



**Oberflächenmodifizierung von
Calciumphosphat-Nanopartikeln mittels Klick-Chemie**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

Vorgelegt von

M. Sc. Kathrin Kostka

geboren in Hagen

Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen

Institut für Anorganische Chemie

2023

Vorwort

Angefertigt wurde die vorliegende Doktorarbeit im Zeitraum von Juli 2020 bis Mai 2023 am Institut der Anorganischen Chemie der Universität Duisburg-Essen in Essen, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Epple.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Epple
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. C. Mayer
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. C. Janiak

Prüfungsvorsitz: Herr Prof. Dr. J. Niemeyer

Tag der Disputation: 21.08.2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/79016

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230926-083449-3

Alle Rechte vorbehalten.

Meiner Familie

*Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,
es doch noch einmal zu versuchen.*

(Thomas Alva Edison)

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>1. Einleitung</i>	<i>1</i>
<i>2. Theoretische Grundlagen</i>	<i>5</i>
2.1 Kolloide und Nanopartikel (NPs)	5
2.2 Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NPs)	6
2.2.1 Knochen und Zähne	10
2.2.2 Synthese von CaP-NPs	10
2.2.3 Stabilität von CaP-NPs	10
2.2.4 Stabilisierung von CaP-NPs	12
2.2.5 CaP-NPs als Trägersysteme in biologischen Anwendungen	14
2.3 Die Klick-Reaktion	18
2.3.1 Oberflächenfunktionalisierung mit Biomolekülen und Gold-NPs	14
2.4 Das Immunsystem und seine Zellinteraktionen	18
2.4.1 Das Humane Immunschwäche Virus (HIV)	14
<i>3. Verwendete Analysemethoden</i>	<i>21</i>
3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	21
3.2 Energiedisperse Röntgenspektroskopie (EDX)	21
3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	21
3.4 Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)	25
3.5 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	26
3.6 Infrarotspektroskopie (IR)	27
3.7 UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis)	28
3.8 Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie	30
3.9 Dynamische Scheibenzentrifugation (DCS)	31
3.10 Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD)	31

3.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	35
3.12 Gefriertrocknung	36
4. Experimenteller Teil	38
4.1 Synthese und Funktionalisierung von CaP-NPs	38
4.1.1 PEI- und CMC-stabilisierte CaP-NPs	38
4.1.2 Peptid-beladene CaP-NPs	38
4.1.3 SiO ₂ -modifizierte CaP-NPs	39
4.1.4 Azid-terminierte CaP-NPs	39
4.1.5 Alkin-terminierte CaP-NPs	40
4.1.6 Thiol-terminierte CaP-NPs	40
4.1.7 Fluoreszenzmarkierung von Env-Proteinen	40
4.1.8 Fluoreszenzmarkierung von BSA und Hämoglobin-Molekülen	40
4.1.9 Oximreaktion der fluoreszierenden Env-Proteine	40
4.1.10 Oximreaktion der fluoreszierenden BSA und Hämoglobin-Moleküle	40
4.1.11 Oberflächenfunktionalisierung von Azidgruppen-modifizierten CaP-NPs mittels Klick-Reaktion	42
4.1.12 Oberflächenfunktionalisierung von Alkingruppen-modifizierten CaP-NPs mittels Klick-Reaktion	43
4.1.13 Linker-Inkubation für eine unspezifische Kopplung von CaP-NPs	43
4.1.14 Unspezifische Oberflächenfunktionalisierung von Thiolgruppen-modifizierten CaP-NPs	43
4.2 Synthese und Funktionalisierung von VLP- und VLP(pEGFP)-NPs	44
4.2.1 VLP- und VLP(pEGFP)-stabilisierte PEI- und PEI-Cy5-NPs	45
4.2.2 SiO ₂ -modifizierte VLP- und VLP(pEGFP)-NPs	45
4.2.3 Azidgruppen-terminierte VLP- und VLP(pEGFP)-NPs	45
4.2.4 Thiolgruppen-terminierte VLP- und VLP(pEGFP)-NPs	46
4.2.5 Oberflächenmodifizierung von VLP- und VLP(pEGFP)-NPs mittels Klick-Reaktion	46
4.2.6 Unspezifische Oberflächenmodifizierung von Thiolgruppen-modifizierten VLP- und VLP(pEGFP)-NPs	46

4.3 Synthese und Funktionalisierung von ultrakleinen Gold-NPs	48
4.3.1 Glutathion-stabilisierte ultrakleine Gold-NPs	49
4.3.2 Azidgruppen-terminierte ultrakleine Gold-NPs	49
4.3.3 Farbstoff-modifizierte ultrakleine Gold-NPs	49
4.4 Zellbiologische Methoden	49
4.4.1 Auftauen von HeLa-Zellen	49
4.4.2 Kultivierung von HeLa-Zellen	50
4.4.3 Fluoreszenzmikroskopie der HeLa-Zellen	50
4.4.4 CLSM der HeLa-Zellen	50
4.4.5 MTT-Test der HeLa-Zellen	50
4.4.6 Einfrieren von HeLa-Zellen	52
5. Ergebnisse und Diskussion	53
5.1 CaP-NPs als innovative Impfstoffplattform für die HIV-1 Forschung	55
5.1.1 Synthese der oberflächenfunktionalisierten CaP-NPs anhand einer unspezifischen Kopplung (<i>T-CaPs</i>)	55
5.1.2 Synthese der oberflächenfunktionalisierten CaP-NPs mittels Klick-Chemie (<i>B-CaPs</i>)	72
5.1.2.1 Klick-Reaktionsstudien zwischen Env-His ₈ - und Env-Ald ₆ -Proteinen	72
5.1.2.2 Klick-Reaktionsstudien zwischen Env-Ald ₆ /FGE-Proteinen mit und ohne Linkerinkubation	72
5.1.2.3 Anbindung der Env-Ald ₆ /FGE-Proteine mit einer unspezifischen Kopplung und mittels Klick-Chemie	84
5.1.3 Beschichtung der VLP- und VLP(pEGFP)-NPs und Funktionalisierung mittels Klick-Chemie (<i>Viro-CaPs</i>)	90
5.2 Anbindungsstudien von Hämoglobin an PEI- (positive Ladung) und CMC- (negative Ladung) stabilisierten CaP-NPs	137
5.3 Ultrakleine Gold-NPs dekorierte CaP-NPs	150
5.4 Konkurrenzreaktionen zwischen fluoreszierenden BSA- und AF-Farbstoff-Molekülen	165
Zusammenfassung	177

Summary	180
Literaturverzeichnis	183
Publikationsliste	195
Vorträge und Posterbeiträge auf wissenschaftlichen Tagungen	197
Eidesstattliche Versicherung	200
Lebenslauf	VI
Danksagung	VII

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AF	AlexaFluor
AK	Antikörper
Au-NPs	Goldnanopartikel
BSA	Rinderserumalbumin
CaP	Calciumphosphat
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CMC	Carboxymethylcellulose
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DCS	<i>Differential Centrifugal Sedimentation</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EtOH	Ethanol
Env	Hüll-Glycoprotein
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks cervix carcinoma</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRTEM	<i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i>
IR	Infrarot
MHz	Megahertz
mV	Millivolt

NP	Nanopartikel
NPs	Nanopartikel (mehrere)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
pDNA	Plasmid DNA
PEI	Polyethylenimin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-Carboxylat
TEM	Transmissionselektronmikroskopie
TEOS	Tetraethylorthosilicat
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THPTA	Tris(3-Hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
VLP	<i>Virus like particle</i>

1. Einleitung

Die Nanotechnologie erstreckt sich in immer mehr Bereiche, wie die Lack- und Kunststoffindustrie, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie, sowie die Gebiete der Gesundheit und Medizin. Die Nanoteilchen, welche sich auf eine Größe von 1-100 nm erstrecken, sollen in den genannten Bereichen für eine Verbesserungen der jeweiligen Produktqualität sorgen. Hierfür sollen z.B. Farben UV-resistenter, Verpackungen stabiler, Gewürze aromatischer, Sonnenschutzmittel effektiver und Therapieverfahren zielgerichteter gemacht werden. Der letzte Punkt besagter Therapien ist ein Gebiet, welches immer mehr an Bedeutung gewinnt und sich in Bereiche wie die Alzheimer-, Krebs-, Wirkstoff- sowie Impfstoffforschung gliedert. Hierbei ist vor allem die zielgerichtete Adressierung von verschiedenen Zelltypen entscheidend und die Erforschung neuer therapeutischer Trägersysteme wichtig.^[1-4] Nanopartikel (NPs) eignen sich besonders gut für diese Forschung, da sie eine geringe Toxizität aufweisen.^[5-9] Eine weitere Besonderheit von NPs ist es, dass sie nicht nur mit verschiedenen Biomolekülen wie pDNA oder Peptiden beladen werden können und diese vor Degradation schützen, sondern dass ihre Oberfläche auch mit Farbstoffen, Proteinen oder anderen Wirkstoffen funktionalisiert werden kann. Durch ihre geringe Größe gelangen die nanopartikulären Systeme durch die Zellmembran und werden somit von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Demnach agieren die synthetisierten NPs als zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme in den Zellen. Durch die erwähnte Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche mit Farbstoff-Molekülen können diese anschließend leicht in der jeweiligen Zellart nachverfolgt und somit Aufnahmestudien ermöglicht werden. Da die Funktionalisierungsarten unterschiedlich sein können, aber auch die Form, die Größe und die Oberflächenladung der NPs variieren kann, ist auch die jeweilige Wirkung der NPs für die *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik steuerbar.^[10-14] Vor allem Krankheiten wie z.B. eine HIV-Infektion werden heute wissenschaftlich untersucht, um neuartige nanopartikelbasierte Impfungen^[15] zu entwickeln. Geschätzt werden laut dem RKI ca. 90.800 erkrankte Personen in Deutschland^[16] die an dem HI-Virus erkrankt sind, sodass es von großer Bedeutung ist, einen geeigneten Impfstoff zu finden.^[17-18] Diese multifunktionalen NPs kombinieren daher nicht nur diagnostische, sondern auch therapeutische Aspekte. Sie sollen unter anderem

Nebenwirkungen reduzieren und die Wirkung des transportierten Wirkstoffs (*targeted delivery*) zielgerichteter freisetzen.

In dieser Arbeit wird der Fokus vor allem auf Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NPs) gelegt, da der Hydroxylapatit, woraus die Partikel bestehen, nicht nur biokompatibel, bioaktiv, sondern insbesondere biologisch abbaubar ist, da er auch im humanen Hartgewebe wie den Zähnen und Knochen anzufinden ist.^[19] Speziell diese Art von NPs weckt ein sehr großes Interesse in der Biomedizin, da sie durch eine spezifische Funktionalisierung ihrer Oberfläche entsprechende Wechselwirkungen mit biologischen Strukturen hervorrufen kann. Durch die Aufnahme der CaP-NPs in Zellen kann unter anderem eine kontrollierbare Freisetzung der transportierten Biomoleküle gewährleistet werden. Hierfür werden die CaP-NPs mit einer Silica-Schale, die die Biomoleküle vor Degradation in der Zelle schützt und die Beladung somit erst am Zielort in der Zelle freigesetzt werden kann, stabilisiert.^[20] Die Silica-Schale bildet außerdem die Grundlage, die eine Funktionalisierung der NPs-Oberfläche mit Farbstoff-Molekülen mittels Klick-Chemie erlaubt.^[21] So können die CaP-NPs mit Liganden kovalent gebunden werden, indem Azidgruppen auf der Oberfläche durch (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPS) angebracht werden. Mittels kupferkatalysierter Klick-Chemie können anschließend Liganden mit endständigen Alkingruppen angebracht werden.^[22] Die vielfältige Anwendung der Klick-Chemie als Funktionalisierungsmethode soll anhand von verschiedenen Biomolekülen, Farbstoff-Molekülen und ultrakleinen Gold-NPs an CaP-NPs hervorgehoben werden. Die NPs werden zunächst mit Azidgruppen funktionalisiert und schaffen somit die Grundlage für eine erfolgreiche Reaktion mit Alkin-funktionalisierten Bio- bzw. Farbstoff-Molekülen. Durch diese kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) können die jeweiligen Liganden in einer orthogonalen Anordnung an die Oberfläche geklickt werden.^[23]

Anhand von vier Teilgebieten in dieser Arbeit sollen der Einsatz und die Funktionalisierung der CaP-NPs mittels Klick-Chemie dargestellt werden.

Das größte Teilgebiet umfasst die Forschung an einer innovativen Impfstoffplattform gegen das HI-Virus. Hierfür wurden verschieden funktionalisierte CaP-NPs synthetisiert. Die sogenannten *T-CaPs* werden mit Adjuvanten (Poly(I:C), R848 oder

CpG) und dem Peptid OT-II beladen und von einer Silica-Schale ummantelt. Durch die Funktionalisierung mit Thiolgruppen und einem Sulfo-SMCC-Linker werden Antikörper wie CD11c oder *Isotype-control* (Kontrollgruppe) angebracht. Ziel ist es hier, die T-Zellen zu aktivieren und die fluoreszenzmarkierten Antikörper in Zellaufnahmestudien nachverfolgen zu können. Ein weiterer Ansatz ist die Aktivierung von B-Zellen (*B-CaPs*). Hierfür werden die CaP-NPs mit dem Env-Hüll-Glycoprotein des HIV mittels Klick-Chemie (*o*-CaPs) oder eines Sulfo-SMCC-Linkers (*r*-CaPs) funktionalisiert. Anhand der *Viro-CaPs* soll eine stärkere Aktivierung der Immunantwort hervorgerufen werden, indem VLPs des HPV von einer PEI- und Silica-Hülle ummantelt werden, um anschließend ebenfalls eine Funktionalisierung mit dem Env-Hüll-Glycoprotein zu gewährleisten. Diese Analysen ermöglichen zielgerichtete und zukunftsweisende Möglichkeiten bei der Erforschung und dem Einsatz eines neuen Impfstoffes.

Ein weiteres Ziel in der vorliegenden Arbeit ist es zu zeigen, dass nicht nur eine Ligandenart auf die Oberfläche der CaP-NPs angeklickt werden kann, sondern ebenso zwei verschiedene Liganden, wie BSA- und Farbstoff-Moleküle.^[24-27] So können nicht nur Proteine alleine, sondern auch Farbstoffe gleichzeitig in das Zellinnere aufgenommen werden. Um zu testen, ob vermehrt fluoreszenzmarkierte BSA-Moleküle (Modellproteine) oder Farbstoff-Moleküle an die Oberfläche angebracht werden können, wurden diese zum gleichen Zeitpunkt zur Reaktion gegeben. Dabei wurde die Farbstoff-Konzentration systematisch erhöht, während die BSA-Konzentration konstant gehalten wurde. Dies ermöglicht neue präzise Nachverfolgungen in biologischen Anwendungen und die zielgerichtete Freisetzung von Proteinen.

Durch die Oberflächenmodifizierung mittels Hämoglobin-Molekülen soll verdeutlicht werden, dass nicht nur wie bisher Modellproteine wie BSA gekoppelt werden können. Dies ermöglicht interessante Studien bei der Partikelfunktionalisierung und anschließenden Freisetzung in den Zellen. Hierbei wurden zunächst die CaP-NPs mit zwei verschieden geladenen Polymeren stabilisiert (PEI; positive Ladung und CMC; negative Ladung). Außerdem wurden die funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche variiert, zum einen mit Thiolgruppen und einem Sulfo-SMCC-Linker und zum anderen mit Azidgruppen und der Klick-Chemie. Hieraus konnte erkannt

werden, welche Ladung der CaP-NPs und welche funktionellen Gruppen eine höhere Anbindung von Hämoglobin-Molekülen auf der Oberfläche begünstigen.

Als weitere Funktionalisierungseinheit werden ultrakleine Gold-NPs an der Oberfläche der CaP-NPs angebracht. Denn auch diese NPs, die nicht größer als 2 nm sind, können die Zellmembran penetrieren.^[28-31] Demnach sind sie durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, als potenzielle Wirkstoffträger in der Biomedizin einsetzbar, da sie sich in biologischer Umgebung inert verhalten.^[32-33] Das eröffnet neue interessante Synthesewege, verschiedene Partikelsysteme (CaP und Gold) für biologische Zwecke in Kombination einzusetzen und nicht wie bisher als einzelne Komponenten.

Alle vier Partikelsysteme sollten nach der erfolgreich durchgeführten Synthese zunächst durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen auf ihre Form und Größe nach jedem Syntheseschritt hin untersucht werden. Anschließend DLS-Untersuchungen sollten Auskunft über die hydrodynamischen Radien der funktionalisierten NPs geben. Das erfolgreiche Anklicken der jeweiligen Liganden sollte nicht nur anhand von spektroskopischen Verfahren wie der UV-Vis-Spektroskopie charakterisiert werden, sondern auch in Zellaufnahmen bestätigt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Kolloide und Nanopartikel (NPs)

Unter dem Begriff der Kolloide wird ein zweiphasiges System verstanden. Darunter können Strukturen verstanden werden, die in einem Medium feinverteilt vorliegen.^[34] Für den Begriff der Kolloide etablierte Staudinger drei Untergruppen, die Molekül-, die Assoziations- und die Dispersionskolloide (Abb. 1).^[35] Unter der Kategorie der Molekülkolloide werden nicht nur chemische Systeme wie Polymere z.B. Polyethylenimin (PEI) oder Polyvinylpyrrolidon (PVP) gezählt, deren Größe vom Polymerisationsgrad abhängt, sondern auch biologische Makromoleküle wie DNA oder Proteine.^[35] Die zweite Kategorie setzt sich aus den Assoziationskolloiden zusammen. Hierbei handelt es sich um Fettsäuren, Tenside und selbst zusammengesetzte Mizellstrukturen, die in wässrigen Medien bei einer kritischen Mizellkonzentration Tensidmolekülen bilden.^[36] Diese Gebilde, besitzen einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Oberfläche. Beide oben genannten Kolloidarten sind im Gegensatz zu der dritten Kategorie, den Dispersionskolloiden thermodynamisch stabil. Die thermodynamische Instabilität der Dispersionskolloide entsteht bei der Minimierung der Oberflächenenergie, was wiederum zur Agglomeration und zur Aggregation führen kann. Aus diesem Grund müssen die Dispersionskolloide von außen stabilisiert werden (siehe Kapitel 2.2.3). Zu den Dispersionskolloiden werden NPs gezählt.

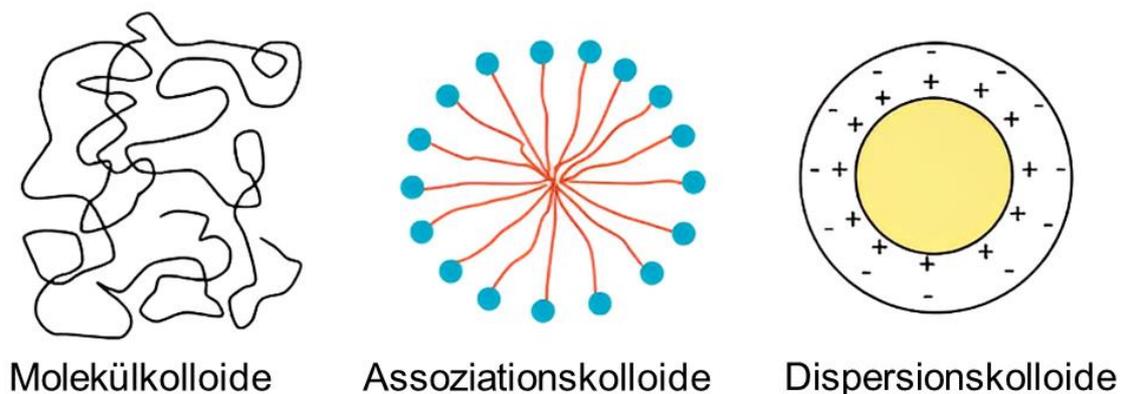


Abb. 1: Die Kolloidarten nach Staudinger.^[37]

Als NP werden nach IUPAC Systeme bezeichnet die in mindestens einer Dimension eine Größe zwischen 1-100 nm aufweisen und feinverteilt in einem Medium dispergiert sind.^[38-41] Im Gegensatz zu Materialien in größeren Bereichen, wie z.B. in Bulk-Systemen, haben die sehr kleinen NPs ein großes Oberfläche-Volumen-Verhältnis. Dies hat den Vorteil, dass sie nicht nur erhöhte katalytische Eigenschaften, sondern auch eine verbesserte optische und elektrische Leitfähigkeit aufweisen, wie Katz *et al.* postulierten.^[42] Hierfür können durch geeignete Syntheserouten die Härte, die Schmelztemperatur sowie die Löslichkeit gesteuert werden.^[43] Vor allem hat sich in den letzten Jahren der Einsatz in der Biomedizin etabliert,^[44-47] denn diese Art von Nanopartikelsystemen kann unter anderem als Trägersysteme für Wirkstoffe eingesetzt werden.^[48] Dabei spielt die Größe der jeweiligen NPs eine entscheidende Rolle, denn kleinere Partikel können durch die Zellmembran diffundieren, wobei größere Partikel mit Hilfe der Endozytose (Kapitel 2.2.5) die Zellmembran passieren können.^[49] Die in dieser Arbeit synthetisierten und charakterisierten CaP-NPs werden ebenfalls über die Endozytose aufgenommen, wie Sokolova *et al.*^[50] bereits zeigen konnten, da sie eine Größenordnung von ca. 100 nm aufweisen.

2.2 Calciumphosphat Nanopartikel (CaP-NPs)

Der Vorteil an Calciumphosphaten ist, dass sie als anorganischer Bestandteil in Knochen und Zähnen vorkommen und demnach biokompatibel und nicht toxisch sind. Außerdem sind sie für die Stabilität und die Härte des Knochens verantwortlich.^[51-52] Der hier vorkommende kristalline Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) setzt sich aus dem stöchiometrischen Verhältnis von 1,67 Ca/P zusammen, er ist gering wasserlöslich und erst bei sauren pH-Werten löslich. Durch die Synthese in Form einer Fällungsreaktion kann das genannte Verhältnis manuell eingestellt werden, wobei die Phosphatanionen eine ionische Bindung mit den Calciumkationen eingehen und die Partikel als Salz gefällt werden. Hierbei spielt das Ca/P-Verhältnis und der pH-Wert eine entscheidende Rolle, denn je niedriger das molare Ca/P-Verhältnis ist, desto wasserlöslicher sind die entstehenden NPs.^[53]

2.2.1 Knochen und Zähne

Das Innere der Knochen setzt sich aus mineralisierten Fibrillen zusammen, das bedeutet, dass zwischen den organischen Kollagenfasern (85-90%, ca. 80-100 nm lang) kristalline, an der c-Achse elongierte Hydroxylapatit-Scheiben gestapelt sind. Dieser Verbund aus organischer Matrix und anorganischen Kristallen wird als Biomineral bezeichnet.^[54] Um den porösen, schwammartigen Innenraum des Knochens vor Beschädigungen zu schützen, umgibt den Knochen eine dichtere, kompakte Schicht. Der Innenraum ist vor allem für die Zugänglichkeit von Zellen von großer Bedeutung.^[55] Durch die Produktion von Kollagen und CaP durch die Osteoblasten, wird der Knochen neu gebildet. Die Osteoklasten bauen den Knochen durch das Herabsetzen des pH-Werts wieder ab, sodass ein permanentes Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau entsteht.^[53]

Der Aufbau der Zähne ist hierbei komplexer, da der Hydroxylapatit vom Zahnschmelz bis hin zum Zahnbein in verschiedenen prozentuellen Anteilen vertreten ist. Die äußere Schicht, das Enamel, besteht bis zu 98% aus Hydroxylapatit und kann nach dem Abbau in einem säurehaltigen Milieu nicht wieder neu gebildet werden.^[56] Darunter befindet sich das Zahnbein (Dentin), welches nur aus ca. 70% Hydroxylapatit besteht. Diese Schicht ähnelt dem Knocheninneren aus Kollagenfasern und kristallinen Hydroxylapatit-Stapeln und wird vom Enamel schützend umgeben.^[57] Die Blutgefäße und Nerven sind in der Pulpa zu finden.

Aus den oben genannten Gründen können CaP-NPs in zahlreichen biomedizinischen Anwendungen eingesetzt werden.^[58] Wie Su *et al.*^[59] in ihrer Arbeit erforschten, können metallische Implantate und Prothesen mit einer Lage aus CaP-NPs beschichtet werden, um vom Körper nicht abgestoßen zu werden. Ionescu *et al.*^[60] konnten außerdem zeigen, dass eine Paste aus CaP-NPs und Knochenzement in Defekte eingesetzt werden kann, um zum einen die Heilung des Knochens zu beschleunigen und zum anderen die Geweberegeneration zu unterstützen.

2.2.2 Synthese von CaP-NPs

Im Allgemeinen haben sich bei der Synthese von NPs zwei grundlegende Methoden bewährt. Bei der ersten Top-Down-Methode wird von großen Substanzen wie Bulk-Materialien ausgegangen, um durch mechanisches Mahlen oder Laserablation kleinere Strukturen wie Puder zu erhalten (siehe Abb. 2). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die NPs vor allem schnell, einfach und in größeren Mengen hergestellt werden können. Einer der Nachteile ist jedoch, dass keine Kontrolle über die Morphologie und keine einheitliche Partikelgrößenverteilung gegeben ist.^[61-62] Für die Synthese von CaP-NPs wird überwiegend die nasschemische Synthese, die sogenannten Bottom-Up-Methode eingesetzt, um Parameter wie Größe und Morphologie zu steuern. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Synthese schnell und unter milden Bedingungen verläuft, das bedeutet es sind keine hohen Temperaturen oder lange Reaktionszeiten nötig.

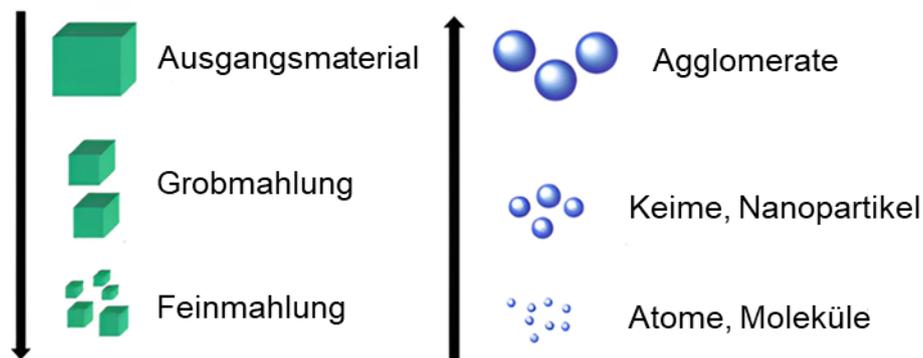


Abb. 2: Die *Top-Down* Methode und die *Bottom-Up* Methode zur Nanopartikelherstellung.^[62]

Da CaP-NPs zur Agglomeration neigen, können durch die Zugabe von Stabilisatoren die Nukleations- und Wachstumsprozesse gesteuert werden (siehe Abb. 3).^[63-66] Das bedeutet, dass NPs in einer Fällungsreaktion aus atomaren und molekularen Einheiten zu Keimen und anschließend zu NPs reifen. Zur Stabilisierung wurden Polymersysteme wie Polyethylenimin (PEI) oder Carboxymethylcellulose (CMC) eingeführt und abschließend eine Silica-Schale um die Partikel gebildet. Danach können Biomoleküle, Farbstoffe oder ultrakleine Gold-NPs an die Silica-Oberfläche angebracht werden. Dabei reagieren die geladenen Biomoleküle mit den

Oberflächenionen der NPs. Negativ geladene Gruppen der Biomoleküle interagieren mit den positiv geladenen Calciumionen, positiv geladene mit den Phosphationen.^[67-70] Diese Syntheseschritte wurden ebenfalls für die vorliegende Arbeit genutzt und die Oberfläche der CaP-NPs mittels Klick-Chemie (Kapitel 2.3) funktionalisiert. Diese nasschemische Synthese wird durch das LaMer-Modell beschrieben, wo in drei wesentlichen Schritten die Bildung der NPs durch eine Salzfällung erläutert wird, wie in Abb. 3 dargestellt.^[71-72]

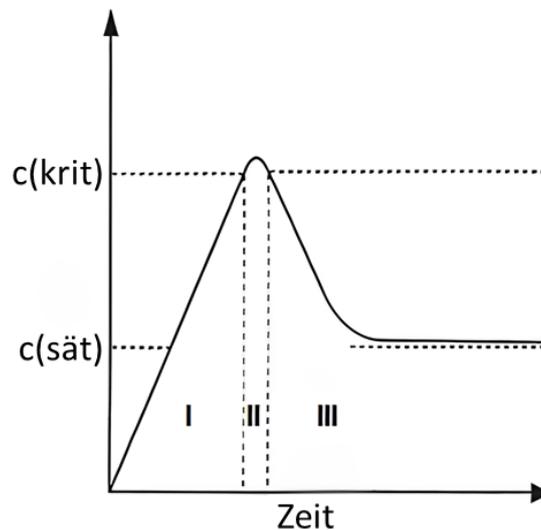


Abb. 3: Das LaMer-Modell.^[72]

Die Kristallisations- und Fällungsreaktion beginnt, wenn eine P- zu einer Ca-Lösung hinzugegeben wird, dabei bilden sich Keime (Phase I) und die Konzentration steigt steil bis zu einer Sättigungskonzentration $c(\text{sät})$ an. Steigt die Konzentration weiter an, kommt es zur Übersättigung und die kritische Übersättigungskonzentration $c(\text{krit})$ wird erreicht. In Phase II wachsen die gebildeten Keime zu Partikeln heran. Bei diesem Nukleationsschritt werden immer mehr Keime verbraucht, sodass die Konzentration wieder unter $c(\text{krit})$ sinkt. Ab diesem Punkt (Phase III) findet keine Keimbildung, sondern Wachstum der Nukleationskeime statt. Der Wachstumsprozess endet, indem die Konzentration unter $c(\text{sät})$ sinkt. Die Triebkraft dieses Prozesses ist dabei die freie Oberflächenenergie möglichst gering zu halten, um das Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu minimieren, was wiederum in Bildung sphärischer Partikel resultiert.^[62]

2.2.3 Stabilität von CaP-NPs

Wie in Kapitel 2.2.2 bereits beschrieben, wird das Wachstum von CaP-NPs durch das LaMer-Modell beschrieben. Wegen ihrer großen spezifischen Oberfläche und hohen Oberflächenenergie versucht das System diese beiden Faktoren zu minimieren und bildet daher größere NPs. Dabei werden kleinere Partikel gelöst und wachsen zu größeren Partikeln zusammen, dies wird als Ostwald-Reifung bezeichnet und wird in Abb. 4 schematisch dargestellt.^[74] Dieser Prozess kann mit der Löslichkeit erklärt werden, denn kleinere Partikel weisen eine höhere Löslichkeit im Gegensatz zu größeren auf, sodass ein Konzentrationsgradient entsteht. Dabei ist die Diffusionsgeschwindigkeit und die Polydispersität für die Geschwindigkeit des Wachstumsprozesses verantwortlich. Der sogenannte Polydispersionsindex (PDI) ist hierbei ein Maß für die Güte der Partikelgrößenverteilung.^[75] Je geringer die Polydispersität ist, desto langsamer läuft auch die Reifung der Partikel ab. Das bedeutet bei einem perfekt monodispersen System findet kaum Reifung statt. Die Reifung und somit das Wachstum wird durch die Temperatur begünstigt, da sich hierbei die Diffusionsgeschwindigkeit erhöht.^[76] Aus diesem Grund muss das Wachstum der NPs durch geeignete Stabilisierungsmethoden gehindert werden (siehe Kapitel 2.2.4).

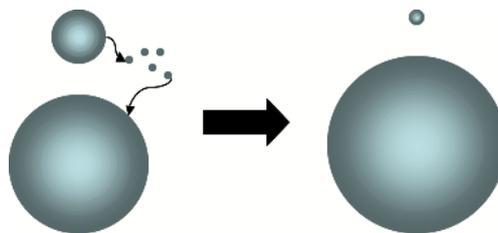


Abb. 4: Die Ostwald-Reifung.^[76]

Die Stabilität der Nanopartikelsysteme kann anhand der DLVO-Theorie verdeutlicht werden,^[77] in der die Wechselwirkungsenergie von dem Abstand der Partikel untereinander abhängt. Hierfür tragen zwei Interaktionen zur Gesamtheit der Wechselwirkungsenergie (U) bei, wie in Abb. 5 dargestellt. Zum einen die repulsiven Wechselwirkungen (V_R , rot), wie der Born- (V_B) und der Doppelschicht-Abstoßung und zum anderen die attraktiven Wechselwirkungen (V_A , grün), die sich aus Van-der-

Waals-Anziehung, elektrostatischen Anziehungskräften und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zusammensetzen.^[77] Sind zwei NPs weit voneinander entfernt (r), ziehen sie sich durch leichte Van-der-Waals-Wechselwirkungen an. Nähern sie sich jedoch stärker an, agglomerieren diese reversibel und es überwiegt die Van-der-Waals-Anziehung (sekundäres Minimum). Die Partikel können jedoch mit Hilfe eines Ultraschallbades wieder getrennt werden.^[78] Nähern sich die Partikel noch weiter, muss eine gewisse Energiebarriere (V_{\max}) überwunden werden. Je stabiler eine Nanopartikeldispersion ist, desto höher ist diese Energiebarriere. Ein unstabiles System überwindet schneller die Barriere, die Partikel bilden untereinander stärkere Bindungen aus und es kommt zur irreversiblen Aggregation (primäres Minimum).^[79]

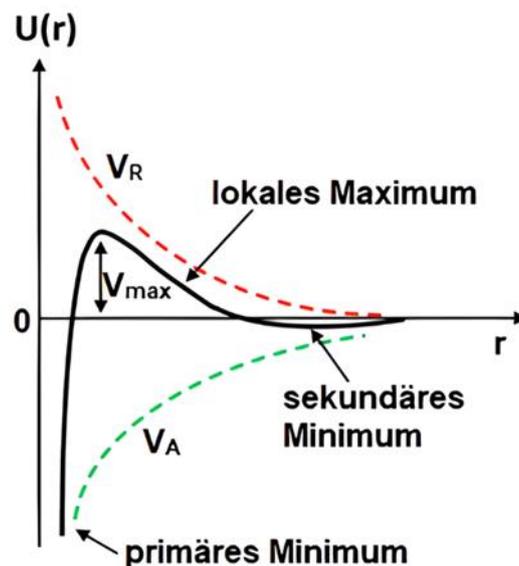


Abb. 5: Potential-Abstand-Diagramm nach der DLVO-Theorie.^[78]

Die Stärke der oben aufgeführten Wechselwirkungen zwischen gleichen (Gleichung 1) und verschiedenen (Gleichung 2) Partikeln kann anhand der Hamaker-Konstante A beschrieben werden, die Werte zwischen 10^{-20} und 10^{-19} J annehmen kann.^[80]

$$A_{ii} = \pi^2 \cdot C^{ii} \cdot \rho_i^2 \quad (1)$$

$$A_{12} = \pi^2 \cdot C^{12} \cdot \rho_1 \rho_2 \quad (2)$$

ρ_i = Atomanzahl pro Volumeneinheit und C = Parameter der Wechselwirkungen der Partikel.

Fällt der Wert für die Hamaker-Konstante, so nehmen die repulsiven Wechselwirkungen zu und die attraktiven Wechselwirkungen nehmen ab, sodass das System stabil ist.^[80]

2.2.4 Stabilisierung von CaP-NPs

Die Stabilisierung von NPs kann unterschiedlich erfolgen, entweder durch eine elektrostatische, eine sterische oder eine Kombination aus beiden (siehe Abb. 6).^[81]

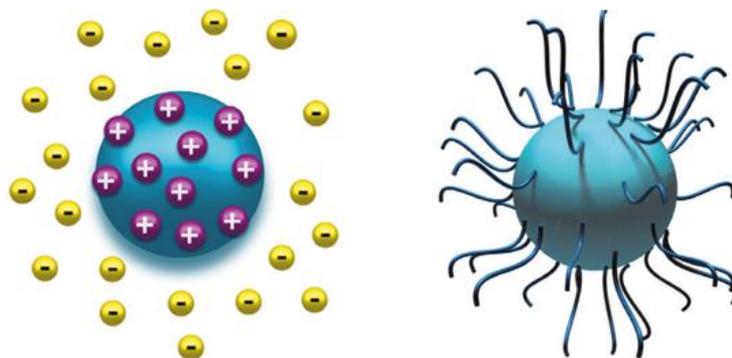


Abb. 6: Stabilisierungsarten, elektrostatisch (links) und sterisch (rechts).^[81]

Unter einer elektrostatischen Stabilisierung wird, wie in Abb. 7 ersichtlich eine Stabilisierung durch einen Elektrolyten verstanden, bei der sich gleich geladene Teilchen abstoßen. Die NPs befinden sich dabei in einer Elektrolytdispersion, in welcher sich um die Partikel eine elektrische Doppelschicht aus Ionen ausbildet. Die erste Schicht besteht aus einer starren inneren Helmholtz-Schicht, wo sich eine weitere Ionenschicht aus entgegen geladenen Ionen anlagert, sodass eine gewisse Ladung auf der Partikeloberfläche entsteht (äußere Helmholtz-Schicht). Beide Helmholtz-Schichten bilden zusammen die Stern-Schicht aus. In dieser Schicht fällt

das Potential linear ab. Anschließend lagern sich weitere Ionen an, die jedoch wegen des gewissen Abstandes zur Partikeloberfläche diffus in der Dispersion vorliegen und die Scher-Schicht bilden. Hier nimmt das Potential exponentiell ab, denn die Ionen können nur bis zur Scherebene genügend stark an die beweglichen Partikel gebunden werden. An der Schnittstelle kann das Zeta-Potential gemessen werden.^[82-83] Die diffuse Schicht ist also ausschlaggebend für die Stabilität kolloidaler Systeme. Je höher das Zeta-Potential (positiv oder negativ) ist, desto stärker wirken die repulsiven Wechselwirkungen und die Stabilität der NPs nimmt zu.

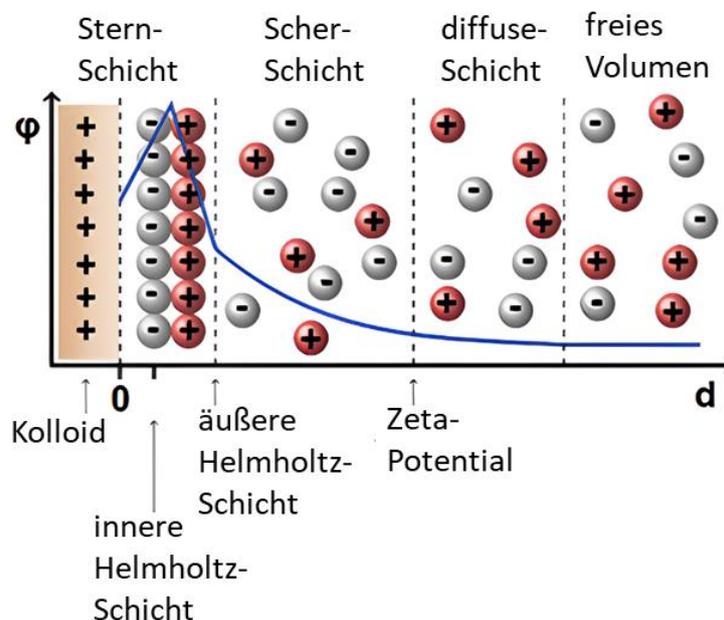


Abb. 7: Schematischer Aufbau der elektrochemischen Schichten mit Potentialverlauf im BMD-Modell.^[83]

Bei der sterischen Stabilisierung werden Liganden wie Polymere (PEI, DNA) direkt bei der Bildung der CaP-NPs eingesetzt, um die Mobilität (Brown'sche Molekularbewegung) der NPs in der Dispersion durch die Größe und Länge der Liganden zu verlangsamen und die Interaktionen zwischen den Partikeln zu hemmen. Außerdem können sich die langen Polymerketten auf der Partikeloberfläche überlagern und es kommt zur Volumenverringern und demnach zur Verringerung der Entropie.

Die Kombination aus beiden entsteht durch Polymere mit einer Oberflächenladung und wird daher als elektrosterische Stabilisation bezeichnet.^[84]

2.2.5 CaP-NPs als Trägersysteme in biologischen Anwendungen

Der Einsatz von CaP-NPs hat sich in der Biomedizin als neuartige und gezielte Wirkstoffträger immer mehr bewährt.^[85] So können die Nebenwirkungen und die Konzentration der Verabreichung verringert sowie die ungerichtete Freisetzung von Wirkstoffen reduziert werden.^[86-87] Dabei ist vor allem die Größe der NPs und ihre Oberflächenfunktionalisierung mit Biomolekülen ausschlaggebend.^[88-91] Durch die geringe Größe der NPs kann die Effizienz der Zellaufnahme (transmembraner Transport) erhöht,^[92-93] der intrazelluläre Transport und eine spezifische Wirkstofffreisetzung angesteuert werden. So akkumulieren die Partikel in unterschiedlichen Organen des Körpers und können abschließend durch die Exozytose wieder ausgeschieden werden.^[94-96] Das hat z.B. zur Folge, dass je nach Beladung der Nanopartikeloberfläche mit Biomolekülen, die Molekülkorona und somit auch die Biodistribution im Organismus beeinflusst werden kann.^[97-98] Mittels PET/CT-Untersuchungen konnten Kollenda *et al.*^[99] die Biodistribution von CaP-NPs nachweisen. Nach der Injektion im Mäuseschwanz verteilten sich die Partikel erst in der Lunge und dann weiter in der Leber und Milz. Die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen mehrschaligen NPs aus einer Polymer- und Silicaschale können die innere Ladung der NPs vor der enzymatischen Degradation schützen. Dabei kann durch die gezielte Schalenladung eine verbesserte Zellaufnahme gewährleistet werden, denn positiv geladene NPs (durch PEI) erreichen einfacher eine Adhäsion an der Zelloberfläche und erleichtern somit die Endozytose.^[100-103] Molekular gelöste Teilchen können passiv durch die Zellmembran diffundieren.^[104-105] Der Begriff der Endozytose spaltet sich in mehrere energieabhängige Mechanismen auf (Abb. 8) und übernimmt mehrere Funktionen in den Zellen. Sie nimmt extrazelluläre Nährstoffe auf, reguliert die Zellpolarität und präsentiert Antigene, um Krankheitserreger, wie z.B. Toxine oder Virustypen von außen abzuwehren.^[106]

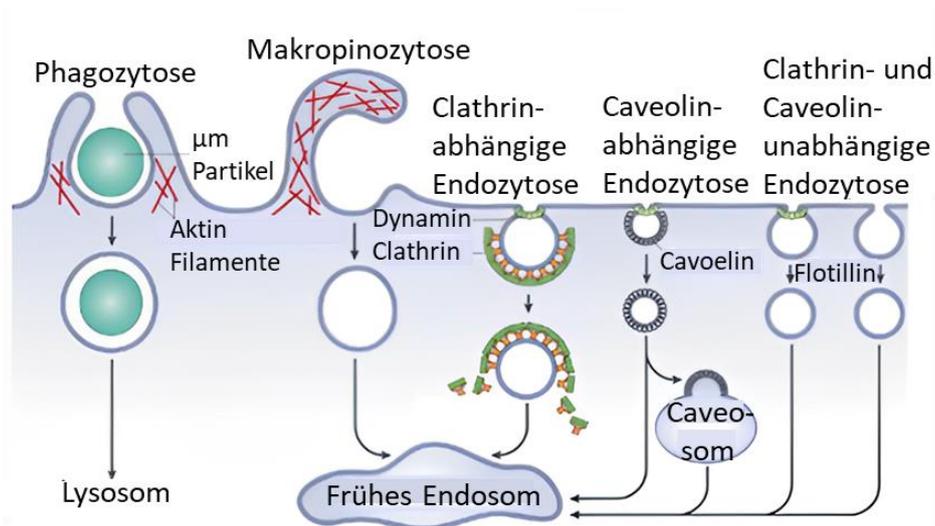


Abb. 8: Schematische Darstellung verschiedener Endozytosewege.^[107]

Die Phagozytose und die Makropinozytose nehmen Partikel bei einer Größenordnung von ca. 500 nm auf und zählen zu der makroskopischen Endozytose, wie in Abb. 8 ersichtlich.^[107] Dabei stülpt sich die Zellmembran um die NPs und bildet eine neue Lipidmembran, damit die NPs bis zum Lysosom transportiert werden können.^[108-111] Die neu gebildete Membran schützt die NPs vor Degradation und es kommt zu weniger Nebenwirkungen in anderen Regionen der Zelle. Jedoch können die NPs vom Immunsystem als Fremdkörper angesehen werden und so aus der Zelle ohne Wirkstofffreisetzung ausgeschleust werden.^[112-114] Die Zellaufnahme der in dieser Arbeit synthetisierten CaP-NPs erfolgt durch die Makropinozytose. Dabei bilden Rezeptorproteine einen Hohlkörper aus der Zellmembran, um die NPs in einer extrazellulären Flüssigkeit in die Zelle aufzunehmen.^[115] Nach der Aufnahme ist das endosomale Entkommen entscheidend, um die transportierten Wirkstoffe auf der Nanopartikeloberfläche ins Zytosol freisetzen zu können. Denn nach der Reifung der Endosomen fusionieren diese mit den Lysosomen, die die NPs und deren Wirkstoffe degradieren. Das endosomale Entkommen kann unter anderem durch den Protonenschwammeffekt beschrieben werden. Hierbei steigt der pH-Wert in den Endosomen zunächst durch stark puffernde Substanzen wie z.B. PEI an. Anschließend wird durch Protonenpumpen Salzsäure (HCl) in das Endosom hineingepumpt, um den ursprünglichen pH-Wert zu erreichen. Abschließend wird der Inhalt der Endosomen in das Zytosol freigesetzt, wenn sich der osmotische Druck in

den Endosomen erhöht und diese platzen.^[116-124] Kleinere Moleküle werden über die Mikropinozytose aufgenommen, die sich in die Clathrin-abhängige, Caveolea-abhängige und die Clathrin-unabhängige Pinozytose gliedert.^[125-126]

2.3 Die Klick-Reaktion

Durch die in dieser Arbeit eingesetzte Klick-Reaktion konnten nicht nur Biomoleküle (BSA, Hämoglobin), sondern auch Farbstoff-Moleküle sowie ultrakleine Gold-NPs and die CaP-Nanopartikeloberfläche angebracht werden. Hierfür wird ein Kupferkatalysator (Cu(I)) eingesetzt, um eine regioselektive Azid-Alkin-Reaktion der Heteroatomverbindungen zu gewährleisten.

Hierbei wird unter milden Bedingungen bei RT, mit Wasser als Lösemittel gearbeitet und eventuell entstandene Nebenprodukte durch Zentrifugation abgetrennt.^[127] Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die stereospezifische Reaktion der organischen Azide mit terminalen Alkinen, sodass sich nur ein 1,4-Isomer bildet. In Abb. 9 ist die kupferkatalysierte Klick-Reaktion dargestellt, welche von Fokin *et al.* etabliert wurde.^[128]

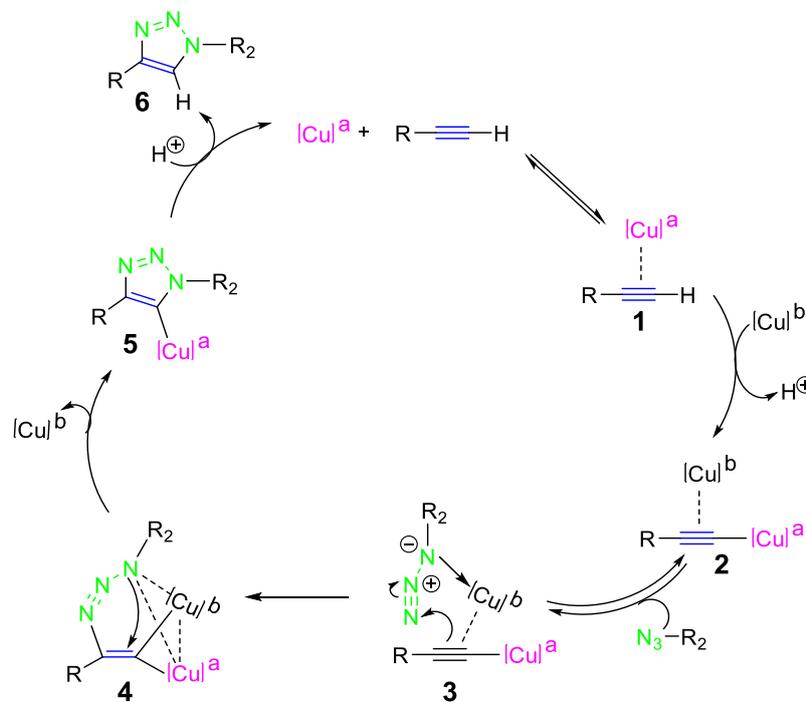


Abb. 9: Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Reaktion.^[129]

Zunächst entsteht eine σ -Bindung zwischen dem Kupferion (**lila**) und der Alkingruppe (**1, blau**). Das Acetylid bildet durch ein weiteres Kupferion (**schwarz**) eine π -Bindung aus (**2**), welche anschließend die Azidgruppe (**grün**) koordiniert und den Komplex aktiviert, siehe (**3**) in Abb. **9**. Durch den nucleophilen Angriff des β -Kohlenstoffs des Alkins zum Stickstoff der Azidgruppe entsteht ein Intermediat (**4**). Abschließend spaltet sich ein Kupferion wieder ab und es entsteht die Spezies (**5**). Der Zyklus endet mit einem Hydrierungsschritt (**6**) wodurch das gewünschte Triazolid gebildet wird.^[129]

2.3.1 Oberflächenfunktionalisierung mit Biomolekülen und Gold-NPs

Biomoleküle kommen auch in lebenden Organismen vor und sind daher nicht körperfremd, daher eignen sie sich ideal als Wirkstoffe, die auf der Oberfläche der CaP-NPs gebunden sind, um mit ihnen in die Zelle aufgenommen zu werden. Die in dieser Arbeit angebrachten Moleküle wurden mit Hilfe der Klick-Chemie (Kapitel **2.3**) an die Oberfläche der NPs gebunden. Dabei handelte es sich zum einen um das *Bovine Serum Albumin* (BSA) und zum anderen um das Hämoglobin.

BSA wird als Standardprotein in vielen medizinischen Anwendungen eingesetzt, da es leicht zu handhaben, stabil und biokompatibel ist. Außerdem besteht die Möglichkeit einer Fluoreszenzmarkierung, um eine Nachverfolgung bei der Zellaufnahme zu gewährleisten. Fluoreszenzmarkierte BSA-Moleküle können unter anderem in Krebszellen zur Nachverfolgung eingesetzt werden, wie Choi *et al.* publizierten.^[130]

Das ebenfalls geklickte humane Hämoglobin ist ein Tetramer aus 4 Untereinheiten (Globinen). Dabei wird zwischen 2 α - und 2 β -Globinen unterschieden in dessen Mitte das Häm (Eisen-(II)-Komplex) gebunden ist. Das Hämoglobin dient in unserem Blutkreislauf als Sauerstofflieferant. Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit von Tsuchida *et al.*^[131] an Hämoglobin-Vesikeln geforscht, die als Sauerstoffträger dienen könnten.

In dieser Arbeit wurden außerdem ultrakleine Gold-NPs in einem Größenbereich von ca. 2 nm synthetisiert und ebenfalls mit Hilfe der Klick-Reaktion an die CaP-NPs angebracht. Wie in Kapitel **2.2.5** bereits erwähnt, können Partikel in diesem Größenbereich leicht von den Zellen aufgenommen werden. Die Synthese der Gold-NPs erfolgte nach der sogenannten Brust-Schiffrin-Methode, die im Laufe der Zeit von

einem zweiphasigen System und einen Phasentransferkatalysator^[132-133] zu einer Eintopfsynthese vereinfacht wurde.^[134] Bei dieser Synthese wurde Natriumborhydrid (NaBH_4) als starkes Reduktionsmittel eingesetzt, das den Goldvorläufer (Tetrachlorogoldsäure) in Gegenwart von Liganden wie Tripeptiden (Glutathion) reduzierte. Hierbei fungiert das Glutathion als Lewis-Base und bindet an die Oberflächenatome (Lewis-Säure) der Gold-NPs.^[135] Es ist bekannt, dass die Thiolgruppen des Glutathions mit der Partikeloberfläche kovalent binden und eine starke Bindungsstärke aufweisen, da sie eine hohe Affinität zu Gold aufweisen (Aurophilie).^[136-137] In der Literatur wird ebenfalls, wie bei den größeren CaP-NPs der Einsatz in der Biomedizin als Wirkstoffträger publiziert,^[138] sodass sich beide Nanopartikelsysteme zusammen bestens für den Einsatz in biologischen Anwendungen eignen.

2.4 Das Immunsystem und seine Zellinteraktionen

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Körper vor Viren, Bakterien und anderen Krankheitserregern zu schützen und deren Vermehrung zu unterbinden. Dabei muss es vor allem zwischen schädlichen und nützlichen Stoffen unterscheiden, um keine Autoimmunreaktionen im Körper auszulösen. Die Zellen des Immunsystems entstehen im Knochenmark und bestehen unter anderem aus reifen B-Zellen (natürliche Killerzellen des Körpers) und unreifen Thymozyten, die aus dem Knochenmark in den Thymus wandern, um weiter zu T-Zellen zu reifen.^[139-140] Von da aus werden sie über den Blutkreislauf zu den sekundären Lymphorganen, wie z.B. den Lymphknoten oder der Milz transportiert. Die Milz ist für den Körper ein sehr wichtiges Organ, welches das Blut filtert, Antikörper bildet und diese ins Blut freisetzt. Sie besteht aus zahlreichen Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Plasmazellen, Dendritischen Zellen (rote Milzpulpa) und CD4^+ T-Helferzellen (weiße Milzpulpa), die vor allem Antigene im Blut abfangen.^[141] Das Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem wird unter anderem von Makrophagen repräsentiert, die bei Infektionen ausgesendet werden und dabei Krankheitserreger mittels Phagozytose bekämpfen.^[142,140] Außerdem gibt es noch die sogenannten *toll-like*-Rezeptoren

(TRLs, transmembrane Proteine), die dem angeborenen Immunsystem helfen zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen zu unterscheiden.

Das adaptive Immunsystem wiederum verwendet Antigen-spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von T- und B-Zellen, um eine gezielte Immunantwort gegen erkannte Krankheitserreger zu erreichen. Dabei werden Antikörper (humorale Immunantwort) und T-Zellen (zelluläre Immunantwort) ausgesendet. Die Antigene werden von den Dendritischen Zellen (DZ) aufgenommen, zu den Lymphknoten transportiert und in einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) umgewandelt. Erst dann können sie den CD4+ und CD8+ T-Zellen präsentiert werden und diese aktivieren.^[140] Anschließend bleibt ein Teil der aktivierten T-Zellen in den Lymphknoten, der andere Teil (T-Helferzellen) verlässt die Lymphknoten und aktiviert antigenbindende B-Zellen um Antikörper aus Plasmazellen freizusetzen.^[143] Somit spielen Helfer-T-Zellen eine unterstützende Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort.

2.4.1 Das Humane Immunschwäche Virus (HIV)

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das humane Immunschwäche Virus (HIV) eine weltweit verbreitete Infektion, mit schätzungsweise 40 Mio. infizierten Menschen.^[144] Denn in einem Zeitraum von 10 Jahren erkranken bis zu 90% der unbehandelten Personen anschließend an dem Immundefektsyndrom (AIDS). Dabei werden nach der Ansteckung durch infektiöse Körperflüssigkeiten, die Viruspartikel im Körper verteilt. Der sphärische Aufbau des HI-Virus resultiert von den schützenden Oberflächenproteinen die das Virusgenom umgeben. Die Proteine haben nicht nur eine schützende Funktion, sondern docken an Wirtszellen an, um die Nukleinsäure in die Zelle einzuschleusen.^[145] Da Viren mit ihrer Größe zwischen 20-300 nm viel geringer als die 1-30 µm großen eukaryotischen Zellen sind, können diese in die Zelle eindringen.^[146] Dabei sind die Viruspartikel auf die Reproduktion in der Zelle angewiesen, da sie keinen eigenen Stoffwechsel besitzen. Die Zelle schreibt zunächst die Virus-RNA durch die reverse Transkriptase in DNA um. Ist der Anstieg der reproduzierten Viruspartikel innerhalb der Zelle zu hoch, platzt diese und setzt somit das Virus in den Körper frei.^[145]

Nach der Ansteckung mit dem HI-Virus durchläuft die infizierte Person drei Krankheitsphasen. Bei der ersten Erkrankungsphase reagiert das Antigen des HI-Virus (Schlüssel) mit dem Rezeptor des CD4-Antikörpers (Schloss) um in die Wirtszelle einzudringen. Hierbei versucht das Immunsystem neue gesunde CD4-Zellen (Lymphozyten mit CD4-Antikörpern) zu produzieren, um abgestorbene und infizierte Zellen zu zerstören.^[147] Das geschieht, indem die Rezeptoren die Fremdkörper erkennen und vermehrt Antikörper hervorrufen.^[148] Anhand dieses Gleichgewichts ist die infizierte Person zwar HIV-positiv, erkrankt jedoch nicht an AIDS. Der Nachteil ist hierbei, dass der Virus unwissentlich weitergegeben werden kann, da zunächst nur Symptome wie Müdigkeit oder Fieber auftreten. Wird das Gleichgewicht zu Gunsten der Virusreproduktion verschoben, tritt die zweite Erkrankungsphase (Latenzphase) mit Hauterkrankungen oder Durchfällen ein und kann einige Jahre anhalten.^[145] Das Immunsystem wird hierbei immer mehr geschwächt und es kann zur dritten Erkrankungsphase kommen. Die ersten Symptome wie z.B. Lungenbeschwerden weisen auf die AIDS-Erkrankung hin. Aus diesem Grund ist es von größter Bedeutung die Latenzphase (zweite Erkrankungsphase) durch geeignete Therapieverfahren möglichst lang zu halten um einer AIDS-Erkrankung vorzubeugen.^[144] Dabei wird die Neubildung der Viruspartikel bei einer regelmäßigen und lebenslangen Einnahme verringert, sodass ruhende Viren zurückbleiben.^[145] Bis heute wird nach neuartigen Impfstoffen geforscht, die entweder mit Adjuvanten oder Proteinen der jeweiligen Krankheitserreger beladen sind, um eine gezielte Immunantwort zu erhalten.^[149] Dabei wird entweder der abgeschwächte Virus, ein inaktiver Virus oder Virus-ähnliche Partikel (VLPs) eingesetzt.^[150-151]

3. Verwendete Analysemethoden

Nach der Synthese der funktionalisierten CaP-NPs wurden diese mittels kolloid-chemischen Methoden wie Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX), Dynamischer Lichtstreuung (DLS), Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), Atomabsorptionsspektroskopie (AAS), Infrarot-(IR), UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Für die ultrakleinen Gold-NPs wurden zusätzliche Charakterisierungsmethoden wie die Dynamische Scheibenzentrifugation (DCS) und die Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD) herangezogen. Mittels Fluoreszenz- und Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurden die mit fluoreszierenden Biomolekülen, Farbstoffen und Gold-NPs funktionalisierten CaP-NPs auf die Effizienz bei der Zellaufnahme hin untersucht.

3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Anhand der Rasterelektronenmikroskopie lässt sich im Gegensatz zu herkömmlichen Mikroskopen eine höhere Auflösung bis zu 1 nm gewährleisten, um die Topografie der jeweiligen Probe abzubilden.^[152] Außerdem lässt sich so auf die Größe der nanometergroßen Partikel schließen. Hierfür werden zunächst Elektronen aus einer Wolfram-Glühkathode generiert, emittiert, gebündelt und mit einer Spannung zwischen 5-30 kV im Vakuum beschleunigt.^[153-155] Durch Magnetspulen wird der Strahl gebündelt und mit elektromagnetischen Linsen auf die Probe fokussiert, um diese Stück für Stück abzurastern. Die Messung wird hierbei unter Hochvakuum bei 10^{-4} Pa durchgeführt, um die Streuung der Elektronen an Luftteilchen zu vermeiden. Dieser Primärelektronenstrahl interagiert mit den Elektronen in der Probe, sodass neben Rückstreuелеktronen (BSE) auch Sekundärelektronen (SE) entstehen und durch die Detektoren in ein elektrisches Signal umgewandelt werden, wie in Abb. **10** zu erkennen.^[156] Aus diesen detektierten Signalen setzt sich am Ende ein Bild der Probenoberfläche zusammen.

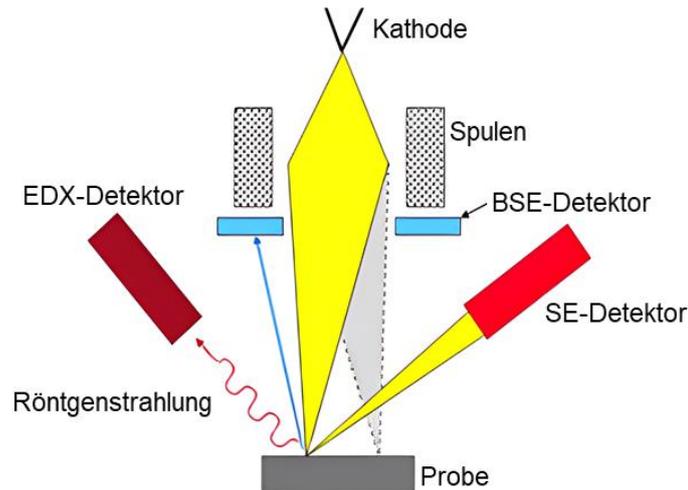


Abb. 10: Aufbau eines Elektronenmikroskops.^[156]

Die erwähnten BSE besitzen noch die gleiche Energie wie der primäre Elektronenstrahl, da sie durch einen elastischen Stoß auf der Probenoberfläche reflektiert werden, wohingegen die emittierten SE niederenergetisch sind, da sie durch die inelastische Streuung des Primärelektronenstrahls an den Probenatomen entstehen.^[157-158] Hierbei können Elektronen aus den äußeren Schichten der Probe herausgelöst und für die Topographieauswertung genutzt werden. Elemente mit einer niedrigen Kernladungszahl erzeugen weniger Streuung und erzeugen dunklere Flächen auf dem REM-Bild als schwerere Elemente. Ein weiterer Grund für den Hell-Dunkel-Kontrast ist die Oberflächenbeschaffenheit der Probe, denn Stellen, die vom Detektor abgewandt sind, erzeugen weniger Elektronen und erscheinen demnach dunkler (Abschattungseffekt).^[156] An Ecken und Kanten können mehr Elektronen aus der Probe rausgeschlagen und detektiert werden, dabei erscheinen sie auf dem erzeugten Bild heller (Kanteneffekt). Damit die Probe elektrisch leitend ist und aufgebrauchte Ladungen besser abgeführt werden können, wird diese vor der Mikroskopie mit Legierungen aus Gold-Palladium (80:20) bedampft (gesputtert).

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurden an einem *Apreo S LoVac der ThermoFisher Scientific Inc. Mikroskop* auf Siliziumträgern durchgeführt.

3.2. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Diese Analyse ist meistens mit der REM gekoppelt. Dabei wird die elementare Zusammensetzung durch die Emission von Röntgenstrahlen bestimmt (siehe Abb. 10). Hierfür wird durch die Anregung mit einem Elektronenstrahl ein Elektron aus der inneren Schale der Probenoberfläche rausgeschlagen. Die somit entstehende Lücke wird direkt durch das Nachrücken eines Elektrons aus einer höheren Schale aufgefüllt. Durch dieses Nachrücken werden charakteristische Röntgenphotonen frei, die detektiert werden und somit Rückschlüsse auf das jeweilige Element ziehen lassen. Dabei ist die erhaltene Intensität proportional zur relativen Menge der Atome in der Probe.^[157]

3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Hierbei wird die Größenverteilung, die Stabilität und die Dispersität von NPs in einer Dispersion mittels monochromatischen Lichts bestimmt. Dabei wird die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel erfasst, sodass verschiedene Fluktuationen durch die Streuintensitäten an den Partikeln entstehen. Die hier detektierte Intensität der Streuung ist von der konstruktiven und destruktiven Interferenz abhängig.^[158-159] Wie in Abb. 11 sichtbar sind die jeweiligen Fluktuationen von der Größe, der Geschwindigkeit und den Zusammenstößen der Partikel mit den Flüssigkeitsmolekülen abhängig. Das bedeutet, je viskoser das Medium, je größerer die Partikel und je niedriger die Temperatur ist, desto langsamer bewegen sich auch die Teilchen in dem Dispersionsmedium.^[160] Größere Partikel führen demnach zu kleineren Intensitätsschwankungen.

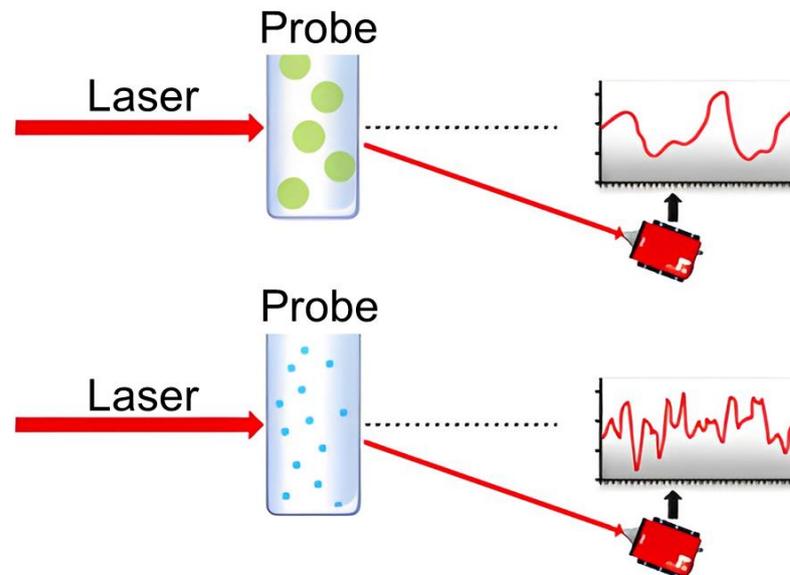


Abb. 11: Messprinzip einer DLS-Analyse.^[158]

Anhand der daraus resultierenden Daten kann der Diffusionskoeffizient durch die Korrelation aus Zeit und Streuintensität bestimmt werden und der hydrodynamische Radius mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (3) berechnet werden.^[160-161]

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (3)$$

D -Diffusionskoeffizient, k_B -Boltzmann-Konstante, T -Temperatur, η -Viskosität des Dispersionsmittels und r_H -hydrodynamischer Radius.

Außerdem lässt sich auch der Polydispersitätsindex (PDI) der Probe, also die Größenverteilung der Partikel in einem Dispersionsmedium bestimmen. Als streng monodispers wird ein System mit einem PDI-Wert von 0 verstanden. PDI-Werte unter 0,3 weisen auf ein monodisperses System hin, wohingegen PDI-Werte über 0,3 auf ein polydisperses System und somit auf größere Agglomerate in der Probe hinweisen. Da die Streulichtintensität proportional zur sechsten Potenz des Radius zunimmt, werden die Partikelgrößen bei dieser Messmethode überschätzt.^[161] Auch bei der Anzahlverteilung muss das jeweilige Volumen der Partikel beachtet werden, denn dieses nimmt proportional zur dritten Potenz des Radius zu.

Die Partikel tragen eine bestimmte Ladung auf ihrer Oberfläche, die entweder aus den gebundenen geladenen Molekülen oder durch die Wechselwirkung mit dem Dispersionsmedium resultiert. Je nach Ladung wandern die NPs nach der Anlegung einer gewissen Spannung zu der entgegengesetzten Elektrode der Messküvette. Abhängig von der Viskosität des Mediums, stellt sich nach einer bestimmten Zeit ein Gleichgewicht zwischen der elektrostatischen Anziehung und der Abstoßung ein. Dieses Gleichgewicht kann mit dem Laser-Doppler-Effekt bestimmt werden.^[162] Erst ab einem Wert von +/- 30 mV gelten Kolloidsysteme als elektrostatisch stabilisiert.^[163] Diese elektrophoretische Mobilität der Partikel kann mit der Henry-Gleichung (4) bestimmt werden.^[164] Hierbei kann für schwache Elektrolyte die Hückel- und für starke Elektrolyte die Smoluchowski-Näherung angewendet werden.^[165]

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(k_a)}{3 \cdot \eta} \quad (4)$$

U_E -Elektrophoretische Mobilität, ε -Dielektrizitätskonstante, ζ -Zeta-Potential, $f(k_a)$ -Henry-Funktion (in wässrigen Lösungen 1,5) und η -Viskosität des Dispersionsmittels.

Die Größen-, PDI- und Zeta-Potential-Messungen wurden mit dem *Malvern Nano ZS ZEN 3600* vermessen.

3.4 Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA)

Durch die Aufnahme eines Videos der Brown'schen Molekularbewegung des Kolloidsystems anhand einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera, kann die Partikelverteilung in der Dispersion und anhand der Stokes-Einstein-Gleichung (3) der hydrodynamische Durchmesser bestimmt werden. Dabei wird ein Laserstrahl durch die Kammer geleitet. Die Partikel in der Probenkammer sind in ständiger Bewegung und begegnen dabei mehrmals dem Laserstrahl. Die dabei entstehende Streuung kann anhand eines Mikroskops beobachtet werden.^[166]

Hierfür wurde für die jeweiligen Partikelsysteme das *Nanosight LM10HS (Malvern Instruments)* verwendet.

3.5 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Mit Hilfe der AAS lässt sich die elementare Zusammensetzung von flüssigen oder festen Proben quantitativ nachweisen, denn jedes Element hat eine konkrete Elektronenkonfiguration und absorbiert eine spezifische Strahlungswellenlänge. Wie in Abb. 12 sichtbar, wird als Lichtquelle eine Hohlkathodenlampe mit der elementspezifischen Kathode verwendet, die bei einer Glimmentladung das elementspezifische Emissionsspektrum generiert. Die Anode besteht hierbei aus einem Wolframdraht und befindet sich mit der Kathode in einer Edelgas-gefüllten Glasröhre. Durch ein Quarzfenster wird UV-Licht mit einer bestimmten Intensität und verschiedenen Wellenlängen gesendet.^[167] Die zu messende Probe wird zunächst in die Gasphase überführt, somit atomisiert und mit UV-Licht bestrahlt. Dabei befinden sich die Elektronen in der Gasphase zunächst in einem elektrischen Grundzustand und können durch Energieaufnahme andere elektrisch angeregte Zustände erreichen. Die angeregten Zustände sind jedoch instabil, sodass Energie freigesetzt wird und die Elektronen wieder in den Grundzustand gelangen.^[168] Die Voraussetzung hierbei ist, dass die elektromagnetische Strahlung mit der gewünschten Wellenlänge dem zu untersuchenden Element entspricht. Außerdem wird die Lichtintensität vor I_0 und nach dem Durchgang durch die Atomwolke I vom Monochromator gemessen, der aus einem Gitter mit Austrittsspalt aufgebaut ist. Das Verhältnis der beiden Intensitäten ist proportional zu der Konzentration des entsprechenden Elements. Die Intensität bei der Schwächung der Resonanzlinien kann mit dem Lambert-Beer'schen-Gesetz (5) dargestellt werden.^[169] Hier ist ersichtlich, dass eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion und der Konzentration des Elements in der Probe herrscht, denn steigt die Konzentration, steigt auch die Extinktion proportional an.^[170] Der Detektor wandelt zum Schluss die aufgenommene Strahlung in ein elektrisches Signal um, welches am Computer ausgewertet werden kann.

$$E = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = c \cdot d \cdot \varepsilon \quad (5)$$

E -Extinktion, I_0 -Intensität des eingestrahnten Lichts, I_1 -Intensität des transmittierten Lichts, c -Stoffmengenkonzentration der absorbierten Substanz in der Lösung, ε -Extinktionskoeffizient und d -Dicke der Küvette.

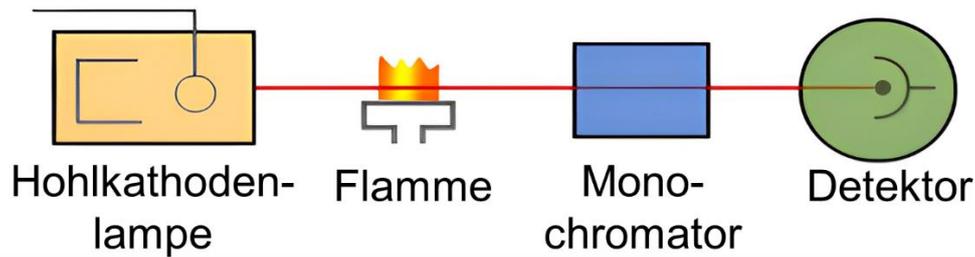


Abb. 12: Schematischer Aufbau der Messanordnung eines Flammen-Atomabsorptionsspektrometers.^[167]

Die Probenvermessung (Ca und Gold) wurde mit einem *Thermo Electron AAS M-Series Spektrometer* durchgeführt.

