolytischen Stabilität, Proteinadsorption und Stabilität der Partikeldispersion charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass die hydrolytische Stabilität und die Dispersionsstabilität unabhängig von der Oberflächenladung waren, wohingegen die Proteinadsorption maßgeblich davon beeinflusst wurde. Mittels SDS-PAGE konnte die *hard corona* der Partikel analysiert werden. STORM- (*stochastic optical reconstruction microscopy*) Untersuchungen erfolgten nicht-invasiv und ermöglichten es dadurch, die *soft* und *hard corona* einzelner Partikel zu bestimmen. Mit steigender Menge an Bernsteinsäureanhydrid, welches zur Funktionalisierung eingesetzt wurde, nahm die Proteinadsorption auf der Partikeloberfläche ab.

Der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung der anti-B220-funktionalisierten MSN auf die selektive Aufnahme in B220-positiven Krebsstammzellen wurde durch Partikel Aufnahme in B220-positiven *CALM/AF10*- im Vergleich zu B220-negativen leukämischen BM3997-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die anti-B220-funktionalisierten MSN_c3 (MSN_c3-B220), welche mit 0,4 mmol/g Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert wurden, die höchste selektive Aufnahme in den B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen aufzeigten. Durch Funktionalisierung mit einem nicht-spezifischen Antikörper (anti-CD9) (MSN_c3-CD9) ließ sich eine verminderte Aufnahme in den B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen im Vergleich zu MSN_c3-B220 beobachten, was auf eine selektivere Aufnahme der MSN_c3-B220 durch Bindung an das B220-Antigen hindeutet.

Die Stabilität in Serum kann das Verhalten der Partikel sowohl *in vitro* als auch *in vivo* maßgeblich verändern. Deshalb wurden Stabilitätsuntersuchungen der MSN_c3 mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung in Serum mittels SDS-PAGE und STORM durchgeführt, um anschließend die zelluläre Aufnahme von in Serum präinkubierten MSN_c3-B220 und MSN_c3-CD9 in den *CALM/AF10*-Zellen zu untersuchen. Es zeigte sich, dass mit steigender Inkubationszeit in Serum die Proteinadsorption auf den Partikeln zunimmt und sich zudem die Anzahl an fluoreszenzmarkiertem anti-B220 (anti-B220-AF488) reduziert. Dies resultierte in einer mit der Präinkubationszeit sinkenden spezifischen Aufnahme der MSN_c3-B220 bedingt durch die Proteinadsorption beeinflusste verminderte Zugänglichkeit sowie die durch die Ablösung reduzierte Menge des Antikörpers auf der Partikeloberfläche. Die Beladung der Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiR und dem therapeutisch relevanten Zytostatikum Daunorubicin sowie deren Freisetzung in Pufferlösungen wurde mittels UV/vis-Spektroskopie untersucht. Der gezielte Transport des Daunorubicins durch MSN_c3-B220 in *CALM/AF10*-Zellen konnte *in vitro* anhand von Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels FACS gezeigt werden. Durch die Behandlung von *CALM/AF10*-Zellen mit Daunorubicin-beladenen MSN_c3-B220 *in vitro*, konnten deren Fähigkeit *in vivo* in Mäusen AML auszulösen, im Vergleich zu Zellen, die mit unbeladenen MSN_c3-B220, Daunorubicin-beladenen MSN_c3-CD9 oder freiem Daunorubicin der gleichen Konzentration behandelt wurden, merklich reduziert werden.

Um die extrazelluläre Freisetzung des Daunorubicins zu verhindern, wäre die kontrollierte reversible Blockierung der Poren eine geeignete Möglichkeit den selektiven Transport des Daunorubicins in folgenden Untersuchungen zu verbessern. Des Weiteren wären *in vivo* Untersuchungen zur weiterführenden Analyse des Anwendungspotentials und gegebenenfalls Optimierung dieses Partikelsystems von großer Bedeutung.

Auch Glucosederivate können als Liganden für die gezielte Aufnahme von MSN in Krebsstamm- und Krebszellen mit erhöhtem Glucosebedarf verwendet werden. Der Einfluss

der Glucosederivat-Modifizierung auf unterschiedlich funktionalisierte MSN wurde durch die Modifizierung 200 nm großer carboxy- (MSN_COOH), Polyethylenimin- (PEI) (MSN_PEI) und aminofunktionalisierter MSN (MSN_NH₂) untersucht. Die Partikel wurden jeweils mit jeweils 7, 70 und 280 µmol/g Glucuronsäure (MSN_PEI_GS1-3, MSN_NH₂_GS1-3) bzw. Glucosamin (MSN_COOH_GA1-3) modifiziert. Die Glucosederivat-Funktionalisierung hatte eine leichte Reduzierung der spezifischen Oberfläche zur Folge, das Zetapotential und der Porendurchmesser veränderte sich im Vergleich zu den Ausgangspartikeln jedoch kaum. Mittels TG-Analyse ließ sich eine erfolgreiche Funktionalisierung der Partikel nachweisen.

Die Analyse der Partikel mit und ohne Glucosederivat-Funktionalisierung unter physiologischen Bedingungen erfolgte mittels DLS und SDS-PAGE. Für alle Partikel konnten unabhängig von der Glucosederivat-Funktionalisierung Partikeldispersionen in Medium mit FCS-Zusatz hergestellt werden, die über einen Zeitraum von 24 h stabil waren und somit eine Grundvoraussetzung für die biologische Anwendung darstellen.

Die Analyse der Proteincorona mittels SDS-PAGE zeigte eine deutliche Abnahme der Gesamtproteinmenge der Glucosederivat-funktionalisierten MSN_NH₂ und MSN_COOH im Vergleich zu den Partikeln ohne Glucosederivat-Funktionalisierung. Die MSN_PEI und Glucuronsäure-funktionalisierten MSN_PEI zeigten keine Unterschiede in der Größe und Zusammensetzung der Proteincorona. Die Proteinadsorption der Glucosederivat-funktionalisierten Partikel war unabhängig von der zur Funktionalisierung eingesetzten Menge an Glucosederivat. Aufgrund der Zugänglichkeit der Oberflächenliganden ist eine geringe Proteinadsorption für die gezielte Aufnahme der Partikel wünschenswert.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Partikelmorphologie und -größe die Proteinadsorption beeinflusst. Deshalb wurden MSN mit AR1, 2 und 4 postsynthetisch aminofunktionalisiert und anschließend mittels 280 µmol/g Glucuronsäure funktionalisiert, da die sphärischen, aminofunktionalisierten und Glucuronsäure-modifizierten Partikel die geringste Proteinadsorption aufwiesen. Auch für diese Partikel konnte die Glucuronsäure-Funktionalisierung ohne große Änderungen der spezifischen Oberflächen, Porengrößen sowie Zetapotentialen durchgeführt werden. Partikeldispersionen zeigten einen stabilen hydrodynamischen Durchmesser über einen Zeitraum von 24 h. Die Proteinadsorption wurde durch die Glucuronsäure-Funktionalisierung vermindert. Das Längen-Breiten-Verhältnis der Partikel hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Proteinadsorption.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die 200 nm großen, sphärischen carboxy- und PEI-funktionalisierten MSN mit und ohne Glucosederivat-Modifizierung für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen ausgewählt. Auch in soliden Tumoren, wie Brustkrebs, können Krebsstammzellen eine entscheidende Rolle für die Tumorentwicklung und das Auftreten von Metastasen sowie Rezidiven spielen. Brustkrebsstammzellen mit gesteigerter Aktivität des Notch-Signalweges stehen in engem Zusammenhang mit aggressiver Metastasenbildung und

Therapieresistenz. Durch die Therapie mit γ -Sekretase-Inhibitoren, die die Notch-Aktivität regulieren könnte die Therapieeffizienz gesteigert sowie der Krebsstammzellpool bekämpft und somit Rezidive vermindert werden. Da die γ -Sekretase-Inhibitoren jedoch oft durch hohe Nebenwirkungen in ihrer Anwendung limitiert sind, wurde der gezielte Transport des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT in dieser Arbeit mittels Glucosederivat-funktionalisierten MSN realisiert. Anhand von Brustkrebszellen (MDA-MB-231) und gesunden Epithelzellen der Brust (MCF-10-Zellen) wurde die Aufnahme der Partikel mit und ohne Glucosederivat-Funktionalisierung *in vitro* analysiert. Für die Glucosederivat-funktionalisierten Partikel konnte im Vergleich zu den MSN_COOH und MSN-PEI eine höhere Aufnahme in den Brustkrebszellen mit höherer glykolytischer Aktivität beobachtet werden. Zudem wurde die zelluläre Aufnahme in Krebs- versus Krebsstammzellen (MDA-MB-231 (und MCF-7)) betrachtet. Die MSN-PEI-GS_{org} zeigten im Gegensatz zu den MSN_COOH_GA eine höhere Aufnahme in den glykolytisch aktiveren Krebsstammzellen. Die MSN_COOH_GA zeigten erst durch die Verwendung der weniger glykolytisch aktiven MCF-7 eine höhere Aufnahme in den Krebsstammzellen.

Die Partikel Aufnahme der MSN_COOH und MSN_COOH_GA in das Brusttumorgewebe von Mäusen wurde durch Fluoreszenztomographie *in vivo* nach intravenöser Injektion der Partikel untersucht. Hierbei war eine deutlich höhere Aufnahme der Partikel ohne Glucosamin-Funktionalisierung und somit keine gezielte Aufnahme bzw. Anreicherung der Partikel im Tumor bedingt durch die Glucosamin-Funktionalisierung festzustellen.

Um Einfluss auf die Notch-Aktivität zu nehmen, wurden die Partikel mit DAPT beladen und deren Transport *in vitro* in Krebs- und Krebsstammzellen (MDA-MB-231-Zellen) sowie *in vivo* mittels des Chorion-Allantois-Membran (CAM) eines Hühnerembryos analysiert. Die Anzahl an Krebs- und Krebsstammzellen wurde im Tumorgewebe des CAM-Modells nach Behandlung mit unbeladenen und DAPT-beladenen Partikeln bestimmt. Die DAPT-beladenen MSN_COOH_GA zeigten nur eine minimale Änderung der Anzahl an Krebs- und Krebsstammzellen im Vergleich zu den DAPT-beladenen MSN-PEI-GS_{org}. Jedoch stieg die Anzahl der Krebsstammzellen der Tumore an, die mit den unbeladenen MSN-PEI-GS_{org} behandelt wurden, weshalb diese für die Anwendung in der Krebstherapie ungeeignet sind. Moderat geladene MSN-NH₂_GA könnten hierbei für weitere Untersuchungen eine gute Alternative darstellen, da sie eine geringe Proteinadsorption sowie eine abgeschwächte positive Ladung aufweisen. Die zu den MSN-PEI-GS analoge Funktionalisierung mit Glucuronsäure könnte somit zu einer gesteigerten Aufnahme in den Krebsstammzellen führen.

In der Krebstherapie können miRNA eingesetzt werden, um Einfluss auf die Genexpression und somit auf die Apoptose- oder Proliferationsrate der Krebszellen zu nehmen. In der AML gelten die Mitglieder der miR-193 Familie als potente Tumorsuppressoren. Der Einsatz dieser

Oligonukleotide ist aufgrund der hohen negativen Ladung und der Instabilität gegenüber Nukleasen auf Transportsysteme beschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beladung unterschiedlich funktionalisierter MSN mit Oligonukleotiden untersucht sowie der Transport von miRNA in Krebsstammzellen *in vitro* gezeigt.

Um die Beladung der MSN mit Oligonukleotiden in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung zu untersuchen, wurden amino-, Glucuronsäure-, Bernsteinsäureanhydrid-, carboxy-, PEI- sowie unfunktionalisierte MSN mit einsträngigen DNA-Strängen beladen. Es zeigte sich, dass die Menge an beladener DNA sehr stark vom Zetapotential und somit von der Oberflächenladung der Partikel abhing. Die Beladung von negativ geladenen unfunktionalisierten Silikananopartikeln konnte nur durch die Verwendung des chaotropen Salzes Guanidin-Hydrochlorid realisiert werden. Jedoch wurden hierbei bereits durch den ersten Waschschrift zwischen 65-77 % der beladenen DNA wieder freigesetzt.

Durch die Beladung von aminofunktionalisierten nichtporösen und mesoporösen MSN mit unterschiedlicher Porengröße konnte gezeigt werden, dass sich die adsorbierte DNA in den Poren der MSN befindet. Der Beladungsgrad wurde hierbei in erster Linie durch die spezifische Oberfläche der Partikel und nicht durch deren Porendurchmesser bestimmt. Das Freisetungsverhalten der DNA wurde bei pH 5 und pH 7,2 untersucht. Hierbei zeigte sich wiederum eine Abhängigkeit von der Oberflächenladung der Partikel. Bei pH 5 waren die meisten Partikel neutral bzw. positiv geladen, wohingegen bei pH 7,2 eher negativ bzw. neutral geladene Partikel vorlagen weshalb bei pH 7,2 deutlich mehr DNA freigesetzt wurde als bei pH 5. Zudem zeigte sich bei pH 7,2 eine erhöhte Freisetzung der DNA von nichtporösen im Vergleich zu mesoporösen aminofunktionalisierten Silikananopartikeln.

Das c-Kit-Protoonkogen codiert ein Transmembran Glycoprotein und hat eine entscheidende Rolle in der AML. Bei 60-80 % aller AML-Patienten wird eine c-Kit-Überexpression beschrieben und oft mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Die erfolgreiche Regulierung der c-Kit-Expression könnte somit ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Therapie der AML sein. Durch den Transport der therapeutisch relevanten miR-193a-3p mittels aminofunktionalisierter MSN (MSN-NH₂) konnte *in vitro* Einfluss auf die c-Kit-Expression genommen werden. Es zeigte sich eine Verminderung der c-Kit positiven Zellen durch miR-193a-3p beladene MSN-NH₂ im Vergleich zu unbeladenen oder miR-Ctr beladenen MSN-NH₂. Somit konnte der Transport der miRNA mittels MSN erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden.

Um die intrazelluläre Partikelkonzentration in den gewünschten Zellen zu steigern, könnte die die Anbringung von Oberflächenliganden zur spezifischen Aufnahme ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein. Darüber hinaus wäre der Verschluss der Poren mit beispielsweise Redox-responsiven Polymeren eine Möglichkeit die extrazelluläre Freisetzung

der DNA zu verhindern oder unfunktionalisierte MSN für den Transport einzusetzen. Die selektive Öffnung der Poren in der Zelle würde die Freisetzung der DNA am gewünschten Wirkungsort ermöglichen.

Zusammengefasst beschrieben gelang es in dieser Arbeit, Partikelsysteme für den gezielten Wirkstoff- und Oligonukleotidtransport in Krebsstammzellen herzustellen. Durch kontrollierte Oberflächenfunktionalisierung konnte dabei Einfluss auf die Oberflächenladung, die unspezifische Proteinadsorption und die Interaktion mit den jeweiligen Wirkstoffen bzw. Oligonukleotiden genommen werden. Die erfolgreiche Applikation dieser maßgeschneiderten Partikelsysteme wurde anhand von *in vitro* und/oder *in vivo* gezeigt.

V. Experimentalteil

1. Material und Methoden

1.1 Verwendete Messgeräte

Thermogravimetrische Analyse

Thermogravimetrische Analysen wurden an einer STA 449C Jupiter[®] und einer TG209 F1 Libra[®] der Firma Netzsch Gerätebau GmbH am Institut für Anorganische Chemie II durchgeführt. Die Proben wurden mit einer Heizrate von 10 °C/min auf eine Temperatur von 1000 °C unter Luftstrom erhitzt.

