
**Entwicklung von Freisetzungssystemen
für Biomoleküle
für regenerative Anwendungen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von

Karen Fabienne Wilhelmine Besecke, M. Sc.

[2020]

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

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

Tag der Promotion: 17.09.2020

Kurzzusammenfassung

Die regenerative Medizin ist ein multidisziplinäres Forschungsfeld mit dem Ziel, beschädigtes Gewebe und dessen biologische Funktion wiederherzustellen oder vollständig zu ersetzen. Durch eine Kombination von Biomaterialien, Biomolekülen und Zellen werden biologisch inspirierte Umgebungen geschaffen sowie Zellfunktionen gezielt gesteuert. Der Einsatz von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) als Freisetzungssystem zur Verbesserung der derzeitigen Ansätze hat im Laufe der Jahre zunehmend Aufmerksamkeit erlangt. Mit ihnen als Plattform können maßgeschneiderte Freisetzungssysteme, die eine kontrollierte und ortsspezifische Freisetzung von Biomolekülen ermöglichen, für verschiedenste Anwendungen entwickelt werden.

Den Schwerpunkt des ersten Teils dieser Arbeit stellt die Synthese zweier verschiedener Sorten NPSNPs sowie deren Oberflächenmodifizierung mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen mittels der *post-grafting*-Methode dar. Die Variation der Oberflächeneigenschaften ermöglichte unterschiedliche Wechselwirkungen mit Biomolekülen, so dass die Immobilisierungsmenge und das Freisetzungsverhalten eingestellt werden konnten.

Darauf aufbauend widmet sich der zweite Teil der Entwicklung eines intrazellulären *Drug Delivery*-Systems für *short interfering*-Ribonukleinsäuren (siRNAs) mittels der synthetisierten und modifizierten Silica-Nanopartikel. Mithilfe von siRNAs lassen sich einzelne Genexpressionen herunterregulieren, wodurch Zelleigenschaften gezielt beeinflusst werden können. Um eine effektive Aufnahme in Zellen zu gewährleisten, wurden die siRNA-beladenen Nanopartikel mit einer Lipidhülle versehen. Neben der Zytotoxizität der entwickelten Nanoträger wurde die Fähigkeit, die siRNAs innerhalb von Zellen wieder freizusetzen, über die Herunterregulierung eines Testproteins untersucht. Die *in vitro*-Experimente lieferten vielversprechende Ergebnisse und es konnte eine Herunterregulierung (*Knockdown*) bis zu 45 % verzeichnet werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Zellaufnahme, die Zellviabilität und die Transfektionseffizienz von Parametern wie der Partikelgröße bzw. -morphologie sowie der Zusammensetzung der Lipidformulierung abhängen.

Im Mittelpunkt des letzten Teils steht der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der maßgeblich an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt ist. Das entwickelte Freisetzungssystem auf Basis der Silica-Nanopartikel fand als Füllmaterial in einer Gerüststruktur aus Fibrin, die mithilfe von Endothelzellen prävasikularisiert werden sollte, Anwendung. Dafür wurde die Immobilisierung des Wachstumsfaktors auf NPSNPs und die anschließende Freisetzung analysiert. Zudem wurde der Einfluss von in Fibrin eingebetteten, VEGF-beladenen Nanopartikeln auf die Kapillarbildung von Endothelzellen *in vitro* beurteilt. Die Untersuchungen demonstrierten eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung des Wachstumsfaktors von den NPSNPs und einen positiven Effekt auf die Bildung kapillarartiger Strukturen (*Tubes*) der Endothelzellen.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit die Eigenschaften der Silica-Nanopartikel-basierten Freisetzungssysteme erfolgreich an die gewünschten biologischen Anforderungen angepasst und das Potential in Hinblick auf ihre Anwendung in der regenerativen Medizin *in vitro* evaluiert.

Stichworte: nanoporöse Silica-Nanopartikel, *Drug Delivery*, siRNA, RNA-Interferenz, Wachstumsfaktor, *vascular endothelial growth factor*, regenerative Medizin

Abstract

Regenerative medicine is a multidisciplinary field that aims to restore or replace damaged tissue and its functions. By combining biomaterials, biomolecules and cells, biologically inspired environments are created and cell functions are specifically controlled. To improve current approaches, the use of nanoporous silica nanoparticles (NPSNPs) as drug delivery system has gained attention over the past years. They constitute a platform for tailor-made release systems for a wide range of applications, enabling controlled and site-specific release of biomolecules.

The first part of this thesis deals with the synthesis of two different types of NPSNPs and their surface modification with various functional groups using the post-grafting method. The variation of surface properties allowed varying interactions with biomolecules, so that immobilisation and release could be adjusted.

Based on this, the second part of the work is devoted to the development of an intracellular drug delivery system for short interfering ribonucleic acids (siRNAs) with the synthesized and modified silica nanoparticles. These siRNAs can be used to knockdown target genes and thereby influence cell properties specifically. In order to ensure an effective cell uptake, the siRNA-loaded nanoparticles were coated with a lipid bilayer. In addition to the cytotoxicity of the designed nanocarriers, the ability to release siRNA within cells was investigated by knocking down the expression of a test protein. The *in vitro* experiments demonstrated promising results and a knockdown of up to 45 % could be recorded. Furthermore, it was shown that cell uptake, cell viability and transfection efficiency depend on parameters such as particle size and morphology as well as the composition of the lipid formulation.

The last part focuses on the growth factor VEGF (vascular endothelial growth factor), which plays a decisive role in the formation of new blood vessels. The developed NPSNP-based delivery system was used as filling material in a fibrin scaffold, which should be prevascularised with the help of endothelial cells. The immobilisation of the growth factor on NPSNPs and the subsequent release was analysed. Moreover, the influence of VEGF-loaded nanoparticles embedded in fibrin on the capillary formation of endothelial cells was investigated. The experiments demonstrated a continuous and long-term release of the growth factor from NPSNPs and a positive effect on tube formation of endothelial cells.

In summary, within this thesis, the properties of silica nanoparticle-based release systems were successfully adapted to the desired requirements and with regard to their application in regenerative medicine their potential was evaluated *in vitro*.

Keywords: nanoporous silica nanoparticles, drug delivery, siRNA, RNA interference, growth factor, vascular endothelial growth factor, regenerative medicine

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Behrens für die Betreuung meiner Arbeit und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis bedanken. Vielen Dank für die Möglichkeit, meine Arbeit in einem interdisziplinären Umfeld durchzuführen und für die zahlreichen Gelegenheiten, meine Ergebnisse auf verschiedenen Tagungen zu präsentieren.

Frau Prof. Dr. Andrea Hoffmann danke ich für die Übernahme des Korreferats. Außerdem bin ich dankbar, dass Sie mir bei jeglichen biologischen Fragen zur Verfügung standen und mir Ihre Labore zum Arbeiten zur Verfügung stellten.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei allen Kooperationspartnern möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit sowie die vielen konstruktiven Diskussionen bedanken. Insbesondere danke ich Henning Hartwig und Sarah Zippusch für die Durchführung diverser *in vitro*-Untersuchungen und die Unterstützung bei der Auswertung. Ferner danke ich Dr. Michael Pflaum für die Messungen am Durchflusszytometer. Bei Dr. Philipp Dillschneider bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Zellkultur.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis Behrens und auch den mittlerweile ehemaligen Mitgliedern für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Abende im Pausenraum. Für das Anfertigen von TEM-Aufnahmen, die Durchführung der TG- bzw. C/S-Messungen und der Sorptionsmessungen möchte ich mich bei Dawid Warwas, Katharina Nolte, Arne Schierz, Mandy Jahns, Songül Noyun, Alexander Mohmeyer, Malte Schäfer und Claudia Schulze bedanken. Außerdem möchte ich auch Merle Feldt, Birgit Zekoll und Simonetta Ruggieri für ihre Hilfe bei administrativen Fragen danken. Der NIFE-Crew gilt ein besonderer Dank für die gemütlichen Mittags- und Kaffeepausen sowie für das schöne Arbeitsklima.

Meinen Bacheloranden Monika Seegers, Luisa Steingrube, Dimitrios Mpouikidis und den NIFE-HiWis Florian Klodwig und Valentin Hagemann danke ich für die Arbeiten, die sie unter meiner Betreuung durchgeführt haben.

Des Weiteren gebührt mein Dank den Korrekturlesern Reinhild Besecke, Elisa Peter, Saskia Zailskas, Philip Schmidt, Dr. Nina Ehlert und Sarah Zippusch für die Zeit, die sie sich zum Lesen genommen haben.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, meinen Freunden und bei Philip Schmidt dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt und für ausreichend Ablenkung gesorgt haben.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
2 Allgemeine Grundlagen.....	4
2.1 Nanoporöse Silica-Nanopartikel	4
2.1.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	5
2.1.2 Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	6
2.2 Biomedizinische Anwendung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	7
2.2.1 Degradation von nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	8
2.2.2 Biokompatibilität von nanoporösen Silica-Nanopartikeln	10
2.2.3 Funktionalisierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln für biomedizinische Anwendungen	12
2.3 Intrazelluläres <i>Drug Delivery</i>	15
2.3.1 Zellaufnahme von (Silica-)Nanopartikeln	15
2.3.2 Einflussparameter der Zellaufnahme.....	17
2.3.3 Strategien zum endosomalen <i>Escape</i>	18
2.4 <i>Drug Delivery</i> -Systeme für siRNA.....	20
2.4.1 Mechanismus der RNA-Interferenz	21
2.4.2 <i>Short interfering-RNA</i>	22
2.4.3 Herausforderungen beim <i>Drug Delivery</i> von siRNA.....	24
2.4.5 Beispiele für <i>Drug Delivery</i> -Systeme für siRNA.....	25
2.4.6 Nachweismethoden des Gen- <i>Knockdowns</i>	29
2.5 Prävaskularisierte Implantate	31
2.5.1 Angiogenese	32
2.5.2 <i>Vascular endothelial growth factor</i>	34
2.5.3 Strategien zur Freisetzung von VEGF.....	35
2.5.4 Zielsetzung des Forschungsprojekts.....	38
3 Material und Methoden.....	40
3.1 Synthesen und Zellkulturexperimente.....	40
3.1.1 Synthese von kleinporigen nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	40

3.1.2	Synthese von großporigen nanoporösen Silica-Nanopartikeln	40
3.1.3	Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln	41
3.1.4	Funktionalisierung der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit FITC	42
3.1.5	siRNA-Immobilisierung auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und daran anschließende Freisetzungsexperimente	43
3.1.6	Untersuchung des Degradationsverhaltens der NPSNPs unter den Freisetzungsbedingungen	44
3.1.7	Bestimmung der maximalen siRNA-Immobilisierungsmenge	45
3.1.8	Umhüllung der mit siRNA beladenen nanoporösen Silica-Nanopartikel mit verschiedenen Lipiden	46
3.1.9	Untersuchungen zur Zellaufnahme an HS-5(-GFP)-Zellen	47
3.1.10	<i>Knockdown</i> -Untersuchungen an HS-5-GFP-Zellen in 96-Well-Platten....	50
3.1.11	MTT-Test an HS-5-GFP-Zellen	52
3.1.12	Zellkultur für die <i>Knockdown</i> -Untersuchungen von HS-5-GFP-Zellen am Durchflusszytometer	52
3.1.13	Zellkultur für die <i>Knockdown</i> -Untersuchungen von CD73 an DPSCs am Durchflusszytometer	53
3.1.14	Zytokompatibilitätstests mit DPSCs.....	55
3.1.15	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Differenzierung von DPSCs mittels Alizarin- Rot-Färbung	56
3.1.16	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur Differenzierung von DPSCs mittels Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität.....	57
3.1.17	Untersuchung des Aggregationsverhaltens von VEGF mittels DLS	58
3.1.18	Immobilisierung von VEGF auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und daran anschließende Freisetzungsexperimente	58
3.1.19	Untersuchungen zur Degradation von VEGF unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen	59
3.1.20	Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten VEGF-Mengen ...	60
3.1.21	Immobilisierung von VEGF auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und daran anschließende Freisetzungsexperimente für den <i>Tube</i> -Assay	61
3.1.22	<i>Tube</i> -Assay mit Endothelzellen (2D)	62
3.1.23	Untersuchung der VEGF-Freisetzung aus den Fibringelen.....	64
3.1.24	<i>Tube</i> -Assay mit Endothelzellen (3D)	64
3.2	Physikochemische Charakterisierungsmethoden	66
3.2.1	Transmissionselektronenmikroskopie	66
3.2.2	Rasterelektronenmikroskopie	66

3.2.3	Konfokale Laser-Rastermikroskopie.....	66
3.2.4	UV/Vis-Photometrie.....	67
3.2.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	67
3.2.6	Physisorption.....	67
3.2.7	Thermogravimetrie.....	68
3.2.8	Dynamische Lichtstreuung.....	68
3.2.9	Zeta-Potential-Messungen.....	69
3.2.10	Kohlenstoff-Elementaranalyse.....	69
3.2.11	Kohlenstoff/Stickstoff-Elementaranalyse.....	69
3.3	Biochemische Charakterisierungsmethoden.....	70
3.3.1	Zytokompatibilitätstests.....	70
3.3.2	Durchflusszytometrie.....	71
3.3.3	Alizarin-Rot-Färbung zur Untersuchung der odontogenen Differenzierung von DPSCs unter Einfluss von NPSNPs.....	73
3.3.4	Alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung zur Untersuchung der odontogenen Differenzierung von DPSCs unter Einfluss von NPSNPs ..	73
3.3.5	ELISA zur Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten VEGF-Mengen.....	74
3.3.6	<i>Tube</i> -Assay.....	75
4	Ergebnisse und Diskussion.....	76
4.1	Silica-Nanopartikel.....	76
4.1.1	Charakterisierung der un- und modifizierten <i>sp</i> -NPSNPs.....	76
4.1.2	Charakterisierung der un- und modifizierten <i>lp</i> -NPSNPs.....	83
4.1.3	Zusammenfassung.....	89
4.2	Entwicklung eines <i>Drug Delivery</i> -Systems für siRNA.....	90
4.2.1	Immobilisierung von siRNAs auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln.....	90
4.2.2	siRNA-Freisetzung von unterschiedlich modifizierten NPSNPs in PBS...	93
4.2.3	Einfluss der Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen auf die Degradation der NPSNPs.....	95
4.2.4	Bestimmung der maximalen Beladung auf NPSNPs.....	98
4.2.5	Charakterisierung der siRNA-beladenen und Lipid-umhüllten NPSNPs	102
4.2.6	Zellaufnahmeuntersuchungen.....	105
4.2.7	Zytokompatibilitätsuntersuchungen an HS-5-GFP-Zellen.....	110
4.2.8	<i>Knockdown</i> -Untersuchungen an HS-5-GFP-Zellen.....	115

4.2.9	Anwendung der designten Freisetzungssysteme in der regenerativen Medizin	123
4.2.10	Zusammenfassung	128
4.3	Entwicklung eines Freisetzungssystems für VEGF	131
4.3.1	Untersuchung des Aggregationsverhaltens von VEGF mittels DLS	131
4.3.2	Mögliche Wechselwirkungen zwischen VEGF und NPSNPs.....	133
4.3.3	Quantifizierung der immobilisierten VEGF-Mengen	134
4.3.4	Freisetzung von VEGF von <i>sp</i> -NPSNPs	136
4.3.5	Degradationsverhalten von VEGF unter den Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen.....	140
4.4.6	<i>Tube</i> -Assay	141
4.3.7	Zusammenfassung	149
5	Fazit und Ausblick	151
6	Literaturverzeichnis	156
7	Anhang.....	168
7.1	Chemikalienverzeichnis	168
7.2	Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien	169
7.3	Zusatzinformationen	170
7.3.1	Charakterisierung der Silica-Nanopartikel	170
7.3.2	<i>In vitro</i> -Untersuchungen.....	174
7.3.3	Berechnung der theoretischen Immobilisierungsmenge von siRNAs auf <i>sp</i> -NPSNPs sowie <i>lp</i> -NPSNPs.....	178
7.3.4	Berechnung der theoretischen Immobilisierungsmengen von VEGF auf <i>sp</i> -NPSNPs.....	179
7.4	Veröffentlichungen	180
7.5	Lebenslauf	182

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A	Adenin
Ago	Argonautprotein
AIBA	2,2'-Azobis(2-amidinopropan) Dihydrochlorid
ALP	alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
ASC	<i>adipose-derived stem cell</i>
BET	Brunauer, Emmett und Teller
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
C-Dots	Cornell-Punkte
CD73-PE	Phycoerythrin-markierter Antikörper für CD73
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> , konfokales Laser-Rastermikroskop
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTB	CellTiterBlue™
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOC	Doxorubicin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan-chlorid
DOX	Doxycyclin
DPSC	<i>dental pulp stem cell</i> , dentale Pulpastammzelle
ds	doppelsträngig
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	endosomaler <i>Escape</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung

g	relative Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
ICP	<i>inductively coupled plasma</i> , induktiv gekoppeltes Plasma
IEP	isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDa	Kilodalton
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
LNQE	Laboratorium für Nano- und Quantenengineering
<i>lp</i>	<i>large pore</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
miRNA	<i>micro</i> -RNA
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD ⁺	oxidierte Form von NADH
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NLDFT	nichtlokale Dichtefunktionaltheorie
NPSNP	nanoporöse Silica-Nanopartikel
PAMAM	Poly(amidoamin)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin
PEG	Poly(ethylenglycol)
PEG-2000	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin- <i>N</i> -[methoxy(polyethylenglycol)-2000]
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PIGF	<i>placenta growth factor</i>
PLL	Poly- <i>L</i> -Lysin
pNP	<i>p</i> -Nitrophenol
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PTMS	Propyltrimethoxysilan
REA-PE	PE-markierter Isotyp-Kontrollantikörper
REM	Rasterelektronenmikroskopie

RFP	<i>red fluorescent protein</i> , rot fluoreszierendes Protein
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reactive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SBF	<i>simulated body fluid</i> , simulierte Körperflüssigkeit
SDA	strukturdirigierendes Agens
SDS	Natriumdodecylsulfat
siGFP	siRNA gegen die mRNA von eGFP
siNEG	Kontroll-siRNA
siRNA	<i>short interfering-RNA</i>
SLOT	scannende laseroptische Tomographie
<i>sp</i>	<i>small pore</i>
SSC	<i>side scatters</i> , Seitwärtsstreuung
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethylorthosilicat
TG	Thermogravimetrie
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTR	Transthyretin
U	Uracil
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
α -MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> – <i>alpha modification</i>

1 Einleitung

Der mögliche Verlust von Gewebe oder ganzen Organen aufgrund von Krankheit und Verletzung treibt die Entwicklung von Therapien voran, die Gewebe regenerieren oder ersetzen können. Innerhalb regenerativen Medizin werden dafür verschiedene Strategien entwickelt. Basierend auf einem kombinatorischen Einsatz von Biomaterialien, Biomolekülen und Stammzellen sollen biologisch-inspirierte zelluläre Mikroumgebungen geschaffen oder gezielt Zellfunktionen gesteuert werden, um körpereigene Regenerations- und Reparaturprozesse anzuregen.^[1,2] Die Nanotechnologie hat in diesem Forschungsbe- reich in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen, da Materialien mit Nano- meterabmessung auf der gleichen Größenskala mit biologischen Moleküle und Zellen interagieren können. Beispielsweise werden Nanofasern für Gewebegerüste verwendet oder Oberflächen mit Nanotopographien versehen, welche die Zelladhäsion, -prolifera- tion und -differenzierung beeinflussen.^[3] Nanomaterialien in Form von Nanopartikeln kommen hauptsächlich für das *Drug Delivery* von *small molecule drugs* und Biomolekü- len zum Einsatz. Der Begriff „Biomolekül“ umfasst generell Moleküle, die in lebenden Organismen vorkommen. Zu den Hauptklassen gehören Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und Kohlenhydrate, deren Zusammensetzungen von einfachen Monomeren bis hin zu komplexen makromolekularen Strukturen reichen können.^[4] Mithilfe von nanopartikulä- ren Freisetzungssystemen kann eine ortsspezifische, kontrollierte Abgabe dieser Mole- küle innerhalb des therapeutischen Fensters erreicht werden, um den regenerativen Pro- zess zu unterstützen.^[1-3]

Als eine mögliche Plattform für diese Systeme werden nanoporöse Silica-Nanopartikel (NPSNPs) evaluiert. Sie zeichnen sich unter anderem durch eine hohe spezifische Ober- fläche, ein großes und permanentes Porenvolumen, eine generelle Biokompatibilität und die Degradierbarkeit in physiologischer Umgebung aus. Darüber hinaus lassen sich ihre physikochemischen Eigenschaften wie Partikelgröße und Porendurchmesser durch Variation von Syntheseparametern gezielt einstellen. Die Silanolgruppen auf der Ober- fläche können für weitere Modifizierungen genutzt werden, um die Oberflächeneigen- schaften der Anwendung entsprechend anzupassen.^[5,6] Zudem sind diagnostische Silica- Nanopartikel für eine klinische Studie der Phase I an Menschen zugelassen, wodurch grundsätzlich gute Aussichten für eine mögliche klinische Anwendung gegeben sind.^[1]

In dieser Arbeit sollen auf Basis von nanoporösen Silica-Nanopartikeln Freisetzungssys- teme für zwei Typen von Biomolekülen (siRNA und ein Protein) entwickelt und explizit auf die gestellten Anforderungen der jeweiligen Anwendung ausgerichtet werden. In bei- den Fällen gilt es zuerst, Nanopartikel mit geeigneter Partikel- und Porengröße herzustel- len und zu untersuchen, welche Oberflächenmodifizierung sich am besten für die Anbin- dung des jeweiligen Biomoleküls eignet. Anschließend bedarf es einer Analyse der im- mobilisierten Mengen sowie des Freisetzungsverhaltens mit Hilfe von Freisetzungsexpe- rimenten. Wünschenswert in Bezug auf die angebondenen Biomoleküle ist hierbei eine

kontrollierte Abgabe definierter Mengen. Darüber hinaus sollen auch diverse *in vitro*-Untersuchungen zur Beurteilung der Zytokompatibilität und der Funktionsfähigkeit der entwickelten Systeme einen Schwerpunkt darstellen.

Der Fokus des ersten Teils dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung von zwei synthetisierten Sorten nanoporöser Silica-Nanopartikel, die sich hinsichtlich ihrer Größe und ihres Porendurchmessers unterscheiden, und ihrer Oberflächenmodifikation mit verschiedenen funktionellen Gruppen. Die verschiedenen Oberflächeneigenschaften ermöglichen ungleich starke Wechselwirkungen mit Biomolekülen, wodurch sich Immobilisierungsmenge und Freisetzungverhalten regeln lassen.

Der zweite Teil befasst sich mit dem Biomolekül siRNA (*short interfering*-Ribonukleinsäure) und der Entwicklung eines intrazellulären Freisetzungssystems auf Basis der hergestellten Nanopartikel. Diese kurzen Oligonukleotide sind maßgeblich an dem Mechanismus der RNA-Interferenz beteiligt. Dabei handelt es sich um einen natürlichen posttranskriptionellen Mechanismus, durch welchen die Expression bestimmter Gene bzw. Proteine herunterreguliert werden kann. Demnach bietet die Verwendung von siRNA die Möglichkeit, Zelleigenschaften so zu steuern, dass beispielsweise eine spezifische Differenzierung von Stammzellen hervorgerufen wird.^[7] Spezielle siRNAs könnten demnach undifferenzierte Pulpastammzellen aus Zähnen in einer Weise beeinflussen, dass sie zu Odontoblasten (dentinbildende Zellen) differenzieren, die wiederum zur Regeneration von beschädigtem Zahngewebe beitragen könnten. Damit siRNAs eine RNA-Interferenz induzieren können, müssen sie allerdings in das Zytoplasma von Zellen gelangen. Jedoch ist eine effektive Zellaufnahme des Moleküls aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der RNA erschwert, weswegen nanopartikuläre *Drug Delivery*-Systeme benötigt werden, die siRNAs in die Zelle schleusen und in das Zytoplasma freisetzen können.^[8] Für diesen Zweck werden häufig lipidbasierte Nanopartikel verwendet, die sich über elektrostatische Wechselwirkungen der negativ geladenen Nukleinsäuren und kationischen Lipide bilden und damit die zellulären Membranschränken aus Lipiddoppelschichten durchdringen können.^[9] Mit solchen Lipoplexen können hohe Transfektionseffizienzen erzielt werden. Zu den Nachteilen zählen aber relativ geringe Beladungsmengen und das Auftreten von Leckagen, die zu einem vorzeitigen Verlust des Wirkstoffs führen können.^[10,11] Ein Kern aus oberflächenmodifizierten nanoporösen Silica-Nanopartikeln, der eine Immobilisierung großer siRNA-Mengen ermöglicht, könnte dahingehend eine Lösung bieten. Die als „Protocell“ bezeichneten Hybridsysteme aus NPSNPs und einer Hülle aus Lipiden vereinen die Vorteile beider Komponenten und der modulare Aufbau erlaubt eine Abstimmung der Eigenschaften für die jeweilige Anwendung.^[12] In der vorliegenden Arbeit sollten im Rahmen der Landesforschungsinitiative „BioFabrication for NIFE“ solche Silica-Nanopartikel-basierenden Nanoträger für siRNAs entwickelt werden. Dabei galt die Fähigkeit mit den funktionalisierten Nanopartikeln siRNAs

in Zellen zu schleusen und eine RNA-Interferenz auszulösen, als Ziel. Eine Variation von Parametern wie Nanopartikelgröße, Oberflächenmodifizierung und Lipidformulierung sollte dazu beitragen, die Effizienz des entwickelten Freisetzungssystems zu optimieren.

Der letzte Teil dieser Arbeit widmet sich der Entwicklung eines prävascularisierten Implantats auf Fibrinbasis. Für gewöhnlich liegen Säugetierzellen nicht mehr als 100 μm von einem Blutgefäß entfernt, welches das Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und zum Entfernen von Stoffwechselprodukten beiträgt. Die Bildungsrate neuer Blutgefäße (Angiogenese) beläuft sich auf ca. 120 μm pro Tag. Größere Gewebeimplantate können deswegen anfangs unter einer unzureichenden Vaskularisierung leiden, da einwachsende Blutgefäße nicht schnell genug in das Innere vordringen können, um migrierte Zellen mit Sauerstoff zu beliefern. Dies kann zu Zellsterben führen und das Risiko eines Implantatversagens erhöhen.^[13–15] Ein Lösungsansatz besteht in der *in vitro*-Erzeugung vorgeformter, mikrovaskulärer Netzwerke in dem Ersatzmaterial. Nach der Implantation können sich einwachsende Blutgefäße des Wirts mit den bereits existierenden verbinden, sodass das gesamte Implantat zeitnah mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann. Das Überleben und die Einheilung des Implantats können damit entscheidend verbessert werden.^[16,17] Die Basis des geplanten Implantats soll ein dreidimensionales Gewebekonstrukt aus Fibrin bilden, das mit Kanälen versehen ist, in die Blutgefäß-bildende Endothelzellen ausgesät werden können. Zur Unterstützung der Prävascularisierung sollte ein Silica-Nanopartikel-basiertes Freisetzungssystem für den proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in das Fibrin eingearbeitet werden. Die Nanopartikel sollten den Wachstumsfaktor kontrolliert freigeben und somit einen VEGF-Gradienten erzeugen, der die Aussprossung von Endothelzellen in das Innere des Fibrins unterstützt. Diesbezüglich wird neben der Untersuchung der Immobilisierung und des Freisetzungsverhaltens von VEGF auch der Einfluss der VEGF-beladenen Nanopartikel auf die Kapillarbildung von Endothelzellen untersucht.

Das Gesamtziel der vorliegenden Arbeit besteht demnach in dem maßgeschneiderten Design von auf nanoporösen Silica-Nanopartikel-basierenden Freisetzungssystemen für zwei unterschiedliche Arten von Biomolekülen, siRNA und Protein, sowie den *in vitro*-Untersuchungen im Hinblick auf ihre Anwendung in der regenerativen Medizin.