3.6 Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektroskopie bewegt sich in einem Wellenlängenbereich von 800 nm bis 1 mm^[171] und nutzt die Wechselwirkungen der elektromagnetischen Strahlung und der Probe aus. Dabei wird eine bestimmte Strahlung auf die Probe geleitet und die absorbierten Frequenzbereiche in Form von Transmissionen vom Detektor ausgewertet. Bei den resultierenden Rotationen und Molekül- sowie Gitterschwingungen kann sich das Dipolmoment der Moleküle verändern, was als IR-aktiv bezeichnet wird und zur Strukturaufklärung dient.^[172] Dabei werden beispielsweise -OH, -N₃ oder -CH₃-Gruppen als Absorptionsbanden bei einer bestimmten Wellenzahl wiedergegeben. Es kann zwischen zwei Arten von Schwingungen unterschieden werden, zum einen Valenz- (periodische Änderungen der Atomabstände) und zum anderen Deformationsschwingungen (periodische Änderungen des Valenzwinkels), die sich bei einer Wellenzahl von über 1.000 cm⁻¹ befinden.^[173] Je kleiner die Atommasse und je stärker die chemische Bindung eines zweiatomigen Moleküls ist, desto größer ist auch die entsprechende Schwingungsfrequenz. Dies kann mit der nachfolgenden Gleichung **6** beschrieben werden, denn je höher die Kraftkonstante ist, desto höher liegt auch die Schwingungsfrequenz.

$$\vartheta = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6)$$

ϑ -Schwingungsfrequenz, k -Kraftkonstante und μ -reduzierte Masse.

Der Infrarotbereich kann in drei Kategorien unterteilt werden, in den Nahen (Anregung von Wasserstoffgruppen), den Mittleren (Analyse der Probenstruktur) und den fernen Bereich (Valenz- und Deformationsschwingungen).^[173]

Die aufgeführten IR-Messungen wurden mit einem *Bruker Alpha Platinum-ATR* durchgeführt.

3.7 UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis)

Bei dieser spektroskopischen Methode werden Wechselwirkungen zwischen der Probe und dem monochromatischen Licht im Wellenlängenbereich zwischen 200-400 nm (UV) und 400-750 nm (Vis) ausgenutzt.^[174] Dabei werden die Moleküle zu Schwingungen angeregt und die Valenzelektronen von der elektromagnetischen Strahlung mit einer bestimmten Wellenlänge vom Grundzustand in ein höheres Energieniveau angeregt, was für die Strukturaufklärung entscheidend ist. Denn bei diesen elektronischen Übergängen wird Strahlung absorbiert bzw. emittiert und kann anschließend einer bestimmten Frequenz und Wellenlänge zugeordnet werden. Dabei sind nur bestimmte Übergänge wie in Abb. 13 gezeigt erlaubt. Aus einem σ -Orbital können Übergänge in ein σ^* - oder π^* -Orbital erfolgen. Es können auch Übergänge vom π -Orbital ins π^* -Orbital, sowie vom n -Orbital in ein σ^* - oder π^* -Orbital stattfinden.^[175] Die Bedingung für alle diese Übergänge ist, dass die Energie der elektromagnetischen Strahlung der Differenz zwischen den jeweiligen Energieniveaus entspricht.^[176] Durch das Absenken in den Grundzustand wird ein Photon mit demselben Energiebetrag wie eingestrahlt wurde, emittiert.

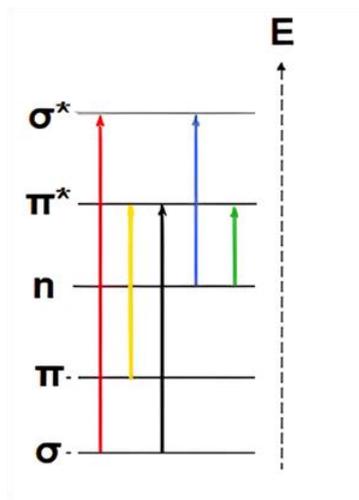


Abb. 13: Schematisches Molekülorbital-Energiediagramm.^[175]

Mit dieser Messmethode können jedoch auch Konzentrationen der jeweiligen Probe bestimmt werden. Hierfür werden Kalibrationsgeraden durch die Messung verschiedener konzentrierter Lösungen erstellt und gegen die Absorption aufgetragen. Neben Kalibrationsgeraden dient auch das Lambert-Beer'sche-Gesetz für die Berechnung von Konzentrationen, indem die Intensität des Lichts beim Einstrahlen und nach dem Durchgang durch die Probe gemessen wird (Gleichung 5). Außerdem wird die lineare Beziehung zwischen der Probenkonzentration und der Extinktion ausgenutzt.

Ein Teil der Anfangsstrahlung wird dabei absorbiert und die somit erhaltene Strahlung vom Detektor registriert. Die entstehenden Banden des absorbierten Lichts können anschließend spezifischen funktionellen Gruppen zugeordnet werden.^[177] Wie in Abb. 14 dargestellt, wird auch für die vorliegende Arbeit ein Einstrahlspektrometer mit einer Xenonlampe verwendet. Anhand eines Monochromators wird das polychromatische Licht in die einzelnen Wellenlängen aufgespalten und durch den Eintrittsspalt auf die Probe geleitet.^[178] Dabei wird zunächst eine Blindprobe in der gleichen Küvette mit dem gleichen Lösemittel wie in der zu analysierenden Probe vermessen. Dies ist wichtig, um später Reflexionen an der Küvettenoberfläche und Lösemiteleinflüsse am Detektor abzuziehen.^[179]

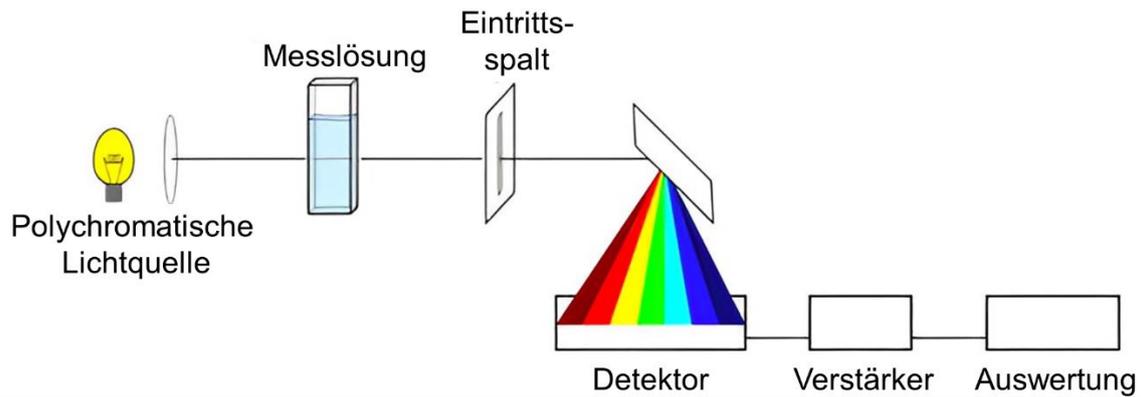


Abb. 14: Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers.^[178]

Die UV/Vis-Messungen wurden anhand eines *Varian Cary 300 Bio* vermessen.

3.8 Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Unter dem Begriff der Fluoreszenz wird die spontane Emission von Photonen nach der Anregung in einem Molekül verstanden. Das Licht einer Wellenlänge wird durch die Probe geleitet und die Emission eines Elektrons vom Detektor aufgenommen. Durch einen Filter werden die Wellenlängen selektiert, sodass nur eine bestimmte Wellenlänge angeregt und emittiert werden kann. Dabei kommt es zu Übergängen vom Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_2 , wie in Abb. 15 beim Jablonski-Diagramm zu entnehmen. Hierfür wird eine bestimmte Anregungsenergie $h\nu_A$ benötigt.^[180] Nach der Anhebung des Elektrons in einen angeregten Zustand, kommt es zu Relaxationsprozessen und Kollisionen mit anderen Molekülen, sodass der niedrigere angeregte Zustand S_1 erreicht wird. Dabei wird der freiwerdende Energiebetrag als strahlungslose Deaktivierung abgegeben.^[181] Nun kann das Molekül entweder durch weitere Schwingungsrelaxationen oder durch den Verlust von Fluoreszenzphotonen bei höheren Wellenlängen in den Grundzustand zurückkehren. Hierbei wird Strahlung emittiert. Anhand des daraus resultierenden Fluoreszenzspektrums können anschließend Rückschlüsse der Elektronenschwingungszustände im Grundzustand gezogen werden. Zum Schluss übersetzt ein Photomultiplier die Emission der detektierten Photonen in ein

elektrisches Signal, sodass die erhaltenen Emissionsspektren in einem 90°-Winkel zur Anregung aufgenommen werden können.^[182]

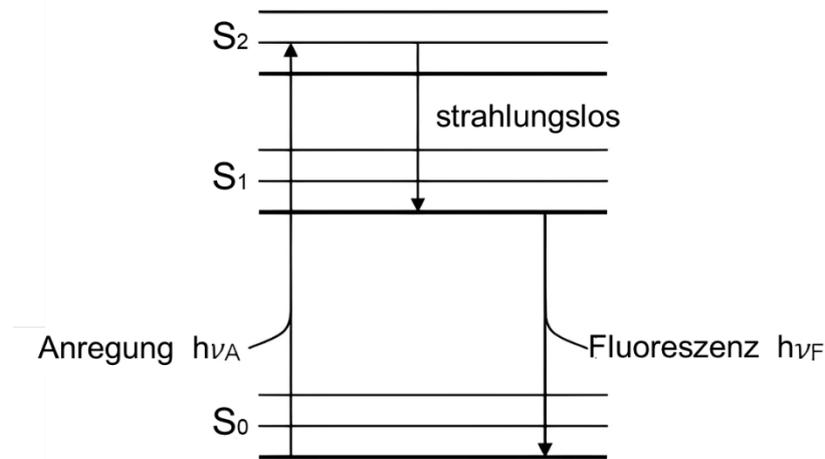


Abb. 15: Das Jablonski-Diagramm.^[180]

Anhand der Stokes-Verschiebung kann der Unterschied zwischen der Emissions- und Anregungswellenlänge erklärt werden, welche von der Umgebung und molekularen Struktur abhängig ist.^[183]

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden anhand eines *Agilent Technologies Cary Eclipse Spektrometers* durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das *Keyence Biorevo BZ-9000* mit FITC- (488) und TRITC- (647) Filtern verwendet.

3.9 Dynamische Scheibenzentrifugation (DCS)

Die DCS dient dazu um die Partikelgrößenverteilung von sehr kleinen Partikeln, wie z.B. ultrakleinen Gold-NPs in einer Dispersion zu bestimmen. Dabei wird zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers die Sedimentation der Partikelsysteme in einer rotierenden Scheibe ausgenutzt. Diese bewegt sich schneller als die natürliche Brown'sche Molekularbewegung der Partikel. Die Liganden und die jeweilige Hydrathülle um die Partikel werden vernachlässigt, sodass bei dieser Methode die Partikelgrößen unterschätzt werden. Vor der Probenmessung wird

zunächst ein Dichtegradient anhand von zwei verschiedenen konzentrierten Saccharose-Lösungen aufgebaut, der von der Mitte zum Rand zunimmt. Durch die Zugabe eines wasserunlöslichen Stoffes wie *n*-Dodecan wird die Zuckerlösung überdeckt. Dies eignet sich besonders gut bei Messungen, die mehrere Stunden andauern und es zur Verdampfung von Wasser kommen kann. Mit Hilfe eines Standards (PVC) mit bekannter Größe (483 nm) wird die Zeit zum Sedimentieren über die Scheibe bis zum Detektor gemessen.^[184-185] Durch die Rotation der Scheibe bewegen sich die Partikel radial zur Gradientenoberfläche und werden durch den Zuckergradienten immer weiter abgebremst. Dadurch wird eine bessere Auftrennung des Partikelsystems erreicht, da ansonsten größere Partikel, kleinere Partikel durch erhöhte Geschwindigkeiten mitreißen könnten. Durch den Laser am Rand wird die Sedimentationszeit gemessen und durch die Stokes-Einstein-Gleichung (7) der hydrodynamische Durchmesser bei einer konstanten Temperatur und Geschwindigkeit bestimmt werden.^[186]

$$d = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta \cdot \ln\left(\frac{R_f}{R_0}\right)}{(\rho_p - \rho_M) \cdot \omega^2 \cdot t}} \quad (7)$$

η -Viskosität des Mediums, ρ_p -Partikeldichte und ρ_M -Mediumsdichte, ω -Winkelgeschwindigkeit, R_0 -Radius am Startpunkt und R_f -Radius am Detektorort sowie t -Sedimentationszeit.

Die synthetisierten ultrakleinen Gold-NPs wurden mit einem *DC2400 (CPS)* vermessen.

3.10 Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD)

Mit Hilfe dieser Analysemethode kann nicht nur die kristallographische Struktur und die Kristallitgröße bestimmt werden, sondern auch die Bestimmung der Gitterparameter und eine Phasenüberprüfung der Probe durchgeführt werden. Dabei muss die Wellenlänge des eingestrahlten Lichts in der gleichen Größenordnung wie die Atomabstände auf den einzelnen Netzebenen des Kristalls sein. Erst dann kann es zu Beugungen an den Elektronenschalen der Gitteratome kommen und die Atomstruktur der kristallinen Probe bestimmt werden. Die Atompositionen sind

periodisch angeordnet und bilden zusammen ein dreidimensionales Gitter, wie in Abb. 16 ersichtlich.^[187]

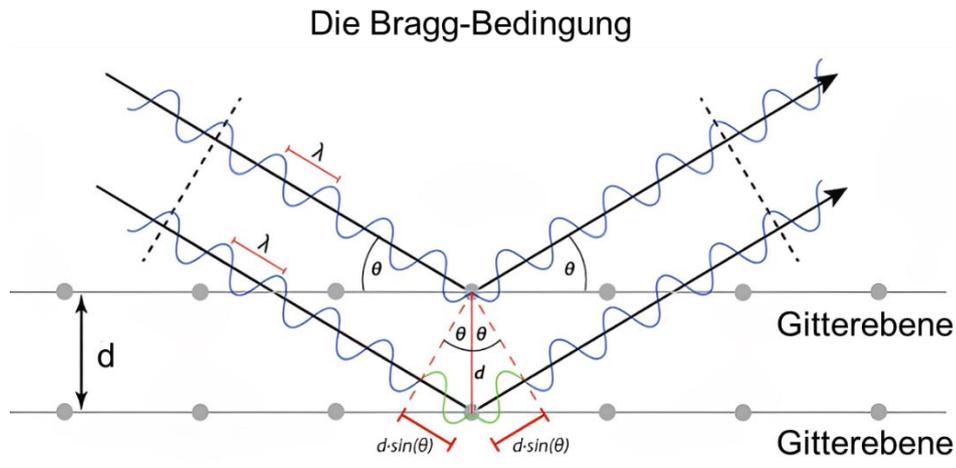


Abb. 16: Röntgenbeugung an den Gitterebenen einer kristallinen Probe.^[187]

In einer Röntgenröhre werden die benötigten hochenergetischen Röntgenstrahlen (0,1 – 100 Å) erzeugt.^[188] Dabei werden Elektronen nach einer Spannungsanlegung aus der Wolframkathode geschlagen und zur Kupferanode beschleunigt. Durch das Auftreffen der Elektronen auf der Anode werden diese abgebremst und es kommt zur Wechselwirkung der Atomkerne mit dem Anodenmaterial. Dabei werden die Bremsstrahlung und die charakteristische Röntgenstrahlung frei. Diese Röntgenstrahlung wird anschließend durch Blenden auf die Probe in einem bestimmten Winkel fokussiert. Nun kommt es zu konstruktiven (Wellenverstärkung) und zu destruktiven (Wellenauslöschung) Interferenzen auf den parallel liegenden Gitterebenen der Probe. Dabei führen nur konstruktive Interferenzen zu einem Beugungsmuster am Detektor. Die Voraussetzung für konstruktive Interferenzen ist, dass der Gangunterschied zwischen zwei gebeugten Wellen ($d \cdot \sin(\theta)$) ein ganzzahliges Vielfaches (n) der eingestrahnten Wellenlänge (λ) der Röntgenstrahlung sein muss. Anhand der Bragg-Gleichung (8) kann diese Bedingung verdeutlicht werden.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta) \quad (8)$$

n -Beugungsordnung, λ -Wellenlänge des einfallenden Lichts, d -Netzebenenabstand und θ -Einfallswinkel.

Nach der Beugung der Röntgenstrahlung wird die Intensität vom Detektor erfasst und die Reflexe gegen den entsprechenden Winkel ($2 \cdot \theta$) aufgetragen. Anhand der Winkellage und der Intensitätsverteilung kann mit Literaturdatenbanken eine Zuordnung der Reflexe getroffen werden. Durch die Halbwertsbreite des Beugungsmusters kann mit Hilfe der Scherrer-Gleichung (10) auf die Kristallitgröße geschlossen werden.^[188]

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad (10)$$

D -Kristallitgröße senkrecht zu den Netzebenen, k -Formfaktor (0,89), λ -Wellenlänge der monochromatischen Röntgenstrahlung, β -Halbwertsbreite und θ -Bragg-Winkel.

Nach dem Erhalt eines Diffraktogramms kann unterschieden werden, ob die Probe kristallin oder amorph ist. Durch die Verbreiterung der Reflexe, dem sogenannten Halo-Effekt, lässt sich auf eine amorphe Probe schließen. Nur bei kristallinen Proben lassen sich scharfe Reflexe erkennen. Die Halbwertsbreite der Reflexe ist von der Anzahl der Netzebenen im Kristall abhängig, das bedeutet, dass bei nanokristallinen Strukturen die Anzahl geringer als bei makrokristallinen Proben ausfällt. Durch die geringe Anzahl der Netzebenen kommt es daher zur Reflexverbreiterung.^[189-190]

Neben der Halbwertsbreite ist auch die Mikrospannung ε für die Bestimmung der Kristallitgröße entscheidend, die mit der Stokes-Wilson-Gleichung (11) bestimmt werden kann. Denn je nach Veränderung der Mikrospannung kann es zu einer Reflexverbreiterung führen und die Kristallinität der Probe nimmt ab.^[191]

$$\varepsilon = \frac{\beta}{4 \cdot \tan(\theta)} \quad (11)$$

ε -Mikrospannung, β -Halbwertsbreite (FWHM) und θ -Bragg-Winkel.

Die Scherrer- und die Stokes-Wilson-Gleichung können anschließend gleichgesetzt werden (12) und in einem sogenannten Williamson-Hall-Plot zur Kristallitgrößenbestimmung genutzt werden.

$$\beta \cdot \cos(\theta) = \left(\frac{k \cdot \lambda}{D}\right) + (4 \cdot \varepsilon \cdot \sin(\theta)) \quad (12)$$

ε -Mikrospannung, β -Halbwertsbreite (FWHM) und θ -Bragg-Winkel.

In der erhaltenen linearen Darstellung kann die Steigung als Mikrospannung und die Kristallitgröße als y-Achsenabschnitt abgelesen werden, nachdem die Werte für den Bragg-Winkel, die Wellenlänge der Röntgenstrahlung und die Halbwertsbreite eingesetzt wurden.^[192-193]

Die CaP- und Goldproben wurden mit einem *Bruker D8 Advance (Bruker)* mit einer Bragg-Brentano-Geometrie und einem Cu-K α -Strahl ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, 40 kV und 40 mA) vermessen.

3.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Das besondere an der CLSM ist, dass sie in der Lage ist eine Zellprobe in einzelne Ebenen zu unterteilen. Dabei können simultan mehrere Farbstoffe aufgenommen werden. Beim Fokussieren wird vor allem ein sehr kleiner Beleuchtungs- (kon) und Beobachtungsbrennpunkt (fokal) ausgenutzt.^[194] Durch einen Laserstrahl können die Abschnitte der Zelle gleichmäßig beleuchtet und Stück für Stück abgerastert werden. Die Intensität ist nur auf einer Ebene im Brennpunkt am höchsten und nimmt außerhalb der Fokusebene mit dem Quadrat des Abstandes immer weiter ab. Wie in Abb. 17 ersichtlich, reflektiert der Strahlleiter das Laserlicht mit der entsprechenden Anregungswellenlänge und fokussiert diese mit Spiegeln auf die entsprechende Ebene. So wird die Zellprobe Stück für Stück durchlaufen, bis ein zweidimensionales Bild entsteht. Dabei werden die Emissionen der fluoreszierenden Moleküle nacheinander detektiert und ein vollständiges Bild erstellt. Mit Hilfe einer Lochblende, die als Raumfilter dient und Signale aus anderen Ebenen als der Fokusebene filtert, gelangt nur das fokussierte emittierte Signal zum Detektor.^[194] Die erhaltenen z-Schnitte der einzelnen Ebenen sind vom Brechungsindex und von der Anregungswellenlänge abhängig. Außerdem kann so eine intrazelluläre Aufnahme der NPs aufgenommen und eine genaue Lokalisation gewährleistet werden.^[195] Durch den

Einsatz von zusätzlichen Objektiven, wie dem Ölimmersionsobjektiv kann die Auflösung erweitert werden.

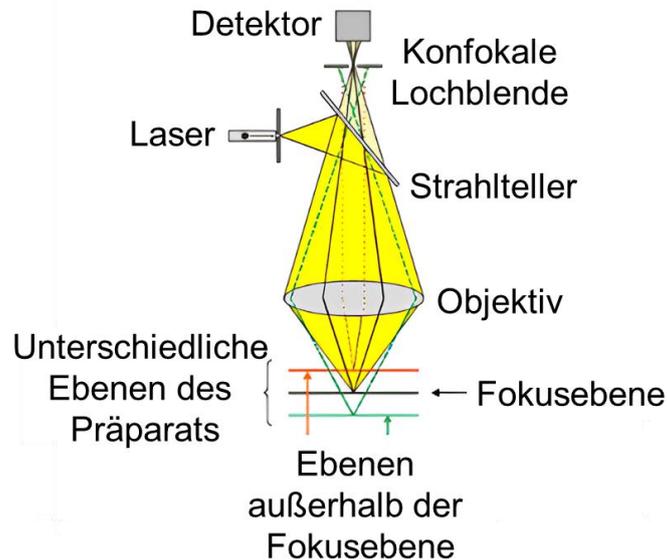


Abb. 17: Schematischer Aufbau eines CLSM.^[195]

Für die Zellaufnahmestudien wurde das *Leica TCS SP8X Falcon Mikroskop des Imaging Center Campus Essen (ICCE)* verwendet. Hierfür wurden Laserwellenlängen von 405 nm, 488 nm, 561 nm und 647 nm eingestellt. Es wurde auch ein WLL Laser (470-670 nm) und ein HC PL APO UVIS CS2 63X/1.2 Wasserimmersionsobjektiv eingesetzt.

3.12 Gefriertrocknung

Mit dieser Methode können vor allem hochempfindliche Partikel mit enthaltenden Biomolekülen schonend getrocknet werden. Dieses Verfahren ist von großer Bedeutung, damit die Biomoleküle weder zerstört noch an ihrer Aktivität verlieren. Dabei wird das Wasser durch Sublimation aus dem gefrorenen Zustand der Probe entzogen. Durch die sehr niedrigen Drücke und Temperaturen im Vakuum kann ein Stoffübergang von fest zu gasförmig erfolgen. Diese Sublimation kann nur entstehen, wenn die Drücke und Temperaturen unter dem Tripelpunkt des Wassers sind. Damit

die Partikel und Biomoleküle zusätzlich vor der Gefriertrocknung geschützt sind, wird eine Zuckermatrix aus Trehalose zur Dispersion hinzugegeben. Nach der Trocknung können die Proben längere Zeit stabil gelagert und mit dem gleichen Volumen des jeweiligen Mediums wieder redispergiert werden.^[196]

4. Experimenteller Teil

4.1 Synthese und Funktionalisierung von CaP-NPs

Die Synthesen und Funktionalisierungsmethoden in diesem Kapitel wurden an Anlehnung der etablierten Synthesevorschriften von Kozlova *et al.*^[20] und Rojas-Sánchez *et al.*^[21] durchgeführt.

4.1.1 PEI- und CMC-stabilisierte CaP-NPs

Vor der Synthese wurden die Ca-, P-, PEI- bzw. CMC-Lösungen frisch hergestellt. Dabei wurden die Lösungen von Calciumlactat (18 mmol L^{-1} , Merck, *p.a.*) und Diammoniumhydrogenphosphat ($10,8 \text{ mmol L}^{-1}$, Merck, *p.a.*) mit einer 1 M NaOH-Lösung (Merck, *p.a.*) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die entsprechende PEI- (2 mg mL^{-1} , $M_w = 25 \text{ kDa}$) bzw. CMC-Lösung (2 mg mL^{-1} , Merck, *p.a.*) wurden parallel angesetzt. Anschließend wurden die Lösungen zu 3,3 mL vorgelegtem Reinstwasser, 10 s lang mittels zwei Peristaltikpumpen hinzugegeben. Die CaP-Lösungen wurden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 5 mL min^{-1} und die Polymerlösung (PEI bzw. CMC) mit einer Geschwindigkeit von 7 mL min^{-1} hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur gerührt um CaP/PEI- bzw. CaP/CMC-NPs zu erhalten.

4.1.2 Peptid-beladene CaP-NPs

Für die Herstellung der *T*-CaPs wurden die in Abschnitt 4.1.1 PEI-stabilisierten CaP-NPs mit folgenden Adjuvanten: Poly (I:C) (1 mg mL^{-1} , InvivoGen), R848 (1 mg mL^{-1} , Resiquidmotiv, InvivoGen), CpG (1 mg mL^{-1} , ODN 1826 (Oligodesoxy-Ribonukleotid), InvivoGen) und immer mit dem Peptid OT-II (1 mg mL^{-1} , ova 323-339, T-Zellepitop, InvivoGen) (1:1) beladen. Nach dem 20-minütigen Rühren wurden 4,5 mL der CaP/PEI-Dispersion entnommen und mit 500 μL der entsprechenden 1:1-Adjuvant-Peptid-Lösung (1 mg mL^{-1}) versetzt und weitere 30 min bei RT gerührt um CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)-NPs zu generieren.

4.1.3 SiO₂-modifizierte CaP-NPs

Die PEI- bzw. CMC-stabilisierten-CaP-NPs wurden anhand des Stöber-Prozesses mit einer Silica-Schale modifiziert.^[197] Dafür wurden 5 mL der in Kapitel 4.1.1 unbeladenen und die in Kapitel 4.1.2 beladenen CaP-NPs entnommen und mit einer vorher angesetzten Lösung aus 50 µL Ammoniak-Lösung (7,8%, Carl Roth), 25 µL Tetraethoxysilan (TEOS, Sigma-Aldrich, 98%) und 20 mL Ethanol (EtOH, VWR, *p.a.*) versetzt und für 16 h bei RT unter Lichtausschluss weitergerührt.

Die Aufreinigung erfolgte am nächsten Tag für 30 min bei 14.200 rpm mit einer Tischzentrifuge (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg). In 5 mL neuem Reinstwasser wurde das Pellet wieder mit einem Ultraschallfinger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) für 10 s redispergiert.

So wurden CaP/PEI/SiO₂- und CaP/CMC/SiO₂-NPs für die Anbringung von Azid- und Alkylgruppen, sowie CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-NPs für die Anbringung von Thiolgruppen erhalten.

4.1.4 Azid-terminierte CaP-NPs

Um funktionelle Azidgruppen auf der zuvor angebrachten Silica-Schale anzubringen wurden 5 mL der jeweiligen CaP-NPs-Dispersion zu einer Lösung aus 20 mL EtOH (VWR, *p.a.*), 75,5 µL (3-Azidopropyl)triethoxysilan (SelectLab Chemicals, 97%) und 25,5 µL Ammoniak-Lösung (Carl Roth, 7,8%) hinzugegeben und für 6 h lang unter Lichtausschluss bei RT gerührt.

Mittels Zentrifugation bei 14.200 rpm für 30 min (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg), Redispergierung in 5 mL Reinstwasser und Ultraschallfingerbehandlung (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) für 12 s, wurden CaP/PEI/SiO₂-N₃- und CaP/CMC/SiO₂-N₃-NPs gewonnen.

4.1.5 Alkin-terminierte CaP-NPs

Für die Synthese der CaP-NPs die anschließend mit ultrakleinen Gold-NPs mittels Klick-Reaktion modifiziert werden, werden statt Azid- nun Alkingruppen auf die Oberfläche angebracht. Hierfür wurden analog zu der Vorschrift in **4.1.4**, 5 mL der CaP/PEI/SiO₂- bzw. CaP/CMC/SiO₂-NPs entnommen und für 6 h bei RT unter Lichtausschluss mit 75,5 µL 3-Trimethylsiloxy-1-Propyn (AOBChem, 95%), 20 mL EtOH und 25,5 µL Ammoniak-Lösung (Carl Roth, 7,8%) gerührt. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 14.200 rpm (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg), wurden die CaP/PEI/SiO₂-Alkin- bzw. CaP/CMC/SiO₂-Alkin-NPs mit 5 mL Reinstwasser und einem Ultraschallfinger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) 12 s lang behandelt.

4.1.6 Thiol-terminierte CaP-NPs

Für die Synthese der *T*-CaPs wurden die CaP-NPs nicht mit Azidgruppen für eine anschließende Klick-Reaktion behandelt, sondern mit Thiolgruppen für eine unspezifische Kopplung der Antikörper an die Nanopartikeloberfläche. 5 mL der CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-NPs wurden 6 h bei RT unter Lichtausschluss mit 25 µL 3-(Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPS, Sigma-Aldrich, 95%) gerührt.

Nach der Synthese werden die Partikel für 30 min bei 14.200 rpm zentrifugiert (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg) und nach der Zugabe von 5 mL Reinstwasser, 12 s lang mit einem Ultraschallfinger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) behandelt.

So wurden CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-S-NPs generiert.

4.1.7 Fluoreszenzmarkierung von Env-Proteinen

Die Env-Proteine: **1**) Env-His₈ (*wild-type*, Trimer mit C-Terminalen His-Tag), **2**) Env-Ald₆ (Trimer mit einer C-terminalen Aldehyd-Gruppe) und **3**) Env-Ald₆/FGE (Trimer mit drei Aldehydgruppen) wurden von Herrn Weingärtner und Herrn Damm der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Überla und Herrn Dr. Temchura (Institut für klinische und molekulare Virologie der Universitätsklinik in Erlangen) bereitgestellt.

Zuerst wurden nach dem Standardprotokoll des Herstellers AlexaFluor[®]-488-(AF488) (1 mg mL⁻¹ in DMSO, ThermoFisher) für Env-His₈ und AlexaFluor[®]-647-Farbstoffe (AF647) (1 mg mL⁻¹ in DMSO, ThermoFisher) für Env-Ald₆ und Env-Ald₆/FGE zum Markieren verwendet. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff mittels Spinfiltration (10 kDa Amicon[®]-Filter, Merck) abgetrennt und die Dispersion bis auf eine Endkonzentration des jeweiligen Env-Proteins (1 mg mL⁻¹) aufkonzentriert um AF488-Env-His₈, AF647-Env-Ald₆ sowie AF647-Env-Ald₆/FGE zu erhalten.

4.1.8 Fluoreszenzmarkierung von BSA- und Hämoglobin-Molekülen

Die BSA- (*Albumin bovine Fraction V*, M_w= 67 kDa, Serva) und Hämoglobin-Moleküle (Human, Sigma-Aldrich) wurden ebenfalls unter gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben behandelt. Das anfängliche Pulver wurde in Reinstwasser auf eine Konzentration von 1 mg mL⁻¹ eingestellt und mit dem AF647-Farbstoff (1 mg mL⁻¹ in DMSO, ThermoFisher) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt, mittels Spinfiltration (10 kDa Amicon[®]-Filter, Merck) aufgereinigt und auf eine Anfangskonzentration von 1 mg mL⁻¹ eingeeengt. So wurden AF647-BSA und AF647-Hämoglobin erzielt.

4.1.9 Oximreaktion der fluoreszierenden Env-Proteine

Zum Erhalt von Alkingruppen an den fluoreszierenden Env-Proteinen aus Kapitel 4.1.7 wurden 10 µL des fluoreszenzmarkierten AF488-Env-His₈ (1 mg mL⁻¹), AF647-Env-Ald₆ (1 mg mL⁻¹) bzw. AF647-Env-Ald₆/FGE (1 mg mL⁻¹) mit 19 µL Reinstwasser, 3,1 µL (125 µM) Propargyl-PEG3-aminoxy-Linker (Broadpharm, San Diego, CA, USA) und 31,3 µL Natriumacetat-Labelpuffer (Sigma-Aldrich) über Nacht bei 37 °C und 400 rpm in einer Oximreaktion inkubiert und mittels Spinfiltern (10 kDa Amicon[®]-Filter, Merck) bei 4.000 rpm für 40 min gereinigt und auf die Anfangskonzentration von 1 mg mL⁻¹ eingeeengt, um AF488-Env-His₈-Alkin, AF647-Env-Ald₆-Alkin bzw. AF647-Env-Ald₆/FGE-Alkin zu gewinnen.

4.1.10 Oximreaktion der fluoreszierenden BSA- und Hämoglobin-Moleküle

10 μL der fluoreszierenden AF647-BSA- und AF647-Hämoglobin-Moleküle (1 mg mL^{-1}) wurden unter gleichen Bedingungen wie zuvor bei den fluoreszierenden Env-Proteinen in einer Oximreaktion mit 19 μL Reinstwasser, 3,1 μL ($125 \text{ }\mu\text{M}$) Propargyl-PEG3-Aminooxy-Linker (Broadpharm, San Diego, CA, USA) und 31,3 μL Natriumacetat-Labelpuffer (Sigma-Aldrich) versetzt und über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 400 rpm belassen.

Mittels Spinfiltration (10 kDa Amicon[®]-Filter, Merck) bei 4.000 rpm für 40 min wurden die AF647-BSA-Alkin- und AF647-Hämoglobin-Alkin-Moleküle (1 mg mL^{-1}) abschließend aufgereinigt.

4.1.11 Oberflächenfunktionalisierung von Azidgruppen-modifizierten CaP-NPs mittels Klick-Reaktion

Für die sogenannten *B-CaPs* (*o-CaPs*) wurden 500 μL der CaP/PEI/SiO₂-N₃-NPs mit 50 μL des AF488-Env-His₈-Alkins (1 mg mL^{-1}), AF647-Env-Ald₆-Alkins (1 mg mL^{-1}) bzw. AF647-Env-Ald₆/FGE-Alkins (1 mg mL^{-1}) gekoppelt.

Für die Klick-Reaktion mit AF647-BSA-Alkin- und AF647-Hämoglobin-Alkin-Molekülen (1 mg mL^{-1}) wurden 500 μL CaP/PEI/SiO₂-N₃- und CaP/CMC/SiO₂-N₃-NPs mit 50 μL des jeweiligen fluoreszierenden Moleküls zur Reaktion gegeben.

Hierfür wurden in beiden Fällen 38,5 μL wässrige Aminoguanidin-Lösung (1 mg mL^{-1} , Alfa Aesar, 98%), 36,5 μL Natriumascorbat (100 mM, Sigma-Aldrich, 99%), 3,65 μL wässrige Lösung aus Kupfersulfat (CuSO₄, 40 μM) und Tris(3-Hydroxypropyl-Triazolylmethyl)amin (THPTA, Sigma-Aldrich, 95%) sowie 0,35 μL NaOH (0,1 M in H₂O, VWR) zusammengegeben und für 1 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Für die Aufreinigung wurde die Dispersion 30 min bei 14.200 rpm (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert, der Überstand entfernt und das erhaltene Präzipitat in 500 μL Reinstwasser und einem Ultraschallfinger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) für 10s redispergiert.

Es wurden folgende NPs erhalten: CaP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF488-Env-His₈-, CaP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF647-Env-Ald₆- bzw. CaP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF647-Env-Ald₆/FGE-NPs.

Außerdem CaP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF647-BSA und CaP/CMC/SiO₂-N₃-Alkin-AF647-BSA, sowie CaP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF647-Hämoglobin und CaP/CMC/SiO₂-N₃-Alkin-AF647-Hämoglobin.

4.1.12 Oberflächenfunktionalisierung von Alkingruppen-modifizierten CaP-NPs mittels Klick-Reaktion

Für die Klick-Reaktion wurden 5 mL CaP/PEI/SiO₂-Alkin- und CaP/CMC/SiO₂-Alkin-NPs mit 167 µL AF488-N₃ (95%, Jena Bioscience), 385 µL wässrige Aminoguanidin-Lösung (1 mg mL⁻¹, Alfa Aesar, 98%), 3,5 µL NaOH (0,1 M in H₂O, VWR), 36,5 µL wässrige Lösung aus Kupfersulfat (CuSO₄, 40 µM) und Tris(3-Hydroxypropyl-Triazolylmethyl)amin (THPTA, Sigma-Aldrich, 95%) sowie 365 µL Natriumascorbat (100 mM, Sigma-Aldrich, 99%) für 1 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Die Menge an Farbstoff wurde zu 1/3 des Standardprotokolls hinzugegeben um nicht alle funktionalen Gruppen (-Alkin) auf den CaP-NPs zu belegen.

Nach der Zentrifugation von 30 min bei 14.200 rpm (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg), dem Redispergieren in 5 mL Reinstwasser und einer Ultraschallfingerbehandlung (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) von 10 s, wurden CaP/PEI/SiO₂-Alkin-N₃-AF488- und CaP/CMC/SiO₂-Alkin-N₃-AF488-NPs synthetisiert.

4.1.13 Linker-Inkubation für eine unspezifische Kopplung von CaPs-NPs

Der für diese Kopplungsmethode eingesetzte Sulfosuccinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-Carboxylat-Linker (Sulfo-SMCC, Merck, 94%) bindet an die Aminogruppen des jeweiligen Proteins und an die Thiolgruppen CaP-NPs, um CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-S-NPs (*T-CaPs*) zu generieren.

Vor der Synthese wurden 600 µL des fluoreszierenden Antikörpers wie CD11c (Anti-Mo CD11c, eBioScience, APC, Invitrogen) und *Isotype-control* (Armenian Hamster

IgG, APC, eBioScience, Invitrogen) mit 300 μL des Sulfo-SMCC-Linkers (2,5 mg in 1,4 mL Reinstwasser) für 2 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die erhaltenen Proteine wurde mit einem 3 kDa Amicon[®]-Filter von überschüssigem Linker gereinigt.

Für die Inkubation der *B-CaPs* (*r-CaPs*) wurden ebenfalls 600 μL der AF488-Env-His₈-, AF647-Env-Ald₆-, AF647-Env-Ald₆/FGE-Proteine (1 mg mL⁻¹) 300 μL des Sulfo-SMCC-Linkers (2,5 mg in 1,4 mL Reinstwasser) für 2 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und mittels eines 3 kDa Amicon[®]-Filters aufgereinigt.

4.1.14 Unspezifische Oberflächenfunktionalisierung von Thiolgruppen-modifizierten CaPs-NPs

Für die Synthese der *T-CaPs* wurden 4 mL der CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-S-NPs mit 330 μL (1 mg mL⁻¹) des aktivierten CD11c-Linker- und *Isotype-control*-Linker-Proteins vermischt und für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Abschließend wurden die CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-S-CD11c und CaP/PEI/(Adjuvant-OT-II)/SiO₂-S-*Isotype-control* für 30 min bei 14.200 rpm zentrifugiert und in 4 mL Reinstwasser redispersiert.

Die Synthese der *B-CaPs* (*r-CaPs*) wurde parallel wie oben beschrieben durchgeführt, indem 4 mL der CaP/PEI/SiO₂-S-NPs mit 330 μL des aktivierten AF488-Env-His₈-Linkers, AF647-Env-Ald₆-Linkers, AF647-Env-Ald₆/FGE-Linkers vermischt und für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert wurden. Durch die Zentrifugation (30 min, 14.200 rpm, 5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg), Redispersierung in 4 mL Reinstwasser und 10 s Ultraschallfingerbehandlung (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s), wurden CaP/PEI/SiO₂-S-AF488-Env-His₈-, CaP/PEI/SiO₂-S-AF647-Env-Ald₆- und CaP/PEI/SiO₂-S-AF647-Env-Ald₆/FGE-NPs erhalten.

4.2 Synthese und Funktionalisierung von VLP- und VLP(pEGFP)-NPs

Für die Beschichtung der VLPs und der VLPs(pEGFP) wurde eine modifizierte Methode von Kozlova *et. al.*^[20] für die Silica-Schale angewendet. In Anlehnung an

Rojas-Sánchez *et al.*^[21] wurde die resultierende Silica-Schale mit Hüllproteinen (Env), mit Modellproteinen (BSA) und AF-Farbstoffen funktionalisiert.

4.2.1 VLP- und VLP(pEGFP)-stabilisierte PEI- und PEI-Cy5- NPs

Die von Herrn Wang aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Überla (Institut für klinische und molekulare Virologie der Universitätsklinik in Erlangen) synthetisierten VLP's (HPV type 16, 360 Einheiten des L1-Codeproteins pro VLP, $M_w = 360 \cdot 55 \text{ kDa} = 19.800 \text{ kDa}$) und VLP(pEGFP)'s (HPV type 16 mit pEGFP) wurden zunächst anhand von Spinfiltration (10 kDa Amicon®-Filter) auf eine Konzentration von 1 mg mL^{-1} eingeeengt. Im nächsten Schritt wurden 500 μL der VLP-Dispersion vorgelegt und mit 850 μL PEI- (2 mg mL^{-1} , $M_w = 25 \text{ kDa}$) bzw. PEI-Cy5-Lösung (2 mg mL^{-1} , Surfay Nanotec GmbH, $M_w = 25 \text{ kDa}$ mit einer PEI-Lösung 1:5 verdünnt) für 10 min gerührt. Es wurden somit VLP/PEI und VLP/PEI-Cy5 sowie VLP(pEGFP)/PEI und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5 erhalten.

4.2.2 SiO₂-modifizierte VLP- und VLP(pEGFP)-NPs

Zu den PEI- bzw. PEI-Cy5-stabilisierten VLP's und VLP(pEGFP)'s in Kapitel 4.2.1 wurde eine Mischung aus 4,5 mL EtOH (VWR, *p.a.*), 11,4 μL Ammoniak-Lösung (7,8%, Carl Roth) und 5,7 μL TEOS (Sigma-Aldrich, 98%) hinzugegeben und für 16 h unter Lichtausschluss gerührt. Die Zentrifugation erfolgte bei 30 min und 14.200 rpm (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg). Nach der Zugabe von 500 μL Reinstwasser wurden die Partikel 6 s lang mit einem Ultraschallfänger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) behandelt, um VLP/PEI/SiO₂- und VLP/PEI-Cy5/SiO₂- sowie VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂- und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-NPs zu erhalten.

4.2.3 Azidgruppen-terminierte VLP- und VLP(pEGFP)-NPs

Im nächsten Schritt wurde die Silica-Schale mit Azidgruppen funktionalisiert, indem 500 μL der VLP- und VLP(pEGFP)-Dispersion zu einer Lösung aus 2 mL EtOH (VWR,

p.a.), 7,6 μL (3-Azidopropyl)triethoxysilan (SelectLab Chemicals, 97%) und 2,6 μL Ammoniak-Lösung (Carl Roth, 7,8%) hinzugegeben und für 6 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt wurden.

Die erhaltene Dispersion wurde bei 30 min und 14.200 rpm zentrifugiert (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg) und nach anschließender Zugabe von 500 μL Reinstwasser durch einen Ultraschallfänger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) für 8 s redispersiert.

Hiermit wurden VLP/PEI/SiO₂-N₃- und VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃- sowie VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃- und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-NPs erhalten.

4.2.4 Thiolgruppen-terminierte VLP- und VLP(pEGFP)-NPs

500 μL der VLP/PEI/SiO₂-, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂- oder VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-NPs wurden mit 2,5 μL (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan für 6 h bei RT unter Lichtausschluss zur Reaktion gebracht. Im nächsten Schritt wurden die Partikel mittels einer Tischzentrifuge (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg) für 30 min bei 14.200 rpm behandelt und mit 500 μL Reinstwasser 8 s lang mit einem Ultraschallfänger (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) redispersiert.

Es wurden VLP/PEI/SiO₂-SH-, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-SH-, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-SH- und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-SH-NPs generiert.

4.2.5 Oberflächenmodifizierung von VLP- und VLP(pEGFP)-NPs mittels Klick-Reaktion

Die Oberflächenfunktionalisierung der *Viro-CaPs* erfolgte analog zu den *B-CaPs*. Hierfür wurden die fluoreszenzmarkierten und Oximreaktion behandelten Moleküle wie in den Kapiteln 4.1.7 und 4.1.8 beschrieben verwendet. Für die PEI-stabilisierten NPs wurden AF568Env-Ald₆/FGE-Alkin, AF568-BSA-Alkin und AF647-Alkin (1 mg mL⁻¹) an die Oberfläche geklickt.

Für die PEI-Cy5-stabilisierten-NPs wurden AF488-Env-Ald₆/FGE-Alkin, AF488-BSA-Alkin und AF488-Alkin (1 mg mL⁻¹) eingesetzt.

Zunächst wurden 500 μL der VLP/PEI/SiO₂-N₃-, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃- oder VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-NPs mit 25 μL AF568Env-Ald₆/FGE-Alkin, AF568-BSA-Alkin, AF647-Alkin, AF488-Env-Ald₆/FGE-Alkin, AF488-BSA-Alkin oder AF488-Alkin (1 mg mL⁻¹), 3,65 μL Kupfersulfat (CuSO₄, 40 μM , Sigma-Aldrich) und Tris(3-Hydroxypropyl-Triazolylmethyl)amin (THPTA, Sigma-Aldrich, 95%), 0,35 μL NaOH (0,1 M in H₂O, VWR), 38,5 μL wässriger Aminoguanidin-Lösung (1 mg mL⁻¹, Alfa Aesar, 98%) und 36,5 μL Natriumascorbat (100 mM, Sigma-Aldrich, 99%) zusammengegeben und für 1 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Nach der Reinigung bei 30 min und 14.200 rpm (5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg), Redispergierung mit 500 μL Reinstwasser und Ultraschallfingerbehandlung (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) für 10s wurden VLP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF568Env-Ald₆/FGE, VLP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF568-BSA, VLP/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF647 und VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Alkin-AF488-Env-Ald₆/FGE, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Alkin-AF488-BSA, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Alkin-AF488 erhalten.

Auf dieselbe Weise wurden die VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF568Env-Ald₆/FGE, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-AF568-BSA, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-Alkin-VLPs(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-AF647 und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Alkin-AF488-Env-Ald₆/FGE, VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Alkin-AF488-BSA und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Alkin-AF488 generiert.

4.2.6 Unspezifische Oberflächenfunktionalisierung von Thiolgruppen-modifizierten VLP- und VLP(pEGFP)-NPs

Vor der unspezifischen Synthese erfolgte zunächst die Inkubation der AF568Env-Ald₆/FGE-, AF568-BSA-, AF488-Env-Ald₆/FGE- und AF488-BSA-Moleküle mit dem Sulfo-SMCC-Linker wie in Kapitel 4.1.12 beschrieben.

Dann wurden 500 μL der VLP/PEI/SiO₂-SH-, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-SH-, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-SH- und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-SH-NPs mit 41,3 μL des aktivierten AF568-Env-Ald₆/FGE-, AF568-BSA-, AF488-Env-Ald₆/FGE- und AF488-BSA-Linkers vermischt und für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach der Aufreinigung (30 min, 14.200 rpm, 5430/5430 R, Eppendorf AG, Hamburg),

Redispergierung in 500 μL Reinstwasser und 10 s Ultraschallfingerbehandlung (UP50H, Hielscher, Ultrasound Technology, Sonotrode N7, Amplitude 70%, Pulsdauer 0,8 s) wurden VLPs, VLP/PEI/SiO₂-S-Linker-AF568Env-Ald₆/FGE, VLP/PEI/SiO₂-S-Linker-AF568-BSA und VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-Linker-AF488-Env-Ald₆/FGE sowie VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-Linker-AF488-BSA generiert.

Für die funktionalisierten VLP(pEGFP) wurden folgende NPs erhalten:

VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-S-Linker-AF568Env-Ald₆/FGE, VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-S-Linker-AF568-BSA und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-S-Linker-AF488-Env-Ald₆/FGE und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-S-Linker-AF488-BSA.

4.3 Synthese und Funktionalisierung von ultrakleinen Gold-NPs

Anhand der Brust-Schiffrin-Methode^[199] wurden ultrakleine NPs erhalten und die Oberfläche mit Farbstoff-Molekülen nach der Vorschrift von Klein *et al.*^[200] funktionalisiert.

4.3.1 Glutathion-stabilisierte ultrakleine Gold-NPs

Zunächst wurde der Kolben einmal in Königswasser und zweimaligen in Reinstwasser ausgekocht. Anschließend wurden 30 mL Reinstwasser vorgelegt und 10 min mit Argon entgast. Um Tetrachlororgoldsäure zu erhalten wurde zunächst elementares Gold ($\geq 99\%$) in Königswasser gelöst. 396 μL der erhaltenen Tetrachlororgoldsäure (1 eq., 9,8 g L⁻¹) und 23,3 mg mL⁻¹ Glutathion (GSH, 2 eq., Sigma-Aldrich, 98%) wurden zu dem entgasten Wasser hinzugegeben. Nach einem 5-minütigen Rühren wurden 800 μL frisch hergestelltes Natriumborhydrid (NaBH₄, 7,6 mg in 1 mL, Sigma-Aldrich, 96%) hinzugegeben und für 15 min weiter gerührt.

Mittels Ultrazentrifugation über Nacht bei 50.000 rpm und nach der Abnahme des Überstandes wurden die Au-GSH-NPs erhalten.

4.3.2 Azidgruppen-terminierte ultrakleine Gold-NPs

Die erhaltenen Au-GSH-NPs wurden anschließend mit Azidgruppen funktionalisiert. Hierfür wurden 5 mg (Au-Gehalt mittels AAS bestimmt) der Au-GSH-NPs in 6 mL Reinstwasser im zuvor ausgekochten Kolben (siehe Kapitel 4.3.1) vorgelegt. Hinzu kommen im Anschluss 1 mL Imidazol-1-Sulfonyl-Azid-Hydrogen-Sulfat, 1 mL Kaliumcarbonat (KCO_3 , Sigma-Aldrich), 1 mL Kupfersulfat (CuSO_4 , SigmaAldrich), 1 mL NaOH (1M in H_2O , VWR) und 18 mL Methanol (VWR, *p.a.*) hinzu. Nach dem 2-tägigen Rühren wurden die resultierenden Au-GSH- N_3 -NPs durch die Ultrazentrifuge bei 50.000 über Nacht aufgereinigt und der Überstand am nächsten Tag entnommen.

4.3.3 Farbstoff-modifizierte ultrakleine Gold-NPs

Um die Oberfläche der Au-GSH- N_3 -NPs mit fluoreszierenden AF647-Alkin-Molekülen zu beladen, aber nicht alle funktionellen Gruppen ($-\text{N}_3$) zu belegen, wurde nur 1/3 der Reaktanden der Standardsynthese nach Klein *et al.*^[200] eingesetzt.

Zunächst wurde die Goldkonzentration mittels AAS bestimmt und 1 mg der Au-GSH- N_3 -NPs in 3 mL Reinstwasser vorgelegt. Eine Kupfer-Stammlösung wurde zuerst wie folgt angesetzt: 500 μL Kupfersulfat (CuSO_4 , 40 μM , Sigma-Aldrich), 500 μL Amminoguanidin (übersättigte Lösung in H_2O , Alfa Aesar, 98%) und 1 mL Tris(3-Hydroxypropyl-Triazolylmethyl)amin (THPTA, 21 mg mL^{-1} in H_2O , Sigma-Aldrich, 95%) wurden zusammengegeben. Hieraus wurden 150 μL entnommen und zusammen mit 429 μL AF647-Alkin (95%, Jena Bioscience) sowie einer Spatelspitze Natriumascorbat (Sigma-Aldrich, 99%) über Nacht bei RT gerührt.

Mittels Spinfiltration (10 kDa Amicon[®]-Filter, Merck) bei 4.000 rpm für 40 min wurde der überschüssige Farbstoff entfernt, um Au-GSH- N_3 -Alkin-AF647-NPs zu erhalten.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Auftauen von HeLa-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen wurden für die Kultivierung zunächst aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad (37 °C) für 2 min aufgetaut. Das

entsprechende Zellkulturmedium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Invitrogen) wurde mit 10% fötalem Rinderserum (FBS, Invitrogen), 100 U mL⁻¹ Penicillin und Streptomycin parallel im Wasserbad erwärmt. Die resultierende Zellsuspension wurde mit 4 mL DMEM verdünnt und für 3 min bei 900 rpm (Heraeus Multifuge X1R, RT) zentrifugiert. Durch das Entfernen des Überstandes wurde der Kryofaktor, Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth, 99,5%) entfernt. Die Redispergierung der Zellen wurde durch die Zugabe von 1 mL Zellkulturmedium durchgeführt und in der Zellkulturflasche mit weiterem 10 mL DMEM vereinigt.

4.4.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

Nach der Zugabe der HeLa-Zellen in die Zellkulturflasche wurden diese anschließend bei 37 °C unter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern, wurden diese alle 48 h mit frischem Medium versetzt und gegebenenfalls passagiert. Hierfür wurde das DMEM entfernt, die Zellen mit *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) gewaschen und mit Hilfe von 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung für 2 min im Inkubator bei 37 °C behandelt. Mit 5 mL DMEM wurde die Zellkulturflasche gespült und die Zellsuspension für 3 min bei 900 rpm (Heraeus Multifuge X1R, RT) zentrifugiert. Nach dem Redispergieren der Zellen in 1 mL frischem DMEM und der Zugabe von 20 mL Zellkulturmedium konnten diese auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt werden.

4.4.3 Fluoreszenzmikroskopie der HeLa-Zellen

Vor der Fluoreszenzmikroskopie für Zellaufnahmestudien wurden die HeLa-Zellen wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben aus der Zellkulturflasche in eine 24-Well-Platte passagiert. Nach der Redispergierung der Zellen in 1 mL DMEM wurden diese ausgezählt und auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen/Well in einem Kulturvolumen von 500 µL berechnet. Die Zellen wurden 24 h vor der Inkubation mit NPs ausgesät und im Inkubator bei 37 °C belassen. Anschließend folgte die Inkubation von 30 µL/Well (1 mg mL⁻¹) der NPs-Dispersion und wurde auf 0,5 mL des Mediums/Well aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C unter 5% CO₂-Atmosphäre. Abschließend wurden die Zellen dreimal

mit DPBS gewaschen und anhand des Fluoreszenzmikroskops (Keyence BZ9000, Deutschland, 40-fache Vergrößerung) untersucht.

4.4.4 CLSM der HeLa-Zellen

Um die HeLa-Zellen aus der Zellkulturflasche in die entsprechende Mikroskopie-Platte (8-Well) zu überführen, wurden die Zellen wie in Kapitel 4.4.2 behandelt. Auch hierfür wurden $3 \cdot 10^4$ Zellen/Well in 250 μL Zellkulturmedium ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen mit 30 μL /Well (1 mg mL^{-1}) der Nanopartikeldispersion für weitere 24 h im Inkubator belassen. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 300 μL DPBS gewaschen, um die haftenden NPs zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen mit 150 μL /Well einer wässrigen Formaldehydlösung (3,7%) für 20 min bei RT fixiert und erneut dreimal mit 300 μL DPBS gewaschen. Für die Aktinfärbung (Zellmembran) wurden die Zellen mit 230 μL einer Lösung von $25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ AF488-Phalloidin, AF647-Phalloidin bzw. AF568-Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in DPBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abermals dreimal mit 300 μL DPBS gewaschen. Der Zellkern wurde 15 min mit 230 μL einer $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst-33342-Lösung (Life Technologies, Eugene, OR, USA) gefärbt. Die Zellen wurden dreimal mit 300 μL DPBS gewaschen und schließlich in 250 μL DPBS aufbewahrt.

4.4.5 MTT-Test der HeLa-Zellen

Um die Lebensfähigkeit der HeLa-Zellen nach der Nanopartikelzugabe zu analysieren, wurde ein MTT-Test durch spektrophotometrische Analyse mit einem Multi-Scan FC-Gerät (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Auch hier wurden die HeLa-Zellen durch den Passagiervorgang in eine 24-Well-Platte mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/Well in 500 μL DMEM überführt und für 24 h im Inkubator belassen. 30 μL (1 mg mL^{-1}) der entsprechenden Nanopartikelsorte wurden für 24 h hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 500 μL DPBS gewaschen und mit 300 μL MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, 1 mg mL^{-1}), 1 h lang bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die MTT-Lösung entnommen und mit 300 μL DMSO ersetzt und für weitere 30 min inkubiert. Schließlich wurden je 100 μL

(Aliquots) der DMSO-Lösung in je 3-Wells einer 96-Well-Platte für die spektrophotometrische Analyse bei $\lambda = 570$ nm übertragen. Die relative Zellviabilität wurde mit einer Kontrollgruppe (Mock) mit unbehandelten Zellen verglichen.

4.4.6 Einfrieren von HeLa-Zellen

Hierfür wurden die Zellen wie im Kapitel **4.4.2** behandelt. Die Zellen wurden jedoch nach der Zentrifugation, Entfernung des Überstandes mit 2 mL eines Gemisches aus DMEM, 10% FBS, 100 U mL⁻¹ Penicillin und Streptomycin und 10% (v/v) DMSO als Kryoprotektor redispergiert und in einem Kryoröhrchen für einen Tag bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen in den Stickstofftank überführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit synthetisierten CaP-NPs besitzen alle den gleichen Grundaufbau und können dann anschließend je nach Syntheseroute unterschiedlich funktionalisiert und behandelt werden. Das bedeutet der anorganische Kern dieser Partikel besteht unter anderem aus Ca, P sowie OH-Gruppen. Dieses Verhältnis wird bei der Vorbereitung der Lösungen für die anschließende Synthese bereits beim Abwiegen eingestellt. Da CaP-NPs wie in Kapitel **2.2.3** bereits beschrieben zur Agglomeration neigen, werden diese mit elektrosterischen Liganden stabilisiert. Hierfür eignen sich wegen der leichten Handhabung zum einen Polyethylenimin (PEI) mit einer positiven Ladung und zum anderen Carboxymethylcellulose (CMC) mit einer negativen Ladung. In Abb. **18** sind beide Stabilisatoren abgebildet. Es lässt sich gut erkennen, dass sie nicht nur wegen ihrer jeweiligen Ladung elektrostatisch gut stabilisieren, sondern wegen ihrer Größe und Verzweigung als Polyelektrolyte auch sterisch stabilisieren. Somit ist die Voraussetzung für das jeweilige Polymer neben der Stabilisation der CaP-NPs auch die Beladungskapazität für Biomoleküle auf der Oberfläche der Partikel zu gewährleisten.

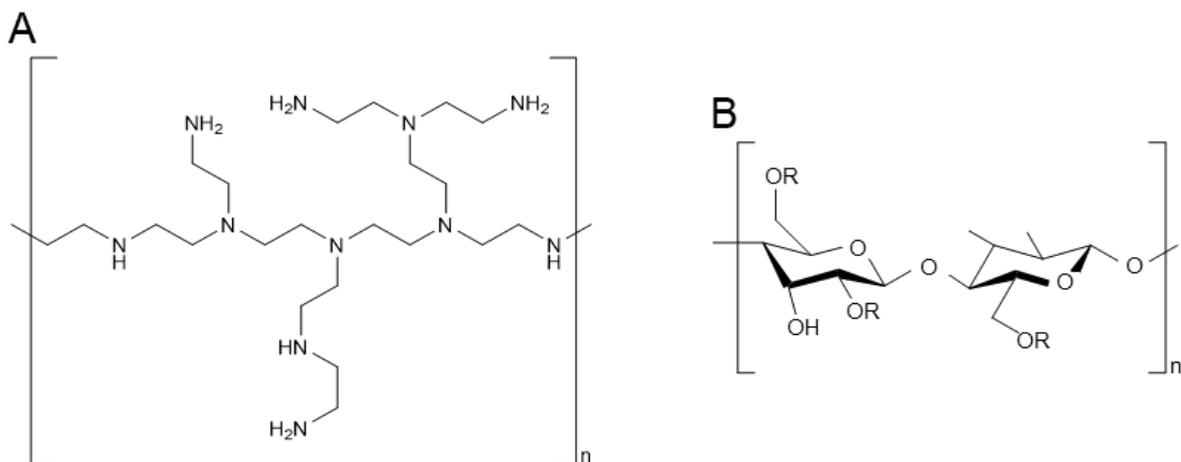


Abb. 18: Strukturformel des verzweigten Polyethylenimins (PEI) (A) und der Carboxymethylcellulose (CMC) (B).

Im nächsten Schritt wird zur weiteren Stabilisierung eine Silica-Schale angebracht. Ab diesem Schritt gibt es zwei Möglichkeiten für das weitere Synthesevorgehen. Werden

Peptide (OT-II), Adjuvanten (R848, CpG, Poly(I:C)) oder Virus-like-particles (VLP's) eingesetzt, werden diese vor dem Anbringen der Silica-Schale zu der polymerstabilisierten CaP-Dispersion hinzugegeben. Die anschließende Silica-Schale schützt zum einen zusätzlich vor Agglomeration, aber auch zum anderen vor Degradation der Biomoleküle im Inneren der NPs. In Abb. 19 ist der Synthesemechanismus des Silanisierens dargestellt. Hierfür werden Tetraorthosilikat (TEOS), Ammoniak-Lösung (7,8%) und Ethanol zur Dispersion der CaP-NPs hinzugegeben, die sich bereits aus dem vorherigen Syntheseschritt in Wasser befinden. Der erste Schritt befindet sich in einem Gleichgewicht, wo sich aus dem Wasser und der Ammoniak-Lösung ein Hydroxid-Ion und ein Ammonium-Ion bilden. Unter basischer Hydrolyse und anschließender Polykondensation wird das TEOS zu Si(OH)_4 hydrolysiert und im weiteren Reaktionsverlauf zu SiO_2 umgesetzt.^[90]

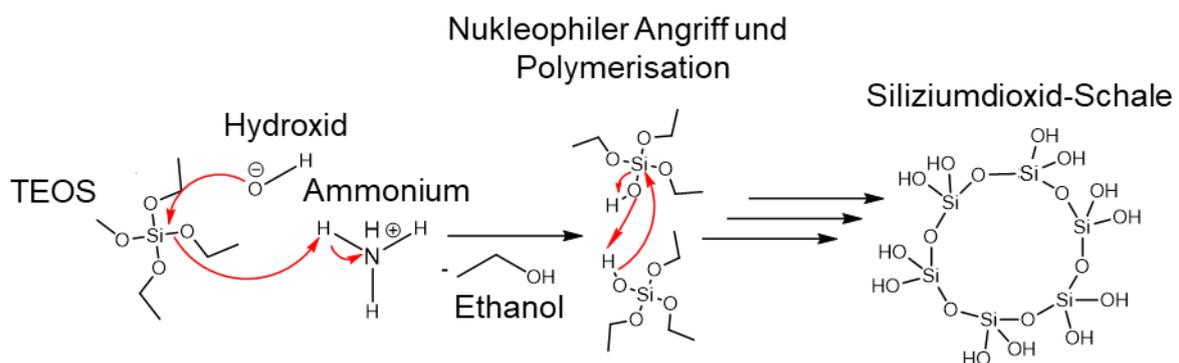


Abb. 19: Mechanismus des Silanisierens.^[90]

Zum besseren Verständnis der drei nacheinander folgenden Syntheseschritte dient die Abb. 20. Der zweite Schritt (Zugabe der Biomoleküle) kann je nach Aufbau der Partikel weggelassen werden und nach der Polymerschicht die Silica-Schale angebracht werden.

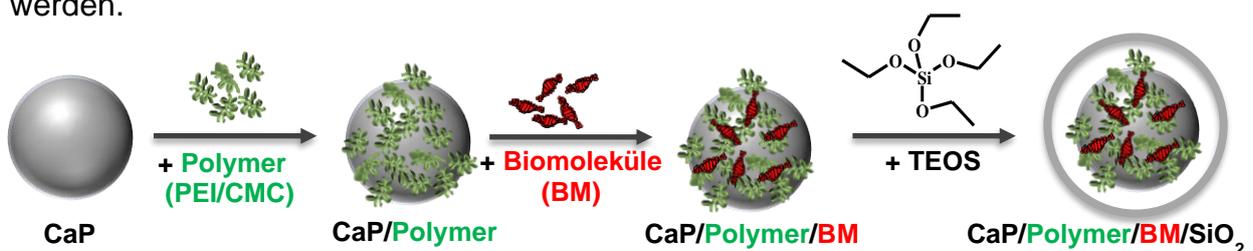


Abb. 20: Syntheschema des dreistufigen Vorgehens.

5.1 CaP-NPs als innovative Impfstoffplattform für die HIV-1 Forschung

Dieses Gebiet setzt sich aus drei verschiedenen Ansätzen zusammen, in denen die CaP-NPs unterschiedlich funktionalisiert und für die Aktivierung verschiedener Immunsystemzellen eingesetzt werden. Die Benennung der NPs stammt von der jeweiligen Zellart ab, die sie ansteuern sollen. Die *T-CaPs* (**Kapitel 5.1.1**) sollen die T-Zellen stimulieren, die *B-CaPs* (**Kapitel 5.1.2**) sollen die B-Zellen aktivieren und die *Viro-CaPs* (**Kapitel 5.1.3**) sollen eine zusätzliche Immunantwort hervorrufen. Um die Oberfläche der CaP-NPs mit Antikörpern (*T-CaPs*) oder mit dem Env-Hüll-Glycoprotein (*B-CaPs*) zu funktionalisieren, können zwei Varianten eingesetzt werden, die unspezifische und die spezifische Kopplung, wie in Abb. 21 schematisch dargestellt.

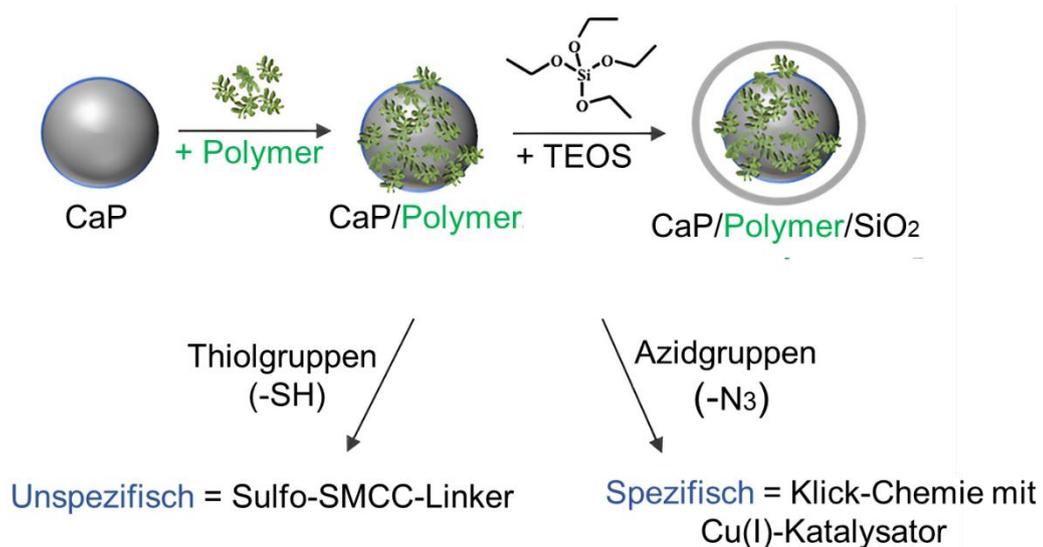


Abb. 21: Reaktionen mit einer unspezifischen und mit einer spezifischen Kopplung.

5.1.1 Synthese der oberflächenfunktionalisierten CaP-NPs anhand einer unspezifischen Kopplung (*T-CaPs*)

Wie im **Kapitel 5.1** beschrieben, können die CaP-NPs vor der Modifizierung mit einer Silica-Schale mit Peptiden und Adjuvanten beladen und die Oberfläche anschließend mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen gesättigt werden (Abb. 22; 1). Hierfür

wurden Thiolgruppen (**3**; rot) als Vorbereitung für die unspezifische Kopplung mit Antikörpern wie CD11c und der negativen Kontrolle dem *Isotype-control* eingesetzt, siehe Abb. **22**.

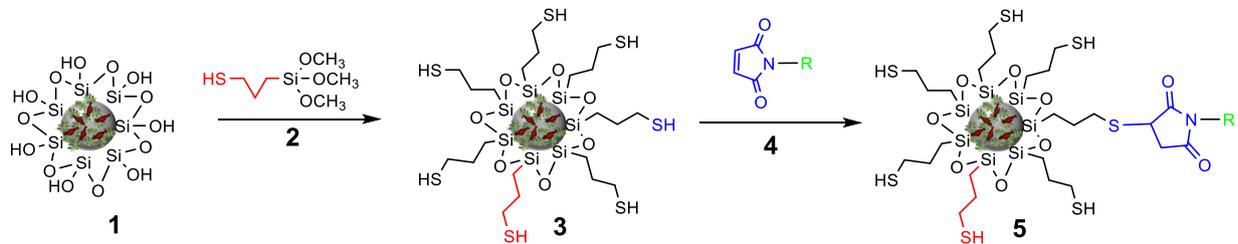


Abb. 22: Unspezifische Kopplung mit dem Sulfo-SMCC-Linker.

Zunächst wird MPS (**2**) zur Reaktion gegeben. Die käuflich erworbenen Allophycocyanin (APC, Wellenlänge bei 647 nm, tieferer Bereich) fluoreszenzmarkierten Antikörper (CD11c und *Isotype-control*) konnten für UV-Vis- und Zellaufnahmestudien eingesetzt werden. Bei der Inkubation mit dem Sulfo-SMCC-Linker, reagiert zunächst das N-Hydroxysuccinimid (NHS-Ester) mit den primären Aminen im Protein und bildet stabile Amidbindungen aus (siehe Abb. **23**). Abschließend reagiert das Maleimid (Abb. **22**; **4**; blau) mit seiner Doppelbindung mit den Thiolgruppen an der CaP-Partikeloberfläche (**3**). In Abb. **23** ist die Reaktion des Sulfo-SMCC-Linkers mit primären Aminen dargestellt.

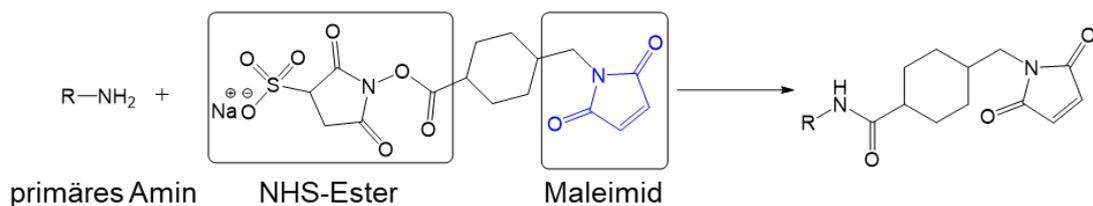


Abb. 23: Reaktion des NHS-Esters mit primären Aminen im Protein.

Nun können die CaP-NPs Stück für Stück weiter ausgebaut werden. In der ersten Variante werden diese zunächst nur mit den spezifischen Antikörpern beladen, die die Dendritischen Zellen (DZ) aktivieren sollen. In Tab. **1** sind die kolloidchemischen

Untersuchungen der Beladung mit den beiden unterschiedlichen Antikörpern zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammenfassung der Analyseergebnisse.

