
**Entwicklung von auf nanoporösen
Silica-Nanopartikeln basierenden
Implantat-assoziierten
Freisetzungssystemen
für Wachstumsfaktoren**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von

Nadeschda Schmidt, M. Sc.

2019

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Behrens

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hoffmann

Tag der Promotion: 13.05.2019

Kurzzusammenfassung

Von genetischen Defekten und infektiösen Erkrankungen bis hin zu Alter und Umwelteinflüssen können verschiedene Ursachen den Einsatz von Implantaten erforderlich machen. Durch eine Implantation erhoffen sich betroffene Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität, indem die ausgefallene Körperfunktion bestmöglich ersetzt wird. Somit ist die stetige Weiterentwicklung und Optimierung von Implantaten von großer Bedeutung. Diese kann beispielsweise durch die Entwicklung von neuen potentiellen Implantatmaterialien oder durch die Funktionalisierung der Implantatoberflächen – auf physikalischem, chemischem, biochemischem oder biologischem Weg – erfolgen.

Im Fokus der vorliegenden Dissertation steht die biochemische Funktionalisierung von Implantaten, indem Implantat-assoziierte Freisetzungssysteme auf Basis von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) für die Wachstumsfaktoren *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und *transforming growth factor-β3* (TGF-β3) entwickelt werden. Ihre Anwendung sollen die zu entwickelnden Freisetzungssysteme auf der Oberfläche der Cochlea-Elektrode (BDNF) bzw. auf einem gradierten Implantat (TGF-β3) für die Regeneration des Sehnen-Knochen-Übergangs finden.

Die durch eine Tensid-gesteuerte Synthese hergestellten NPSNPs wurden an ihrer Oberfläche mittels der *post-grafting*-Methode mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgestattet, um die Immobilisierungsmenge und die Freisetzung der Wachstumsfaktoren gezielt zu steuern. Aufgrund der großen Oberfläche konnte die gesamte eingesetzte Menge des jeweiligen Proteins unabhängig von der Modifizierung auf der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert werden. Bei den Freisetzungsexperimenten ließen sich dagegen, in Abhängigkeit von der Modifizierung, unterschiedliche Freisetzungskinetiken beobachten. Vor allem hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Wachstumsfaktoren und der Nanopartikeloberfläche begünstigten eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung. Neben den Wechselwirkungen hatte die unterschiedliche Stabilität der Proteine über den Freisetzungsvverlauf einen entscheidenden Einfluss auf die freigesetzte Menge an aktivem Wachstumsfaktor.

In Hinblick auf die angestrebten Anwendungen lieferten *in vitro*-Untersuchungen der beiden Freisetzungssysteme vielversprechende Ergebnisse. Die aus amino-modifizierten NPSNPs freigesetzten BDNF-Mengen übten einen starken neuroprotektiven und einen geringen neuroregenerativen Effekt auf die Spiralganglienneurone aus. Auch konnten die aus un- und amino-modifizierten NPSNPs freigesetzten TGF-β3-Mengen die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen anregen; in geringerem Maße galt dies auch für die aus Fasermatten aus Polycaprolacton freigesetzten TGF-β3-Mengen; diese Fasermatten waren zuvor mit TGF-β3-beladenen NPSNPs funktionalisiert worden.

Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Freisetzungssysteme explizit für die gewünschten Anforderungen entwickelt und zusätzlich ein generelles Wissen bezüglich der Verwendung der NPSNPs als Freisetzungssysteme für Wachstumsfaktoren generiert.

Stichworte: nanoporöse Silica-Nanopartikel, drug delivery, Wachstumsfaktor, *brain-derived neurotrophic factor*; Neuroprotektion, *transforming growth factor-β3*, chondrogene Differenzierung

Abstract

From genetic defects and infectious diseases to aging and environmental impacts, the necessity for the application of an implant has many reasons. The implants should compensate the lost body function in order to significantly enhance the quality of life of the affected patients. Thus, research is carried out on new materials and on the functionalization of the implant surface, which can be achieved in a physical, chemical, biochemical or biological way.

In this work, implant-associated delivery systems based on nanoporous silica nanoparticles (NPSNPs) have been developed for the controlled delivery of the growth factors brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3). These delivery systems can find their application on the surface of the cochlear implant (BDNF) and on the surface of graded implants for the regeneration of tendon-bone connections (TGF- β 3), respectively.

NPSNPs were synthesized by a surfactant-directed sol-gel process. Subsequently, the particles were modified via post-grafting methods with different functional groups to control the immobilized amounts and the release kinetics of the proteins. Due to the large surface area, the applied protein amount was immobilized on the surface of the NPSNPs to full extent, independent of the modification. In contrast, the type of modification led to different release behaviors. In general, the presence of hydrophobic functionalities on the surface of the NPSNPs promoted a continuous and long-term delivery of the growth factors in both cases. Apart from the interaction between the nanoparticles and the growth factors, the different stability of the proteins over the release period had an important influence on the released amounts of active protein.

With regard to the intended applications, *in vitro* studies provided promising results for both growth factor release systems. The BDNF amounts released from BDNF-loaded, amino-modified NPSNPs exerted a strong neuroprotective and a slight neuro-regenerative effect on spiral ganglion neurons. Also, TGF- β 3 amounts released from unmodified as well as from amino-modified NPSNPs led to a chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Although the effect was less pronounced, this is also true for the TGF- β 3 amounts released from polycaprolactone fiber mats, which had been functionalized with TGF- β 3-loaded NPSNPs.

In summary, within this work, two delivery systems were developed for the specific requirements of the respective applications; furthermore, additional general knowledge on the use of NPSNPs as delivery systems for growth factors could be generated.

Keywords: nanoporous silica nanoparticles, drug delivery, growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neuroprotection, transforming growth factor- β 3, chondrogenic differentiation

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle einigen Personen danken, ohne deren Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Peter Behrens für die Betreuung meiner Arbeit und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Vielen Dank für die Möglichkeit, die Arbeit in interdisziplinären Kooperationen durchzuführen und für die Gelegenheiten, meine Ergebnisse auf unterschiedlichen Tagungen vorzustellen.

Frau Prof. Dr. Andrea Hoffmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein großer Dank gilt allen Kooperationspartnern des Exzellenzclusters „Hearing4all“ und der Forschergruppe „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen“ für eine gute Zusammenarbeit sowie viele konstruktive Diskussionen. Insbesondere danke ich Dr. Yvonne Roger und Dr. Jennifer Schulze für die Durchführung diverser *in vitro*-Untersuchungen und die Unterstützung bei der Auswertung.

Dem gesamten Arbeitskreis Behrens und auch den mittlerweile ehemaligen Mitgliedern danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und dafür, dass man eine Menge Spaß zusammen haben konnte. Für das Anfertigen von REM- und TEM-Aufnahmen, die Durchführung der TG-Messungen und für einige Sorptionsmessungen möchte ich mich bei Dr. Nina Ehlert, Dr. Bastian Hoppe, Marvin Lietzow, Inga Wille, Dr. Alexandra Satalov, Dawid P. Warwas, Katharina Nolte, Marc Krey, Mandy Jahns und Alexander Mohmeyer bedanken. Dr. Thomas Asche und Dr. Hans-Christoph Schwarz danke ich für diverse Hilfen bei Computerproblemen. Außerdem möchte ich an dieser Stelle auch Merle Feldt und Birgit Zekoll für ihre immer kompetente Hilfe in vielen administrativen Fragen danken.

Des Weiteren danke ich den Korrekturlesern Karen Besecke, Dr. Nina Ehlert, Alexander Mohmeyer, Dr. Yvonne Roger und Dr. Jennifer Schulze für die Zeit, die sie sich genommen haben, und für die konstruktive Kritik.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Alexander dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben, dass sie mich immer wieder motiviert, aber auch für Abwechslung gesorgt haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Allgemeine Grundlagen	5
2.1 Wachstumsfaktoren	5
2.1.1 <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	6
2.1.2 <i>Transforming growth factor-β3</i> (TGF- β 3)	8
2.1.3 Nachweis von Wachstumsfaktoren bzw. Proteinen	10
2.1.4 Strategien zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren	14
2.2 Nanoporöse Silica-Nanopartikel	17
2.2.1 Synthese und Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln	18
2.2.2 Degradation von nanoporösen Silica-Nanopartikeln	21
2.2.3 Nanoporöse Silica-Nanopartikel in biomedizinischen Anwendungen ...	23
2.3 Immobilisierung von Wachstumsfaktoren	26
2.3.1 Stabilität von Proteinen	27
2.3.2 Mechanismus der Proteinimmobilisierung auf Oberflächen	27
2.3.3 Einflüsse auf die Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen	28
2.3.4 Strategien zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren an nanoporöse Silica-Nanopartikel	29
2.4 Implantate	31
2.4.1 Cochlea-Implantat	32
2.4.2 Gradierte Implantate	41
3 Methoden und Materialien	48
3.1 Physikochemische Charakterisierungsmethoden	48
3.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie	48
3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie	48
3.1.3 Infrarotspektroskopie	48
3.1.4 Physisorption	49

3.1.5	Thermogravimetrie.....	49
3.1.6	Elementaranalyse.....	49
3.1.7	Zeta-Potential-Messung.....	50
3.2	Biochemische Charakterisierungsmethoden.....	50
3.2.1	ELISA.....	50
3.2.2	Cytokompatibilitätstests mit Fibroblasten.....	51
3.2.3	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zum neuroprotektiven und -regenerativen Effekt von BDNF mit Spiralganglienzellen.....	52
3.2.4	Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen.....	54
3.3	Experimentelles.....	58
3.3.1	Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	59
3.3.2	Modifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	59
3.3.3	Funktionalisierung der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit FITC.....	60
3.3.4	Immobilisierung der Wachstumsfaktoren auf NPSNPs.....	61
3.3.5	Freisetzungsexperimente mit beladenen NPSNPs.....	61
3.3.6	Untersuchungen zur Degradation der Nanopartikel unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen.....	62
3.3.7	Untersuchungen zur Degradation der Wachstumsfaktoren unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen.....	62
3.3.8	Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten BDNF- und TGF- β 3-Mengen.....	63
3.3.9	Funktionalisierung der PCL-Fasermatten mit TGF- β 3-beladenen bzw. unbeladenen NPSNPs.....	64
3.3.10	Freisetzung von TGF- β 3 von den PCL-Fasermatten.....	65
3.3.11	Degradation von mit NPSNPs funktionalisierten PCL-Fasermatten.....	65
3.3.12	Fluoreszenzmarkierung von BDNF.....	66
3.3.13	Probenpräparation für die <i>in vitro</i> -Untersuchungen.....	66
4	Ergebnisse und Diskussion.....	69
4.1	Charakterisierung der unmodifizierten und modifizierten NPSNPs.....	69
4.2	Entwicklung eines Freisetzungssystems für BDNF.....	77
4.2.1	Wechselwirkungen zwischen BDNF und NPSNPs.....	78
4.2.2	Quantifizierung der immobilisierten BDNF-Mengen.....	79
4.2.3	Freisetzung von BDNF von unterschiedlich modifizierten NPSNPs.....	82

4.2.4	Degradation von BDNF unter Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen	84
4.2.5	Einfluss der Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen auf die Degradation der NPSNPs	86
4.2.6	Neuroprotektiver und -regenerativer Effekt von BDNF-beladenen NPSNPs und freigesetzten BDNF-Mengen	90
4.2.7	Fluoreszenzmarkierung von BDNF	101
4.2.8	Zusammenfassung.....	105
4.3	Entwicklung eines Freisetzungssystems für TGF- β 3	108
4.3.1	Wechselwirkungen zwischen TGF- β 3 und NPSNPs	108
4.3.2	Quantifizierung der immobilisierten TGF- β 3-Mengen.....	110
4.3.3	Freisetzung von TGF- β 3 von unterschiedlich modifizierten NPSNPs ..	111
4.3.4	Degradation von TGF- β 3 unter Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen	114
4.3.5	Chondrogenese von MSCs durch TGF- β 3-beladene NPSNPs und durch freigesetzte TGF- β 3-Mengen	116
4.3.6	Funktionalisierung von PCL-Fasermatten mit unterschiedlichen NPSNPs 128	
4.3.7	Freisetzung von TGF- β 3 von NPSNP-funktionalisierten PCL-Fasermatten	131
4.3.8	<i>In vitro</i> -Untersuchungen hinsichtlich der Chondrogenese von MSCs mit NPSNP-funktionalisierten PCL-Fasermatten	135
4.3.9	Zusammenfassung.....	139
5	Fazit und Ausblick.....	143
6	Literaturverzeichnis.....	149
7	Anhang.....	168
7.1	Chemikalienverzeichnis	168
7.2	Zusammensetzungen der verwendeten Medien.....	169
7.3	Zusatzinformationen	170
7.3.1	Charakterisierung der Nanopartikel.....	170
7.3.2	Berechnung der theoretischen BDNF- bzw. TGF- β 3-Immobilisierungsmengen.....	172
7.3.3	Degradationsuntersuchungen der Nanopartikel.....	174

7.3.4	Fluoreszenzmarkierung von BDNF.....	175
7.3.5	Untersuchungen mit Fibrin zur Aufbringung der Nanopartikel auf die Silicon-Oberfläche.....	175
7.3.6	Charakterisierung der funktionalisierten PCL-Fasermatten mit unterschiedlichen Nanopartikeln	176
7.4	Veröffentlichungen.....	177
7.5	Lebenslauf	179

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
ACAN	Aggrecan
aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ALPL	alkalische Phosphatase
ATR	<i>attenuated total reflection</i> , abgeschwächte Totalreflexion
a.u.	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BET	Brunauer, Emmet und Teller
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BRE	<i>BMP-responsive element</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CI	Cochlea-Implantat
CMC	<i>critical micelle concentration</i> , kritische Mizellbildungskonzentration
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DFT	Dichtefunktionaltheorie
d. h.	das heißt
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMB	Dimethylmethylenblau
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM HG	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose</i>
DMEM LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>

EISA	<i>evaporation-induced self assembly</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, und andere</i>
FCS	<i>fetal calf serum, fetales Kälberserum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
GAG	Glykosaminoglykan
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
IEP	isoelektrischer Punkt
ICP-AES	<i>inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IR	Infrarot
ITS	<i>insulin, transferrin, sodium selenite</i>
LC	<i>liquid crystalline, flüssigkristallin</i>
Lit.	Literatur
Luc	Luciferase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCM	<i>Mobil Composition of Mater</i>
MMP-13	Matrix-Metalloprotease-13
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSCs	<i>mesenchymal stem cells, mesenchymale Stammzellen</i>
MSC-GM	<i>mesenchymal stem cell-growth medium</i>
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLDFT	nichtlokale Dichtefunktionaltheorie
NPSNP	nanoporöse Silica-Nanopartikel
NRU	<i>neutral red uptake assay, Neutralrot-Test</i>
NT	Neurotrophine
PBS	<i>phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCL	Polycaprolacton
PCR	<i>polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>

PEG	Poly(ethylenglycol)
PLA	<i>polylactic acid</i> , Polylactid
PLGA	<i>polylactic-co-glycolic acid</i> , Polylactid-co-Glycolid
PLL	Poly-L-Lysin
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIA	Radioimmunassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPS29	ribosomales Protein S29
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SBF	<i>simulated body fluid</i> , simulierte Körperflüssigkeit
SDA	strukturdirigierendes Agens
SGNs	Spiralganglienneurone
SGZs	Spiralganglienzellen
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethoxysilan
TG	Thermogravimetrie
TGF- β 3	<i>transforming growth factor-β3</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Trk	Tyrosinkinase
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
XRD	<i>X-ray diffraction</i> , Röntgen-Diffraktometrie
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Durch eine Implantation erhoffen sich betroffene Patienten vor allem eine Verbesserung der Lebensqualität, indem die ausgefallene Körperfunktion mithilfe eines Implantates bestmöglich ersetzt wird. Infolge der immer älter werdenden Gesellschaft und des zunehmenden technischen Fortschritts steigt die Zahl der eingesetzten Implantate kontinuierlich an und lag z. B. im Jahre 2016 allein in Deutschland bei ca. 1.6 Millionen.^[1] Der größte Anteil fällt auf die Zahnimplantate, allerdings sind Implantate auch in anderen Bereichen des Körpers, u. a. im Bewegungsapparat und zur Wiederherstellung der Sinneswahrnehmungen, von großer Bedeutung. Um den gegenwärtigen Anforderungen gerecht zu werden, bedarf es einer intensiven Forschung. Im Fokus steht dabei die Optimierung hinsichtlich der Biokompatibilität, Biofunktionalität und Biointegration des Implantates, die im Wesentlichen den Verlust der Implantatfunktion verhindern bzw. die Anzahl an Revisionseingriffen minimieren soll.^[2] Für die Implantatoptimierung werden unterschiedliche Ansätze untersucht. Dazu zählen beispielsweise die Entwicklung von neuen potentiellen Implantatmaterialien und die Funktionalisierung der Implantatoberfläche, die auf verschiedenen Wegen – physikalisch, chemisch, biochemisch oder zellulär – erfolgen kann. Damit sollen gezielte Reaktionen des umliegenden Gewebes stimuliert werden.^[2,3] Im Fokus dieser Dissertation steht die biochemische Funktionalisierung von Implantaten, indem Implantat-assoziierte Freisetzungssysteme für zwei unterschiedliche Wachstumsfaktoren entwickelt und auf die Oberfläche aufgebracht werden sollen. Der Aspekt der Implantat-assoziierten Freisetzung ist im Falle von Wachstumsfaktoren besonders entscheidend, da sie in unterschiedlichen Bereichen des Körpers ihre Wirkung entfalten können, für die gewünschte Anwendung diese aber nur am Einsatzort benötigt wird.

Generell können Wachstumsfaktoren vielfältige Funktionen wie die Migration, die Proliferation und die Differenzierung bestimmter Zellgruppen steuern und sind deshalb vielversprechende Kandidaten für die Geweberegeneration bzw. für die Anregung von gezielten Reaktionen des umgebenden Gewebes.^[4,5] Aufgrund der einzigartigen Wirkung der Signalmoleküle werden derzeit Freisetzungssysteme für Wachstumsfaktoren in der Forschung stark untersucht, wobei es verschiedene Strategien zur Freisetzung gibt. Neben der zell- und genbasierten Therapie, bei denen die Freisetzungssysteme mit Zellen bzw. Vektoren besiedelt werden, die die Produktion der Wachstumsfaktoren am Wirkort ermöglichen sollen, gibt es auch die Möglichkeit der direkten Immobilisierung.^[6,7] Eine weitere Auswahlmöglichkeit ergibt sich durch die Anwendung von diversen Freisetzungssystemen, die beispielsweise nach ihrer Grundstruktur in Scaffolds, Hydrogele und partikuläre Systeme unterteilt werden können.^[8,9] Trotz der gegebenen Vielfältigkeit ist der klinische Einsatz von Wachstumsfaktoren noch sehr begrenzt und damit das gegebene Potential noch nicht ausgeschöpft.

Folglich beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Entwicklung von optimierten Freisetzungssystemen für die zwei unterschiedlichen Wachstumsfaktoren BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und TGF- β 3 (*transforming growth factor- β 3*). Aufgrund ihrer Eigenschaften fungieren nanoporöse Silica-Nanopartikel (NPSNPs) als Basis für die Freisetzungssysteme. Zu diesen vorteilhaften Eigenschaften gehören die hohe spezifische Oberfläche, das große Porenvolumen (bis zu 50 %) und die generelle Biokompatibilität und -degradation. Einen Vorteil bieten zugleich die Silanol-Gruppen auf der Oberfläche, die einstellbare Oberflächeneigenschaften ermöglichen.^[10,11] Zudem sprechen erste *in human*-Studien mit diesen Partikeln, z. B. jene von Bukara *et al.*, für die Möglichkeit einer biomedizinischen Anwendung.^[12] Obwohl das Porensystem bei den hier verwendeten NPSNPs mit einer durchschnittlichen Porengröße von 3 nm nicht für die Immobilisierung der Wachstumsfaktoren genutzt werden kann, ergeben sich gewisse Vorteile der porösen Nanopartikel gegenüber dichten Nanopartikeln derselben Größe. Einerseits führt die vorhandene Porosität zu einer generellen Vergrößerung der äußeren Oberfläche, die entscheidend für die Immobilisierung der Wachstumsfaktoren ist. Des Weiteren kann das Porensystem für die Einlagerung von anderen Wirkstoffen genutzt werden, die z. B. mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor zu einem verstärkten Effekt führen können.^[13,14] Neben den genannten Voraussetzungen konnten bisherige Untersuchungen mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren zeigen, dass sich die NPSNPs für die Immobilisierung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren prinzipiell eignen.^[15-17] Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Freisetzungssysteme explizit auf die gewünschten Anforderungen auszurichten. Neben Untersuchungen hinsichtlich der Immobilisierung und Freisetzung der Wachstumsfaktoren stehen auch diverse *in vitro*-Untersuchungen im Fokus, um die Wirkung der immobilisierten Wachstumsfaktoren bzw. der freigesetzten Mengen auf spezifische Zellen zu beurteilen. Außerdem soll auch ein generelles Wissen bezüglich der Verwendung von NPSNPs als Freisetzungssysteme für Wachstumsfaktoren generiert werden. Durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Wachstumsfaktoren kann zum einen beurteilt werden, ob sich die verwendeten Bedingungen grundsätzlich für die Entwicklung eines Freisetzungssystems auf Basis von NPSNPs eignen und zum anderen, ob bestimmte Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel die Immobilisierung bzw. die Freisetzung der Wachstumsfaktoren generell begünstigen. Zusätzlich wird der Einfluss der Degradation der NPSNPs und des jeweiligen Wachstumsfaktors unter den gegebenen Bedingungen auf die Ergebnisse untersucht.

BDNF wird beispielhaft für eine Vielzahl an verschiedenen neurotrophen Faktoren ausgewählt. Bei neurotrophen Faktoren handelt es sich um Signalmoleküle, die sowohl das neuronale Überleben und Wachstum als auch die Differenzierung von Nervenzellen stimulieren können.^[18] Anwendung finden soll das entwickelte BDNF-Freisetzungssystem auf der Oberfläche der Cochlea-Elektrode, dem implantierten Teil des Cochlea-Implantates. Dieses Implantat kommt zum Einsatz, um die Situation bei einer Innenohrschwerhörigkeit oder -taubheit zu verbessern, indem die Funktion

der ausgefallenen Haarzellen, die für einen Höreindruck entscheidend sind, kompensiert wird.^[19,20] Der Verlust der Haarzellen hat meist eine Degeneration der Spiralganglienneuronen (SGNs) zur Folge. Die Anzahl und die Aktivität der SGNs sind jedoch für einen guten Höreindruck – auch mit einem Cochlea-Implantat – von zentraler Bedeutung. Somit ist hier nicht nur eine Verbesserung des Implantates hinsichtlich der Biointegration und der Biokompatibilität gewünscht, sondern auch eine Optimierung des Elektroden-Nerven-Kontaktes. Dieser ist maßgeblich vom Zustand der SGNs abhängig, sodass sich viele Forschungsarbeiten das Ziel gesetzt haben, das Überleben der SGNs und das gerichtete Wachstum ihrer Dendriten zur Cochlea-Elektrode zu fördern. Im Rahmen des Exzellenzclusters „Hearing4all“ wird der Aspekt der Implantat-assoziierten Freisetzungssysteme für neurotrophe Faktoren wie BDNF getestet. Als Freisetzungssystem kommt sowohl die Kombination der NPSNPs mit der Silicon-Oberfläche der Ummantelung der Cochlea-Elektrode als auch die Kombination der NPSNPs mit den Platinkontakten, dem zweiten Elektrodenmaterial, in Frage. In Bezug auf die Anwendung werden in der vorliegenden Arbeit zunächst Freisetzungssysteme für BDNF auf Basis der NPSNPs entwickelt, die eine langfristige und kontinuierliche Freisetzung des Wachstumsfaktors ermöglichen sollen. Zudem werden erste Ansätze zur Aufbringung der NPSNPs auf die Implantatoberfläche vorgestellt.

Neben der Entwicklung eines optimierten Freisetzungssystems soll für das BDNF auch eine Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung des Proteins untersucht werden. Solche Markierungen können in weiteren Untersuchungen hilfreich sein, um beispielsweise *in vivo* den Transport und die Verteilung des BDNFs zu beobachten.^[21] Der zweite Fokus dieser Arbeit liegt in der Anwendung von TGF- β 3 in einem Freisetzungssystem auf einem gradierten Implantat für die Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs. Im Rahmen der Forschergruppe 2180 „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen“ sollen dafür degradierbare, elektrogewebene Fasermatten aus Polycaprolacton (PCL) als Gerüststruktur zum Einsatz kommen, die mit einer biologischen Funktion ausgestattet werden. Hierfür werden nanoporöse Silica-Nanopartikel und/oder Chitosan-Nanopartikel auf die Fasermatte aufgebracht, die als Freisetzungssysteme für die Wachstumsfaktoren BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) und TGF- β 3 und für den Transkriptionsfaktor Smad8 (L+MH2) dienen sollen. Der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt bei TGF- β 3, für das ein Freisetzungssystem auf Basis der NPSNPs entwickelt werden soll und das die Differenzierung der endogenen Stammzellen zu Knorpelzellen anregen soll.^[22] TGF- β 3 erhält dabei den Vorzug gegenüber anderen TGF- β -Wachstumsfaktoren, da vorherige Studien gezeigt haben, dass eine Wiederherstellung von funktionell aktivem Gewebe unter einer verminderten Narbenbildung mittels TGF- β 3 möglich ist.^[23] Für eine vollständige Regeneration des Sehnen-Knochen-Übergangs ist eine kontinuierliche Freisetzung der jeweiligen biologisch aktiven Proteine über einen Zeitraum von etwa 28 Tagen notwendig. Somit muss das entwickelte TGF- β 3-Freisetzungssystem eine Freisetzung über mindestens diesen Zeitraum erfüllen. Neben der Entwicklung des Freisetzungssystems wird zudem die Aufbringung der NPSNPs auf modifizierte PCL-

Fasermatten mittels elektrostatischer Wechselwirkungen untersucht. Zwar ist auch die direkte Anbindung der Wachstumsfaktoren an PCL-Fasermatten möglich,^[24,25] jedoch erscheint dieser Ansatz aufgrund der erhöhten Anforderungen in Bezug auf die Freisetzungskinetik nicht ausreichend, sodass stattdessen zunächst Nanopartikel mit den Wachstumsfaktoren belegt und auf die Oberfläche der PCL-Fasermatte aufgebracht werden. Hiermit soll eine stärker kontrollierbare Freisetzung der Proteine erzielt werden.

2 Allgemeine Grundlagen

Dieses Kapitel bietet einen Überblick über die Grundlagen des für die vorliegende Arbeit relevanten Forschungsgebiets. Nach einer kurzen Einleitung zu den verwendeten Wachstumsfaktoren und deren Eigenschaften wird auf verschiedene Nachweismethoden für Proteine allgemein eingegangen. Anschließend wird der bisherige Forschungsstand hinsichtlich der Entwicklung von Delivery-Systemen für Wachstumsfaktoren thematisiert. Des Weiteren werden die nanoporösen Silica-Nanopartikel als Freisetzungssystem, alle relevanten Aspekte in Bezug auf die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und letztlich die Anwendungsmöglichkeiten der zu entwickelnden Freisetzungssysteme vorgestellt.

2.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Regeneration von Gewebe. Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um Signalmoleküle, welche die Zellproliferation und/oder die Differenzierung von Vorläuferzellen bzw. Stammzellen beeinflussen. Als Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 6–45 kDa weisen sie eine dreidimensionale Struktur auf und können entweder als Monomer oder als Dimer vorliegen. Ein Beispiel für ein lösliches Monomer ist der Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*). Bei den Dimeren, bei denen die Ketten über Disulfidbrücken und/oder über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden sind, wird zwischen Homo- (Moleküle mit identischen Ketten) und Heterodimeren (Moleküle mit verschiedenen Ketten) unterschieden. Beispiele hierfür sind die VEGFs (*vascular endothelial growth factors*) sowie die in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren BDNF und TGF- β 3. Wachstumsfaktoren werden im Körper von verschiedenen Zellen bei unterschiedlichen Bedingungen ausgeschüttet, dabei können sie auch als membrangebundene Profaktoren vorliegen und vor der Freisetzung an der Außenseite der Zellmembran verankert sein.^[26,27] Nach der Freisetzung agieren sie als Signalmoleküle, indem sie durch die Anbindung an einen für den Wachstumsfaktor spezifischen Rezeptor eine Signalkaskade starten. Damit können sie vielfältige Zellfunktionen wie die Migration, die Proliferation und die Differenzierung bestimmter Zellgruppen steuern.^[4,5] Hinsichtlich der Distanz zwischen der Wachstumsfaktor-produzierenden Zelle und der Zelle, auf die der Wachstumsfaktor wirkt, gibt es eine weitere Klassifizierung. Wirkt der Wachstumsfaktor auf die eigene Zelle, wird von einer autokrinen Wirkung gesprochen, wohingegen bei einer parakrinen Wirkung die benachbarten Zellen beeinflusst werden. Endokrine Wirkungen (Einfluss auf entferntere Zellen) wurden für manche Wachstumsfaktoren nachgewiesen, sind jedoch selten, da Wachstumsfaktoren nur kurze Diffusionswege durch die extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) zurücklegen und eine kurze Halbwertszeit aufweisen.^[4,28] Generell ist der hervorgerufene

Effekt eines Wachstumsfaktors konzentrationsabhängig und stark durch das zelluläre Mikroumfeld beeinflussbar.^[29] Wachstumsfaktoren können auch die Sekretion und die Wirkung anderer Faktoren (Entgegenwirken bzw. Verbessern) regulieren,^[30] zudem können unterschiedliche Wachstumsfaktoren den gleichen biologischen Effekt hervorrufen.^[31] Somit wirken sie in einer komplexen, nicht-monotonen Art und Weise, die eine Vorhersagbarkeit der Wirkungsweise schwer macht.

In der Forschung werden trotz der genannten Problematik viele verschiedene Wachstumsfaktoren und ihrer Anwendung in Freisetzungssystemen für Implantate untersucht. In den folgenden Unterkapiteln werden zwei Wachstumsfaktoren detaillierter bezüglich ihrer Struktur und Wirkung im Körper vorgestellt. Dabei handelt es sich um BDNF und TGF- β 3, die für die beiden interdisziplinären Forschungsprojekte von Interesse sind, in deren Rahmen die vorliegende Arbeit entstand: dem Exzellenzcluster 1077 „Hearing4all“ und der Forschergruppe FOR 2180 „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen“.

2.1.1 *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)

Der Wachstumsfaktor BDNF wurde 1982 erstmals von Barde *et al.* aus Schweinehirnen extrahiert und charakterisiert.^[32] Hierauf lässt sich auch die Bezeichnung „vom Gehirn stammender neurotropher Faktor“ zurückführen. Mit dem bereits bekannten NGF (*nerve growth factor*)^[33] definierten sie die Familie der Neurotrophine, zu denen auch die Neurotrophine 3 (NT-3),^[34] -4 (NT-4),^[35] -5 (NT-5)^[36] und -6 (NT-6)^[37] gehören, die in der nachfolgenden Zeit entdeckt wurden. Da es sich bei NT-4 und NT-5 nur um Variationen desselben Moleküls handelt, werden diese zusammenfassend auch als NT-4/5 bezeichnet.^[38] Bei den Neurotrophinen handelt es sich generell um lösliche, stark basische (pH 9–10.5)^[39] dimere Moleküle, deren Aminosäuresequenzen zu mindestens 50 % identisch sind. Zur Homologie gehört die dreidimensionale, von zwei Paaren antiparalleler β -Stränge determinierte Struktur und sechs Cystein-Reste, die drei Disulfidbrücken ausbilden. Diese charakteristische Disulfidverbrückung für Neurotrophine wird als Cystin-Knoten bezeichnet, dabei verbinden zwei Disulfidbrücken das Polypeptid-Rückgrat zu einem Ring, durch den eine dritte Disulfidbrücke hindurchtritt.^[40–42]

BDNF ist strukturchemisch ein Homodimer und besteht aus zwei Monomeren mit ungefähr 240 Aminosäuren. Jedes Monomer ist aus sieben β -Strängen aufgebaut, die über drei lösungsexponierte β -Schleifen und eine längere β -Schleife verbunden sind. Die Dimere sind parallel zueinander ausgerichtet und werden nicht-kovalent, hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen, zusammengehalten (s. Abbildung 2.1 a).^[40,43] Die hydrophoben Interaktionen ermöglichen auch die Bildung von Heterodimeren. Diese Möglichkeit führte dazu, dass Röntgen-Kristallstrukturanalysen von BDNF-Heterodimeren mit NT-3 bzw. NT-4/5 durchgeführt wurden und diese einige Indizien hinsichtlich der BDNF-Struktur liefern konnten.^[44,45] Zudem gibt die Röntgen-Kristallstrukturanalyse des NGFs aufgrund der Homologie eine

gewisse Vorstellung über die Größe eines BDNF-Homodimers. Die Größe eines NGF-Dimers beträgt in etwa $60 \times 25 \times 30 \text{ \AA}$.^[46]

Ein entscheidender Faktor für die Immobilisierung von BDNF ist die Oberflächenbeschaffenheit des Wachstumsfaktors. Mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 10 ist BDNF ein stark basisches Protein,^[32,39,47] bei dem die positiv geladenen Bereiche auf der Oberfläche überwiegen, wie in Abbildung 2.1 b durch die farbliche Codierung für das elektrostatische Potential der Oberfläche gezeigt wird.^[48]

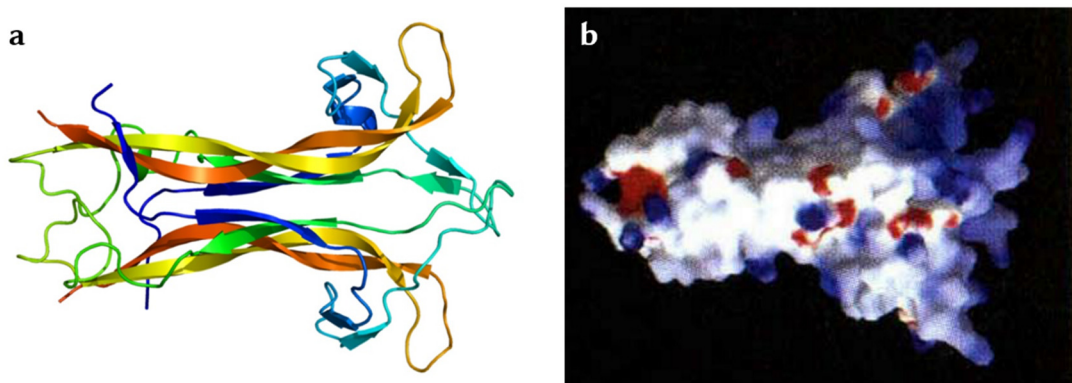


Abbildung 2.1: Modulierte Struktur vom BDNF-Homodimer. Die Pfeile in der Proteinstruktur stellen die β -Stränge dar (a).^[49] Darstellung des elektrostatischen Potentials auf der Oberfläche des BDNF-Homodimers (blau: positives Potential, rot: negatives Potential, weiß: unpolar) (b).^[48]

Das Vorläuferprotein (pro-BDNF) ist ein 32 kDa schweres Protein und besteht aus 382 Aminosäuren. Es wird extrazellulär im synaptischen Spalt durch Proteasen zu BDNF, welches ein Molekulargewicht von 28 kDa aufweist, gespalten.^[39,43] BDNF wird hauptsächlich im präfrontalen Cortex und Hippocampus exprimiert und wirkt auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, wo seine Wirkung durch die Bindung an einen neurotrophinspezifischen Rezeptor, Tyrosinkinase-(Trk)-Rezeptor B, entfaltet wird.^[43,50] Generell weisen die Neurotrophine eine hohe Affinität gegenüber diesen Tyrosinkinase-Rezeptoren auf. NGF bindet spezifisch an den TrkA-Rezeptor, BDNF und NT-4/5 haben eine hohe Affinität zum TrkB-Rezeptor und die biologische Aktivität des NT-3 wird über die Bindung zum TrkC-Rezeptor vermittelt.^[51,52] Zudem binden alle Neurotrophine mit der gleichen Affinität an den p75-Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR}). Dabei kann die Bindung an den p75^{NTR}-Rezeptor einen gegensätzlichen Effekt hervorrufen oder auch als Corezeptor fungieren, indem er die Spezifität der Trk-Rezeptoren steigert.^[53] Infolge der Aktivierung des Rezeptors, die sich in einer Dimerisierung und Phosphorylierung zeigt, wird eine Vielzahl an intrazellulären Kaskaden initiiert, die z. B. das neuronale Überleben und die Differenzierung der Nervenzellen stimulieren und die synaptische Plastizität regulieren können.^[18] In der Cochlea ist die Aktivierung des Rezeptors u. a. mit dem ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg verknüpft. Dieser Signalweg fördert die neuronale Differenzierung, die die Neurogenese und das Neuritenwachstum umfasst. Letztlich reguliert er auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)-

responsive element-binding protein). CREB leitet daraufhin die Expression von überlebensfördernden Genen innerhalb der Spiralganglienneurone ein (Abbildung 2.2).^[14,54]

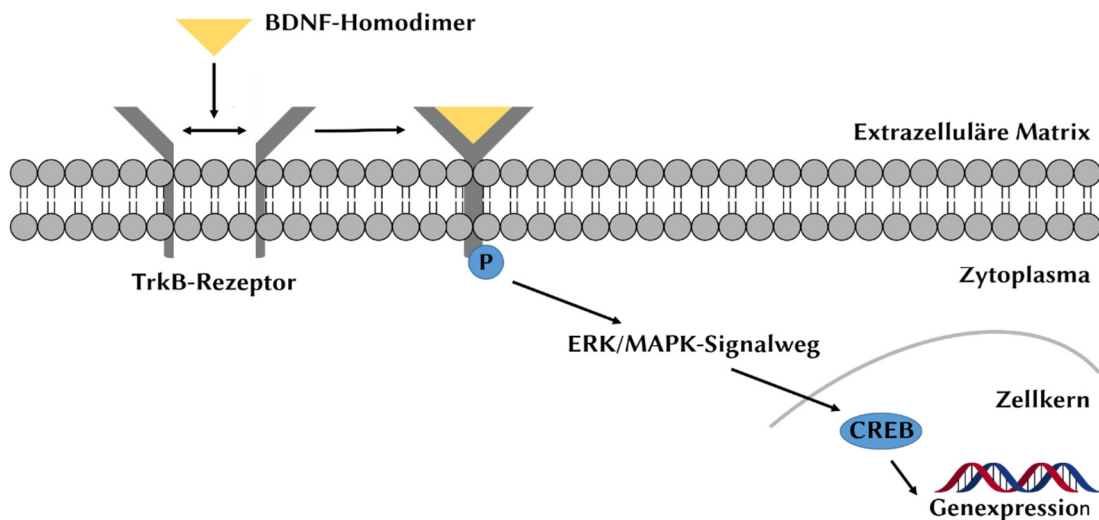


Abbildung 2.2: Schema der BDNF-Signaltransduktion über die Anbindung an den TrkB-Rezeptor und die Weiterleitung über den ERK/MAPK-Signalweg in neuronalen Zellen (nach Lit.^[14,54]).

2.1.2 Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3)

Der Wachstumsfaktor TGF- β 3 gehört zu einer großen Gruppe an Proteinen, der sogenannten TGF- β -Superfamilie. Neben den drei Isoformen des TGF- β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2 und $-\beta$ 3), die im Säugetier nachgewiesen wurden, gehören u. a. auch die BMPs (*bone morphogenetic proteins*), die GDNFs (*glial cell line-derived neurotrophic factors*) und die Aktivin/Inhibin-Familie dazu. Die Mitglieder regulieren die Proliferation und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen und spielen deshalb eine Schlüsselrolle bei der Geweberegeneration bzw. -reparatur.^[55] In Abhängigkeit vom Zelltyp, der Dosis und der Umgebung können die Faktoren pleiotrop wirken, wobei auch entgegengesetzte zelluläre Effekte wie Proliferation und Zelltod hervorgerufen werden können.^[56,57] Die TGF- β s werden als inaktive Pro-Proteine synthetisiert, dabei spielen die Pro-Domänen eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung und der Dimerisierung der Monomere. Diese Monomere werden durch eine enzymatische Abspaltung der Pro-Domäne erhalten und sind aus 110–140 Aminosäuren aufgebaut. Jede monomerische Untereinheit weist sieben Cystein-Reste auf, wobei sechs davon einen Cystin-Knoten mit drei intramolekularen Disulfidbrücken ausbilden. Der siebte Cystein-Rest geht eine intermolekulare Disulfidbrücke ein, sodass zwei Monomere zum biologisch aktiven Dimer verknüpft werden. Diese Bindung bietet eine zusätzliche Stabilisierung für die Dimerisierung, die hauptsächlich durch die hydrophoben Wechselwirkungen angetrieben wird.^[57–59] Der Prototyp dieser Gruppe wurde 1983 aus menschlichen Blutplättchen isoliert und als TGF- β 1 bezeichnet.^[60]

TGF- β 3 mit einem Molekulargewicht von 25 kDa wurde 1988 erstmals von Derynck *et al.* isoliert und charakterisiert.^[61] Es ist ein Homodimer, bei dem die Untereinheiten jeweils aus 112 Aminosäuren aufgebaut und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jedes Monomer weist dabei drei α -Helix-Stränge und vier β -Faltblatt-Stränge auf, die antiparallel zueinander angeordnet sind (Abbildung 2.3 a). Die Monomere haben eine Größe von ungefähr 60 x 20 x 15 Å. Die Oberfläche des TGF- β 3-Dimers ist größtenteils hydrophob. Jedoch zeigen zwei Bereiche im Molekül auch ein negativ elektrostatisches Potential auf und ein Bereich besitzt ein positiv elektrostatisches Potential. Diese Bereiche sind in Abbildung 2.3 b farblich codiert und mit N1, N2 und P1 bzw. N1', N2' und P1' für die einzelnen Untereinheiten gekennzeichnet.^[61–64] Es ergibt sich ein isoelektrischer Punkt bei einem pH-Wert von ca. 6.8.^[64,65] Somit hat TGF- β 3 eine geringe Löslichkeit in physiologischem Medium und neigt im Gegensatz zu den anderen Isoformen (TGF- β 1 und - β 2) unter diesen Bedingungen stark zu aggregieren. Dieser Aspekt ist vor allem bei höheren Proteinkonzentrationen ($>5 \mu\text{g mL}^{-1}$) ausschlaggebend.^[64]

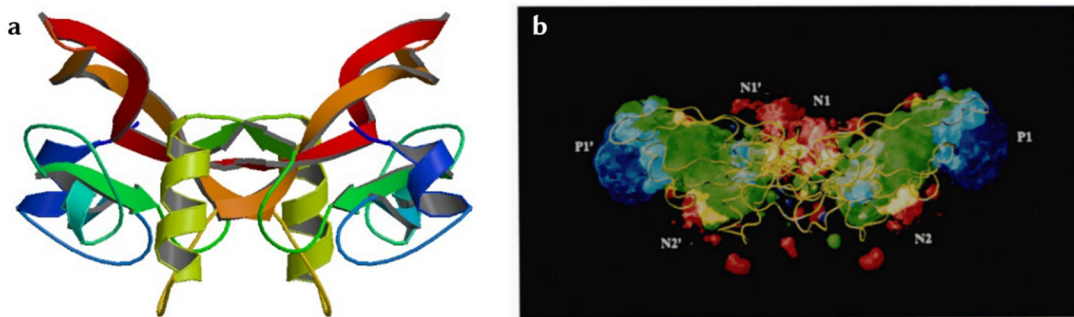


Abbildung 2.3: Modulierte Struktur des TGF- β 3-Homodimers. Die β -Stränge sind durch Pfeile und die α -Helix durch Spiralen dargestellt (a).^[66] Farblich codierte Darstellung der hydrophoben und hydrophilen Oberflächen des TGF- β 3. Die Bereiche in grün weisen auf hydrophobe Eigenschaften hin. Die Oberflächen in rot haben ein negativ elektrostatisches Potential und die in blau ein positiv elektrostatisches Potential (b).^[63]

Aufgrund ihrer hohen Homologie ($>75\%$) wirken die Isoformen von TGF- β über den gleichen Rezeptor-Signalweg. Dabei wird die Signalkaskade, die in Abbildung 2.4 gezeigt wird, durch die Bindung an einen tetrameren Rezeptorkomplex ausgelöst. Dieser Komplex besteht aus zwei TGF- β Typ I-Rezeptoren (T β RI) und zwei TGF- β Typ II-Rezeptoren (T β RII), bei denen es sich um Serin/Threoninkinase-Rezeptoren handelt. Es erfolgt zunächst die Bindung an den dimeren T β RII-Rezeptor, wodurch ein dimeres T β RI-Rezeptormolekül rekrutiert wird. Nach Interaktion der beiden Rezeptoren wird der Typ I-Rezeptor phosphoryliert und das Signal über Rezeptor-regulierte Smad-Proteine ins Zellinnere weitergeleitet, wo die Transkription bestimmter Gene aktiviert wird. Der Smad-Signalweg wird mittlerweile als der „klassische“ Weg für die Signalvermittlung der TGF- β -Superfamilie bezeichnet. Bei der Signalvermittlung sind drei Klassen von Smad-Proteinen beteiligt. Zunächst werden die Rezeptor-regulierten Smad-Proteine (R-Smads) zum Typ I-Rezeptor rekrutiert und

phosphoryliert. Bei den TGF- β -Isoformen handelt es sich hierbei um Smad2/3. Bei den BMPs vermitteln im Wesentlichen Smad1/5/8 die Antworten. Anschließend kommt es bei allen R-Smads zu einer Wechselwirkung mit dem *common mediator* Smad4-Protein (Co-Smad4), wodurch spezifische Komplexe gebildet werden, die dann in den Zellkern wandern. Inhibitorische Smad-Proteine (I-Smads) wie Smad6 und Smad7 können intrazellulär in den Signalweg eingreifen, in dem sie an den Typ I-Rezeptor oder an die R-Smads binden und damit eine erfolgreiche Signaltransduktion verhindern. Die Vielfalt der TGF- β -Superfamilie zeigt sich nicht nur durch die verschiedenen Signalproteine, sondern auch in den unterschiedlichen Rezeptoren, da allein im Wirbeltier schon sieben Typ I-Rezeptoren und fünf Typ II-Rezeptoren bekannt sind, die im gesamten Körper verteilt vorkommen. Außerdem gibt es die Möglichkeit neben den kanonischen Smad-Signalweg auch andere Signalwege wie z. B. den MAPK-Signalweg zu aktivieren.^[56,57,59,67]

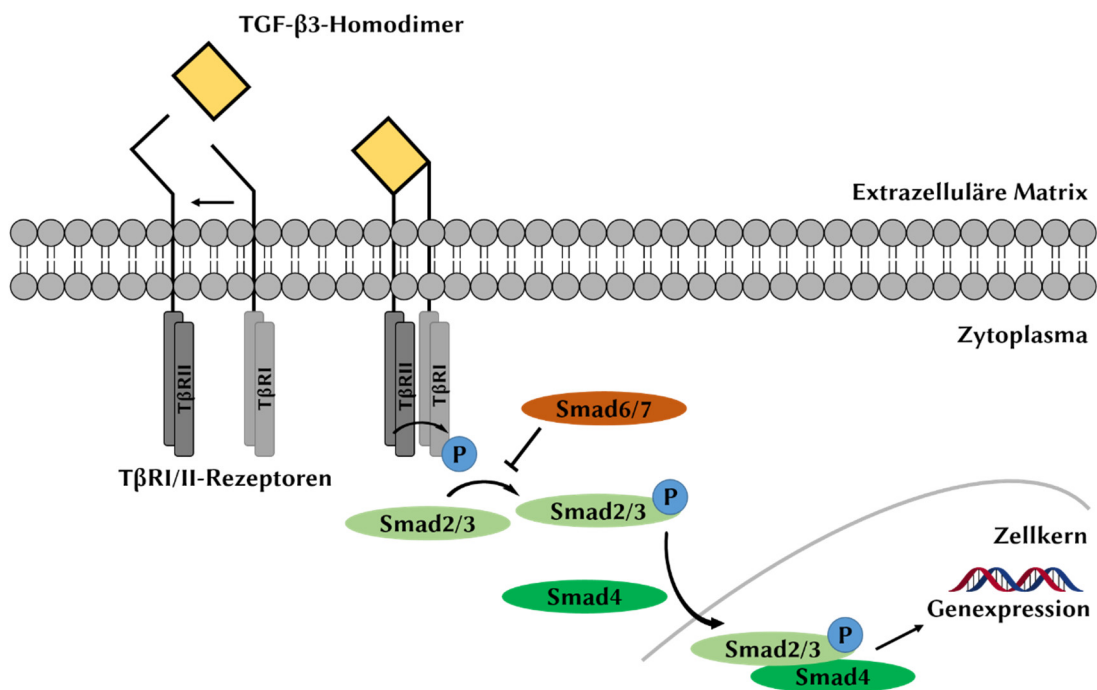


Abbildung 2.4: Schema der TGF- β -Signalkaskade über den kanonischen Smad-Signalweg (nach Lit.^[56,57]).

2.1.3 Nachweis von Wachstumsfaktoren bzw. Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen ist eine der am häufigsten durchgeführten Arbeitsoperationen im biochemischen Labor. Dabei ist nicht nur die Proteinmengenbestimmung, sondern auch der qualitative Nachweis von Proteinen, wie z. B. über die Fluoreszenzmarkierung, ein Aspekt, der in der Forschung stark untersucht wird. Solche Methoden sind hilfreich, um beispielsweise den Signalweg von Wachstumsfaktoren zu verstehen, indem der Transport des markierten Biomoleküls verfolgt wird.^[21]

In diesem Kapitel wird generell von Proteinen gesprochen, da die Wachstumsfaktoren eine spezielle Klasse dieser darstellen.

Quantitative Nachweismethoden von Proteinen. Im Laufe der Jahre sind die quantitativen Nachweismethoden aufgrund des zunehmenden Kenntnisstands immer empfindlicher und spezifischer geworden. Trotzdem wird keine Methode als Goldstandard für die Quantifizierung von Proteinen angesehen, da die Wahl für die richtige Methode von vielen Faktoren abhängig ist. Entscheidend sind insbesondere die zur Verfügung stehende Konzentration des Proteins, die Anwesenheit von Störsubstanzen sowie die Spezifität als auch die Sensitivität der Methode. Es wird zwischen spektrometrischen Methoden, kolorimetrischen Methoden und immunologischen Verfahren unterschieden.

Zu den spektrometrischen Methoden gehört die UV-Absorptionsmethode. Die Grundlage für diese Methode ist das Absorptionsmaximum von einigen Proteinen bei 280 nm, hervorgerufen durch aromatische Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin. Diese Methode ist eine zerstörungsfreie Methode, weil die native Struktur erhalten bleibt. Sie findet jedoch nur geringfügige Anwendung, da sie nicht sehr empfindlich ist und viele Störfaktoren (z. B. Nukleinsäuren) aufweist, die auch im Bereich um 280 nm absorbieren.^[68] Bei Proteinen können die aromatischen Aminosäuren aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems auch eine sogenannte „intrinsische Fluoreszenz“ verursachen. Das Fluoreszenzverhalten ist dabei überwiegend von den Tryptophanresten abhängig, die am stärksten fluoreszieren. Zusätzlich haben das Lösungsmittel und die strukturelle Form des Proteins (nativ/denaturiert) Einfluss auf die Lage und die Amplitude des Emissionsmaximums.^[68,69]

Die kolorimetrischen Methoden basieren auf einer Verfärbung der zu untersuchenden Proteinlösung nach Zugabe von bestimmten Reagenzien, die mit der Verfärbung von Kalibrationslösungen bekannter Proteinkonzentrationen verglichen wird. Bekannte Methoden sind u. a. der BCA-Assay, die Bradford- und die Lowry-Methode. Die Lowry-Methode basiert auf der Biuret-Reaktion und einer darauffolgenden Reaktion mit einem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz. Bei der Biuret-Reaktion kommt es in alkalischen Lösungen zunächst zu einer Komplexierung zwischen den Peptidbindungen eines Proteins und Kupfer-Ionen. Dieser Protein-Kupfer-Komplex reduziert dann das zugegebene Folin-Reagenz, wobei die aromatischen Aminosäuren gleichzeitig oxidiert werden. Es kommt zu einer starken Blaufärbung der Lösung, die als Maß für die Proteinkonzentration dienen kann. Diese Methode eignet sich für die Quantifizierung von Proteinmengen innerhalb von $0.01\text{--}1\text{ mg mL}^{-1}$, womit die Empfindlichkeit der Reaktion gering ausfällt. Günstig dagegen ist die hohe Spezifität, da neben Proteinen nur Peptide erfasst werden. Die Anwesenheit von Störfaktoren wie anderen Reduktionsmitteln oder Ammonium-Ionen, die mit Kupfer Tetraamin-Komplexe bilden, sollte ausgeschlossen werden.^[70–72]

Die Bradford-Methode ist eine sensitivere Methode verglichen mit der Lowry-Methode. Zur Bestimmung der Proteinmenge wird der Farbstoff Coomassie-Brillantblau verwendet, der primär an Arginin- und Lysinreste des Proteins bindet. Durch

die Bindung im sauren Milieu kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Somit ist die Proteinkonzentration proportional zur Absorbanz bei 595 nm. Je nach Assay lassen sich Proteinmengen im Bereich von 10–100 µg, aber auch in einem Bereich von 1–10 µg, bestimmen. Ein großer Nachteil dieser Methode ist die starke Abhängigkeit von der Proteinspezies, sodass es zu großen Abweichungen vom Standardprotein, welches für die Kalibration verwendet wird, kommen kann.^[71,73,74]

Der BCA-Assay (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure) ist eine Weiterentwicklung der Lowry-Methode. Auch in diesem Fall wird die Biuret-Reaktion genutzt, bei der durch die Protein-Kupfer-Komplexbildung in alkalischen Medium Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Die Reduktion erfolgt durch die Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan sowie durch die Peptidbindung. Die Cu^+ -Ionen können dann direkt mit dem zugesetzten BCA einen violetten Farbkomplex bilden, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist. Die Durchführung des BCA-Assays erfolgt bei 60 °C, da bei dieser Temperatur unterschiedliche Proteinzusammensetzungen die geringsten Einflüsse haben. Ein großer Vorteil ist die Stabilität der Bicinchoninsäure unter alkalischen Bedingungen, was eine Detektion in nur einem Schritt möglich macht, wohingegen bei der Lowry-Methode zwei Schritte benötigt werden. Trotz der Vorteile können Störfaktoren, ähnlich denen bei der Lowry-Methode, die Ergebnisse beeinträchtigen. Der BCA-Assay kann als Standard-Assay ($0.1\text{--}1\text{ mg mL}^{-1}$) und als Micro-Assay ($0.5\text{--}10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) für die Proteinquantifizierung eingesetzt werden.^[71,75,76]

Eines der bekanntesten immunologischen Verfahren zur Detektion bzw. Quantifizierung von Proteinen ist der sogenannte ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Erstmals wurde das ELISA-Verfahren im Jahre 1971 von Engvall und Perlmann zur Quantifizierung von Immunoglobulin G verwendet.^[77] Es sollte eine Alternative zum Radioimmunassay (RIA) darstellen, um die erhebliche Gefahr durch den Einsatz von radioaktiven Reagenzien zu umgehen. Obwohl das RIA-Verfahren noch in einigen Fällen verwendet wird, wurde es weitgehend durch den sicheren, technisch weniger aufwendigen ELISA ersetzt.^[78] Mit immunologischen Verfahren lassen sich allgemein geringe Proteinkonzentrationen (bis in den pg mL^{-1} -Bereich) bestimmen. Trotz der verschiedenen Arten des ELISAs (direkte, indirekte oder „Sandwich“-Methode) ist das Grundprinzip dasselbe: Antikörper, die mit einem Enzym konjugiert sind, binden an ein Antigen (den Analyten), der auf einem Träger immobilisiert ist. Das Enzym kann dann eine Farbreaktion eines chromogenen Substrates katalysieren. Die Farbveränderung bestätigt die Anwesenheit des Analyten bei einem qualitativen Test. In einem quantitativen Assay wird die Farbänderung mit der Farbänderung von Kalibrationslösungen bekannter Analytkonzentrationen verglichen, um die Menge des vorhandenen Analyten abzuschätzen.^[79,80]

In dieser Arbeit kommt aufgrund der geringen Proteinmengen nur das ELISA-Verfahren zur Quantifizierung der Wachstumsfaktoren in Betracht. Der in dieser Arbeit verwendete „Sandwich“-ELISA wird im Kapitel 3.2.1 näher beschrieben.

Fluoreszenzmarkierung von Proteinen. Eine Möglichkeit der Visualisierung von Proteinen, beispielsweise zur Beobachtung von biologischen Prozessen, ist die Fluoreszenzmarkierung. In der Forschung wird dieser Bereich stark untersucht und unterschiedliche Möglichkeiten der Markierung beschrieben. Zum einen ist es möglich, Proteine durch das sogenannte GFP (*green fluorescent protein*) zu markieren.^[81] Bei GFP handelt es sich um ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes Protein, welches bei Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert. Um ein GFP-Fusionsprotein herzustellen, wird die DNA des zu untersuchenden Proteins mit der GFP-DNA als Vektor in eine Zelle gegeben, um diese zu transfizieren, sodass sie anschließend das Fusionsprotein herstellt. So lässt sich die räumliche und zeitliche Verteilung des Protein *in vivo* beobachten.^[82] Mittlerweile gibt es auch zahlreiche Varianten des GFPs, die andere Fluoreszenzfarben aufweisen. Ein großer Vorteil ist die hohe Spezifität dieser Markierungstechnik. Nachteilig kann dagegen die Veränderung des Molekulargewichts sein, da die fluoreszierenden Proteine gleich groß bzw. größer als das zu untersuchende Protein sind. Dies kann die Funktion des Proteins beeinflussen. Zudem zeigen sie eine geringe Stabilität und neigen nach anhaltender Anregung zum Ausbleichen. Als Alternative zur Markierung von Proteinen bieten sich stabile Fluorophore mit guten photochemischen und physikalischen Eigenschaften an.^[83] Dazu gehören u. a. die Alexa Fluor®-Farbstoffe, die Cyanine, die Rhodamine, das Fluorescein und Quantendots.^[84] Neben der Vielzahl an unterschiedlichen Fluorophoren gibt es auch noch unterschiedliche Möglichkeiten, die Fluorophore für die Anbindung an das Protein zu modifizieren. Dabei lassen sich verschiedene funktionelle Gruppen als Kupplungsreagenzien an den Farbstoff anbringen, wie z. B. ein Succinimidylester (NHS-Ester) oder eine Maleimid-Gruppe. Der NHS-Ester ist ein häufig verwendetes Kupplungsreagenz, um Farbstoffe mit primären Aminen der Proteine (z. B. Lysinreste) zu konjugieren. Die Maleimid-Gruppe reagiert dagegen mit Thiol-Gruppen der Cystein-Aminosäure.^[85] Aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten muss je nach spezifischer Anwendung das passende System ausgesucht werden. Entscheidend ist, dass durch die Markierung die biologische Funktion des Proteins nicht verloren geht, was aber bei der chemischen Anbindung von Farbstoffen häufig der Fall sein kann.^[21] Cui *et al.* und Xie *et al.* konnten zeigen, dass Neurotrophine (NGF bzw. BDNF), die über eine Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung mit Quantendots konjugiert wurden, ihre biologische Aktivität beibehalten.^[21,86] Diese Markierungstechnik eignet sich, um den axonalen Transport von NGF bzw. BDNF zu beobachten und wird in der vorliegenden Arbeit für die Fluoreszenzmarkierung von BDNF getestet.

Neben der Fluoreszenzmarkierung gibt es auch noch andere Wege, Proteine *in vivo* zu verfolgen, wie beispielsweise die Radiomarkierung mit Iod-125^[87] und die Markierung mit kolloidalen Gold-Partikeln,^[88] die an dieser Stelle der Vollständigkeit halber jedoch nur erwähnt werden.

2.1.4 Strategien zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren in der regenerativen Medizin ist eine Möglichkeit, die Geweberegeneration zu unterstützen. Allerdings bringt diese Anwendung auch viele Herausforderungen mit sich, da die Wachstumsfaktoren eine kurze *in vivo*-Halbwertszeit, eine schlechte Bioverfügbarkeit aufgrund von Proteolyse oder Hydrolyse und eine geringe Gewebepenetration aufweisen.^[4,28,54] Traditionelle Wege der Darreichung, z. B. die intravenöse Injektion, lassen sich somit nicht anwenden. Diese führen zu einer Verteilung über den gesamten Körper und sind folglich nicht nur auf den Zielort lokalisiert, was zu systemischen Nebeneffekten führen kann. Angesichts der kurzen Halbwertszeit degradieren die Wachstumsfaktoren relativ schnell nach ihrer Sekretion, sodass trotz der geringen benötigten Mengen an Wachstumsfaktoren für eine Zellantwort (im Piko- bis Nanogramm-Bereich) die Endkonzentration am Zielort nach einer Injektion meist nicht ausreicht. Beispielsweise haben die TGF- β -Wachstumsfaktoren noch eine vergleichbar hohe Halbwertszeit von 11–160 Minuten, wohingegen diese für NGF nur noch 1.5 Minuten beträgt.^[6,28,89] Ein Weg, die Effizienz von Wachstumsfaktoren zu verbessern, besteht darin, die bioaktiven Moleküle durch ein Delivery-System zum Wirkort zu bringen und dort eine zeitlich und örtlich kontrollierte Freisetzung über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Hierfür werden in der gegenwärtigen Forschung im Wesentlichen drei Freisetzungsstrategien in Betracht gezogen, die in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt sind.^[6,7]

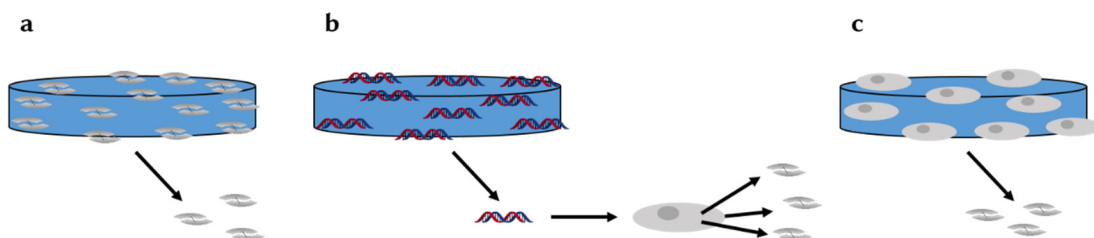


Abbildung 2.5: Unterschiedliche Freisetzungsstrategien für Wachstumsfaktoren (nach Lit.^[6]). Direkte Immobilisierung der Wachstumsfaktoren auf das Freisetzungssystem (a). In der Gentherapie wird ein Vektor, der einen bestimmten Wachstumsfaktor codiert, immobilisiert und durch die zelluläre Aufnahme und die Expression von Genen die Produktion des Wachstumsfaktors am Wirkort ermöglicht (b). Bei der zellbasierten Strategie wird das Freisetzungssystem mit Zellen besiedelt, die den Wachstumsfaktor sekretieren können (c).

In der ersten Strategie (Abbildung 2.5 a) werden die Wachstumsfaktoren direkt auf das Freisetzungssystem aufgebracht. Bei der Wahl des passenden Systems müssen jedoch einige Bedingungen berücksichtigt werden. Die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors sollte durch die Immobilisierungsbedingungen und die anschließenden Wechselwirkungen zum Freisetzungssystem nicht vermindert werden. Des Weiteren sollte das System das Protein vor dem schnellen enzymatischen Abbau und vor der Aufnahme durch das retikulohistiozytäre System (Teil des Immunsystems)

schützen.^[6,28,54] Die Freisetzung aus solchen Systemen kann durch die immobilisierte Menge an Wachstumsfaktoren, durch die Diffusion aus dem Freisetzungssystem und durch die Degradation des Systems kontrolliert werden. Vor allem in der Gefäßneubildung^[6,90], der Knochenregeneration^[6,7] und der Wundheilung^[6,8] werden solche Freisetzungssysteme intensiv erforscht. Diese Forschung führte auch zu FDA (*Food and Drug Administration*) genehmigten Wachstumsfaktor-Systemen für die Geweberegeneration. Ein Beispiel hierfür ist das Regranex[®], ein Gel zur äußeren Behandlung von diabetischen Ulzera. Dieses Produkt besteht aus einem Carboxymethylcellulose-basierendem Gel, in welches 0.01 % rekombinantes PDGF (*platelet-derived growth factor*) immobilisiert sind.^[91,92] Auch für die Knochenregeneration gibt es ein FDA geprüfetes Produkt, das INFUSE[®]-BMP-2, bei dem das BMP-2 in einer Kollagenmatrix immobilisiert ist.^[93]

Neben der Möglichkeit, den Wachstumsfaktor direkt auf das Freisetzungssystem zu immobilisieren, gibt es noch die Möglichkeit der indirekten Immobilisierung mittels der gen- (Abbildung 2.5 b) bzw. zellbasierten Strategie (Abbildung 2.5 c).

Bei der Gentherapie wird die mögliche Problematik der Instabilität des Wachstumsfaktors, auch wenn er in ein Freisetzungssystem eingebettet ist, dadurch umgangen, dass anstatt des Wachstumsfaktors virale bzw. nicht-virale Vektoren mit spezifischen Gensequenzen auf dem Träger immobilisiert sind. Diese können die lokale Produktion des Faktors ermöglichen, indem die Vektoren durch Zellen aufgenommen werden und diese daraufhin Gene für die bestimmten Wachstumsfaktoren exprimieren.^[6] Die kontrollierte Freisetzung von genetischen Materialien zeigt schon großes Potential in bisherigen Studien z. B. für die orthopädische Anwendung,^[7,94] allerdings bringt auch diese Methode ihre Vor- und Nachteile mit sich. Die Verwendung von viralen Vektoren (wie z. B. Retroviren und Adenoviren) weist eine hohe Transduktionseffizienz und eine hohe Genexpression auf; allerdings haben Adenoviren in klinischen Studien auch gezeigt, dass sie eine immunologische Abwehrreaktion hervorrufen können. Die nicht-viralen Vektoren (z. B. Plasmide) haben dagegen nur eine geringe Immunogenität und sind einfach handzuhaben, jedoch ist ihre Transfektionseffizienz gering.^[7,95]

Im Falle der zellbasierten Strategie werden die Freisetzungssysteme mit Zellen besiedelt, die die gewünschten Wachstumsfaktoren natürlich sekretieren können oder zuvor genetisch modifiziert wurden. Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) können eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren je nach biologischem Umfeld produzieren,^[96] meist ist die Konzentration der sekretierten Wachstumsfaktoren aber zu gering, um gewisse zelluläre Prozesse zu aktivieren, sodass vor allem die genetisch modifizierten Zellen ihre Anwendung finden.^[6] Dabei ist es nicht nur möglich, die Zellen auf die Freisetzung von einem Wachstumsfaktor zu spezifizieren, wie es z. B. mit den MSCs für die Freisetzung von BMPs gezeigt wurde,^[97,98] sondern auch die Zellen so zu modifizieren, dass sie zwei Wachstumsfaktoren sekretieren können. Dies konnte u. a. mit MSCs für die Freisetzung von VEGF und BMP-4 und mit Fibroblasten für die Expression von PDGF und VEGF gezeigt werden.^[99,100]

Als Basis für das Freisetzungssystem wurden in den bisherigen Forschungsarbeiten schon diverse Materialien in verschiedenen Formen untersucht, die für alle drei Strategien nutzbar sind.^[6,7] Aufgrund der Vielfältigkeit gibt es mehrere Möglichkeiten der Klassifizierung. Eine mögliche Einstufung der unterschiedlichen Freisetzungssysteme lässt sich mittels ihrer Grundstruktur erhalten, dabei werden partikuläre Systeme, Scaffolds, Hydrogele und anderen Systeme unterschieden.^[8,9]

Die partikulären Systeme können nach ihrer Größe in Mikrosphären (1–1 000 μm) und in Nanopartikel (<1 000 nm) unterteilt werden. Insbesondere die nanoskalige Dimension verleiht den Partikeln einzigartige Eigenschaften hinsichtlich der Löslichkeit, der Biodistribution, der Immunogenität und der Freisetzung.^[8,9] Die genannten Eigenschaften können aber auch nachteilig sein, da z. B. die gute Bioverteilung das Entfernen der Nanopartikel erschwert, falls eine Therapie vorzeitig abgebrochen werden muss.^[89] Wachstumsfaktoren können bei partikulären Systemen entweder auf die Oberfläche immobilisiert oder eingekapselt werden. Viel erforscht wurden in dieser Hinsicht poröse Silica-Partikel,^[101,102] Liposomen^[103,104] und Polymer-Partikel, auf Basis von natürlichen bzw. synthetischen Polymeren.^[105,106]

Dreidimensionale Gerüststrukturen (Scaffolds) können nicht nur als Plattform für die Wachstumsfaktoren dienen, sondern agieren im Tissue Engineering auch als stützende Struktur für die Zellanbindung, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Die Wachstumsfaktoren lassen sich durch physikalische Adsorption oder durch eine *in situ*-Einlagerung bei der Bildung der Gerüststruktur aufbringen. Mehrere Wachstumsfaktor-beladene Gerüststrukturen basieren auf Biomaterialien, die aus der extrazellulären Matrix stammen, wie z. B. das Chitosan, die Hyaluronsäure und das Kollagen.^[8,9] Aber auch Scaffolds auf Polymerbasis werden intensiv für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren untersucht, wobei vor allem das biodegradierbare Poly(lactid-co-glycolid)-Copolymer (*polylactic-co-glycolic acid*, PLGA) in der Literatur im Fokus steht. Dieses ist zum einen von der FDA für die humane Anwendung zugelassen^[8] und wurde zum anderen auch schon als Freisetzungssystem für verschiedene Wachstumsfaktoren u. a. BMP-2^[107] und TGF- β 3^[108] verwendet. Zudem kann es zusätzlich modifiziert werden, indem z. B. Heparin kovalent an die Oberfläche eines makroporösen PLGA-Gerüsts angebunden wird, um die Immobilisierung von beispielsweise FGF (*fibroblast growth factor*) zu verbessern.^[109] Die speziellen Wechselwirkungen zwischen Heparin und einigen Wachstumsfaktoren verhindern einen sogenannten *burst release*, der in den meisten Fällen bei einer einfachen physikalischen Immobilisierung erhalten wird, und führen zu einer kontinuierlichen Freisetzung der Wachstumsfaktoren.

Trotz der Tatsache, dass Gerüststrukturen sehr nützlich für die Anwendung im Tissue Engineering sind, gibt es den großen Nachteil, dass diese Freisetzungssysteme am Ort des Defektes implantiert werden müssen, was zu Komplikationen führen kann. Die Verwendung von Hydrogelen bietet den Vorteil, dass sie aufgrund des hohen Wassergehaltes flexibler sind und injiziert werden können. Die Strategien zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf Hydrogele gleichen denen der

Gerüststrukturen. Einige präklinische Studien mit Hydrogele als Freisetzungssysteme zeigten vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf die Regeneration von bestimmten Geweben.^[8,9] Luca *et al.* konnten beispielsweise einen osteoinduktiven Effekt eines mit BMP-2-beladenen Chitosan-Hydrogels nachweisen, welches in einen Defekt einer Kaninchenspeiche injiziert wurde.^[110]

Auch die Kombination unterschiedlicher Freisetzungssysteme wurde bereits in vielen Studien getestet. Lee *et al.* zeigten in ihrer Studie eine erfolgreiche Kombination eines Poly-(L-lactid-co- ϵ -caprolacton)-Netzwerks, welches mit einem BMP-2-beladenen Heparin-Hydrogel beschichtet wurde. Die Kombination führte zu einer verbesserten Knochenneubildung und Mineralisation als die Gerüstverbindung ohne das Hydrogel.^[111] Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Kombination von partikulären Systemen mit Hydrogelen oder Gerüststrukturen. Zum einen kann dadurch der schnellen Freisetzung aus den Gerüststrukturen entgegengewirkt werden, indem die Wachstumsfaktoren zunächst in die Nanopartikel immobilisiert werden und diese anschließend ins Netzwerk eingebracht werden. Beispielsweise konnten Lee *et al.* in ihren Untersuchungen eine kontrollierte Freisetzung von NGF zeigen, wenn der Wachstumsfaktor auf NPSNPs immobilisiert in ein Kollagen-Hydrogel eingebettet wurde.^[112] Zum anderen ermöglicht die Kombination auch eine duale Freisetzung mit unterschiedlichen Freisetzungskinetiken.^[9] Ein erfolgreiches Beispiel dafür zeigten Richardson *et al.* 2001, indem sie Mikrosphären, die mit PDGF beladen waren, in ein polymeres Netzwerk einlagerten, welches VEGF enthielt. Die Freisetzung der zwei Angiogenesefaktoren führte zu einer schnellen Bildung eines vaskulären Netzwerkes.^[113]

2.2 Nanoporöse Silica-Nanopartikel

Generell bieten sich poröse Silica-Materialien aufgrund ihrer Eigenschaften für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungsgebieten an. Dazu gehören die Katalyse,^[114–116] die Adsorption,^[117,118] die Chromatographie,^[118–120] die Photochemie bzw. Optik^[121,122] und die Biomedizin – im Speziellen das Drug Delivery,^[10,11,123,124] die Biosensorik,^[125,126] das Bioimaging^[127,128] und die Theranostik.^[127] Im Hinblick auf diese Arbeit ist insbesondere die Anwendung als Delivery-System hervorzuheben. Die ersten Patente hinsichtlich der Herstellung von nanoporösen Silica-Materialien wurden schon um 1970 eingereicht.^[129–131] Jedoch fehlte die detaillierte Charakterisierung, sodass die eigentliche Entdeckung dieser Materialien erst auf die frühen 1990er Jahre datiert wird. Dort gelang relativ zeitgleich der Arbeitsgruppe von Yanagisawa *et al.* und der Mobil Oil Company die erfolgreiche Synthese von nanoporösem Silica.^[132,133] Diese Synthese legte den Grundstein für die bis heute andauernde Forschung von diversen nanoporösen Silica-Materialien und ihren Anwendungen. Zu den vorteilhaften Eigenschaften dieser Materialien zählen eine große spezifische Oberfläche, ein großes Porenvolumen und eine kontrollierbare, enge Porenweitenverteilung.^[134] Nach der neuen IUPAC-Nomenklatur von 2015 definiert die Bezeichnung „nanoporös“ alle Porendurchmesser bis ungefähr

100 nm.^[135] Da nach einer vorherigen Nomenklatur bei den Porengrößen noch zwischen mikroporös (<2 nm), mesoporös (2–50 nm) und makroporös (>50 nm) unterschieden werden kann,^[136] findet man in der Literatur für die hier untersuchten Nanopartikel häufig auch die Bezeichnung „mesoporöse Silica-Nanopartikel“.