Elektronenmikroskopie

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem EM10 der Firma Zeiss und an einem JEM-1400 der Firma Jeol in der Zentralen Einrichtung für Elektronenmikroskopie aufgenommen. Die Proben wurden zuvor in Harz eingebettet und davon Ultradünnschnitte angefertigt oder direkt aus einer ethanolischen Dispersion auf ein mit Kohlenstoff bedampftes Kupfernetz aufgetragen.

Stickstoffsorptionsmessungen

Die Analyse mittels Stickstoffsorption wurde an einer Quadrasorb-SI der Firma Quantachrome Instruments am Institut für Anorganische Chemie II durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung 24 h bei 100 °C (Bernsteinsäureanhydrid, PEI bzw. Glucosederivat-funktionalisierte Partikel) bzw. 140 °C (reine Silika, amino- und carboxyfunktionalisierte Partikel) im Vakuum ausgeheizt. Die Berechnung der spezifischen Oberfläche erfolgte über die Methode nach Brunauer, Emmet und Teller (BET)^[166] und die Berechnung der Porendurchmesser standardmäßig über die nicht-lokale Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT)^[239] unter Verwendung des *equilibrium* Kernels für Stickstoff bei 77 K auf Silika-basierten Materialien mit zylindrischen Poren.

Röntgendiffraktometrie

Röntgendiffraktometrie wurde an einem Empyrean der Firma PANalytical am Institut für Physik, Chemie und Biologie der Universität Linköping (Schweden) durchgeführt. Als Röntgenquelle wurde Cu-K_α-Strahlung ($\lambda = 154,2$ nm) verwendet.

DLS-, Zetapotentialmessungen und Zetapotentialtitrationen

Das Zetapotential und die dynamische Lichtstreuung wurden an einem Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 der Firma Malvern Instruments am Institut für Anorganische Chemie II untersucht. Die Messung erfolgte mittels Rückstreuung bei 173° und einer Wellenlänge von 633 nm in 1 mM KCl-Lösung, HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2) oder DMEM mit 10 bzw. 15 % FCS. Die Partikel wurden vor der Messung im jeweiligen Medium mit einer Konzentration von 100 µg/mL in einem fokussierten Ultraschallbad S220 der Firma Covaris dispergiert. Der Mittelwert für jede Probe ergibt sich aus 3 Messungen im Automatikmodus.

Für Zetapotentialtitrationen wurden die Partikel (2 mg/mL) in 1 mM KCl-Lösung dispergiert. Der pH-Wert wurde durch Verwendung von 0,25 M NaOH-Lösung und 0,25 M Salzsäure, automatisiert mittels des Titrators MPT-2 der Firma Malvern Instruments, eingestellt (pH 2,5-9) und das Zetapotential sowie der hydrodynamische Durchmesser analog zur Standardmessung bestimmt.

UV/vis-Spektroskopie

UV/vis-spektroskopische Messungen von Daunorubicin erfolgten an einem SPECORD® 50 der Firma Analytik Jena am Institut für Anorganische Chemie II im Bereich von $\lambda = 400-600$ nm. Die Menge an DNA/miRNA in Lösung wurde durch Absorptionmessungen bei $\lambda = 260$ nm (A260) an einem Nanodrop 2000c der Firma ThermoScientific am Institut für Anorganische Chemie II mit Hilfe der NanoDrop 2000/2000c Software ermittelt. Die Messung wurde im Pedestal-Modus (V = 2 µL) durchgeführt.

Optische Emissionsspektroskopie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

Der Siliziumgehalt wurde mittels ICP-OES-Messungen an einem Ultima 2 der Firma HORIBA Jobin Yvon durch das Institut für Analytische und Bioanalytische Chemie bestimmt.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden an einem Multiplate Reader infinite M1000 der Firma Tecan am Institut für Organische Chemie III und an einem Multiplate Reader Spark® 10M der Firma Tecan am Institut für Anorganische Chemie II durchgeführt.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung des Proteingemisches (Probe bzw. FCS in PBS (3 %) verdünnt mit Laemmli-Puffer (30 µL bzw. 20 µL); Molekulargewichtsstandard: *Ladder PageRuler Unstained Protein Ladder* (10 µL)) erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Trenngel 12 %, Sammelgel 5 %; Zusammensetzung vgl. Tabelle 12) mit einer Bio-Rad PROTEAN II XL Gelelektrophorese-Kammer bei einer konstanten Spannung von 300 V. Die Gele wurden im

Anschluss fünfmal mit Wasser gewaschen, in einer Coomassie-Färbelösung nach Kang *et al.*^[188] für 1 h angefärbt und anschließend für 24 h von unspezifisch gebundenem Farbstoff in Wasser befreit. Die Visualisierung der Gele erfolgte an einem *bioradTM geldoc system*, gefolgt von der Analyse mit Hilfe der *image lab software*.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

	Sammelgel (5%ig)	Trenngel (12%ig)
Acrylamide/ <i>N,N'</i>-Methylen-bis-acrylamid (30 % T; 2,67 % C)	6,7 mL	160 mL
TRIS-Puffer (1,5 M, pH 8,8)	-	100 mL
TRIS-Puffer (0,5 M; pH 6,8)	10 mL	-
Wasser	22,7 mL	134 mL
10 Gew.% Ammoniumperoxodisulfat	0,2 mL	2 mL
Tetramethylethyldiamin	40 µL	0,2 mL

1.2 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (vgl. Tabelle 13) wurden, wenn nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Das Trocknen der Lösungsmittel erfolgte über Natrium und Diethylphtalat (Ethanol) unter Rückfluss und anschließender Destillation bzw. über Molsieb 4 Å (Dichlormethan, Toluol).

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
(3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) (≥ 98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
(3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) (97 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyaniniodid (DiR)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
1,4-Dithiothreit (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (≥ 97,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA
Natrium-Salz (99,3 %)	
Aceton (technisch)	VWR International GmbH
Acrylamid (2x krist.) (≥ 98 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Alexa Fluor® 488-Tetrafluorophenyl (TFP)-Ester	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Alumiunium-Hexadecahydrat (≥ 95 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ambion® Nuklease freies Wasser (Diethylcarbonat (DEPC) behandelt)	Thermo Fisher Scientific, Inc.

Chemikalie	Hersteller
Ammoniak (28 %)	VWR International GmbH
Ammoniak (32 %)	Merck KGaA
Ammoniumnitrat (99,0 %)	Merck KGaA
Ammoniumperoxodisulfat (≥ 98 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>anti-human CD9 (Purified)</i> (Clone: eBioSN4 (SN4 C3-3A2))	eBioscience, Inc.
<i>anti-human/mouse CD45R (B220) (Functional Grade Purified)</i> (Clone: RA3-6B2)	eBioscience, Inc.
<i>anti-human/mouse CD45R (B220) Alexa Fluor® 488</i> (Clone: RA3-6B2)	eBioscience, Inc.
<i>anti-human/mouse CD45R (B220) eFluor® 450</i> (Clone: RA3-6B2)	eBioscience, Inc.
ATTO 488-Amin	ATTO-TEC GmbH
ATTO 594-Amin	ATTO-TEC GmbH
ATTO 594-NHS-Ester	ATTO-TEC GmbH
ATTO 647N-Amin	ATTO-TEC GmbH
Ammoniumnitrat (99,0 %)	Merck KGaA
Bernsteinsäureanhydrid (98,0 %)	Merck KGaA
Bromphenolblau	Merck KGaA
Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz (25 % in Wasser)	abcr GmbH
Cetyltrimethylammoniumbromid (C ₁₆ TAB) (99,0 %)	Merck KGaA
Coomassie® Brillant Blue G250	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cyclohexan (wasserfrei, 99,5 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Daunorubicin Hydrochlorid (98 %)	CHEMOS GmbH
D-Glucosamin Hydrochlorid (≥ 98 %)	Alfa Aesar
D-Glucuronsäure (zur Synthese)	Merck KGaA
Dichlormethan ($\geq 99,9$ %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Diethylphtalat (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO) (wasserfrei)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
DNA-Oligonukleotide (Sequenz (ssDNA): 5' CGC TGA CCC TGA AGT TCA T '3)	biomers.net GmbH
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Dulbecco's Phospatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Eisessig (99-100 %)	Merck KGaA
Ethanol (absolut)	VWR International GmbH
Ethanol (technisch, Methylethylketon vergällt)	VWR International GmbH
Ethylenglykol (EG) (reinst)	Bernd Kraft GmbH
Ethylenimin	Ferak GmbH
fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Glycerin (wasserfrei, 99,0-101,0 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycin (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG

Chemikalie	Hersteller
Guanidin-Hydrochlorid (> 98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol (technisch)	VWR International GmbH
miRNA mimic (CONmiR Negative Control-N1 (Sequenz (ds): UGU ACU GCU UAC GAU UCG GCC))	Riboxx GmbH
miRNA mimic(CONmiR mimic ((hsa-miR-193a-3p); Sequenz (ds): AAC UGG CCU ACA AAG UCC CAG CCC C))	Riboxx GmbH
<i>N,N'</i> -Methylen-bis-acrylamid (≥ 98 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5-Difluorphenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycin- <i>tert</i> - butylester (DAPT) (≥ 98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumazid (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS) (≥ 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid (99,0 %)	VWR International GmbH
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS) (98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>n</i> -Pentan (technisch)	VWR International GmbH
<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85 %)	VWR International GmbH
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Penicillin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Salzsäure (32 %)	Merck KGaA
SICAPENT®	Merck KGaA
Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Tetraethylorthosilikat (TEOS) (≥ 99,0 %)	Merck KGaA
Tetramethylethylendiamin	VWR International GmbH
Tetramethylorthosilikat (TMOS) (≥ 98,0 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Toluol (≥ 99,3 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triethylamin (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trioctylphosphinoxid (TOPO) (90 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG

1.3 Verwendete (Puffer-)Lösungen

HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2)

6,5 g (25,0 mM) HEPES-Natriumsalz
pH-Wert mit konz. HCl/Natronlauge einstellen

Tris-HCl-Puffer (1,5 M; pH 8,8)

181,5 g/L (1,5 M) Tris
pH-Wert mit konz. HCl einstellen

Tris-HCl-Puffer (0,5 M; pH 6,8)

60,5 g/L (0,5 M) Tris
pH-Wert mit konz. HCl einstellen

Acrylamid/ N,N'-Methylen-bis-acrylamid (30 % T, 2,67 % C)

292,0 g/L (4,1 M) Acrylamid
8,0 g/L (51,9 mM) N,N'-Methylen-bis-acrylamid

SDS-Puffer

40,0 g/L (138,7 mM) SDS
10,0 g/L (64,8 mM) 1,4-Dithiothreit
4,8 g (40,0 mM) Tris

Laemmli-Puffer

1,2 mL (0,6 mmol) Tris-HCl-Puffer (pH 6,8; 0,5 M)
1,2 g (4,2 mmol) SDS
6,0 mg (9,0 µmol) Bromphenolblau
4,7 mL (64,3 mmol) Glycerin
2,9 mL (161,1 mmol) Wasser
0,9 g (6,0 mmol) 1,4-Dithiothreit

Laufpuffer

1 mg/L SDS (3,5 mM)
6,0 g/L Tris (49,5 mM)
28,8 g/L Glycin (384,0 mM)
(0,2 g/L Natriumazid (3,0 mM))

Natriumazid wurde zu dem in der Elektrophoresekammer befindlichen Puffer hinzugegeben.

Coomassie-Färbelösung nach Kang et al.^[188]

50 g/L (79,3 mM) Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat

20 g/L (173,5 mM) *ortho*-Phosphorsäure (85 %)

100 mL/L (1,7 M) Ethanol

0,2 g/L (234,2 µM) Coomassie® Brillant Blau G-250

Das Aluminiumsulfat wurde in Wasser gelöst und mit dem Ethanol versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Coomassie® Brillant Blau G-250 gefolgt von der Phosphorsäure. Zum Schluss wurde die Lösung mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 L gebracht.

2. Partikelsynthese

2.1 Synthese von nichtporösen Silikananopartikeln (SN)

Nichtporöse Silikananopartikel wurden über den Stöberprozess nach einer Vorschrift von Sato-Berrú^[158] synthetisiert. Hierfür wurden in eine Mischung aus Wasser (10,0 mL; 0,6 mol), Ethanol (40,0 mL; 0,7 mol) und Ammoniak (28 %ig) (3,0 mL; 37,8 mmol) unter ständigem Rühren (250 rpm) tropfenweise TEOS (1,5 mL; 6,8 mmol) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 24 h bei Raumtemperatur (RT) unter kontinuierlichem Rühren (200 rpm) wurden die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt, dreimal mit Ethanol gewaschen und anschließend für 24 h bei 60 °C getrocknet.

2.2 Synthese von sphärischen MSN (MSN, MSN_NH₂)

Die Synthese der mesoporösen Silikananopartikel in der Größenordnung von 200 nm wurde nach einer modifizierten Synthese von Rosenholm *et al.*^[28] durchgeführt. In einem Gemisch aus Wasser (963,3 g; 53,5 mol), Methanol (640,0 g; 20,0 mol) und Natronlauge (2,3 mL; 2 M; 4,6 mmol) wurde C₁₆TAB (7,9 g; 21,6 mmol) gelöst. Die Präkursoren TMOS (2,2 mL; 14,8 mmol) und APTMS (360,0 µL; 2,1 mmol) wurden unter Argon-Atmosphäre gemischt und unter Rühren zügig zu der Tensidlösung gegeben. Die Syntheselösung wurde bei RT für 45 min bei 500 rpm und anschließend für 24 h bei 300 rpm gerührt.

Die Partikel wurden durch Zugabe von Ammoniumnitrat zur Fällung gebracht und mittels Zentrifugation von der Syntheselösung abgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Entfernung des Tensids durch Calcinierung oder Extraktion.

Templatentfernung mittels Calcinierung (MSN)

Vor dem Calcinierungsvorgang wurden die Partikel zweimal mit Ethanol gewaschen und über Nacht bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurden die Partikel für 6 h bei 550 °C (Heizrate: 1 °C/min) calciniert.

Extraktion (MSN_NH₂)

Für die Templatentfernung mittels Extraktion wurden die Partikel dreimal für je 1 h in einer ethanolschen Ammoniumnitratlösung (6,0 g/L) im Ultraschallbad behandelt. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit Ethanol wurden die Partikel über Nacht bei 60 °C getrocknet.