Probe	$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{kg m}^{-3}$	$c(\text{HAP}) / \text{kg m}^{-3}$	Partikelanzahl / Partikel pro m^{-3}	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta-Potential / mV	UV-Vis (Antikörper-APC) / kg m^{-3}
CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c (APC)	0,060	0,150	$1,5 \cdot 10^{17}$	84	124	0,3	+13	$2,0 \cdot 10^{-2}$
CaP/PEI/SiO₂-S-Isotype-control (APC)	0,066	0,165	$1,2 \cdot 10^{17}$	95	168	0,3	+23	$1,0 \cdot 10^{-2}$

Die Ca-Konzentration von $0,060 \text{ kg m}^{-3}$ für die CaP/PEI/SiO₂S-CD11c-NPs konnte anhand der AAS ermittelt werden, was einer Konzentration von $0,150 \text{ kg m}^{-3}$ für den stöchiometrischen Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entspricht. Mittels folgender Berechnung kann die Konzentration bestimmt werden.

$$c(\text{HAP}) = \frac{c(\text{Ca}) \cdot M(\text{HaP})}{10 \cdot M(\text{Ca})} \quad (13)$$

$$c(\text{HAP}) = \frac{0,060 \text{ kg m}^{-3} \cdot 1004,62 \text{ g mol}^{-1}}{10 \cdot 40,08 \text{ g mol}^{-1}} = 0,150 \text{ kg m}^{-3}$$

Um im nächsten Schritt das Volumen der CaP-NPs zu bestimmen, kann folgende Rechnung angewendet werden. Hierfür wird von sphärischen Partikeln ausgegangen und somit die Formel einer Kugel mit dem Radius des anorganischen Kerns (42 nm, siehe Tab. 1, REM (d) = 84 nm), der mittels REM bestimmt wurde, angewendet.

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (r(NP))^3 \quad (14)$$

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (42 \cdot 10^{-9} m)^3 = 3,10 \cdot 10^{-22} m^3$$

Für die Bestimmung der Masse eines CaP-NP wird die Dichte des stöchiometrischen Hydroxylapatits (HAP, 3140 kg m⁻³) eingesetzt.

$$m(NP) = \rho(\text{HaP}) \cdot V(NP) \quad (15)$$

$$m(NP) = 3140 \text{ kg m}^{-3} \cdot (3,10 \cdot 10^{-22} m^3) = 9,74 \cdot 10^{-19} \text{ kg}$$

Mit der Konzentration des Hydroxylapatits und der Masse kann abschließend die Anzahl der NPs in der Dispersion (Gleichung 16) ermittelt werden.

$$\text{Anzahl NP pro } m^3 = \frac{c(\text{HaP})}{m(NP)} \quad (16)$$

$$\text{Anzahl NP pro } m^3 = \frac{0,15 \text{ kg m}^{-3}}{9,74 \cdot 10^{-19} \text{ kg}} = 1,54 \cdot 10^{17}$$

Um die Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Partikeloberfläche zu quantifizieren, wurden diese mittels UV-Vis-Spektroskopie (APC; Wellenlänge 647 nm) vermessen. Aus den gemessenen Werten der Antikörper-Konzentration kann die Antikörper-Anzahl pro m⁻³ bestimmt werden. Hierfür wird zunächst die gemessene Konzentration durch die Molare Masse des jeweiligen Allophycocyanin (APC) fluoreszenzmarkierten Antikörpers, M_w (CD11c-APC) = 225 kDa und M_w (Isotype-control-APC) = 230 kDa) geteilt, um das Ergebnis mit der Avogadro-Konstante ($6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) zu multiplizieren. In den Gleichungen 17, 18 und 19 ist eine Beispielrechnung für die

CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c dargestellt, für alle anderen Partikelsysteme wurden die gleichen Berechnungen durchgeführt.

$$\frac{0,02 \frac{g}{L}}{225.000 \frac{g}{mol}} = 8,89 \cdot 10^{-8} \frac{mol}{L} \quad (17)$$

$$CD11c - \text{Anzahl in Dispersion} = \left(8,89 \cdot 10^{-8} \frac{mol}{L}\right) \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol} = 5,35 \cdot 10^{16} \frac{1}{L} \quad (18)$$

Um im nächsten Schritt noch die Anzahl an CD11c-Molekülen pro CaP-NPs zu bestimmen, muss die berechnete Anzahl an CD11c-Molekülen durch die Anzahl an CaP-NP in der Dispersion dividiert werden.

$$CD11c - \text{Anzahl pro CaP} - NP = \frac{5,35 \cdot 10^{16} \frac{1}{L}}{1,54 \cdot 10^{14} \frac{1}{L}} = 347 \quad (19)$$

Somit ergeben sich für die CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs eine Anzahl von je $2,6 \cdot 10^{19} \text{ m}^{-3}$ Dispersion und 223 pro CaP-NP.

Anhand der REM-Aufnahmen in Abb. **24** kann der anorganische Kern der beiden Partikelsorten abgebildet werden. Dabei weisen die CaP-NPs eine annähernd sphärische Morphologie auf. Werden die beiden REM-Abbildungen der beiden Partikelsorten miteinander verglichen, fällt auf, dass der Durchmesser der CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs um ca. 11 nm größer ist als der Durchmesser der CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c-NPs. Die Abmessungen der 50 Partikelgrößen konnten mit Hilfe des Computerprogramms *ImageJ* realisiert und ein mittlerer Durchmesser ermittelt werden. Diese Beobachtung lässt sich auch anhand der DLS-Messungen in Abb. **25** bestätigen.

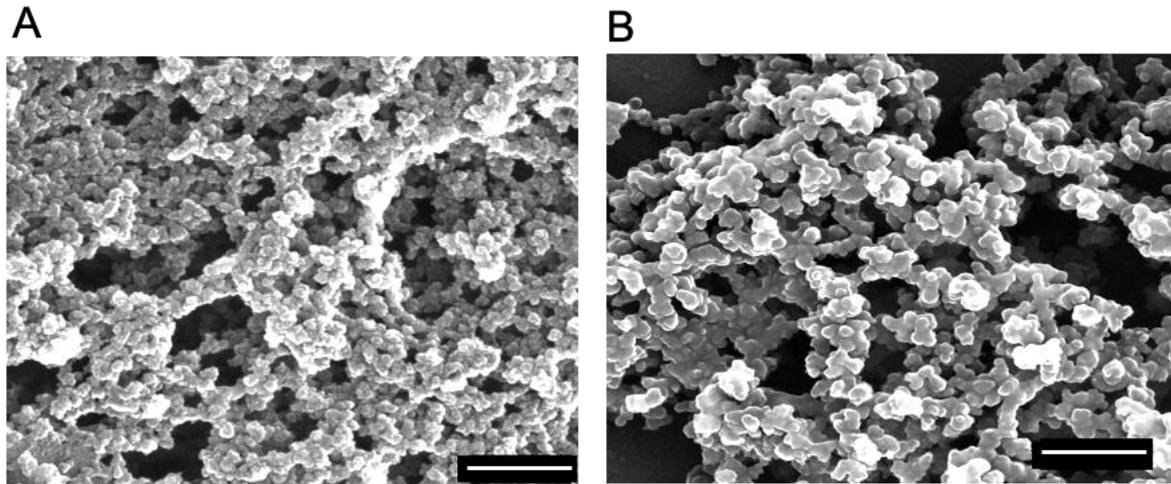


Abb. 24: REM-Darstellungen der (A) CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c- und der (B) CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs. Maßstab: 500 nm.

Mit DLS-Messungen kann der hydrodynamische Durchmesser sowie die Stabilität der CaP-NPs untersucht werden. Die Größen der REM- und DLS-Untersuchungen können dadurch abweichen, dass bei der DLS der hydrodynamische Durchmesser ermittelt wird. In **Abb. 25** können die Anzahlverteilungen der DLS-Messungen der CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c- und CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs von 124 nm und 168 nm, mit einem PDI von 0,3 entnommen werden. Der gemessene PDI weist auf ein monodisperses System hin. Wird das Zeta-Potential von über +13 mV bei beiden Partikeln betrachtet, kann von einer guten Stabilität gesprochen werden.

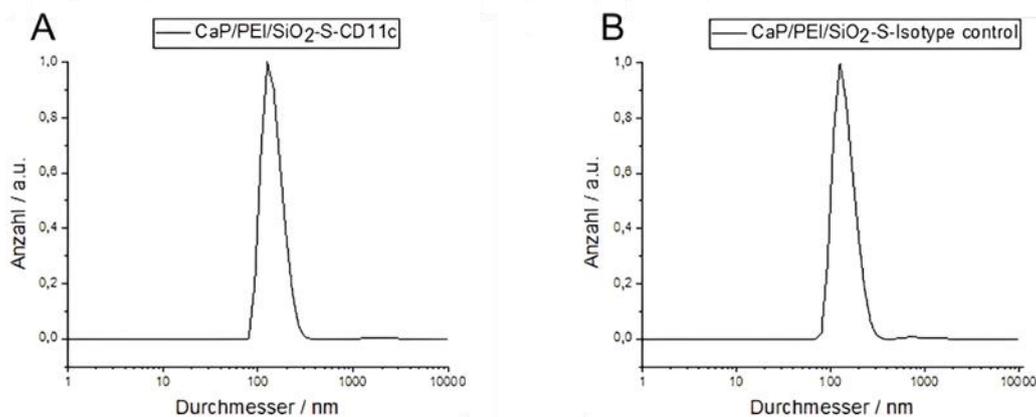


Abb. 25: Normierte Anzahlverteilungen der synthetisierten (A) CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c- und der (B) CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs.

Abschließend wurden für *in vitro*-Untersuchungen Fluoreszenz- und CLSM-Aufnahmen durchgeführt, um die Aufnahme durch HeLa-Zellen zu untersuchen. Nach der Zugabe von 30 μL NP-Dispersion und einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und an den Mikroskopen untersucht. In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen im Hellfeld (Abb. 26 a) fokussiert und in den beiden Fluoreszenzkanälen (Abb. 26 b) konnten die APC-fluoreszenzmarkierten Antikörper auf der CaP-Nanopartikeloberfläche innerhalb der Zellen lokalisiert werden.

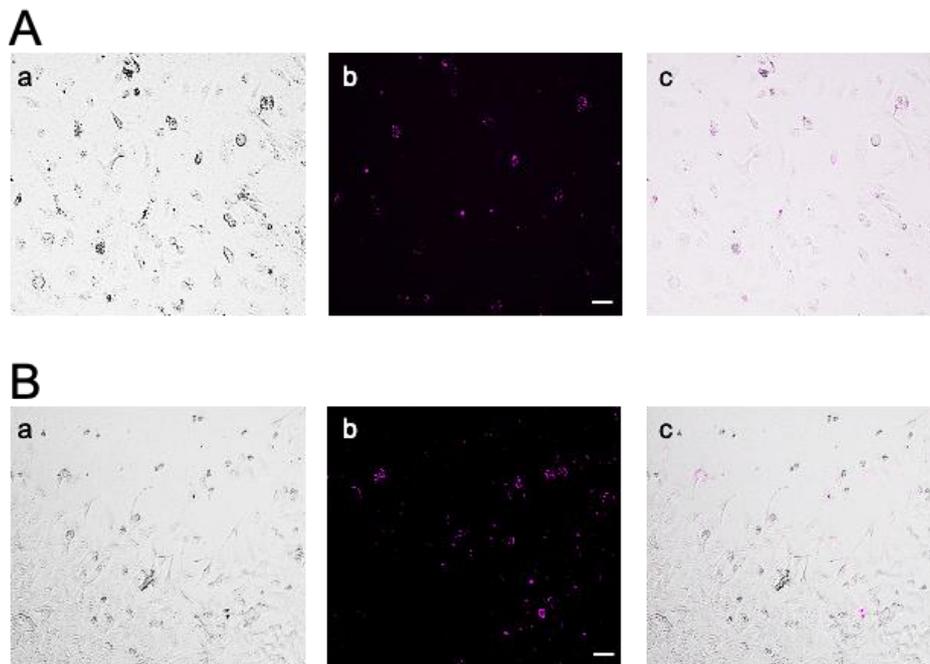


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der (A) CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c- und der (B) CaP/PEI/SiO₂-S-Isotype-control-NPs. (A;a und B;a) Hellfeld, (A; b und B; b) fluoreszierende CaP-NPs und (A;c und B;c) Überlagerung beider Kanäle. Maßstab: 50 μm .

Um erkennen zu können, ob sich alle CaP-NPs im intrazellulären Raum der HeLa-Zellen befinden, wurden CLSM-Aufnahmen durchgeführt. Diese Untersuchung ermöglicht es z-Schnitte durch die Zelle zu erstellen (Abb. 27). Folglich kann entschieden werden ob sich die Partikel innerhalb der Zelle oder auf der Zellmembran befinden. Die Vorbereitungen der Zellen für die CLSM wurden in dieser Arbeit wie bei van der Meer *et al.* beschrieben durchgeführt.^[201] Hierzu wurden wie für die Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen die HeLa-Zellen für 24 h mit 30 μL der CaP-NPs

für 24 h inkubiert. In vorherigen Arbeiten haben unter anderem Fernando *et al.*^[202] gezeigt, dass PEI-stabilisierte CaP-NPs innerhalb von 1 h die Zellmembran durchdringen können. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zum Fixieren mit wässrigem Paraformaldehyd (PFA; 3,7%) für 20 min bei RT behandelt. Anschließend folgte die Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin und die Zellkernfärbung mit Hoechst-33342 in DPBS.

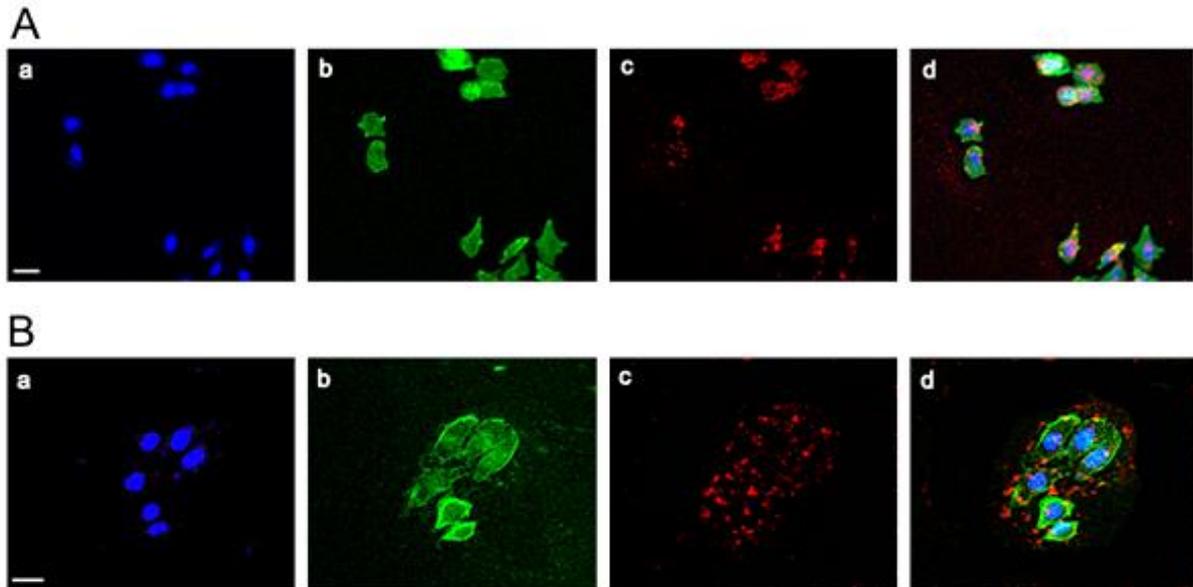


Abb. 27: CLSM mittels z-Schnitten der (A) CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c- und der (B) CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs. (A;a und B;a) Kernfärbung mit Hoechst-33342, Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (A;b und B;b), fluoreszierende Antikörper mit APC markiert (A;c und B;c) und Überlagerung aller Kanäle (A;d und B;d). Maßstab: 20 μ m.

Durch die Überlagerungsbilder in Abb. 27 d ist zu erkennen, dass die rot fluoreszierenden CaP/PEI/SiO₂-S-CD11c-NPs (APC) deutlich von den Zellen aufgenommen werden, im Gegensatz zu den CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs. Viele der CaP/PEI/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs sind an der Zellmembran und nicht innerhalb der Zelle lokalisiert.

Im nächsten Schritt wurden die CaP-NPs mit OT-II-Peptiden beladen, mit einer Silica-Schale stabilisiert und anschließend mit den beiden zuvor eingesetzten Antikörpern

auf der CaP-NPs-Oberfläche funktionalisiert. In dieser Versuchsreihe wurden Antikörper ohne die Fluoreszenzmarkierung mit APC angewendet, sodass nur eine Messung der OT-II-Peptidkonzentration ($\lambda = 280 \text{ nm}$) vor der Kopplung der Antikörper möglich war. In Tab. 2 ist eine Zusammenfassung der Charakterisierungsmethoden dargestellt.

Tab. 2: Zusammenfassung der Analyseergebnisse.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel pro m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV	Nano Drop (OT-II) / kg m ⁻³
CaP/PEI/ OT-II/ SiO₂-SH	0,089	0,223	1,6·10 ¹⁶	109	108	0,4	+21	3,0·10 ⁻²
CaP/PEI/ OT-II/ SiO₂-S- CD11c (APC)	0,073	0,183	1,2·10 ¹⁷	98	126	0,3	+20	-
CaP/PEI/ OT-II/ SiO₂-S- Isotype- control (APC)	0,069	0,173	1,2·10 ¹⁶	102	167	0,4	+18	-

Beide Partikelsorten wurden bis zur Kopplung gleichbehandelt, das bedeutet sie haben den gleichen Aufbau (CaP/PEI/OT-II/SiO₂-SH) und die gleiche Menge an OT-II-Peptid. Der Durchmesser des anorganischen Kerns konnte anhand der REM-Abbildungen und mittels der Software *ImageJ* vermessen werden. Hierbei ist der Durchmesser der CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-CD11c-NPs nur minimal (3 nm) geringer als die der CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs. Abb. 28 zeigt die REM-Aufnahmen der Antikörper-funktionalisierten CaP-NPs. Auch hier kann eine sphärische Morphologie der Partikelsysteme angenommen werden.

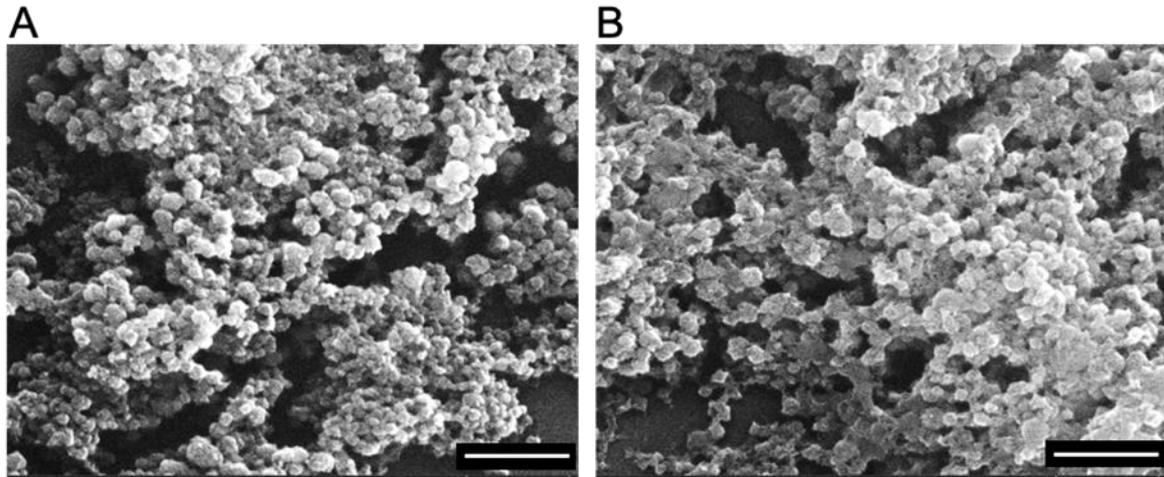


Abb. 28: REM-Darstellungen des anorganischen Kerns der (A) CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-CD11c- und der (B) CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs. Maßstab: 500 nm.

Um den hydrodynamischen Durchmesser bestimmen zu können, wurden DLS-Messungen mit den CaP-NPs-Dispersionen durchgeführt und in Abb. 29 aufgetragen. Durch die Auftragungen der Größenverteilungen und PDI-Messungen kann bei den CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-CD11c-NPs von einem monodispersen System (0,3) und bei den CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs von dem Beginn eines polydispersen Systems (0,4) gesprochen werden. Das positive Zeta-Potential ist auf das positiv geladene PEI zurückzuführen und liegt zwischen 18 und 20 mV.

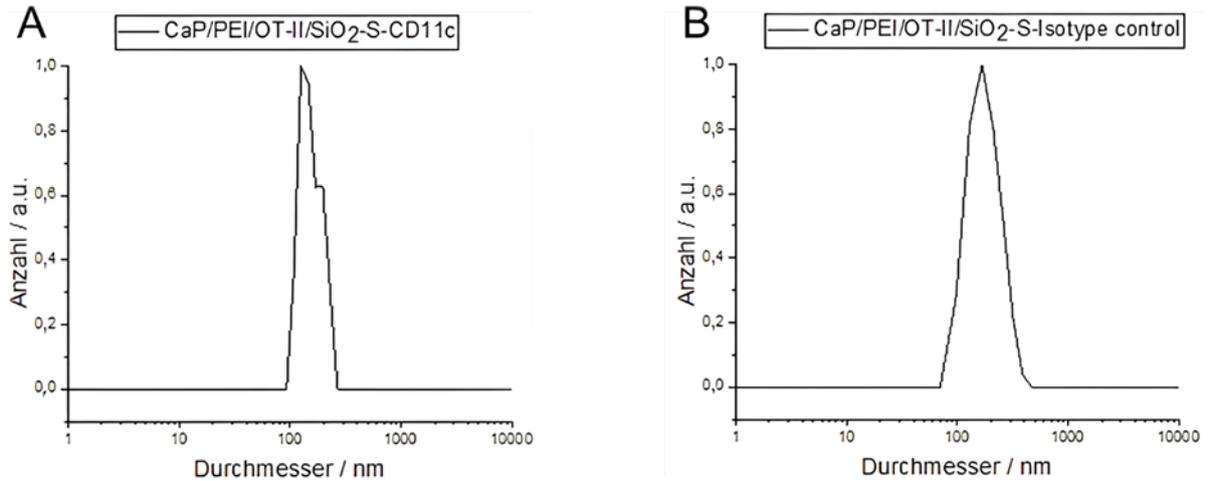


Abb. 29: Normierte Anzahlverteilungen der synthetisierten (A) CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-CD11c- und der (B) CaP/PEI/OT-II/SiO₂-S-Isotype-control-NPs.

Im letzten Schritt wurden die CaP-NPs mit einem 1:1-Gemisch des OT-II-Peptids und dem entsprechenden Adjuvanten wie Poly(I:C), R848 oder CpG vermischt und abschließend mit den beiden APC-fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD11c bzw. *Isotype-control* funktionalisiert. In Tab. 3 werden die Charakterisierungsergebnisse dargestellt.

Tab. 3: Zusammenfassung der Analyseergebnisse.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel pro m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV	Nano Drop (Antikör- per- APC)/ kg m ⁻³
CaP/PEI/OT- II+Poly(I:C)/ SiO₂-S- CD11c (APC)	0,094	0,236	2,8·10 ¹⁷	80	146	0,3	+18	6,0·10 ⁻²
CaP/PEI/OT- II+Poly(I:C)/ SiO₂-S- Isotype- control (APC)	0,068	0,171	4,4·10 ¹⁷	62	161	0,4	+14	9,0·10 ⁻²
CaP/PEI/OT- II+R848/ SiO₂-S- CD11c (APC)	0,095	0,238	1,4·10 ¹⁸	47	108	0,2	+19	5,0·10 ⁻²
CaP/PEI/OT- II+R848/ SiO₂-S- Isotype- control (APC)	0,078	0,196	7,2·10 ¹⁷	55	138	0,3	+21	6,0·10 ⁻²
CaP/PEI/OT- II+CpG/ SiO₂-S- CD11c (APC)	0,090	0,226	1,1·10 ¹⁸	50	111	0,4	+17	6,0·10 ⁻²
CaP/PEI/OT- II+CpG/ SiO₂-S- Isotype- control (APC)	0,062	0,155	5,1·10 ¹⁷	57	168	0,4	+19	7,0·10 ⁻²

Aus den obigen gemessenen Antikörperkonzentrationen, die anhand ihrer Fluoreszenz mittels UV-Vis aufgenommen werden konnten, konnte im nächsten Schritt die jeweilige Menge an Antikörpern pro m⁻³ Dispersion und pro CaP-NP bestimmt

werden. Die Ergebnisse für die jeweiligen Partikelsysteme sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Anzahl der Antikörper in der Dispersion und pro CaP-NPs.

Probe	APC-Antikörper pro m ⁻³	APC-Antikörper pro Partikel
<i>CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-CD11c (APC)</i>	1,6·10 ²⁰	574
<i>CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-Isotype-control (APC)</i>	2,4·10 ²⁰	542
<i>CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-CD11c (APC)</i>	1,3·10 ²⁰	96
<i>CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-Isotype-control (APC)</i>	1,6·10 ²⁰	220
<i>CaP/PEI/OT-II+CpG/SiO₂-S-CD11c (APC)</i>	1,6·10 ²⁰	146
<i>CaP/PEI/OT-II+CpG/SiO₂-S-Isotype-control (APC)</i>	1,8·10 ²⁰	359

Anhand der REM-Aufnahmen (**Abb. 30**) konnte die sphärische Morphologie der jeweiligen Partikelsorte abgebildet werden. Es ist zu erkennen, dass die Partikelgrößen der *Isotype-control*-funktionalisierten CaP-NPs im Schnitt um 8 nm größer ausfallen als die Partikel mit CD11c-Funktionalisierung. Dies hat eine unterschiedliche Beladung zur Folge. Denn kleinere Partikel haben eine geringere Oberfläche zum Koppeln von Antikörpern. Es kann jedoch auch ein Indiz sein, dass sich mehr Peptid und Adjuvant im Inneren der CaP-NPs befinden. Diese Menge kann jedoch durch die Anbringung der Antikörper auf der Oberfläche mittels NanoDrop nicht eindeutig bestimmt werden. Außerdem handelt es sich um ein 1:1-Gemisch aus Peptid und Adjuvant, sodass an dieser Stelle keine eindeutige Aussage über die Konzentration gemacht werden kann.

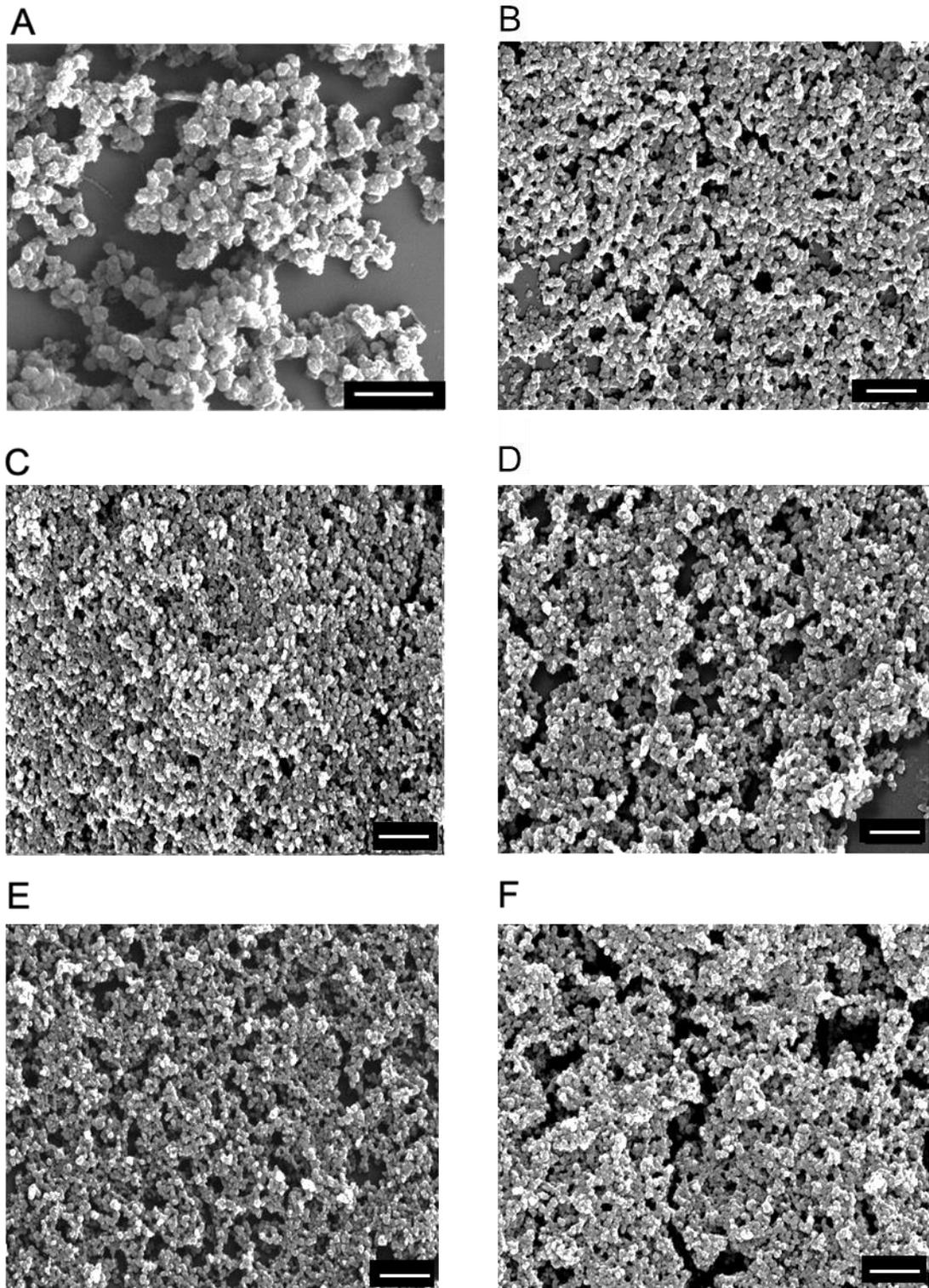


Abb. 30: REM-Aufnahmen der (A) CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-CD11c-, der (B) CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-*Isotype-control*-, der (C) CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-CD11c-, der (D) CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-*Isotype control*-, der (E) CaP/PEI/OT-II+CpG/SiO₂-S-CD11c- und der (F) CaP/PEI/OT-II+CpG/SiO₂-S-*Isotype-control*-NPs. Maßstab: 500 nm.

Im nächsten Schritt wurden die Partikelsorten mittels DLS in einer Anzahlverteilung (Abb. 31) auf ihren hydrodynamischen Durchmesser hin untersucht.

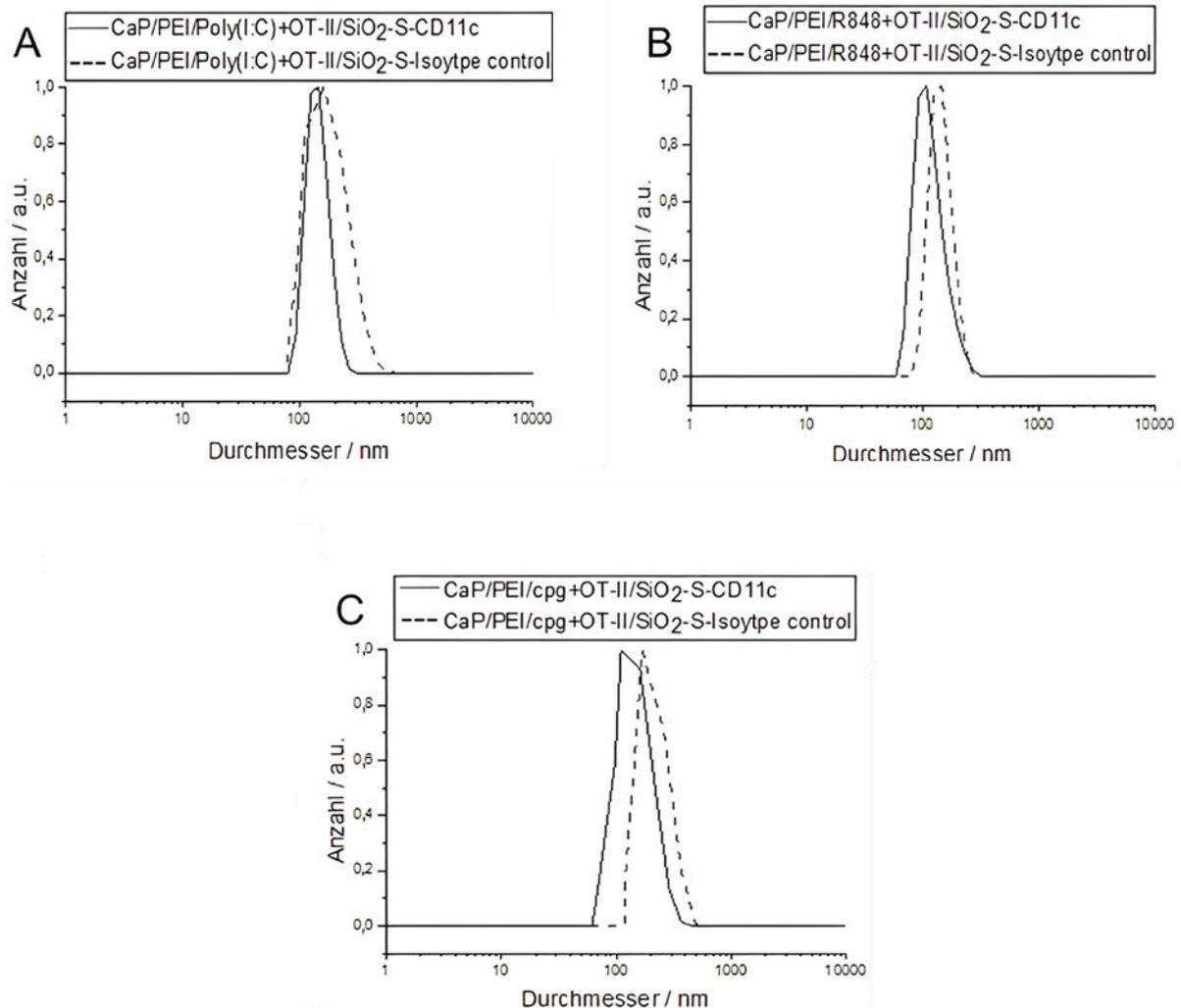


Abb. 31: Normierte Anzahlverteilungen der sechs verschiedenen Partikelsysteme im Vergleich mit den entsprechenden Antikörpern. In (A) die CaP-NPs mit Poly(I:C), (B) die Partikel mit R848 beladen und (C) die Beladung der Partikel mit CpG.

Der PDI (0,4) weist auf eine polydisperse Größenverteilungen hin, was sich in den Anzahlverteilungen widerspiegelt. Die hydrodynamischen Durchmesser der *Isotype-control*-funktionalisierten NPs sind zwischen 15 nm – 57 nm größer als die CD11c-funktionalisierten NPs, was die größeren Kerndurchmesser der REM-Aufnahmen bestätigt. Nach der kolloidchemischen Analyse wurden die fluoreszenzmarkierten

CaP-NPs auf ihre Effizienz in Zellaufnahmen nach einer Inkubation von 24 h untersucht. Die rote Fluoreszenz der APC-markierten Antikörper konnte im TRITC-Kanal sichtbar gemacht werden. Werden das Hellfeldbild (Abb. 32 a) und der TRITC-Kanal (Abb. 32 b) überlagert, können die CaP-NPs innerhalb der Zellen in Abb. 32 c lokalisiert werden. Durch die Wechselwirkung der negativ geladenen Zellmembran und den positiv geladenen CaP-NPs, werden diese bevorzugt von den HeLa-Zellen aufgenommen.

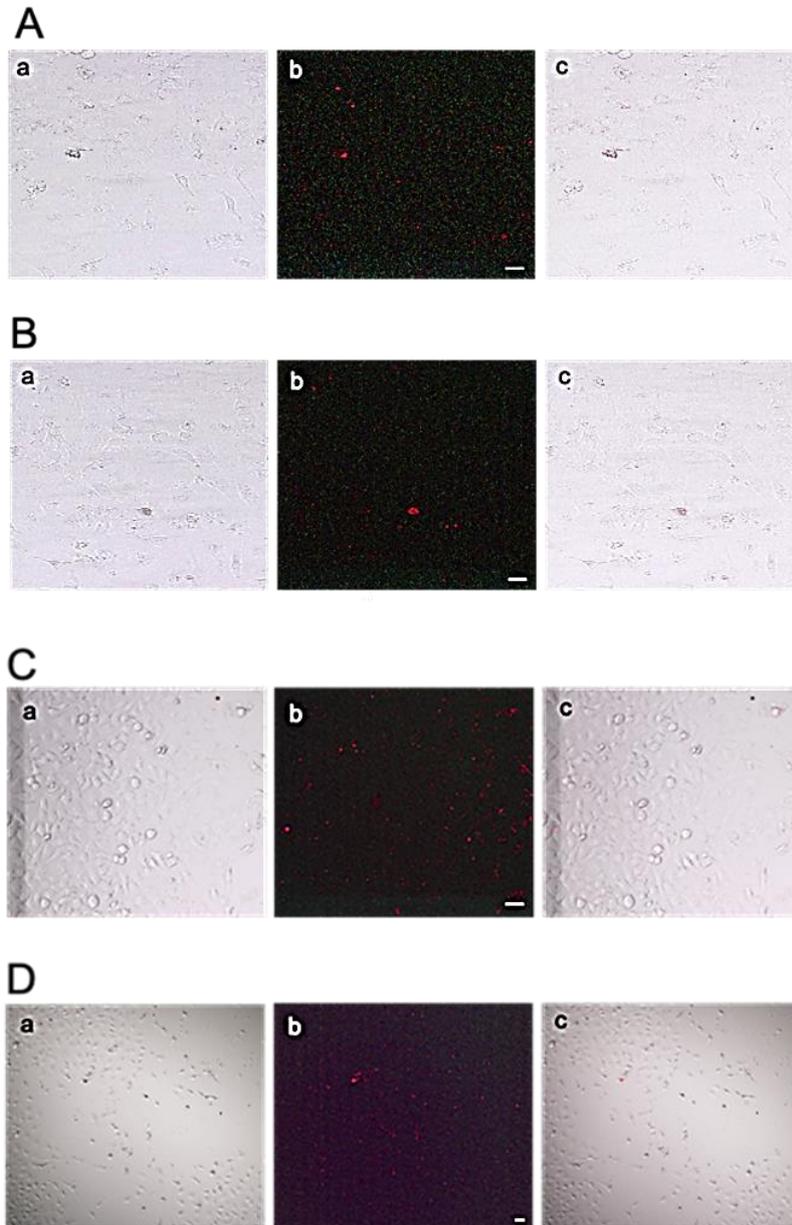


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der (A) CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-CD11c-, der (B) CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-*Isotype-control*-, der (C) CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-CD11c-, der (D) CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-*Isotype-control*. Maßstab: 50 μ m.

Nachdem die CaP-NPs anhand der Fluoreszenzaufnahmen in **Abb. 32** innerhalb der Zellen bestätigt werden konnten, wurde die genaue Lokalisation der Partikel innerhalb der Zellen mit z-Schnitten mittels CLSM (**Abb. 33**) untersucht. Wie anhand der roten Punkte (APC) sichtbar, befinden sich die Partikel im intrazellulären Raum der HeLa-Zellen.

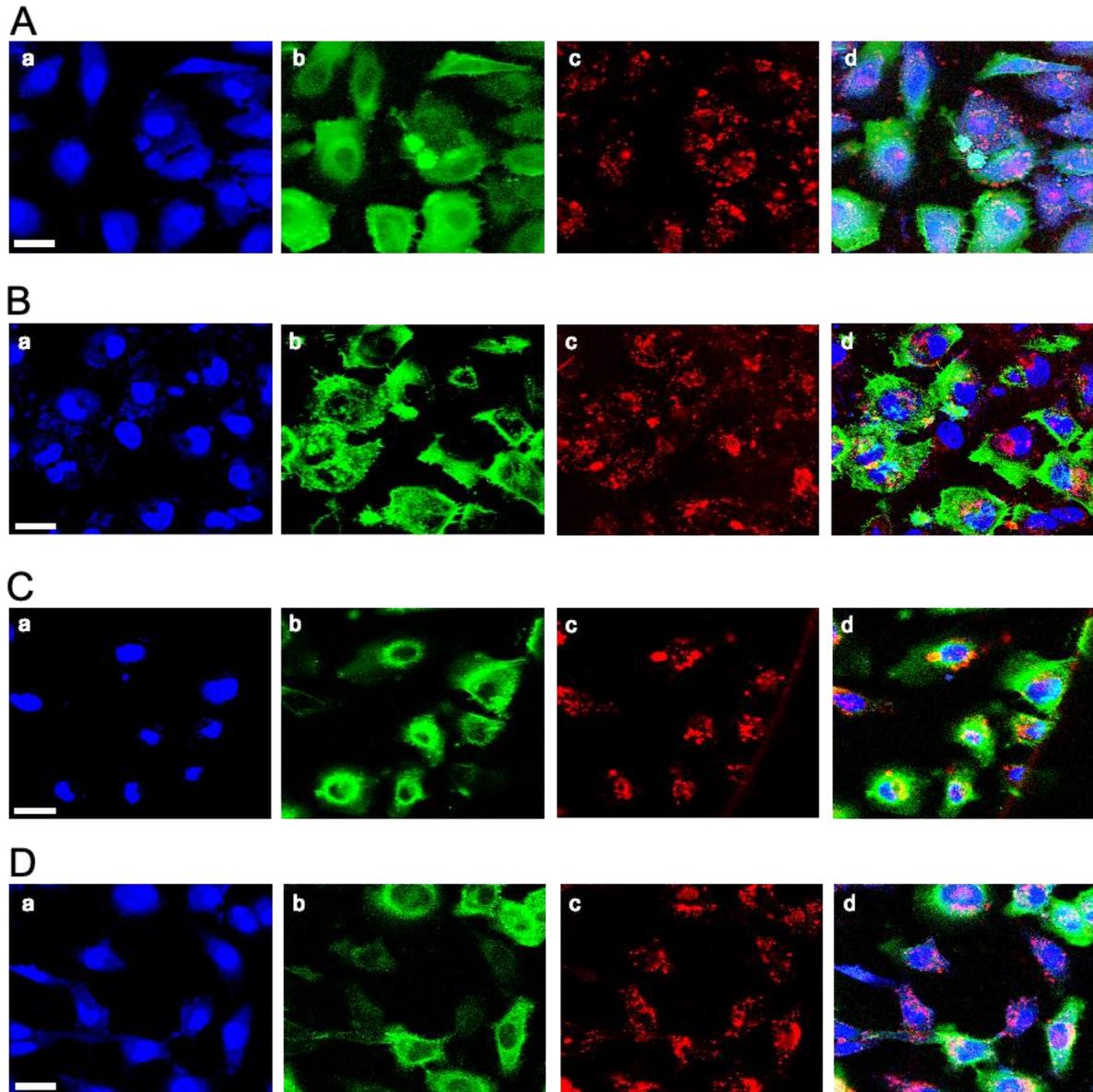


Abb. 33: CLSM der (A) CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-CD11c-, der (B) CaP/PEI/OT-II+Poly(I:C)/SiO₂-S-*Isotype-control*-, der (C) CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-CD11c-, der (D) CaP/PEI/OT-II+R848/SiO₂-S-*Isotype-control*. Kernfärbung mit Hoechst-33342 (a), Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (b), fluoreszierende Antikörper mit APC-Markierung (c) und Überlagerung aller Kanäle (d). Maßstab: 20 µm.

Durch die rote Fluoreszenz innerhalb der Zellen kann ebenfalls von einem stabilen CaP-NPs-Antikörper-System gesprochen werden, der auch nach der Zellaufnahme erhalten bleibt. Somit bestätigt sich die Annahme, dass diese Art von funktionalisierten CaP-NPs als Trägersysteme für Biomoleküle fungieren und die Zellaufnahme ermöglichen.

Nach der kolloidchemischen Untersuchung und den Aufnahmestudien in HeLa-Zellen, sollen die synthetisierten *T-CaPs* in der Virologie (Uniklinik Erlangen durch Herrn Weingärtner und Herrn Dr. Temchura) in zukünftigen Experimenten *in vitro*-analysiert werden. Hierfür wird die Effizienz der Aktivierung der Dendritischen Zellen (DZ) auf die entsprechende Beladung der *T-CaPs* mit den unterschiedlichen Adjuvanten (Poly(I:C), R848 und CpG) sowie dem OT-II-Peptid untersucht. In abschließenden *in vivo*-Untersuchungen werden Mäuse mit den verschieden beladenen *T-CaPs* immunisiert und das Serum mittels FACS analysiert.

5.1.2 Synthese der oberflächenfunktionalisierten CaP-NPs mittels Klick-Chemie (*B-CaPs*)

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, sind die CaP-NPs auch in diesem Abschnitt mit Polymeren wie PEI bzw. CMC stabilisiert, mit Silanolgruppen (**1**) funktionalisiert und werden anschließend mit dem Env-Hüll-Glycoprotein behandelt. In Abb. 34 werden die einzelnen Syntheseschritte schematisch dargestellt.

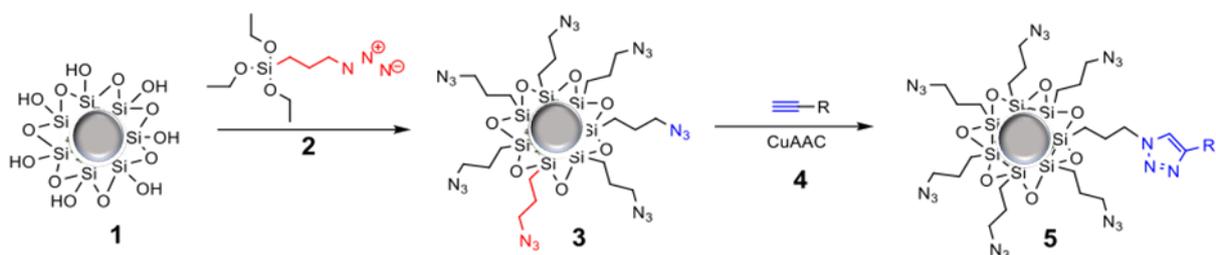


Abb. 34: Spezifische Kopplung mittels Klick-Chemie.

Für die sogenannte spezifische Kopplung werden Azidgruppen (**3**) auf der Oberfläche der CaP-NPs benötigt. Um das zu erreichen wird 3-(Azidopropyl)triethoxysilan eingesetzt (**2**). Dabei reagiert die Azidgruppe (**rot**) mit den Silanolgruppen auf der CaP-Partikeloberfläche (**1**), sodass nach der Aufreinigung der CaP-NPs nur gebundene Azidgruppen zurückbleiben (**3**). Für die Synthese der *B*-CaPs werden rekombinante Env-Hüll-Glycoproteine benötigt, die eine ortsspezifische Aldehydgruppe (C-terminal) tragen (siehe Abb. **35**). Das ist für den weiteren Verlauf der Synthese von großer Bedeutung um eine sogenannte bioorthogonale Reaktion zu gewährleisten. Diese bioorthogonale Syntheseroute wurde von C.R. Bertozzi entdeckt und kann in selektiven chemischen Reaktionen eingesetzt werden.^[203,204] Der eingesetzte Propargyl-PEG3-Aminoxy-Linker (Abb. **35**) reagiert in einer Oximreaktion (über Nacht, 37°C, 400 rpm) mit den C-terminalen Aldehydgruppen der Env-Trimere, sodass endständige Alkingruppen erhalten werden.

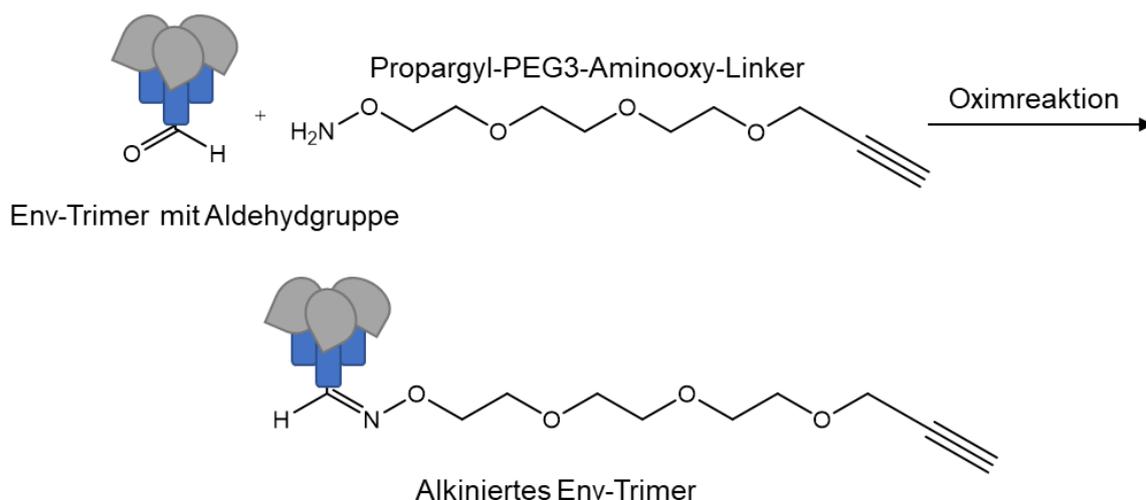


Abb. 35: Oximreaktion des Env-Trimers mit dem Propargyl-PEG3-Aminoxy-Linker.

In blau (Abb. **34**) ist die Alkingruppe verdeutlicht. Mit Hilfe eines Cu(I)-Katalysators (**4**) können in einer Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), die Alkingruppen an den C-terminalen Env-Proteinen mit den Azidgruppen auf der CaP-Partikeloberfläche (**3**) reagieren. Abschließend entsteht durch eine Cycloaddition das Produkt (**5**).

5.1.2.1 Klick-Reaktionsstudien zwischen den Env-His₈- und Env-Ald₆-Proteinen

Um zu zeigen, dass die verschiedenen funktionellen Gruppen (His- und Aldehydgruppen) an den Env-Proteinen Einfluss auf die Oxim- und anschließende Klick-Reaktion haben, wurden diese mit unterschiedlich fluoreszierenden AlexaFluor®-Farbstoffen (AF) gefärbt. Das Env-His₈ (8-fache Hisgruppe, *wild-type*) mit AF488 (grün) und das Env-Ald₆ (6-fache Aldehydgruppe) mit AF647 (rot). Zu diesem Zweck wurde das sogenannte Zweifarben-Experiment durchgeführt, um zu verdeutlichen, dass die Oximreaktion spezifisch abläuft und nur mit den Aldehydgruppen des Env-Ald₆ reagiert, sodass auch nur Env-Proteine mit der gewünschten Alkingruppe (nach der Oxim-Reaktion) an die CaP-Nanopartikeloberfläche angeklickt werden können, wie in Abb. 36 dargestellt.

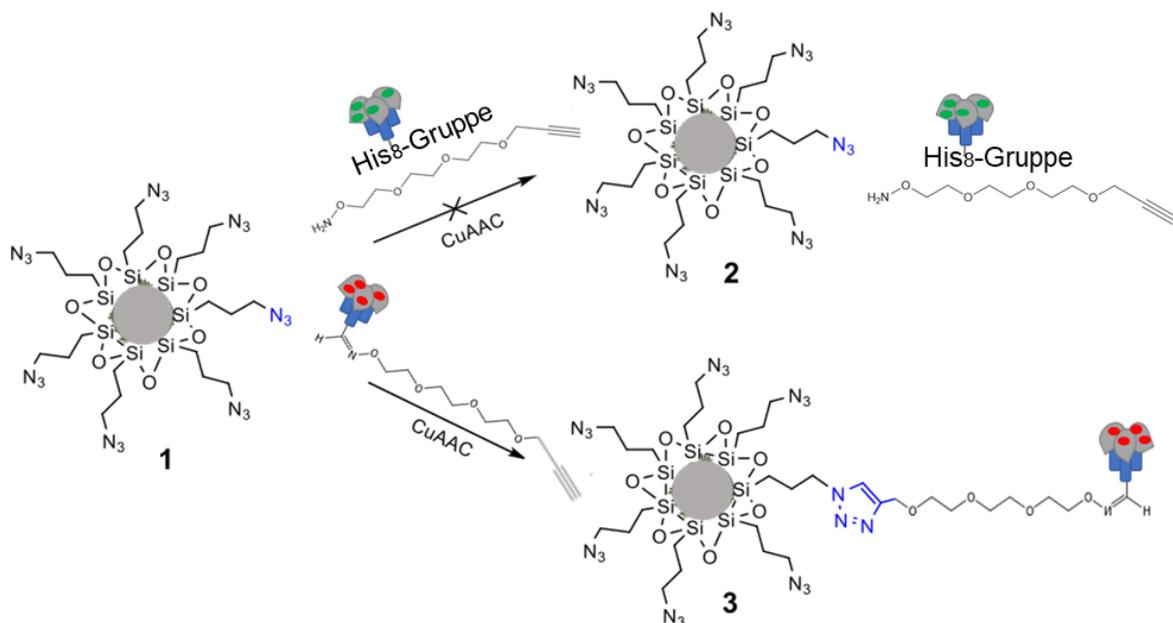


Abb. 36: Reaktionsschema von ungebundenem Env-His₈ und dem Propargyl-PEG₃-Aminooxy-Linker (grün, 2) und vom gebundenen alkylierten Env-Ald₆ (rot, 3) nach der Klick-Reaktion.

Das Env-His₈ wird durch nicht-kovalente Adsorption an die NPs gebunden (2), wobei das Env-Ald₆ zu einer spezifischen Kopplung an die Nanopartikeloberfläche führt (3). Die PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs wurden hinsichtlich ihres Ca-Gehalts (AAS), ihrer Größe (REM), ihres hydrodynamischen Durchmessers und ihrer Stabilität (DLS) sowie ihrer Beladung mit Env-Proteinen (UV-Vis) analysiert (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Zusammenfassung der charakterisierten kationischen und anionischen CaP-NPs.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Pote- ntial / mV	UV-Vis (AF488/ AF647) / kg m ⁻³
CaP/PEI/ SiO₂-N₃/ Env-His₈	0,013	0,032	1,8·10 ¹⁷	61	50	0,4	+19	-
CaP/PEI/ SiO₂-N₃- Env-Ald₆	0,023	0,058	2,8·10 ¹⁶	69	104	0,4	+25	1,5·10 ⁻²
CaP/CMC /SiO₂-N₃/ Env-His₈	0,007	0,017	5,3·10 ¹⁶	58	61	0,4	-20	-
CaP/CMC /SiO₂-N₃- Env-Ald₆	0,012	0,031	3,8·10 ¹⁶	54	80	0,4	-17	1,6·10 ⁻²

Um die Anzahl der gebundenen Env-Proteine auf der Partikeloberfläche zu bestimmen, wurden diese wie oben erwähnt mit AF-Farbstoffen markiert und mittels UV-Vis-Spektroskopie vermessen. Hierfür wird die Molare Masse eines Env-Trimers ($M_w = 420$ kDa) verwendet und wie in Gleichung **17**, **18** und **19** weiter verfahren. In Abb. **37** kann die annähernd sphärische Morphologie der funktionalisierten CaP-NPs dargestellt werden. Nach der Abmessung von 50 Partikeln mittels *ImageJ* konnte bei den vier Partikelsorten ein durchschnittlicher Durchmesser von 57 nm bestimmt werden. Dabei fällt die Größe der CMC-stabilisierten CaP-NPs geringer aus (3 nm - 15 nm) als bei den PEI-stabilisierten NPs.

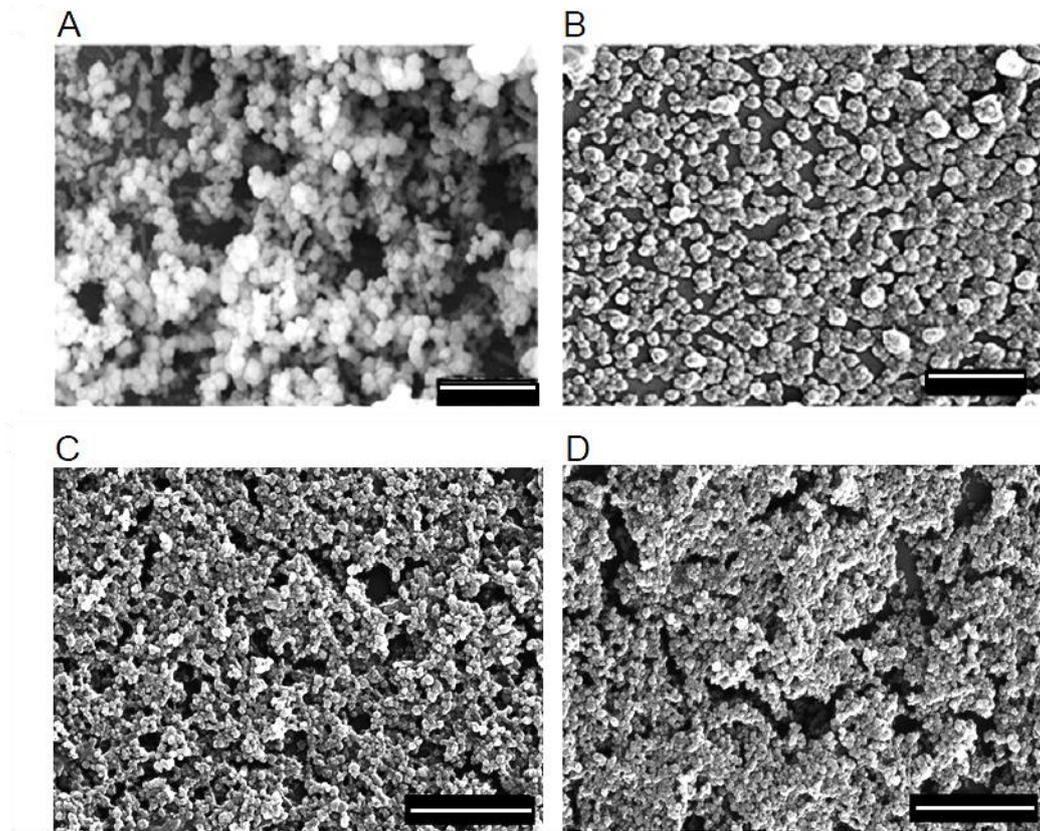


Abb. 37: REM-Aufnahmen der (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-His₈, der (B) CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆, der (C) CaP/CMC/SiO₂-N₃/Env-His₈ und der (D) CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆-NPs. Maßstab: 1000 nm.

Die hydrodynamischen Durchmesser und die Stabilitätsmessungen der Partikel wurden mittels DLS bestimmt. Die unterschiedliche Ladung der Partikel resultiert aus den verschiedenen stabilisierten CaP-NPs mittels PEI (positiv geladen, Zeta-Potential im Durchschnitt +23 mV) bzw. CMC (negativ geladen, Zeta-Potential im Durchschnitt – 19 mV). Die Zeta-Potentiale weisen somit auf stabile Partikel hin. Der PDI von 0,4 weist auf leicht polydisperse Systeme hin. Ein Merkmal für das erfolgreiche Anbinden der Env-Ald₆-Proteine sind die Größenunterschiede von 19 nm und 54 nm, im Vergleich zu den CaP-NPs die mit Env-His₈-Proteinen zur Reaktion gegeben wurden.

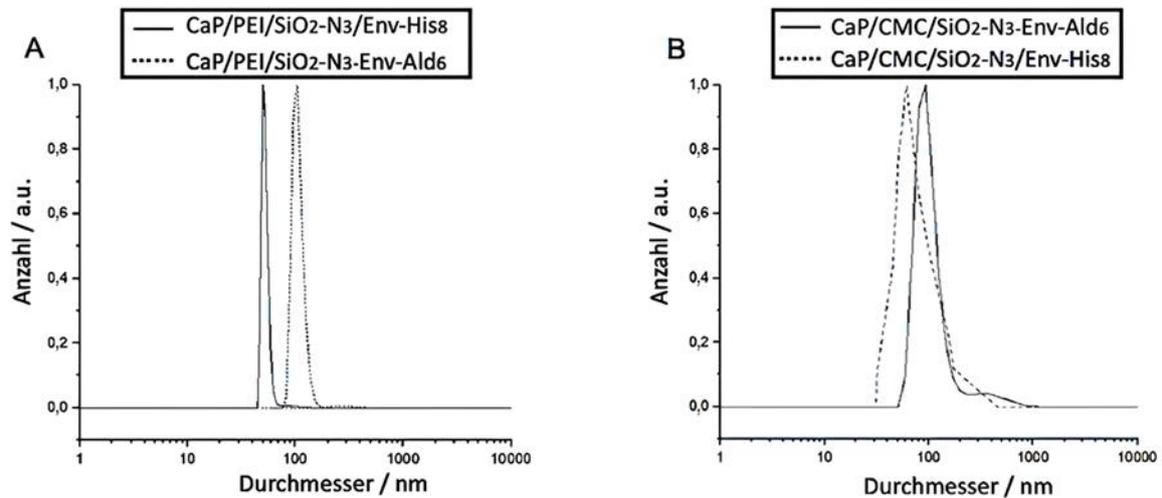


Abb. 38: Normierte Anzahlverteilungen der synthetisierten (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-His₈ und CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆ sowie der (B) CaP/CMC/SiO₂-N₃/Env-His₈ und CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆-NPs.

Nach den kolloidchemischen Untersuchungen wurden die Partikel auf ihre Aufnahme in HeLa-Zellen untersucht. Nach einer Inkubation von 24 h mit den entsprechenden CaP-NPs, konnte anhand von Fluoreszenz- (Abb. 39 A) und CLSM-Aufnahmen (Abb. 39 B) gezeigt werden, dass die CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆-NPs erfolgreich (rote Punkte im TRITC-Kanal) von den Zellen aufgenommen werden konnten. Im Gegensatz dazu waren die CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-His₈-NPs nicht sichtbar. Diese Aufnahmestudien bestätigen die Partikelgrößen der DLS-Messungen, wo ein größerer hydrodynamischer Durchmesser bei den Env-Ald₆-funktionalisierten CaP-NPs detektiert wurde. Der kleinere hydrodynamische Durchmesser der Env-His₈-funktionalisierten CaP-NPs und die fehlende Fluoreszenz im Aufnahmekanal (Abb. 39 A;b und Abb. 39 B;c) bestätigen das keine Env-His₈-Proteine von den Zellen aufgenommen wurden. Mittels UV-Vis-Spektroskopie konnte die fehlende Absorption der AF488-markierten Env-His₈-CaP-NPs zusätzlich belegt werden.

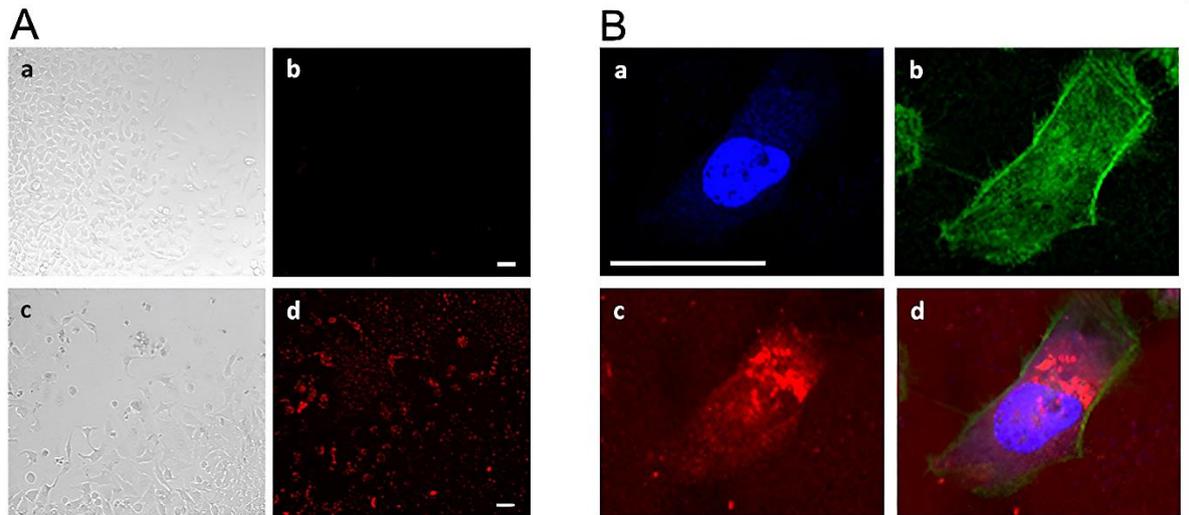


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopieuntersuchungen von HeLa-Zellen nach der Inkubation mit CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-His₈ (A;a und b) und CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆ (A;c und d). Dabei sind (A;a und c) im Hellfeld und (A;b und d) Nanopartikelkanal/Aufnahmekanal zu sehen (Maßstab: 50 µm). CLSM der CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆-NPs (B). Kernfärbung mit Hoechst-33342 (B;a), Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (B;b), fluoreszierende Env-Ald₆-NPs (B;c) und Überlagerung aller Kanäle (B;d). Maßstab: 10 µm.

Auch für die CMC-stabilisierten CaP-NPs wurden Aufnahmestudien mittels Fluoreszenz- (Abb. 40 A) und CLSM (Abb. 40 B) durchgeführt. Auch hier konnte die erfolgreiche Aufnahme der Env-Ald₆-modifizierten CaP-NPs in den HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation beobachtet werden (Abb. 40 A;d und Abb. 40 B;c). Mittels z-Schnitten konnten die fluoreszierenden Env-Ald₆-Proteine auf den CaP-NPs innerhalb der Zellen lokalisiert werden. Es kann beobachtet werden, dass weniger CMC-stabilisierte CaP-NPs intrazellulär vorzufinden sind, als bei den PEI-stabilisierten CaP-NPs. Dies liegt an den abstoßenden Wechselwirkungen mit der ebenfalls negativ geladenen Zellmembran.

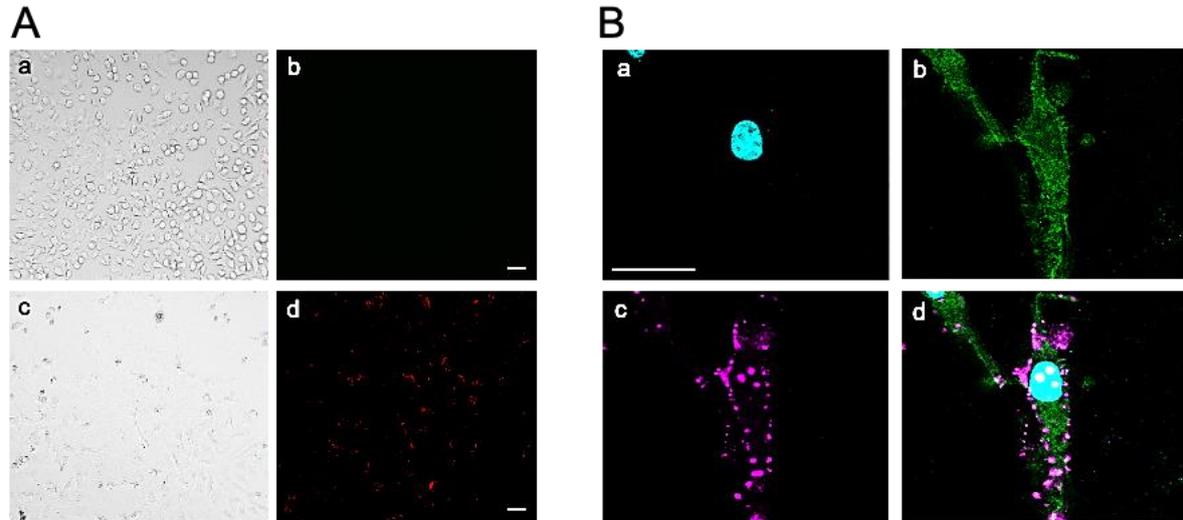


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopieuntersuchungen von HeLa-Zellen nach der Inkubation mit CaP/CMC/SiO₂-N₃/Env-His₈ (A;a und b) und CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆ (A;c und d). Dabei sind (A;a und c) im Hellfeld und (A;b und d) Nanopartikelkanal/Aufnahmekanal zu sehen. Maßstab: 50 µm. CLSM der CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆-NPs (B). Kernfärbung mit Hoechst-33342 (B;a), Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (B;b), fluoreszierende Env-Ald₆-NPs (B;c) und Überlagerung aller Kanäle (B;d). Maßstab: 10 µm.

Somit konnte mit Hilfe des Zweifarben-Experiments (Env-Trimere mit Hisgruppe (grün) und Env-Trimere mit einer Aldehydgruppe (rot)) bestätigt werden, dass die Oximreaktion nur mit spezifischen Gruppen an den Env-Trimeren und dem Propargyl-PEG3-Aminoxy-Linker (bioorthogonale Kopplung) stattfinden kann. Wie an der schematischen Abb. 36 gezeigt wurde, konnte der Linker nur mit der Aldehydgruppe reagieren, um im nächsten Schritt mittels kupferkatalysierter Klick-Reaktion an die CaP-NPs gebunden zu werden.

5.1.2.2 Klick-Reaktionsstudien zwischen Env-Ald₆/FGE-Proteinen mit und ohne Linkerinkubation

Um in dieser Versuchsreihe das erfolgreiche Anklicken der Env-Ald₆/FGE-Proteine (Aldehyd-Gruppe mit FGE = Formylglycin-generierendes Enzym) an den CaP-NPs zu testen, wurden diese mit AF647 (rot) fluoreszenzmarkiert. Hierbei wurde ein Teil der Env-Ald₆/FGE-Proteine einer Oximreaktion für das Anbringen der entsprechenden Alkingruppe unterzogen. Als Kontrolle dienten Env-Ald₆/FGE-Proteine ohne

Oximreaktion. Dies soll verdeutlichen, dass ohne entsprechenden Linker, keine spezifische Bindung der Env-Proteine an der Oberfläche der CaP-NPs stattfinden kann. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Zusammenfassung der Charakterisierungsmethoden.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Pote- ntial / mV	UV-Vis (AF647) / kg m ⁻³
<i>CaP/PEI/ SiO₂-N₃/ Env- Ald₆/FGE</i>	0,018	0,046	4,5·10 ¹⁷	40	44	0,3	+15	-
<i>CaP/PEI/ SiO₂-N₃- Env- Ald₆/FGE</i>	0,017	0,043	4,3·10 ¹⁷	39	120	0,3	+20	1,6·10 ⁻²
<i>CaP/CMC /SiO₂-N₃/ Env- Ald₆/FGE</i>	0,019	0,048	2,2·10 ¹⁸	24	51	0,4	-11	-
<i>CaP/CMC /SiO₂-N₃- Env- Ald₆/FGE</i>	0,017	0,043	1,0·10 ¹⁶	136	216	0,4	-13	1,4·10 ⁻²

Wie in Tab. 6 dargestellt, wurden die CaP-NPs auf ihren Ca-Gehalt (AAS), ihre Partikelgröße (REM), ihre Stabilität und ihren hydrodynamischen Durchmesser (DLS) sowie ihre Proteinbeladung (UV-Vis) untersucht. Für die PEI-stabilisierten CaP-NPs ergaben sich 2,3·10¹⁹ pro m⁻³ Env-Ald₆/FGE-Proteine in der Dispersion und 54 Proteine pro CaP-NP. Für die CMC-stabilisierten CaP-NPs wurden Werte von 2,0·10¹⁹ pro m⁻³ und 2,0·10³ pro NP erhalten. Diese Anzahlunterschiede zwischen den PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs resultieren aus den REM-Radien, die für die CMC-stabilisierten NP um ca. 100 nm größer ausfallen. Aus diesem Grund können mehr Env-Ald₆/FGE-Proteine an die Oberfläche gebunden werden. Die REM-Aufnahmen (Abb. 41) zeigen eine annähernd sphärische Morphologie der CaP-NPs.