2 Allgemeine Grundlagen

Im Fokus der vorliegenden Dissertation steht die Entwicklung eines Freisetzungssystems für zwei unterschiedliche Biomoleküle (siRNA und ein Protein, der Wachstumsfaktor VEGF). Das folgende Kapitel dient der Einführung in die thematischen Grundlagen dieses Forschungsbereichs. Zunächst werden nanoporöse Silica-Nanopartikel, die als Freisetzungsplattform dienen sollen, vorgestellt. Dabei werden relevante Aspekte für ihre biomedizinische Anwendung behandelt. In Hinblick auf eine angestrebte Freisetzung der siRNA innerhalb von Zellen wird außerdem explizit auf intrazelluläre *Drug Delivery*-Systeme mit Nanopartikeln als Basis eingegangen. Anschließend werden die beiden Arten von Biomolekülen betrachtet und der bisherige Forschungsstand hinsichtlich der Entwicklung von *Delivery*-Systemen für sie thematisiert.

2.1 Nanoporöse Silica-Nanopartikel

Pionierarbeiten für die Herstellung von monodispersen Nanopartikeln aus amorphem Siliciumdioxid (Silica) leisteten Stöber *et al.* Sie veröffentlichten 1968 eine effektive Methode zur Produktion von dichten Silica-Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 50 nm und 2 μm . Die Synthese beruhte auf einer kontrollierten Hydrolyse- und Kondensationsreaktion der Silica-Vorstufenverbindung Tetraethylorthosilicat (TEOS) in einem Wasser-Ethanol-Gemisch und unter Verwendung eines basischen Katalysators.^[18] Knapp 20 Jahre später, in den frühen 1990ern, wurde eine der ersten Synthesen zur Fertigung von nanoporösen Silica-Materialien von Forschern der Mobil Oil Company beschrieben. Sie verwendeten strukturdirigierende Agenzien als Templat, die nach ihrer Entfernung eine Nanostrukturierung generierten.^[19,20] Basierend auf diesen Entdeckungen modifizierten Grün *et al.* die sogenannte „Stöber-Synthese“, sodass 1997 erstmals über die Herstellung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) mit Durchmessern unter einem Mikrometer berichtet wurde.^[21,22]

Der Begriff „nanoporös“ umfasst dabei Materialien, die nach einer Definition der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) einen Porendurchmesser mit bis zu 100 nm besitzen.^[23] Wegen einer früheren IUPAC-Konvention, die poröse Materialien weiterhin nach ihrer Porengröße in mikroporös (< 2 nm), mesoporös (2–50 nm) und makroporös (> 50 nm) unterteilt, kann auch die Bezeichnung „mesoporös“ für diese Materialien in der Literatur gefunden werden.^[24]

Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften von nanoporösen Silica-Materialien, zu denen unter anderem eine hohe spezifische Oberfläche, ein hohes Porenvolumen sowie die Möglichkeit einer simplen Oberflächenmodifizierung bzw. -funktionalisierung gehören, hielten sie in den letzten Jahren Einzug in eine Vielzahl von Anwendungsbereichen.^[6,22] Dazu zählen die Adsorption^[25], Katalyse^[26], Chromatographie^[27] und Photochemie bzw. Optik^[28]. Darüber hinaus ermöglichen Charakteristika wie die generelle Biokompatibilität und Degradierbarkeit eine Verwendung im Bereich der Biomedizin

(vgl. Abschnitt 2.2).^[6] Seither wurden für einen zielgerichteten Einsatz neue Syntheserouten entwickelt, um die Partikelgröße, den Porendurchmesser, die Morphologie und die Oberflächeneigenschaften von nanoporösen Silica-Nanomaterialien den Anwendungen entsprechend anzupassen.

2.1.1 Synthese von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Eine Möglichkeit zur Herstellung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln ist die bereits erwähnte modifizierte Stöber-Synthese. Dabei kommen Tenside als strukturdirigierende Agenzien (SDAs) zum Einsatz, die als Templat für die Kondensation einer hydrolysierten Silica-Vorstufenverbindung wie TEOS dienen. Bei den Tensiden kann es sich um ionische Moleküle in Form von Alkanen mit polaren Kopfgruppen (z. B. Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB) oder um nicht-ionische Blockcopolymere wie Pluronic® F-127 handeln.^[25] In Abhängigkeit der SDA-Konzentration wird zwischen zwei Bildungsmechanismen unterschieden. Bei dem echten Flüssigkristall-Templat-Mechanismus muss die Tensidkonzentration so hoch sein, dass sich unter den gegebenen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert etc.) eine lyotrope Flüssigkristallphase aus Tensidmizellen ausbilden kann. Erst dann wird ein Silica-Präkursor hinzugegeben, und es findet eine Kondensation um die sich zuvor gebildeten Flüssigkristalle statt. Im Gegensatz dazu bildet sich beim Prozess der kooperativen Selbstorganisation eine flüssigkristalline Phase bereits bei geringen Tensidkonzentrationen durch Interaktion mit einer direkt zugesetzten Silica-Vorstufe aus.^[22,29] Um nanoporöses Silica zu erhalten, muss in beiden Fällen das strukturdirigierende Agens nach der Synthese entweder durch Calcination oder Extraktion entfernt werden.^[29,30] Das resultierende poröse Material besteht aus polykondensierten Siliciumdioxid-Tetraedern, die durch (Si–O–Si)-Bindungen miteinander verbunden sind. Zudem sorgt ein variierender Kondensationsgrad für reaktive Silanolgruppen ($\equiv\text{Si-OH}$) auf der Oberfläche.^[31]

Die Einstellung der Partikelgrößen, der Porengrößen und der Morphologien kann durch eine Abwandlung der Reaktionsbedingungen erfolgen. Zu den veränderbaren Parametern gehören die Konzentration der Reaktanden, die Synthesetemperatur, die Rührgeschwindigkeit, die Wahl der strukturdirigierenden Agenzien und des Katalysators sowie die Zugabe weiterer Additive.^[25,32,33] Ausgehend davon wurde eine Vielzahl von Synthesestrategien für die Herstellung der NPSNPs mit unterschiedlichen Eigenschaften entworfen, von denen eine Auswahl an dieser Stelle vorgestellt wird.

Die Partikelgröße kann je nach Syntheseroute einen Bereich von einigen zehn Nanometern bis zu einem Mikrometer umfassen.^[32] Über modifizierte Stöber-Synthesen lassen sich üblicherweise monodisperse Nanopartikel mit einem Durchmesser zwischen 30 nm und 500 nm herstellen. Kleinere Partikel können synthetisiert werden, indem die Hydrolyse- und Kondensationsreaktion durch Verdünnen der Reaktionslösung mit anschließender Neutralisation gequenchet wird.^[34] Um das Partikelwachstum zu begrenzen, können

aber auch zwei Tenside mit unterschiedlichen Affinitäten zum Silica zum Einsatz kommen. Beispielsweise benutzten Suzuki *et al.* neben einem ionischen Tensid zur Mizellenbildung ein neutrales Blockcopolymer zur Abschirmung der Oberfläche für die Herstellung nanoporöser Silica-Nanopartikel mit einer Größe von 20 nm bis 50 nm.^[35] Darüber hinaus können Additive wie Di- oder Triethanolamin^[36] sowie *L*-Lysin^[37] zur Kontrolle der Hydrolyse- und Kondensationsreaktion beitragen und somit zur Einstellung der Nanopartikelgröße herangezogen werden. Eine alternative Möglichkeit für die Beschränkung des Partikelwachstums besteht in der Verwendung von Mikroemulsionen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Lösungsmittel unter Zusatz von Tensiden als Stabilisator. Die sich dabei bildenden Tröpfchen aus inversen Mizellen können dann als Nanoreaktor zur Bildung von Nanopartikeln dienen.^[38]

Die Porengröße, die mit der Kettenlänge des verwendeten Tensides als SDA korreliert, liegt üblicherweise in einem Bereich von 2–10 nm.^[29,33] Durch die Zugabe von Quellungsmitteln wie 1,3,5-Trimethylbenzol kann der Porendurchmesser jedoch auf bis zu 23 nm vergrößert werden.^[39] Eine Alternative zur Erzeugung von größeren Poren besteht in der Nutzung von Polymeren wie Polystyrol als Templat.^[40]

Neben der Größe und dem Porendurchmesser kann die Morphologie der Silica-Nanopartikel variiert werden. In der Literatur können Synthesen für Partikel in Form von Stäbchen, Ellipsoiden, Plättchen oder Würfeln gefunden werden.^[25] Als Reservoir für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen werden auch hohle Silica-Nanopartikel untersucht.^[41]

2.1.2 Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln besteht in der Möglichkeit, über eine Modifizierung der Oberfläche die Eigenschaften der Nanopartikel der jeweiligen Anwendung entsprechend anzupassen. So kann beispielsweise durch das Einführen funktioneller Gruppen das Agglomerationsverhalten minimiert, die Beladungskapazität sowie die Freisetzung von Wirkstoffmolekülen eingestellt oder die Interaktion mit Zellen gesteuert werden.^[30,41] Des Weiteren können die aufgebrachtten Gruppen als Ankerpunkte für eine zusätzliche Modifizierung der Oberfläche mit Polymeren dienen.^[42] Für die Oberflächenmodifizierung werden häufig Trialkoxyorganosilane verwendet und bei der praktischen Durchführung kann generell zwischen zwei Ansätzen unterschieden werden: die Co-Kondensation und die *post-grafting*-Methode.^[32]

Bei der Co-Kondensation werden neben einem Silica-Präkursor simultan Trialkoxyorganosilane bei der Synthese verwendet, sodass die funktionellen Gruppen homogen verteilt in die Silica-Struktur eingebaut werden. Vorteile bietet zudem die Möglichkeit, den Kern und die äußere Hülle der Nanopartikel mit unterschiedlichen Gruppen zu modifizieren, indem mit Zeitverzögerung ein zweites Organoalkoxysilan zu der Reaktionsmischung ge-

geben wird.^[5] Zum Freilegen der Nanoporen, in die dann die funktionellen Gruppen ragen, muss zuletzt das SDA entfernt werden. Dies kann allerdings nur über eine Extraktion erfolgen, da eine Calcination bei hohen Temperaturen mit einer Zersetzung des organischen Anteils der funktionellen Gruppe einhergehen würde. Für eine Anwendung in der Biomedizin muss jedoch eine vollständige Extraktion gewährleistet sein, da Tenside schon in geringen Mengen eine zytotoxische Wirkung hervorrufen können.^[43] Von Nachteil ist auch der limitierte Funktionalisierungsgrad, da der Selbstorganisationsprozess zwischen Silica-Präkursor und dem SDA durch das Organosilan beeinflusst wird. Außerdem kann es angesichts unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten zu Homokondensationen der verschiedenen Vorläuferverbindungen und somit zu inhomogenen Verteilungen der funktionellen Gruppen kommen.^[29,30]

Bei dem *post-grafting*-Ansatz wird die Oberfläche erst nach der Nanopartikelsynthese in einem zusätzlichen Reaktionsschritt modifiziert. Dabei wird ausgenutzt, dass Silica-Oberflächen reaktive Silanolgruppen besitzen, an die Trialkoxyorganosilane oder Chlorosilane kovalent gebunden werden können. Gewöhnlich werden die zu modifizierenden nanoporösen Nanopartikel in einem trockenen Lösungsmittel wie Toluol dispergiert und unter Rückflußbedingungen mit zugesetzten Silanen unter Luftausschluß umgesetzt, um eine vorzeitige Hydrolyse sowie eine Selbstkondensation der Silane zu vermeiden.^[5] Wurde das strukturdirigierende Agens vor der Modifizierung nicht aus den Poren entfernt, kann die äußere und innere Oberfläche der Nanopartikel selektiv modifiziert werden. Dafür wird in einem ersten Schritt das Alkoxysilan nur an die äußere Oberfläche gebunden, während das Porensystem durch das vorhandene SDA blockiert wird. Nach einer Extraktion des SDAs stehen dann die freigelegten Silanolgruppen der inneren Porenoberfläche für eine zweite Modifizierung mit einem anderen Organosilan zur Verfügung.^[33] Bei der *post-grafting*-Methode bleibt die Nanostrukturierung der Partikel in der Regel erhalten. In Abhängigkeit der Größe und des Belegungsgrads der organischen Reste ist jedoch häufig eine Abnahme der Porosität zu verzeichnen, die auf das Auskleiden der Porenwände zurückzuführen ist.^[29] Des Weiteren kann es zu inhomogenen Verteilungen der funktionellen Gruppen kommen, verursacht durch Organosilane, die vornehmlich an der Porenöffnung reagieren und die Diffusion weiterer Moleküle in das Innere verhindern. Zuletzt können sich auch Homokondensate der Trialkoxyorganosilane, die sich bei hohen Konzentrationen der Organosilane oder bei Anwesenheit von Wasser bilden können, auf die Porenöffnungen legen und diese blockieren.^[29,30]

2.2 Biomedizinische Anwendung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Die Anpassungsfähigkeit der Eigenschaften zusammen mit einer generellen Biokompatibilität eröffnet nanoporösen Silica-Nanopartikeln einen vielfältigen Einsatz im Bereich der Biomedizin. Beispielsweise werden Silica-Nanopartikel als *Drug Delivery*-System für die kontrollierte Freisetzung von Biomolekülen oder Medikamenten erprobt. Darüber

hinaus wird an der Entwicklung von Silica-Nanopartikel-basierten Systemen für Biosensoren, das *Bioimaging* und die Theranostik geforscht.^[30,38,44] Im nächsten Unterkapitel wird auf das Degradationsverhalten sowie die Biokompatibilität von nanoporösen Silica-Nanopartikeln eingegangen, da die Pharmakokinetik von Nanomaterialien in engem Zusammenhang mit diesen Parametern steht.^[6] Anschließend wird anhand von ausgewählten Beispielen die Bandbreite der Funktionalisierungsmöglichkeiten von NPSNPs vorgestellt.

2.2.1 Degradation von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Im Hinblick auf eine Anwendung nanoporöser Silica-Nanopartikel im Bereich der Biomedizin spielt die Stabilität bzw. die Degradation in wässrigen und physiologischen Medien eine besondere Rolle. Das Abbauverhalten hat nicht nur einen großen Einfluss auf die Freisetzungskinetik von Biomolekülen und Wirkstoffen, sondern auch auf die Toxizität.^[44,45] Im Allgemeinen werden amorphe Silica-Nanopartikel zu wasserlöslicher Orthokieselsäure ($\text{Si}(\text{OH})_4$) abgebaut. Die Auflösung kann dabei in drei Schritte unterteilt werden, die in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt sind. Zuerst erfolgt eine Hydratisierung, bei der Wasser im Silica-Netzwerk adsorbiert wird. Anschließend findet eine Hydrolyse statt. Zuletzt wird nach dem nukleophilen Angriff eines Hydroxidions ein Kieselsäuremolekül abgespalten.^[46] *In vivo* würde dieses Molekül über den Blutstrom bzw. über das Lymphsystem diffundieren und über den Urin ausgeschieden werden.^[46–48]

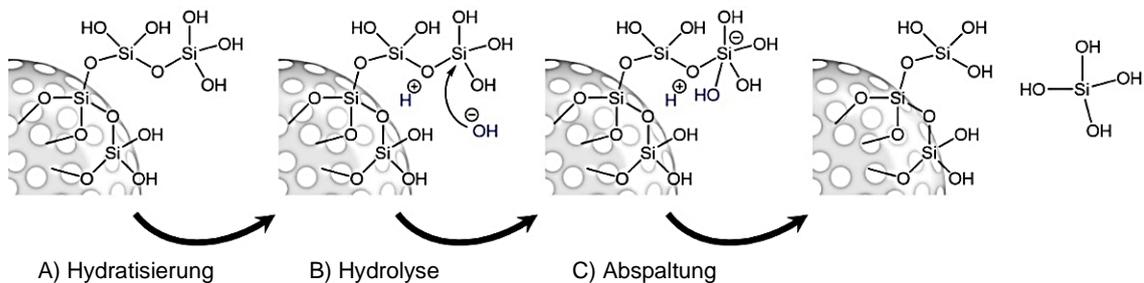


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Auflösungsprozesses von Silica-Nanopartikeln: A) Hydratisierung; B) Hydrolyse und C) Abspaltung (nach Lit.^[46]).

Der Abbau von Silica im wässrigen Milieu ist stark vom pH-Wert abhängig. Er nimmt unter alkalischen Bedingungen deutlich zu, während die Auflösung im Säuren wesentlich geringer ausfällt. Der Grund dafür ist eine zunehmende Deprotonierung der Silanolgruppen im Basischen gepaart mit einer verstärkten Hydrolyse der Si–O–Si-Bindungen, die durch nukleophile Angriffe der OH^- -Ionen katalysiert wird.^[49] Neben dem pH-Wert beeinflussen aber auch Parameter wie die Morphologie, die spezifische Oberfläche, die chemische Zusammensetzung, die Oberflächenfunktionalisierung, die beladenen Wirkstoffmoleküle, die Konzentration sowie die physiologische Umgebung den *in vitro*-Abbau von Silica-Nanopartikeln.^[45,46] Da all diese Einflüsse die Auflösungskinetik bestimmen, kann die vollständige Degradation einige Stunden bis hin zu Wochen oder Monaten um-

fassen, weswegen es für jede Nanopartikelsorte bzw. jedes System eigentlich einer separaten, möglichst anwendungsbezogenen Untersuchung bedarf.^[46,50] In Bezug auf einen Gebrauch in der Biomedizin lassen sich dennoch in der Literatur unzählige *in vitro*-Studien zum Degradationsverhalten finden, welche die einflussnehmenden Parameter beschreiben.

Generell führt eine höhere spezifische Oberfläche zu einer schnelleren Degradation, da der Kontakt mit der umgebenden Flüssigkeit größer ist. Der Durchmesser der Nanopartikel scheint hingegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.^[31] Dies legten unter anderem Yamada *et al.* dar, die den Abbau von Silica-Nanopartikeln mit gleicher spezifischer Oberfläche, aber Durchmessern zwischen 20 nm und 80 nm in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) unter statischen Bedingungen untersuchten und eine Größenunabhängigkeit feststellten.^[51] Ähnliche Befunde veröffentlichten auch Braun *et al.* in einer Studie zum Auflösungsverhalten von Silica-Nanopartikeln mit Größen zwischen 80 nm und 1 500 nm in verschiedenen simulierten Körperflüssigkeiten. Sie fanden heraus, dass im Gegensatz zum Partikeldurchmesser das Medium einen weitaus größeren Einfluss auf die Auflösung hat. Dabei ergab sich folgende Reihenfolge in Bezug auf die Auflösungsrate in den unterschiedlichen Medien: simulierte Lungenflüssigkeit (pH 7.4) > simulierte Körperflüssigkeit (*simulated body fluid*, SBF) (pH 7.25) \approx PBS (pH 7.4) > simulierte Magenflüssigkeit (pH 1.6). Nach Braun *et al.* beschleunigen in simulierter Lungenflüssigkeit hauptsächlich die organischen Säuren den Abbau, während der niedrige pH-Wert der Magenflüssigkeit für die vergleichsweise langsamen Prozesse verantwortlich ist.^[49]

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Auflösung ist die Nanopartikelkonzentration, da die Sättigungskonzentration von amorphem Silica bei neutralen Bedingungen und 25 °C bei ~ 115 ppm (~ 0.1 mg mL⁻¹) liegt.^[45,47] Den Zusammenhang zwischen Konzentration und Degradation untersuchten He *et al.*, indem sie Degradationsversuche mit NPSNPs (200–300 nm) in SBF bei 37 °C und Partikelkonzentrationen zwischen 0.1 mg mL⁻¹ und 0.5 mg mL⁻¹ durchführten. Sie fanden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Auflösungsgeschwindigkeit, nachdem das gelöste Siliciumdioxid mittels induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma*, ICP) quantifiziert wurde. Die am stärksten verdünnten Partikel lösten sich innerhalb von drei Stunden zu über 90 %, wohingegen nur 35 % bei der höchsten Konzentration degradiert waren.^[48] Derartige Beziehungen publizierten auch Möller *et al.*, wobei sie die konzentrationsabhängige Auflösung an Silica-Nanopartikeln, die mittels Co-Kondensation mit Amino- und Thiolgruppen modifiziert waren, analysierten.^[45]

Eine Oberflächenmodifizierung wirkt sich generell auf die Degradationskinetik aus. Cauda *et al.* verglichen diese von unmodifizierten mit verschiedenen modifizierten Silica-Nanopartikeln mit einer Konzentration von 2 mg mL⁻¹ in SBF. Es stellte sich heraus, dass besonders die mit Polyethylenglycol(PEG)-modifizierten Nanopartikel eine langsamere

Abbauraten besaßen.^[52] Allerdings scheint die Verlangsamung bei geringeren Konzentrationen nicht signifikant zu sein. In einer Studie aus dem Jahr 2019 zeigten Möller *et al.*, dass bei einer Konzentration von 0.1 mg mL^{-1} trotz PEGylierung bereits nach 4 h ein Auflösungsgrad zwischen 60 % und 75 % erreicht werden konnte.^[45] Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt für eine Anwendung in biologischen Systemen ist die Anwesenheit von Proteinen bzw. die Bildung einer Proteinkorona (vgl. Abschnitt 2.2.2) und ihr Einfluss auf die Degradation. Beispielsweise demonstrierten Experimente zum Auflösungsverhalten in fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) eine deutliche Reduktion der Abbauraten der untersuchten Silica-Nanopartikel.^[45]

Die vorgestellten Studien verdeutlichen, dass das exakte Auflösungsvermögen von nanoporösen Silica-Nanopartikeln besonders in biologischer Umgebung schwer vorherzusagen ist, da eine Reihe unterschiedlicher Parameter dieses beeinflusst. Es sind deshalb noch weitere Untersuchungen nötig, um das Degradationsverhalten von NPSNPs zu beurteilen und letztendlich kontrollieren zu können.^[45]

2.2.2 Biokompatibilität von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Der Begriff „Biokompatibilität“ ist in der Biomaterialwissenschaft weit verbreitet, jedoch sind seine Bedeutung und die Reaktionen, die die Biokompatibilität eines Materials ausmachen, bisher nicht eindeutig definiert.^[53] Eine allgemeine Definition beschreibt die Biokompatibilität als die Fähigkeit eines Materials, mit einer geeigneten Wirtsreaktion in einer bestimmten Anwendung zu fungieren („*the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application*“).^[53] Dies impliziert, dass die Biokompatibilität im Hinblick auf den exakten Einsatzort, in dem ein Biomaterial verwendet wird, betrachtet werden muss, womit „biokompatibel“ keine universelle Eigenschaft eines Materials ist.^[54] In Bezug auf Silica-Nanopartikel spezifizierten Tang *et al.* die allgemeine Wortklärung und inkludierten alle schädlichen und vorteilhaften biologischen Wirkungen, die durch die Partikel verursacht werden. Darunter fallen sowohl die Zytotoxizität und die *in vivo*-Toxizität als auch jegliche Veränderungen von Zellen und Gewebe auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene.^[55]

Die *in vitro*-Toxizität von NPSNPs auf Zellen kann hauptsächlich auf zwei Ursachen zurückgeführt werden.^[50] Zum einen können die freien Silanolgruppen auf der Partikeloberfläche Wasserstoffbrücken bzw. deprotonierte Silanolgruppen elektrostatische Wechselwirkungen mit Membrankomponenten eingehen und dadurch die Lyse, d. h. das Sterben der Zelle durch Beschädigung der Zellmembran, hervorrufen.^[50,56] Zum anderen kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) auf der Silicaoberfläche kommen.^[57] Diese können in geringen Konzentrationen die Produktion von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren hochregulieren sowie die Mutagenese fördern. Hohe ROS-Konzentrationen führen schließlich den Zelltod herbei.^[50,56] Doch

genau wie auf die Degradation haben die Konzentration, die Partikelgröße und -morphologie, die Porosität sowie die Oberflächeneigenschaften wie Modifizierung und Funktionalisierung einen Einfluss auf die Toxizität bzw. die Verträglichkeit. Darüber hinaus ist die Kompatibilität auch vom Zelltyp abhängig, was allgemeine Aussagen schwierig macht.^[58,59]

Viele *in vivo*-Studien zur Untersuchung der Pharmakokinetik und der Verteilung von Silica-Nanopartikeln im Organismus wurden an Mäusen (durch intravenöse Injektion einer Partikellösung) durchgeführt.^[60] Es zeigte sich, dass kleine Nanopartikel mit einem Durchmesser bis ca. 5 nm überwiegend über die Nieren (renales System) mit dem Urin ausgeschieden werden.^[46] Partikel, die größer als 10 nm sind, werden dagegen innerhalb von Minuten bis Stunden von phagozytierenden Zellen des Immunsystems aufgenommen und reichern sich zuerst in Organen wie Leber und Milz an, bevor es zur Exkretion kommt.^[57,61]

Im Blut sind über tausend verschiedene Proteine vorhanden, die sich in ihrer Konzentration um bis zu zwölf Größenordnungen unterscheiden. Direkt nach der Injektion von Partikeln adsorbieren eine Vielzahl dieser Serumproteine auf der Partikeloberfläche. Die sich dabei ausbildende Proteinkorona verändert nicht nur die Größe eines Nanopartikels, sondern verleiht ihm auch eine neue biologische Identität, die Auswirkungen auf physiologische Reaktionen wie Zellaufnahme, Zirkulationslebensdauer, Transport, Akkumulation und Toxizität hat.^[62,63] Beispielsweise erhöhen einige der adsorbierten Proteine (u. a. Opsonine) die Erkennung durch Zellen des Immunsystems. Dadurch werden die Partikel zügig aus der Blutbahn entfernt und ihre Zirkulationsdauer verkürzt sich. Betroffen davon sind überwiegend Nanopartikel mit positiver Oberflächenladung oder mit hydrophobem Charakter.^[62] Im Vergleich dazu kann eine PEGylierung der Nanopartikeloberfläche die Affinität gegenüber Plasmaproteinen verringern, eine Opsonierung eindämmen und die Zirkulationsdauer erhöhen.^[61] Die Struktur und Zusammensetzung der Proteinkorona wird von den physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel (Größe, Form, funktionelle Oberflächengruppen und Oberflächenladungen, Hydrophobizität etc.) bestimmt. Da neben den Eigenschaften der Nanopartikel auch Parameter wie die physiologische Umgebung und die Expositionsdauer die Zusammensetzung der Proteinkorona ausmachen, ist es schwierig, die Auswirkungen von nanoporösen Silica-Nanopartikeln in biologischen Systemen (besonders *in vivo*) exakt vorherzusagen.^[61] Es sind deswegen weitere Studien erforderlich, die für ein tiefergehendes Verständnis hinsichtlich der Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und Bestandteilen der physiologischen Umgebung sorgen. Dieser Komplexität ist es auch geschuldet, dass trotz einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Studien bisher keine klinischen Studien mit nanoporösen Silica-Nanopartikeln durchgeführt wurden.^[30,45] Grundsätzlich wird Silica von der FDA mit der Bezeichnung „GRAS“ (*generally recognized as safe*), also generell als sicher eingestuft, und es wird bereits als Lebensmittelzusatzstoff und in Kosmetika verwendet.^[57] Zudem

wurden 2014 erstmals multifunktionale Silica-Nanopartikel als Bildgebungshilfe für Tumore für eine klinische Phase I-Studie von der FDA zugelassen.^[64] Bei den verwendeten „Cornell-Punkten“ (C-Dots) handelt sich um kleine (6–7 nm), nicht poröse Silica-Nanopartikel, die mit einem Fluorophor markiert und einer PEG-Beschichtung zur Erhöhung der Zirkulationsdauer im Organismus versehen wurden. Zusätzlich sind sie mit Iod(I^{124})-markierten Peptiden ausgestattet, die zur Visualisierung mittels Positronen-Emissions-Tomographie dienen sowie als *Targeting*-Ligand fungieren sollen.^[64,65]

Dieses Beispiel zeigt einerseits die erste praktische Anwendung von Silica-Nanopartikeln in der Biomedizin, andererseits verdeutlicht es, wie die Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln zielgerichtet angepasst werden kann. Im nächsten Abschnitt werden deshalb weitere Möglichkeiten für eine Funktionalisierung vorgestellt.