2.3 Synthese von MSN mit erweiterten Poren (MSNe)

Die Porenerweiterung der MSN wurde basierend auf der Synthese der sphärischen MSN nach einer Vorschrift von Miller *et al.*^[160] durchgeführt. Anstelle der beiden Präkursoren TMOS und APTMS wurde hierfür nur TMOS verwendet (2,4 mL; 16,1 mmol). Nach erfolgter Synthese wurden die Partikel mittels Ammoniumnitrat-Fällung sowie Zentrifugation abgetrennt und einmal mit Ethanol gewaschen. Die eigentliche Porenerweiterung erfolgte durch anschließende hydrothermale Behandlung der Partikel unter Zusatz des Quellmittels TOPO. Hierfür wurden die Partikel für 30 min in Ethanol (30 mL; 0,5 mol) dispergiert und anschließend zu einer Lösung von Trioctylphosphinoxid (1,0 g; 2,6 mmol) in Ethanol (10,0 mL; 0,2 mol) und Wasser (10,0 mL; 0,6 mol) gegeben. Die gesamte Lösung wurde für 4 Tage bei 125 °C unter Rühren (300 rpm) im Autoklav behandelt. Anschließend wurden die Partikel von der Lösung abgetrennt und einmal mit Ethanol gewaschen. Die Entfernung des Tensids erfolgte durch Extraktion mit Ammoniumnitrat in Ethanol (vgl. Abschnitt V.2.2). Die Partikel wurden abschließend zweimal mit Ethanol gewaschen und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

2.4 Synthese von Partikeln mit unterschiedlicher Morphologie (MSN1, MSN2, MSN4)

Die Synthese von Partikeln mit unterschiedlichen *aspect ratios* (AR) (Längen-Breiten-Verhältnissen) erfolgte nach einer veränderten Synthese von Huang *et al.*^[84] C₁₆TAB (vgl. Tabelle 14) wurde in einem Gemisch aus Wasser (270,0 mL; 15,0 mol) und Ammoniak (32 %ig) (5,7 mL; 93,8 mmol) gelöst. Nach 10 min Rühren bei RT wurde unter ständigem Rühren (600 rpm) TEOS (Tabelle 14) zur Reaktionslösung gegeben. Die Abtrennung der Partikel erfolgte nach weiteren 4 h Rühren (600 rpm) bei RT. Anschließend wurden die Partikel zweimal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet. Die Entfernung des Tensids erfolgte mittels Calcinierung (vgl. Abschnitt V.2.2).

Um den Einfluss von Ethylenglykol auf die Morphologie der resultierenden Partikel zu untersuchen, wurden zur ammoniakalischen Tensidlösung der Synthese der Partikel mit AR2 unterschiedliche Mengen an Ethylenglykol (40, 50, 60, 80 oder 100 g; 0,65, 0,81, 0,97, 1,29 oder 1,61 mol) zugegeben. Die Ethylenglykol-Zugabe erfolgte dabei vor der TEOS-Zugabe. Der Einfluss der Temperatur auf die Synthese der Partikel mit AR2 wurde bei 12, 40, 50, 55, 60, 70 und 80 °C analysiert.

Tabelle 14: Eingesetzte Mengen an C₁₆TAB, TEOS und Ethylenglykol für die Synthese von Partikel mit unterschiedlichen Längen-Breiten-Verhältnissen.

	m_{C16TAB} [g]	n_{C16TAB} [mmol]	V_{TEOS} [mL]	n_{TEOS} [mmol]	m_{Ethylenglykol} [g]	n_{Ethylenglykol} [mol]
MSN1	1,1	3,0	4,7	21,2	100	1,61
MSN2	1,1	3,0	4,7	21,2	-	-
MSN4	2,2	6,0	9,4	41,0	-	-

3. Postsynthetische Modifizierung und Beladung der Partikel

3.1 Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen

3.1.1 Funktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid (MSN_c1-c5)

Um adsorbiertes Wasser vor der Funktionalisierung zu entfernen, wurden die Partikel (MSN_NH₂) für 3 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Partikel in getrocknetem Ethanol dispergiert (15,0 mg/mL) und Bernsteinsäureanhydrid in Ethanol zugegeben (vgl. Tabelle 15). Nach 24 h unter ständiger Bewegung wurden die Partikel durch Zentrifugation separiert, dreimal mit Ethanol gewaschen und über Nacht im Vakuum bei RT getrocknet.

Tabelle 15: Mengen an Bernsteinsäureanhydrid, die zur Funktionalisierung der Partikel verwendet wurden.

	MSN_c1	MSN_c2	MSN_c3	MSN_c4	MSN_c5
$m_{\text{Bernsteinsäureanhydrid}}/m_{\text{Partikel}}$ [mg/g]	400	200	40	10	2
$n_{\text{Bernsteinsäureanhydrid}}/m_{\text{Partikel}}$ [mmol/g]	4	2	0,4	0,1	0,02

3.1.2 Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff

Um die Partikel in biologischen Anwendungen detektieren zu können, wurden diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Hierfür wurden die Partikel in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) dispergiert (20,0 mg/mL) und eine Lösung von ATTO 594-NHS-Ester (1,8 µg/mg; 1,3 nmol/mg) bzw. Alexa Fluor® 488-TFP-Ester (1,0 µg/mg; 1,1 nmol/mg) in DMSO (1,0 mg/mL) hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min unter ständiger Bewegung wurden die Partikel mittels Zentrifugation abgetrennt, zweimal mit Ethanol gewaschen und für 24 h im Vakuum getrocknet.

3.1.3 Beladung des Fluoreszenzfarbstoffes DiR

Um *in vitro* den Transport und die Freisetzung eines Modellmedikaments zu analysieren, wurden die Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiR beladen. Adsorbiertes Wasser wurde vor der Beladung durch dreistündige Trocknung bei 80 °C im Vakuum aus den Poren entfernt. Für die Beladung wurden die Partikel in Pentan (4 mg/mL) dispergiert und eine Lösung von DiR in Pentan (30 µg/mL; 7 µg/mg Partikel; 7 nmol/mg) hinzugegeben. Nach 10 min Rotation wurden die beladenen Partikel abzentrifugiert, einmal mit Pentan gewaschen und bei RT im Vakuum über Nacht getrocknet. Die erfolgreiche Beladung wurde über UV/vis-Spektroskopie qualitativ nachgewiesen.

3.1.4 Beladung des Zytostatikums Daunorubicin (MSN_c3_D)

Daunorubicin-Hydrochlorid wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Wu *et al.*^[240] neutralisiert. Daunorubicin-Hydrochlorid (4,0 mg; 7,0 µmol) wurde in Wasser (0,5 mL; 27,8 mmol) gelöst und unter Rühren für 10 min mit Triethylamin (1,2 µL; 8,4 µmol) neutralisiert. Das neutralisierte Daunorubicin wurde durch Extraktion mit Dichlormethan aus der wässrigen in die organische Phase überführt. Anschließend wurde das Dichlormethan im Vakuum entfernt.

Vor der Beladung wurden die Partikel für 3 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Partikel in einer Lösung von neutralisiertem Daunorubicin in Dichlormethan dispergiert und über Nacht rotiert. Die Partikel wurden durch Zentrifugation abgetrennt und dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Mittels UV/vis-spektroskopischer Analyse der Ausgangslösung, des Überstandes und der Waschwasser wurde die Menge an Daunorubicin auf den Partikeln ermittelt. ($\lambda = 499 \text{ nm}$; Kalibriergerade: $y = 0,0101 \text{ mL/nmol} \cdot x + 0,0375$; $R^2 = 0,9984$; $n = 3$)

3.1.5 Antikörperfunktionalisierung (MSN_c1-5-B220, MSN_c3-CD9)

Um die Anbindung des Antikörpers unter milden Bedingungen (RT, pH 7) zu realisieren, wurde die Carboxygruppe am Antikörper mittels EDC und NHS aktiviert. Hierfür wurde der Antikörper *anti-human/mouse CD45R (B220) functional grade purified* bzw. *anti-human CD9 purified* in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) suspendiert (10 µg/mg; 20 µg/mL), EDC (1,7 µL/mg; 9,6 µmol/mg) und NHS in HEPES-Puffer (50,0 mg/mL) (23 µL/mg; 1,2 µg/mg; 9,9 µmol/mg) zugegeben. Nach 30 min Rotation bei RT wurde eine Dispersion der Partikel (2,0 mg/mL) hinzugegeben. Nach erneuten 90 min Rotation bei RT wurde die Lösung zentrifugiert und die Partikel zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und in Vollmedium redispergiert. Die

Antikörperquantifizierung wurde analog mit dem fluoreszenzmarkierten *anti-human/mouse CD45R (B220) eFluor® 450* durchgeführt. Die Überstände und Waschwasser wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 444 \text{ nm}$). Der Grad der Funktionalisierung wurde aus der Differenz der Fluoreszenzintensität der Ausgangslösung und der Summe des Überstandes und der Waschwasser bestimmt. Die Konzentration des Antikörpers auf den Partikeln wurde mittels einer Kalibriergerade von freiem Antikörper in HEPES-Puffer berechnet. Für die Messungen am STORM-Mikroskop wurden die Partikel analog mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper *anti-human/mouse CD45R (B220) Alexa Fluor® 488* funktionalisiert.

Im Falle der mit Daunorubicin beladenen Partikel wurde die Menge an Daunorubicin, die während der Antikörperfunktionalisierung freigesetzt wurde, mittels UV/vis-Spektroskopie ermittelt. ($\lambda = 481 \text{ nm}$; Kalibriergerade: $y = 0,0122 \text{ mL/nmol} \cdot x - 0,0072$; $R^2 = 0,9995$; $n = 3$)

3.1.6 Freisetzung von Daunorubicin

Die Freisetzung des Wirkstoffes Daunorubicin wurde mit Daunorubicin-beladenen MSN_c3-B220 (vgl. Abschnitt V.3.1.5) durchgeführt. Hierfür wurden die Partikel in PBS (pH 7,4) dispergiert und für 0,17, 0,5, 1, 2, 4, 6, 24 und 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Menge an Daunorubicin im Überstand mittels UV/vis-Spektroskopie bestimmt. (Kalibriergerade: $y = 0,0118 \text{ mL/nmol} \cdot x + 0,0022$; $R^2 = 0,9993$; $n = 3$)

3.1.7 Stabilität antikörperfunktionalisierter Partikel in Serum

Um den Einfluss der Proteinadsorption und der hydrolytische Stabilität der Antikörper-Partikel-Konjugate auf die zelluläre Aufnahme zu untersuchen, wurden die MSN_c3-B220 und MSN_c3-CD9 (1 mg/mL) in 100 % FCS bei 37 °C inkubiert. Nach 0,25, 1, 4, 12, 18 und 24 h wurden je Aliquote entnommen und mit DMEM mit 5,5 % FCS 1:10 verdünnt (resultierende Partikelkonzentration: 100 µg/mL). Die Partikelaufnahme in CALM/AF10-Zellen wurde anschließend mittels FACS untersucht (vgl. Abschnitt V.5.1.1 *In vitro* Untersuchungen).

3.2 Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten

3.2.1 Carboxyfunktionalisierung (MSN_COOH)

MSN wurden in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25 mM) dispergiert (4,3 mg/mL) und Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz (25 % in Wasser) (2 µL/mg; 3,3 µmol/mg) hinzugegeben. Nach 4 h Reaktionszeit mit ständiger Durchmischung wurden die Partikel abgetrennt, zweimal mit Wasser und zweimal mit Ethanol gewaschen und anschließend über Nacht bei 60 °C getrocknet.

3.2.2 Postsynthetische Aminofunktionalisierung (MSN1_NH₂, MSN2_NH₂, MSN4_NH₂)

Vor der Funktionalisierung wurden die MSN (200,0 mg) bei 100 °C für 4 h im Vakuum von adsorbiertem Wasser befreit. Die getrockneten Partikel wurden anschließend in trockenem Toluol (40,0 mL; 0,4 mol) dispergiert und APTES (120,0 µL; 0,5 mmol) unter Schutzgasatmosphäre hinzugegeben. Die gesamte Reaktionslösung wurde für 24 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurden die Partikel abgetrennt und je einmal mit Toluol und Wasser sowie zweimal mit Ethanol gewaschen. Die aminofunktionalisierten Partikel wurden über Nacht bei 60 °C im Vakuum getrocknet.

3.2.3 PEI-Funktionalisierung (MSN_PEI)

Analog zur postsynthetischen Aminofunktionalisierung wurden auch vor der Oberflächenpolymerisation mit Ethylenimin die Partikel (200,0 mg) für 4 h bei 100 °C im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Partikel in Toluol (20,0 mL; 0,2 mol) dispergiert und katalytische Mengen an Eisessig (15,0 µL; 0,3 µmol) sowie Ethylenimin (75,2 µL; 1,5 mmol) hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei 80 °C für 24 h unter ständigem Rühren durchgeführt, bevor die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Anschließend wurden die Partikel zweimal mit Toluol und zweimal mit Ethanol gewaschen und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

3.2.4 Funktionalisierung mit Glucosederivaten

3.2.4.1 *Simultane Fluoreszenzmarkierung und Glucosamin-funktionalisierung (MSN_COOH_GA)*

MSN_COOH wurden in HEPES (pH 7,2; 25,0 mM) dispergiert (14,0 mg/mL) und die Carboxygruppen mittels EDC (1,7 μ L/mg; 9,6 μ mol/mg) und NHS in HEPES-Puffer (50,0 mg/mL) (23 μ L/mg; 1,2 μ g/mg; 9,9 μ mol/mg) aktiviert. Nach 30 min unter ständiger Bewegung bei RT wurde ATTO 647N-NH₂ in DMSO (1,0 mg/mL) (1,0 μ L/mg; 1,0 μ g/mg; 1,2 nmol/mg) zugegeben und für 30 min im Überkopfschüttler gedreht. Anschließend wurde eine Lösung von Glucosamin-Hydrochlorid in HEPES-Puffer (36 mg/mL) (387,1 μ g/mg; 1,8 mmol/g) hinzugegeben und nochmals 4 h gedreht. Die Partikel wurden mittels Zentrifugation abgetrennt, zweimal mit Wasser sowie zweimal mit Ethanol gewaschen und für 24 h bei 60 °C getrocknet.

3.2.4.2 *Glucosaminfunktionalisierung (MSN_COOH_GA1-3)*

Die COOH-Gruppen der MSN_COOH wurden mittels EDC und NHS aktiviert (vgl. Abschnitt V.3.2.4.1). Anschließend wurden unterschiedliche Mengen an Glucosamin-Hydrochlorid in HEPES-Puffer (1,0 mL) (vgl. Tabelle 16) zur Partikeldispersion (7,1 mL; 14,0 mg/mL) gegeben. Nach 4 h wurden die Partikel von der Reaktionslösung abgetrennt, zweimal mit Wasser sowie zweimal mit Ethanol gewaschen und für 24 h bei 60 °C getrocknet.

Tabelle 16: Eingesetzte Mengen an Glucosamin-Hydrochlorid zur Funktionalisierung von MSN_COOH.

	MSN_COOH_GA1	MSN_COOH_GA2	MSN_COOH_GA3
$n_{\text{Glucosamin-Hydrochlorid}}/m_{\text{Partikel}}$ [μ g/mg]	60,4	15,1	1,5
$n_{\text{Glucosamin-Hydrochlorid}}/m_{\text{Partikel}}$ [μ mol/g]	280,0	70,0	7,0

3.2.4.3 *Glucuronsäurefunktionalisierung (MSN1_GS, MSN2_GS, MSN4_GS, MSN_NH₂_GS1-3, MSN_PEI_GS1-3)*

Die Funktionalisierung der Partikel mit Glucuronsäure erfolgte nach einer Vorschrift von Niemelä *et al.*^[26]. Im ersten Schritt wurde die Carboxygruppe der Glucuronsäure mit EDC und NHS aktiviert. Hierfür wurde Glucuronsäure (GS1: 5,4 mg/mL; GS2: 1,4 mg/mL; GS3: 0,1 mg/mL) in HEPES-Puffer (pH 7,2; 25,0 mM) gelöst. Die Glucuronsäure-Lösungen (1,0 mL) wurden mit NHS in HEPES-Puffer (50,0 mg/mL) (2,3 mL; 115,0 mg; 1,0 mmol) und EDC

(170,0 μL , 1,0 mmol) versetzt und für 1 h bei RT rotiert. Die Partikel (MSN_{NH₂}, MSN_{PEI}, MSN1_{NH₂}, MSN2_{NH₂} bzw. MSN4_{NH₂}) wurden in HEPES-Puffer dispergiert (7,5 mL; 13,3 mg/mL), zur aktivierten Glucuronsäure gegeben und für weitere 4 h bei RT gedreht. Die Partikel wurden durch Zentrifugation abgetrennt, zweimal mit Wasser sowie zweimal mit Ethanol gewaschen und anschließend für 24 h bei 60 °C getrocknet.