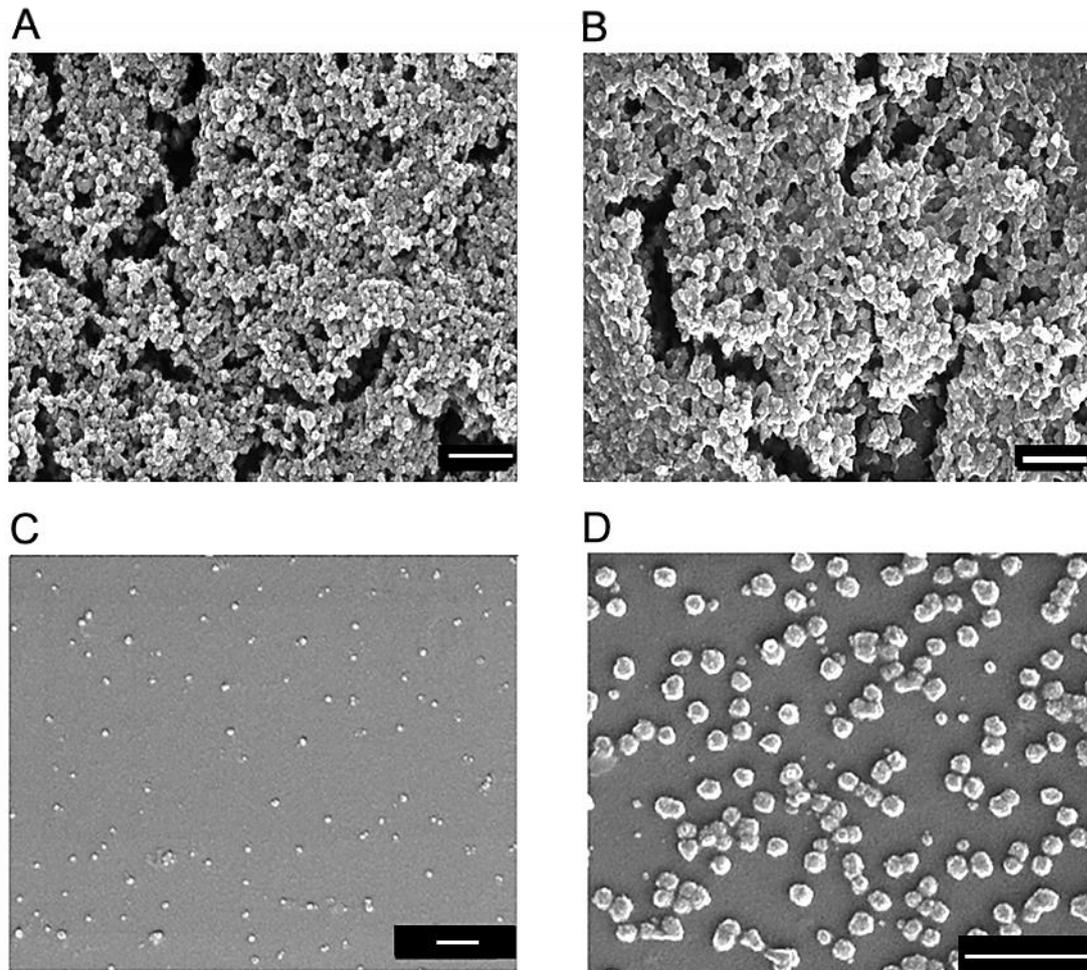


Abb. 41: REM-Aufnahmen der (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE, der (B) CaP/PEI/SiO₂-N₃-Ald₆/FGE, der (C) CaP/CMC/SiO₂-N₃/Ald₆/FGE und der (D) CaP/CMC/SiO₂-N₃-Ald₆/FGE-NPs.
Maßstab: 500 nm.

Anhand der DLS-Aufnahmen (Abb. 42) konnte ein deutlicher Größenunterschied zwischen den CaP-NPs abgelesen werden. PEI- sowie CMC-stabilisierte NPs die mit Env-Ald₆/FGE-Proteinen mit vorheriger Linkerinkubation zur Reaktion gegeben wurden, waren drei- (PEI-stabilisiert) bis vierfach (CMC-stabilisiert) größer als die mit Env-Ald₆/FGE ohne vorherige Oximreaktion. Durch Zeta-Potential-Messungen kann auf stabile Partikelsysteme geschlossen werden. Die Zeta-Potentiale liegen im Schnitt zwischen + 18 mV (PEI-stabilisiert) und – 12 mV (CMC-stabilisiert). Der PDI mit 0,4 weist hingegen auf den Beginn eines polydispersen Systems hin, was sich mit der Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung (Abb. 42) bestätigen lässt.

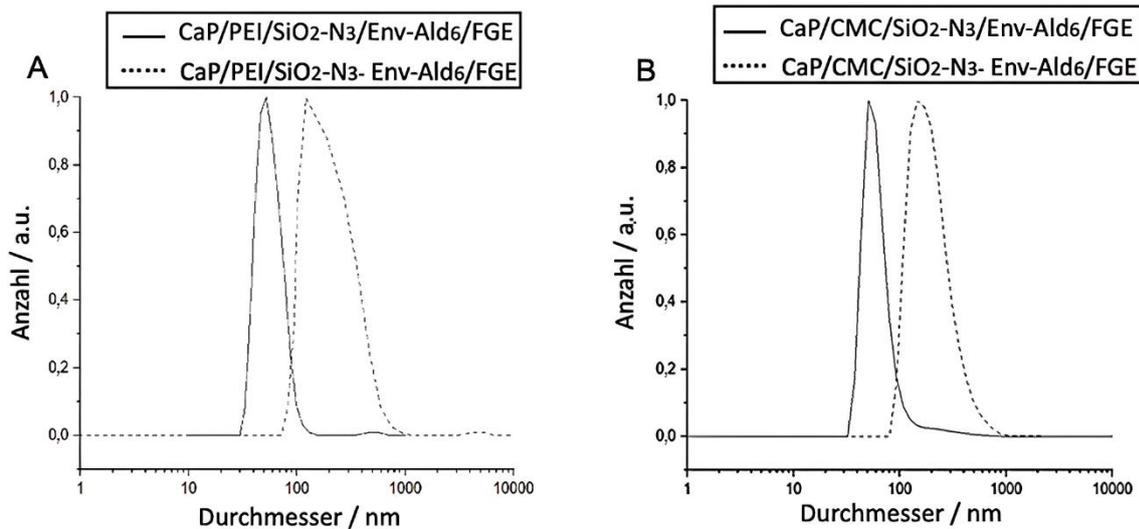


Abb. 42: Normierte Anzahlverteilungen und Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach der Synthese mit Env-Proteinen ohne und mit Linker. (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE und CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE, (B) CaP/CMC/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE und CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE-NPs.

Nach abgeschlossenen Größen- und UV-Vis-Charakterisierungen wurden *in vitro*-Studien mit den synthetisierten CaP-NPs an HeLa-Zellen durchgeführt. Nach 24 h Inkubation waren die CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE-NPs deutlich im Zellinneren lokalisiert und wurden als helle rote Punkte (Abb. 43 A;d und B;c) detektiert. Durch die Aktinfärbung mit dem grün fluoreszierenden AF488-Phalloidin konnten die Partikel mittels CLSM (Abb. 43 B) im Zytosol ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu waren die CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE-NPs ohne vorherige Linker-Inkubation nicht in den zellulären Aufnahmen sichtbar. Das ist ein Indiz, dass die Env-Ald₆/FGE-Proteine ohne vorherige Linkerinkubation nicht an die CaP-Nanopartikeloberfläche anbinden können.

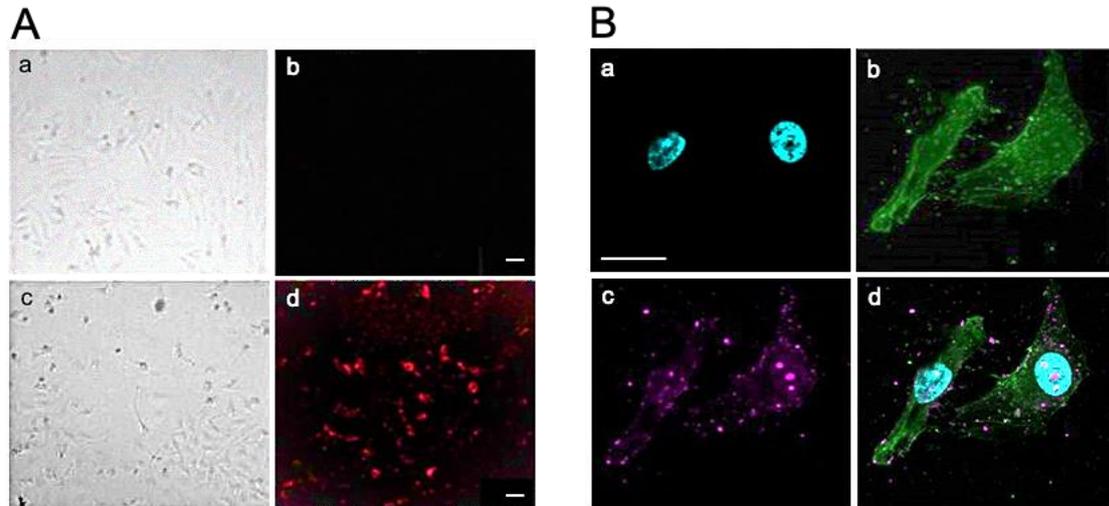


Abb. 43: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HeLa-Zellen nach der Inkubation ohne Linker CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE (A;a und b) und CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE mit Linker (A;c und d). Dabei sind die Zellen im Hellfeld (A;a und c) und die fluoreszierenden NPs in (A;b und d) dargestellt. Maßstab: 50 µm. Aufnahme von CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE mit Linker mittels CLSM (B). Kernfärbung durch Hoechst-33342 (B;a), Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (B;b), fluoreszierende Env-Ald₆/FGE-NPs (B;c) und Überlagerungsbild (B;d). Maßstab: 10 µm.

Nach der 24 h Inkubation mit CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE-NPs in HeLa-Zellen, konnten auch diese mittels z-Schnitten im intrazellulären Raum aufgenommen werden. Anhand der Fluoreszenz kann bestätigt werden, dass das gekoppelte Protein auf den CaP-NPs nach der zellulären Aufnahme erhalten bleibt. Auch hier gibt es Anzeichen, dass die Env-Ald₆/FGE-Moleküle ohne Oximreaktion zu keiner Anbindung auf der Oberfläche und somit zu keiner Fluoreszenz innerhalb der Zellen führen (Abb. 44 A;b).

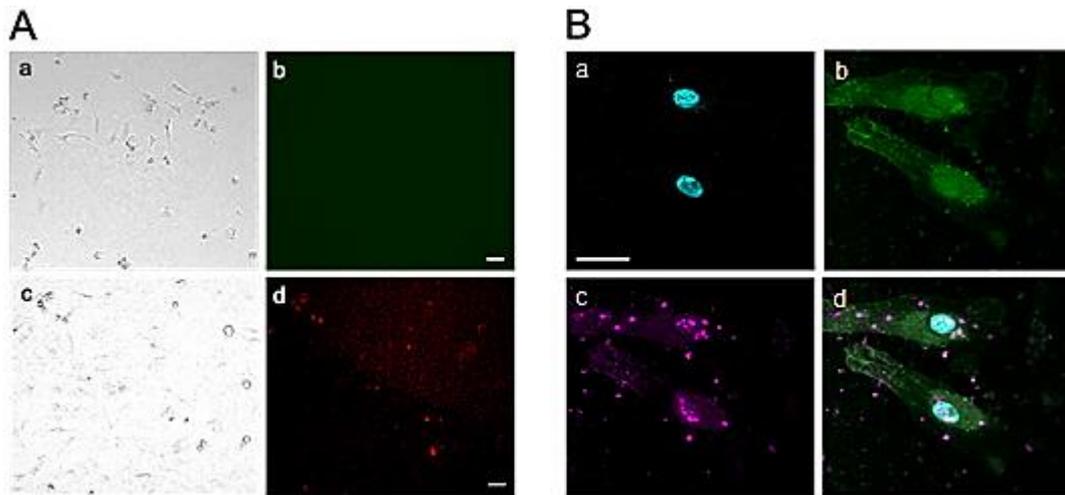


Abb. 44: Aufnahme von NPs durch HeLa-Zellen. Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit CaP/CMC/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE ohne Linker (A;a und b), sowie mit Linker-Zugabe (A;c und d). Dabei sind in A;a und c die Zellen im Hellbild dargestellt und A;c und d die fluoreszierenden NPs. Maßstab: 50 µm. CLSM von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit CaP/PEI/SiO₂-N₃/Env-Ald₆/FGE mit Linker (B). Dabei ist der Zellkern mit Hoechst-3342 (B;a), Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (B;b), der AF647-markierten Env-Trimere (B;c) sowie ein Überlagerungsbild (B;d) gezeigt. Maßstab: 10 µm.

Hiermit bestätigt sich, dass Protein-funktionalisierte CaP-NPs für die Zellaufnahme geeignet sind und als Trägersysteme fungieren.

5.1.2.3 Anbindung der Env-Ald₆/FGE-Proteine mit einer unspezifischen Kopplung und mittels Klick-Chemie

Um abschließend noch die Effektivität der Kopplungsmethode zu untersuchen, wurden die Env-Ald₆/FGE-Proteine auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen auf die CaP-Nanopartikeloberfläche angebracht. Zum einen durch die unspezifische Kopplung der Proteine mittels Sulfo-SMCC-Linker und zuvor angebrachten Thiolgruppen und zum anderen mittels Klick-Reaktion und Azidgruppen. Die sogenannten *r*-CaPs besitzen eine zufällige Anordnung der Env-Proteine auf der CaP-Nanopartikeloberfläche (**Abb. 45 A**) und die *o*-CaPs eine orthogonale Anordnung (**Abb. 45 B**).

Wie in Abb. 35 gut sichtbar haben die bioorthogonal angebrachten Env-Trimere^[203] (Abb. 45 B, *o*-CaPs) eine verbesserte Zugänglichkeit zu den B-Zellrezeptoren (grün) auf der B-Zelloberfläche. Dies kann zur einer gesteigerten B-Zellaktivierung führen. Wie in Kapitel 5.1.2 bereits erklärt, spielt die eingeführte C-terminale Aldehydgruppe der Env-Trimere eine entscheidende Rolle bei der Linkerinkubation (Oximreaktion) und anschließender Klick-Reaktion.^[204] Wohingegen nur einzelne Env-Trimere bei einer unspezifischen Kupplung auf der CaP-Nanopartikeloberfläche (*r*-CaPs) mit den B-Zellrezeptoren interagieren können (Abb. 35 A).

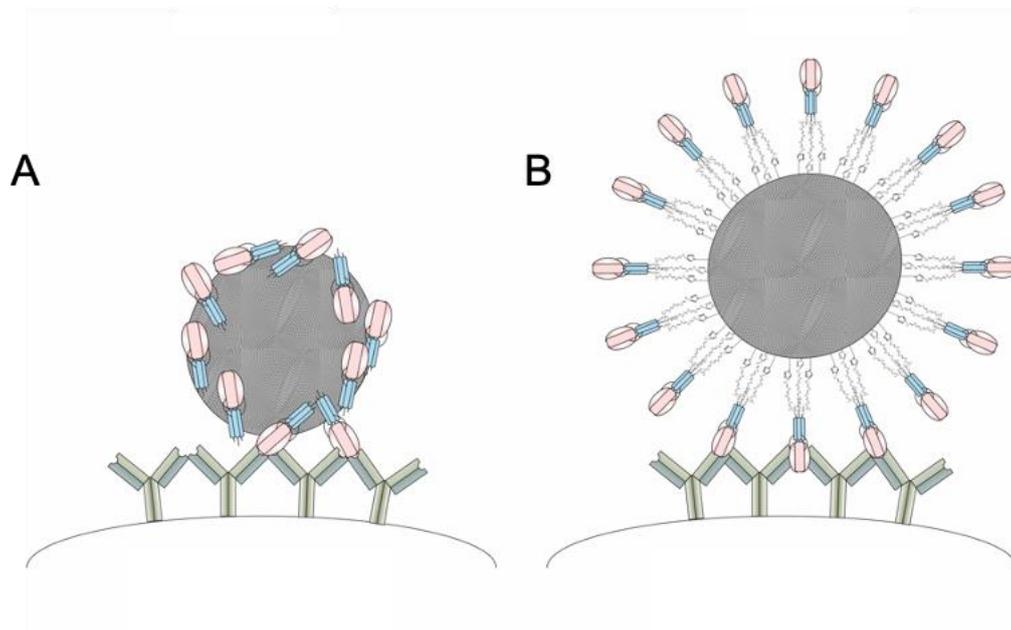


Abb. 45: Schematische Darstellung der Aktivierung der B-Zellen mit unspezifisch gebundenen Env-Proteinen auf der CaP-Nanopartikeloberfläche (A; *r*-CaPs) und mit orthogonal spezifisch angeklickten Env-Molekülen (B; *o*-CaPs).^[205]

Die CaP-NPs wurden zunächst mit einer positiven Ladung (PEI) oder einer negativen Ladung (CMC) synthetisiert und dann mit den beiden oben beschriebenen Syntheseverfahren mit den Env-Ald₆/FGE-Proteinen funktionalisiert. Die Env-Ald₆/FGE-Proteine wurden ohne Fluoreszenzmarkierung direkt mit dem jeweiligen Linker inkubiert. In Tab. 7 sind die kolloidchemischen Analyseergebnisse zusammengefasst.

Tab. 7: Zusammenfassung der kolloidchemischen Ergebnisse der vier Partikelsysteme.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV	Nano Drop (Env / kg m ⁻³)
<i>CaP/PEI/ SiO₂-S- Env- Ald₆/FGE</i>	0,079	0,198	3,4·10 ¹⁷	71	230	0,3	+21	7,0·10 ⁻²
<i>CaP/PEI/ SiO₂-N₃- Env- Ald₆/FGE</i>	0,087	0,218	5,3·10 ¹⁷	63	232	0,3	+17	9,0·10 ⁻²
<i>CaP/CMC /SiO₂-S- Env- Ald₆/FGE</i>	0,089	0,223	3,5·10 ¹⁷	73	198	0,4	-12	5,0·10 ⁻²
<i>CaP/CMC /SiO₂-N₃- Env- Ald₆/FGE</i>	0,068	0,171	4,2·10 ¹⁷	63	260	0,4	-15	6,0·10 ⁻²

Mittels NanoDrop konnte die Konzentration der Env-Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen werden, sodass eine Proteinmessung auch ohne Fluoreszenzmarkierung möglich war. Aus den Gleichungen **17**, **18** und **19** (siehe Kapitel **5.1.1**), kann die Anzahl von Env-Proteinen pro m⁻³ Dispersion und pro CaP-NP berechnet werden, die Resultate sind in Tab. **8** zusammengetragen.

Tab. 8: Anzahl der Env-Ald₆/FGE-Proteine in Dispersion und pro NPs.

Probe	Anzahl pro m ⁻³	
	Dispersion	Partikel
<i>CaP/PEI/SiO₂-S-Env-Ald₆/FGE</i>	1,0·10 ²⁰	298
<i>CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE</i>	1,3·10 ²⁰	243
<i>CaP/CMC/SiO₂-S-Env-Ald₆/FGE</i>	7,2·10 ¹⁹	205
<i>CaP/CMC/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE</i>	8,6·10 ¹⁹	207

Werden nun die REM-Aufnahmen näher betrachtet, fällt die annähernd sphärische Morphologie der CaP-NPs auf. Wird die Größe des anorganischen Kerns von 50 Partikeln vermessen, ergeben sich Durchmesser zwischen 63 nm und 73 nm.

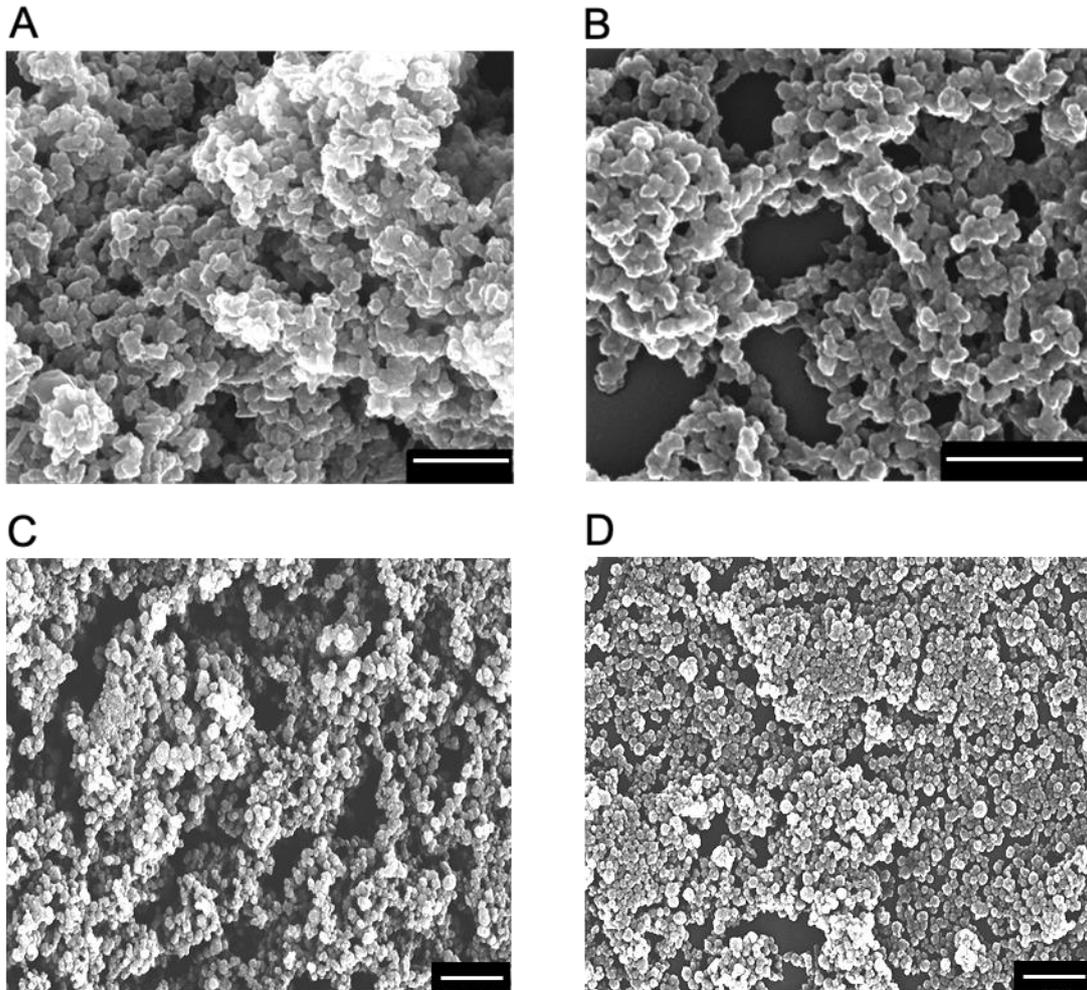


Abb. 46: REM-Aufnahmen der (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃-Env-Ald₆/FGE, der (B) CaP/PEI/SiO₂-S-Ald₆/FGE, der (C) CaP/CMC/SiO₂-N₃-Ald₆/FGE und der (D) CaP/CMC/SiO₂-S-Ald₆/FGE -NPs.
Maßstab: 500 nm.

Mittels DLS-Messungen fällt die recht schmale Größenverteilung der funktionalisierten CaP-NPs auf. Dabei sind die Thiolgruppen-funktionalisierten CaP-NPs, 2 nm (PEI-stabilisiert) bis zu 62 nm (CMC-stabilisiert) kleiner als CaP-NPs mit Azidgruppen. Anhand der PDI-Messungen (0,3 - 0,4) lässt sich der Beginn eines polydispersen Systems erkennen (siehe Tab. 7). Die Zeta-Potential-Messungen weisen jedoch auf stabile Partikelsysteme hin. Die unterschiedlichen Potentiale (positiv und negativ) resultieren durch die Ladungen der jeweiligen stabilisierenden Polymere, PEI bzw. CMC.

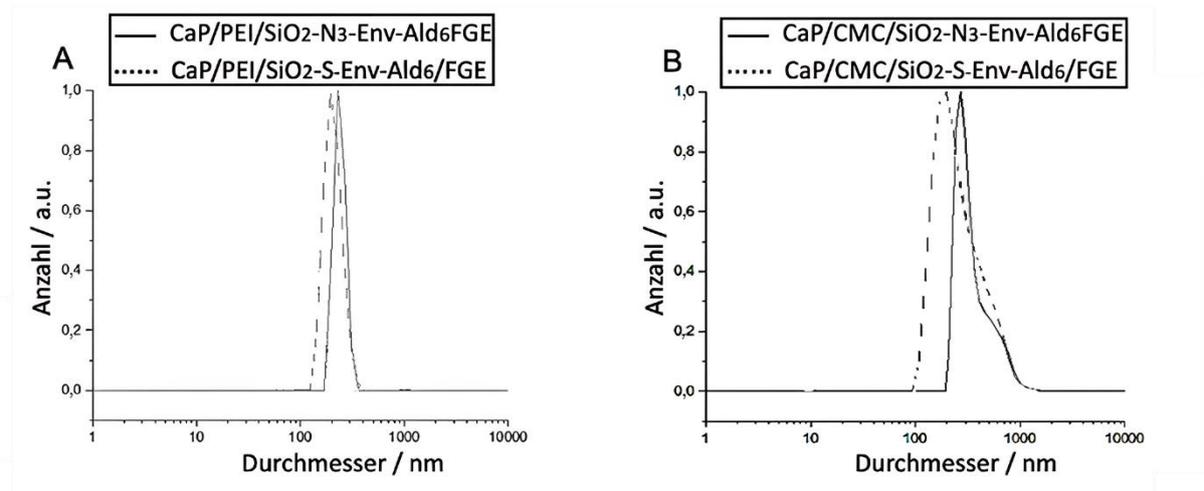


Abb. 47: Normierte Auftragungen anhand der Anzahlverteilung. (A) PEI-stabilisierte- und (B) CMC-stabilisierte-NPs.

Nach dem Abschluss der kolloidchemischen Untersuchungen der CaP-NPs (*r*- und *o*-CaPs) wurden am Uniklinikum in Erlangen von Herrn Dr. Damm und von Herrn Dr. Temchura *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen (Abb. 48) durchgeführt. Hierfür wurden naive B-Zellen aus PGT121-Mäusen isoliert und mit verschiedenen CaP-Nanopartikelkonzentrationen ($0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ – 200 ng mL^{-1} ; Abb. 48 A, y-Achse) für 18 h inkubiert. Bei dieser *in vitro*-Studie sollte die Aktivierung von Env-spezifischen B-Zellen mittels FACS-Analysen untersucht werden (Abb. 48 A).

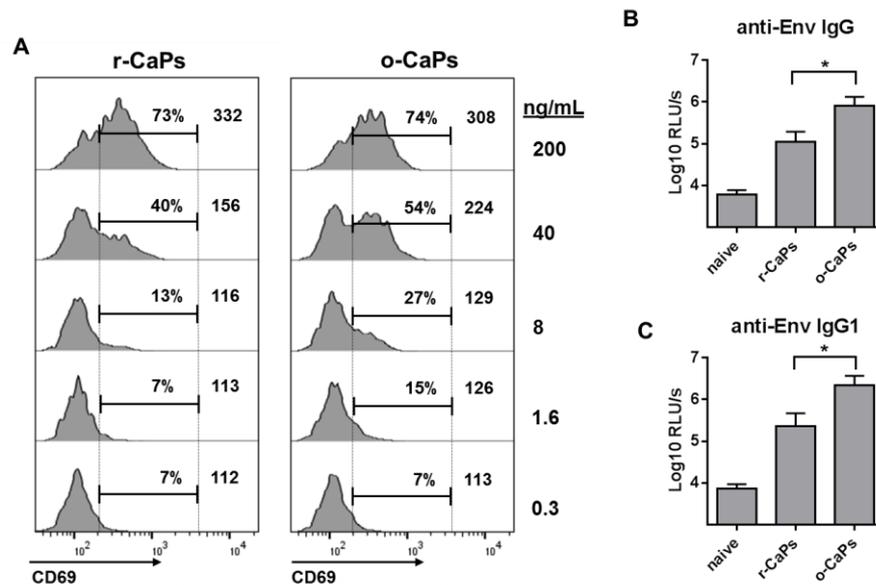


Abb. 48: (A) FACS-Analysen der CD69-Antikörper-Expression, (B) anti-Env IgG Antikörperreaktionen und (C) anti-Env IgG 1 Antikörperreaktionen nach der Durchführung eines ELISA-Assays.^[205]

Durch das anschließende Anfärben der B-Zellen mit Anti-CD69- und Anti-CD19-Antikörpern konnte mittels FACS-Analyse die CD69-Expression (Abb. 48 A, x-Achse) auf den CD19-positiven B-Zellen bestimmt werden. Wie in Abb. 48 A zu erkennen ist, ist der prozentuale Anteil der CD69-positiven Zellen nach der Inkubation mit den *o*-CaPs höher, als bei den *r*-CaPs. Die höchste prozentuale Abweichung zwischen den *r*- und *o*-CaPs liegt bei 14% und resultiert nach der Inkubation mit einer Partikelkonzentration von 8 ng mL⁻¹ und 40 ng mL⁻¹.

Im abschließenden Schritt wurden *in vivo*-Experimente für Anti-Env-Antikörperreaktionen durchgeführt (Abb. 48 B und C). Hierfür wurden *wild-type*-Mäuse mit den *r*- und *o*-Caps immunisiert und nach 3 Wochen das entnommene Serum mittels ELISA auf die Antikörperreaktionen (anti-Env IgG (Abb. 48 B) und anti-Env IgG1 (Abb. 48 C)) untersucht. Auch in diesen Untersuchungen konnte anhand der Balken in der Abb. 48 B und C bestätigt werden, dass die Immunisierung mit den *o*-CaPs, im Gegensatz zu der Immunisierung mit den *r*-CaPs zu einer gesteigerten Antikörperreaktion führt.

Diese Befunde sind für die Erforschung einer innovativen Impfstoffplattform gegen den HI-Virus von großer Bedeutung, da eine gesteigerte Immunantwort mittels

bioorthogonal angeordneter Env-Trimere auf der CaP-Nanopartikeloberfläche (o-CaPs) nach der Immunisierung erzielt werden konnte.

5.1.3 Beschichtung der VLP- und VLP(pEGFP)-NPs und Funktionalisierung mittels Klick-Chemie (*Viro-CaPs*)

Die in dieser Arbeit verwendeten VLP's wurden von Herrn Wang der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Überla der Uniklinik Erlangen synthetisiert, aufgereinigt und für weitere Beschichtungsexperimente bereitgestellt. Um die Morphologie der erhaltenen VLP's bestimmen zu können, wurden diese mit Hilfe von Spinfiltration auf eine Konzentration von 1 mg mL^{-1} eingengt, um mehr Partikel in einem geringeren Volumen generieren zu können. In Abb. 49 ist eine schematische Abbildung der Aufkonzentrierung mittels Spinfiltration abgebildet.

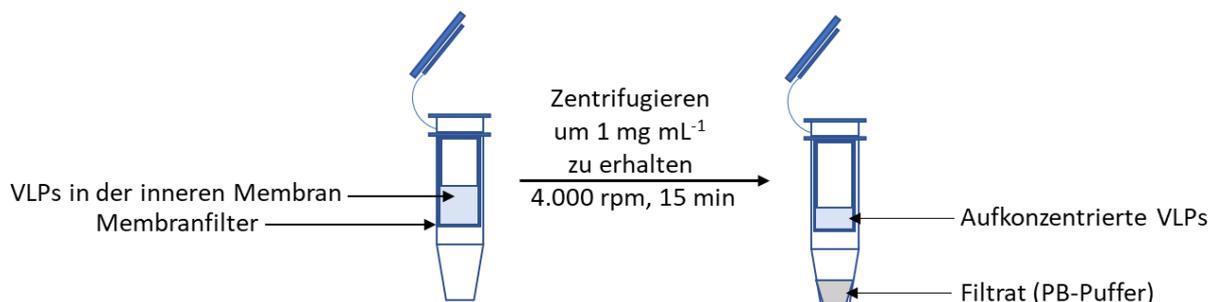


Abb. 49: Schema der Aufkonzentrierung der VLP's mittels Spinfiltration.

In Abb. 50 sind STEM-Bilder der beiden VLP-Konzentrationen abgebildet. In **50 A** resultiert eine Konzentration von $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ und in **50 B** die gewünschte Konzentration von 1 mg mL^{-1} nach der Spinfiltration. In Abb. **50 A** sind repräsentativ einige VLP's durch rote Pfeile verdeutlicht. Die hier gezeigten STEM-Abbildungen wurden von Frau Dr. Loza durchgeführt.

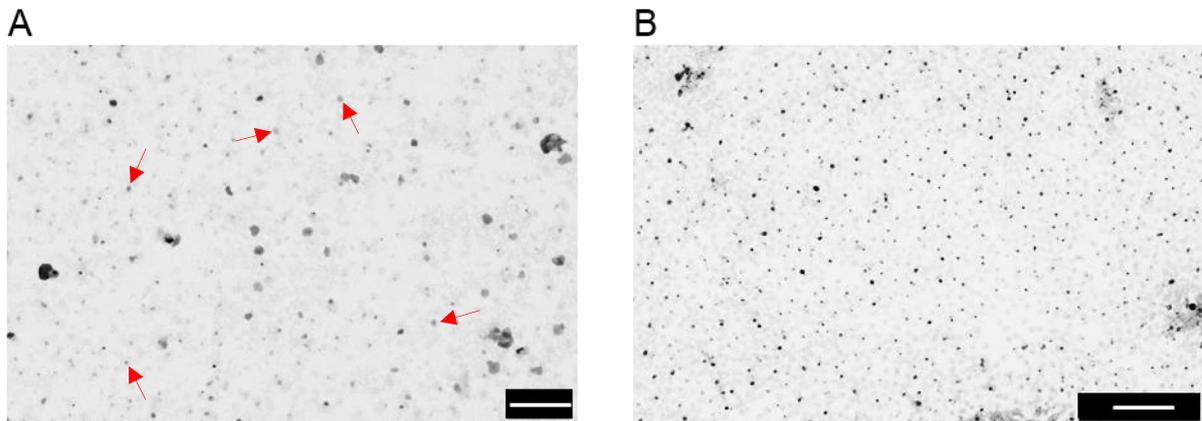


Abb. 50: STEM-Aufnahmen der VLP's, (A) vor (B) nach der Aufkonzentrierung mittels Spinfiltration. Maßstab: 500 nm.

Wie in den beiden obigen Abbildungen sichtbar, können einige kristalline/salzartige Morphologien erkannt werden, die vom getrockneten PB-Puffer resultieren, in dem die VLP's gelagert werden. Die Kristalle sind kontrastreicher als die hohlen VLP's und erscheinen daher dunkler. Dennoch reicht der Kontrast der hellgrauen VLP's aus, um die Größe der einzelnen Partikel zu bestimmen. Hierfür wurden 50 Partikel ausgezählt, sodass eine Größe von 53 ± 7 nm erhalten wurde.

Anhand von TEM-Aufnahmen, die an der Uniklinik in Erlangen aufgenommen wurden, konnte die genaue Struktur der VLP's (Abb. 51) dargestellt werden.

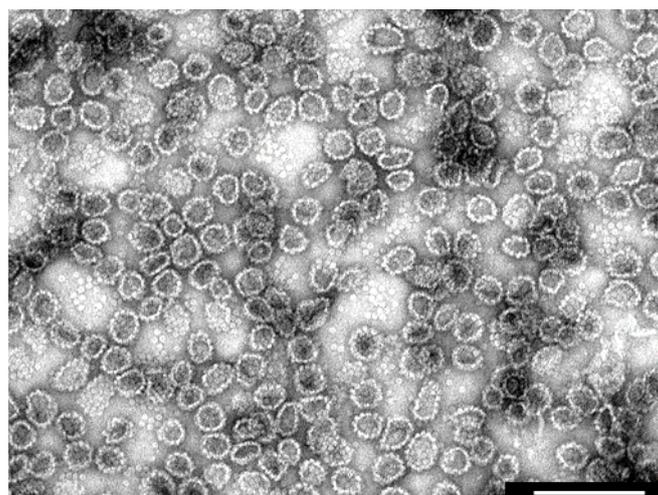


Abb. 51: TEM-Aufnahme der VLP's. Maßstab: 200 nm.

Anhand der TEM-Aufnahmen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den VLP's um hohle Gebilde und nicht um dicht gepackte Kugeln handelt. In dessen Inneren ist ebenfalls die PB-Puffer-Lösung enthalten. Im weiteren Verlauf wurde der hydrodynamische Durchmesser und das Zeta-Potential der Partikel mittels DLS (Abb. 52) bestimmt.

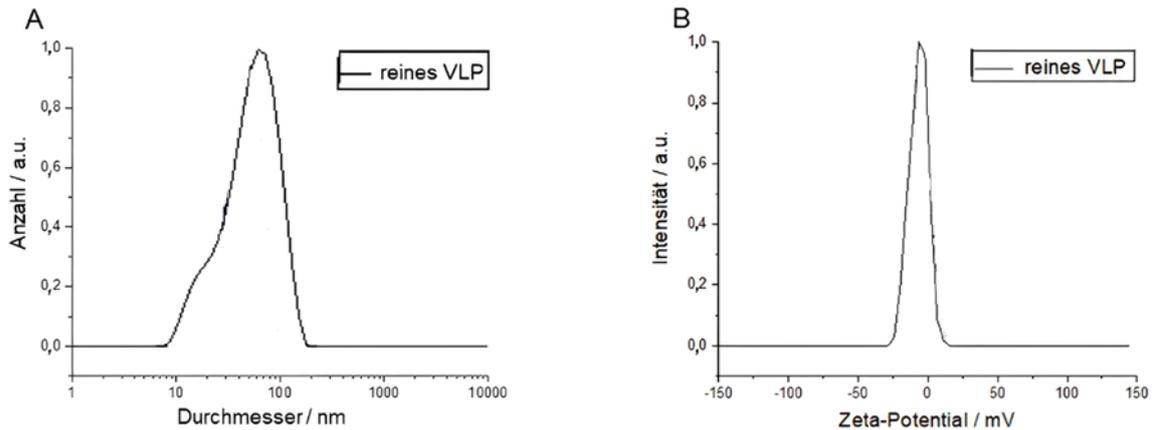


Abb. 52: (A) Normierte Intensitätsverteilung und (B) Zeta-Potential-Messung der reinen VLP's.

Wie in Abb. 52 sichtbar, bestätigt sich der vermessene Durchmesser der STEM-Abbildungen. Der hydrodynamische Durchmesser beträgt 67 ± 5 nm. Wird das Zeta-Potential in Abb. 52 B betrachtet, sind die VLP's negativ geladen und liegen bei -6 ± 4 mV. Eine weitere Methode der Größenvermessung ist die Untersuchung mittels NTA. Hierfür wird die Brown'sche Molekularbewegung detektiert und die Partikelgrößenverteilung als Liniendiagramm (Abb. 53 A) oder als Punktdiagramm für die Häufigkeit der jeweiligen Partikelgröße (Abb. 53 B) dargestellt. Dabei beträgt der hydrodynamische Durchmesser ungefähr 50 nm.

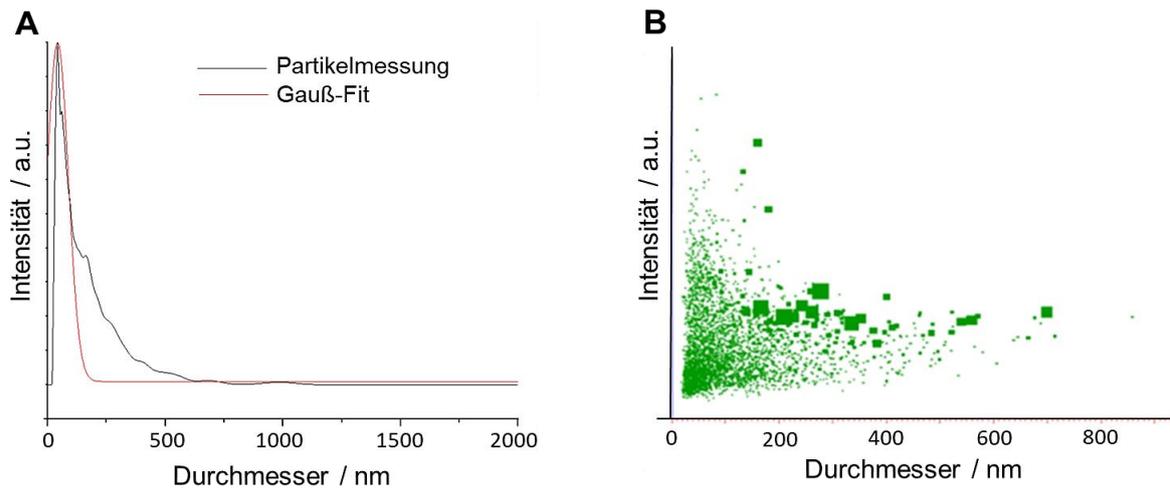


Abb. 53: Größenverteilung der VL-Partikel als Linien- (A) und als Punktdiagramm (B) mittels NTA.

Die effektivste Beschichtungsart wurde durch Vorexperimente mit unterschiedlich geladenen Verbindungen wie **(1)** Calciumlactat-Pentahydrat (positiv), **(2)** Diammoniumphosphat (negativ), **(3)** einer Kombination aus beiden (CaP) und **(4)** der Kombination aus CaP mit der zusätzlichen Zugabe von PEI (positiv) ermittelt. Nach einer 10-minütigen Reaktionszeit nach jedem Beschichtungsschritt und Aufreinigung mittels Zentrifugation, wurden STEM-Abbildungen der beschichteten VLP's (Abb. 54) aufgenommen.

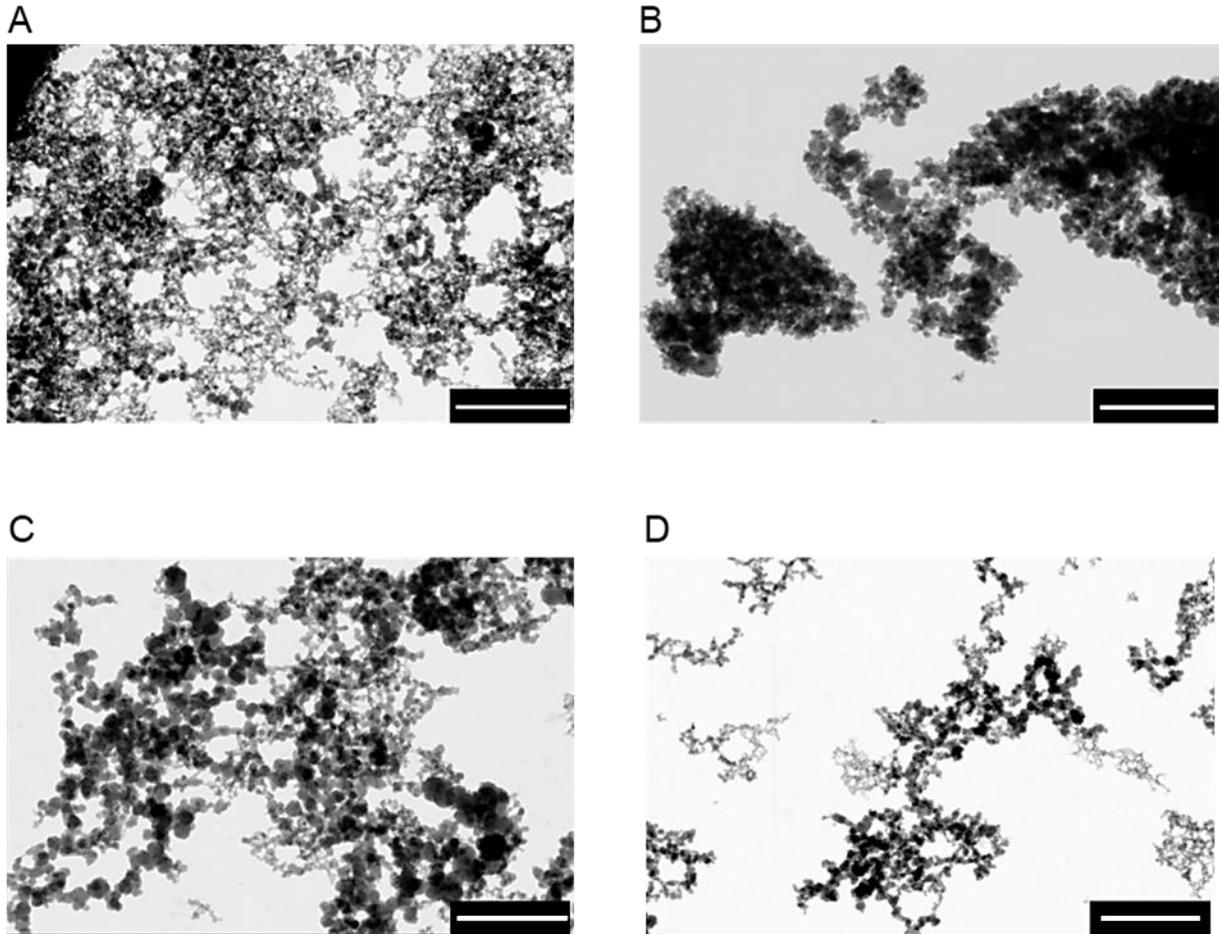


Abb. 54: STEM-Aufnahmen der (A) Ca, der (B) P, der (C) CaP und der (D) CaP-PEI beschichteten VLP's. Maßstab: 400 nm.

Wie in den obigen vier Abbildungen sichtbar, kann eine sphärische Morphologie der Partikel erkannt werden. Die Morphologie hat sich nach den Beschichtungsvorgängen somit nicht geändert. Anhand des höheren Kontrastes (schwarze Partikel) kann eine erfolgreiche Beschichtung der VLP's angenommen werden. Werden die unbeschichteten VLP's in Abb. 50 beobachtet, fällt der niedrigere Kontrast der Partikel (hellgrau) auf.

Anschließend wurde der hydrodynamische Durchmesser und die Stabilität mit Hilfe der DLS vermessen und in Abb. 55 dargestellt.

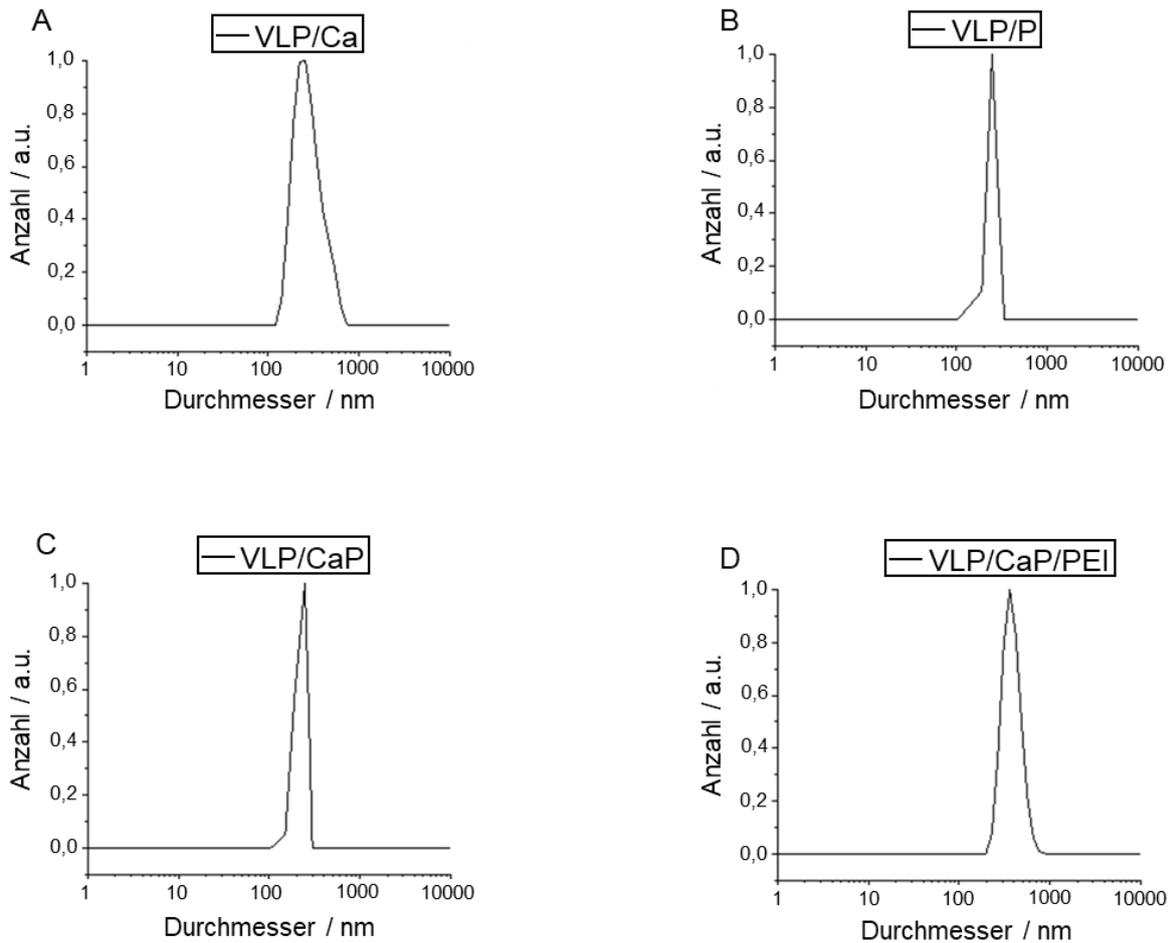


Abb. 55: Normierte Anzahlverteilung der (A) Ca, (B) P, (C) CaP und (D) CaP-PEI-beschichteten VLP's.

Wie zu erkennen ist, zeigt sich bei den CaP-PEI beschichteten VLP's eine starke Größenzunahme, was auf eine erfolgreiche Anbringung der einzelnen Schichten hindeutet. Da CaP alleine ohne weitere Stabilisierung eines Polymers (PEI bzw. CMC) zur Agglomeration neigt, kann in Abb. **55 A** und **55 B** die Verbreiterung der Größenverteilung beobachtet und ein PDI über 0,3 gemessen werden. In Tab. **9** ist eine Zusammenfassung der unterschiedlich beschichteten VLP's dargestellt.

Tab. 9: Charakterisierungszusammenfassung der vier verschiedenen beschichteten VLP's.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	STEM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV	Nano Drop (VLP / kg m ⁻³)
<i>VLP/Ca</i>	0,106	0,266	6,6·10 ¹⁸	29±4	257	0,3	+5	0,92
<i>VLP/P</i>	-	-	-	36±5	247	0,4	-18	0,91
<i>VLP/CaP</i>	0,077	0,194	7,5·10 ¹⁷	54±10	248	0,3	+6	0,90
<i>VLP/CaP/ PEI</i>	0,116	0,291	9,6·10 ¹⁷	57±12	361	0,4	+9	0,86

Um weitere STEM-, TEM- und EDX-Mapping-Untersuchungen durchzuführen, wurden die VLP's mit einer CaP-Schale beschichtet. Anhand der Abb. 56 konnten erste Aussagen über die Morphologie und die Beschichtungseffizienz anhand des stärkeren Kontrastes getroffen werden.

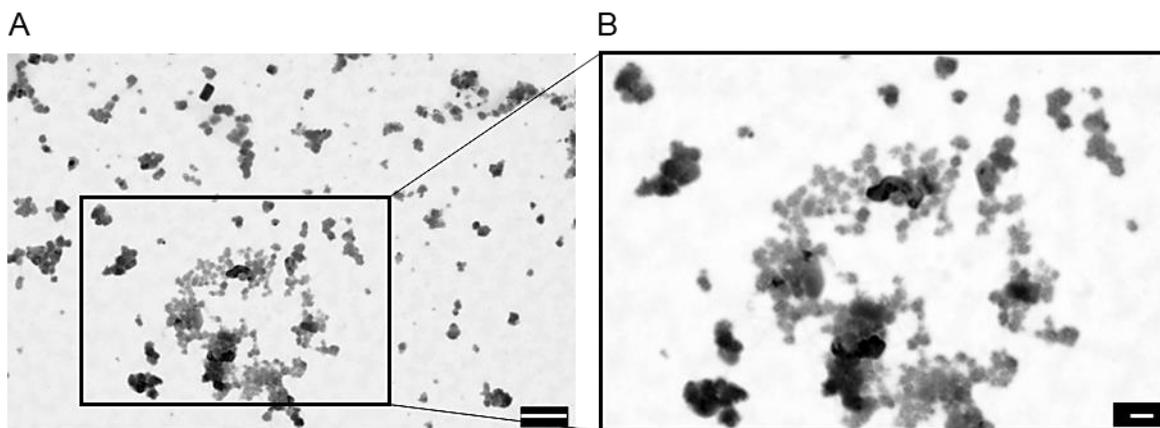


Abb. 56: STEM-Aufnahme der CaP-beschichteten VLP's . Maßstab: (A) 500 nm und (B) 200 nm.

Um eine höhere Auflösung der Partikel zu erzielen, wurden an der Uniklinik in Erlangen TEM-Aufnahmen der Partikel aus Abb. 56 aufgenommen.

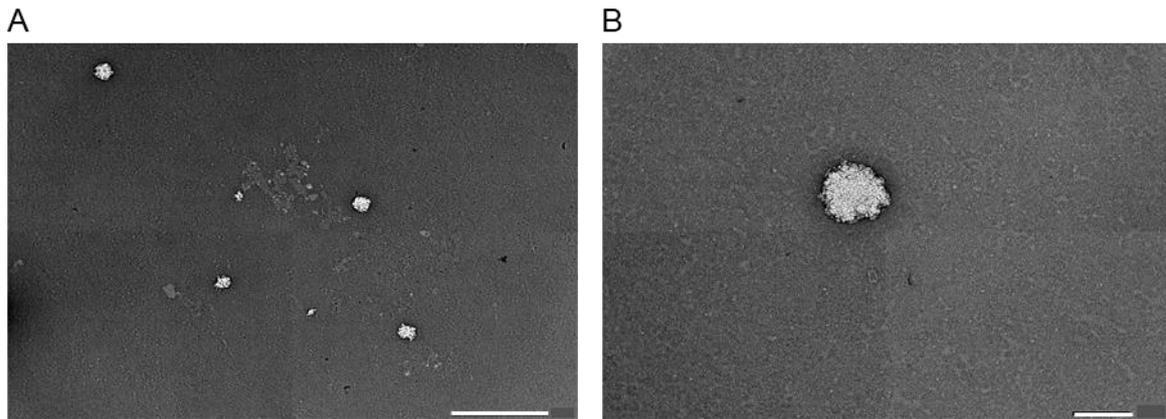


Abb. 57: TEM-Aufnahme der CaP-beschichteten VLP's. Maßstab: (A) 1000 nm und (B) 200 nm.

Somit bestätigt sich die typische sphärische Morphologie der Partikel. Um zu analysieren, ob es sich wirklich um eine Schicht aus CaP handelt, wurde ein EDX-Mapping (Abb. 58) durchgeführt.

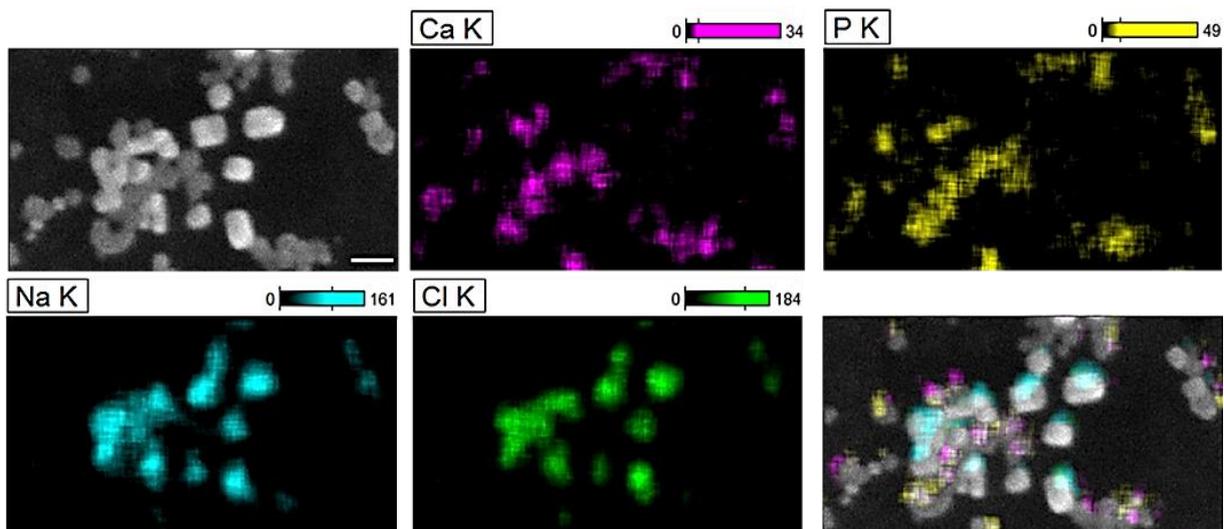


Abb. 58: EDX-Mapping der CaP-beschichteten VLP's.

Anhand der Zuordnung der unterschiedlichen Farben zu den jeweiligen Elementen kann in der letzten Abbildung eine Überlagerung aller Kanäle durchgeführt werden. Hiermit konnte bestätigt werden, dass es sich um CaP handelt. Neben den beschichteten VL-Partikeln sind in Abb. 58 auch die kristallähnlichen Strukturen zu erkennen, die sich als Natrium und Chlorid erweisen. Diese können von der

ursprünglichen Puffer-Lösung zurückgeblieben sein. Sodass weitere Aufreinigungsschritte erforderlich wären um die restliche Puffer-Lösung, in der die VLP's gelagert werden, zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde ein Querschnitt eines Partikels aufgenommen, um zu sehen, wie sich die Konzentration an CaP durch das Partikel hindurch verhält. In Abb. **59 A** ist der Partikelquerschnitt und das entsprechende Diagramm in Abb. **59 B** der beiden Elementkonzentrationen dargestellt.

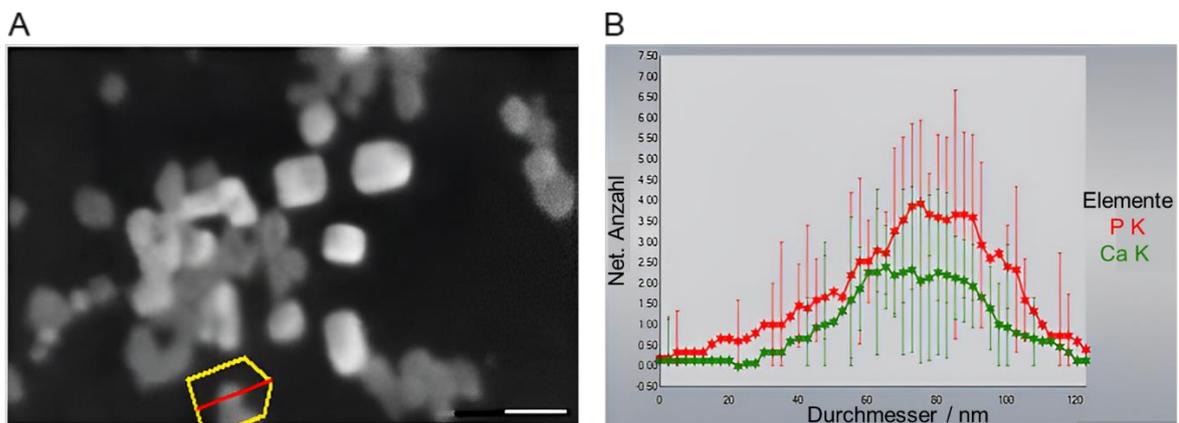


Abb. 59: (A) Querschnitt und (B) Konzentrationsdiagramm der CaP-beschichteten VLP's.
Maßstab: 100 nm.

Wie in Abb. **59 B** sichtbar steigt die CaP-Konzentration zunächst stetig an. In der Mitte des Partikels, wo sich der Kern aus dem VLP befindet, bildet sich ein Plateau. Erst danach fällt die Konzentration an CaP wieder ab. Anhand der Ca- (grün) und der P- (rot) Kurve kann der Konzentrationsverlauf in Abb. **59 B** nachverfolgt werden. Anhand der Skala im Diagramm kann die Größe des Partikels abgelesen werden. Das Partikel ist ca. 120 nm groß, wo der VLP-Kern ab 60 nm beginnt und ungefähr 40 nm groß ist. Um sicher zu gehen, dass das detektierte Plateau wirklich auf den Kern aus VLP hindeutet, wurden reine CaP-NPs unter gleichen Bedingungen synthetisiert und als negative Kontrolle eingesetzt. In Abb. **60** ist der Querschnitt (A) und das Konzentrationsdiagramm (B) dargestellt.

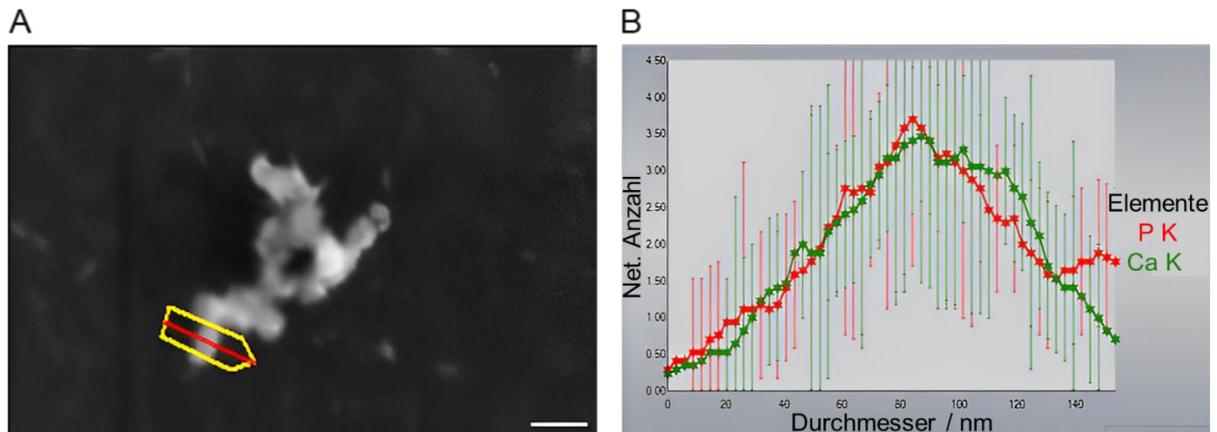


Abb. 60: (A) Querschnitt und (B) Konzentrationsdiagramm reiner CaP-NPs als negative Kontrolle. Maßstab: 100 nm.

Wie anhand der Auftragung in Abb. **60 B** zu erkennen, läuft die Konzentration an CaP in der Mitte des Partikels nicht zu einem Plateau zusammen, sondern es bildet sich ein Maximum der beiden Konzentrationen und fällt danach wieder ab. Damit kann bestätigt werden, dass es bei reinen CaP zu keinem Plateau kommt, sondern nur bei einem Kern mit beschichteten VLP's. Nach der ausführlichen spektroskopischen Charakterisierung der unbeschichteten und der beschichteten VLP's, wurden Zellaufnahmeuntersuchungen mit CaP-beschichteten VLP's durchgeführt. Da die VLP's nicht fluoreszenzmarkiert waren, konnte ein indirekter Immunfluoreszenz-Assay durchgeführt werden. Das bedeutet, dass die HeLa-Zellen nach der üblichen VLP's-Inkubation von 24 h, zunächst für eine Stunde mit dem Anti-HPV16L1-Antigen inkubiert wurden. Hierbei bindet das Antigen an die beschichteten VLP's. Nach dieser einstündigen Inkubationszeit wurden die HeLa-Zellen für eine weitere Stunde mit fluoreszierendem FITC-anti-mouse-Farbstoff belassen. Dieser Farbstoff bindet wiederum an das Antigen, wodurch eine indirekte Fluoreszenz der Partikel gewährleistet wird. In Abb. **61** sind Zellaufnahmen mittels eines Fluoreszenzmikroskops abgebildet. Als negative Kontrolle dienten HeLa-Zellen ohne Partikel-Inkubation, aber gleicher Inkubation mit Antigen und FITC-Farbstoff.

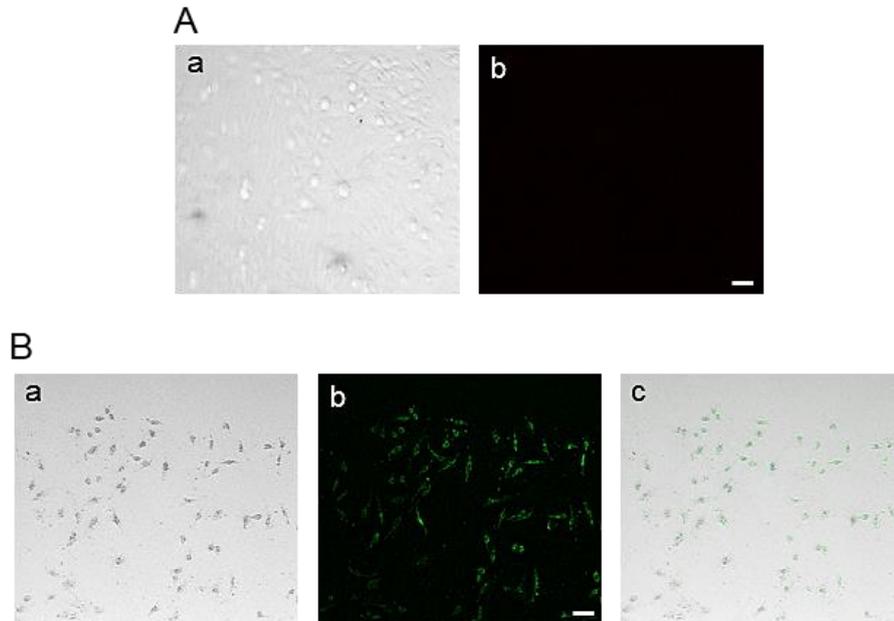


Abb. 61: Indirekter Immunfluoreszenz-Assay mit Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen (A) ohne und (B) mit der Zugabe der CaP-beschichteten VLP's. In (a) Hellfeld, in (b) Fluoreszenzkanal des FITC's und in (c) Überlagerungsbild. Maßstab: 50 μ m.

Wie in Abb. 61 sichtbar, kann nur eine Fluoreszenz des FITC's innerhalb der HeLa-Zellen nach einer Inkubation mit CaP beschichteten VLP's (Aufnahmekanal **B;b**), detektiert werden. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Morphologie (Hellfeld) und auch der Kontrast der Zellen nach der Partikelaufnahme anders sind als bei den Zellen ohne Partikel-Inkubation. Durch dieses Experiment konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich VLP's im Inneren der CaP-Schale befinden.

Um jedoch Klick-Experimente durchführen zu können, wird eine Silica-Schale auf der Partikeloberfläche benötigt. Aus diesem Grund wurde zur Reduzierung der Syntheseschritte, statt einer CaP-Schale eine direkte Beschichtung mit PEI als Stabilisierung und eine anschließende Beschichtung mit Silica gewählt (Abb. 62). Ein weiterer Grund für den Einsatz von PEI ist, dass die VLP's selbst eine leicht negative Ladung besitzen (wie in den Vorexperimenten sichtbar), somit kann die Beschichtung mit einer positiven Ladung (PEI) gewährleistet werden. Die abschließende Silica-Schale besitzt wiederum eine negative Ladung, sodass Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Ladungen resultieren. In Abb. 62 sind die PEI- und Silica-

beschichteten VLP's mittels einer STEM-Abbildung sichtbar und besitzen weiterhin eine sphärische Morphologie.

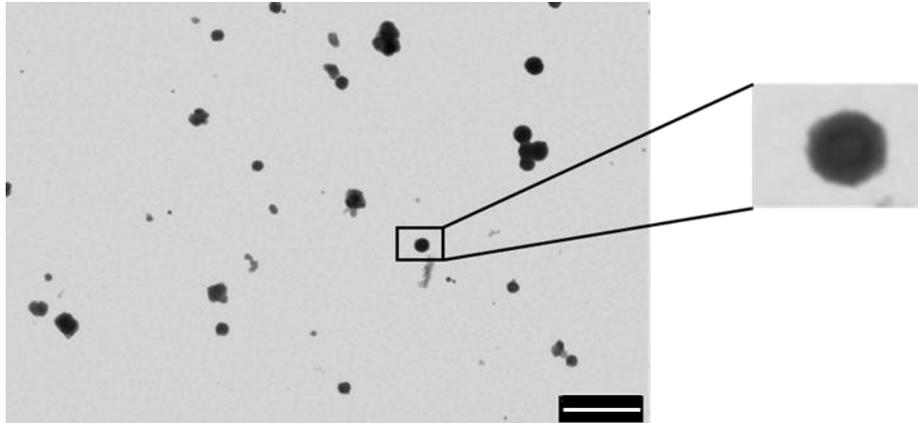


Abb. 62: STEM-Aufnahme der PEI-SiO₂-beschichteten VLP's. Maßstab: 500 nm.

Ebenfalls ist der erhöhte Kontrast der beschichteten Partikel zu erkennen. Mittels *ImageJ* konnte ein durchschnittlicher Durchmesser von 200 nm vermessen werden. Auch nach dieser Beschichtung wurde ein EDX-Mapping (Abb. 63) durchgeführt um die Oberflächenbeschaffenheit der beschichteten VLP's zu untersuchen.

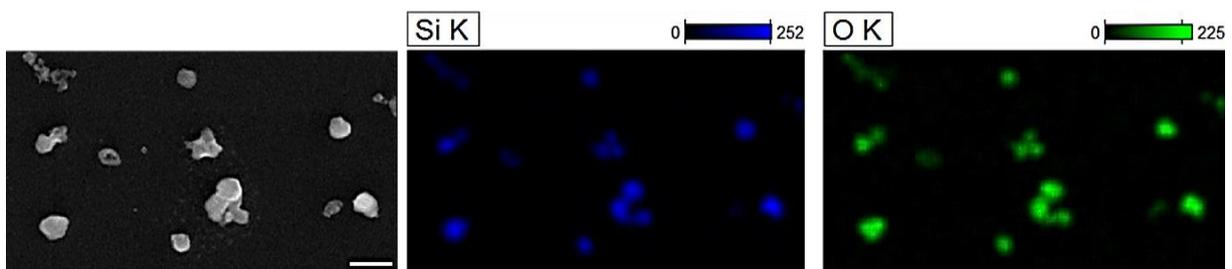


Abb. 63: EDX-Mapping der PEI-SiO₂-beschichteten VLP's. Maßstab: 300 nm.

Anhand der Anregung von Silizium (blau) und Sauerstoff (grün) konnte bestätigt werden, dass eine Silica-Schale um die VLP-Partikel gebildet wurde. Zur vollständigen Charakterisierung dieser Partikelsorte wurde ein Querschnitt durch eines der abgebildeten Partikel durchgeführt, um den Konzentrationsverlauf innerhalb des Partikels zu beobachten.

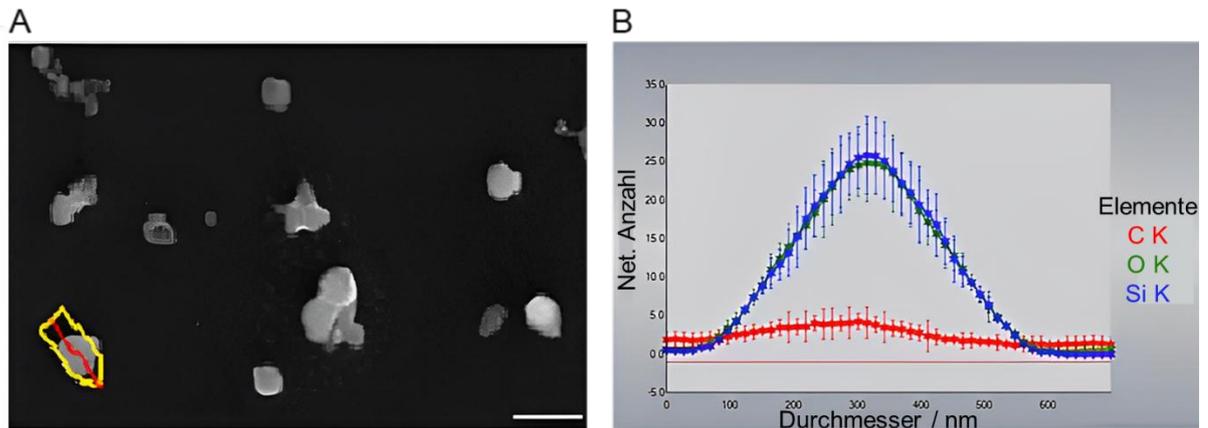


Abb. 64: (A) Querschnitt und (B) Konzentrationsdiagramm der PEI-SiO₂-beschichteten VLP's.
Maßstab: 300 nm.

Auch hier konnte ähnlich wie bei den CaP-beschichteten VLP's ein Plateau in der Mitte des Partikels beobachtet werden, was auf den Kern aus VLP hindeutet. Die Partikel besitzen eine Größe von ca. 500 nm und fallen demnach vierfach größer aus als die CaP-beschichteten VLP's (ca. 120 nm). Das Plateau weist auf einen Kern von ca. 50 nm hin, was die Beobachtungen der CaP-beschichteten VLP's (Plateaulänge 40 nm) bestätigt. Abschließend wurde der hydrodynamische Durchmesser der VLP/PEI/SiO₂-Partikel mittels DLS aufgenommen und ist in Abb. 65 abgebildet.