2.2.3 Funktionalisierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln für biomedizinische Anwendungen

In den letzten Jahrzehnten der Forschung wurden enorme Anstrengungen unternommen, um für eine Vielzahl biomedizinischer Anwendungen multifunktionale Trägersysteme mit nanoporösen Silica-Nanopartikeln als Basis zu entwickeln.^[66] Neben dem *Drug Delivery* umfasst ihr Einsatz biomedizinische Bereiche wie die Bildgebung und die Diagnostik. Um für jedes dieser Gebiete eine maximale Effektivität zu gewährleisten, bedarf es einer Einstellung der Eigenschaften, was über gezielte Modifizierung bzw. Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel erreicht werden kann. In Abbildung 2.2 ist eine Auswahl der Optionen dargestellt. Abschnitt 2.1 thematisierte bereits die Auswahlmöglichkeiten bei der Synthese und der Oberflächenmodifizierung, wodurch physikochemische Eigenschaften eingestellt werden können. An dieser Stelle werden einige generelle Funktionalisierungsoptionen vorgestellt, die sich zum anwendungsspezifischen Design von Silica-Nanopartikeln anbieten und miteinander kombiniert werden können, um die Effektivität der Systeme zu erhöhen.

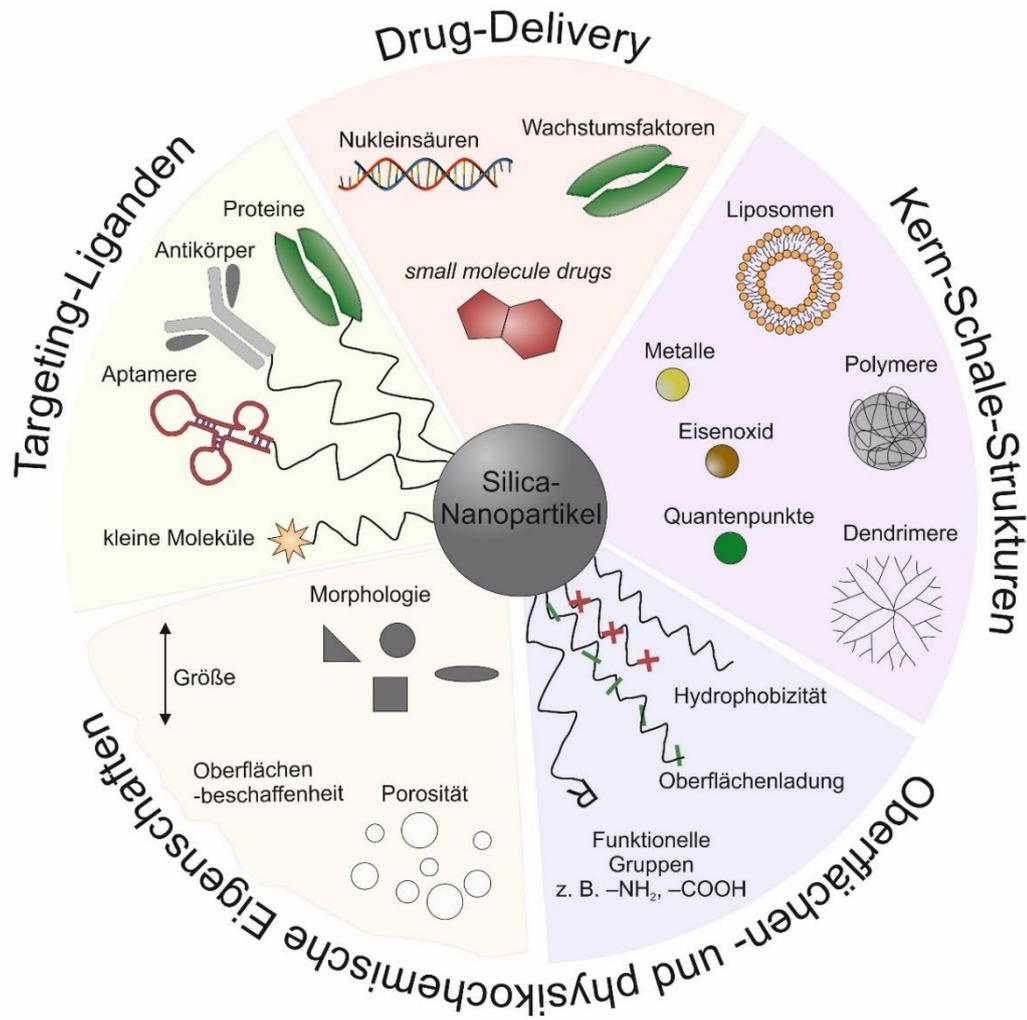


Abbildung 2.2: Illustration der vielseitigen Möglichkeiten zur Einstellung der Eigenschaften sowie der Funktionalisierung von Silica-Nanopartikeln, die sich durch Kombination zum anwendungsspezifischen Design anbieten (nach Lit.^[67] mit CoreDRAW erstellt).

Um 2001 wurden nanoporöse Silica-Nanopartikel erstmals als Träger für den Transport und die Freisetzung von Therapeutika vorgeschlagen. Vallet-Regi *et al.* untersuchten damals die Einlagerung von Ibuprofen, einem entzündungshemmenden Medikament, in nanoporöse Silica-Materialien mit unterschiedlichen Porengrößen sowie die dazugehörige *in vitro*-Freisetzung.^[68] Seitdem wurde das Konzept, nanoporöse Silica-Materialien als *Drug Delivery*-Plattform zu nutzen, weiterentwickelt und auf eine Vielzahl kleiner Moleküle (u. a. *small molecule drugs* wie Doxorubicin^[69], Gentamicin^[70], Aspirin^[71]) und größerer Biomoleküle (Nukleinsäuren^[72] oder Proteine^[73]) übertragen.^[55] Die zur Beladung am häufigsten verwendete Methode ist die physikalische Adsorption dieser Moleküle in den Poren und/oder auf der Oberfläche der NPSNPs. Dazu werden die Partikel für einen bestimmten Zeitraum mit einer konzentrierten Wirkstofflösung inkubiert.^[74] Aufgrund der großen Oberfläche, des großen Porenvolumens und der einstellbaren Porengrößen können mit nanoporösen Silica-Nanopartikeln hohe Beladungskapazitäten erzielt

werden. Die Adsorption kann begünstigt werden, wenn die Oberfläche mit Funktionalitäten wie Carbonsäuren, Aromaten oder Aminen modifiziert wird, sodass zusätzliche Adsorbat/Adsorbens-Interaktionen z. B. über Wasserstoffbrückenbindung, elektrostatische, aromatische oder hydrophobe Wechselwirkungen bereitstehen.^[75] Neben der Beladungsmenge wird durch die Modifikationen aber auch die Freisetzungskinetik beeinflusst. In den meisten Fällen sind die Wechselwirkungen nicht stark genug, um die Freisetzung der aufgenommenen Moleküle zu verhindern, bevor die Partikel den Einsatzort erreichen.^[6,75] Durch weitere Modifizierungen kann dann die Freigabe gesteuert sowie die Fracht vor äußeren Einflüssen geschützt werden. Zum Beispiel ist dies über eine Umhüllung der Partikel mit Polymeren oder Dendrimeren realisierbar.^[76] Eine weitere Strategie ist die Einkapselung der Partikel in ein Liposom. Letzteres besteht aus amphiphilen Lipiden, die sich in wässriger Lösung und oberhalb der kritischen Vesikelkonzentration spontan zu einer oder mehreren Lipiddoppelschichten zusammenlagern und hydrophile Substanzen in ihrem Inneren einschließen können.^[77] Um über reversibles Öffnen und Schließen von Porenöffnungen die Freisetzung durch Reize gezielt zu kontrollieren, können auch Stimuli-Response-Systeme eingeführt werden.^[44,78] Dabei wird zwischen internen Stimuli, u. a. pH-Wert oder Redoxpotential, und äußeren Stimuli wie Magnetfeldern, Ultraschall oder Licht unterschieden.^[44]

Die Bildgebungsmöglichkeiten mit NPSNPs reichen von der optischen Mikroskopie über die Magnetresonanztomographie (MRT) bis hin zur Ultraschallbildgebung und anderen Techniken. Für die optische Mikroskopie und ihre Anwendbarkeit zur Echtzeitbeobachtung von Nanopartikelsystemen in Zellkulturen und Geweben können die Nanopartikel mit fluoreszierenden Farbstoffen wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ausgestattet werden.^[78] Da die Detektionszeit damit aber aufgrund einer geringen Fluoreszenzlebensdauer und durch das Ausbleichen des Farbstoffes begrenzt ist, können die Partikel alternativ einen Kern aus fluoreszierenden Quantenpunkten (z. B. aus Cadmiumsulfid oder Cadmiumselenid) besitzen.^[41]

Mit dem Einbau eines magnetischen Kerns, hauptsächlich Eisenoxid-Nanopartikel, können Silica-Nanopartikel als Kontrastmittel bei der MRT zum Einsatz kommen.^[79] Außerdem bietet sich die Option, die mit einem Wirkstoff beladenen nanoporösen Silica-Nanopartikel mithilfe eines externen Magnetfelds in bestimmte Körperregionen zu lenken.^[80] Eine unzureichende Zielselektivität beim Transport von Arzneimitteln mit Silica-Nanopartikeln kann unerwünschte Nebenwirkungen verursachen und die therapeutische Wirksamkeit verringern.^[78] Ein Ansatzpunkt, um dem entgegenzuwirken, ist das aktive *Targeting*, die Erkennung und selektive Bindung an bestimmte Zelloberflächenrezeptoren mit spezifischen Liganden auf der Außenseite der Nanopartikel. In der Literatur wird über Liganden wie Folsäure^[81] und den epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF)^[82] berichtet, aber es werden auch kurze Peptidsequenzen, Antikörper und Aptamere erprobt. Üblicherweise werden die Liganden kovalent über lange Spacer, z. B.

PEG-Ketten, an der äußeren Oberfläche verankert. Eine solche Verknüpfung bietet eine hohe Flexibilität, die zu einer effizienten Bindung der Liganden an die Zellmembranrezeptoren führt. Die größte Herausforderung dieser zielgerichteten Nanoträger besteht allerdings darin, gleichzeitig eine hohe *Targeting*-Spezifität zu erzielen und eine unspezifische Bindung und Aktivierung immunogener Effekte zu vermeiden.^[78]

Die Beispiele zeigen, dass sich über das Zusammenfügen bzw. Integrieren eines oder mehrerer der vorgestellten Optionen in Kombination mit Biomolekülen und/oder Medikamenten multifunktionale Nanosysteme auf Basis von Silica-Nanopartikeln für eine Reihe von Anwendungen im biomedizinischen Bereich entwickeln lassen.^[83]

2.3 Intrazelluläres Drug Delivery

Für einige Anwendungen ist es notwendig, dass ein Wirkstoff innerhalb von Zellen freigesetzt wird. Um dafür effiziente und sichere Nanosysteme zu entwickeln, ist ein Verständnis über den Mechanismus der Zellaufnahme und die beeinflussenden Parameter erforderlich.^[84]

2.3.1 Zellaufnahme von (Silica-)Nanopartikeln

Nanopartikel werden über den Mechanismus der Endozytose ins Zellinnere aufgenommen. Dabei wird in Abhängigkeit der physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel und der Zellart grundlegend zwischen zwei Hauptinternalisierungswegen unterschieden: die Phagozytose und die Pinozytose (Abbildung 2.3).^[66,84–86]

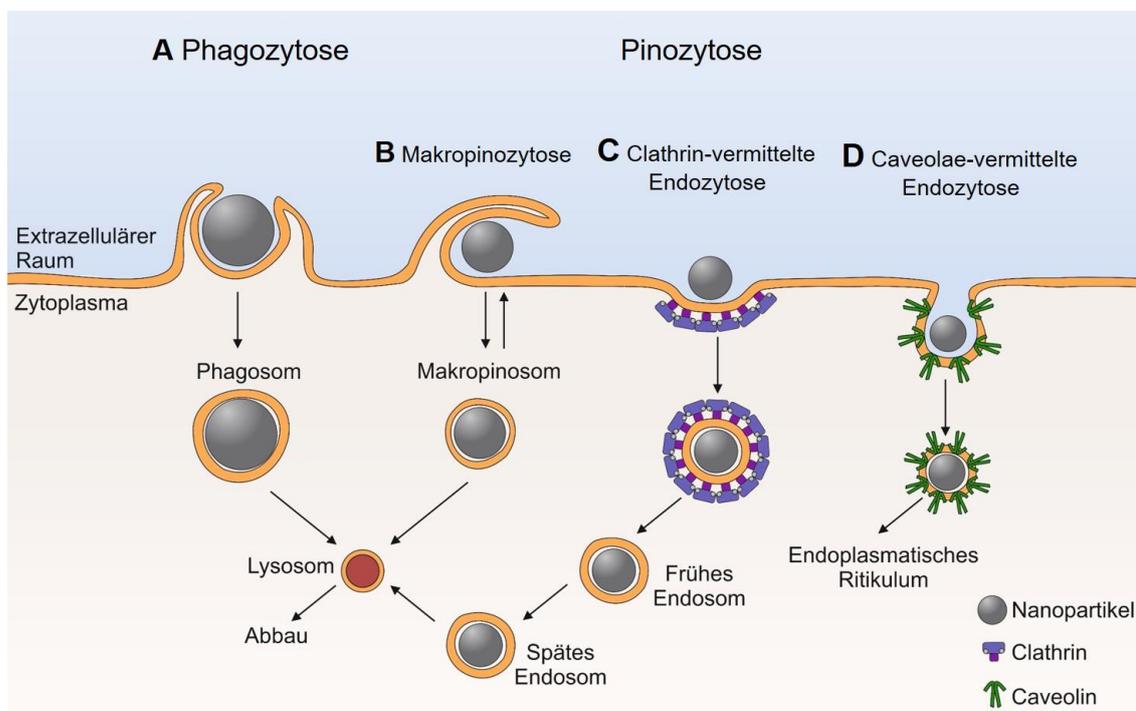


Abbildung 2.3: Zellaufnahmewege von Nanopartikeln: A) Phagozytose; B) Makropinozytose; C) Clathrin-vermittelte Endozytose und D) Caveolae-vermittelte Endozytose (nach Lit.^[67,85,87] mit CorelDRAW erstellt).

Bei der Phagozytose (Abbildung 2.3 A) werden hauptsächlich Partikel mit einem Durchmesser größer als 500 nm aufgenommen. Sie tritt vornehmlich bei spezialisierten Zellen auf, sogenannten Phagozyten wie Makrophagen oder Monozyten, die im Organismus eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung von Krankheitserregern, Zelltrümmern sowie anderen Fremdkörpern spielen.^[85-87] Die Aufnahme wird initialisiert, sobald ein Partikel durch Bindung an einen Oberflächenrezeptor (üblicherweise über Opsonine) von einem Phagozyten erkannt wurde. Die Plasmamembran bildet daraufhin becherförmige Vorsprünge (Pseudopodien) aus, die das Partikel umschließen. Nach dem Verschmelzen ihrer Enden ist ein Phagosom entstanden, das nach innen abgeschnürt wird. Die anschließende Verdauung findet durch Fusion mit Lysosomen statt. Dabei handelt es sich um membranumhüllte Kompartimente mit einem inneren pH-Wert zwischen 4 und 5, welche eine Enzymmischung aus Proteasen, Lipasen und Nukleasen für die intrazelluläre Verdauung enthalten.^[14,66,88]

Im Gegensatz zur Phagozytose tritt der Mechanismus der Pinozytose bei allen Zellarten auf. Er kann je nach Größe des entstandenen Endosoms (Vesikel, das sich nach der Endozytose bildet) und der an der Vesikelbildung beteiligten Proteine in die folgenden Untergruppen kategorisiert werden: die Makropinozytose, die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolae-vermittelte Endozytose und andere Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytosen.^[66,67,89,90]

Die Makropinozytose ist ein Prozess, welcher kontinuierlich in stark gekräuselten Regionen der Zellmembran abläuft.^[89] In einem der Phagozytose ähnelnden Mechanismus werden hierbei zunächst Membranausstülpungen gebildet, die das umliegende Medium mit einem gegebenenfalls enthaltenen Partikel umschließen können. Wenn eine solche Ausstülpung mit der Zellmembran kollabiert und mit dieser verschmilzt, entsteht ein Vesikel, das als Makropinosom bezeichnet wird und einen Durchmesser zwischen 0.2 μm und 5 μm besitzen kann (Abbildung 2.3 B).^[85,91] Im Allgemeinen folgt nach der Zellaufnahme entweder ein Abbau des Makropinosoms durch Fusion mit Lysosomen oder eine Exozytose, bei der das Vesikel zur Zelloberfläche zurücktransportiert und wieder ausgeschleust wird.^[85]

Die Clathrin-vermittelte Endozytose tritt typischerweise in Membranregionen auf, die mit dem zytosolischen Protein Clathrin angereichert sind. Seine dreibeinartige (triskenförmige) Struktur ermöglicht die Ausbildung korbartiger Vertiefungen durch gitterartige Zusammenlagerung direkt auf der zytosolischen Seite der Zellmembran.^[85] Während der Zellaufnahme eines Partikels wächst das Gitter um die Einstülpung. Nach dem Abtrennen von der Membran ist ein Clathrin-bedecktes Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu 120 nm entstanden (Abbildung 2.3 C).^[66,86,87] Eine Aufnahme über diesen Weg kann durch spezifische Liganden wie Lipoproteine niedriger Dichte, Transferrin, Insulin oder den epidermalen Wachstumsfaktor induziert werden.^[87] Nach dem Eintritt in die Zelle wird das Endosom weiter über eine endolysosomale Route von der Zelle prozessiert. Sie

beginnt mit dem frühen Endosom, dessen innerer pH-Wert zunehmend sauer wird, da Protonenpumpen in der Membran für eine Akkumulation von H^+ -Ionen im Inneren des Vesikels sorgen. Es reift zu einem späten Endosom mit einem pH-Wert zwischen 5 und 6 heran. Nachfolgend fusioniert das späte Endosom mit Lysosomen und wird bei pH 4–5 von der Zelle verdaut.^[66] Um eine Degradation eines mit Biomolekülen beladenen Nanopartikels zu verhindern, muss ein Entkommen aus dem Endosom gewährleistet werden. Diesbezüglich werden Strategien in Abschnitt 2.3.3 vorgestellt.

Bei der Caveolae-vermittelten Endozytose werden Nanopartikel über Caveolae aufgenommen (Abbildung 2.3 D). Dabei handelt es sich um kolbenförmige Membraneinstülpungen in einem Größenbereich von 50–100 nm, die mit dem dimeren Protein Caveolin dekoriert sind.^[66,85] Folsäure, Albumin und Cholesterin gehören zu Liganden, die diesen Mechanismus initialisieren können.^[85,92] Verglichen mit der Clathrin-vermittelten Endozytose ist die Aufnahmekinetik der Caveolae-vermittelten Endozytose deutlich langsamer. Darüber hinaus unterscheiden sich auch die Abbauewege der entstandenen Endosomen. Während bei der Clathrin-vermittelten Endozytose eine endolysosomale Route eingeschlagen wird, durchläuft ein Caveolin-bedecktes Endosom unter neutralem pH-Wert Zellorganellen wie das Endoplasmatische Retikulum.^[90] Eine Degradation über den endolysosomalen Weg kann nach aktuellem Stand der Forschung allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.^[85,92] Intrazelluläres *Drug Delivery* mit Nanopartikeln, die die Caveolae-vermittelte Endozytose nutzen, kann vorteilhaft sein, wenn das getragene Biomolekül gegenüber Säuren oder einer enzymatischen Degradation empfindlich ist und der endolysosomale Abbaueweg umgangen werden soll.^[85]

Neben den vorgestellten Internalisierungswegen gibt es noch weitere, deren vollständiger Mechanismus noch aufgeklärt werden muss, und auf die nicht näher eingegangen wird.^[86,93] Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der physikalischen Membranpenetration zur Einschleusung von Nanopartikeln in Zellen. Zu diesen Methoden gehören Mikroinjektion und Elektroporation.^[66,67]

2.3.2 Einflussparameter der Zellaufnahme

Die Endozytose von Nanopartikeln ist ein komplexer Prozess, der von vielen Parametern beeinflusst wird. Häufig tritt mehr als nur einer der Wege in die Zelle auf, wobei die exakten Mechanismen derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt sind.^[88]

Die Abhängigkeit der Partikelgröße auf die zelluläre Aufnahme von nanoporösen Silica-Nanopartikeln analysierten unter anderem Lu *et al.* An HeLa-Zellen bestimmten sie nach einer fünfstündigen Inkubation über ICP den Siliciumgehalt der Zellen und fanden folgende Größenabhängigkeit der Aufnahmemengen: 50 nm > 30 nm > 110 nm > 280 nm. Dabei war die zelluläre Internalisierung der 50 nm-Partikel etwa 2.5-mal höher als die der 30 nm-Partikel.^[94] Auch andere Studien mit Nanopartikeln aus Gold^[95] oder Quantenpunkten^[96] zeigen den Trend, dass Partikel mit Ausmaßen von 50 nm die höchsten

Zellaufnahmeraten aufweisen.^[66] Begründet werden kann dieser Befund damit, dass Partikel dieser Größe durch Bindung an eine ausreichende Anzahl an Rezeptoren eine Membranhülle induzieren können. Größere Partikel interagieren dagegen mit deutlich mehr Rezeptoren, sodass durch einen lokalen Rezeptormangel nach der Aufnahme die Bindung weiterer Nanopartikel limitiert wird.^[57,61]

Hinsichtlich der Morphologie von Silica-Nanopartikeln zeigen verschiedene Studien, dass bei Partikeln mit einer Größe über 100 nm Stäbchen höhere Zellaufnahmeraten besitzen als Kugeln.^[84,97] Allerdings können sich die Endozytosewege für Partikel mit verschiedenen Morphologien unterscheiden, was wiederum einen Einfluss auf die beteiligte Kinetik hat (vgl. Abschnitt 2.3.1). Beispielsweise verglichen Herd *et al.* die Zellaufnahmemechanismen von stäbchenförmigen mit sphärischen Silica-Nanopartikeln an Makrophagen. Es zeigte sich, dass kugelförmige Nanopartikel bevorzugt über die Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wurden, während bei den stäbchenförmigen Nanopartikeln aufgrund ihrer Ausmaße die Makropinozytose bzw. die Phagozytose stattfand.^[98] Unterdessen deuten Untersuchungen mit Gold-Nanopartikeln unter 100 nm darauf hin, dass Kugeln gegenüber Stäbchen doch einen Vorteil in Bezug auf die Zellaufnahmeraten aufweisen.^[95,99] Dies verdeutlicht die Komplexität der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Zellen und es bedarf weiterer Forschung zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen.

Neben der Größe und der Morphologie der Nanopartikel bestimmt die Oberflächenladung die Zellaufnahme. Da eine Zellmembran üblicherweise leicht negativ geladen ist, wird angenommen, dass positiv geladene Partikel, begünstigt durch elektrostatische Wechselwirkungen, schneller aufgenommen werden als neutrale oder negativ geladene Partikel.^[57] Allerdings muss in einer physiologischen Umgebung berücksichtigt werden, dass sich um die Nanopartikel eine Korona aus Serumproteinen, Opsoninen (Proteine zur Induktion der Phagozytose) und Ionen bildet. Diese verleiht den Partikeln u. a. durch Veränderung der Größe und der Ladung eine neue biologische Identität, wodurch wiederum die Zellaufnahme und -toxizität beeinflusst wird.^[57] Letztendlich sind die Effektivität und der Mechanismus der Zellaufnahme von Nanopartikeln auch vom Zelltyp abhängig, sodass allgemeingültige Aussagen nicht zu treffen sind.^[66,100]

2.3.3 Strategien zum endosomalen *Escape*

Beim intrazellulären *Drug Delivery* werden Nanopartikel verwendet, um Therapeutika in Zellen zu schleusen und dort gezielt freizusetzen. Unabhängig von dem Initialisierungsmechanismus sind nach der Endozytose die beladenen Nanopartikel von einer Lipiddoppelschicht umhüllt in einem Endosom eingekapselt.^[100] Bei Medikamenten, die wie das Krebstherapeutikum Doxorubicin Zellwände passieren können, ist das Entkommen aus dem Endosom, der sogenannte „endosomale *Escape*“ (EE), nur bedingt entscheidend für die Wirkung nach der Zellaufnahme. Diese Arzneistoffe benötigen vielmehr ein Mittel

zur Verhinderung einer vorzeitigen Freisetzung aus dem Nanoträger, um eine globale Verteilung im Organismus zu vermeiden. Im Gegensatz dazu besitzen eine große Anzahl molekularer und makromolekularer Therapeutika einschließlich siRNA eine unzureichende Membranpermeabilität. Für eine intrazelluläre Freisetzung muss deswegen das nanopartikuläre Trägersystem so designt sein, dass ein endosomaler *Escape* gewährleistet wird. Erst über den endosomal *Escape* kann der Wirkstoff in das Zytoplasma abgegeben werden und wird nicht mittels Lysosomen verdaut.^[78]

Zur Induktion des EE gibt es eine Reihe postulierter Mechanismen.^[101] Eine Hypothese beinhaltet den sogenannten „Protonenschwammeffekt“ (*proton sponge effect*). Beim Durchlaufen der endolysosomalen Route, nach Eintritt eines Partikels in die Zelle, sinkt der pH-Wert des Vesikels nach der Fusion mit Lysosomen bis auf pH 4–5, und diese pH-Wert-Änderung kann zur Induktion des EE ausgenutzt werden. Besitzt eine Komponente des *Drug Delivery*-Systems eine gewisse Pufferkapazität, müssen zur Erniedrigung des pH-Wertes vermehrt Protonen in das Endosom gepumpt werden. Um die Elektroneutralität aufrecht zu erhalten, ist die Akkumulation der positiven Ladungen mit einem passiven Zustrom von Chloridanionen verbunden. Der starke Anstieg der Ionenkonzentration innerhalb des Endosoms führt gleichzeitig zum Einströmen von Wassermolekülen, woraus eine osmotische Schwellung und ein anschließender Membranbruch resultiert.^[101,102]

Kationische Polymere mit vielen Aminogruppen, welche eine beträchtliche Pufferkapazität besitzen, werden deswegen in Form von Nanopartikeln zum intrazellulären *Drug Delivery* verwendet. Durch die Abstoßung zwischen den protonierten Aminogruppen wird die Schwellung des Endosoms zusätzlich gefördert.^[103] Außerdem können einige kationische Polymere direkt mit der Endosomenmembran interagieren und somit die Ausbildung von Poren induzieren, durch die der Wirkstoff ins Zytoplasma gelangt.^[101,104] Zur Unterstützung des Protonenschwammeffekts können auch Chemikalien wie Chloroquin oder Methylamin im *Drug Delivery*-System integriert werden.^[102]

Neben Polymeren werden häufig Liposomen zur Einkapselung von Therapeutika und anschließender intrazellulärer Freisetzung verwendet. Für Nukleinsäuren wie siRNAs werden bei ihrer Formulierung üblicherweise kationische Lipide verwendet, die über elektrostatische Wechselwirkungen ein Lipoplex bilden. Lipoplexe sind nach der Zellaufnahme ebenfalls von einer Endosomenmembran umgeben.^[104] Hier spielt der Protonenschwammeffekt beim EE allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr kommt es durch die Wechselwirkung der kationischen Lipide mit den anionischen Phospholipiden aus der Endosomenmembran zur Ausbildung von Ionenpaaren, woraus eine Konformationsänderung der Lipide resultiert. Diese sorgt für eine Destabilisierung der Membran und eine Freisetzung der Fracht in das Zytoplasma wird ermöglicht. Die Effektivität des EE kann durch die Kombination mit Helferlipiden erhöht werden, da diese ebenfalls einer Konformationsänderung unterliegen und den destabilisierenden Effekt verstärken.^[104–106]

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion eines endosomalen *Escapes* ist die Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden. Diese zeichnen sich durch eine hohe positive Ladung und Amphiphilität aus, die auf große Anteile basischer bzw. unpolarer Aminosäuren zurückzuführen ist (z. B. Lysin und Arginin bzw. Tryptophan und Phenylalanin). Es wird angenommen, dass zellpenetrierende Peptide über die Fusion mit oder durch Erzeugen von Poren in der Zellmembran internalisiert werden. Der genaue Mechanismus ist jedoch weiterhin umstritten.^[105,107]

Neben der Ausnutzung des pH-Wertes zur Induktion des EE kann auch ein äußerer Stimulus für die Zerstörung der Endosomenmembran genutzt werden. Ein Beispiel ist die Technik der photochemischen Internalisierung. Dabei kommen Photosensibilisatoren zum Einsatz, welche nach Belichtung die Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff induzieren, der dann die Membran des Endosoms zerstören kann.^[108,109] Darüber hinaus werden auch Systeme entwickelt, die über Ultraschall oder ein Magnetfeld einen Bruch der Endosomenmembran verursachen und somit den endosomalen *Escape* ermöglichen können.^[110]

Der Einschluss von Nanopartikeln in Endosomen stellt einen kritischen Schritt bei der effizienten zytosolischen Abgabe von nicht permeablen Arzneimittel-molekülen dar. Es ist deshalb essentiell, die Mechanismen vollends aufzuklären, um mit dem gewonnenen Wissen effiziente *Drug Delivery*-Systeme zu entwickeln.^[78]

2.4 *Drug Delivery*-Systeme für siRNA

Als RNA-Interferenz (RNAi) wird ein natürlicher Mechanismus in eukaryotischen Zellen bezeichnet, bei dem kurze RNA-Segmente für einen zielgerichteten Abbau komplementärer Ziel-mRNA (*messenger*-RNA) sorgen und somit eine spezifische Herunterregulierung einer Genexpression hervorrufen.^[11,111] Seine Aufklärung geht auf Andrew Fire und Craig Mello zurück, die 1998 über das Stummschalten hochregulierter Gene mittels doppelsträngiger RNA (dsRNA) in Fadenwürmern berichteten und 2006 schließlich für ihre Arbeiten den Nobelpreis erhielten. Das Verständnis der RNAi gilt als Meilenstein in der Gentherapie. Mit seiner Hilfe wurden Möglichkeiten zur gezielten Erforschung von Genfunktionen sowie molekularen Signalwegen eröffnet. Ferner wird RNAi für die Therapie von verschiedenen Krankheiten wie Krebs, genetischen Störungen, Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen erprobt.^[112] Synthetische *short interfering*-RNAs (siRNAs) sind in der Lage, eine RNA-Interferenz zu induzieren, wofür sie allerdings in das Zytoplasma von Zellen transportiert werden müssen. Wie bereits erwähnt, zeichnen sich Silica-Nanopartikel unter anderem durch vielfältige Modifizierungs- und Funktionalisierungsmöglichkeiten aus. Aus diesem Grund können, auf der Basis dieser Partikel sowie der Kenntnisse über die Zellaufnahme und die Strategien zum endosomalen *Escape* (s. Abschnitt 2.3), effiziente Nanoträger für siRNAs entwickelt werden. Mit diesem anwendungsbezogenen Design befasst sich ein Teil dieser Dissertation. Zur Einleitung in

das Themengebiet der siRNA-Forschung wird im folgenden Abschnitt zunächst der Mechanismus der RNA-Interferenz beschrieben. Anschließend werden die Eigenschaften von siRNA und die Herausforderungen bei der Entwicklung von Freisetzungssystemen für sie vorgestellt. Zuletzt werden in der Literatur beschriebene *Drug Delivery*-Systeme sowie Nachweismethoden einer erfolgreichen RNA-Interferenz behandelt.