2.2.1 Synthese und Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln. Bei der Synthese von nanoporösen Silica-Materialien werden im Allgemeinen zwei Mechanismen (Abbildung 2.6) unterschieden, wobei bei beiden anionische bzw. kationische Moleküle wie das Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oder auch nicht-ionische Moleküle wie das Pluronic F-127 als strukturdirigierende Agenzien (SDAs) zum Einsatz kommen. Liegt eine hohe Konzentration des SDAs vor, so erfolgt die Synthese nach dem echten Flüssigkristall-Templat-Mechanismus. Hierbei bilden die Tensidmoleküle nach Überschreiten der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC, *critical micelle concentration*) zunächst sphärische Mizellen aus. Diese ordnen sich in Abhängigkeit von der Temperatur, der Konzentration und dem Lösungsmittel zu größeren Aggregaten, den sogenannten lyotropen, flüssigkristallinen Phasen (LC-Phasen, *liquid crystalline*), an. Bei den LC-Phasen ist eine hexagonale, kubische oder lamellare Anordnung möglich. Anschließend werden Silica-Vorstufen, wie z. B. Tetraethoxysilan (TEOS), zugegeben, die in einem Sol-Gel-Prozess zunächst hydrolysieren und dann um die organische Phase zu einem amorphen Siliciumdioxid-Netzwerk kondensieren. Beim kooperativen Flüssigkristall-Templat-Mechanismus bilden sich die LC-Phasen auch bei geringen Tensidkonzentrationen aus, indem es zu einer kooperativen Selbstorganisation des SDAs mit der direkt eingesetzten Silica-Spezies kommt. Somit sind attraktive Wechselwirkungen zwischen dem SDA und der Silica-Vorstufe für dieses Verfahren essentiell. Nach der Entfernung des SDAs durch Calcination bei hohen Temperaturen oder durch Lösungsmittel-Extraktion wird in beiden Mechanismen das Porensystem zugänglich gemacht und damit das nanoporöse Silica-Material erhalten.^[137–139] Des Weiteren wurden in der Literatur andere Synthesemechanismen vorgeschlagen, die die Bildung von nanoporösen Silica-Materialien unter bestimmten Bedingungen erklären, jedoch nicht verallgemeinert werden können.^[140–143]

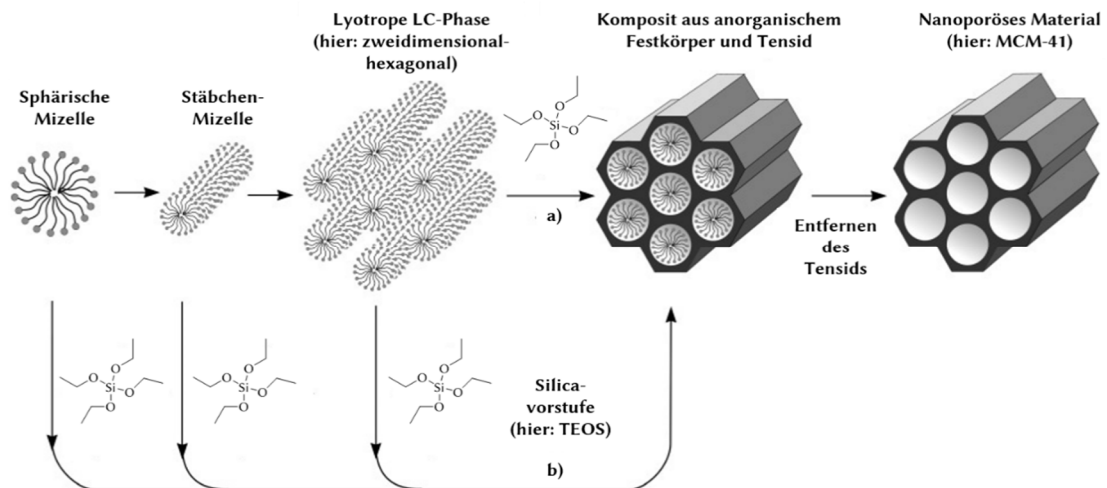


Abbildung 2.6: Mechanismen zur Bildung von nanoporösen Silica-Materialien unter Verwendung von strukturdirigierenden Agenzien: a) echter Flüssigkristall-Templat-Mechanismus und b) kooperativer Flüssigkristall-Templat-Mechanismus (nach Lit.^[137,139]).

Die Einstellung der Partikelgröße kann über die Konzentration der Reaktanden, durch die Zugabe von Additiven oder auch über die Synthesebedingungen (z. B. pH-Wert) erfolgen, denn entscheidend für die Größe der Partikel ist zum einen das Verhältnis zwischen der Hydrolyse und der Kondensation der Silica-Spezies und zum anderen die Wechselwirkung zwischen dem Templat und der Silica-Vorstufe.^[114,144] Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden unterschiedliche Synthesestrategien für die Herstellung von nanoporösen Silica-Partikeln im nanoskaligen Bereich entwickelt. Nanoporöse Silica-Nanopartikel lassen sich z. B. durch modifizierte Stöber-Synthesen herstellen. Grün *et al.* gelang es als erstes die klassische Stöber-Synthese, bei der Tetraalkylsilicate, ein Wasser/Alkohol-Gemisch und als Katalysator Ammoniak verwendet werden, durch die Zugabe eines kationischen Tensids so zu modifizieren, dass Silica-Partikel unter einem Mikrometer erhalten werden konnten.^[145] Durch weitere Verfeinerungen lassen sich mittels dieser Methode auch kleinere Partikel im Bereich von 30–500 nm herstellen.^[146] Des Weiteren kann die Bildung von Silica-Nanopartikeln auch durch stark verdünnte Reaktionslösungen, die das Zusammenlagern der Silica-Mizell-Intermediate zu größeren Aggregaten verhindern,^[147,148] oder durch die Neutralisation der Syntheselösung, um das Wachstum der Silica-Partikel zu stoppen,^[149] begünstigt werden. Die Nutzung von zwei Tensiden, einem ionischen zur Mizellbildung und einem neutralen Blockcopolymer zur Abschirmung der Silica-Partikel-Oberfläche, nutzten Suzuki *et al.* zur Herstellung von Nanopartikeln.^[150] Qiao *et al.* zeigten, dass Additive wie Di- oder Triethanolamin die Bildung von Nanopartikeln begünstigen, da die Pufferwirkung dieser Additive zu einer kontrollierten Hydrolyse und Kondensation der Silica-Vorstufe führt.^[151]

Die Porengröße des Silica-Materials wird durch das verwendete Tensid und dessen Kettenlänge definiert. Dabei ergeben sich Poren mit einer Größe von 2–10 nm.^[11,144] Durch die Zugabe von Quellungsmitteln wie z. B. 1,3,5-Trimethylbenzol kann der

Durchmesser auf bis zu 15 nm vergrößert werden.^[152,153] Auch lassen sich Nanopartikel mit größeren Poren (<15 nm) in einem Öl/Wasser-Gemisch unter Verwendung von Polystyrol als Templat herstellen.^[154] Nanopartikel mit größeren Poren bieten die Möglichkeiten der Einlagerung von größeren Biomolekülen in die Poren oder können als Freisetzungssystem für die Gentherapie verwendet werden. Um das für die Einlagerung verwendete Porenvolumen noch weiter zu vergrößern, werden in der Literatur auch unterschiedliche Synthesen zur Herstellung von hohlen Silica-Nanopartikeln thematisiert.^[11,155,156]

Neben Silica-Partikeln lassen sich auch nanoporöse Silica-Dünnschichten vornehmlich durch das Tauchziehverfahren nach dem EISA-Prozess (*evaporation-induced self assembly*) herstellen. Bei diesem Prozess ist es wichtig, dass die Tensidkonzentration zunächst unterhalb der CMC liegt und erst durch das Verdampfen des Lösungsmittels überschritten wird. Danach ist der Prozess dem Flüssigkristall-Templat-Mechanismus sehr ähnlich.^[139,157]

Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln. Die gezielte Modifizierung der Oberfläche von Silica-Nanopartikeln ist eine vielfältig genutzte Methode, um die Eigenschaften für bestimmte Anwendungen zu verändern. Durch das Aufbringen von funktionellen Gruppen oder Polymeren können z. B. bestimmte Wechselwirkungen zu Wirkstoffmolekülen eingestellt, das Agglomerationsverhalten minimiert und auch die Interaktion mit Zellen gesteuert werden. Die Modifizierung kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: über die Co-Kondensation oder durch die *post-grafting*-Methode.

Bei der Co-Kondensation werden Trialkoxyorganosilane *in situ* bei der Bildung des Silica-Materials umgesetzt. Somit sind die funktionellen Gruppen homogen verteilt in die Silica-Struktur eingebaut. Jedoch ist die in das Netzwerk eingebaute Menge des Trialkoxyorganosilans meist geringer als die Ausgangsmenge in der Reaktionsmischung. Dies wird durch die unterschiedlichen Hydrolyse- bzw. Kondensationsgeschwindigkeiten der beiden Silica-Vorstufen verursacht, sodass es nicht nur zur vernetzten Co-Kondensation der Silica-Vorstufen kommt, sondern auch zu einer Homokondensation des hinzugefügten Trialkoxyorganosilans. Ein weiterer Nachteil der Co-Kondensation ist die eingeschränkte Entfernung des SDAs, da eine Calcination auch zum Zersetzen des organischen Teils der funktionellen Gruppe führen kann.^[137-139] Folglich ist nur eine Extraktion möglich, die meist unvollständig abläuft. Für biomedizinische Anwendungen ist eine unvollständige Extraktion von erheblichem Nachteil, da Tenside schon in geringen Mengen cytotoxisch wirken können.^[158]

Bei der *post-grafting*-Methode werden die funktionellen Gruppen in einem separaten Reaktionsschritt an das Silica-Material angebunden. Aufgrund der reaktiven Silanol-Gruppen auf der Silica-Oberfläche lassen sich funktionelle Gruppen dabei sehr einfach kovalent über Silylierungsreaktionen anbinden. Die Modifizierung erfolgt primär mit Organosilanen vom Typ $(R'O)_3SiR$, ist aber auch durch Reaktionen mit Chlorsilanen bzw. Silazanen möglich. Die Struktur der Partikel bleibt weitestgehend intakt, allerdings kann es zu einer inhomogenen Verteilung der Gruppen auf der

Oberfläche kommen, sodass z. B. nur die äußere Oberfläche der Nanopartikel und die Porenöffnungen modifiziert werden und somit die Poren für die Modifizierung nicht mehr zugänglich sind.^[137–139,159] Eine Ursache für die inhomogene Verteilung kann eine Homokondensation der Trialkoxyorganosilane sein, die bei hohen Konzentrationen der Organosilane und bei einem Überschuss an Wasser auftreten kann.^[160] Diese führt zur Ausbildung von größeren Oligomeren oder dichten Multischichten auf der Silica-Oberfläche, die die Porenöffnungen der Partikel blockieren. Um einer Homokondensation entgegenzuwirken, werden *post-grafting*-Synthesen meist in Toluol und mit geringen Mengen an Organosilanen durchgeführt.^[161]

Ein interessanter Aspekt der *post-grafting*-Methode ist die Möglichkeit der selektiven Modifizierung der äußeren und inneren Oberfläche der Nanopartikel, indem im ersten Schritt die äußere Oberfläche modifiziert wird und durch die anschließende Extraktion des SDAs die innere Oberfläche für eine Modifizierung mit einem weiteren Organosilan zur Verfügung steht.^[162]

2.2.2 Degradation von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Für viele Anwendungsgebiete, speziell aber im biomedizinischen Bereich, ist die Degradation bzw. die hydrolytische Stabilität der NPSNPs ein entscheidender Aspekt. Diese beeinflusst nicht nur die Freisetzungskinetik von Wirkstoffen, sondern auch den Abbau der Nanopartikel im biologischen System. Silica-Nanopartikel degradieren im wässrigen Medium innerhalb von einigen Tagen bis Wochen in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften. Der Auflösungsprozess von amorphem Silica im wässrigen Medium beinhaltet drei Stufen (Abbildung 2.7): a) die Hydratisierung, bei der Wasser im Silica-Netzwerk adsorbiert wird; b) die Hydrolyse, bei der Siloxanbindungen zu Silanol-Gruppen hydrolysiert werden; c) die Abspaltung, bei der ein nukleophiler Angriff eines OH^- -Ions erfolgt und eine Kieselsäure aus dem Netzwerk entfernt wird.^[163] Somit handelt es sich bei den Degradationsprodukten um Kieselsäuren in Form von $\text{Si}(\text{OH})_4$, welche die dominierende Form bei geringen Konzentrationen ($<2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) ist.^[164] Das monomere Produkt ist im Vergleich zu den Polykieselsäuren, die Enzyme binden können, nicht toxisch, diffundiert über den Blutstrom bzw. über das Lymphsystem und wird über den Urin ausgeschieden.^[165,166]

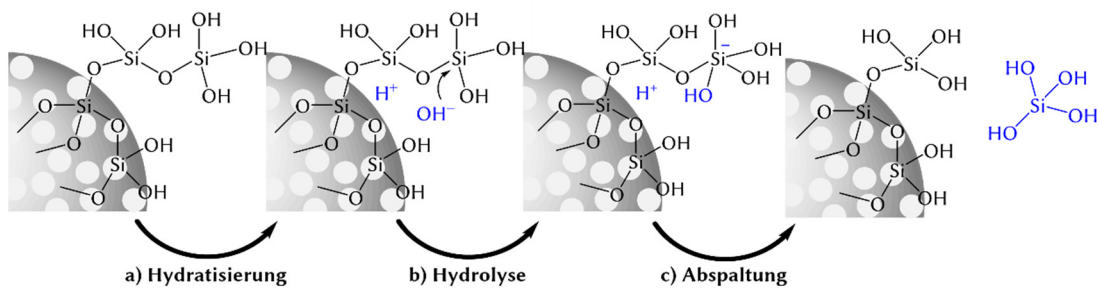


Abbildung 2.7: Darstellung des Auflösungsprozesses von Silica-Nanopartikeln in drei Stufen: a) Hydratisierung, b) Hydrolyse und c) Abspaltung (nach Lit.^[163]).

Die Degradation der Silica-Nanopartikel wird von vielen Faktoren u. a. der Größe und der Porosität der Nanopartikel, dem Medium, der Modifizierung der Nanopartikel und der Konzentration der Nanopartikel beeinflusst.^[163]

Den Effekt der Größe untersuchten Yamada *et al.* 2012 in ihrer Studie zur Degradation von kolloidalen Silica-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Durchmessern (20–80 nm) in wässrigem Medium und unter statischen Bedingungen. Es zeigte sich, dass sich die Degradationsrate bei gleicher spezifischer Oberfläche in Abhängigkeit von der Größe der Nanopartikel nicht veränderte. Jedoch konnte eine deutlich langsamere Degradation bei nicht-porösen Nanopartikel als auch bei Nanopartikelaggregaten beobachtet werden. Folglich konnte gezeigt werden, dass die Degradation unabhängig von der Größe ist, aber stark von der spezifischen Oberfläche der Nanopartikel abhängt.^[167] Die Größenunabhängigkeit der Degradation konnte auch für NPSNPs mit Durchmessern von 150–390 nm von Chen *et al.* in SBF (*simulated body fluid*, simulierte Körperflüssigkeit) bei 37 °C festgestellt werden.^[168] Des Weiteren wurde die Abhängigkeit von der spezifischen Größe von He *et al.* bestätigt.^[169]

Li *et al.* untersuchten die Degradation von NPSNPs in unterschiedlichen simulierten Körperflüssigkeiten. Hierbei wurden NPSNPs mit einem Durchmesser von 80 nm für 7 d bei 37 °C in simulierter Magen- (pH 1.2), Darm- (pH 6.8) und Körperflüssigkeit (pH 7) dispergiert. Die NPSNPs zeigten eine starke Degradation von 50–60 % in den simulierten Flüssigkeiten mit einem pH-Wert von ca. 7. Dagegen nur eine geringe Degradation von ca. 10 % in der simulierten Magenflüssigkeit.^[170] Ein ähnliches Verhalten fanden Lindén *et al.* 2016 für unterschiedlich große NPSNPs heraus. Sie postulierten, dass die Auflösungserscheinungen der NPSNPs folgender Reihenfolge folgen: simulierte Lungenflüssigkeit (pH 7.4) > SBF ≈ PBS (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) > simulierte Magenflüssigkeit. Dabei sollen hauptsächlich die organischen Säuren in der simulierten Lungenflüssigkeit die Auflösung beschleunigen.^[171]

Der Einfluss von unterschiedlichen Modifizierungen der NPSNPs auf ihre Degradation wurde von Cauda *et al.* untersucht. Die einzelnen Modifizierungen führten zu unterschiedlichen Degradationskinetiken in SBF, wobei vor allem die PEGylierten Nanopartikel eine deutlich langsamere Degradation aufwiesen.^[172] Die PEGylierung

mit längeren Kettenlängen, die zu einer dichteren Polymerschicht auf der Oberfläche führten, konnten den Effekt der verlangsamten Degradation in SBF noch verstärken.^[173] Der Effekt von funktionellen Gruppen (Amino- und Carboxy-Gruppen) auf die Degradation wurde auch für nanoporöse Silica-Mikropartikel untersucht. Choi *et al.* stellten fest, dass die Degradation der modifizierten Mikropartikel nach drei Tagen in SBF geringer ist.^[174]

Auch die Konzentration der Nanopartikel spielt eine entscheidende Rolle. Die Löslichkeit von porösen Silica-Nano- und Mikropartikeln liegt in Wasser unter normalen Bedingungen bei 40 mg L^{-1} .^[163,166] Dieser Schwellenwert kann aber durch unterschiedliche Faktoren wie z. B. die Gegenwart von auflösenden Agenzien, den pH-Wert, die Ionenstärke und die Proteinkonzentration verändert werden.^[175] He *et al.* untersuchten u. a. die Degradationskinetiken von nanoporösen Silica-Partikeln in unterschiedlichen Konzentrationen in SBF. Alle drei Proben wurden nach 15 d vollständig degradiert, jedoch zeigte sich besonders in den ersten zwei Stunden ein unterschiedliches Verhalten. Bei einer Konzentration von 0.5 mg mL^{-1} wurden in dieser Zeit nur 35 % degradiert, wohingegen bei einer Konzentration von 0.1 mg mL^{-1} sich schon 90 % des Materials auflösten. Diese Arbeitsgruppe postulierte aufgrund ihrer Untersuchungen auch eine dreistufige Degradation von nanoporösen Silica in SBF. Innerhalb von Stunden erfolgt eine schnelle Auflösung des Bulkmaterials, die von der Bildung von Calcium- und Magnesiumsilicaten gefolgt wird. Diese Silicatschicht auf der Partikeloberfläche bewirkt eine darauffolgende langsamere Degradation innerhalb von Tagen.^[169]

2.2.3 Nanoporöse Silica-Nanopartikel in biomedizinischen Anwendungen

Hinsichtlich der biomedizinischen Anwendung der NPSNPs ist ein entscheidender Faktor die Biokompatibilität des Systems. Somit wird in den folgenden Kapiteln zunächst die Biokompatibilität der NPSNPs in Betracht gezogen und anschließend auf die möglichen Anwendungen vor allem als Delivery-System eingegangen.

Biokompatibilität von nanoporösen Silica-Nanopartikeln. Nach einer Definition von Tang *et al.* werden unter dem Begriff „Biokompatibilität“ sowohl die positiven als auch die negativen Effekte von Nanopartikeln, einschließlich der Cytotoxizität und der *in vivo*-Toxizität, aber auch alle Veränderungen von Zellen und Gewebe auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene zusammengefasst.^[11] Entscheidenden Einfluss auf die Biokompatibilität der NPSNPs haben vorwiegend die Konzentration,^[158,176,177] die Partikelgröße^[146,178,179] und -form,^[180] die Porosität^[181,182] und die Oberflächeneigenschaften^[183] wie Funktionalität^[173,184] und Ladung^[185–187]. Trotz der Vielzahl an *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen bezüglich der Biokompatibilität sind NPSNPs noch nicht für die klinische Anwendung zugelassen,^[11,138,188,189] wobei *in human*-Studien mit solchen Partikeln, z. B. jene von Bukara *et al.* von 2016, als vielversprechend für die Zukunft angesehen werden können.^[12] Generell wird Silica von der FDA mit der Bezeichnung GRAS (*generally recognized as safe*) als ungefährlich eingestuft. Es findet seine Anwendung als

Lebensmittelzusatzstoff, in der Kosmetik und als Träger bei der Tablettenformulierung.^[189] Auch für eine klinische Phase I-Studie wurden die ersten Silica-Nanopartikel, die „C-Dots“ (Cornell dots) von der FDA zugelassen. Dabei handelt es sich um <10 nm große, multifunktionelle Silica-Nanopartikel mit einem fluoreszierenden Kern und einer Poly(ethylenglycol)-Hülle auf der Oberfläche, die mit einem Iod-124-markierten Peptid ausgestattet ist.^[188,190] In Bezug auf die nanoporösen Silica-Nanopartikel gibt es viele widersprüchliche Studien, sodass noch weitere systematische und angepasste Studien durchgeführt werden müssen, bis sich eine Tür für klinische Anwendungen öffnet.^[188,189]

Anwendung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln als Delivery-System. Die intensive Forschung hinsichtlich der Anwendung von NPSNPs als Delivery-System begann 2001 mit dem ersten Einsatz von nanoporösen Silica-Materialien in diesem Bereich. Es handelte sich dabei um MCM-41 (*Mobil Composition of Mater*), welches mit Ibuprofen beladen wurde.^[191] NPSNPs sind aufgrund ihrer großen spezifischen Oberfläche, der einstellbaren Partikel- und Porengröße und der Möglichkeit zur Oberflächenmodifizierung vielversprechende Kandidaten für eine hohe Beladung und eine kontrollierte Freisetzung von pharmazeutischen Wirkstoffen, Proteine und Genen.^[10] Das Ziel von Delivery-Systemen ist es durch eine kontrollierte Freisetzung die Wirkstoffe in gewünschten Mengen am Zielort freizusetzen und somit die Bioverfügbarkeit und die Effizienz des Wirkstoffes zu verbessern und gleichzeitig Nebenwirkungen zu reduzieren.^[188,192] Generell werden die Partikel zur Beladung in einer konzentrierten Wirkstofflösung dispergiert, damit das jeweilige Molekül in den Poren und/oder an der Oberfläche adsorbiert wird.^[193] Die Freisetzungsexperimente erfolgen dann häufig in körperähnlichen Medien wie PBS oder SBF.

Nach der Entdeckung der nanoporösen Silica-Materialien als Delivery-System folgten weitere Studien zur erfolgreichen Beladung und Freisetzung von anderen Wirkstoffen.^[194] Ein wichtiger Schritt zur kontrollierten Freisetzung waren vor allem Studien, z. B. jene von Song *et al.*, die zeigen konnten, dass durch die Modifizierung des SBA-15 mit Amino-Gruppen eine höhere Wirkstoffbeladung erfolgt und dass Ibuprofen kontrollierter freigesetzt wird.^[195] Einen ähnlichen Erfolg konnten Ehlert *et al.* für die Beladung von Ciprofloxacin auf Silica-Schichten erzielen. Durch die Modifizierung mit Sulfonsäure-Gruppen erfolgte eine höhere Beladung mit Ciprofloxacin und durch eine zusätzliche hydrophobe Organosiloxan-Schicht konnte die Freisetzung besser reguliert werden.^[196] Neben der Möglichkeit die Freisetzung durch die Beschichtung mit hydrophoben Gruppen zu verlangsamen bzw. zu regulieren, können auch Beschichtung mit Polymeren und Doppellipidschichten erfolgreich sein.^[184,197] Generell ist die Freisetzungskinetik der jeweiligen Wirkstoffe von einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter abhängig. Die Partikelgröße kann beispielsweise bei einer diffusionskontrollierten Freisetzung entscheidend sein, da eine Verringerung der Partikelgröße zu einer schnelleren Freisetzung führt.^[193] Im Falle einer gleichen Partikelmorphologie können größere Poren zu einer erhöhten Freisetzungsrates führen.^[198,199] Zusätzlich zu diesen Parametern ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Freisetzungskinetik die Oberflächenmodifizierung der

Partikel. Neben den schon erwähnten Möglichkeiten, die Freisetzung durch unterschiedliche Beschichtungen zu regulieren, sind auch die Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und der Partikeloberfläche von Bedeutung. Es kann zu elektrostatischen Anziehungen, Wasserstoffbrückenbindungen, aromatischen oder hydrophoben Wechselwirkungen kommen. Diese Wechselwirkungen können nicht nur die Beladungsmenge bestimmen, sondern auch die Freisetzungskinetiken beeinflussen. Somit ergeben sich unterschiedliche Freisetzungsprofile für nanoporöse Silica-Materialien (Abbildung 2.8).^[194] Profil *a* wird meist bei unmodifizierten Materialien beobachtet, bei denen nur schwache Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Träger vorliegen. Es kommt anfänglich zu einem sogenannten *initial burst release*, gefolgt von einer geringen Freisetzungsrate.^[191] Eine solche Freisetzung eignet sich besonders zur Behandlung von akuten Infektionen, da in einem geringen Zeitraum eine hohe Dosis des Wirkstoffes benötigt wird. Profil *b* zeigt eine Freisetzungskinetik erster Ordnung in Bezug auf die Wirkstoffkonzentration, bei der die Freisetzung durch die Diffusion, die Auflösung der Silica-Matrix und durch stärkere Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Trägermaterial beeinflusst werden kann.^[195,196,200] Für viele biomedizinische Anwendungen, speziell bei Delivery-Systemen über einen längeren Zeitraum, ist eine kontinuierliche Freisetzung nullter Ordnung (Profil *c*) wünschenswert. Hierbei ist die Freisetzung nur zeitabhängig.^[201] Das Freisetzungsprofil *d* zeigt den Verlauf für ein *stimulus responsive*-System. In diesen Systemen wird die Freisetzung durch äußere Einflüsse (z. B. pH-Wert, Temperatur, magnetisches Feld) kontrolliert, indem die Freisetzung reversibel und nur unter Einwirkung eines bestimmten Reizes erfolgt.^[202,203]

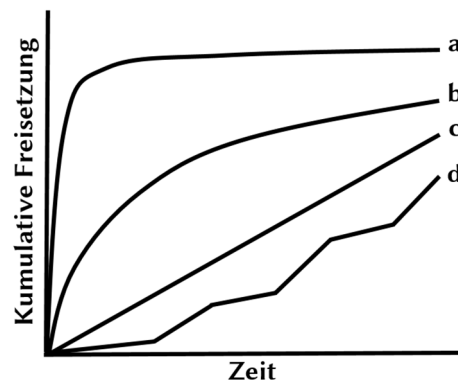


Abbildung 2.8: Wirkstofffreisetzungsprofile für nanoporöse Silica-Materialien (nach Lit.^[194]).

NPSNPs lassen sich nicht nur als Delivery-System für Wirkstoffe wie Antibiotika und Entzündungshemmer verwenden, sondern auch für Enzyme, DNA- und siRNA-Moleküle, Silbernanopartikel und Proteine.^[11] Slowing *et al.* zeigten z. B. die erfolgreiche Einlagerung von Cytochrom C in NPSNPs mit einer Porengröße von 5 nm und deren Freisetzung in HeLa-Zellen.^[204] Ein Delivery-System für Plasmid-DNA und siRNA wurde u. a. von Xia *et al.* auf Basis von NPSNPs mit einer zusätzlichen PEI-

Schicht (Polyethylenimin-Schicht) entwickelt.^[205] Auch eine erfolgreiche Einlagerung von Silbernanopartikeln, welche antibakterielle Effekte aufweisen, konnte z. B. von Park *et al.* gezeigt werden.^[206] Mit der Immobilisierung und Freisetzung von Proteinen wie Wachstumsfaktoren beschäftigt sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich, sodass dieser Teil in Kapitel 2.3.4 detaillierter behandelt wird.

Ein großer Forschungsbereich ist auch die Entwicklung von multifunktionalen Silica-Nanopartikeln. NPSNPs mit einem magnetischen Eisenoxid-Kern beispielsweise finden vor allem in der Tumorthherapie ihre Anwendung. Durch ein externes Magnetfeld können die Partikel in bestimmte Körperregionen gelenkt werden, wo sie dann den notwendigen Wirkstoff freisetzen.^[207] Auch kann das Magnetfeld bei den meist superparamagnetischen Nanopartikeln eine thermische Energie generieren, die zur Freisetzung der Wirkstoffe genutzt werden kann.^[208] Ein großer Vorteil dieser magnetischen NPSNPs ist die Reduzierung von Nebenwirkungen, da die meist toxischen Wirkstoffe für die Tumorthherapie nur am Zielort freigesetzt werden.^[209] Um Partikel in biologischen Systemen zu verfolgen und damit z. B. Akkumulationen auffindig zu machen, können die Nanopartikel mit einem Fluoreszenzmarker auf der Oberfläche ausgestattet werden.^[210] Jedoch ist die Detektionszeit bei solchen Systemen aufgrund von geringen Fluoreszenzlebensdauern und durch das Ausbleichen des Farbstoffes begrenzt.^[211] Eine Alternative stellen fluoreszierende Kern-Schale-Nanopartikel dar, bei denen ein fluoreszierender Kern bestehend aus z. B. Quantendots (CdS)^[212] oder Lanthanoid-dotierten Nanopartikeln (CeF₃:Tb³⁺)^[211] in die NPSNPs eingebaut wird. Auch eine Kombination von fluoreszierenden und gleichzeitig magnetischen NPSNPs ist möglich.^[210]

Somit lassen sich insgesamt auf Basis der NPSNPs sehr komplexe Delivery-Systeme mit verschiedenen Funktionen aufbauen.

2.3 Immobilisierung von Wachstumsfaktoren

Biomoleküle wie Enzyme, Antikörper und auch Wachstumsfaktoren wurden schon auf Oberflächen von unterschiedlichen Biomaterialien immobilisiert, um diese für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen (u. a. Geweberegeneration, Therapeutik, Diagnostik und Biokatalyse) zu nutzen.^[213] Auch nanoporöse Silica-Materialien stehen für die Immobilisierung von Proteinen seit Jahren im Fokus der Forschung.^[144,214] Erstmals wurde nanoporöses Silica 1996 für die Immobilisierung von Enzymen verwendet.^[215]

Im Folgenden wird zunächst auf die allgemeine Stabilität von Proteinen, auf den Mechanismus der Proteinadsorption an Oberflächen und auf die entscheidenden Faktoren für die Adsorption eingegangen. Letztlich werden die unterschiedlichen Strategien für die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf NPSNPs vorgestellt.

2.3.1 Stabilität von Proteinen

Der für die biologische Aktivität eines Proteins essentielle Schritt ist die Proteinfaltung. Anhand der Struktur lassen sich die erhaltenen Proteine in fibrilläre und globuläre Proteine unterteilen. Die meisten Proteine nehmen die globuläre Konformation an. Hierbei ragen die unpolaren Seitenketten der Aminosäuren ins Molekülinnere und die geladenen Aminosäurereste befinden sich auf der Moleküloberfläche. Diese Proteinfaltung wird insbesondere durch hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt, da ein minimaler Kontakt zwischen den Polypeptidketten und dem Lösungsmittel angestrebt wird. Die gefaltete, native Form ist jedoch nur geringfügig stabiler als die entfaltete, biologisch inaktive Form des Proteins, sodass die Proteinstabilität durch geringe Veränderungen von externen Faktoren wie der Temperatur, dem pH-Wert und durch die Zugabe unterschiedlicher Additive beeinflusst werden kann. Diese physikalische Instabilität zeigt sich meist in der Denaturierung der Proteine, der weitere Inaktivierungsprozesse wie die Aggregation und die Adsorption folgen können. Hohe Temperaturen können zu einer Denaturierung führen, die bei einigen Proteinen aber reversibel ist, d. h., dass durch die Senkung der Temperatur wieder die native Struktur zurückgewonnen wird. Häufig führt die Temperaturerhöhung aber auch zu einer irreversiblen Denaturierung, da es zur Aggregation der Protein-Moleküle kommt. Wenn sich der pH-Wert einer Proteinlösung in der Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP) des Proteins befindet, gibt es auf der Oberfläche des Proteins sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen, sodass es zu Protein-Protein-Wechselwirkungen kommen kann, die eine Aggregation begünstigen. Ist der pH-Wert dagegen weit vom IEP entfernt, so liegen hoch geladene Proteinmoleküle vor; repulsive Wechselwirkungen verhindern dann die Aggregation. Stark saure bzw. basische Lösungen können die repulsiven Effekte auch innerhalb des Proteins erhöhen, was wiederum zu einer Entfaltung des Proteins führen kann. Des Weiteren können Zusätze wie z. B. organische Lösungsmittel die Denaturierung der Proteine begünstigen.^[216] Neben der physikalischen Instabilität ist auch eine chemische Degradation der Proteine möglich, die zu einer kovalenten Modifizierung des Proteins führt. Durch chemische Reaktionen wie Hydrolyse und Oxidation kann es hierbei zur Bildung bzw. Spaltung von Bindungen kommen.^[216-219]

2.3.2 Mechanismus der Proteinimmobilisierung auf Oberflächen

Kommt eine Proteinlösung mit einer Festkörperoberfläche in Kontakt, so wird eine spontane Adsorption der Proteine beobachtet,^[220] die meist mit einigen Konformationsänderungen einhergeht. Dies kann damit begründet werden, dass die energiegunstigste Konformation des Proteins in Lösung nicht der energiegunstigsten Konformation auf einer Oberfläche entspricht. Zunächst sind die Proteine in ihrer nativen Struktur nur schwach adsorbiert. Jedoch kann es durch Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Oberfläche zur strukturellen Reorganisation und zum Entropiegewinn kommen, der auf den Verlust der geordneten Sekundärstruktur des Proteins und auf die Freisetzung von Solvatmolekülen zurückzuführen ist. Aufgrund

der vielen notwendigen Rotationen im Molekül, die mit der strukturellen Umordnung einhergehen, ist die Geschwindigkeit des Prozesses relativ langsam, was auch Auswirkungen auf die Desorptionskinetik hat. Eine Konsequenz der Adsorption des Proteins kann letztlich der Verlust der biologischen Aktivität sein. Dies ist stark vom Protein selbst abhängig.^[221] Zum einen kann der Adsorptions-/Desorptionsprozess reversibel verlaufen, sodass das Protein seine biologische Aktivität nach der Desorption beibehält. Zum anderen kann der Adsorptionsprozess aber auch zu einer irreversiblen Konformationsänderung führen, die es dem Protein nicht erlaubt, sich nach der Desorption wieder in seine native Form zu falten.^[222] In einigen Fällen kann die Adsorption so stark sein, dass es nicht mehr zur Desorption kommt.^[223] Des Weiteren gibt es Beispiele, bei denen Proteine ihre biologische Aktivität erst durch die Adsorption zeigen.^[224] Ein großer Vorteil der Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen kann eine Stabilisierung des Proteins sein, die das Molekül z. B. vor der Denaturierung in Lösung schützt.^[225]

2.3.3 Einflüsse auf die Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen

Die Proteinimmobilisierung wird stark durch die Eigenschaften der Proteine und der Oberfläche, aber auch durch externe Parameter beeinflusst.

Die Größe der Proteine hat insofern einen Einfluss auf die Immobilisierung, als dass kleinere Proteine durch ihre höhere Diffusionsgeschwindigkeit schneller am Substrat ankommen und folglich direkt immobilisiert werden können. Im Gegensatz dazu haben größere Proteine zwar eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit, weisen aufgrund ihrer Größe aber mehr Bindungsstellen für eine Interaktion mit der Oberfläche auf. Proteine bestehen aus Aminosäuren, die je nach pH-Wert geladen sein können. Somit ist die Ladung, aber auch die Verteilung der Ladung auf der Oberfläche des Proteins, entscheidend für die Immobilisierung. Generell gilt, dass positiv geladene Bereiche des Proteins bevorzugt an negativ geladene Oberflächen adsorbieren und umgekehrt. Allerdings weisen Proteine interessanterweise eine höhere Oberflächenaktivität in der Nähe ihres IEPs auf, wo die Ladungen des Proteins auf der Oberfläche ausgeglichen sind. Eine mögliche Erklärung dafür kann die Wechselwirkung mit anderen Proteinen in Lösung sein. Am IEP sind die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinmolekülen reduziert, sodass mehr Moleküle an die Oberfläche immobilisiert werden können. Proteine haben einen amphiphilen Charakter, d. h. sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche in der Struktur. In wässrigen Medien sind verstärkt die hydrophilen Bereiche auf der Oberfläche des Proteins präsent, sodass die Proteine zur Adsorption an polare Oberflächen tendieren. Jedoch kann ein Protein Konformationsänderungen eingehen, die auch eine Wechselwirkung mit hydrophoben Oberflächen möglich machen. Die strukturelle Stabilität von Proteinen kann zudem die Immobilisierung auf Oberflächen beeinflussen. Proteine mit einer geringeren Stabilität können schneller in ihre entfaltete Form übergehen, sodass sich mehr Kontaktfläche für die Interaktion mit der Oberfläche ergibt.^[221,226–228]

Für die Interaktion zwischen dem Protein und der Oberfläche sind natürlich auch die Eigenschaften der Oberfläche von Bedeutung. Wie bereits erwähnt, begünstigt eine Entropiezunahme die Proteinimmobilisierung an Oberflächen. Dies ist vor allem bei hydrophoben Oberflächen der Fall, da durch die Adsorption des Proteins an die Oberfläche Wassermoleküle von der Oberfläche freigesetzt werden, was mit einer Entropiezunahme einhergeht. Bei hydrophilen Oberflächen konkurrieren die Proteine mit den Wassermolekülen um die Bindungsstellen, die Wasserstoffbrückenbindungen zu der Oberfläche ausbilden können. Zudem hat die Topographie der Oberfläche einen Einfluss auf die Immobilisierung, da Oberflächen mit z. B. Poren eine größere Oberfläche für die Interaktion mit den Proteinen zur Verfügung stellen als glatte Oberflächen. Die Ladung der Oberfläche beeinflusst die Immobilisierung in einem ähnlichen Maße wie die Ladung des Proteins. Die Ladung der Oberfläche wird vorwiegend durch unterschiedliche funktionelle Gruppen bestimmt, die durch einen Modifizierungsschritt auf der Oberfläche erhalten werden können. Hinsichtlich dieser funktionellen Gruppen weisen Proteine unterschiedliche Affinität auf.^[226,227,229] Die Umgebungsbedingungen, bei denen die Proteinadsorption stattfindet, können den Prozess in gewisser Weise steuern. Eine zunehmende Temperatur führt zu höheren Diffusionsgeschwindigkeiten der Proteine, sodass mehr Protein immobilisiert werden kann. Allerdings können zu hohe Temperaturen auch zur Denaturierung des Proteins führen. Neben der Temperatur kann auch der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielen, denn dieser bestimmt maßgeblich die Ladungen auf der Oberfläche bzw. des Proteins. Außerdem hat der pH-Wert auch einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten, da ein pH-Wert nahe des IEP eine Aggregation der Proteine begünstigt. Des Weiteren wirkt sich die Ionenstärke auf die Proteinimmobilisierung aus. Bei entgegengesetzt geladenen Oberflächen und Proteinen wird durch eine gesteigerte Ionenkonzentration die elektrostatische Anziehung geringer und somit die Affinität zur Adsorption verringert. Dagegen kann eine erhöhte Ionenstärke bei gleich geladenen Oberflächen die attraktiven Wechselwirkungen erhöhen. Letztlich können Zusätze wie andere Proteine oder Tenside einen Effekt auf die Immobilisierung ausüben, indem sie den Adsorptionsprozess durch Bindung an das Protein verändern bzw. mit dem Protein um die Bindungsstellen auf der Oberfläche konkurrieren. Ein Beispiel für ein solches passivierendes Protein sind die Albumine, die die Adsorption von anderen Proteinen minimieren, aber auch Proteine während ihrer Immobilisierung stabilisieren können.^[213,218,221,226,227,230]

2.3.4 Strategien zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren an nanoporöse Silica-Nanopartikel

Für die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren an nanoporöse Silica-Nanopartikel gibt es drei mögliche Strategien: den physikalischen Einschluss, die kovalente Anbindung und die physikalische Adsorption.^[213,231] Von einer erfolgreichen Immobilisierung spricht man, wenn das Protein in hohen Mengen adsorbiert wird und dabei seine biologische Aktivität nicht verliert bzw. nach der Desorption wieder erlangt.

Im Falle des physikalischen Einschlusses müssen die Poren des Silica-Materials groß genug sein, damit die Wachstumsfaktoren in die Poren diffundieren können. Anschließend kann die Porenöffnung durch eine Silanisierung verengt werden, damit das Protein in den Poren eingeschlossen wird. Diese Methode führt dazu, dass das Protein erst durch die Degradation des Silica-Materials freigesetzt werden kann.^[215,231] Eine andere Möglichkeit ist auch, die Silica-Oberfläche mit einem Polymer zu modifizieren, sodass die Diffusion des Biomoleküls kontrolliert wird.^[173] Ein Nachteil dieser Methode ist, dass für die Weitermodifizierung z. T. toxische Lösungsmittel eingesetzt werden müssen, die eine Denaturierung des Proteins hervorrufen können.^[231] Der physikalische Einschluss ist häufig die Methode der Wahl für die Immobilisierung von Biomolekülen in Hydrogele oder Mikrokapseln.^[213]

Bei einer kovalenten Anbindung wird der Wachstumsfaktor durch eine chemische Reaktion an die Oberfläche angebunden. Vor allem eignen sich für eine chemische Anbindung die Amino- bzw. Carboxy-Gruppen der Biomoleküle, die mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen (u. a. Thiol-, Amino-, Carboxy- und Epoxy-Gruppen) auf der Silica-Oberfläche reagieren können.^[232] Ein bekanntes Beispiel ist die Anbindung von Proteinen über ihre primären Amine, indem die Carboxy-Gruppe auf der Oberfläche des Biomaterials durch eine Reaktion mit den Kupplungsreagenzien NHS/EDC (N-Hydroxysuccinimid/1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid) aktiviert wird.^[233] Ein großer Nachteil dieser Methode ist einerseits der mögliche Verlust der biologischen Aktivität des Proteins. Andererseits ist die Methode für die Freisetzung der Wachstumsfaktoren nach der Immobilisierung, die in dieser Arbeit angestrebt wird, nicht geeignet, da die kovalente Bindung zu stark ist und das Protein möglicherweise erst bei der Degradation der Silica-Matrix freigesetzt wird.

Eine kostengünstige Methode, die auch die Freisetzung nach der Immobilisierung der Wachstumsfaktoren ermöglicht, ist die nicht-kovalente, physikalische Adsorption. Auf diese Art von Wechselwirkungen wird sich in dieser Arbeit fokussiert, dabei sind unterschiedliche Interaktionen über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen möglich.^[232,234,235] Welche Wechselwirkungen bevorzugt werden, hängt von den Eigenschaften der NPSNPs und des Wachstumsfaktors unter den gegebenen Bedingungen ab (s. Kapitel 2.3.3).^[226,227] Die Interaktion über Wasserstoffbrückenbindungen ist sehr schwach, sodass diese Wechselwirkungen nur eine untergeordnete Rolle bei der Proteinimmobilisierung spielen. Zu elektrostatischen Anziehungen kommt es, wenn die positiv bzw. negativ geladenen Bereiche des Proteins mit den entgegengesetzt geladenen Oberflächen des Silicas wechselwirken. Weisen die NPSNPs hydrophobe Funktionalitäten auf ihrer Oberfläche auf, so kann es auch zu hydrophoben Wechselwirkungen mit den unpolaren Bereichen des Proteins kommen. Die treibende Kraft für diese Wechselwirkungen ist der Entropiegewinn, der auf die Dehydratisierung an den hydrophoben Bereichen zurückgeführt werden kann. Somit ist die hydrophobe Wechselwirkung für die Proteinimmobilisierung eine nicht zu unterschätzende Wechselwirkung.^[232,235]

NPSNPs eignen sich angesichts der vielen möglichen Oberflächenmodifizierungen hervorragend für eine passgenaue Immobilisierung eines beliebigen Wachstumsfaktors. Einige Beispiele an Modifizierungsmöglichkeiten, die in dieser Arbeit ihre Anwendung finden, und ihre möglichen Wechselwirkungen zu den Wachstumsfaktoren sind in Abbildung 2.9 dargestellt. Auch die hohe spezifische Oberfläche der NPSNPs ist vorteilhaft, da sich viele Adsorptionsstellen anbieten. Obwohl das große Porenvolumen der hier verwendeten NPSNPs aufgrund der zu kleinen Poren nicht für die Immobilisierung genutzt werden kann, bietet die poröse Struktur trotzdem eine größere äußere Oberfläche als beispielsweise nicht-poröse Silica-Nanopartikel der gleichen Größe. In bisherigen Forschungsarbeiten konnte bereits die erfolgreiche Immobilisierung von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren auf modifizierte NPSNPs gezeigt werden. Beispielweise führten BMP-2-beladene, amino-modifizierte NPSNPs zur osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.^[15] Des Weiteren zeigten Untersuchungen von Sun *et al.*, dass NGF-beladene, amino-modifizierte NPSNPs das Neuritenwachstum fördern können.^[16]

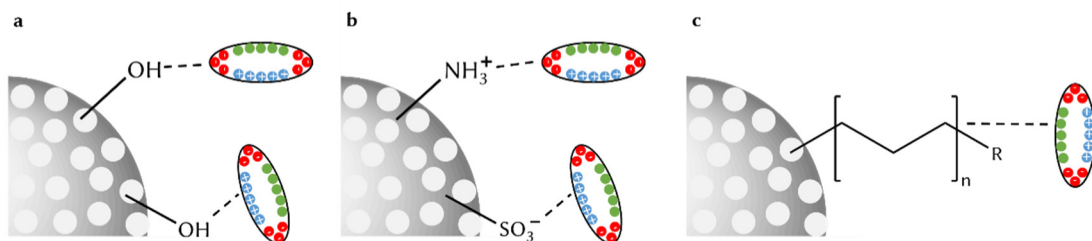


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der physikalischen Wechselwirkungen zwischen NPSNPs und Wachstumsfaktoren: a) Wasserstoffbrückenbindungen; b) elektrostatische Interaktionen; c) hydrophobe Wechselwirkungen (nach Lit.^[226,234]).

2.4 Implantate

Die in dieser Arbeit zu entwickelnden Freisetzungssysteme sollen ihre Anwendung auf unterschiedlichen Implantaten finden. Nach einer Definition von 1986 handelt es sich bei einem Implantat „um eine medizinische Vorrichtung aus einem oder mehreren Materialien, welches innerhalb des Körpers entweder vollständig oder teilweise unter der Haut platziert wird“.^[236] Je nach Einsatzdauer werden temporäre und permanente Implantate unterschieden. Permanentimplantate sind darauf ausgelegt, dass sie die jeweilige Funktion im Körper für die Restlebensdauer des Patienten ausüben und somit langfristig im Körper verbleiben. Dagegen sind temporäre Implantate so konzipiert, dass sie nach einer bestimmten Verweildauer im Körper entfernt werden oder sich abbauen. Insbesondere die biodegradierbaren Implantate sind Gegenstand aktueller Forschung, da dem Patienten eine weitere Operation zur Entfernung des Implantates und mögliche Nebenwirkungen, die die Permanentimplantate häufig mit sich bringen, erspart bleiben sollen.^[236,237] Je nach der Zusammensetzung des jeweiligen Implantates können unterschiedliche Gewebereaktionen

hervorgerufen werden. Von inkompatiblen Implantaten wird gesprochen, wenn es zur Freisetzung von Substanzen in toxischen Konzentrationen oder zur Ausschüttung von Antigenen kommt, die zu Fremdkörperreaktionen, Entzündungsreaktionen und Nekrosen führen können. Bei inerten Implantaten bildet sich eine nicht-adhärenzte Bindegewebskapsel um das Implantat aus. Bioaktive Materialien dagegen haben zur Folge, dass es zu einer Bindung zwischen Gewebe und Implantat kommt und degradierbare Implantate werden letztlich durch das Gewebe ersetzt.^[236,238]

Trotz der Vielzahl an jährlich eingesetzten Implantaten bedarf es noch weiterer Optimierung hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Biofunktionalität und Biointegration. Ein häufiges Problem, welches bei diversen Implantaten unabhängig vom Einsatzort auftritt, ist die Bakterienansammlung im direkten Umfeld des Implantates. Die daraus resultierenden Infektionen können zum Verlust der Implantatfunktion und zu Revisionseingriffen führen. Dabei können Infektionen auch noch Jahre nach der Operation auftreten. Neben dieser allgemeinen Problematik besteht aber auch weiterer Optimierungsbedarf je nach eingesetztem Implantat. In der Forschung werden unterschiedliche Ansätze für die Implantatoptimierung untersucht. Dazu zählen u. a. die Entwicklung von neuen potentiellen Implantatmaterialien und die Funktionalisierung der Implantatoberfläche, indem beispielsweise Delivery-Systeme für Wirkstoffe und bioaktive Moleküle auf der Oberfläche etabliert werden. Wirkstoffe wie Antibiotika finden vor allem ihre Anwendung im Sinne eines Implantat-assoziierten Freisetzungssystems, sodass die Medikamente direkt nur am Wirkort freigegeben werden. Die Freisetzung von bioaktiven Molekülen wie Wachstumsfaktoren wird im Bereich der Regeneration interessant, bei der der Einfluss auf das zelluläre Umfeld und die kontrollierte Bildung neuer Gewebe in Vordergrund stehen.^[2,239,240]

Im Fokus dieser Dissertation stehen zwei Implantatsysteme, die im Folgenden näher betrachtet werden. Zum einen handelt es sich um das Cochlea-Implantat als Beispiel für ein Permanentimplantat, bei dem eine Optimierung der Cochlea-Elektrode u. a. in Bezug auf die Biointegration und Hörqualität gewünscht wird. Zum anderen befasst sich die Arbeit mit der Entwicklung von Delivery-Systemen für die Anwendung auf einem degradierbaren Implantat zur Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs.

2.4.1 Cochlea-Implantat

Seit über 30 Jahren gilt das Cochlea-Implantat, eine elektronische Hörprothese, als Gold-Standard zur Behandlung von Innenohrschwerhörigkeit.^[3] Dabei handelt es sich um eine häufige Form der Schwerhörigkeit, unter der weltweit insgesamt ca. 466 Millionen Menschen (Angabe der Weltgesundheitsorganisation, Stand: März 2018) leiden. Gründe für die Schwerhörigkeit können genetische Defekte, infektiöse Krankheiten, hohe Lärmexpositionen aber auch das Alter sein.^[241] Die Innenohrschwerhörigkeit ist meist durch den Ausfall der Haarzellen begründet. Beim Ausfall der äußeren Haarzellen kommt es zu einem teilweisen Hörverlust. Sind zusätzlich

die inneren Haarzellen beschädigt, führt dies zu einer hochgradigen Schwerhörigkeit oder zur kompletten Taubheit.^[19] Durch das Cochlea-Implantat wird die Funktion der ausgefallenen Haarzellen übernommen und ein Höreindruck durch die direkte Reizung des Hörnervs erzeugt.^[20]

Normaler Hörvorgang. Zum Verständnis der Funktionsweise des Cochlea-Implantates werden vorab anhand von Abbildung 2.10 der Aufbau des Ohres und der Hörvorgang eines gesunden Organs erläutert. Das Ohr lässt sich in drei Hauptbereiche unterteilen: Außen-, Mittel und Innenohr. Schallwellen aus der Umgebung werden von der Ohrmuschel, die wie ein Trichter fungiert, eingefangen. Über den Gehörgang gelangt der Schall zum Trommelfell und versetzt dieses und die Gehörknöchelchen im Mittelohr in Schwingungen. Damit kommt es zur Umwandlung der Schallwellen in mechanische Schwingungen, die am ovalen Fenster an die Flüssigkeit des Innenohres übertragen werden. Durch die Umwandlung gelangt der Schall nahezu verlustfrei von einem Medium mit niedrigem Schallwiderstand (Luft im Außen- und Mittelohr) zu einem Medium mit hohem Schallwiderstand (Flüssigkeit im Innenohr). Im Innenohr bildet sich durch die Schwingungen eine sogenannte Wanderwelle über die Schneckenform aus, die entlang der Basilarmembran an einem frequenzspezifischen Ort ihr Maximum erreicht. Bei einem gesunden Ohr können entlang der Basilarmembran Frequenzen zwischen 20–16 000 Hz aufgetrennt werden. Hohe Töne bzw. hohe Schallfrequenzen „hört“ der Mensch am Schnecken- eingang, tiefe Tönen dagegen eher in der Schneckenspitze. Am Ort des Maximums kommt es zur Verformung der Basilarmembran und somit zur Anregung der auf der Membran sitzenden Haarzellen. Durch die Reizung der Haarzellen wird die mechanische Energie in chemische Signale umgewandelt und an die Nervenzellen bzw. an den Hörnerv weitergegeben. Der Hörnerv übermittelt die Informationen anschließend über elektrische Impulse an das Gehirn, wo letztlich ein Höreindruck entsteht.^[19,20]

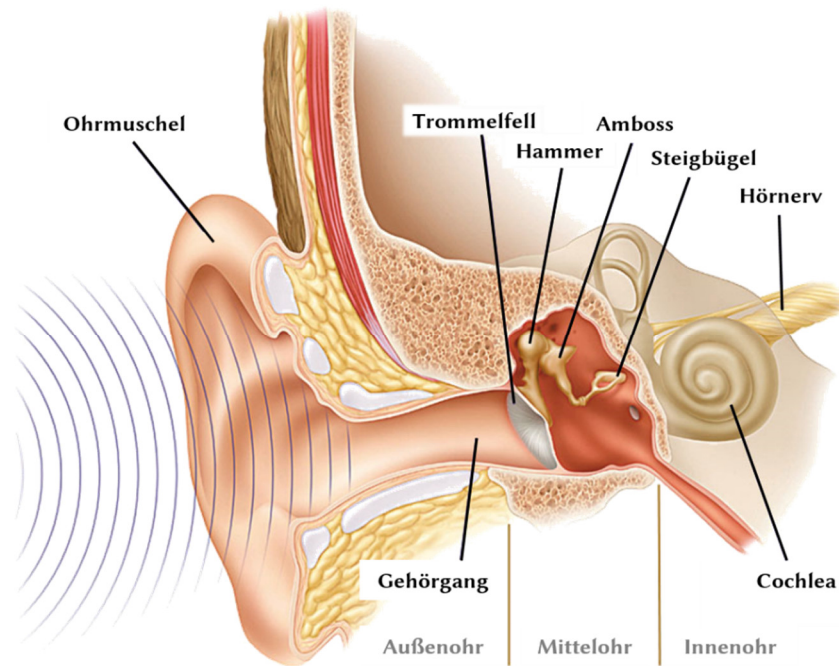


Abbildung 2.10: Aufbau eines gesunden Ohres.^[242]

Funktionsweise des Cochlea-Implantates. Liegt eine Schädigung der Haarzellen vor, die keine Beeinträchtigung des Hörnervs mit sich bringt, kann das Cochlea-Implantat die ausgefallene Funktion übernehmen.

Das Cochlea-Implantat (CI) besteht aus einem externen Teil mit einem Soundprozessor, welcher hinter dem Ohr getragen wird, und einer Sendespule, die seitlich am Hinterkopf fixiert wird. Der interne Teil, bestehend aus der Empfangsspule und der Elektrode, wird implantiert. Bei der Implantation wird für die Empfangsspule ein Teil des Schädelknochens abgetragen und die flexible Elektrode vorsichtig in die *scala tympani* der Cochlea eingeführt. Die Elektrode besteht aus bis zu 24 Platin-Kontakten, die in eine elektrisch isolierende Silicon-Matrix eingebettet sind und über Platin-Iridium-Drähte einzeln angesprochen werden können (Abbildung 2.11).

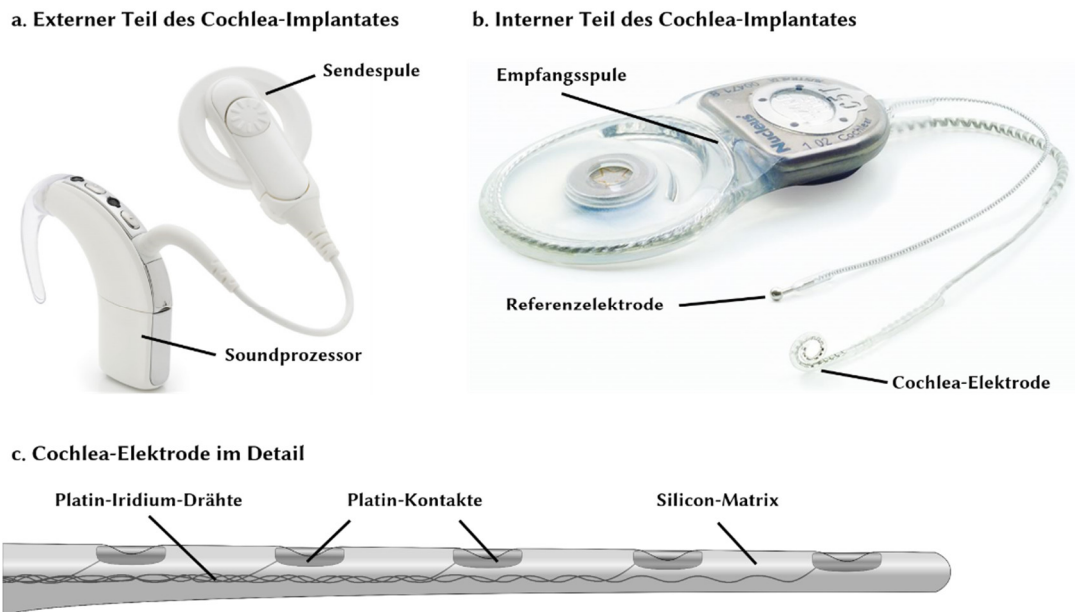


Abbildung 2.11: Aufbau eines Cochlea-Implantates.^[243,244]

Der Hörprozess mit einem Cochlea-Implantat (s. Abbildung 2.12) beginnt mit der Aufnahme des Schalls über ein Mikrofon am Soundprozessor, der die Signale anschließend verarbeitet und in einen digitalen Code umwandelt. Diese digitalen, elektrischen Impulse werden an die Sendespule weitergeleitet und von dort transkutan über Radiowellen oder Induktion auf die Empfangsspule übermittelt. Das Implantat bereitet die elektrischen Impulse auf und gibt sie an die entsprechenden Elektroden in der Cochlea weiter, die ihrerseits direkt die vorhandenen Nervenzellen über elektrische Reize anregen. Durch die Weiterleitung mittels Hörnerv entsteht letztlich eine Hörwahrnehmung im Gehirn.^[3,19]

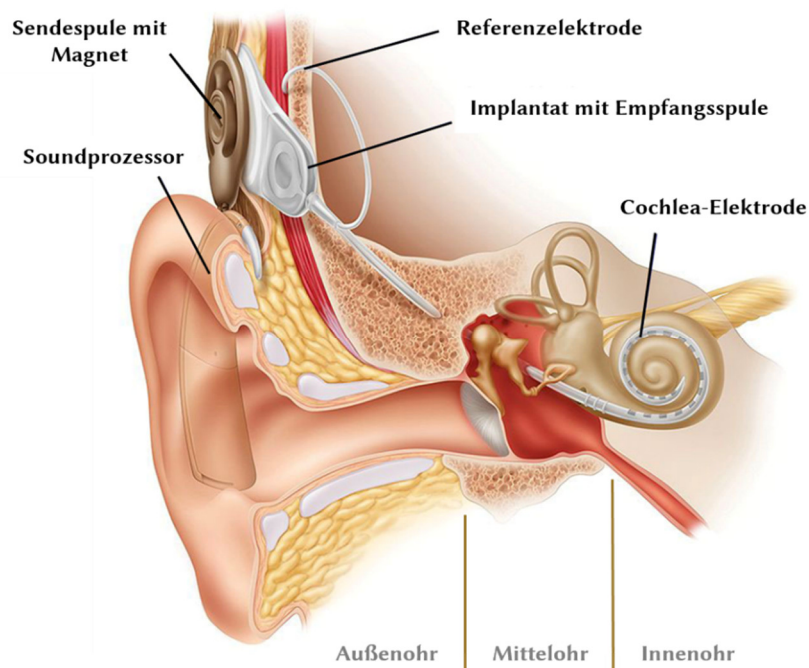


Abbildung 2.12: Aufbau eines Ohres mit eingesetztem Cochlea-Implantat.^[242]

Die Hörwahrnehmung mit einem Cochlea-Implantat ist natürlich nicht mit dem normalen Hören vergleichbar, denn durch die begrenzte Anzahl an Elektroden, die die Aufgabe der Haarzellen übernehmen, ist die Frequenzauflösung vergleichsweise sehr gering. Dies ist für den CI-Patienten vor allem in größeren Menschenmengen und bei der Wahrnehmung von Musik oft problematisch.^[245] Zudem ist der Erfolg einer CI-Implantation individuell sehr unterschiedlich und lässt sich auf verschiedene Kriterien zurückführen. Zunächst hat die Ausgangssituation (Schwere und Dauer des Hörverlustes, Zustand der Cochlea) einen entscheidenden Einfluss auf das Hören mit einem Cochlea-Implantat. Aber auch die individuelle Anstrengung mit dem Cochlea-Implantat zu arbeiten, beeinflusst das verbleibende Hörvermögen erheblich.^[19,246]

Optimierung der Cochlea-Elektrode. Trotz des bemerkenswerten Erfolgs des Cochlea-Implantates bedarf es weiterer Optimierung, um die Hörqualität der Patienten zu verbessern. Neben den generellen Anforderungen der Langzeitstabilität und -funktionalität des Implantates liegt ein Schwerpunkt der Forschung auf der Optimierung der Elektrode, um z. B. die Biokompatibilität, die Biointegration und den Elektroden-Nerven-Kontakt zu verbessern.^[3] Dieser Aspekt wird im Folgenden thematisiert. Jedoch sind auch Weiterentwicklungen in anderen Bereichen, wie dem Soundprozessor, entscheidend für eine bessere Sprachwahrnehmung des Patienten und sollten nicht außer Acht gelassen werden.

Aufgrund des Aufbaus der Cochlea-Elektrode (s. Abbildung 2.11) bieten sich der Forschung vorerst zwei bereits etablierte Materialien, das Platin und die Silicon-Matrix, zur Weiterentwicklung bzw. Optimierung an, bevor neue Materialien für die Cochlea-Elektrode entwickelt werden, da ein solcher Prozess sehr zeit- und kostenaufwendig ist. Hinsichtlich der Silicon-Matrix zeigten Stöver *et al.* unterschiedliche Möglichkeiten zur Funktionalisierung der Silicon-Oberfläche, die in der Literatur thematisiert werden.^[3] Unter dem Aspekt der Entwicklung eines biomimetischen Implantates kann die Oberfläche dabei physikalisch (Änderung der Topographie), chemisch (Beschichtung der Oberfläche), biologisch (Besiedlung mit Zellen) oder biochemisch (Anbindung von Signalproteinen) verändert werden. Auch der Ansatz der Etablierung von Delivery-Systemen auf der Implantatoberfläche wird in dieser Hinsicht erwähnt.^[3] Diese unterschiedlichen Möglichkeiten der Funktionalisierung lassen sich größtenteils auch auf das Platin-System adaptieren.

Eine physikalische Funktionalisierung der Silicon-Oberfläche kann beispielweise mittels Laserablation durchgeführt werden. Durch die erhaltene Mikrostrukturierung konnte ein geringeres Wachstum von Bindegewebszellen wie Fibroblasten auf der Oberfläche beobachtet werden. Dies ist wichtig, da durch die Anlagerung von Bindegewebe an die Elektrode die Impedanz erhöht und somit die Effizienz der elektrischen Stimulation verringert wird.^[247] Zudem konnte in einer weiteren Studie mittels der mikrostrukturierten Silicon- und auch der Platin-Oberfläche ein gerichtetes Wachstum von Neuriten erhalten werden.^[245]

Eine Kombination aus einer chemischen und biologischen Funktionalisierung zeigten Schendzielorz *et al.*, indem die Silicon-Oberfläche zunächst mit einer Polydopamin-Schicht ausgestattet und durch die erhöhte Hydrophilie der Oberfläche die Adhäsion von aus Fettgewebe-stammenden Stammzellen verbessert wurde. Diese Stammzellen können anschließend als Quelle für neurotrophe Faktoren dienen.^[248] Eine Funktionalisierung auf biologischer Basis ist u. a. auch durch die direkte Besiedlung der Materialien mit Zellen möglich. In einer Untersuchung von Warnecke *et al.* konnte mittels dieser Methode die Überlebensrate von Spiralganglienneuronen (SGNs) *in vitro* und *in vivo* verbessert werden, indem lentiviral-modifizierte Fibroblasten zur Sekretion von BDNF auf eine Silicon-Oberfläche aufgebracht wurden.^[249] Die Degeneration der SGNs ist ein Problem, dass mit der Innenohrschwerhörigkeit einhergeht.^[250] Dies konnte sowohl im Tiermodell^[251] als auch bei humanen Cochleae^[252] beobachtet werden. Die Ursache für die Degeneration der SGNs ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch kann die fehlende endogene Versorgung der SGNs mit Neurotrophinen wie BDNF und NT-3 eine mögliche Erklärung sein, da sie hauptsächlich von den Haarzellen und von Stützzellen im sogenannten Corti-Organ produziert werden.^[253,254] Auch eine fehlende Aktivierung der SGNs beim Verlust der Haarzellen kann aufgrund von Nichtgebrauch zur Degeneration führen. Der Degenerationsprozess ist in Abbildung 2.13 dargestellt. Bei einem gesunden Ohr liegt eine Interaktion zwischen den primären auditiven Neuronen (SGNs) und den Haarzellen im Corti-Organ vor. Durch den Verlust der Haarzellen kommt es zur Degeneration der SGNs, die sich in der Rückbildung der Dendriten und in der abnehmenden Anzahl an SGNs zeigt, wobei sich dies mit fortschreitender Schädigung stärker bemerkbar macht. Eine Schädigung des Corti-Organs kann auch zum Verlust der Stützzellen führen, welches das Ausmaß der Degeneration der SGNs noch weiter verstärkt.^[255,256]

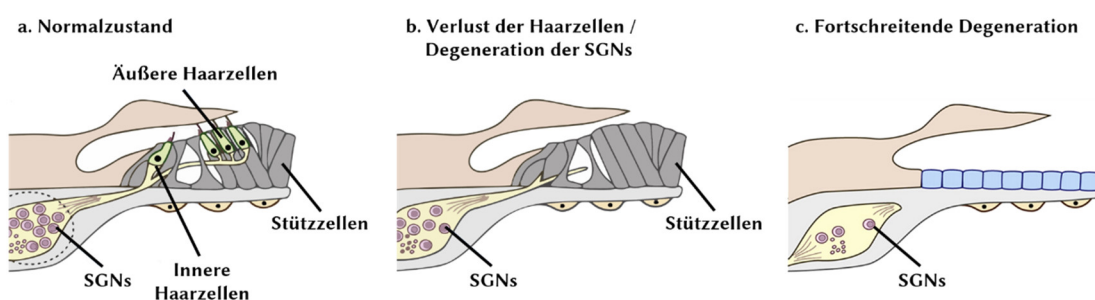


Abbildung 2.13: Zustand des Corti-Organs in einem gesunden Ohr und nach Verlust der Haarzellen in Abhängigkeit vom Fortschritt der Schädigung (nach Lit.^[255]).

Je geringer die Anzahl an SGNs ist, desto schlechter ist auch die Reizweiterleitung mittels eines Cochlea-Implantates, sodass das Überleben der SGNs einen starken Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des CIs hat. Dieser Aspekt führt dazu, dass sich viele Forschungsarbeiten mit der Protektion der SGNs befassen. Neben der Protektion der SGNs sind für einen verbesserten Elektroden-Nerven-Kontakt auch die Regeneration und das zielgerichtete Wachstum der SGNs in Richtung des Cochlea-

Implantates entscheidend, da für eine optimale Stimulation eine möglichst geringe Distanz vorteilhaft ist. Der Abstand zwischen den SGNs im Corti-Organ und der Cochlea-Elektrode in der *scala tympani* beträgt jedoch bis zu 2.3 mm^[257] und zusätzlich befindet sich eine knöchernen Wand zwischen den entscheidenden Strukturen. Somit sind starke elektrische Impulse für eine ausreichende Aktivierung der SGNs notwendig. Dies führt wiederum dazu, dass auch benachbarte Bereiche Reize erfahren und eine fokussierte Stimulation nicht möglich ist.^[245,258] Um dieser Problematik entgegenzuwirken, werden vor allem verschiedene Implantat-assoziierte Delivery-Systeme für neuroprotektive/-regenerative Faktoren, bei denen es sich um kleine Wirkstoffe wie Rolipram^[14,259] und Kreatin^[260] oder um komplexe bioaktive Moleküle wie die Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF handeln kann, erforscht. Diese Systeme bieten den Vorteil, dass durch die Freisetzung der Faktoren vom Implantat aus ein Konzentrationsgradient das zielgerichtete Wachstum der SGNs zur Elektrode begünstigen kann. Dabei gibt es unterschiedliche Ansätze für das Freisetzungssystem, einige ausgewählte Beispiele werden hier näher vorgestellt. Richardson *et al.* konnten eine erfolgreiche Funktionalisierung der Platin-Elektroden mit einer Polypyrrol-Beschichtung zeigen, die zusätzlich als Freisetzungssystem für das Neurotrophin NT-3 diente. Die so beschichteten Elektroden wurden in Meeresschweinchen implantiert und führten zu einer erhöhten SGN-Dichte.^[261] Aber auch Hydrogel-basierte Elektrodenbeschichtungen eignen sich als Freisetzungssystem für Neurotrophine. Solche Beschichtungen konnten sowohl auf dem Platin-Material^[262] als auch auf der Silicon-Oberfläche^[263] aufgebracht werden. Zudem lieferten Untersuchungen mit Freisetzungssystemen auf Basis von partikulären Systemen vielversprechende Ergebnisse. Hierbei wurden beispielsweise PLGA-Partikel mit BDNF beladen und in ein Alginate-Hydrogel inkubiert, welches selbst auf eine Cochlea-Elektrode aufgebracht wurde.^[262] Des Weiteren führten hohle Nanosphären bestehend aus Calciumphosphat zu einem gerichteten Wachstum der neuronalen Zellen, indem sie mit GDNF beladen auf eine CI-Elektrode beschichtet wurden.^[264] Neben den unterschiedlichen Ansätzen, bei denen der neurotrophe Faktor in einem Freisetzungssystem direkt auf das Implantat aufgebracht wird, lassen sich im Hinblick auf eine Implantat-assoziierte Freisetzung auch genetisch modifizierte Zellen zur Sekretion eines neurotrophen Faktors auf die Implantatoberfläche aufbringen, wie bereits eine erwähnte Studie gezeigt hat.^[249]

Trotz der intensiven Forschung hinsichtlich der Implantat-assoziierten Delivery-Systeme sei zu erwähnen, dass auch weitere Ansätze zur lokalen Freisetzung von neurotrophen Faktoren untersucht werden. Da diese Ansätze in der vorliegenden Arbeit keine entscheidende Rolle spielen, sollen diese nur der Vollständigkeit halber an dieser Stelle aufgeführt werden. Zum einen lassen sich neurotrophe Faktoren über eine osmotische Pumpe in die Cochlea einzubringen.^[265,266] Diese pumpbasierende Systeme sind allerdings begrenzt einsetzbar, da das Reservoir nach bestimmten Zeitabständen wieder aufgefüllt werden muss, und die Gegenwart einer Pumpe zudem ein zusätzliches Risiko für Infektionen bietet.^[250] Eine Alternative bietet zum anderen die direkte Injektion von partikulären Systemen, die mit neurotrophen Faktoren

beladen sind. Diese Injektion kann über die Rundfenstermembran oder über eine Cochleostomie erfolgen und sowohl bei der CI-Implantation oder bei einem zusätzlichen Eingriff durchgeführt werden.^[267–269] Mit dieser Methode konnten schon vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, jedoch ist immer die Gefahr einer unkontrollierbaren Verteilung der Partikel innerhalb der Cochlea gegeben.

Strategien des Exzellenzclusters „Hearing4all“ zur Freisetzung von neurotrophen Faktoren. Im Rahmen des Exzellenzclusters „Hearing4all“ werden u. a. unterschiedliche Möglichkeiten der Modifizierung der Cochlea-Elektrode untersucht, um ein Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem für eine langfristige und kontinuierliche Freisetzung eines Wirkstoffs zu entwickeln. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines Freisetzungssystems für BDNF basierend auf NPSNPs. Diese sollen anschließend durch eine Modifizierung der Silicon-Oberfläche auf das Implantat aufgebracht werden und als Delivery-System dienen. Die gewünschte Wirkung der zu entwickelnden Freisetzungssysteme ist in Abbildung 2.14 schematisch gezeigt. Dabei sollen die BDNF-beladenen NPSNPs auf der Implantatoberfläche das BDNF freisetzen und somit einen Konzentrationsgradienten schaffen, der zu einem zielgerichteten Wachstum der SGNs in Richtung des Implantates führt (Abbildung 2.14, rechts). Im Falle einer unmodifizierten Implantatoberfläche kommt es dagegen zur Degeneration der SGNs und teilweise zum Absterben dieser Neurone (Abbildung 2.14, links).