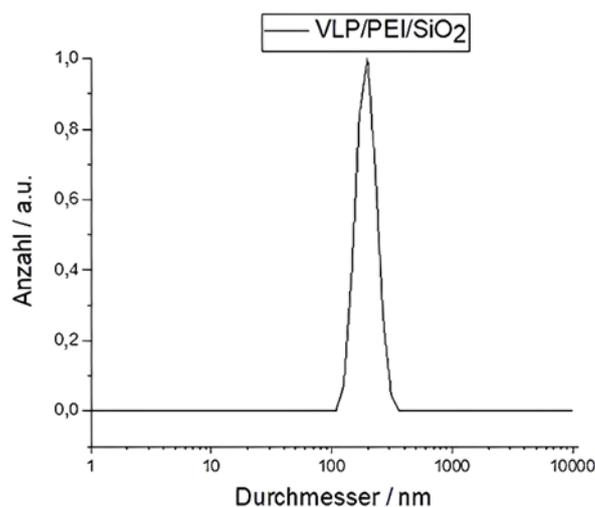


Abb. 65: Normierte Anzahlverteilung der PEI-SiO₂-beschichteten VLP's nach der DLS.

Der gemessene hydrodynamische Durchmesser stimmt gut mit den Abmessungen der STEM-Abbildungen überein. Es wurde eine durchschnittliche hydrodynamische Größe von 201 nm und ein Zeta-Potential von -9 mV aufgenommen. Die leichte Erhöhung der negativen Ladung resultiert aus der negativ geladenen Silica-Schale. Die PDI-Messungen von 0,3 weisen auf ein monodisperses System mit leichter Agglomeration hin. In einer weiteren Untersuchung wurde die NT-Analyse eingesetzt um den hydrodynamischen Durchmesser der DLS-Messungen zu bestätigen. Anhand der NT-Analyse konnte ein durchschnittlicher hydrodynamischer Durchmesser von 188 nm detektiert werden. Somit stimmt die Partikelgröße gut mit der Größe aus der DLS-Messung überein.

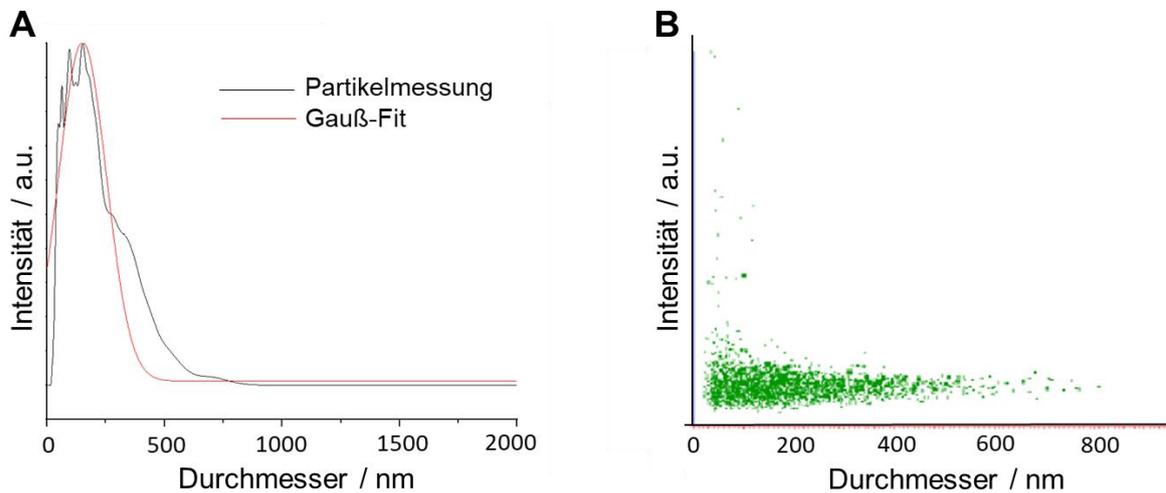


Abb. 66: NT-Analyse der PEI-SiO₂-beschichteten VLP's als Liniendiagramm (A) und als Punktdiagramm (B).

Um eine Nachverfolgung in Zellen zu gewährleisten, wurde für diese Versuchsreihe PEI-Cy5 eingesetzt. Zunächst wurde in Abb. 67 eine STEM-Aufnahme der sphärischen VLP/PEI-Cy5-Partikel abgebildet. Bei näherer Betrachtung fällt auch hier der erhöhte Kontrast der Partikel im Gegensatz zu den unbeschichteten VLP's auf. Diese Indizien weisen auf eine erfolgreiche Beschichtung hin. Nach der Abmessung von 50 Partikeln konnte ein mittlerer Durchmesser von 47 nm bestimmt werden.

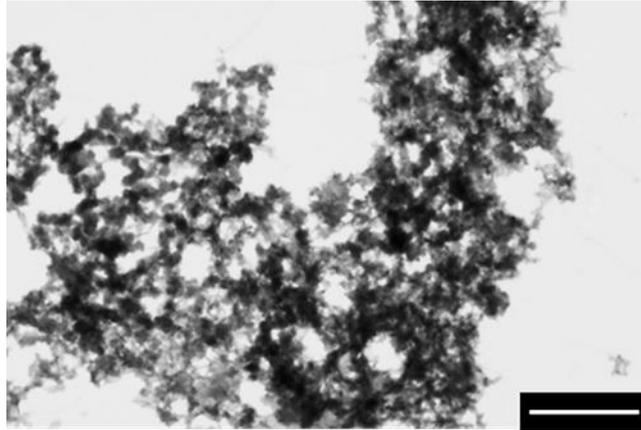


Abb. 67: STEM-Aufnahme der PEI-Cy5-beschichteten VLP's. Maßstab: 500 nm.

Mittels zusätzlicher DLS-Analyse konnte der hydrodynamische Durchmesser der VLP/PEI-Cy5-Partikel bestimmt werden.

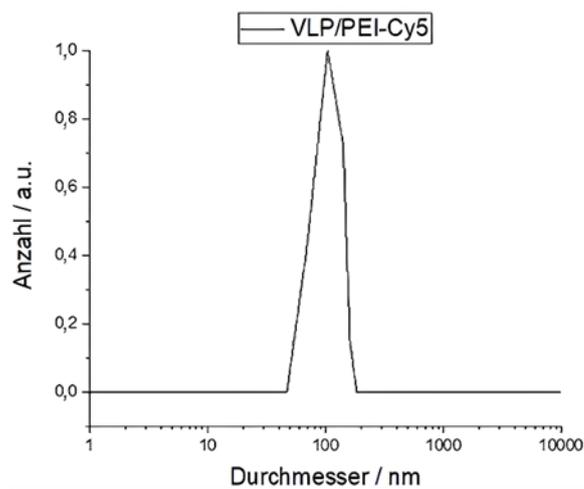


Abb. 68: Normierte Anzahlverteilung der PEI-Cy5-beschichteten VLP's.

Wie an der Gauß-Verteilung in Abb. 68 sichtbar, sind die PEI-Cy5-beschichteten Partikel ausreichend stabilisiert (+11 mV) und haben einen PDI von 0,3. Somit variiert das Zeta-Potential je nach Beschichtungsart mit PEI-Cy5 (positiv) oder mit Silica (negativ). In Tab. 10 ist eine ausführliche Zusammenfassung aller Charakterisierungsmethoden dargestellt.

Tab. 10: Charakterisierungsergebnisse der unterschiedlichen Beschichtung der VLP's.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	STEM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Pote ntial / mV	UV-Vis (Cy5) / kg m ⁻³
VLP/CaP/ PEI-Cy5	0,065	0,163	9,6·10 ¹⁷	47±8	140	0,3	+11	9,0·10 ⁻³
VLP/PEI/ SiO ₂	-	-	-	197±10	201	0,3	-9	-

Durch die Messung der Fluoreszenz der Cy5-Moleküle (Wellenlänge 647 nm) mittels UV-Vis-Spektroskopie kann die Anzahl der Moleküle in der Dispersion und um einen VLP-Partikel bestimmt werden (siehe Gleichung 17, 18 und 19 in Kapitel 5.1.1).

Tab. 11: PEI-Cy5-Moleküle in der Dispersion und an einem VLP.

Probe	Anzahl pro m ⁻³ Dispersion	Anzahl pro Partikel
VLP/PEI-Cy5	2.2·10 ²⁰	227

Eine weitere Möglichkeit fluoreszierende Partikel zu generieren, ist die Markierung der VLP's mit NHS-Fluorescein. Hierfür werden die Partikel für eine Stunde mit diesem inkubiert und durch mehrmalige Waschschrte mittels Spinfiltration vom überschüssigen NHS-Fluorescein gereinigt. In Abb. 69 ist eine schematische Vorgehensweise der einzelnen Schritte abgebildet.

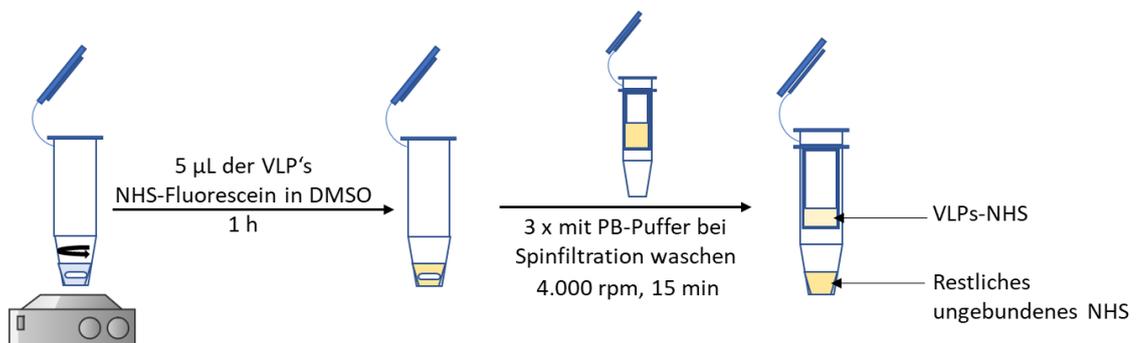


Abb. 69: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmarkierung der VLP's mit anschließender Aufreinigung mittels Spinfiltration.

Nach der Fluoreszenzmarkierung der VLP's wurden STEM-Aufnahmen durchgeführt, um die Morphologie der erhaltenen Partikel darzustellen. Mittels roter Pfeile werden repräsentativ einige VLP-NHS-Partikel in Abb. 70 verdeutlicht.

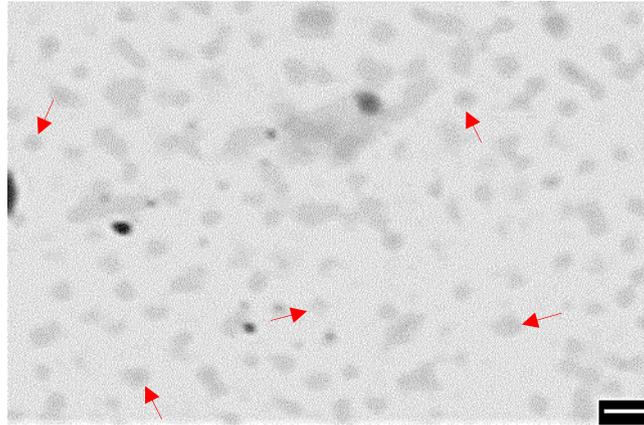


Abb. 70: STEM-Aufnahme der fluoreszenzmarkierten VLP-NHS. Maßstab: 100 nm.

Werden die VLP's anhand der STEM-Aufnahmen vor und nach der NHS-Markierung verglichen, fällt auf, dass die NHS-markierten VLP's eine Größe von 46 ± 10 nm aufweisen, im Gegensatz zu unmarkierten VLP's mit einer Größe von 53 ± 7 nm. Durch DLS-Messungen konnte die Abnahme der Größe bestätigt werden. Es wurde ein hydrodynamischer Durchmesser nach der Anzahlverteilung von 51 ± 6 nm detektiert. Das Zeta-Potential von -6 mV weist auf annähernd stabile Partikel hin, was anhand der PDI-Messungen (0,3) bestätigt werden kann. Der PDI-Wert fällt sogar von 0,37 (reine VLP's) auf 0,33, was bei der Partikelgrößenverteilung in Abb. 71 gut sichtbar ist. In dieser Abbildung sind die beiden Durchmesser nach der Anzahlverteilung (**A**) und Zeta-Potential-Messungen nach der Intensitätsverteilung (**B**) vor und nach der Behandlung mit NHS-Fluorescein vergleichend dargestellt.

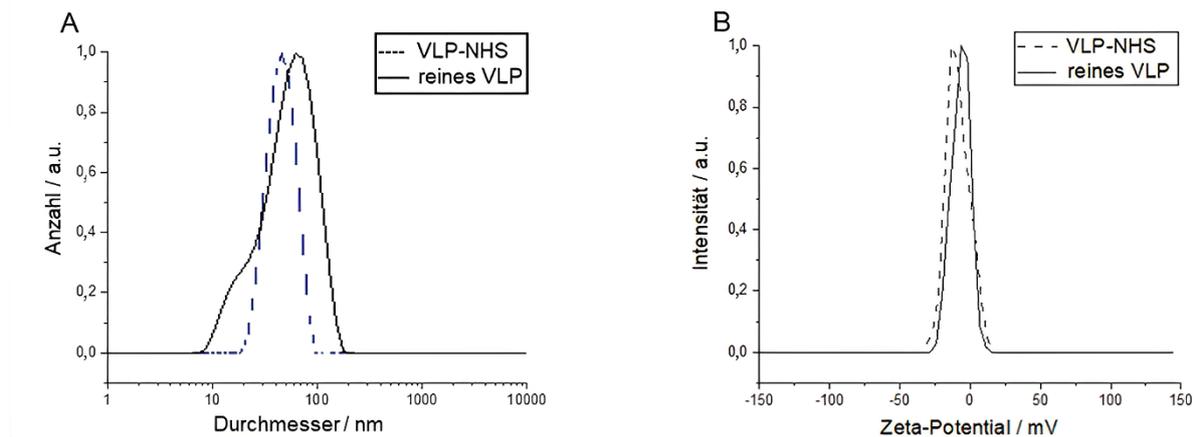


Abb. 71: Vergleich der (A) Normierten Anzahlverteilungen und (B) Zeta-Potential-Messungen vor und nach dem Markieren mit NHS-Fluorescein.

Wie bei den unmarkierten VLP's wurden die Partikel mit **(1)** CaP, **(2)** CaP und PEI-Cy5 sowie **(3)** PEI und SiO₂ beschichtet. Nach der Abmessung von 20 Partikeln aus den STEM-Bildern und der Messung der Ca-Konzentration mittels AAS, kann die Anzahl an Partikeln innerhalb der Dispersion berechnet werden (siehe Gleichungen **13**, **14** und **15**). Anhand der daraus resultierenden Fluoreszenz kann mittels UV-Vis-Spektroskopie die Konzentration an NHS-Fluorescein quantifiziert werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. **12** zusammengefasst.

Tab. 12: Zusammenfassung und Vergleich der verschiedenen beschichteten VLP-NHS-Partikel.

Probe	$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{kg m}^{-3}$	$c(\text{HAP}) / \text{kg m}^{-3}$	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta-Potential / mV	UV-Vis (NHS) / kg m^{-3}
<i>Reine VLP-NHS</i>	-	-	80	0,4	-6	1,00
<i>VLP-NHS/CaP</i>	0,147	0,366	96	0,4	-2	0,81
<i>VLP-NHS/CaP /PEI-Cy5</i>	0,091	0,228	104	0,3	+13	0,73
<i>VLP-NHS/PEI/ SiO₂</i>	-	-	198	0,3	-12	0,86

Anhand der UV-Vis-Bestimmung ist ersichtlich, dass nach jedem Synthese- und anschließendem Aufreinigungsschritt ein gewisser Teil an VLP-NHS abgetrennt wird. Aus diesem Grund wurde die Zentrifugationszeit und Geschwindigkeit für die nächsten Experimente verkürzt. Der hydrodynamische Durchmesser der beschichteten Partikel variiert je nach Beschichtungsart zwischen 80 nm und 198 nm. Anhand der DLS-Auftragungen in Abb. 72 kann die Partikelgrößenverteilung der beschichteten VLP's dargestellt werden. Der PDI weist auf ein leicht polydisperses System hin, wobei die Werte der beschichteten VLP's geringer ausfallen, als ohne Beschichtung. Somit bestätigt sich die Annahme, dass die Beschichtung zu einer Stabilisierung der Partikel beiträgt.

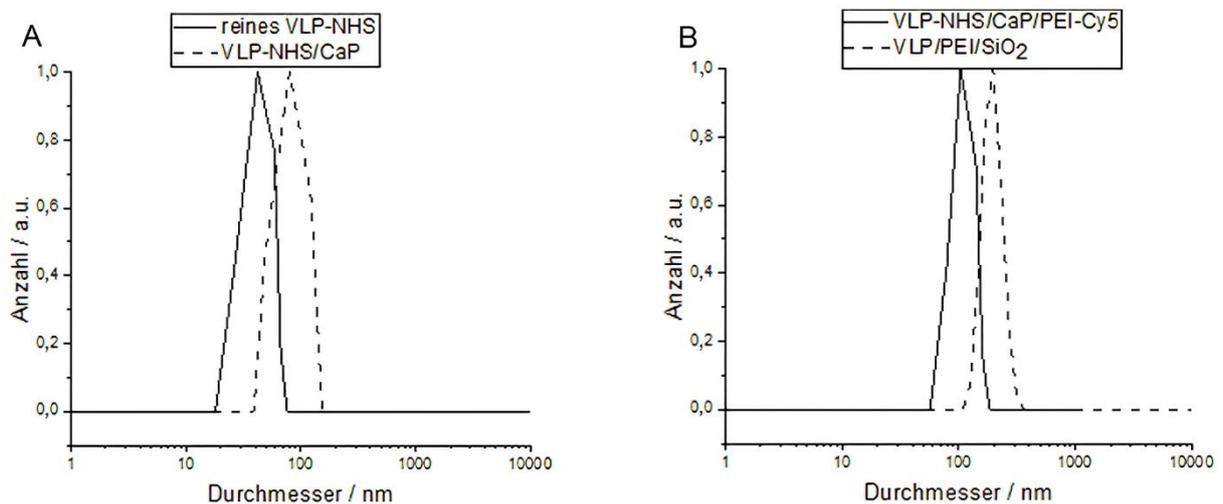


Abb. 72: Normierte Anzahlverteilungen der (A) reinen und CaP-beschichteten VLP's sowie (B) CaP/PEI-Cy5- und PEI/SiO₂-beschichteten VLP's.

Im nächsten Schritt wurden fluoreszenzmikroskopische Zellexperimente mit HeLa-Zellen durchgeführt. Anhand der Fluoreszenz konnten in den Aufnahmekanälen in Abb. 73 b und c erste Annahmen über die Zellaufnahme getroffen werden. Hierbei wurden die unbeschichteten VLP-NHS-Partikel als Kontrollgruppe (Abb. 73 A und Abb. 73 A) eingesetzt. Die starke grüne Fluoreszenz der VLP-NHS kann im FITC-Kanal entnommen werden. In Abb. 73 C;c ist die Aufnahme der beschichteten VLP's mit PEI-Cy5 im TRITC-Kanal sichtbar. Die Partikelarten konnten gut und zahlreich von den HeLa-Zellen aufgenommen werden, was vor allem in der Überlagerung aller drei

Kanäle sichtbar ist. Unter anderem kann auf nicht toxische Partikel geschlossen werden, da die typische Morphologie der Zellen erhalten bleibt.

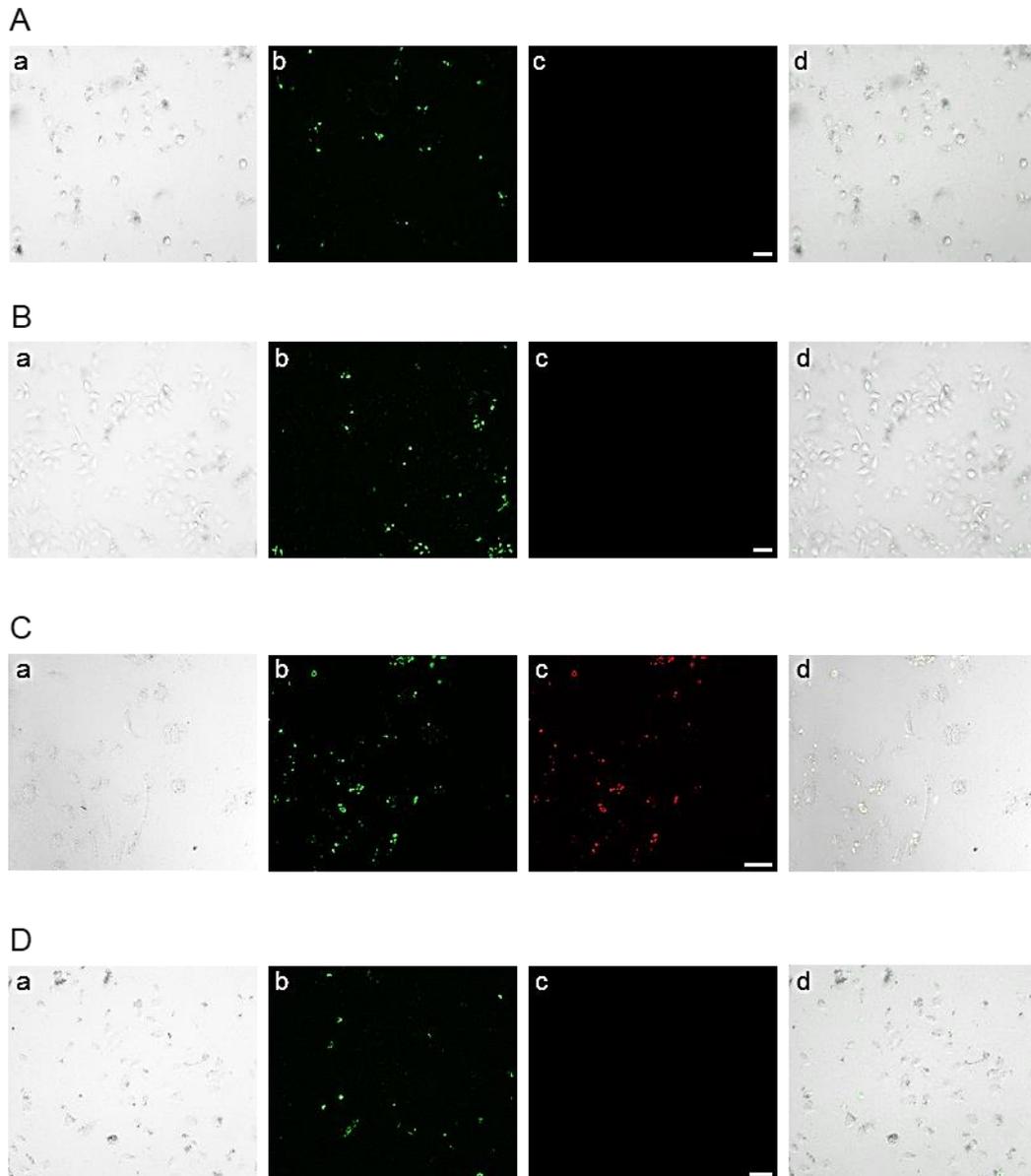


Abb. 73: Aufnahme von unbeschichteten und verschieden beschichteten VLP's durch HeLa-Zellen. Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) unbeschichteten VLP-NHS, (B) VLP-NHS/CaP, (C) VLP-NHS/CaP/PEI-Cy5 und (D) VLP-NHS/PEI/SiO₂. In (a) die Zellen im Hellbild, in (b) Fluoreszenz des NHS, (c) Fluoreszenz des PEI-Cy5 und (d) Überlagerungsbild. Maßstab: 50 µm.

Für weitere Zellaufnahmestudien wurden mittels CLSM z-Schnitte der Zellen durchgeführt, um die genaue Lokalisation der beschichteten Partikel darzustellen. Außerdem konnte so ausgeschlossen werden, dass sich die Partikel nur an der Zellmembran angelagert haben.

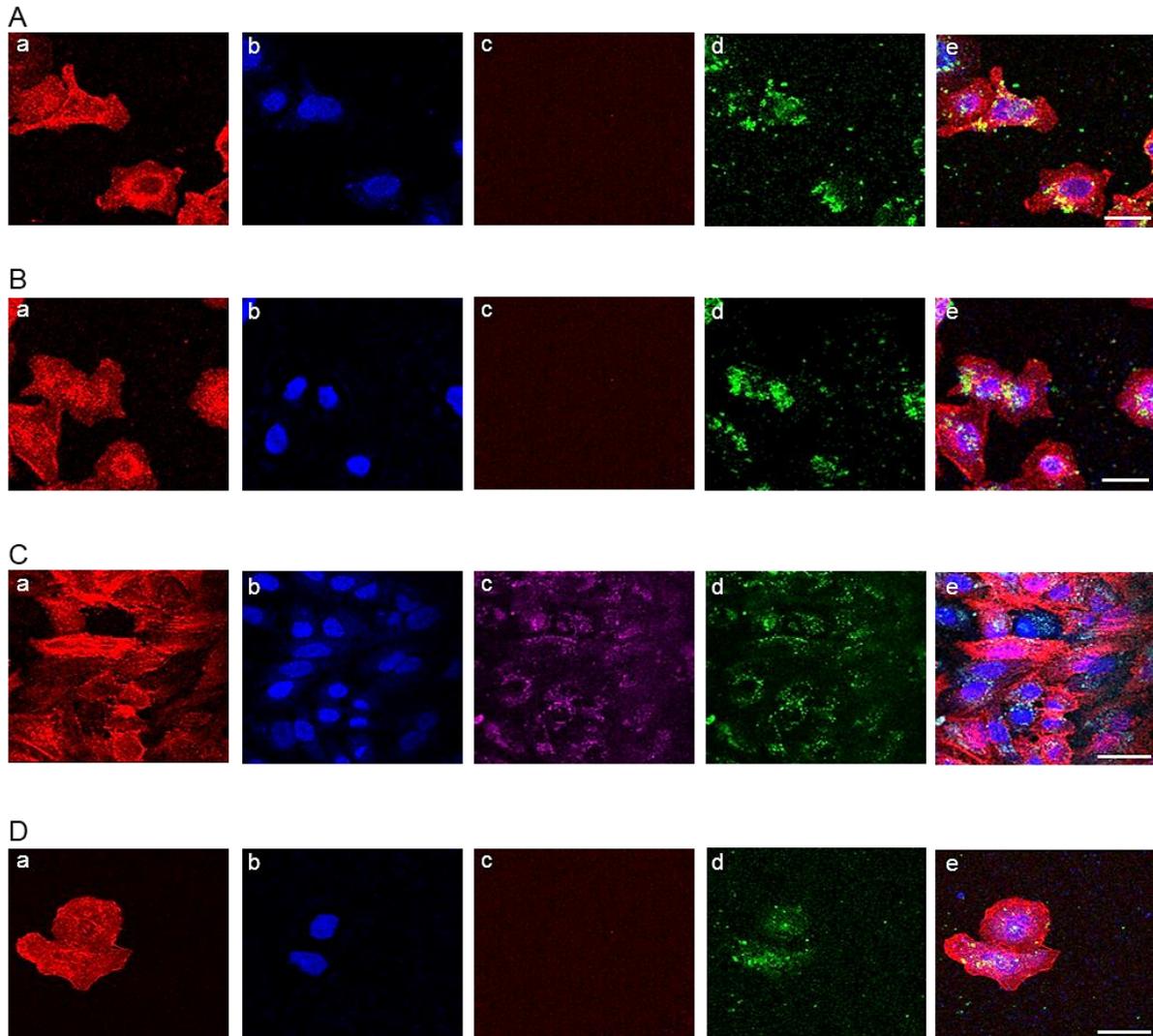


Abb. 74: CLSM von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) unbeschichteten VLP-NHS, (B) VLP-NHS/CaP, (C) VLP-NHS/CaP/PEI-Cy5 und (D) VLP-NHS/PEI/SiO₂. Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin (a), Zellkern mit Hoechst-3342 (b), PEI-Cy5-Fluoreszenz (c), NHS-Fluoreszenz (d) sowie ein Überlagerungsbild (e). Maßstab: 20 µm.

In den CLSM-Aufnahmen ist sichtbar, dass die unbeschichteten Partikel in Abb. 74 A;e nur teilweise von den Zellen aufgenommen wurden. Einige grün fluoreszierende VLP-

NHS-Partikel befinden sich an der Zellmembran. Durch die Beschichtung mit den einzelnen Schalen konnte eine verbesserte Zellaufnahme gewährleistet werden. Das kann vor allem in den Überlagerungskanälen in der Abb. 74 e bestätigt werden. Durch die Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin (rot) konnten die grün fluoreszierenden VLP-NHS klar sichtbar im intrazellulären Raum detektiert werden. Das bedeutet, dass eine verbesserte Zellaufnahme erst dann gewährleistet ist, wenn die VLP-Partikel beschichtet sind. Somit bestätigt sich auch hier, dass CaP und SiO₂ als Trägersysteme für Biomoleküle dienen können, da Moleküle allein nur teilweise von Zellen aufgenommen werden können. Im darauffolgenden Schritt wurden erste Klick-Experimente mit AF647-Farbstoffen durchgeführt. Hierfür wurden die NHS-markierten VLP's zum einen mit CaP/PEI/SiO₂ und zum anderen nur mit einer Silica-Schale beschichtet. Mittels DLS-Messungen konnte die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers nach jedem Reaktionsschritt nachverfolgt werden (Abb. 75). Der mittlere Durchmesser der CaP/PEI/SiO₂-beschichteten VLP's war nach den Klick-Experimenten mit AF647 um 153 nm größer als die unbeschichteten VLP-NHS-Partikel. Für die Silica-beschichteten VLP-NHS-Partikel konnte eine Größenzunahme von sogar 186 nm detektiert werden. Dies bestätigt sich anhand der Vorexperimente, in welchen gezeigt wurde, dass die Beschichtung mit einer Silica-Schale größer ausfällt (Abb. 64, Querschnittsmessung bei ca. 500 nm), als die Beschichtung mit CaP (Abb. 59, Querschnittsmessung ca. 120 nm).

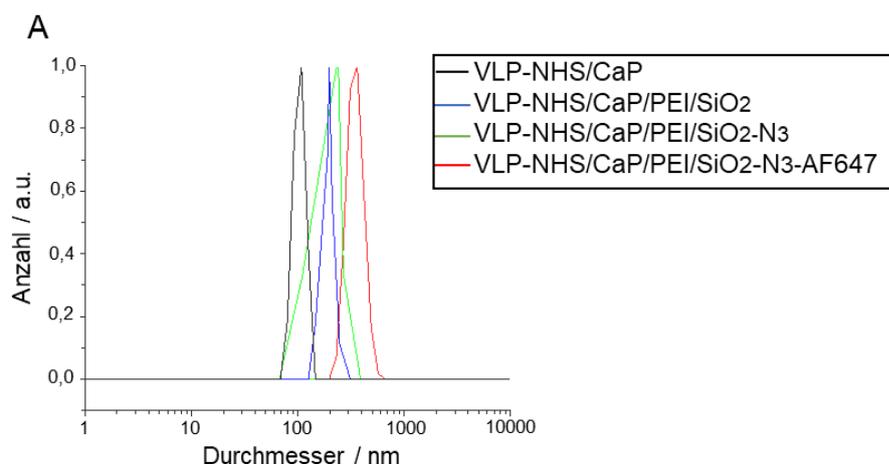


Abb. 75 A: Normierte Anzahlverteilungen der VLP-NHS ausgehend von einer CaP-Beschichtung mit anschließender Klick-Reaktion.

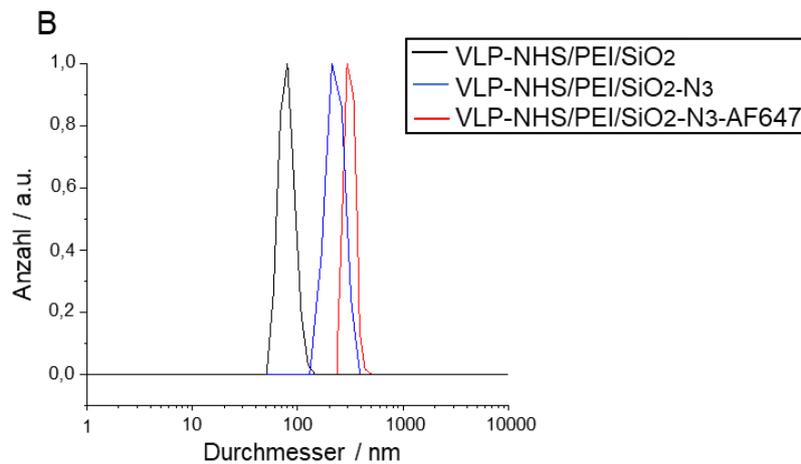


Abb. 75 B: Normierte Anzahlverteilungen der VLP-NHS ausgehend von einer SiO₂-Beschichtung mit anschließender Klick-Reaktion.

Mittels PDI-Messungen von 0,4 kann von einem polydispersen System gesprochen werden. Dies bestätigen die Zeta-Potentiale von maximal -9 mV, welche ein Beweis für die nicht ausreichende Stabilisierung und daraus resultierende Agglomeration sind. In Tab. **13** ist eine Zusammenfassung der Analyseergebnisse vor und nach der Klick-Reaktion mit AF647 aufgelistet.

Tab. 13: Zusammenfassung und Vergleich der beiden Beschichtungsmethoden der fluoreszierenden VLP-NHS.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	STEM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV
VLP- NHS/CaP	0,147	0,366	2,7·10 ¹⁷	94±21	108	0,4	-4
VLP- NHS/CaP /PEI/SiO ₂ - N ₃ -AF647	0,092	0,231	2,0·10 ¹⁷	-	261	0,4	-9
VLP- NHS/PEI/ SiO ₂	-	-	-	84±13	180	0,3	-7
VLP- NHS/PEI/ SiO ₂ -N ₃ - AF647	-	-	-	-	294	0,4	-4

Anhand von UV-Vis-Messungen konnten die Konzentrationen an geklicktem AF647 und des NHS-Fluoresceins an den VLP-NHS-Partikeln nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte und daraus resultierenden Moleküle in der Dispersion werden in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Berechnung der NHS- und AF647-Moleküle in der Dispersion.

Probe	UV-Vis (NHS) / kg m ⁻³	NHS Anzahl pro m ⁻³ Dispersion	UV-Vis (AF647) / kg m ⁻³	AF647 Anzahl pro m ⁻³ Dispersion
VLP-NHS/CaP	0,81	1,1·10 ²⁴	-	-
VLP-NHS/CaP/PEI/SiO ₂ - N ₃ -AF647	0,61	7,2·10 ²³	0,23	1,5·10 ²³
VLP-NHS/PEI/SiO ₂	0,86	1,2·10 ²⁴	-	-
VLP-NHS/PEI/SiO ₂ -N ₃ - AF647	0,74	1,0·10 ²⁴	0,24	1,6·10 ²³

Im nächsten Schritt wurden *in vitro*-Studien herangezogen, um Aufnahmeuntersuchungen durchzuführen. Auch hier konnte zum einen die Fluoreszenz des NHS-Fluoresceins im FITC-Kanal (Abb. 76 b) und zum anderen die

Fluoreszenz der angeklickten AF647-Moleküle (Abb. 76 c) abgebildet werden. Mittels Überlagerung konnte bestätigt werden, dass beide Fluoreszenzen im Inneren der Zellen vorzufinden sind. Dies lässt auf eine erfolgreiche Zellaufnahme und die Stabilität des Partikelbaus schließen.

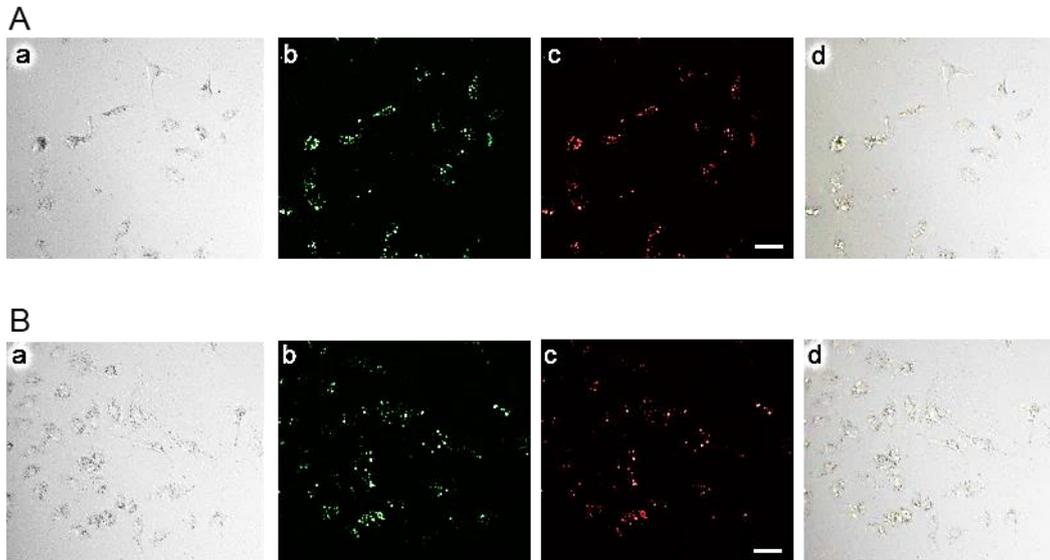


Abb. 76: Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) VLP-NHS/CaP/PEI/SiO₂-N₃-AF647 und (B) VLP-NHS/PEI/SiO₂-N₃-AF647 Partikeln. Dabei sind in (a) die Zellen im Hellbild, in (b) die VLP-NHS, in (c) die AF647-Moleküle und in (d) eine Überlagerung aller Kanäle dargestellt. Maßstab: 50 μ m.

Da die Beschichtung mit einer Silica-Schale genauso zielführend war, wurde die Beschichtung mit CaP- und anschließender Silica-Schale nicht weiterverfolgt. Aus diesem Grund wurden die VLP's direkt mit PEI als positiv geladenes Polymer und danach mit einer Silica-Schale stabilisiert (Erster Schritt, Abb. 77). Eine weitere Besonderheit in dieser Versuchsreihe war, dass nicht nur leere VLP's, sondern auch VLP(pEGFP)'s eingesetzt wurden. Das bedeutet, dass die Plasmid-DNA im Kern der VLP's zu einer Transfektion in Zellexperimenten führen kann. In Abb. 77 ist eine schematische Abbildung der einzelnen Syntheseschritte dargestellt. Durch die Anbringung der Silica-Schale konnte die Oberfläche der VLP/PEI/SiO₂ im nächsten Schritt (Zweiter Schritt, Abb. 77) entweder mit Thiolgruppen (unspezifische Kopplung) oder mit Azidgruppen (Klick-Reaktion) in Kombination mit Biomolekülen funktionalisiert

werden. Als Kontrollgruppen dienten AF647-Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte BSA-Moleküle (BSA-AF568). Zuletzt wurden fluoreszenzmarkierte Env-AF568 eingesetzt. Die fluoreszierenden BSA-AF568- und Env-AF568-Moleküle wurden vor der Synthese mit dem entsprechenden Linker (Sulfo-SMCC oder Propargyl-PEG3-Aminoxy), wie im letzten Kapitel bei den *B-CaPs* dargestellt, inkubiert und zur Reaktion mit den VLP's und VLP(pEGFP)'s gegeben.

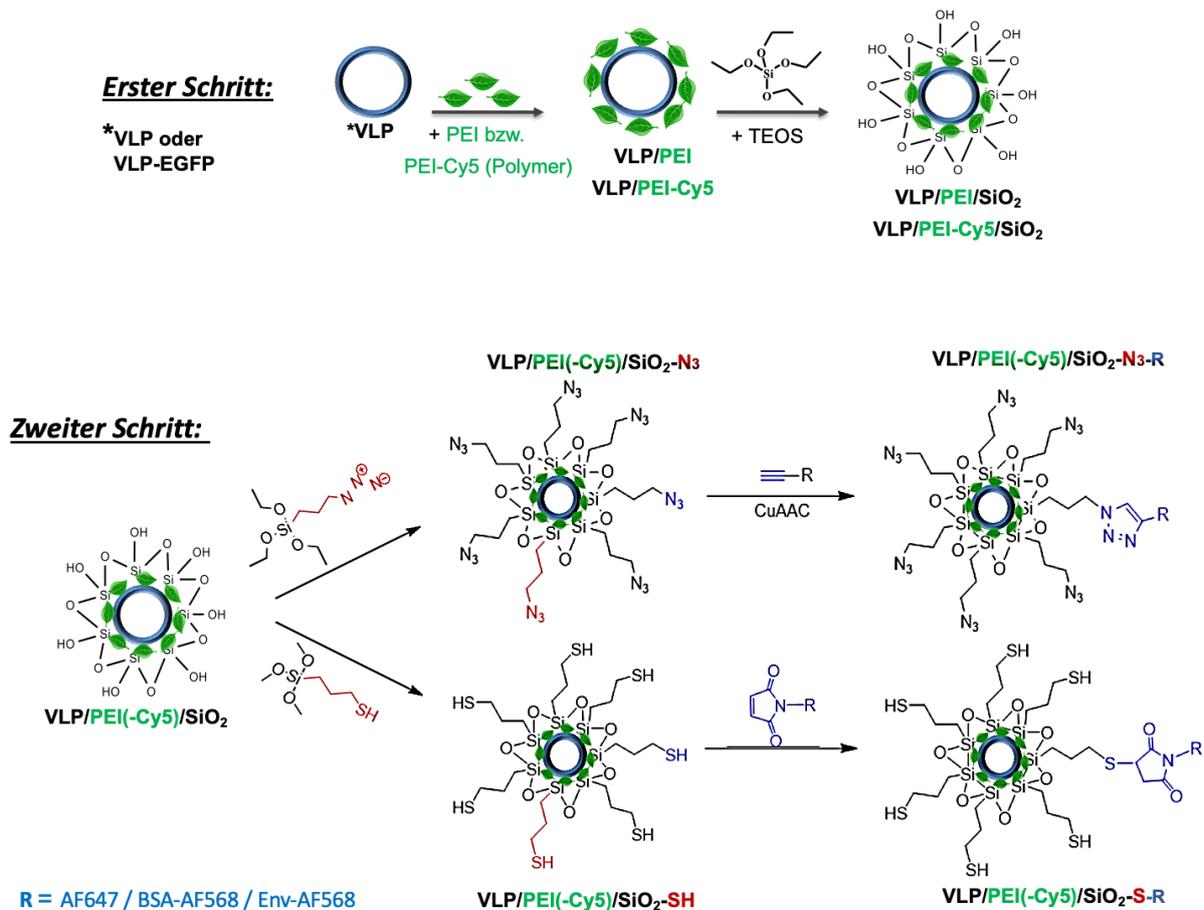
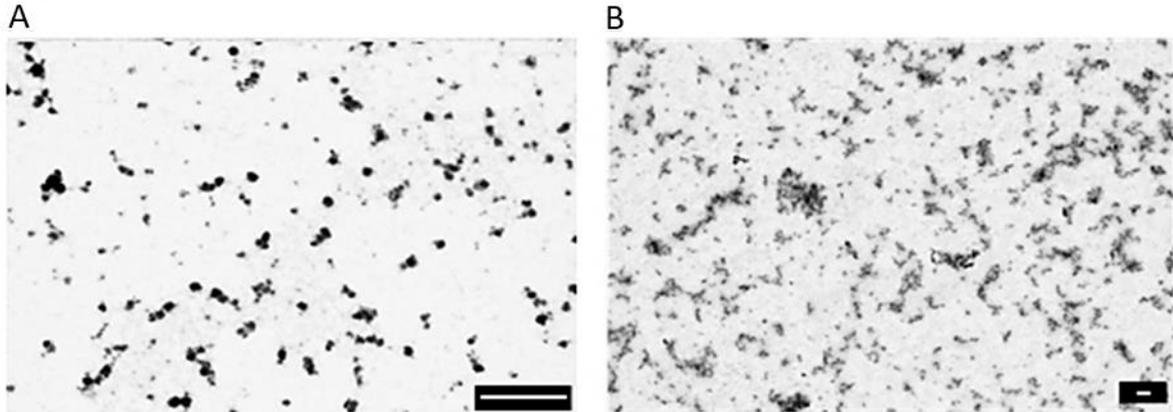


Abb. 77: Schematische Abbildung der beiden Syntheseschritte für die Beschichtung und anschließender Funktioanlisierung der VLP-Oberfläche.

Auch für diese Untersuchungen wurden STEM-Aufnahmen von Frau Dr. Loza durchgeführt. In Abb. **78** sind die STEM-Aufnahmen der beschichteten VLP's und VLP(pEGFP)'s nach der Stabilisierung mit PEI und einer Silica-Schale dargestellt.



**Abb. 78: STEM-Aufnahmen der (A) VLP/PEI/SiO₂ und der (B) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂ Partikel.
Maßstab: 500 nm.**

Die STEM-Bilder zeigen eine sphärische Morphologie der Partikel mit einem mittleren Durchmesser aus 30 gemessenen Partikeln von 108 nm (VLP/PEI/SiO₂) und 125 nm (VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂). Im zweiten Schritt (Abb. **77**) wurden die Silica-stabilisierten VLP's und VLP(pEGFP)'s mit Thiolgruppen bzw. Azidgruppen funktionalisiert, um eine Anbringung von Farbstoff- und Biomolekülen zu gewährleisten. In Abb. **79** sind repräsentative STEM-Darstellungen der Azidgruppen-funktionalisierten VLP's dargestellt, die **(A)** mit AF647, **(B)** mit fluoreszierenden BSA-AF568 und **(C)** mit Env-AF568 mittels Klick-Chemie angebracht worden sind.

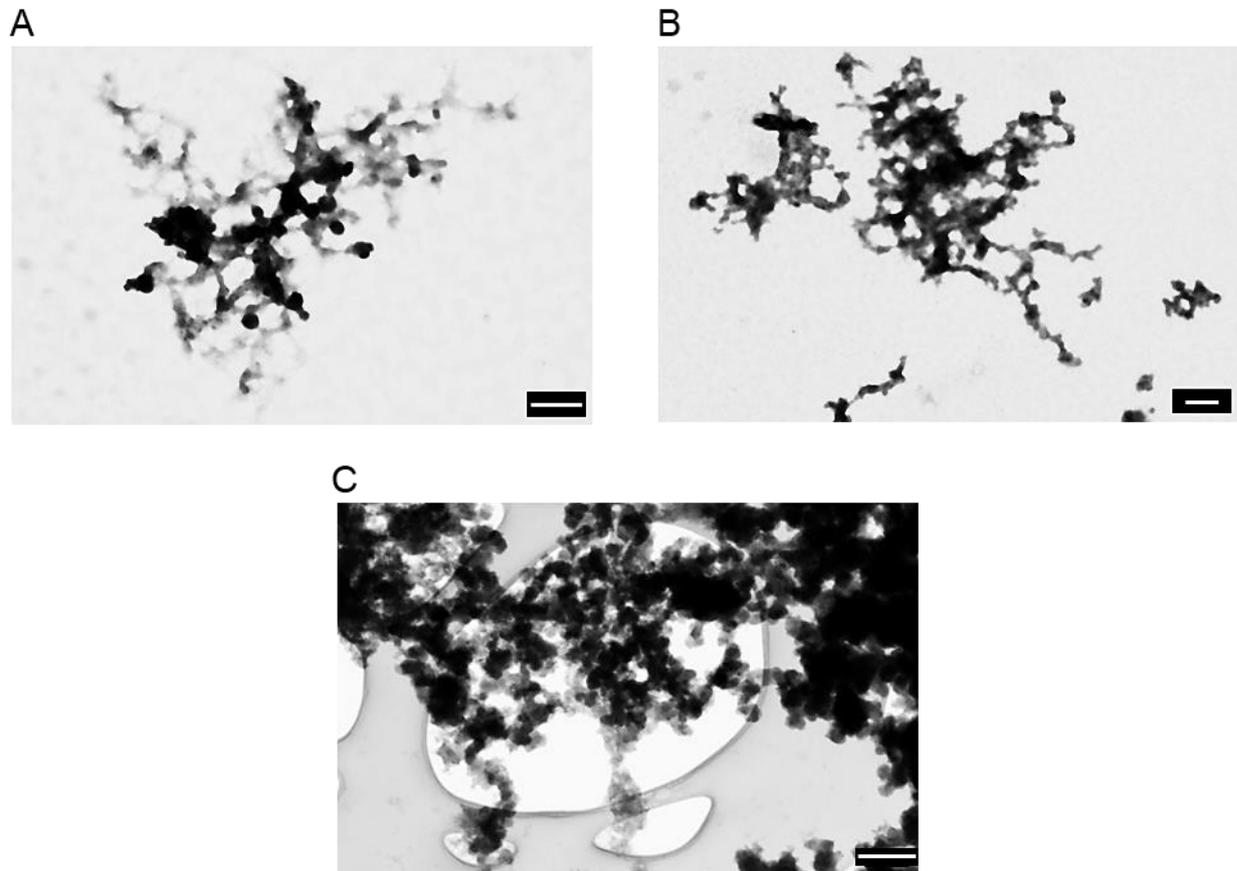


Abb. 79: STEM-Aufnahmen der (A) VLP/PEI/SiO₂-N₃-AF647, der (B) VLP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568 und der (C) VLP/SiO₂-N₃-Env-AF568 Partikel. Maßstab: 500 nm.

Die STEM-Bilder stellen eine sphärische Morphologie der Partikel nach der Klick-Reaktion dar. Die mittlere Größe der VLP/PEI/SiO₂-N₃-Env-AF568-Partikel ist um 10 nm größer als die der VLP/PEI/SiO₂-N₃-AF647-Partikel. Die VLP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568-Partikel weisen hingegen auf gleiche Größenverhältnisse wie die VLP mit reinem Farbstoff (AF647) hin. Durch DLS-Messungen konnten die hydrodynamischen Durchmesser anhand der Anzahlverteilung der VLP/PEI/SiO₂ nach jedem Syntheseschritt dargestellt werden. Wie in Abb. 80 zu erkennen, nimmt die Partikelgrößenverteilung systematisch zu, was auf eine erfolgreiche Anbringung der Farbstoff- und Biomoleküle schließen lässt. Dabei ist zu erkennen, dass die Thiolgruppen-funktionalisierten VLP's einen 30 nm - 53 nm größeren hydrodynamischen Durchmesser zeigen, als die Azidgruppen-funktionalisierten VLP's. Das gleiche Vorgehen wurde für die VLP(pEGFP)'s durchgeführt. Das bedeutet, dass die Partikel mit PEI und einer Silica-Schale stabilisiert und im Anschluss mit Farbstoff-

und Biomolekülen funktionalisiert wurden. Die hydrodynamischen Durchmesser der Anzahlverteilungen sind ebenfalls in Abb. 80 zu entnehmen. Hier spiegelt sich, genauso wie bei den VLP's, die Größenzunahme nach jedem Reaktionsschritt und ein 25 nm – 32 nm größerer Durchmesser der Thiolgruppen-funktionalisierten VLP(pEGFP)'s wider.

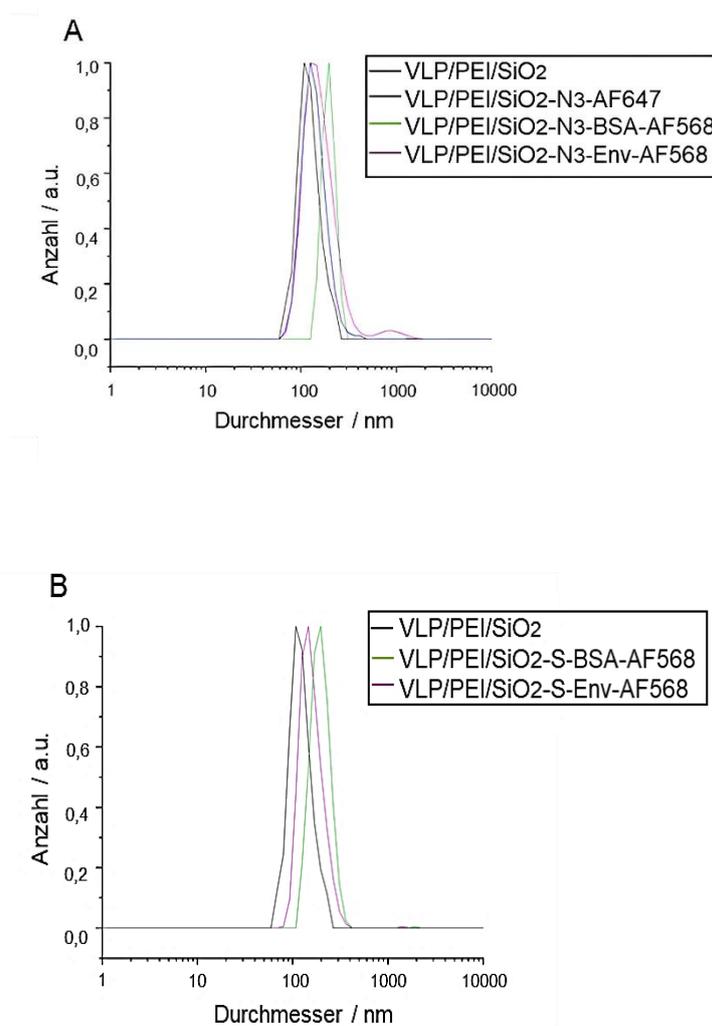


Abb. 80 A - B: Normierte DLS-Auftragungen anhand der Anzahlverteilung. In (A) die VLP/PEI/SiO₂ mit Azidgruppen und in (B) mit Thiogruppen-funktionalisierten Partikel.

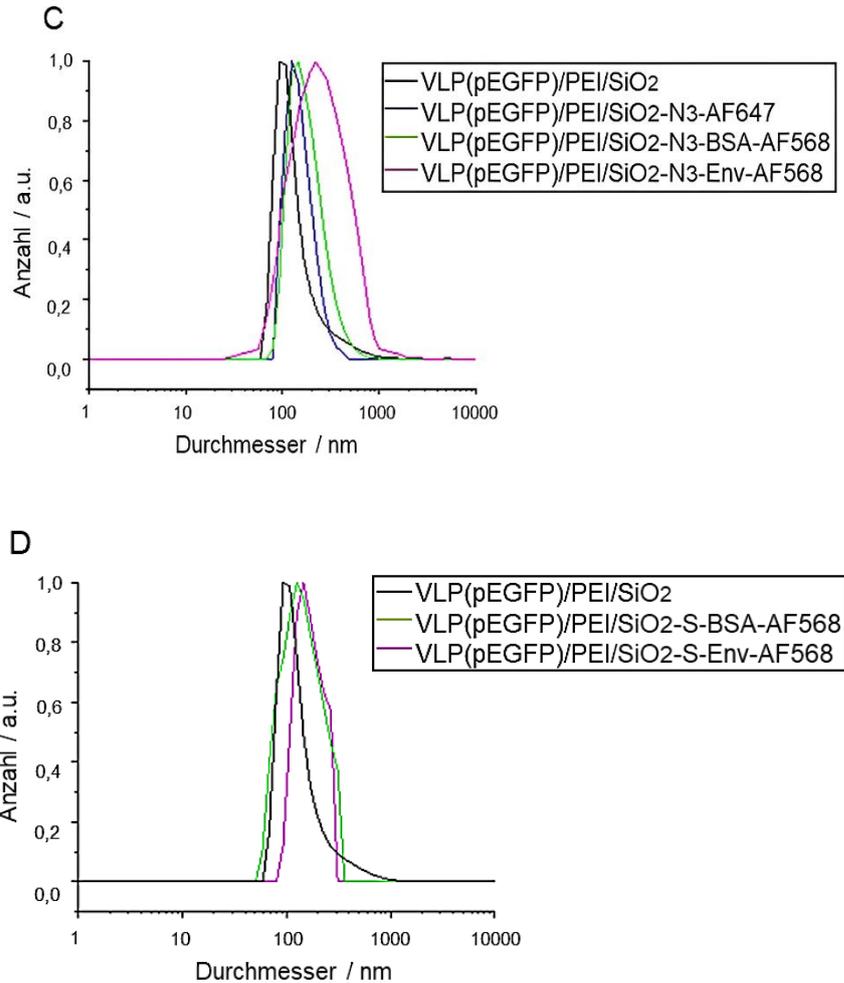


Abb. 80 C - D: Normierte DLS-Auftragungen anhand der Anzahlverteilung. In (C) die VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂ mit Azidgruppen und in (D) mit Thiolgruppen-funktionalisierten Partikel nach der Anbringung von fluoreszierenden Molekülen an die Oberfläche.

Um die Anzahl der gekoppelten Moleküle zu bestimmen, wurden UV-Vis-spektroskopische Aufnahmen durchgeführt. Anhand der Absorption bei Wellenlängen von 650 nm (AF647) und 570 nm (AF568) konnte nach der Aufreinigung der Partikel bestätigt werden, dass sich markierte Farbstoff- und Biomoleküle auf der Partikeloberfläche befinden. In Abb. 81 sind die repräsentativen Spektren der angeklickten AF647-Moleküle an die VLP/PEI/SiO₂-Partikel zu entnehmen.

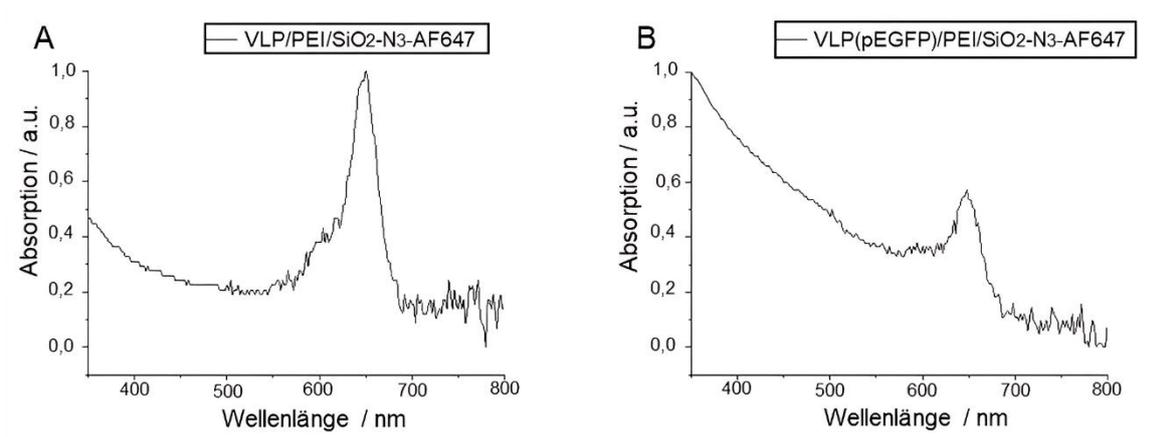


Abb. 81: Normierte UV-Vis-Messungen der (A) VLP's und der (B) VLP(pEGFP)'s nach der Funktionalisierung mit AF647-Farbstoff-Molekülen.

In Tab. 15 ist eine Zusammenfassung aller Charakterisierungsmethoden dargestellt. Aus der Tabelle sind die PDI-Werte von 0,4 zu entnehmen, was auf polydisperse Partikelsysteme hindeutet. Das Zeta-Potential weist hingegen auf gut stabilisierte Partikel hin.

Tab. 15: Zusammenfassung der Analyseergebnisse nach der Funktionalisierung mit fluoreszierenden Molekülen.

Probe	STEM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta-Potential / mV
<i>VLP/PEI/SiO₂</i>	110±15	108±35	0,3	+13
<i>VLP/PEI/SiO₂-N₃-AF647</i>	115±18	124±12	0,4	+16
<i>VLP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568</i>	122±21	127±16	0,4	+11
<i>VLP/PEI/SiO₂-N₃-Env-AF568</i>	130±14	134±25	0,4	+14
<i>VLP/PEI/SiO₂-S-BSA-AF568</i>	137±24	157±30	0,4	+17
<i>VLP/PEI/SiO₂-S-Env-AF568</i>	143±32	187±12	0,4	+19

Aus den erhaltenen Werten der UV-Vis-Messungen kann die Anzahl an gebundenen Molekülen in der Dispersion und pro VLP bestimmt werden. Hierfür wird die Masse eines VLP's aus der Molaren Masse angenommen. Die Molare Masse ergibt sich aus den 360 Einheiten des L1-Proteins (55 kDa), wie in Gleichung 20 gezeigt.

$$M_{w(VLP)} = 360 \cdot 55 \frac{kg}{mol} = 1,98 \cdot 10^4 \frac{kg}{mol} \quad (20)$$

Durch die Division der Molaren Masse aus Gleichung **20** mit der Avogadro-Konstante ergibt sich die Masse eines VLP's.

$$m_{(VLP)} = \frac{M_w}{N_A} = \frac{1,98 \cdot 10^4 \frac{kg}{mol}}{6,023 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}} = 3,29 \cdot 10^{-20} kg \quad (21)$$

Mit der gemessenen Konzentration an VLP's in der Dispersion ($g L^{-1}$) mittels NanoDrop kann die Anzahl an VLP's in der Dispersion berechnet werden. In Gleichung **22** ist die Beispielrechnung für die VLP/PEI/SiO₂ aufgeführt. Für die anderen Partikelsysteme wurden die gleichen Berechnungen analog durchgeführt und sind in Tab. **16** dargestellt.

$$N \text{ (VLP's in Dispersion)} = \frac{c_{(VLP)}}{m_{(VLP)}} = \frac{0,87 \frac{kg}{m^3}}{3,29 \cdot 10^{-20} kg} = 2,64 \cdot 10^{19} \frac{1}{m^3} \quad (22)$$

Die Anzahl an AF647-, BSA-AF568- und Env-AF568-Molekülen auf einem VLP wird mit Hilfe der gemessenen Konzentrationen durch die UV-Vis-Spektroskopie, der zuvor bestimmten Anzahl an VLP's in der Dispersion, der Molaren Masse des Moleküls und der Avogadro-Konstante anhand einer Beispielrechnung für die VLP/PEI/SiO₂-AF647 aufgeführt.

$$m_1 \text{ (AF647)} = \frac{c_{(AF647)}}{N_{(VLP's)}} = \frac{0,025 \frac{kg}{m^3}}{2,01 \cdot 10^{19} \frac{1}{m^3}} = 1,24 \cdot 10^{-21} kg \quad (23)$$

$$m_2 \text{ (AF647)} = \frac{M_{(AF647)}}{N_A} = \frac{0,910 \frac{kg}{mol}}{6,023 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}} = 1,51 \cdot 10^{-24} kg \quad (24)$$

$$N (\text{Anzahl AF647 pro VLP}) = \frac{m_1 (\text{AF647})}{m_2 (\text{AF647})} = \frac{1,24 \cdot 10^{-21} \text{ kg}}{1,51 \cdot 10^{-24} \text{ kg}} = 821 \quad (25)$$

Die Bestimmung der Molekülanzahl der BSA-AF568 ($M_w = 66 \text{ kDa}$) und Env-AF568 ($M_w = 420 \text{ kDa}$) wurde analog durchgeführt und wird in Tab. 16 aufgelistet.

Tab. 16: Anzahl der geklickten Farbstoff- und Biomoleküle in der Dispersion und pro VLP.

Probe	NanoDrop (VLP) / kg m^{-3}	UV-Vis (AF647 / BSA-AF568 / Env-AF568) / kg m^{-3}	VLP Anzahl pro m^{-3} Dispersion	AF647 / BSA-AF568 / Env-AF568 Anzahl pro VLP
<i>VLP/PEI/SiO₂</i>	0,87	-	$2,64 \cdot 10^{19}$	-
<i>VLP/PEI/SiO₂-N₃-AF647</i>	0,66	0,025	$2,01 \cdot 10^{19}$	821
<i>VLP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568</i>	0,63	0,760	$1,91 \cdot 10^{19}$	362
<i>VLP/PEI/SiO₂-N₃-Env-AF568</i>	0,61	0,850	$1,85 \cdot 10^{19}$	66
<i>VLP/PEI/SiO₂-S-BSA-AF568</i>	0,58	0,890	$1,76 \cdot 10^{19}$	416
<i>VLP/PEI/SiO₂-S-Env-AF568</i>	0,57	0,930	$1,73 \cdot 10^{19}$	77

Werden die resultierenden Werte der Moleküle pro Partikel betrachtet, fällt auf, dass sechsfach weniger Env-AF568-Moleküle gekoppelt wurden als die BSA-AF568-Moleküle. Das kann durch die unterschiedlichen Molaren Massen erklärt werden, denn die Molare Masse des Env-Trimers ist ca. sechsfach größer als die eines BSA-Moleküls. Somit kann von einer vergleichsweise gleichen Klick-Effizienz gesprochen werden. Die VLP(pEGFP)'s wurden unter gleichen Bedingungen mit den Farbstoff- und Biomolekülen mittels einer unspezifischen Anbindung sowie mittels Klick-Chemie funktionalisiert. In Tab. 17 ist eine Zusammenfassung der STEM- und DLS-Größen, sowie die PDI- und Zeta-Potential-Werte aufgelistet. Auch hier weist der PDI auf polydisperse Systeme hin, was sich in den Anzahlverteilungen der DLS-Auftragungen widerspiegelt.

Tab. 17: Zusammenfassung der beschichteten und funktionalisierten VLP(pEGFP)'s.

Probe	STEM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV
<i>VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂</i>	125±23	140±11	0,4	+15
<i>VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-AF647</i>	128±07	160±14	0,4	+17
<i>VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568</i>	114±15	171±32	0,3	+16
<i>VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-Env-AF568</i>	132±17	158±23	0,4	+14
<i>VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-S-BSA-AF568</i>	150±24	196±20	0,4	+16
<i>VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-S-Env-AF568</i>	170±21	190±22	0,4	+20

Die Anzahl an pEGFP-Molekülen pro VLP konnte anhand der Molaren Masse von pEGFP = 3120 kDa berechnet und mittels NanoDrop die pDNA-Konzentration bestimmt werden. Die Anzahl an VLP's in der Dispersion wurde analog zu den Gleichungen **20** – **22** ermittelt. Beispielhaft wird die Berechnung der pEGFP-Moleküle pro VLP an den VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂ dargestellt.

$$m_{1(pEGFP)} = \frac{c_{(pEGFP)}}{N_{(VLP's)}} = \frac{5,59 \cdot 10^{-2} \frac{kg}{m^3}}{2,86 \cdot 10^{19} \frac{1}{m^3}} = 1,95 \cdot 10^{-21} kg \quad (26)$$

$$m_{2(pEGFP)} = \frac{M_{(pEGFP)}}{N_A} = \frac{3,12 \cdot 10^3 \frac{kg}{mol}}{6,023 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}} = 5,18 \cdot 10^{-21} kg \quad (27)$$

$$N \text{ (Anzahl pEGFP pro VLP)} = \frac{m_{1(pEGFP)}}{m_{2(pEGFP)}} = \frac{1,95 \cdot 10^{-21} kg}{5,18 \cdot 10^{-21} kg} = 0,376 \quad (28)$$

Die berechneten pDNA-Moleküle innerhalb der VLP's und die fluoreszierenden Moleküle auf der Partikeloberfläche (analog berechnet wie in den Gleichungen **23** – **25**) sind in Tab. **18** dargestellt. Durch UV-Vis-Aufnahmen konnte die Absorption der Farbstoffe gemessen und mittels Kalibrationsgeraden auf die Konzentration geschlossen werden.

Tab. 18: Berechnungen der VLP's, der pEGFP- und der fluoreszierenden Moleküle in der Disperion und pro VLP.

Probe	NanoDrop (VLP) / kg m ⁻³	NanoDrop (pEGFP) / kg m ⁻³	UV-Vis (AF647 / BSA- AF568 / Env- AF568) / kg m ⁻³	VLP Anzahl pro m ⁻³ Dispersion	pEGFP Anzahl pro VLP	AF647 / BSA-AF568 / Env-AF568 Anzahl pro VLP
<i>VLP(pEGFP) /PEI/SiO₂</i>	0,94	5,59·10 ⁻²	-	2,86·10 ¹⁹	0,376	-
<i>VLP(pEGFP) /PEI/SiO₂-N₃- AF647</i>	0,81	4,83·10 ⁻²	0,027	2,46·10 ¹⁹	0,379	726
<i>VLP(pEGFP) /PEI/SiO₂-N₃- BSA-AF568</i>	0,77	4,57·10 ⁻²	0,650	2,34·10 ¹⁹	0,377	253
<i>VLP(pEGFP) /PEI/SiO₂-N₃- Env-AF568</i>	0,78	4,62·10 ⁻²	0,700	2,37·10 ¹⁹	0,376	42
<i>VLP(pEGFP) /PEI/SiO₂-S- BSA-AF568</i>	0,76	4,52·10 ⁻²	0,660	2,31·10 ¹⁹	0,378	261
<i>VLP(pEGFP) /PEI/SiO₂-S- Env-AF568</i>	0,80	4,77·10 ⁻²	0,650	2,43·10 ¹⁹	0,379	38

Werden die VLP-Konzentrationen nach den Kopplungsreaktionen aufgelistet, bleiben im Schnitt 80% der VLP's nach den Reaktionen und Aufreinigungsschritten erhalten. Im nächsten Schritt wurden Aufnahmestudien der beschichteten Partikel mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Im TRITC-Kanal (Abb. **82 b**) können anhand der roten Punkte die fluoreszierenden Partikel detektiert werden. Durch die Überlagerungsbilder (Abb. **82 c**) können die Partikel deutlich innerhalb der Zellen lokalisiert werden. Aus den Tab. **15** und **18** können die positiven Zeta-Potentiale der Partikel entnommen werden, sodass diese bevorzugt mit der Zellmembran wechselwirken und von den Zellen aufgenommen werden.

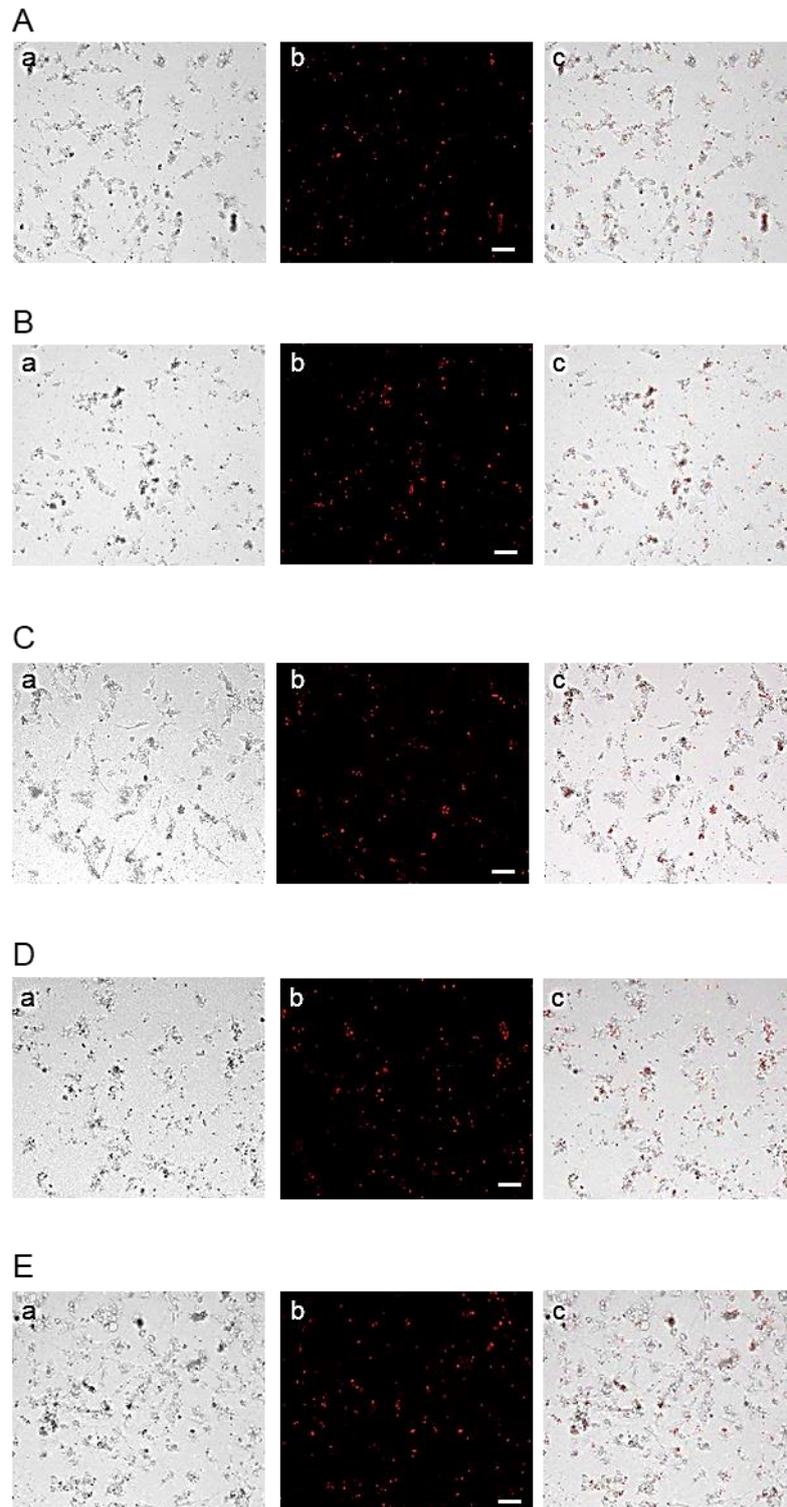


Abb. 82: Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) VLP/PEI/SiO₂-N₃-AF647, (B) VLP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568, (C) VLP/PEI/SiO₂-N₃-Env-AF568, (D) VLP/PEI/SiO₂-S-BSA-AF568 und (E) VLP/PEI/SiO₂-S-Env-AF568. In (a) Hellbild, in (b) Fluoreszenzkanal der AF647- und AF568-Moleküle und (c) eine Überlagerung. Maßstab: 50 µm.