2.4.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Bei der Expression eines Gens wird ein DNA-Abschnitt im Zuge der Transkription zuerst in mRNA umgeschrieben. Diesem Vorgang folgt die Translation, bei der einzelne Aminosäuren entsprechend der Informationen aus der mRNA aneinandergereiht, durch Peptidbindungen verknüpft und somit in das durch die mRNA kodierte Protein umgesetzt werden (s. Abbildung 2.4).^[113]

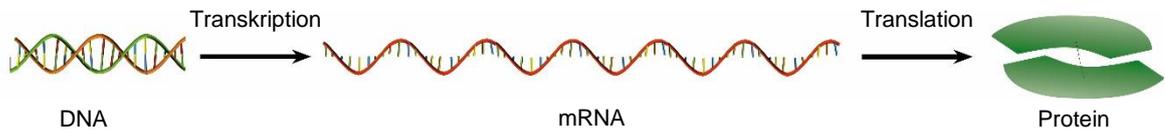


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Synthese eines Proteins innerhalb einer Zelle.

Die RNA-Interferenz ist ein posttranskriptionaler Mechanismus, der diese Proteinsynthese in der Zelle beeinflusst. Er kann in verschiedene Schritte unterteilt werden, die in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt sind.

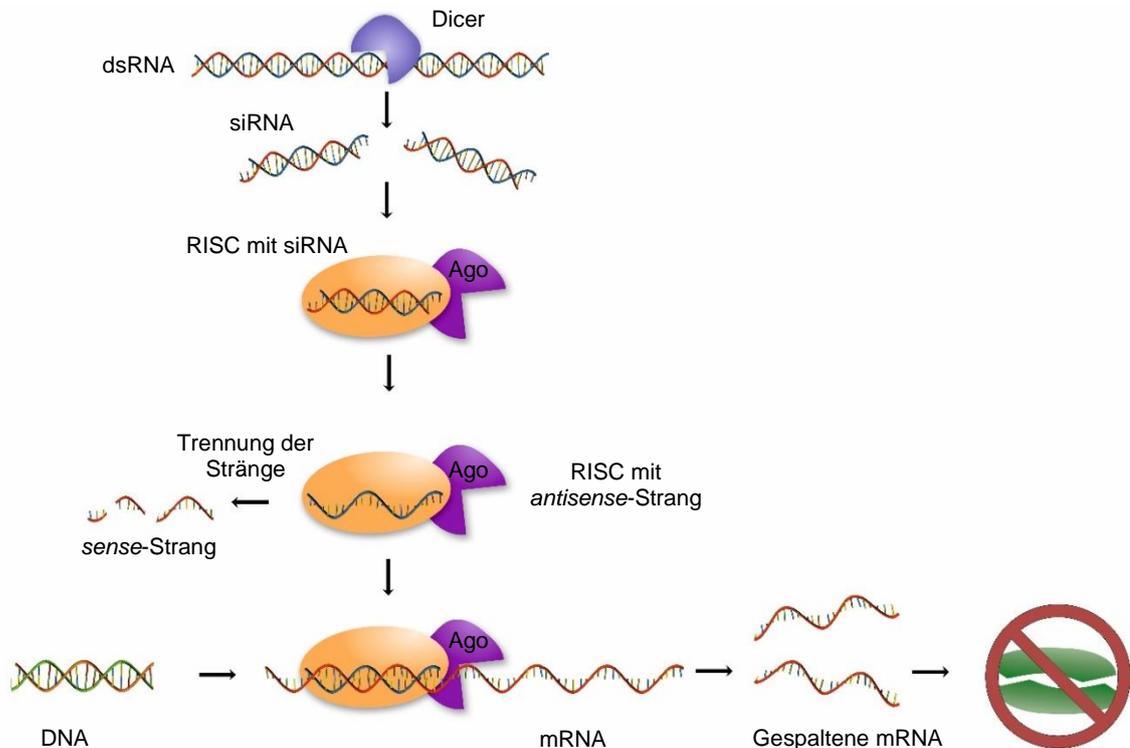


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz.

Zuerst wird ein langer doppelsträngiger RNA-Strang, der in die Zelle eingeführt wurde, durch ein, als Dicer bekanntes Ribonuklease-III-Enzym (RNase-III-Enzym) erkannt und in kleine dsRNA-Fragmente mit 21–23 Basenpaaren zerteilt. Diese werden als siRNA bezeichnet.^[114] Im nächsten Schritt wird ein solches Teilstück in einen Komplex aus mehreren Proteinen, den sogenannten RISC (*RNA-induced silencing complex*), inkorporiert. Dort kommt es zu einer Entwindung der siRNA und Trennung der beiden Stränge. Der Passagier-Strang (*passenger-* oder auch *sense*-Strang) wird gespalten und aus dem Komplex entfernt, während der *Guide*-Strang (auch *antisense*-Strang) im RISC verbleibt. Er dient als Leitstruktur für die Erkennung von mRNA mit komplementärer Basensequenz. Im nächsten Schritt bindet der RISC an eine Ziel-mRNA, woraufhin diese durch das im Komplex enthaltene Argonautprotein (Ago) gespalten wird. Als Folge daraus wird die Translation unterbrochen und die Synthese eines bestimmten Proteins unterbunden. Nach der Zerstörung der mRNA bleibt der *Guide*-Strang im RISC, sodass dieser an eine weitere Ziel-mRNA binden und deren Abbau initiieren kann.^[105,111–115]

Üblicherweise sind Säugetierzellen nicht in der Lage, in die Zelle eingeschleuste dsRNA in wirksame RNA-Fragmente zu spalten.^[116] Doch mit dem Nachweis, dass auch chemisch synthetisierte und in Zellen geschleuste siRNA eine spezifische RNAi auslösen können, eröffneten Elbashir *et al.* das Forschungsfeld für die Analyse von Genfunktionen und die Entwicklung genspezifischer Therapeutika mittels siRNA.^[117]

Neben exogenen (von außen kommenden) siRNAs gibt es weitere kurze RNA-Segmente, die über einen ähnlichen RNAi-Mechanismus eine Gensuppression hervorrufen können. Zu ihnen gehören *micro*-RNAs (miRNAs), PIWI-*interacting* RNAs (piRNAs), *short hairpin*-RNAs (shRNAs) bzw. endogene siRNAs (endo-siRNAs).^[118] Da in dieser Arbeit ausschließlich mit siRNAs gearbeitet wurde, widmet sich der folgende Abschnitt lediglich deren Eigenschaften, wobei Unterschiede zwischen den einzelnen RNA-Spezies nicht näher spezifiziert werden.

2.4.2 *Short interfering-RNA*

Bei siRNAs handelt es sich um kurze doppelsträngige RNA-Fragmente endogenen Ursprungs. Sie bestehen aus 21–23 Basenpaaren, wobei üblicherweise 19 von ihnen die Kernregion bilden und jeweils zwei ungepaarte Nukleotide an jedem 3'-Ende überhängen.^[119] Die Molmasse eines siRNA-Moleküls liegt damit zwischen 12 kDa^[120] und 14 kDa^[121] und seine Ausmaße betragen ungefähr 7.5 nm in der Länge bzw. 2 nm im Durchmesser.^[122] Wegen der über 40 Phosphatgruppen des Phosphatgerüsts der RNA hat das Molekül zudem einen polyanionischen und hydrophilen Charakter.^[123–125] Im Allgemeinen besitzt siRNA eine Basensequenz, die zu ihrer Ziel-mRNA perfekt komplementär ist, sodass eine spezifische Zerstörung der mRNA induziert werden kann.^[122] Theoretisch ist es somit möglich, jedes Gen mit bekannter mRNA-Sequenz durch eine künstlich synthetisierte siRNA herunterzuregulieren.^[66] Typischerweise wird dies als *Gen-Knockdown*

bezeichnet, da die Expression des Gens zwar verringert, aber nicht gänzlich ausgeschaltet wird, wie es beim Gen-Knockout der Fall wäre.^[113] Der Abbau der mRNA beginnt unmittelbar, nachdem die siRNA in das Zytoplasma der Zelle eingedrungen ist. Der Zeitpunkt, zu dem dann ein inhibitorischer Effekt auf Proteinebene nachgewiesen werden kann, hängt indessen von der Halbwertszeit des Zielproteins ab. Üblicherweise kann 48 Stunden nach siRNA-Transfektion eine deutliche Verringerung der Konzentration des Zielproteins detektiert werden. Es gibt aber auch Proteine mit sehr langsamen Umsatzgeschwindigkeiten bzw. hohen Stabilitäten, bei denen die Auswirkung der siRNA-Transfektion erst später nachweisbar ist. Die Wirkung von siRNA ist transient, d. h. nur vorübergehend.^[119] Nach ungefähr fünf bis sieben Tagen lässt der Einfluss langsam nach und die Proteinsynthese beginnt sich zu normalisieren. Die exakte Wirkdauer wird jedoch von zahlreichen Faktoren wie dem Zielorgan oder dem Zielgen beeinflusst.^[119] Eine siRNA-Therapie könnte demzufolge zu jedem Zeitpunkt und in jedem Stadium einer Behandlung gestoppt werden, was einen entscheidenden Faktor für regulatorische und sicherheitstechnische Überlegungen darstellt. In diesem Zusammenhang ist auch von Vorteil, dass die siRNA nicht ins Genom integriert wird.^[105] Einen weiteren Vorzug stellt die siRNA-typische, kurze Sequenz dar, die vergleichsweise schnell und unkompliziert bei geringen Produktionskosten synthetisiert werden kann.^[88] Bei der Herstellung sind auch keine komplexen Aufreinigungen oder Faltungen vonnöten, wie es oft bei Proteinen vorkommt.^[122]

All dieses hat dazu beigetragen, dass über die letzten Jahre an einer Vielzahl siRNA-basierter Therapeutika geforscht wurde, wovon sich einige bereits in klinischen Studien befinden.^[8] Im Jahr 2018 wurde das erste Medikament auf Basis von siRNA von der FDA zugelassen. Bei ONPATRO™ (Patisiran) handelt es sich um in Liposomen eingekapselte siRNA, die ein mutiertes Gen bei der Transthyretin(TTR)-vermittelten Amyloidose herunterregulieren. Bei dieser Krankheit wird aufgrund der Genmutation das TTR-Protein, welches hauptsächlich von Hepatozyten in der Leber produziert wird, fehlgefaltet. Als Folge lagert es sich in Form von Fibrillen (Amyloide) in Geweben bzw. Organen des Körpers ab und beeinträchtigt deren Struktur und Funktion. Eine speziell entworfene siRNA ist in der Lage, an die TTR-mRNA zu binden und die Bildung des abnormalen Proteins zu inhibieren. Das zugelassene *Delivery*-System für die siRNA besteht aus verschiedenen kationischen sowie PEGylierten Lipiden. Nach intravenöser Verabreichung werden die Lipoplexe durch das Apolipoprotein E (ApoE) opsonisiert, gelangen durch Gefäßfenster in die Leber und binden an die ApoE-Rezeptoren auf der Oberfläche von Hepatozyten. Eine anschließende Endozytose gefolgt von einem endosomalen *Escape* bringt die siRNA in die Zielzellen und ermöglicht die Initialisierung der RNA-Interferenz. Dadurch wird die Konzentration des TTR-Proteins reduziert und das Auftreten von Amyloiden vermindert.^[126–128]

Die Zulassung dieses Medikaments gilt als Meilenstein für die RNAi-Therapie. Doch trotz des immensen Potentials, das sich mit siRNA als Therapeutikum bietet, bestehen noch einige Herausforderungen, die den Einsatz bislang einschränken.

2.4.3 Herausforderungen beim *Drug Delivery* von siRNA

Die zentrale Herausforderung liegt in einem sicheren und effizienten Transport der siRNA ins Zytoplasma. Nach direkter Verabreichung (z. B. über Injektion) wird freie siRNA zügig von Nukleasen abgebaut.^[112,129,130] Darüber hinaus besitzen siRNA-Moleküle physikochemische Eigenschaften, die eine effektive Zellaufnahme erschweren. Ihre Größe bzw. ihr hohes Molekulargewicht, zusammen mit dem hydrophilen Charakter und der durch die Phosphatgruppen verursachten negativen Ladung, verhindern einen passiven Transport durch hydrophobe und ebenfalls negativ geladene Zellmembranen.^[131,132] Stattdessen wird siRNA über Endozytose aufgenommen und durchläuft dann den endolysosomalen Abbau (vgl. Abschnitt 2.3.1).^[77] Damit siRNA als Therapeutikum verwendet werden kann, muss zudem sichergestellt sein, dass durch ihren Einsatz keine unerwünschten Nebeneffekte oder starke Immunantworten hervorgerufen werden.^[133] Um diese Herausforderungen zu bewältigen, stehen einerseits die Modifizierung bzw. die Funktionalisierung der siRNA-Stränge und andererseits die Entwicklung effizienter *Drug Delivery*-Systeme im Fokus der Forschung.^[130]

Der erste wesentliche Schritt für eine erfolgreiche siRNA-Therapie ist das Design einer siRNA-Sequenz, die wirksam und spezifisch für die Ziel-mRNA ist, um jegliche (und möglicherweise toxische) Nebeneffekte zu minimieren.^[131,134] Diese sogenannten *Off-Target*-Effekte beinhalten unter anderem die unspezifische Bindung des RISCs an mRNA, deren Protein nicht herunterreguliert werden soll, oder die Beladung des RISC mit dem Passagier-Strang anstelle des *Guide*-Strangs.^[135] Um diesen Nebenwirkungen entgegenzuwirken, sollten möglichst geringe siRNA-Konzentrationen verwendet werden, damit eine Übersättigung der RNAi-Maschinerie vermieden wird.^[131,134] Außerdem kann eine chemische Modifizierung der siRNA-Stränge diese *Off-Target*-Effekte reduzieren. Beispielsweise können funktionelle Gruppen wie –O–Methyl, –O–Fluoro oder –O–(2-Methoxyethyl) an der 2'-Hydroxylgruppe des Pentoserings im Rückgrat der RNA eingebracht werden.^[136,137] Damit ist unter anderem eine vollständige Inaktivierung des Passagier-Strangs möglich.^[119] Eine chemische Modifikation der siRNA kann zudem eine Immunantwort des Organismus reduzieren oder die siRNA-Moleküle vor einer frühzeitigen Degradation durch Nukleasen schützen.^[105,131] Zur Verbesserung der Zellaufnahme wird eine Konjugation der siRNA mit Liganden erprobt.^[138] Dabei kann es sich z. B. um Cholesterin^[139], α -Tocopherol (Vitamin E)^[140], Aptamere^[141], Antikörper^[142] oder zellpenetrierende Peptide^[143] handeln. Allerdings kann die Aktivität der siRNA durch eine solche Funktionalisierung beeinträchtigt werden. Des Weiteren kann selbst konjugierte siRNA mit einem durchschnittlichen Durchmesser von weniger als 10 nm innerhalb von

fünf bis zehn Minuten nach der Verabreichung durch die Filtration über die Niere mit dem Urin ausgeschieden werden.^[119,138] Aus diesem Grund wird intensiv an der Entwicklung von *Delivery*-Systemen geforscht, die siRNA vor Degradation schützen, sie in Zellen schleusen und schließlich in das Zytoplasma freisetzen können.^[77] Als Transportvehikel kommen Nanopartikel zum Einsatz, die aus organischen Materialien (Lipide, Polymere etc.) und/oder anorganischen Bestandteilen (wie Silica, Eisenoxid, Gold) aufgebaut sein können.^[132] Unabhängig von der Zusammensetzung werden jedoch eine Reihe von Anforderungen an das Trägersystem gestellt, die in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind. An einem Freisetzungssystem, das alle Kriterien erfüllt, wird intensiv geforscht und das nächste Unterkapitel widmet sich der Vorstellung potentieller Kandidaten.

Tabelle 2.1: Auflistung der Anforderungen, die an ein *Drug Delivery*-System für siRNA gestellt werden.

Anforderung	Referenz
- Hohe kolloidale Stabilität des Nanoträgers	[144]
- Hohe Beladungskapazität	[111,145]
- Schutz der siRNA vor Nukleasen	[146]
- Transport zur Zielzelle	[144,146]
- Hohe Transfektionseffizienz	[105,147]
- Freisetzung der siRNA ins Zytoplasma	[100]
- Geringe Toxizität	[111,144,146]
- Nicht immunogen	[111]
- Geringe Auswirkungen auf Physiologie	[77]
- Reproduzierbar	[77]

2.4.5 Beispiele für *Drug Delivery*-Systeme für siRNA

Virale Vektoren wurden zuerst als Transport- und Freisetzungssystem für siRNA verwendet. Dies ist vor allem der Möglichkeit einer einfachen Beladung und hohen zellulären Aufnahmemengen zuzuschreiben. Jedoch schränken Nebenwirkungen wie Toxizität bzw. Immunogenität sowie geringe Beladungskapazitäten die *in vivo*-Anwendung viraler Systeme ein.^[82,134] Deshalb wird intensiv an der Entwicklung nicht-viraler Transportsysteme geforscht. Grundlegend stehen dafür organische oder anorganische Materialien zur Verfügung.^[111] Zur Erzeugung von Hybridsystemen können aber auch organische mit anorganischen Bestandteilen kombiniert werden, wodurch sich die vorteilhaften Eigenschaften beider Komponenten vereinen lassen. Im Folgenden werden einige in der Literatur beschriebene *Delivery*-Systeme vorgestellt, wobei besonders Silica-Nanopartikel-basierte Systeme hervorgehoben werden.

Die gängigste Methode zur Transfektion ist die Lipofektion, die Felgner *et al.* 1987 einführten, um mithilfe von kationischen Liposomen DNA-Fragmente in eukaryotische Zellen zu transportieren.^[148] Seitdem wurde das Konzept weiterentwickelt und mittels neuer

Lipidformulierungen die Transfektionseffizienz stetig verbessert.^[8,138] Auch das erste zugelassene Medikament mit siRNA basiert auf dieser Methode (vgl. Abschnitt 2.4.2). Die Liposomen, die für die siRNA-Freisetzung konstruiert werden, bestehen im Wesentlichen aus zwei Arten von Lipiden, den kationischen und den neutralen bzw. fusogenen Lipiden. Erstgenannte sind essentiell für elektrostatische Wechselwirkungen mit anionischer siRNA und Zellmembranen. Neutrale Lipide wie DOPE (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin), das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, sorgen für eine zusätzliche Destabilisierung der Endosomenmembran und erhöhen die Effektivität des endosomal *Escapes* (vgl. Abschnitt 2.3.3).^[9,119] Unterschiedliche Eigenschaften der Lipoplexe können über verschiedene Struktureinheiten des Phospholipids (wie die Kopfgruppe, die aliphatische Kette oder die Linker zwischen ihnen) sowie das Verhältnis zwischen Lipiden und siRNA gesteuert werden.^[9] Darüber hinaus können weitere Funktionalisierungen über eine Dekoration der Lipoplexe mit *Targeting*-Liganden eingebracht werden. Die meisten kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien sind Lipid-basiert. Das in dieser Arbeit als Kontrolle verwendete Lipofectamine®-2000 ist beispielsweise aus dem kationischen DOSPA und dem Helferlipid DOPE in einem Verhältnis von 3:1 zusammengesetzt (Abbildung 2.6).^[149]

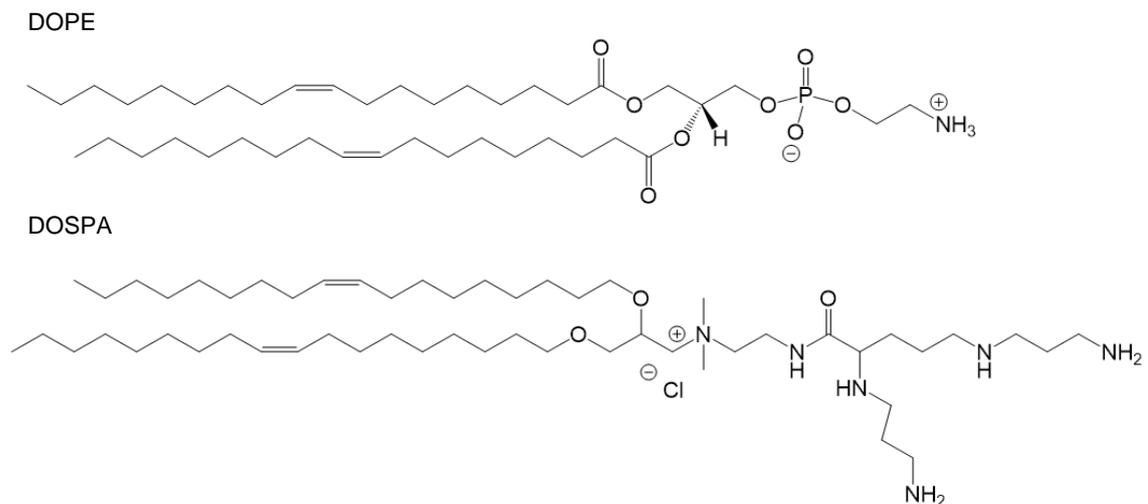


Abbildung 2.6: Strukturformel von DOPE und DOSPA.

Polyplex-Nanopartikel werden im Allgemeinen über eine elektrostatische Komplexierung kationischer Polymere und anionischer Nukleinsäuren erzeugt. Beispiele für kationische Polymere sind Polyethylenimin (PEI), Poly-*L*-Lysin (PLL), Chitosan oder synthetische Dendrimere wie Poly(amidoamin) (PAMAM).^[123] Ein Hauptvorteil von Polyplex-Nanopartikeln ist, dass die verwendeten Polymere maßgeschneidert synthetisiert werden können. Damit ist es möglich, deren Zusammensetzung einzustellen und Funktionen wie Schutzgruppen aus PEG oder *Targeting*-Fähigkeiten für bestimmte Zelltypen zu integrieren.^[88] Eine Herausforderung stellt allerdings die Gewährleistung einer homogenen Größenverteilung der sich bildenden Nanopartikel dar. In Anbetracht der Tatsache,

dass die Größe und die Oberflächeneigenschaften generell einen großen Einfluss auf die Zellaufnahme, Toxizität und Verteilung haben (vgl. Abschnitt 2.2.3), kann ein heterogenes Partikelkollektiv nachteilig sein.^[150]

Aus diesem Grund bieten sich nanoporöse Silica-Nanopartikel als Freisetzungsplattform an. Ihre Degradierbarkeit und Biokompatibilität, zusammen mit der bereits thematisierten Möglichkeit einer zielgerichteten Einstellung der physikochemischen Eigenschaften wie Größe und Porosität (Abschnitt 2.1 und 2.2), machen sie zu idealen Kandidaten für die Entwicklung intrazellulärer Transportsysteme. Durch Kombination mit anorganischen oder organischen Komponenten können funktionale und effiziente *Drug Delivery*-Systeme entwickelt werden, deren Eigenschaften über die Wahl der einzelnen Komponenten exakt gesteuert werden können. Freisetzungssysteme für siRNA auf Basis von NPSNPs wurden in der Literatur vielfach beschrieben. In Tabelle 2.2 sind einige dieser publizierten Systeme aufgelistet. Dabei ist neben der Partikel- und der Porengröße der verwendeten Silica-Nanopartikel auch die Modifizierung bzw. Funktionalisierung mit organischen und anorganischen Bestandteilen angegeben.