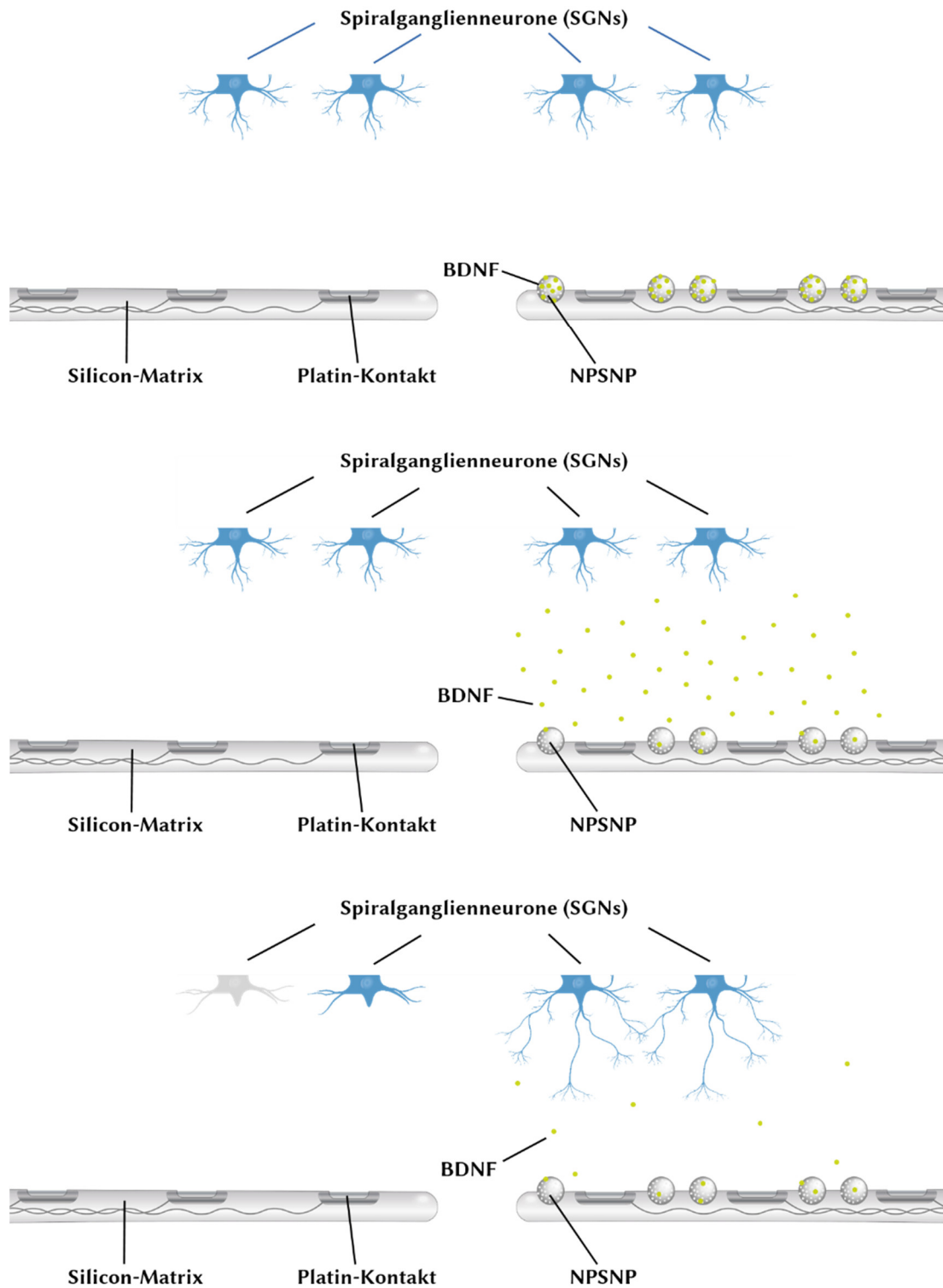


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung einer Cochlea-Elektrode mit (rechts) bzw. ohne (links) BDNF-beladenen NPSNPs und ihre Wirkung auf die SGNs.

Bezüglich des Materials konnten vorherige Studien schon zeigen, dass BDNF-beladene Mikropartikel ($\approx 500 \mu\text{m}$) aus nanoporösem Silica das Überleben von SGNs *in vivo* fördern. Diese Partikel wurden direkt in die Cochlea injiziert und nicht als Implantat-assoziiertes Delivery-System eingesetzt.^[102,268] Zudem lässt sich die Verwendung von Silica-Nanopartikeln im Innenohr als sicher einstufen, da auch gezeigt

werden konnte, dass sie die Cochlea-Funktion nicht beeinflussen.^[270] NPSNPs konnten schon erfolgreich für die Freisetzung von Rolipram verwendet werden, welches als *small molecule drug* zu den neuroprotektiven Faktoren zählt. Hierbei lassen sich die beladenen NPSNPs in die Silicon-Matrix einbetten und eine Freisetzung aus dem Komposit beobachten.^[271] Die Einarbeitung von BDNF-beladenen NPSNPs in die Silicon-Matrix ist dagegen ungünstig, da für das BDNF eher kurze Diffusionswege aufgrund der Größe geschaffen werden sollten, um auch einer möglichen Denaturierung des Proteins entgegenzuwirken. Somit sollte eine Anbindung der BDNF-beladenen NPSNPs auf die Silicon-Oberfläche erfolgsversprechender sein. Eine Kombination der beiden Freisetzungssysteme stellt zusätzlich einen weiteren aussichtsreichen Ansatz dar, weil die gleichzeitige Anwesenheit von Rolipram und BDNF die Überlebensrate von SGNs erhöhen kann.^[14]

Um Delivery-Systeme auf den Platin-Kontakten zu etablieren, wird in der Arbeitsgruppe Behrens z. B. auch an porösen Platinbeschichtungen geforscht, um diese je nach Porengröße und je nach chemischer Oberflächenmodifizierung für unterschiedliche neurotrophe Faktoren zu nutzen.

2.4.2 Gradierte Implantate

Die Regeneration von Gewebeübergängen ist ein immer stärker werdender Zweig in der regenerativen Medizin. Forscher in diesem Bereich sind damit konfrontiert, Methoden zu entwickeln, um eine gleichzeitige Reparatur von mehreren Gewebesystemen zu gewährleisten.^[272] Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen Gewebe meist sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, da unterschiedliche Strukturen und Zusammensetzungen beispielsweise die Funktionalität und die biomechanischen Eigenschaften stark beeinflussen können.^[273] Ein Gewebeübergang von besonderem Interesse ist der Sehnen-Knochen-Übergang, wie er auch in der Rotatorenmanschette der Schulter zu finden ist. Das hohe Aufkommen von degenerativen Rissen in der Rotatorenmanschette und die hohe Wahrscheinlichkeit von wiederkehrenden Rupturen nach einer Operation (20–95 %) führen dazu, dass Verletzungen an der Rotatorenmanschette ein bedeutendes Problem im Gesundheitsbereich darstellen. Jährlich werden beispielsweise allein in den USA 200 000–300 000 Wiederherstellungsvorgänge im Bereich der Rotatorenmanschette durchgeführt. Neben der altersbedingten Degeneration kann es auch zu akuten Rupturen in Folge eines Unfalls kommen.^[274,275]

Sehnen-Knochen-Übergänge. Um die Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs zu verstehen, müssen zunächst die anatomischen Strukturen der einzelnen Gewebearten näher betrachtet werden. Der Übergang von Sehnen, Bändern oder Gelenkkapseln in den Knochen wird als Entthese bezeichnet. Es lassen sich dabei zwei Arten unterscheiden: fibröse und fibrocartilaginäre Entthese. Die fibröse Form, welche aus dichtem fibrösem Bindegewebe besteht, ist die vorherrschende Form an Meta- und Diaphysen der langen Röhrenknochen. Die zweite Form der Entthese, die im Körper häufiger vorkommt und an Epiphysen zu finden ist, weist dagegen einen

vierzonigen Aufbau auf: Bestehend aus der Sehne, gefolgt von nicht-mineralisiertem Faserknorpel, anschließend mineralisiertem Faserknorpel, der letztendlich in den Knochen übergeht (Abbildung 2.15).^[276]

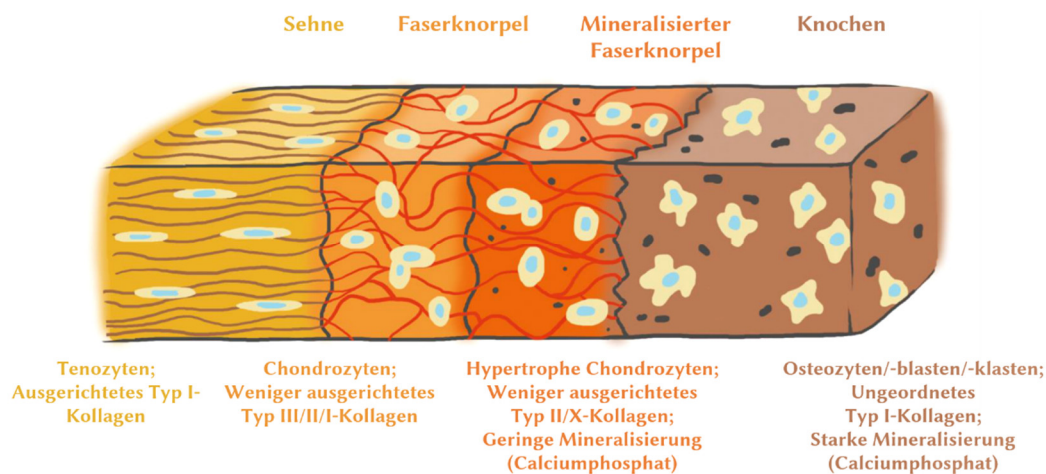


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung einer fibrokartilaginären Entthese aus vier ineinandergreifenden Zonen (nach Lit.^[274,277]).

Die Sehne setzt sich größtenteils aus Wasser und Typ I-Kollagen zusammen. Dabei sorgen die dichten, ausgerichteten Kollagenfasern für die Widerstandskraft der Sehne. Die elongierten Sehnenzellen (Tenozyten) sind in länglichen Reihen zwischen den Kollagenfasern angeordnet. Weitere Zusätze, wie die Proteoglykane, die eine gelartige Matrix ausbilden und damit die Stabilität der Kollagenfasern erhöhen, und Elastin, welches die Elastizität der Gesamtstruktur deutlich steigert, gehören ebenfalls zum Sehnenaufbau dazu.^[278] Bei der zweiten und dritten Zone handelt es sich um Faserknorpel. Faserknorpel ist eine von drei Knorpelformen, die im Körper vorkommen und sich in der Art der Zusammensetzung unterscheiden. Neben der hier beschriebenen Knorpelform gehören noch der hyaline und der elastische Knorpel dazu. Die zweite Zone der Entthese dominieren weniger ausgerichtete Typ III/II/I-Kollagenfasern. Zusätzlich ändert sich der vorliegende Zelltyp von elongierten Sehnenzellen zu eher abgerundeten Knorpelzellen (Chondrozyten). Diese Zellen liegen in der dritten Zone im hypertrophen Zustand zwischen den Kollagenfasern vor, bei denen Typ II-Kollagen dominiert. Außerdem kommt es in diesem Bereich zu einem Anstieg des Mineralgehaltes, der die Steifigkeit des Gewebes erhöht. Dieser Mineralgehalt steigt in der Knochenzone noch weiter an. Der hohe Mineralgehalt lässt sich auf die Calciumphosphat-Kristalle zurückführen, die in einer Matrix aus ungeordneten Typ I-Kollagenfasern vorliegen. Zudem durchziehen die sogenannten Osteozyten die Knochenmatrix.^[273,274,279]

Überblick über mögliche Strategien zur Wiederherstellung von Sehnen-Knochen-Übergängen. Eine konservative Behandlung mittels Schmerztherapie und Krankengymnastik bzw. ein operativer Eingriff führen bei einem Defekt der Rotatorenmanschette oft nur zu einem mäßigen Erfolgserlebnis. Angesichts der geringen Regenerationsfähigkeit von Sehnen-Knochen-Verbindungen, die auf der

Degeneration der Sehne, der geringen Vaskularisation des Faserknorpels und der fehlenden Integration zum Knochen beruht, lässt sich die ursprüngliche Funktionalität kaum wiedererlangen.^[280,281] Diese Problematik führte dazu, dass aktuell in der Forschung eine Vielzahl von unterschiedlichen Ansätzen nach dem Tissue Engineering-Konzept zur Erzeugung eines Sehnen-Knochen-Übergangs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Zum Teil lieferten einige Studien auch schon vielversprechende Ergebnisse, sodass diese im Folgenden vorgestellt werden. Welche Anforderungen für eine erfolgreiche Regeneration des Sehnen-Knochen-Übergangs vom jeweiligen Freisetzungssystem bzw. Scaffold erfüllt werden müssen, postulierten sowohl Chainani *et al.* als auch Prabhath *et al.*^[274,275] Allerdings führt zum derzeitigen Stand noch kein Ansatz zur langfristigen Wiederstellung eines Sehnen-Knochen-Übergangs unter Berücksichtigung aller Aspekte.

In vielen Studien wurde die Herstellung von Konstrukten mit unterschiedlichen Zonen, die definierte Eigenschaften aufweisen, gezeigt.^[272] Dabei wurde jedoch oftmals ein kontinuierlicher Gradient zwischen den einzelnen Zonen nicht berücksichtigt, sodass es an diesen Stellen zu örtlichen Spannungen und Belastungen kommen kann. Nichtsdestotrotz konnten auch erfolgreiche Geweberegeneration für einfache Übergänge zwischen zwei Geweben, z. B. im Bereich der osteochondralen Wiederherstellung,^[282,283] aber auch für komplexe Gewebeübergänge gezeigt werden. Vielversprechende Ergebnisse lieferten in dieser Hinsicht die Studien von Lu *et al.* bezüglich eines kontinuierlichen dreiphasigen Scaffolds für die Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs. Phase A des Scaffolds besteht aus einem PLGA-Gerüst, welches für die Sehnenbildung zuständig ist. Phase B weist gesinterte PLGA-Mikrosphären auf, die die Faserknorpelbildung anregen sollen. Die dritte Phase C ist für die Knochenbildung zuständig und setzt sich aus PLGA-Keramik-Komposit-Mikrosphären zusammen. Für die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen wurden die einzelnen Zonen mit Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten besiedelt. Das zellbesiedelte Scaffold konnte daraufhin eine erfolgreiche Geweberegeneration für alle drei Bereiche zeigen. In Untersuchungen bezüglich der mechanischen Eigenschaften kam es hingegen z. B. zur Abnahme der Streckfestigkeit des Scaffolds in Abhängigkeit von der Implantationszeit, sodass die notwendige Reißfestigkeit für einen Sehnen-Knochen-Übergang aufgrund der relativ schnellen Degradation des Polymers PLGA möglicherweise nicht gegeben ist.^[284,285]

In anderen Studien wurden osteokonduktive Materialien wie Calciumphosphat gradiert auf beispielsweise PLGA/PCL-Fasermatten, welche zuvor plasmabehandelt und mit Gelatine beschichtet wurden, aufgebracht. Die gradierte Mineralisation führte in einem anschließenden *in vitro*-Versuch zu einer gradierten Besiedlung mit MC3T3-Zellen, Vorläufern von Knochenzellen.^[286] Einen ähnlichen Effekt konnten PCL-Fasermatten mit β -Tricalciumphosphat-Nanopartikeln zeigen.^[287] Der Einsatz von osteokonduktiven Materialien scheint für weitere Untersuchungen, in denen man den mechanischen Gradienten mit einem biochemischen Gradienten (Wachstums- bzw. Transkriptionsfaktoren) verknüpft, sehr vielversprechend.

Auch genbasierte Ansätze zur Herstellung eines degradierbaren Implantates mit kontinuierlichen Gradienten wurden untersucht. Dazu beschichteten Phillips *et al.* Kollagenschwämme zunächst gradiert mit Poly-L-Lysin (PLL). Auf dieses Scaffold wurden entsprechend des PLL-Gradienten anschließend Retroviren, die in diesem Fall den osteogenen Transkriptionsfaktor RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) codierten, aufgebracht. Für die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen folgte im letzten Schritt eine Besiedlung mit Fibroblasten. Mit dieser Methode konnte ein Gradient hinsichtlich der osteogenen Differenzierung und der mechanischen Eigenschaften (Mineralgehalt) erhalten werden. Bei den Untersuchungen wurde sich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem kationischen Polymer und der negativen Oberflächenladung der Retroviren zu Nutze gemacht.^[288] Da auch Retroviren für die Codierung von anderen Transkriptionsfaktoren verwendet werden können, könnten auch weitere Retroviren auf die Gerüststruktur aufgebracht werden und somit die Bildung von Sehnen- und Knorpelzellen anregen.

Untersuchungen, bei denen biochemische Gradienten auf einem degradierbaren Implantat durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren zu Stande kommen, sind im Hinblick auf die Zielsetzung der Forschergruppe FOR 2180, mit der sich das folgende Kapitel befasst, sehr interessant. Suciati *et al.* konnten beispielsweise eine räumlich kontrollierte Freisetzung von BMP-2 von Polylactid-Scaffolds (*polylactid acid*, PLA) zeigen, die durch das Sintern von PLA-Mikrosphären hergestellt wurden. Der BMP-2-Gradient wurde durch das Mischen von beladenen und unbeladenen Mikrosphären eingestellt. *In vitro* konnte mithilfe der BMP-2-Freisetzung eine osteogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen (C2C12-Zelllinie) beobachtet werden.^[289] Zudem gelang Wang *et al.* eine osteochondrale Geweberegeneration in ihren Untersuchungen, indem sie BMP-2 und IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) in PLGA- und Seidenfibroin-Mikropartikel einlagerten und diese auf Alginate- bzw. Seidengerüststrukturen brachten. Anschließend wurden die Scaffolds bezüglich ihres Einflusses auf die Knochen- und Knorpelzellbildung humaner MSCs untersucht. Durch gradiertes Aufbringen der Mikropartikel und durch die unterschiedlichen Freisetzungskinetiken war sowohl eine räumliche als auch eine zeitliche Freisetzung der Wachstumsfaktor möglich, wobei die Freisetzung von IGF-1 limitiert war.^[290]

Zielsetzung der Forschergruppe FOR 2180 „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen“. Die Entwicklung eines gradierten, zellfreien Implantates für die anspruchsvolle Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs in der Rotatorenmanschette ist der Hauptaspekt der Forschergruppe FOR 2180 (Abbildung 2.16). Als Grundmaterial dienen elektrogenesponnene PCL-Fasermatten mit einem gerichteten und ungerichteten Faserverlauf, um die Anordnung der Kollagenfasern in der Sehne, dem Faserknorpel und dem Knochen nachzuahmen. Durch unterschiedliche Modifizierungen soll die Fasermatte den notwendigen Anforderungen hinsichtlich der strukturellen und mechanischen Eigenschaften sowie der Funktionalität gerecht werden. Die Fasermatte soll dabei eine gewisse Porosität und Permeabilität aufweisen, um die Zellinfiltration, den Nährstoffaustausch sowie die Angiogenese zu ermöglichen.^[275] Um die PCL-Fasermatte für die

Zellbesiedlung attraktiver zu machen, d. h. die Hydrophilie zu erhöhen, sollen Modifizierungen mittels Plasmabehandlung, chemischer Methoden aber auch durch das Blend-Verfahren durchgeführt werden. Vorteilhaft ist die Verwendung von PCL als Grundmaterial in Bezug auf die guten mechanischen Eigenschaften und die langsame Degradation, die eine vollständige Integration und Regeneration des Sehnen-Knochen-Übergangs ermöglicht.^[275,291,292] Um die PCL-Fasermatten mit einer biologischen Funktion auszustatten, werden nanoporöse Silica-Nanopartikel und/oder Chitosan-Nanopartikel auf die Fasermatten aufgebracht. Dabei dienen diese Partikel als Freisetzungssysteme für die Wachstumsfaktoren BMP-2 (für die knochenseitige Regeneration) und TGF- β 3 (zur Anregung der Knorpelzellbildung) und für den Transkriptionsfaktor Smad8 (L+MH2), der die Sehnenzellbildung fördern soll. Die Einstellung der zeitlichen Freisetzungsrates erfolgt somit durch die unterschiedlichen Freisetzungskinetiken. Eine räumliche Freisetzung wird durch die gradierte Aufbringung der nanopartikulären Systeme auf die Fasermatten ermöglicht.^[22] Am Ende soll ein translationsfähiges Implantat für den Sehnen-Knochen-Übergang vorliegen, welches stabil gegenüber Sterilisation, Lagerung und Handhabung ist.^[275]

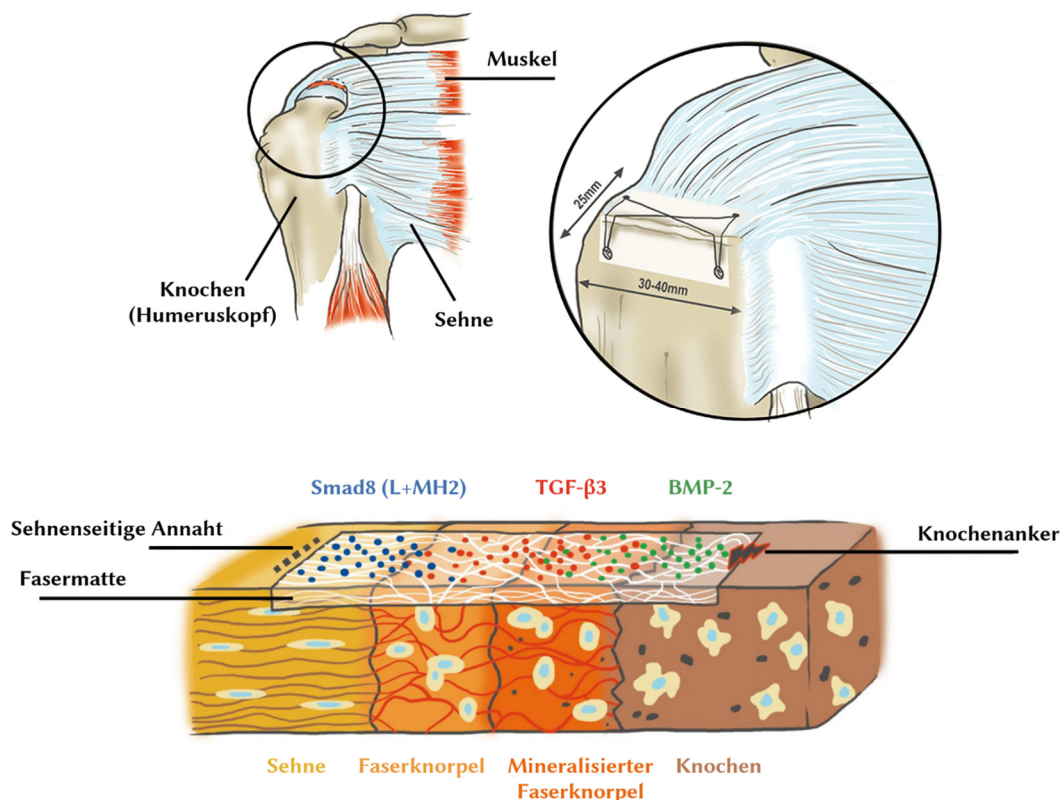


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Rotatorenmanschette der rechten Schulter in der Vorderansicht: Defektsituation z. B. durch einen Sehnenabriss hervorgerufen (oben, links); mit einem Implantat versorgter Defekt unter Angabe der benötigten Abmessungen für den Menschen (oben, rechts vergrößert). Schematische Darstellung des gradierten Implantates: Die blauen, roten und grünen Punkte repräsentieren die nanopartikulären Freisetzungssysteme (unten).^[22]

Spezieller Blick auf die Knorpelzellbildung bzw. die Chondrogenese von MSCs. Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist die Wiederherstellung von Knorpelgewebe durch die Chondrogenese von MSCs. Diese Chondrogenese soll durch die entwickelten Freisetzungssysteme für TGF- β 3 hervorgerufen werden. Somit erfolgt in diesem Kapitel ein spezieller Blick auf die Chondrogenese von MSCs. Die Chondrogenese ist ein essentieller Prozess bei den Wirbeltieren und spielt eine entscheidende Rolle in der enchondralen Ossifikation.^[293] So wird der Prozess der Bildung von allen Knochen des axialen Skeletts über die Zwischenstufe des Knorpels bezeichnet.^[294] Die Chondrogenese beinhaltet eine Reihe von unterschiedlichen Differenzierungsstufen, die mit der Aggregation und Kondensation der MSCs startet und letztlich in der Bildung und Reifung des Knorpelgewebes endet.^[295] Um die chondrogene Differenzierung von MSCs zu verifizieren, lassen sich bestimmte exprimierte Markergene, die für einzelne Stufen spezifisch sind, detektieren (Abbildung 2.17).

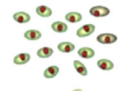
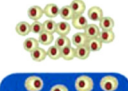
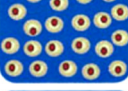
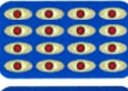

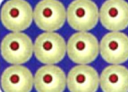
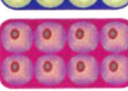
Differenzierungsstufen	Histologische Merkmale	Extrazelluläre Matrix Markergene	Regulierende Markergene
Mesenchymale Zellen – Chondrogene Vorläuferzellen		COL1A1	SOX9, RUNX2
Kondensierte mesenchymale Zellen – Chondroblasten		NCAM1 (COL2A1)	SOX9, (SOX5, SOX6)
Reife Chondrozyten		COL2A1, ACAN, (COMP)	SOX5, SOX6, SOX9
Proliferierende Chondrozyten		COL2A1, ACAN, COMP	SOX5, SOX6, SOX9
Prä-Hypertrophe Chondrozyten		COL2A1, ACAN, COMP, (COL10A1)	RUNX2
Hypertrophe Chondrozyten		COL10A1	RUNX2
Reife hypertrophe Chondrozyten		MMP13, SPP1, ALPL	RUNX2

Abbildung 2.17: Darstellung der Chondrogenese mit den einzelnen Differenzierungsstufen und den dazugehörigen histologischen Merkmalen, den ECM-Markergenen und den regulierenden Markergenen (nach Lit.^[293]).

Der erste offensichtliche Schritt der Chondrogenese ist die Aggregation der MSCs zu Zellkondensaten. Dieser Prozess wird durch die Expression von unterschiedlichen Zelladhäsionsmolekülen wie NCAM (*neural cell adhesion molecule*) vermittelt. Zellen im Kern des Kondensats beginnen anschließend in Chondrozyten zu differenzieren, dabei ändert sich die Zellmorphologie von Fibroblasten-ähnlichen Zellen zu sphärischen Zellen.^[296] Dieser Differenzierungsschritt geht einher mit der Bildung einer extrazellulären Matrix und der Expression von frühen Knorpelmarkern wie COL2A1

(Typ II Kollagen) und ACAN (Aggrecan).^[293,296] Der Transkriptionsfaktor SOX9, welcher in diesem Stadium der Chondrogenese hochreguliert wird, ist essentiell für die Knorpelentwicklung. Die Expression bleibt auf einem hohen Level in den Chondrozyten und wird erst herunterreguliert, wenn die Zellen den hypertrophen Zustand erreichen. Beim Übergang in den hypertrophen Bereich ändert sich auch die Zellmorphologie, indem beispielsweise das Volumen des Cytoplasmas um das Zehnfache ansteigt.^[293] In der hypertrophen Phase kommt es vermehrt zur Expression von COL10A1 (Typ 10 Kollagen), welches auf eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix hindeutet.^[296] Zudem wird von den Zellen wieder der Transkriptionsfaktor RUNX2 exprimiert, wie es schon in den chondrogenen Vorläuferzellen der Fall war.^[297] Erreichen die Zellen schließlich das terminale Stadium, so produzieren sie Markergene wie MMP13 (Matrix-Metalloprotease-13) und ALPL (alkalische Phosphatase), die auch als osteogene Marker definiert werden.^[293] Das MMP13 fördert beispielsweise die vaskuläre Invasion der extrazellulären Matrix, sodass osteogene Vorläuferzellen eindringen können und zu Osteoblasten differenzieren. Diese Zellen bilden die Knochenmatrix, die das Knorpelgewebe letztlich ersetzt.^[296]

Der Wachstumsfaktor TGF- β 3 wie auch die anderen Isoformen können die Kondensation der MSCs und Differenzierung der MSCs zu Chondrozyten fördern.^[296,298] Zudem sollen die TGF- β -Moleküle die weitere Differenzierung zu hypertrophen Zellen unterdrücken.^[296] Dies ist für die Anwendung auf dem gradierten Implantat entscheidend, da durch den Einsatz von TGF- β 3 primär die Knorpelregeneration und nicht die Wiederherstellung des Knochengewebes angeregt werden soll.

3 Methoden und Materialien

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Analysemethoden, die Synthesen und die durchgeführten Experimente vorgestellt. Bei den Charakterisierungsmethoden wird dabei zwischen physiko- und biochemischen Methoden unterschieden.

3.1 Physikochemische Charakterisierungsmethoden

Bei den verwendeten physikochemischen Charakterisierungsmethoden handelt es sich um Standardmethoden, sodass sich hier vornehmlich auf die Beschreibung der gewählten Messparameter beschränkt wird.

3.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Um die synthetisierten Nanopartikel hinsichtlich ihrer Größe und Morphologie zu charakterisieren, wurden transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von Dr. Alexandra Satalov und Dawid P. Warwas an einem TEM Tecnai G2 F20 TMP der Firma FEI Company durchgeführt. Es wurde eine Beschleunigungsspannung von 200 kV verwendet. Für die Präparation wurden die Partikel in Ethanol oder Wasser dispergiert, die Dispersion auf ein Kupfernetz getropft und über Nacht getrocknet. Die grafische Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ 1.49v des National Institutes of Health.

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Morphologisch wurden die Proben an einem Rasterelektronenmikroskop (REM) vom Typ JSM-6610LV der Firma JEOL untersucht. Hierfür wurden die Proben auf ein leitfähiges Graphitklebeband aufgebracht und für 30 Sekunden an einer Bedampfanlage 108auto der Firma Cressington mit einer dünnen Goldschicht versehen. Die Messungen wurden von Dr. Nina Ehlert, Dr. Bastian Hoppe, Marvin Lietzow und Inga Wille durchgeführt.

3.1.3 Infrarotspektroskopie

Mithilfe der Infrarot(IR)-Spektroskopie lassen sich Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung einer Probe ziehen, da funktionelle Gruppen IR-Strahlung mit charakteristischer Energie absorbieren. Die Spektren wurden mit einem Fourier-Transformations(FT)-IR-Spektrometer des Typs Tensor 27 der Firma Bruker aufgenommen. Für alle pulvrigen Proben wurden KBr-Presslinge gepresst, indem eine kleine Menge an Probe mit einem Überschuss Kaliumbromid (KBr) vermischt und fein gemörsert wurde. Die Hintergrundkorrektur erfolgte vor der Probenmessung mit einem reinen KBr-Pressling. Die Proben wurden in einem Bereich von $4\,000\text{ cm}^{-1}$

bis 400 cm^{-1} in Transmission gemessen. Für Messungen an Fasermatten wurde die ATR-Einheit (*attenuated total reflection*, abgeschwächte Totalreflexion) verwendet. Zur Hintergrundkorrektur erfolgte eine Messung gegen Luft. Die Spektren wurden in einem Bereich von $4\,000\text{ cm}^{-1}$ bis 600 cm^{-1} aufgenommen. Die Auswertung aller Spektren erfolgte mit der Software OPUS 5.0 des Messgeräteherstellers.

3.1.4 Physisorption

Die Physisorption wurde zur Untersuchung der spezifischen Oberflächen, der Porenvolumina und der Porenweitenverteilungen der NPSNPs genutzt. Die Messungen wurden von Mandy Jahns und Alexander Mohmeyer an einem Gassorptionssystem Autosorb-3 der Firma Quantachrome unter Verwendung von Stickstoff als Adsorptiv bei 77 K durchgeführt. Vor den jeweiligen Messungen erfolgte eine Aktivierung der Proben für 24 h bei $80\text{--}100\text{ °C}$ im Vakuum. Für die Berechnung der spezifischen Oberfläche wurde das BET-Modell verwendet,^[135] die Bestimmung des dafür notwendigen Relativdruckbereiches erfolgte mithilfe des Micropore BET Assistant, welcher in der Software ASiQwin 2.0 der Firma Quantachrome implementiert ist. Das Porenvolumen wurde bei einem Relativdruck von $p/p_0 = 0.92$ berechnet, um interpartikuläres Volumen auszuschließen. Mithilfe der nichtlokalen Dichtefunktionaltheorie (NLDFT)^[299] erfolgte eine Modellierung der Isotherme zur Bestimmung der Porenweitenverteilung. Hierfür wurde der Kernel „N2 at 77 K on silica (cylindrical pore, NLDFT equilibrium model)“ eingesetzt.

3.1.5 Thermogravimetrie

Thermogravimetrische (TG) Messungen wurden von Katharina Nolte an einem STA 429 CD Thermoanalysator und von Marc Krey an einem STA 409 PC Thermoanalysator der Firma Netzsch angefertigt. Beim ersten Messgerät wurde in Luftatmosphäre und beim zweiten Messgerät in einem Argon/Sauerstoff-Gemisch (80 %:20 %) gearbeitet. Alle Proben wurden mit einer Heizrate von 5 K min^{-1} bis $1\,000\text{ °C}$ erhitzt. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Proteus Thermal Analysis 4.3.1 der Herstellerfirma.

3.1.6 Elementaranalyse

Für die Bestimmung des Kohlenstoff- und Schwefelgehaltes der modifizierten Nanopartikel wurden C/S-Analysen angefertigt. Die Messungen wurden von Claudia Schulze an einem Analysator des Typs CS 2000 der Firma Eltra durchgeführt. Die Proben, jeweils in Dreifachbestimmung, wurden im Sauerstoffstrom verbrannt und als Kohlenstoff- bzw. Schwefeldioxid nach einem Trocknungsschritt mit einem Infrarot-Detektor detektiert. Die Kalibration des Gerätes erfolgte mittels Standardproben, die einen definierten Kohlenstoff- bzw. Schwefelgehalt aufweisen.

3.1.7 Zeta-Potential-Messung

Mithilfe der elektrophoretischen Lichtstreuung wurde das Zeta-Potential der Partikel, welches mit der Oberflächenladung dieser korreliert, bestimmt. Die Messungen erfolgten an einem Zetasizer Nano ZSP der Firma Malvern Instruments. Zusätzlich wurde ein MPT2 Autotitrator derselben Firma verwendet, da die Messungen meist in Abhängigkeit vom pH-Wert durchgeführt wurden. Zur Probenpräparation wurde eine Nanopartikeldispersion in Reinstwasser bzw. PBS mit einer Konzentration von 0.5 mg mL^{-1} hergestellt. Die Messdaten wurden mit der Software Malvern Zetasizer 7.11 ausgewertet.

3.2 Biochemische Charakterisierungsmethoden

Aufgrund des biomedizinischen Hintergrundes dieser Arbeit mit potentiellen Anwendungen auf Implantaten werden die biochemischen Charakterisierungsmethoden ausführlicher beschrieben.

3.2.1 ELISA

Wie bereits in Kapitel 2.1.3 erwähnt wurde, ist einer der wichtigsten ELISA-Formen der sogenannte „Sandwich-ELISA“, bei dem das zu untersuchende Antigen zwischen zwei Antikörpern gefangen wird. Die Wellplatte wird mit einem primären Antikörper vorbeschichtet, an den die Antigene, die sich in der zu untersuchenden Probe befinden, binden können. Dann wird ein sekundärer, biotinylierter Antikörper zugeben, der das Sandwich vervollständigt. An die biotinylierte Stelle bindet anschließend ein Peroxidase-Komplex, welcher die enzymatische Farbreaktion des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (TMB) katalysiert (Abbildung 3.1). Vorteilhaft ist vor allem die hohe Spezifität dieser Methode, jedoch werden zwei Antikörper benötigt, die an unterschiedliche Bereiche des Antigens binden müssen.

In dieser Arbeit wurde der ELISA zur Quantifizierung von zwei Wachstumsfaktoren verwendet. Hierfür wurden ELISA Kits von unterschiedlichen Herstellern erworben, sodass die detaillierte Durchführung der einzelnen ELISAs in Abschnitt 3.3.8 folgt.

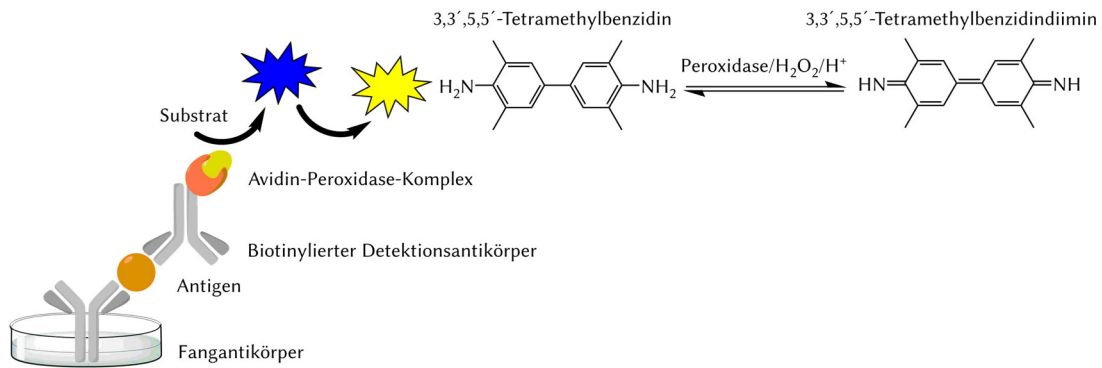


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines „Sandwich-ELISAs“ zur Quantifizierung der Wachstumsfaktoren. Die enzymatische Farbreaktion beinhaltet die Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zu gelbem 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin, welches bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden kann. Die Menge des zu untersuchenden Antigens ist proportional zur gemessenen Absorbanz.

3.2.2 Cytokompatibilitätstests mit Fibroblasten

Die generelle Cytokompatibilität von ausgewählten Proben wurde mit murinen Fibroblasten (NIH3T3) getestet. Die Zelltests orientierten sich hinsichtlich der Durchführung an vorherigen Untersuchungen von Williams *et al.*^[158]

Zunächst wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von $1\ 000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ der zu untersuchenden Nanopartikel mit sterilem Wasser hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden Nanopartikeldispersionen mit folgenden Konzentrationen angefertigt: $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $250\ \mu\text{g mL}^{-1}$ und $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von 10 000 Zellen pro Well (96-Wellplatte) in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, standardisiertes Nährmedium) kultiviert, welches mit 10 % FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) sowie 1 % Penicillin und Streptomycin versetzt war. Die Kultivierung fand in einem Inkubator für drei Tage bei $37\ ^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 statt. Nach der Inkubation wurde das Medium gewechselt und 50 μL frisches Medium und 50 μL der jeweiligen wässrigen Nanopartikeldispersion zu den Wells gegeben. Durch die 1:1-Verdünnung mit dem Medium wurden letztlich folgende Nanopartikelkonzentrationen auf ihre Cytokompatibilität getestet: $5\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $125\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $250\ \mu\text{g mL}^{-1}$ und $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Bei der Inkubation über vier Tage wurde täglich die Morphologie und Proliferation der Zellen am Durchlichtmikroskop des Typs CKX41 mit der CCD-Kamera des Typs Colorview und der Software CellP der Firma Olympus dokumentiert.

Zur Bestimmung der Zellviabilitäten wurde der Neutralrot-Test (NRU, *neutral red uptake assay*) durchgeführt. Der Test basiert auf einer Farbreaktion, durch die lebende und tote Zellen unterschieden werden können. Der Farbstoff Neutralrot diffundiert dabei durch die Zellmembran und wird in den zellulären Lysosomen akkumuliert. In geschädigten/toten Zellen ist die Fähigkeit, Neutralrot aufzunehmen, vermindert, da sie keine intakten Lysosomen mehr besitzen. Somit lassen sich durch die Menge des zellulär gebundenen Farbstoffes Rückschlüsse auf die Zellviabilität

ziehen.^[300] Zur Durchführung wurde eine Neutralrot-Stammlösung mit einer Konzentration von 4 mg mL^{-1} hergestellt und mit vorgewärmtem ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) DMEM 1:50 verdünnt. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt, $100 \text{ }\mu\text{L}$ des Neutralrot-Mediums pro Well hinzugegeben und 3 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen, indem das Medium entfernt und eine wässrige Lösung mit 1 % Calciumchlorid und 0.5 % Formaldehyd zugegeben wurde. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Fixierlösung entfernt und für eine Inkubationszeit von zehn Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ das Neutralrot aus den Zellen mit $100 \text{ }\mu\text{L}$ einer wässrigen Lösung mit 1 % Essigsäure und 50 % Ethanol (95 %) herausgewaschen. Die quantitative Bestimmung der aufgenommenen Farbstoffmenge erfolgte mittels der Absorptionsbestimmung in den Überständen bei einer Wellenlänge von 570 nm an einem Multiplatten-Reader Multiskan der Firma Thermo Fisher Scientific.

Die Cytokompatibilitätsuntersuchungen wurden von Dr. Jennifer Schulze an der Medizinischen Hochschule Hannover (AG Warnecke, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) durchgeführt.

3.2.3 *In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven und -regenerativen Effekt von BDNF mit Spiralganglienzellen

Für die Untersuchung des neuroprotektiven und -regenerativen Effektes von BDNF-beladenen Nanopartikeln und freigesetzten BDNF-Mengen wurden Zelltests mit Spiralganglienzellen durchgeführt.

Gewinnung der Spiralganglienzellen. Spiralganglienzellen (SGZs) wurden aus den Cochleae von neonatalen Sprague Dawley Ratten (postnatale Tage 3–5) isoliert. Dabei erfolgte das Präparieren der Cochleae und die enzymatische und mechanische Dissoziation der primären Zellkultur nach einem bereits beschriebenen Protokoll von Wefsteadt *et al.*^[301] Dazu wurde die HBSS-Lösung (*Hanks' Balanced Salt Solution*), in der die SGZs aufbewahrt wurden, abgetrennt und 2 mL erwärmte Verdaulösung, bestehend aus HBSS mit 0.1 % Trypsin und 0.01 % DNase (Desoxyribonuklease), dazugegeben. Nach einer Inkubation von 16 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter intermittierenden Schütteln wurde die Verdaulösung durch Zentrifugation abgetrennt und die Zellen mit $200 \text{ }\mu\text{L}$ warmen FCS versetzt, um den Verdau zu stoppen. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 1 mL serumfreien Medium, welches hinzugegeben und wieder abgezogen wurde. Anschließend wurde 1 mL serumfreies Medium hinzugegeben und dieses zum mechanischen Verdau ca. 60 x auf- und abgezogen. Beim serumfreien Medium handelte es sich um das SGZ-Standardmedium bestehend aus Panserin 401, welches mit HEPES (25 mM, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Glukose (6 mg mL^{-1}), Penicillin (30 U mL^{-1}), N-2-Zusatz ($3 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) und Insulin ($5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) versetzt wurde. Anschließend wurde die Anzahl an lebenden Zellen in der Neubauer-Zählkammer mithilfe des Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt. Zur Zellzählung wurden $10 \text{ }\mu\text{L}$ Zellsuspension mit

10 μL Trypanblau verdünnt und 10 μL dieses Gemisches in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Am Ende wurden pro Well (96-Wellplatte) 10 000 Zellen in 50 μL Medium zugegeben.

Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen. Für die Untersuchungen wurden 96-Wellplatten mit Poly-D/L-Ornithin (0.1 mg mL^{-1}) und Laminin (0.01 mg mL^{-1}) beschichtet. In die beschichteten Wells wurden dann 50 μL Zellsuspension und 50 μL der zu untersuchenden Probe (Nanopartikeldispersion bzw. Release-Überstand) gegeben. Die detaillierte Beschreibung der Probenpräparation erfolgt in Kapitel 3.3.13. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 48 h. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch die Zugabe einer 1:1-Mischung aus Aceton und Methanol für 10 min fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und in 150 μL PBS bei 4°C bis zur Färbung aufbewahrt. Als Kontrollen befanden sich auf jeder Wellplatte die Einsaatkontrolle, bei der die Fixierung schon nach 4 h erfolgte, eine Negativkontrolle (SGZ-Standardmedium), eine Positivkontrolle (SGZ-Standardmedium mit einem BDNF-Zusatz von 50 ng mL^{-1}) und eine zusätzliche Kontrolle bestehend aus einem 1:1-Gemisch aus PBS (0.1 % BSA; *bovine serum albumin*) und serumfreiem Medium. Neben den Standardkontrollen der MHH (Positiv- und Negativkontrolle) wurde die erwähnte Zusatzkontrolle mituntersucht, da alle zu untersuchenden Proben auf einer PBS (0.1 % BSA)-Lösung basierten.

Bestimmung der Überlebensrate und der Neuritenlänge der Spiralganglienneurone. Um die Überlebensrate und die Neuritenlänge der Spiralganglienneurone (SGNs) zu bestimmen, mussten die Neurone zunächst identifiziert werden, da es sich bei der gewonnenen Zellkultur um eine Mischkultur aus Neuronen, Gliazellen und Fibroblasten handelt. Die Visualisierung der Neurone erfolgte durch eine spezifische Färbung über einen primären Neurofilament-Maus-Antikörper (monoklonal, 200 kDa), einen sekundären, biotinylierten Antikörper und einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex mithilfe des Vectastain Elite ABC Kits und der genauen Befolgung des zuvor beschriebenen Protokolls.^[301] Dabei wurden die Antikörper-Komplexe letztlich durch die Zugabe von Diaminobenzidin angefärbt und überlebende Neurone als Neurofilament-positiv bezeichnet, wenn sie eine Neuritenlänge von mindestens drei Zellkörpern (Soma) aufwiesen.^[302] Die Neurone wurden mit einem inversen Mikroskop des Typs CKX41 der Firma Olympus visualisiert und der neuroprotektive Effekt bestimmt, indem die Überlebensrate der SGNs ermittelt wurde. Dafür wurde die Anzahl der überlebenden SGNs nach 48 h zur Anzahl der Neurone in der Einsaatkontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Um den neuroregenerativen Effekt zu bestimmen, wurden die fünf längsten Neurone eines Wells (ein Neuron im Zentrum und vier Neurone im Umkreis) ausgewählt und mithilfe der Software CellP vermessen.

Alle *in vitro*-Untersuchungen mit SGZs wurden in einem Zeitraum von Oktober 2015 bis Januar 2018 von Dr. Jennifer Schulze an der Medizinischen Hochschule Hannover (AG Warnecke, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) durchgeführt.

Statistische Analyse. Die statistische Analyse der Daten der *in vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven und -regenerativen Effekt von BDNF auf SGNs erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5. Es wurde eine Einweganalyse der Varianz (*one-way analysis of variance*; ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni's Mehrfachvergleichstest (*multiple comparison test*) durchgeführt. P-Werte von weniger als 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle quantitativen Daten stellen Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Ansätzen (N) und mindestens einer Dreifachbestimmung (Triplets) jeder Probe (n) dar. Die Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt angegeben: n.s. = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.4 Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen

Die Untersuchungen zur Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) wurden genutzt, um einen möglichen chondrogenen Effekt der TGF- β 3-beladenen Nanopartikel, der freigesetzten TGF- β 3-Mengen von den Nanopartikeln und der PCL-Fasermatten, funktionalisiert mit TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln, nachzuweisen. Die Probenpräparation und die zu untersuchenden Bedingungen werden in Kapitel 3.3.13 näher erläutert. Alle Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Yvonne Roger in einem Zeitraum von September 2017 bis August 2018 an der Medizinischen Hochschule Hannover (AG Hoffmann, Klinik für Orthopädie) durchgeführt. Die detaillierten Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind der Tabelle 7.2 im Anhang zu entnehmen.

Kultivierung und Expansion der MSCs. Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark isoliert und in einer Zellkulturflasche mit MSC-Growth Medium (MSC-GM) expandiert. Zum Expandieren wurden die Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und das Medium nach dem Anwachsen der Zellen (ca. 4–6 h) und danach alle drei bis vier Tage gewechselt. Bei 70–80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden zunächst 20 mL PBS und anschließend 5 mL Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) auf die Zellen gegeben. Es folgte eine fünfminütige Inkubationszeit und zusätzlich mehrmaliges Klopfen gegen die Flasche, um das Ablösen der Zellen zu beschleunigen. Auf die abgelösten Zellen wurden dann 15 mL MSC-GM pipettiert und durch mehrmaliges Spülen eine homogene Suspension erzeugt. Durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in der Suspension vereinzelt. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, indem 20 μ L der Suspension in die Kammer gegeben wurden.

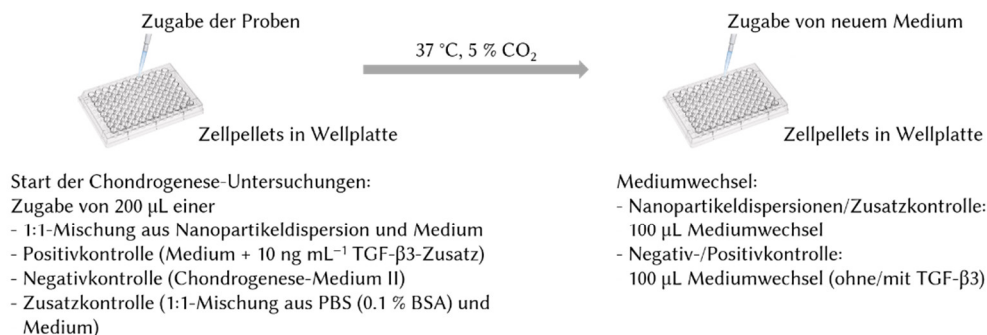
Durchführung der Chondrogenese. Die Untersuchungen zur Chondrogenese der MSCs mit den Nanopartikeldispersionen und den Release-Überständen erfolgten mit

Zellpellets, um durch die 3D-Kultivierung die Körperbedingungen besser zu simulieren.^[298] Bei den Untersuchungen mit den PCL-Fasermatten wurde dagegen die Zellsuspension direkt auf die Fasermatte gegeben.

Die benötigte Anzahl an Zellen, von den zuvor gewonnenen MSCs, wurde zunächst zentrifugiert (5 min, 200 g), der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in einem Chondrogenese-Medium I resuspendiert, wobei dafür 200 μL Medium pro 125 000 Zellen hinzugegeben wurden. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, 200 g) und ebenfalls das Verwerfen des Überstandes. Die Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einem Chondrogenese-Medium II resuspendiert.

Für die Kultivierung mit Zellpellets wurden jeweils 200 μL der entstandenen Suspension (125 000 Zellen) zu den Wells gegeben. Damit die Zellen ein Pellet bilden, wurden die Platten für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Für die darauffolgende Inkubation wurden die Platten in einen Inkubator (37 °C, 5 % CO_2) gelegt, wobei das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Beim ersten Mediumwechsel nach 48 h erfolgte ein kompletter Mediumwechsel und anschließend die Zugabe der zu untersuchenden Proben. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Chondrogenese der MSCs über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht. In Abbildung 3.2 sind die Vorgehensweisen für die jeweiligen Untersuchungen mit Nanopartikeldispersionen bzw. Release-Überständen beschrieben.

a. Untersuchungen mit Nanopartikeldispersionen



b. Untersuchungen mit Release-Überständen

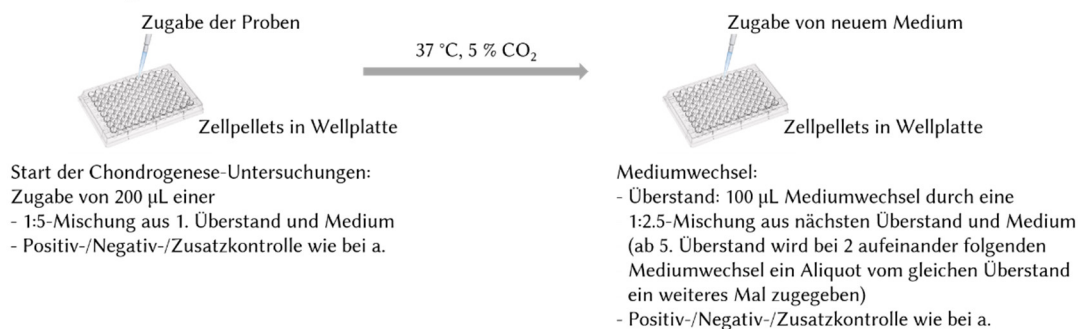


Abbildung 3.2: Ablauf der Untersuchungen zur Chondrogenese von MSCs mit Nanopartikeldispersionen (a) bzw. Release-Überständen (b).

Für die Untersuchungen mit den Fasermatten wurden jeweils 500 μL einer Zellsuspension mit 50 000 Zellen direkt auf die Faserplatte in einem Well gegeben und damit die Chondrogenese der MSCs gestartet. Die Inkubation fand für einen Zeitraum von 28 Tagen bei 37 °C und 5 % CO_2 statt. Die detaillierte Vorgehensweise für den Start der Untersuchungen und für den Mediumwechsel ist in Abbildung 3.3 beschrieben.

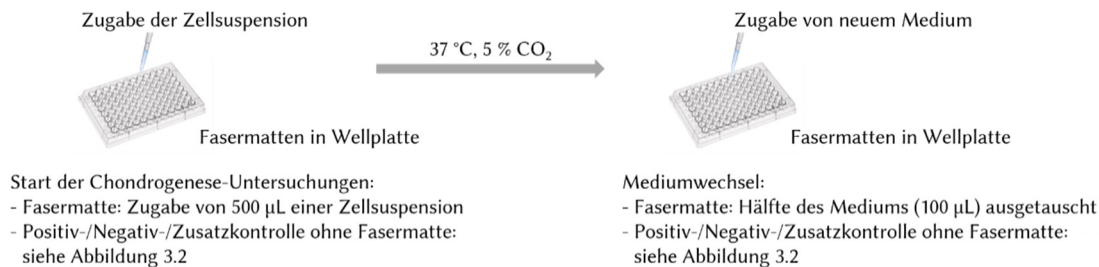


Abbildung 3.3: Ablauf der Untersuchungen zur Chondrogenese von MSCs mit Fasermatten.

DNA- und Glykosaminoglykan-Bestimmung. Um den DNA- und den Glykosaminoglykan-Gehalt zu bestimmen, müssen die Zellen zunächst mittels Papain enzymatisch verdaut werden. Diese Methode war als Analysemethode nur bei den Zellkulturuntersuchungen mit den Zellpellets möglich. Dazu wurden die Pellets nach der Chondrogenese mit PBS gewaschen und 200 μL einer Papain-Verdauungslösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln für 18–24 h bei 60 °C.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes ist wichtig, um mögliche Abweichungen in der Zellmenge der Proben auszugleichen. Dies ist mithilfe des Farbstoffs Hoechst 33342 möglich, da der Farbstoff sich in die AT-reichen Sequenzen der DNA einlagern kann. Der Fluoreszenz-Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und nach der Bindung an die DNA gibt es ein Emissionsmaximum bei 460 nm.^[303] Die für die Färbung benötigte Lösung mit einer Konzentration von 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ wurde frisch mit dem DNA-Ansatzpuffer aus der wässrigen Stammlösung (2 mg mL^{-1}) hergestellt. Zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes wurde eine Standardreihe aus reiner DNA aus Kalbsthymus hergestellt. Diese Standardreihe umfasste die Konzentrationen 1, 2, 4, 6, 8, 12.5, 15 und 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$, wobei die DNA in einem PBE-Puffer (Phosphatpuffer mit EDTA-Zusatz) gelöst wurde. Zur Messung der Fluoreszenz wurden jeweils 10 μL der Standardreihen in Duplikaten und 10 μL der jeweiligen verdauten Chondrogenese-Pellets in Dreifachbestimmung in eine schwarze 96-Wellplatte gegeben. Als Referenz wurde der PBE-Puffer vermessen. Zu jeder Probe wurden anschließend 200 μL der Hoechst-Lösung gegeben und die Wellplatte am Plattenreader bei einer Anregung von 360 nm und einem Emissionsmaximum bei 460 nm vermessen.

Die bei der Chondrogenese der MSCs gebildete extrazelluläre Knorpelmatrix weist Glykosaminoglykane (GAGs) auf, die mithilfe des Farbstoffs Dimethylmethyleneblau (DMB) nachgewiesen werden können. Diese Färbung wird genutzt, um die chondrogene Differenzierung und deren Fortschritt zu zeigen. Es handelt sich dabei um eine relativ spezifische Färbung, da z. B. andere polyanionische Moleküle wie die DNA und die nicht-sulfatierten GAGs wie Hyaluronsäure mit diesen Farbstoff nicht

reagieren können.^[304] Für die Messung wurde als Standard Chondroitinsulfat aus Haiknorpel verwendet und eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Anschließend wurden jeweils 5 μL der zu untersuchenden Proben in eine 96-Wellplatte pipettiert, wobei die Kalibrationsreihe wiederum in Duplikaten und die Proben der verdauten Chondrogenese-Pellets in Dreifachbestimmung auf die Platte gegeben wurden. Als Blindwert diente der PBE-Puffer. Bevor die Platte bei 530 nm sowie 590 nm vermessen wurde, wurde zu jeder Probe 125 μL DMB-Lösung gegeben und dieses Gemisch 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

RNA-Isolation und -Aufreinigung. Um die Expression bestimmter Gene zu analysieren, wird die mRNA (*messenger ribonucleic acid*) der Zellen benötigt. Die RNA-Isolation und -Aufreinigung erfolgte bei den Untersuchungen mit den Zellpellets mit einem Precellys Tissue RNA Kit (VWR Corporation). Für die Gewinnung der mRNA aus den Zellen, die in den Untersuchungen mit den Fasermatten zum Einsatz kamen, wurde ein sogenannter Direct-zolTM RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) nach den Herstellervorgaben angewendet.

Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). In diesem Verfahren wird die mRNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben, da sich die RNA nicht direkt in der anschließenden qRT-PCR amplifizieren lässt.^[305] Die isolierte RNA wurde am NanoDropTM 2000c (Thermo Fisher Scientific) vermessen, um eine Menge von 200 ng abzuschätzen. Dieses RNA-Isolat (max. 10 μL) wurde dann mit 1 μL DNase-Reaktionspuffer (10-faches Konzentrat) und 1 μL DNase I versetzt und für 30 min bei 37 °C im Thermocycler Flex Cycler² (Analytik Jena AG) inkubiert. Zur Hemmung vieler DNA-modifizierender Enzyme wurden anschließend EDTA (50 mM, 1 μL) und die Oligo-dT₁₅-Primer (1 μL) hinzugefügt und für weitere 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Mastermix bestehend aus 4 μL DNase-Reaktionspuffer (5-faches Konzentrat), 0,5 μL RNase-Inhibitor (RiboLock, 40 U mL^{-1}), 0,5 μL Wasser, 2 μL Nukleotid-Lösung (dNTP Mix, 10 mM) und 1 μL des Enzyms Reverse Transkriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus*, MMLV-RT) zum Reaktionsansatz gegeben. Zunächst wurde für 5 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Bei diesem Schritt bindet die RT an die Primer und beginnt Nukleotide zu verknüpfen, sodass ein mRNA/DNA-Hybrid entsteht. Durch eine abschließende Temperaturerhöhung auf 70 °C für 5 min wurde das Enzym deaktiviert.

Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Die qRT-PCR ist eine Amplifikationsmethode, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht, jedoch lässt sich bei dieser Methode die Quantifizierung in Echtzeit verfolgen. Die Quantifizierung erfolgt über Fluoreszenzmessungen, die am Ende oder während eines PCR-Zyklus durchgeführt werden. Es gibt unterschiedliche Formen der Fluoreszenzdetektion, z. B. mittels TaqManTM-Sonden. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide, die komplementär zur Zielsequenz sind und am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencher aufweisen,

sodass die Fluoreszenz durch den Quencher zunächst unterdrückt wird. Ist die Zielsequenz auf der cDNA vorhanden, kann die Sonde zwischen die beiden Primerbindungsstellen binden. Bei den Primern handelt es sich ebenfalls um Oligonukleotide, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, somit sitzt ein Primer am 5'-Ende und der andere am 3'-Ende. Die Primer sind zudem die Startpunkte für die Polymerisation durch die Taq-Polymerase (hitze stabiles Enzym aus dem wärme liebenden Bakterium *Thermus aquaticus*). Im Rahmen der Polymerisation wird die Sonde gespalten und der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt, sodass es zu einem Fluoreszenzsignal kommt. Diese Fluoreszenz nimmt mit jedem PCR-Zyklus zu. Um die relative Menge der Ausgangssequenz zu bestimmen, wird der *Threshold-Cycle* (CT-Wert, „Schwellenwert-Zyklus“) bestimmt, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Wert wird schneller erreicht, wenn die Ausgangssequenz in der Probe häufiger vertreten ist. Zudem wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Referenzgens (*housekeeping gen*) normiert, um mögliche Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA- oder DNA-Proben auszugleichen.^[306–308] Bei einer optimalen PCR-Effizienz von 2, d. h. dass die Anzahl der Zielsequenz sich mit jedem Zyklus verdoppelt, kann die Genexpression mit folgender Formel relativ quantifiziert werden:^[309]

$$\text{Menge des Zielgens} = 2^{-\Delta\text{CT}} \quad (1)$$

Für die Durchführung der Methode wurde ein Mastermix bestehend aus Primer (0.5 µL), TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (5 µL) und RNase-freiem Wasser (3.5 µL) mit 1 µL der jeweiligen cDNA-Probe vermischt und in Duplikaten auf eine 96-Wellplatte pipettiert. Die Messung wurde an einem StepOne™-System (Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurde für 20 s bei 95 °C und anschließend 40 Zyklen für 1 s bei 95 °C und für 20 s bei 60 °C erhitzt. Die qRT-PCR wurde genutzt, um die Expression folgender Gene zu untersuchen: ACAN (Aggrecan), ALPL (alkalische Phosphatase), COL2A1 (Typ II Kollagen), COMP (oligometrisches Knorpelmatrixprotein), MMP13 (Matrix-Metalloprotease-13) und SOX9. Als Referenzgen wurde das RPS29 (ribosomales Protein S29) getestet.

3.3 Experimentelles

Das folgende Kapitel beinhaltet die Synthesevorschriften für die Herstellung, die Modifizierung sowie die Funktionalisierung der nanoporösen Silica-Nanopartikel. Für die Synthesen wurde ausschließlich Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von 0.055 µS cm⁻¹ verwendet, das entweder über eine Anlage vom Typ MicroPure der Firma Thermo Electron LED GmbH oder über eine Anlage vom Typ Milli-Q® Integral System der Firma Merck Millipore gewonnen wurde.

Den Synthesevorschriften folgen die Beschreibungen zur Durchführung der Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente mit den NPSNPs. Dabei wird auch auf die

Degradation der Nanopartikel und der Wachstumsfaktoren unter diesen Bedingungen eingegangen. Anschließend werden die Funktionalisierung der PCL-Fasermatten und die Freisetzungsexperimente mit diesen beschrieben. Auch hier wird der Aspekt der Degradation der funktionalisierten Fasermatten unter den Freisetzungsbedingungen untersucht. In den letzten Kapiteln wird auf eine Möglichkeit für die Fluoreszenzmarkierung von BDNF eingegangen und die Probenpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen erläutert.

3.3.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Für die Synthese der nanoporösen Silica-Nanopartikel wurde eine modifizierte Vorschrift von Qiao *et al.* verwendet.^[151]

Dafür wurden zunächst 3.16 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und 0.23 g Diethanolamin in 75 mL Wasser und 13.4 mL Ethanol gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 40 °C gerührt und anschließend mit 8.56 mL Tetraethoxysilan (TEOS) versetzt. Nach der Zugabe von TEOS wurde das Reaktionsgemisch für weitere 2 h bei 40 °C gerührt. Die Partikel wurden durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und zweimal mit Wasser und einmal mit Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde bei 60 °C über Nacht getrocknet und danach 5 h bei 550 °C (Aufheizrate 1 °C min⁻¹) calciniert, um das strukturdirigierende Agens CTAB zu entfernen.

3.3.2 Modifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Es wurden NPSNPs mit unterschiedlichen Modifizierungen hergestellt. Dabei erfolgten alle Modifizierungen nach der *post-grafting*-Methode unter Verwendung unterschiedlicher Trimethoxy- bzw. Triethoxysilane. Das Reaktionsschema wird in Abbildung 3.4 gezeigt.

Für die Modifizierung wurden 500 mg unmodifizierte NPSNPs in 20 mL Toluol mittels Ultraschallbad dispergiert. Zu der Nanopartikeldispersion wurden anschließend 75 µL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und das jeweilige Trimethoxysilan bzw. Triethoxysilan hinzugefügt. Bei der Synthese von amino-modifizierten NPSNPs (NPSNP-NH₂) handelte es sich hierbei um 3-Aminopropyltrimethoxysilan (95 µL, 0.55 mmol). Zur Herstellung von amino-modifizierten NPSNPs mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂) wurde das *N*-(6-Aminoethyl)aminomethyltriethoxysilan (223 µL, 0.70 mmol) verwendet. Um thiol-modifizierte Nanopartikel herzustellen, wurde 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (125 µL, 0.67 mmol) eingesetzt. Das jeweilige Gemisch wurde unter Rühren für 2 h bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde das Produkt durch Zentrifugation abgetrennt, dreimal mit Ethanol gewaschen und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

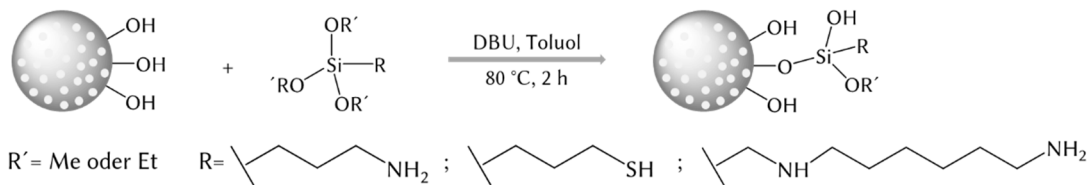


Abbildung 3.4: Reaktionsschema für die Modifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Trimethoxy- bzw. Triethoxysilanen.

Um die Thiol-Gruppe zur Sulfonsäure-Gruppe zu oxidieren (Abbildung 3.5), wurden 400 mg thiol-modifizierte Nanopartikel in 40 mL Wasserstoffperoxid-Lösung (34–36 %) dispergiert und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Danach wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation von der Lösung getrennt, zweimal mit Wasser und einmal mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

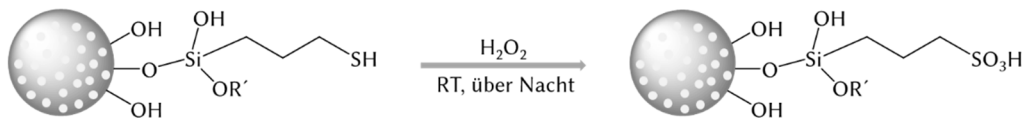


Abbildung 3.5: Reaktionsschema für die Oxidation von thiol-modifizierten Nanopartikeln mit H_2O_2 zu sulfonsäure-modifizierten NPSNPs (NPSNP- SO_3H).

3.3.3 Funktionalisierung der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit FITC

Zur Funktionalisierung der NPSNPs mit einem Farbstoff wurde das Fluorescein-isothiocyanat (FITC) nach einer modifizierten Vorschrift von Haynes *et al.* kovalent an die Nanopartikel gebunden (Abbildung 3.6).^[210]

Dazu wurden 100 mg amino-modifizierte Nanopartikel in 10 mL Ethanol dispergiert. Zu dieser Dispersion wurden 38.9 mg FITC gegeben, sodass eine 0.01 M ethanolische FITC-Lösung vorlag. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach dem Reaktionsende wurde zunächst die Reaktionslösung abzentrifugiert und anschließend die Nanopartikel mit Ethanol so lange gewaschen, bis der Überstand farblos war (mind. zehnmal). Es folgte eine Trocknung bei 60 °C.

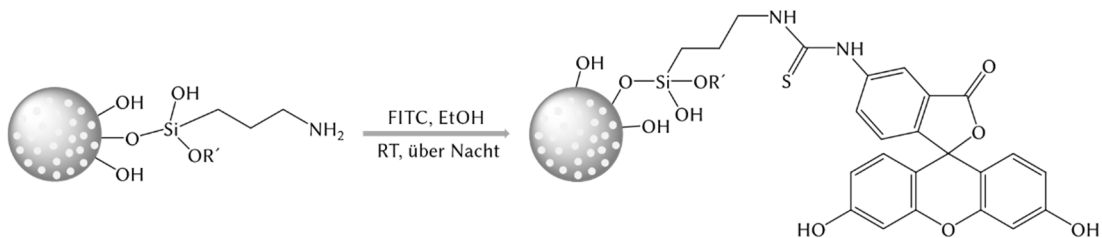


Abbildung 3.6: Reaktionsschema für die kovalente Anbindung von FITC an amino-modifizierte Silica-Nanopartikel.

3.3.4 Immobilisierung der Wachstumsfaktoren auf NPSNPs

Die Immobilisierung der Wachstumsfaktoren auf nanoporösen Silica-Nanopartikel fand unter aseptischen Bedingungen statt. Hierfür wurden die verwendeten Nanopartikel sterilisiert, indem sie zunächst in Ethanol dispergiert und anschließend 2 h mit UV-Strahlung bestrahlt wurden. Beide Wachstumsfaktoren, BDNF und TGF- β 3, wurden steril-filtriert und lyophilisiert kommerziell erworben. Das rekombinante BDNF (Thermo Fisher Scientific) wurde aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnen und hatte eine Reinheit von 98 %. TGF- β 3 (PeproTech) wurde ebenfalls rekombinant in *E. coli* produziert und wies eine Reinheit von ≥ 98 % auf. Als Immobilisierungsmedium wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung mit 0.1 % bovinem Serumalbumin-Zusatz (PBS+0.1 % BSA) verwendet. Hierbei sollte BSA als Stabilisator für das jeweilige Protein dienen.^[230]

Für die Immobilisierung des jeweiligen Wachstumsfaktors wurden 5 mg der un- bzw. modifizierten NPSNPs zunächst in 0.5 mL PBS (0.1 % BSA) dispergiert. Zu diesen Nanopartikeldispersionen wurden dann 0.5 mL Protein-Lösung ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) zugegeben, sodass die Inkubationskonzentration der Wachstumsfaktoren bei $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ lag. Die Inkubation der Nanopartikel in der Proteinlösung wurde auf einen Thermoschüttler der Firma Biozym Scientific für 24 h bei 4 °C unter konstantem Schütteln (1 000 rpm) durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Nanopartikel zentrifugiert und einmal mit 1 mL PBS (0.1 % BSA) gewaschen, bevor sie direkt für die Freisetzungsexperimente weiterverwendet wurden. Alle Inkubations- und Waschlösungen wurden bis zur Quantifizierung mittels eines ELISAs bei -20 °C eingefroren, um einen Verlust der Proteinaktivität aufgrund der Lagerung zu vermeiden. Als Kontrolle wurden bei jedem Immobilisierungsversuch 5 mg der jeweiligen Nanopartikelsorte unter den gleichen Bedingungen, aber ohne Protein-Zugabe, behandelt. Für die Immobilisierung von BDNF wurden die unmodifizierten (NPSNP), die amino-modifizierten (NPSNP-NH₂) und die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-SO₃H) als Delivery-System untersucht. Für TGF- β 3 wurden zusätzlich die amino-modifizierten NPSNPs mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂) getestet.

3.3.5 Freisetzungsexperimente mit beladenen NPSNPs

Wie schon in Abschnitt 3.3.4 erwähnt wurde, wurden die Nanopartikel nach der Inkubation und einem Waschschrift direkt für die Freisetzungsexperimente weiterverwendet. Die Freisetzungsexperimente fanden auch unter aseptischen Bedingungen statt.

Der Freisetzungsstart erfolgte durch die Zugabe von 1 mL PBS (0.1 % BSA) zu den zuvor beladenen Nanopartikeln. PBS wurde als Freisetzungsmedium gewählt, da es sich hierbei um ein Standardmedium zur Simulation von physiologischen Bedingungen handelt. BSA kam wiederum als Stabilisator für das jeweilige Protein zum Einsatz. Die Nanopartikeldispersionen wurden anschließend kurz auf dem Vortexer behandelt und bei 37 °C gelagert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 10 000 rpm), der Überstand vorsichtig entfernt und

durch die Zugabe von 1 mL frischem PBS (0.1 % BSA) die Freisetzung fortgesetzt. Nach einer kurzen Behandlung auf dem Vortexer kamen die Proben erneut in einen Inkubationsofen bei 37 °C. Ähnlich wie die Inkubations- und Waschlösungen wurden die entnommenen Überstände bis zur Analyse durch ELISAs bzw. für die *in vitro*-Untersuchungen bei –20 °C aufbewahrt. Der Ablauf der Freisetzungsexperimente ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

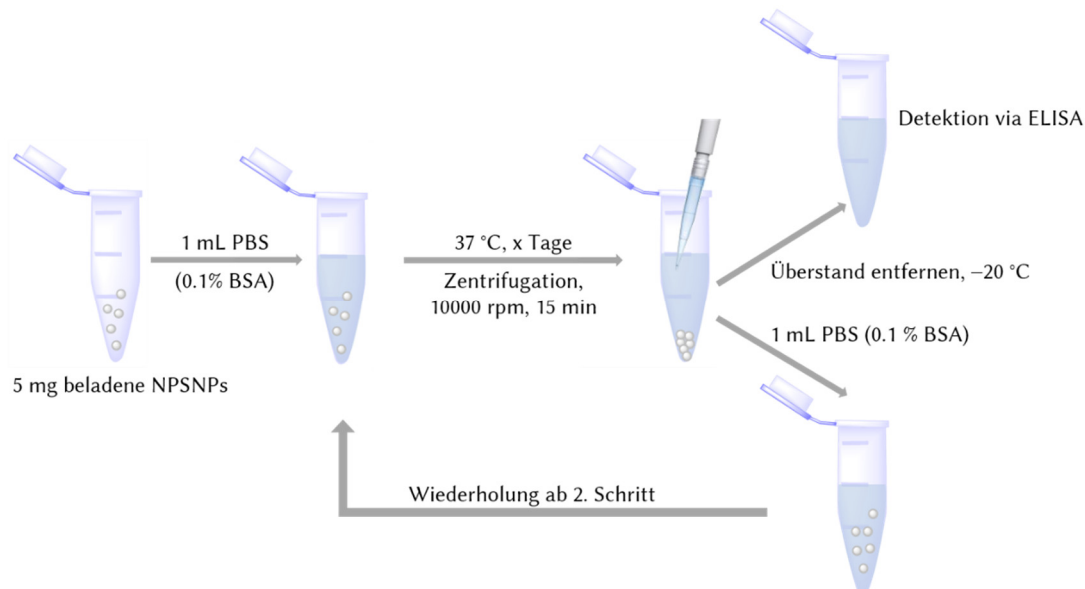


Abbildung 3.7: Ablauf der Freisetzungsexperimente mit beladenen NPSNPs.