Tabelle 17: Glucuronsäuremengen, die zur Funktionalisierung der amino- und PEI-funktionalisierten Partikel eingesetzt wurden.

	GS1/GS	GS2	GS3
$n_{\text{Glucuronsäure}}/m_{\text{Partikel}} [\mu\text{g}/\text{mg}]$	54,4	13,6	1,4
$n_{\text{Glucuronsäure}}/m_{\text{Partikel}} [\mu\text{mol}/\text{g}]$	280,0	70,0	7,0

3.2.5 Beladung des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT

Vor der Beladung wurden die Partikel für 3 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet und anschließend in einer Lösung des γ -Sekretase-Inhibitors *N*-[*N*-(3,5-Difluorphenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycin-*tert*-butylester (DAPT) in Cyclohexan (0,1 mg/mL; 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$; 46,3 nmol/mg) dispergiert und über Nacht bei RT gedreht. Die beladenen Partikel wurden durch Zentrifugation abgetrennt und anschließend zweimal mit Cyclohexan gewaschen, bevor die Partikel über Nacht im Vakuum bei RT getrocknet wurden.

3.3 Transport von kurzen Nukleotid-Sequenzen mittels MSN

3.3.1 Carboxyfunktionalisierung (MSN_{COOH})

Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt V.3.2.1 Carboxyfunktionalisierung (MSN_{COOH}).

3.3.2 Postsynthetische Aminofunktionalisierung (SN_{NH₂}, MSNe_{NH₂}).

Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt V.3.2.2 Postsynthetische Aminofunktionalisierung.

3.3.3 Bernsteinsäureanhydridfunktionalisierung (MSN_c1-c5)

Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt V.3.1.1 Funktionalisierung mit Bernsteinsäureanhydrid (MSN_c1-c5).

3.3.4 Glucuronsäurefunktionalisierung

Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt V.3.2.4.3 Glucuronsäurefunktionalisierung (MSN1_GS, MSN2_GS, MSN4_GS, MSN_NH2_GS1-3, MSN_PEI_GS1-3).

3.3.5 PEI Funktionalisierung

Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt V.3.2.3 PEI-Funktionalisierung.

3.3.6 Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff

MSN_NH₂ wurden analog zu Abschnitt V.3.1.2 mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 594 funktionalisiert.

3.3.7 Beladung mit Oligonukleotiden

Die Beladung der Partikel mit kurzen Oligonukleotid-Sequenzen erfolgte in DEPC-Wasser bei pH 5. Die Partikel wurden in DEPC-Wasser dispergiert (0,5 mL; 2,0 mg/mL) und mit einer Oligonukleotid-Lösung (CONmiR mimic (hsa-miR-193a-3p) (2,5-3,0 nmol/mg), CONmiR Negative Control-N1 (miR-ctr) (2,5-3,0 nmol/mg) oder DNA_19 bp (3,3 nmol/mg)) in DEPC-Wasser (0,5 mL) hinzugefügt. Das Ganze wurde für 1 h bei RT gedreht, die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt und einmal mit DEPC-Wasser (1 mL) gewaschen. Der Beladungsgrad wurde mittels UV/vis-Spektroskopie (A₂₆₀) der Ausgangslösung, des Überstandes und des Waschwassers bestimmt.

Für die Beladung unter Zusatz des chaotropen Salzes Guanidin-Hydrochlorid wurden die Partikel in einer wässrigen Guanidin-Hydrochlorid-Lösung (4 M) (17 µL; 29,4 mg/mL) dispergiert. Anschließend wurde eine Lösung der DNA in MilliQ-Wasser (23 µL; 6,5-7,1 nmol/mg) mit absolutem Ethanol (67 µL) versetzt und zur Partikeldispersion gegeben. Nach Behandlung der Lösung für 90 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler wurden die Partikel abzentrifugiert und einmal mit MilliQ-Wasser (107 µL) oder PBS (107 µL)

gewaschen. Mittels UV/vis-Spektroskopie (A260) der Ausgangslösung, des Überstandes und des Waschwassers wurde der Beladungsgrad bestimmt.

3.3.8 Freisetzung von Oligonukleotiden

Die mit Oligonukleotiden beladenen Partikel wurden in PBS (pH 7,4 bzw. pH 5) dispergiert (1 mg/mL) und für 24 h bei 37 C gedreht. Nach dem Abtrennen der Partikel durch Zentrifugation wurde die Menge an DNA/miRNA im Überstand mittels UV/vis-Spektroskopie (A260) bestimmt.

4. Charakterisierung mesoporöser Silikananopartikel

4.1 Dispersionsstabilität

Dispersionsstabilität wurde mittels DLS-Messungen in Medium mit FCS durchgeführt. Hierfür wurden die Partikel in DMEM mit 10 bzw. 15 % FCS (100 µg/mL) für 12 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend der hydrodynamische Radius über einen Zeitraum von 24 h vermessen.

4.2 Auflösungsversuche

Die hydrolytische Stabilität der Partikel unter biologischen Bedingungen wurde mit optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES – *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*) untersucht. Die Partikel wurden in PBS mit 15 % FCS dispergiert (0,1 mg/mL) und für 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24 und 48 h bei 37 °C rotiert. Anschließend wurden die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt und die Überstände hinsichtlich des Siliziumgehalts mittels ICP-OES untersucht. Um die Vergleichbarkeit der Partikel (MSN_{NH₂} und MSN_{c1-5}) zu gewährleisten, wurden die Partikel ohne Antikörper analog zum anti-B220-Anbindungsschritt für 90 min bei RT in HEPES-Puffer inkubiert.

4.3 Proteinadsorption

4.3.1 Proteinadsorption zur Analyse mittels SDS-PAGE

Um die Zusammensetzung der Proteincorona der unterschiedlichen Partikel nach Inkubation in FCS zu analysieren, wurden diese in PBS mit einem Serumgehalt von 10 bzw. 15 % oder in Vollserum dispergiert (1 mg/mL) und anschließend für 24 h bei 37 °C rotiert. Der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Entwicklung der Proteincorona wurde nach 0,25, 1, 4, 12, 18 und 24 h untersucht. Die Partikel wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit PBS von schwach adsorbierten Proteinen befreit.

Durch redispergieren in SDS-Puffer (10 mg/mL) und 30-minütige Behandlung im Ultraschallbad wurden die auf den Partikeln adsorbierten Proteine wieder abgelöst und die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt. Der proteinhaltige Überstand sowie eine 3%ige Lösung von FCS in PBS (100 µL) wurden mit Laemmli-Puffer (20 µL) verdünnt und für 10 min bei 95 °C behandelt.

4.3.2 Proteinadsorption zur Analyse mittels STORM

Die Proteinadsorption und anschließende Visualisierung mittels STORM wurde von Natalia Feiner-Gracia am „*Institute for Bioengineering of Catalonia*“ in Barcelona (Spanien) unter der Leitung von Dr. Lorenzo Albertazzi durchgeführt. Die experimentelle Vorgehensweise findet sich in dem in Kürze veröffentlichten Artikel „*Super-resolution microscopy unveils dynamic heterogeneities in nanoparticle protein corona*“^[176].

5. Biologische Evaluation

5.1 Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen

5.1.1 *In vitro* Untersuchungen

Die *in vitro* Untersuchungen für den Teil des gezielten Medikamententransports in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie wurden von Tamoghna Mandal am Institut für Experimentelle Tumorforschung des Universitätsklinikums Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Buske durchgeführt. Die Vorgehensweisen finden sich in den in Kürze veröffentlichten Artikeln „*Super-resolution microscopy unveils dynamic heterogeneties in nanoparticle protein corona*“^[176], „*Serum protein adsorption enhances active leukaemia stem cell targeting of mesoporous silica nanoparticles*“^[56] und „*Targeting murine leukemic stem cells by antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles*“^[177].

5.2 Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten

5.2.1 Gezielter Medikamententransport in Brustkrebsstammzellen

Die Durchführung der *in vitro* sowie *in vivo* Evaluierung der Glucosederivat-funktionalisierten Partikel (Abschnitt V.3.2) erfolgte in der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Cecilia Sahlgren am „*Turku Centre for Biotechnology*“ in Turku (Finnland). Die experimentellen Vorgehensweisen finden sich in der zugehörigen Publikation: „*Inhibiting notch activity in breast cancer stem cells by glucose functionalized nanoparticles carrying γ -secretase inhibitors*“^[152].

5.3 Transport von kurzen Nukleotid-Sequenzen mittels MSN

5.3.1 Transport von miRNA in Hoxa9/Meis1-Zellen

Der Transport von miRNA mittels mesoporösen Silikananopartikeln, wurde von Angelika Vollmer am Institut für Experimentelle Tumorforschung, des Universitätsklinikums Ulm in der Arbeitsgruppe von Dr. Florian Kuchenbauer *in vitro* analysiert.

Murine Hoxa9/Meis1-Knochenmarkzellen wurden in Vollmedium (DMEM mit 15 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, Zytokinen IL-3, IL-6 und Stammzellfaktoren) bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchte kultiviert.

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der ATTO 594-markierten sowie miRNA-beladenen Partikel und des Einflusses auf die c-Kit-Expression, wurden die Zellen (20.000 Zellen) mit Partikeldispersionen (50, 100, 150 bzw. 200 µg/mL) in Vollmedium für 48, 72 bzw. 96 h in 96-well-Platten (V = 200µL) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FBS-haltigem PBS (10 %) gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 30 min auf Eis angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mittels FACS analysiert. Hierbei wurde die Population lebender Zellen (*SytoxBlue*-negativ) im FACS detektiert und hinsichtlich der Anzahl an ATTO 594 und c-Kit (stark) positiven Zellen untersucht.

VI. Anhang

1. Synthese von Silikananopartikeln

1.1 Synthese von MSN unterschiedlicher Form

1.1.1 Variation der Reaktionstemperatur

In Abbildung 75 sind die Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel nach Huang *et al.*^[84] dargestellt, die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen hergestellt wurden.

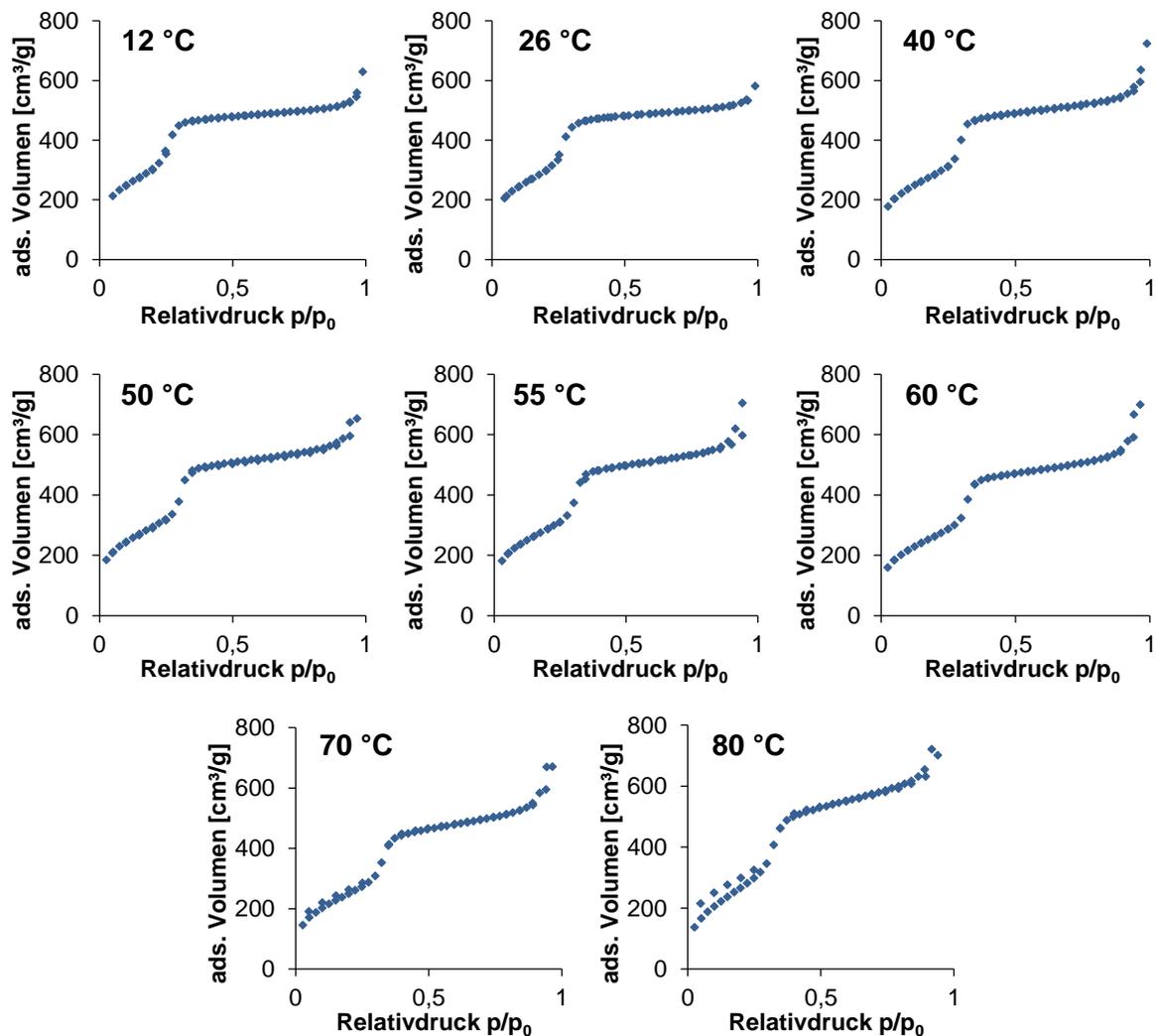


Abbildung 75: Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel, die bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen synthetisiert wurden.

1.1.2 Einfluss der Zugabe von Ethylenglykol

Die Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel nach Huang *et al.*,^[84] die unter Zusatz von Ethylenglykol hergestellt wurden, sind in Abbildung 76 abgebildet.

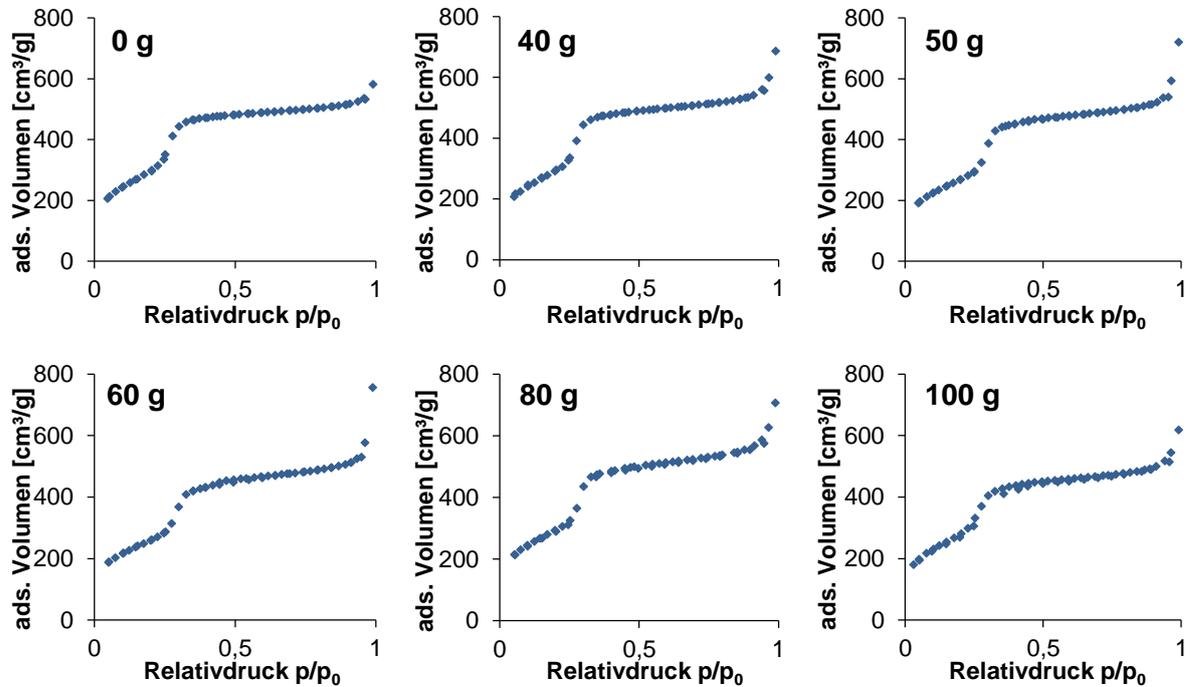


Abbildung 76: Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel, die mit 0, 40, 50, 60, 80 und 100 g an Ethylenglykol hergestellt wurden.