Tabelle 2.2: Zusammenstellung von Literaturbeispielen für siRNA-Freisetzungssysteme mit modifizierten und funktionalisierten Silica-Nanopartikeln.
Abkürzungen: APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilan; Co-Del.: *Co-Delivery*; DOC: Doxorubicin; FA: *folic acid*; GFP: grün fluoreszierendes Protein; n. a.: nicht angegeben; PAMAM: Poly(amidoamin); PEI: Polyethylenimin; PEG: Polyethylenglycol; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Partikelgröße / nm	Porengröße / nm	Modifizierung	Protein- <i>Knockdown</i>	Besonderheit	Lit.
60	n. a.	PEI	GFP		[151]
50	n. a.	PEI-PEG	Glycoprotein	Co-Del. DOC	[152]
< 130	2.5	PEI	GFP		[153]
165	23–30	PEG-Liposom	Cyclin	Peptid-Liganden	[154]
200	23	APTES und PEG	GFP		[39]
100–200	28	Poly- <i>L</i> -Lysin	Kinase		[155]
105	n. a.	Cyclodextrin-PEI	Kinase		[156]
50	3.6	PEI	VEGF oder GFP	Eisenoxid-Kern u. PEG-KALA	[150] [151]
150	2	PEI	Sclerostin		[159]
150	4	Kationisches Block- copolymer	GFP		[72]
150	12	Tanninsäure	GFP	Eisenoxid-Kern	[160]
200	2.9	PAMAM	Bcl2	Co-Del. DOC u. FA-Ligand	[69]

Einer der üblichen Mechanismen zum Immobilisieren von siRNA auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln verläuft über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Nukleinsäuren und NPSNPs, deren Oberfläche mit positiven funktionellen Gruppen modifiziert wurde.^[130] Dazu bieten sich Aminosilane wie APTES an. Ein alternativer Ansatz ist die Dotierung von NPSNPs mit Calciumionen. Diese erlauben eine Immobilisierung des Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren ohne vorangegangene Oberflächenmodifizierung.^[161] Des Weiteren wird häufig die Oberfläche der NPSNPs mit kationischen Polymeren modifiziert. Diese können einerseits über elektrostatische Wechselwirkungen die siRNA immobilisieren, andererseits tragen sie zum Schutz der siRNA und nach der Zellaufnahme zum endosomalen *Escape* bei (vgl. Abschnitt 2.3.3). Am häufigsten wird Polyethylenimin (PEI) mit nanoporösen Silica-Nanopartikeln kombiniert, wobei die Eigenschaften des Polymers im Vorfeld an die Anwendung angepasst werden können.^[162] In der Literatur wird in Bezug auf PEI u. a. von Modifizierungen mit Molekülen wie Polyethylenglycol^[152] oder Cyclodextrin^[156] berichtet. Um die Zellaufnahme zu verbessern, lässt sich PEI auch nach der Umhüllung der Silica-Partikel mit *Targeting*-Liganden dekorieren.^[162] Beispielsweise immobilisierten Li *et al.*^[157] und Chen *et al.*^[158] zuerst siRNA auf amino-modifizierten NPSNPs. Danach beschichteten sie die Partikel mit PEI und konjugierten zuletzt das zellpenetrierende Peptid KALA an das Polymer. Neben PEI kommen auch andere Polymere wie Poly-*L*-Lysin, Cyclodextrin oder Poly-*L*-Arginin zur Modifikation der NPSNPs für siRNA-Freisetzungssysteme zum Einsatz.^[162] Ferner synthetisierten Möller *et al.* ein spezielles Blockcopolymer aus positiv geladenen, künstlichen Aminosäuren und Ölsäureblöcken, das gleichzeitig zur Umhüllung der Silica-Nanopartikel und zur Verbesserung des endosomalen *Escapes* fungierte.^[72]

Die Kombination siRNA-beladener Silica-Partikel mit (PEGylierten) Liposomen wird ebenfalls erforscht. Brinker *et al.* führten für Silica-Nanopartikel, die in ein Liposom eingekapselt sind, die Bezeichnung „Protozelle“ (*protocell*) ein. Die Forscher entwickelten ein Freisetzungssystem mit großporigen (23–30 nm) Silica-Nanopartikeln, die in Liposomen aus verschiedenen Lipiden eingekapselt wurden. Zusätzlich funktionalisierten sie die Hülle der Partikel mit Peptidsequenzen (SP94 und H5WYG) als *Targeting*-Liganden.^[154] Sind die Poren der nanoporösen Silica-Nanopartikel wie im vorgenannten Beispiel groß genug, können siRNA-Moleküle in diese eingelagert werden. Häufig werden aber Porengrößen unter 4 nm verwendet, sodass die siRNAs überwiegend auf der äußeren Oberfläche immobilisiert werden. Dies ist u. a. der Tatsache geschuldet, dass die Freisetzung von in Poren eingelagerter siRNA verzögert werden kann. Für einen effektiven *Knockdown* ist aber nach Eintritt in die Zelle eine möglichst schnelle Abgabe erwünscht.^[72] Aus diesem Grund wird das Porensystemen vermehrt zur Einlagerung von *small molecule drugs* erprobt. Dies bietet die Möglichkeit einer kombinatorischen Freisetzung, aus der synergistische Effekte resultieren können. In der Entwicklung von Therapeutika gegen Krebs wird häufig Doxorubicin (DOC), ein Apoptose-induzierender Wirkstoff, zusammen mit

verschiedenen siRNAs über nanoporöse Silica-Nanopartikel freigesetzt. Beispielsweise entwickelten Chen *et al.* einen Nanoträger zur Therapie von Eierstockkrebs. Sie immobilisierten siRNA gegen Bcl2, ein Zelltod regulierendes Gen, auf Silica-Nanopartikeln, die mit dem Dendrimer PAMAM modifiziert waren. Zusätzlich lagerten sie Doxorubicin in die Poren der NPSNPs ein. Bei Zelltests mit dem *Co-Delivery*-System war Doxorubicin, das zusammen mit siRNAs abgegeben wurde, effektiver (d. h. zytotoxischer) bei der Bekämpfung der Krebszellen als jenes, das ohne siRNA freigesetzt wurde.^[69] Ähnliche Befunde wurden bei anderen Zelltypen beobachtet, einschließlich Gebärmutterhals-^[163] und Brustkrebszellen^[81]. Auch bei diesen Beispielen wurden Bcl2-siRNAs in Kombination mit Doxorubicin verwendet, lediglich wurde PEI als Polymerbeschichtung der Silica-Nanopartikel und zusätzlich Folsäure als *Targeting*-Ligand verwendet.^[162] Diese Beispiele verdeutlichen, dass nanoporöse Silica-Nanopartikel das Potenzial haben, eine ideale Plattform für die effiziente und sichere Abgabe von Nukleinsäuren und Arzneimitteln darzustellen.

2.4.6 Nachweismethoden des Gen-*Knockdowns*

Eine erfolgreiche RNA-Interferenz kann sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.^[164] Dafür stehen mehrere Verfahren zur Verfügung.

Durch den Einfluss der siRNAs wird innerhalb der Zelle die zum *antisense*-Strang komplementäre Ziel-mRNA abgebaut. Eine erfolgreiche Transfektion kann demnach über den Nachweis dieser mRNA gezeigt werden. Üblicherweise wird dazu in der Molekularbiologie die Northern Blot-Methode oder die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet.^[164] Beim Northern Blot werden die isolierten RNA-Bestandteile einer Probe zunächst über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Über eine Hybridisierung mit komplementären DNA-Sonden lassen sich dann die RNA-Sequenzen spezifisch markieren und nachweisen.^[113] Bei der RT-PCR wird die mRNA zuerst mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben, da sich die RNA nicht direkt in der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion amplifizieren (vermehren) lässt. Die PCR vervielfältigt die DNA, sodass sie quantifiziert werden kann.^[165]

Alternativ kann ein erfolgreicher *Knockdown* auf Proteinebene nachgewiesen werden, da mit dem Abbau der mRNA eine Abnahme der Translation einhergeht. Eine Methode zum Nachweis von Proteinen ist der Western Blot. Dabei werden, analog zum Northern Blot, die Proteine einer Probe mittels Gelelektrophorese zuerst aufgetrennt. Hinterher kann der Nachweis des zu untersuchenden Proteins z. B. über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper erfolgen.^[113] Um die Transfektionseffizienz entwickelter *Drug Delivery*-Systeme für siRNA zu untersuchen, werden häufig auch fluoreszierende Proteine herangezogen. Das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) und seine Variationen

sind dabei die am häufigsten verwendeten Vertreter. Über molekularbiologische Methoden ist es möglich, ein Gen, das ein fluoreszierendes Protein kodiert, in das Genom eines gewünschten Zelltyps zu integrieren. Zur Untersuchung des *Knockdowns* mit einer siRNA gegen GFP kann dann eine RT-PCR zur Quantifizierung der GFP-mRNA herangezogen werden. Bei erfolgreicher RNAi wird zudem die Bildung des Proteins und damit das korrelierende Fluoreszenzsignal reduziert. Der Nachweis über die Fluoreszenz kann beispielsweise an einem geeigneten Fluoreszenzlesegerät erfolgen. Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, das Fluoreszenzsignal jeder einzelnen Zelle einer Population zu messen. Das zugrundeliegende Prinzip wird im Unterkapitel 3.3.2 näher erläutert. Neben der Verwendung von fluoreszierenden Proteinen können mit einem Fluorophor markierte Antikörper zum Nachweis von Proteinen eingesetzt werden. Diese Methode ist in Abbildung 2.7 schematisch dargestellt und soll in Anlehnung an die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit dentalen Pulpastammzellen (DPSCs) kurz erläutert werden.

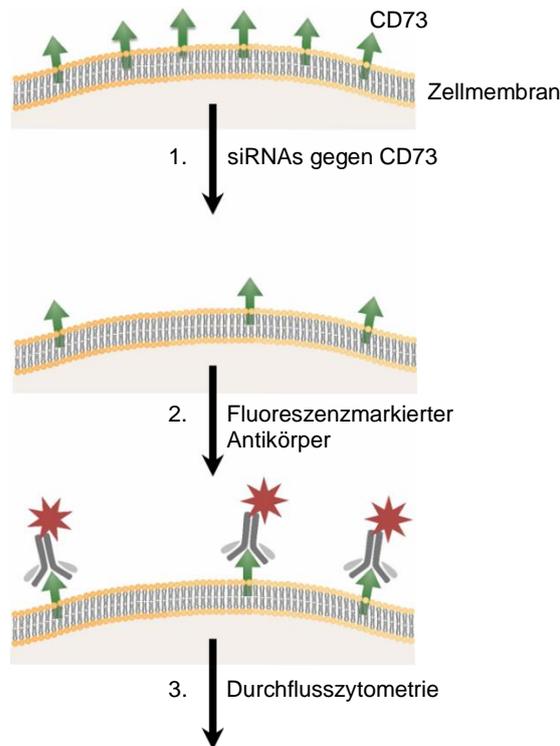


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zum Nachweis eines Gen-*Knockdowns* mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper am Beispiel CD73.

Zellen besitzen membrangebundene Oberflächenproteine, deren Gruppe als *Cluster of Differentiation* (CD) bezeichnet wird. Eines dieser Proteine bei DPSCs ist CD73, welches als Enzym Nukleotide zu Nukleosiden hydrolysieren kann. Die Bildung von CD73 kann mit der passenden siRNA herunterreguliert werden. In der Literatur kann dafür die Bezeichnung „siNT5E“ gefunden werden, da das Gen NT5E das Protein codiert.^[166] Nach

der Herunterregulierung der Expression können die verbliebenen CD73-Moleküle mit einem speziellen fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert und schließlich mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden.

2.5 Prävascularisierte Implantate

Der in der klinischen Praxis vorhandene hohe Bedarf an Gewebeersatzmaterialien und transplantierbaren Organen hat das *Tissue Engineering* in der regenerativen Medizin in den letzten Jahren zu einem stetig wachsenden Forschungsfeld gemacht.^[13] Die Anzahl klinischer Anwendungen ist jedoch begrenzt. Dies ist unter anderem der Problematik geschuldet, dass in der Anfangsphase nach der Implantation eines Ersatzmaterials keine ausreichende Blutversorgung und damit auch keine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung für die in das Implantat einwachsenden Zellen bereitgestellt werden kann.^[17] Die Wachstumsgeschwindigkeit neuer Blutgefäße liegt bei ca. 5 μm pro Stunde (ca. 120 μm pro Tag).^[13] Daher leiden größere Implantate anfangs unter einer unzureichenden Vaskularisation, was wiederum zu Zellsterben führen und das Risiko eines Transplantatversagens erhöhen kann (Abbildung 2.8 A).^[17,167] Durch Verwendung eines prävascularisierten Implantats könnte dies verhindert werden. Die Strategie basiert im Wesentlichen auf einer *in vitro*-Erzeugung vorgeformter mikrovaskulärer Netzwerke in einem Ersatzmaterial vor der Implantation. Nach der Implantation kann dieses Netzwerk über Anastomosen (Verbindungsgänge zwischen zwei anatomischen Strukturen) mit dem einwachsenden Gefäßsystem des Wirts verbunden werden und somit das Implantat mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Bei diesem Ansatz müssen die Blutgefäße nicht in das gesamte Konstrukt hineinwachsen, sondern nur in die äußeren Regionen, bis die prävascularisierten Strukturen erreicht sind (Abbildung 2.8 B).^[16,17]

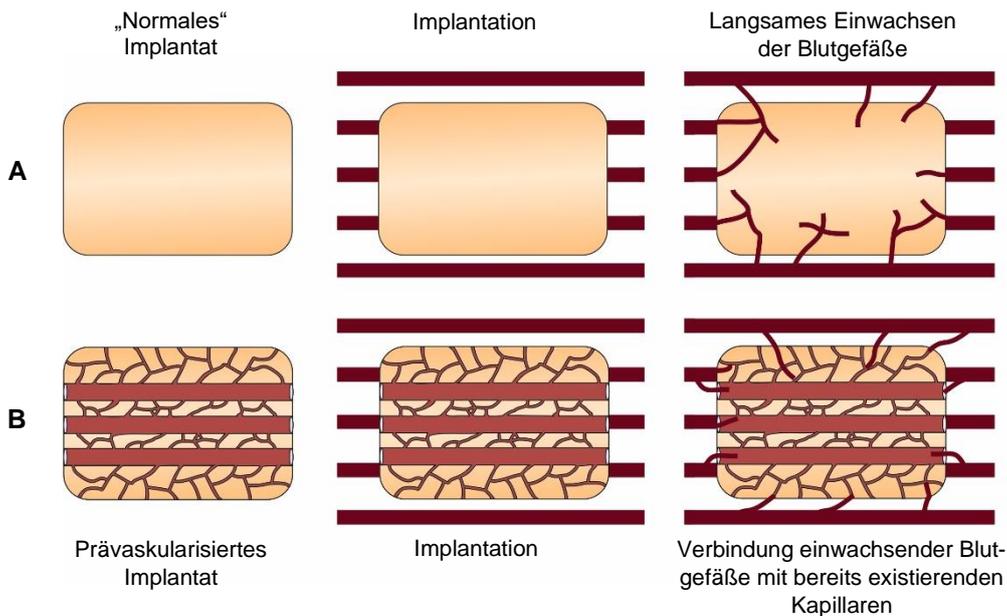


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Einsatzes eines prävascularisierten Implantats im Vergleich mit einem normalen Implantat ohne vorgeformte Gefäßstrukturen (nach Lit.^[13] mit CoreIDRAW erstellt).

Der am weitesten verbreitete Ansatz zur *in vitro*-Prävaskularisierung ist das Aussäen von gefäßbildenden Zellen (z. B. Endothelzellen) auf einem Ersatzmaterialgerüst. Der Prozess der Vaskularisation kann zusätzlich durch das Einbringen von Wachstumsfaktoren gefördert werden.^[16] Zu den bedeutenden Wachstumsfaktoren für die Bildung neuer Blutgefäße gehört der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Für diesen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Freisetzungssystem auf Basis nanoporöser Silica-Nanopartikel entwickelt. Die beladenen Nanopartikel sollen dann als Füllmaterial in ein Fibringerüst eingearbeitet werden, um durch eine örtlich kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors die Aussprossung von Endothelzellen in das Gerüst zu unterstützen.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst der Mechanismus der Angiogenese beschrieben und VEGF als proangiogenetischer Faktor vorgestellt. Anschließend werden Freisetzungsstrategien für Wachstumsfaktoren thematisiert und Literaturbeispiele für VEGF-Freisetzungssysteme präsentiert, wobei der Fokus auf Silica-Materialien liegt. Zuletzt folgt eine Darstellung des Projektkonzepts zur Entwicklung eines prävaskularisierten Implantats.

2.5.1 Angiogenese

Fast alle Säugetierzellen liegen für gewöhnlich zwischen 50 μm und 100 μm von einem Blutgefäß entfernt.^[14,15] Dieses versorgt das Gewebe nicht nur mit Sauerstoff und Nährstoffen, sondern trägt auch zum Entfernen von Stoffwechselprodukten bei.^[168,169] Bei der Bildung von neuen Blutgefäßen wird grundsätzlich zwischen dem Mechanismus der Vaskulogenese und dem der Angiogenese unterschieden. Als Vaskulogenese wird die *de novo*-Ausbildung von Blutgefäßen in der frühen Embryoentwicklung bezeichnet.^[170,171] Die Angiogenese umfasst dagegen die Aussprossungen von Kapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen sowie die Remodellierung und die Reifung präexistierender Gefäße.^[172] In adulten humanen Organismen ist das Blutgefäßwachstum (mit Ausnahme des Ovarialzyklus) weitestgehend abgeschlossen, weswegen eine Angiogenese generell mit Prozessen wie Wundheilung, Tumorbildung oder Gewebeischämie (Minderdurchblutung) verknüpft ist.^[171,173]

Der komplexe Vorgang der Angiogenese erfordert ein enges Zusammenspiel zwischen diversen Zellen, Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix. Nichtsdestotrotz kann er vereinfacht in mehrere Schritte unterteilt werden, die für die klassische Aussprossung (*sprouting angiogenesis*) in Abbildung 2.9 schematisch dargestellt sind.^[174,175]

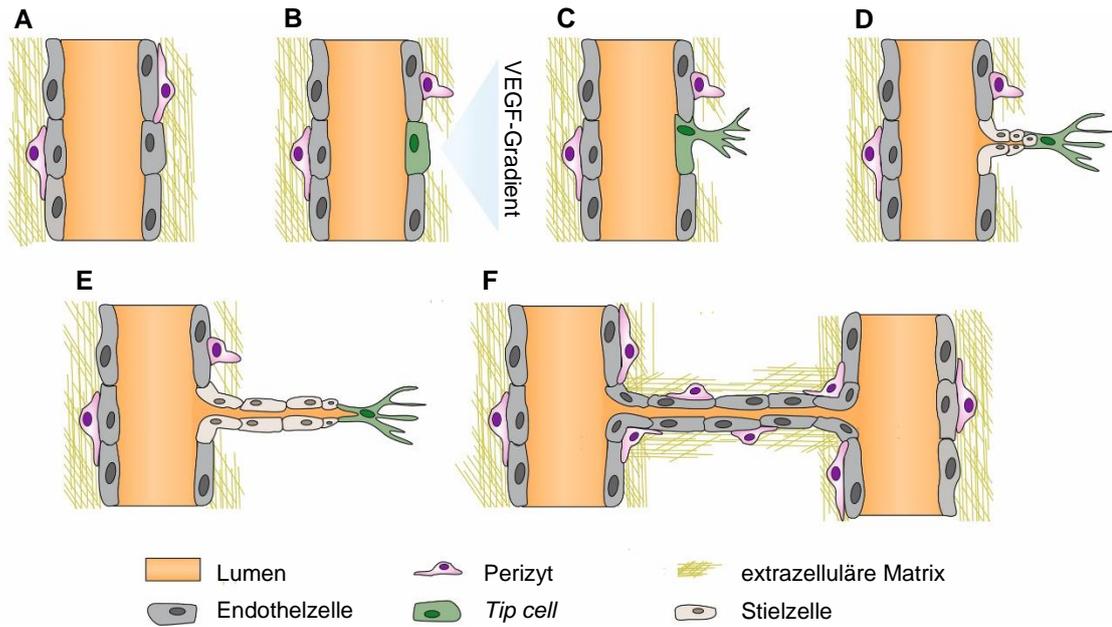


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der klassischen Angiogenese (*sprouting angiogenesis*) (nach Lit.^[176] mit CorelDRAW erstellt).

Ein Blutgefäß (Abbildung 2.9 A) besteht üblicherweise aus einer Schicht aus Endothelzellen, welche die Innenseite eines blutdurchströmten Lumens (Hohlraum) auskleiden. Von außen wird dieses sogenannte Endothel von einer Basallamina (auch Basalmembran) umgeben.^[14] Dabei handelt es sich um eine dünne Schicht extrazellulärer Matrix, welche die Endothelschicht vom Bindegewebe trennt und verhindert, dass ansässige Endothelzellen ihre Position verlassen.^[177] Größere Gefäße (Arterien und Venen) werden zudem von einer dicken Schicht glatter Gefäßmuskulatur umgeben, die zur Stabilisierung beitragen und eine Gefäßkontraktion ermöglichen. Im Gegensatz dazu sind kleinere Gefäße wie Kapillaren nur vereinzelt mit glatten Muskelzellen bedeckt. Sie werden als Perizyten bezeichnet und fördern unter anderem die Gefäßstabilisierung und spielen eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Endothelzellen.^[173] Damit es zu einer Aussprossung kommen kann, bedarf es zunächst einer Aktivierung der Endothelzellen durch proangiogene Faktoren, zu denen VEGF-A (vgl. folgender Abschnitt) zählt. Dieser Wachstumsfaktor wird auch von hypoxischen Zellen sekretiert. Als Folge einer VEGF-Stimulation werden Proteasen von umliegenden Endothelzellen ausgeschüttet, welche die angrenzende extrazelluläre Matrix abbauen und somit die Gefäßpermeabilität erhöhen.^[15] Darüber hinaus bewirkt der Wachstumsfaktor die Spezialisierung einer Endothelzelle zu einer sogenannten Endzelle (*tip cell*) (Abbildung 2.9 B). Diese beginnt dynamische Filopodien mit einem Durchmesser von ca. 100 nm^[178] und einer Länge von bis zu 100 µm^[178] auszubilden, mit deren Hilfe eine Navigation durch das Gewebe bis zur Quelle der Wachstumsfaktoren möglich ist.^[181,182] Da die physikalischen Barrieren durch die Auflösung der extrazellulären Matrix aufgehoben wurden, ist die Endzelle in der Lage, sich aus ihrem Ver-

band zu lösen und entlang des Wachstumsfaktorgradienten zu migrieren.^[181] Die ihr folgenden Stielzellen (*stalk cells*) zeigen, stimuliert durch VEGF, hohe Proliferationsraten und bauen ein neues Lumen auf, um die Elongation des Sprosses zu unterstützen (Abbildung 2.9 E).^[180] Infolge der koordinativen Wirkung von End- und Stielzellen entsteht somit ein neuer Gefäßast, der durch Hypoxiezonen reicht und der nach dem Verbinden mit einem weiteren Spross den Blutfluss und die Sauerstoffzufuhr zu diesen Bereichen wiederherstellen kann.^[182] Die Stabilisierung der unreifen Gefäße wird durch Rekrutierung von Perizyten und Erzeugung einer extrazellulären Matrix erreicht (Abbildung 2.9 F). Erfolgt diese Befestigung nicht, wird das neu gebildete Gefäß zurückgebildet.^[169,180] Neben dieser klassischen Form der Angiogenese existieren noch weitere, auf die jedoch nicht weiter eingegangen wird. Zu ihnen gehören Prozesse der Intussuszeption und der Gefäßverlängerung bzw. -erweiterung, die als „*non-sprouting angiogenesis*“ zusammengefasst werden.^[171]

2.5.2 *Vascular endothelial growth factor*

VEGF wurde ursprünglich als ein von Tumorzellen sezerniertes Protein identifiziert, welches die Durchlässigkeit von Blutgefäßen gegenüber zirkulierenden Makromolekülen erhöht und die Proliferation von Endothelzellen fördert. Seit der Entdeckung wurden der VEGF-Familie bei Säugetieren fünf Mitglieder (VEGF-A, -B, -C, -D sowie PlGF (*placenta growth factor*)) zugeordnet.^[171,183–185] Da von ihnen VEGF-A der bedeutendste Wachstumsfaktor hinsichtlich der Angiogenese ist und ausschließlich dieser in der Arbeit zum Einsatz kam, wird im Folgenden näher auf seine Eigenschaften sowie seine Funktion eingegangen.

Bei VEGF-A handelt es sich um ein glykosyliertes Homodimer (ca. 45 kDa)^[186], dessen Monomere über Disulfidbrücken verbunden sind (Abbildung 2.10).

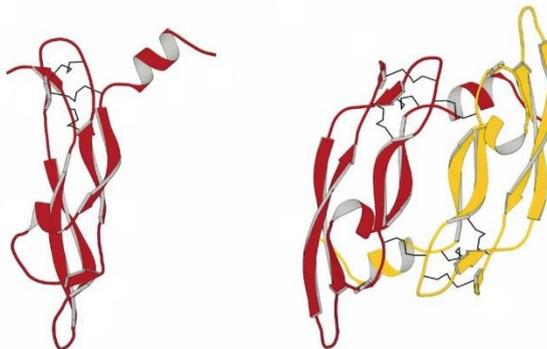


Abbildung 2.10: Banddarstellungen der Rezeptorbindungsdomäne (Aminosäuren 14 bis 109) des VEGF-A-Monomers (links) und des VEGF-A-Dimers (rechts). Die Pfeile in der Proteinstruktur stellen die β -Stränge dar. Disulfidbindungen sind als schwarze Linien gekennzeichnet.^[187]

Durch alternatives Spleißen der Exon-Intron-Sequenz der prä-mRNA während deren Prozessierung zur reifen mRNA entstehen nach Translation der mRNA monomere Isoformen mit Unterschieden in Sequenzlänge, Aufbau und Funktionalität.^[170] Bislang sind sieben

Isoformen bekannt, wobei die Monomere 121, 145, 148, 165, 183, 189 oder 206 Aminosäuren besitzen und entsprechend der Anzahl als VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅ usw. bezeichnet werden. VEGF-A₁₆₅ ist die dominierende sezernierte Spezies. Als Folge dieser Varianz resultieren unterschiedliche biologische Aktivitäten, die sich unter anderem in der Löslichkeit sowie Diffusions- und Rezeptorbindungsfähigkeit äußern.^[188] Dem VEGF-A₁₂₁ fehlt beispielsweise eine Bindungsdomäne für Heparin, weswegen es frei durch Gewebe diffundieren kann. Im Vergleich dazu verfügen VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆ über eine solche Bindungsstelle und zeigen eine hohe Affinität gegenüber Heparin, was sich in einer Retention aufgrund von Bindung an Zelloberflächen oder an der extrazellulären Matrix äußert.^[170,175]

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, ist VEGF-A ein entscheidender Faktor für die Erhöhung der Gefäßpermeabilität sowie die Bildung von Blutgefäßen.^[171] Dabei beeinflusst das VEGF-A verschiedene Aspekte des Verhaltens von Endothelzellen. Das Protein ist zum einen ein Mitogen und induziert somit die Zellteilung, zum anderen fördert VEGF die Zellmigration. Darüber hinaus verändert VEGF-A das Genexpressionsmuster von Endothelzellen sowie ihre Morphologie und kann als lebenserhaltender Faktor (*survival factor*) für sie und neu gebildete Gefäße fungieren.^[171,189] Studien zeigen jedoch, dass eine unkontrollierte und erhöhte Gabe von VEGF-A zu übermäßiger Gefäßproliferation zusammen mit dem Wachstum von aberranten Gefäßen und Gefäßtumoren führen kann.^[190–192] Daraus wird deutlich, dass VEGF ein starker und unter Umständen kritischer Gefäßregulator ist, sodass seine Dosierung in räumlicher, zeitlicher und quantitativer Weise genau reguliert werden muss, um unkontrolliertes Gefäßwachstum zu vermeiden.^[184] Aus diesem Grund wird an der Entwicklung von Freisetzungssystemen für VEGF geforscht, die eine ortsspezifische und kontrollierte Gabe des Wachstumsfaktors ermöglichen.