3.3.6 Untersuchungen zur Degradation der Nanopartikel unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen

Um eine mögliche Degradation der NPSNPs während der Immobilisierung bzw. der Freisetzungsexperimente zu untersuchen, wurden ausgewählte Nanopartikelsorten mit bzw. ohne Wachstumsfaktoren unter den gleichen Bedingungen, wie in Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5 beschrieben, behandelt. Nach bestimmten Zeitabständen (nach der Inkubation und nach 7 d, 14 d und 81 d Freisetzung) wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation vom Medium getrennt und bis zu weiteren Untersuchungen bei –20 °C aufbewahrt.

3.3.7 Untersuchungen zur Degradation der Wachstumsfaktoren unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen

Um die Degradation der Wachstumsfaktoren durch die Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen zu untersuchen, wurden Lösungen des jeweiligen Wachstumsfaktors unter den gleichen Bedingungen, wie in Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5 beschrieben, behandelt. Dazu wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ hergestellt und zunächst für 24 h bei 4 °C auf einem Theroschüttler behandelt. Anschließend wurde die erste Probe bei –20 °C eingefroren, um die

Einflüsse der Immobilisierungsbedingungen zu untersuchen. Alle anderen Proben wurden in einen Inkubationsofen bei 37 °C gestellt. Nach 1 d, 7 d und 14 d wurde die jeweilige Probe aus dem Ofen genommen und wiederum bei -20 °C eingefroren, um die Einflüsse der Freisetzungsbedingungen zu untersuchen. Alle Proben wurden mittels ELISA analysiert.

3.3.8 Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten BDNF- und TGF- β 3-Mengen

Die Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten BDNF- und TGF- β 3-Mengen, aber auch die Analysen zu den Degradationsuntersuchungen, erfolgten mit dem ELISA-Verfahren. Die Bestimmung der immobilisierten Mengen fand dabei indirekt statt, weil die Konzentrationen in der verbleibenden Inkubations- und in der Waschlösung bestimmt und diese von der bekannten Ausgangsmenge subtrahiert wurden. Die Durchführung des ELISAs fand nach den Herstellervorgaben statt und wird im Folgenden für BDNF und TGF- β 3 einzeln beschrieben.

Zur Quantifizierung der BDNF-Mengen wurde ein ELISA Kit des Herstellers Boster Biological Technology mit einem Bestimmungsbereich von 31.2–2 000 pg mL⁻¹ verwendet. Um diesen Bestimmungsbereich zu erreichen, wurden die Proben nach den Verdünnungsrichtlinien des Herstellers verdünnt. Anschließend wurde der BDNF-Standard von 10 000 pg mL⁻¹ hergestellt und aus diesem die Kalibrationsreihe bestehend aus sieben Konzentrationen (2 000 pg mL⁻¹, 1 000 pg mL⁻¹, 500 pg mL⁻¹, 250 pg mL⁻¹, 125 pg mL⁻¹, 62.5 pg mL⁻¹ und 31.2 pg mL⁻¹) erstellt. Von jeder Probe und von jeder Kalibrationskonzentration wurden 100 μ L auf die Wellplatte gegeben. Die Wells waren dabei mit monoklonalen Antikörpern speziell für BDNF vorbebeschichtet. Alle Proben wurden mindestens als Duplikate vermessen. Als Blindwert wurde zudem der Probenverdünnungspuffer in zwei Wells pipettiert. Nach dem Auftragen wurde die Platte abgedeckt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Platteninhalt verworfen und jeweils 100 μ L des biotinylierten anti-human BDNF-Antikörpers (1:100) in die Wells pipettiert. Es folgte wiederum eine Inkubation für 60 min bei 37 °C. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde der Platteninhalt verworfen, die Platte ausgeklopft und die Wells dreimal ca. eine Minute mit 0.01 M PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 μ L einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexlösung (ABC-Lösung) wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Waschvorgang mit PBS fünfmal wiederholt und 90 μ L der TMB-Lösung zugegeben. Die darauffolgende Inkubationszeit (ca. 20–25 min) ist von der sichtbaren Farbreaktion abhängig und wird bei Blaufärbung der ersten vier Kalibrationskonzentrationen gestoppt, indem 100 μ L der sauren Stopplösung in die Wells gegeben wurde. Es fand ein Farbumschlag von blau nach gelb statt. Direkt nach der Zugabe erfolgte die Vermessung der Wellplatte bei 450 nm an einem Multifunktionsreader Spark 10M der Firma Tecan Group AG.

Zur Quantifizierung der TGF- β 3-Mengen wurde ein ELISA Kit von R&D Systems mit einem Detektionsbereich von 31.3–2 000 pg mL⁻¹ verwendet. Zunächst wurde die

Wellplatte mit dem Fangantikörper beschichtet, dazu wurden 100 μL der Antikörperlösung in einer Konzentration von $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu den Wells gegeben. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde der Platteninhalt verworfen, die Platte ausgeklopft und die Wells dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen, indem 300 μL Waschpuffer für etwa eine Minute in den Wells gelassen wurde. Anschließend folgte ein Blockierungsschritt mit der Zugabe von 300 μL PBS (1% BSA), um ungebundene Stellen für falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Waschschrte wiederholt. Somit war die Platte für die Durchführung des ELISAs präpariert, sodass im nächsten Schritt die zuvor hergestellte Kalibrationsreihe, mit den gleichen Konzentrationen wie beim BDNF-ELISA, und die für die Untersuchung verdünnten Proben in einer Menge von 100 μL zu den Wells gegeben wurden. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur und eine Wiederholung der Vorgänge mit Ausklopfen und Waschen. Daraufhin wurde der biotinylierte Detektionsantikörper in einer Konzentration von 100 ng mL^{-1} zu den Wells gegeben und wiederum für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem darauffolgenden Waschen wurden die Wells für 20 min unter Lichtausschluss mit 100 μL einer frisch hergestellte Streptavidin-HRP-Lösung (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*, 1:200) inkubiert. Anschließend folgte ein letztes Mal der Waschvorgang, bevor zu den Wells eine Tetramethylbenzidin/ H_2O_2 -Lösung gegeben wurde und in der Inkubationszeit von 20 min eine Blaufärbung erfolgte. Diese Inkubation wurde unter Lichtausschluss durchgeführt und mit der Zugabe von 50 μL 1 M Schwefelsäure gestoppt. Es kam zu einem Farbumschlag von blau zu gelb. Direkt nach der Zugabe erfolgte die Vermessung der Wellplatte bei 450 nm an einem Multifunktionsreader Spark 10M der Firma Tecan Group AG. Zusätzlich wurde die Wellplatte bei 540 nm und 570 nm vermessen, um laut Hersteller mögliche optische Störstellen zu korrigieren.

3.3.9 Funktionalisierung der PCL-Fasermatten mit TGF- β 3-beladenen bzw. unbeladenen NPSNPs

Für die Funktionalisierung wurden PCL-Fasermatten verwendet, welche zuvor „*shish-kebab*“-strukturiert (PCL_{SK}) bzw. mit einer zusätzlichen Alginat-Schicht ($\text{PCL}_{\text{SK-Alg}}$) versehen worden sind. Die Herstellung der verwendeten PCL-Fasermatten erfolgte durch Elektrospinning am Institut für Mehrphasenprozesse (AG Glasmacher, Leibniz Universität Hannover). Die Modifizierung der PCL-Fasermatten mittels der „*shish-kebab*“-Strukturierung und der Aufbringung einer Alginat-Schicht wurde von Dominik de Cassan (AG Menzel, Institut für Technische Chemie, Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Alle dafür benötigten Parameter und die Beschreibungen der einzelnen Vorgehensweisen sind in einer Veröffentlichung der Forschergruppe FOR 2180 detailliert beschrieben.^[291]

Zur Funktionalisierung mit NPSNPs wurden die Fasermatten mit einer Abmessung von 8 mm x 16 mm zunächst in Ethanol getaucht und dann jede Seite für 20 min mit

UV-Licht bestrahlt. Die Nanopartikel wurden nach einem ähnlichen Prinzip (s. Abschnitt 3.3.4) sterilisiert, sodass die Funktionalisierung aufgrund der anschließenden Freisetzungsuntersuchungen unter aseptischen Bedingungen stattfand. Auch die Funktionalisierung mit unbeladenen NPSNPs erfolgte mit sterilisierten NPSNPs und Fasermatten, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Somit wurden, wie im Abschnitt 3.3.4 zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf NPSNPs beschrieben, zunächst 5 mg der jeweiligen Nanopartikelsorte in 0.5 mL PBS (0.1 % BSA) dispergiert und anschließend zu diesen Nanopartikeldispersionen entweder 0.5 mL TGF- β 3-Stammlösung ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) oder zu den Kontrollen 0.5 mL PBS (0.1 % BSA) gegeben. Es folgte eine Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 000 rpm für 24 h. In diese Nanopartikel-dispersionen wurde direkt im Anschluss an die Inkubation jeweils eine PCL-Fasermatte (PCL_{SK} bzw. PCL_{SK-Alg}) eingetaucht. Die Inkubation der Fasermatten erfolgte für 3 h bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln (1 000 rpm). Anschließend wurden die Fasermatten zum Waschen für 2 min in 1 mL frisches PBS (0.1 % BSA) getaucht und entweder direkt für die Freisetzungsexperimente verwendet oder zur Analyse bei Raumtemperatur unter reduziertem Druck getrocknet.

3.3.10 Freisetzung von TGF- β 3 von den PCL-Fasermatten

Die Freisetzungsexperimente fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Zum Freisetzungsstart wurde jeweils eine der zuvor funktionalisierten Fasermatten mit unbeladenen bzw. TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln in 1 mL PBS (0.1 % BSA) getaucht. Anschließend erfolgte die Freisetzung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter statischen Bedingungen. Nach bestimmten Zeitabständen wurden die Fasermatten aus der Freisetzungslösung genommen und die Freisetzung fortgesetzt, indem die Fasermatten in 1 mL frisches PBS (0.1 % BSA) überführt wurden. Ähnlich wie bei den Freisetzungsexperimenten mit den Nanopartikeln wurden die entnommenen Überstände bis zur Analyse durch ELISAs bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

3.3.11 Degradation von mit NPSNPs funktionalisierten PCL-Fasermatten

Zusätzlich zur Freisetzung von TGF- β 3 von den NPSNPs-funktionalisierten PCL-Fasermatten wurde auch die Degradation dieser Fasermatten unter Freisetzungsbedingungen untersucht. Dazu wurden die Fasermatten mit unbeladenen Nanopartikeln (Herstellung wie in Abschnitt 3.3.9 beschrieben) in 1 mL PBS (0.1 % BSA) getaucht und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Nach bestimmten Freisetzungszeiträumen (1 d, 14 d und 21 d) wurde ein Teil der Fasermatte abgeschnitten und unter reduziertem Druck getrocknet. Zu der restlichen Fasermatte wurde wiederum PBS (0.1 % BSA) gegeben und die Proben in den Inkubationsofen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) gestellt, jedoch die Menge des Mediums der verbleibenden Fasermatte angepasst.

3.3.12 Fluoreszenzmarkierung von BDNF

Neben den quantitativen Analysen hinsichtlich der Wachstumsfaktoren durch das ELISA-Verfahren wurde auch eine Möglichkeit zum qualitativen Nachweis getestet. Hierfür wurde ein kommerziell erwerbliches, rekombinantes BDNF-Biotin (Alomone Labs, >98 %) mit einem Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat (Thermo Fisher Scientific) nach einer Vorschrift von Xie *et al.* kombiniert.^[21]

Zunächst wurden 10 µL der BDNF-Biotin-Lösung (1.2 µM, in PBS (0.1 % BSA)) mit 10 µL der Streptavidin-Konjugat-Lösung (1 µM, in 1 M Betain-Löung) über Nacht bei 4 °C auf dem Thermoschüttler unter konstantem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss. Nach der Inkubation wurde das BDNF-Qdot® 655-Konjugat über eine Größenausschlusschromatographie mittels einer PD-10 Säule (GE Healthcare) von freien BDNF-Biotin-Molekülen abgetrennt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellervorschrift. Dazu wurde die Säule zunächst mit dem verwendeten Puffer (20 mM HEPES, pH 7.2) äquilibriert. Dann wurde die Probe auf die Säule gegeben und auf 2.5 mL mit der HEPES-Lösung aufgefüllt. Nachdem die 2.5 mL Lösung vollständig von der Säule aufgenommen worden waren, wurden weitere 3.5 mL HEPES-Lösung auf die Säule gegeben und gleichzeitig Fraktionen á 100 µL Lösung aufgefangen. Alle Fraktionen wurden bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

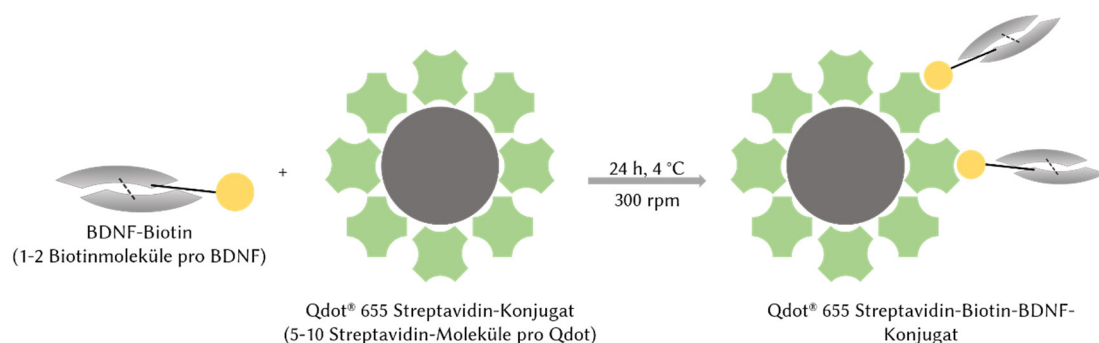


Abbildung 3.8: Fluoreszenzmarkierung von BDNF mit einem Qdot® 655 über eine Biotin-Streptavidin-Bindung.

3.3.13 Probenpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen

Die Probenpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen, die in den Abschnitten 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben wurden, sind unter aseptischen Bedingungen durchgeführt worden, d. h., dass nur sterile Lösungen zur Herstellung der Proben verwendet wurden und alle Schritte unter der sterilen Werkbank erfolgten.

Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen. Bezüglich der Kompatibilität mit Spiralganglienneuronen wurden sowohl BDNF-beladene Nanopartikel als auch Release-Überstände untersucht.

Zur Herstellung der Nanopartikeldispersionen wurden zunächst die Nanopartikel nach dem beschriebenen Immobilisierungsprozess (Kapitel 3.3.4) beladen und aus der

Stammlösung mit einer Nanopartikelkonzentration von 5 mg mL^{-1} die zu untersuchenden Nanopartikelkonzentrationen von 100, 250, 500 und $1\,000 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ durch Verdünnung mit PBS (0.1 % BSA) hergestellt. Dabei erfolgten die Beladung der Nanopartikel und die Herstellung der Verdünnungsreihe immer direkt vor der Zugabe zum Zellkulturmedium, sodass keine Lagerung der Nanopartikeldispersionen notwendig war. Da die Proben vor der Zugabe zu den Spiralganglienzellen mit dem SGZ-Medium 1:1 verdünnt wurden, betragen die finalen Nanopartikelkonzentrationen 50, 125, 250 und $500 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Es wurden die unmodifizierten und die amino-modifizierten Nanopartikel jeweils mit bzw. ohne BDNF-Beladung getestet.

Bis zu den Untersuchungen mit den Release-Überständen wurden die Überstände, wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben, bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und erst kurz vor der Zugabe auf die Spiralganglienzellen aufgetaut und in einem 1:1-Verhältnis mit dem SGZ-Medium zu den Zellen gegeben. Es wurden acht Release-Überstände der amino-modifizierten Nanopartikel mit bzw. ohne BDNF-Beladung bis zum 39. Freisetzungstag getestet.

Zellkulturuntersuchungen zur Chondrogenese von MSCs. Hinsichtlich der Chondrogenese von MSCs wurden die TGF- β 3-beladenen Nanopartikel, die Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit den Nanopartikeln und die PCL-Fasermatten, die mit beladenen Nanopartikeln funktionalisiert wurden, untersucht. Auch bei diesen *in vitro*-Untersuchungen wurden die Nanopartikel direkt vor der Zugabe zu den Zellen zunächst nach dem in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Immobilisierungsprozess mit TGF- β 3 beladen. Neben der Stammkonzentration von 5 mg mL^{-1} wurde eine weitere Nanopartikelkonzentration von 2 mg mL^{-1} durch Verdünnung mit PBS (0.1 % BSA) hergestellt und getestet. Zu den Chondrogenese-Pellets wurden die Nanopartikeldispersionen dann in einer 1:1-Mischung mit dem Medium gegeben, sodass letztlich Nanopartikeldispersionen mit den Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} und 2.5 mg mL^{-1} bezüglich ihres chondrogenen Effektes untersucht wurden. Als Nanopartikeltypen wurden die unmodifizierten und amino-modifizierten Nanopartikel ausgewählt und mit bzw. ohne TGF- β 3-Beladung zu den Chondrogenese-Pellets gegeben.

Für die Untersuchungen mit den Release-Überständen erfolgte das Auftauen der Proben erst kurz vor der Zugabe zu den Chondrogenese-Pellets. In den Zelltests wurden die ersten acht Überstände der un- und amino-modifizierten Nanopartikel mit bzw. ohne TGF- β 3-Beladung bis zum 35. Tag berücksichtigt.

Die PCL-Fasermatten (8 mm x 16 mm) wurden nach der Vorschrift aus Kapitel 3.3.9 mit beladenen bzw. unbeladenen Nanopartikeln funktionalisiert. Nach dem Waschschriff wurden die PCL-Fasermatten für die Zellkulturuntersuchungen im noch feuchten Zustand auf Abmessungen von 8 mm x 4 mm zugeschnitten und direkt mit dem Zellmedium in Kontakt gebracht. Folgende Bedingungen wurden getestet: PCL_{SK}-Fasermatten mit unmodifizierten Nanopartikeln (+/- TGF- β 3-Beladung) und

PCL_{SK}-Alg-Fasermatten mit amino-modifizierten Nanopartikeln (+/- TGF- β 3-Beladung).

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel befasst sich mit der Auswertung der durchgeführten Experimente und der Diskussion der dabei erhaltenen Ergebnisse. Zunächst werden die hergestellten NPSNPs und ihre Modifizierungen charakterisiert. Anschließend werden die entwickelten Freisetzungssysteme für BDNF und TGF- β 3 einzeln in Augenschein genommen und ihre Anwendbarkeit für den vorgesehenen Bereich diskutiert.

4.1 Charakterisierung der unmodifizierten und modifizierten NPSNPs

Als Grundmaterial für alle Modifizierungen dienten die nanoporösen Silica-Nanopartikel, die nach einer modifizierten Synthese von Qiao *et al.* hergestellt wurden.^[151] Bei diesen Nanopartikeln handelt es sich um sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 40–50 nm bei einer monodispersen Größenverteilung, wie die TEM-Aufnahme in Abbildung 4.1 (links) zeigt. Zudem lässt sich auf dieser Aufnahme die hohe Porosität der Nanopartikel erkennen, die mittels N_2 -Physisorptionsmessungen weiter quantifiziert wurde. Anhand der N_2 -Physisorptionsisotherme in Abbildung 4.1 (rechts) konnte mithilfe des BET-Modells eine spezifische Oberfläche für die unmodifizierten NPSNPs von $1\,160\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ ermittelt werden. Diese hohe spezifische Oberfläche kann durch das vorhandene Porensystem begründet werden, bei dem die durchschnittliche Porengröße, die mit der DFT-Methode bestimmt wurde (s. Abbildung 7.1 im Anhang), 3,1 nm beträgt. Der Beginn des Isothermenverlaufs bei etwa $200\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ deutet auf einen kleinen Anteil an Mikroporen hin, die jedoch durch die N_2 -Physisorption nicht ermittelt werden können. Der steile Anstieg der Isotherme ab einem Relativdruck von $p/p_0 = 0,92$ ist hier nicht dargestellt, da dieser durch die Kondensation in interpartikulären Zwischenräumen verursacht wird. Somit wurde das Porenvolumen bis zu diesem Relativdruck bestimmt und ergab einen Wert von $1,0\text{ cm}^3\text{ g}^{-1}$.

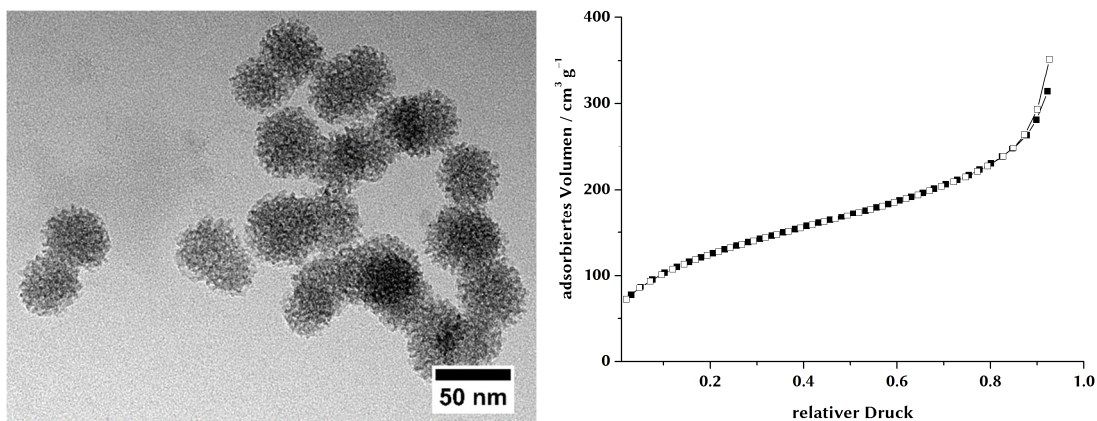


Abbildung 4.1: TEM-Aufnahme (links) und N_2 -Physisorptionsisotherme (rechts) der unmodifizierten NPSNPs.

Hinsichtlich der Größe und Morphologie unterscheiden sich die modifizierten Nanopartikel, die durch die *post-grafting*-Methode mit Trialkoxysilanen hergestellt wurden, kaum von den unmodifizierten NPSNPs. Exemplarisch ist in Abbildung 4.2 die TEM-Aufnahme der amino-modifizierten NPSNPs gezeigt.

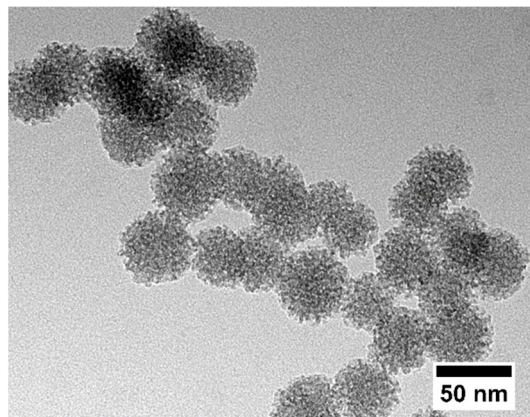


Abbildung 4.2: TEM-Aufnahme der amino-modifizierten NPSNPs als Beispiel für die modifizierten NPSNPs.

Bezüglich der Porosität – speziell der spezifischen Daten, die durch die N_2 -Physisorptionsmessungen bestimmt und in Tabelle 4.1 dargestellt werden – ergeben sich aber deutliche Unterschiede. Die jeweiligen Isothermen und Porenweitenverteilungen der modifizierten Nanopartikel sind in Abbildung 7.2 im Anhang zu finden. Alle modifizierten Silica-Nanopartikel zeigen im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikeln eine drastische Abnahme der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens. Die Porengröße bleibt dagegen bei den amino-modifizierten Nanopartikeln unabhängig von der Kettenlänge (NPSNP-NH₂ bzw. NPSNP-hexyl-NH₂) gleich. Nur im Falle der sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-SO₃H) nimmt auch der Porendurchmesser durch die Modifizierung ab. Dies deutet darauf hin, dass die organischen Gruppen auch im Poreninnenraum angebunden wurden. Bei den amino-modifizierten Nanopartikeln kann der gleichbleibende Porendurchmesser bei gleichzeitiger Abnahme der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens durch ein sogenanntes *pore blocking* erklärt werden, indem Organosilan-Komponenten durch eine Homokondensation gebildet und auf der Partikeloberfläche abgelagert werden und damit teilweise die Porenöffnungen für die Modifizierung blockieren.^[137,160]

Tabelle 4.1: Bestimmung der spezifischen Daten mittels N₂-Physisorptionsmessungen für die modifizierten NPSNPs im Vergleich zu den unmodifizierten NPSNPs.

	Spezifische Oberfläche (S_{BET}) / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Porenvolumen (V) / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	Porengröße (d) / nm
NPSNP	1 160	1.20	3.1
NPSNP-NH ₂	440	0.50	3.2
NPSNP-SO ₃ H	460	0.49	2.6
NPSNP-hexyl-NH ₂	390	0.53	3.2

Der Erfolg der einzelnen Modifizierungen wurde zusätzlich mittels IR-Spektren, C/S- und TG-Analysen und Zeta-Potential-Messungen bestätigt.

Die IR-Spektren der modifizierten Nanopartikel sind im Vergleich zum IR-Spektrum der unmodifizierten Nanopartikel in Abbildung 4.3 gezeigt. Alle IR-Spektren weisen charakteristische Banden für ein Silica-Material auf. Zu denen gehören die Si–OH-Valenzschwingungen bei 960 cm^{-1} und im Bereich um $3\,400 \text{ cm}^{-1}$, die letztere wird aber meist durch die intensive O–H-Valenzschwingung der Wassermoleküle überlagert; die asymmetrischen Si–O–Si-Valenzschwingungen bei $1\,220 \text{ cm}^{-1}$ und $1\,080 \text{ cm}^{-1}$, wobei die Bande bei $1\,220 \text{ cm}^{-1}$ nur als Schulter der anderen Si–O–Si-Valenzschwingung wahrgenommen wird; die symmetrische Valenzschwingung bei 800 cm^{-1} und die Si–O–Si-Deformationsschwingung bei 464 cm^{-1} .^[310] Die C–H-Valenzschwingungen im Bereich um $2\,900 \text{ cm}^{-1}$, die nur bei den IR-Spektren der modifizierten Nanopartikel auftauchen, sind ein Indiz für den Erfolg der jeweiligen Modifizierung und werden durch die Alkylketten der organischen Gruppen hervorgerufen. Zusätzliche charakteristische Banden für die einzelnen funktionellen Gruppen sind dagegen schwer auszumachen, da sie meist durch intensivere Banden überdeckt werden. So kann beispielsweise die N–H-Deformationsschwingung der amino-modifizierten Nanopartikel bei $1\,650 \text{ cm}^{-1}$ durch eine O–H-Deformationsschwingung überlagert werden.^[311] Eine ähnliche Situation liegt auch bei den sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln vor, da eine mögliche S–O-Valenzschwingung zwischen $1\,300$ – $1\,100 \text{ cm}^{-1}$ durch die intensive Silica-Bande in diesem Bereich überdeckt wird.^[312]

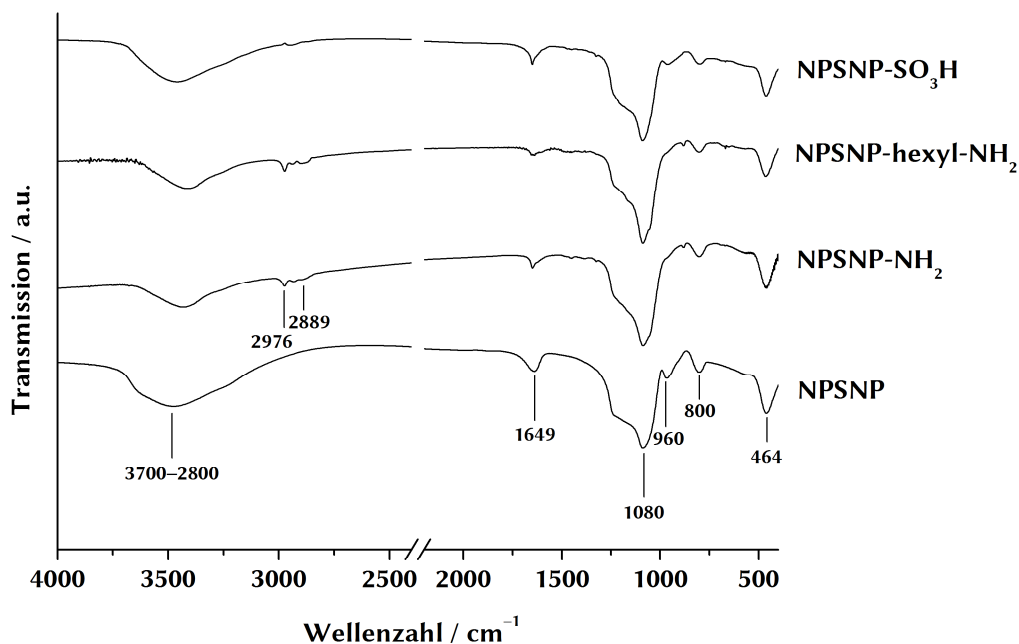


Abbildung 4.3: IR-Spektren der modifizierten Nanopartikel im Vergleich zum IR-Spektrum der unmodifizierten Nanopartikel.

Weitere Indizien für eine erfolgreiche Modifizierung konnten die TG-Messungen (Abbildung 4.4) und die C/S-Analysen liefern (Tabelle 4.2). Nach den jeweiligen Modifizierungen lässt sich bei allen Partikeln im Gegensatz zu den unmodifizierten Nanopartikeln ein Kohlenstoff-Gehalt und bei den sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln zusätzlich ein Schwefel-Gehalt ermitteln. In den TG-Kurven ist neben dem Massenverlust bis 150 °C, der durch das Entfernen von Lösungsmittelresten verursacht wird, bei allen modifizierten Nanopartikeln ein weiterer Massenverlust im Temperaturbereich von 150–700 °C zu erkennen. Dieser Massenverlust ist bei den unmodifizierten Nanopartikeln nicht wahrnehmbar und kann somit auf die Verbrennung der funktionellen Gruppen zurückgeführt werden. Im Einzelnen ergibt sich für die amino-modifizierten Nanopartikel bei der C/S-Analyse ein Kohlenstoff-Gehalt von 9.1 % und in der TG-Analyse ein Massenverlust von 12 %. Die C/S-Analyse der sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel lieferte einen ähnlichen Kohlenstoff-Gehalt von 9.4 % und einen zusätzlichen Schwefelgehalt von 3.1 %, jedoch lag der Massenverlust in der TG-Messung mit 18 % deutlich höher. Die letzte Modifizierung der Nanopartikel (NPSNP-hexyl-NH₂) führte zu einem höheren Kohlenstoff-Gehalt von 11.3 % und einem Massenverlust von 16 %. Diese Ergebnisse sind zunächst eine Bestätigung dafür, dass in allen drei Fällen eine Modifizierung erfolgreich stattgefunden hat. Um die Ergebnisse in Bezug auf den Modifizierungsgrad vergleichen zu können, wurde der Anteil an funktionellen Gruppen pro 1 g Nanopartikel zum einen über den Kohlenstoff-Gehalt (a) und zum anderen über den Massenverlust im Temperaturbereich von ca. 150–700 °C (b) ermittelt (s. Tabelle 4.2). Es ergeben sich z. T. deutliche Unterschiede in den bestimmten Werten, vor allem für die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel. Der ermittelte Anteil an funktionellen Gruppen über den Kohlenstoff-Gehalt ist dabei bei allen drei Modifizierungen höher

als der Wert, der aus dem Massenverlust erhalten wird. Da bei der C/S-Analyse für den bestimmten Kohlenstoff-Gehalt allerdings nicht zwischen Kohlenstoff aus den funktionellen Gruppen und Kohlenstoff aus beispielsweise Lösungsmittelresten wie Ethanol unterschieden werden kann, können die höheren Anteile damit begründet werden, sodass die Interpretation hinsichtlich des Modifizierungsgrad im Folgenden auf Grundlage der ermittelten Werte aus den TG-Messungen erfolgt. Nichtsdestotrotz liefert die C/S-Analyse entscheidende Indizien zur Beurteilung der Modifizierung, insbesondere für die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel, denn der Schwefel-Gehalt kann mit dieser Methode einzeln erfasst werden und geht nicht wie in der TG in der Gesamtheit des organischen Restes unter. Es zeigt sich, dass der Anteil der funktionellen Gruppe im Falle der amino-modifizierten Nanopartikel am höchsten ist. Dies kann einerseits mit einem generell höheren Modifizierungsgrad zusammenhängen. Andererseits kann auch ein höherer Grad der Homokondensation, der zu größeren Mengen von Organosilanen auf der Oberfläche führt, die Ursache dafür sein. Trotz der gleichen Endgruppe, der Amino-Gruppe, weisen die amino-modifizierten Nanopartikel mit längerer Alkylkette einen geringeren Anteil an funktionellen Gruppen pro 1 g Nanopartikel auf. Eine mögliche Ursache kann die sterische Hinderung durch die längeren Alkylreste sein, sodass einige Silanol-Gruppen für die Modifizierung mit weiteren Organosilanen nicht zur Verfügung stehen.

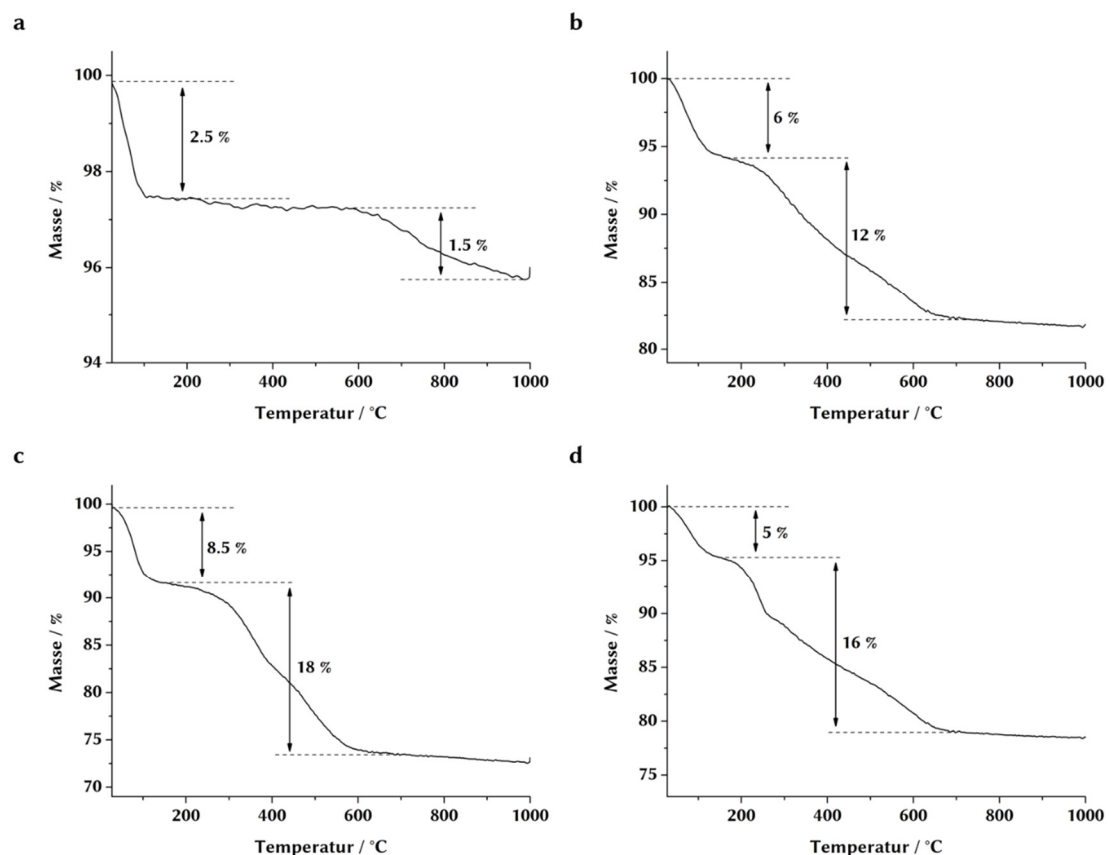


Abbildung 4.4: TG-Messungen der unmodifizierten (a) und unterschiedlich modifizierten Nanopartikel (NPSNP-NH₂ (b), NPSNP-SO₃H (c) und NPSNP-hexyl-NH₂ (d)).

Tabelle 4.2: Ergebnisse aus den C/S-Analysen für die jeweilige Modifizierung. Zusätzliche Angabe der berechneten Anteile der funktionellen Gruppen pro 1 g Nanopartikel über den Kohlenstoff-Gehalt aus der C/S-Analyse (a) bzw. über den Massenverlust aus der TG-Messung im Temperaturbereich von ca. 150–700 °C (b).

	Kohlenstoff- Gehalt / %	Schwefel- Gehalt / %	Anteil der funkt. Gruppen / mmol g ⁻¹ (a)	Anteil der funkt. Gruppen / mmol g ⁻¹ (b)
NPSNP	–	–	–	–
NPSNP-NH ₂	9.1 ± 0.4	–	2.5	2.1
NPSNP-SO ₃ H	9.4 ± 0.5	3.1 ± 0.3	2.6	1.5
NPSNP- hexyl-NH ₂	11.3 ± 0.6	–	1.4	1.2

Neben den Auswirkungen auf die Porosität und die Zusammensetzung der Nanopartikel hat jeder Modifizierungsschritt auch einen starken Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit. Dieser Aspekt ist besonders im Hinblick auf die Wechselwirkungen mit den Wachstumsfaktoren entscheidend und wurde mittels Zeta-Potential-Messungen in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abbildung 4.5) bzw. in PBS (Tabelle 4.3) ermittelt.

Zunächst lässt sich festhalten, dass alle modifizierten Nanopartikel Titrationskurven aufweisen, die stark von der Titrationskurve der unmodifizierten Nanopartikel abweichen. Das Zeta-Potential der unmodifizierten Nanopartikel ist stark negativ bei hohen pH-Werten. Mit Zugabe von HCl (0.2 M) nimmt die Oberflächenladung der NPSNPs, die mit dem Zeta-Potential korreliert, ab, sodass bei geringen pH-Werten ein neutrales Zeta-Potential vorliegt. Dabei wird der isoelektrische Punkt (IEP) bei einem pH-Wert von ca. 3 erreicht. Dieses Verhalten ist charakteristisch für Silica-Nanopartikel aufgrund der schwach sauren Silanol-Gruppen auf der Oberfläche. Auch stimmt der IEP mit dem Literaturwert von pH 2–3 überein,^[313] wobei es zu Schwankungen im IEP kommen kann, je nachdem wie viele Silanol-Gruppen sich auf der Oberfläche befinden, da diese wiederum die Acidität beeinflussen. Im Gegensatz zu den unmodifizierten NPSNPs erreichen die amino-modifizierten Nanopartikel unabhängig von ihrer Kettenlänge (NPSNP-NH₂ bzw. NPSNP-hexyl-NH₂) ein positives Zeta-Potential schon bei höheren pH-Werten (IEP = 7.9 bzw. IEP = 8.2). Infolgedessen weisen sie ein stark positives Zeta-Potential bei geringen pH-Werten auf. Dieses Verhalten lässt sich auf die Protonierung der Amino-Gruppen bei Erhöhung der HCl-Konzentration zurückführen. Aufgrund der stark sauren Sulfonsäure-Gruppen auf der Oberfläche der NPSNP-SO₃H zeigen diese Nanopartikel über den gesamten pH-Bereich ein stark negatives Zeta-Potential, sodass auch kein isoelektrischer Punkt ermittelt werden kann.

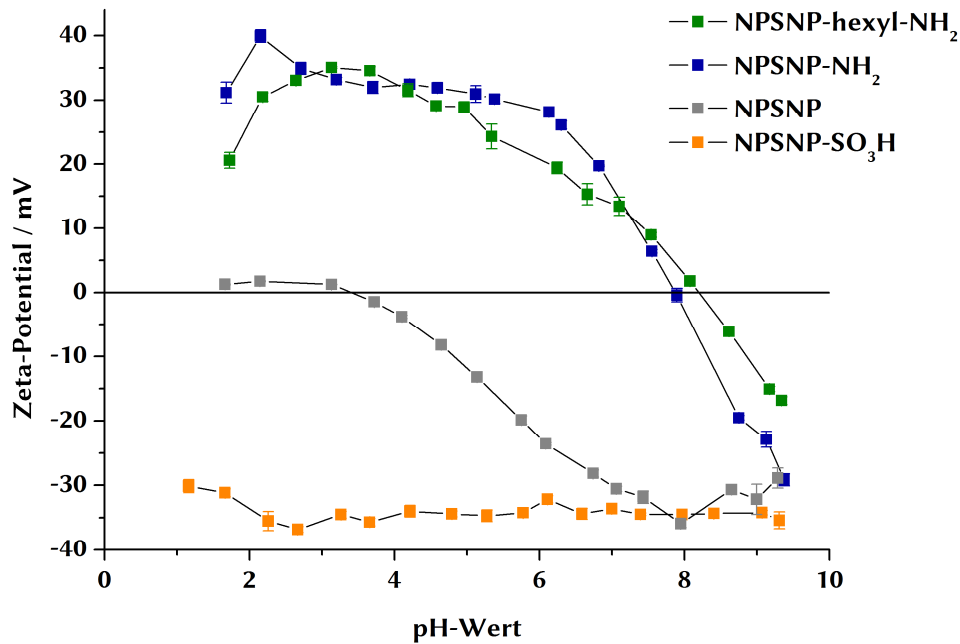


Abbildung 4.5: Zeta-Potential-Messungen für die unmodifizierten und modifizierten Nanopartikel in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Entscheidende Informationen hinsichtlich der Wechselwirkung mit den Wachstumsfaktoren lieferten auch die Zeta-Potential-Bestimmungen in PBS, d. h. bei einem pH-Wert von 7.4. Diese Messungen wurden zusätzlich durchgeführt, weil die Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente mit den Wachstumsfaktoren in PBS stattfanden und sich das Zeta-Potential in PBS aufgrund der höheren Salzkonzentration vom Zeta-Potential in Wasser bei pH 7.4 unterscheiden kann. Allerdings wurden die Ergebnisse aus den pH-Wert-abhängigen Messungen in Wasser bestätigt. Die zwei amino-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-NH₂ bzw. NPSNP-hexyl-NH₂) weisen eine positive Oberflächenladung in PBS auf. Mit einem Zeta-Potential um 10 mV kann aber von keiner stabilen Dispersion in PBS gesprochen werden, da hierfür ein Wert von 30 mV überschritten werden müsste. Eine ähnliche Situation liegt bei den unmodifizierten Nanopartikeln vor, die in PBS ein Zeta-Potential von -10.4 mV haben, somit oberhalb der Grenze von -30 mV für eine stabile Dispersion liegen. Jedoch sind die unmodifizierten NPSNPs im Gegensatz zu den amino-modifizierten Nanopartikeln in PBS negativ geladen. Auch die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel sind mit einem Zeta-Potential von -25.2 mV stark negativ geladen und können mit diesem Zeta-Potential am ehesten eine stabile Dispersion in PBS darstellen.

Tabelle 4.3: Zeta-Potential der jeweiligen Nanopartikelsorten in PBS (pH 7.4).

	Zeta-Potential in PBS / mV
NPSNP	-10.4
NPSNP-NH ₂	9.1
NPSNP-SO ₃ H	-25.2
NPSNP-hexyl-NH ₂	10.4

Für die Anwendung als Freisetzungssystem sind neben den physikochemischen auch die biochemischen Eigenschaften wie die Cytokompatibilität der Nanopartikel entscheidend. Die generelle Cytokompatibilität von nanoporösen Silica-Nanopartikeln wurde in vielen vorherigen Studien auch in der Arbeitsgruppe Behrens [15,158] bereits untersucht, dennoch wurden die hier hergestellten Nanopartikel zusätzlich auf ihre Cytokompatibilität mit murinen Fibroblasten (NIH3T3) als standardisierte Zelllinie getestet. Dabei fanden die Untersuchungen im Zuge einer Veröffentlichung statt, bei der die un- bzw. amino-modifizierten Nanopartikel im Fokus standen,^[13] sodass nur diese Nanopartikelsorten in den Untersuchungen berücksichtigt wurden. Zudem erfolgte erst kürzlich eine detaillierte Cytokompatibilitätsuntersuchung mit MSCs für alle modifizierten Nanopartikeln im Rahmen der Dissertation von Dr. Alexandra Satalov.^[314]

Nach einer Vorkultivierung wurden die un- bzw. amino-modifizierten Nanopartikel in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Fibroblasten gegeben. Für die Bestimmung der Zellviabilitäten wurde der NRU-Test genutzt, dessen Ergebnisse in Abbildung 4.6 dargestellt sind. Die relativen Zellviabilitäten liegen bei beiden Nanopartikelsorten unabhängig von der Konzentration über 70 %, sodass sie nach DIN EN ISO 10993-5 als cytokompatibel eingestuft werden können.^[315] Es konnte somit eine gute Cytokompatibilität für Nanopartikelkonzentrationen bis zu $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ nachgewiesen werden. Die unmodifizierten Nanopartikel zeigen in allen Konzentrationen eine leicht bessere Zellviabilität für die Fibroblasten als die amino-modifizierten Nanopartikel, jedoch wird der Unterschied vor allem bei den höheren Konzentrationen marginal. Die Tendenz der steigenden Zellviabilität mit steigender Nanopartikelkonzentration ist eher ungewöhnlich, obwohl ein ähnlicher Effekt schon bei den Cytokompatibilitätsuntersuchungen mit HepG2-Zellen (*human hepatocellular carcinoma cell line*) für amino-modifizierte Nanopartikel beobachtet wurde.^[158]

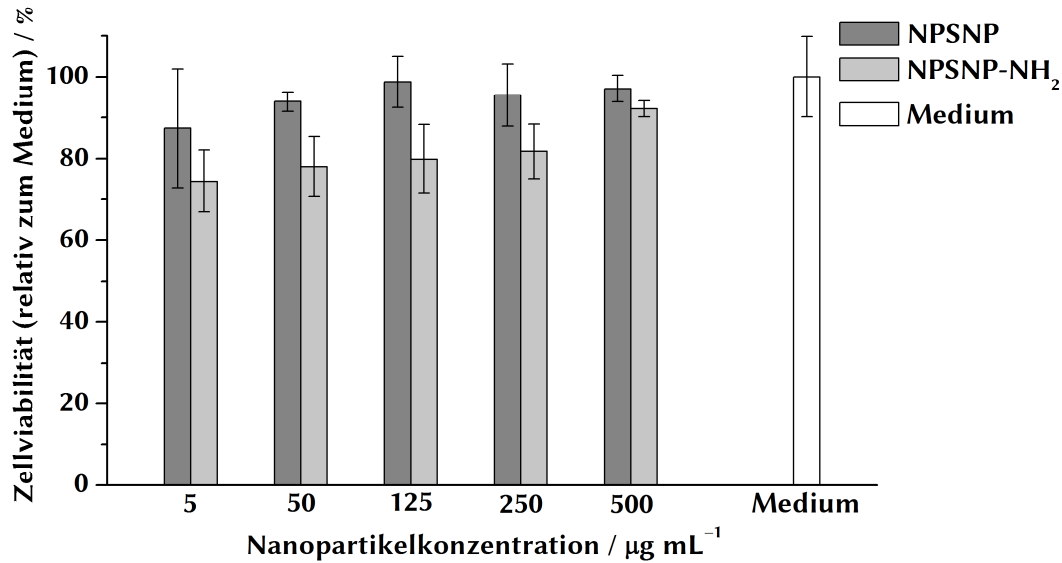


Abbildung 4.6: Relative Zellviabilitäten der NIH3T3-Fibroblasten in Gegenwart von un- bzw. amino-modifizierten Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen, die mittels des NRU-Tests bestimmt wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel erfolgreich mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgestattet werden können. Dies konnte durch unterschiedliche Charakterisierungsmethoden wie die IR-Spektroskopie, die Elementaranalyse, die Thermogravimetrie und mittels Zeta-Potential-Messungen bestätigt werden. Dabei wurden in diesem Kapitel nur die Modifizierungen charakterisiert, die für die Entwicklung der Freisetzungssysteme für BDNF und TGF- β 3 entscheidend waren. Die modifizierten Nanopartikel weisen unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten auf, die verschiedene Interaktionen mit den Wachstumsfaktoren zulassen. Auf die jeweiligen Wechselwirkungen wird im Folgenden bei jedem Wachstumsfaktor einzeln eingegangen. Ein entscheidender Faktor für ein Freisetzungssystem in biomedizinischen Anwendungen ist eine gute Cytokompatibilität aller Komponenten, die für die eingesetzten Nanopartikel im Rahmen dieser Arbeit und in vorherigen Studien gezeigt werden konnte.

4.2 Entwicklung eines Freisetzungssystems für BDNF

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Implantat-assoziierten Freisetzungssystems für BDNF hinsichtlich der Anwendung auf der Cochlea-Elektrode. Als Wirtmaterial für diese Freisetzungssysteme kamen die zuvor charakterisierten Nanopartikel zum Einsatz.

Im folgenden Kapitel sollen zunächst die möglichen Wechselwirkungen zwischen BDNF und den verwendeten NPSNPs vorgestellt werden. Anschließend werden die Ergebnisse bezüglich der Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten BDNF-Mengen dargestellt und diskutiert. Des Weiteren werden die Auswirkungen der Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen auf das BDNF und die NPSNPs präsentiert. Um den neuroprotektiven und -regenerativen Einfluss der entwickelten

Freisetzungssysteme zu bestimmen, folgt eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen. Im letzten Unterkapitel wird dann die Fluoreszenzmarkierung von BDNF thematisiert.

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in der referierten Fachzeitschrift „*PLoS One*“ publiziert.^[13]

4.2.1 Wechselwirkungen zwischen BDNF und NPSNPs

Da die Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente in PBS bei einem pH-Wert von 7.4 stattfanden, sind besonders die Oberflächeneigenschaften der NPSNPs und des BDNFs bei diesem pH-Wert entscheidend. Das Zeta-Potential der NPSNPs unter diesen Bedingungen wurde schon in Tabelle 4.3 gezeigt. Für die Entwicklung eines BDNF-Freisetzungssystems wurden die unmodifizierten (NPSNP), die amino-modifizierten (NPSNP-NH₂) und die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-SO₃H) berücksichtigt. BDNF mit seinem isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von etwa 10 ist ein stark basisches Protein, sodass in PBS die positiv geladenen Bereiche auf der Oberfläche stark überwiegen.^[48] In Abhängigkeit von den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel kann das Biomolekül mit diesen über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen oder über eine Kombination aus mehreren Wechselwirkungen interagieren (Abbildung 4.7).

Die unmodifizierten Nanopartikel besitzen zahlreiche Silanol-Gruppen auf der Oberfläche, sodass neben schwachen Wasserstoffbrückenbindungen in PBS auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Oberfläche der Nanopartikel und den positiv geladenen Bereichen des Proteins stattfinden können. Die unmodifizierten Nanopartikel wurden im Rahmen dieser Arbeit als Kontrolle für die modifizierten Nanopartikel gewählt. Jedoch konnte auch schon unmodifiziertes Silica-Material in Form von Mikrosphären erfolgreich für die Immobilisierung und Freisetzung von BDNF verwendet werden.^[102,268]

Die amino-modifizierten Nanopartikel zeigten in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Behrens vielversprechende Ergebnisse in der Immobilisierung und Freisetzung von BMP-2.^[15,314] Da der IEP von BMP-2 (pH 8.5) über dem pH-Wert des Mediums (PBS, pH 7.4) liegt,^[316] überwiegen auf der Oberfläche des BMP-2 ebenfalls die positiv geladenen Bereiche, sodass das Verhalten mit dem von BDNF vergleichbar ist und beide Proteine in ähnlicher Weise interagieren sollten. Aufgrund der Amino-Gruppen weisen die Nanopartikel in PBS eine positive Oberflächenladung auf und können somit elektrostatisch nur mit negativ geladenen Bereichen auf dem Protein interagieren. Diese sind jedoch auf der Oberfläche des BDNFs bei einem pH-Wert von 7.4 kaum vorhanden, weswegen eine andere Wechselwirkung in diesem Fall hauptsächlich zum Tragen kommt. Mittels der Propyl-Kette in den funktionellen Gruppen sind hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Regionen des BDNFs möglich. Zusätzlich können bei den amino-modifizierten Nanopartikeln wiederum Wasserstoffbrückenbindungen eine untergeordnete Rolle spielen.

Die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel wurden ausgewählt, um eine andere Kombination an Wechselwirkungen zu testen. Aufgrund der Alkylkette ist wie bei den amino-modifizierten Nanopartikeln die Möglichkeit zu hydrophoben Wechselwirkungen gegeben. Zudem weisen diese Nanopartikel ein stark negatives Zeta-Potential in PBS auf, sodass auch eine elektrostatische Anziehung auf das BDNF-Molekül ausgeübt werden kann.

Generell lässt sich sagen, dass die nicht-kovalente Anbindung von Proteinen über physikalische Interaktionen einen sehr komplexen Bereich darstellt und die letztlich vorliegenden Wechselwirkungen aufgrund von verschiedenen Faktoren, die die Immobilisierung noch zusätzlich beeinträchtigen können (Kapitel 2.3.3), schwer vorhersagbar sind.

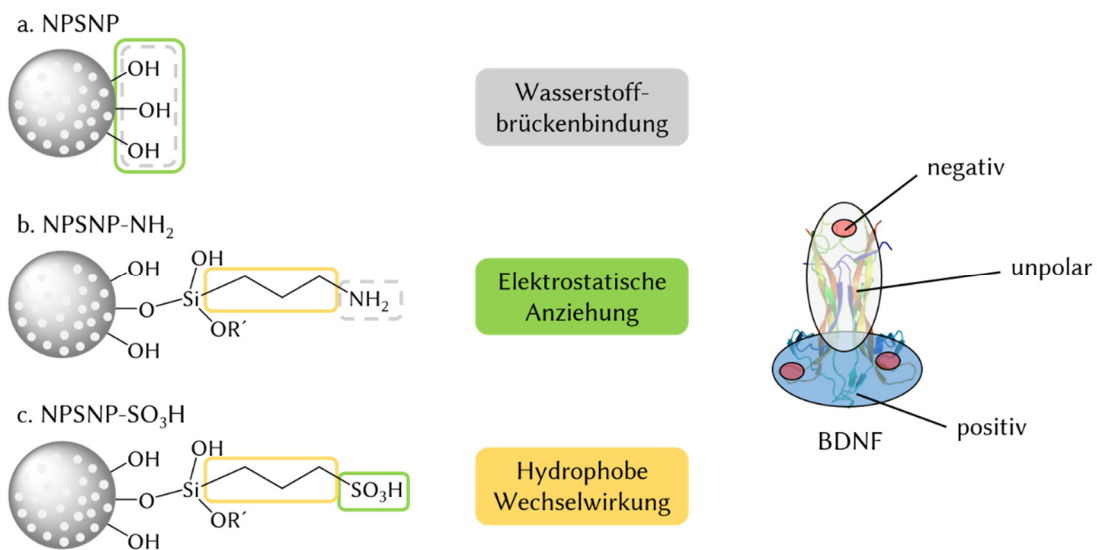


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der attraktiven Wechselwirkungen zwischen BDNF (vgl. Abbildung 2.1)^[49] und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten (NPSNP), amino-modifizierten (NPSNP-NH₂) und sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-SO₃H).

4.2.2 Quantifizierung der immobilisierten BDNF-Mengen

Zur Immobilisierung von BDNF auf die unterschiedlichen Nanopartikel wurden 5 mg der Nanopartikel in einer BDNF-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg mL⁻¹ (in PBS (0.1 % BSA)) inkubiert. Die Quantifizierung der immobilisierten Mengen erfolgte anschließend indirekt mittels der ELISA-Methode. Dazu wurden die verbleibenden Konzentrationen an BDNF in der Inkubations- und Waschlösung bestimmt und von der eingesetzten Inkubationskonzentration (1 µg mL⁻¹) subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Neben den bestimmten Konzentrationen ist auch die jeweilige Beladungseffizienz angegeben.

Die bestimmten Konzentrationen an BDNF liegen in allen Lösungen im unteren ng mL⁻¹-Bereich. Im Vergleich zur Inkubationskonzentration (1 µg mL⁻¹) sind die Konzentrationen damit sehr gering. Trotz der unterschiedlichen Wechselwirkungen

für die einzelnen NPSNPs lassen sich kaum Unterschiede hinsichtlich der berechneten Beladungseffizienz erkennen, da diese in allen Fällen bei nahezu 100 % liegt und somit die eingesetzte Menge von BDNF (1 μg) fast vollständig auf den 5 mg Nanopartikeln immobilisiert zu sein scheint. Folglich ergibt sich eine Menge von 0.2 μg BDNF pro mg Nanopartikel. Allerdings sollte bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass die Protein-Moleküle gewissen Konformationsänderungen durch die Adsorptions- und Desorptionsprozesse auf der Partikeloberfläche unterliegen, sodass es zur Denaturierung der Proteine kommen kann. Dies hätte zur Folge, dass die Proteine nicht mehr immunologisch aktiv sind und damit auch nicht mehr zum ELISA-Signal beitragen können und die indirekt bestimmten Immobilisierungsmengen vermeintlich zu hoch ausfallen.

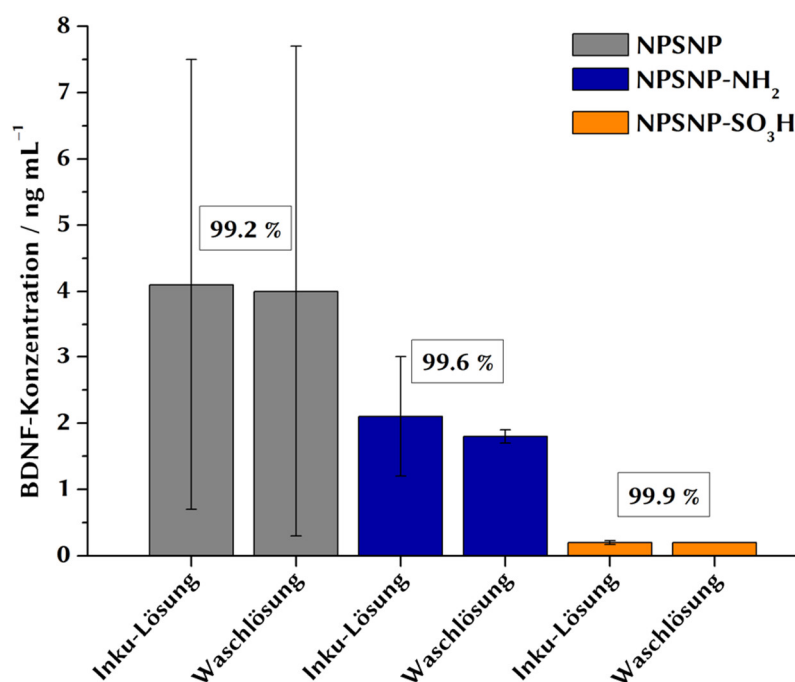


Abbildung 4.8: Darstellung der ermittelten BDNF-Konzentrationen in den jeweiligen Inkubations- bzw. Waschlösungen unter Angabe der dazugehörigen Beladungseffizienz.

Die Inkubationskonzentration wurde aus mehreren Gründen mit 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ relativ niedrig gewählt. Zum einen aus wirtschaftlichen Aspekten, da schon geringe Mengen an BDNF relativ kostspielig sind. Zum anderen konnten vorherige Studien zeigen, dass geringe Mengen an BDNF (im ng-Bereich) bereits ausreichen, um einen neuroprotektiven Effekt hervorzurufen.^[268,301] Zudem kann es insbesondere bei höheren Konzentrationen ($>5 \mu\text{g mL}^{-1}$) zu einem stärkeren Aggregationsverhalten der Proteine in Lösung kommen.^[64] Die Immobilisierung von größeren Aggregaten wäre für eine gewünschte langfristige und kontinuierliche Freisetzung von BDNF eher unvorteilhaft. Trotz der vielen Gründe, die für eine geringe Inkubationskonzentration sprechen, wurde die theoretisch mögliche BDNF-Immobilisierungsmenge ermittelt, die an die Oberfläche der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 nm in einer Monoschicht adsorbieren kann. Für diese

Berechnung (s. Kapitel 7.3.2 im Anhang, vgl. Berechnungen von Huang *et al.*)^[197] wurden folgende Voraussetzungen angenommen: Als Dichte für die nanoporösen Silica-Nanopartikel wurde ein Wert von 1 g cm^{-3} verwendet. Dieser Wert wurde aus der Literatur für Stöber-Partikel (2 g cm^{-3})^[317] übernommen und zusätzlich eine Porosität von 50 % angenommen. Da die Größe von einem BDNF-Dimer nicht bekannt ist, wurden hinsichtlich der Homologie zum NGF die Abmessungen eines NGF-Dimers in zweidimensionaler Ausrichtung ($6 \text{ nm} \times 3 \text{ nm}$) verwendet. Daraus resultierend ergibt sich eine maximale BDNF-Immobilisierungsmenge von $375 \mu\text{g}$ pro mg Nanopartikel. Im Vergleich zu der immobilisierten Menge von $0.2 \mu\text{g}$ pro mg Nanopartikel, die bei einer Inkubationskonzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ erhalten wird, zeigt sich das noch deutlich mehr BDNF auf der Oberfläche immobilisiert werden kann.

Allerdings muss bei dieser Aussage beachtet werden, dass sich auch BSA-Moleküle (1 mg mL^{-1}) in der Inkubationslösung befinden und diese aufgrund des natürlichen Verhaltens von Proteinen ebenfalls auf der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert werden können. Dadurch sind sie ein Konkurrent hinsichtlich der Bindungsstellen und können zudem die Immobilisierung von BDNF beeinflussen. Um den Einfluss von BSA zu untersuchen, wurden beispielhaft Zeta-Potential-Messungen der amino-modifizierten Nanopartikel nach der Inkubation in PBS (0.1 % BSA) ohne (NPSNP-NH₂-Inku) bzw. mit BDNF-Zusatz (NPSNP-NH₂-BDNF-Inku) durchgeführt und in Abbildung 4.9 im Vergleich zur Titrationskurve der amino-modifizierten Nanopartikel nach der Synthese (NPSNP-NH₂) gezeigt. Der isoelektrische Punkt der Partikel verschiebt sich durch die Inkubation in PBS (0.1 % BSA) unabhängig davon, ob ein BDNF-Zusatz vorhanden ist oder nicht, von pH 8 in den Bereich um pH 6. Diese Verschiebung kann durch eine Immobilisierung von BSA erklärt werden, da BSA (IEP = 4.7) unter den Inkubationsbedingungen eine negative Oberflächenladung aufweist und somit die Protonierung der Amino-Gruppen durch Zugabe von HCl teilweise kompensieren kann. Die Immobilisierung von BDNF hat im Vergleich zum BSA dagegen keinen Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften, zumal die Konzentration um den Faktor 1 000 geringer ist. Eine vollständige Immobilisierung von BDNF sollte jedoch durch eine Immobilisierung von BSA nicht beeinträchtigt werden, weil theoretische Berechnungen (s. Kapitel 7.3.2 im Anhang) gezeigt haben, dass auch eine vollständige Adsorption der eingesetzten BSA-Moleküle zusätzlich gewährleistet sein sollte.

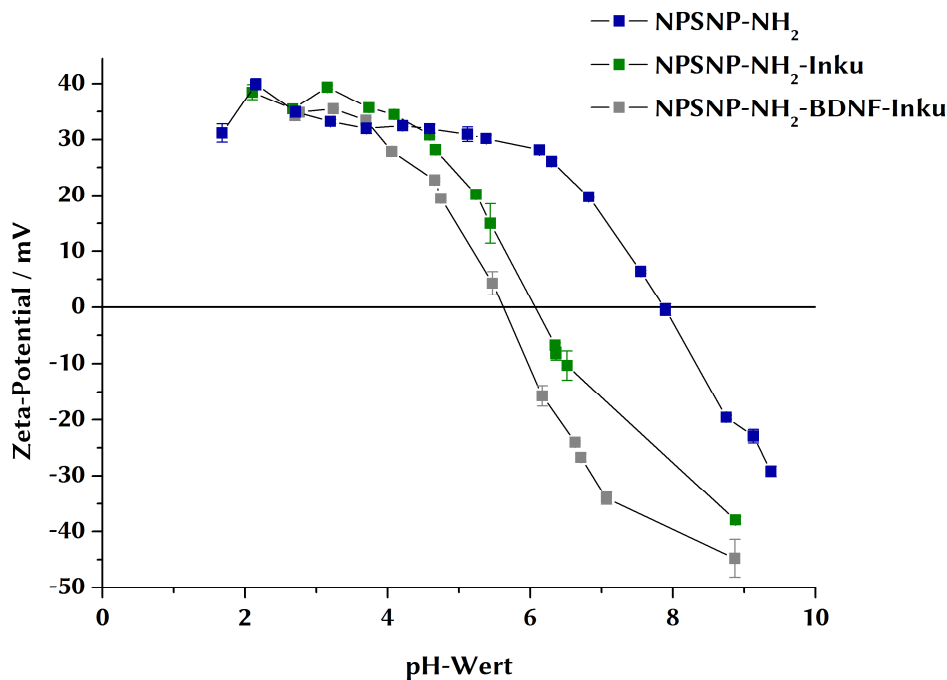


Abbildung 4.9: Zeta-Potential-Titrationskurven der amino-modifizierten Nanopartikel nach der Synthese (NPSNP-NH₂) und nach der Inkubation in PBS (0.1 % BSA) ohne (NPSNP-NH₂-Inku) bzw. mit einem BDNF-Zusatz von 1 µg mL⁻¹ (NPSNP-NH₂-BDNF-Inku).

Die nachgewiesene Anwesenheit von BSA auf der Oberfläche kann allerdings Auswirkungen auf die Immobilisierung von BDNF haben. Angesichts der negativen Oberflächenladung der BSA-Moleküle bei pH 7.4 sind elektrostatische Anziehungskräfte zum BDNF-Dimer möglich, da dieses positiv geladen ist. Somit sind alle Erklärungsmodelle für die Adsorption von BDNF an die NPSNPs noch ziemlich spekulativ, da viele Faktoren diese beeinflussen können. Dennoch kann aufgrund der Ergebnisse von einer erfolgreichen BDNF-Immobilisierung auf unterschiedliche NPSNPs gesprochen werden, unabhängig davon, welche Effekte diese letztlich begründen. Die gering eingesetzte BDNF-Menge und das Bestreben von Proteinen auf Oberflächen zu adsorbieren, in Kombination mit der großen Nanopartikeloberfläche, stellt jedoch eine plausible Erklärung für die fast vollständige Immobilisierung von BDNF auf alle unterschiedlichen Nanopartikel dar.

4.2.3 Freisetzung von BDNF von unterschiedlich modifizierten NPSNPs

Zur Untersuchung des Freisetzungsverhaltens von BDNF von unterschiedlichen NPSNPs wurde die freigesetzte Menge aus jeweils 5 mg beladenen Nanopartikel in PBS (0.1 % BSA) bei 37 °C mittels ELISA bestimmt und kumulativ in Abbildung 4.10 aufgetragen.

Je nach Modifizierung der NPSNPs zeigte sich ein anderes Freisetzungsprofil für BDNF. Während nur sehr geringe BDNF-Mengen aus den unmodifizierten (1 ng mg⁻¹, 0.5 % der immobilisierten Menge) und sulfonsäure-modifizierten (100 pg mg⁻¹, 0.05 % der immobilisierten Menge) Nanopartikeln über 60 Tage

freigesetzt wurden, konnten aus den amino-modifizierten Nanopartikeln deutlich höhere BDNF-Mengen (23 ng mg^{-1} , 11 % der immobilisierten Menge) in einem Zeitraum von 80 Tagen freigesetzt werden. Zusätzlich zu den geringen Mengen lässt sich bei den un- und sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln der Freisetzungsvorgang mit einem *burst release* in den ersten Tagen, gefolgt von einer geringen Freisetzungsrate, beschreiben. Nach 60 Tagen ist nahezu keine Zunahme in der Freisetzungsmenge bestimmbar, sodass die Freisetzungsforschungen mit diesen Nanopartikeln gestoppt wurden. Ein anderes Bild zeigt sich bei den amino-modifizierten Nanopartikeln. Über einen Zeitraum von 80 Tagen wird eine relativ kontinuierliche Freisetzung von BDNF beobachtet, weil im Gegensatz zu den anderen NPSNPs auch noch in den letzten Untersuchungstagen BDNF in messbaren Mengen freigesetzt wurde. Das Freisetzungsprofil lässt zusätzlich vermuten, dass die Freisetzung nach 80 Tagen noch nicht beendet ist, da die Freisetzungskurve keinen Sättigungspunkt erreicht hat. Allerdings verringert sich die Freisetzungsrate von 1.7 ng mg^{-1} pro Freisetzungstag in den ersten sieben Tagen auf eine Rate von 0.15 ng mg^{-1} pro Tag zum Ende des Freisetzungszeitraums. Somit erfolgte die Freisetzung nahezu einer Kinetik erster Ordnung.

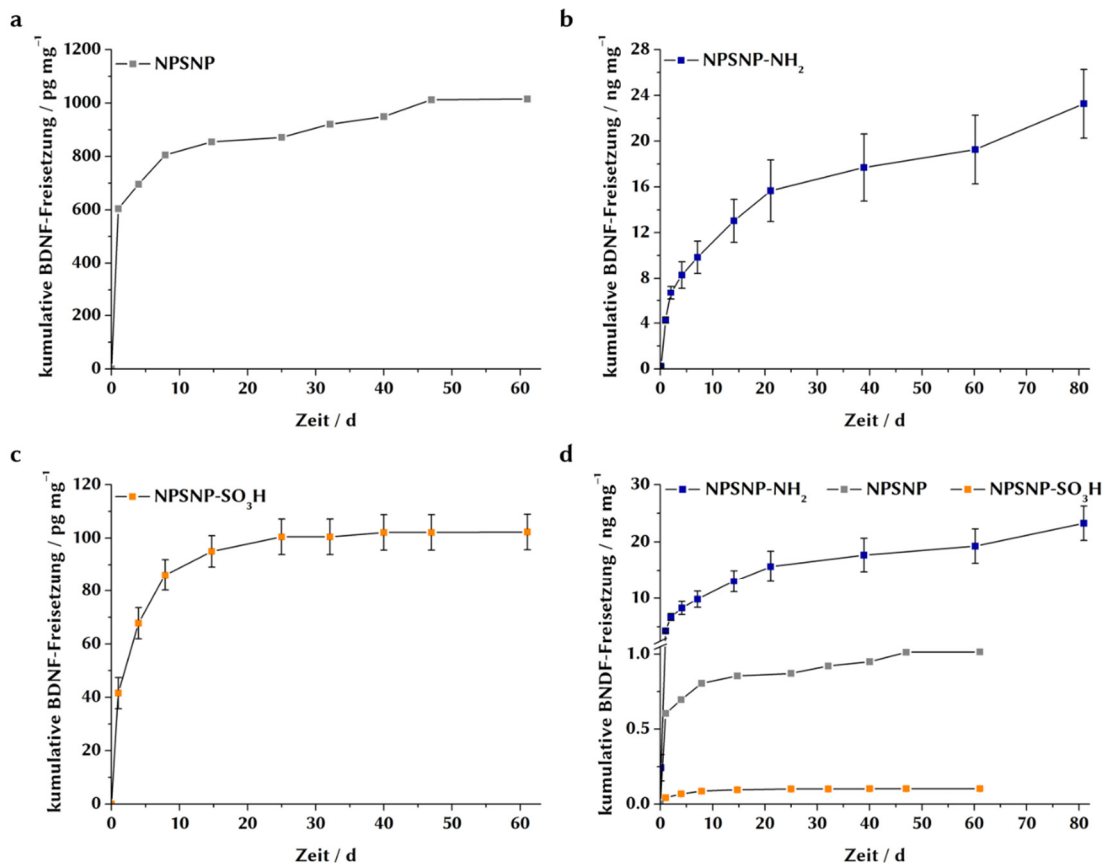


Abbildung 4.10: Kumulative BDNF-Freisetzung von unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln in PBS (0.1 % BSA) bei 37 °C. BDNF-Freisetzungsprofil für NPSNP über 60 Tage (a); für NPSNP-NH₂ über 80 Tage (b); für NPSNP-SO₃H über 60 Tage (c) und alle Freisetzungsprofile im Vergleich (d).

Generell ist die treibende Kraft für eine Freisetzung der Konzentrationsgradient an BDNF zwischen der Nanopartikeloberfläche und dem umgebenden Medium. Einen entscheidenden Einfluss haben aber unterschiedliche Faktoren wie z. B. die Interaktionen des BDNFs mit der Nanopartikeloberfläche. Die Ergebnisse der BDNF-Freisetzung deuten darauf hin, dass insbesondere die elektrostatische Anziehungskraft zwischen den un- bzw. sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln und dem BDNF die Freisetzung verhindert bzw. diese Wechselwirkungen zu einer stärkeren Immobilisierung des Proteins führen. Aufgrund der gleichen Gesamtladung in PBS ist die elektrostatische Anziehung zwischen den amino-modifizierten Nanopartikeln und dem BDNF nicht so stark ausgeprägt. In diesem Fall wird die Freisetzung hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen reguliert, die bezogen auf die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente eine kontinuierliche BDNF-Freisetzung über einen längeren Zeitraum ermöglichen. Ein weiterer Aspekt, der die Freisetzung von NPSNPs beeinflussen kann, ist die bekannte Degradation bzw. Auflösung der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen. Durch die Auflösung kann eine Freisetzung der Wirkstoffe begünstigt werden. Inwieweit es zur Degradation der eingesetzten Nanopartikel unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen gekommen ist, wird im Kapitel 4.2.5 näher betrachtet. Entscheidend für die Freisetzungsmenge an BDNF könnte auch die Stabilität des Proteins unter den verwendeten Bedingungen sein, denn auch im Falle der amino-modifizierten Nanopartikel, die bezüglich der Freisetzung die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten, konnten nur ca. 11 % der ermittelten Immobilisierungsmenge freigesetzt werden. Dies erscheint für den untersuchten Zeitraum von 80 Tagen relativ gering. Jedoch beobachteten Wang *et al.* eine ähnliche Freisetzungsrate von BDNF aus Mikropartikeln basierend auf nanoporösem Silica, die in einem Zeitraum von 70 Tagen 10 % der immobilisierten Menge freisetzten.^[102] Nichtsdestotrotz wurde der Aspekt der Degradation des Proteins als mögliche Ursache für die geringen BDNF-Mengen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im nächsten Kapitel 4.2.4 dargestellt und diskutiert.