2. Selektiver Medikamententransport in B220-positive leukämische Stammzellen

2.1 Partikelfunktionalisierung

Abbildung 77 zeigt die Stickstoffsorptionsisothermen der mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten Partikel.

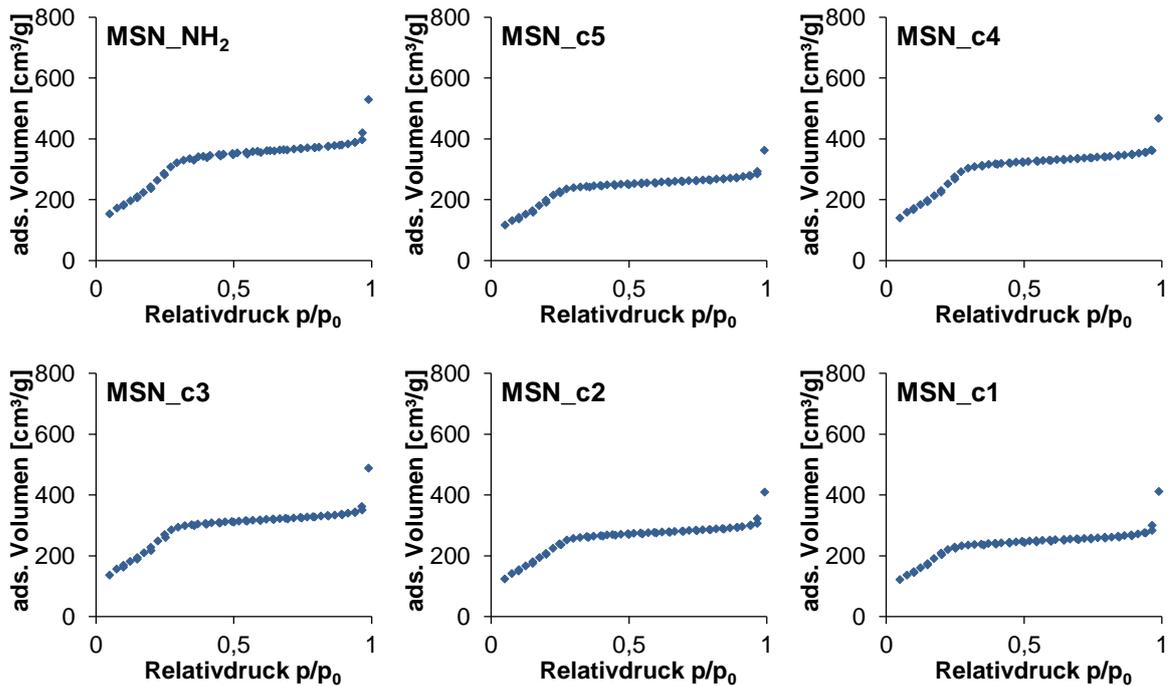


Abbildung 77: Stickstoffsorptionsisothermen der Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid (0,02 (MSN_c5), 0,1 (MSN_c4), 0,4 (MSN_c3), 2 (MSN_c2) und 4 mmol (MSN_c1) /g MSN_NH₂) funktionalisiert wurden.

Die Zetapotentialtitrationen der Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten Partikel sind in Abbildung 78 dargestellt.

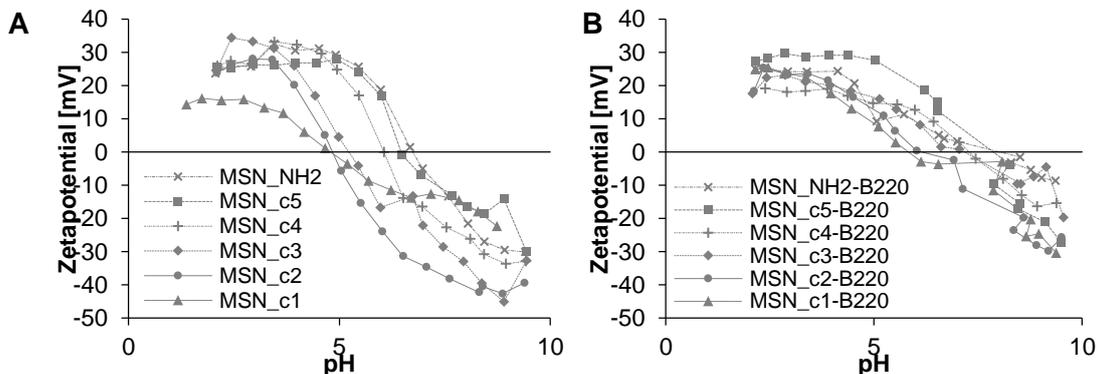


Abbildung 78: Zetapotentialtitrationen der Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten Partikel (B) und (A) ohne anti-B220-Funktionalisierung.^[56]

2.2 Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen

Die hydrolytische Stabilität der MSN_NH₂ und MSN_c1-5 mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung in DMEM mit 15 % FCS wurde mittels ICP-OES untersucht (vgl. Abbildung 79 A und B).

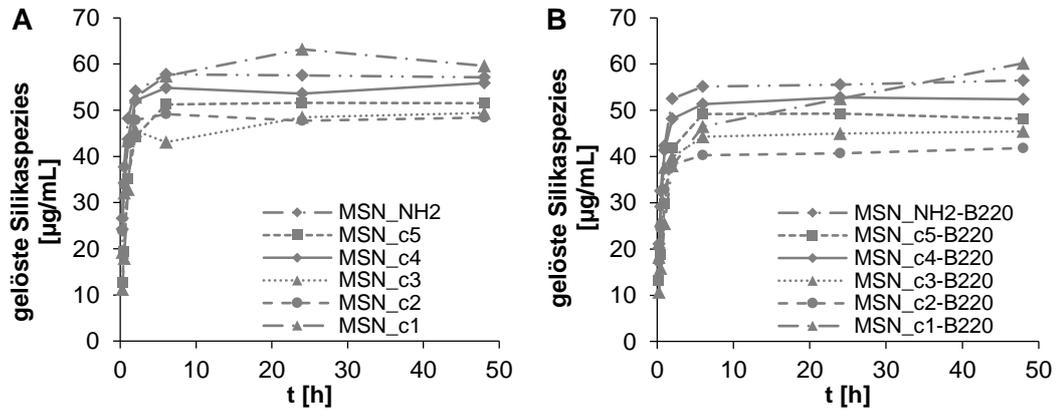


Abbildung 79: Untersuchung der Auflösungskinetik von MSN_NH₂ welche mit unterschiedlichen Mengen an Bernsteinsäureanhydrid (MSN_c1-5) funktionalisiert wurden. Partikel (A) ohne und (B) mit anti-B220-Funktionalisierung wurden in DMEM mit 15 % FCS inkubiert und resultierende Siliziumkonzentration im Überstand mittels ICP-OES bestimmt. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56,176], Copyright 2017, American Chemical Society und Wiley-VCH)

Die Dispersionsstabilität der Bernsteinsäureanhydrid-funktionalisierten Partikel mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung in DMEM mit 15 % FCS wurde mit DLS über 24 h ermittelt. Der Verlauf des hydrodynamischen Durchmessers ist in Abbildung 80 dargestellt.

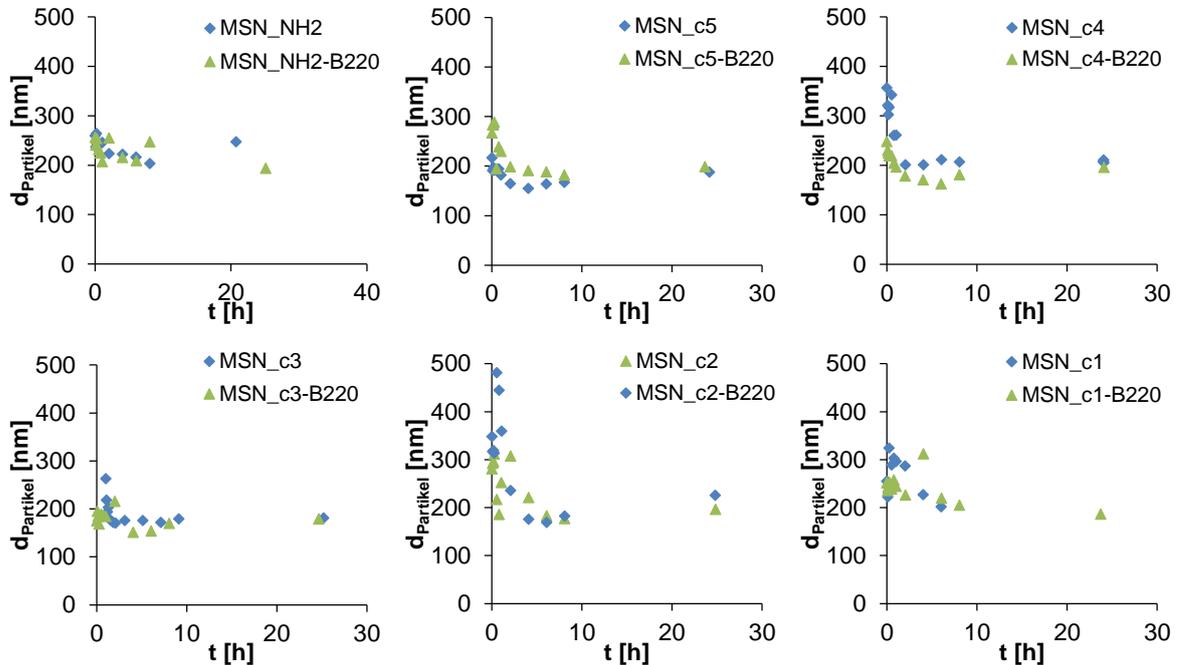


Abbildung 80: Untersuchung der Dispersionsstabilität von Bernsteinsäureanhydrid-modifizierten Partikeln mit und ohne anti-B220-Funktionalisierung. Der hydrodynamische Durchmesser wurde in DMEM mit 15 % FCS über einen Zeitraum von 24 h bestimmt. (Wiederverwendet mit freundlicher Genehmigung ^[56], Copyright 2017, American Chemical Society)

Die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa Fluor 488 an MSN_NH₂ (Abbildung 81 A), MSN_c3 (Abbildung 81 B) und MSN_c1 (Abbildung 81 C) wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie bestätigt.

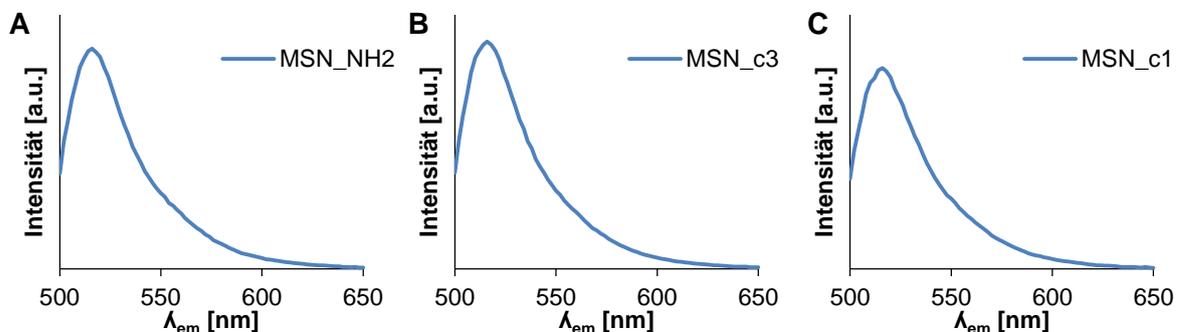


Abbildung 81: Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$) der Alexa Fluor 488-funktionalisierten (A) MSN_NH₂, (B) MSN_c3 und (C) MSN_c1 bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie.

2.3 Biokompatibilität und zelluläre Aufnahme

Abbildung 82 zeigt den Anteil der für die fluoreszenzmarkierten Antikörper anti-B220 (Abbildung 82 A) bzw. anti-CD9 (Abbildung 82 B) positiven *CALM/AF10*-Zellen, bestimmt durch Durchflusszytometrie.

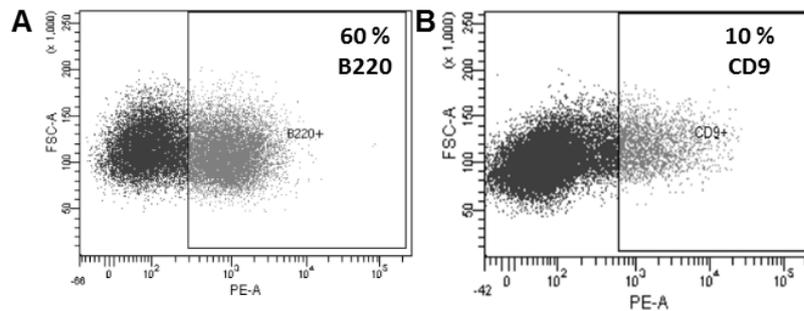


Abbildung 82: Färbung der CD9- und B220-Epitope auf murinen *CALM/AF10*-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (*anti-human/mouse CD45 R (B220) PE* bzw. *anti-human CD9 PE*) und anschließende FACS-Analyse.^[177]

2.4 Stabilität in Serum und Einfluss auf die gezielte Aufnahme in B220-positive Leukämienstammzellen

Abbildung 83 zeigt das Fluoreszenzspektrum der MSN_c3, die mit dem fluoreszenzmarkierten anti-B220-Alexa Fluor 488 funktionalisiert wurden.

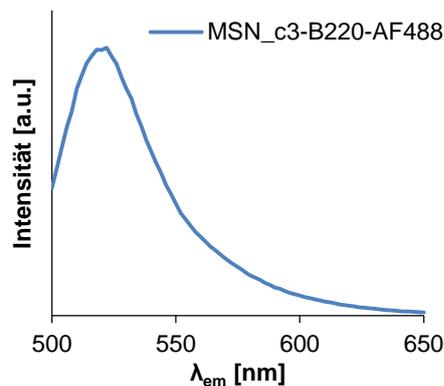


Abbildung 83: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-B220-AF488) funktionalisierten MSN_c3 ($\lambda_{exc} = 455 \text{ nm}$).

2.5 Gezielter Medikamententransport

Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an anti-B220-positiven *CALM/AF10*-Zellen vor (Abbildung 84 A) und nach (Abbildung 84 B) der Blockierung der B220-Antigenen mittels freiem anti-B220 bestimmt.