2.5.3 Strategien zur Freisetzung von VEGF

Bei traditionellen Strategien zur therapeutischen Unterstützung der Angiogenese werden angiogene Wachstumsfaktoren in den Blutkreislauf oder gezielt in das Gewebe injiziert, um eine Reaktion (z. B. Migration, Proliferation) der zellulären Komponente bereits vorhandener Blutgefäße auszulösen.^[193] Verabreichtes VEGF wird jedoch innerhalb kurzer Zeit (unter einer Stunde)^[194] abgebaut und aus dem Körper entfernt, wodurch eine wiederholte Verabreichung mit höheren Dosen notwendig wird.^[195,196] Diese Ansätze zur Abgabe von Wachstumsfaktoren können die Bildung unerwünschter Blutgefäße, beispielsweise an Stellen ruhender Tumore, und toxische Nebenwirkungen fördern.^[193] Ein *Delivery*-System, das eine ortsspezifische und kontrollierte Freisetzung über einen längeren Zeitraum gewährleistet, könnte dagegen die Wirksamkeit der Behandlung erhöhen und somit eine niedrigere Dosis des Wachstumsfaktors ermöglichen.^[197]

Die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren an einem Freisetzungssystem kann über physikalischen Einschluss, kovalente Anbindung oder physikalische Adsorption erfolgen.^[198-200] Der physikalische Einschluss wird häufig bei der Immobilisierung von Biomolekülen in Hydrogelen oder Mikrokapseln angewandt.^[201] In Bezug auf nanoporöse Silica-Materialien müssen bei dieser Methode die Poren groß genug sein, damit das Eindiffundieren der Wachstumsfaktoren möglich ist. Zum Einschließen des Biomoleküls und zur Kontrolle der Freisetzung können hinterher die Porenöffnungen über eine Silanisierung verengt oder mit einem Polymer überzogen werden.^[201] Nachteilig ist dabei, dass für die Modifizierung nach der Proteinadsorption z. T. Lösungsmittel eingesetzt werden müssen, welche die verwendeten Proteine denaturieren können.^[200] Bei einer kovalenten Immobilisierung wird der Wachstumsfaktor chemisch über die Reaktion funktioneller Gruppen (u. a. Thiol-, Amino-, Carboxy- und Epoxygruppen) an einer Oberfläche angebunden und fixiert. Eine diffusionskontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors ist dadurch nicht möglich und die Freigabe des Proteins hängt vielmehr von der Degradation der Trägermatrix ab.^[202] Der größte Nachteil dieses Verfahrens besteht in dem möglichen Verlust der biologischen Aktivität des Wachstumsfaktors.^[198,200]

Die physikalische Adsorption ist die einfachste Methode zur Immobilisierung von Enzymen auf Oberflächen, und da keine weiteren Modifizierungen erfolgen müssen, ist das Risiko einer Denaturierung der Enzyme vergleichsweise gering.^[198] Das Protein kann über verschiedene Interaktionen wie Wasserstoffbrücken, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen an der Oberfläche adsorbieren.^[200] Welche Wechselwirkungen auftreten, hängt einerseits von den Eigenschaften des Wachstumsfaktors (Größe, Ladung, Struktur) und andererseits von der Beschaffenheit der Oberfläche (wie Topographie, Hydrophobizität oder chemischer Zusammensetzung) und den gegebenen Bedingungen ab.^[203]

Die in der Literatur beschriebenen Freisetzungssysteme für VEGF verwenden hauptsächlich die Einkapselung und die physikalische Adsorption zur Immobilisierung. Eine Zusammenstellung verschiedener in der Literatur beschriebener Systeme ist in Tabelle 2.3 zu finden. Für diese Arbeit sind besonders Freisetzungssysteme mit Silica-Materialien interessant. Beispielsweise immobilisierten Kim *et al.* VEGF auf NPSNPs mit einem Partikeldurchmesser von ca. 205 nm (250 ng VEGF pro Milligramm Nanopartikel). Diese beladenen Partikel wurden anschließend in ein Kollagen gel inkorporiert, aus dem über Gefriertrocknung ein Schwammgerüst fabriziert wurde. Aus dem *Scaffold* konnte über einen Untersuchungszeitraum von 28 Tagen kontinuierlich VEGF freigesetzt werden. Darüber hinaus zeigte sich bei *in vivo*-Versuchen zur Angiogenese, dass das VEGF-freisetzende Gerüst im Vergleich zu einem VEGF-freien Gerüst die Bildung einer erhöhten Anzahl Blutgefäßen induzierte.^[204] Dashnyam *et al.* immobilisierten VEGF auf Silica-Mikropartikeln mit einem Durchmesser von 250 µm und konnten über einige Wochen eine kontinuierliche Freisetzung von VEGF sowie von Si⁴⁺-Ionen verzeichnen.

Weiterhin untersuchten sie die Auswirkungen der Si^{4+} -Ionen auf die Genexpression von Endothelzellen und konnten eine Hochregulierung angiogener Schlüsselmarker durch die Inkubation beobachten. *In vivo*-Untersuchungen zeigten, dass mit den VEGF-freisetzenden Mikropartikeln die Gesamtlängen und -flächen sowie die sich gebildeten röhrenförmigen Übergänge neuer Blutgefäße signifikant höher waren als in den Kontrollgruppen. Mit der Studie wurde eine synergistische Stimulation der Funktionen der Endothelzellen durch die simultane Freisetzung von VEGF und Si^{4+} -Ionen postuliert.^[205]

Neben Silica-Partikeln werden häufig auch Polymerpartikel aus Alginat oder Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) zur Freisetzung von VEGF verwendet. Zur Steigerung der Stimulation der Angiogenese wird zudem die simultane Freisetzung zweier Wachstumsfaktoren erprobt.

Tabelle 2.3 Beispiele für VEGF-Freisetzungs-systeme, welche in publizierten Studien verwendet wurden.
Abkürzungen: MCP-1: *monocyte chemotactic protein 1*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; PLGA: Poly(lactid-co-glycolid); VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Freisetzungssystem	Lit.
- VEGF immobilisiert auf Silica-Nanopartikeln (≈ 200 nm) eingearbeitet in eine Kollagen-Matrix	[204]
- VEGF immobilisiert auf Silica-Mikropartikeln (≈ 250 μm)	[205]
- VEGF eingekapselt in Alginat-Mikropartikel (10 μm)	[206]
- VEGF eingekapselt in PLGA-Nanopartikel (≈ 400 nm)	[197]
- VEGF eingekapselt in ein Alginat-Gel	[207]
- VEGF eingekapselt in PLGA-Mikropartikel (77 μm) in Kombination mit Fibrinkleber	[208]
- VEGF immobilisiert auf Heparin-funktionalisierten PLGA-Nanopartikeln (160 nm), eingearbeitet in Fibrin	[209,210]
- VEGF/MPC-1 eingekapselt in Alginat-Mikropartikel (9 μm), eingearbeitet in ein Kollagen/Fibronectin-Gel	[211]
- VEGF/PDGF immobilisiert auf PLGA-Matrix	[212]

2.5.4 Zielsetzung des Forschungsprojekts

Wie beschrieben, stellt bei größeren Implantaten die vollständige Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, aufgrund einer unzureichenden Vaskularisation eine der größten Herausforderungen im Bereich des *Tissue Engineerings* dar. Aus diesem Grund besteht das Ziel des Forschungsprojekts in der Entwicklung eines prävaskularisierten Implantats. Das Konzept ist in Abbildung 2.11 skizziert.

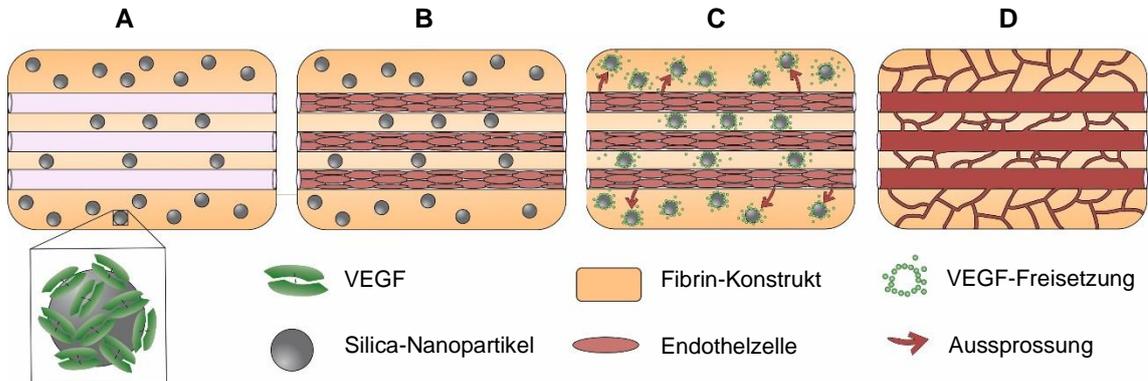


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des Projektkonzepts zur Entwicklung eines prävaskularisierten Implantats. A) Fibrin-Konstrukt mit vorgeformten Kanälen und VEGF-beladenen Silica-Nanopartikeln; B) Besiedlung der Kanäle u. a. mit Endothelzellen; C) Aussprossung der Endothelzellen in das Fibringerüst, unterstützt durch von Nanopartikeln freigesetztes VEGF; D) Prävaskularisiertes Implantat.

Die Basis des Implantats soll ein dreidimensionales Gewebekonstrukt aus Fibrin bilden. Fibrin ist ein natürliches Polymer, das durch die enzymatische Polymerisation von Fibrinogen gebildet wird. Bei Fibrinogen handelt es sich um ein Plasmaprotein (340 kDa), welches durch die Einwirkung von Thrombin zu Fibrinmonomeren prozessiert wird. Diese Monomere können sich anschließend spontan zu geordneten faserförmigen Strukturen zusammenlagern, die dann als Fibrin bezeichnet werden.^[213–215] Fibrin wird während der Blutgerinnung gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei der Blutstillung und Wundheilung. Die Fibrinmatrix wirkt dabei nicht nur als Barriere, die weiteren Blutverlust verhindert, sondern bietet auch ein temporäres Gerüst, das zur Unterstützung der Heilung und des Umbaus des Gewebes benötigt wird. Bei dem Prozess infiltrieren u. a. Endothelzellen die Matrix und bilden von dort aus neue kapillarartige Gefäßstrukturen.^[216] Aus diesem Grund, zusammen mit der Tatsache, dass Fibrin vom menschlichen Körper abgebaut werden kann, stellt dieses ein ideales Basismaterial für ein prävaskularisiertes Gewebeersatzmaterial dar.^[217] Zudem wurde in bereits in Studien gezeigt, dass sich Fibrin generell zur Prävaskularisierung eignet.^[218,219] Ein Nachteil bei der Verwendung von Fibrin ist allerdings die geringe mechanische Festigkeit. Mit einer Erhöhung der Dichte des Fibrinogens können die mechanischen Eigenschaften verbessert werden. Allerdings sind solche hochkonzentrierten Fibringele zu dicht, als dass Zellen in ausreichendem Maße einwachsen können.^[220] Das Einbringen eines Füllstoffs wie Silica-Nanopartikel

könnte einen Ansatz darstellen, bei geringen Konzentrationen des Fibrinogens die Eigenschaften zu verbessern.

Das geplante Fibringerüst soll mit Kanälen ausgestattet sein, die eine Aussaat mit Endothelzellen und anderen Zellen wie Stammzellen aus dem Fettgewebe (*adipose-derived stem cells*, ASCs) im Inneren des Gerüsts ermöglichen. Zusätzlich sollen VEGF-beladene Silica-Nanopartikel in das Fibrin eingearbeitet werden. Diese sollen nach der Besiedlung mit Zellen den Wachstumsfaktor kontrolliert freigegeben und somit einen VEGF-Gradienten erzeugen, der die Aussprossung der Endothelzellen in das Innere des Fibrins unterstützt. Schlussendlich soll mithilfe des prävascularisierten Implantats die sofortige Versorgung eines Gewebes nach Implantation ermöglicht werden, sodass das Überleben und die Einheilung des Implantats maßgeblich verbessert wird.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel erfolgt zunächst eine Beschreibung der durchgeführten Synthesen sowie eine Darstellung der vollzogenen Zellkulturexperimente. Anschließend werden die verwendeten Analysemethoden vorgestellt, wobei zwischen physiko- und biochemischen Methoden unterschieden wird.

3.1 Synthesen und Zellkulturexperimente

Als Freisetzungsbasis wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene nanoporöse Silica-Nanopartikelsorten verwendet. Der nächste Abschnitt thematisiert die Synthesevorschriften für die Herstellung und die Modifizierung sowie die Funktionalisierung dieser Nanopartikel. Generell wurde für die Synthesen ausschließlich Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$ verwendet, das einer Anlage vom Typ Milli-Q[®] Integral System der Firma Merck Millipore entnommen wurde.

Diesem Teil folgen Schilderungen zu den Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimenten mit den Biomolekülen. Außerdem werden die Durchführungen der verschiedenen Zellkulturexperimente ausgeführt.

3.1.1 Synthese von kleinporigen nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Die Synthese der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit einem Partikeldurchmesser von ca. 45 nm und einem Porendurchmesser von ungefähr 3 nm erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Qiao *et al.*^[36] Sie werden im weiteren Verlauf der Arbeit als *small pore-NPSNPs* (*sp-NPSNPs*) bezeichnet.

Zur Herstellung wurden zuerst 3.16 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und 0.23 g Diethanolamin in einem Gemisch aus 13.4 mL Ethanol (EtOH) und 75 mL Wasser unter Rühren bei 40 °C für 30 Minuten gelöst. Nach einer anschließenden Zugabe von 8.56 mL Tetraethylorthosilicat (TEOS) wurde die Reaktionslösung für weitere zwei Stunden bei gleicher Temperatur gerührt. Die entstandenen Partikel wurden durch Zentrifugation von der Lösung getrennt, zweimal mit Wasser und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und im Trockenschrank bei 60 °C über Nacht getrocknet. Zuletzt erfolgte die Entfernung des strukturdirigierenden Agens durch eine Calcination bei 550 °C für 5 h mit einer Aufheizrate von 1 K min^{-1} .

3.1.2 Synthese von großporigen nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Die Synthese der ca. 80 nm großen nanoporösen Silica-Nanopartikel mit 3.5 nm und 7.5 nm großen Poren wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von Nandiyanto *et al.* durchgeführt.^[40] Diese Nanopartikelsorte wird im Folgenden als *large pore-NPSNPs* (*lp-NPSNPs*) benannt.

Zunächst wurden 338 mg CTAB in einem Gemisch aus 120 mL Wasser und 76.36 mL Octan bei 60 °C unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Im Anschluss erfolgte eine rasche Zugabe von 84 mg *L*-Lysin, 4.135 mL TEOS, 64 µL ausgeschütteltem Styrol (s. u.) sowie 168 mg 2,2'-Azobis(2-amidinopropan) Dihydrochlorid (AIBA). Das Reaktionsgemisch rührte dann für drei Stunden unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation von der Reaktionslösung separiert und mit absolutem Ethanol gewaschen. Zur Entfernung der strukturdirigierenden Agenzien wurden die Partikel für 5 h bei 550 °C mit einer Aufheizrate von 1 K min⁻¹ calciniert.

Vor der Verwendung wurde das in der Synthese genutzte Styrol durch basisches Ausschütteln aufgereinigt. Dazu wurden 10 mL Styrol dreimal mit 5 mL 2.5 molarer Natronlauge ausgeschüttelt. Das Styrol wurde über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Verwendung verschlossen im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

3.1.3 Oberflächenmodifizierung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Nach der Synthese wurden beide synthetisierten Nanopartikelsorten über ein *post grafting*-Verfahren mit Alkoxysilanen modifiziert.

Für amino-modifizierte Partikel (NPSNP-NH₂) wurden zuerst 200 mg der unmodifizierten Silica-Nanopartikel (*sp*-NPSNP oder *lp*-NPSNP) in 8 mL Toluol im Ultraschallbad dispergiert. Im nächsten Schritt wurden zu dieser Dispersion 40 µL (0.17 mmol) 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) hinzugefügt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren für 2 h bei 80 °C erhitzt und danach weitere 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Schluss wurden die modifizierten Nanopartikel mittels Zentrifugation von der Reaktionslösung abgetrennt, dreimal mit Ethanol gewaschen und über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Das dazugehörige Reaktionsschema für diese Modifizierung ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

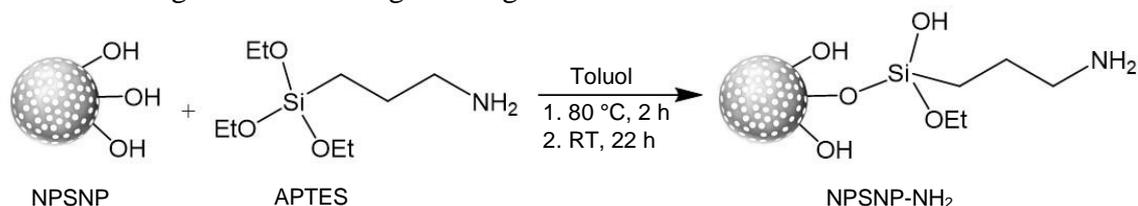


Abbildung 3.1: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung der NPSNPs mit APTES.

Neben der Oberflächenmodifizierung mit APTES wurden die nanoporösen Silica-Nanopartikel auch simultan mit zwei verschiedenen Alkoxysilanen mit variierenden Stoffmengenanteilen modifiziert. Dazu wurde ein Teil des APTES durch die entsprechende Stoffmenge Propyltrimethoxysilan (PTMS) ersetzt. Beispielsweise wurden bei der Probe NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) 50 % der Stoffmenge des APTES mit der entsprechenden Stoffmenge PTMS ausgetauscht. Die Durchführung erfolgte ansonsten analog zu der oben bereits beschriebenen. Es wurden lediglich beide Alkoxysilane rasch hintereinander

zu den in Toluol dispergierten Nanopartikeln gegeben. Das betreffende Reaktionsschema ist in Abbildung 3.2 zu sehen und die jeweils verwendeten Volumina für 200 mg Nanopartikel sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Volumen- und Stoffmengenangaben der verschiedenen Alkoxysilane, die für die Modifizierung verwendet wurden.

Bezeichnung	APTES		PTMS	
	Volumen / μL	Stoffmenge / mmol	Volumen / μL	Stoffmenge / mmol
NPSNP-NH ₂	40.0	0.170	–	–
NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	20.0	0.085	15.5	0.085
NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	13.3	0.057	20.7	0.133
NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	6.0	0.026	26.4	0.144

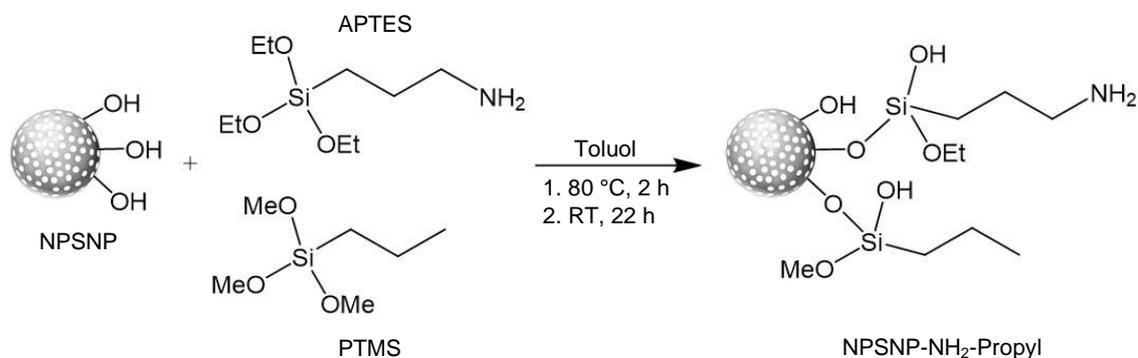


Abbildung 3.2: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung der NPSNPs mit APTES und PTMS.

3.1.4 Funktionalisierung der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit FITC

Um die Silica-Nanopartikel nach der Zellaufnahme zu lokalisieren, wurden sie mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Dazu wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von Lu *et al.*^[94] das FITC kovalent an die Aminogruppen von zuvor modifizierten NPSNPs (NPSNP-NH₂ oder NPSNP-NH₂-Propyl) gebunden. Ein Schema dieser Reaktion ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Für die Anbindung wurden zunächst 80 mg der modifizierten Silica-Nanopartikel in 23.88 mL absolutem Ethanol dispergiert. Danach wurde eine ethanolische FITC-Lösung aus 2 mg FITC und 300 μL absolutem Ethanol angesetzt, von der 278 μL zu der Partikeldispersion hinzugefügt wurden. Nach der Zugabe rührte das Gemisch verschlossen und unter Lichtausschluss über Nacht bei 30 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Reaktionslösung zentrifugiert. Danach wurden die Partikel mit absolutem Ethanol gewaschen, bis die Waschlösung farblos war (min. zehnmal). Die Trocknung der Partikel erfolgte unter Lichtausschluss bei 60 °C.

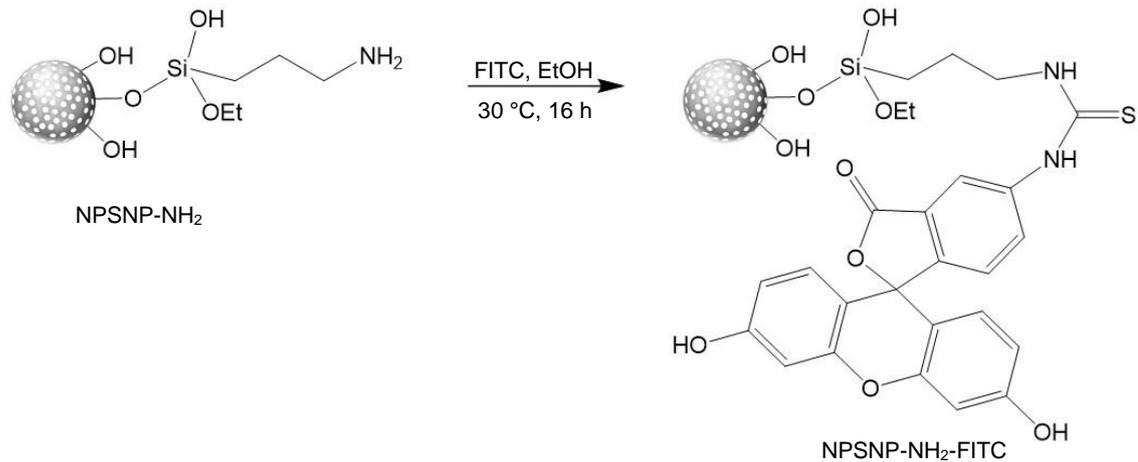


Abbildung 3.3: Reaktionsschema für die kovalente Anbindung von FITC an amino-modifizierte Silica-Nanopartikel.

3.1.5 siRNA-Immobilisierung auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und daran anschließende Freisetzungsexperimente

Für diese Versuche wurden mit dem Fluorophor DY-547 markierte Kontroll-siRNAs der Firma horizon Dharmacon verwendet (siGLO Red Transfection Indicator), die lyophilisiert in 5 nmol oder 20 nmol Aliquoten geliefert wurden. Um daraus eine 100 μM -Stamm-lösung anzusetzen, wurden 50 μL bzw. 200 μL Wasser (steril und RNase-frei) zu den siRNAs gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt.

Die Immobilisierung der siRNAs auf die nanoporösen Silica-Nanopartikel fand unter aseptischen Bedingungen statt. Dafür wurden die verwendeten Nanopartikel zunächst sterilisiert, indem sie mit Ethanol (70 %) gewaschen und unter einer sterilen Sicherheitswerkbank getrocknet wurden. Unmittelbar vor den Beladungsexperimenten wurden sie zusätzlich unter einer sterilen Werkbank für 30 Minuten mit UV-Strahlung bestrahlt.

Als Immobilisierungsmedium wurde ein Puffer aus 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) mit pH 5 gewählt. Zum Ansetzen der MES-Puffer-Lösung wurden 5.33 g MES abgewogen und in 400 μL Reinstwasser gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 5 mit 2 M Natronlauge wurde die Lösung in einen 500 mL-Messkolben überführt und das Volumen bis zur Ringmarke ergänzt. Vor der Verwendung wurde der Puffer steril filtriert. Aus den sterilisierten Partikeln wurde durch Zugabe des MES-Puffers eine Dispersion mit einer Konzentration von 2 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hergestellt. Danach wurden 40 μL dieser Dispersion (80 μg NPSNPs) in einem Mikroreaktionsgefäß (0.5 mL) vorgelegt und mit 3.01 μL der siRNA-Stammlösung (4.4 μg) und 44.99 μL MES-Puffer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Bei dem Gesamtvolumen von 88 μL betrug die resultierende Konzentration bezogen auf die siRNAs 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und bezogen auf die NPSNPs 0.9 mg mL^{-1} . Für die Inkubation wurden die Reaktionsgefäße schließlich bei 7 °C für 24 Stunden in einen Thermomixer der Firma Biozym Scientific mit einer Schüttelrate von 500 rpm gestellt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Separation der Partikel

von der Inkubationslösung durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 10 000 rpm bzw. 9 744 g. Anschließend wurden der Inkubationsüberstand entnommen und bis zur weiteren Quantifizierung der siRNA-Menge bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Freisetzungsexperimente mit den beladenen Partikeln erfolgten direkt im Anschluss an die Immobilisierung. Dazu wurde das entnommene Volumen der Inkubationslösung durch eine sterile 0.01 molare, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ersetzt und durch mehrmaliges Pipettieren mit den Partikeln vermischt. Die Freisetzung fand dann bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer Dauer von einer Woche statt. An bestimmten Zeitpunkten erfolgte ein erneutes Abtrennen der Silica-Nanopartikel von der Freisetzungslösung durch Zentrifugation, gefolgt von einer Entnahme des Überstandes und einem Ersetzen des entnommenen Volumens mit frischem PBS. Das Prinzip der Durchführung ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

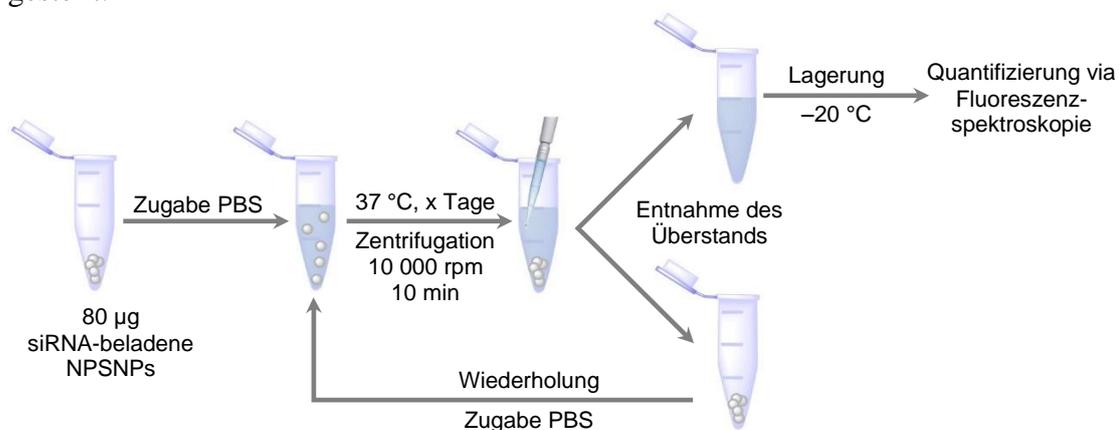


Abbildung 3.4: Verlauf der Freisetzungsexperimente mit siRNA-beladenen NPSNPs.

Neben den Inkubationsüberständen wurden auch alle Freisetzungslösungen bis zur Quantifizierung mittels Fluoreszenz- bzw. UV/VIS-Spektroskopie (NanoDrop™) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Für diese Versuche wurden sowohl die *sp*-NPSNPs als auch die *lp*-NPSNPs mit allen in Tabelle 3.1 aufgelisteten Modifizierungen verwendet. Als Referenzproben wurde bei jeder Partikelart anstelle der siRNA-Stammlösung das entsprechende Volumen durch MES-Puffer ersetzt, ansonsten erfolgte eine Behandlung unter gleichen Bedingungen.

3.1.6 Untersuchung des Degradationsverhaltens der NPSNPs unter den Freisetzungsbedingungen

Um eine mögliche Degradation der Silica-Nanopartikel während der Freisetzungsexperimente zu untersuchen, wurden ausgewählte Nanopartikelsorten (*sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) und *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)) unter gleichen Bedingungen, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, behandelt. Zur Simulation der Immobilisierungsbedingungen wurden 45 mg der Nanopartikel zunächst in 50 mL MES-Puffer (pH 5) dispergiert und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Partikel für 15 Minuten bei

5 000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde entnommen. Zur Nachahmung der Freisetzungsbedingungen wurden im Anschluss 50 mL PBS zu den Partikeln gegeben, sodass die Nanopartikelkonzentration mit 0.9 mg mL^{-1} derjenigen aus den siRNA-Freisetzungsexperimenten entsprach. Die Partikel wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 10 mL-Pipette mit der Lösung vermischt und danach bis zum Mediumwechsel im Inkubationsofen bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Wechsel des Mediums erfolgte analog zu den Freisetzungsexperimenten an den Tagen 1, 2, 5 und 7. An diesen Tagen wurden die Proben zuerst zentrifugiert (15 Minuten, 5 000 rpm), dann wurde das überstehende Medium abgenommen und durch das gleiche Volumen PBS ersetzt. Bei den Proben, für die das Experiment an dem jeweiligen Tag enden sollte, wurde anstatt des Mediumwechsels ein Waschschrift mit 50 mL Reinstwasser vollzogen. Dies sollte überschüssiges PBS entfernen und einer möglichen Auskristallisation von Phosphatsalzen bei der anschließenden Trocknung bei $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ entgegenwirken.