4.2.4 Degradation von BDNF unter Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen

Um eine mögliche Degradation des BDNFs zu untersuchen, wurde eine BDNF-Lösung mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ und ohne Zusatz von Nanopartikeln unter den beschriebenen Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen behandelt. Alle Proben wurden mittels ELISA analysiert und die dazugehörigen Ergebnisse in Abbildung 4.11 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Behandlung unter Inkubationsbedingungen keine Auswirkungen auf die Stabilität der BDNF-Moleküle hatte, da die ermittelte Konzentration von $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ unter Berücksichtigung der Standardabweichung ($\pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) der Inkubationskonzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ entspricht. Auch die Lagerung für 24 h unter Freisetzungsbedingungen (37°C) führte nur zu einer geringen Abnahme der BDNF-Konzentration auf $0.94 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dies ändert sich

aber drastisch im weiteren Verlauf der Freisetzungsexperimente. Nach 7 d Freisetzung kann nur noch etwa die Hälfte der BDNF-Anfangskonzentration (52 %) detektiert werden. Eine noch stärkere Abnahme der BDNF-Konzentration lässt sich nach 14 d Freisetzung erhalten. In diesem Fall sind nur noch etwa 35 % der BDNF-Moleküle immunologisch aktiv und mittels ELISA nachweisbar.

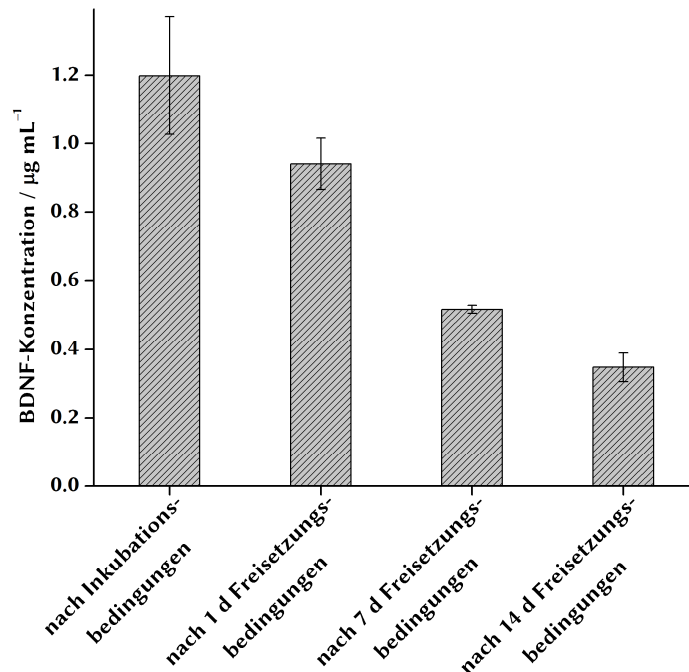


Abbildung 4.11: Mittels ELISA bestimmte BDNF-Konzentrationen einer BDNF-Lösung mit einer Anfangskonzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ nach unterschiedlichen Behandlungen (nach der Inkubation und nach 1 d, 7 d und 14 d Freisetzung).

Die Ergebnisse deuten auf eine Degradation des BDNFs im Verlauf der Freisetzungsexperimente hin, somit haben die anwesenden Albumin-Moleküle entgegen der Erwartung keinen bzw. nur einen schwachen Stabilisierungseffekt auf das BDNF.^[230] Die Degradation kann generell mit den Konformationsänderungen von Proteinen in Lösung erklärt werden, da die native Struktur nur gering thermodynamisch stabil ist.^[218] Solchen Konformationsänderungen unterliegen auch die freigesetzten BDNF-Moleküle, sodass die geringen Freisetzungsmengen (im besten Fall: 11 % der immobilisierten Menge) auf eine Degradation des Proteins in Lösung zurückgeführt werden kann. Allerdings ist zu beachten, dass in Gegenwart der Nanopartikel die Degradation geringer ausfallen sollte. Bereits vorherige Studien haben gezeigt, dass die Anbindung an nanoskalige Materialien einen stabilisierenden Effekt auf die Proteine haben kann.^[225] Dies deutet zumindest auch die Freisetzung von den aminomodifizierten Nanopartikeln an, bei der nach 80 Tagen noch 11 % der ermittelten Immobilisierungsmenge freigesetzt werden konnten und der Freisetzungsverlauf auf kein Ende hinweist. Sollte nämlich die Degradation des Proteins in Gegenwart der Nanopartikel einen ähnlichen Verlauf aufweisen, so sollten nach 80 Tagen keine 11 % der eingesetzten Proteinkonzentration noch immunologisch aktiv sein.

4.2.5 Einfluss der Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen auf die Degradation der NPSNPs

Die Degradation von NPSNPs unter physiologischen Bedingungen ist ein stark erforschtes Gebiet, jedoch sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgrund von vielen Faktoren, die die Degradation beeinflussen, sehr unterschiedlich. Somit wurde die Degradation der Nanopartikel, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, unter den verwendeten Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen untersucht, um explizit das Verhalten dieser zu beurteilen. Die Untersuchungen fokussierten sich auf die unmodifizierten und amino-modifizierten Nanopartikel mit bzw. ohne BDNF, da sie im Rahmen der schon erwähnten Veröffentlichung stattfanden.^[13] Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte nach der Behandlung unter Immobilisierungsbedingungen und nach 7 d, 14 d und 81 d im Freisetzungsmedium mittels TEM-Aufnahmen (Abbildung 4.12) hinsichtlich der Morphologie, der Größe und des Porensystems.

Im Vergleich zu den frisch synthetisierten Nanopartikeln zeigen die Nanopartikel nach einem simulierten Immobilisierungsschritt keine sichtbaren Veränderungen bezüglich ihrer Morphologie. Auch die Größe der Nanopartikel verändert sich durch die zusätzliche Behandlung kaum, da die durchschnittliche Größe beider Nanopartikelsorten um nur ca. 1 nm abnimmt (Tabelle 4.4 und 4.5). Zudem scheint das Porensystem angesichts der sichtbaren Porosität auf den TEM-Aufnahmen auch nach der Inkubation in PBS (0.1 % BSA) bei 4 °C und für 24 h intakt zu sein. Ein anderes Bild ergibt sich für die Nanopartikel nach einem simulierten Freisetzungsexperiment bei 37 °C und gleicher Zusammensetzung des Mediums. Einerseits verändert sich die Morphologie der Nanopartikel dahingehend, dass die gleichmäßig sphärische Struktur, die bei den frisch hergestellten Nanopartikeln aber auch nach der simulierten Immobilisierung sichtbar ist, einer ungeordneten Partikelform weicht. Andererseits zeigen sich Auswirkungen auf die Nanopartikelgröße und auf das Porensystem. Die Größe nimmt im Laufe der Freisetzung kontinuierlich bei beiden Nanopartikelsorten ab. Die Größenveränderung ist besonders in den ersten sieben Tagen ersichtlich, da hierbei die Größe der unmodifizierten Nanopartikel auf 36.2 nm und der amino-modifizierten Nanopartikel auf 37.0 nm abnimmt. Nach 14 d und 81 d Freisetzung ist die Größenabnahme nicht mehr so stark, weil sich der Durchmesser der Nanopartikel im Vergleich zu den Nanopartikeln nach 7 d Freisetzung nur um ca. 2–3 nm verändert. Außerdem unterscheiden sich die Nanopartikel dieser Zeitpunkte (14 d und 81 d) auch kaum in der Größe untereinander trotz der deutlich unterschiedlichen Lagerungszeit in wässrigem Medium. Die Veränderung bezüglich der Porosität zeigt sich am deutlichsten nach 7 d Freisetzung, da das Porensystem nicht mehr so klar erkennbar ist wie bei den Nanopartikeln direkt nach der Synthese.

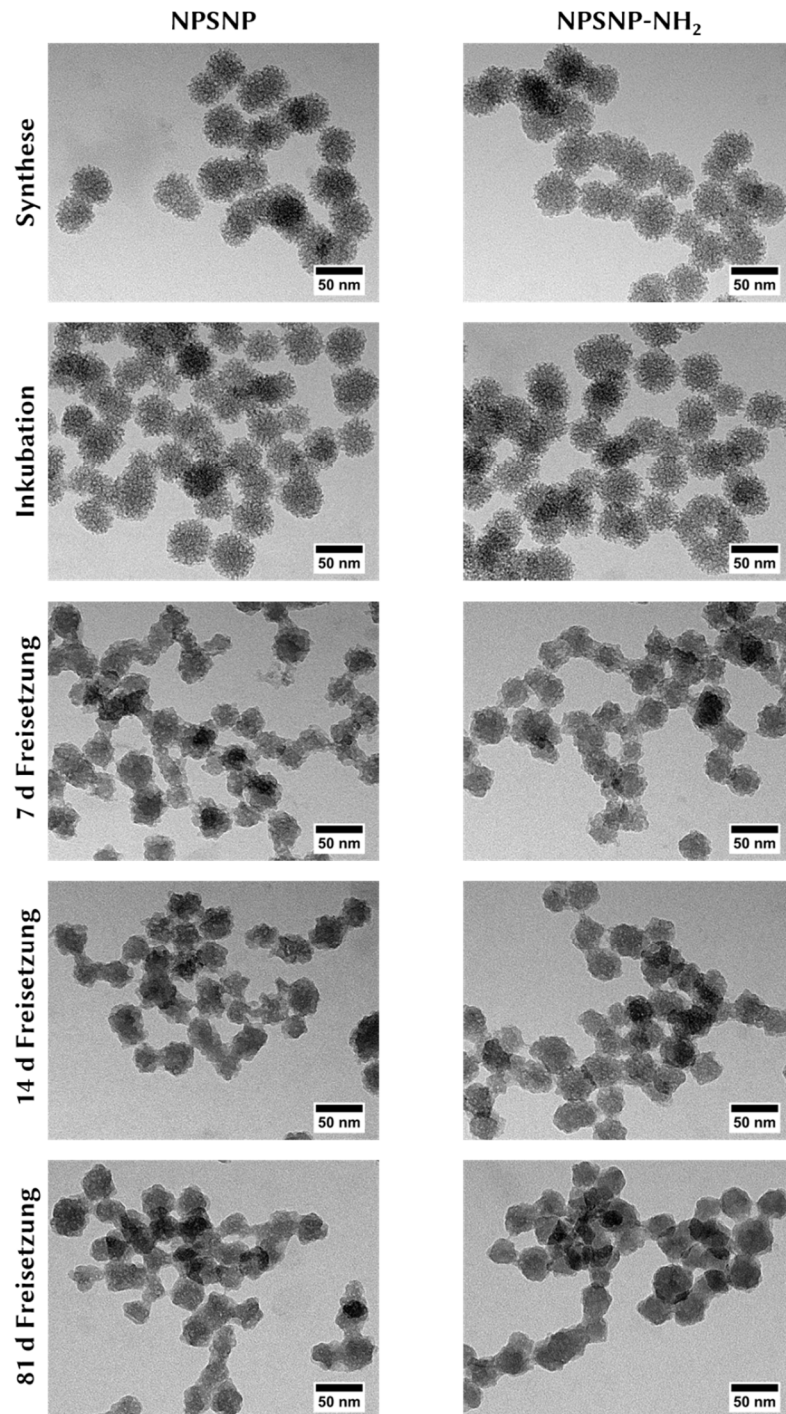


Abbildung 4.12: TEM-Aufnahmen der unmodifizierten und amino-modifizierten NPSNPs zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Freisetzung. Die TEM-Aufnahmen wurden zum einen direkt nach der Nanopartikel-Synthese (obere Aufnahmen) und nach einer zusätzlichen Behandlung in PBS (0.1 % BSA), welche den Immobilisierungsschritt simulieren sollte, aufgenommen. Des Weiteren sind TEM-Aufnahmen der Nanopartikel nach einem simulierten Freisetzungszeitraum von 7 d, 14 d und 81 d Tagen gezeigt.

Tabelle 4.4: Ermittelte Größe der unmodifizierten NPSNPs nach unterschiedlichen Bedingungen. Die Größe wurde anhand von TEM-Aufnahmen bestimmt, indem 30 Nanopartikel vermessen wurden und daraus der Mittelwert berechnet wurde.

	NPSNP	NPSNP _Inku	NPSNP _7d	NPSNP _14d	NPSNP _81d
∅	45.8	44.1	36.2	34.0	33.5
±	3.9	4.2	4.0	4.1	4.1

Tabelle 4.5: Ermittelte Größe der amino-modifizierten NPSNPs nach unterschiedlichen Bedingungen. Die Größe wurde anhand von TEM-Aufnahmen bestimmt, indem 30 Nanopartikel vermessen wurden und daraus der Mittelwert berechnet wurde.

	NPSNP-NH ₂	NPSNP-NH ₂ _Inku	NPSNP-NH ₂ _7d	NPSNP-NH ₂ _14d	NPSNP-NH ₂ _81d
∅	45.4	44.5	37.0	33.9	33.3
±	2.6	2.5	3.5	3.3	5.4

Zusätzlich wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors BDNF auf die Degradation der Nanopartikel nach der Immobilisierung und nach 7 d und 14 d Freisetzung untersucht. Die entsprechenden TEM-Aufnahmen der Nanopartikel in An- bzw. Abwesenheit von BDNF zeigen allerdings keine Unterschiede (s. Abbildung 7.3 im Anhang), werden demzufolge aufgrund ihrer fehlenden Aussagekraft für die Interpretation der Ergebnisse nicht weiter berücksichtigt.

Die Degradationsuntersuchungen anhand der TEM-Aufnahmen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Immobilisierungsbedingungen (4 °C, 24 h, in PBS (0.1 % BSA)) keine Auswirkungen auf die Morphologie und Größe der un- und amino-modifizierten Nanopartikel haben. Auch die Porenstruktur scheint sich unter diesen Bedingungen nicht zu verändern. Um diesen Aspekt näher zu betrachten, wurden zusätzlich Physisorptionsmessungen der Nanopartikel nach der simulierten Immobilisierung durchgeführt. Diese Untersuchungen (s. Tabelle 7.3 im Anhang) zeigten, dass sowohl die spezifische Oberfläche als auch das Porenvolumen beider Nanopartikelsorten schon durch die Immobilisierungsbedingungen verringert werden. Diese Abnahmen haben aber keine sichtbaren Auswirkungen auf das Porensystem wie die TEM-Aufnahmen in Abbildung 4.12 zeigen. Eine mögliche Erklärung ist ein teilweises *pore blocking*, welches durch das Auflösen von Silica-Spezies und das Wiederausfallen dieser hervorgerufen wird. Ein ähnlicher Effekt wird bei der Modifizierung der Nanopartikel beobachtet. Auch hier verringern sich die spezifische Oberfläche und das Porenvolumen durch die Modifizierung, jedoch führt dies zu keiner Veränderung der Morphologie der Nanopartikel auf den TEM-Aufnahmen (vgl. Kapitel 4.1). Diese Erklärung kann zudem durch Untersuchungen von Mortera *et al.* bestärkt werden, die bei der Dispersion in SBF eine Abnahme des

Porenvolumens bei gleichbleibender mesoporöser Struktur (XRD-Messungen) beobachteten.^[318]

Erst unter den Freisetzungsbedingungen kommt es zu Degradationserscheinungen bei den Nanopartikeln, die sich auch auf den TEM-Aufnahmen zeigen. Die ermittelte Größenabnahme und Verformung der Nanopartikel ist auf die Auflösung der Silica-Nanopartikel in wässrigem Medium zurückzuführen. Ein deutlicher Hinweis darauf ist auf der TEM-Aufnahme der unmodifizierten NPSNPs nach einer simulierten Freisetzung von 7 d (vgl. Abbildung 4.12) zu erkennen, bei der kleinere Silica-Fragmente sich von der Oberfläche ablösen. Dies ist ein generelles Verhalten der Silica-Nanopartikel, welches schon zuvor in zahlreichen Studien beobachtet wurde (zusammengefasst in Lit.^[163]). Eine vollständige Degradation der Nanopartikel, wie sie beispielsweise in der Studie von Yamada *et al.* gezeigt wurde,^[167] konnte bei den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen auch nach 81 d nicht erhalten werden. Ein ausschlaggebender Punkt ist in diesem Fall die verwendete Konzentration der Nanopartikel. Mit 5 mg mL^{-1} liegt die Konzentration deutlich über der Löslichkeit von porösen Silica-Nanopartikeln in PBS von $120 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.^[166] Das Medium wurde im Verlauf des Freisetzungsexperiments von 81 Tagen zehnmal gewechselt, sodass max. 1.2 mg Silica-Material sich auflösen konnten. In den ersten 7 d wurde das Medium allein fünfmal gewechselt, was eine mögliche Erklärung für die deutliche Größenabnahme in diesem Zeitraum sein kann. Zu späteren Zeitpunkten der Freisetzung erfolgte der Mediumwechsel immer seltener, sodass auch keine großen Veränderungen in der Größe nach 14 d und 81 d beobachtet werden konnten. Huang *et al.* konnten ein ähnliches Verhalten in ihren Degradationsuntersuchungen in PBS über 180 Tage erkennen.^[197] Des Weiteren ergaben die vorliegenden Untersuchungen, dass die un- und amino-modifizierten Nanopartikel sich hinsichtlich ihres Degradationsverhaltens kaum voneinander unterscheiden. Diese Beobachtung stimmt mit den bisherigen Untersuchungen überein, bei denen kovalent-angebundene Organosilane kaum Auswirkungen auf das Degradationsverhalten der Nanopartikel hatten im Gegensatz zu beispielsweise einer Polymerschicht auf der Nanopartikeloberfläche.^[172]

Zusammenfassend konnten die Degradationsuntersuchungen anhand von TEM-Aufnahmen zeigen, dass die Nanopartikel über einen Freisetzungszeitraum von 81 d teilweise degradieren und daher die Freisetzung von BDNF begünstigen können. Die unvollständige Degradation der Nanopartikel unter diesen Bedingungen bietet somit eine weitere Erklärung für das Freisetzungsprofil der amino-modifizierten Nanopartikel, da nach 81 d Freisetzung die Möglichkeit besteht, dass BDNF-beladene Nanopartikel im Medium vorliegen und die Freisetzung noch nicht beendet ist. Um eine ausführliche Untersuchung des Degradationsverhaltens der Nanopartikel durchzuführen, sollten neben TEM-Aufnahmen und Physisorptionsmessungen auch z. B. ICP-AES-Messungen (*inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy*) zur Ermittlung des Si-Gehaltes im Medium herangezogen werden.

4.2.6 Neuroprotektiver und -regenerativer Effekt von BDNF-beladenen NPSNPs und freigesetzten BDNF-Mengen

Das angestrebte Ziel ist der Einsatz der entwickelten BDNF-Freisetzungssysteme auf der Cochlea-Elektrode. Nachdem die nanoporösen Silica-Nanopartikel in Bezug auf die BDNF-Immobilisierung und -Freisetzung charakterisiert wurden, soll in diesem Kapitel mithilfe diverser *in vitro*-Untersuchungen ihre Anwendbarkeit für das angestrebte Ziel beurteilt werden. Aufgrund der Freisetzungsexperimente erscheinen die amino-modifizierten Nanopartikel angesichts einer langfristigen BDNF-Freisetzung am vielversprechendsten, sodass sich die folgenden Untersuchungen überwiegend auf diese fokussieren und die unmodifizierten Nanopartikel z. T. als Kontrolle mitgetestet wurden.

Zunächst wurde die generelle Cytokompatibilität der Nanopartikel mit bzw. ohne BDNF-Beladung mit den Spiralganglienneuronen (SGNs), bei denen es sich um die Nervenzellen in der Cochlea handelt, getestet. Dazu wurden die Überlebensraten und die Neuritenlängen der SGNs nach einer Kultivierung in direktem Kontakt mit den jeweiligen Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Da das eigentliche Ziel jedoch die Fixierung der Nanopartikel auf der Cochlea-Elektrode ohne jeglichen Kontakt zu den SGNs ist, wurde auch der neuroprotektive und -regenerative Effekt der Release-Überstände, in die BDNF aus den Nanopartikeln in einem vorherigen Experiment freigesetzt wurde, ermittelt. Hierbei sollen allein die freigesetzten BDNF-Mengen ihre biologische Aktivität auf die SGNs ausüben.

***In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven und -regenerativen Effekt der BDNF-beladenen Nanopartikel auf SGNs.** Anhand der Ergebnisse der generellen Cytokompatibilitätstests mit Fibroblasten und den Ergebnissen aus den Freisetzungsexperimenten wurde in einem Vorversuch mit SGZs der neuroprotektive Einfluss folgender Nanopartikelkonzentrationen untersucht: 125, 250 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diese Konzentrationen wiesen zum einen eine gute Cytokompatibilität mit Fibroblasten auf, sodass sie auch in den Untersuchungen mit SGZs keine negativen Effekte zeigen sollten. Zum anderen wurden diese relativ hohen Nanopartikelkonzentrationen ausgewählt, da die Freisetzungsexperimente gezeigt haben, dass schon aus 5 mg amino-modifizierte Nanopartikel in einem Zeitraum von 48 h, der für die Kultivierung mit den SGZs verwendet wurde, nur ca. 33 ng mL^{-1} BDNF freigesetzt werden. Diese Menge liegt somit schon unterhalb der BDNF-Konzentration von 50 ng mL^{-1} , die in einer Studie der Medizinischen Hochschule Hannover für ein maximales neuronales Überleben der SGNs ermittelt wurde.^[301] Die Nanopartikelkonzentration in *in vitro*-Untersuchungen kann jedoch nicht beliebig hoch gewählt werden, da in vorherigen Studien gewisse cytotoxische Effekte für Konzentrationen ab 1 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ beobachtet wurden.^[15,158] Deswegen wurde zunächst mit diesen drei Nanopartikelkonzentrationen gearbeitet. Zur Ermittlung des neuroprotektiven Effektes wurden Nanopartikeldispersionen in PBS (0.1 % BSA) mit dem SGZ-Standardmedium 1:1 verdünnt, sodass im Endeffekt die genannten Nanopartikelkonzentrationen erzielt wurden. Dabei wurden zuerst die unmodifizierten und

amino-modifizierten Nanopartikel ohne BDNF-Beladung in den unterschiedlichen Konzentrationen getestet, um generelle Effekte der Rohmaterialien auf die SGNs zu ermitteln. Die bestimmten Überlebensraten der SGNs sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

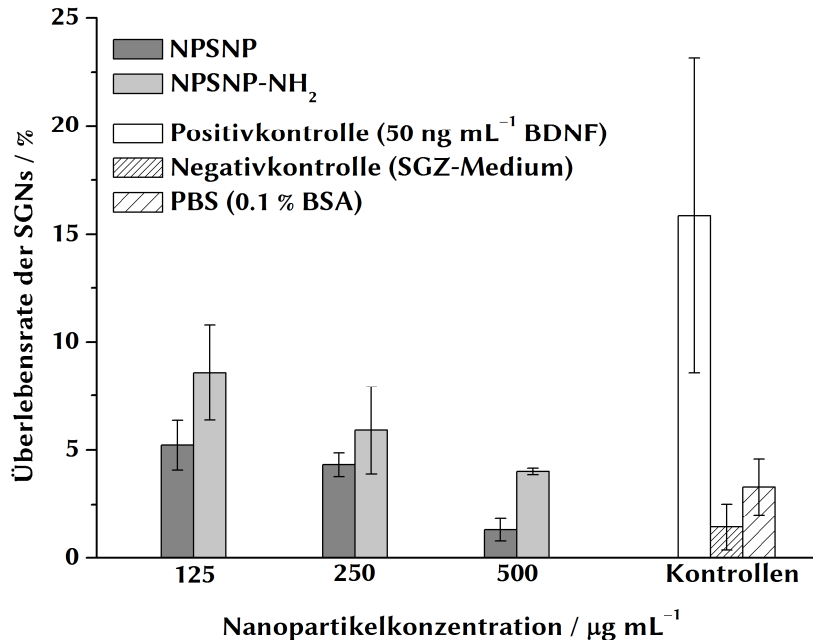


Abbildung 4.13: Vergleich der Überlebensraten der SGNs nach einer Kultivierung von 48 h im direkten Kontakt mit un- und amino-modifizierten Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei der Negativ- bzw. Positivkontrolle handelt es sich um das SGZ-Medium ohne bzw. mit einem BDNF-Zusatz von 50 ng mL^{-1} . Als zusätzliche Kontrolle wurde eine 1:1-Mischung von PBS (0.1 % BSA) und SGZ-Medium getestet, da die untersuchten Nanopartikeldispersionen auf diesem Medium basieren.

Alle Nanopartikel, bis auf die unmodifizierten NPSNPs in einer Konzentration von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, führen zu einer erhöhten Überlebensrate der SGNs, die sowohl oberhalb des Wertes für die Negativkontrolle als auch für die zusätzliche Kontrolle (1:1-Mischung von PBS (0.1 % BSA) und SGZ-Medium) liegt. Somit scheinen schon die unbeladenen Nanopartikel unabhängig von ihrer Modifizierung einen geringen neuroprotektiven Effekt auf die SGNs zu haben. Beim Vergleich der Nanopartikel-sorte zeigt sich in allen Konzentrationen eine höhere Überlebensrate der SGNs in Gegenwart der amino-modifizierten Nanopartikel. Vor allem bei der geringsten Konzentration wird eine relativ hohe Überlebensrate von 8.5 % erreicht, welche etwa der Hälfte des Wertes der Positivkontrolle entspricht. Des Weiteren fällt auf, dass die höchste Konzentration von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei beiden Nanopartikeln zu einer Abnahme in der Überlebensrate führt. Eine mögliche Ursache für die Abnahme kann die verstärkte Agglomeration der Nanopartikel bei dieser Konzentration sein, wie es auf den mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.14 ersichtlich wird. Anhand solcher repräsentativer Aufnahmen fand die Bestimmung der SGN-Überlebensraten für die einzelnen Proben statt. Es sei zu erwähnen, dass neben den Neuronen auch

die anderen Bestandteile der SGZ-Mischkultur, die Fibroblasten und die Gliazellen, auf den Aufnahmen deutlich erkennbar sind.

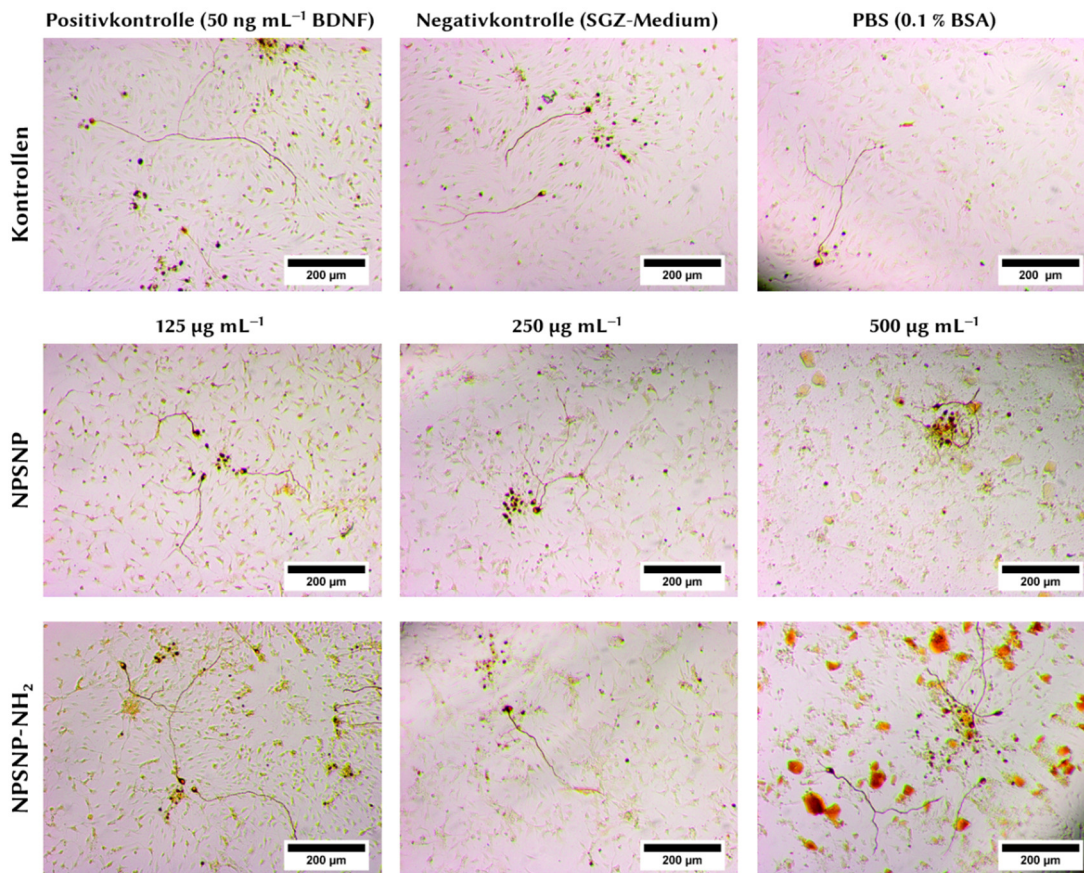


Abbildung 4.14: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der SGZ-Mischkultur nach einer Kultivierung von 48 h in Gegenwart von un- und amino-modifizierten Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen. Zum Vergleich wurden die SGZs in SGZ-Standardmedium ohne (Negativkontrolle) bzw. mit BDNF-Zusatz von 50 ng mL^{-1} (Positivkontrolle) und in einer 1:1-Mischung von PBS (0.1 % BSA) und SGZ-Medium kultiviert.

Mithilfe des Vorversuches konnte gezeigt werden, dass sich die Nanopartikelkonzentration von 500 µg mL^{-1} nicht für die *in vitro*-Untersuchungen mit SGZs eignet. Aus diesem Grund wird in den folgenden Untersuchungen nur mit den anderen beiden Konzentrationen gearbeitet. Auch fokussieren sich die weiteren Untersuchungen nur noch auf die amino-modifizierten Nanopartikel, da die unmodifizierten Nanopartikel in allen Konzentrationen zu geringeren Überlebensraten der SGNs führten.

Um den Einfluss der BDNF-Beladung auf den neuroprotektiven Effekt der Nanopartikel zu bestimmen, wurden die amino-modifizierten Nanopartikel ohne bzw. mit BDNF-Beladung in den Konzentrationen 125 µg mL^{-1} und 250 µg mL^{-1} für 48 h mit den SGZs kultiviert. Die BDNF-Beladung erfolgte direkt vor der Zugabe zur Zellkultur nach dem beschriebenen Protokoll (s. Kapitel 3.3.4). Neben den Kontrollen, die auch schon im Vorversuch zum Einsatz kamen, wurden zusätzlich unbeladene,

amino-modifizierte Nanopartikel in den beiden Konzentrationen mit einem exogenen BDNF-Zusatz von 50 ng mL^{-1} getestet. Diesbezüglich sollte der neuroprotektive Effekt von immobilisiertem und exogen zugegebenem BDNF verglichen werden. Anhand der repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.15) lässt sich zunächst beobachten, dass alle Zellkulturen, die BDNF in jeglicher Form – sei es immobilisiert oder exogen zugegeben – enthalten, eine höhere Anzahl an Neuronen aufweisen. Auffallend ist, dass die Anzahl in Gegenwart der amino-modifizierten Nanopartikel mit immobilisiertem oder exogen zugegebenem BDNF z. T. höher zu sein scheint als in der Positivkontrolle.

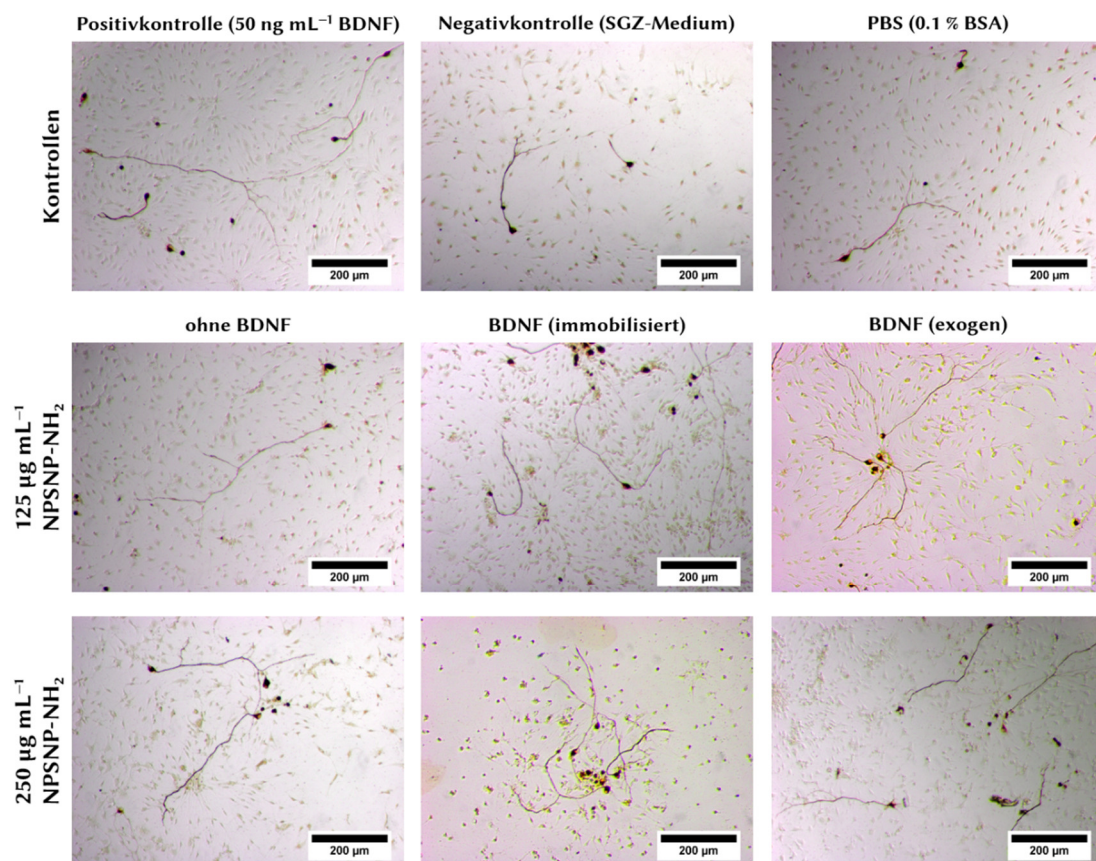


Abbildung 4.15: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der SGZs nach einer Kultivierung von 48 h in Gegenwart von amino-modifizierten Nanopartikeln (ohne BDNF), BDNF-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikeln (BDNF immobilisiert) und amino-modifizierten Nanopartikeln mit einer exogenen Zugabe von 50 ng mL^{-1} BDNF (BDNF exogen) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Zum Vergleich wurden die SGZs in SGZ-Standardmedium ohne (Negativkontrolle) bzw. mit BDNF-Zusatz von 50 ng mL^{-1} (Positivkontrolle) und in einer 1:1-Mischung von PBS (0.1 % BSA) und SGZ-Medium kultiviert.

Um jedoch quantitative Aussagen hinsichtlich des neuroprotektiven Effektes zu machen, wurden die jeweiligen Überlebensraten der SGNs bestimmt und in Abbildung 4.16 dargestellt. Dabei erfolgte die Auswertung der Ergebnisse nach einer statistischen Analyse, indem die verschiedenen Bedingungen in zwei voneinander unabhängigen Zellkulturuntersuchungen mit jeweils einer Dreifachbestimmung

($N = 2$, $n = 3$) untersucht wurden. Zunächst bestätigen die Ergebnisse die Vermutung aus dem Vorversuch, dass die amino-modifizierten Nanopartikel selbst einen geringfügigen neuroprotektiven Effekt auf die SGNs haben. Denn im Vergleich zur Positivkontrolle weisen die Proben, die zusätzlich zu den 50 ng mL^{-1} BDNF noch amino-modifizierte Nanopartikel in der Zellkultur aufweisen, eine höhere Überlebensrate der SGNs auf. Im Falle der Nanopartikelkonzentration von $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ist die Überlebensrate sogar signifikant höher. Auch die BDNF-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel führen zu Überlebensraten, die signifikant ($p < 0.01$) über dem Wert der Positivkontrolle liegen. Im Einzelnen liegen die Überlebensraten der SGNs in Gegenwart der BDNF-beladenen Nanopartikel bei $23.1 \% \pm 2.6 \%$ für $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ und bei $23.3 \% \pm 2.0 \%$ für $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ und sind somit die höchsten Werte im Experiment. Da die Unterschiede zu den unbeladenen Nanopartikeln noch deutlicher ausfallen, lässt sich den BDNF-beladenen Nanopartikeln ein starker neuroprotektiver Effekt zuschreiben. Dies wird durch den Vergleich mit den Überlebensraten der unbeladenen Nanopartikel, zu denen exogen 50 ng mL^{-1} BDNF hinzugegeben wurde, bestätigt. Es zeigt sich, dass das immobilisierte BDNF auf den Nanopartikeln entweder genauso biologisch aktiv (für die Nanopartikelkonzentration von $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) oder sogar effektiver (für die Nanopartikelkonzentration von $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) als das exogen zugegebene BDNF ist. Der neuroprotektive Effekt muss in diesem Fall durch einen direkten Kontakt des BDNFs auf der Nanopartikeloberfläche und den SGNs kommen, da im Kultivierungszeitraum von 48 h in Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration nur 1.6 ng mL^{-1} bzw. 0.8 ng mL^{-1} BDNF freigesetzt werden und diese Mengen für einen solchen neuroprotektiven Effekt zu gering sind. Unter Berücksichtigung der BDNF-Immobilisierungsmenge von $0.2 \text{ } \mu\text{g}$ pro mg Nanopartikel (vgl. Kapitel 4.2.2) und den eingesetzten Nanopartikelkonzentrationen von $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ lassen sich die BDNF-Mengen berechnen, die sich auf den Nanopartikeln befinden. Bei der höheren Nanopartikelkonzentration ergibt sich eine BDNF-Menge von 50 ng mL^{-1} , die mit der Konzentration in der Positivkontrolle bzw. mit der Konzentration des exogen zugegebenen BDNFs übereinstimmt. Diese Berechnung unterstützt damit das Ergebnis, dass das immobilisierte BDNF und das exogen zugegebene BDNF bei einer Nanopartikelkonzentration von $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ einen vergleichbaren neuroprotektiven Effekt aufweisen. Bei einer Nanopartikelkonzentration von $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ befindet sich somit eine BDNF-Konzentration von 25 ng mL^{-1} im Kultivierungsmedium. Interessanterweise ist diese immobilisierte BDNF-Menge effektiver als das exogen zugegebene BDNF in einer Konzentration von 50 ng mL^{-1} bei der gleichen Nanopartikelkonzentration von $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Dieses Ergebnis ist an dieser Stelle schwer zu erklären, da viele Faktoren einen Einfluss darauf ausüben könnten, sodass es weiterer Untersuchungen bedarf. Letztendlich lässt sich aber durch diese Untersuchungen festhalten, dass das immobilisierte BDNF seine biologische Aktivität auf der Oberfläche der Nanopartikel beibehält und einen positiven Effekt auf das Überleben der SGNs ausübt.

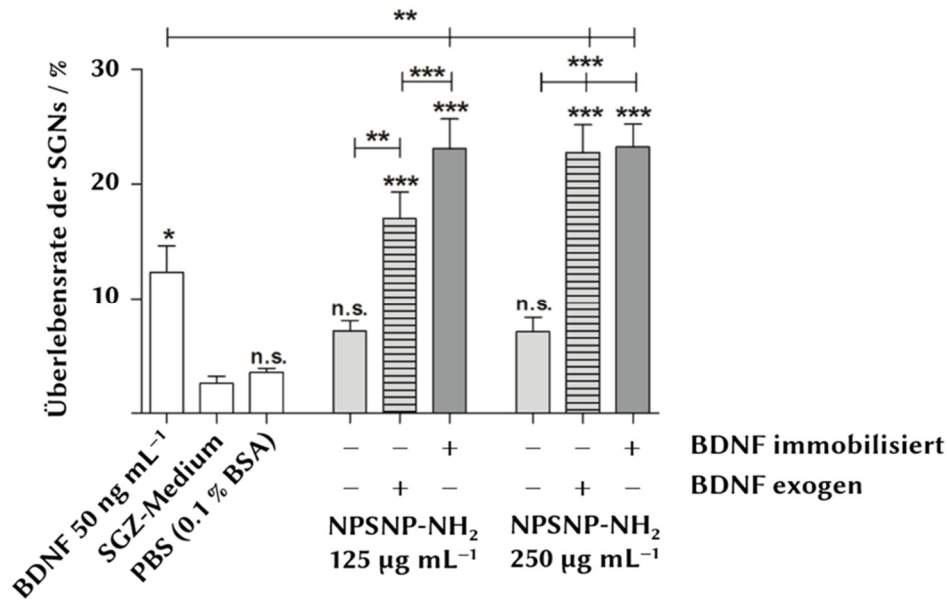


Abbildung 4.16: Vergleich der Überlebensraten der SGNs nach einer Kultivierung von 48 h in Gegenwart von NPSNP-NH₂ (hellgrau), BDNF-beladenen NPSNP-NH₂ (dunkelgrau) und NPSNP-NH₂ mit einer exogenen Zugabe von 50 ng mL⁻¹ BDNF (hellgrau, gestreift). Bei den Kontrollen handelt es sich wiederum um die Proben, die schon bei den vorherigen Untersuchungen mitgetestet wurden. Alle Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben ($N = 2$, $n = 3$). Die Sternchen über den Balken geben die Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle an. Sternchen zwischen zwei Balken zeigen die Signifikanz zwischen diesen Bedingungen auf.

Um neben dem neuroprotektiven Effekt auch einen neuroregenerativen Effekt zu untersuchen, wurden die Neuritenlängen der fünf längsten Neurite eines Wells bestimmt (Abbildung 4.17). Hierbei kann jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Nanopartikelproben beobachtet werden, denn sowohl die Proben mit BDNF-beladenen Nanopartikeln als auch die Proben mit unbeladenen Nanopartikeln zeigen Neuritenlängen im Bereich von $422 \pm 36 \mu\text{m}$ bis $491 \pm 22 \mu\text{m}$ auf. Es lässt sich nur im Vergleich zur Negativkontrolle ($334 \pm 27 \mu\text{m}$) eine Zunahme in den Neuritenlängen erkennen. Folglich zeigen die Nanopartikel unabhängig von der Anwesenheit von BDNF einen geringfügigen neuroregenerativen Effekt auf, der allerdings nur im Falle der Nanopartikel, bei denen BDNF exogen zugegeben wurde, signifikant ist.

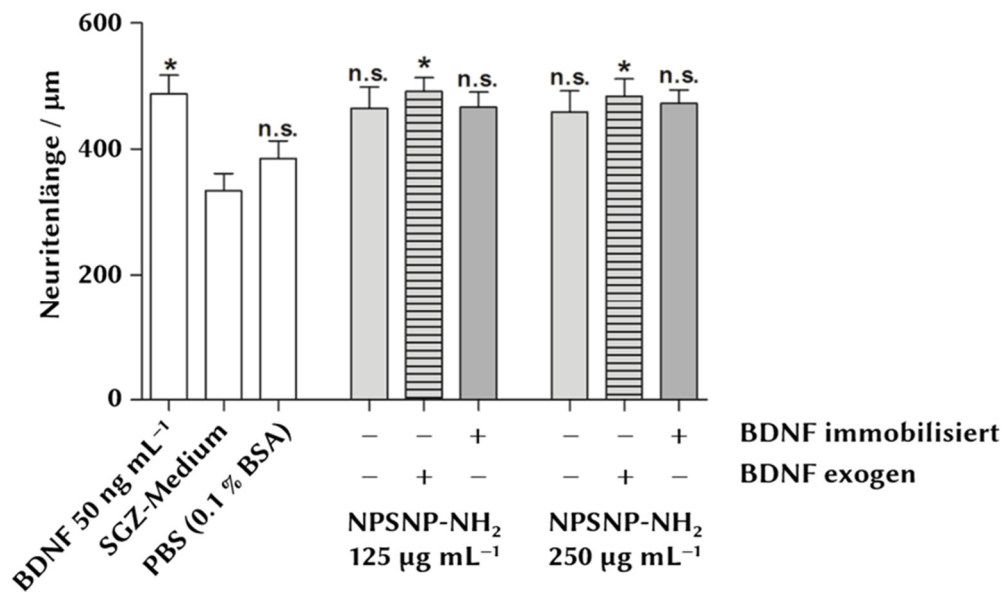


Abbildung 4.17: Neuritenlängen der SGNs kultiviert mit BDNF-beladenen Nanopartikeln (dunkelgrau) und nicht mit BDNF beladenen Nanopartikeln mit (hellgrau, gestreift) und ohne (hellgrau) exogenem BDNF-Zusatz. Alle Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben ($N = 2$, $n = 3$). Die Sternchen über den Balken geben die Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle an.

Die *in vitro*-Untersuchungen mit BDNF-beladenen, amino-modifizierten Silica-Nanopartikeln lieferten erste positive Erkenntnisse in Bezug auf die Anwendung im Innenohr. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Nanopartikel mit aber auch ohne BDNF-Beladung keinen negativen Einfluss auf die SGNs haben. Im Gegenteil konnte vor allem für die BDNF-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel ein starker neuroprotektiver Effekt beobachtet werden. Interessanterweise zeigte auch das Rohmaterial, die amino-modifizierten Silica-Nanopartikel, einen neuroprotektiven Effekt auf, der bis dato in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Die Ergebnisse hinsichtlich des neuroprotektiven Effektes der BDNF-beladenen Nanopartikel korrelieren gut mit den Ergebnissen aus einer vorherigen Studie von Wise *et al.*^[268] Diese *in vivo*-Studien zeigten einen neuroprotektiven Effekt für BDNF-beladene Silica-Mikropartikel, die aus nanoporösen Silica-Nanopartikeln aufgebaut waren. Neben dem neuroprotektiven Effekt konnte in den vorliegenden Untersuchungen kein neuroregenerativer Effekt der BDNF-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel beobachtet werden, der auf das immobilisierte BDNF zurückzuführen ist. Dieser Aspekt wird jedoch auch erst in den *in vitro*-Untersuchungen mit den freigesetzten BDNF-Mengen, welche im nächsten Kapitel folgen, entscheidend sein. Denn in der angestrebten Anwendung im Sinne eines Implantat-assoziierten Freisetzungssystems gibt es keinen direkten Kontakt zwischen den SGNs und den Nanopartikeln, sodass die freigesetzten BDNF-Mengen neben der Erhöhung des neuronalen Überlebens auch zu gewissen Neuritenlängen führen sollten, damit der Abstand zwischen den Neuronen und der Cochlea-Elektrode verringert wird. Ein verbesserter

Elektroden-Nerven-Kontakt ist dabei maßgeblich für den Höreindruck mit einem Cochlea-Implantat entscheidend.

***In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven und -regenerativen Effekt der freigesetzten BDNF-Mengen auf SGNs.** Um dem angestrebten Ziel durch weitere *in vitro*-Untersuchungen gerecht zu werden, wurden die SGZs auch in Gegenwart der einzelnen Überstände aus den Freisetzungsexperimenten der aminomodifizierten Nanopartikel (5 mg) mit bzw. ohne BDNF-Beladung kultiviert. Dabei kamen die Zellen für 48 h in eine 1:1-Mischung des jeweiligen Überstandes und des SGZ-Mediums. Um gewissen Lagerungseffekten vorzubeugen, wurden die Überstände bis zu den Untersuchungen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und erst kurz vor der Zugabe zum Zellmedium aufgetaut. Auf den mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.18) zeigt sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des neuronalen Überlebens zwischen den Überständen aus den Freisetzungsexperimenten mit BDNF-beladenen Nanopartikeln und den Überständen aus den Kontrollversuch mit unbeladenen Nanopartikeln. Während im ersten Fall bei allen Überständen eine hohe Anzahl an Neuronen sichtbar ist, ist diese im Falle der Überstände von den unbeladenen Nanopartikeln beträchtlich geringer.

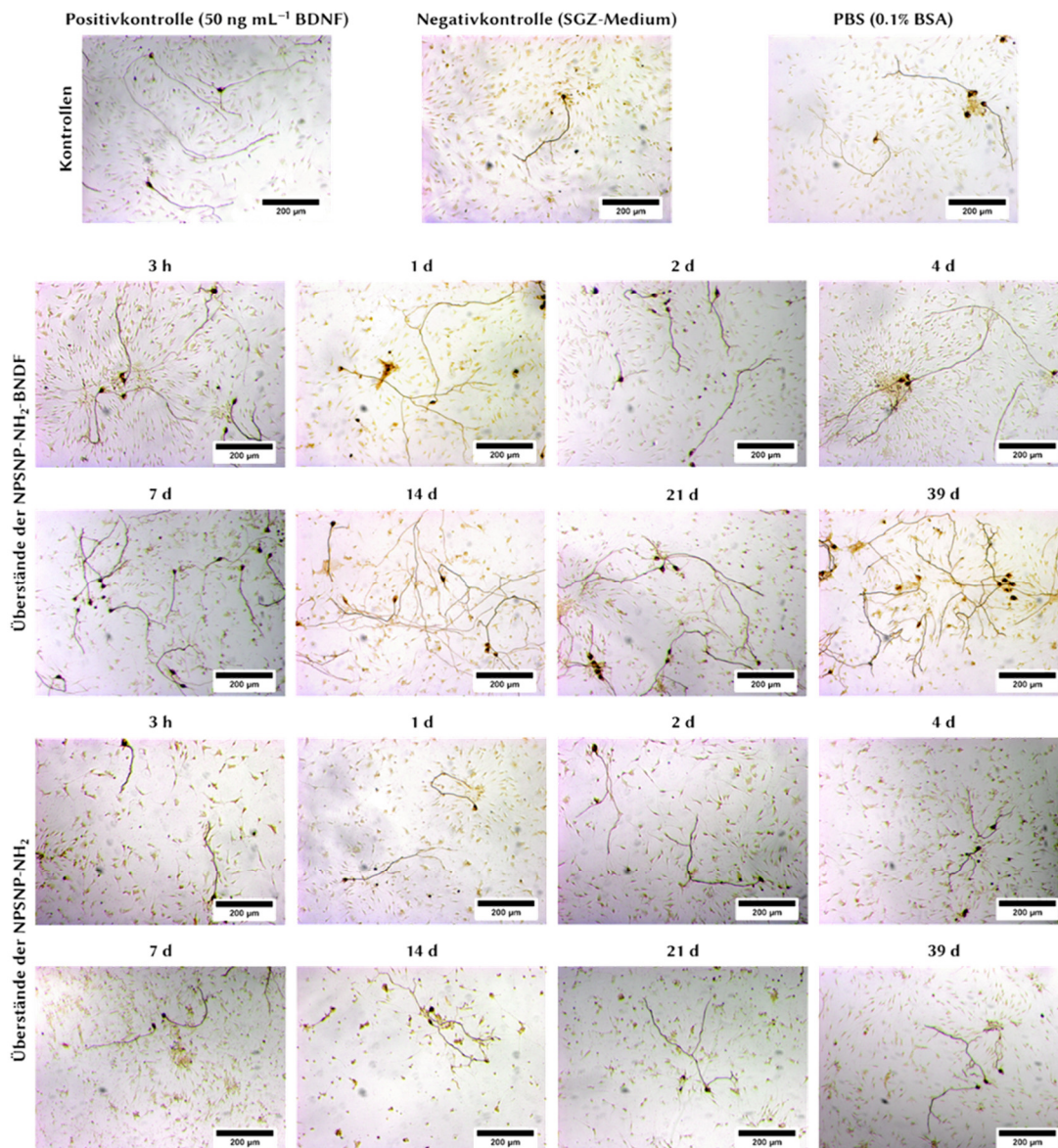


Abbildung 4.18: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der SGZs nach einer Kultivierung von 48 h in unterschiedlichen Mediumzusammensetzungen. Die Zellen wurden in Gegenwart der Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit BDNF-beladenen Nanopartikeln (NPSNP-NH₂-BDNF) und den Überständen aus dem Kontrollversuch mit unbeladenen Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) kultiviert. Als Kontrollen dienten wiederum die Positiv- (BDNF-Zusatz von 50 ng mL⁻¹), Negativ- (SGZ-Medium) und Zusatzkontrolle (PBS (0.1 % BSA):SGZ-Medium (1:1)).

Die bestimmten Überlebensraten der SGNs (Abbildung 4.19) bestätigen die Beobachtungen aus dem Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen. Es lässt sich eine deutlich erhöhte Überlebensrate der SGNs, die in den Überständen aus den Freisetzungsexperimenten mit NPSNP-NH₂-BDNF kultiviert wurden, im Vergleich zur Negativkontrolle beobachten. Dabei führen alle Überständen bis auf den, der nach 3 h abgenommen wurde, zu einer signifikanten Erhöhung der SGN-Überlebensrate ($p < 0.001$). Beim Vergleich der Überstände der einzelnen Freisetzungsexperimente zeigt sich, dass die Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit NPSNP-NH₂-

BDNF zu einem höheren neuronalen Überleben führen als die Überstände aus dem Kontrollversuch mit den NPSNP-NH₂. Dabei sind die bestimmten Überlebensraten alle bei etwa 20 % mit Ausnahme der Zellkultur, die mit dem Überstand nach 3 h inkubiert wurde. Folglich liegen diese Überlebensraten im Bereich der Positivkontrolle oder führen z. T. sogar zu höheren Überlebensraten, die im Falle des Überstands nach 14 d auch noch signifikant ist. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da die Freisetzungsexperimente gezeigt haben, dass bei keinem Überstand eine BDNF-Konzentration von 50 ng mL⁻¹ erreicht wurde. Die freigesetzten BDNF-Mengen der einzelnen Überstände lagen im Bereich von etwa 10–20 ng mL⁻¹. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die für ein maximales SGN-Überleben bestimmte BDNF-Konzentration von 50 ng mL⁻¹ möglicherweise nicht die allgemeingültige Konzentration für alle *in vitro*-Untersuchungen ist.^[301] Zum einen sind biologische Testsysteme immer sehr anfällig auf kleine Änderungen, sodass eine Allgemeingültigkeit schwer auszumachen ist. Zum anderen konnten andere Studien auch ein hohes neuronales Überleben bei einer BDNF-Konzentration von 10 ng mL⁻¹ zeigen,^[319] sodass eine optimale Konzentration von BDNF nicht unbedingt gegeben ist und auch die freigesetzten BDNF-Mengen einen hohen neuroprotektiven Effekt hervorrufen können bzw. auch machen. Die geringe SGN-Überlebensrate des Überstandes nach 3 h (ca. 10 %) korreliert dagegen gut mit den Ergebnissen aus dem Freisetzungsexperiment, da auch hier gezeigt werden konnte, dass nach 3 h nur geringe Mengen an BDNF (1.2 ng mL⁻¹) freigesetzt werden. Die Überstände des Kontrollversuchs mit unbeladenen Nanopartikeln erhöhen die Überlebensrate der SGNs unabhängig vom Freisetzungszeitraum kaum und sind vergleichbar mit den Werten der Negativ- und Zusatzkontrolle. Dies kann durch das Nichtvorhandensein des BDNFs begründet werden. Somit führen diese Untersuchungen zur Schlussfolgerung, dass das zunächst immobilisierte und dann freigesetzte BDNF seine biologische Aktivität bezüglich eines neuroprotektiven Effektes durch den Adsorptions- und Desorptionsprozess auf der Nanopartikeloberfläche nicht verliert.

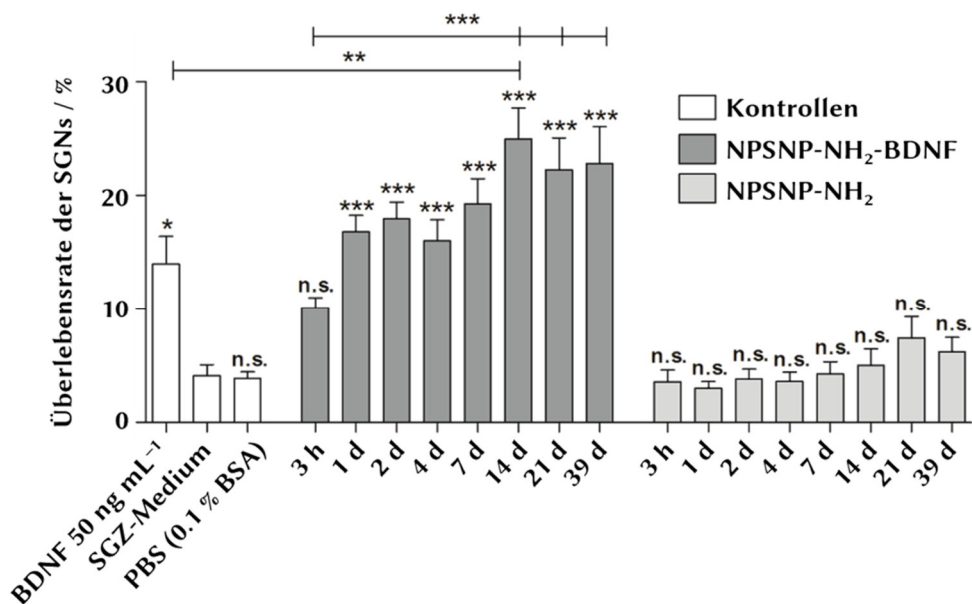


Abbildung 4.19: Bestimmte Überlebensraten der SGNs nach einer Kultivierung von 48 h. Die Zellen wurden in Gegenwart der Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit BDNF-beladenen Nanopartikeln (NPSNP-NH₂-BDNF) und der Überstände aus den Kontrollversuch mit unbeladenen Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) kultiviert. Alle Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben ($N = 3$, $n = 3$). Die Sternchen über den Balken geben die Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle an. Sternchen zwischen zwei Balken zeigen die Signifikanz zwischen diesen Bedingungen auf.

Entscheidend neben dem neuroprotektiven Effekt der freigesetzten BDNF-Mengen ist bei diesen *in vitro*-Untersuchungen auch ein möglicher neuroregenerativer Effekt, der z. B. anhand des Neuritenwachstums beurteilt werden kann. Dies ist auch ein für die Anwendung wichtiger Aspekt, denn durch ein solches Neuritenwachstum kann der Abstand zwischen der Cochlea-Elektrode und den Neuronen verringert werden. Die Ergebnisse hinsichtlich der Neuritenlängen sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Die Kultivierung in den Überständen der BDNF-beladenen Nanopartikel (NPSNP-NH₂-BDNF) resultierte in geringfügig längeren Neuriten ($467 \pm 19 \mu\text{m}$ bis $567 \pm 21 \mu\text{m}$) als die Kultivierung in den Überständen der unbeladenen Nanopartikel (NPSNP-NH₂), die Neuritenlängen im Bereich von $369 \pm 26 \mu\text{m}$ bis $519 \pm 37 \mu\text{m}$ aufweisen. Obwohl der Effekt nicht signifikant ist, lässt sich ein Trend vor allem dann erkennen, wenn die Werte der Proben, die zum selben Zeitpunkt abgenommen wurden, miteinander verglichen werden. Folglich wird von den freigesetzten BDNF-Mengen zusätzlich zum starken neuroprotektiven Effekt ein geringer neuroregenerativer Effekt ausgeübt.

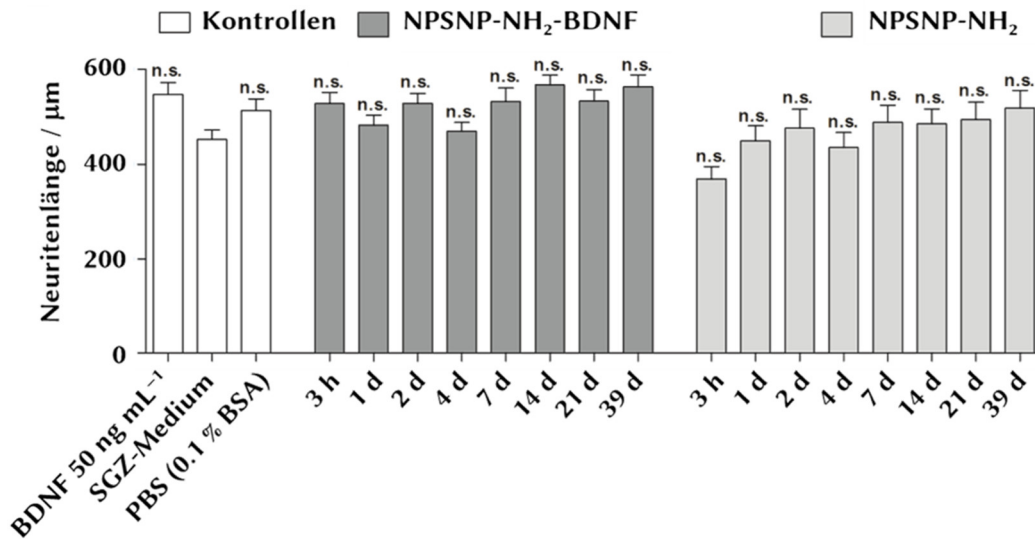


Abbildung 4.20: Neuritenlängen der SGNs kultiviert in den Überständen der BDNF-beladenen (NPSNP-NH₂-BDNF) und der nicht mit BDNF beladenen Nanopartikel (NPSNP-NH₂). Alle Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben ($N = 3$, $n = 3$). Die Bemerkungen über den Balken geben die Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle an.

Zusammenfassend lieferten die *in vitro*-Untersuchungen in Bezug auf die Anwendung von BDNF-beladenen NPSNPs im Innenohr vielversprechende Ergebnisse. Insbesondere die Untersuchungen mit den freigesetzten BDNF-Mengen sind dabei neuartige Untersuchungen, da bis dato explizit der Einfluss der freigesetzten BDNF-Mengen auf die SGNs nicht gezeigt wurde. Dass die freigesetzten BDNF-Mengen diesbezüglich jedoch ein Potential aufweisen, konnten Tan *et al.* in ihrer Studie feststellen, indem freigesetztes BDNF die Apoptose von SH-SY5Y-Zellen verhinderte.^[269] Hinsichtlich des starken neuroprotektiven und in geringerem Maße neuroregenerativen Effektes der freigesetzten BDNF-Mengen ergibt sich somit die lukrative Möglichkeit, dass die BDNF-Freisetzungssysteme auf der Cochlea-Elektrode ihre Anwendung finden können und keinen direkten Kontakt zu den Neuronen aufweisen müssen, um einen positiven Effekt auf diese auszuüben. Ein wesentlicher Aspekt, der bei der Beurteilung der Ergebnisse beachtet werden muss, ist, dass die nachgewiesenen Ergebnisse von den einzelnen Freisetzungsoberständen hervorgerufen worden sind und damit in der Gesamtheit die freigesetzten BDNF-Mengen zu weitaus höheren Effekten führen könnten.

4.2.7 Fluoreszenzmarkierung von BDNF

Neben der Entwicklung eines Freisetzungssystems wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Fluoreszenzmarkierung von BDNF näher betrachtet, um zusätzlich zum immunologischen Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen (ELISA) auch eine Möglichkeit zur Visualisierung der Proteine zu haben. Mit dieser Methode sollen Prozesse wie die Immobilisierung des BDNFs auf der Nanopartikeloberfläche sichtbar gemacht werden und die Lokalisierung des BDNFs in *in vitro*-Untersuchungen

ermöglicht werden. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte nach einer Vorschrift von Xie *et al.*, nach der rekombinantes BDNF-Biotin mit einem Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat kombiniert wurde.^[21] Bei dieser Kombination macht man sich eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen, jene zwischen Biotin und Streptavidin, zu Nutze.^[320]

Zunächst wurde die biologische Aktivität des käuflich erworbenen BDNF-Biotins getestet, indem unterschiedliche Konzentrationen von BDNF-Biotin (50, 75 und 100 ng mL⁻¹) mit SGZs inkubiert wurden. Abbildung 4.21 zeigt die bestimmten Überlebensraten der SGNs nach ihrer Kultivierung von 48 h in Gegenwart der unterschiedlichen BDNF-Biotin-Konzentrationen. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurde reines BDNF in den gleichen Konzentrationen zum Zellmedium gegeben und mitgetestet. Trotz der zusätzlichen Modifikation durch das Biotin weist das BDNF-Biotin eine ähnliche biologische Aktivität wie das reine BDNF auf. Demzufolge haben ein bis zwei Biotin-Moleküle am BDNF, die laut Hersteller an das Protein angebunden werden, keine Auswirkung auf die biologische Aktivität, wie es oft für Modifizierungen am Protein vermutet wird.^[320] Erwähnenswert ist dabei die Beobachtung, dass alle Konzentrationen von BDNF-Biotin zu etwas höheren SGN-Überlebensraten (18–22 %) als die jeweiligen BDNF-Konzentrationen (12–15 %) führen. Dies könnte auf einen zusätzlichen neuroprotektiven Effekt hindeuten. Dieser Aspekt sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden, ist aber an dieser Stelle, bei der nur die biologische Aktivität von BDNF-Biotin getestet werden sollte, nicht weiter relevant.

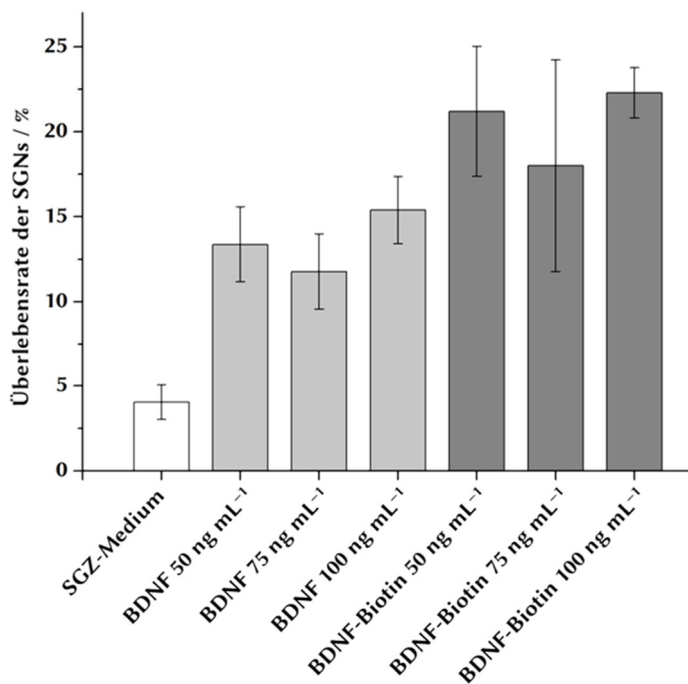


Abbildung 4.21: Nachweis der biologischen Aktivität von BDNF-Biotin. Die SGZs wurden für 48 h in Gegenwart von BDNF-Biotin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation in Gegenwart von BDNF mit den gleichen Konzentrationen.

Nachdem die biologische Aktivität für das BDNF-Biotin nachgewiesen wurde, wurde es mit dem Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat kombiniert. Um das gebildete BDNF-Qdot® 655-Konjugat von den freien BDNF-Biotin-Molekülen abzutrennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die einzelnen aufgefangenen Fraktionen von je 100 µL sind in Abbildung 4.22 unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) gezeigt. In den ersten 10 Fraktionen ist eine deutliche Fluoreszenz, insbesondere in den Fraktionen 3–6, erkennbar, die BDNF-Qdot® 655-Konjugate bzw. teilweise auch die Qdot® 655 Streptavidin-Konjugate ohne angebundenes BDNF-Biotin enthalten und nicht separiert gewonnen werden können, da sich diese im Molekulargewicht kaum unterscheiden. Der Anteil an nicht markierten BDNF-Biotin-Molekülen ($\approx 28 \text{ kDa}$) sollte in diesen Fraktionen dagegen zum einen aufgrund des deutlichen Unterschieds im Molekulargewicht zu den Qdot® 655 Streptavidin-Konjugate ($\approx 2500 \text{ kDa}$) sehr gering sein. Zum anderen sollte ein solcher Anteil nach einer erfolgreichen Konjugation laut Literatur überhaupt kaum vorhanden sein, da nahezu alle Moleküle mit den Qdot® 655 Streptavidin-Konjugaten markiert werden sollten. In einem ähnlichen Prozess zur Markierung von NGF lagen nämlich nach der Inkubation nur noch weniger als 6 % vom NGF-Biotin ungebunden vor.^[86] Ab der 11. Fraktion nimmt die sichtbare Fluoreszenz deutlich ab, sodass sich hier keine bzw. nur sehr geringe, vernachlässigbare Mengen der Qdot®-Konjugate befinden.

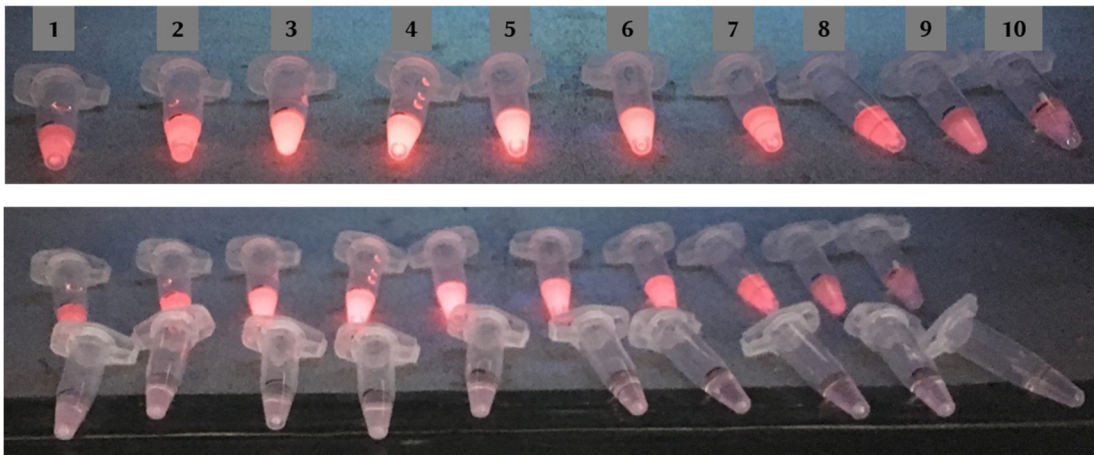


Abbildung 4.22: Fotografische Aufnahmen der aufgefangenen Fraktionen (je 100 µL) nach der Größenausschlusschromatographie unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Die ersten 10 Fraktionen sind zum einen separat (oben) und zum anderen im Vergleich zu den darauffolgenden 10 Fraktionen (unten) gezeigt.

Mithilfe der Größenausschlusschromatographie ist die Auftrennung der Qdot® 655 Streptavidin-Konjugate mit bzw. ohne BDNF-Biotin-Anbindung kaum möglich, sodass die Fraktionen 5/6 beispielhaft in einer weiteren *in vitro*-Untersuchung mit SGZs auf ihren neuroprotektiven Effekt untersucht wurden (Abbildung 4.23). Damit sollte festgestellt werden, ob sich in diesen Fraktionen tatsächlich Qdot® 655 Streptavidin-Konjugate mit BDNF-Biotin-Anbindung befinden, oder ob die sichtbare Fluoreszenz von den Qdot® 655 Streptavidin-Konjugate ohne BDNF ausgeübt wird, denn nur Konjugate mit angebundener BDNF können einen neuroprotektiven

Effekt ausüben. Die Überlebensraten der SGNs, die in der Gegenwart der Fraktionen kultiviert wurden, sind vergleichsweise nicht so hoch wie die Überlebensraten in Gegenwart von BDNF mit bzw. ohne Biotin-Anbindung in einer Konzentration von 50 ng mL^{-1} . Jedoch ist ein geringer neuroprotektiver Effekt zumindest für die 6. Fraktion feststellbar, da die Überlebensrate mit 9 % deutlich über der Überlebensrate der Negativkontrolle liegt. Dies ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von Qdot® 655 Streptavidin-Konjugaten mit BDNF-Biotin-Anbindung in dieser Fraktion. Die SGN-Überlebensrate der 5. Fraktion ist dagegen vergleichbar mit der Negativkontrolle, somit gibt es keinen nachweisbaren neuroprotektiven Effekt der 5. Fraktion. Die deutlich sichtbare Fluoreszenz dieser Fraktion wird damit wohl hauptsächlich durch das Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat ohne angebundenes BDNF-Biotin hervorgerufen.