Aus den UV-Vis-spektroskopischen Messungen konnte das erfolgreiche Anbinden von fluoreszierenden Molekülen an die Oberfläche der VLP(pEGFP)-Partikel bestätigt werden. Auf Basis dieser Resultate wurden Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt, um die Aufnahme in Zellen zu untersuchen. Hierbei konnten neben den roten Punkten der markierten Moleküle auf der Partikeloberfläche (Abb. **83 c**), auch die transfizierten Zellen (Abb. **83 b**, grün) beobachtet werden. Diese Transfektion resultiert aus der Beladung der VLP's mit dem pEGFP. In Abb. **83** sind die repräsentativen Zellaufnahmen der VLP(pEGFP)'s (**A**) vor der Funktionalisierung und nach der Funktionalisierung mit Azidgruppen (**B - D**), mit Thiolgruppen (**E** und **F**) und den fluoreszierenden Farbstoff- und Biomolekülen dargestellt. Mit Hilfe der Überlagerungen der Kanäle konnte eine Kolokalisation der transfizierten Zellen und den fluoreszierenden Partikeln innerhalb der Zellen ausgemacht werden. Das ist ein Indiz für die Stabilität der Partikelsysteme, was darauf hindeutet, dass die gebundenen Moleküle und der pEGFP-Kern zusammen von den Zellen aufgenommen und zielgerichtet eingesetzt werden können.

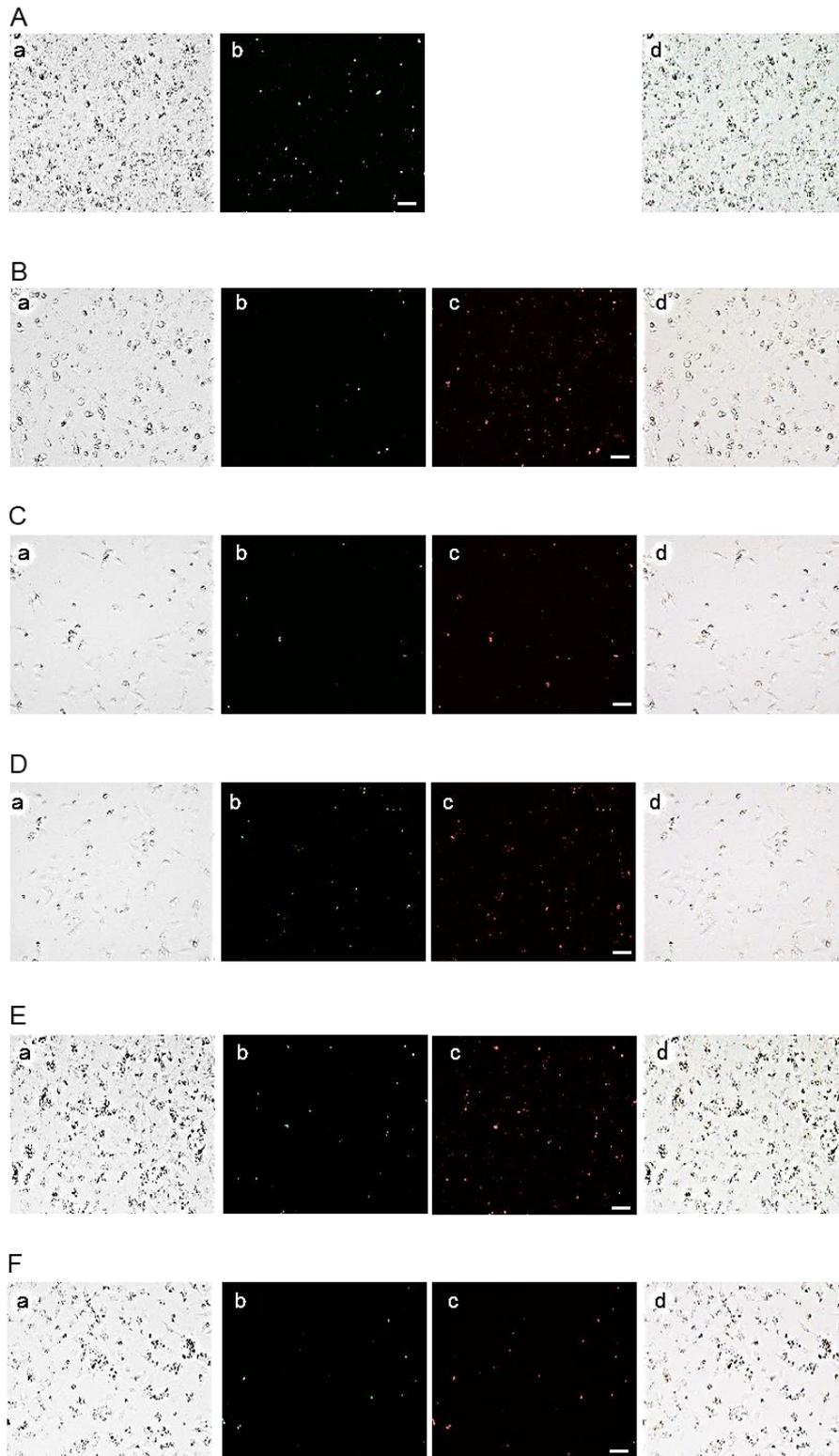


Abb. 83: Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂, (B) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-AF647, (C) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF568, (D) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-N₃-Env-AF568, (E) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-S-BSA-AF568 und (F) VLP(pEGFP)/PEI/SiO₂-S-Env-AF568. In (a) Hellbild, in (b) Fluoreszenzkanal der AF647- und AF568-Moleküle und (c) eine Überlagerung. Maßstab: 50 µm.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die VLP`s und VLP(pEGFP)`s mit PEI-Cy5 stabilisiert und mit fluoreszierenden Molekülen funktionalisiert. Dadurch kann zusätzlich die Anzahl an PEI-Cy5-Molekülen pro VLP bestimmt werden. Hierfür werden die Gleichungen **22** – **25** und die Molare Masse des PEI-Cy5 von 25 kDa eingesetzt. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tab. **19** dargestellt. Mit Hilfe von spektroskopischen Messungen und einer Kalibriergeraden konnte die Konzentration des PEI-Cy5 bestimmt werden.

Tab. 19: Zusammenfassung der PEI-Cy5- und Molekülanzahl auf den VLP-Partikeln.

Probe	NanoDrop (VLP) / kg m ⁻³	UV-Vis (PEI-Cy5) / kg m ⁻³	UV-Vis (AF488 / BSA-AF488 / Env-AF488) / kg m ⁻³	VLP Anzahl pro m ⁻³ Dispersion	PEI-Cy5 Anzahl pro VLP	AF488 / BSA-AF488 / Env-AF488 Anzahl pro VLP
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂</i>	0,74	0,132	-	2,25·10 ¹⁹	141	-
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-AF488</i>	0,70	0,127	0,043	2,13·10 ¹⁹	144	1570
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-BSA-AF488</i>	0,68	0,122	0,670	2,07·10 ¹⁹	142	296
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488</i>	0,66	0,118	0,670	2,01·10 ¹⁹	142	48
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-BSA-AF488</i>	0,71	0,126	0,790	2,16·10 ¹⁹	141	334
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488</i>	0,63	0,114	0,690	1,91·10 ¹⁹	143	52

Durch Tab. **19** kann eine annähernd gleiche Anzahl an PEI-Cy5-Molekülen um die VLP-Partikel ausgemacht werden. Im Gegensatz zu den PEI-stabilisierten Partikeln (80%) aus Tab. **16**, konnten durchschnittlich 70% der VLP's detektiert werden. Wird die Anzahl an BSA-AF568- und Env-AF568-Molekülen verglichen, wird auch hier ein sechsfacher Unterschied festgestellt. Das bestätigt die vorherigen Messungen (siehe Tab. **16**) der PEI-stabilisierten VLP's. Gleiche Berechnungen wurden für die

VLP(pEGFP)-Partikel durchgeführt. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tab. 20 aufgelistet.

Tab. 20: Zusammenfassung der PEI-Cy5- und Molekülanzahl auf den VLP(pEGFP)-Partikeln.

Probe	NanoDrop (VLP und pEGFP) / kg m ⁻³	UV-Vis (PEI-Cy5) / kg m ⁻³	UV-Vis (AF488 / BSA- AF488 / Env- AF488) / kg m ⁻³	VLP Anzahl pro m ⁻³ Dispersion	PEI-Cy5 und pEGFP Anzahl pro VLP	AF488 / BSA-AF488 / Env-AF488 Anzahl pro VLP
<i>VLP(pEGFP) /PEI- Cy5/SiO₂</i>	0,92 / 5,5·10 ⁻²	0,241	-	2,80·10 ¹⁹	208 / 0,378	-
<i>VLP(pEGFP) /PEI- Cy5/SiO₂-N₃- AF488</i>	0,72 / 4,3·10 ⁻²	0,137	0,162	2,19·10 ¹⁹	151 / 0,379	5760
<i>VLP(pEGFP) /PEI- Cy5/SiO₂-N₃- BSA-AF488</i>	0,68 / 4,0·10 ⁻²	0,125	0,640	2,07·10 ¹⁹	146 / 0,376	283
<i>VLP(pEGFP) /PEI- Cy5/SiO₂-N₃- Env-AF488</i>	0,66 / 3,9·10 ⁻²	0,129	0,660	2,01·10 ¹⁹	155 / 0,379	47
<i>VLP(pEGFP) /PEI- Cy5/SiO₂-S- BSA-AF488</i>	0,69 / 4,7·10 ⁻²	0,161	0,630	2,10·10 ¹⁹	185 / 0,434	274
<i>VLP(pEGFP) /PEI- Cy5/SiO₂-S- Env-AF488</i>	0,67 / 4,6·10 ⁻²	0,138	0,710	2,04·10 ¹⁹	163 / 0,435	50

Durch die Vermessungen der pDNA-Konzentrationen konnten annähernd gleiche Werte wie nach der PEI-Stabilisierung (Tab. 18) erhalten werden. Werden die erhaltenen PEI-Cy5-Konzentrationen mit den PEI-Cy5-Konzentrationen der VLP's (Tab. 19) verglichen, resultiert eine durchschnittlich 10%-ig höhere Konzentration bei den VLP(pEGFP)-Partikeln.

Abschließend können die Schalendicken des PEI-Cy5 um die VLP's bestimmt werden. Um die Dicke der Schale zu bestimmen, wird beispielhaft die Schalendicke der VLP/PEI-Cy5/SiO₂-Partikel wie folgt berechnet. Zunächst wird das Volumen der PEI-

Cy5-Moleküle aus der bestimmten Masse der PEI-Cy5-Moleküle und einer Dichte von 1080 kg m^{-3} berechnet.

$$V(\text{PEI} - \text{Cy5}) = \frac{m_1(\text{PEI-Cy5})}{\rho(\text{PEI-Cy5})} = \frac{5,87 \cdot 10^{-21} \text{ kg}}{1080 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}} = 5,44 \cdot 10^{-24} \text{ m}^3 \quad (29)$$

Durch die Berechnung der Oberfläche eines VLP's mit dem Radius von $30 \cdot 10^{-9} \text{ m}$, kann die Schalendicke mit Gleichung (31) berechnet werden.

$$O(\text{PEI} - \text{Cy5}) = 4 \cdot \pi \cdot (30 \cdot 10^{-9} \text{ m})^2 = 1,13 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \quad (30)$$

$$\text{Schalendicke}(\text{PEI} - \text{Cy5}) = \frac{V(\text{PEI-Cy5})}{O(\text{VLP})} = \frac{5,44 \cdot 10^{-24} \text{ m}^3}{1,13 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2} = 4,81 \cdot 10^{-10} \text{ m} \quad (31)$$

In Tab. 21 sind die berechneten Schalendicken der funktionalisierten VLP- und VLP(pEGFP)-Partikel zusammengefasst.

Tab. 21: Berechnung des Volumens an PEI-Cy5 und die Schalendicke um die VLP sowie VLP(pEGFP)-Partikel.

Probe	Volumen (PEI-Cy5) / m ³	Schalendicke (PEI-Cy5) / m
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂</i>	5,44 · 10 ⁻²⁴	4,80 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-AF488</i>	5,53 · 10 ⁻²⁴	4,89 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-BSA-AF488</i>	5,47 · 10 ⁻²⁴	4,83 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488</i>	5,45 · 10 ⁻²⁴	4,82 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-BSA-AF488</i>	5,41 · 10 ⁻²⁴	4,78 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488</i>	5,51 · 10 ⁻²⁴	4,87 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂</i>	7,98 · 10 ⁻²⁴	7,06 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-AF488</i>	5,80 · 10 ⁻²⁴	5,13 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-BSA-AF488</i>	5,60 · 10 ⁻²⁴	4,95 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488</i>	5,95 · 10 ⁻²⁴	5,26 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-S-BSA-AF488</i>	7,11 · 10 ⁻²⁴	6,28 · 10 ⁻¹⁰
<i>VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488</i>	6,27 · 10 ⁻²⁴	5,55 · 10 ⁻¹⁰

Da sich die Partikel in Wasser als Dispersionsmittel befinden, sind die bestimmten Schalendicken in Tab. 21 in der Realität dicker (gequollen). Abschließend wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Hier konnte unter anderem die Fluoreszenz in den Zellen und die Zellaufnahme aller Partikelsorten nachverfolgt werden. In Abb. 84 sind die repräsentativen Aufnahmebilder der VLP/PEI-Cy5/SiO₂, VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488 und VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488 sowie VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂, VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488 und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488 dargestellt.

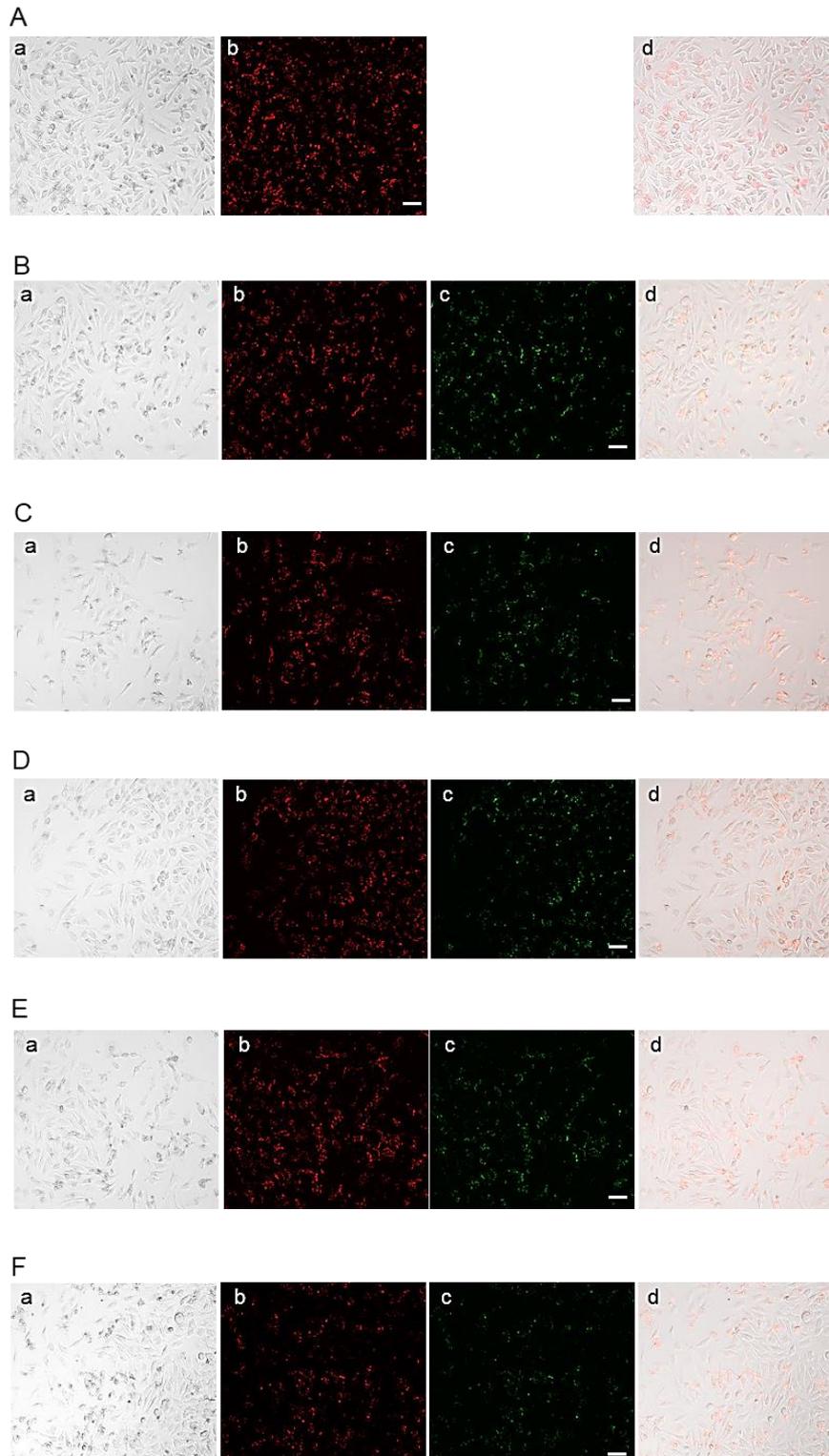


Abb. 84: Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) VLP/PEI-Cy5/SiO₂, (B) VLP/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488, (C) VLP/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488, (D) VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂, (E) VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-N₃-Env-AF488 und (F) VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-S-Env-AF488. In (a) die Zellen im Hellbild, in (b) PEI-Cy5, in (c) Env-AF488 und in (d) die Überlagerung aller Kanäle. Maßstab: 50 µm.

Anhand der Überlagerung der Aufnahmekanäle in Abb. **84 b** und **c (A-F)** ist eine Koexistenz beider Fluoreszenzen (PEI-Cy5; Abb. **84 b** und pEGFP; Abb. **84 c**) zu erkennen. Mit abschließenden CLSM-Untersuchungen sollte die genaue Lokalisation der Partikel festgestellt werden. In Abb. **85** sind die repräsentativen CLSM-Zellstudien vor der Klick-Reaktion für die VLP/PEI-Cy5/SiO₂ (Abb. **85 A**) und VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-Partikel (Abb. **85 B**) dargestellt. In Abb. **85 A;d** ist eine starke Fluoreszenz des Cy5 (magenta) im Aufnahmekanal sichtbar, was ebenfalls auf eine erfolgreiche Beschichtung mit PEI-Cy5 der VLP/PEI-Cy5/SiO₂-Partikel schließen lässt.

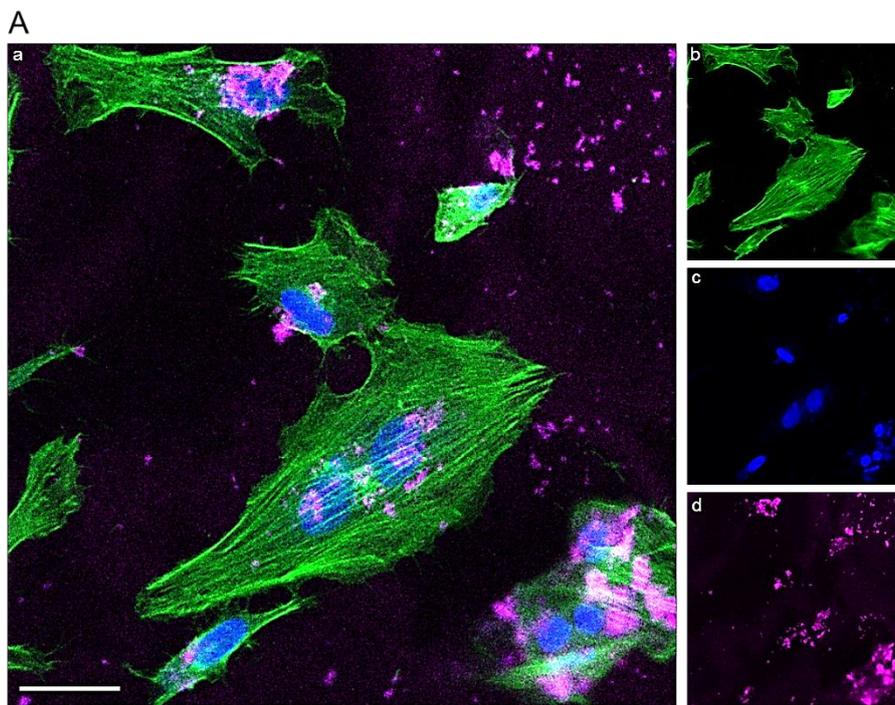


Abb. 85 A: CLSM-Aufnahme der HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit VLP/PEI-Cy5/SiO₂-Partikeln. (a) Überlagerungsbild, (b) Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin, (c) Zellkern mit Hoechst-33342, (d) PEI-Cy5-Fluoreszenz. Maßstab: 20 µm.

In Abb. **85 B;a** kann mittels der Überlagerung des Cy5- (**B;d**, magenta) und des pEGFP-Kanals (**B;e**, grün) eine Kolokalisation im intrazellulären Raum festgestellt werden. Durch die Vergrößerung des pEGFP-Kanals (**B;e**) kann zusätzlich die erfolgreiche Transfektion der Zellen anhand der grün fluoreszenzierenden Zellen bestätigt werden.

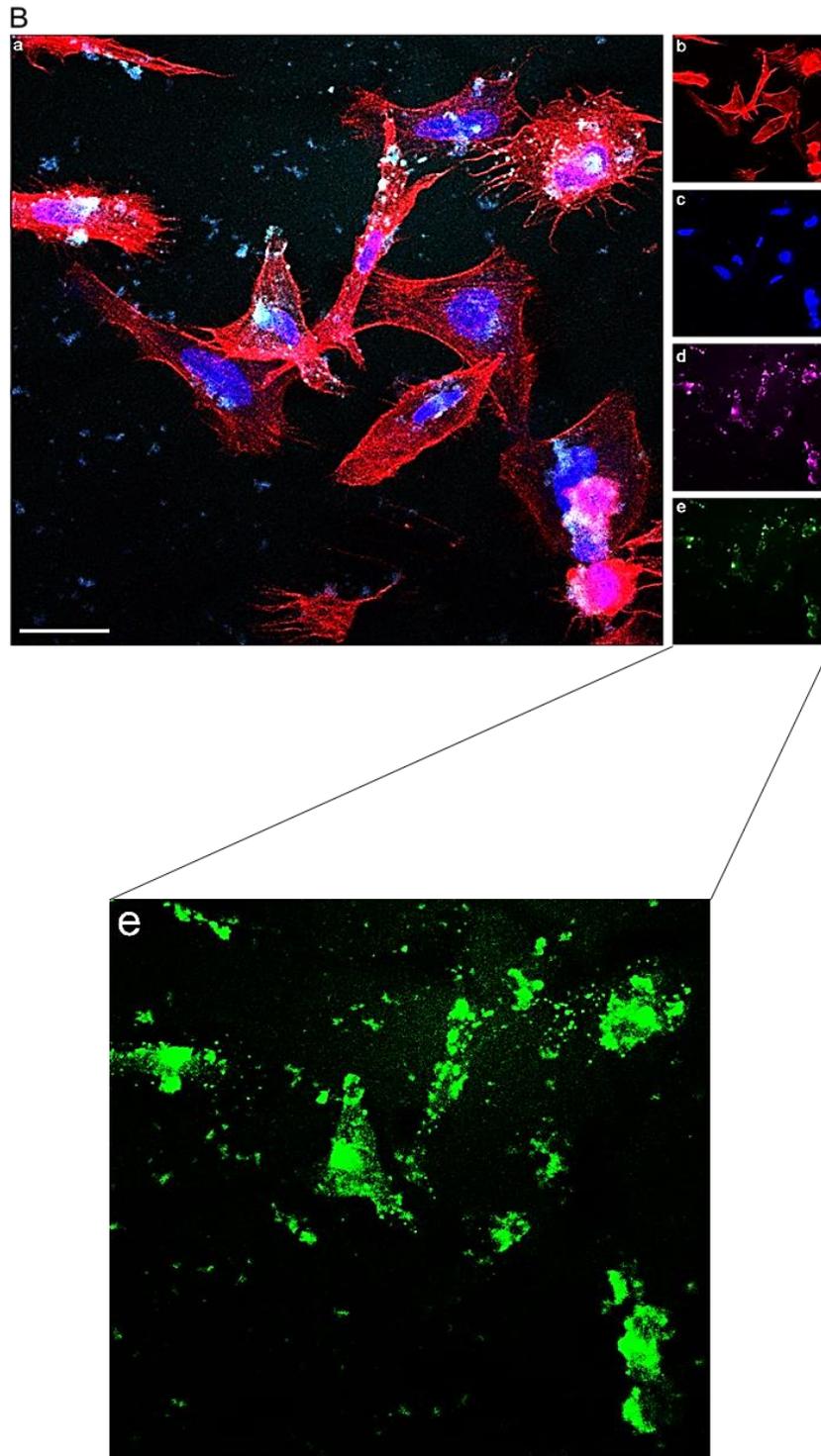


Abb. 85 B: CLSM-Aufnahme der HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit VLP(pEGFP)/PEI-Cy5/SiO₂-Partikeln. (a) Überlagerungsbild, (b) Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin, (c) Zellkern mit Hoechst-3342, (d) PEI-Cy5-Fluoreszenz und (e) pEGFP-Transfektion. Maßstab: 20 µm.

In Abb. 86 wurden repräsentativ die Zellaufnahme-Studien für die Env-AF488-funktionalisierten Partikel verdeutlicht. Anhand der 3-dimensionalen Aufnahmen in Abb. 86 A;f und B;f kann deutlich die zelluläre Aufnahme beobachtet werden. Außerdem lässt sich eine Kolokalisation durch die Cy5- (A;c und B;c) sowie AF488-Kanäle (A;d und B;d) darstellen. Das lässt auf stabile Partikel schließen, da sie als Komplex aus dem PEI-Cy5 im Inneren und aus den geklickten Env-AF488-Molekülen außen in der Zelle lokalisiert werden können.

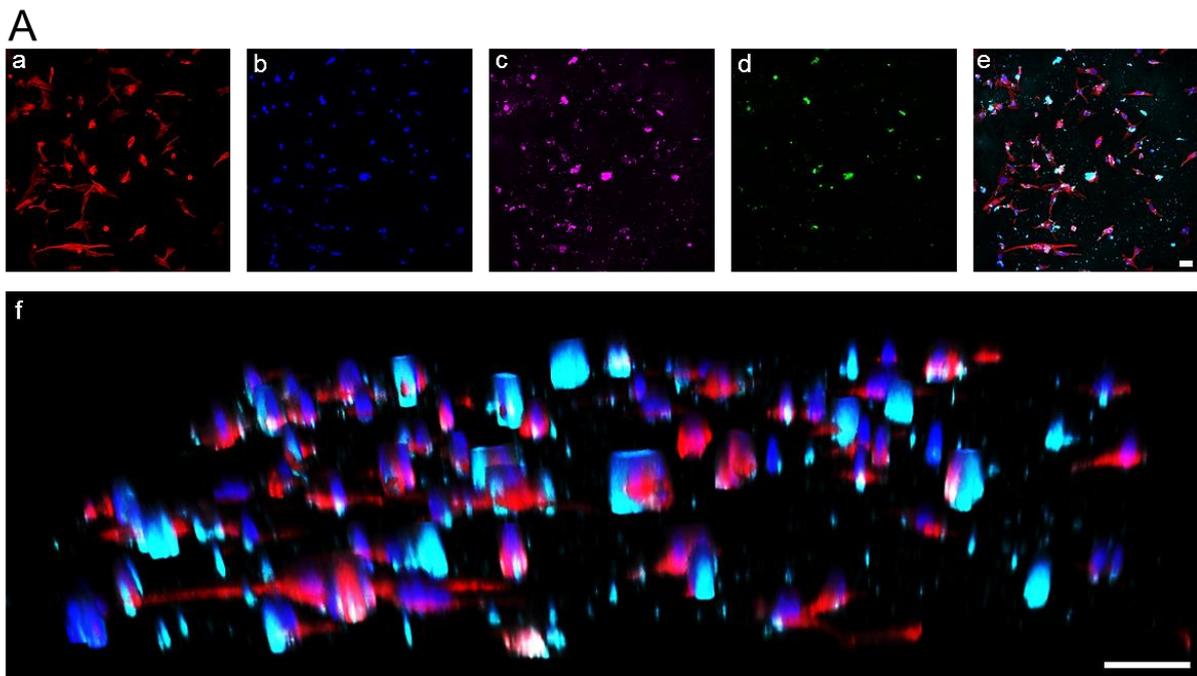


Abb. 86 A: CLSM der HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit PEI-Cy5-stabilisierten und Env-AF488-funktionalisierten VLP's. (a) Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin, (b) Zellkern mit Hoechst-33342, (c) PEI-Cy5-Fluoreszenz, (d) AF488-Fluoreszenz, (e) Überlagerung und (f) 3D-Darstellung der Zellen. Maßstab: 20 μm .

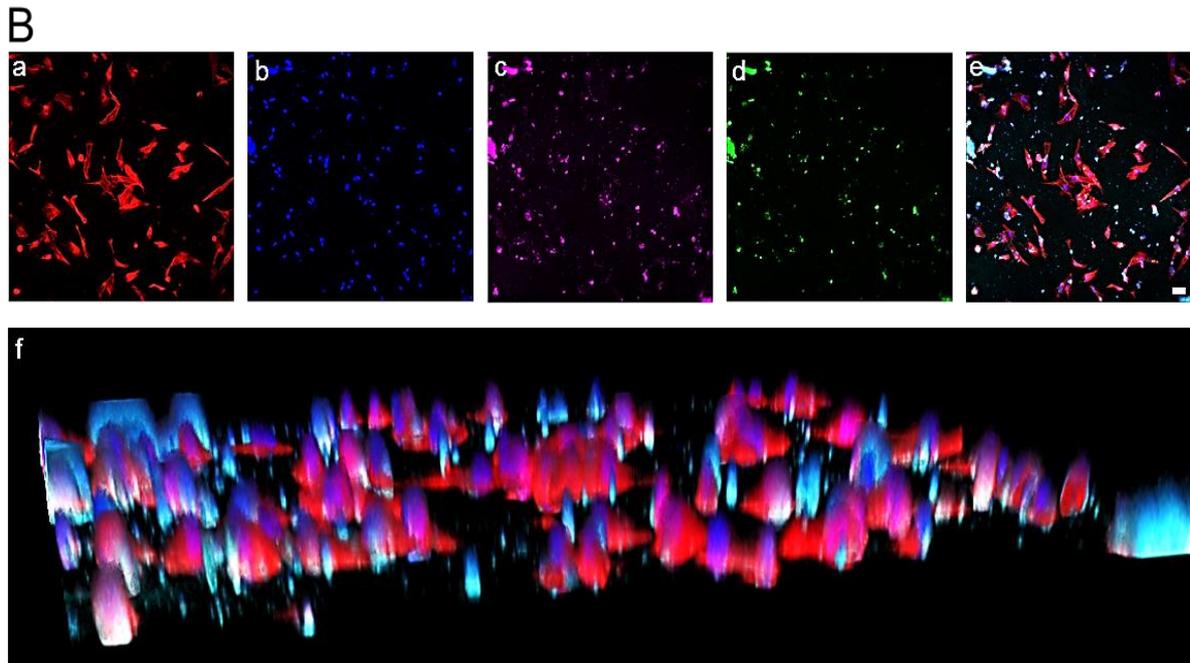


Abb. 86 B: CLSM der HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit PEI-Cy5-stabilisierten und Env-AF488-funktionalisierten VLP(pEGFP)'s. (a) Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin, (b) Zellkern mit Hoechst-3342, (c) PEI-Cy5-Fluoreszenz, (d) AF488-Fluoreszenz, (e) Überlagerung und (f) 3D-Darstellung der Zellen. Maßstab: 20 μ m.

Somit besteht auch hier eine Stabilität zwischen dem PEI-Cy5-Kern und den gebundenen Molekülen auf der Partikeloberfläche. Somit eignen sich diese Partikel als Trägersysteme für *in vitro*-Studien und bilden eine innovative Möglichkeit bei der Erforschung einer neuen Impfstoffplattform gegen den HI-Virus. Durch die Zellaufnahme der VLP's des HP-Virus im Inneren und der Env-Moleküle außen kann somit eine verstärkte Immunantwort in weiteren Studien untersucht werden.

Die Beschichtung der VLP's sollte in dieser Experimentenreihe die Bindung an HPV-spezifischen Antikörpern mittels der außen präsentierten HIV-Antigenen blockieren. In zukünftigen Experimenten sollen von Herrn Wang an der Uniklinik in Erlangen (Virologie) *in vitro*- und *in vivo*-Studien durchgeführt werden. Dabei soll vor allem die intrastrukturelle Hilfe der *Viro-CaPs* an *wild-type*-Mäusen nach einer Immunisierung mit den *Viro-CaPs* verdeutlicht und somit die HIV-Env-Antikörperreaktionen verstärkt werden.

5.2 Anbindungsstudien von Hämoglobin an PEI- (positive Ladung) und CMC- (negative Ladung) stabilisierten CaP-NPs

In dieser Untersuchungsreihe wurden vier verschiedene Partikelsysteme synthetisiert (siehe Abb. 87). Hierfür wurden die CaP-NPs zunächst mit (1) PEI bzw. (2) CMC stabilisiert. Im nächsten Schritt wurden die Partikel zum einen mit (3) Thiolgruppen und zum anderen mit (4) Azidgruppen funktionalisiert. So konnten Annahmen über die bevorzugte Anbindung von Hämoglobin-Molekülen getroffen werden, indem die Ladung und die Oberflächenfunktionalisierung der CaP-NPs variiert wurde. In der Vergangenheit wurden vor allem kationische Polymere eingesetzt, daher ist es von großem Interesse Anbindungsstudien an CaP-NPs mit einer negativen Ladung durchzuführen.

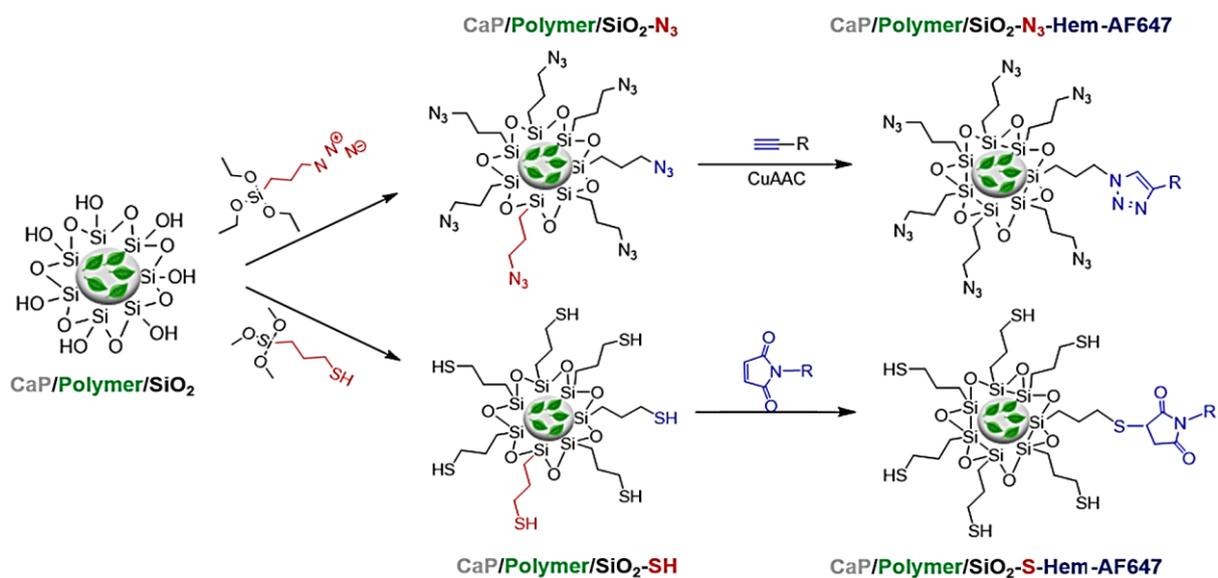


Abb. 87: Schematische Darstellung der beiden Syntheserouten für die Funktionalisierung der CaP-Nanopartikeloberfläche.

Zu Beginn wurde die Anzahl an Thiolgruppen mittels UV-Vis-Spektroskopie und Titrationskurven bestimmt (Abb. 88). Hierfür wurde die Zugabe der synthetisierten CaP-NPs zum Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)propionat (SPDP; $3,14 \cdot 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$) systematisch erhöht, bis sich eine Sättigung eingestellt hat. Hierbei reagiert das SPDP mit den primären Thiolgruppen. Ab einer gleichbleibenden Absorption (UV-Vis) wurden

alle Thiolgruppen auf den CaP-NPs durch das SPDP abgesättigt. Wie anhand Abb. 88 sichtbar, wurde ein höheres Volumen bei den PEI-stabilisierten CaP-NPs hinzugegeben (schwarze Kästchen, 80 μL) als bei den CMC-stabilisierten CaP-NPs (rote Punkte, 65 μL).

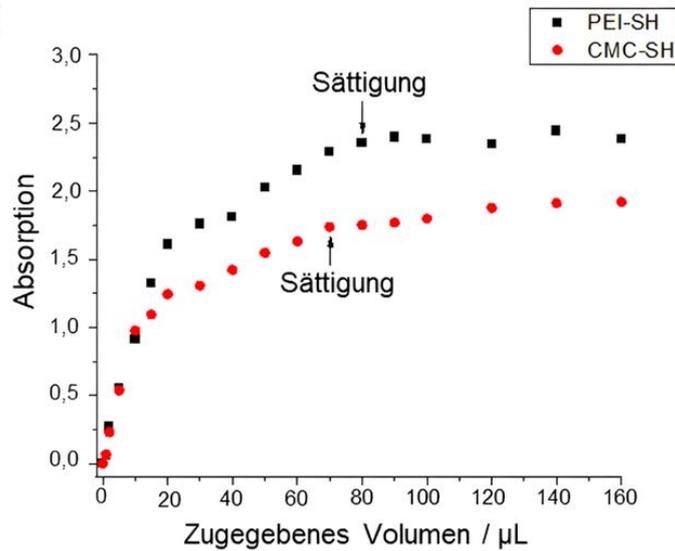


Abb. 88: Titrationskurven der PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs, mittels UV-Vis-Spektroskopie aufgenommen.

Wird jedoch die Thiolgruppen-Anzahl pro nm^2 auf der Partikeloberfläche aus Tab. 22 entnommen, fällt auf, dass die Anzahl der funktionellen Gruppen fast identisch ist. Dies liegt an der unterschiedlichen Partikelgröße der PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs.

Tab. 22: Vergleich der Anzahl an Thiolgruppen in der Dispersion und pro Partikel auf den PEI- und CMC-stabilisierten NPs.

Probe	Thiolgruppen Anzahl pro m^{-3} Dispersion	Thiolgruppen Anzahl pro Partikel	Oberflächen dichte Thiolgruppe pro nm^{-2}	Thiolgruppen pro Partikel / nm^{-2}
<i>CaP/PEI/SiO₂-SH</i>	$7,70 \cdot 10^{21}$	$2,93 \cdot 10^4$	1,40	0,72
<i>CaP/CMC/SiO₂-SH</i>	$6,26 \cdot 10^{21}$	$9,54 \cdot 10^3$	1,10	0,92

Mittels IR-Spektroskopie konnte die Anzahl an Azidgruppen auf der CaP-Nanopartikeloberfläche bestimmt werden. In Abb. 89 sind die Azid-Schwingungen bei ca. 2102 cm^{-1} sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass eine Funktionalisierung mit Azidgruppen erfolgreich war.

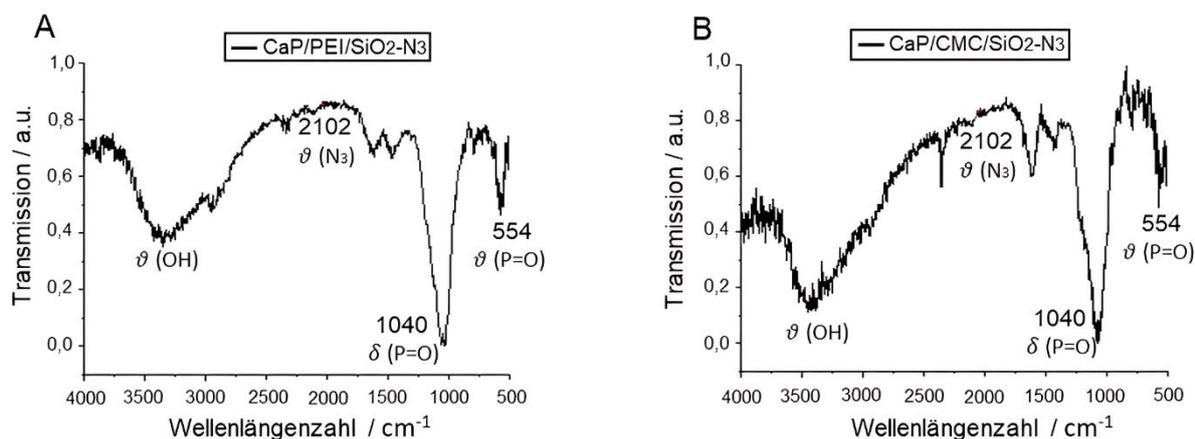


Abb. 89: Normierte IR-Spektren der PEI- und CMC-stabilisierten NPs zur Bestimmung der Azidgruppenanzahl.

Wird die resultierende Fläche integriert, kann daraus die Anzahl an Azidgruppen berechnet werden. In Tab. 23 kann die Anzahl an Azidgruppen auf den PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs abgelesen werden. Ähnlich wie bei den Thiolgruppen-funktionalisierten Ca-NPs konnte eine ungefähr gleiche Anzahl an funktionellen Gruppen pro nm^2 auf den unterschiedlich stabilisierten CaP-NPs detektiert werden.

Tab. 23: Zusammenfassung der Azidgruppen in der Dispersion und pro PEI- und CMC-stabilisierten Partikel.

Probe	Azidgruppen-Anzahl pro m^{-3} Dispersion	Azidgruppen-Anzahl pro Partikel	Oberflächen dichte Azidgruppe pro nm^{-2}	Azidgruppen pro Partikel / nm^{-2}
<i>CaP/PEI/SiO₂-N₃</i>	$2,63 \cdot 10^{22}$	$1,83 \cdot 10^5$	8,70	0,12
<i>CaP/CMC/SiO₂-N₃</i>	$2,13 \cdot 10^{22}$	$6,51 \cdot 10^4$	7,40	0,14

Im nächsten Schritt wurden die charakterisierten Partikel mit Hämoglobin-Molekülen funktionalisiert. Das bedeutet für Thiolgruppen-funktionalisierte CaP-NPs wurden die Hämoglobin-Moleküle mit einem Sulfo-SMCC-Linker eingesetzt. Für die Partikel mit Azidgruppen auf der Oberfläche wurden die Hämoglobin-Moleküle mit dem Propargyl-PEG-3-Aminooxy-Linker inkubiert. Als erste Analysemethode nach der Aufreinigung der Partikel mittels Zentrifugation, dienten REM-Abbildungen, um die Morphologie und die Größe des anorganischen Kerns auszumachen. In Abb. 90 sind die vier Partikelsorten für einen Vergleich nebeneinander abgebildet. Bei allen Partikeln ist eine annähernd sphärische Morphologie zu erkennen. Außerdem lässt sich sagen, dass die CMC-stabilisierten CaP-NPs kleiner ausfallen (im Durchschnitt 53 nm, von N= 50), als die PEI-stabilisierten NPs, die ca. 82 nm groß sind.

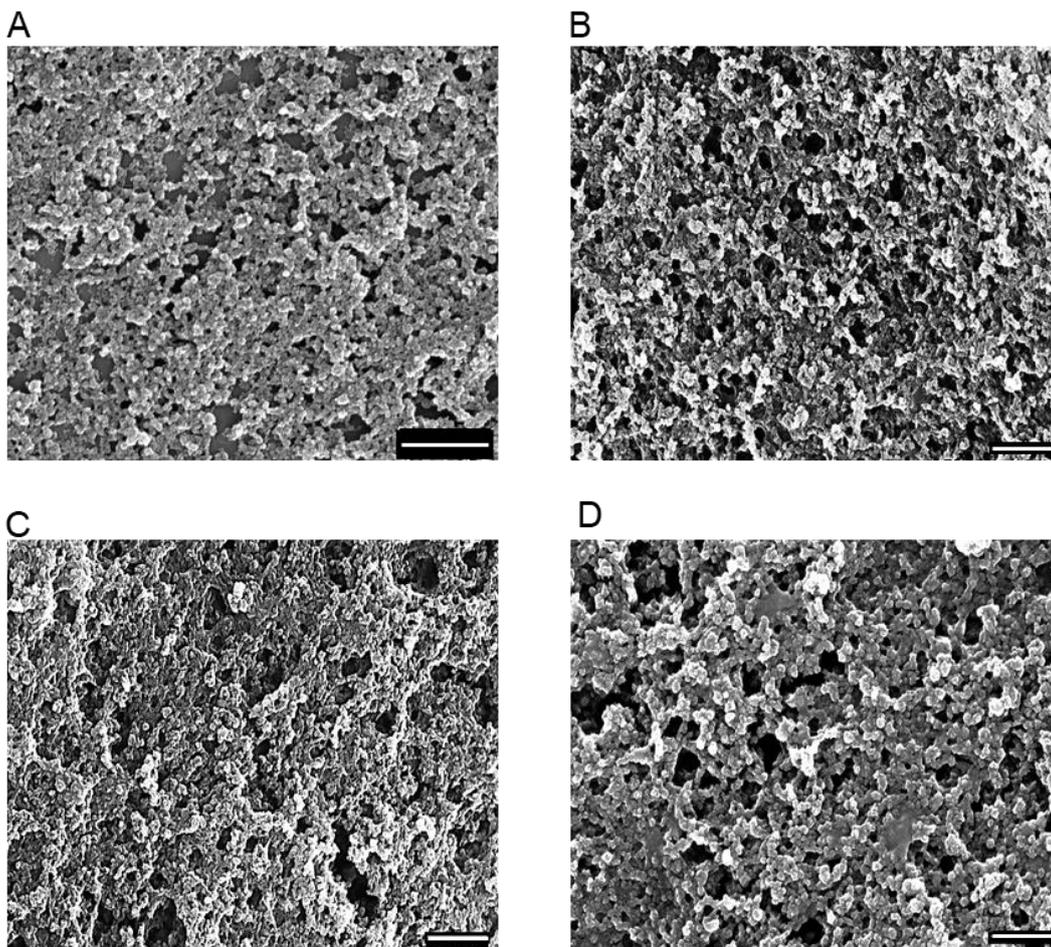


Abb. 90: REM-Darstellungen der PEI- stabilisierten (A und B) und der CMC-stabilisierten (C und D) CaP-NPs. (A und C) zeigen die CaP-NPs mit Azidgruppen und (B und D) die CaP-NPs mit Thiolgruppen auf der Oberfläche. Maßstab = 500 nm.

Nachdem der anorganische Kern der Partikel vermessen wurde, konnten im nächsten Schritt die hydrodynamischen Durchmesser mittels DLS durch Anzahlverteilungen (Abb. 91) bestimmt werden. Auch hier lässt sich der Trend der REM-Ausmessungen bestätigen, dass die mit PEI-stabilisierten CaP-NPs größer ausfallen als die CMC-stabilisierten Partikel. Außerdem ist zu erkennen, dass die Thiolgruppen-funktionalisierten Partikel in beiden Fällen einen zweifach größeren hydrodynamischen Durchmesser aufweisen, als die mit Azidgruppen-funktionalisierten NPs. Dies kann jedoch auch auf eine leichte Agglomeration der Partikelsysteme hinweisen, wie an dem PDI in Tab. 24 zu entnehmen ist.

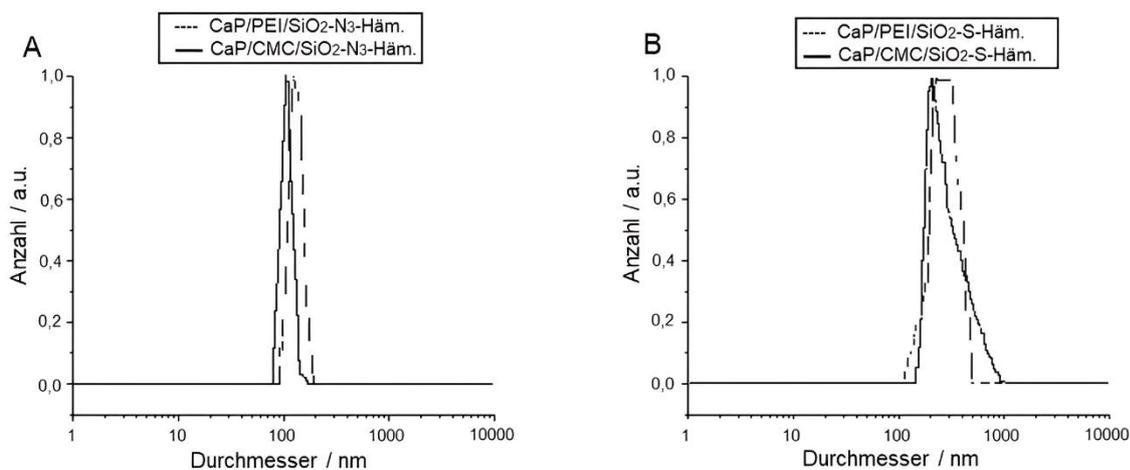


Abb. 91: Normierte Anzahlverteilungen der synthetisierten (A) PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs mit Azidgruppen und Hämoglobin-Molekülen (Häm. abgekürzt) und (B) PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs mit der Funktionalisierung von Thiolgruppen und Hämoglobin-Molekülen (Häm. abgekürzt).

In allen vier Partikelsystemen konnte anhand des Zeta-Potentials (siehe Tab. 24) auf eine gute Stabilisierung der Partikel geschlossen werden. Anhand der Abb. 91 ist zu erkennen, dass die Polydispersität bei den Thiolgruppen-funktionalisierten CaP-NPs (0,36 PEI-stabilisiert und 0,32 CMC-stabilisiert) höher liegt, als bei den Azidgruppen-funktionalisierten CaP-NPs (0,26 PEI-stabilisiert und 0,21 CMC-stabilisiert). In Tab. 24 sind die AAS-Ergebnisse, die REM-Durchmesser, sowie die DLS- und Zeta-Potential-Messungen zusammengefasst.

Tab. 24: Zusammenfassung der kolloidchemischen Analyseergebnisse. Hämoglobin als Häm. abgekürzt.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Pote- ntial / mV	Nano Drop (Häm.) / kg m ⁻³
<i>CaP/PEI/ SiO₂-N₃- Häm.</i>	0,052	0,130	5,3·10 ¹⁷	53±11	98	0,4	+14	1,7·10 ⁻²
<i>CaP/PEI/ SiO₂-S- Häm.</i>	0,095	0,238	4,2·10 ¹⁷	70±14	201	0,2	+25	5,8·10 ⁻²
<i>CaP/CMC /SiO₂-N₃- Häm.</i>	0,032	0,080	3,9·10 ¹⁷	50±9	102	0,2	-16	2,4·10 ⁻²
<i>CaP/CMC /SiO₂-S- Häm.</i>	0,064	0,160	1,8·10 ¹⁷	82±17	238	0,4	-19	4,3·10 ⁻²

Durch den Einsatz der Molaren Masse des Hämoglobins (65 kDa) und der gemessenen Konzentration mittels UV-Vis-Messungen (Wellenlänge bei 405 nm), können die Anzahl der Hämoglobin-Moleküle in der Dispersion und auf einem CaP-NP bestimmt werden. In Tab. 25 ist die Anzahl an Hämoglobin-Molekülen dargestellt.

Tab. 25: Anzahl der Hämoglobin-Moleküle (Häm.) in der Dispersion und pro CaP-NPs.

Probe	Hämoglobin pro m ⁻³	Hämoglobin pro CaP-NP	Hämoglobin pro nm ²
<i>CaP/PEI/SiO₂-N₃-Häm.</i>	1,6·10 ²⁰	3,0·10 ²	5,7
<i>CaP/PEI/SiO₂-S-Häm.</i>	5,4·10 ²⁰	1,3·10 ³	18,6
<i>CaP/CMC/SiO₂-N₃-Häm.</i>	2,2·10 ²⁰	5,7·10 ²	11,4
<i>CaP/CMC/SiO₂-S-Häm.</i>	4,0·10 ²⁰	2,3·10 ³	28,1

Mittels Tab. 25 ist ersichtlich, dass sich durchschnittlich dreimal so viele Hämoglobin-Moleküle pro nm² auf den Thiolgruppen-funktionalisierten Partikeln befinden, als bei den Azidgruppen-funktionalisierten CaP-NPs. Da Hämoglobin selbst unter Luftsauerstoff zu Methämoglobin oxidiert und somit eine dunklere Farbe annimmt, wurden Messungen mit gerade angesetzten und einige Stunden unter Luftsauerstoff

ausgesetzten Hämoglobin durchgeführt. In Abb. 92 sind beide Absorptionen abgebildet.

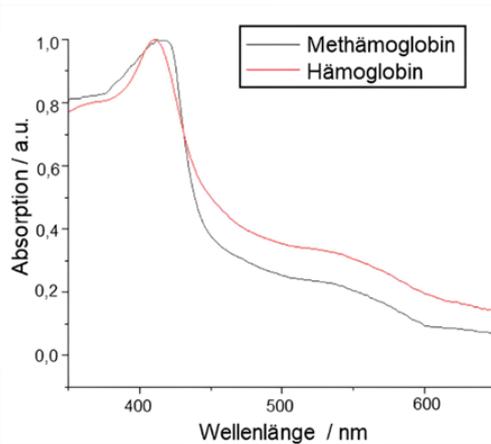


Abb. 92: Normierte UV-Vis-Auftragungen des Hämoglobins (rot) und des Methämoglobins (schwarz).

Wie in Abb. 92 sichtbar, verändert sich die Absorption der beiden Hämoglobinarten (Methämoglobin in schwarz und Hämoglobin in rot) kaum. So konnte die Absorption der Hämoglobin-funktionalisierten Partikel ebenfalls bei einer Wellenlänge von ca. 405 nm abgelesen werden. In Abb. 93 sind die vier Partikelsorten in einem UV-Vis-Diagramm mit y-Versatz vergleichend übereinander abgebildet.

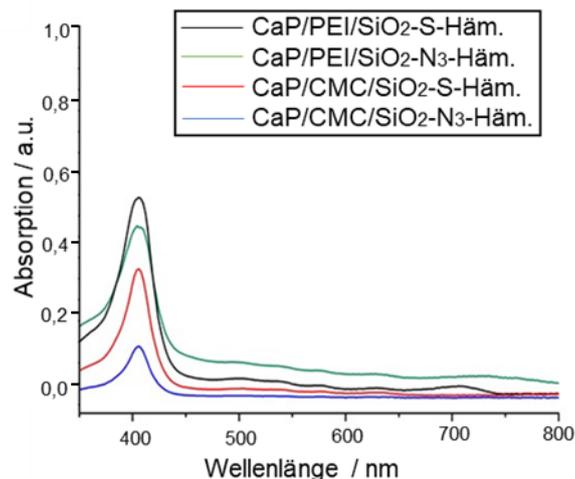


Abb. 93: Normiertes UV-Vis-Spektrum der PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs, jeweils mit Azid- und Thiolgruppen mit anschließender Funktionalisierung der Oberfläche mit Hämoglobin-Molekülen.

Um im nächsten Schritt die Partikel in Zellen nachverfolgen zu können, wurden die Hämoglobin-Moleküle fluoreszenzmarkiert. Hierfür wurde der AF647-Farbstoff eingesetzt und mit dem entsprechenden Linker inkubiert. Somit wurden die Hämoglobin-Moleküle mit dem Sulfo-SMCC-Linker (für Thiolgruppen-funktionalisierte NPs) und mit dem Propargyl-PEG-3-Aminooxy-Linker (für die Azidgruppen-funktionalisierten NPs) inkubiert. Anhand der repräsentativen REM-Bilder für die PEI- (Abb. 94 A) und der CMC-stabilisierten CaP-NPs (Abb. 94 B) konnte eine sphärische Morphologie der Partikelsysteme beobachtet werden.

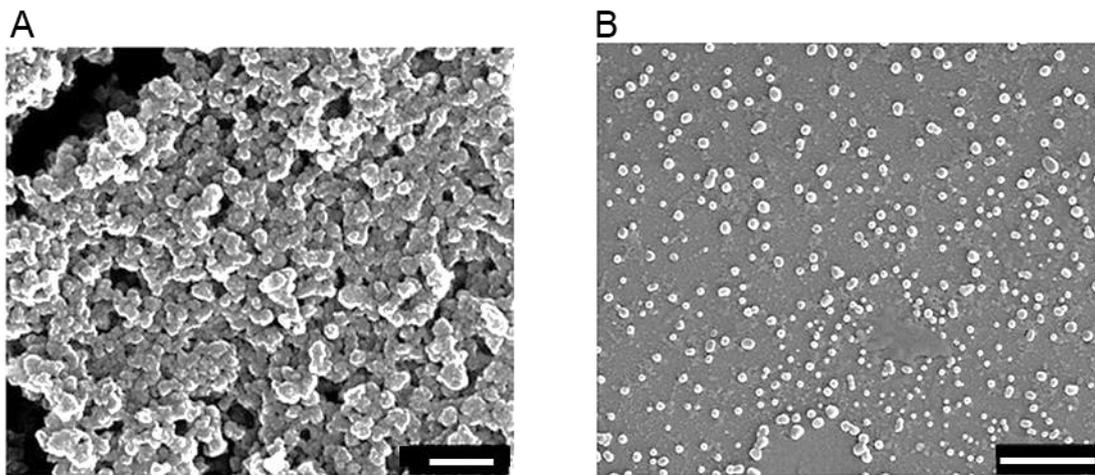


Abb. 94: REM-Abbildungen der PEI- (A) und CMC-stabilisierten (B) CaP-NPs mit Azidgruppen und fluoreszierenden Hämoglobin-AF647-Molekülen funktionalisiert. Maßstab: 500 nm.

Mittels der REM-Abbildungen lässt sich, wie bei den CaP-NPs mit unmarkiertem Hämoglobin, ein größerer Durchmesser der PEI-stabilisierten Partikel erkennen. Auch für diese vier Partikelarten wurden DLS- und Zeta-Potential-Messungen (Abb. 95) durchgeführt, um den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel zu bestimmen.

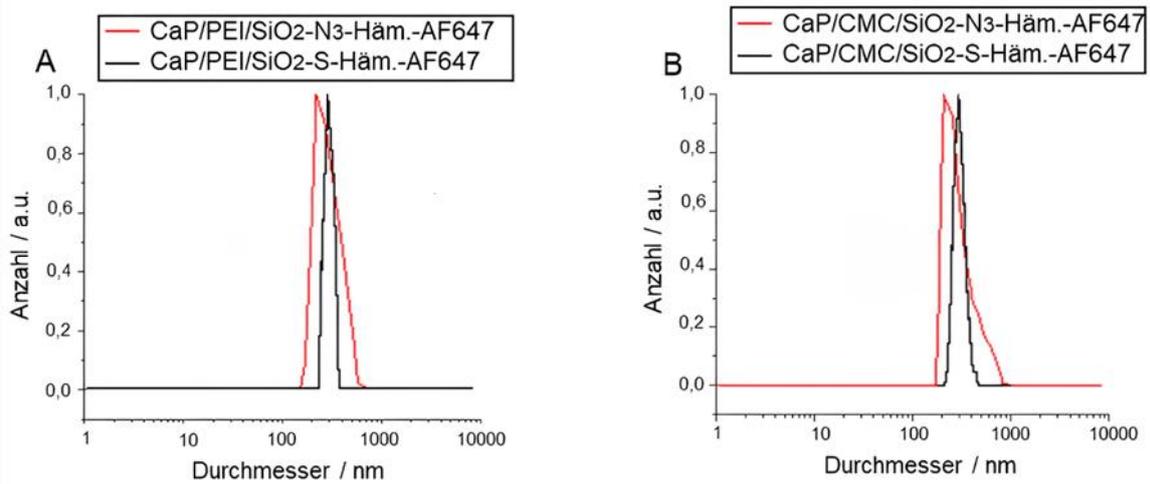


Abb. 95: Normierte DLS-Auftragungen anhand der Anzahlverteilung . In (A) die PEI-stabilisierten und in (B) die CMC-stabilisierten CaP-NPs. Jeweils im Vergleich nach der Funktionalisierung mit Azid- und Thiolgruppen und Anbringung von Hämoglobin-AF647-Molekülen.

Wie in Abb. 95 sichtbar sind die Partikelgrößenverteilungen der Thiolgruppen-funktionalisierten NPs größer als für die Azidgruppen-funktionalisierten NPs. Die gemittelten PDI-Werte von 0,3 weisen auf den Beginn eines polydispersen Systems hin, was sich in den mittleren Zeta-Potentialen von 22 mV und – 21 mV widerspiegelt. Dennoch kann noch von ausreichend stabilisierten Partikel gesprochen werden.

Eine ausführliche Charakterisierungszusammenfassung ist in Tab. 26 aufgeführt.

Tab. 26: Zusammenfassung aller Analyseergebnisse der verschiedenen funktionalisierten CaP-NPs mit fluoreszierenden Hämoglobin-AF647-Molekülen.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Pote ntial / mV	UV-Vis (AF647) / kg m ⁻³
<i>CaP/PEI/ SiO₂-N₃- Häm.- AF647</i>	0,056	0,140	1,2·10 ¹⁸	41±5	126	0,3	+20	1,2·10 ⁻²
<i>CaP/PEI/ SiO₂-S- Häm.- AF647</i>	0,064	0,160	2,6·10 ¹⁷	72±12	230	0,2	+23	1,5·10 ⁻²
<i>CaP/CMC /SiO₂-N₃- Häm.- AF647</i>	0,053	0,133	1,6·10 ¹⁸	37±3	206	0,4	-24	9,1·10 ⁻³
<i>CaP/CMC /SiO₂-S- Häm.- AF647</i>	0,059	0,148	3,3·10 ¹⁷	65±9	240	0,3	-17	1,1·10 ⁻²

Zum besseren Vergleich der angebrachten Hämoglobin- und AF647-Moleküle auf den CaP-NPs und um die Effizienz der jeweiligen Synthesroute besser beurteilen zu können, wurde die jeweilige Molekülanzahl pro nm² bestimmt und in Tab. 27 zusammengefasst. Durch die eingesetzte Molare Masse des Hämoglobin-AF647 (65,9 kDa) und die gemessene Konzentration an AF647 und Hämoglobin, konnte die Anzahl an fluoreszierenden Hämoglobin-Molekülen pro CaP-NP bestimmt werden. Hierfür wurde zuerst das fluoreszenzmarkierte Hämoglobin vor der Reaktionszugabe (Stammlösung) vermessen und anschließend die vier Partikelsorten mittels UV-Vis analysiert. So konnte bestimmt werden, welche Menge an AF647 und Hämoglobin nach der Reaktion und Aufreinigung auf der CaP-Nanopartikeloberfläche gebunden wurde.

Tab. 27: Anzahl der bestimmten Hämoglobin- und AF647-Moleküle pro CaP-NP.

Probe	AF647 pro Häm.	Häm. pro CaP-NP	Häm. pro nm ²	AF647 pro CaP-NP	AF647 pro nm ²
<i>CaP/PEI/SiO₂-N₃- Häm.-AF647</i>	3,1	148	4	457	11
<i>CaP/PEI/SiO₂-S- Häm.-AF647</i>	3,3	766	11	2528	35
<i>CaP/CMC/SiO₂-N₃- Häm.-AF647</i>	2,9	87	2	253	7
<i>CaP/CMC/SiO₂-S- Häm.-AF647</i>	3,1	465	7	1443	22

Wird die Hämoglobin-Anzahl pro CaP-NP (nm²) betrachtet, fällt auf, dass ungefähr dreimal weniger Moleküle auf den CMC-stabilisierten Partikeln konjugiert wurden. Dabei wurde eine verbesserte Anbringung bei den Thiolgruppen-funktionalisierten CaP-NPs erreicht.

Mittels UV-Vis-Messungen (Abb. 96) konnten neben den Absorptionen des Hämoglobins (ca. 405 nm) die Absorptionen des AF647-Farbstoffes bei einer Wellenlänge von ca. 650 nm detektiert werden.

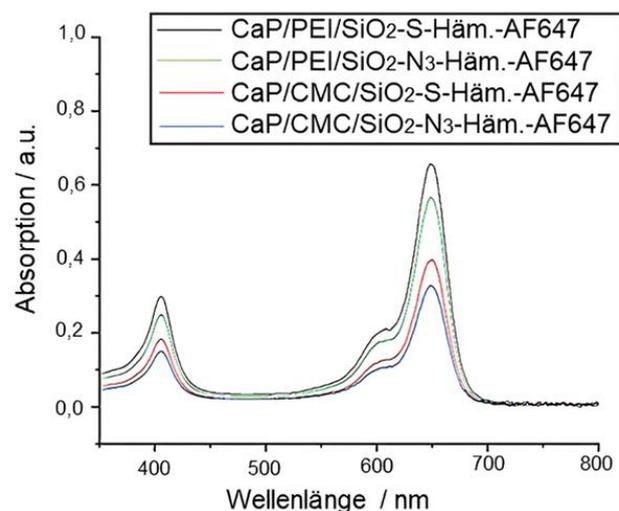


Abb. 96: Normierte UV-Vis-Auftragungen der PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs mit Azid- und Thiolgruppen sowie der Funktionalisierung mit Hämoglobin-AF647-Molekülen.

In den abschließenden Studien wurden HeLa-Zellen für 24 h mit den vier Partikelsorten inkubiert. Dabei wurde zunächst eine Fluoreszenzmikroskopie und danach eine CLSM mit z-Schnitten durchgeführt. MTT-Analysen sollten das nicht toxische Verhalten der Partikel anhand der hohen Zellviabilität verdeutlichen. In Abb. 97 sind die Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen dargestellt.

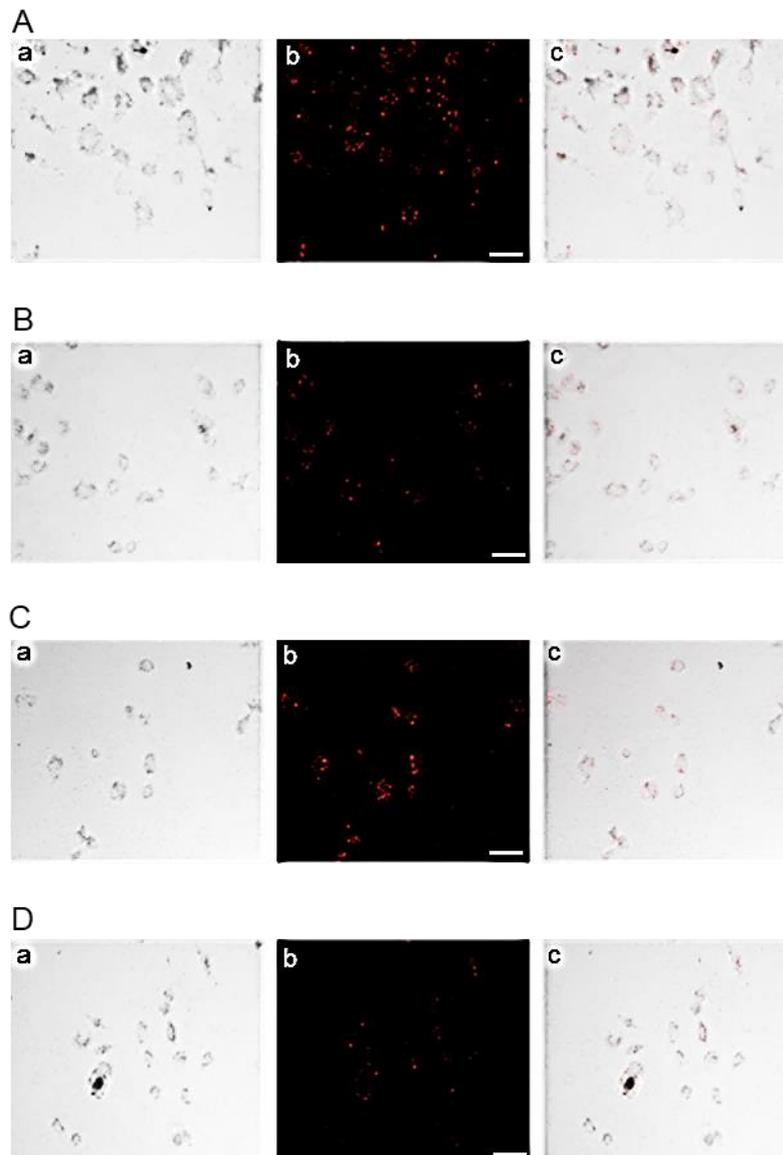


Abb. 97: Fluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) CaP/PEI/SiO₂-S-Häm.-AF647, (B) CaP/PEI/SiO₂-N₃-Häm.-AF647, (C) CaP/CMC/SiO₂-S-Häm.-AF647 und (D) CaP/CMC/SiO₂-N₃-Häm.-AF647. In (a) Hellbild, (b) die fluoreszierenden Häm-AF647-Moleküle und (c) ein Überlagerungsbild. Maßstab: 50 µm.

Die fluoreszierenden Hämoglobin-Moleküle an den Partikeln sind im Aufnahmekanal (Abb. 97 b) anhand von zahlreichen roten Punkten in den Zellen zu erkennen. So können erste Anhaltspunkte über die fluoreszierenden CaP-NPs in den Zellen nach einer Inkubation von 24 h getroffen werden. Im nächsten Schritt wurden mittels CLSM z-Schnitte durchgeführt, um zu gewährleisten, dass sich die Partikel in den Zellen und nicht an der Zellmembran befinden.