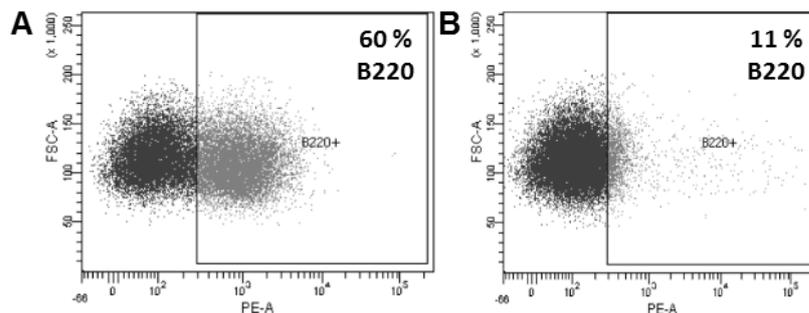


Abbildung 84: Blockierung des B220-Antigens auf *CALM/AF10*-Zellen mit freiem anti-B220 für 4 h und anschließende Bestimmung der freien Epitope mit dem fluoreszenzmarkierten anti-B220 (*anti-human/mouse CD45 R (B220) PE*).^[177]

In Tabelle 18 sind die Beladungsgrade, Partikelkonzentrationen und die Menge an Daunorubicin dargestellt, die für die Behandlung der *CALM/AF10*-Zellen *in vitro* und die anschließende Injektion in Mäuse verwendet wurden.

Tabelle 18: Beladungsgrade, Partikelkonzentrationen und die Menge an Daunorubicin der Partikel, welche für die Behandlung der *CALM/AF10*-Zellen *in vitro* und anschließende intravenöse Injektion in Mäuse verwendet wurden.^[177]

		$m_{\text{Dauno}}/$ m_{Partikel} [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	$n_{\text{Dauno}}/$ m_{Partikel} [nmol/mg]	m_{Partikel} [$\mu\text{g}/\text{mL}/10^5$ Zellen]	n_{Dauno} [pmol/ $\text{mL}/10^5$ Zellen]
Experiment 1	MSN_c3-B220_D	2,8	5,3	100	530
	MSN_c3-CD9_D	3,0	5,8	100	580
	freies Daunorubicin (13 μM)	-	-	-	500
Experiment 2	MSN_c3-B220_D	1,9	3,7	157	576
	freies Daunorubicin (13 μM)	-	-	-	572

3. Funktionalisierung von MSN mit Glucosederivaten

3.1 Synthese und Charakterisierung von MSN mit Glucosederivat-Funktionalisierung

3.1.1 MSN mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen

Die Stabilität der Partikeldispersionen wurde mittels DLS bestimmt. Abbildung 85 zeigt den zeitlichen Verlauf des hydrodynamischen Durchmessers der MSN_COOH und MSN_COOH_GA1 mit und ohne Glucosederivat-Funktionalisierung.

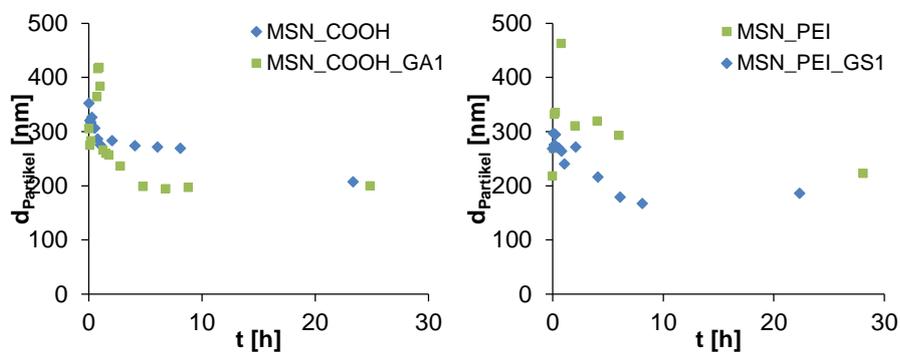


Abbildung 85: Hydrodynamischer Durchmesser der MSN_COOH und MSN_COOH_GA1 sowie der MSN_PEI und MSN_PEI_GS1 in DMEM mit 10 % FCS in Abhängigkeit der Inkubationszeit.^[203]

3.1.2 Einfluss der Form auf die Proteinadsorption und Dispergierbarkeit

Die Dispersionsstabilität von amino- und Glucuronsäure-funktionalisierten, stäbchenförmigen Partikeln mit AR 1,1 und 3,4 (vgl. Abbildung 86) in DMEM mit 10 % FCS wurde mittels DLS über einen Zeitraum von 24 h bestimmt.

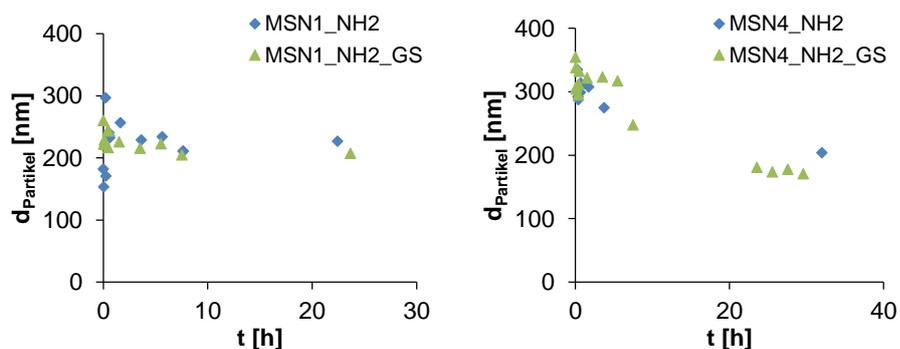


Abbildung 86: Hydrodynamischer Durchmesser stäbchenförmiger amino- und Glucuronsäure-funktionalisierter MSN mit AR von 1,1 und 3,4 in DMEM mit 10 % FCS.

3.2 Gezielter Medikamententransport in Brustkrebsstammzellen

Abbildung 87 zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren der ATTO 647N-funktionalisierten MSN_COOH und MSN_COOH_GA.

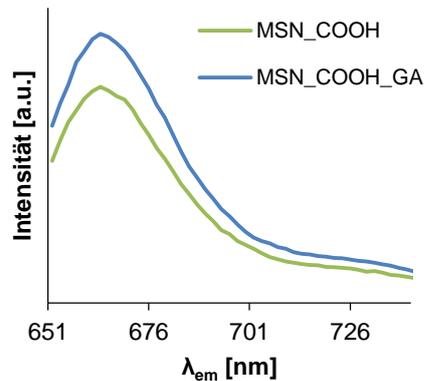


Abbildung 87: Emissionsspektren der ATTO 647N-funktionalisierten MSN_COOH und MSN_COOH_GA bestimmt durch Fluoreszenzspektroskopie ($\lambda_{exc} = 644$ nm).^[152]

Die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Deoxyglucose (2NBDG) in Krebszellen (adhärente Platte) und Krebsstammzellen (sphäroide Platte) der Zelllinien MDA-MB-231 (vgl. Abbildung 88 A) und MCF-7 (vgl. Abbildung 88 B) wurde mittels FACS analysiert.

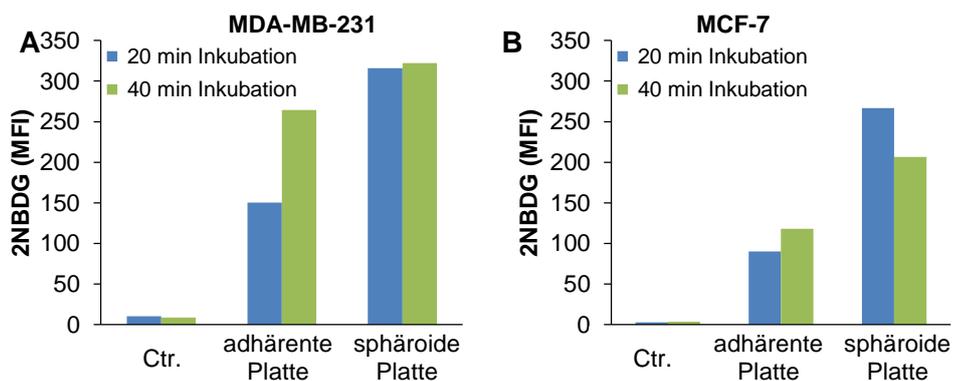


Abbildung 88: Aufnahme von fluoreszenzmarkierter Deoxyglucose (2NBDG) in Brustkrebszellen (adhärente Platte) und Brustkrebsstammzell-Sphäroiden (sphäroide Platte) der Zelllinien (A) MDA-MB-231 und (B) MCF-7, bestimmt mittels FACS. (repräsentativer Graph von einem aus drei Experimenten). (verändert nach ^[152])

Literaturverzeichnis

- [1] T. Asefa, Z. Tao, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265–2284.
- [2] O. V. Salata, *J. Nanobiotechnology* **2004**, *2*, 1–6.
- [3] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869–1879.
- [4] M. Köping-Höggård, A. Sánchez, M. J. Alonso, *Expert Rev. Vaccines* **2005**, *4*, 185–196.
- [5] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Lindén, *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 1166–1186.
- [6] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1870–1883.
- [7] B. Díaz, C. Sánchez-Espinel, M. Arruebo, J. Faro, E. de Miguel, S. Magadán, C. Yagüe, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, J. Santamaría, A. González-Fernández, *Small* **2008**, *4*, 2025–2034.
- [8] *Nanotechnology White Paper; U.S. Environmental Protection Agency EPA 100/B-07/001; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2007.*
- [9] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D. M. Shin, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310–1316.
- [10] K. P. García, K. Zarschler, L. Barbaro, J. A. Barreto, W. O'Malley, L. Spiccia, H. Stephan, B. Graham, *Small* **2014**, *10*, 2516–2529.
- [11] E. Chang, N. Thekkekk, W. W. Yu, V. L. Colvin, R. Drezek, *Small* **2006**, *2*, 1412–1417.
- [12] K. Braun, A. Pochert, M. Lindén, M. Davoudi, A. Schmidtchen, R. Nordström, M. Malmsten, *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *475*, 161–170.
- [13] U. Schubert, N. Hüsing, *Synthesis of Inorganic Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [14] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*, Wiley, New York, **1979**.
- [15] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Inc., New York, **1990**.
- [16] D. W. Schaefer, *Science* **1989**, *243*, 1023–1027.
- [17] F. Schüth, *Angew. Chemie* **2003**, *115*, 3730–3750.
- [18] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chemie* **2006**, *118*, 3290–3328.
- [19] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. Chmelka, F. Schüth, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1176–1191.
- [20] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7924–7937.
- [21] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1278–1288.
- [22] C. Caltagirone, A. Bettoschi, A. Garau, R. Montis, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4645–4671.
- [23] K. W. Gallis, J. T. Araujo, K. J. Duff, J. G. Moore, C. C. Landry, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1452–1455.

- [24] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 689–702.
- [25] S. Budi Hartono, S. Z. Qiao, K. Jack, B. P. Ladewig, Z. Hao, G. Q. M. Lu, *Langmuir* **2009**, *25*, 6413–6424.
- [26] E. Niemelä, D. Desai, Y. Nkizinkiko, J. E. Eriksson, J. M. Rosenholm, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 11–21.
- [27] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res.* **2008**, *1*, 99–115.
- [28] J. M. Rosenholm, A. Meinander, E. Peuhu, R. Niemi, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *ACS Nano* **2009**, *3*, 197–206.
- [29] W. L. Marshall, J. M. Warakowski, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1980**, *44*, 915–924.
- [30] S. H. Chan, *Geothermics* **1989**, *18*, 49–56.
- [31] G. Okamoto, T. Okura, K. Goto, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1957**, *12*, 123–132.
- [32] W. Vogelsberger, J. Schmidt, F. Roelofs, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *324*, 51–57.
- [33] K. Braun, A. Pochert, M. Beck, R. Fiedler, J. Gruber, M. Lindén, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2016**, *79*, 319–327.
- [34] Q. He, J. Shi, M. Zhu, Y. Chen, F. Chen, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *131*, 314–320.
- [35] J. M. Rosenholm, V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nanomedicine* **2012**, *7*, 111–120.
- [36] J. Lu, Z. Li, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Nanomedicine* **2012**, *8*, 212–220.
- [37] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, F. Tang, *ACS Nano* **2011**, *7*, 5390–5399.
- [38] P. Bihari, M. Vippola, S. Schultes, M. Praetner, A. G. Khandoga, C. A. Reichel, C. Coester, T. Tuomi, M. Rehberg, F. Krombach, *Part. Fibre Toxicol.* **2008**, *5*, 1–14.
- [39] D. Drescher, G. Orts-Gil, G. Laube, K. Natte, R. W. Veh, W. Österle, J. Kneipp, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 1367–1373.
- [40] C. Bellmann, *Chemie-Ingenieur-Technik* **2003**, *75*, 662–668.
- [41] Y.-S. Lin, N. Abadeer, C. L. Haynes, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 532–534.
- [42] S. Deguchi, T. Yamazaki, S. A. Mukai, R. Usami, K. Horikoshi, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 854–858.
- [43] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786.
- [44] V. Puddu, C. C. Perry, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6356–6363.
- [45] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- [46] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780–2799.
- [47] L. Vroman, A. L. Adams, *Surf. Sci.* **1969**, *16*, 438–446.

- [48] S. Y. Jung, S. M. Lim, F. Albertorio, G. Kim, M. C. Gurau, R. D. Yang, M. A. Holden, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12782–12786.
- [49] N. P. Mortensen, G. B. Hurst, W. Wang, C. M. Foster, P. D. Nallathamby, S. T. Retterer, *Nanoscale* **2013**, *5*, 6372–6380.
- [50] M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, S. Laurent, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5610–5637.
- [51] M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525–2534.
- [52] M. Sarparanta, L. M. Bimbo, J. Rytkoänen, E. Mäkilä, T. J. Laaksonen, P. Laaksonen, M. Nyman, J. Salonen, M. B. Linder, J. Hirvonen, H. A. Santos, A. J. Airaksinen, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 654–663.
- [53] A. M. Clemments, C. Muniesa, C. C. Landry, P. Botella, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 29134–29138.
- [54] A. Gessner, R. Waicz, A. Lieske, B. R. Paulke, K. Maeder, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 245–249.
- [55] M. Karlsson, U. Carlsson, in *Encycl. Surf. Colloid Sci.*, **2007**.
- [56] M. Beck, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 18566–18574.
- [57] Z. J. Deng, M. Liang, M. Monteiro, I. Toth, R. F. Minchin, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 39–44.
- [58] A. Salvati, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, K. Prapainop, F. B. Bombelli, D. R. Hristov, P. M. Kelly, C. Åberg, E. Mahon, K. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 137–143.
- [59] Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, Y. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1085–1092.
- [60] A. Yildirim, E. Ozgur, M. Bayindir, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1909–1920.
- [61] R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong, G. Garratty, P. Richette, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 1319–1323.
- [62] A. S. A. Lila, H. Kiwada, T. Ishida, *J. Control. Release* **2013**, *172*, 38–47.
- [63] C. Lemarchand, R. Gref, C. Passirani, E. Garcion, B. Petri, R. Müller, D. Costantini, P. Couvreur, *Biomaterials* **2006**, *27*, 108–118.
- [64] S. Dufort, L. Sancey, J. L. Coll, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 179–189.
- [65] M. Moros, B. Pelaz, P. López-Larrubia, M. L. García-Martin, V. Grazú, J. M. de la Fuente, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1746–1755.
- [66] C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 327–341.
- [67] S. Chen, L. Li, C. Zhao, J. Zheng, *Polymer* **2010**, *51*, 5283–5293.
- [68] S. Jiang, Z. Cao, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 920–932.
- [69] S. Chen, J. Zheng, L. Li, S. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14473–14478.