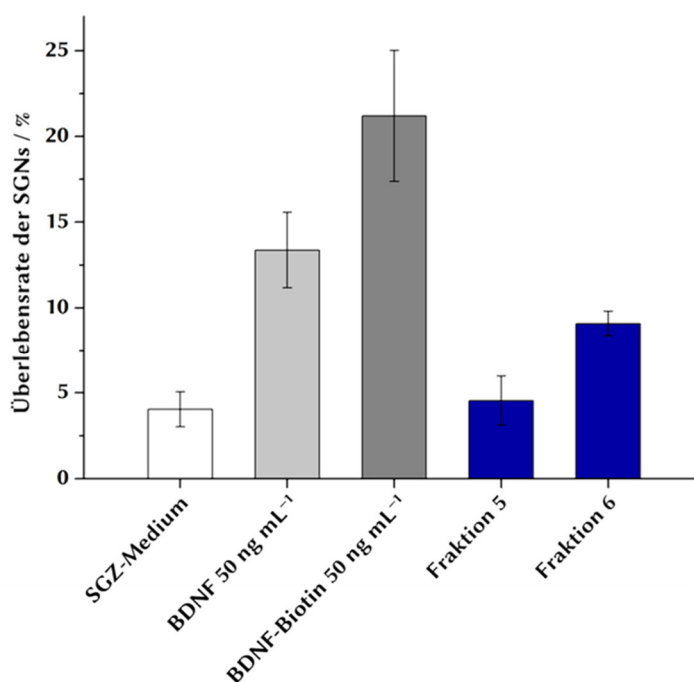


Abbildung 4.23: SGN-Überlebensraten nach einer Inkubation von 48 h in Gegenwart der Fraktionen 5/6. Zum Vergleich sind als Positivkontrollen die Überlebensraten der SGNs in Gegenwart von 50 ng mL^{-1} BDNF mit bzw. ohne Biotin-Anbindung und als Negativkontrolle das Ergebnis im SGZ-Medium gezeigt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist ein wichtiger Aspekt zu berücksichtigen. Die Konzentration an BDNF, welche sich in den Fraktionen befindet, ist nicht vergleichbar mit der Konzentration von 50 ng mL^{-1} der Positivkontrollen. Denn die Gesamtkonzentration an BDNF, die sich maximal in allen Fraktionen befinden kann, liegt bei 56.7 ng mL^{-1} . Teilt sich diese Menge beispielsweise einheitlich auf die ersten 10 Fraktionen auf, so befinden sich ca. 5 ng mL^{-1} BDNF in jeder Fraktion. Mit diesen Überlegungen lässt sich der im Vergleich zu den Positivkontrollen erhaltene, relativ geringe neuroprotektive Effekt für die 6. Fraktion besser in Korrelation setzen, zumal sich die Menge an BDNF aufgrund der geringen Überlebensrate in Gegenwart der

5. Fraktion anscheinend nicht einheitlich über alle Fraktionen verteilt. Um die tatsächlichen Mengen an BDNF in den einzelnen Fraktionen zu ermitteln, wäre eine Quantifizierung mittels ELISA denkbar, mit der zumindest der immunologisch aktive Teil ermittelt werden kann. Dazu wurde in einem Vorversuch zunächst die immunologisch aktive Konzentration von BDNF-Biotin vor und nach der Markierung mit dem Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat bestimmt (s. Abbildung 7.4 im Anhang). Vor der Markierung stimmt die ermittelte Konzentration unter Berücksichtigung der Standardabweichung gut mit der theoretisch vorliegenden Menge von $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ überein. Ein anderes Bild ergibt sich nach der Markierung. Von der theoretisch vorhandenen Menge von $17 \mu\text{g mL}^{-1}$ BDNF konnten nur ca. 23 % als immunologisch aktiv nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt im Prinzip des ELISAs, denn das immunologische Verfahren basiert selbst auf gemessenen Absorptionen und diese können durch die Fluoreszenz der Quantendots in gewisser Weise beeinflusst werden. Damit eignet sich das ELISA-Verfahren nicht zur Quantifizierung der BDNF-Mengen in den einzelnen Fraktionen. Nichtsdestotrotz konnte mit den *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass die Markierung des BDNFs mit dem Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat erfolgreich war, da die Fraktionen, die eine Fluoreszenz aufweisen, sonst keinen neuroprotektiven Effekt auf die SGNs ausüben würden.

4.2.8 Zusammenfassung

Mit dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für ein effektives BDNF-Freisetzungssystem basierend auf NPSNPs für die spätere Anwendung auf der Cochlea-Elektrode zur neuroprotektiven und -regenerativen Wirkung auf SGNs gelegt.

Zunächst wurde die Immobilisierung von BDNF auf unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln untersucht. Dabei ließen sich bei einer indirekten Bestimmung der Beladungsmengen keine Unterschiede feststellen, obwohl verschiedene Möglichkeiten der Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Nanopartikeln gegeben sein sollten. Alle getesteten Nanopartikel zeigten unabhängig von ihrer Modifizierung eine nahezu vollständige Immobilisierung der eingesetzten BDNF-Menge auf der Nanopartikeloberfläche. Diese Tatsache kann durch die relativ geringe Menge an eingesetztem BDNF, die zu einer Immobilisierung von $0.2 \mu\text{g BDNF pro mg Nanopartikel}$ führte, begründet werden. Im Vergleich dazu ergaben theoretische Berechnungen eine maximal mögliche Immobilisierungsmenge von $375 \mu\text{g BDNF pro mg Nanopartikel}$. Somit kann das verwendete BDNF vollständig an der hohen spezifischen Oberfläche der Nanopartikel anbinden, unabhängig von der Oberflächenbeschaffenheit.

Im Gegensatz zu den Immobilisierungsuntersuchungen ergaben die BDNF-Freisetzungsexperimente deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen modifizierten Nanopartikeln. Die amino-modifizierten Nanopartikel nehmen dabei eine besondere Stellung ein, da mit 23 ng mg^{-1} erheblich mehr BDNF freigesetzt werden konnte als

aus den unmodifizierten und sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln. Zudem lief die Freisetzung bei diesen Partikeln relativ kontinuierlich und langfristig über einen Zeitraum von 80 Tagen ab. Demgegenüber war die BDNF-Freisetzung aus den unmodifizierten bzw. sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln nach einem *burst release* innerhalb von 60 Tagen beendet und lieferte nur geringe BDNF-Mengen von 1 ng mg^{-1} bzw. 100 pg mg^{-1} . Die möglichen Wechselwirkungen zwischen BDNF und der Nanopartikeloberfläche können einen starken Einfluss auf die BDNF-Freisetzung haben und somit für die unterschiedlichen Freisetzungsverläufe verantwortlich sein. Die überwiegend attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen bei den unmodifizierten bzw. sulfonsäure-modifizierten Nanopartikeln können zu einer stärkeren Anbindung des Proteins führen, sodass die Freisetzung in gewisser Weise verhindert wird. Dagegen scheinen die hydrophoben Wechselwirkungen die Freisetzung von BDNF im Falle der amino-modifizierten Nanopartikel zu begünstigen, zumal vermutlich eine repulsive Kraft zwischen diesen Nanopartikeln und dem Protein wirkt. Neben der Menge an freigesetztem BDNF ist ein weiterer wichtiger Aspekt, dass die freigesetzten BDNF-Mengen biologisch aktiv waren, wie die anschließenden *in vitro*-Untersuchungen zeigen konnten.

In den *in vitro*-Untersuchungen konnte im ersten Teil zusätzlich zur generell bekannten Cytokompatibilität der Nanopartikel mit relativ robusten Zellen wie Fibroblasten auch eine gute Cytokompatibilität für die unmodifizierten und amino-modifizierten Nanopartikel bis zu einer Konzentration von $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ mit den empfindlicheren SGNs festgestellt werden. Die Anbindung des Neurotrophins BDNF auf der Oberfläche der amino-modifizierten Nanopartikel brachte einen erheblichen neuroprotektiven Effekt – eine Steigerung der SGN-Überlebensrate um 23 % – mit sich, der vergleichbar mit exogen zugegebenem BDNF in einer Konzentration von 50 ng mL^{-1} war. Da in dem untersuchten Zeitraum eine solche BDNF-Menge nicht von den Nanopartikeln freigesetzt wird, ist der erhaltene neuroprotektive Effekt auf den direkten Kontakt der SGNs mit dem BDNF auf der Nanopartikeloberfläche zurückzuführen. Demzufolge behält das BDNF auch nach der Immobilisierung seine biologische Aktivität bei.

Der zweite Teil der *in vitro*-Untersuchungen beschäftigte sich mit einem mehr anwendungsbezogenen Aspekt, indem der neuroprotektive und -regenerative Effekt der freigesetzten BDNF-Mengen untersucht wurde. Es zeigte sich, dass die freigesetzten BDNF-Mengen von den amino-modifizierten Nanopartikeln bis zum untersuchten 39. Freisetzungstag einen starken neuroprotektiven Effekt und einen geringen neuroregenerativen Effekt auf die SGNs ausübten. Dabei handelte es sich bei dem neuroprotektiven Effekt um eine Steigerung des neuronalen Überlebens von ca. 20 %. Neuroregenerativ führten die freigesetzten BDNF-Mengen im Kultivierungsmedium zu geringfügig längeren Neuriten als die Überstände ohne BDNF. Mit diesen Ergebnissen konnte in Hinblick auf die Anwendung an der Cochlea-Elektrode gezeigt werden, dass die Freisetzungssysteme keinen direkten Kontakt zu den SGNs aufweisen müssen, um einen Einfluss auf diese zu haben.

Insgesamt können die Ergebnisse der BDNF-Freisetzung von amino-modifizierten Nanopartikeln und der entsprechenden *in vitro*-Untersuchungen als vielversprechend eingestuft werden, sodass diese Nanopartikel ein hohes Potential als Freisetzungssystem für BDNF aufweisen. Zum einen war eine kontinuierliche und langfristige BDNF-Freisetzung über 80 Tage möglich und zum anderen übten die freigesetzten BDNF-Mengen einen starken neuroprotektiven und in geringerem Maße neuroregenerativen Effekt auf die SGNs aus. Für ein Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem muss jedoch noch die Aufbringung der Freisetzungssysteme auf die Implantatoberfläche, in diesem Fall der Cochlea-Elektrode, erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu schon einige Vorversuche durchgeführt. Neben der erfolglosen Aufbringung einer Polydopamin-Schicht auf eine Silicon-Oberfläche, in die die Nanopartikel eingebettet werden sollten,^[248,321] zeigten hingegen erste Untersuchungen mit Fibrin vielversprechende Ergebnisse (s. Abbildung 7.5 im Anhang). Der Vorteil der Verwendung des Fibrins liegt dabei auf der Hand, da es sich um ein körpereigenes Produkt handelt und somit keine Schwierigkeiten in Bezug auf die Biokompatibilität erwartet werden sollten. Zudem erfolgt die Bildung der Fibrinschicht auf der Silicon-Oberfläche in einer einfachen Durchführung und unter milden Bedingungen, indem die einzelnen Komponenten, Fibrinogen und Thrombin, direkt auf der Silicon-Oberfläche miteinander vermischt werden und dabei vernetzen. Ein entscheidender Schritt für einen besseren Kontakt zur Silicon-Oberfläche scheint eine vorherige Plasma-Aktivierung und eine damit verbundene hydrophilere Oberfläche zu sein. Die Nanopartikel können direkt in das Fibrin-Netzwerk eingebaut werden, indem sie vor dem Vernetzen zu einer Fibrinkomponente gegeben werden.^[322] Diese Möglichkeit bietet einen einfachen Ansatz für ein Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem, dennoch sollte vor den Untersuchungen zur Freisetzung von BDNF und dessen biologischer Aktivität zunächst ein Nachweis über die erfolgreiche Aufbringung der Nanopartikel in das Fibrinnetzwerk folgen, beispielsweise mit fluoreszierenden Nanopartikeln (s. Kapitel 3.3.3). Abgesehen von der Idee der Aufbringung der Nanopartikel auf die Silicon-Oberfläche bietet die Arbeitsgruppe Behrens eine weitere Möglichkeit, bei der das entwickelte BDNF-Freisetzungssystem auf Basis der amino-modifizierten Nanopartikel angewendet werden kann. Hierzu werden statt des Silicons die Platinkontakte der Cochlea-Elektrode verwendet, indem eine poröse Platinbeschichtung auf die Platin-Elektroden aufgebracht wird und in dessen Poren sich die NPSNPs befinden können (Patent-Anmeldenummer: 102018118092.6). Die Entwicklung eines solchen Systems ist Gegenstand aktueller Forschung.

Neben der Entwicklung eines optimierten Freisetzungssystems für BDNF konnte im Rahmen dieser Arbeit das BDNF erfolgreich fluoreszierend markiert werden. Die Markierung des Proteins eröffnet dabei eine Vielzahl von unterschiedlichen Anwendungen. Zum einen ist eine grundsätzliche Visualisierung der BDNF-Moleküle in den unterschiedlichen Stadien der Entwicklung eines Freisetzungssystems – Immobilisierung auf der Nanopartikeloberfläche, Freisetzungsexperimente und *in vitro*-Untersuchungen – gegeben. Auch für kommende *in vivo*-Untersuchung ergibt sich

damit die Möglichkeit den Transport und die Verteilung des BDNFs zu beobachten. Zusätzlich zur Literatur-bekanntem Durchführung^[21] konnten die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit entscheidende Zusatzinformationen liefern, indem gezeigt wurde, dass die Markierung des BDNFs über eine Biotin-Streptavidin-Bindung mit einem vergleichsweise großen Qdot[®] (bis zu 20 nm) die biologische Aktivität nicht vermindert. Zumindest konnte ein gewisser neuroprotektiver Effekt mit den BDNF-Qdot[®] 655-Konjugaten auf die SGNs ausgeübt werden. Da die erwähnte Größe der Quantendots jedoch zu einigen Nachteilen führen kann, sollte für zukünftige Untersuchungen die Verwendung von beispielsweise Cy[®] Streptavidin-Konjugaten in Betracht gezogen werden.

4.3 Entwicklung eines Freisetzungssystems für TGF- β 3

Dieses Kapitel stellt die Ergebnisse der Entwicklung eines optimierten Freisetzungssystems für TGF- β 3 auf Basis unterschiedlicher NPSNPs und der Aufbringung der nanopartikulären Systeme auf ein elektrogenesponnenes PCL-Scaffold dar. Damit behandelt dieser Teil der vorliegenden Arbeit ein Teilprojekt der Forschergruppe FOR 2180, deren Ziel die Entwicklung eines gradierten, zellfreien Implantates für die Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs ist.

Im Folgenden werden die möglichen Wechselwirkungen zwischen TGF- β 3 und den eingesetzten NPSNPs vorgestellt. Anschließend folgt eine Darstellung der Ergebnisse bezüglich der Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten TGF- β 3-Mengen. Dabei wird das Wissen, welches in Kapitel 4.2 gewonnen wurden, berücksichtigt, indem z. B. ähnliche Protokolle zur Durchführung der Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente verwendet werden, da diese für die Untersuchungen mit Wachstumsfaktoren sinnvoll erscheinen. Des Weiteren wird auch die Degradation von TGF- β 3 unter den Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen untersucht. Um Erkenntnisse hinsichtlich des chondrogenen Einflusses der entwickelten Freisetzungssysteme zu gewinnen, folgt eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen mit MSCs. Die Aufbringung der Nanopartikel auf die PCL-Fasermatten wird zunächst durch die Ergebnisse der Charakterisierung der entstandenen Komposite beurteilt und anschließend ähnliche Aspekte, wie beispielsweise die Freisetzung und der Einfluss auf die Chondrogenese der MSCs, mit den Kompositen wie zuvor mit den Nanopartikeln untersucht.

4.3.1 Wechselwirkungen zwischen TGF- β 3 und NPSNPs

Für die Entwicklung eines TGF- β 3-Freisetzungssystems sind ähnlich zum BDNF die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Nanopartikeloberfläche entscheidend. TGF- β 3 hat einen isoelektrischen Punkt bei pH 6,8, sodass im PBS-Medium, in dem die Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente durchgeführt wurden, eine geringe negative Gesamtoberflächenladung vorliegt. Allerdings wird die Oberfläche überwiegend durch die hydrophoben Bereiche bestimmt. Durch die

Nähe zum isoelektrischen Punkt kann es zur Aggregation der Proteine in PBS kommen. Dieser Aspekt kommt aber hauptsächlich erst bei Konzentration über $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ zum Tragen.^[64,65] Da für die Immobilisierung wiederum eine Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ eingesetzt wurde, sollte dieses Verhalten nicht ausschlaggebend sein. Zusätzlich zu den Nanopartikelsorten (NPSNP, NPSNP-NH₂ und NPSNP-SO₃H), die schon beim BDNF eingesetzt wurden, wurde eine weitere Modifizierung der Nanopartikel für eine optimale Immobilisierung und Freisetzung von TGF- β 3 untersucht. Es handelt sich um eine funktionelle Gruppe mit einer endständigen Amino-Gruppe, jedoch im Unterschied zu den NPSNP-NH₂ mit einer längeren Alkylkette als der Propyl-Rest. Mit der vorhandenen Hexylkette soll die Vermutung aus den Untersuchungen mit BDNF überprüft werden, die gezeigt haben, dass die hydrophoben Wechselwirkungen eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung des Wachstumsfaktors begünstigen. In Abhängigkeit von den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel können diese mit TGF- β 3 über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen oder über eine Kombination aus mehreren Wechselwirkungen interagieren (Abbildung 4.24). Bezüglich der unterschiedlichen IEPs sollte TGF- β 3 dabei andere Wechselwirkungen mit den Nanopartikeln eingehen als das BDNF.

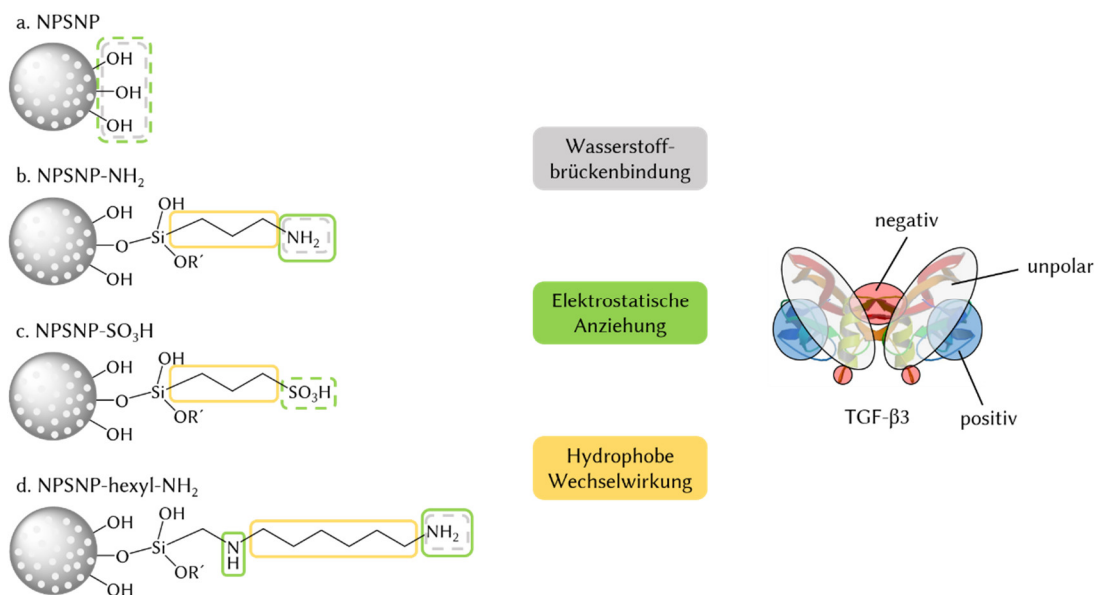


Abbildung 4.24: Schematische Darstellung der attraktiven Wechselwirkungen zwischen TGF- β 3 (vgl. Abbildung 2.3)^[66] und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten (NPSNP), amino-modifizierten (NPSNP-NH₂), sulfonsäure-modifizierten (NPSNP-SO₃H) und amino-modifizierten Nanopartikel mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂).

Für die unmodifizierten Nanopartikel bieten sich wegen der vorhandenen Silanol-Gruppen auf der Oberfläche zunächst wieder schwache Wasserstoffbrückenbindungen an. Auch schwache elektrostatische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen Bereichen auf der Proteinoberfläche sind möglich, wobei diese Bereiche in PBS aufgrund der negativen Gesamtladung des Proteins nur geringfügig

vorhanden sind. Die unmodifizierten Nanopartikel wurden daher, wie schon in den Untersuchungen mit BDNF, vorwiegend als Kontrolle mitgetestet.

Mit den beiden amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂ und NPSNP-hexyl-NH₂) kann TGF-β₃ über alle drei möglichen Arten der Wechselwirkung interagieren, wobei die schwachen Wasserstoffbrückenbindungen eher eine untergeordnete Rolle spielen. Angesichts der positiv geladenen Oberfläche ist eine elektrostatische Anziehung zu den Biomolekülen möglich, da diese eine schwach negative Gesamtladung in PBS aufweisen. Mit den vorhandenen Alkylketten auf der Nanopartikeloberfläche und den dominierenden hydrophoben Bereichen auf dem Protein sind vor allem die hydrophoben Wechselwirkungen ausschlaggebend. Diese Wechselwirkungen sollten bei den Nanopartikeln mit längerer Alkylkette stärker in Erscheinung treten als bei den anderen.

Trotz der nicht vielversprechenden Ergebnisse der sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel in den Untersuchungen mit BDNF wurden diese Nanopartikel auch für die Immobilisierung mit TGF-β₃ getestet. Hierbei tritt die elektrostatische Interaktion aufgrund der anderen Oberflächeneigenschaften des Proteins (negative Gesamtladung) eher als repulsive Kraft in Erscheinung. Diese kann daher in Kombination mit den hydrophoben Wechselwirkungen, die bei der BDNF-Freisetzung bekanntlich vielversprechende Ergebnisse lieferten, die TGF-β₃-Freisetzung begünstigen.

Die Wechselwirkungen ergeben sich bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit der Proteine und der Nanopartikel in PBS. Da allerdings weitere Faktoren einen Einfluss haben können (Kapitel 2.3.3), sollten die hier beschriebenen Wechselwirkungen mit Vorsicht behandelt werden.

4.3.2 Quantifizierung der immobilisierten TGF-β₃-Mengen

Nachdem die unterschiedlichen Nanopartikel in einer TGF-β₃-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg mL⁻¹ für 24 h inkubiert wurden, wurde die immobilisierte TGF-β₃-Menge indirekt mit der ELISA-Methode bestimmt. Die damit ermittelten TGF-β₃-Konzentrationen in den verbleibenden Inkubations- und Waschlösungen sind unter Angabe der jeweiligen Beladungseffizienz für die unterschiedlichen Nanopartikel in Abbildung 4.25 dargestellt.

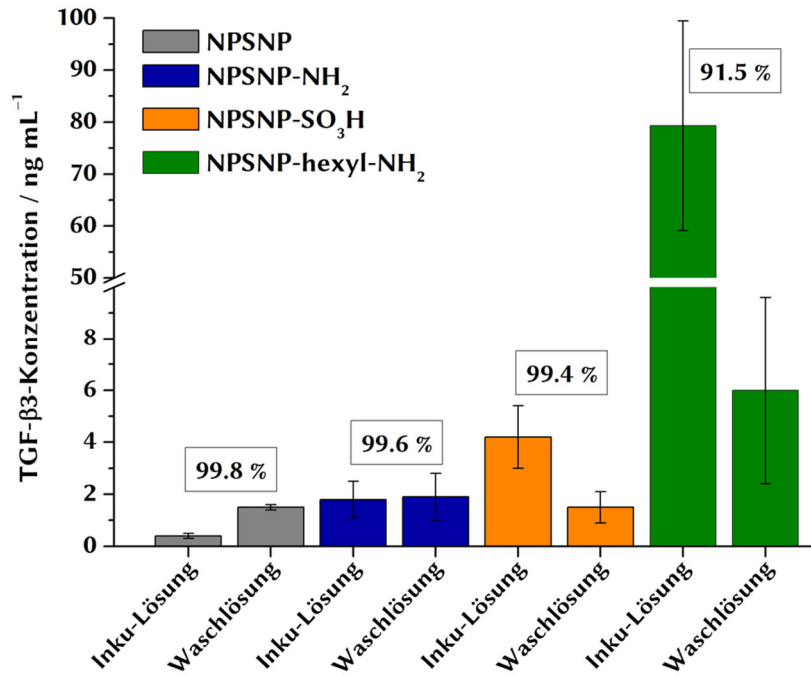


Abbildung 4.25: Darstellung der ermittelten TGF-β3-Konzentrationen in den jeweiligen Inkubations- bzw. Waschlösungen unter Angabe der dazugehörigen Beladungseffizienz für die unterschiedlichen Nanopartikel.

Ähnlich zu den Untersuchungen mit BDNF liegen die ermittelten TGF-β3-Mengen im unteren ng mL⁻¹-Bereich. Nur die bestimmte TGF-β3-Konzentration in der verbleibenden Inkubationslösung der NPSNP-hexyl-NH₂ ist mit ca. 80 ng mL⁻¹ vergleichsweise hoch. Da die TGF-β3-Konzentration in der Waschlösung derselben Probe zu den anderen Konzentrationen im unteren ng mL⁻¹-Bereich passt, handelt es sich bei dieser Probe vermutlich um eine fehlerhafte Bestimmung. Möglicherweise wurden bei der Abnahme des Überstandes nach der Zentrifugation Nanopartikel mitgeführt, welche im ELISA ein falsch positives Signal auslösen können, indem das TGF-β3 auf der Oberfläche der Nanopartikel im ELISA detektiert und folglich mehr TGF-β3 nachgewiesen wird. Bei allen anderen Nanopartikeln ergeben sich wiederum Beladungseffizienzen von über 99 %, sodass die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln und dem TGF-β3 zu keinen Unterschieden in der Immobilisierungsmenge führen. Dies ist mit der hohen Oberfläche der Nanopartikel zu erklären. Ähnlich wie beim BDNF lässt sich für TGF-β3 eine theoretische Immobilisierungsmenge von 348 μg pro mg Nanopartikel berechnen (s. Kapitel 7.3.2 im Anhang), sodass die immobilisierte Menge von 0.2 μg pro mg Nanopartikel deutlich kleiner ist. Aufgrund des Bestrebens von Proteinen an Oberflächen zu adsorbieren, kann die vergleichsweise geringe TGF-β3-Menge vollständig auf der Nanopartikeloberfläche adsorbieren.

4.3.3 Freisetzung von TGF-β3 von unterschiedlich modifizierten NPSNPs

Zur Untersuchung des Freisetzungsverhaltens von TGF-β3 wurden Freisetzungsexperimente mit 5 mg beladenen Nanopartikeln durchgeführt. Die Untersuchungen

erfolgten bei 37 °C in PBS (0.1 % BSA), wobei die abgenommenen Überstände nach gewissen Zeitpunkten eingefroren und anschließend mittels ELISA die enthaltenen TGF- β 3-Mengen bestimmt wurden. Die Ergebnisse der ELISAs sind in Abbildung 4.26 dargestellt, wo die freigesetzten TGF- β 3-Konzentrationen von den unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln kumulativ in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen sind.

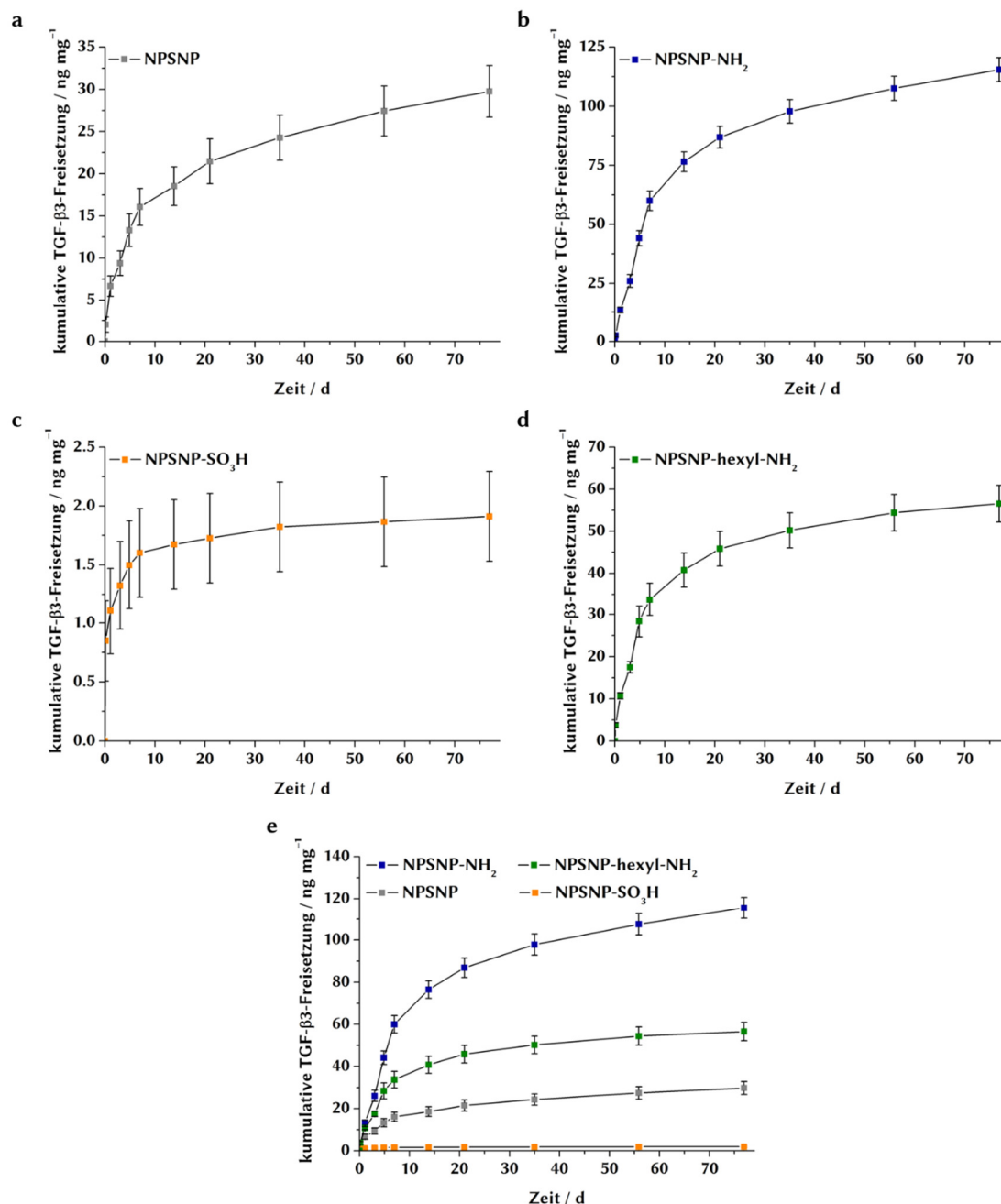


Abbildung 4.26: Kumulative TGF- β 3-Freisetzung von unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln in PBS (0.1 % BSA) bei 37 °C über einen Zeitraum von 77 d. TGF- β 3-Freisetzungsprofil für NPSNP (a); für NPSNP-NH₂ (b); für NPSNP-SO₃H (c); für NPSNP-hexyl-NH₂ (d) und alle Freisetzungsprofile im Vergleich (e).

Im Gegensatz zur TGF- β 3-Immobilisierung haben die unterschiedlichen Modifizierungen der Nanopartikel einen deutlichen Einfluss auf die Freisetzung des Proteins. Ähnlich wie beim BDNF setzten die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-SO₃H) nur geringe Mengen an TGF- β 3 frei, wobei das Freisetzungsverhalten wieder mit einem *burst release* beschrieben werden kann. In den ersten sieben Tagen wurde nahezu die gesamte Menge von ca. 2 ng TGF- β 3 pro mg Nanopartikel (1 % der ermittelten immobilisierten Menge) freigesetzt. In den darauffolgenden Tagen liegt die Freisetzungsrates im geringen pg mg⁻¹-Bereich (3 pg mg⁻¹), sodass diese Mengen vernachlässigbar sind. Für die unmodifizierten Nanopartikel (NPSNP) ergibt sich bei der TGF- β 3-Freisetzung ein anderes Bild als im Falle des BDNFs. Zunächst wurde mit 30 ng mg⁻¹ in 77 d (TGF- β 3) im Vergleich zu 1 ng mg⁻¹ in 60 d (BDNF) deutlich mehr Protein freigesetzt. Dies entspricht etwa 15 % der ermittelten Beladungsmenge. Ebenfalls ist die Freisetzungskinetik nicht mit einem *burst release* vergleichbar. Obwohl die Freisetzungsrates in den ersten 7 d mit 2.2 ng mg⁻¹ pro Tag deutlich höher ist als die Freisetzungsrates in den darauffolgenden Wochen (0.2 ng mg⁻¹ pro Tag), wurde in der ersten Woche nur etwa 50 % der insgesamt freigesetzten Menge freigesetzt. Die höchsten TGF- β 3-Freisetzungsmengen im Experiment wurden mit den beiden amino-modifizierten Nanopartikeln erzielt. Trotz des ähnlichen Aufbaus der funktionellen Gruppe und den daraus resultierenden Wechselwirkungen ergeben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Freisetzungsmenge. Von den amino-modifizierten Nanopartikeln mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂) wurde TGF- β 3 in 77 d in einer Konzentration von 57 ng mg⁻¹ (31 % der ermittelten Immobilisierungsmenge) freigesetzt. Für die amino-modifizierten Nanopartikel mit Propyl-Rest (NPSNP-NH₂) ergab sich dagegen eine Freisetzungsmenge von 115 ng mg⁻¹, somit 58 % der ermittelten Immobilisierungsmenge. Trotzdem sind sich die Freisetzungen der beiden Nanopartikelsorten in ihrem Verlauf ähnlich, welcher sich durch eine hohe Freisetzungsrates in den ersten 7 d und einem anschließenden drastischen Rückgang kennzeichnet. Dieser typische Verlauf der Freisetzungsrates ist auf den Konzentrationsgradienten zurückzuführen, der am Anfang des Freisetzungsexperimentes zwischen der Nanopartikeloberfläche und dem umgebenden Medium erwartungsgemäß höher ausfällt als im Verlauf der Freisetzung. Der Unterschied ergibt sich aber in den absoluten Werten der Freisetzungsrates. Für NPSNP-hexyl-NH₂ liegt eine Freisetzungsrates von 4.7 ng mg⁻¹ pro Tag vor, die auf einen Wert von 0.2 ng mg⁻¹ pro Tag abfällt. Die amino-modifizierten Nanopartikel mit kürzerer Alkylkette weisen dagegen eine höhere Freisetzungsrates von 8.5 ng mg⁻¹ pro Tag in der ersten Woche und von 0.6 ng mg⁻¹ pro Tag in den darauffolgenden Wochen auf. Beide Freisetzungskurven erreichen am Ende des Untersuchungszeitraums noch keinen Sättigungswert, sodass die Freisetzungen nach 77 d noch nicht beendet zu sein scheinen.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellen die amino-modifizierten Nanopartikel mit Propyl-Gruppe, wie schon in den Untersuchungen mit BDNF, auch für TGF- β 3 die vielversprechendste Modifizierung der Nanopartikel für eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung dar. Es konnte gezeigt werden, dass die amino-modifizierten

Nanopartikel mit längerer Alkylkette den Ergebnissen der NPSNP-NH₂ durch den ähnlichen Aufbau der funktionellen Gruppe am nächsten kommen, jedoch aufgrund der stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen die gesamte Freisetzungsmenge geringer ausfällt. Folglich scheinen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen einem Propyl-Rest in der funktionellen Gruppe auf der Nanopartikeloberfläche und dem Wachstumsfaktor ein optimaler Fall für eine gute Freisetzung zu sein. Da auch die sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel diese Gruppe aufweisen und keine zusätzlichen anderen starken Wechselwirkungen, wie beim BDNF die elektrostatische Anziehung, eine Rolle spielen, sollten diese einen ähnlichen Verlauf wie die amino-modifizierten Nanopartikel zeigen. Dies ist allerdings nicht der Fall, sodass weitere Faktoren einen Einfluss auf die Freisetzung haben müssen. Bei den Sulfonsäure-Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche handelt es sich um stark saure Gruppen. Solche Gruppen können zur Denaturierung des Proteins führen, indem ionische Wechselwirkungen, die wichtig für die Tertiärstruktur eines Proteins sind, gelöst werden.^[218,323] Somit ist es möglich, dass in Anwesenheit der sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel die Proteine zum Großteil denaturieren und dadurch, trotz unterschiedlicher Wechselwirkungen, sowohl bei den Freisetzungsexperimenten mit BDNF als auch mit TGF-β₃ kaum Protein nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse, die mit den unmodifizierten Nanopartikeln erhalten wurden, zeigen auch ein untypisches Verhalten. Denn aufgrund der schwachen anziehenden Wechselwirkungen, die zwischen der Nanopartikeloberfläche und dem Wachstumsfaktor vorherrschen, sollte das TGF-β₃ relativ schnell und in einer unkontrollierten Art und Weise freigesetzt werden. Der Freisetzungsverlauf dieser Nanopartikel zeigt jedoch zum einen keinen starken *burst release* und zum anderen ist der Verlauf – natürlich nicht bezüglich der absoluten Werte – mit dem der amino-modifizierten Nanopartikel vergleichbar. Folglich haben auch hier weitere Faktoren einen Einfluss auf die Freisetzung, die bis dato noch nicht geklärt werden konnten.

Im Vergleich zu den BDNF-Freisetzungen fällt ein Aspekt sehr schnell auf: Die freigesetzten TGF-β₃-Mengen liegen deutlich über den freigesetzten BDNF-Mengen, wenn die einzelnen Modifizierungen untereinander verglichen werden. Da die Auflösung der Nanopartikel, die mit einer höheren Freisetzung des Wachstumsfaktors einhergeht, sich unter den gleichen Bedingungen nicht ändern sollte, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Degradation von TGF-β₃ unter den gleichen Freisetzungsbedingungen nicht so stark ausfallen sollte wie beim BDNF. Dieser Aspekt wird im folgenden Kapitel 4.3.4 untersucht.

4.3.4 Degradation von TGF-β₃ unter Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen

Die Untersuchungen zur Degradation von TGF-β₃ erfolgten mit einer TGF-β₃-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg mL⁻¹ und ohne Zusatz von Nanopartikeln,

wobei die Lösung unter den beschriebenen Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen behandelt wurde. Alle Proben wurden mittels ELISA analysiert und die bestimmten TGF- β 3-Konzentrationen in Abbildung 4.27 dargestellt.

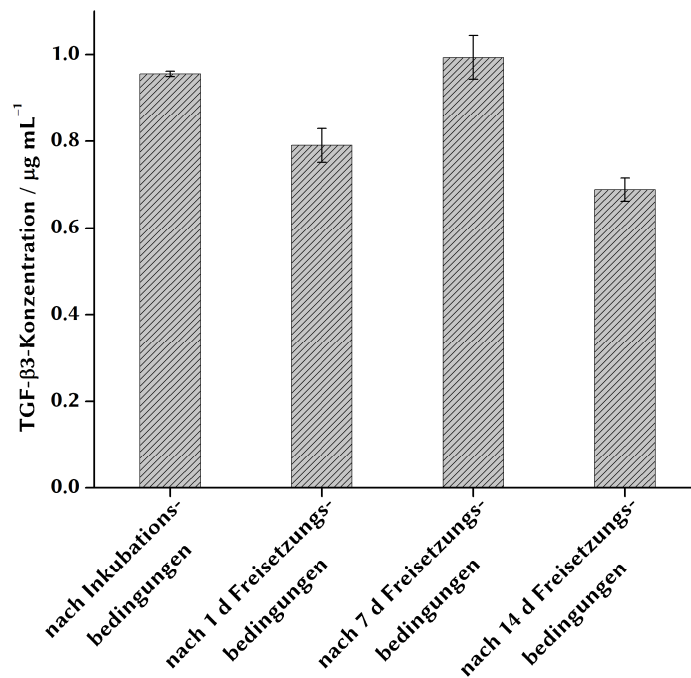


Abbildung 4.27: Mittels ELISA bestimmte TGF- β 3-Konzentrationen einer TGF- β 3-Lösung (Anfangskonzentration: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) nach unterschiedlichen Behandlungen (nach der Inkubation und nach 1 d, 7 d und 14 d Freisetzung).

Die Inkubation über Nacht bei 4°C führt zu einer geringfügigen Abnahme der TGF- β 3-Konzentration auf $0.96 \mu\text{g mL}^{-1}$, sodass die Immobilisierungsbedingungen marginale Auswirkungen auf die TGF- β 3-Stabilität haben. Ein deutlicherer Abfall ist dagegen nach 1 d Freisetzung wahrzunehmen, da nur noch 79 % des eingesetzten TGF- β 3 als immunologisch aktiv detektiert werden konnten. Im Vergleich zu den anderen Konzentrationen fällt jedoch auf, dass nach 7 d Freisetzung wiederum fast die gesamte Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (99 %) nachgewiesen wurde. An dieser Stelle ist es schwierig zu sagen, welcher Wert fehlerbehaftet ist, wobei eine Wiederholung der Untersuchung Klarheit schaffen sollte. Nichtsdestotrotz kann im Gegensatz zum BDNF beim TGF- β 3 von einer höheren Stabilität des Proteins unter den untersuchten Bedingungen gesprochen werden, denn nach 14 d Freisetzung wurden immer noch $0.69 \mu\text{g mL}^{-1}$ TGF- β 3 detektiert. Dagegen lag beim BDNF die Konzentration an dieser Stelle nur noch bei 35 % immunologisch aktivem BDNF.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Stabilität von TGF- β 3 unter physiologischen Bedingungen (PBS, pH 7.4), die in diesen Untersuchungen zum Einsatz kamen, stehen nicht im Einklang mit den Ergebnissen von Pellaud *et al.*, die ebenfalls das Verhalten von TGF- β 3 in Lösung untersuchten.^[64] Sie konnten ein starkes Aggregationsverhalten für TGF- β 3 ($> 5 \mu\text{g mL}^{-1}$) unter physiologischen Bedingungen feststellen, sodass TGF- β 3 nur noch in nanomolaren Konzentrationen in Lösung

nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit stattfanden, deuten auf keine starke Aggregation des Proteins hin, zumindest nicht bei der eingesetzten Konzentration ($\leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Obwohl auch die Protein-Aggregate immunologisch aktiv sein könnten und im ELISA zu einem positiven Ergebnis führen könnten, sollte jedoch spätestens bei einer vorliegenden Aggregation kein TGF- β 3 in den Überständen der Freisetzungsexperimente nachgewiesen werden, da für die Abnahme der Überstände eine vorherige Zentrifugation notwendig ist. Somit lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Stabilität von TGF- β 3 unter physiologischen Bedingungen auf die eingesetzte Konzentration zurückführen.

Die unterschiedliche Stabilität der in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren BDNF und TGF- β 3 lässt sich nicht eindeutig erklären. Unter gleichen Bedingungen und bei gleicher Konzentration zeigt das BDNF eine deutlich stärkere Degradation als das TGF- β 3. Mögliche Ursachen können die unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten der Proteine sein. Diesbezüglich ergeben sich auch andere Interaktionen mit den anwesenden BSA-Molekülen, die laut den hier erbrachten Ergebnissen die Stabilität der TGF- β 3-Moleküle eher begünstigen als die der BDNF-Moleküle. Zudem kann aber auch die generelle Proteinstabilität der BDNF-Moleküle geringer sein als die der TGF- β 3-Moleküle.

4.3.5 Chondrogenese von MSCs durch TGF- β 3-beladene NPSNPs und durch freigesetzte TGF- β 3-Mengen

Nachdem die unterschiedlich modifizierten Silica-Nanopartikel hinsichtlich ihrer TGF- β 3-Immobilisierung und -Freisetzung charakterisiert wurden, wurden diverse *in vitro*-Untersuchungen mit den TGF- β 3-beladenen NPSNPs und mit den freigesetzten TGF- β 3-Mengen durchgeführt, um ihren Effekt auf die Chondrogenese der MSCs zu untersuchen. Dabei soll überprüft werden, ob das TGF- β 3 seine biologische Aktivität trotz Immobilisierung beibehalten hat und ob biologisch aktives TGF- β 3 in ausreichender Menge wieder freigesetzt wird. Für die Untersuchungen wurden die verschiedenen Proben (s. Kapitel 3.3.13) zu den MSC-Pellets gegeben, sodass eine 3D-Kultivierung stattfand, die die anaeroben Bedingungen im Knorpel simulieren sollte. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen, um eine Knorpelentwicklung nachzuweisen. Im Rahmen der Forschergruppe FOR 2180 konnte in weiterführenden Arbeiten gezeigt werden, dass schon eine TGF- β 3-Freisetzung von 14 d ausreichend sein kann, um eine chondrogene Differenzierung einzuleiten. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der amino-modifizierten Nanopartikel in den Freisetzungsexperimenten, aber auch in den vorherigen Studien zum BDNF, wurde der Schwerpunkt auch in den folgenden Untersuchungen auf diese Nanopartikel gelegt. Als Kontrolle wurden die unmodifizierten Nanopartikel mitgetestet.

Untersuchungen zum Einfluss der TGF- β 3-beladenen NPSNPs auf die chondrogene Differenzierung der MSCs. Zur Untersuchung des Einflusses der

TGF- β 3-beladenen NPSNPs auf die Chondrogenese der MSCs wurden Nanopartikel-dispersionen in PBS (0.1 % BSA) mit dem Chondrogenese-Medium II im Verhältnis 1:1 auf Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} und 2.5 mg mL^{-1} verdünnt und zu den Pellets gegeben. Als Nanopartikelsorten kamen die unmodifizierten und amino-modifizierten Nanopartikel mit und ohne TGF- β 3-Beladung zum Einsatz. Bei der anschließenden Kultivierung über 28 Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt, indem vorsichtig die Hälfte des Mediums entfernt und dieselbe Menge an frischem Medium dazugegeben wurde, damit die Nanopartikel weiter im Zellmedium verbleiben.

Die chondrogene Differenzierung geht einher mit der Bildung einer extrazellulären Matrix,^[293,296] welche sich in einer deutlichen Vergrößerung des Pellets zeigt. Deshalb wurde zuerst die Morphologie der Pellets unter einem Mikroskop (Abbildung 4.28) betrachtet, um eventuelle Größenunterschiede festzustellen bzw. erste Indizien für die Differenzierung der MSCs zu erhalten. Alle MSC-Pellets in Gegenwart der TGF- β 3-beladenen Nanopartikel unabhängig von der Modifizierung und Konzentration sind deutlich größer als die Pellets in der Zellkultur mit unbeladenen Nanopartikeln. Die Größe der Pellets ist zudem vergleichbar mit dem Pellet der Positivkontrolle, zu der TGF- β 3 in einer Konzentration von 10 ng mL^{-1} bei jedem Mediumwechsel zugegeben wurde. Somit sind die mikroskopischen Aufnahmen ein erstes Indiz für eine chondrogene Differenzierung der MSCs in Gegenwart der TGF- β 3-beladenen Nanopartikel. Auf den mikroskopischen Aufnahmen lässt sich zudem die Agglomeration der Nanopartikel in der höheren Konzentration beobachten, die allerdings aufgrund der erhaltenen Ergebnisse keine Auswirkung auf die Chondrogenese der MSCs zu haben scheint.

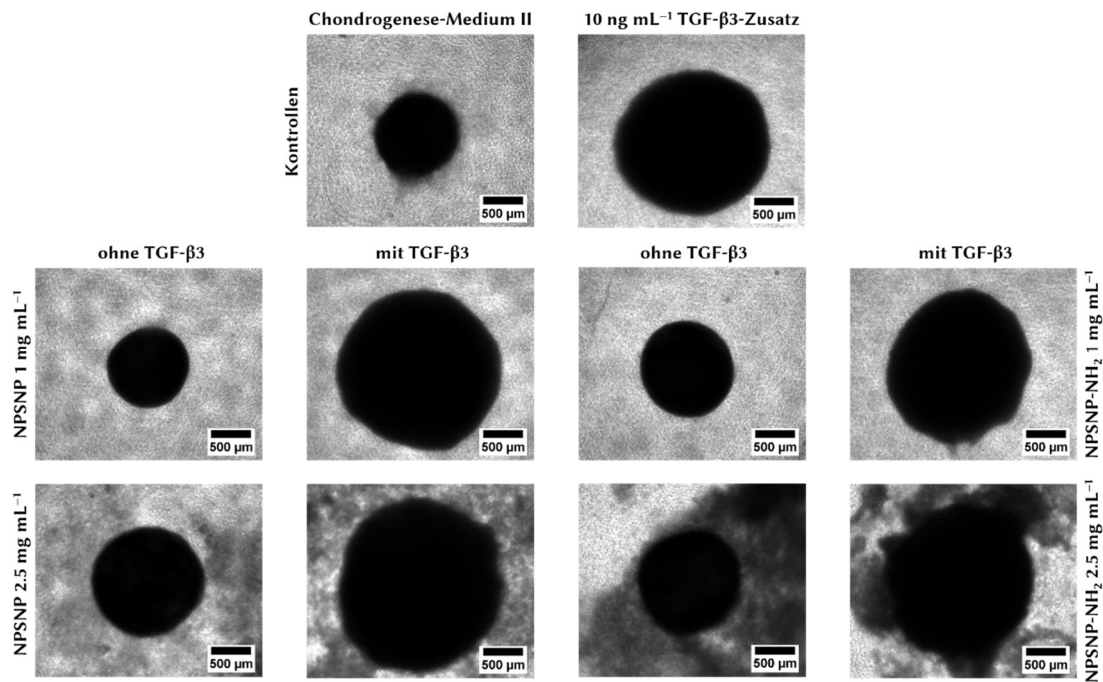


Abbildung 4.28: Vergleich der *in vitro*-Chondrogenese (Kultivierung in Zellpellets) für MSCs in Gegenwart von unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) in zwei unterschiedlichen Konzentration (1 mg mL⁻¹ und 2.5 mg mL⁻¹) und jeweils mit bzw. ohne TGF-β3-Beladung. Bei den Kontrollen handelt es sich um das Zellkulturmedium mit bzw. ohne TGF-β3-Zusatz von 10 ng mL⁻¹ je Mediumwechsel.

Mithilfe der mikroskopischen Aufnahmen lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Modifizierungen bzw. Konzentrationen der Nanopartikel ermitteln, sodass weitere Untersuchungen herangezogen werden müssen. Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurde der GAG/DNA-Gehalt für die einzelnen Proben bestimmt. Die Glykosaminoglykane (GAGs), wie z. B. Aggrecan oder verschiedene Kollagene, sind Bestandteile der sich bildenden extrazellulären Matrix und wurden über eine spezifische Färbung mithilfe des Farbstoffs Dimethylmethyleneblau (DMB) nachgewiesen (Abbildung 4.29 a). Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt mithilfe des Farbstoffs Hoechst 33342 bestimmt, um mögliche Abweichungen in der Zellmenge der Proben auszugleichen (Abbildung 4.29 b). Das sich daraus ergebene GAG/DNA-Verhältnis ist in Abbildung 4.29 c dargestellt.

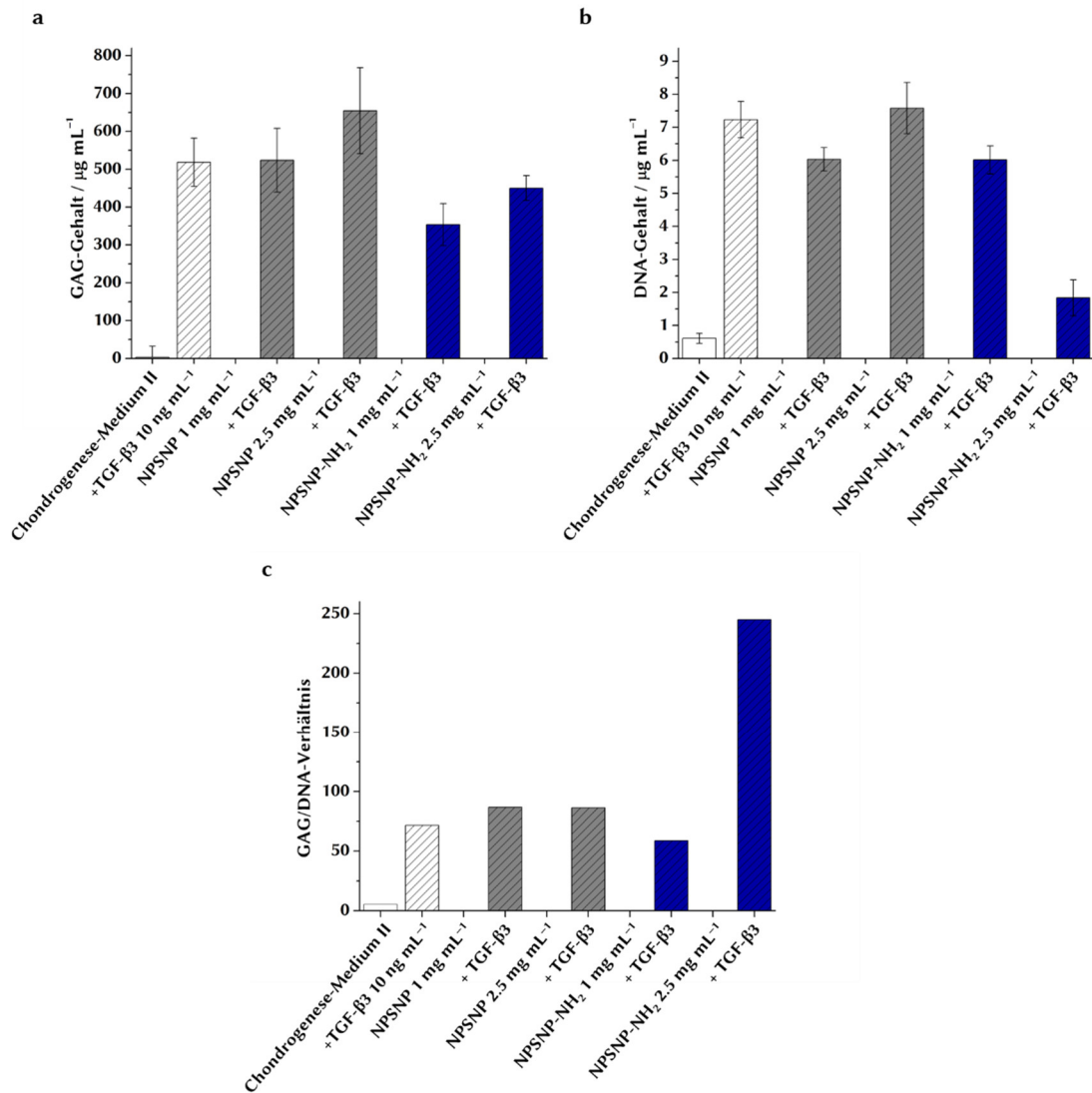


Abbildung 4.29: Quantifizierung der *in vitro*-Chondrogenese der MSCs in Gegenwart von unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH $_2$) in zwei unterschiedlichen Konzentration (1 mg mL $^{-1}$ und 2.5 mg mL $^{-1}$) und jeweils mit bzw. ohne TGF- β 3-Beladung. Bei den Kontrollen handelt es sich um das Zellkulturmedium mit bzw. ohne TGF- β 3-Zusatz von 10 ng mL $^{-1}$ je Mediumwechsel. Die Quantifizierung erfolgt über das GAG/DNA-Verhältnis (c), zusätzlich sind die dazugehörigen GAG- (a) und DNA-Gehalte (b) dargestellt.

Es zeigt sich, dass nur ein GAG-Gehalt und damit auch nur ein GAG/DNA-Verhältnis ermittelt werden konnte, wenn TGF- β 3 in der Zellkultur vorlag. Das höchste GAG/DNA-Verhältnis lässt sich für die TGF- β 3-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel in einer Konzentration von 2.5 mg mL $^{-1}$ bestimmen. Damit wurde die Knorpelmatrix in dieser Probe am stärksten ausgebildet. Aber auch die anderen TGF- β 3-beladenen Nanopartikel führen zu einem GAG/DNA-Verhältnis, welches mit dem der Positivkontrolle vergleichbar ist. Hinsichtlich der Nanopartikel-modifizierung bzw. der Nanopartikelkonzentration lassen sich anhand dieser Ergebnisse keine Unterschiede erkennen. Zum einen unterscheiden sich die Ergebnisse bei den unmodifizierten Nanopartikeln nicht in Abhängigkeit von der Konzentration.

Zum anderen liegt das GAG/DNA-Verhältnis der TGF- β 3-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel in einer Konzentration von 2.5 mg mL^{-1} über dem Wert und in einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} unter dem Wert der entsprechenden unmodifizierten Nanopartikel.

Laut des GAG/DNA-Verhältnisses zeigen die TGF- β 3-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel in einer Konzentration von 2.5 mg mL^{-1} die vielversprechendsten Ergebnisse in Bezug auf die chondrogene Differenzierung der MSCs. Jedoch müssen ebenfalls Genexpressionsanalysen erfolgen, um genaue Aussage über den Differenzierungsgrad der MSCs zu treffen. Hierfür wurde die RNA der Zellen isoliert und aufgereinigt und mittels der quantitativen Real-Time-PCR die Genexpression folgender Gene untersucht: ALPL, ACAN, COL2A1, COMP, MMP13 und SOX9. Wie bereits in Abbildung 2.17 gezeigt wurde, deutet eine hohe Expression von ACAN, COL2A1, COMP und SOX9 auf die Differenzierungsstufe der reifen bzw. proliferierenden Chondrozyten hin. Diese Differenzierungsstufe ist für die spätere Anwendung auf dem gradierten Implantat erwünscht, da durch den Einsatz von TGF- β 3 auf dem PCL-Scaffold primär die Knorpelregeneration und nicht die Wiederherstellung des Knochengewebes angeregt werden soll. Der Übergang zur Bildung eines Knochengewebes wird durch die hohe Produktion von Markergenen wie ALPL und MMP13 angedeutet. Die Ergebnisse zur Genexpression sind in Abbildung 4.30 dargestellt. Der auf der Y-Achse aufgetragene Wert ist auf ein Referenzgen normiert und stellt eine Möglichkeit der quantitativen Angabe der Menge des Markergens dar.

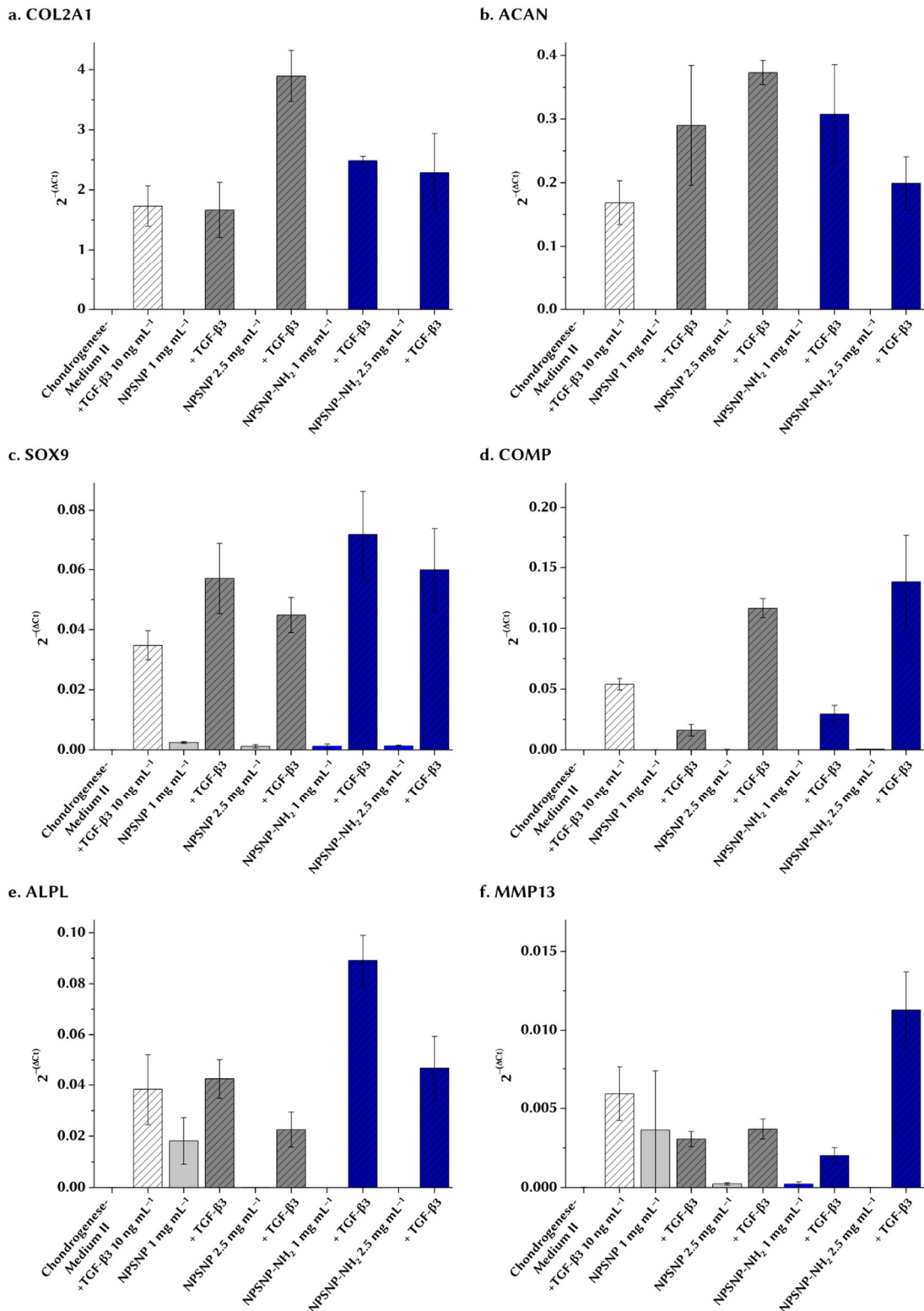


Abbildung 4.30: Untersuchungen zur Genexpression der Markergene COL2A1 (a), ACAN (b), SOX9 (c), COMP (d), ALPL (e) und MMP13 (f) mittels qRT-PCR. Die Untersuchungen erfolgten mit der RNA von MSCs, die in Zellpellets in Gegenwart von unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH $_2$) in zwei unterschiedlichen Konzentration (1 mg mL $^{-1}$ und 2.5 mg mL $^{-1}$) und jeweils mit bzw. ohne TGF- β 3-Beladung kultiviert wurden. Als Kontrolle wurde das Chondrogenese-Medium II mit bzw. ohne TGF- β 3-Zusatz von 10 ng mL $^{-1}$ je Mediumwechsel getestet.

Die Ergebnisse der Genexpression zeigen, dass alle Proben ohne TGF- β 3 nahezu keine Produktion der einzelnen Markergene aufweisen. Zudem sind die Ergebnisse dieser Nanopartikel mit denen der Negativkontrolle vergleichbar. Somit haben die Rohmaterialien, die un- und amino-modifizierten Nanopartikel, keinen Effekt auf die chondrogene Differenzierung der MSCs. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den Erkenntnissen aus den mikroskopischen Aufnahmen und dem GAG/DNA-Verhältnis in Einklang bringen. Die vorherigen Untersuchungen von Christel *et al.* können allerdings nicht bestätigt werden.^[15] In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die amino-modifizierten Nanopartikel eine osteogene Differenzierung der MSCs hervorrufen. Die amino-modifizierten Nanopartikel in der vorliegenden Arbeit übten dagegen sowohl keinen chondrogenen als auch keinen osteogenen Effekt auf die MSCs aus. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die verschiedenen Untersuchungsmethoden sein. Während die Ergebnisse dieser Arbeit vor allem auf einer Genexpressionsanalyse basieren, wurden die Ergebnisse bei Christel *et al.* mithilfe von histologischen Färbungen erhalten.

Die Proben mit TGF- β 3 weisen hingegen eine Expression aller Markergene auf, die sich aber in der Höhe der Genexpression und in Abhängigkeit der Nanopartikelart und -konzentration unterscheidet. Hinsichtlich der gewünschten Markergene (ACAN, COL2A1, COMP und SOX9) führen beide Nanopartikelsorten unabhängig von ihrer Konzentration zu einer hohen Expression der Gene, die z. T. über der der Positivkontrolle liegt. Die vielversprechendsten Ergebnisse unter Berücksichtigung aller vier Markergene zeigen die un- und amino-modifizierten Nanopartikel in einer Konzentration von 2.5 mg mL⁻¹. Im Falle der amino-modifizierten Nanopartikel führt diese Konzentration allerdings auch zu einer vergleichsweise hohen Expression von ALPL und MMP13, die bekanntlich zu den hypertrophen Chondrogenese- bzw. osteogenen Markern gehören. Damit erreichen die MSCs in Gegenwart der TGF- β 3-beladenen, amino-modifizierten Nanopartikel eine Differenzierungsstufe, die in der späteren Anwendung eher unerwünscht ist, da es z. T. schon zur Ausbildung einer Knochenmatrix kommt.

Somit lässt sich festhalten, dass beide Nanopartikelsorten mit TGF- β 3-Beladung in den ersten *in vitro*-Untersuchungen eine chondrogene Differenzierung der MSCs auslösen. Interessanterweise stehen die unmodifizierten den amino-modifizierten Nanopartikeln in nichts nach. Obwohl deutlich geringere Mengen an TGF- β 3 freigesetzt werden, ist der chondrogene Effekt in beiden untersuchten Konzentrationen vergleichbar bzw. z. T. besser, da die Differenzierung in die osteogene Richtung durch die unmodifizierten, TGF- β 3-beladenen Nanopartikel in geringerem Maße hervorgerufen wird als durch die amino-modifizierten Nanopartikel mit TGF- β 3-Beladung. Möglicherweise ist die freigesetzte TGF- β 3-Menge aus den amino-modifizierten Nanopartikeln zu hoch, sodass die chondrogene Differenzierung der MSCs zu schnell voranschreitet. Da aber auch das immobilisierte TGF- β 3 auf den Nanopartikeln einen Einfluss ausüben kann, weil die Nanopartikel bei den Untersuchungen im direkten Kontakt zu den Zellpellets stehen, wurde in weiteren

in vitro-Untersuchungen der Effekt der jeweiligen TGF- β 3-Freisetzungsmengen untersucht. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel diskutiert.

Untersuchungen zum Einfluss der freigesetzten TGF- β 3-Mengen auf die chondrogene Differenzierung der MSCs. Für die Untersuchungen zum Einfluss der freigesetzten TGF- β 3-Mengen wurden die Zellpellets über 28 Tage in Überständen kultiviert, die aus den jeweiligen Freisetzungsexperimenten mit 5 mg unmodifizierten bzw. amino-modifizierten Nanopartikeln stammen. Dabei erfolgte die Zugabe der Überstände nach einem beschriebenen Ablauf, der in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Die zugehörigen Freisetzungsmengen pro abgenommenen Überstand lassen sich der Abbildung 4.26 entnehmen. An dieser Stelle ist festzuhalten, dass eine Quantifizierung während der Kultivierung nicht möglich ist und somit nach 28 Tagen nur der kumulative Effekt der Überstände ermittelt werden konnte. Unter Berücksichtigung der angegebenen Verdünnungen der Überstände betrug die TGF- β 3-Konzentration im Kultivierungsmedium bei Zugabe der Überstände der amino-modifizierten Nanopartikel etwa 20–30 ng mL⁻¹. Somit sind die TGF- β 3-Konzentrationen bei diesen Proben höher als die Konzentration im Falle der Positivkontrolle (10 ng mL⁻¹). Da aus den unmodifizierten Nanopartikeln generell weniger TGF- β 3 freigesetzt wurde, lag die TGF- β 3-Konzentration im Kultivierungsmedium bei nur ca. 5 ng mL⁻¹.

Wie schon bei den vorherigen *in vitro*-Untersuchungen wurden nach der Kultivierung zunächst die Morphologie und die Größe der Zellpellets begutachtet (Abbildung 4.31). Das Vorhandensein von TGF- β 3 führte bei allen Proben zum Wachsen der Zellpellets. Somit ist ein erster Hinweis auf die chondrogene Differenzierung der MSCs gegeben. Allerdings erscheinen die Zellpellets, die in den Überständen der Nanopartikel kultiviert wurden, etwas kleiner im Vergleich zum Zellpellet der Positivkontrolle. Dies deutet auf einen stärkeren chondrogenen Effekt des exogenen TGF- β 3-Zusatzes als der freigesetzten TGF- β 3-Mengen hin, obwohl die Konzentration in den Überständen der amino-modifizierten Nanopartikel höher sein sollte.

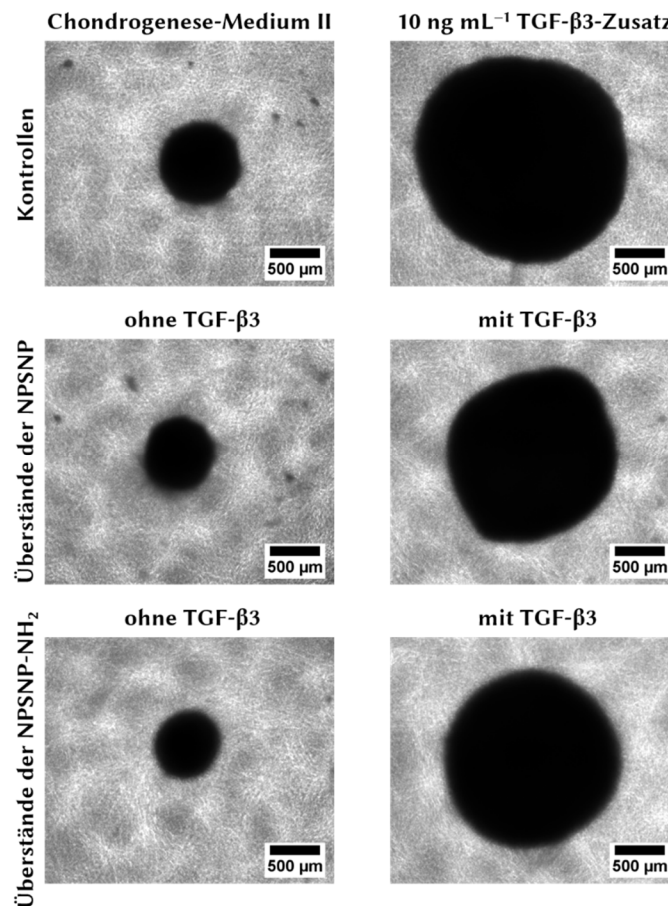


Abbildung 4.31: Vergleich der *in vitro*-Chondrogenese (Kultivierung in Zellpellets) für MSCs in Gegenwart der Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) jeweils mit bzw. ohne TGF-β₃-Beladung. Bei den Kontrollen handelt es sich um das Zellkulturmedium mit bzw. ohne TGF-β₃-Zusatz von 10 ng mL⁻¹.

Für quantitative Aussagen bezüglich des chondrogenen Effektes der freigesetzten TGF-β₃-Mengen wurde das GAG/DNA-Verhältnis für die jeweiligen Bedingungen ermittelt und die Genexpression unterschiedlicher Markergene mittels qRT-PCR untersucht. In Abbildung 4.32 sind zunächst die Ergebnisse bezüglich des GAG/DNA-Verhältnisses dargestellt. Die Bestimmung eines GAG-Gehaltes und auch eines GAG/DNA-Verhältnisses konnte nur in Gegenwart von TGF-β₃ erfolgen. Allerdings führen die Überstände der TGF-β₃-beladenen Nanopartikel zu geringeren GAG-Gehalten als die Positivkontrolle. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen, die anhand der mikroskopischen Aufnahmen gemacht wurden, da auch dort das Zellpellet der Positivkontrolle etwas größer war. Ein größeres Zellpellet und ein höherer GAG-Gehalt sind an dieser Stelle mit einer stärkeren Ausbildung einer extrazellulären Matrix gleichzusetzen. Infolgedessen kann den freigesetzten TGF-β₃-Mengen aus beiden Nanopartikeln eindeutig ein chondrogener Effekt zugesprochen werden, der aber geringer zu sein scheint als der Effekt von exogenem TGF-β₃ in der Positivkontrolle. Hinsichtlich der Ausbildung einer extrazellulären Matrix scheint somit eine Konzentration von 10 ng mL⁻¹ optimal zu sein, da sowohl eine geringere

(Überstände der unmodifizierten Nanopartikel) als auch höhere TGF- β 3-Konzentration (Überstände der amino-modifizierten Nanopartikel) den chondrogenen Effekt nicht verbessert.

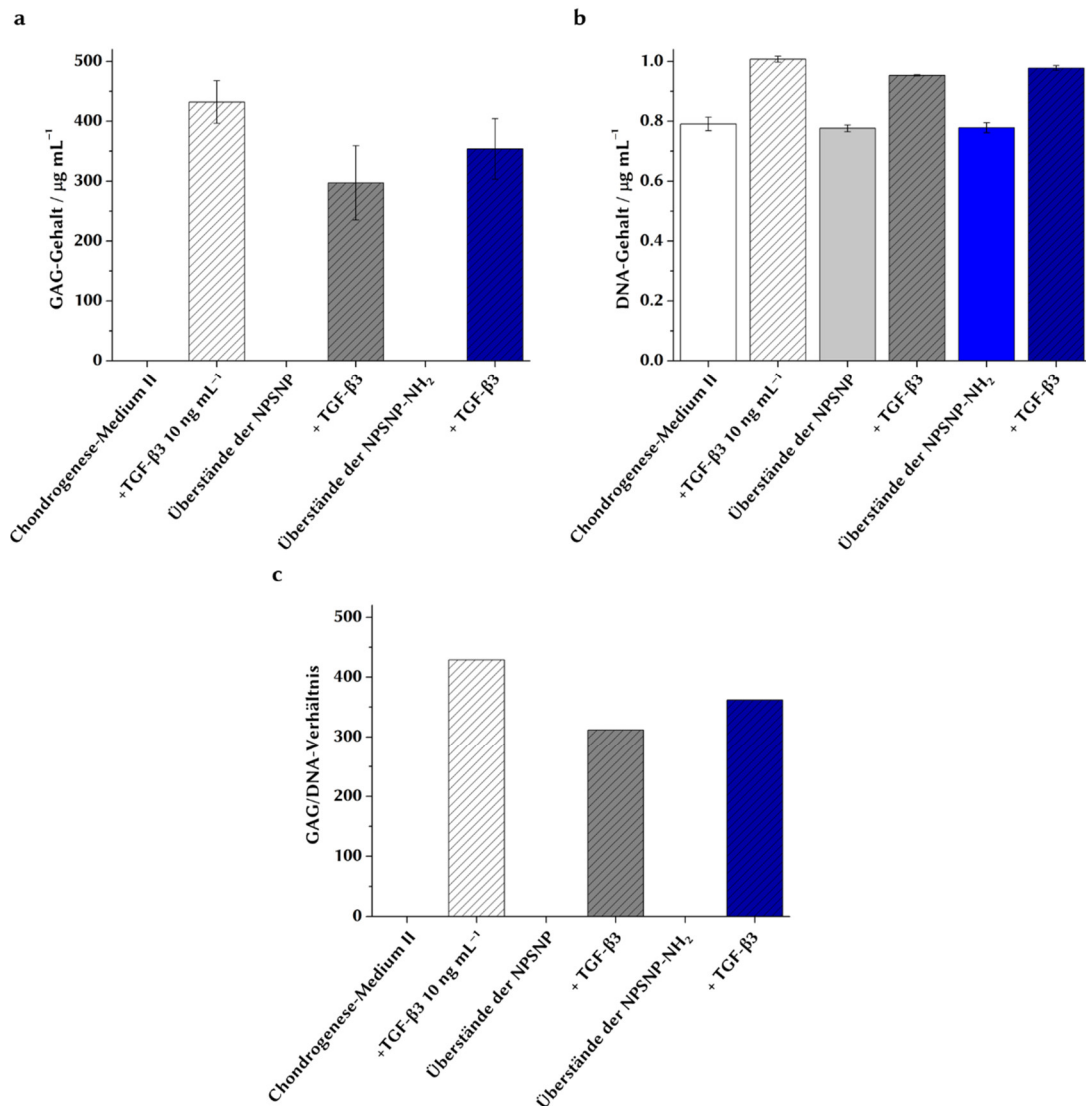


Abbildung 4.32: Quantifizierung der *in vitro*-Chondrogenese der MSCs in Gegenwart der Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) jeweils mit bzw. ohne TGF- β 3-Beladung. Bei den Kontrollen handelt es sich um das Zellkulturmedium mit bzw. ohne TGF- β 3-Zusatz von 10 ng mL^{-1} . Die Quantifizierung erfolgt über das GAG/DNA-Verhältnis (c), zusätzlich sind die dazugehörigen GAG- (a) und DNA-Gehalte (b) dargestellt.