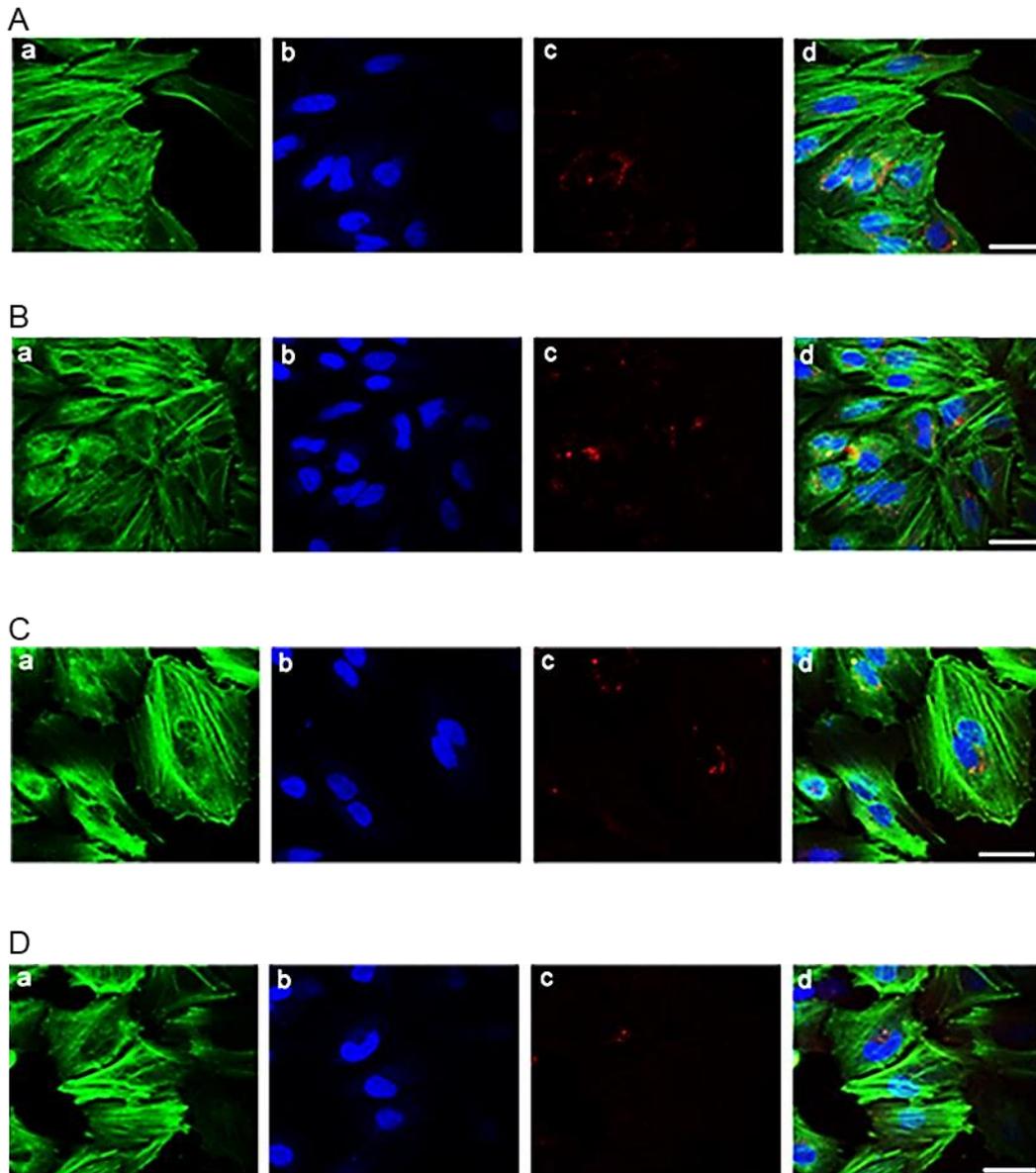


Abb. 98: CLSM von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃-Häm.-AF647, (B) CaP/PEI/SiO₂-S-Häm.-AF647, (C) CaP/CMC/SiO₂-N₃-Häm.-AF647 und (D) CaP/CMC/SiO₂-S-Häm.-AF647. Aktinfärbung mit AF488-Phalloidin (a) Zellkern mit Hoechst-3342 (b), (c) Häm.-AF647-markierte CaP-NPs und (d) ein Überlagerungsbild. Maßstab: 20 µm.

Durch die Überlagerungsbilder in Abb. 98 d konnten die Partikelsysteme eindeutig im intrazellulären Raum lokalisiert werden. Somit eignen sich die CaP-NPs auch als Trägersysteme für Hämoglobin-Moleküle, was weitere interessante Möglichkeiten in biologischen Studien eröffnet. Abschließend wurde die Toxizität der Partikel anhand von MTT-Tests bestimmt.

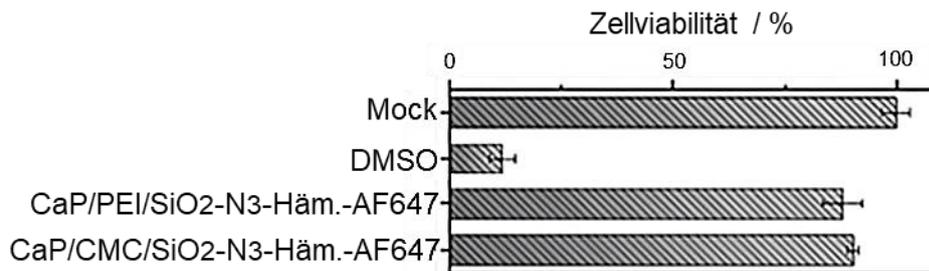


Abb. 99: MTT-Analyse um die Zellviabilität der HeLa-Zellen zu testen. Mock: positive Kontrolle ohne NP-Zugabe und DMSO: negative Kontrolle nur mit der Zugabe von DMSO.

Wie in der Abb. 99 sichtbar handelt es sich bei den Partikeln um nicht toxische Komponenten. Es ist eine Zellviabilität von ca. 94% bei den CMC-stabilisierten CaP-NPs und eine ca. 91% bei den PEI-stabilisierten sichtbar. Diese Beobachtung wird in der Literatur bestätigt, die besagt, dass eine moderate Toxizität von PEI selbst ausgeht.^[206] Wird die stärkere Abweichung bei den PEI-stabilisierten CaP-NPs in Betracht gezogen, kann von nicht toxischen Partikeln gesprochen werden.

5.3 Ultrakleine Gold-NPs dekorierte CaP-NPs

Um ultrakleine Gold-NPs zu erhalten, wurde in einer *in situ*-Reaktion Tetrachlorogoldsäure durch Natriumborhydrid reduziert und die Oberfläche der resultierenden Gold-NPs mit stabilisierenden Liganden funktionalisiert. Hierfür wurde das bereits in der Literatur beschriebene Tripeptid Glutathion, bestehend aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, als Ligand eingesetzt.^[207,208] Die Struktur des Glutathions ist in Abb. 100 dargestellt.

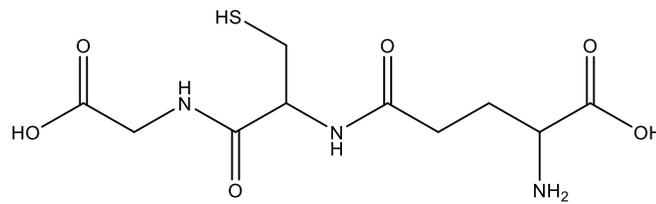


Abb. 100: Schematische Struktur des Glutathions (GSH).^[208]

Als Vorbereitung für die Klick-Chemie wurde die Nanopartikeloberfläche der Au-GSH-NPs mit Azidgruppen modifiziert. Um das erfolgreiche Anbinden der ultrakleinen Gold-NPs an den CaP-NPs zu untersuchen, wurden die Azidgruppen-modifizierten Gold-NPs zunächst mittels Klick-Reaktion und einem Kupferkatalysator mit AF647-Alkin-Molekülen zur Reaktion gebracht. Damit jedoch nicht alle Azidgruppen von den AF647-Alkin-Molekülen besetzt werden, wurde nur ein Drittel der ursprünglichen Konzentration zur Anbindung hinzugegeben. Da die Gold-NPs selbst zu klein sind, konnten diese nur anhand der dynamischen Scheibenzentrifugation (DSC) nach jedem Syntheseschritt auf ihren hydrodynamischen Durchmesser hin untersucht werden. In Abb. 101 sind die DCS- und UV-Vis-Messungen nach jedem Syntheseschritt aufgetragen.

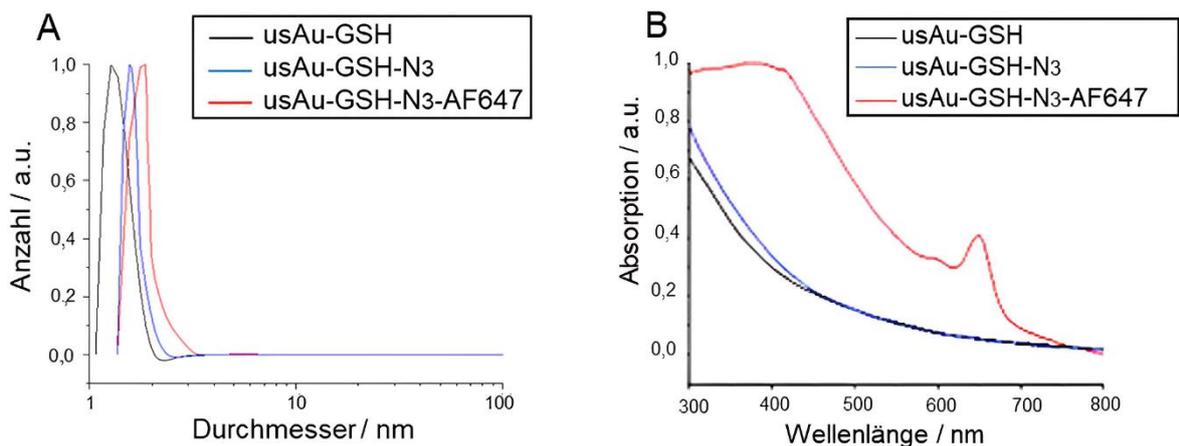


Abb. 101: Normierte (A) DCS- und (B) UV-Vis-Auftragungen der Au-NPs bei der Funktionalisierung mit Glutathiongruppen (schwarz), mit anschließenden Azidgruppen (blau) und abschließender Funktionalisierung der Oberfläche mit AF647-Molekülen (rot).

Es ist klar erkennbar, dass es zu einer minimalen Größenzunahme nach jedem Reaktionsschritt kommt (siehe Abb. **101 A**), was auf eine erfolgreiche Funktionalisierung von Azidgruppen (blau) und von AF647-Molekülen (rot) hindeutet. Außerdem ergab sich eine monodisperse Anzahlverteilung mit Durchmessern zwischen 1,3 und 1,9 nm, was auf ultrakleine Gold-NPs schließen lässt.^[209] Wie anhand der schwarzen und blauen Linie im UV-Vis-Spektrum (Abb. **101 B**) ersichtlich, handelt es sich hierbei um ultrakleine NPs, da keine Absorptionsbande und somit auch keine Plasmonenresonanz auftritt. Erst durch die Zugabe von AF647-Farbstoffmolekülen und anschließender Spinfiltration kann eine Absorptionsbande bei ungefähr 647 nm beobachtet werden.

Um die Oberfläche der PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs weiter funktionalisieren zu können, wurde eine Silica-Schale eingeführt. Diese dient zur Stabilisierung vor Agglomeration, zur Adsorption von Polymeren und zur kovalenten Konjugation mit Molekülen.^[90] So wurden für weitere Untersuchungen zunächst AF488-Azid-Moleküle an die Oberfläche der CaP-NPs konjugiert. Hierfür wurden die CaP-NPs anders als die CaP-NPs in den vorherigen Kapiteln dieser Arbeit, statt mit Azidgruppen mit Alkingruppen unter gleichen Synthesebedingungen funktionalisiert. Um auch hier nicht alle funktionellen Gruppen durch Farbstoff-Moleküle zu blockieren, wurde nur ein Drittel der ursprünglichen Konzentration eingesetzt. Mittels Fluoreszenzmessungen konnte die jeweilige Fluoreszenz in den jeweiligen Dispersionen bestätigt werden. In Abb. **102** sind die Fluoreszenzauftragungen der CaP-NPs und der Au-NPs vor der Reaktion miteinander dargestellt. Die Extinktions- bzw- Emissionsbanden des AF488 der CaP-NPs sind in grün und die Banden des AF647 der ultrakleinen Gold-NPs sind in rot ersichtlich.

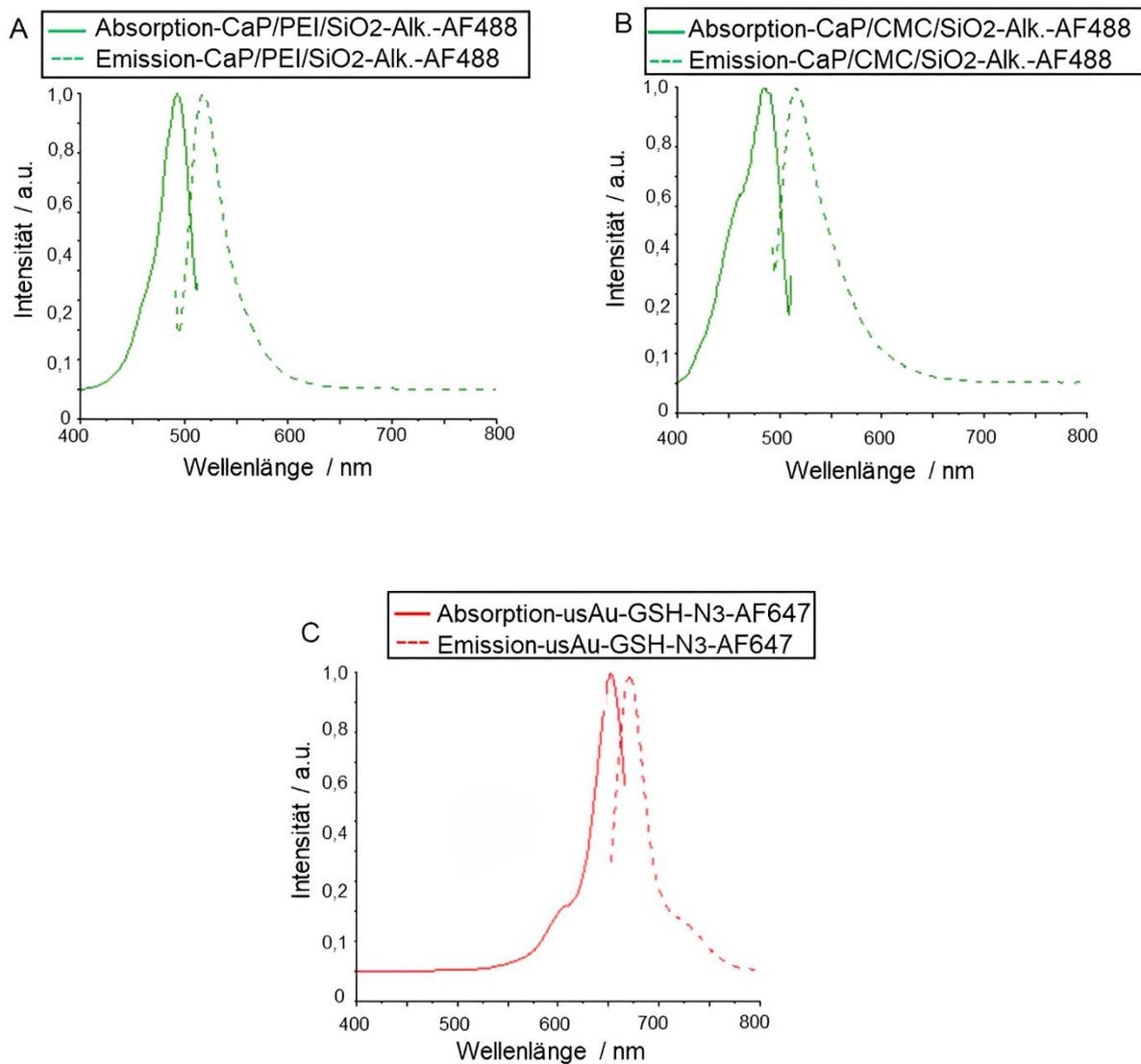


Abb. 102: Normierte Fluoreszenzspektroskopie-Auftragungen der CaP-NPs mit Alkingruppen (Alk. abgekürzt) und AF488-Farbstoff-Molekülen funktionalisiert in (A und B) und die fluoreszierenden Au-AF647-NPs in (C). In (A) sind die PEI-stabilisierten und in (B) die CMC-stabilisierten CaP-NPs dargestellt.

Nach der Reaktion der CaP- mit den Gold-NPs und anschließender Aufreinigung, wurden UV-Vis-Aufnahmen durchgeführt. In Abb. **103** sind die UV-Vis-Spektren der AF488 markierten CaP-NPs in schwarz und nach der Reaktion mit den fluoreszierenden Gold-AF647-NPs in rot abgebildet.

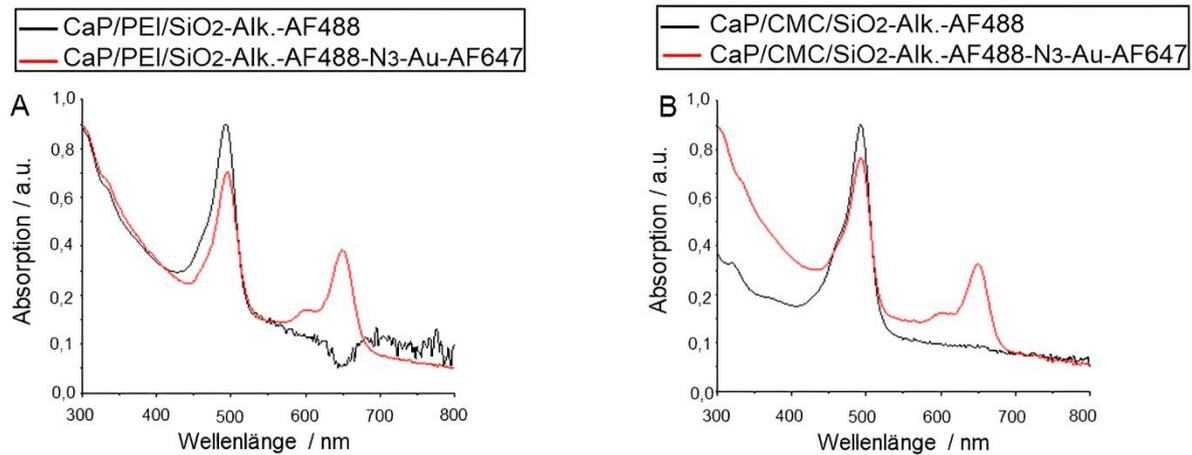


Abb. 103: Normierte UV-Vis-Auftragungen der CaP-NPs vor und nach der Funktionalisierung mit Au-NPs. In (A) sind die PEI-stabilisierten und in (B) die CMC-stabilisierten CaP-NPs dargestellt.

Bei der schwarzen Absorptionslinie kann die erfolgreiche Funktionalisierung der CaP-NPs in beiden Fällen mit den AF488-Farbstoff-Molekülen bestätigt werden. Erst nach der Klick-Reaktion mit den fluoreszierenden Gold-NPs ist eine zusätzliche charakteristische Bande bei 647 nm erkennbar, was ebenfalls auf eine erfolgreiche Anbindung der ultrakleinen Gold-NPs schließen lässt. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie konnte die erfolgreiche Anbindung der Gold-NPs an die CaP-Nanopartikeloberfläche anhand der gemessenen Fluoreszenz bestätigt werden (Abb. 104).

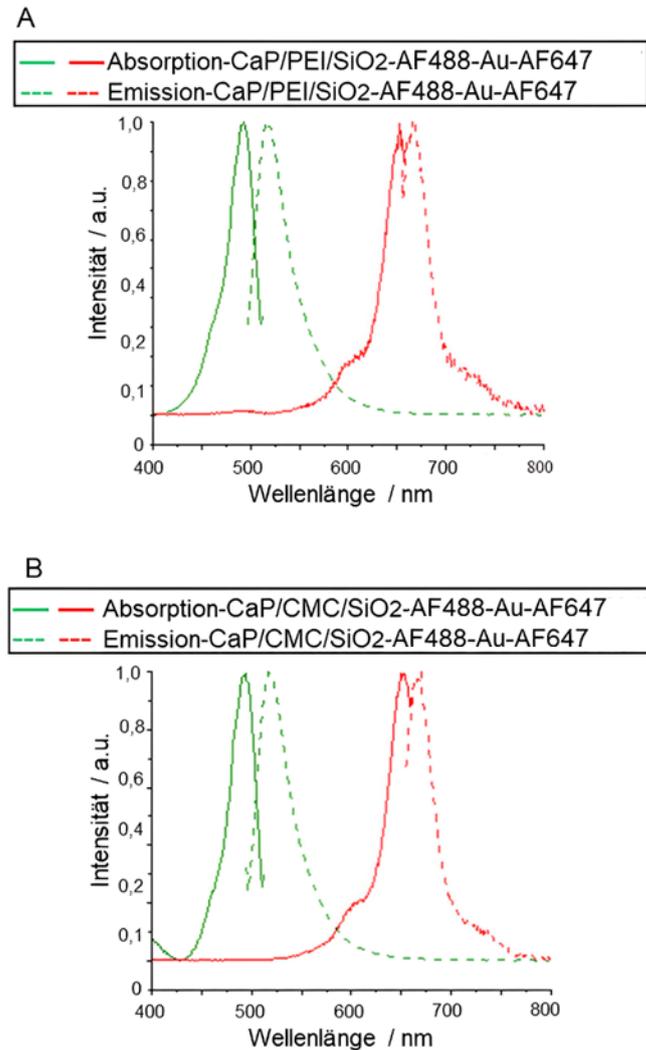


Abb. 104: Normierte Fluoreszenzspektroskopie-Diagramme nach der Klick-Reaktion mit Au-AF647-NPs. In (A) sind die PEI-stabilisierten und in (B) die CMC-stabilisierten CaP-NPs gezeigt.

Anhand von REM-Aufnahmen konnte die Morphologie der CaP-NPs nach der Klick-Reaktion mit den Gold-NPs betrachtet werden. Da die ultrakleinen Gold-NPs (ca. 2 nm) in einer anderen Größenordnung als die viel größeren CaP-NPs (ca. 100 nm) sind, können diese mittels REM-Aufnahmen (Abb. **105**) nicht abgebildet werden. Hierfür müssten transmissionselektronmikroskopische Aufnahmen (TEM) für eine viel höhere Auflösung eingesetzt werden. Aus Abb. **105** ist zu entnehmen, dass sich leichte Agglomerate der sphärischen NPs gebildet haben.

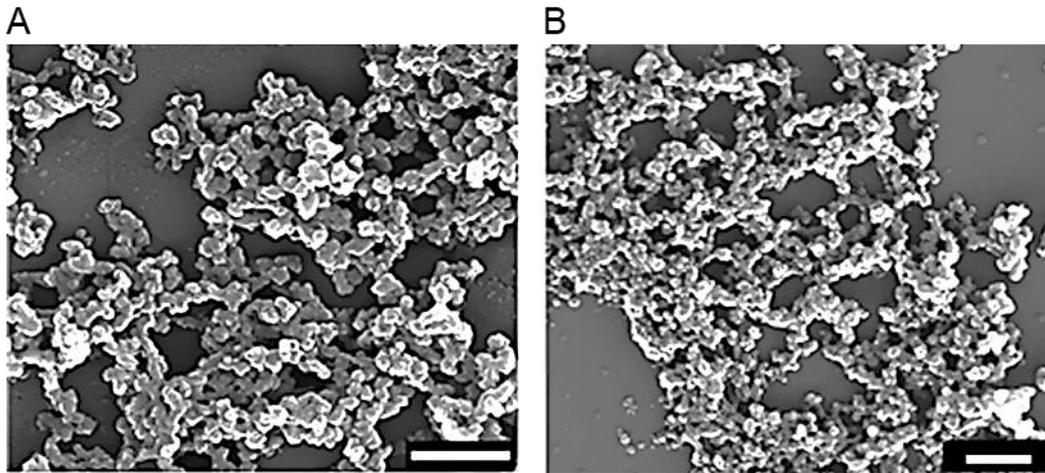


Abb. 105: REM-Darstellungen der Au-AF647-funktionalisierten CaP-NPs. (A) PEI- und (B) CMC-stabilisierte CaP-NPs. Maßstab: 500 nm.

Es ist ersichtlich, dass die PEI- (Abb. **105 A**) und die CMC-stabilisierten CaP-NPs (Abb. **105 B**) ungefähr in der gleichen Größenordnung liegen. Generell wurden weniger Moleküle und Gold-NPs an die CMC-stabilisierten CaP-NPs angebracht, was sich in den nachfolgenden Charakterisierungsmethoden durchgehend bestätigen lässt. Mittels DLS (Abb. **106**) konnte der hydrodynamische Durchmesser der CaP-NPs vor und nach der Reaktion mit den Gold-NPs vermessen werden. Durch den Vergleich der schwarzen Auftragung (vor der Klick-Reaktion) und der roten Auftragung (nach der Klick-Reaktion) ist eine Größenzunahme zwischen 51 nm und 101 nm ersichtlich, was auf eine leichte Agglomeration der CaP-NPs schließen lässt. Der gemessene PDI weist auf den Beginn eines polydispersen Systems hin, was sich anhand der Zeta-Potential-Messungen bestätigen lässt (siehe Tab. **28**).

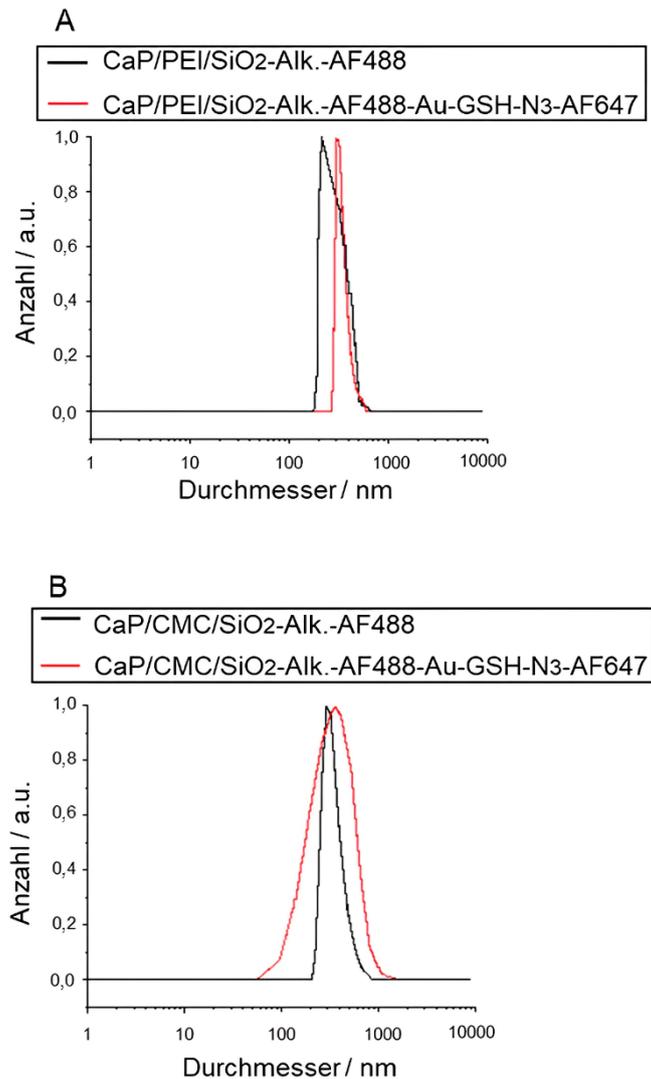


Abb. 106: Normierte Anzahlverteilung der synthetisierten (A) PEI-stabilisierten und (B) CMC-stabilisierten CaP-NPs. Vor (schwarz) und nach (rot) der Klick-Reaktion mit Au-AF647-NPs.

Um das Verhältnis von Gold und Ca zu ermitteln, wurden zwei Methoden zur Untersuchung herangezogen. Zum einen die AAS, deren Ergebnisse in Tab. **29** zusammengetragen sind und zum anderen mittels energiedisperser Röntgenspektroskopie (EDX). In Abb. **107** sind die erhaltenen EDX-Diagramme für die PEI- und für die CMC-stabilisierten CaP-NPs vor und nach der Reaktion mit den ultrakleinen Gold-NPs dargestellt.

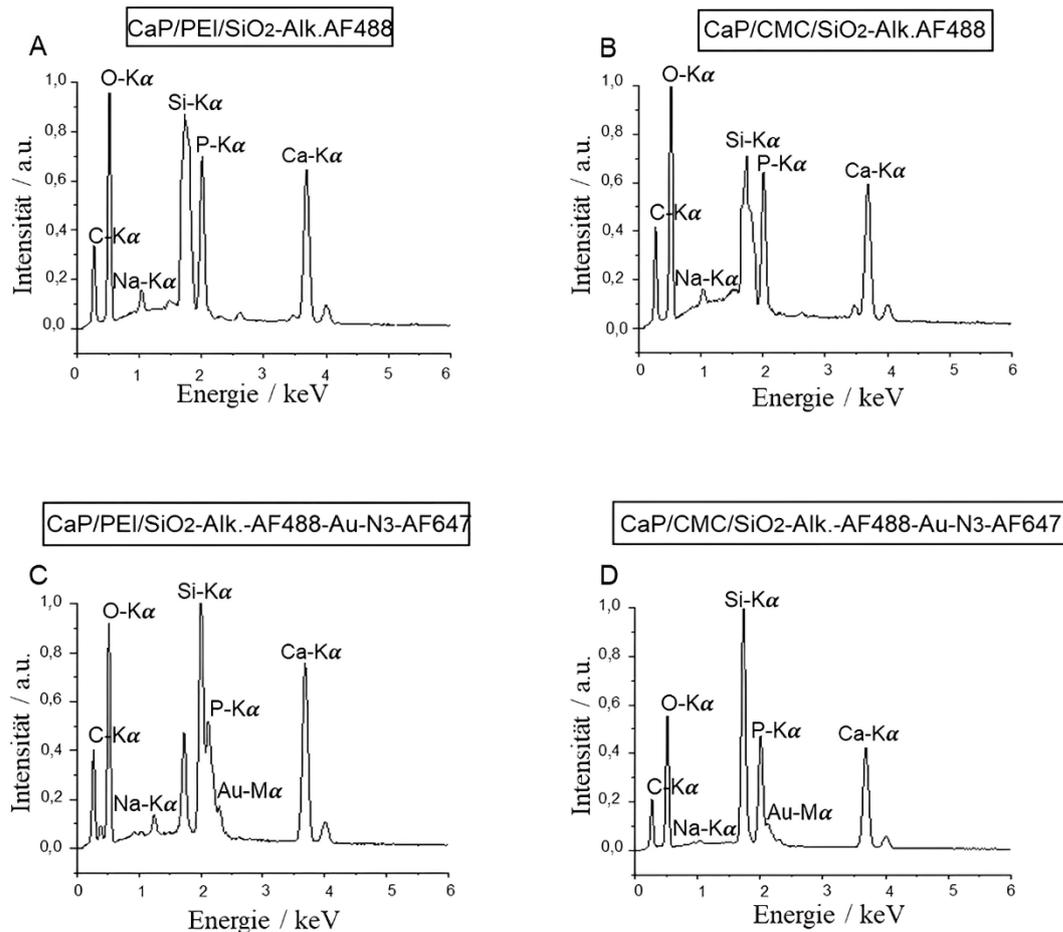


Abb. 107: Normierte EDX-Diagramme der vier verschiedenen CaP-NPs. In (A und B) vor der Funktionalisierung mit Au-AF647-NPs und in (C und D) nach der Funktionalisierung. In (A und C) sind die PEI-stabilisierten NPs und in (B und D) die CMC-stabilisierten NPs abgebildet.

Durch die EDX-Auftragungen in Abb. 107 ist zu erkennen, dass die Intensität für den Ca-Gehalt nach der Reaktion mit den Gold-NPs nicht signifikant abfällt. Das bedeutet, dass trotz Aufreinigungsschritte nach der Reaktion, die Menge an CaP-NPs erhalten bleibt. Neben der Intensität für Ca und Au, kann auch die Intensität für Natrium (Na) detektiert werden. Diese kann aus den Stammlösungen von Ca und P resultieren, da Natriumhydroxid (NaOH) zur pH-Werteinstellung genutzt wird. Abschließende Untersuchungen wurden mittels PXR (Abb. 108) durchgeführt, um die Kristallinität der vier Proben zu untersuchen. Mittels der vier Diffraktogramme kann eine amorphe Natur der Partikel in Abb. 108 entnommen werden.

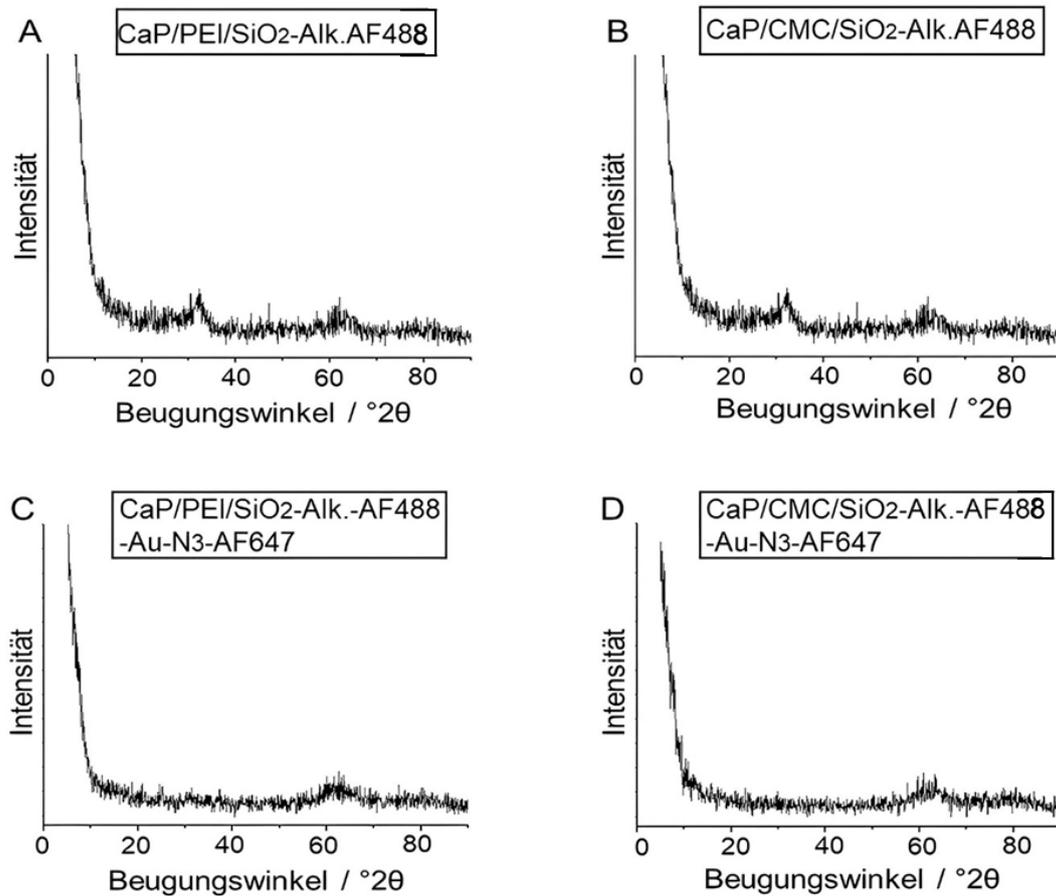


Abb. 108: PXRD-Diffraktogramme der CaP-NPs vor (A und B) und nach der Funktionalisierung mit Au-AF647-NPs (C und D).

In Abb. **108 A** und **B** sind die PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs mit der Oberflächenfunktionalisierung durch AF488-Moleküle dargestellt. Es sind zwei amorphe Halos bei einem Beugungswinkel von 32 (°2θ) und 62 (°2θ) sichtbar. In den unteren beiden Diffraktogrammen in Abb. **108 C** und **D**, ist nur noch das Halo bei einem Beugungswinkel von 62 (°2θ) nach der Klick-Reaktion mit den ultrakleinen Gold-NPs erkennbar.

In Tab. **28** sind die Untersuchungsergebnisse der CaP-NPs zunächst ohne die Anbringung von Gold-NPs in den ersten beiden Spalten zusammengefasst und in den beiden letzten Spalten sind die Ergebnisse nach der Klick-Reaktion dargestellt. Für die durchschnittlichen REM-Kerndurchmesser wurden 50 NPs vermessen. Für einen besseren Vergleich der Oberflächenbeladung der CaP-NPs wurden die AF488- und die Au-AF647-Moleküle pro nm² berechnet und in Tab. **29** dargestellt.

Tab. 28: Zusammenfassung der Analyseergebnisse vor und nach der Reaktion mit Au-AF647-NPs.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Potential / mV
<i>CaP/PEI/SiO₂- Alk.-AF488</i>	0,096	0,241	3,9·10 ¹⁷	72±11	200	0,3	+20
<i>CaP/CMC/SiO₂- Alk.-AF488</i>	0,092	0,231	3,5·10 ¹⁷	74±12	291	0,2	-17
<i>CaP/PEI/SiO₂- Alk.-AF488-N3- Au-AF647</i>	0,046	0,115	1,0·10 ¹⁷	89±15	301	0,3	+14
<i>CaP/CMC/SiO₂- Alk.-AF488-N3- Au-AF647</i>	0,040	0,100	1,4·10 ¹⁷	76±10	340	0,4	-12

Um die Anzahl an fluoreszierenden Gold-NPs auf der CaP-Nanopartikeloberfläche zu bestimmen, wurde mittels AAS die Goldmenge und mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie die AF647-Menge in der Dispersion bestimmt. In Tab. 29 sind die erhaltenen Ergebnisse abgebildet.

Tab. 29: Anzahl der Au-NPs und Anzahl der AF647-Moleküle nach der Klick-Reaktion mit CaP-NPs.

Probe	c(Au) / kg m ⁻³	Au-NPs / Partikel m ⁻³	Au-NPs / Partikel mol m ⁻³	c(AF647) / mol m ⁻³	AF647 pro Au- NP
<i>CaP/PEI/SiO₂- Alk.-AF488-N3- Au-AF647</i>	4,00·10 ⁻²	4,94·10 ²⁰	8,2·10 ⁻⁴	1,95·10 ⁻³	2,4
<i>CaP/CMC/SiO₂- Alk.-AF488-N3- Au-AF647</i>	5,75·10 ⁻³	7,11·10 ¹⁹	1,18·10 ⁻⁴	2,61·10 ⁻⁴	2,2

In Tab. 29 ist zu sehen, dass weniger AF647-Moleküle nach der Reaktion mit den CMC-stabilisierten Partikeln in der Dispersion waren. Als Beispielrechnung für die Bestimmung der Anzahl der Gold-NPs pro m⁻³ Dispersion auf den PEI-stabilisierten NPs, diente Gleichung 31. Hierfür wurde die gemessenen Goldmenge (AAS) in der Probe und durch die Masse eines Gold-NP geteilt.

$$\text{Anzahl Au - NPs} = \frac{c(\text{Au})}{m(\text{Au})} = \frac{4,00 \cdot 10^{-2} \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}}{8,09 \cdot 10^{-23} \text{ kg}} = 4,94 \cdot 10^{20} \text{ m}^{-3} \quad (31)$$

Die Masse eines Gold-NPs ($8,09 \cdot 10^{-23}$ kg) ergab sich wiederum aus der Multiplikation des Volumens eines sphärischen Partikels ($4,19 \cdot 10^{-27}$ m³) mit der Dichte von Gold (19302 kg m⁻³). Für die Volumenberechnung wurde der Radius eines Partikels von $1 \cdot 10^{-9}$ m angenommen. Durch die Division der Anzahl der Au-NPs mit der Avogadro-Konstante ($6,023 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹) wird die Anzahl der Au-NPs in mol m⁻³ erhalten. Im abschließenden Schritt kann mittels Gleichung **32** die Anzahl an AF647-Molekülen pro Gold-NP bestimmt werden. Dabei wird die AF647-Konzentration durch die Anzahl an Gold-NPs geteilt.

$$\text{Anzahl AF647 - Moleküle pro Au - NP} = \frac{c(\text{AF647})}{\text{Au-NPs}} = \frac{1,95 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}}{8,2 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}} = 2,37 \quad (32)$$

In Tab. **30** werden die berechneten Farbstoff-Moleküle und Gold-NPs auf den CaP-NPs aufgelistet. Mittels AAS- und EDX-Messungen konnte das Verhältnis von Ca zu Gold bestimmt werden. Für die AAS-Vermessungen wurde die NP-Dispersion zuvor in Königswasser gelöst und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Für die EDX-Analysen wurde die aufkonzentrierte Probe auf einen Probenträger getropft und bei RT getrocknet.

Tab. 30: Berechnete AF488- und AF647-Moleküle pro CaP-NP, sowie die Anzahl an Gold-NPs pro CaP-NP mit ihrem Verhältnis zueinander. Bestimmt mittels AAS und EDX.

Probe	AF488 pro Partikel	AF647 pro Partikel	Au-NPs pro Partikel	Au-NPs pro CaP- NPs (nm ²)	Ver- hältnis Ca:Au mittels AAS	Ver- hältnis Ca:Au mittels EDX
<i>CaP/PEI/SiO₂-Alk.- AF488</i>	9,32·10 ⁴	-	-	-	-	-
<i>CaP/CMC/SiO₂-Alk.- AF488</i>	7,92·10 ³	-	-	-	-	-
<i>CaP/PEI/SiO₂-Alk.- AF488-N₃-Au-AF647</i>	2,11·10 ²	1,18·10 ⁴	4,98·10 ³	56	85:15	93:7
<i>CaP/CMC/SiO₂-Alk.- AF488-N₃-Au-AF647</i>	1,12·10 ²	1,13·10 ³	5,09·10 ²	7	97:3	95:5

Werden die Verhältnisse von Ca:Au durch die beiden Messmethoden verglichen, fällt bei den PEI-stabilisierten CaP-NPs eine größere Abweichung auf. Die Verhältnisse für die CMC-stabilisierten Partikel passen jedoch gut überein. Wird die Anzahl an Au-NPs pro nm² der CaP-Nanopartikeloberfläche betrachtet, fällt auf, dass auf den PEI-stabilisierten CaP-NPs ungefähr achtmal so viele Au-NPs gebunden sind, als auf den CMC-stabilisierten Partikeln.

Anschließend wurden nach einer 24 h Inkubation mit HeLa-Zellen die verschiedenen Partikelsorten auf ihre Zellaufnahme untersucht. Mittels CLSM konnten die fluoreszierenden Partikel erste Anhaltspunkte über die Zellaufnahme geben. Anhand der grünen (CaP-AF488) und roten Punkte (Au-AF647) konnten die Partikel bei den Zelluntersuchungen nachverfolgt werden. In allen vier Beispielen (Abb. **109**) konnten die Partikel von den Zellen aufgenommen werden. Durch die Überlagerung (Abb. **109 e**) der beiden Kanäle aus Abb. **109 c** und **d**, konnte eine Kofluoreszenz auf der CaP-Nanopartikeloberfläche detektiert werden. Unter anderem hat sich gezeigt, dass die PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs unabhängig ihrer Ladung von den Zellen aufgenommen wurden.

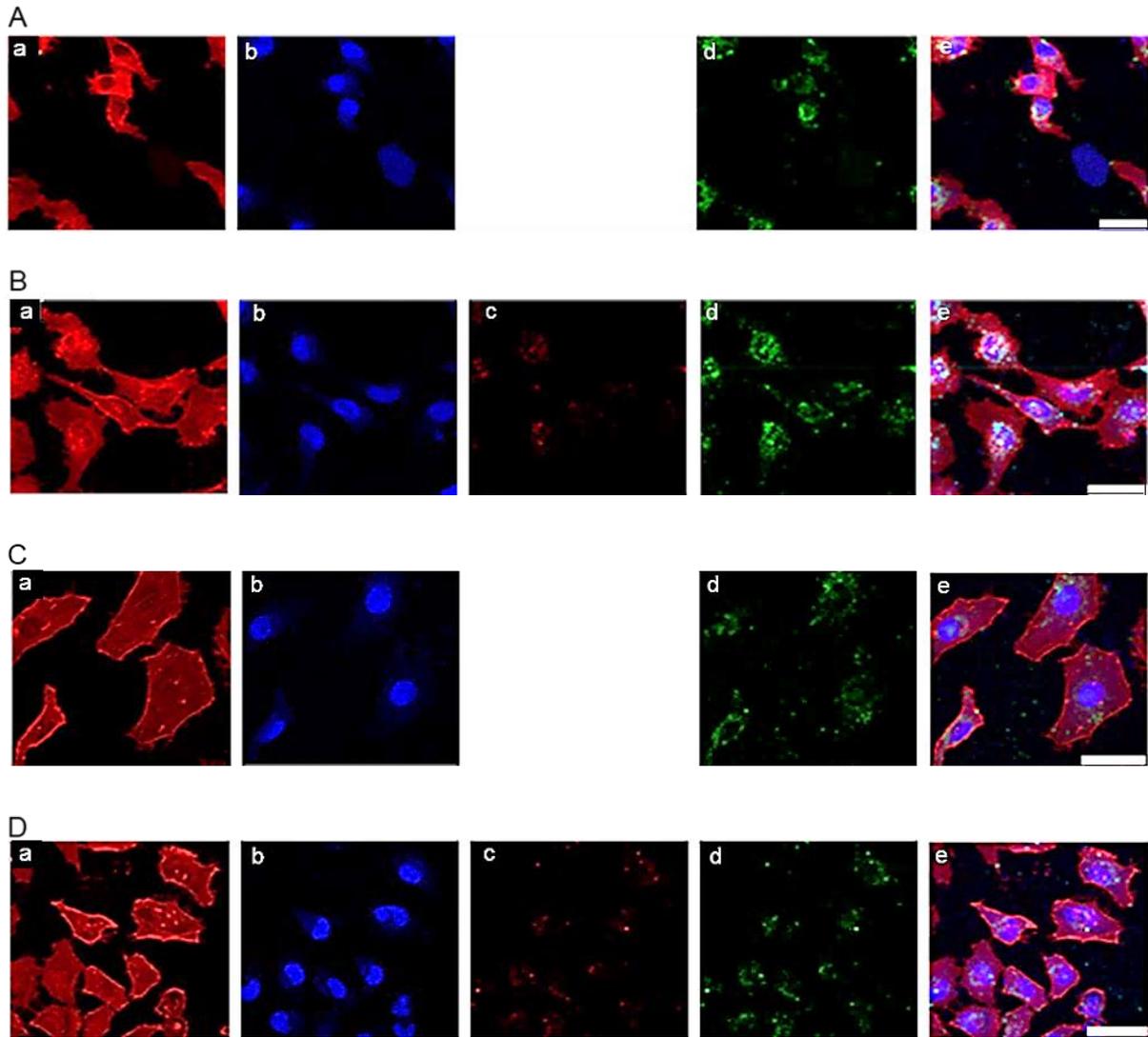


Abb. 109: CLSM von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit (A) CaP/PEI/SiO₂-Alk.-AF488, (B) CaP/PEI/SiO₂-Alk.-AF488-N₃-Au-AF647, (C) CaP/CMC/SiO₂-Alk.-AF488 und (D) CaP/CMC/SiO₂-Alk.-AF488-N₃-Au-AF647. Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin (a), Zellkern mit Hoechst-3342 (b), AF647 der Au-NPs (c), AF488 der CaP-NPs (d) sowie ein Überlagerungsbild (e). Maßstab: 20 µm.

Um neben den Zellaufnahmestudien auch die Toxizität und die Überlebensrate der Zellen nach einer Inkubation von 24 h mit den jeweiligen Partikeln zu untersuchen, wurde eine MTT-Analyse (Zellviabilitäts-Analyse) durchgeführt.

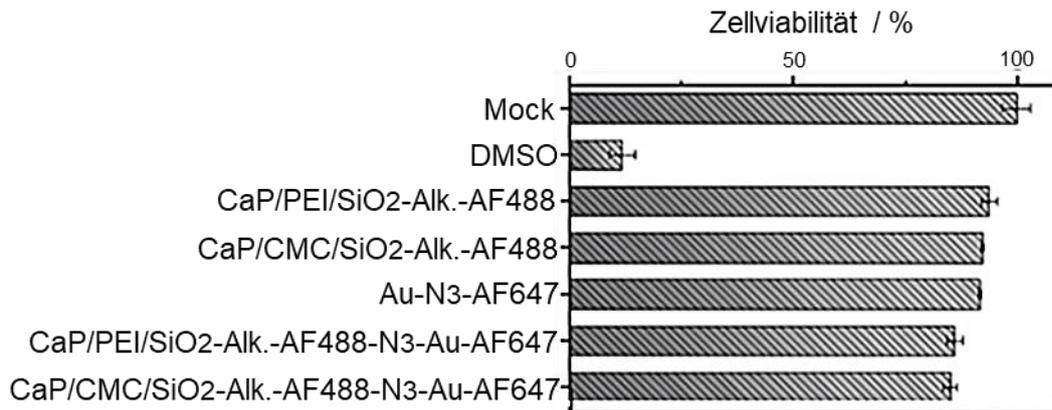


Abb. 110: MTT-Analyse der CaP-NPs vor und nach der Funktionalisierung mit Au-AF647-NPs, sowie reine Au-AF647-NPs. Mock: positive Kontrolle ohne NPs Zugabe, DMSO: reine Zugabe an DMSO statt NPs.

Mittels Abb. 110 ist abzulesen, dass alle drei Startpartikel nur eine sehr geringe Toxizität verglichen zu den unbehandelten HeLa-Zellen aufweisen. Die Zellviabilität fällt bei den PEI bzw. CMC stabilisierten CaP-NPs um nur 5% ab. Bei den AF647-fluoreszenzmarkierten Gold-NPs ist kaum eine Abweichung von diesem Trend ersichtlich. Erst nach der Klick-Reaktion fällt die Zellviabilität um weitere 4%, unabhängig von der jeweiligen Stabilisierung der CaP-NPs. Dies kann daran liegen, dass es sich hierbei um eine Mischung aus zwei verschiedenen Farbstoffen und Partikelarten handelt, sodass die Zellen unter zusätzlichem Stress leiden. Dennoch muss erwähnt werden, dass eine Zellviabilität von 91% erzielt werden kann, was gleichwohl auf eine marginale Toxizität schließen lässt. Die CaP-NPs werden nach längerer Zeit durch die Endozytose aufgelöst, sodass nur noch die Gold-NPs in den Zellen zurückbleiben.

Mit diesen Untersuchungen eröffnet sich eine weitere Möglichkeit die CaP-NPs als Trägersysteme nicht nur für Biomoleküle, sondern auch für den Transport kleinerer Nanopartikel für *in vitro*-Untersuchungen einzusetzen.

5.4 Konkurrenzreaktionen zwischen fluoreszierenden BSA- und AF-Farbstoff-Molekülen

Nach der Funktionalisierung von CaP-NPs mit Azidgruppen (CaP-N₃) können Alkin-funktionalisierte-BSA-AF647- und AF488-Moleküle mit Hilfe der Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion an die NPs gebunden werden. Um BSA-AF647-Moleküle zu erhalten, wurden diese zunächst mit dem Propargyl-PEG3-Aminoxy-Linker in einer Oximreaktion bei 37 °C über Nacht inkubiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nicht nur BSA-AF647- oder AF488-Moleküle einzeln geklickt werden können, sondern auch eine Mischung aus beiden. Eine schematische Darstellung der funktionalisierten CaP-NPs ist in Abb. 111 zu sehen.

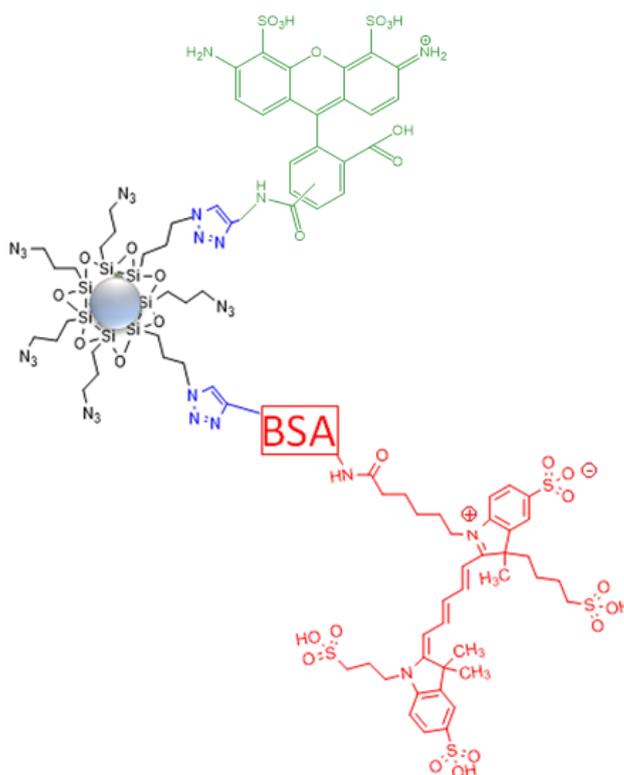


Abb. 111: Schematische Illustration der BSA-AF647- und AF488-funktionalisierten CaP-NPs.

Um die Klick-Effizienz von BSA-AF647- und AF488-Molekülen zu untersuchen, wurden 8 verschiedene Synthesen durchgeführt. In Tab. 31 ist die Zugabe von BSA-AF647 (1 mg mL⁻¹) und AF488 (1 mg mL⁻¹) dargestellt. Die Zugabe von BSA-AF647

war bei jeder Synthese konstant, aber die Zugabe von AF488 wurde systematisch erhöht.

Tab. 31: Syntheseparameter für die Zugabe von BSA-AF647 und AF488 zu den CaP-NPs.

Probennummer	BSA-AF647 Zugabe / µL	AF488 Zugabe / µL	Konzentrations- Verhältnis
1	25	0	1:0
2	25	2,5 (10%)	1:0,1
3	25	7,5 (30%)	1:0,3
4	25	12,5 (50%)	1:0,5
5	25	17,5 (70%)	1:0,7
6	25	22,5 (90%)	1:0,9
7	25	25 (100%)	1:1
8	0	25	0:1

Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass neben dem kationischen Polymer PEI auch das anionische Polymer CMC zur Stabilisierung der CaP-NPs eingesetzt wurde. Auch hier ist die Ladung eine weitere Möglichkeit der Untersuchung in Zellstudien. Partikel mit einer positiven Ladung wechselwirken mit den negativen Proteinen auf der Zelloberfläche und werden, wie in Kapitel **2.2.5** erwähnt mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen.^[100-103]

Es hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung der AF488-Konzentration das Klicken der größeren BSA-AF647-Moleküle beeinflusst, obwohl die Zugabekonzentration des BSA-AF647 konstant bleibt. Dies lässt sich mit Hilfe von UV-Vis-Messungen in Abb. **112** verdeutlichen. Die Absorption des BSA-AF647 (Wellenlänge 648 nm) nimmt systematisch ab, was im Spektrum deutlich von der schwarzen zur blauen Linie sichtbar ist. Im Gegenzug steigt die Absorption von AF488 (Wellenlänge 488 nm) durch die erhöhte Zugabe von 0%, 50% und 100%. Durch die Absorptionen der gemessenen CaP-NPs lässt sich nachweisen, dass die Absorption der jeweiligen Farbstoff-Konzentrationen für die PEI-stabilisierten CaP-NPs (**A**) im Vergleich zu den CMC-stabilisierten NPs (**B**) höher ist.

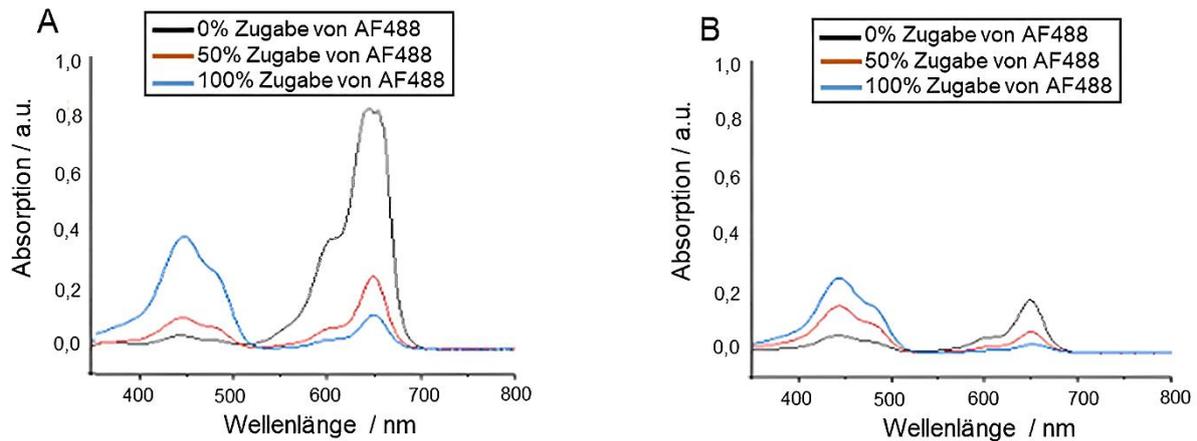


Abb. 112: UV-Vis-Messungen von PEI-stabilisierten (A) und von CMC-stabilisierten (B) CaP-NPs. Die BSA-AF647-Absorption nimmt mit steigender AF488-Absorption (von schwarz nach blau) ab.

Mittels UV-Vis-Spektroskopie kann das erfolgreiche Anklicken der fluoreszenzmarkierten BSA-AF647- und AF488-Moleküle an die CaP-NPs bestätigt werden. Auf der Grundlage der UV-Vis-Messungen konnte die Menge an BSA-AF647 und AF488 in mg mL^{-1} in der CaP-NPs-Dispersion berechnet und in den folgenden Diagrammen in Abb. 113 dargestellt werden. Die zugegebene Konzentration der BSA-AF647-Moleküle (A und C) und der AF488-Moleküle (B und D) ist durch die orangenen Säulen dargestellt. Die wiedergewonnene Konzentration (nach der Partikel-Aufreinigung) ist in blauen Säulen dargestellt. In Abb. 113 A und B ist die Konzentration der BSA-AF647- und AF488-Moleküle auf den PEI-stabilisierten CaP-NPs dargestellt, und in Abb. 113 C und D die angeklickte BSA-AF647- und AF488-Konzentration auf den CMC-stabilisierten CaP-NPs. An den PEI-stabilisierten NPs konnten mehr BSA-AF647- und AF488-Moleküle angeklickt werden als an den CMC-stabilisierten NPs (vgl. blaue Säulen in Abb. 113 A und C). Dies lässt sich durch die abstoßende Ladung der CMC-stabilisierten CaP-NP gegenüber den BSA-AF647-Molekülen erklären, die ebenfalls anionischer Natur sind. Für beide unterschiedlich geladenen NPs ist jedoch derselbe Trend zu erkennen, dass mit zunehmender AF488-Konzentration die BSA-AF647-Konzentration allmählich abnimmt, obwohl die Zugabe bei jeder Synthese konstant bleibt.

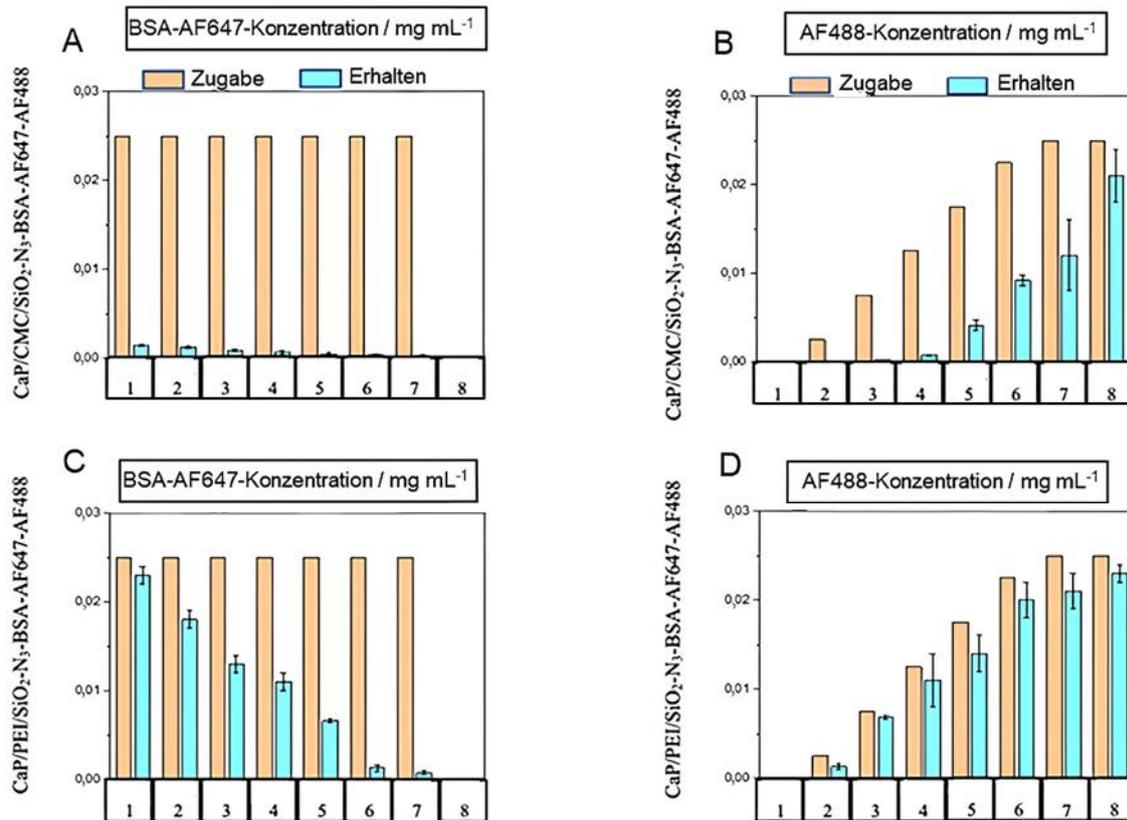


Abb. 113: Konzentrationsdiagramme der funktionalisierten CaP-NPs nach der Klick-Chemie mit BSA-AF647- und AF488-Molekülen, gemessen durch die UV-Vis-Spektroskopie. CMC-stabilisierte NPs (A und B) und PEI-stabilisierte CaP-NPs (C und D). Orangene Säulen = zugegebene Konzentration und blaue Säulen = gebundene Konzentration an fluoreszierenden Molekülen.

Neben der UV-Vis-Spektroskopie wurden auch Fluoreszenzanalysen durchgeführt. In Abb. 114 sind die Fluoreszenzspektren der PEI- und CMC-stabilisierten NPs dargestellt. Einmal ohne die Zugabe von AF488 (0%, Abb. 114 A und B) und einmal mit der Zugabe von AF488 zur Reaktion (100%, Abb. 114 C und D). Damit lässt sich bestätigen, dass beide Farbstoffe auf der Oberfläche der CaP-NPs konjugiert wurden.

5. Ergebnisse und Diskussion

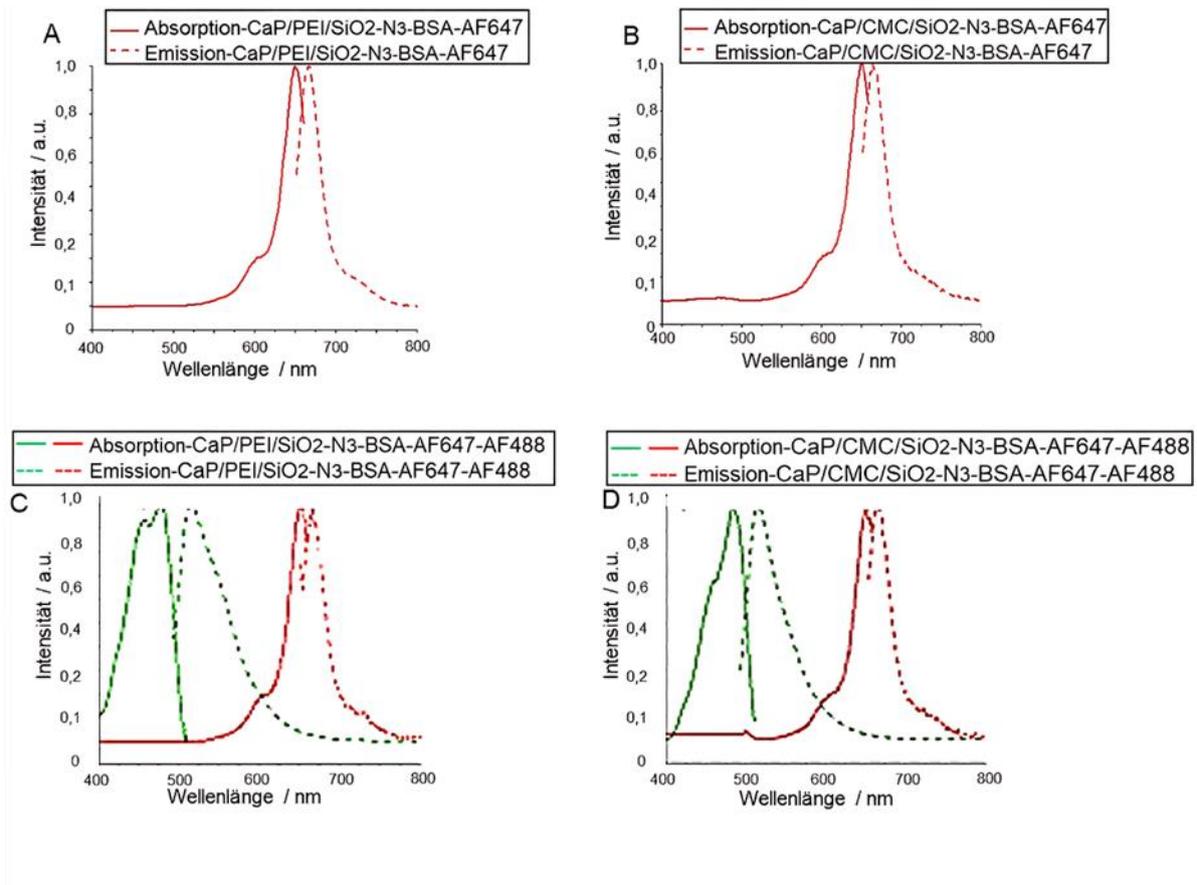


Abb. 114: Normierte fluoreszenzspektroskopische Auftragungen der funktionalisierten CaP-NPs nach der Klick-Chemie mit BSA-AF647- und AF488-Molekülen. PEI-stabilisierte NPs (A und C) und CMC-stabilisierte CaP-NPs (B und D).

Eine weitere spektroskopische Methode ist die IR-Spektroskopie, mit der Azidgruppen auf der CaP-NPs-Oberfläche bestimmt werden können (Abb. 115). Neben der Valenz- (554 cm^{-1}) und der Deformationsschwingung (1040 cm^{-1}) des P=O, ist bei einer Wellenzahl von 2102 cm^{-1} die symmetrische Valenzschwingung der Azidgruppe nach der Synthese sichtbar. Nach der Integration der markierten Fläche (rot in Abb. 115), ist ebenfalls zu erkennen, dass mehr Azidgruppen auf den PEI-stabilisierten CaP-NPs (A) im Vergleich zu den CMC-stabilisierten CaP-NPs (B) detektiert werden können. Diese Ergebnisse passen sehr gut zur geklickten Menge an BSA-AF647- und AF488-Molekülen, da weniger fluoreszierende Moleküle auf den CMC-stabilisierten CaP-NPs durch die UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden konnten (Abb. 112).

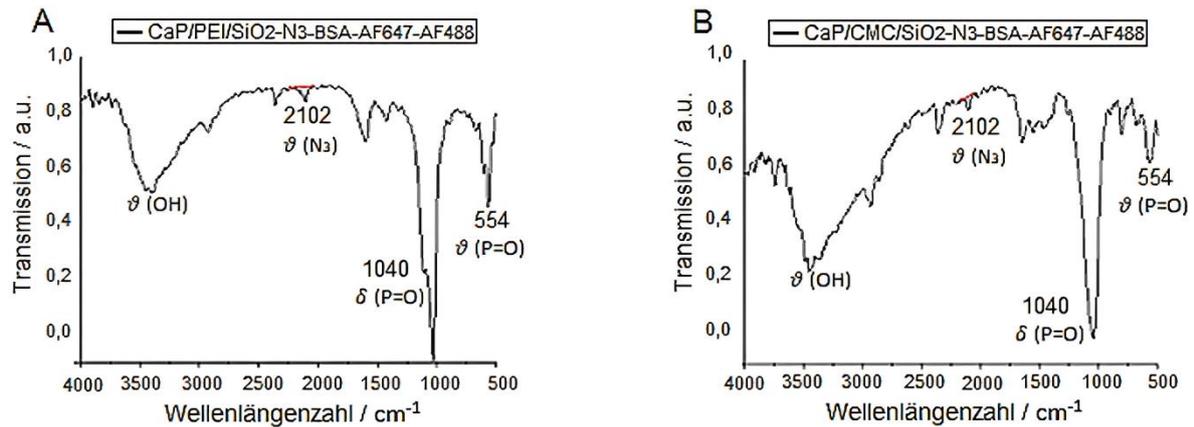


Abb. 115: Normierte IR-Messungen der PEI- (A) und der CMC- (B) stabilisierten CaP-NPs nach der Klick-Reaktion mit BSA-AF647- und AF488-Molekülen.

Zur weiteren Charakterisierung der erhaltenen CaP-NPs wurde der Durchmesser des Kerns der Partikel nach der Funktionalisierung der Oberfläche mit Azidgruppen mittels REM vermessen und der durchschnittliche Durchmesser aus $N=50$ CaP-NPs mit der *Software ImageJ* berechnet. Zusätzlich zu dieser Charakterisierungsmethode wurden nach jedem Syntheseschritt DLS-Messungen durchgeführt, um die erfolgreiche Modifizierung der Azidgruppen und das anschließende Anklicken der BSA-AF647- und AF488-Moleküle an der CaP-NPs-Oberfläche zu bestimmen. Abb. 116 zeigt die REM-Bilder der beiden Stabilisierungsarten (PEI und CMC) nach der CuAAC-Reaktion mit BSA-AF647- und AF488-Molekülen. Beide zeigen eine sphärische Morphologie der CaP-NPs (Abb. 116 A und B). Es ist zu erkennen, dass die CMC-stabilisierten NPs kleiner sind als die PEI-stabilisierten. Dabei resultiert ein Durchmesser von 64 nm (PEI) und 49 nm (CMC). Diese Ergebnisse können durch die DLS-Messungen bestätigt werden, da der hydrodynamische Durchmesser 11 nm – 32 nm der CMC-stabilisierten CaP-NPs kleiner ist als der der PEI-stabilisierten CaP-NPs. Der zunehmende hydrodynamische Durchmesser bestätigt die erfolgreiche Anbindung der BSA-AF647- und AF488-Moleküle (von der schwarzen zur roten Linie) nach jedem Syntheseschritt (Abb. 116 C und D). Wird die blaue Linie (CaP/CMC/SiO₂-N₃ = 120 nm) mit der roten Linie (CaP/CMC/SiO₂-N₃-BSA-AF647-AF488 = 149 nm) verglichen, so fällt auf, dass sich der hydrodynamische Durchmesser nur geringfügig verändert. Im Fall der PEI-stabilisierten CaP-NPs ist jedoch ein größerer Größenunterschied zu erkennen. Der

hydrodynamische Durchmesser nach der Klick-Reaktion beträgt etwa 289 nm (CaP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF647-AF488) im Vergleich zu den Azidgruppen-funktionalisierten CaP-NPs (CaP/PEI/SiO₂-N₃ = 210 nm).