- [70] L. Shang, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 5.
- [71] D. Napierska, L. C. J. Thomassen, V. Rabolli, D. Lison, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, J. A. Martens, P. H. Hoet, *Small* **2009**, *5*, 846–853.
- [72] K. O. Yu, C. M. Grabinski, A. M. Schrand, R. C. Murdock, W. Wang, B. Gu, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11*, 15–24.
- [73] Y. S. Lin, C. L. Haynes, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4834–4842.
- [74] Y. Zhang, L. Hu, D. Yu, C. Gao, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8465–8474.
- [75] F. Lu, S. H. Wu, Y. Hung, C. Y. Mou, *Small* **2009**, *5*, 1408–1413.
- [76] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–668.
- [77] J. A. Varela, M. G. Bexiga, C. Åberg, J. C. Simpson, K. A. Dawson, M. G. Bexiga, J. C. Simpson, *J. Nanobiotechnology* **2012**, *10*, 39–44.
- [78] J. Huang, L. Bu, J. Xie, K. Chen, Z. Cheng, X. Li, X. Chen, *ACS Nano* **2010**, *4*, 7151–7160.
- [79] I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14792–14793.
- [80] H. Gao, *J. Mech. Phys. Solids* **2014**, *62*, 312–339.
- [81] H. Gao, W. Shi, L. B. Freund, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 9469–9474.
- [82] Q. He, Z. Zhang, F. Gao, Y. Li, J. Shi, *Small* **2011**, *7*, 271–280.
- [83] J. Lu, M. Liong, Z. Li, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Small* **2010**, *6*, 1794–1805.
- [84] X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He, *Biomaterials* **2010**, *31*, 438–448.
- [85] H. Meng, S. Yang, Z. Li, T. Xia, J. Chen, Z. Ji, H. Zhang, X. Wang, S. Lin, C. Huang, Z. H. Zhou, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4434–4447.
- [86] D. Sen Karaman, D. Desai, R. Senthilkumar, E. M. Johansson, N. Råttts, M. Odén, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, D. M. Toivola, J. M. Rosenholm, *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 358–371.
- [87] B. G. Trewyn, J. A. Nieweg, Y. Zhao, V. S. Y. Lin, *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 23–29.
- [88] Z. Tao, B. B. Toms, J. Goodisman, T. Asefa, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1869–1880.
- [89] A. J. Di Pasqua, K. K. Sharma, Y. L. Shi, B. B. Toms, W. Ouellette, J. C. Dabrowiak, T. Asefa, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1416–1423.
- [90] T. H. Chung, S. H. Wu, M. Yao, C. W. Lu, Y. S. Lin, Y. Hung, C. Y. Mou, Y. C. Chen, D. M. Huang, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2959–2966.
- [91] S. Shahabi, L. Treccani, R. Dringen, K. Rezwani, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 13821–13833.
- [92] X. He, H. Nie, K. Wang, W. Tan, X. Wu, P. Zhang, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9597–9603.
- [93] V. Cauda, C. Argyo, T. Bein, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 8693.
- [94] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- [95] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271–284.

- [96] M. Arruebo, M. Valladares, Á. González-Fernández, *J. Nanomater.* **2009**, DOI 10.1155/2009/439389.
- [97] S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4607–4612.
- [98] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
- [99] J. Sudimack, R. J. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 147–162.
- [100] R. J. Shaw, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 598–608.
- [101] J. W. Locasale, L. C. Cantley, *BMC Biol.* **2010**, *8*, 88.
- [102] D. Brevet, M. Gary-bobo, L. Raehm, S. Richeter, O. Hocine, K. Amro, B. Looock, P. Couleaud, C. Frochot, A. Morère, P. Maillard, M. Garcia, J. Durand, *Chem. Commun.* **2009**, 1475–1477.
- [103] I. Y. Park, I. Y. Kim, M. K. Yoo, Y. J. Choi, M. H. Cho, C. S. Cho, *Int. J. Pharm.* **2008**, *359*, 280–287.
- [104] S. Sahu, N. Sinha, S. K. Bhutia, M. Majhi, S. Mohapatra, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3799–3808.
- [105] S. Chen, Y. Yang, H. Li, X. Zhou, M. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 283–285.
- [106] C. L. Zhu, X. Y. Song, W. H. Zhou, H. H. Yang, Y. H. Wen, X. R. Wang, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 7765–7770.
- [107] L. Le Li, Q. Yin, J. Cheng, Y. Lu, *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1*, 567–572.
- [108] I. J. Fang, I. I. Slowing, K. C. W. Wu, V. S. Y. Lin, B. G. Trewyn, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7787–7792.
- [109] L. An, H. Hu, J. Du, J. Wei, L. Wang, H. Yang, D. Wu, H. Shi, F. Li, S. Yang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 5381–5392.
- [110] C. P. Tsai, C. Y. Chen, Y. Hung, F. H. Chang, C. Y. Mou, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5737–5743.
- [111] M. Bottini, F. Cerignoli, D. M. Mills, F. D’Annibale, M. Leone, N. Rosato, A. Magrini, M. Pellecchia, A. Bergamaschi, T. Mustelin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7814–7823.
- [112] F. Chen, H. Hong, Y. Zhang, H. F. Valdovinos, S. Shi, G. S. Kwon, C. P. Theuer, T. E. Barnhart, C. Weibo, *ACS Nano* **2013**, *7*, 9027–9039.
- [113] F. Chen, T. R. Nayak, S. Goel, H. F. Valdovinos, H. Hong, C. P. Theuer, T. E. Barnhart, W. Cai, *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 4007–4014.
- [114] Y. Zhang, J. Wang, X. Bai, T. Jiang, Q. Zhang, S. Wang, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 505–513.
- [115] Q. He, J. Shi, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 391–411.
- [116] J. An, X. Zhang, Q. Guo, Y. Zhao, Z. Wu, C. Li, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *482*, 98–108.
- [117] J. M. Rosenholm, E. Peuhu, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nano Lett.* **2009**, *9*,

- 3308–3311.
- [118] Y. J. Cheng, G. F. Luo, J. Y. Zhu, X. D. Xu, X. Zeng, D. B. Cheng, Y. M. Li, Y. Wu, X. Z. Zhang, R. X. Zhuo, F. He, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 9078–9087.
- [119] L. Pan, Q. He, J. Liu, Y. Chen, M. Ma, L. Zhang, J. Shi, **2012**, *134*, 5722–5725.
- [120] D. P. Ferris, J. Lu, C. Gothard, R. Yanes, C. R. Thomas, J. C. Olsen, J. F. Stoddart, F. Tamanoi, J. I. Zink, *Small* **2011**, *7*, 1816–1826.
- [121] S. Shahabi, S. Döscher, T. Bollhorst, L. Treccani, M. Maas, R. Dringen, K. Rezwan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 26880–26891.
- [122] Y. Gao, S. Gu, Y. Zhang, X. Xie, T. Yu, Y. Lu, Y. Zhu, W. Chen, H. Zhang, H. Dong, P. J. Sinko, L. Jia, *Small* **2016**, *12*, 2595–2608.
- [123] X. Wang, Y. Liu, S. Wang, D. Shi, X. Zhou, C. Wang, J. Wu, Z. Zeng, Y. Li, J. Sun, J. Wang, L. Zhang, Z. Teng, G. Lu, *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *332*, 308–317.
- [124] C. S. O. Paulo, R. Pires das Neves, L. S. Ferreira, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 494002–494012.
- [125] M. Y. Hanafi-Bojd, L. Ansari, B. Malaekheh-Nikouei, *Ther. Deliv.* **2016**, *7*, 649–655.
- [126] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [127] J. Li, S. Xue, Z. W. Mao, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 6620–6639.
- [128] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [129] C. Neumann-Haefelin, H. E. Blum, R. Thimme, *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **2008**, *133*, 2407–2409.
- [130] D. M. Dykxhoorn, C. D. Novina, P. A. Sharp, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 457–467.
- [131] R. W. Carthew, E. J. Sontheimer, *Cell* **2009**, *136*, 642–655.
- [132] X. Li, Q. R. Xie, J. Zhang, W. Xia, H. Gu, *Biomaterials* **2011**, *32*, 9546–56.
- [133] Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang, S. Wang, *Nanomedicine: NBM* **2015**, *11*, 313–327.
- [134] S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont, J. C. Fernandes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 1–8.
- [135] H. Meng, M. Liong, T. Xia, Z. Li, Z. Ji, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4539–50.
- [136] T. Xia, M. Kovichich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2009**, *3*, 3273–3286.
- [137] J. Shen, H. C. Kim, H. Su, F. Wang, J. Wolfram, D. Kirui, J. Mai, C. Mu, L. N. Ji, Z. W. Mao, H. Shen, *Theranostics* **2014**, *4*, 487–497.
- [138] C. Hom, J. Lu, M. Liong, H. Luo, Z. Li, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Small* **2010**, *6*, 1185–1190.
- [139] D. Lin, Q. Cheng, Q. Jiang, Y. Huang, Z. Yang, S. Han, Y. Zhao, S. Guo, Z. Liang, A. Dong, *Nanoscale* **2013**, *5*, 4291–301.

- [140] M. Wang, X. Li, Y. Ma, H. Gu, *Int. J. Pharm.* **2013**, *448*, 51–57.
- [141] H. K. Na, M. H. Kim, K. Park, S. R. Ryoo, K. E. Lee, H. Jeon, R. Ryoo, C. Hyeon, D. H. Min, *Small* **2012**, *8*, 1752–1761.
- [142] S. Kim, H. K. Na, C. Won, D. H. Min, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 27143–27150.
- [143] A. M. Chen, M. Zhang, D. Wei, D. Stueber, O. Taratula, T. Minko, H. He, *Small* **2009**, *5*, 2673–2677.
- [144] B. G. Trewyn, S. Giri, I. I. Slowing, V. S. Y. Lin, *Chem. Commun.* **2007**, 3236–3245.
- [145] T. Yu, A. Malugin, H. Ghandehari, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5717–5728.
- [146] S. Huh, J. W. Wiench, J. C. Yoo, M. Pruski, V. S. Y. Lin, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4247–4256.
- [147] M. Mizutani, Y. Yamada, T. Nakamura, K. Yano, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4777–4782.
- [148] R. F. Schlenk, K. Döhner, H. Döhner, *Internist* **2013**, *54*, 171–178.
- [149] H. Zong, S. Sen, G. Zhang, C. Mu, Z. F. Alabayati, D. G. Gorenstein, X. Liu, M. Ferrari, P. A. Crooks, G. J. Roboz, H. Shen, M. L. Guzman, *Leukemia* **2016**, *30*, 1582–1586.
- [150] A. J. Deshpande, M. Cusan, V. P. S. Rawat, H. Reuter, A. Krause, C. Pott, L. Quintanilla-Martinez, P. Kakadia, F. Kuchenbauer, F. Ahmed, E. Delabesse, M. Hahn, P. Lichter, M. Kneba, W. Hiddemann, E. Macintyre, C. Mecucci, W. D. Ludwig, R. K. Humphries, et al., *Cancer Cell* **2006**, *10*, 363–374.
- [151] A. Burke, R. Singh, D. Carroll, *J. Mol. Biomark. Diagn.* **2012**, *8*, 1–8.
- [152] V. Mamaeva, R. Niemi, M. Beck, E. Özliseli, D. Desai, S. Landor, T. Gronroos, P. Kronqvist, I. K. N. Pettersen, E. McCormack, J. M. Rosenholm, M. Lindén, C. Sahlgren, *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 926–936. (CC BY-SA 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>)
- [153] M. Moros, B. Hernáez, E. Garet, J. T. Dias, B. Sáez, V. Grazú, Á. González-Fernández, C. Alonso, J. M. De La Fuente, *ACS Nano* **2012**, *6*, 1565–1577.
- [154] P. Rizzo, H. Miao, G. D’Souza, C. Osipo, J. Yun, H. Zhao, J. Mascarenhas, D. Wyatt, G. Antico, L. Hao, K. Yao, P. Rajan, C. Hicks, K. Siziopikou, S. Selvaggi, A. Bashir, D. Bhandari, A. Marchese, U. Lendahl, et al., *Cancer Res.* **2008**, *68*, 5226–5235.
- [155] E. R. Andersson, U. Lendahl, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 357–378.
- [156] R. Jammal, K. Krowiorz, N. Haetscher, S. Emmrich, A. Rouhi, M. Heuser, S. Bothur, L. Bullinger, K. Döhner, C. Lai, T. Maetzing, A. Obulkasim, V. Martins, M. A. Mulaw, J. Stary, A. Baruchel, V. De Haas, D. Reinhardt, H. Döhner, et al., *Blood* **2016**, *128*, 1534.
- [157] C. Röcken, *Onkologe* **2011**, *17*, 487–494.
- [158] R. Sato-Berrú, J. M. Saniger, J. Flores-Flores, M. Sanchez-Espindola, *Journals Mater. Sci. Eng.* **2013**, *3*, 237–242.
- [159] T. Kobayashi, K. Mao, S. G. Wang, V. S. Y. Lin, M. Pruski, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2011**, *39*, 65–71.