3.1.7 Bestimmung der maximalen siRNA-Immobilisierungsmenge

Um eine Aussage über die maximale Immobilisierungsmenge auf den modifizierten Silica-Nanopartikeln zu treffen, wurden einer festgelegten Partikelmenge (*sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) bzw. *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)) unterschiedliche siRNA-Konzentrationen offeriert und die Effizienz der Immobilisierung indirekt aus der verbliebenen siRNA-Konzentration im Überstand bestimmt. Für diese Versuche wurden ebenfalls DY-547-markierte Kontroll-siRNAs der Firma horizon Dharmacon verwendet.

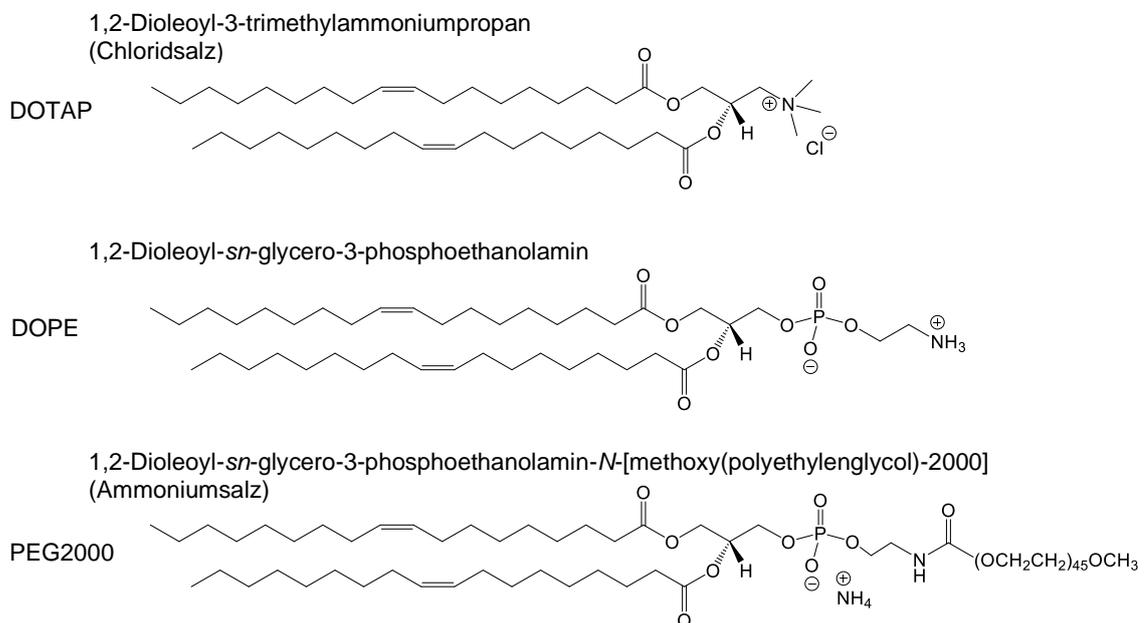
Die Sterilisation der eingesetzten Nanopartikel vor dem Versuch erfolgte nach der Beschreibung in Abschnitt 3.1.5. Mit den sterilisierten Partikeln wurde durch Zugabe von steril filtriertem MES-Puffer (pH 5) eine $2\,000 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Dispersion hergestellt, von der $50 \text{ }\mu\text{L}$ ($100 \text{ }\mu\text{g}$) in einem Mikroreaktionsgefäß vorgelegt wurden. Zu den Partikeln wurden dann verschiedene Volumina der siRNA-Stammlösung sowie MES-Puffer gegeben, sodass bei einem Gesamtvolumen von $100 \text{ }\mu\text{L}$ siRNA-Konzentrationen zwischen $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ und $250 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht wurden. Die verwendeten Volumina können zusammen mit den dazugehörigen siRNA-Massen Tabelle 3.2 entnommen werden. Zur Inkubation wurden die verschiedenen Ansätze für 24 Stunden bei $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in einen Thermoschüttler (500 rpm) gestellt. Hinterher erfolgte eine Separation der Partikel vom überstehenden Medium mittels zehnmütiger Zentrifugation. Die Überstände der einzelnen Ansätze wurden abgenommen und bis zur Quantifizierung der verbleibenden siRNA-Menge bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Im Anschluss an die Immobilisierung fand eine Untersuchung der siRNA-Freisetzung analog zu der in Abschnitt 3.1.5 statt.

Tabelle 3.2: Angaben der verwendeten Volumina der siRNA-Stammlösung sowie der MES-Pufferlösung. Die offerierte Nanopartikelmasse betrug 100 µg und das Gesamtvolumen 100 µL.

Endkonzentration siRNA / µg mL ⁻¹	Volumen siRNA- Stammlösung / µL	Korrespondierende siRNA-Masse / µg	Volumen MES- Puffer / µL
000	00.00	00.0	50.00
050	03.76	05.0	46.24
075	05.64	07.5	44.36
100	07.52	10.0	42.48
150	11.28	15.9	38.72
250	18.80	25.9	31.20

3.1.8 Umhüllung der mit siRNA beladenen nanoporösen Silica-Nanopartikel mit verschiedenen Lipiden

Um die immobilisierten siRNAs vor einer frühzeitigen Degradation zu schützen und gleichzeitig die Zellaufnahme der Partikel zu verbessern, wurden die mit siRNAs beladenen Silica-Nanopartikel zusätzlich mit einer Lipidhülle versehen. Bei den verwendeten Lipiden handelte es sich um DOPE, DOTAP und PEG2000, die als Pulver von der Firma Avanti[®] erworben wurden. Ihre vollständigen Namen sind zusammen mit ihren Strukturformeln in Abbildung 3.5 dargestellt.

**Abbildung 3.5:** Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Lipide.

Die Umhüllung verlief nach einer abgewandelten Vorschrift von Möller *et al.*^[72] Im Vorfeld wurden dafür aus den einzelnen Lipiden Lösungen mit einer Konzentration von 2.5 mg mL⁻¹ in einem Gemisch aus Wasser und Ethanol (60/40) hergestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Zum Einsatz kamen üblicherweise 100 μg Silica-Nanopartikel, die entsprechend der Vorschrift in Abschnitt 3.1.7 zunächst mit siRNAs beladen wurden (entweder 50 $\mu\text{g mg}^{-1}$ oder 75 $\mu\text{g mg}^{-1}$). Nach der Immobilisierung wurden die beladenen Partikel für zehn Minuten bei 10 000 rpm (9 744 g) zentrifugiert und das überstehende Medium entfernt. Daran anschließend erfolgte die Umhüllung mit verschiedenen Lipidformulierungen. Dazu wurden unterschiedliche Volumina der entsprechenden Lipidlösungen (s. Tabelle 3.3) hintereinander zu den Nanopartikeln gegeben und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach einer zweisekündigen Behandlung im Ultraschallbad wurden 200 μL Wasser (auf ca. 5 $^{\circ}\text{C}$ gekühlt) zu dem Reaktionsgemisch gegeben und mit einer Pipette für ungefähr 30 Sekunden gründlich vermischt. Überschüssige Lipide wurden hinterher über zweimaliges Waschen mit 200 μL Wasser entfernt, wobei zwischen jeder Wasserzugabe eine Zentrifugation von zehn Minuten bei 10 000 rpm durchgeführt wurde. Zuletzt konnten nach der Abnahme des Waschwassers die umhüllten Partikel in einem Medium nach Wahl (Wasser oder PBS) wiederaufgenommen werden.

Tabelle 3.3: Volumen- und Stoffmengenangaben der Lipidlösungen (2.5 mg mL^{-1} in einem Gemisch aus Wasser und Ethanol) für die verschiedenen Lipidformulierungen.

Verhältnis von DOTAP/DOPE/PEG2000	DOTAP	DOPE	PEG2000
50/50/0	17.1 μL (61 nmol)	18.0 μL (61 nmol)	–
60/35/5	20.4 μL (73 nmol)	12.7 μL (43 nmol)	6.8 μL (6 nmol)

3.1.9 Untersuchungen zur Zellaufnahme an HS-5(-GFP)-Zellen

Die Zellaufnahme der siRNA-beladenen Silica-Nanopartikel wurde an HS-5-Zellen sowie an HS-5-Zellen, die mit einem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)-Gen funktionalisiert waren (HS-5-GFP-Zellen), untersucht. Letztgenannte besaßen das Gen einer verbesserten Variante des grün fluoreszierenden Proteins von Clontech, welches über einen lentiviralen Vektor exprimiert wurde. Die Expression des eGFP-Gens war konditional, sodass während der Kultivierung Doxycyclin (DOX) als Induktor vorliegen musste, damit es zur Bildung des eGFPs kam. Die Zellen wurden von der AG Hoffmann (Klinik für Orthopädie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)) zur Verfügung gestellt. Die HS-5-Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, standardisiertes Nährmedium) kultiviert, welches mit FCS, HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) sowie Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) versetzt war. Die vollständige Rezeptur des Nährmediums ist im Anhang 7.2 zu finden. Bei der Kultivierung der HS-5-GFP-Zellen wurde vor der Verwendung des Mediums Doxycyclin hinzugegeben (Endkonzentration 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Kultivierung und Expansion der Zellen. Zunächst wurde ein Zellaliquot (HS-5 sowie HS-5-GFP) mit 500 000 Zellen aufgetaut und mit 1 mL warmem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen in ein Zentrifugengefäß überführt, in dem bereits 5 mL

warmes Medium (\pm DOX) vorgelegt waren, und für fünf Minuten bei 200 g (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert. Danach folgte eine Abnahme des überstehenden Mediums sowie eine Resuspension der Zellen in 1 mL frischem Medium. Die Zellen wurden in eine 175 cm² Zellkulturflasche mit 25 mL Medium (\pm DOX) überführt und für zwei bis drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank expandiert.

Aussaat der Zellen. Die Zellaufnahme der mit siRNAs beladenen Nanopartikel wurde mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie untersucht. Zur Probenpräparation mussten die Zellen dafür fixiert werden, weswegen sie auf 4-Kammer-Objektträgern (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™) der Firma Thermo Fisher Scientific kultiviert wurden. Für die Aussaat wurde nach der Expansion das überstehende Medium entfernt und die Zellen wurden mit 20 mL PBS gewaschen. Danach wurden 4.8 mL Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zur Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche hinzugegeben, wobei die Inkubationszeit im Brutschrank fünf Minuten betrug. Nach dem Verstreichen der Zeit wurde die Reaktion mit 18 mL Medium gequencht. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer serologischen Pipette in Einzelzellen suspendiert und in ein Zentrifugengefäß überführt. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 20 μ L dieser Suspension entnommen, in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und unter einem Mikroskop ausgezählt. Die restlichen Zellen wurden für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert und das überstehende Medium wurde verworfen. Über die Zugabe frischen Mediums konnte die Zellkonzentration zuerst auf 1 Million Zellen pro Milliliter und dann in einem weiteren Gefäß auf 34 000 Zellen pro Milliliter verdünnt werden. Zuletzt wurde 1 mL dieser Zellsuspension in jede Kammer eines Objektträgers gegeben. Zum Anwachsen der Zellen wurden sie für 24 Stunden in einen Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gestellt.

Transfektion. Einen Tag nach der Zellaussaat erfolgte die Transfektion. Zur Vorbereitung wurde dafür das überstehende Zellmedium in den Kammern entfernt und durch 400 μ L frischen Mediums (\pm DOX) ersetzt.

Für die Untersuchung der Zellaufnahme wurde die NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierung beider Nanopartikelsorten sowie ihre dazugehörige FITC-funktionalisierte Variante verwendet. Am Vortag wurden sie mit fluoreszenzmarkierten siRNAs (horizon Dharmacon) beladen (75 μ g mg⁻¹). Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt 3.1.7, lediglich der Ansatz wurde herunterskaliert. Die verwendeten Volumina sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Auflistung der verwendeten Volumina für die Experimente zur Zellaufnahme.

siRNA-Stammlösung (20 μM)	NPSNP-Lösung (2 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	MES-Puffer
7.76 μL (2.1 μg)	13.75 μL (27.5 μg)	19.75 μL

Am Tag der Transfektion wurden die Lipidumhüllungen nach Abschnitt 3.1.8 durchgeführt. Auch hierbei wurden die Volumina den kleineren Mengen angepasst. Die genauen Angaben sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Nach dem Waschen wurden die lipidumhüllten Partikel durch Zugabe von PBS auf eine siRNA-Konzentration von 375 nM verdünnt. Zuletzt wurden jeweils 100 μL dieser Verdünnungen in eine der Kammern auf einem Chamber-Slide getropft, sodass die Konzentration bezogen auf die siRNAs 75 nM betrug. Dabei wurden die Ansätze mit FITC-markierten Silica-Nanopartikeln auf die HS-5-Zellen gegeben und die mit Silica-Partikel ohne Fluoreszenzmarkierung auf die HS-5-GFP-Zellen. Zusätzlich wurden siRNA-beladene Nanopartikel ohne Lipidumhüllung auf die Zellen gegeben.

Tabelle 3.5: Angaben der eingesetzten Volumina für die verschiedenen Lipidformulierungen bei den Zellkulturexperimenten. Die Lipide lagen dabei mit einer Konzentration von 2.5 mg mL^{-1} in einem Gemisch aus Wasser und Ethanol (60/40) vor.

Verhältnis von DOTAP/DOPE/PEG2000	DOTAP	DOPE	PEG2000
50/50/0	4.69 μL (17 nmol)	4.95 μL (17 nmol)	–
60/35/5	5.60 μL (20 nmol)	3.48 μL (12 nmol)	1.87 μL (2 nmol)

Zum Vergleich wurde an den HS-5-GFP-Zellen eine Transfektion der fluoreszenzmarkierten siRNAs mit Lipofectamine®-2000 (Thermo Fisher Scientific), einem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz, durchgeführt. Dazu wurden zunächst 1.5 μL einer siRNA-Lösung (20 μM) mit 8.5 μL sterilem Wasser sowie mit 50 μL DMEM ohne Zusätze vermischt. Anschließend wurden zu den siRNAs 60 μL eines Gemisches aus 1.75 μL Lipofectamine®-2000 und 58.25 μL DMEM hinzugefügt. Zum Durchmischen wurde mehrmals auf- und abpipettiert sowie ein Vortexer verwendet (zwei Sekunden). Nach einer kurzen Zentrifugation zum Sammeln der Mixtur am Boden des Reaktionsgefäßes wurde eine Reaktionszeit von fünf Minuten eingehalten. Zuletzt wurden 50 μL der siRNA-Lipofectamine®-Komplexe zusammen mit 50 μL Medium auf die Zellen gegeben, wodurch eine siRNA-Konzentration von 25 nM erreicht wurde.

Fixieren und Färben. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte eine Fixierung der Zellen. Dazu wurde zuerst das überstehende Medium in jeder Kammer entfernt, danach konnte dreimal mit 500 μL PBS gewaschen werden. Es wurden 500 μL einer Paraform-

aldehyd(PFA)-Lösung (0.5 % in PBS) in jedes Segment gegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hinterher erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 500 μL PBS. Zum Färben der Zellkerne wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Aus 13 μL einer 1 mg mL^{-1} -Stammlösung wurde zunächst durch 1 000-fache Verdünnung mit PBS eine Lösung hergestellt, von der dann 500 μL in jedes der zuvor entleerten Kompartimente gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug zehn Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Es folgte eine Wiederholung der Waschprozedur mit 500 μL PBS, wobei nach dem letzten der drei Waschschrte die Flüssigkeit sorgfältig entfernt wurde. Zum Präparieren der Objektträger für die Mikroskopie wurden die umgebenen Kammern entfernt und 50 μL Fluoromount-GTM (Thermo Fisher Scientific) auf jedes Segment der Objektträger gegeben. Zuletzt wurden Deckgläschen auf den Zellen platziert und durch vorsichtiges Andrücken die Luft einschüsse entfernt (s. Abbildung 3.6). Bis zur Mikroskopie wurden die präparierten Proben unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert.

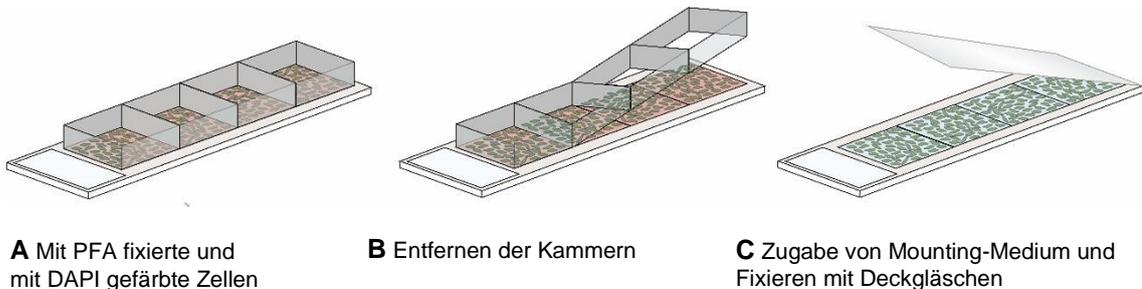


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung zur Probenpräparation der Zellaufnahmeuntersuchungen für die konfokale Laser-Rastermikroskopie.

3.1.10 Knockdown-Untersuchungen an HS-5-GFP-Zellen in 96-Well-Platten

Die Fähigkeit der designierten Silica-Nanopartikel, die immobilisierte siRNA im Zytoplasma einer Zelle freizusetzen und damit eine RNAi zu induzieren, wurde an HS-5-GFP-Zellen untersucht. Dabei diente das eGFP als Testprotein, dessen Produktion herunterreguliert werden sollte. Die passende siRNA gegen die mRNA des eGFP-Gen wurde von Thermo Fisher Scientific kommerziell erworben. Die Basensequenz aus Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uracil (U) lautete aus: 3'-GCAUCAAGGUGAA-CUUCAATT-5' (*sense*-Strang) und 3'-UUGAAGUUCACCUUGAUGCCG-5' (*anti-sense*-Strang). Als Kontrolle wurden Versuche mit der Silencer®Select Negative Control-siRNA von InvitrogenTM durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die siRNAs gegen eGFP als „siGFP“ und die Kontroll-siRNAs als „siNEG“ bezeichnet.

Kultivierung und Expansion der HS-5-GFP-Zellen. Die Kultivierung und Expansion der Zellen erfolgte analog zur in Abschnitt 3.1.9 beschriebenen Vorgehensweise.

Aussaat der Zellen. Die Aussaat der Zellen wurde auf ähnliche Weise durchgeführt wie in Abschnitt 3.1.9, anstelle der Chamber-Slides wurde jedoch eine schwarze 96-Well-

Platte mit durchsichtigem Boden (Corning Life Science) verwendet. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kultivierungsflasche und dem Zählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 11 000 Zellen pro Milliliter angesetzt. Von dieser wurden 200 μL in jedes Well der Platte gegeben, sodass eine Zellzahl von 2 200 Zellen pro Well (6 875 Zellen pro cm^2) erreicht wurde.

Transfektion. Einen Tag nach der Aussaat fand die Transfektion statt. Dazu wurden zunächst 120 μL des Kulturmediums entfernt. Für die *Knockdown*-Untersuchung kam die NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierung beider Nanopartikelsorten zum Einsatz. Wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, fand am Vortag die Beladung mit siGFP oder siNEG (75 $\mu\text{g mg}^{-1}$) und am Tag der Transfektion die Lipidumhüllungen mit den beiden Lipidformulierungen (vgl. Tabelle 3.5) statt. Nach dem Waschen wurden die lipidumhüllten Partikel durch Zugabe von PBS auf eine siRNA-Konzentration von 2.069 μM verdünnt. Von dieser Lösung wurden weitere Verdünnungen mit PBS angesetzt, sodass durch Zugabe von 20 μL in jedes Well siRNA-Konzentrationen zwischen 50 und 200 nM erzielt wurden. Eine Vermischung mit dem vorhandenen Medium im Well erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Neben den lipidumhüllten Partikeln wurde die Transfektion auch mit siRNA-beladenen Partikeln ohne Lipidumhülle durchgeführt.

Eine Transfektion mit Lipofectamine®-2000 diente bei diesen Versuchen als Kontrolle. Die Vorschrift zur Herstellung der siRNA-Lipofectamine®-Komplexe wurde bereits in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, wobei anstelle der fluoreszenzmarkierten siRNAs siGFP bzw. siNEG verwendet wurde. Von jedem Ansatz wurde so viel in jedes Well gegeben, dass bei einem Gesamtvolumen von 100 μL siRNA-Konzentrationen von 25 nM oder 50 nM erreicht wurden.

Als Kontrolle wurden zu Zellen nur 20 μL PBS ohne Nanopartikel gegeben. Die Inkubationszeit für das Experiment belief sich auf 24 Stunden. Nach dieser Zeit wurde das überstehende Medium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Untersuchungen des *Knockdowns*. Vor der Transfektion sowie zwei Tage nach der Transfektion wurde die Fluoreszenzintensität der HS-5-GFP-Zellen zur Beurteilung des GFP-*Knockdowns* an einem Plattenreader des Typs Infinite 200 PRO der Firma Tecan über die Software i-control 1.12 bestimmt. Die Exzitationswellenlänge betrug dabei 485 nm und die Emissionswellenlänge 535 nm und die Messungen wurden von unten als Mehrfachmessung (3x3) durchgeführt. Zur Visualisierung der Herunterregulierung der GFP-Expression wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (OLYMPUS CKX53 mit der Software cellSense Standard) Aufnahmen der Zellen angefertigt.

Die Zellen wurden weiter in Kultur gehalten, wobei alle zwei bis drei Tage ihr Medium gewechselt wurde. Sechs Tage nach der Transfektion erfolgte zur Evaluation der Zellviabilität ein Assay mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Die dazugehörige Vorgehensweise ist im nächsten Abschnitt beschrieben.

3.1.11 MTT-Test an HS-5-GFP-Zellen

Sechs Tage nach der Transfektion (vgl. vorheriger Abschnitt) erfolgte eine Bestimmung der Zellviabilitäten der HS-5-GFP-Zellen mittels eines MTT-Tests der Firma Roche. Dazu wurde zunächst das überstehende Zellmedium verworfen und 60 μL eines Gemisches aus 3.3 mL Medium und 330 μL MTT-Reagenz in die Wells pipettiert. Zum Verteilen des Mediums wurde die Platte vorsichtig geschwenkt und anschließend für vier Stunden bei 37 °C gelagert. Danach folgte eine Zugabe von 100 μL einer Solubilisations-Lösung, die aus 0.01 M HCl mit 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) bestand und zum Lösen der sich gebildeten Formazankristalle diente. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Zellkulturplatte zuerst zentrifugiert (15 Minuten, 2 000 rpm), dann wurden 100 μL der jeweiligen Überstände in eine UV/Vis-Platte pipettiert und bei 580 nm mit 650 nm als Referenz an einem Multiplattenreader infinite F200 PRO der Firma Tecan vermessen.

3.1.12 Zellkultur für die *Knockdown*-Untersuchungen von HS-5-GFP-Zellen am Durchflusszytometer

Kultivierung und Expansion der HS-5-GFP-Zellen. Die Kultivierung und Expansion wurde, wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, durchgeführt.

Aussaat der Zellen. Für die Aussaat wurden bei diesen Experimenten 12-Well-Platten der Firma Greiner verwendet. Die expandierten Zellen wurden vom Boden der Kultivierungsflasche abgelöst und mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Danach wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 17 416 Zellen pro Milliliter angesetzt. Von dieser wurden 1.5 mL in jedes Well der Platte gegeben, sodass wie bei den Versuchen in der 96-Well-Platte eine Zellkonzentration von 6 875 Zellen pro cm^2 lag.

Transfektion. Auch bei diesen Versuchen fand die Transfektion einen Tag nach der Aussaat statt. Vor der Transfektion wurden 700 μL des überstehenden Zellmediums entfernt. Für die *Knockdown*-Untersuchung kam ebenfalls die NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierung beider Nanopartikelsorten zum Einsatz. Wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, fanden am Vortag die Beladungen mit siGFP oder siNEG (75 $\mu\text{g mg}^{-1}$) und am Tag der Transfektion die Lipidumhüllungen statt. Nach dem Waschen wurden die lipidumhüllten Partikel durch Zugabe von PBS auf eine siRNA-Konzentration von 2.069 μM verdünnt. Von dieser Lösung wurden weitere Verdünnungen mit PBS angesetzt, sodass durch Zugabe von 200 μL in jedes Well eine siRNA-Konzentration von 75 nM erzielt wurde. Die Transfektionslösungen wurden dabei vorsichtig in das jeweilige Well getropft. Danach wurde die Platte zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt.

Als Kontrolle wurde wieder eine Transfektion mit Lipofectamine®-2000 durchgeführt. Die Vorschrift zur Herstellung der siRNA-Lipofectamine®-Komplexe wurde bereits in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, wobei anstelle der fluoreszenzmarkierten siRNAs siGFP

bzw. siNEG verwendet wurde. Von jedem Ansatz (mit siGFP bzw. mit siNEG) wurden 100 μ L zusammen mit 100 μ L Medium in das entsprechende Well gegeben, wodurch bei einem Gesamtvolumen von 1 mL eine siRNA-Konzentration von 25 nM erreicht wurde. Einen Tag nach der Zugabe der siRNAs zu den Zellen wurde das Medium gewechselt, zwei Tage später erfolgte die Untersuchung am Durchflusszytometer.

Präparation für die Durchflusszytometrie. Für die Durchflusszytometrie mussten die Zellen als Suspension in einem Puffer aus PBS mit 0.5 % BSA (*bovine serum albumin*, Rinderserumalbumin) und 2 mM EDTA mit einer Konzentration von ca. 43 000 Zellen pro 100 μ L vorliegen. Am Tag der Untersuchung wurden die Zellen deshalb mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 150 μ L Trypsin/EDTA vom Boden der 12-Well-Platte gelöst. Die Reaktion wurde mit 1 mL Medium nach fünf Minuten Inkubation gequentscht, und die Zellkonzentration wurde mithilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Hinterher konnte durch Zugabe der Pufferlösung die gewünschte Zellkonzentration eingestellt werden. Bis zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer wurden die Zellen auf Eis gelagert.

3.1.13 Zellkultur für die *Knockdown*-Untersuchungen von CD73 an DPSCs am Durchflusszytometer

Neben den *Knockdown*-Untersuchungen an HS-5-GFP-Zellen wurden Versuche zur Herunterregulierung eines Gens mit den NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierungen beider Nanopartikelsorten mit einer Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (50/50/0) an dentalen Pulpastammzellen durchgeführt. Dabei wurde der Oberflächenmarker CD73 (*Cluster of Differentiation 73*), der von dem NT5E-Gen codiert wird, als Testprotein ausgewählt. Die passende siRNA gegen die mRNA des NT5E-Gens wurde von Thermo Fisher Scientific kommerziell erworben (Cat. # 4390824; 3'-GUAUCCAUGUGCAUUUUAATT-5' (*sense*-Strang) und 3'-UUAAAUGCACAUGGAUACGT-5' (*antisense*-Strang)). Als Kontrolle wurden wieder Silencer® Select Negative Control-siRNAs von Invitrogen™ verwendet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die siRNA gegen NT5E als „siNT5E“ und die Kontroll-siRNA als „siNEG“ bezeichnet. Vor der Quantifizierung am Durchflusszytometer mussten die CD73-Moleküle auf der Oberfläche der Zellen mit einem fluoreszenten Antikörper markiert werden. Dieser wurde von Miltenyi Biotec bezogen, war mit dem Fluorophor R-Phycoerythrin (PE) gelabelt und wird im Folgenden als CD73-PE gekennzeichnet. Zusätzlich kam bei nicht-transfizierten Zellen ein PE-markierter Isotyp-Kontrollantikörper (REA-PE) zum Einsatz, der ebenfalls von Miltenyi Biotec bezogen wurde.

Kultivierung und Expansion der Zellen. Zunächst wurde ein Zellaliquot DPSCs der Firma Lonza (Passage 6) mit 500 000 Zellen aufgetaut und in einer 175 cm² Zellkulturflasche für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ expandiert. Als Medium wurde dafür

α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle–alpha modification*, standardisiertes Nährmedium), welches mit 10 % FCS sowie 1 % Pen/Strep versetzt war, verwendet.

Aussaat der Zellen. Für die Aussaat wurden bei diesen Experimenten 6-Well-Platten eingesetzt. Die expandierten Zellen wurden mithilfe von Accutase vom Boden der Kultivierungsflasche abgelöst und mit einer Zellzahl von 48 000 Zellen in 3 mL pro Well ausgesät (5 000 Zellen pro cm²).