Neben dem Nachweis eines chondrogenen Effektes ist die Differenzierungsstufe der MSCs, die durch die Gegenwart der freigesetzten TGF- β 3-Mengen hervorgerufen wird, entscheidend. Hierfür wurden nach der Kultivierung Untersuchungen zur Genexpression unterschiedlicher Markergene durchgeführt (Abbildung 4.33).

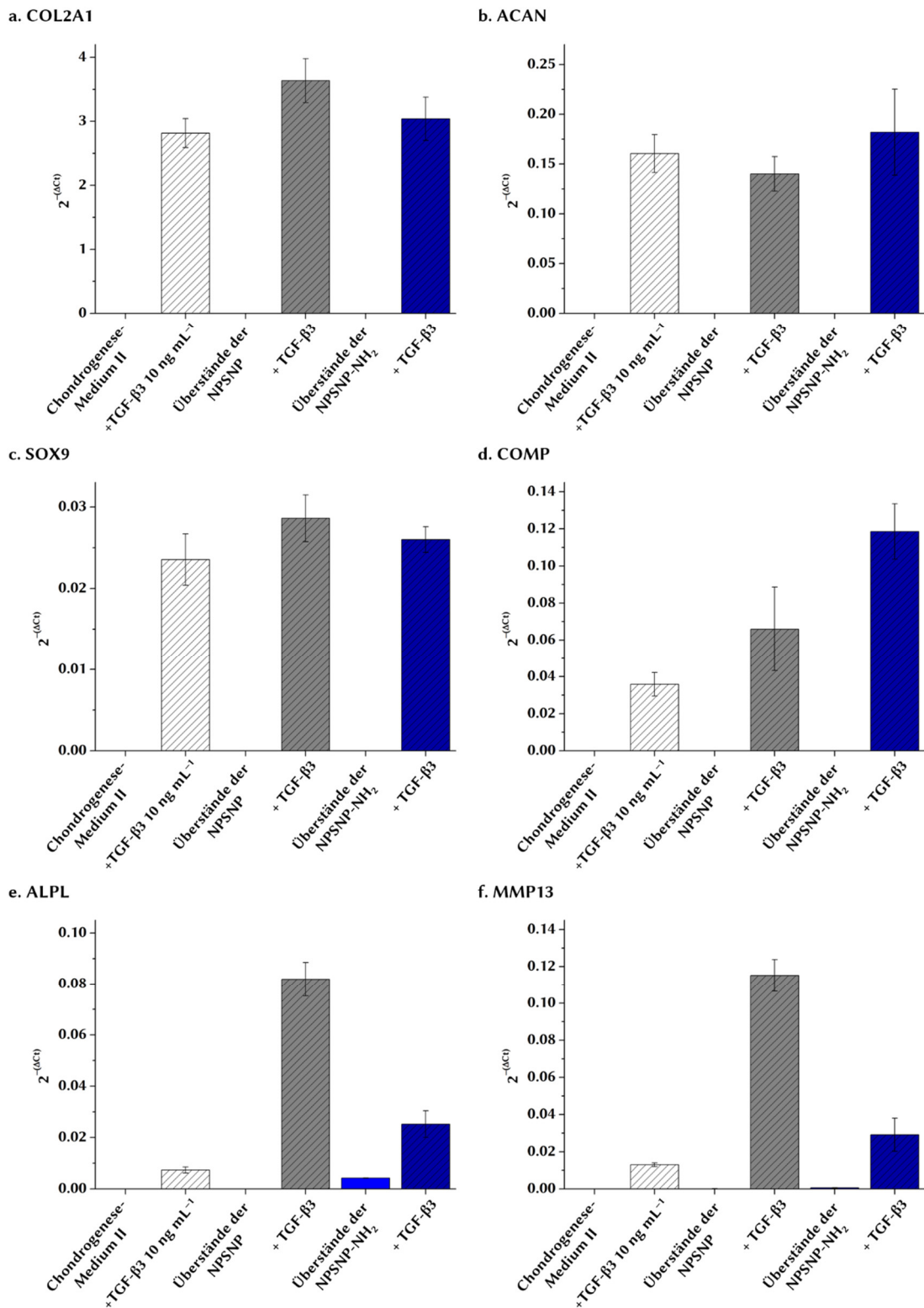


Abbildung 4.33: Untersuchungen zur Genexpression der Markergene COL2A1 (a), ACAN (b), SOX9 (c), COMP (d), ALPL (e) und MMP13 (f) mittels qRT-PCR. Die Untersuchungen erfolgten mit der RNA von MSCs, die in Zellpellets in Gegenwart der Überstände aus den Freisetzungsexperimenten mit unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) jeweils mit bzw. ohne TGF- β 3-Beladung kultiviert wurden. Als Kontrolle wurde das Chondrogenese-Medium II mit und ohne TGF- β 3-Zusatz von 10 ng mL⁻¹ getestet.

Bezüglich der Expression der Markergene COL2A1, ACAN und SOX9 lassen sich unter Einbeziehung der Standardabweichungen keine Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den jeweiligen freigesetzten TGF- β 3-Mengen der unmodifizierten bzw. amino-modifizierten Nanopartikel erkennen. Beim vierten Markergen (COMP), welches zusätzlich auf die Bildung von reifen und proliferierenden Chondrozyten hinweist, ergeben sich geringe Unterschiede, da mit den freigesetzten Mengen eine etwas höhere Produktion dieses Gens erreicht wird. Demzufolge führen die freigesetzten TGF- β 3-Mengen insgesamt trotz der geringeren Ausbildung einer extrazellulären Matrix (bezogen auf die mikroskopischen Aufnahmen und die bestimmten GAG/DNA-Gehalte) zu einer vergleichbaren Produktion der gewünschten Chondrozyten wie die Positivkontrolle. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die unterschiedlichen Konzentrationen an TGF- β 3 zwar die Bildung der extrazellulären Matrix beeinflussen können, jedoch keine ersichtlichen Auswirkungen auf die Expression der gewünschten Markergene haben. In Bezug auf die osteogenen Markergene ergibt sich im Vergleich zu den *in vitro*-Untersuchungen mit den TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln ein anderes Bild. Die freigesetzten Mengen aus den unmodifizierten Nanopartikeln führen hierbei zu einer höheren Produktion der osteogenen Markergene und damit zu einer späteren Differenzierungsstufe. Dieser Aspekt ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärbar, zumal die TGF- β 3-Konzentration in Gegenwart der Überstände der unmodifizierten Nanopartikel am geringsten ist und eher höhere TGF- β 3-Konzentrationen eine spätere Differenzierungsstufe begünstigen sollten. Es ist deshalb zwingend erforderlich weitere Wiederholungsversuche durchzuführen, um die Ergebnisse zu verifizieren, da Zellen sehr empfindlich auf die Zusammensetzung des umgebenden Mediums reagieren und deren Verhalten dadurch manchmal schwer nachvollziehbar ist.

Dennoch zeigen die ersten *in vitro*-Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse, weil sowohl die TGF- β 3-beladenen Nanopartikel als auch die freigesetzten TGF- β 3-Mengen einen nachweisbaren chondrogenen Effekt auf die MSCs haben. Dies konnte anhand der mikroskopischen Aufnahmen, der bestimmten GAG/DNA-Gehalte und mithilfe der Untersuchungen zur Genexpression spezieller Markergene gezeigt werden. Somit verliert das TGF- β 3 durch die Immobilisierung auf der Nanopartikeloberfläche und die anschließende Freisetzung seine biologische Aktivität nicht und kann demzufolge *in vitro* die MSCs zur Differenzierung anregen. Da jedoch die unmodifizierten und die amino-modifizierten Nanopartikel z. T. keine Unterschiede untereinander aufweisen bzw. keine einheitliche Tendenz in den Ergebnissen zu erkennen ist, kann an dieser Stelle keine Aussage bezüglich der Fragestellung getroffen werden, welche Nanopartikelart sich am besten als Freisetzungssystem für TGF- β 3 in Hinblick auf die spätere Anwendung eignet. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig. Insbesondere ist dabei der Aspekt entscheidend, welche Ergebnisse die Komposite bestehend aus der PCL-Fasermatte und den TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln in ähnlichen *in vitro*-Untersuchungen zeigen. Aus diesem Grund wird in den folgenden Kapiteln das Hauptaugenmerk auf diese Komposite gelegt, indem sie zunächst charakterisiert werden, ihr Freisetzungsverhalten für

TGF- β 3 untersucht wird und sie letztlich hinsichtlich ihrer Aufgabe in ersten *in vitro*-Untersuchungen getestet werden.

4.3.6 Funktionalisierung von PCL-Fasermatten mit unterschiedlichen NPSNPs

Die Funktionalisierung der PCL-Fasermatten mit unterschiedlichen Nanopartikeln erfolgte durch eine einfache Prozedur, indem jeweils eine Fasermatte mit Abmessungen von 8 mm x 16 mm in einer Nanopartikeldispersion mit einer Konzentration von 5 mg mL⁻¹ inkubiert wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenladungen der eingesetzten Nanopartikel wurden auch unterschiedliche PCL-Fasermatten verwendet. Die PCL_{SK}-Fasermatten, bei denen es sich um die Fasermatten mit „*shish-kebab*“-Strukturierung handelt, haben eine positiv geladene Oberfläche und zeigen somit gute Voraussetzungen für eine Funktionalisierung mit unmodifizierten Nanopartikeln. Für die Funktionalisierung mit amino-modifizierten Nanopartikeln wurden die PCL_{SK}-Fasermatten mit einer zusätzlichen Alginat-Beschichtung ausgestattet (PCL_{SK}-Alg-Fasermatten), um eine negative Oberflächenladung zu erzeugen, welche eine elektrostatische Wechselwirkung mit den positiv geladenen, amino-modifizierten Nanopartikeln möglich machte. Neben den unmodifizierten Nanopartikeln (NPSNP) und den amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂), die in den ersten *in vitro*-Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse zeigten, wurden als Alternative auch die amino-modifizierten Nanopartikel mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂) zur Funktionalisierung der PCL-Fasermatten eingesetzt. Obwohl diese Nanopartikel für die beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen nicht in Frage kamen, sind sie aufgrund der zusätzlichen wissenschaftlichen Erkenntnisse interessant, da die Aufbringung von modifizierten Nanopartikeln auf biodegradierbare Scaffolds weniger erforscht ist als die der unmodifizierten Nanopartikel.^[324,325] Des Weiteren sei erwähnt, dass in den ersten Versuchen noch keine gradierte Aufbringung der Nanopartikel auf die Fasermatten erfolgte, jedoch diesbezüglich im Rahmen der Forschergruppe schon erfolgreich Methoden entwickelt wurden. Für die vorliegende Arbeit mit dem Ziel ein generelles Freisetzungssystem für TGF- β 3 auf Basis der nanoporösen Silica-Nanopartikel und der PCL-Fasermatten zu entwickeln, ist dieser Aspekt aber nicht relevant.

Eine Möglichkeit, die PCL-Fasermatten hinsichtlich ihrer Funktionalisierung mit Nanopartikeln zu charakterisieren, ist die Anfertigung von REM-Aufnahmen (Abbildung 4.35). Die elektrogesponnenen Fasern, die einen Durchmesser von etwa $\leq 3 \mu\text{m}$ haben, weisen in allen drei Fällen Nanopartikel auf ihrer Oberfläche auf. Zudem lassen sich die Nanopartikel jeweils bis ins Innere der Fasermatte erkennen, sodass von einer guten Funktionalisierung über die gesamte Fasermatte gesprochen werden kann. Allerdings sind deutliche Unterschiede in der Bedeckung durch die unmodifizierten bzw. amino-modifizierten Nanopartikel auszumachen. Während die unmodifizierten Nanopartikel auf den Fasern z. T. einzeln oder in kleinen Agglomeraten vorzufinden sind, liegen die amino-modifizierten Nanopartikel eher

in größeren Agglomeraten vor. Dies lässt sich durch die Reaktionsbedingungen für die Funktionalisierung begründen, da sich die amino-modifizierten Nanopartikel bei einem pH-Wert von 7.4 nahe an ihrem isoelektrischen Punkt befinden und somit zur Aggregation neigen.

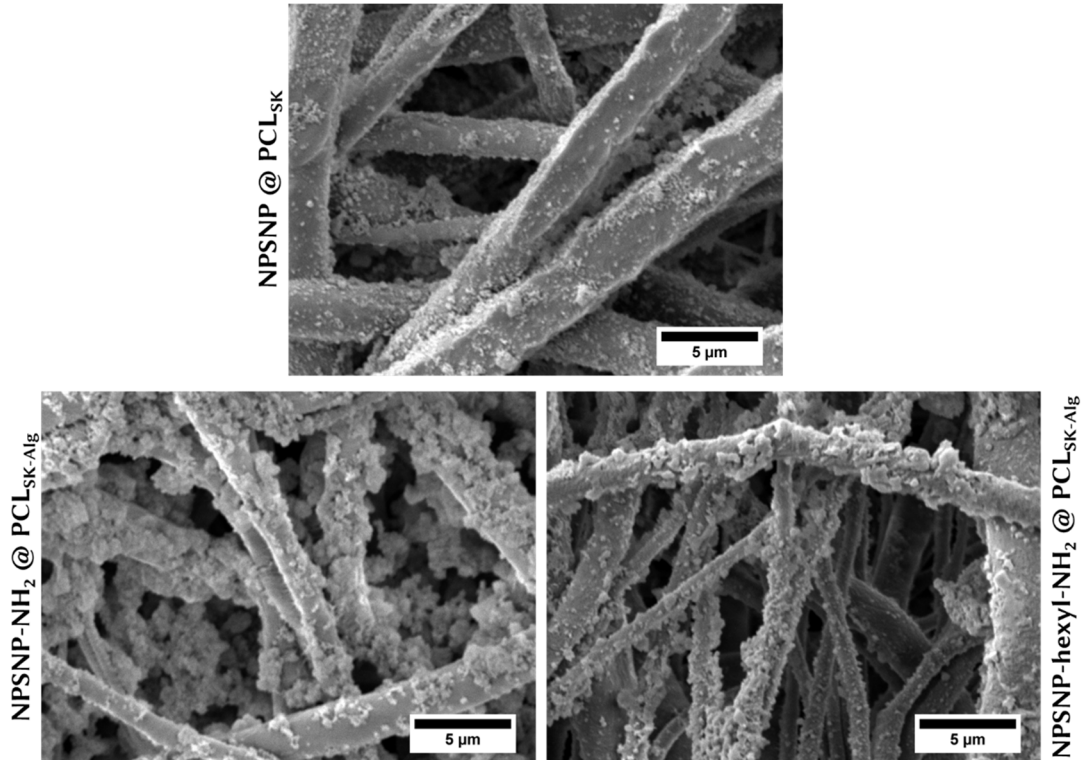


Abbildung 4.34: REM-Aufnahmen der „shish-kebab“-strukturierten Fasermatten, die mit unmodifizierten Nanopartikeln funktionalisiert wurden (NPSNP @ PCL_{SK}) bzw. der PCL_{SK-Alg}-Fasermatten, die mit den unterschiedlichen amino-modifizierten Nanopartikeln dekoriert wurden ((NPSNP-NH₂ bzw. NPSNP-hexyl-NH₂ @ PCL_{SK}).

Weiterhin lässt sich die Anwesenheit der Nanopartikel auf der Oberfläche der Fasermatten durch die IR-Spektroskopie bestätigen (s. Abbildung 7.6 im Anhang). Bei den IR-Spektren der funktionalisierten Fasermatten tritt zusätzlich zu den charakteristischen Banden von PCL eine breite Bande um $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$ auf, die auf die starke Si–O–Si-Valenzschwingungen von Silica-Materialien zurückzuführen ist. Alle weiteren charakteristischen Banden z. B. für die funktionellen Gruppen der Nanopartikel sind von geringerer Intensität und daher schwer zu identifizieren.

Die jeweilige Menge an Nanopartikeln auf den PCL-Scaffolds wurde mittels Thermogravimetrie bestimmt. Abbildung 4.35 zeigt die Ergebnisse der thermogravimetrischen Untersuchungen an den mit unterschiedlichen Nanopartikeln funktionalisierten PCL-Fasermatten im Vergleich zur TG-Messung der PCL_{SK-Alg}-Fasermatte. Bei allen Fasermatten ohne Silica-Nanopartikel, sei es das reine PCL-Scaffold, das „shish-kebab“-strukturierte Scaffold (bei dem zusätzlich zum PCL-Material Chitosan ins Spiel kommt) oder die Fasermatte mit einer zusätzlichen Alginate-Schicht, kommt es aufgrund der rein organischen Bestandteile an Luft zu einer vollständigen,

thermischen Degradation. Laut Literatur zeigen dabei alle Ausgangsmaterialien – PCL,^[326] Chitosan^[327] und Alginsäure^[328] – eine zweistufige Zersetzung im Temperaturbereich von 200 °C bis 500 °C. Diese Zersetzungsstufen sind auch bei der PCL_{SK}-Alg-Fasermatte (Abbildung 4.35 a) wiederzufinden, die hier beispielhaft für die PCL-Fasermatten ohne Nanopartikel gezeigt ist. Angesichts der vollständigen Degradation der PCL-Fasermatte kann die verbleibende Restmenge bei den funktionalisierten Fasermatten auf die Menge der Silica-Nanopartikel zurückgeführt werden. Bei diesem anorganischen Rest handelt sich um SiO₂. Bei den TG-Messungen mit den funktionalisierten PCL-Fasermatten kann zunächst beobachtet werden, dass bei allen diese gewisse Restmenge zurückbleibt, sodass die TG-Messungen zusätzlich eine erfolgreiche Funktionalisierung der Fasermatten mit unterschiedlichen NPSNPs bestätigen. Die funktionalisierten Fasermatten unterscheiden sich jedoch in der zurückgebliebenen SiO₂-Menge und somit in der Menge der Silica-Nanopartikel auf der jeweiligen Fasermatte. Die unmodifizierten Nanopartikel lassen sich mit einem Massenanteil von 8 % auf die PCL_{SK}-Fasermatte aufbringen. Dies entspricht einer Beladung von 0.58 mg Nanopartikel pro cm² Fasermatte. Die amino-modifizierten Nanopartikel machen dagegen auf der PCL_{SK}-Alg-Fasermatte einen etwas geringeren Massenanteil von 6 % (NPSNP-NH₂) bzw. 5.5 % (NPSNP-hexyl-NH₂) aus. Diese Werte entsprechen einer jeweiligen Beladungsmenge von 0.42 mg cm⁻² bzw. 0.39 mg cm⁻².

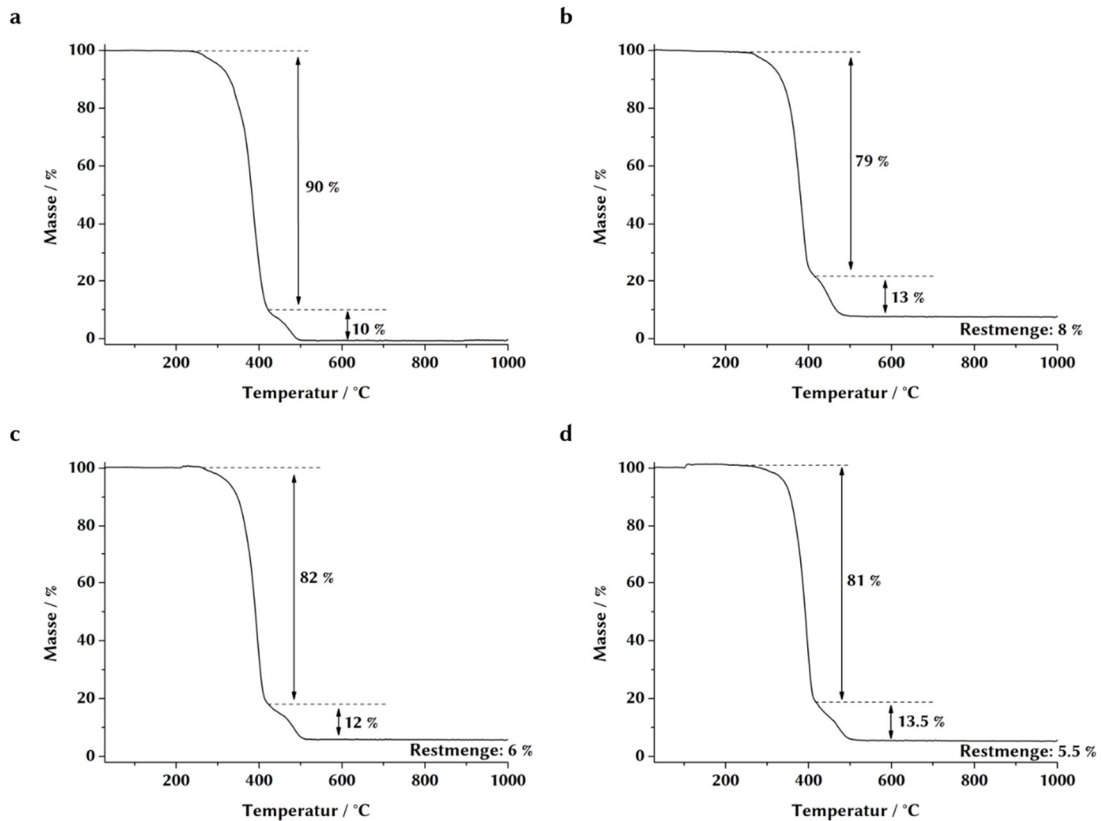


Abbildung 4.35: Thermogravimetrische Untersuchungen der funktionalisierten PCL-Fasermatten mit unterschiedlichen Nanopartikeln (b: NPSNP @ PCL_{SK}, c: NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK}-Alg und d: NPSNP-hexyl-NH₂ @ PCL_{SK}-Alg) im Vergleich zur TG-Messung der PCL_{SK}-Alg-Fasermatte (a).

Die unmodifizierten Nanopartikel führen folglich nicht nur zu einer homogenen Verteilung der Nanopartikel auf der PCL_{SK}-Fasermatte, sondern auch zu einer höheren Beladungsmenge pro Fasermatte. Dass die Beladungsmengen der amino-modifizierten Nanopartikel auf den PCL_{SK}-Alg-Fasermatten geringer sind, kann mit den größeren Agglomeraten dieser Nanopartikel auf der Fasermatte erklärt werden. Aufgrund der Größe können sie die Porengänge des PCL-Scaffolds z. T. verschließen und damit das Eindringen der Nanopartikel in weitere Schichten der Fasermatte verhindern. Trotz der Unterschiede in der Bedeckung der Fasermatte und in der Beladungsmenge konnten im Endeffekt alle untersuchten Nanopartikelsorten auf die PCL-Fasermatte mithilfe von elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgreich aufgebracht werden. Ob die größeren Agglomerate der amino-modifizierten Nanopartikel negative Einflüsse auf die TGF- β 3-Freisetzung von den Kompositen bzw. auf die *in vitro*-Untersuchungen mit MSCs haben, wird in den folgenden Kapiteln näher betrachtet.

4.3.7 Freisetzung von TGF- β 3 von NPSNP-funktionalisierten PCL-Fasermatten

Für die Freisetzungsexperimente mit den unterschiedlichen funktionalisierten PCL-Fasermatten wurde jeweils eine Fasermatte mit einer Abmessung von 8 mm x 16 mm

in einer Nanopartikeldispersion mit einer Konzentration von 5 mg mL^{-1} inkubiert. Die Nanopartikel wurden zuerst mit TGF- β 3 nach dem beschriebenen Prozess (s. Kapitel 3.3.4) beladen und sollten nach den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.2 unabhängig von der Modifizierung eine TGF- β 3-Menge von etwa $0.2 \text{ } \mu\text{g}$ pro mg Nanopartikel aufweisen. Die Freisetzung wurde unter den üblichen Bedingungen (PBS (0.1 % BSA) und $37 \text{ } ^\circ\text{C}$) für einen Zeitraum von 43 Tagen untersucht und mittels ELISA die freigesetzten TGF- β 3-Mengen ermittelt. Diese sind kumulativ für die einzelnen NPSNP-funktionalisierten PCL-Fasermatten in Abbildung 4.36 aufgetragen. In dem 43-tägigen Untersuchungszeitraum konnte TGF- β 3 aus allen drei funktionalisierten PCL-Fasermatten freigesetzt werden. Für die beiden PCL-Fasermatten mit amino-modifizierten Nanopartikeln ergaben sich relativ ähnliche Gesamt-mengen von 271 ng (NPSNP-NH₂) bzw. 245 ng TGF- β 3 (NPSNP-hexyl-NH₂), die aus 1 cm^2 Fasermatte freigesetzt wurden. Bei den PCL-Fasermatten mit unmodifizierten Nanopartikeln war die Gesamtmenge mit 85 ng cm^{-2} deutlich geringer. Hinsichtlich des Freisetzungssprofils lassen sich aber wiederum Parallelen finden. Bei allen drei funktionalisierten PCL-Fasermatten wurde TGF- β 3 in den ersten 7 d in großen Mengen (etwa 78–88 % der Gesamtmenge) freigesetzt. Anschließend wurde deutlich weniger TGF- β 3 pro Freisetzungstag nachgewiesen. Folglich sinkt die Freisetzungsgeschwindigkeit stark über den untersuchten Freisetzungsraum.

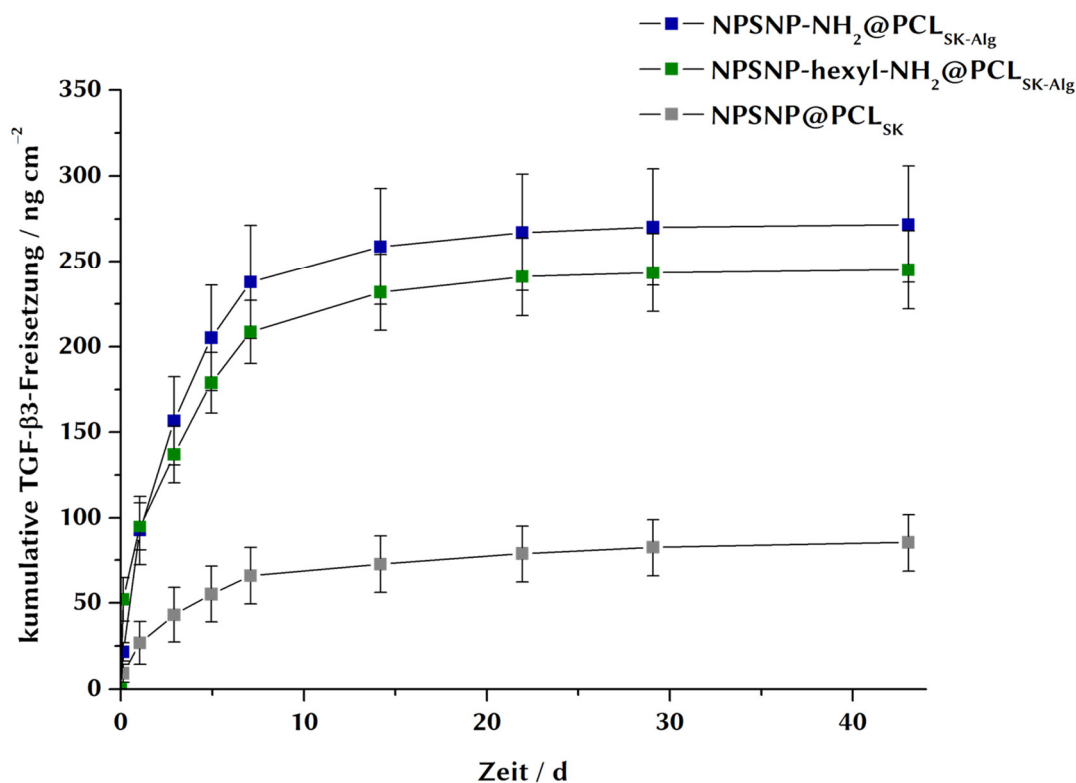


Abbildung 4.36: Kumulative TGF- β 3-Freisetzung von unterschiedlichen NPSNP-funktionalisierten PCL-Fasermatten in PBS (0.1 % BSA) bei $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von 43 d.

Die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente, vor allem die hohen Freisetzungsmengen aus den funktionalisierten PCL-Fasermatten mit amino-modifizierten Nanopartikeln, entsprechen nicht den Erwartungen. Diese liegen deutlich über den theoretisch berechneten TGF- β 3-Mengen, die sich insgesamt auf der jeweiligen Fasermatte befinden sollten. Mithilfe der TGF- β 3-Beladungsmenge auf den Nanopartikeln ($0.2 \mu\text{g mg}^{-1}$) und den jeweiligen Beladungsmengen der Nanopartikel auf den Fasermatten (s. Kapitel 4.3.6) ergeben sich folgende theoretische TGF- β 3-Mengen auf den jeweiligen Fasermatten: 116 ng cm^{-2} (NPSNP @PCL_{SK}), 84 ng cm^{-2} (NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK-Alg}) und 78 ng cm^{-2} (NPSNP-hexyl-NH₂ @ PCL_{SK-Alg}). Somit lässt sich nur die freigesetzte Gesamtmenge aus den funktionalisierten PCL-Fasermatten mit unmodifizierten Nanopartikeln mit diesen Berechnungen in Einklang bringen. Eine mögliche Erklärung für die zu großen Freisetzungsmengen könnte die schon bereits beschriebene Problematik der Agglomeration der amino-modifizierten Nanopartikel auf den Fasermatten sein. Denn in den Freisetzungsexperimenten kann es neben der gewünschten TGF- β 3-Freisetzung von der Nanopartikeloberfläche auch zum Ablösen der Nanopartikelagglomerate in das Freisetzungsmedium kommen. Diese können im ELISA ein falsch positives Signal auslösen, indem das TGF- β 3 auf der Oberfläche der Nanopartikel detektiert wird. Ob die hohen Freisetzungsmengen darauf zurückzuführen sind, sollte in weiteren Freisetzungsexperimenten durch eine zusätzliche Zentrifugation des Freisetzungsmediums geklärt werden.

Um weitere Rückschlüsse aus den Freisetzungsexperimenten zu ziehen, wurde sich die Degradation der funktionalisierten PCL-Fasermatten unter den Freisetzungsbedingungen angeschaut. Dafür wurden REM-Aufnahmen der Fasermatten nach 1 d, 14 d und 21 d unter diesen Bedingungen angefertigt (Abbildung 4.37). Nach einem Tag im Freisetzungsmedium lässt sich noch eine gute Bedeckung der Fasermatte mit den Nanopartikeln in allen drei Fällen erkennen. Diese REM-Aufnahmen sind mit denen direkt nach der Funktionalisierung (s. Abbildung 4.34) vergleichbar. Für die PCL_{SK}-Fasermatten mit unmodifizierten Nanopartikeln zeigt sich eine homogene Verteilung der Nanopartikel über die einzelnen Fasern und nur kleinere Nanopartikelagglomerate. Teilweise sieht es nach einer kompletten Bedeckung der Fasern durch eine Schicht an Nanopartikeln aus. Dies ist auf der REM-Aufnahme direkt nach der Funktionalisierung in diesem Maße nicht erkennbar, kann aber durch unterschiedliche Ausschnitte auf der Fasermatte, die für die REM-Aufnahmen ausgewählt wurden, begründet werden. Auf den PCL_{SK-Alg}-Fasermatten mit amino-modifizierten Nanopartikeln befinden sich nach einem Tag im Freisetzungsmedium weiterhin größere Agglomerate auf der Fasermatte. Zum Teil kommt es sogar zu einem Verklumpen der einzelnen Fasern durch die Nanopartikelagglomerate, wie es auf der angefertigten REM-Aufnahme der NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK-Alg} zu sehen ist. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch nach 14 d bzw. 21 d im Freisetzungsmedium. Hier sind alle drei funktionalisierten PCL-Fasermatten in ihrer Morphologie vergleichbar. Es lassen sich kaum noch Nanopartikelagglomerate auf der Fasermatte erkennen. Auch ist generell die Menge an Nanopartikeln deutlich geringer, da nach 14 d nur

vereinzelt Nanopartikel und nach 21 d kaum noch Nanopartikel auf den Fasern zu erkennen sind. Diese Beobachtungen können mehrere Ursachen haben. Die Nanopartikel können sich im Verlauf des Freisetzungszeitraums von der Fasermatte ablösen, da nur eine elektrostatische Wechselwirkung zur Fasermatte vorliegt. Zudem kommt es zu einer generellen Auflösung der Nanopartikel im Freisetzungsmedium (s. Kapitel 4.2.5). Im Falle der amino-modifizierten Nanopartikel, bei denen die Fasermatte vor der Aufbringen der Nanopartikel mit einer Alginat-Schicht versehen wurde, kann auch das Ablösen der Polymerschicht samt der Nanopartikel eine Ursache für die geringen Mengen an Nanopartikel auf der Fasermatte nach einer längeren Zeit im Freisetzungsmedium sein, zumal die Aufbringen der Alginat-Schicht auch einer elektrostatischen Anziehung unterliegt. Da aber laut der einzelnen Freisetzungprofile auch nach 14 d zwar geringe, aber nachweisbare TGF- β 3-Mengen freigesetzt wurden, sollten sich noch Nanopartikel auf den Fasermatten befinden. Diese liegen dann mit hoher Wahrscheinlichkeit nur noch vereinzelt vor, sodass sie bei der gewählten Vergrößerung aufgrund ihrer nanoskaligen Größe schwer auszumachen sind. Des Weiteren können sie sich auch im Inneren der Fasermatte befinden, wodurch der Nachweis mittels REM nicht mehr geeignet ist.

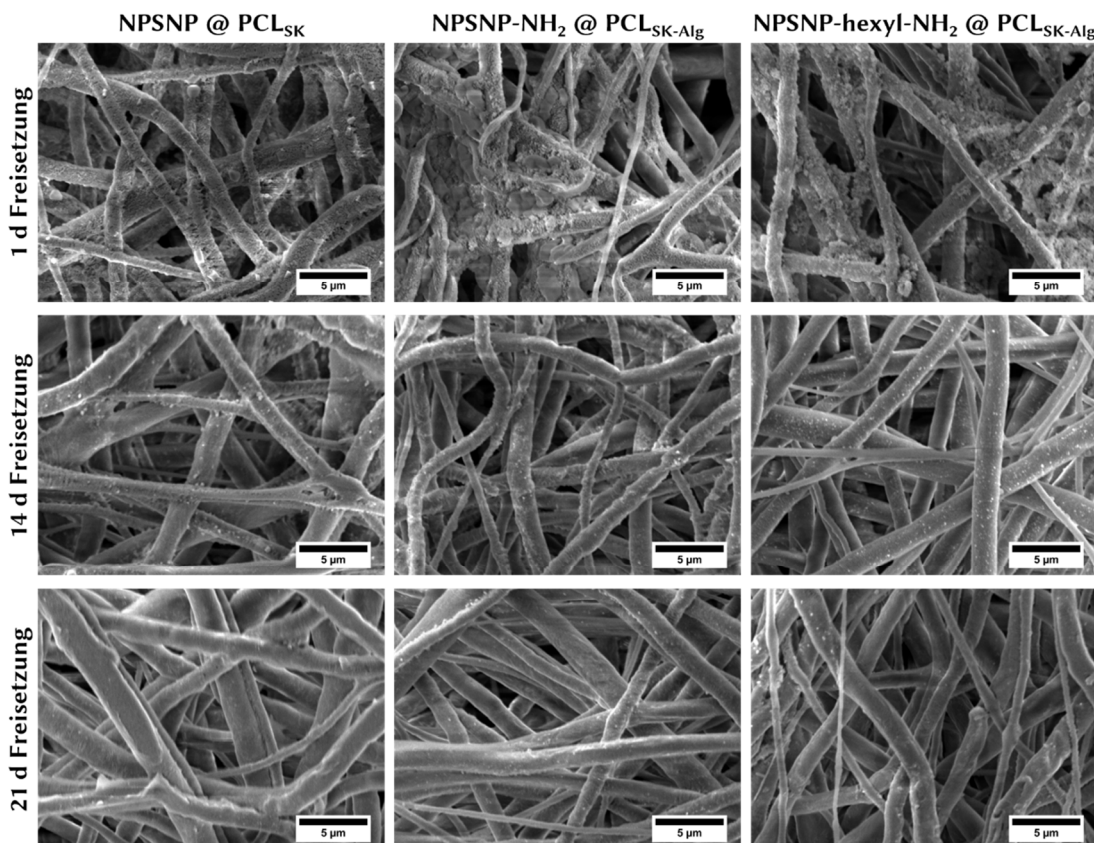


Abbildung 4.37: REM-Aufnahmen der funktionalisierten Fasermatten (NPSNP @PCL_{SK}, NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK}-Alg und NPSNP-hexyl-NH₂ @ PCL_{SK}-Alg) nach unterschiedlichen Zeiträumen im Freisetzungsmedium (1 d, 14 d und 21 d).

Die Untersuchungen zur Degradation der funktionalisierten PCL-Fasermatten unterstützen die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente, da ein generelles Ablösen

der Nanopartikel von der Fasermatte über den Freisetzungszeitraum beobachtet werden kann. Somit kann TGF- β 3 nicht nur in der gewünschter Form ins Freisetzungsmedium gelangen, indem es durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen zur Nanopartikeloberfläche kontrolliert von der Fasermatte freigesetzt wird; sondern auch, indem sich die Nanopartikel im Freisetzungsmedium von der Faseroberfläche ablösen – sei es unabhängig von der Polymerschicht bzw. mit der Alginat-Schicht – und sich aufgrund einer gewissen Löslichkeit von $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS auflösen^[166] und damit das TGF- β 3 freisetzen. Ein weiterer Faktor, der vor allem bei den amino-modifizierten Nanopartikeln Bedeutung erlangt, ist die Möglichkeit der Ablösung von Nanopartikelagglomeraten, die sich im Freisetzungsmedium nicht komplett auflösen und folglich Auswirkungen auf das ELISA-Signal haben können. Welcher Prozess den stärksten Einfluss auf die erhaltenen Freisetzungen hat, ist schwer auszumachen und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die unmodifizierten Nanopartikel hinsichtlich der Funktionalisierung der PCL-Fasermatten und der TGF- β 3-Freisetzung von diesen Kompositen die vielversprechendsten Ergebnisse zeigen, da zum einen eine geringere Agglomeration der Nanopartikel auf der Fasermatte vorliegt und zum anderen die TGF- β 3-Freisetzung in sich stimmende Ergebnisse liefert. Zudem ist auch die insgesamt freigesetzte Menge mit 85 ng cm^{-2} über 43 d groß.

4.3.8 *In vitro*-Untersuchungen hinsichtlich der Chondrogenese von MSCs mit NPSNP-funktionalisierten PCL-Fasermatten

In der späteren Anwendung sollen die entwickelten TGF- β 3-Freisetzungssysteme auf dem PCL-Scaffold die chondrogene Differenzierung der MSCs hervorrufen und damit einen entscheidenden Einfluss auf die Knorpelregeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs ausüben. Diesbezüglich wurde in ersten *in vitro*-Untersuchungen der Effekt der funktionalisierten PCL-Fasermatten mit TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln auf die Chondrogenese von MSCs getestet. Dafür wurden $500 \mu\text{L}$ einer Zellsuspension bestehend aus 50 000 Zellen auf eine zu untersuchende Fasermatte mit einer Abmessung von $4 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$ gegeben. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Untersuchungen mit den TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln bzw. mit den freigesetzten TGF- β 3-Mengen erfolgten die Untersuchungen somit nicht in einer 3D-Kultivierung (Zellpellets), sondern in einer 2D-Kultur. Die Chondrogenese wurde für einen Zeitraum von 28 Tagen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 untersucht und alle drei bis vier Tage frisches Medium hinzugegeben. Wie schon bei den *in vitro*-Untersuchungen, die in Kapitel 4.3.5 beschrieben wurden, wurden auch hier nur die unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten Nanopartikel (NPSNP-NH₂) auf den jeweiligen Fasermatten untersucht. Die amino-modifizierten Nanopartikel mit längerer Alkylkette brachten auch bei der Funktionalisierung der PCL-Fasermatte keinen sichtbaren Vorteil gegenüber den anderen amino-modifizierten Nanopartikeln, sodass sie für die folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden.

Aufgrund der Kultivierung auf der Fasermatte ergaben sich einige Probleme bei der anschließenden Analyse. Zum einen konnte kein GAG/DNA-Gehalt bestimmt werden, da eine enzymatische Verdauung der Zellen mittels Papain hier nicht möglich ist. Zum anderen kann anhand von einfachen mikroskopischen Aufnahmen keine Aussage in Bezug auf die Chondrogenese getroffen werden, wie es bei den Zellpellets noch möglich war. Deshalb musste ein Umweg über eine DAPI-Färbung (4',6-Diamidino-2-phenylindol) des Zellkerns und über eine Rhodamin-Färbung des Actins, Bestandteil des Cytoskeletts, gemacht werden, um Aussagen über die Morphologie der Zellen auf der Fasermatte zu treffen (Abbildung 4.38). Bei den funktionalisierten PCL_{SK}-Fasermatten mit unmodifizierten Nanopartikeln lassen sich keine Unterschiede zwischen den Proben mit bzw. ohne TGF- β 3 beobachten, da in beiden Fällen eine relativ homogene Zellschicht entlang der Fasermatte sichtbar ist. Dagegen wird der Einfluss von TGF- β 3 bei den PCL_{SK}-Alg-Fasermatten mit aminomodifizierten Nanopartikeln deutlicher. Bei der Probe mit TGF- β 3 kommt es verstärkt zu „Löchern“ in der Zellschicht auf der Fasermatte. Diese entstehen durch die Zusammenlagerung von einigen Zellen, wie es auf der Vergrößerung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme dieser Probe sichtbar wird. Ein solches Verhalten der Zellen ist ein Hinweis auf den Start der Chondrogenese, da für die Differenzierung der MSCs eine vorherige Aggregation und Kondensation der Zellen notwendig ist.^[295] Bei einer 3D-Kultivierung ist dieser Schritt nicht notwendig, da dort die Zellen schon kompakt in einem Pellet vorliegen.

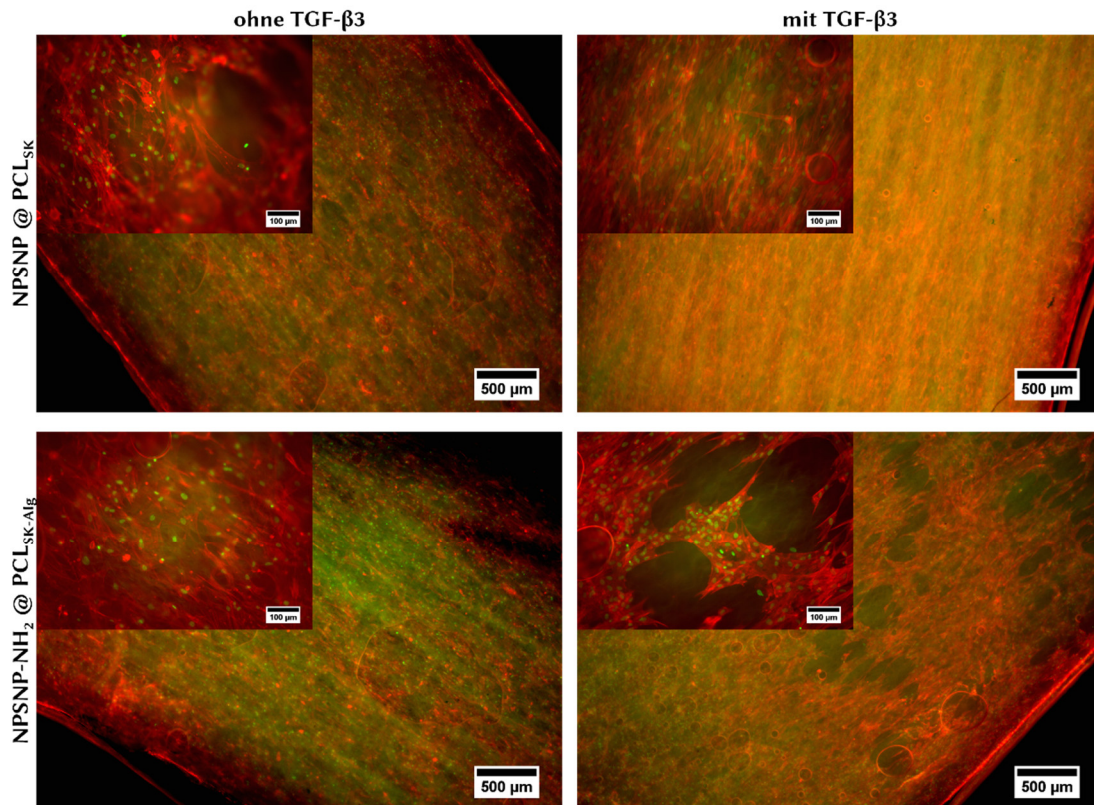


Abbildung 4.38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der MSCs nach einer Kultivierung von 28 d auf der Oberfläche von funktionalisierten PCL-Fasermatten (NPSNP @PCL_{SK} und NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK}-Alg) mit bzw. ohne TGF-β₃-Beladung. Die Zellkerne sind durch eine DAPI-Färbung gekennzeichnet, aber zur besseren Sichtbarkeit mit einem Bildbearbeitungsprogramm grün eingefärbt. Das Actin ist mittels Rhodamin-Färbung rot angefärbt.

Um jedoch quantitative Aussagen hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung der MSCs zu treffen, wurde die Genexpressionsanalyse bestimmter Markergene herangezogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für folgende Gene in Abbildung 4.39 dargestellt: COL2A1, ACAN, SOX9, COMP, ALPL und MMP13.

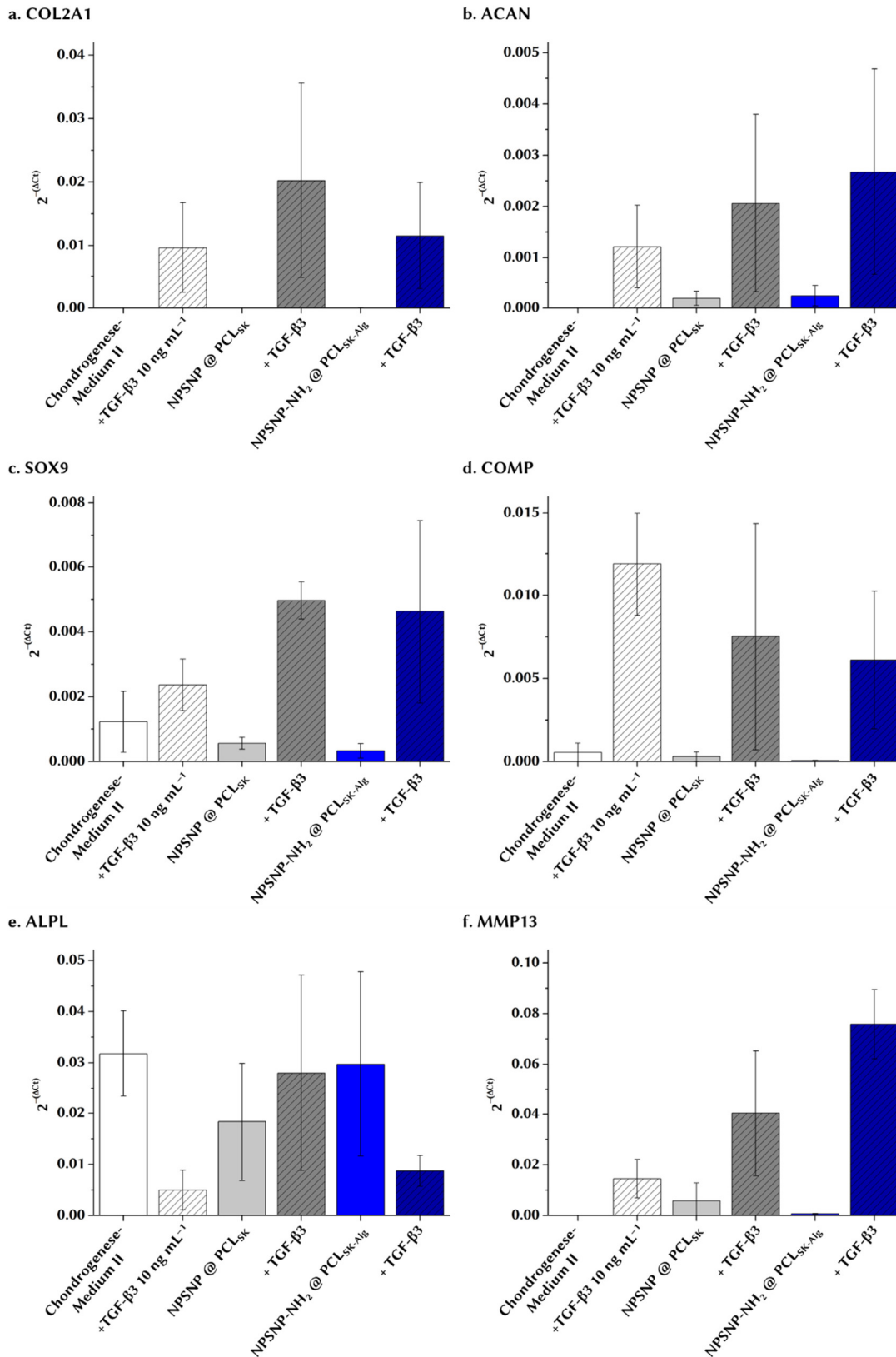


Abbildung 4.39: Untersuchungen zur Genexpression der Markergene COL2A1 (a), ACAN (b), SOX9 (c), COMP (d), ALPL (e) und MMP13 (f) mittels qRT-PCR. Die Untersuchungen erfolgten mit der RNA von MSCs, die auf der Oberfläche von unterschiedlich funktionalisierten Fasermatten (NPSNP @PCL_{sk} und NPSNP-NH₂ @ PCL_{sk}-Alg) mit bzw. ohne TGF-β₃-Beladung kultiviert wurden. Als Kontrolle wurde das Chondrogenese-Medium II mit und ohne einen TGF-β₃-Zusatz von 10 ng mL⁻¹ getestet.

Als erstes fällt beim Vergleich der absoluten Werte der jeweiligen Genexpression mit denen, die mit den TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln (s. Abbildung 4.30) bzw. mit den freigesetzten TGF- β 3-Mengen (s. Abbildung 4.33) erhalten werden konnten, auf, dass diese deutlich geringer sind. Teilweise liegt die Genexpression hier eine (z. B. bei ACAN und COMP) bis sogar zwei Größenordnungen (COL2A1) unter den Werten der vorherigen *in vitro*-Untersuchungen. Dies spiegelt sich auch in den Werten der Kontrollen wieder. Somit sind die Bedingungen für die Untersuchungen mit den Fasermatten womöglich nicht optimal gewählt. Einerseits kann es an einer zu gering eingesetzten Zellzahl liegen, denn durch eine Erhöhung der Zelldichte auf der Fasermatte könnte es zu einer schnelleren Zusammenlagerung der MSCs und damit zu einem früheren Start der Chondrogenese kommen. Dieser Aspekt wird durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bekräftigt, da schon hier nur vereinzelt eine Aggregation der Zellen beobachtet werden konnte. Andererseits könnte auch die Erhöhung der Kultivierungszeit eine Verbesserung liefern, da sich die Zellen nach den erhaltenen Ergebnissen anscheinend noch in einem frühen Stadium der Chondrogenese befinden. Die relativ geringen TGF- β 3-Mengen auf den Fasermatten (116 ng cm^{-2} für NPSNP @PCL_{SK} und 84 ng cm^{-2} für NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK-Alg}) sollten für einen chondrogenen Effekt ausreichen, zumal die MSCs aufgrund der Kultivierung auf der Fasermatte im direkten Kontakt zum Wachstumsfaktor stehen. Dass diese TGF- β 3-Mengen auch einen geringen chondrogenen Effekt zeigen, lässt sich anhand der geringfügig höheren Expression der Markergenen im Vergleich zu den Proben ohne TGF- β 3 bestätigen. Besonders die SOX9-Expression deutet einen chondrogenen Effekt beider TGF- β 3-beladenen Fasermatten an, da SOX9 als frühes Markergen in vergleichbaren Mengen wie bei den vorherigen *in vitro*-Untersuchungen exprimiert wurde.

Folglich lassen sich aufgrund des Optimierungsbedarfs der *in vitro*-Untersuchungen mit den funktionalisierten Fasermatten keine eindeutigen Rückschlüsse aus den Ergebnissen ziehen. Zumindest zeigen die Ergebnisse der Genexpression einen leichten Trend auf, dass die Fasermatten, die mit TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln funktionalisiert wurden, einen geringen chondrogenen Effekt auf die MSCs haben. Die gewünschten Gene, COL2A1, ACAN, SOX9 und COMP, werden bei diesen Proben etwas stärker exprimiert. Des Weiteren deuten die Untersuchungen darauf hin, dass die Problematik der Agglomeration im Falle der amino-modifizierten Nanopartikel keinen sichtbaren Einfluss auf die MSCs hat, da die Ergebnisse beider funktionalisierter Fasermatten vergleichbar sind. Trotzdem sollten die Ergebnisse dieser *in vitro*-Untersuchungen kritisch betrachtet werden und durch eine optimierte Wiederholung verifiziert werden.

4.3.9 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurden einige Erkenntnisse für die Entwicklung eines optimierten TGF- β 3-Freisetzungssystems gewonnen, insbesondere auch im Hinblick auf die spätere Anwendung am gradierten Implantat.

In Bezug auf die Immobilisierung des Wachstumsfaktors auf der Oberfläche der Silica-Nanopartikel konnten die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit BDNF bestätigt werden. Die Menge von 1 µg wurde nahezu vollständig auf die Oberfläche von 5 mg NPSNPs unabhängig von der Modifizierung immobilisiert. Dagegen hatte die Modifizierung einen starken Einfluss auf die Freisetzung des Proteins. In den dazugehörigen Freisetzungsexperimenten zeigten die amino-modifizierten Nanopartikel mit einem Propyl-Rest in der funktionellen Gruppe (NPSNP-NH₂) wiederum die vielversprechendsten Ergebnisse besonders bezüglich der insgesamt freigesetzten Menge. Mit 115 ng mg⁻¹ TGF-β₃ (58 % der ermittelten Immobilisierungsmenge) wurde aus diesen Nanopartikeln doppelt so viel freigesetzt wie aus den amino-modifizierten Nanopartikeln mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂), die die zweithöchsten TGF-β₃-Mengen im Untersuchungszeitraum von 77 d lieferten. Der Zeitraum von 77 d ist für die vorgesehene Anwendung am gradierten Implantat zur Wiederherstellung eines Sehnen-Knochen-Übergangs zwar nicht notwendig, da für eine vollständige Regeneration eine kontinuierliche TGF-β₃-Freisetzung von etwa 28 d – nach neuesten Erkenntnissen sogar von 14 d – ausreichen. Aus wissenschaftlicher Sicht ist die langfristige Freisetzung von TGF-β₃ von unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln jedoch von Interesse, da bis dato dieser Aspekt nicht untersucht wurde und in anderen Bereichen der Geweberegeneration von Vorteil sein könnte.

Sowohl die amino-modifizierten als auch die unmodifizierten Nanopartikel, jeweils beladen mit TGF-β₃, zeigten in den ersten *in vitro*-Untersuchungen einen deutlichen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von MSCs. Dieser konnte anhand der vergrößerten Zellpellets, des höheren GAG/DNA-Verhältnisses, aber auch durch eine erhöhte Genexpression von Markergenen, die auf die Differenzierung von reifen bzw. proliferierenden Chondrozyten hindeuten, identifiziert werden. Auch mit den freigesetzten TGF-β₃-Mengen konnten für beide Nanopartikelsorten ähnliche Effekte erzielt werden. Somit behält das TGF-β₃ nach der Immobilisierung auf der Nanopartikeloberfläche und der anschließenden Freisetzung seine biologische Aktivität bei und kann sie in den *in vitro*-Untersuchungen auf die MSCs entfalten. Neben dem indirekten Nachweis der biologischen Aktivität des TGF-β₃s, kann diese auch mit einem zellbasierten Assay (analog zum BRE-Luc-Assay für BMP-2)^[329] bestimmt werden. Dieser Aspekt ist noch Bestandteil der aktuellen Forschung der Forschergruppe FOR 2180 und kann in weiterführenden Arbeiten für die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse genutzt werden. Zusammenfassend zeigten die *in vitro*-Untersuchungen mit den TGF-β₃-beladenen Nanopartikeln und den freigesetzten TGF-β₃-Mengen keine eindeutige Tendenz hinsichtlich der Fragestellung, welches Freisetzungssystem sich im Hinblick auf die spätere Anwendung am besten eignet, zumal es sich um erste Untersuchungen handelte. Ein entscheidender Aspekt, der für die spätere Anwendung beachtet werden muss, ist das Herauszögern der Bildung von Knochenzellen in der chondrogenen Differenzierung der MSCs, die sich z. T. in den vorliegenden *in vitro*-Untersuchungen durch die Expression von osteogenen Markergenen andeutete. Eine Möglichkeit ist die Kultivierungszeit von 28 d auf die

besagten 14 d zu reduzieren, da die freigesetzten TGF- β 3-Mengen aus den unterschiedlichen Nanopartikeln für die Differenzierung der MSCs ausreichend zu sein scheinen.

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit war die Kombination der TGF- β 3-Freisetzungssysteme basierend auf den NPSNPs mit dem PCL-Scaffold, welches als Grundgerüst für das zu entwickelnde gradierte Implantat fungieren soll. Drei unterschiedlich modifizierte Nanopartikel wurden erfolgreich auf die Oberfläche der PCL-Fasermatte, die eine „*shish-kebab*“-Strukturierung bzw. eine zusätzliche Alginat-Schicht aufwies, aufgebracht. Den höchsten Massenanteil auf der Fasermatte lieferten die unmodifizierten Nanopartikel, mit denen bis zu 8 % erzielt werden konnten. Diese Nanopartikel zeigten auch eine homogenere Verteilung auf der Faser Oberfläche als die amino-modifizierten Nanopartikel, die zum größten Teil als größere Agglomerate vorlagen. Eine Möglichkeit die Agglomeration der Nanopartikel zu vermindern, wäre eventuell eine stärkere Ultraschall-Behandlung der Nanopartikel, bevor sie mit TGF- β 3 beladen und auf die Fasermatten aufgebracht werden. Zudem könnte die Funktionalisierung der PCL-Fasermatte unter anderen Bedingungen, insbesondere bei einem anderen pH-Wert, das Problem beseitigen. In den Arbeiten von Dr. Alexandra Satalov traten diese Schwierigkeiten nicht auf, indem die Funktionalisierung der PCL-Fasermatte bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt wurde.^[314] Allerdings sollten die Auswirkungen, die eine Veränderung des pH-Wertes mit sich bringt, beachtet und zusätzlich untersucht werden. Mit einer Gesamtmenge von 85 ng cm^{-2} über einen Zeitraum von 43 d konnten mit den PCL_{SK}-Fasermatten, die mit den unmodifizierten und TGF- β 3-beladenen Nanopartikeln funktionalisiert wurden, zwar die geringsten Freisetzungsmengen erzielt werden, jedoch stimmt diese Menge als einziges gut mit der theoretisch möglichen TGF- β 3-Menge (116 ng cm^{-2}) auf der Fasermatte überein. In den *in vitro*-Untersuchungen mit den Kompositen waren die Unterschiede zwischen den funktionalisierte Fasermatten (NPSNP @PCL_{SK} und NPSNP-NH₂ @ PCL_{SK}-Alg) mit TGF- β 3-Beladung marginal bzw. nicht nachweisbar, da beide Fasermatten einen geringen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der MSCs ausübten. Die Ergebnisse sind trotzdem vielversprechend, zumal der geringe Effekt eher mit nicht optimalen Bedingungen für die *in vitro*-Untersuchungen begründet werden kann. Dies ist nicht unüblich, da noch keine Erfahrungen zu diesem komplexen System gemacht wurden und dieses somit erst etabliert werden muss.

Zusammenfassend scheinen die unmodifizierten Nanopartikel auf Basis aller erhaltenen Ergebnisse die geeignetste Wahl für ein TGF- β 3-Freisetzungssystem zu sein, insbesondere in Hinblick auf die spätere Anwendung auf einem PCL-Scaffold. Denn trotz der relativ geringen Freisetzungsmengen zeigten die unmodifizierten Nanopartikel einzeln aber auch in Form eines Komposits mit der PCL-Fasermatte vielversprechende Ergebnisse in den *in vitro*-Untersuchungen. Obwohl auch die amino-modifizierten Nanopartikel in diesem Bereich vergleichbare Ergebnisse zeigten, ergab sich eine gewisse Problematik in Form der Agglomeration der Nanopartikel bei der Funktionalisierung der PCL-Fasermatten. Bei einer

Reduzierung der Agglomeration durch optimierte Bedingungen können aber auch diese Nanopartikel für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Ein großer Vorteil der amino-modifizierten Nanopartikel ist die kontinuierliche und langfristige TGF- β 3-Freisetzung mit deutlich höheren Freisetzungsmengen als von den unmodifizierten Nanopartikeln. Im Endeffekt ist dieser Aspekt für die hier angestrebte Anwendung zur Regeneration eines Sehnen-Knochen-Übergangs nach einer Ruptur in der Rotatorenmanschette nicht so entscheidend, jedoch kann er bei einer anderen Form der Geweberegeneration von Vorteil sein. TGF- β -Proteine sind in viele Prozesse der Geweberegeneration involviert, sodass sich eine Vielzahl von weiteren Anwendungsmöglichkeiten ergeben kann.^[55]

5 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) basierenden Freisetzungssystemen für die Wachstumsfaktoren BDNF und TGF- β 3. So wurden zunächst NPSNPs mit ausgesuchten Oberflächenmodifizierungen hergestellt, die verschiedene Wechselwirkungen zu den Wachstumsfaktoren ermöglichen. Im Falle des BDNFs konnte eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung mit amino-modifizierten Nanopartikeln erzielt werden, was sehr gut für die angestrebte Anwendung als Freisetzungssystem auf der Cochlea-Elektrode geeignet ist. In *in vitro*-Untersuchungen zeigten die freigesetzten BDNF-Mengen den erwünschten neuroprotektiven und in geringerem Maße neuroregenerativen Effekt auf die SGNs. In Hinblick auf die Anwendung als Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem müssen aber noch weitere Arbeiten zur Aufbringung auf die Implantatoberfläche folgen. Bei den Untersuchungen mit dem zweiten Wachstumsfaktor lieferten sowohl die unmodifizierten als auch die amino-modifizierten Nanopartikel die erforderlichen TGF- β 3-Mengen, die zu einer chondrogenen Differenzierung der MSCs führten. Bei der Funktionalisierung der PCL-Scaffolds mit den unterschiedlichen Nanopartikeln konnten jedoch vorwiegend die unmodifizierten Nanopartikel überzeugen, da sie den größten Massenanteil auf der Fasermatte ausmachten und homogen aufgebracht werden konnten. Des Weiteren zeigten diese Komposite auch eine erfolgreiche TGF- β 3-Freisetzung und gute Ergebnisse in den ersten *in vitro*-Untersuchungen zur chondrogenen Differenzierung von MSCs, sodass sie potentiell für die Anwendung auf dem gradierten Implantat geeignet sind. Neben diesen Erkenntnissen, die explizit für die jeweiligen Wachstumsfaktoren erzielt werden konnten und in den vorherigen Kapiteln 4.2.8 und 4.3.9 bereits detailliert beschrieben wurden, konnte auch generelles Wissen bezüglich der Verwendung von NPSNPs als Freisetzungssysteme für Wachstumsfaktoren generiert werden und gewisse Verfahrensweisen etabliert werden.

So konnten beispielsweise geeignete Bedingungen für die Immobilisierung und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren ermittelt werden. Die indirekt bestimmte Immobilisierungsmenge liegt für beide Wachstumsfaktoren mit $0.2 \mu\text{g mg}^{-1}$ deutlich unter der theoretisch möglichen Beladung (ca. $350 \mu\text{g mg}^{-1}$), wobei beachtet werden muss, dass viele Plätze auf den NPSNPs auch mit den vorhandenen BSA-Molekülen besetzt werden können. Dennoch konnte in den *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass die freigesetzten Mengen an BDNF bzw. TGF- β 3 für eine positive Antwort der jeweiligen Zellen ausreichend waren. Nichtsdestoweniger bieten diese Ergebnisse die Möglichkeit, dass die Immobilisierungsmenge der beiden Wachstumsfaktoren auf den Nanopartikeln durch die Erhöhung der Inkubationskonzentration noch weiter gesteigert werden kann und somit eventuell stärkere Effekte hervorgerufen werden können, falls dies anwendungsspezifisch erwünscht ist. Des Weiteren sollte der Einfluss vom BSA in zukünftigen Untersuchungen verifiziert werden, indem ähnliche Untersuchungen ohne BSA durchgeführt werden, zumal

BSA im Körper nicht vorkommt. Angesichts der erhaltenen Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen kann aber festgehalten werden, dass die BSA-Moleküle keine negativen Einflüsse ausüben. Alle Experimente mit den Wachstumsfaktoren erfolgten in PBS, einem Medium, welches physiologische Bedingungen simuliert und eine erste Option für solche Untersuchungen darstellt. Jedoch sollten für den weiteren Verlauf auch Medien in Betracht gezogen werden, die die Körperflüssigkeiten in den jeweiligen Anwendungsbereichen besser simulieren. Beispielsweise können weitere Untersuchungen mit BDNF in einer aCSF-Lösung (*artificial cerebrospinal fluid*) erfolgen, da die Zusammensetzung der Perilymphe ähnelt.^[330] Mithilfe der Freisetzungsexperimente konnten viele Erkenntnisse für weitere Untersuchungen gewonnen werden. Zunächst zeigten die Nanopartikel in Abhängigkeit ihrer Modifizierung deutliche Unterschiede hinsichtlich der Freisetzung des jeweiligen Wachstumsfaktors. Eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung konnte in den beiden hier untersuchten Fällen mit den amino-modifizierten Nanopartikeln (NPSNP-NH₂) erzielt werden. Ähnlich gute Ergebnisse zeigten die amino-modifizierten Nanopartikel auch schon in vorherigen Studien mit BMP-2.^[15,314] Da die Wasserstoffbrückenbindungen generell bei den Wechselwirkungen zwischen der Nanopartikeloberfläche und dem Protein nur eine untergeordnete Rolle spielen und die elektrostatischen Wechselwirkungen aufgrund der unterschiedlichen IEPs der Wachstumsfaktoren unterschiedliche Auswirkungen haben, kommt hier offensichtlich den hydrophoben Interaktionen eine wesentliche Rolle zu. Eine hydrophobe Funktionalität auf der Nanopartikeloberfläche kann bei den amino-modifizierten NPSNPs auch verstärkt vorliegen, da eine Homokondensation besonders durch Amino-Gruppen katalysiert wird und sich somit größere Aggregate der Organosilane auf der Oberfläche ablagern können, die angereicherte hydrophobe Funktionen enthalten. Bei den Freisetzungsexperimenten mit TGF-β3 wurden zusätzliche Untersuchungen mit amino-modifizierten Nanopartikeln mit längerer Alkylkette (NPSNP-hexyl-NH₂) durchgeführt. Diese führten zu einer vergleichbaren kontinuierlichen Freisetzung, aber mit deutlich geringeren Freisetzungsmengen. Anhand der erhaltenen Ergebnisse scheinen somit die amino-modifizierten Nanopartikel mit einer Propyl-Gruppe in der funktionellen Gruppe die geeignetste Modifizierung in Bezug auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu sein. Wenn die hydrophoben Wechselwirkungen entscheidend sind, wäre grundsätzlich auch die Modifizierung der Nanopartikel mit unfunktionalisierten Alkylresten, z. B. Propylresten, denkbar. Die propyl-modifizierten Nanopartikel lassen sich jedoch angesichts ihrer stark hydrophoben Oberflächenbeschaffenheit schlecht in ein wässriges Medium transferieren und können somit in der Anwendung zu Schwierigkeiten führen. Dementsprechend stellt eine *post-grafting*-Modifizierung der Nanopartikel mit zwei unterschiedlichen Trialkoxysilanen (z. B. 3-Aminopropyl- und Propyltrimethoxysilan) eine vielversprechende Alternative dar, wobei die Hydrophobizität durch die Amino-Gruppen verringert und gleichzeitig das Verhältnis Propyl-Gruppe zu Amino-Gruppe erhöht wird. Im Gegensatz zu den amino-modifizierten Nanopartikeln konnten aus den sulfonsäure-modifizierten

Nanopartikeln trotz der vorhandenen Propyl-Gruppe nur geringe Mengen der Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen Funktionsverlust der Proteine in Anwesenheit der sulfonsäure-modifizierten Nanopartikel hin. Aufgrund der stark sauren Gruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel kann es zur Denaturierung der Proteine gekommen sein.^[218,323] Um diese Aussage zu verifizieren, sollten Untersuchungen mit ähnlich stark sauren Gruppe (z. B. Carboxyl-Gruppen) folgen.

Neben den Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Nanopartikeloberfläche sind für die Freisetzung auch die Stabilität der Nanopartikel und der Proteine unter den gegebenen Bedingungen von Bedeutung. Die entsprechenden Untersuchungen an NPSNPs zeigten, dass die un- und amino-modifizierten Nanopartikel unter den Freisetzungsbedingungen gewisse Degradationserscheinungen aufweisen. Die anhand von TEM-Aufnahmen ermittelte Größenabnahme und Verformung der Nanopartikel ist auf die Auflösung der Silica-Nanopartikel in wässrigem Medium zurückzuführen. Diese Auflösung scheint aber unabhängig von der Modifizierung der Nanopartikel zu sein und sollte daher einen vergleichbaren Einfluss auf die Freisetzung aller Nanopartikel haben. Wie viel Protein immunologisch aktiv ist und im ELISA nachgewiesen wird, hängt damit stark von der Stabilität der Proteine unter den gegebenen Bedingungen ab. Anhand der Degradationsuntersuchungen mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren konnte festgestellt werden, dass die BDNF-Moleküle einem stärkeren Stabilitätsverlust im PBS-Medium unterliegen als die TGF- β 3-Moleküle. Auch in den Freisetzungsexperimenten wird dies offensichtlich, da die nachgewiesenen freigesetzten TGF- β 3-Mengen deutlich höher sind als die entsprechenden BDNF-Mengen. Das unterschiedliche Verhalten der Wachstumsfaktoren kann auf verschiedene Aspekte zurückgeführt werden. Zum einen weisen die Wachstumsfaktoren unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten und -ladungen auf, die nicht nur Auswirkungen auf das Verhalten in wässrigem Medium haben können, sondern auch in gewisser Weise den Adsorptions-/Desorptionsprozess beeinflussen. Des Weiteren kann die Anwesenheit der BSA-Moleküle einen unterschiedlichen Einfluss auf die Stabilität der Proteine haben. Zudem kann aber auch die generelle Proteinstabilität der BDNF-Moleküle geringer sein als die der TGF- β 3-Moleküle. Inwieweit welcher Aspekt die Stabilität des jeweiligen Wachstumsfaktors beeinflusst, kann anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht geklärt werden. Hierfür müssen weiterführende Untersuchungen folgen, beispielsweise mit Computer-gestützten Simulationen, mithilfe derer Aussagen über den Adsorptions-/Desorptionsprozess auf molekularer Ebene getroffen werden können.^[221]

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich Freisetzungssysteme für zwei Wachstumsfaktoren basierend auf NPSNPs etabliert werden, die ihre gewünschte Wirkung für die jeweilige Anwendung in den durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen unter Beweis stellten. Beim Betrachten der bisherigen Forschungsarbeiten, die bezüglich der Verwendung von NPSNPs als Freisetzungssysteme für Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden, lässt sich festhalten, dass trotz der

Vorteile, die NPSNPs in diesem Bereich nur wenig Beachtung erhalten haben. Zudem wurden vor allem die unmodifizierten Nanopartikel in unterschiedlichen Größen als Freisetzungssystem verwendet und unterschiedlich modifizierte Nanopartikel kaum untersucht. Beispiele hierfür sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Übersicht über bisherige Berichte zu auf NPSNPs basierenden Freisetzungssystemen für Wachstumsfaktoren.