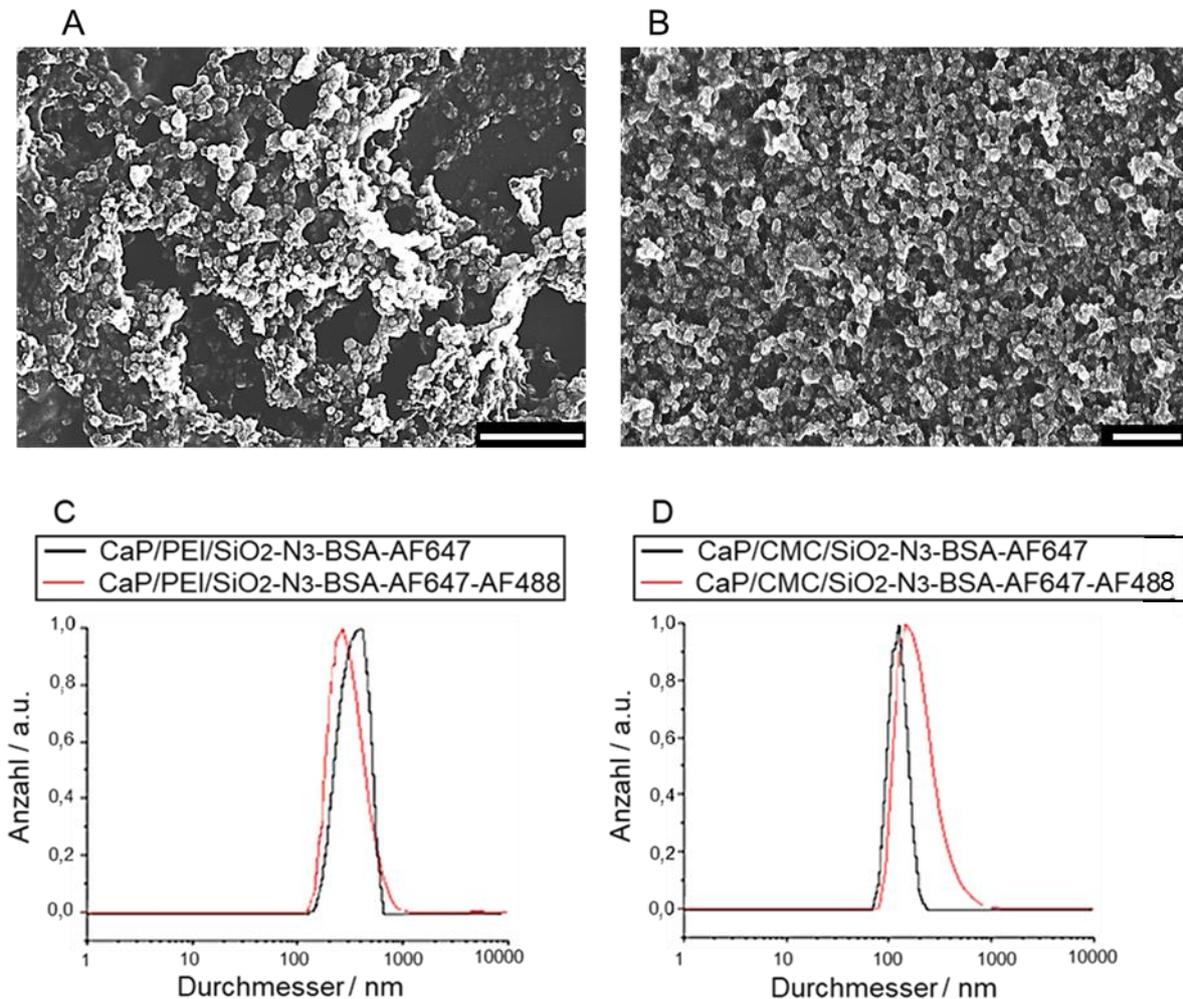


Abb. 116: REM-Bilder der funktionalisierten CaP-NPs nach der Klick-Chemie mit BSA-AF647- und AF488-Molekülen. PEI-stabilisierte NPs (A) und (B) CMC-stabilisierte CaP-NPs. Maßstab: 500 nm. Normierte Anzahlverteilungen der CaP-NP-Dispersion mit (C) PEI- und (D) CMC-stabilisierten CaP-NPs.

Tab. 32 zeigt die Ergebnisse der PEI- sowie CMC-stabilisierten CaP-NPs für (1) die 0%-ige AF488-Zugabe und (2) die 100%-ige Zugabe von AF488. Die Ca-Konzentration in den Proben wurde durch AAS-Messungen bestimmt. Das gleiche

Verfahren wurde für die CMC-stabilisierten NPs angewandt. Die Klick-Effizienz konnte durch die gemessene Konzentration (UV-Vis-Spektroskopie) bestimmt werden.

Tab. 32: PEI- und CMC-stabilisierte CaP-NPs nach der Reaktion mit BSA-AF647-Molekülen, sowie ohne und mit der Zugabe von AF488-Molekülen.

Probe	c(Ca ²⁺) / kg m ⁻³	c(HAP) / kg m ⁻³	Partikel- anzahl / Partikel m ⁻³	REM (d) / nm	DLS (Anzahl) (d) / nm	PDI (DLS)	Zeta- Poten- tial / mV
CaP/PEI/ SiO₂-N₃- BSA- AF647	0,092	0,231	5,4·10 ¹⁷	64±6	181	0,3	+17
CaP/PEI/ SiO₂-N₃- BSA- AF647- AF488	0,080	0,201	3,6·10 ¹⁷	70±10	198	0,2	+13
CaP/CMC /SiO₂-N₃- BSA- AF647	0,090	0,226	1,2·10 ¹⁸	49±5	149	0,3	-16
CaP/CMC /SiO₂-S- BSA- AF647- AF488	0,072	0,181	1,4·10 ¹⁷	92±11	187	0,4	-13

Zum besseren Vergleich der angebrachten BSA-AF647- und AF488-Moleküle auf den CaP-NPs und um die Effizienz der jeweiligen Synthesroute besser beurteilen zu können, wurden in Tab. 33 die gemessenen Moleküle pro CaP-NP berechnet. Es wurde eine Molare Masse von BSA-AF647 (67,83 kDa) und AF488 (0,77 kDa) eingesetzt.

Tab. 33: Zusammenfassung der berechneten BSA-AF647- und AF488-Moleküle pro CaP-NP.

Probe	BSA pro Partikel	BSA pro nm ²	AF647 pro Partikel	AF647- Moleküle pro BSA	AF488 pro Partikel
<i>CaP/PEI/SiO₂-N₃-BSA- AF647</i>	3,85·10 ²	6	1,39·10 ³	3,6	-
<i>CaP/PEI/SiO₂-N₃-BSA- AF647-AF488</i>	11	0,2	37	3,2	1,82·10 ⁵
<i>CaP/CMC/SiO₂-N₃- BSA-AF647</i>	9,2	0,2	34	3,7	-
<i>CaP/CMC/SiO₂-S- BSA-AF647-AF488</i>	9,4	0,1	32	3,4	1,95·10 ⁴

Wird die BSA-Anzahl in Tab. 33 betrachtet, kann die 43-fach höhere Beladung der PEI-stabilisierten CaP-NPs im Gegensatz zu den CMC-stabilisierten entnommen werden. Eine weitere Methode zur kolloidchemischen Charakterisierung der NPs wurde die PXRD durchgeführt. Anhand dieser Methode konnte durch die Überlagerung einer Referenz des Hydroxylapatits (rot, JCPDS-Nr. 00-009-0432) die erhaltenen Reflexe der jeweiligen Messungen verglichen werden. Wie in Abb. 117 A und B zu sehen ist, sind noch einige scharfe Reflexe des Hydroxylapatits 27 (°2θ) und 32 (°2θ) enthalten und einige neue 8 (°2θ), 17 (°2θ) und 37 (°2θ) hinzugekommen. Werden die beiden Diffraktogramme in Abb. 117 C und D betrachtet, fällt auf, dass die Partikel eine amorphe Struktur (Verbreiterung der Reflexlage) annehmen, wenn sie neben den fluoreszierenden BSA-Molekülen noch mit AF488-Farbstoff-Molekülen funktionalisiert werden.

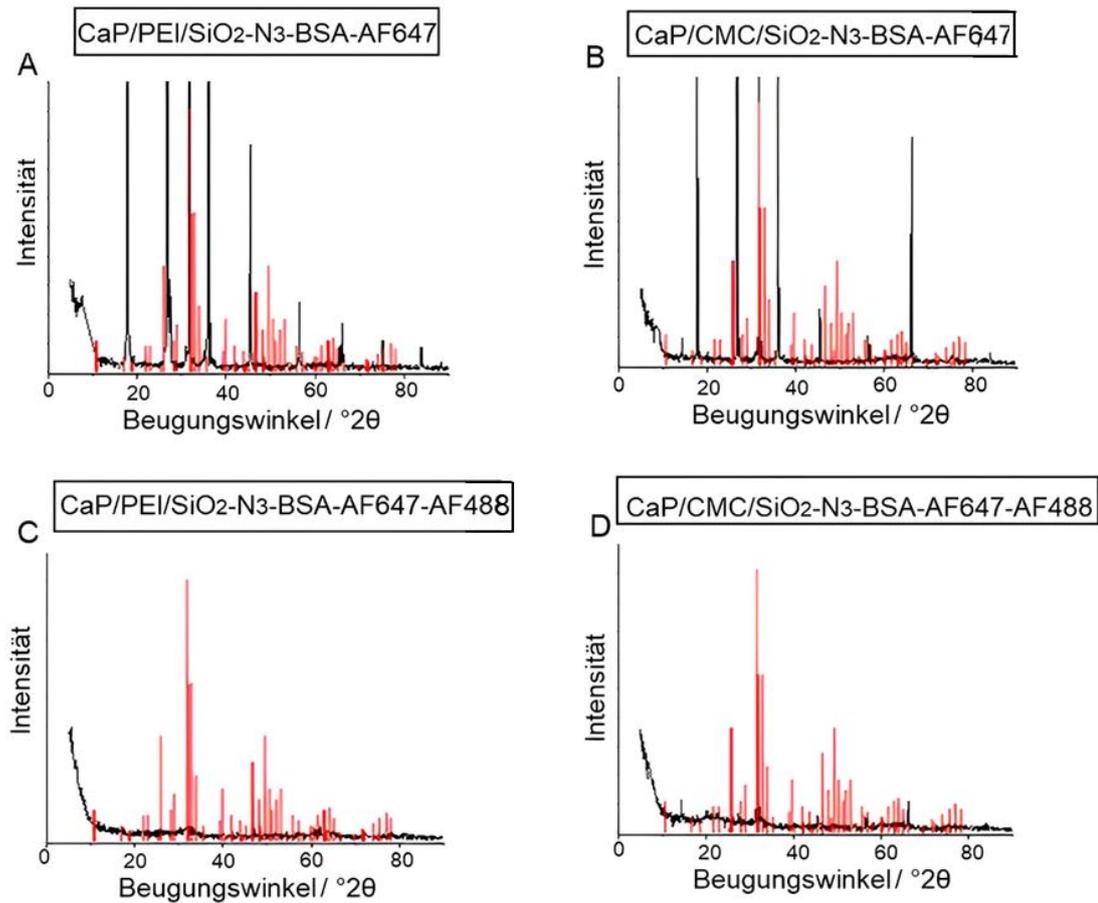


Abb. 117: PXRD-Diffraktogramme der reinen BSA-AF647-Zugabe (A und B) und nach der Reaktion mit einem Gemisch aus BSA-AF647 und AF488 (C und D), jeweils PEI- und CMC-stabilisiert. In rot die Referenz des Hydroxylapatits (JCPDS-Nr. 00-009-0432) und in schwarz die Probenmessung.

Schließlich wurde die Zellaufnahme mit HeLa-Zellen unter Verwendung eines Fluoreszenz- und CLS-Mikroskops durchgeführt. Die (A) CaP/PEI/SiO₂-BSA-AF647, (B) CaP/PEI/SiO₂-BSA-AF647-AF488 (100%), (C) CaP/CMC/SiO₂-BSA-AF647 und (D) CaP/CMC/SiO₂-BSA-AF647-AF488 (100%) wurden 24 h lang inkubiert. In Abb. 118 sind die fluoreszenzmarkierten BSA-AF647- und AF488-Moleküle in den Aufnahmekanälen (b und c) deutlich als hellrote (BSA-AF647) und grüne (AF488) Punkte zu erkennen. Bei den PEI- und CMC-stabilisierten CaP-NPs sind ungefähr gleich viele rote (BSA-AF647) und grüne Punkte (AF488) zu erkennen. Aus diesem Grund kann auf keine Bevorzugung der Partikelladung bei der Zellaufnahme geschlossen werden.

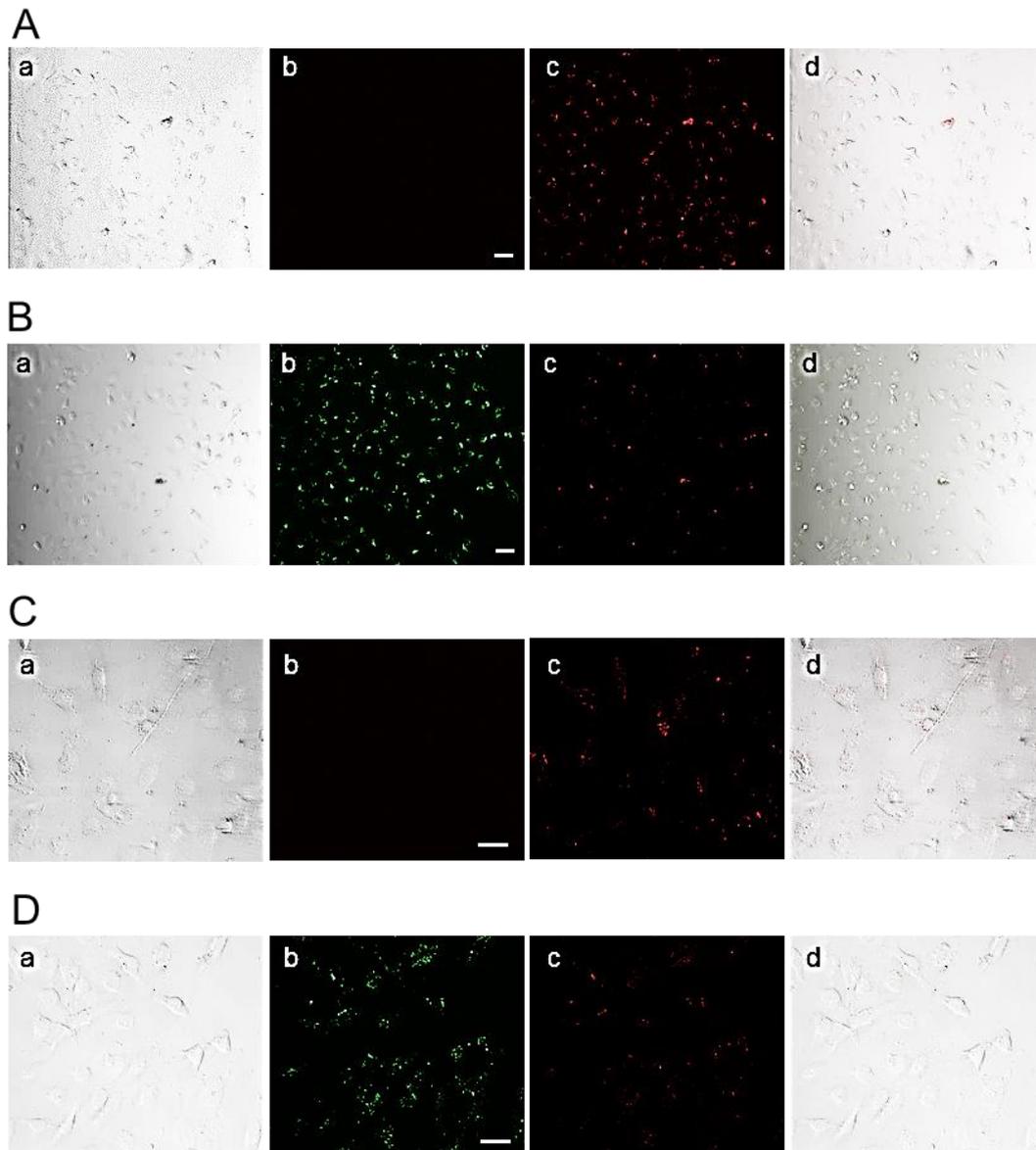


Abb. 118: Fluoreszenzmikroskopie-Bilder zum Nachweis der Aufnahme und Fluoreszenz von BSA-AF647- und AF488-funktionalisierten CaP-NPs. (A) CaP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF647, (B) CaP/PEI/SiO₂-N₃-BSA-AF647-AF488, (C) CaP/CMC/SiO₂-N₃-BSA-AF647 und (D) CaP/CMC/SiO₂-N₃-BSA-AF647-AF488. Maßstab: 50 μ m.

Anschließend erfolgte die Mikroskopie der HeLa-Zellen mittels eines CLSM und z-Schnitten zur genauen Lokalisierung der Partikel.

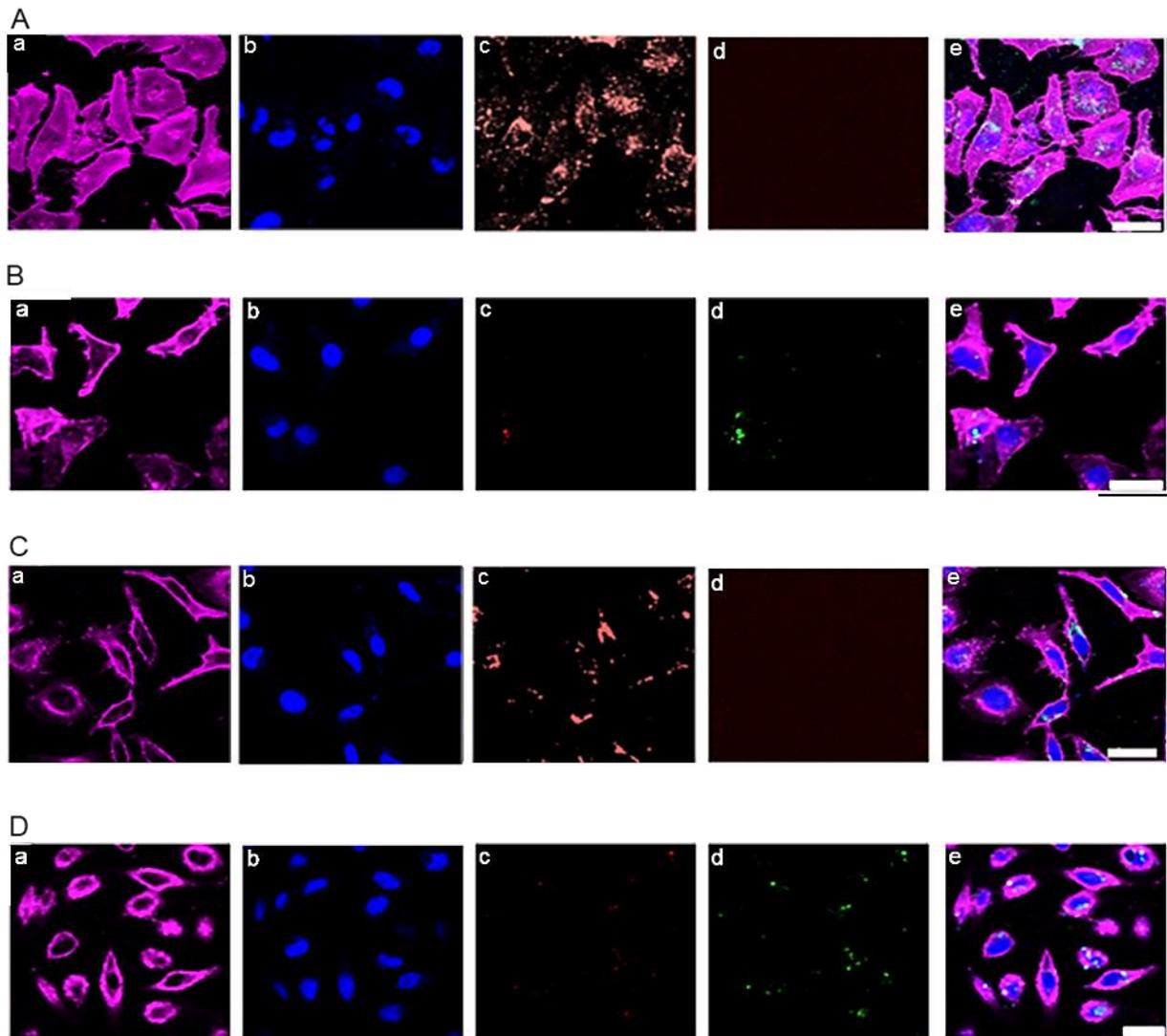


Abb. 119: CLSM-Bilder zum Nachweis der Aufnahme von BSA-AF647- und AF488-funktionalisierten CaP-NPs. (A) PEI-stabilisierte CaP-NPs mit BSA-AF647-Zugabe, (B) PEI-stabilisierte CaP-NPs mit einem Gemisch aus BSA-AF647 und AF488, (C) CMC-stabilisierte CaP-NPs mit BSA-AF647-Zugabe und (D) CMC-stabilisierte CaP-NPs mit BSA-AF647- und AF488-Zugabe. Aktinfärbung mit AF568-Phalloidin (a), Kernfärbung mit Hoechst-3342 (b), BSA-AF647 (c) und AF488 (d) sowie eine Überlagerung aller Kanäle (e). Maßstab: 20 μm .

Durch die Überlagerungen der Aufnahmekanäle in Abb. 119 c und d kann eine Kolo-kalisation beider Farbstoffe detektiert werden. Dies lässt schließen, dass die CaP-NPs als Trägersysteme mit gleichzeitiger Anbindung von Farbstoff- und Biomolekülen in Zelluntersuchungen geeignet sind.

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Vielfältigkeit der Klick-Chemie anhand unterschiedlicher Oberflächenmodifizierungen an CaP-NPs zu verdeutlichen. Auf diesem Weg sollte ein variables Wirkstoffträgersystem geschaffen werden, um einen weitgefächerten Einsatz in medizinischen und biologischen Anwendungen zu schaffen. Ein weiterer Vorteil der Klick-Chemie ist, dass mit ihr eine Kopplung unter milden Temperaturen stattfinden und mit ihr in Wasser als Lösemittel gearbeitet werden kann. Durch die Varianz der Oberflächenbeladung der CaP-NPs mittels positiv und negativ geladener Polymere, konnte die Effektivität der Klick-Reaktion untersucht werden. Hierfür wurden die CaP-NPs nach der Stabilisierung mittels PEI oder CMC mit Azidgruppen funktionalisiert und mit Alkylgruppen-terminierten Liganden geklickt. Dabei hat sich gezeigt, dass das Anklicken nicht nur von Molekülen, sondern auch mittels ultrakleiner Gold-NPs erfolgreich war.

Die Arbeit kann somit in vier Gruppen unterteilt werden in denen verschiedene fluoreszenzmarkierte Biomoleküle sowie Gold-NPs an die CaP-NPs geklickt wurden. Als Biomoleküle wurden fluoreszenzmarkiertes **1)** Env, **2)** Hämoglobin sowie **3)** BSA mit gleichzeitiger Farbstoff-Zugabe zur Klick-Reaktion gegeben. Zur letzten Gruppe wurden **4)** fluoreszenzmarkierte Au-NPs eingesetzt.

Bei der Erforschung eines geeigneten HIV-Impfstoffes wurden drei verschiedene Partikelarten synthetisiert, um eine zusätzliche Immunantwort von unterschiedlichen Zelltypen hervorzurufen. Dabei wurden neben der Synthese von CaP-NPs mit Peptiden, Adjuvanten im Inneren und spezifischen Antikörpern auf der Oberfläche (*T-CaPs*), Env-Moleküle spezifisch (Klick-Chemie, CaP/PEI/SiO₂-N₃) und unspezifisch (Sulfo-SMCC, CaP/PEI/SiO₂-SH) an die CaP-Nanopartikeloberfläche gebunden (*B-CaPs*). Anschließend wurden VLP's des HP-Virus mit einer CaP- und Silica-Schale ummantelt und im nächsten Schritt mittels Klick-Chemie mit dem fluoreszierenden Hüll-Glycoprotein Env geklickt (*Viro-CaPs*). Es hat sich durchgehend gezeigt, dass der hydrodynamische Durchmesser anhand der Anzahlverteilung nach der Klick-Reaktion größer gewesen ist als vor der Reaktion mit den entsprechenden Env-Molekülen. Diese Größenzunahme und die Zunahme des PDI weist auf ein erfolgreiches Anklicken hin. Das polydisperse System, welches mit dem PDI größer 0,3 angezeigt wurde, konnte auch an den STEM-Aufnahmen bestätigt werden, in welchen ein

gewisser Agglomerationsgrad der NPs beobachtet werden konnte. Für die Ermittlung der Größenverteilung des anorganischen Durchmessers der CaP-NPs wurden 50 Partikel vermessen. Diese Vermessungen spiegelten eine heterogene Größenverteilung wider. Dennoch konnte durch die Messungen des Zeta-Potentials ($> \pm 12$ mV) und die monomodale Größenverteilungen in den DLS-Messungen auf stabile NPs geschlossen werden. Mittels EDX-Mappings konnte die erfolgreiche Beschichtung der VL-Partikel bestätigt werden. Durch die UV-Vis-Messungen konnte neben der Farbstoff-Konzentration (AF647 $\rightarrow \lambda = 647$ nm und AF488 $\rightarrow \lambda = 488$ nm) auch die Konzentration an Protein ($\lambda = 280$ nm) gemessen und für die Berechnungen der Env-Anzahl pro CaP-NPs eingesetzt werden. Anhand von CLSM-Aufnahmen konnten die beschichteten VLP's mit geklickten Env-Molekülen im intrazellulären Raum bestätigt werden. Dies wäre ein großer Vorteil für die Entwicklung einer neuen Impfstoffplattform gegen den HI-Virus.

Bei der Modifizierung der CaP-Nanopartikeloberfläche mit fluoreszierenden Hämoglobin-Molekülen hat sich gezeigt, dass die Ladung der vorherigen Polymerstabilisierung ausschlaggebend für die Beladung ist. Aus den zusammenfassenden Tabellen in den Kapiteln konnte gezeigt werden, dass eine positive Ladung der CaP-NPs die Klick-Reaktion der Hämoglobin-Moleküle begünstigt. Dies konnte an spektroskopischen Vermessungen bestätigt werden, bei welchen die Anzahl des AF647-Farbstoff-Moleküls durchschnittlich zwischen 3,2 (PEI-stabilisiert) und 3,0 (CMC-stabilisiert) bei einem Hämoglobin-Molekül liegt.

Mit Hilfe der UV-Vis-Auftragung konnte eine Konkurrenzreaktion zwischen den größeren BSA-AF647-Molekülen und kleineren AF488-Farbstoff-Molekülen beobachtet werden, denn trotz der gleichbleibenden Zugabe der BSA-Moleküle, aber steigender Farbstoffkonzentration, konnte mehr AF488-Farbstoff detektiert werden. Gleiche Beobachtungen konnten auch hier, wie bei dem Klicken der Hämoglobin-Moleküle bei einer negativ geladenen CaP-Nanopartikeloberfläche gemacht werden. Bei einer PEI-Stabilisierung konnten im Schnitt 42-Mal so viele BSA-Moleküle angebracht werden als bei den CMC-stabilisierten. Dies kann vor allem mit dem Isoelektrischen Punkt von BSA (ca. 4,5)^[210] erklärt werden, an welchem es somit zu einer Abstoßung der CaP-Oberfläche und dem Molekül kommt.

Die Beladung der ultrakleinen Gold-NPs mit AF647-Farbstoff-Molekülen betrug zwischen 2,2 und 2,4. Sokolova *et al.* publizierten in ihrer Arbeit, dass unter der

herkömmlichen Funktionalisierungsreaktion bis zu 18 AF647-Moleküle auf der Gold-Nanopartikeloberfläche angebunden werden können.^[211] In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur ein Drittel der Konzentration des AF647-Farbstoffes zum Anklicken an die Gold-NPs angewendet, um nicht alle funktionellen Gruppen zu besetzen. Ein weiterer Unterschied ist auch, dass die resultierenden Au-AF647-NPs zur weiteren Reaktion mit den CaP-NPs eingesetzt wurden.

Eine weitere Bestätigung der erfolgreichen Anbindung der unterschiedlichen fluoreszierenden Moleküle bzw. Gold-NPs war die Fluoreszenzspektroskopie sowie die Fluoreszenzmikroskopie. Wie anfangs erwähnt, dienten die verschiedenen funktionalisierten CaP-NPs als Wirkstoffträger für die Moleküle auf deren Oberfläche, in den Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h und mehreren Waschschritten vor der Mikroskopie, konnte die Fluoreszenz der markierten Moleküle im Zytosol aufgenommen werden. Mittels CLSM-Untersuchungen und z-Schnitten konnten anschließend die CaP-NPs-Systeme in den HeLa-Zellen lokalisiert werden. So wurde bestätigt, dass sich die fluoreszierenden Molekül-beladenen CaP-NPs nicht auf der Zellmembran, sondern intrazellulär anzutreffen sind. Anhand der Zelluntersuchungen konnte zusätzlich die Stabilität der funktionalisierten CaP-Nanopartikelsysteme in *in vitro*-Untersuchungen bewiesen werden, da die Moleküle auf der Oberfläche der CaP-NPs geklickt waren und somit in die Zellen aufgenommen wurden. In der Literatur wird berichtet, dass Moleküle ohne die CaP-NPs als Wirkstoffträger nicht von Zellen aufgenommen werden und somit auch keine Fluoreszenz im intrazellulären Raum beobachtet werden kann.^[212] Trotz leichter Agglomerationen an der Zellmembran konnte der Großteil der CaP-NPs im Zytosol detektiert werden. Mittels zusätzlicher MTT-Analysen konnte bewiesen werden, dass die unterschiedlich funktionalisierten CaP-NPs nicht toxisch sind und eine hohe Zellviabilität nach 24 h Inkubation (85 - 91%) bestätigt werden konnte. Unter anderem hat sich auch gezeigt, dass die PEI-stabilisierten CaP-NPs eine höhere Zellviabilität aufweisen, als die CMC-stabilisierten. Dies kann aus der moderaten Zytotoxizität der stabilisierenden Polymere resultieren.^[213] Aus den MTT-Tests lässt sich ebenfalls erkennen, dass die unterschiedliche Beladung mit Molekülen bzw. Gold-NPs auf den CaP-NPs keinen Einfluss auf die Zellviabilität ausübt.

Summary

The aim of the present work was to illustrate the versatility of click chemistry using different surface modifications on CaP-NPs. In this way, a variable drug carrier system should be created in order to create a wide range of uses in medical and biological applications. Another advantage of click chemistry is that a coupling can take place under mild temperatures and in water as solvent. By varying the surface loading of the CaP-NPs using positively and negatively charged polymers, the efficacy of the click reaction could be studied. For this purpose, the CaP-NPs were functionalized with azide groups after stabilization with PEI or CMC and clicked with alkyne group-terminated ligands. It was shown that the clicking was successful not only of molecules but also of ultrasmall gold-NPs.

The work can be divided into four groups in which different fluorescently labelled biomolecules as well as gold-NPs were clicked onto the CaP-NP surface.

As biomolecules, fluorescently labelled **1)** Env, **2)** hemoglobin as well as **3)** BSA with simultaneous dye addition were added to the click reaction. For the last group, **4)** fluorescently labelled Au-NPs were used.

In research of a suitable HIV vaccine, three different types of particles were synthesized to elicit an additional immune response from different cell types of the immune system. In addition to synthesizing CaP-NPs with peptides, adjuvants inside and specific antibodies on the surface (*T-CaPs*), Env molecules were specifically (click chemistry, CaP/PEI/SiO₂-N₃) and non-specifically (Sulfo-SMCC, CaP/PEI/SiO₂-SH) bound to the CaP nanoparticle surface (*B-CaPs*). Finally, VLP's of the HP-virus were coated with a CaP and silica shell and in the next step clicked with the fluorescent envelope protein Env using click chemistry (*Viro-CaPs*). It was consistently shown that the hydrodynamic diameter based on the number distribution was larger after the click reaction than before the reaction with the corresponding Env molecules. This increase in size and the increase in PDI indicates a successful clicking process. The polydisperse system indicated with the PDI greater than 0.3 could also be confirmed on the STEM images, where a certain degree of agglomeration of the NPs could be observed. For the determination of the size distribution of the inorganic diameter of the CaP-NPs, 50 particles were measured. These measurements reflected a

heterogeneous size distribution. Nevertheless, the measurements of the zeta potential ($> \pm 12$ mV) and the monomodal size distributions in the DLS measurements led to the conclusion that the NPs were stable. By means of EDX mappings, the successful coating of the VLP particles could be confirmed. By UV-Vis-measurements, not only the dye concentration (AF647 $\rightarrow \lambda = 647$ nm and AF488 $\rightarrow \lambda = 488$ nm) but also the concentration of protein ($\lambda = 280$ nm) could be measured and used for the calculations of the Env number per CaP-NPs. Based on CLSM images, the coated VLP's could be confirmed with clicked Env-molecules in the intracellular space. This would be a great advantage for the development of a new vaccine platform against HIV.

When modifying the CaP-NP surface with fluorescent hemoglobin molecules, it has been shown that the charge of the previous polymer stabilization is crucial for the loading. Based on the summarized evaluation of the tables in the chapters, it could be shown that a positive charge of the CaP-NPs favors the click reaction of the hemoglobin molecules. This could be confirmed on spectroscopic measurements, where the number of AF647-dye-molecule is on average between 3.2 (PEI-stabilized) and 3.0 (CMC-stabilized) for one hemoglobin molecule.

Using UV-Vis-application, a competitive reaction between the larger BSA-AF647-molecules and smaller AF488-dye-molecules could be observed, as more AF488-dye could be detected despite the constant addition of the BSA-molecules but increasing dye concentration. The same observations could be made here as with the clicking of the hemoglobin-molecules with a negatively charged CaP nanoparticle surface. In the case of PEI stabilization, on average 42 times as many BSA-molecules could be attached as in the case of CMC-stabilized ones. This can be explained mainly by the isoelectric point of BSA (about 4.5),^[210] where repulsion of the CaP surface and the molecules thus occurs.

The loading of the ultras-small gold NPs with AF647-dye-molecules was between 2.2 and 2.4. Sokolova *et al.* published in their work that under the conventional functionalization reaction up to 18 AF647-molecules can be attached on the gold nanoparticle surface.^[211] In the present work however, only one-third of the concentration of AF647-dye was applied to click on the gold-NPs in order not to occupy all functional groups. Another difference is also that the resulting Au-AF647-NPs were used for further reaction with the CaP-NPs.

Further confirmation of the successful binding of the different fluorescent molecules or gold-NPs was provided by fluorescence spectroscopy as well as fluorescence microscopy. As mentioned at the beginning, the different functionalized CaP-NPs served as drug delivery systems for the molecules and NPs on their surface in the cells. After an incubation period of 24 h and several washing steps before microscopy, the fluorescence of the labelled molecules in cytosol could be recorded. By means of CLSM examinations and z-stacks, the CaP-NPs systems could then be localized in the HeLa cells. This confirmed that the fluorescent molecule-loaded CaP-NPs are not found on the cell membrane but intracellularly. Based on the cell investigations, the stability of the functionalized CaP-NP systems was additionally proven in *in vitro*-investigations that the molecules were clicked onto the surface of the CaP-NPs and were thus taken up into the cells. The literature reports that molecules alone, without the CaP-NPs as drug carriers, are not taken up by cells and thus no fluorescence can be observed in the intracellular space.^[212] Despite slight agglomerations on the cell membrane, the majority of the CaP-NPs could be detected in the cytosol. By means of additional MTT analyses, it could be proven that the differently functionalized CaP-NPs are not toxic and a high cell viability after 24 h incubation (85 - 91%) could be confirmed. Among other things, it was also shown that the PEI-stabilized CaP-NPs have a higher cell viability than the CMC-stabilized ones. This may be due to the moderate cytotoxicity of the stabilizing polymers.^[213] The MTT tests also show that the different loading of molecules or gold NPs on the CaP-NPs has no influence on cell viability.

Literaturverzeichnis

- [1] T.L. Doane and C. Burda, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2885-2911.
- [2] W.J. Stark, *Angew. Chem.*, **2011**, 50, 1242-1258.
- [3] B.Y.S. Kim, J. T. Rutka and W. C. W. Chan, *New England J. Med.*, **2010**, 363, 2434-2443.
- [4] K. Riehemann, S.W. Schneider, T.A. Luger, B. Godin, M. Ferrari and H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 872-897.
- [5] L. Agüero, D. Zaldivar-Silva, L. Pena and M.L. Dias, *Carbohydr. Polym.*, **2017**, 168, 32-43.
- [6] S. Amidon, J.E. Brown and V.S. Dave, *Aaps. Pharm. Sci. Tech*, **2015**, 16, 731-741.
- [7] F. Zhang, *Aaps. Pharm. Sci. Tech.*, **2016**, 17, 56-67.
- [8] E. Moghimipour, F.A. Dorkoosh, M. Rezaei, M. Kouchak, J. Fatahiasi, K.A. Angali, Z. Ramezani, M. Amini and S. Handali, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2018**, 43, 50-56.
- [9] F. Liu, R. Lizio, C. Meier, H.U. Peterleit, P. Blakey and A.W. Basit, *J. Control. Release*, **2009**, 133, 119-124.
- [10] A.E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson, *Nature Mater.*, **2009**, 8, 543-557.
- [11] S. Mitragotri and J. Lahann, *Nature Mater.*, **2009**, 8, 15-23.
- [12] S.M. Dizaj, S. Jafari and A.Y. Khosroushahi, *Nanoscale Res. Lett.*, **2014**, 9, 9.
- [13] M.A. Mintzer and E.E. Simanek, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 259-302.
- [14] A. Kovtun, R. Heumann and M. Epple, *Biomed. Mater. Eng.*, **2009**, 19, 241-247.
- [15] D. Tang, M. DeVit and S.A. Johnston, *Nature*, **1992**, 356, 152-154.
- [16] www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2022/08_2022.
Aufgerufen am 04.04.2023.
- [17] F. Wang, Y.C. Wang, S. Dou, M.H. Xiong, T.M. Sun and J. Wang, *ACS Nano.*, **2011**, 5, 3679-3692.

- [18] S.D. Brown, P. Nativo, J.A. Smith, D. Stirling, P.R. Edwards, B. Venugopal, D.J. Flint, J.A. Plumb, D. Graham and N.J. Wheate, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 4678-4684.
- [19] V. Sokolova, T. Knuschke, J. Buer, A.M. Westendorf and M. Epple, *Acta Biomat.*, **2011**, 7, 4029-4036.
- [20] D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A.M. Westendorf and M. Epple, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 396-404.
- [21] L. Rojas-Sánchez, E. Zhang, V. Sokolova, M. Zhong, H. Yan, M. Lu, Q. Huimin Yan and M. Epple, *Acta Biomat.*, **2020**, 110, 254-265.
- [22] H.C. Kolb, M.G. Finn and K.B. Sharpless, *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 2056-2075.
- [23] C.D. Hein, X. Liu and D. Wang, *Pharm. Res.*, **2008**, 25, 2216-2230.
- [24] M. Mammen, S.K. Choi and G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2754-2794.
- [25] P.I. Kitov, D.R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16271-16284.
- [26] S. Hong, P.R. Leroueil, I.J. Majoros, B.G. Orr, J.R. Baker and M.M. Banaszak Holl, *Chem. Biol.*, **2007**, 14, 107-115.
- [27] M. Kopp, S. Kollenda and M. Epple, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50, 1383-1390.
- [28] Q. Liu, S. Huang, J.P. Matinlinna, Z. Chen and H. Pan, *BioMed Research Int.*, **2013**, 2314-6133.
- [29] D.M. Dykxhoorn. and J. Lieberman, *Annu. Rev. Med.*, **2005**, 56, 401-423.
- [30] G. Sahay, D.Y. Alakhova and A.V. Kabanov, *J. Control. Release*, **2010**, 145, 182-195.
- [31] V. Sokolova, G. Nzou, S.B van der Meer, T. Ruks, M. Heggen, K. Loza, N. Hagemann, F. Murke, B. Giebel, D.M Hermann, A.J Atala and M. Epple, *Acta biomat.*, **2020**, 111, 349-362.
- [32] A. Leifert, Y.P. Bartnek, U. Simon and W. Jahnen-Dechent, *Nanoscale*, **2013**, 5, 6224-6242.
- [33] G. Schmid, W.G. Kreyling and U. Simon, *Arch. Toxicol.*, **2017**, 91, 3011-3037.
- [34] T. Cosgrove, *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*; Wiley, **2010**.

- [35] H.D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*; Springer, **2002**.
- [36] E. Riedel and C. Janiak, *Anorganische Chemie*; de Gruyter, **2007**.
- [37] E.C. Lancho, *Dissertation*, Universität Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, **2006**.
- [38] X. Han, K. Xu, O. Taratula and K. Farsad, *Nanoscale*, **2019**, 11, 799-819.
- [39] H.D. Duffus, H. John, M. Nordberg and M.D. Templeton, *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79, 1153.
- [40] A.D. McNaught and A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Terminology*; Blackwell Science, **1997**.
- [41] D.H. Everett, *Pure Appl. Chem.*, **1972**, 577.
- [42] E. Katz and I. Willner, *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 6166-6235.
- [43] T. Hofmann, *Chemie Unserer Zeit*, **2004**, 38, 24-35.
- [44] G. Schmid, *Nanoparticles: from theory to application*; John Wiley & Sons, **2011**.
- [45] M.A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 257-264.
- [46] G. Mie, *Contributions to the optics of turbid media*, **1976**, 25, 377-445.
- [47] L.N. Lewis, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2693-2730.
- [48] M. Kopp, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2018**.
- [49] S.B. van der Meer, K. Loza, K. Wey, M. Heggen, C. Beuck, P. Bayer and M. Epple, *Langmuir*, **2019**, 35, 7191-7204.
- [50] V. Sokolova and M. Epple, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 7471.
- [51] S.V. Dorozhkin and M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3130-3146.
- [52] S.V. Dorozhkin and M. Epple, *Angew. Chem.*, **2002**, 41, 114.
- [53] K. Byrappa, *Handbook of hydrothermal technology*; William Andrew, **2013**.
- [54] M. Roesgen, *Unfallchirurgie*, **1990**, 16, 258-265.
- [55] F.U. Niethard, *Knochenaufbau und -funktion*; Thieme, **2014**.
- [56] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*; Springer, **2013**.
- [57] B.K.B. Berkovitz, *The teeth of mammalian vertebrates*; Elsevier, **2018**.
- [58] V. Sokolova and M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 1382-1395.
- [59] Y. Su, I. Cockerill, Y. Zheng, L. Tang, Y.X. Qin and D. Zhu, *Bioact. Mater.* **2019**, 20, 196-206.

- [60] A.C. Ionescu, L. Degli Esposti, M. Iafisco and E. Brambilla, *Sci. Rep.*, **2022**, 12, 5994.
- [61] T.F. Tadros, *Nanodispersions*; De Gruyter, **2016**.
- [62] S.D.R. Carmen, M.S. Ricardo, A.C.C. Sónia, F.J. Maldonado-Hódar and M.M. Wastewater, *Catalysts*, **2019**, 9.
- [63] S. Verma, R. Gokhale and D.J. Burgess, *Int. J. Pharm.*, **2009**, 380, 216-222.
- [64] B.K. Teo and X. Sun, *J. Clust. Sci.*, **2006**, 17, 529-540.
- [65] C. O'Dwyer, M. Szachowicz, G. Visimberga, V. Layayen, S.B. Newcomb and C.M. Sotomayor Torres, *Nat. Nanotechnol.*, **2009**, 4, 239-244.
- [66] T.F. Tadros, *Nanodispersions*; De Gruyter, **2016**.
- [67] S.A. Rosenberg, P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R.A. Morgan, R. Moen, E.M. Karson, M.T. Lotze, J.C. Yang, S.L. Topalian, M.J. Merino, K. Culver, A.D. Miller, R.M. Blaese and W.F. Anderson, *New Engl. J. Med.*, **1990**, 323, 570-578.
- [68] J.M. Wilson, *Hum. Gene Ther.*, **2005**, 16, 1014-1015.
- [69] E.S. Stroes, M.C. Nierman, J.J. Meulenberg, R. Franssen, J. Twisk, C.P. Henny, M.M. Maas, A.H. Zwinderman, C. Ross, E. Aronica, K.A. High, M.M. Levi, M.R. Hayden, J.J. Kastelein and J.A. Kuivenhoven, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, **2008**, 28, 2303-2304.
- [70] R.A. Freitas, *Nanomedicine*; S. Karger AG, **2004**.
- [71] R.A. Freitas, *Nanomedicine*, **2005**, 1, 2-9.
- [72] Y. Huang and J.E. Pemberton, *Physicochem. Eng. Asp.*, **2010**, 360, 175-183.
- [73] S. Jendrzej, B. Gökce, M. Epple and S. Barcikowski, *ChemPhysChem*, **2017**, 18, 1012-1019.
- [74] U. Schubert and N. Hüsing, *Synthesis of Inorganic Materials*; Wiley-VCH, **2019**.
- [75] W.V. Rybinski, *Konzentration auf das wesentliche: Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer, **2002**.
- [76] G.J. Lauth, *Thermodynamik: Eine Einführung*; Springer, **2015**.
- [77] R.H. Yoon and L. Wang, *Hydrophobic forces in thin aqueous films and their role in film thinning*; Elsevier, **2005**.

- [78] A. Fernández-Nieves, A. Fernández-Berbero, B. Vincent and F.J. de las Nieves, *Langmuir*, **2001**, 17, 1841-1846.
- [79] T. Cosgrove, *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*; Wiley, **2010**.
- [80] J.G. Lauth and J. Kowalczyk, *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*; Springer, **2016**.
- [81] D. Mahl, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2011**.
- [82] H.D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*; Springer, **2002**.
- [83] R.J. Hunter, *Zeta potential in colloid science: principles and applications*; Academic Press, **1988**.
- [84] W. Sun, Q. Zeng and A. Yu, *Langmuir*, **2013**, 29, 2175-2184.
- [85] R. Ranganathan, S. Madanmohan, A. Kesavan, G. Baskar, Y.R. Krishnamoorthy, R. Santosham, D. Ponraju, S.K. Rayala and G. Venkatraman, *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, 7, 1043-1060.
- [86] T.M.A. Cullis, *Science*, **2004**, 303, 1818-1822.
- [87] K.S. Chu, W. Hasan, S. Rawal, M.D. Walsh, E.M. Enlow, J.C. Luft, A.S. Bridges, J.L. Kuijter, M.E. Napier, W.C. Zamboni and J.M. DeSimone, *Nanomedicine*, **2013**, 9, 686-693.
- [88] O.V. Salata, *J. Nanobiotechnology*, **2004**, 2, 1-6.
- [89] A.M. Morawski, P.M. Winter, K.C. Crowder, S.D. Caruthers, R.W. Fuhrhop, M.J. Scott, J.D. Robertson, D.R. Abendschein, G.M. Lanza, S.A. Wickline, *J. Int. Soc. Magn. Reson. Med.*, **2004**, 51, 480-486.
- [90] M. Nahrendorf, H. Zhang, S. Hembador, P. Panizzi, D.E. Sosnovik, E. Aikawa, P. Libby, F.K. Swirski and R. Weissleder, *Circulation*, **2008**, 117, 379.
- [91] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z.G. Chen and D.M. Shin, *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14, 1310-1316.
- [92] W. Poon, A. Heinmiller, X. Zhang and J.L. Nadeau, *J. Biomed. Opt.*, **2015**, 20, 1-8.
- [93] K. Huang, H. Ma, J. Liu, S. Huo, A. Kumar, T. Wei, X. Zhang, S. Jin, Y. Gan, P.C. Wang, S. He, X. Zhang, X.J. Liang, *ACS Nano.*, **2012**, 6, 4483-4493.
- [94] T.K. Kim, J.H. Eberwine, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397, 3173-3178.

- [95] S.A. Kollenda, J. Klose, T. Knuschke, V. Sokolova, J. Schmitz, M. Staniszewska, P.F. Costa, K. Herman, A.M. Westendorf, W.P. Fendler and M. Epple, *Acta Biomat.*, **2020**, 109, 244-253.
- [96] D.W. Grainger and D.G. Castner, *Adv. Mat.*, **2008**, 20, 867-877.
- [97] T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggård, S.C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse and K.A. Dawson, *Angew. Chem.*, **2007**, 119, 5856-5858.
- [98] C.D. Walkey, J.B. Olsen, F. Song, R. Liu, H. Guo, D.W.H. Olsen, Y. Cohen, A. Emili and W.C.W. Chan, *ACS Nano.*, **2014**, 8, 2439-2455.
- [99] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny and F. Delie, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, 69, 1-9.
- [100] Z.K. Nagy, A. Balogh, B. Vajna, A. Farkas, G. Patyi, À. Kramarics and G. Marosi, *J. Pharm. Sci.*, **2012**, 101, 322-332.
- [101] M. Seleci, D.A. Seleci, R. Jonczyk, F. Stahl, C. Blume and T. Scheper, *BioNanoMaterials*, **2016**, 17, 33.
- [102] P.Y. Aw Yong, P. Gan, A. Sasmita, S.T. Mak and A. Ling, *Int. J. Biomed. Biotechnol.*, **2018**, 7, 1-11.
- [103] F. Ridi, I. Meazzini, B. Castroflorio, M. Bonini, D. Berti and P. Baglioni, *Adv. Colloid and Interface Sci.*, **2017**, 244, 281-295.
- [104] J. Gruenberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **2001**, 2, 721-730.
- [105] A. Akinc and G. Battaglia, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, 5, a016980-a016980.
- [106] L.D. Esposti, F. Carella, A. Adamiano, A. Tampieri and M. Iafisco, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2018**, 44, 1223-1238.
- [107] G.J. Doherty and H.T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78, 857-902.
- [108] E. Pérez-Herrero and A. Fernández-Medarde, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2015**, 93, 52-79.
- [109] J. He, C. Li, L. Ding, Y. Huang, X. Yin, J. Zhang, C. Yao, M. Liang, R.P. Pirraco, J. Chen, Q. Lu, R. Baldrige, Y. Zhang, M. Wu, R.L. Reis and Y. Wang, *Adv. Mater.*, **2019**, 31, e1902409.
- [110] S. Chernousova and M. Epple, *Gene Ther.*, **2017**, 24, 282-289.
- [111] N. Bertrand and J.C. Leroux, *J. Control. Release*, **2012**, 161, 152-163.
- [112] S. Falcone, E. Cocucci, P. Podini, T. Kirchhausen, E. Clementi and J. Meldolesi, *J. Cell Sci.*, **2006**, 119, 4758-4769.

- [113] H.T. McMahon and E. Boucrot, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2011**, 12, 517-533.
- [114] M. Marsh and H.T. McMahon, *Science*, **1999**, 285, 215-220.
- [115] S.F.M. Van Dongen, W.P.R. Verdurmen, R.J.R. Peters, R.J.M. Nolte, R. Brock and J.C.M. Van Hest, *Angew. Chem.*, **2010**, 122.
- [116] S. Boe, A.S. Longva and E. Hovig, *Oligonucleotides*, **2008**, 18, 123-132.
- [117] I. Mellman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1996**, 12, 575-625.
- [118] S. Mukherjee, R.N. Ghosh and F.R. Maxfield, *Physiol. Rev.*, **1997**, 77, 759-803.
- [119] W. Stoorvogel, G.J. Strous, H.J. Geuze, V. Oorschot and A.L. Schwartz, *Cell*, **1991**, 65, 417-427.
- [120] H. Keiser, G. Weissmann and A.W. Bernheimer, *J. Cell. Biol.*, **1964**, 22, 101-113.
- [121] H. Xu and D. Ren, *Annu. Rev. Physiol.*, **2015**, 77, 57-80.
- [122] J. Gruenberg and F.R. Maxfield, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1995**, 7, 552-563.
- [123] J.P. Luzio, B.A. Rous, N.A. Bright, P.R. Pryor, B.M. Mullock and R.C. Piper, *J. Cell Sci.*, **2000**, 113, 1515-1524.
- [124] A. Futerman and G. van Meer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 5, 554-565.
- [125] S.D. Conner and S.L. Schmid, *Nature*, **2003**, 422, 37-44.
- [126] M.A. Dobrovolskaia and S.E. McNeil, *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2, 469.
- [127] C.K. Hartmuth, M.G. Finn and K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.
- [128] B.T. Worrell, J.A. Malik, V.V. Fokin, *Science*, **2013**, 340, 457-460.
- [129] J.E. Berlier, A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D.R. Gray, B.J. Filanoski, W.G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.Y. Cheung, W. Chang, J.D. Hirsch, J.M. Beechem, R.P. Haugland and R.P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.*, **2003**, 51, 1699-1712.
- [130] J.S. Choi and N. Meghani, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **2016**, 145, 653-661.
- [131] E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu and K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 1419-1440.
- [132] M.J. Hostetler, J.E. Wingate, C.J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M.R. Clark, J.D. Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans and R.W. Murray, *Langmuir*, **1998**, 14, 17-30.

- [133] A.G. Kanaras, F.S. Kamounah, K. Schaumburg, C.J. Kiely and M. Brust, *Chem. Commun.*, **2002**, 2294-2295.
- [134] Y. Negishi, K. Nobusada and T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5261-5270.
- [135] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533-3539.
- [136] R.J. Ouellette and J.D. Rawn, *Structure and Bonding in Organic Compounds*; Academic Press, **2018**.
- [137] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo and G.M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1103-1170.
- [138] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy and M.A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2740-2779.
- [139] P.H. Raven and G. B. Johnson, *Biology*; Mcgraw-Hill College, **2001**.
- [140] J. Parkin and B. Cohen, *Lancet*, **2001**, 357, 1777–1789.
- [141] T. W. Mak and M.E. Saunders, *Primer to the immune response*; Academic Press, **2008**.
- [142] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli, *Lab. Invest.*, **2000**, 80, 617–53.
- [143] G. Pier, J. Lyczak and L. Wetzler, *Immunology, Infection, and Immunity*; ASM Press, **2004**.
- [144] R. Weiss, *Science*, **1993**, 260, 1273-1279.
- [145] S.E. Luria, M. Delbrück, *Genetics*, **1943**, 28, 491-511.
- [146] W. Jaeger, G. Darai, H.W. Doerr, H.W. Zentgraf and K. Munk, *Acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC)*; Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, **1978**.
- [147] D.V. Havlir and D.D. Richman, *Ann. Intern. Med.*, **1996**, 124, 984-994.
- [148] P.G. Schultz, *Angew. Chem.*, **1989**, 101.
- [149] A. Sheik, M. Al-Shamisi and W. Morrow, *Curr. Opin. Molec. Therapeut.*, **2000**, 2, 37–54.
- [150] P. Verdijk, N.Y. Rots, M.G. van Oijen, M.S. Oberste, C.J. Boog, H. Okayasu, R.W. Sutter and W.A. Bakker, *Vaccine*, **2013**, 31, 5531–5536.
- [151] P. Riese, K. Schulze, T. Ebensen, B. Prochnow and C.A. Guzman, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2013**, 13, 2562–2580.

- [152] D. Buchhold, *Ein Beitrag zu Darstellung komplexer nanoskaliger Cyanide und Oxide sowie nanoskaliger Hohlkugeln in w/o-Mikroemulsionen*; Nanostructured materials, **2007**.
- [153] E.A. Ring and N. De Jonge, *Microsc. Microanal.*, **2010**, 16, 622.
- [154] K.J. Augsten, R. Ohnsorge and R. Holm, *Rasterelektronenmikroskopie—Eine Einführung für Mediziner und Biologen*; Georg Thieme-Verlag, **1978**.
- [155] R. Schill and N. Ehler, *Biol. unserer Zeit*, **1972**, 2.
- [156] H. Michael, *Rasterelektronenmikroskop*; Nanobiotechnologie, **2009**.
- [157] G. Joseph, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis, a text for biologists, materials scientists and geologists*; Springer Verlag, **1981**.
- [158] D.K. Carpenter, *J. Chem. Educ.*, **1977**, 54, a430.
- [159] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E.A. Kubareva, E.A. Romanova, T.S. Oretskaya, R. Heumann and M. Eppler, *J. Mater. Chem.*, **2007**, 17, 721-727.
- [160] L. Mrkvicková, B. Porsch and O.L. Sundelöf, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1995**, 58.
- [161] D. Coglitore, S.P. Edwardson, P. Macko, E.A. Patterson and M. Whelan, *Royal Soc. Open Sci.*, **2017**, 4.
- [162] J. Eichler, H.J. Eichler, *Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*; Springer, **2010**.
- [163] H. Krieger, *Strahlungsquellen für Technik und Medizin*; Springer Fachmedien, **2013**.
- [164] L. Chen, J.M. McCrate, J.C. Lee and H. Li, *Nanotechnol.*, **2011**, 22, 105708.
- [165] A. Einstein, *Untersuchungen über die Theorie der Brownschen Molekularbewegung*; Thun, **1997**.
- [166] N. Comfort, K. Cai, T.R. Bloomquist, M.D. Strait, A.W. Ferrante Jr and A.A. Baccarelli, *J. Vis. Exp.*, **2021**, 169, 10.3791-62447.
- [167] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie : Eine Einführung, Springer Spektrum*; **2014**.
- [168] B. Welz, *Atomic absorption spectrometry*; Wiley-VCH, **1999**.
- [169] G. Schwedt, T.C. Schmidt and O.J. Schmitz, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*; Wiley, **2016**.
- [170] D. Calloway, *J. Chem. Educ.*, **1997**, 74.

- [171] H. Günzler and H.U. Gremlich, *IR-Spektroskopie : eine Einführung*; Wiley-VCH, **2003**.
- [172] G. Kemmer, *Infrarot-Spektroskopie: Grundlagen, Anwendung, Methoden*; Franckh, **1969**.
- [173] G. Müller and E. Schröder, *Acta Polym.*, **1980**, 31.
- [174] H.H. Perkampus, *UV-Vis-Spektroskopie und ihre Anwendungen*; Springer, **1986**.
- [175] P. Skrabal, *Spektroskopie: eine methodenübergreifende Darstellung vom UV- bis zum NMR-Bereich*; VDF-Hochschulverlag, **2009**.
- [176] Aprentas, *Laborpraxis: Analytische Methoden*; Springer: Cham, **2017**.
- [177] H. Michael, *Dissertation*, Universität Konstanz, **2009**.
- [178] E. Pretsch, P. Bühlmann and M. Badertscher, *UV/Vis-Spektroskopie*; Springer, **2010**.
- [179] P.W. Atkins, C.A. Trapp, J. De Paula and C. Giunta, *Physikalische Chemie*; Wiley-VCH, **2013**.
- [180] M. Jochen, *Fluoreszenz-Radiochemie, Elektrochemie, Photochemie, Analytische Biotechnologie*; Springer, **2008**.
- [181] M. Krumrey, R. Garcia-Diez, C. Gollwitzer and S. Langner, *PTB-Mitteilungen*, **2014**, 4, 13-16.
- [182] M. Hof, V. Fidler and R. Hutterer, *Fluorescence Spectroscopy in Biology: Advanced Methods and their Applications to Membranes, Proteins, DNA, and Cells*; Springer, **2005**.
- [183] J.W. Lichtman and J.A. Conchello, *Nat. Methods*, **2005**, 2, 910-919.
- [184] D. Scott, S.E. Harding, A. Rowe, I. Laidlaw and M. Steinmetz, *Analytical ultracentrifugation: techniques and methods*; Royal Soc. Open Sci., **2005**.
- [185] C. Instruments, *Handbuch CPS-Scheibenzentrifuge*; Universität Duisburg-Essen, **2022**.
- [186] D. Scott, S.E. Harding, A. Rowe, I. Laidlaw and M. Steinmetz, *Analytical ultracentrifugation: Techniques and methods*; Royal Soc. Open Sci., **2005**.
- [187] U. Busch, *Fortschritte der physikalischen Röntgenforschung bis 1915*; Springer Spektrum, **2020**.
- [188] P. Scherrer, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Phys. Kl.*, **1918**, 2, 98.
- [189] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*; Teubner, **2007**.

- [190] R. Allmann, *Röntgenpulverdiffraktometrie*; Springer, **2003**.
- [191] V.K. Pecharsky and P.Y. Zavalij, *Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials*; Springer, **2003**.
- [192] P. Scherrer, *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Mathematisch-Physikalische Klasse*; Wiley, **1918**.
- [193] R.T. Borlinghaus, *Konfokale Mikroskopie in Weiß: Optische Schnitte in allen Farben*; Springer, **2016**.
- [194] R.H. Webb, *Rep. Prog. Phys.*, **1996**, 59, 427.
- [195] Y. When, X. Zhang, M. Chen, Z. Wu and Z. Wang, *J. Water Reuse Desal.*, **2019**, 9.
- [196] J.W. Snowman, *Downstream Processes: Equipment and Techniques*; Alan R. Liss, Inc., **1988**.
- [197] W. Stöber, A. Fink and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, , **1968**, 26, 62–69.
- [198] N. Green, H. Alexander, A. Olson, S. Alexander, T.M. Shinnick, J.G. Sutcliffe and R.A. Lerner, *Cell*, **1982**, 28, 477–487.
- [199] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin and C. Kiely, *J. Chem. Soc., Chem. commun.*, **1995**, 16, 1655-1656.
- [200] K. Klein, K. Loza, M. Heggen and M. Epple, *ChemNanoMat.*, **2021**, 7, 1330.
- [201] S.B. van der Meer, K. Loza, K. Wey, M. Heggen, C. Beuck, P. Bayer and M. Epple, *Langmuir*, **2019**, 35, 7191-7204.
- [202] L.P. Fernando, P.K. Kandel, J. Yu, J. McNeill; P. Ackroyd and K. Christensen, *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 2675-2682.
- [203] I. Carrico, B. Carlson and C.R. Bertozzi, *Nat.Chem.Biol.*, **2007**, 3, 321–322.
- [204] E.M. Sletten and C.R. Bertozzi, *Angew.Chem.*, **2009**, 48, 6974–6998.
- [205] D. Damm, K. Kostka, C. Weingärtner, J.T. Wagner, L. Rojas-Sánchez, S. Gensberger-Reigl, V. Sokolova, K. Überla, M. Epple and V. Temchura, *Acta Biomater.*, **2022**, 140, 586-600.
- [206] A. Paul, C.J. Eun and J.M. Song, *Polymer*, **2014**, 55, 5178–5188.
- [207] Z. Wu, J. Suhan and R. Jin, *J. Mat. Chem.*, **2009**, 19, 622-626.
- [208] C. Zhou, C. Sun, M. Yu, Y. Qin, J. Wang, M. Kim and J. Zheng, *J. Phys. Chem. C.*, **2010**, 114, 7727-7732.
- [209] V. Sokolova, G. Mekky, S.B. van der Meer, M.C. Seeds, A.J. Atala and M. Epple, *Sci. Rep.*, **2020**, 10, 18033.

- [210] H.T. Phan, S. Bartelt-Hunt, K.B. Rodenhausen, M. Schubert and J.C. Bartz, *PLoS One*, **2015**, 10, e0141282.
- [211] V. Sokolova, J.F. Ebel, S. Kollenda, K. Klein, B. Kruse, C. Veltkamp, C.M. Lange, A.M. Westendorf and M. Epple, *Small*, **2022**, 18, 2201167.
- [212] V. Sokolova and M. Epple, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 7471.
- [213] L. Parhamifar, A.K. Larsen, A.C. Hunter, T.L. Andresen and S.M. Moghimi, *Soft. Mat.*, **2010**, 6, 4001–4009.

Publikationsliste

V. Sokolova, K. Kostka, K.T. Shalumon, O. Prymak, J.P. Chen, M. Epple. „Synthesis and characterization of PLGA/HAP scaffolds with DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering” (2020). *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 31: 102.

S. Hosseini, O. Wetzel, K. Kostka, M. Heggen, K. Loza, M. Epple. „Pathways for Oral and Rectal Delivery of Gold Nanoparticles (1.7 nm) and Gold Nanoclusters into the Colon: Enteric-Coated Capsules and Suppositories” (2021). *Molecules*, 26: 5069

D. Damm, K. Kostka, C. Weingärtner, J.T. Wagner, L. Rojas-Sánchez, S. Gensberger-Reigl, V. Sokolova, K. Überla, M. Epple, V. Temchura. „Covalent coupling of HIV-1 glycoprotein trimers to biodegradable calcium phosphate nanoparticles via genetically encoded aldehyde-tags” (2022). *Acta Biomater.*, 140: 586-600.

K. Kostka, B. Kruse, C. Fischer, M. Epple. „Ein Rumtopf chemisch betrachtet“ (2022). *Chem. Unserer Zeit*, 56: 378-383.

F. Machla, V. Sokolova, V. Platania, O. Prymak, K. Kostka, B. Kruse, M. Agrymakis, S. Pasadaki, A. Kritis, K. Alpantaki, M. Vidaki, M. Chatzinikolaidou, M. Epple, A. Bakopoulou. „Tissue engineering at the dentin-pulp interface using human treated dentin scaffolds conditioned with DMP1 or BMP2 plasmid DNA-carrying calcium phosphate nanoparticles” (2023). *Acta Biomater.*, 159: 156-172.

N. Imangali, V. Sokolova, K. Kostka, M. Epple, C. Winkler. „Functionalized calcium phosphate nanoparticles to direct osteoprotegerin to bone lesion sites in a medaka (*Oryzias latipes*) osteoporosis model” (2023). *Front. Endocrinol.*, 14: 1101758.

K. Kostka, S. Hosseini, M. Epple. „*In vitro*-cell responses to strontium/magnesium-doped calcium phosphate nanoparticles” (2023). *Micro*, 3: 156-171.

E. Smollich, E. Döbbeler, T. Müller–Geipel, L. Stratmann, C. Koch, V. Merkus, K. Kostka, D. V. Okhrimenko, M. Solvang, M. Nachev, S. Zimmermann, T. Schmidt, B. Sures. „Assessment of acute and chronic ecotoxicological effects of aqueous eluates of stone wool insulation materials” (2023). *Environ. Sci. Eur.*, 35: 24.

V. Sokolova, K. Kostka, A. El-Taibany, B. Kruse, D. Porada, N. Wolff, O. Prymak, M. C. Seeds, M. Epple, A. J. Atala. „Application of ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) functionalized with doxorubicin in healthy and glioblastoma 3D blood-brainbarrier organoid models” (2023). *Eingereicht an Adv. Mater. Interfaces*.

K. Kostka, M. Epple. „A systematic study on the surface functionalization of calcium phosphate nanoparticles by click chemistry: Attachment of dyes, proteins, and ultrasmall gold nanoparticles” (2023). *Chemistry*, 5: 1060-1076.

T. Tenkumo, B. Kruse, K. Kostka, V. Sokolova, T. Ogawa, N. Yoda, O. Prymak, O. Suzuki, K. Sasaki, M. Epple. „Development of triple-functionalized calcium phosphate nanoparticles to induce bone formation, vascularization and to inhibit inflammation as advanced drug delivery system” (2023). *Eingereicht an Acta Biomater*.

Vorträge und Posterbeiträge auf wissenschaftlichen Tagungen

31st Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Porto, Portugal, 05.-09.09.2021. S. Hosseini, K. Kostka, M. Epple. „*In vitro*-cell responses to strontium/magnesium-doped calcium phosphate nanoparticles.” (Poster)

2021 CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Brüssel, Belgien, 16.-18.09.2021. F. Machla, V. Sokolova, O. Prymak, K. Kostka, B. Kruse, V. Platania, M. Chatzinikolaidou, M. Epple, A. Bakopoulou. „Dentin regeneration by DMP-1/BMP-2-plasmid-modified nanoparticle-treated DPSCs on freeze-dried dentin scaffolds.” (Poster)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Stuttgart, Deutschland, 07.-09.10.2021. M. Epple, S. Kollenda, K. Klein, N. Wolff, B. Kruse, K. Kostka, V. Sokolova. „Ultrasmall gold nanoparticles as carriers of (bio-)molecules into cells into cells and across the blood-brain barrier.” (Vortrag)

7th Int'l Conference on Tissue Engineering in conjunction with the 5th International Conference on Regenerative Biomedical Materials, Ioannina, Griechenland, 26.-31.05.2022. F. Machla, V. Sokolova, V. Platania, O. Prymak, K. Kostka, B. Kruse, M. Chatzinikolaidou, M. Epple, A. Bakopoulou. „Dentin-pulp complex tissue engineering: a proposal for future dental clinical practice.” (Vortrag)

International Conference on Nanosciences and Nanotechnologies (NN22), Thessaloniki, Griechenland, 05.-08.07.2022. K. Kostka, M. Epple. „Calcium phosphate nanoparticles as transporters of proteins into cells.” (Vortrag)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Essen, Deutschland, 15.-17.09.2022. K. Kostka, M. Epple. „Calcium phosphate nanoparticles with attached proteins as drug delivery systems.“ (Poster)

2022 PER-IADR Oral Health Research Congress, Marseille, Frankreich, 15.-17.09.2022. F. Machla, V. Sokolova, V. Platania, O. Prymak, K. Kostka, B. Kruse, S. Pasadaki, K. Alpantaki, M. Vidaki, M. Chatzinikolaidou, M. Epple, A. Bakopoulou. „Dentin-pulp complex regeneration: towards a paradigm shift for dental practice.“ (Vortrag)

2023 MRS Spring Meeting, San Francisco, USA, 10.-14.04.2023. M. Epple, N. Bialas, M. Heggen, K. Klein, S. Kollenda, K. Kostka, B. Kruse, K. Loza, V. Sokolova, N. Wolff. „Nanoparticles of silver and of silver-gold alloys: Synthesis, ultrastructure, and the mechanism of their biological action.“ (Vortrag)

Symposium on HIV Immunology, Vaccine, and Cure Research, Essen, Deutschland, 21.-22.04.2023. D. Damm, L. Rojas-Sánchez, K. Kostka, C. Weingärtner, J.T. Wagner, V. Sokolova, K. Überla, M. Epple, V. Temchura. „Modulation of HIV-1 Env antibody responses in mice with rationally designed calcium phosphate nanoparticles.“ (Vortrag)

Zentrum für Nanointegration Duisburg-Essen (CENIDE), Bergisch-Gladbach, Deutschland, 02.-04.05.2022. K. Kostka, K. Steiger, G. Haberhauer, M. Epple. „Synthetic steps to prepare chiral ultrasmall gold nanoparticles“. (Poster)

10th NRW Nano Conference, Dortmund, Deutschland, 23.-24.05.2023. B. Kruse, V. Sokolova, K. Kostka, N. Wolff, O. Prymak M. Epple. „Synthesis and cytotoxicity of doxorubicin-functionalized ultrasmall gold nanoparticles.“ (Poster)

101st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), IX Meeting of the Latin American Region, 12th World Congress on Preventive Dentistry, Bogota, Kolumbien, 21.-25.06.2023. F. Machla, I. Angelopoulos, P. Monou, V. Platania, K. Kostka, B. Kruse, M. Chatzinikolaidou, M. Epple, D. Fatouros, I. About, D. Andreadis, A. Bakopoulou. „Dentin-Pulp-Complex-on-Chip: A Nanotechnology-based Microfluidic Model for Biocompatibility Assessment of Biomaterials.“ (*eingereicht*)

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorstehende Arbeit mit dem Titel „Oberflächenmodifizierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mittels Klick-Chemie“ selbständig angefertigt und mich fremder Hilfe nicht bedient habe. Alle Stellen, die sinngemäß veröffentlichtem Schrifttum entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Universität eingereicht.

Essen, den 10.05.2023

(Kathrin Kostka)

Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Matthias Epple bedanken, der es mir ermöglicht hat, diese interessanten Themen in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und mich über den ganzen Zeitraum der Dissertation unterstützt und mit Ratschlägen begleitet hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Christoph Janiak für die Übernahme des Drittgutachtens.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Kateryna Loza für die vielen STEM-Aufnahmen und Frau Ursula Giebel für die zahlreichen REM-Aufnahmen, sowie für viele nette und aufbauende Gespräche.

Außerdem danke ich Herrn Robin Meya für die Vermessung der AAS-Proben und ebenfalls Herrn Dietrich Tönnes für die PXRD-Messungen.

Meinen Kooperationspartnern Frau Dr. Viktoriya Sokolova, Herrn Dr. Oleg Prymak und Herrn Benedikt Kruse bin ich für die angenehme Zusammenarbeit bei mehreren gemeinsamen Projekten dankbar. Frau Dr. Viktoriya Sokolova danke ich darüber hinaus auch noch für die schöne und gewinnbringende Dienstreise und für die vielen motivierenden Gespräche.

Zusätzlich danke ich Herrn Christoph Weingärtner (AG Temchura), Herrn Dr. Dominik Damm und Herrn Yu Wang (AG Überla) aus Erlangen (Virologie, Uniklinik Erlangen) für den Versand der Env- sowie VLP-Proben und die vielen beratenden Emails.

Unter anderem danke ich auch Frau Foteini Machla und Frau Melania Toska aus Griechenland (AG Bakopoulou) für die nette Arbeit an dem Projekt und den guten wissenschaftlichen Austausch.

Ich bin auch dankbar für die anderen schönen ausländischen Kooperationen mit Taiwan, Singapur, USA und Japan.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Arbeitskreis für die familiäre Atmosphäre, die vielen entspannenden und lustigen Kaffeerunden und für die gegenseitige Hilfestellung.

Darüber hinaus danke ich Herrn Oussama Tihouna für die Zuarbeit und wissenschaftliche Unterstützung bei anfallenden Aufgaben.

Im Zuge dessen möchte ich mich auch bei Frau Carola Fischer bedanken, die bei allen technischen Problemen immer geholfen hat. Außerdem auch bei Frau Sabine Kiefer und Frau Sabine Bollmann für alle organisatorischen Hilfestellungen.

Ansonsten danke ich vor allem Herrn Dr. Mateusz Olejnik, Frau Dr. Kateryna Loza und Herrn Daniel Wirtz für die Zeit und die Mühe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei meinen Eltern möchte ich mich herzlich bedanken, die mich bei allen Entscheidungen unterstützen und mit Ratschlägen zur Seite stehen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund bedanken, der mich in allen Situationen motiviert und aufgebaut hat, sowie für die Liebe und den Glauben.

Zuletzt danke ich auch der DFG für die finanzielle Unterstützung und daher die Möglichkeit bei der Forschung an vielen interessanten Gebieten mitzuwirken.