- [160] L. Miller, G. Winter, B. Baur, B. Witulla, C. Solbach, S. Reske, M. Lindén, *Nanoscale* **2014**, *6*, 4928–4935.
- [161] K. Yano, Y. Fukushima, *J. Mater. Chem.* **2004**, 1579–1584.
- [162] K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquérol, T. Siemieniowska, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603–619.
- [163] K. Sing, *Colloids Surfaces A* **2001**, *187–188*, 3–9.
- [164] M. Thommes, B. Smarsly, M. Groenewolt, P. I. Ravikovitch, A. V. Neimark, *Langmuir* **2006**, *22*, 756–764.
- [165] L. Sarkisov, P. A. Monson, *Langmuir* **2001**, *17*, 7600–7604.
- [166] S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319.
- [167] K. Yano, *R&D Rev. Toyota CRDL* **2004**, *40*, 28–35.
- [168] Q. Cai, Z. Luo, W. Pang, Y. Fan, X. Chen, F. Cui, *Chem. Mater.* **2001**, *10*, 258–263.
- [169] S. S. Soni, G. Brotons, M. Bellour, T. Narayanan, A. Gibaud, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15157–15165.
- [170] J. Gu, W. Fan, A. Shimojima, T. Okubo, *Small* **2007**, *3*, 1740–1744.
- [171] P. Piller, Einfluss von Form und Glucuronsäure-Funktionalisierung auf die zelluläre Aufnahme und Biokompatibilität von mesoporösen Silikananopartikeln, Bachelorarbeit, Universität Ulm, **2016**.
- [172] G. Schmid, *Nanoparticles - From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [173] C. G. Tan, B. D. Bowen, N. Epstein, *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *118*, 290–293.
- [174] P. M. Reppert, F. D. Morgan, *J. Geophys. Res.* **2003**, *108*, 2546–2557.
- [175] *Effect of Temperature on Surface Zeta Potential*, Malvern Instruments Limited, **2014**.
- [176] N. Feiner-Gracia, M. Beck, S. Pujals, S. Tosi, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, L. Albertazzi, *Small* **2017**, *13*, 1701631.
- [177] T. Mandal, M. Beck, N. Kirsten, M. Lindén, C. Buske, *Sci. Rep.* **2018**, *8*:989, DOI:10.1038/s41598-017-18932-4. (CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>)
- [178] B. Löwenberg, J. R. Downing, A. Burnett, *Med. Prog.* **1999**, *341*, 1051–1062.
- [179] A. J. Deshpande, C. Buske, *Cell Cycle* **2007**, *6*, 543–545.
- [180] M. Schaich, G. Ehninger, *Der Onkol.* **2006**, *10*, 1003–1011.
- [181] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, Taylor & Francis, New York, **2001**.
- [182] D. Knopp, D. Tang, R. Niessner, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647*, 14–30.
- [183] C. C. Fleischer, C. K. Payne, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 14017–14026.
- [184] C. Barbé, J. Bartlett, L. Kong, K. Finnie, H. Q. Lin, M. Larkin, S. Calleja, A. Bush, G. Calleja, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1959–1966.
- [185] R. Moertera, S. Fiorilli, E. Garrone, E. Verné, B. Onida, *Chem. Eng. J.* **2010**, *156*, 184–

- 192.
- [186] D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Köller, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6176–6181.
- [187] S. Ritz, S. Schöttler, N. Kotman, G. Baier, A. Musyanovych, J. Kuharev, K. Landfester, H. Schild, O. Jahn, S. Tenzer, V. Mailänder, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1311–1321.
- [188] D. Kang, Y. S. Ghoo, M. Suh, C. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1511–1512.
- [189] <http://www.uniprot.org/uniprot/> (zuletzt abgerufen am 13.02.2017),
- [190] A. Pochert, I. Vernikouskaya, F. Pascher, V. Rasche, M. Lindén, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *488*, 1–9.
- [191] S. Winzen, S. Schoettler, G. Baier, C. Rosenauer, V. Mailänder, K. Landfester, K. Mohr, *Nanoscale* **2015**, *7*, 2992–3001.
- [192] F. Wang, L. Yu, M. P. Monopoli, P. Sandin, E. Mahon, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nanomedicine: NBM* **2013**, *9*, 1159–1168.
- [193] M. J. Rust, M. Bates, X. W. Zhuang, *Nat Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [194] B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, *Cell* **2010**, *143*, 1047–1058.
- [195] S. Yu, A. Perálvarez-Marín, C. Minelli, J. Faraudo, A. Roig, A. Laromaine, *Nanoscale* **2016**, *8*, 14393–14405.
- [196] V. Mirshafiee, R. Kim, S. Park, M. Mahmoudi, M. L. Kraft, *Biomaterials* **2016**, *75*, 295–304.
- [197] W. Zimmermann, *Im Focus Onkol.* **2016**, *19*, 2016.
- [198] M. R. Luskin, J. W. Lee, H. F. Fernandez, O. Abdel-Wahab, J. M. Bennett, R. P. Ketterling, H. M. Lazarus, R. L. Levine, M. R. Litzow, E. M. Paietta, J. P. Patel, J. Racevskis, J. M. Rowe, M. S. Tallman, Z. Sun, S. M. Luger, *Blood* **2016**, *127*, 1551–1558.
- [199] M. Wilhelm, A. Mukherjee, B. Bouvier, K. Zakrzewska, J. T. Hynes, R. Lavery, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8588–8596.
- [200] Y. Wang, Y. Sun, J. Wang, Y. Yang, Y. Li, Y. Yuan, C. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 17166–17175.
- [201] S. Yu, G. Huang, G. Qian, Y. Li, G. Wu, R. Guo, *J. Chemother.* **2007**, *19*, 34–42.
- [202] J. Koolman, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**.
- [203] A. Mutschler, Einfluss der Glucosefunktionalisierung von mesoporösen Silikananopartikeln auf die zelluläre Aufnahme, die Zellvitalität und die Proteinadsorption, Masterarbeit, Universität Ulm, **2016**.
- [204] M. Chen, X. He, K. Wang, D. He, S. Yang, P. Qiu, S. Chen, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 428–436.
- [205] M. Xie, H. Shi, K. Ma, H. Shen, B. Li, S. Shen, X. Wang, Y. Jin, *J. Colloid Interface Sci.*

- 2013**, 395, 306–314.
- [206] S. C. Brown, M. Kamal, N. Nasreen, A. Baumuratov, P. Sharma, V. A. Antony, B. M. Moudgil, *Adv. Powder Technol.* **2007**, 18, 69–79.
- [207] S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild, R. H. Stauber, *ACS Nano* **2011**, 5, 7155–7167.
- [208] A. M. Clemments, P. Botella, C. C. Landry, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 21682–21689.
- [209] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 14265–14270.
- [210] M. Dean, T. Fojo, S. Bates, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 275–284.
- [211] P. Marcato, C. A. Dean, C. A. Giacomantonio, P. W. K. Lee, *Cell Cycle* **2011**, 10, 1378–1384.
- [212] K. Hori, A. Sen, S. Artavanis-Tsakonas, *J. Cell Sci.* **2013**, 126, 2135–2140.
- [213] P. Ntziachristos, J. S. Lim, J. Sage, I. Aifantis, *Cancer Cell* **2014**, 25, 318–334.
- [214] C. A. Martz, K. A. Ottina, K. R. Singleton, J. S. Jasper, S. E. Wardell, A. Peraza-Penton, G. R. Anderson, P. S. Winter, T. Wang, H. M. Alley, L. N. Kwong, Z. A. Cooper, M. Tetzlaff, P.-L. Chen, J. C. Rathmell, K. T. Flaherty, J. A. Wargo, D. P. McDonnell, D. M. Sabatini, et al., *Sci. Signal.* **2014**, 7, ra121.
- [215] D. L. Abravanel, G. K. Belka, T.-C. Pan, D. K. Pant, M. A. Collins, C. J. Sterner, L. A. Chodosh, *J. Clin. Invest.* **2015**, 125, 2484–2496.
- [216] Y. Dong, A. Li, J. Wang, J. D. Weber, L. S. Michel, *Cancer Res.* **2010**, 70, 5465–5474.
- [217] S. K.-J. Landor, A. P. Mutvei, V. Mamaeva, S. Jin, M. Busk, R. Borra, T. J. Grönroos, P. Kronqvist, U. Lendahl, C. M. Sahlgren, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108, 18814–18819.
- [218] V. Mamaeva, J. M. Rosenholm, L. T. Bate-Eya, L. Bergman, E. Peuhu, A. Duchanoy, L. E. Fortelius, S. Landor, D. M. Toivola, M. Lindén, C. Sahlgren, *Mol. Ther.* **2011**, 19, 1538–1546.
- [219] V. Mayen, T. Wutikhun, O. Ketchart, P. Kopermsub, *J. Microsc. Soc. Thail.* **2012**, 5, 10–13.
- [220] X. Li, J. Zhang, H. Gu, *Langmuir* **2011**, 27, 6099–6106.
- [221] J. Zhang, W. Sun, L. Bergman, J. M. Rosenholm, M. Lindén, G. Wu, H. Xu, H. C. Gu, *Mater. Lett.* **2012**, 67, 379–382.
- [222] K. A. Melzak, C. S. Sherwood, R. F. B. Turner, C. A. Haynes, *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 181, 635–644.
- [223] H. E. Schaefer, *Nanoscience - The Science of the Small in Physics, Engineering, Chemistry, Biology and Medicine*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2010**.

- [224] S. M. Solberg, C. C. Landry, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15261–15268.
- [225] J. Zhang, M. Niemelä, J. Westermarck, J. M. Rosenholm, *Dalt. Trans.* **2014**, *43*, 4115–4126.
- [226] E. S. Lee, Y. H. Bae, *J. Control. Release* **2008**, *132*, 164–170.
- [227] K. Krowiorz, J. Ruschmann, C. Lai, M. Ngom, T. Maetzig, V. Martins, A. Scheffold, E. Schneider, N. Pochert, C. Miller, L. Palmqvist, A. Staffas, M. Mulaw, S. R. Bohl, C. Buske, M. Heuser, J. Kraus, K. O'Neill, C. L. Hansen, et al., *Blood Cancer J.* **2016**, *6*, e508.
- [228] C. H. Lawrie, *Blood Rev.* **2013**, *27*, 143–154.
- [229] B. Zhang, X. Pan, G. P. Cobb, T. A. Anderson, *Dev. Biol.* **2007**, *302*, 1–12.
- [230] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, T. R. Golub, *Nature* **2005**, *435*, 834–838.
- [231] K. Krowiorz, R. Jammal, S. Emmrich, A. Rouhi, M. Heuser, L. Bullinger, K. Döhner, C. Lei, T. Mätzig, V. Martins, M. Mulaw, C. M. Zwaan, J. Stary, A. Baruchel, V. De Haas, D. Reinhardt, M. Fornerod, H. Döhner, J. Ruschmann, et al., *Blood* **2015**, *126*, 1244.
- [232] X.-N. Gao, J. Lin, Y.-H. Li, L. Gao, X.-R. Wang, W. Wang, H.-Y. Kang, G.-T. Yan, L.-L. Wang, L. Yu, *Oncogene* **2011**, *30*, 3416–3428.
- [233] F. Heidel, J. Cortes, F. G. Rücker, W. Aulitzky, L. Letvak, T. Kindler, C. Huber, H. Döhner, H. Kantarjian, T. Fischer, *Cancer* **2007**, *109*, 907–914.
- [234] T. Kindler, F. Breitenbuecher, A. Marx, J. Beck, G. Hess, B. Weinkauff, J. Duyster, C. Peschel, C. J. Kirkpatrick, M. Theobald, H. Gschaidmeier, C. Huber, T. Fischer, *Blood* **2004**, *103*, 3644–3654.
- [235] B. Jiao, C. F. Wu, Y. Liang, H. M. Chen, S. M. Xiong, B. Chen, J. Y. Shi, Y. Y. Wang, J. H. Wang, Y. Chen, J. M. Li, L. J. Gu, J. Y. Tang, Z. X. Shen, B. W. Gu, W. L. Zhao, Z. Chen, S. J. Chen, *Leukemia* **2009**, *23*, 1598–1604.
- [236] J. Lennartsson, T. Jelacic, D. Linnekin, R. Shivakrupa, *Stem Cells* **2005**, *23*, 16–43.
- [237] N. Boissel, H. Leroy, B. Brethon, N. Philippe, S. de Botton, A. Auvrignon, E. Raffoux, T. Leblanc, X. Thomas, O. Hermine, B. Quesnel, A. Baruchel, G. Leverger, H. Dombret, C. Preudhomme, *Leukemia* **2006**, *20*, 965–970.
- [238] R. Cairoli, A. Beghini, G. Grillo, G. Nadali, F. Elice, B. C. Ripamonti, P. Colapietro, M. Nichelatti, L. Pezzetti, M. Lunghi, A. Cuneo, A. Viola, F. Ferrara, M. Lazzarino, F. Rodeghiero, G. Pizzolo, L. Larizza, E. Morra, *Blood* **2006**, *107*, 3463–3468.
- [239] J. R. Olivier, *J. Porous Mat.* **1995**, *2*, 9–17.
- [240] Y. Wu, E. K. Shih, A. Ramanathan, S. Vasudevan, T. Weil, *Biointerphases* **2012**, *7*, DOI 10.1007/s13758-011-0005-7.

Danksagung

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Curriculum Vitae

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht in:

Zeitschriftenbeiträge:

- T. Mandal*, M. Beck*, M. Lindén[#], C. Buske[#], „*Targeting murine leukemic stem cells by antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles*“, Sci.Rep. **2018**, 8:989. (DOI: 10.1038/s41598-017-18932-4) (*,[#]*contributed equally*)
- N. Feiner-Gracia, M. Beck, S. Pujals, S. Tosi, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, L. Albertazzi, “*Super-resolution microscopy unveils dynamic heterogeneities in nanoparticle protein corona*“, Small **2017**, 13, 1701631. (DOI: 10.1002/smll.201701631)
- M. Beck*, T. Mandal*, C. Buske[#], M. Lindén[#], „*Serum protein adsorption enhances active leukemia stem cell targeting of mesoporous silica nanoparticles*“, ACS Appl. Mater. Interfaces **2017**, 9, 18566-18574. (DOI: 10.1021/acsami.7b04742) (*,[#]*contributed equally*)
- T. Mandal, M. Beck, M. Lindén, C. Buske, “*Targeting of leukemic stem cells by antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles in a mouse model of CALM-AF10 positive acute myeloid leukemia*“, Blood **2016**, 128, 4713.
- K. Braun*, A. Pochert*, M. Beck, R. Fiedler, J. Gruber, M. Lindén, “*Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids*“, J. Sol-Gel Sci. Technol. **2016**, 79, 319-327. (DOI: 10.1007/s10971-016-4053-9) (**contributed equally*)
- V. Mamaeva, R. Niemi*, M. Beck*, E. Özliseli, D. Desai, S. Landor, T. Gronroos, P. Kronqvist, I.K.N. Pettersen, E. McCormack, J.M. Rosenholm, M. Lindén, C. Sahlgren, “*Inhibiting notch activity in breast cancer stem cells by glucose functionalized nanoparticles carrying γ -secretase inhibitors*” Mol. Ther. **2016**, 23, 926-936. (DOI: 10.1038/mt.2016.42) (**contributed equally*)

Fachvorträge:

- M. Beck, T. Mandal, N. Feiner-Gracia, S. Pujals, S. Tosi, L. Albertazzi, C. Buske, M. Lindén, “*Detailed analysis of protein corona of mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery in leukaemia stem cells*” 29. Deutsche Zeolithtagung, **2017**, Frankfurt, Deutschland

Posterbeiträge:

- T. Mandal, M. Beck, M. Lindén, C. Buske, "*Targeting of leukemic stem cells by antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles in a mouse model of CALM-AF10 positive acute myeloid leukemia*", 58th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology, **2016**, San Diego, Amerika
- M. Beck, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, "*Targeted drug delivery system based on monoclonal antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles*", Crossing Biological Barriers – Advances in Nanocarrier Design for Targeted Drug Delivery, **2015**, Dresden, Deutschland
- M. Beck, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, "*Targeting of leukaemia stem cells by monoclonal antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles*", Summer School Projekthaus NanoBioMater, **2015**, Bad Herrenalb, Deutschland
- M. Beck, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, "*Mesoporous silica nanoparticles functionalized with a monoclonal antibody enhances cellular uptake by leukaemia stem cells-toward targeted drug delivery to a subpopulation of cells*", 4th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, **2015**, Sitges, Spanien
- M. Beck, T. Mandal, C. Buske, M. Lindén, "*Monoclonal antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles and their application in leukaemia therapy*", 27. Deutsche Zeolithtagung, **2015**, Oldenburg, Deutschland
- M. Beck, T. Mandal, L. Bergman, C. Buske, M. Lindén, "*Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for targeting of leukaemia stem cells*", 26. Deutsche Zeolithtagung, **2014**, Paderborn, Deutschland
- M. Beck, D. Böcking, M. Lindén, "*Cytotoxicity evaluation of differently shaped mesoporous amino-functionalized silica nanoparticles*", 25. Deutsche Zeolithtagung, **2013**, Hamburg, Deutschland

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Mesoporöse Silikananopartikel als Transportsysteme für miRNA und
Wirkstoffmoleküle für die Therapie von Krebsstammzellen“**

selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten, gegebenenfalls auch elektronischen Medien, entnommen sind, wurden durch eine Quellenangabe kenntlich gemacht. Alle mit dieser Arbeit unmittelbar im Zusammenhang stehenden praktischen Leistungen wurden von mir selbständig erbracht. Diese Arbeit hat in dieser oder einer ähnlichen Form noch nicht im Rahmen einer anderen Prüfung vorgelegen.

(Ort, Datum)

(Michaela Beck)