Wachstumsfaktor	Wirkung	Freisetzungssystem	Lit.
bFGF	Wundheilung und Angiogenese	<i>In situ</i> -Beladung der NPSNPs (≈ 60 nm)	[101]
		Multifunktionalisierte, Heparin-modifizierte NPSNPs (90–140 nm)	[331]
BMP-2	Osteogene Differenzierung	Amino-modifizierte NPSNPs (40–50 nm)	[15,314]
	Knochenregeneration	NPSNPs (100–200 nm) mit Chitosan-Schicht	[332]
BDNF	Neuroprotektiver Effekt auf SGNs	Mikropartikel (≈ 500 μm) basierend auf NPSNPs	[102,268,333]
		Amino-modifizierte NPSNP (40–50 nm)	[13]
EGF	Zielgerichtete Krebstherapie	Kov. Anbindung an hohle, amino-modifizierte NPSNPs (≈ 120 nm)	[334]
NGF	Nervenregeneration	NPSNPs (≈ 300 nm) mit größeren Poren (≈ 15 nm) im Kollagen-Hydrogel	[112]
	Neuroprotektion und -regeneration	Amino-modifizierte NPSNPs (≈ 65 nm)	[16]
VEGF	Angiogenese	NPSNPs (≈ 200 nm) im Kollagen-Scaffold	[17]

Somit liefert die vorliegende Arbeit, in der unterschiedliche Modifizierungen der NPSNPs und ihrer Auswirkungen auf die Freisetzung von zwei unterschiedlichen Wachstumsfaktoren untersucht wurden, wichtige Erkenntnisse in diesem Forschungsgebiet, welche größtenteils konsistent sind und somit auch auf weitere Wachstumsfaktoren angewendet werden können. Beispielsweise kommen die

NPSNPs als Freisetzungssysteme für weitere neurotrophe Faktoren, wie z. B. NT3 oder NGF in Frage, die für die Anwendung auf der Cochlea-Elektrode interessant sein können. Für die Arbeiten der Forschergruppe FOR 2180 ist neben dem BMP-2 und dem TGF- β 3, für die in einer vorherigen Arbeit^[314] bzw. in dieser Arbeit bereits Freisetzungssysteme etabliert wurden, der Transkriptionsfaktor Smad8 (L+MH2) ein weiterer entscheidender Faktor. Anhand der erhaltenen Erkenntnisse sollte die Etablierung eines Freisetzungssystems für ein jeweils erwünschtes Protein schnell generierbar sein, wobei der Aspekt der Stabilität des jeweiligen Biomoleküls unter den gegebenen Bedingungen berücksichtigt werden muss, wie es die unterschiedlichen nachgewiesenen Stabilitäten von BDNF und TGF- β 3 gezeigt haben.

Ein zusätzlicher Vorteil, der sich bei der Verwendung von NPSNPs ergibt, ist das vorhandene Porensystem, welches für die Immobilisierung der Wachstumsfaktoren aufgrund von deren Größe nicht belegt werden kann. Infolgedessen können zusätzlich zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf die äußere Oberfläche weitere sogenannte *small molecule drugs* in die Poren der Nanopartikel eingelagert werden. Während die Freisetzung von Wachstumsfaktoren von NPSNPs bisher nur gering erforscht wurde, gibt es dagegen zahlreiche Konzepte und Beispiele für die kontrollierte Freisetzung von solchen niedermolekularen Wirkstoffen.^[11,335] Hierbei kann es sich um Wirkstoffe handeln, die den Effekt des Wachstumsfaktors verstärken oder eine allgemeinere Wirkung, z. B. eine entzündungshemmende Wirkung, ausüben. Im Falle des BDNFs konnte in vorherigen Studien bereits erfolgreich eine verstärkte Wirkung auf die SGNs gezeigt werden, wenn zusätzlich zum BDNF der Wirkstoff Rolipram im Medium vorhanden war.^[14] Die Kombination von TGF- β 3 mit *small molecule drugs* wurde zwar noch nicht beschrieben, jedoch gibt es eine Vielzahl von Molekülen, die die chondrogene Differenzierung von MSCs fördern können und damit für die Kombination mit TGF- β 3 in Frage kommen. Dazu gehören u. a. das Kartogenin und das Dexamethason,^[336] welches zusätzlich eine entzündungshemmende Wirkung^[337] aufweist und die Bildung von fibrösem Gewebe^[338] mindern kann. Diese Eigenschaft kann beim Einsatz auf Implantaten von Vorteil sein. Die Kombination mit *small molecule drugs* ist somit ein interessanter Aspekt, der in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden sollte und die Effizienz der in dieser Arbeit etablierten Freisetzungssysteme steigern könnte.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, die diese Arbeit bezüglich der Entwicklung von Freisetzungssystemen für unterschiedliche Wachstumsfaktoren liefert, soll an dieser Stelle auch erwähnt werden, dass die Untersuchungen mit den Wachstumsfaktoren einige Probleme und Herausforderungen mit sich bringen. Zum einen sind die Untersuchungen angesichts der mühsamen Gewinnung von Wachstumsfaktoren sehr kostspielig. Des Weiteren bedarf die Handhabung mit Wachstumsfaktoren einer gewissen Erfahrung, da es sich bei Proteinen generell um sensible Moleküle handelt, die unter ungeeigneten Bedingungen schnell denaturieren können. Angesichts der komplexen Struktur ist das Verhalten der Wachstumsfaktoren schwer vorhersagbar und durch viele äußere Bedingungen beeinflussbar. Daher sollten für zukünftige Arbeiten auch Alternativen zu Wachstumsfaktoren berücksichtigt werden. Dazu

gehören einerseits die bereits erwähnten *small molecule drugs*, die teilweise Wirkungen aufweisen, die denen der Wachstumsfaktoren ähneln,^[336] aber auch *peptide mimetics*, bei denen es sich um niedermolekulare Verbindungen handelt, die die wesentlichen strukturellen Elemente eines Wachstumsfaktors zur Bindung an den jeweiligen Rezeptor aufweisen. Durch die Bindung an den Rezeptor können sie die Signalkaskade für den jeweiligen Wachstumsfaktor starten.^[40,339] Beispiele für solche Verbindungen sind die LM22A-4-Moleküle, die an den TrkB-Rezeptor (BDNF) binden können.^[340] Aufgrund der hervorragenden Eigenschaften der NPSNPs sollten sich diese Nanopartikel auch als Basis für die Konstruktion von Freisetzungssystemen für solche Moleküle eignen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] <https://www.sueddeutsche.de/gesundheit/chirurgie-hunderttausende-implantate-pro-jahr-1.2908882-5>, Zugriff am **20.08.2018**.
- [2] T. Lenarz, Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen, Medizinische Hochschule Hannover, *Forschungsbericht SFB 599* **2014**, 767–771.
- [3] T. Stöver, T. Lenarz, *GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.* **2009**, 8, 1–22.
- [4] K. Lee, E. A. Silva, D. J. Mooney, *J. R. Soc. Interface* **2011**, 8, 153–170.
- [5] K. H. Sprugel, J. M. McPherson, A. W. Clowes, R. Ross, *Am. J. Pathol.* **1987**, 129, 601–613.
- [6] R. R. Chen, D. J. Mooney, *Pharm. Res.* **2003**, 20, 1103–1112.
- [7] T. N. Vo, F. K. Kasper, A. G. Mikos, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 1292–1309.
- [8] J. W. Park, S. R. Hwang, I.-S. Yoon, *Molecules* **2017**, 22, 1259–1278.
- [9] P. Koria, *Biodrugs* **2012**, 26, 163–175.
- [10] Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang, *et al.*, *Nanomedicine: NBM* **2015**, 11, 313–327.
- [11] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 1504–1534.
- [12] K. Bukara, L. Schueller, J. Rosier, F. Kiekens, *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, 108, 220–225.
- [13] N. Schmidt, J. Schulze, D. P. Warwas, N. Ehlert, T. Lenarz, A. Warnecke, P. Behrens, *PLoS One* **2018**, 13, e0194778.
- [14] K. Kranz, A. Warnecke, T. Lenarz, M. Durisin, V. Scheper, *PLoS One* **2014**, 9, e92157.
- [15] A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, P. Behrens, *RSC Adv.* **2013**, 3, 24222–24230.
- [16] B. Sun, A. Taing, H. Liu, G. Nie, J. Wang, Y. Fang, L. Liu, Y. Xue, J. Shi, Y.-P. Liao, *et al.*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, 16, 2390–2393.
- [17] J.-H. Kim, T.-H. Kim, M. S. Kang, H.-W. Kim, *Biomed Res. Int.* **2016**, 2016, 9676934.
- [18] C. Zuccato, E. Cattaneo, *Nat. Rev. Neurol.* **2009**, 5, 311–322.

- [19] T. Lenarz, *Cochlea-Implantat*, Springer Verlag, Berlin, **1998**.
- [20] T. Lenarz, H.-G. Boenninghaus, *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde*, Springer Verlag, Berlin, **2012**.
- [21] W. Xie, K. Zhang, B. Cui, *Integr. Biol.* **2012**, 4, 953–960.
- [22] <https://www.gradierte-implantate.de/fragestellung>, Zugriff am **30.08.2018**.
- [23] D. Kovacevic, A. J. Fox, A. Bedi, L. Ying, X.-H. Deng, R. F. Warren, S. A. Rodeo, *Am. J. Sport. Med.* **2011**, 2011, 811–819.
- [24] T.-Y. Wang, K. A. F. Bruggeman, R. K. Sheean, B. J. Turner, D. R. Nisbet, C. L. Parish, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 15044–15051.
- [25] H. Zhang, F. Migneco, C.-Y. Lin, S. J. Hollister, *Tissue Eng. Part A* **2010**, 16, 3441–3448.
- [26] H. Schliephake, in *Chirurgische Grundlagen* (Eds.: N. Schwenzer, M. Ehrenfeld), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2008**, p. 370 ff.
- [27] C. Wagener, O. Müller, *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, Klinische Aspekte*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2009**.
- [28] J. E. Babensee, L. V. McIntire, A. G. Mikos, *Pharm. Res.* **2000**, 17, 497–504.
- [29] B. P. Tayalia, D. J. Mooney, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3269–3285.
- [30] D. Santoli, Y. C. Yang, S. C. Clark, B. L. Kreider, D. Caracciolo, G. Rovera, *J. Immunol.* **1987**, 139, 3348–3354.
- [31] L. J. Murphy, *J. Mol. Endocrinol.* **1998**, 21, 97–107.
- [32] Y.-A. Barde, D. Edgar, H. Thoenen, *EMBO J.* **1982**, 1, 549–553.
- [33] R. Levi-Montalcini, *Science* **1987**, 237, 1154–1162.
- [34] P. C. Maisonpierre, L. Belluscio, S. Squinto, N. Y. Ip, M. E. Furth, R. M. Lindsay, G. D. Yancopoulos, *Science* **1990**, 247, 1446–1451.
- [35] F. Hallböök, C. F. Ibanez, H. Persson, *Neuron* **1991**, 6, 845–858.
- [36] L. R. Berkemeier, J. W. Winslow, D. R. Kaplan, K. Nikolics, D. V Coeddel, A. Rosenthal, *Neuron* **1991**, 7, 857–866.
- [37] R. Götz, R. Köster, C. Wlankert, F. Raulft, F. L. Li, M. Scharltt, H. Thoenen, *Nature* **1994**, 372, 266–269.
- [38] G. R. Lewin, Y.-A. Barde, *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, 19, 289–317.

- [39] N. K. Mohtaram, A. Montgomery, S. M. Willerth, *Biomed. Mater.* **2013**, *8*, 22001–22013.
- [40] P. D. O’Leary, R. A. Hughes, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25738–25744.
- [41] D. K. Binder, H. E. Scharfman, *Growth Factors* **2004**, *22*, 123–131.
- [42] A. Buttstedt, F. Paoletti, E. Schwarz, *BIOSpektrum* **2011**, *2*, 150–153.
- [43] C. Laske, G. Eschweiler, *Nervenarzt* **2006**, *77*, 523–537.
- [44] R. C. Robinson, C. Radziejewski, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *Biochem.* **1995**, *34*, 4139–4146.
- [45] R. C. Robinson, C. Radziejewski, G. Spraggon, J. Greenwald, M. R. Kostura, L. D. Burtnick, D. I. Stuart, S. Choe, E. Y. Jones, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2589–2597.
- [46] N. Q. McDonald, R. Lapatto, J. Murray-Rust, J. Gunning, A. Wlodawer, T. L. Blundell, *Nature* **1991**, *354*, 411–414.
- [47] M. M. Pakulska, I. Elliott Donaghue, J. M. Obermeyer, A. Tuladhar, C. K. McLaughlin, T. N. Shendruk, M. S. Shoichet, *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600519.
- [48] N. Q. McDonald, M. V. Chao, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19669–19672.
- [49] S. J. Allen, J. J. Watson, D. K. Shoemark, N. U. Barua, N. K. Patel, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 155–175.
- [50] M. Lommatzsch, A. Braun, A. Mannsfeldt, V. A. Botchkarev, N. V Botchkareva, R. Paus, A. Fischer, G. R. Lewin, H. Renz, *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1183–1193.
- [51] M. Barbacid, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, *7*, 148–155.
- [52] M. Ockel, Y.-A. Barde, *Neuroforum* **1995**, *3*, 31–35.
- [53] D. Mahadeo, L. Kaplan, M. V Chaos, B. L. Hempsteadon, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6884–6891.
- [54] C. Géral, A. Angelova, S. Lesieur, *Pharmaceutics* **2013**, *5*, 127–167.
- [55] J. Massagué, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1990**, *6*, 597–641.
- [56] N. Oshimori, E. Fuchs, *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 751–764.
- [57] L. Kubiczkova, L. Sedlarikova, R. Hajek, S. Sevcikova, *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 1–24.
- [58] D. M. Kingsley, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 133–146.
- [59] M. Böttner, K. Kriegstein, K. Unsicker, *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 2227–2240.

- [60] R. K. Assoians, A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller, M. B. Sporn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 7155–7160.
- [61] R. Derynck, P. B. Lindquist, A. Lee, D. Wen, J. Tamm, J. L. Graycar, L. Rhee, A. J. Mason, D. A. Miller, R. J. Coffey, *et al.*, *EMBO J.* **1988**, *7*, 3737–3743.
- [62] D. A. Cox, *Cell Biol. Int.* **1995**, *19*, 357–371.
- [63] P. R. E. Mittl, J. P. Priestle, D. A. Cox, G. McMaster, N. Cerletti, M. G. Grutter, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1261–1271.
- [64] J. Pellaud, U. Schote, T. Arvinte, J. Seelig, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7699–7704.
- [65] A. Jen, K. Madörin, K. Vosbeck, T. Arvinte, H. P. Merkle, *J. Control. Release* **2002**, *78*, 25–34.
- [66] <https://www.rcsb.org/structure/1TGK>, Zugriff am **12.08.2018**.
- [67] J. Massagué, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 616–630.
- [68] S. Frey, Faltungshelferproteine des endoplasmatischen Retikulums und ihr Einfluss auf die Faltung und Aktivität des monoklonalen Antikörpers MAK33, Dissertation, Technische Universität München, **2006**.
- [69] L. O. Narhi, R. Rosenfeld, J. Talvenheimo, S. J. Prestrelski, T. Arakawa, J. W. Lary, C. G. Kolvenbach, R. Hecht, T. Boone, J. A. Miller, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13309–13317.
- [70] J. H. Waterborg, in *Protein Protocoll Handbook* (Ed.: J.M. Walker), Humana Press, Totowa, **2002**, p. 7 ff.
- [71] C. V Sapan, R. L. Lundblad, N. C. Price, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 99–108.
- [72] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
- [73] N. Kruger, in *Protein Protocoll Handbook* (Ed.: J.M. Walker), Humana Press, Totowa, **2002**, p. 15 ff.
- [74] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [75] J. M. Walker, in *Protein Protocoll Handbook* (Ed.: J.M. Walker), Humana Press, Totowa, **2002**, p. 11 ff.
- [76] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- [77] E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochem.* **1971**, *8*, 871.

- [78] R. M. Lequin, *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2415–2418.
- [79] <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>, Zugriff am **15.08.2018**.
- [80] <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1461/eine-einfuehrung-in-die-elisa-methode-teil-1/>, Zugriff am **15.08.2018**.
- [81] N. Adachi, K. Kohara, T. Tsumoto, *BMC Neurosci.* **2005**, *6*, 1–10.
- [82] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [83] G. Zhang, S. Zheng, H. Liu, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3405–3417.
- [84] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855–866.
- [85] M. Modesti, in *Single Molecule Analysis* (Eds.: E.J.G. Peterman, G.J.L. Wuite), Humana Press, Totowa, **2011**, p. 101 ff.
- [86] B. Cui, C. Wu, L. Chen, A. Ramirez, E. L. Bearer, W.-P. Li, W. C. Mobley, S. Chu, *PNAS* **2007**, *104*, 13666–13671.
- [87] A. J. Reynolds, I. A. Hendry, *Brain Res. Protoc.* **1999**, *3*, 308–312.
- [88] J. Roth, *J. Histochem. Cytochem.* **1982**, *30*, 691–696.
- [89] S. P. Baldwin, W. M. Saltzman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *33*, 71–86.
- [90] J. L. Cleland, E. T. Duenas, A. Park, A. Daugherty, J. Kahn, J. Kowalski, A. Cuthbertson, *J. Control. Release* **2001**, *72*, 13–24.
- [91] J. M. Embil, M. K. Nagai, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2002**, *2*, 211–218.
- [92] J. M. Smiell, T. J. Wieman, D. L. Steed, B. H. Perry, A. R. Sampson, B. H. Schwab, *Wound Repair Regen.* **1999**, *7*, 335–346.
- [93] W. F. McKay, S. M. Peckham, J. M. Badura, *Int. Orthop.* **2007**, *31*, 729–734.
- [94] J. E. Phillips, C. A. Gersbach, A. J. Garcia, *Biomater.* **2007**, *28*, 211–229.
- [95] G. Pelled, A. Ben-Arav, C. Hock, D. G. Reynolds, C. Yazici, Y. Zilberman, Z. Gazit, H. Awad, D. Gazit, E. M. Schwarz, *Tissue Eng. Part B* **2010**, *16*, 13–20.
- [96] X. Chen, M. Katakowski, Y. Li, D. Lu, L. Wang, L. Zhang, J. Chen, Y. Xu, S. Gautam, A. Mahmood, *et al.*, *J. Neurosci. Res.* **2002**, *69*, 687–691.
- [97] J. M. Mason, A. S. Breitbart, M. Barcia, R. G. Pergolizzi, D. A. Grande, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2000**, *379*, 171–178.

- [98] K. Partridge, X. Yang, N. M. P. Clarke, Y. Okubo, K. Bessho, W. Sebald, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, R. O. C. Oreffo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 144–152.
- [99] H. Peng, V. Wright, A. Usas, B. Gearhart, H.-C. Shen, J. Cummins, J. Huard, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 751–759.
- [100] A. S. Breitbart, D. A. Grande, J. Laser, M. Barcia, D. Porti, S. Malhotra, A. Kogon, R. T. Grant, J. M. Mason, *Ann. Plast. Surg.* **2001**, *46*, 555–562.
- [101] J. Zhang, L.-M. Postovit, D. Wang, R. B. Gardiner, R. Harris, M. M. Abdul, A. A. Thomas, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 1297–1302.
- [102] Y. Wang, A. K. Wise, J. Tan, J. W. Maina, R. K. Shepherd, F. Caruso, *Small* **2014**, 4244–4248.
- [103] J.-S. Kim, *J. Pharm. Investig.* **2016**, *46*, 387–392.
- [104] C. Alemdaroglu, Z. Degim, N. Celebi, M. Sengezer, M. Alömeroglu, A. Nacar, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *85*, 271–283.
- [105] M. Ye, S. Kim, K. Park, *J. Control. Release* **2010**, *146*, 241–260.
- [106] P. C. Bessa, R. Machado, S. Nürnberger, D. Dopler, A. Banerjee, A. M. Cunha, J. C. Rodríguez-Cabello, H. Redl, M. Van Griensven, R. L. Reis, *et al.*, *J. Control. Release* **2010**, *142*, 312–318.
- [107] Y.-C. Fu, H. Nie, M.-L. Ho, C.-K. Wang, C.-H. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 996–1006.
- [108] H. Fan, H. Tao, Y. Wu, Y. Hu, Y. Yan, Z. Luo, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2010**, *95*, 982–992.
- [109] J. J. Yoon, H. J. Chung, H. J. Lee, T. G. Park, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2006**, *79*, 934–942.
- [110] L. Luca, A.-L. Rougemont, B. H. Walpoth, L. Boure, A. Tami, J. M. Anderson, O. Jordan, R. Gurny, *J. Biomed. Mater. Res.* **2011**, *96*, 66–74.
- [111] J. Lee, W. Il Choi, G. Tae, Y. H. Kim, S. S. Kang, S. E. Kim, S.-H. Kim, Y. Jung, S. H. Kim, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 244–257.
- [112] J. H. Lee, J.-H. Park, M. Eltohamy, R. Perez, E.-J. Lee, H.-W. Kim, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 24202–24214.
- [113] T. P. Richardson, M. C. Peters, A. B. Ennett, D. J. Mooney, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1029–1034.
- [114] S.-H. Wu, C.-Y. Mou, H.-P. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3862–3875.

- [115] R. A. Garcia-Munoz, V. Morales, M. Linares, B. Rico-Oller, *Langmuir* **2014**, *30*, 881–890.
- [116] J. Shi, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2139–2181.
- [117] A. Walcarius, L. Mercier, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4478–4511.
- [118] F. Hoffmann, M. Fröba, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 608–620.
- [119] J. Gañán, S. Morante-Zarcero, D. Pérez-Quintanilla, I. Sierra, *Microchem. J.* **2014**, *114*, 53–58.
- [120] D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcero, I. Sierra, *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *414*, 14–23.
- [121] S. Gandhi, K. Thandavan, B.-J. Kwon, H.-J. Woo, S. S. Yi, H. S. Lee, J. H. Jeong, K. Jang, D. S. Shin, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 5953–5962.
- [122] B. J. Scott, G. Wirnsberger, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3140–3150.
- [123] S. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *117*, 1–9.
- [124] G. V Deodhar, M. L. Adams, B. G. Trewyn, *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, e1600408.
- [125] H. Rao, X. Wang, X. Du, Z. Xue, *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 2789–2812.
- [126] X. Qiu, S. Han, Y. Hu, M. Gao, H. Wang, *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 1493–1501.
- [127] J. L. Vivero-Escoto, R. C. Huxford-Phillips, W. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2673–85.
- [128] M. Liong, J. Lu, M. Kovichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi, J. I. Zink, *ACS Nano* **2008**, *2*, 889–896.
- [129] M. Le Page, R. Beau, J. Duchene, *Porous silica particles containing a crystallized phase and method*, **1970**, US Patent 3,493,341.
- [130] H. Biegler, G. Kallrath, *Process for producing silica in the form of hollow spheres*, **1968**, US Patent 3,383,172.
- [131] V. Chiola, J. E. Ritsko, D. Clarence, *Process for producing low-bulk density silica*, **1971**, US Patent 3,556,725.
- [132] T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, C. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 988–992.
- [133] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710–712.

- [134] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T.-W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843.
- [135] M. Thommes, K. Kaneko, A. V Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 1051–1069.
- [136] J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. H. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, K. K. Unger, *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1739–1758.
- [137] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3290–3328.
- [138] T. Asefa, Z. Tao, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265–2284.
- [139] S. C. Nunes, P. Almeida, V. de Zea Bermudez, in *Sol-Gel Handbook* (Eds.: D. Levy, M. Zayat), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2015**, pp. 575–580, 1309 ff.
- [140] G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Göltner, *Nature* **1995**, *378*, 366–368.
- [141] C. G. Göltner, S. Henke, M. C. Weissenberger, M. Antonietti, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 613–616.
- [142] A. Steel, S. W. Car, M. W. Anderson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1571–1572.
- [143] A. Monnier, F. Schuth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, *et al.*, *Science* **1993**, *261*, 1299–1303.
- [144] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7924–7937.
- [145] M. Grün, I. Lauer, K. K. Unger, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 254–257.
- [146] F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung, C.-Y. Mou, *Small* **2009**, *5*, 1408–1413.
- [147] H.-P. Lin, C.-P. Tsai, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 1092–1093.
- [148] Q. Cai, Z.-S. Luo, W.-Q. Pang, Y.-W. Fan, X.-H. Chen, F.-Z. Cui, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 258–263.
- [149] C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau, S. Mann, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 649–652.
- [150] K. Suzuki, K. Ikari, H. Imai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 462–463.
- [151] Z.-A. Qiao, L. Zhang, M. Guo, Y. Liu, Q. Huo, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3823–3829.

- [152] A. B. Fuertes, P. Valle-Vigón, M. Sevilla, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *349*, 173–180.
- [153] M.-H. Kim, H.-K. Na, Y.-K. Kim, S.-R. Ryoo, H. S. Cho, K. E. Lee, H. Jeon, R. Ryoo, D.-H. Min, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3568–3576.
- [154] A. B. D. Nandiyanto, S. G. Kim, F. Iskandar, K. Okuyama, *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *120*, 447–453.
- [155] J. Hu, M. Chen, L. Wu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5472–5491.
- [156] C.-H. Lin, J.-H. Chang, Y.-Q. Yeh, S.-H. Wu, Y.-H. Liu, C.-Y. Mou, *Nanoscale* **2015**, *7*, 9614–9626.
- [157] C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 579–585.
- [158] S. Williams, A. Neumann, I. Bremer, Y. Su, G. Dräger, C. Kasper, P. Behrens, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 1–16.
- [159] M. H. Lim, A. Stein, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3285–3295.
- [160] T. Vallant, H. Brunner, U. Mayer, H. Hoffmann, T. Leitner, R. Resch, G. Friedbacher, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 7190–7197.
- [161] M. E. McGovern, K. M. R. Kallury, M. Thompson, *Langmuir* **1994**, *10*, 3607–3614.
- [162] F. de Juan, E. Ruiz-Hitzky, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 430–432.
- [163] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, N. M. Khashab, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1604634.
- [164] K. R. Martin, in *Interrelations between essential metal ions and human diseases* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel), Springer, Heidelberg, **2013**, p. 451 ff.
- [165] Q. He, Z. Zhang, Y. Gao, J. Shi, Y. Li, *Small* **2009**, *5*, 2722–2729.
- [166] K. S. Finnie, D. J. Waller, F. L. Perret, A. M. Krause-Heuer, H. Q. Lin, J. V. Hanna, C. J. Barbe, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, 12–18.
- [167] H. Yamada, C. Urata, Y. Aoyama, S. Osada, Y. Yamauchi, K. Kuroda, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 1462–1471.
- [168] G. Chen, Z. Teng, X. Su, Y. Liu, G. Lu, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 1–8.
- [169] Q. He, J. Shi, M. Zhu, Y. Chen, F. Chen, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *131*, 314–320.
- [170] L. Li, T. Liu, C. Fu, L. Tan, X. Meng, H. Liu, *Nanomedicine: NBM* **2015**, *11*, 1915–1924.

- [171] K. Braun, A. Pochert, M. Beck, R. Fiedler, J. Gruber, M. Linden, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2016**, *79*, 319–327.
- [172] V. Cauda, A. Schlossbauer, T. Bein, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *132*, 60–71.
- [173] V. Cauda, C. Argyo, T. Bein, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 8693–8699.
- [174] Y. Choi, J. E. Lee, J. H. Lee, J. H. Jeong, J. Kim, *Langmuir* **2015**, *31*, 6457–6462.
- [175] T. Fontecave, C. Sanchez, T. Azais, C. Boissiere, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 4326–4336.
- [176] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952–1967.
- [177] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1870–1883.
- [178] Q. He, Z. Zhang, F. Gao, Y. Li, J. Shi, *Small* **2011**, *7*, 271–280.
- [179] X. Wang, X. Li, A. Ito, Y. Sogo, T. Ohno, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7480–7489.
- [180] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, F. Tang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 5390–5399.
- [181] Y.-S. Lin, C. L. Haynes, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4834–4842.
- [182] I. I. Slowing, C.-W. Wu, J. L. Vivero-Escoto, V. S.-Y. Lin, *Small* **2009**, *5*, 57–62.
- [183] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- [184] C. E. Ashley, E. C. Carnes, G. K. Phillips, D. Padilla, P. N. Durfee, P. A. Brown, T. N. Hanna, J. Liu, B. Phillips, M. B. Carter, et al., *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 389–397.
- [185] E. Fröhlich, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577–5591.
- [186] A. Verma, F. Stellacci, *Small* **2010**, *6*, 12–21.
- [187] I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14792–14793.
- [188] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 689–702.
- [189] Y. Shi, M. L. Miller, A. J. Di Pasqua, *Comments Inorg. Chem.* **2016**, *36*, 61–80.
- [190] E. Phillips, O. Penate-Medina, P. B. Zanzonico, R. D. Carvajal, P. Mohan, Y. Ye, J. Humm, M. Gönen, H. Kalaigian, H. Schöder, et al., *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 1–10.

- [191] M. Vallet-Regí, A. Ramila, R. P. del Real, J. Perez-Pariente, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308–311.
- [192] P. Yang, S. Gai, J. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3679–3698.
- [193] T. Linnell, H. A. Santos, E. Mäkilä, T. Heikkilä, J. Salonen, D. Y. Murzin, N. Kumar, T. Lakksonen, L. Peltonen, J. Hirvonen, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 3294–3306.
- [194] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558.
- [195] S.-W. Song, K. Hidajat, S. Kawi, *Langmuir* **2005**, *21*, 9568–9575.
- [196] N. Ehlert, M. Badar, A. Christel, S. J. Lohmeier, T. Luessenhop, M. Stieve, T. Lenarz, P. P. Mueller, P. Behrens, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 752–760.
- [197] X. Huang, N. P. Young, H. E. Townley, *Nanomater. Nanotechnol.* **2014**, *4*, 1–15.
- [198] V. Cauda, L. Mühlstein, B. Onida, T. Bein, *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *118*, 435–442.
- [199] Y. Hu, J. Wang, Z. Zhi, T. Jiang, S. Wang, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363*, 410–417.
- [200] B. Chang, J. Guo, C. Liu, J. Qian, W. Yang, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9941–9947.
- [201] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8116–8117.
- [202] H. Fullriede, P. Abendroth, N. Ehlert, K. Doll, J. Schäske, A. Winkel, S. N. Stumpp, M. Stiesch, P. Behrens, *BioNanoMaterials* **2016**, *17*, 59–72.
- [203] E. Aznar, M. Oroval, L. Pascual, J. R. Murguía, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 561–718.
- [204] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845–8849.
- [205] T. Xia, M. Kovichich, M. Liang, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **2009**, *3*, 3273–3286.
- [206] J.-H. Park, J.-K. Park, H.-Y. Shin, *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 156–159.
- [207] F. Jia, X. Liu, L. Li, S. Mallapragada, B. Narasimhan, Q. Wang, *J. Control. Release* **2013**, *172*, 1020–1034.
- [208] A. Baeza, E. Guisasola, E. Ruiz-Hernández, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 517–524.

- [209] S. Laurent, M. Mahmoudi, *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **2011**, *2*, 367–390.
- [210] Y. S. Lin, C. L. Haynes, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3979–3986.
- [211] D. Y. Kong, Z. L. Wang, C. K. Lin, Z. W. Quan, Y. Y. Li, C. X. Li, J. Lin, *Nanotechnol.* **2007**, *18*, 1–7.
- [212] S. Veerananarayanan, A. C. Poulouse, Y. Nagaoka, S. Iwai, Y. Nakagame, S. Kashiwada, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 3769–3786.
- [213] A. S. Hoffman, J. A. Hubbell, in *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine* (Eds.: B.R. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons), Academic Press, **2013**, pp. 339–349.
- [214] G. V. Deodhar, M. L. Adams, B. G. Trewyn, *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, e1600408.
- [215] J. F. Díaz, K. J. Balkus, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1996**, *2*, 115–126.
- [216] M. C. Manning, K. Patel, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 903–918.
- [217] H. P. Erickson, *Biol. Proced. Online* **2009**, *11*, 32–51.
- [218] E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1325–1336.
- [219] H. Wu, *Adv. Protein Chem.* **1931**, *46*, 6–26.
- [220] C. Czeslik, *Z. Phys. Chem.* **2004**, *218*, 771–801.
- [221] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87–106.
- [222] W. Norde, C. E. Giacomelli, *J. Biotechnol.* **2000**, *79*, 259–268.
- [223] V. Ball, A. Bentaleb, J. Hemmerle, J.-C. Voegel, P. Schaaf, *Langmuir* **1996**, *12*, 1614–1621.
- [224] S. Noinville, F. Bruston, C. El Amri, D. Baron, P. Nicolas, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1196–1206.
- [225] P. Asuri, S. S. Karajanagi, H. Yang, T.-J. Yim, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Langmuir* **2006**, *22*, 5833–5836.
- [226] K. C. Dee, D. A. Puleo, R. Bizios, in *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions* (Eds.: K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios), John Wiley & Sons, New Jersey, **2002**, pp. 37–52.
- [227] D. R. Schmidt, H. Waldeck, W. J. Kao, in *Biological Interaction on Materials Surfaces* (Eds.: D.A. Puleo, R. Bizios), Springer, New York, **2009**, pp. 1–18.
- [228] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 233–244.

- [229] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 270–280.
- [230] X. Li, Y. Su, S. Liu, L. Tan, X. Mo, S. Ramakrishna, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 418–424.
- [231] H. H. P. Yiu, P. A. Wright, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3690–3700.
- [232] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453–468.
- [233] B. Teste, J. Vial, S. Descroix, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.-C. Hennion, *Talanta* **2010**, *81*, 1703–1710.
- [234] T. A. Horbett, J. L. Brash, in *Proteins Interfaces II* (Eds.: T.A. Horbett, J.L. Brash), American Chemical Society, **1987**, pp. 1–33.
- [235] V. Puddu, C. C. Perry, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6356–6363.
- [236] E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Medizintechnik*, Springer, Heidelberg, **2009**, pp. 69 ff.
- [237] S. B. Hein, *WOMag* **2015**, *11*, 17–19.
- [238] L. L. Hench, J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific Publishing, Singapur, **1993**.
- [239] J. M. Schierholz, J. Beuth, *J. Hosp. Infect.* **2001**, *49*, 87–93.
- [240] N. Ehlert, P. P. Mueller, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3847–3861.
- [241] B. S. Wilson, D. L. Tucci, M. H. Merson, G. M. O'Donoghue, *Lancet* **2017**, *390*, 2503–2515.
- [242] <http://www.orl.usz.ch/fachwissen/cochlea-implantat-zentrum/seiten/infos-ci-versorgung.aspx>, Zugriff am **20.08.2018**.
- [243] <https://hoer-wunder.de/cochlea-implantat/>, Zugriff am **26.02.2019**.
- [244] <https://www.medel.com/de/electrodes/>, Zugriff am **26.02.2019**.
- [245] U. Reich, E. Fadeeva, A. Warnecke, G. Paasche, P. Mu, B. Chichkov, T. Lenarz, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2012**, *100*, 940–947.
- [246] P. K. Plinkert, S. Hoth, *Das Cochlea-Implantat*, UniversitätsKlinikum Heidelberg, **2008**.
- [247] U. Reich, P. P. Mueller, E. Fadeeva, B. N. Chichkov, T. Stoeber, T. Fabian, T. Lenarz, G. Reuter, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2008**, *87*, 146–153.

- [248] P. Schendzielorz, K. Rak, K. Radeloff, J. Völker, T. Gehrke, A. Scherzad, N. Kleinsasser, R. Hagen, A. Radeloff, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2017**, 1–8.
- [249] A. Warnecke, S. Sasse, G. I. Wenzel, A. Hoffmann, G. Gross, G. Paasche, V. Scheper, U. Reich, K. H. Esser, T. Lenarz, *et al.*, *Hear. Res.* **2012**, *289*, 86–97.
- [250] W. S. Konerding, H. Janssen, P. Hubka, J. Tornøe, P. Mistrik, L. Wahlberg, T. Lenarz, A. Kral, V. Scheper, *Hear. Res.* **2017**, *350*, 110–121.
- [251] N. A. Hardie, R. K. Shepherd, *Hear. Res.* **1999**, *128*, 147–165.
- [252] C. E. Zimmermann, B. J. Burgess, J. B. Nadol, *Hear. Res.* **1995**, *90*, 192–201.
- [253] L. N. Gillespie, R. K. Shepherd, *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *22*, 2123–2133.
- [254] Y. Zilberstein, M. C. Liberman, G. Corfas, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 405–410.
- [255] S. B. Shibata, C. L. Budenz, S. A. Bowling, B. E. Pfingst, Y. Raphael, *Hear. Res.* **2011**, *281*, 56–64.
- [256] L. N. Pettingill, R. T. Richardson, A. K. Wise, S. J. O’Leary, R. K. Shepherd, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2007**, *54*, 1138–1148.
- [257] J. H. Goldwyn, S. M. Bierer, J. A. Bierer, *Hear. Res.* **2010**, *268*, 93–104.
- [258] G. Clark, *Cochlear Implants: Fundamentals and Applications*, Springer, New York, **2003**.
- [259] S. M. Schaal, M. S. Garg, M. Ghosh, L. Lovera, M. Lopez, M. Patel, J. Louro, S. Patel, L. Tuesta, W.-M. Chan, *et al.*, *PLoS One* **2012**, *7*, e43634.
- [260] S. Di Santo, A. Mina, A. Ducray, H. R. Widmer, P. Senn, *Neuroreport* **2014**, *25*, 446–451.
- [261] R. T. Richardson, A. K. Wise, B. C. Thompson, B. O. Flynn, P. J. Atkinson, N. J. Fretwell, J. B. Fallon, G. G. Wallace, R. K. Shepherd, G. M. Clark, *et al.*, *Biomater.* **2009**, *30*, 2614–2624.
- [262] J. A. Chikar, J. L. Hendricks, S. M. Richardson-Burns, Y. Raphael, B. E. Pfingst, D. C. Martin, *Biomater.* **2012**, *33*, 1982–1990.
- [263] Y. S. Kikkawa, T. Nakagawa, L. Ying, Y. Tabata, H. Tsubouchi, A. Ido, J. Ito, *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 280.
- [264] H. Li, F. Edin, H. Hayashi, O. Gudjonsson, N. Danckwardt-Lillieström, H. Engqvist, H. Rask-Andersen, W. Xia, *Biomater.* **2017**, *122*, 1–9.
- [265] V. Scheper, G. Paasche, J. M. Miller, A. Warnecke, N. Berkingali, T. Lenarz, T. Stöver, *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 1389–1399.

- [266] P. A. Leake, G. T. Hradek, A. M. Hetherington, O. Stakhovskaya, *J. Comp. Neurol.* **2011**, *519*, 1526–1545.
- [267] S. Rahmani, A. M. Ross, T. H. Park, H. Durmaz, A. F. Dishman, D. M. Prieskorn, N. Jones, R. A. Altschuler, J. Lahann, *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 94–100.
- [268] A. K. Wise, J. Tan, Y. Wang, F. Caruso, R. K. Shepherd, *PLoS One* **2016**, *11*, e0164867.
- [269] J. Tan, Y. Wang, X. Yip, F. Glynn, R. K. Shepherd, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3362–3366.
- [270] M. Praetorius, C. Brunner, B. Lehnert, C. Klingmann, H. Schmidt, H. Staecker, B. Schick, *Acta Otolaryngol.* **2007**, *127*, 486–490.
- [271] T. Heemeier, Biomaterialien für Implantate im Ohrbereich, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, **2016**.
- [272] N. H. Dormer, C. J. Berkland, M. S. Detamore, *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 2121–2141.
- [273] K. L. Moffat, W.-H. S. Sun, P. E. Pena, N. O. Chahine, S. B. Doty, G. A. Ateshian, C. T. Hung, H. H. Lu, *PNAS* **2008**, *105*, 7947–7952.
- [274] A. Prabhath, V. N. Vernekar, E. Sanchez, C. T. Laurencin, *Int. J. Pharm.* **2018**, *544*, 358–371.
- [275] A. Chainani, D. Little, *Tech. Orthop.* **2016**, *31*, 91–97.
- [276] J. Freyschmidt, *Skeletterkrankungen*, Springer-Verlag, Berlin, **2008**.
- [277] A. Seidi, M. Ramalingam, I. Elloumi-Hannachi, S. Ostrovidov, A. Khademhosseini, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1441–1451.
- [278] A. Hirschmüller, in *Die Sehne: Leitfaden zur Behandlung von Sehnenpathologien* (Eds.: C. Plaaß, L. Weisskopf), Walter De Gruyter GmbH, Berlin, **2017**, p. 1 ff.
- [279] D. L. J. Bunker, V. Ilie, V. Ilie, S. Nicklin, *Muscles Ligaments Tendons J.* **2014**, *4*, 343–350.
- [280] K. Atesok, F. H. Fu, M. R. Wolf, M. Ochi, L. M. Jazrawi, N. Doral, J. H. Lubowitz, S. A. Rodeo, *J. Bone Jt. Surg.* **2014**, *96*, 513–521.
- [281] X. Zhang, D. Bogdanowicz, C. Eriskin, N. M. Lee, H. H. Lu, *J. Shoulder Elb. Surg.* **2012**, *21*, 266–277.
- [282] T. J. Levingstone, A. Matsiko, G. R. Dickson, F. J. O’Brien, J. P. Gleeson, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1996–2004.

- [283] S. T. B. Ho, D. W. Hutmacher, A. K. Ekaputra, D. Hitendra, J. H. Hui, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 1123–1141.
- [284] H. H. Lu, S. D. Subramony, M. K. Boushell, X. Zhang, *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 2142–2154.
- [285] J. P. Spalazzi, E. Dagher, S. B. Doty, X. E. Guo, S. A. Rodeo, H. H. Lu, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *86*, 1–12.
- [286] X. Li, J. Xie, J. Lipner, X. Yuan, S. Thomopoulos, Y. Xia, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2763–2768.
- [287] C. Erisken, D. M. Kalyon, H. Wang, *Biomater.* **2008**, *29*, 4065–4073.
- [288] J. E. Phillips, K. L. Burns, J. M. Le Doux, R. E. Guldberg, A. J. García, *PNAS* **2008**, *105*, 12170–12175.
- [289] T. Suciati, D. Howard, J. Barry, N. M. Everitt, K. M. Shakesheff, F. R. Rose, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 1049–1056.
- [290] X. Wang, E. Wenk, X. Zhang, L. Meinel, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, *J. Control. Release* **2009**, *134*, 81–90.
- [291] D. de Cassan, S. Sydow, N. Schmidt, P. Behrens, Y. Roger, A. Hoffmann, A. L. Hoheisel, B. Glasmacher, R. Hänsch, H. Menzel, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *163*, 309–320.
- [292] X. Jing, H.-Y. Mi, X.-C. Wang, X.-F. Peng, L.-S. Turng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 6955–6965.
- [293] V. Lefebvre, P. Smits, *Birth Defects Res.* **2005**, *75*, 200–212.
- [294] F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu, J. M. Murphy, *Exp. Cell Res.* **2001**, *268*, 189–200.
- [295] T. Karimi, D. Barati, O. Karaman, S. Moeinzadeh, E. Jabbari, *Integr. Biol.* **2015**, *7*, 112–127.
- [296] W. Wang, D. Rigueur, K. M. Lyons, *Birth Defects Res.* **2014**, *102*, 37–51.
- [297] F. Long, D. M. Ornitz, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a008334.
- [298] H. Fan, C. Zhang, J. Li, L. Bi, L. Qin, H. Wu, Y. Hu, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 927–934.
- [299] J. Landers, G. Y. Gor, A. V Neimark, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *437*, 3–32.
- [300] E. Borenfreund, J. A. Puerner, *Toxicol. Lett.* **1985**, *24*, 119–124.
- [301] P. Wefstaedt, V. Scheper, T. Lenarz, T. Stöver, *Neuroreport* **2005**, *16*, 19–22.

- [302] L. N. Gillespie, G. M. Clark, P. F. Bartlett, P. L. Marzella, *Neuroreport* **2001**, *12*, 275–279.
- [303] Y.-J. Kim, R. L. Y. Sah, J.-Y. Doong, A. J. Grodzinsky, *Anal. Biochem.* **1988**, *174*, 168–176.
- [304] R. W. Farndale, D. J. Buttle, A. J. Barrett, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *883*, 173–177.
- [305] H.-J. Müller, D. R. Prange, *PCR – Polymerase- Kettenreaktion*, Springer Spektrum, **2015**.
- [306] B. Holzapfel, L. Wickert, *Biol. Unserer Zeit* **2007**, *2*, 120–126.
- [307] M. W. Pfaffl, *BIOspektrum* **2004**, *1*, 92–95.
- [308] M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lina, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, *et al.*, *Mol Asp. Med* **2006**, *27*, 95–125.
- [309] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
- [310] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston, **1990**.
- [311] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, San Diego, **1991**.
- [312] R. Marschall, I. Bannat, J. Caro, M. Wark, *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, *99*, 190–196.
- [313] P. G. Hartley, I. Larson, P. J. Scales, *Langmuir* **1997**, *13*, 2207–2214.
- [314] A. Satalov, Nanoporous Silica Nanoparticles and Bone Morphogenetic Protein 2 for Bone Regeneration, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, **2017**.
- [315] A. Wenz, K. Janke, E. Hoch, G. E. M. Tovar, K. Borchers, P. J. Kluger, *BioNanoMaterials* **2016**, *17*, 179–184.
- [316] H. Uludag, D. D’Augusta, J. Golden, J. Li, G. Timony, R. Riedel, J. M. Wozney, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 227–238.
- [317] A. Ruff, Metallkomplex-modifizierte Kieselgelpartikel - Synthese und Charakterisierung von Stöber-SiO₂-Materialien und Co-Schiff-Basen-Komplexen für deren Modifizierung, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, **2008**.
- [318] R. Mortera, S. Fiorilli, E. Garrone, E. Verné, B. Onida, *Chem. Eng. J.* **2010**, *156*, 184–192.

- [319] C. J. Hartnick, H. Staecker, B. Malgrange, P. P. Lefebvre, W. Liu, G. Moonen, T. R. Van De Water, *J. Neurobiol.* **1996**, *30*, 246–254.
- [320] T. Cass, F. S. Ligler, *Immobilized Biomolecules in Analysis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.
- [321] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- [322] W. Zhou, M. Zhao, Y. Zhao, Y. Mou, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22*, 1221–1230.
- [323] K. A. Dill, *Biochem.* **1990**, *29*, 7133–7155.
- [324] J. M. Rosenholm, J. Zhang, M. Linden, C. Sahlgren, *Nanomedicine* **2016**, *11*, 391–402.
- [325] M. Mehrasa, M. A. Asadollahi, K. Ghaedi, H. Salehi, A. Arpanaei, *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *79*, 687–695.
- [326] O. Persenaire, P. Dege, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 288–294.
- [327] D. de Britto, S. P. Campana-Filho, *Thermochim. Acta* **2007**, *465*, 73–82.
- [328] J. P. Soares, J. E. Santos, G. O. Chierice, E. T. G. Cavalheiro, *Ecl. Quim.* **2004**, *29*, 57–63.
- [329] D. Logeart-Avramoglou, M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke, H. Petite, *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 78–86.
- [330] N. El Kechai, F. Agnely, E. Mamelle, Y. Nguyen, E. Ferrary, A. Bochot, *Int. J. Pharm.* **2015**, *494*, 83–101.
- [331] Q. Wu, C. Liu, L. Fan, J. Shi, Z. Liu, R. Li, L. Sun, *Nanotechnol.* **2012**, *23*, 485703.
- [332] Q. Gan, J. Zhu, Y. Yuan, H. Liu, J. Qian, Y. Li, C. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2056–2066.
- [333] Y. Ma, M. Bjo, A. K. Wise, C. Cortez-Jugo, E. Revalor, Y. Ju, O. M. Feeney, R. T. Richardson, E. Hanssen, R. K. Shepherd, *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 31019–31031.
- [334] X. She, L. Chen, L. Velleman, C. Li, C. He, J. Denman, T. Wang, S. Shigdar, W. Duan, L. Kong, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 6094–6104.
- [335] S. Kwon, R. K. Singh, R. A. Perez, E. A. Abou Neel, H.-W. Kim, W. Chrzanowski, *J. Tissue Eng.* **2013**, *4*, 1–18.
- [336] Y. Wang, G. Zhu, N. Li, J. Song, L. Wang, X. Shi, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1626–1640.

- [337] D. H. Kim, D. C. Martin, *Biomater.* **2006**, *27*, 3031–3037.
- [338] V. Scheper, R. Hessler, M. Hütten, M. Wilk, C. Jolly, T. Lenarz, G. Paasche, *PLoS One* **2017**, *12*, e0183820.
- [339] J. Vagner, H. Qu, V. J. Hruby, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292–296.
- [340] S. M. Massa, T. Yang, Y. Xie, J. Shi, M. Bilgen, J. N. Joyce, D. Nehama, J. Rajadas, F. M. Longo, *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1774–1785.

7 Anhang

7.1 Chemikalienverzeichnis

Tabelle 7.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Bezugsquelle
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	>99 %	Sigma-Aldrich
3-Aminopropyltrimethoxysilan	97 %	Sigma-Aldrich
3-Mercatopropyltrimethoxysilan	95 %	Sigma-Aldrich
BDNF	98 %	Thermo Fisher Scientific
BDNF-Biotin	>98 %	Alomone Labs
BSA	≥98 %	Sigma-Aldrich
Cetyltrimethylammoniumbromid	≥96 %	Sigma-Aldrich
Diethanolamin	≥99 %	Sigma-Aldrich
Ethanol (absolut)	≥99 %	Merck
FITC	≥99 %	Sigma-Aldrich
HEPES	≥99.5 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -(6-Aminoethyl)aminomethyltriethoxysilan	92 %	ABCR
PBS	–	Sigma-Aldrich
Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat	–	Thermo Fisher Scientific
TGF-β3	≥98 %	PeptoTech
Tetraethoxysilan	≥99 %	Sigma-Aldrich
Toluol	≥99.7 %	Honeywell
Wasserstoffperoxid	34.5–36.5 %	Sigma-Aldrich

7.2 Zusammensetzungen der verwendeten Medien

Tabelle 7.2: Zusammensetzung der verwendeten Medien für die Chondrogenese-Untersuchungen.

Reagenz	Menge	Medium
DMEM LG	500 mL	MSC-GM
HyClone FCS	10 %	
Penicillin/Streptomycin	1 %	
HEPES	25 mM	
FGF-2	2 ng mL ⁻¹	
DMEM HG	300 mL	Chondrogenese-Medium I
HEPES	20 mM	
Penicillin/Streptomycin	1 %	
Dexamethason	0.1 µM	Chondrogenese-Medium II
ITS-Zusatz	1 %	
phosphoryliertes Ascorbat (Asc2P)	0.17 mM	
Natriumpyruvat	1 mM	
Prolin	0.35 mM	
H ₂ O	1 L	PBE-Puffer pH 6.5
Na ₂ HPO ₄	6.53 g	
NaH ₂ PO ₄	6.48 g	
EDTA	1.46 g	
H ₂ O	1 L	DNA Ansatzpuffer pH 7
NaCl	116.88 g	
Natriumcitrat	4.41 g	
H ₂ O	967.7 mL	DMB-Lösung
HCl	32.3 mL	
NaCl	4 g	
DMB	54.4 mg	
Glycin	5.2 g	
PBE-Puffer	40 mL	Papain-Verdauungslösung
L-Cystein	63 mg	
Papain	5 mg	

7.3 Zusatzinformationen

7.3.1 Charakterisierung der Nanopartikel

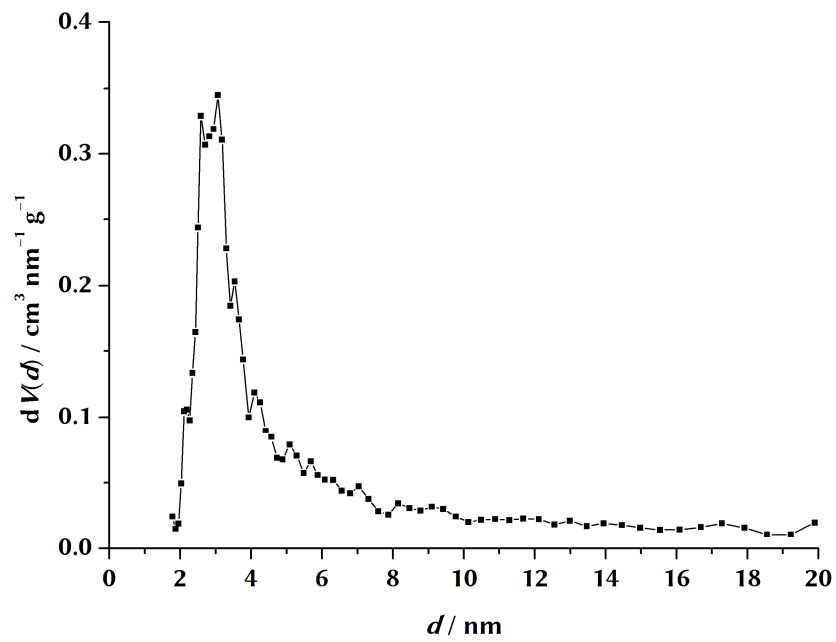


Abbildung 7.1: DFT-Porenweitenverteilung für die unmodifizierten NPSNPs.

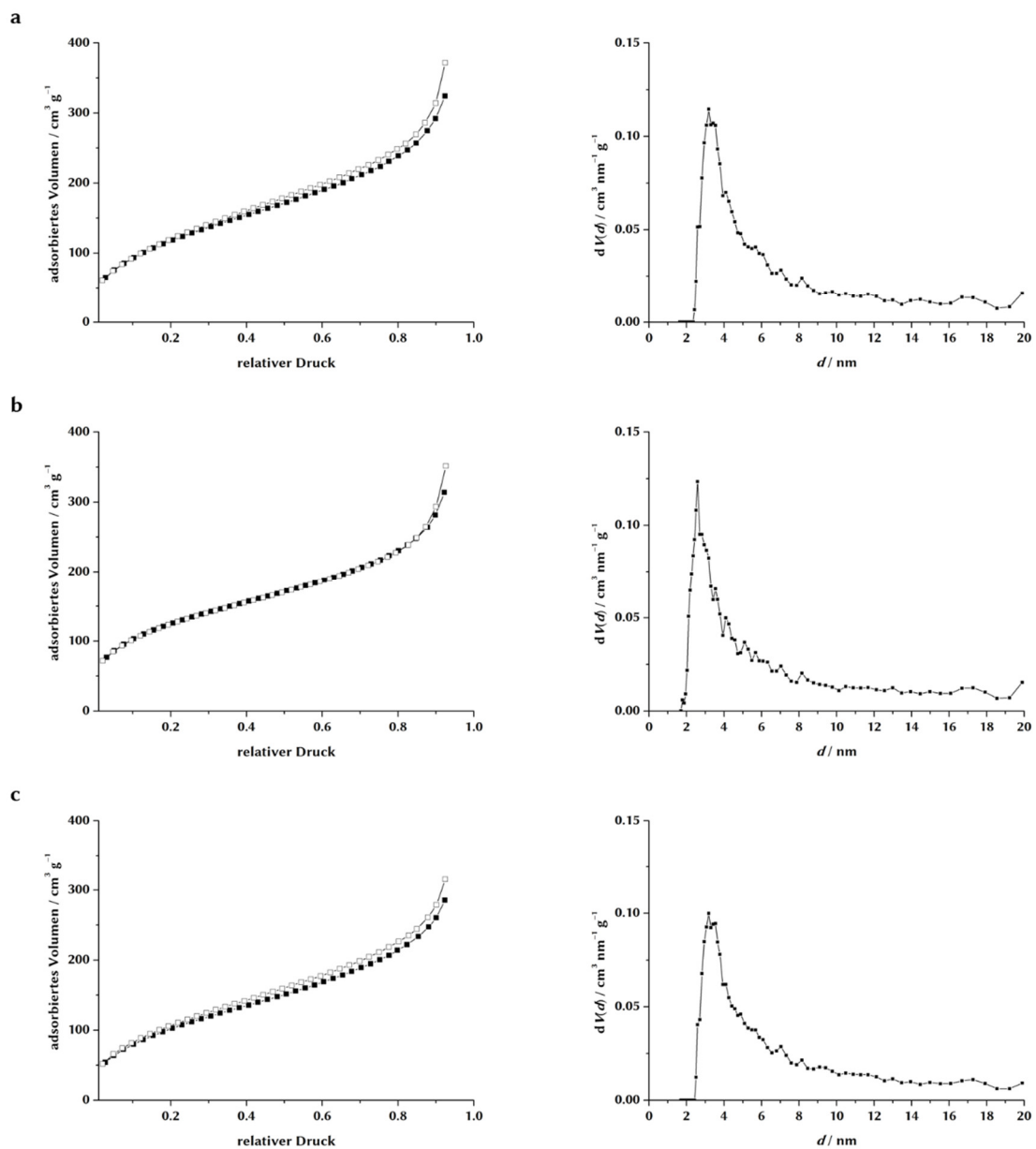


Abbildung 7.2: N₂-Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von NPSNP-NH₂ (a), NPSNP-SO₃H (b) und NPSNP-hexyl-NH₂ (c).

7.3.2 Berechnung der theoretischen BDNF- bzw. TGF- β 3-Immobilisierungsmengen

Berechnungen für BDNF und TGF- β 3:

a.) Dichte der NPSNPs:

$$\rho(\text{Stöber}) = 2 \text{ g cm}^{-3} \text{ (Annahme: 50 \% Porosität)} \rightarrow \rho(\text{NPSNP}) = 1 \text{ g cm}^{-3}$$

b.) Volumen der Partikel:

$$V = (4/3) \pi r^3 = (4/3) \cdot \pi \cdot (40 \text{ nm}/2)^3 = 33\,510 \text{ nm}^3$$

c.) Masse der Partikel:

$$m = V \cdot \rho = 33\,510 \text{ nm}^3 \cdot 1 \text{ g cm}^{-3} = 3.351 \cdot 10^{-14} \text{ mg}$$

d.) Menge Partikel in 5 mg:

$$N(\text{Partikel}) = 5 \text{ mg} / 3.351 \cdot 10^{-14} \text{ mg} = 1.492 \cdot 10^{14}$$

e.) Oberfläche der Partikel:

$$O(\text{Partikel}) = 4 \pi r^2 = 4 \cdot \pi \cdot (40 \text{ nm}/2)^2 = 5\,027 \text{ nm}^2$$

f.) Oberfläche des BDNFs / des TGF- β 3s:

$$O(\text{BDNF/TGF-}\beta 3) = 3 \text{ nm} \cdot 6 \text{ nm} = 18 \text{ nm}^2$$

g.) Masse von BDNF/TGF- β 3-Molekül:

$$m(\text{BDNF}) = 27\,000 \text{ g mol}^{-1} / 6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 4.5 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

$$m(\text{TGF-}\beta 3) = 25\,000 \text{ g mol}^{-1} / 6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 4.17 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

h.) Menge von BDNF/TGF- β 3 auf Oberfläche (Partikel):

$$N(\text{BDNF/TGF-}\beta 3 @ \text{NP}) = O(\text{Partikel}) / O(\text{BDNF/TGF-}\beta 3) = 279.28$$

i.) Masse von BDNF/TGF- β 3 maximal auf 5 mg NPSNPs:

$$\begin{aligned} m(\text{BDNF, max.}) &= N(\text{BDNF}@ \text{NP}) \cdot m(\text{BDNF}) \cdot N(\text{Partikel}) \\ &= 279.28 \cdot 4.5 \cdot 10^{-20} \text{ g} \cdot 1.492 \cdot 10^{14} = 1.875 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} m(\text{TGF-}\beta 3, \text{ max.}) &= N(\text{TGF-}\beta 3 @ \text{NP}) \cdot m(\text{BDNF}) \cdot N(\text{Partikel}) \\ &= 279.28 \cdot 4.17 \cdot 10^{-20} \text{ g} \cdot 1.492 \cdot 10^{14} = 1.738 \text{ mg} \end{aligned}$$

j.) Masse von BDNF/TGF- β 3 maximal auf 1 mg NPSNP:

$$m(\text{BDNF, max.}) = 1.875 \text{ mg} / 5 = 0.375 \text{ mg}$$

$$m(\text{TGF-}\beta 3, \text{ max.}) = 1.738 \text{ mg} / 5 = 0.348 \text{ mg}$$

Zusätzliche Berechnung für BSA:

f.) Oberfläche des BSAs:

$$O(\text{BSA}) = 4 \text{ nm} \cdot 14 \text{ nm} = 56 \text{ nm}^2$$

g.) Masse von BSA-Molekül:

$$m(\text{BSA}) = 66\,430 \text{ g mol}^{-1} / 6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 1.1 \cdot 10^{-19} \text{ g}$$

h.) Menge von BSA auf Oberfläche (Partikel):

$$N(\text{BSA@NP}) = O(\text{Partikel}) / O(\text{BSA}) = 89.77$$

i.) Masse von BSA maximal auf 5 mg NPSNPs:

$$\begin{aligned} m(\text{BSA, max.}) &= N(\text{BSA@NP}) \cdot m(\text{BSA}) \cdot N(\text{Partikel}) \\ &= 89.77 \cdot 1.1 \cdot 10^{-19} \text{ g} \cdot 1.492 \cdot 10^{14} = 1.473 \text{ mg} \end{aligned}$$

j.) Masse von BDNF/TGF- β 3 maximal auf 1 mg NPSNP:

$$m(\text{BSA, max.}) = 1.473 \text{ mg} / 5 = 0.295 \text{ mg}$$

7.3.3 Degradationsuntersuchungen der Nanopartikel

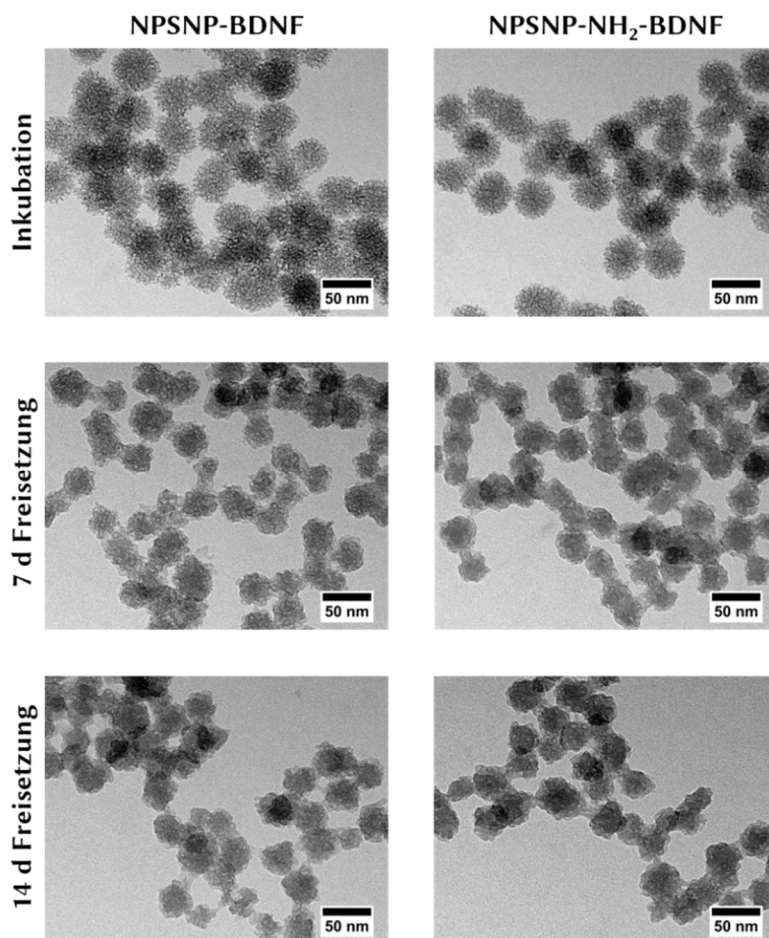


Abbildung 7.3: TEM-Aufnahmen der un- und amino-modifizierten Nanopartikel mit BDNF-Beladung nach der Immobilisierung und nach Freisetzungsräumen von 7 d und 14 d.

Tabelle 7.3: Bestimmung der spezifischen Daten mittels N₂-Physisorptionsmessungen für die un- und amino-modifizierten NPSNPs vor und nach einer simulierten Immobilisierung.

	Spezifische Oberfläche (S_{BET}) / m ² g ⁻¹	Porenvolumen (V) / cm ³ g ⁻¹
NPSNP	1 020	0.91
NPSNP_Inku	660	0.57
NPSNP-NH ₂	560	0.58
NPSNP-NH ₂ _Inku	430	0.44

7.3.4 Fluoreszenzmarkierung von BDNF

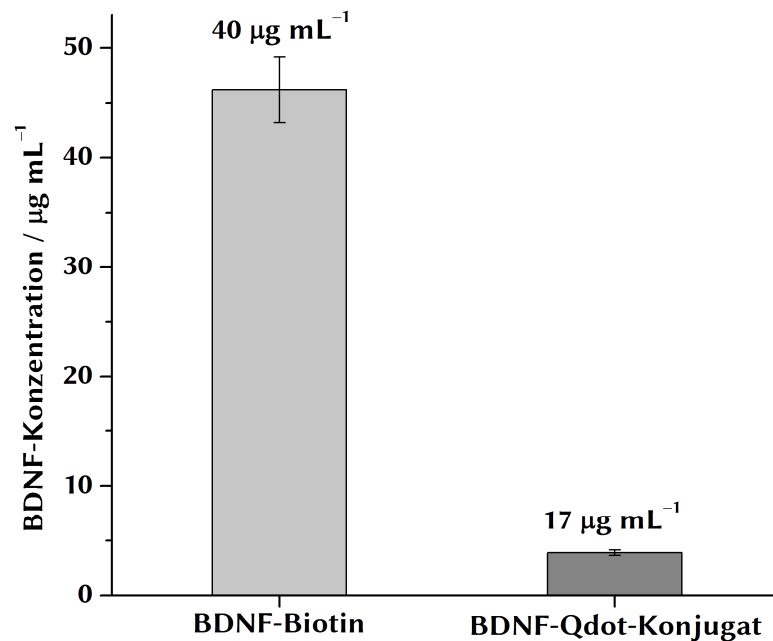
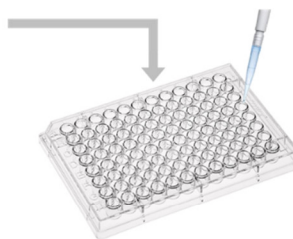
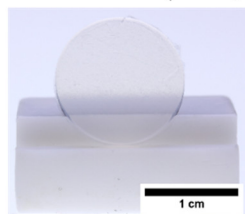


Abbildung 7.4: Mittels ELISA bestimmte BDNF-Konzentration vor und nach der Markierung mit dem Qdot® 655 Streptavidin-Konjugat. Zum Vergleich sind über den Balken die theoretisch vorliegenden Konzentrationen angegeben.

7.3.5 Untersuchungen mit Fibrin zur Aufbringung der Nanopartikel auf die Silicon-Oberfläche

a Plasma-aktiviert (70 W, 30 s)



1. Fibrinogen (100 μL)
2. Thrombin (20 μL) + Nanopartikeldispersion (50 μL , 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

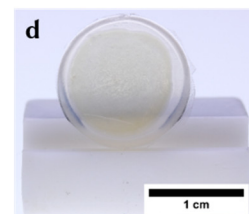
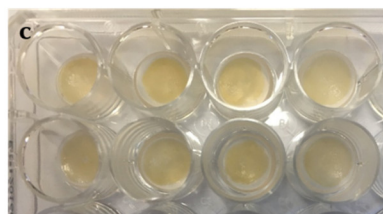
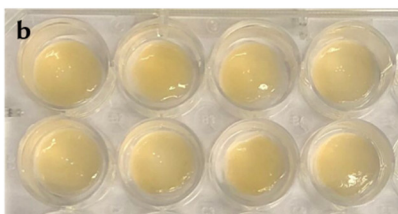


Abbildung 7.5: Schematische Darstellung der Durchführung zur Aufbringung einer Fibrin-Schicht mit NPSNPs auf die Silicon-Oberfläche (a). Fotografische Aufnahmen direkt nach der Herstellung (b) und 28 Tage nach der Herstellung (c) in der 24-Wellplatte und von einem Silicon-Pad mit aufgebracht und getrockneter Fibrinschicht (d).

7.3.6 Charakterisierung der funktionalisierten PCL-Fasermatten mit unterschiedlichen Nanopartikeln

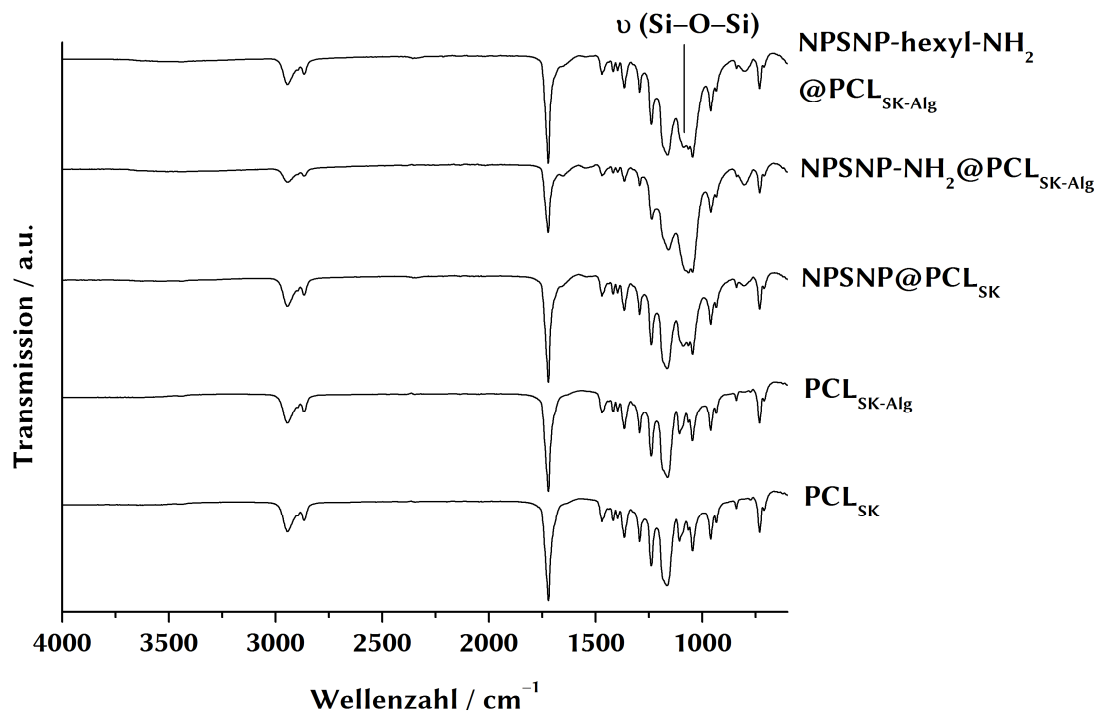


Abbildung 7.6: IR-Spektren der mit unterschiedlichen NPSNPs funktionalisierten PCL-Fasermatten im Vergleich zu den Ausgangsmaterialien (PCL_{SK} bzw. PCL_{SK}-Alg).

7.4 Veröffentlichungen

Artikel

Long-term Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) from Nanoporous Silica Nanoparticles Improves the Survival of Spiral Ganglion Neurons in Vitro

Schmidt, N.; Schulze, J.; Warwas, D. P.; Ehlert, N.; Lenarz, T.; Warnecke, A.; Behrens, P.

PLoS One **2018**, 13, e0194778

Attachment of nanoparticulate drug-release systems on poly(ϵ -caprolactone) nanofibers via a graftpolymer as interlayer

de Cassan, D.; Sydow, S.; Schmidt, N.; Behrens, P.; Roger, Y.; Hoffmann, A.; Hoheisel, A. L.; Glasmacher, B.; Hänsch, R.; Menzel, H.

Colloids Surf. B Biointerfaces **2018**, 163, 309–320

Photoluminescent Aerogels from Quantum Wells

Naskar, S.; Miethe, J. F.; Sánchez-Paradinas, S.; Schmidt, N.; Kanthasamy, K.; Behrens, P.; Pfnür, H.; Bigall, N. C.

Chem. Mater. **2016**, 28, 2089–2099

Vorträge

Nanoporous Silica Nanoparticles as Delivery Systems for Neuroprotective Factors

Schmidt, N.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

4th European Symposium & Exhibition on Biomaterials and Related Areas (Euro BioMAT), **2017**, Weimar

Development of Delivery Systems based on Nanoporous Silica Nanoparticles for Neuronal Applications

Schmidt, N.; Heemeier, T.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

„Dreiländertagung“ Swiss, Austrian and German Societies of Biomedical Engineering (BMT), **2016**, Basel

Delivery Systems based on Nanoporous Silica Nanoparticles for Neuronal Applications

Schmidt, N.; Heemeier, T.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), **2016**, Aachen

Posterbeiträge (als Hauptautor)

Release of TGF- β 3 from Differently Modified Nanoporous Silica Nanoparticles for Cartilage Regeneration

Schmidt, N.; Roger, Y.; Hoffmann, A.; Behrens, P.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), **2017**, Würzburg

BDNF-loaded Nanoporous Silica Nanoparticles for Biomedical Applications

Schmidt, N.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

13. NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering, **2017**, Hannover

Nanoporous Silica Nanoparticles as Delivery Systems for Surface Modification of Cochlear Electrodes

Schmidt, N.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

54th Workshop on Inner Ear Biology and Symposium, **2017**, Hannover

BDNF-loaded Nanoporous Silica Nanoparticles for Biomedical Applications

Schmidt, N.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

International Symposium of Biofabrication for NIFE, **2017**, Hannover

Release of Neuroprotective Factors from Nanoporous Silica Nanoparticles for Neuronal Applications

Schmidt, N.; Heemeier, T.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

28. Deutsche Zeolith Tagung (DZT), **2016**, Gießen

Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) from Nanoporous Silica Nanoparticles for Neuronal Applications

Schmidt, N.; Heemeier, T.; Satalov, A.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), **2015**, Freiburg

Development of delivery systems for bioactive molecules applied for implants and tissue engineering scaffolds

Schmidt, N.; Heemeier, T.; Schulze, J.; Warnecke, A.; Behrens, P.

3rd European Symposium & Exhibition on Biomaterials and Related Areas (Euro BioMAT), **2015**, Weimar

Development of drug delivery systems for the release of neuroprotective factors

Schmidt, N.; Heemeier, T.; Satalov, A.; Behrens, P.

Deutsch-französisch-polnisches Symposium "Strukturierte Biomaterialien für die Medizin", **2014**, Berlin

7.5 Lebenslauf

	Nadeschda Schmidt
Geburtsdatum	02.04.1990
Geburtsort	Tarlyk
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
10/2014 – 03/2019	Promotion zum Dr. rer. nat. in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Behrens am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Dissertation: <i>Entwicklung von auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln basierenden Implantat-assoziierten Freisetzungssystemen für Wachstumsfaktoren</i>
10/2012 – 09/2014	M. Sc. Material- und Nanochemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Masterarbeit: <i>Entwicklung von Drug Delivery-Systemen für die Freisetzung neuroprotektiver Faktoren</i>
10/2009 – 09/2012	B. Sc. Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Bachelorarbeit: <i>Synthese multifunktionaler Core-Shell-Nanopartikel</i>
06/2009	Abitur am Schiller-Gymnasium Hameln