Transfektion. Einen Tag nach der Aussaat fand die Transfektion der siRNAs mit den Silica-Nanopartikeln sowie mit Lipofectamine®-2000 als Kontrolle statt. Die Durchführung zur Beladung der *sp*- bzw. *lp*-NPSNPs-NH₂-Propyl (50/50) mit siRNA (75 μ g mg⁻¹) sowie deren Umhüllung mit Lipiden wurde bereits in Abschnitt 3.1.9 beschrieben. Nach dem Umhüllen wurden die Partikel in unterschiedlichen Volumen PBS aufgenommen, sodass durch Zugabe von 400 μ L zu den Zellen siRNA-Konzentrationen von 50 nM bei den *sp*-NPSNPs und 75 nM bei den *lp*-NPSNPs erzielt wurden. Durch vorsichtiges Schwenken der Well-Platte wurde nach dem Hinzufügen der Partikel eine zusätzliche Vermischung erreicht.

Für die Transfektion mit Lipofectamine® wurden zunächst 3 μ L einer siRNA-Lösung (20 μ M siNT5E bzw. siNEG) mit 17 μ L RNase-freiem Wasser vermischt. Anschließend wurden zu der siRNA 100 μ L α -MEM (ohne Zusätze) gegeben. In einem separaten Mikroreaktionsgefäß wurden 3.5 μ L Lipofectamine®-2000 mit 116.5 μ L α -MEM vermischt. Dieses Volumen von 120 μ L wurde danach zu den 120 μ L siRNA-Lösungen gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Zudem erfolgte eine kurze Behandlung auf einem Vortexer, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation zum Sammeln der Lösung am Boden des Reaktionsgefäßes. Zur Bildung der Lipoplexe wurde eine Reaktionszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur eingehalten. Zuletzt wurden 200 μ L des siRNA-Lipofectamine®-Gemisches sowie 200 μ L Medium auf die Zellen gegeben, wodurch die resultierende siRNA-Konzentration bei einem Gesamtvolumen von 2 mL 25 nM betrug.

Einen Tag nach der Transfektion wurde das Medium der Zellen verworfen und durch 2 mL frisches α -MEM mit FCS und Pen/Strep ersetzt.

Präparation für die Durchflusszytometrie. Zwei Tage nach der Transfektion wurde der *Knockdown* am Durchflusszytometer quantifiziert. Dafür mussten die vorhandenen CD73-Moleküle mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert werden. Für die Markierung wurde das überstehende Zellmedium der einzelnen Proben verworfen. Nach einem zweimaligen Waschen der Zellen mit 2 mL PBS wurden sie mit 0.5 mL Accutase-Lösung vom Boden der Well-Platte gelöst. Das Stoppen der Reaktion mit 1.5 mL Medium erfolgte nach einer zehnminütigen Inkubation bei 37 °C. Zum Auszählen der Zellen wurden 50 μ L in eine Neubauer-Zählkammer (*improved*) gegeben. Die restlichen DPSCs

wurden für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das überstehende Zellmedium verworfen und die Zellen auf eine Konzentration von 3 Millionen Zellen pro Milliliter mit einem Puffer aus PBS mit 0.5 % BSA und 2 mM EDTA verdünnt. Von dieser Suspension wurden 100 µL (300 000 Zellen) in ein Mikroreaktionsgefäß (1.5 mL) überführt und mit 2 µL des CD73-PE versetzt. Als Kontrolle wurden Zellen, bei denen keine Transfektion stattgefunden hatte, die aber ansonsten unter gleichen Bedingungen behandelt wurden, mit 2 µL REA-PE versetzt. Die Reaktionszeit zur Anbindung der Antikörper betrug in beiden Fällen 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank. Nach dieser Zeit wurde 1 mL Puffer zu den DPSCs hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für fünf Minuten bei 200 g. Zuletzt wurde der Überstand entfernt, und es erfolgte eine Resuspension der Zellen mit dem Puffer auf eine Konzentration von 500 Zellen pro Mikroliter. Bis zur Untersuchung der Zellen am Durchflusszytometer wurden die DPSCs unter Lichtausschluss auf Eis gelagert.

Der Versuch wurde in Kooperation mit Henning Hartwig (AG Stiesch, Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde, MHH) durchgeführt.

3.1.14 Zytokompatibilitätstests mit DPSCs

Die Zytokompatibilität von ausgewählten Proben wurde mit DPSCs der Firma Lonza über einen CellTiter-Blue®(CTB)-Test untersucht. Für den Test wurden zunächst die DPSCs (Passage 6) in 100 µL α -MEM, welches mit FCS sowie Pen/Strep versetzt war, ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zelldichte betrug 1 600 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte (5 000 Zellen pro cm²). Am Tag nach der Aussaat erfolgte die Zugabe der Silica-Nanopartikel. Dabei kamen sowohl unmodifizierte als auch NH₂-Propyl (50/50)-modifizierte NPSNPs beider Nanopartikelsorten zum Einsatz. Von den zu testenden Partikeln wurden mit sterilem Wasser Dispersionen mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Darauffolgend wurden davon jeweils 10 µL zu den bereits 100 µL Zellmedium gegeben und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pipette vermischt. Die resultierenden Partikelkonzentrationen variierten zwischen 10 µg mL⁻¹ und 500 µg mL⁻¹. Als Kontrolle dienten Zellen, zu denen 10 µL steriles Wasser ohne Nanopartikel gegeben wurden. Nachdem die Zellen einen Tag mit den jeweiligen Proben inkubiert waren, wurde das Medium gewechselt. Die erste Bestimmung der Zellviabilitäten erfolgte 48 h nach der Probenzugabe. Dazu wurde das Medium entfernt und durch 100 µL eines Gemisches aus 1.67 mL CTB-Reagenz (Promega) und 8.33 mL Medium ersetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. vier Stunden wurden die Überstände in eine schwarze 96-Well-Fluoreszenzplatte überführt und 100 µL frisches Medium auf die Zellen gegeben. Die quantitative Bestimmung der umgesetzten Farbstoffmengen erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm an einem Multiplattenreader des Typs infinite F200 PRO der Firma Tecan. Die dazugehörige Software war i-control 1.12.

Die Zellen wurden weiter in Kultur gehalten. Nach zwei Tagen fand ein Mediumwechsel statt und sechs Tage nach der Inkubation erfolgte eine erneute Bestimmung der Zellviabilitäten nach einer analogen Durchführung.

Die Aussaat der Zellen für dieses Experiment erfolgte durch Henning Hartwig (AG Stiesch, Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde, MHH).

3.1.15 *In vitro*-Untersuchungen zur Differenzierung von DPSCs mittels Alizarin-Rot-Färbung

Zur Untersuchung des Einflusses der Silica-Nanopartikel auf die Differenzierung der DPSCs wurde eine Alizarin-Rot-Färbung herangezogen.

Dentale Pulpastammzellen der Firma Lonza (Passage 6) wurden in α -MEM, welches mit 10 % FCS sowie 1 % Penicillin und Streptomycin versetzt war, in einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Volumen betrug dabei 3 mL und die Zelldichte 5 000 Zellen pro cm². Einen Tag nach der Aussaat wurden 1.2 mL des Mediums entnommen. Dann wurden 200 μ L einer Dispersion aus modifizierten Silica-Nanopartikeln in Wasser vorsichtig auf die Zellen getropft. Die bei dem Gesamtvolumen von 2 mL erreichten Konzentrationen der modifizierten Silica-Nanopartikel (*sp*- bzw. *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)) beliefen sich auf 25 μ g mL⁻¹, 100 μ g mL⁻¹ sowie 400 μ g mL⁻¹. Von den *sp*-NPSNPs ohne Modifizierung wurde eine Konzentration von 100 μ g mL⁻¹ auf den Zellen getestet. Als Kontrolle wurden 200 μ L Wasser ohne Nanopartikel auf Zellen gegeben. Einen Tag nach dem Start der Inkubation wurde das überstehende Zellmedium entfernt und durch ein zur odonto- bzw. osteogenen Differenzierung anregendes Medium (Osteo-Medium) ersetzt. Dieses besaß neben FCS und Pen/Strep noch β -Glycerolphosphat, Natriumascorbat, Dexamethason und Kaliumdihydrogenphosphat als Zusatz. Die jeweiligen Konzentrationsangaben sind in Tabelle 7.2 im Anhang aufgeführt. Die Zellen wurden für 12 Tage kultiviert, wobei alle drei bis vier Tage das Medium durch frisches Medium ersetzt wurde. Zum Vergleich wurden Zellen einer gleichen Behandlung unterzogen, allerdings wurde nach der Inkubation anstelle des Osteo-Mediums weiterhin α -MEM mit FCS und Pen/Strep verwendet.

12 Tage nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA (4 % in PBS) über einen Zeitraum von 30 Minuten fixiert und hinterher dreimal mit 2 mL PBS gewaschen. Vor der Färbung wurden die Zellen zusätzlich dreimal mit 2 mL destilliertem Wasser gewaschen, hinterher wurden die Waschlösungen aus den Wells entfernt. Es folgte eine Zugabe von 1 mL Alizarin-Rot-Lösung (1 % in Wasser, pH 4.1) pro Well. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Lösung verworfen und die Waschprozedur mit destilliertem Wasser wiederholt. Zur Extraktion des Farbstoffes wurden die Zellen mit 1 mL Lysepuffer, der aus Wasser mit 10 % Essigsäure und 20 % Methanol bestand, versetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der

gesamte Inhalt eines jeden Wells in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, welches daraufhin auf einen Vortexer gehalten und für zehn Minuten bei 85 °C gelagert wurde. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 13 300 rpm zentrifugiert und 100 µL der Überstände wurden in eine 96-Well-Platte gegeben. Zur Bestimmung des Alizarin-Rot-Gehalts wurden zusätzlich 100 µL einer Kalibrationsreihe in die Platte pipettiert. Für die Kalibration wurde zunächst eine Alizarin-Standardlösung (2.08 mM) aus 50 µL 1 % Alizarin-Lösung mit 1 mL Lysepuffer angesetzt. Aus dieser wurde durch eine 1:1-Verdünnung eine Kalibrationsreihe mit fünf Werten erstellt. Zuletzt wurde die Absorption der Proben und der Kalibration bei 405 nm an einem Multiplattenreader Infinite F200 der Firma Tecan vermessen.

Die Zellkultur und die Alizarin-Rot-Färbungen wurden von Henning Hartwig (AG Stiesch, Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde) an der MHH durchgeführt.

3.1.16 *In vitro*-Untersuchungen zur Differenzierung von DPSCs mittels Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Neben der Alizarin-Rot-Färbung (s. vorheriger Abschnitt) erfolgte eine Beurteilung der Differenzierung über die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP). Für diese Versuche wurden DPSCs mit einer Zelldichte von 5 000 Zellen pro cm² in 6-Well-Platten ausgesät. Einen Tag nach der Aussaat erfolgte analog zu den Versuchen der Alizarin-Rot-Färbung eine Entnahme von 1.2 mL Medium und die Zugabe der verschiedenen Nanopartikeldispersionen. Mit den modifizierten Silica-Nanopartikeln (*sp*- bzw. *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)) wurden Konzentrationen von 25 µg mL⁻¹ und 100 µg mL⁻¹ getestet. Die Konzentration der *sp*-NPSNPs ohne Modifizierung betrug wieder 100 µg mL⁻¹. Einen Tag nach dem Start der Inkubation wurde das überstehende Medium entfernt und, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, entweder durch ein zur odonto- bzw. osteogenen Differenzierung anregendes Medium (Osteo-Medium) oder durch α-MEM (mit FCS und Pen/Strep) ersetzt. Auch diese Zellen wurden für 12 Tage kultiviert, wobei alle drei bis vier Tage das Medium erneuert wurde.

Die ALP-Aktivität wurde 12 Tage nach dem Start der Inkubation untersucht. Für eine Standardreihe wurden zunächst 9.9 mL Natronlauge (0.02 M) mit 100 µL einer 100 mM *p*-Nitrophenol-Lösung vermischt. Aus dieser Lösung wurde anschließend eine Standardreihe mit Natronlauge angesetzt, wobei von jeder Verdünnung jeweils 200 µL in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert wurden. Von den Zellen wurde das überstehende Medium entnommen und sie wurden zweimal mit 2 mL einer Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris)-Puffer-Lösung (*Tris-buffered saline*, TBS) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 mL einer 1 %-igen Triton X-100-Lösung (in TBS-Puffer) für 30 Minuten bei 37 °C permeabilisiert und vom Boden der Wells gelöst. Die DPSCs wurden in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten bei 13 300 rpm zentrifugiert. Von

dem Überstand wurden 20 μL in die Well-Platte gegeben. Zusätzlich wurde aus dem Überstand eine 1:10-Verdünnung (10 μL Probe mit 90 μL Substratpuffer) hergestellt und ebenfalls in die Platte pipettiert. Für die Substrat-Lösung wurde eine Tablette *p*-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz Hexahydrat in 5 mL Substratpuffer gelöst. Der Substratpuffer wurde im Vorfeld aus 478 μL Diethanolamin (0.1 M), 50 μL Triton X-100-Lösung (0.1 %) und 50 μL Magnesiumchlorid-Lösung (1 mM) angesetzt und mit Salzsäure auf pH 9.8 gebracht. Zu den Proben wurden 100 μL der Substrat-Lösung gegeben und nach dem Befüllen wurde die Platte zum Durchmischen der Lösungen kurz auf einen Schüttler gestellt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C. Nachfolgend wurden 80 μL NaOH (1 M) zu den Proben gegeben und die Platte wurde erneut kurz auf einem Schüttler behandelt. Zuletzt erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm an einem Multiplattenreader Infinite F200 der Firma Tecan. Sowohl bei der Standardreihe als auch bei den Proben wurden Bestimmungen als Duplikate angefertigt.

Die Zellkultur sowie die Bestimmung der ALP-Aktivität wurde ebenfalls von Henning Hartwig (AG Stiesch, Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde) an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

3.1.17 Untersuchung des Aggregationsverhaltens von VEGF mittels DLS

Um das Aggregationsverhalten von VEGF in den Medien Wasser und PBS zu untersuchen, wurden DLS-Messungen von Lösungen mit Proteinkonzentrationen zwischen 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ angefertigt. Mit der Probe, die 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ VEGF in Wasser enthielt, wurde zusätzlich eine Zeta-Potential-Messung durchgeführt. Diese hohe Konzentration musste gewählt werden, da die Mindestkonzentration laut Gerätehersteller 130 $\mu\text{g mL}^{-1}$ betragen sollte. Das verwendete VEGF₁₆₅-A wurde steril-filtriert und lyophilisiert von der Firma PeproTech kommerziell erworben. Laut Herstellerangaben wurde es in *Escherichia coli* (*E. coli*) produziert und hatte eine Reinheit von ≥ 98 %.

3.1.18 Immobilisierung von VEGF auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und daran anschließende Freisetzungsexperimente

Die Untersuchungen zur Immobilisierung und Freisetzung des Wachstumsfaktors fanden in Anlehnung an vorherige Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Behrens statt.^[221,222] Die Immobilisierung des VEGFs auf den nanoporösen Silica-Nanopartikeln fand unter aseptischen Bedingungen statt. Analog zu den Versuchen mit siRNA wurden die jeweiligen Nanopartikel zuerst in Ethanol (70 %) dispergiert, zentrifugiert und unter einer Sicherheitswerkbank getrocknet. Anschließend wurden die Partikel für 30 Minuten einer UV-Strahlung ausgesetzt. Als Medium für die Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente wurde eine 0.01 molare, phosphatgepufferte Salzlösung mit 0.1 % bovinem Serumalbumin-Zusatz (PBS (0.1 % BSA)) verwendet, wobei das PBS ein Standardmedium zur Simulation von physiologischen Bedingungen darstellte und das BSA als Stabilisator für das Protein dienen sollte.^[223] Üblicherweise wurden 10 μg Aliquote des

lyophilisierten VEGFs akquiriert, aus denen durch Zugabe von 1 mL Medium eine $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Stammlösung hergestellt wurde.

Für die Immobilisierung des Wachstumsfaktors wurden die unmodifizierten *sp*-NPSNPs sowie die amino-modifizierten *sp*-NPSNPs (*sp*-NPSNPs-NH₂) verwendet. Zuerst wurden 4 mg der zuvor sterilisierten Nanopartikel in 720 μL PBS (0.1 % BSA) dispergiert. Danach wurden 80 μL aus einer $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ -VEGF-Stammlösung hinzugegeben, sodass die Inkubationskonzentration des Wachstumsfaktors bei $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ und das Gesamtvolumen bei 800 μL lag. Darüber hinaus wurde für die amino-modifizierten Nanopartikel eine Konzentration von $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ für die Immobilisierung verwendet, wofür die Partikel in 640 μL PBS (0.1 % BSA) dispergiert wurden und 160 μL der VEGF-Stammlösung zum Einsatz kam.

Die Inkubation der Nanopartikel in der Proteinlösung fand in einem Thermomixer der Firma Biozym Scientific unter konstantem Schütteln (800 rpm) für 24 h bei 4 °C statt. Nach dieser Zeit wurden die Nanopartikel zentrifugiert (zehn Minuten, 5 000 rpm bzw. 2 436 g), der Inkubationsüberstand abgenommen und die Partikel einmal mit frischem PBS (0.1 % BSA) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation und der Entnahme der Waschlösung wurden die beladenen Partikel direkt für die Freisetzungsexperimente weiterverwendet. Alle Inkubations- und Waschlösungen wurden bis zur Quantifizierung des VEGF-Gehaltes bei -20 °C aufbewahrt. Als Referenz dienten bei jedem Immobilisierungsversuch 4 mg der jeweiligen Nanopartikelsorte, bei denen anstatt der VEGF-Stammlösung lediglich PBS (0.1 % BSA) zugesetzt wurde.

Im Anschluss an die Immobilisierung des VEGFs auf der Oberfläche der nanoporösen Silica-Nanopartikel erfolgten die Freisetzungsexperimente. Dafür wurde zunächst frisches PBS (0.1 % BSA) zu den beladenen Partikeln gegeben. Hinterher wurden die Proben zwei Sekunden auf einem Vortexer behandelt und schließlich für die Freisetzung des Proteins bei 37 °C gelagert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden die Partikel durch Zentrifugation (zehn Minuten, 5 000 rpm) vom Medium getrennt. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und durch frisches PBS (0.1 % BSA) ersetzt. Nach einer kurzen Behandlung auf dem Vortexer kamen die Proben erneut in einen Inkubationsofen bei 37 °C, sodass die Freisetzung fortgesetzt werden konnte. Analog zu den Inkubations- und Waschlösungen wurden die entnommenen Überstände bis zur VEGF-Quantifizierung bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.19 Untersuchungen zur Degradation von VEGF unter den Immobilisierungs- bzw. Freisetzungsbedingungen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen auf die Stabilität des VEGFs hatten, wurden Proteinlösungen unter den gleichen Bedingungen, wie in Abschnitt 3.1.18 beschrieben, behandelt und ihre VEGF-Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. Eine VEGF-Ausgangslösung mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

in PBS (0.1% BSA) wurde dafür zunächst aliquotiert. Danach wurde jedes Aliquot für 24 h bei 4 °C auf einem Thermoschüttler behandelt (800 rpm) und hinterher für zehn Minuten bei 5 000 rpm zentrifugiert. Um eine mögliche Degradation des Proteins während der Immobilisierung festzustellen, wurden sowohl von der Ausgangslösung als auch von den im Schüttler behandelten Proben drei Aliquots bis zur späteren Quantifizierung mittels ELISA eingefroren (−20 °C).

Die restlichen Aliquots wurden bei 37 °C in einen Inkubationsofen gestellt und für unterschiedliche Zeitabstände aufbewahrt, sodass die Wirkung der Freisetzungsbedingungen auf das Protein simuliert werden konnte. Zu bestimmten Zeitpunkten, beispielsweise nach einem Tag im Inkubationsofen, wurden jeweils drei der einzelnen Proben aus dem Ofen genommen und bei −20 °C bis zur Quantifizierung des VEGF-Gehalts gelagert.

3.1.20 Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten VEGF-Mengen

Die Quantifizierung des Wachstumsfaktors VEGF erfolgte mit einem enzymgekoppelten Immunadsorptions-Test (*enzym linked immunosorbent assay*, ELISA). Das eingesetzte ELISA-Kit für VEGF wurde von der Firma PeproTech (Human VEGF₁₆₅ Standard TMB ELISA Development Kit) bezogen und in Kombination mit einem Puffer-Kit der gleichen Firma verwendet. Die Durchführung des ELISAs verlief nach den Herstellervorgaben und wird im Folgenden kurz beschrieben.

Zuerst wurde die 96-Well-Platte, in der der ELISA stattfinden sollte, mit einem primären Fangantikörper beschichtet. Dazu wurden 100 µL einer 0.5 µg mL⁻¹-Antikörperlösung (Kaninchen Anti-Human VEGF in PBS) in jedes Well gegeben. Die Platte wurde daraufhin mit einer Klebefolie versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Inkubation wurde der Platteninhalt verworfen und die Platte zum Entfernen der Lösungsrückstände ausgeklopft. Es folgte ein viermaliges Waschen mit 300 µL einer Waschpufferlösung (PBS + 1 % Tween-20), die in jedes Well pipettiert und wieder verworfen wurde. Bevor das Antigen in die mit dem Fangantikörper versehenen Wells gegeben wurde, mussten unspezifische Adsorptionsplätze mit boviner Serumalbumin-Lösung blockiert werden. Dies geschah durch Zugabe von 300 µL PBS (1 % BSA) innerhalb einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Platte wieder viermal mit dem Waschpuffer gewaschen und sorgfältig ausgeklopft. Anschließend konnte das Antigen in die Wells gegeben werden. Als Kalibration dienten acht VEGF-Lösungen mit Konzentration zwischen 800 pg mL⁻¹ und 6.25 pg mL⁻¹, die mithilfe eines Standards und einem Verdünnungspuffer aus PBS mit 1 % BSA und 2 % Tween-20 hergestellt wurden. Als Blindwert wurde der Verdünnungspuffer ohne VEGF verwendet. Da die zu untersuchenden Proben aus den jeweiligen Experimenten deutlich höhere Konzentrationen aufwiesen, wurden ebenfalls Verdünnungen nach den Richtlinien des Herstellers erstellt. Von den Kalibrationslösungen und den Verdünnungen der Proben wurden dann jeweils 100 µL in das vorgesehene Well pipettiert.

Die Inkubationszeit für diesen Schritt betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von einem Wiederholen der Waschprozedur. Bei dem folgenden sekundären Detektionsantikörper, der an eine andere Stelle des Antigens binden konnte als der primäre Antikörper, handelte es sich um einen biotinylierten Kaninchen Anti-Human Antikörper. Es wurden 100 μL einer 0.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Lösung (im Verdünnungspuffer) zu den Wells gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten vier Waschschritten wurden 100 μL einer frisch angesetzten Streptavidin-HRP-Lösung (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*, 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ im Verdünnungspuffer) in die Wells gegeben. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten, und nach diesem Schritt erfolgte noch einmal die Waschprozedur. Die Peroxidase diente der katalytischen Umsetzung des farblosen Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), von dem 100 μL in jedes Well gegeben wurden, in ein blaues Reaktionsprodukt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten unter Lichtausschluss. Zuletzt wurde die Umsetzung durch Zugabe von 100 μL Salzsäure (1 M) gestoppt, wodurch gelbes 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin stabilisiert wurde, welches spektrophotometrisch bei 450 nm vermessen werden konnte. Für eine Untergrundkorrektur wurde eine Referenzmessung bei 620 nm durchgeführt. Die Absorptionsmessungen wurden an einem Spark 10M Plattenreader der Firma Tecan mit der Software Sparkcontrol V 1.1 durchgeführt.

3.1.21 Immobilisierung von VEGF auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln und daran anschließende Freisetzungsexperimente für den *Tube*-Assay

Zur Simulation der Bedingungen des *Tube*-Assays, der zur Beurteilung der Auswirkungen der VEGF-beladenen Nanopartikel auf die *Tube*-Bildung von Endothelzellen diente, wurden Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente mit veränderten Parametern (eingesetzte Partikelmasse und VEGF-Konzentration) durchgeführt. Zum Ansetzen der Inkubationslösung wurden 5 mg *sp*-NPSNP-NH₂ abgewogen, sterilisiert und anschließend in 2 mL PBS (0.1 % BSA) dispergiert. Darauffolgend wurden 80 μL von dieser Dispersion (200 μg) in ein Mikroreaktionsgefäß (0.5 mL) überführt und mit 50 μL einer 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -VEGF-Lösung versetzt. Zuletzt wurden 70 μL PBS hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 200 μL erreicht wurde. Die Beladungsmenge belief sich damit auf 12.5 μg VEGF pro Milligramm Nanopartikel. Die nachfolgenden Schritte zur Immobilisierung und Freisetzung erfolgten analog zu den bereits beschriebenen aus Abschnitt 3.1.18. Nach der Inkubation wurden die Partikel zuerst über eine Zentrifugation von der Inkubationslösung getrennt und danach mit 200 μL PBS (0.1 % BSA) gewaschen. Für die Untersuchung der Freisetzung wurden nach der Abnahme der Waschlösung 200 μL frisches PBS (0.1 % BSA) zu den Partikeln gegeben. Die Proben wurden für bestimmte Zeit bei 37 °C gelagert, wobei alle zwei Tage ein Wechsel des Freisetzungsmediums erfolgte. Jegliche Überstände wurden bis zur VEGF-Quantifizierung bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.22 Tube-Assay mit Endothelzellen (2D)

Zur Beurteilung des Einflusses der entwickelten VEGF-Freisetzungssysteme auf die Bildung kapillarartiger Strukturen (engl. *Tubes*) von Endothelzellen wurde ein zweidimensionaler Fibrin-basierter *Tube*-Assay durchgeführt. Dabei wurden Endothelzellen zwischen zwei Fibrinschichten kultiviert. Die untere Schicht diente als Untergrund für die Kultivierung der Zellen, in der oberen Schicht waren die VEGF-beladenen Nanopartikel eingearbeitet, von denen VEGF freigesetzt werden sollte (Abbildung 3.7). Die Durchführung basierte auf einem von Lau *et al.* beschriebenen dreidimensionalen Assay.^[224] Die verwendeten Endothelzellen (Passage 6) aus humanen Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) der Firma PeloBiotech konnten ein rot fluoreszierendes Protein (*red fluorescent protein*, RFP) exprimieren und werden deswegen im Folgenden als RFP-HUVECs bezeichnet.

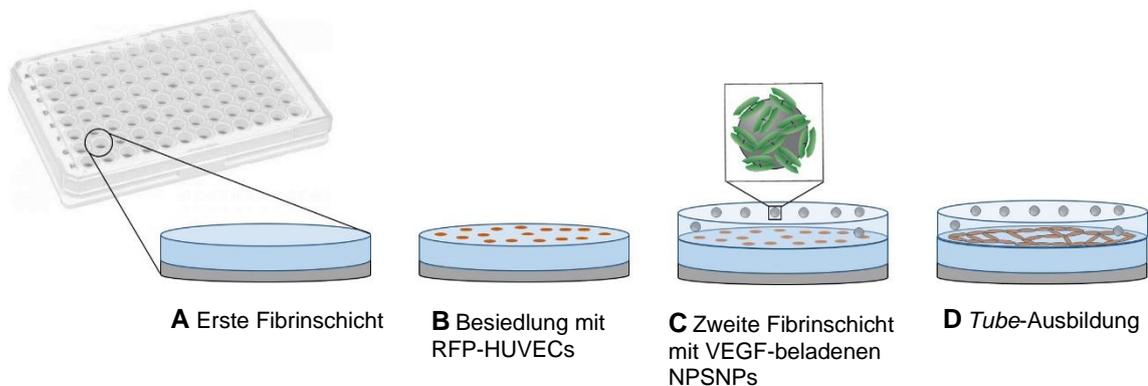


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Durchführung des 2D-*Tube* Assays.

Am Tag vor dem Start des *Tube*-Assay wurden analog zum vorherigen Abschnitt 200 μg Silica-Nanopartikel (*sp*-NPSNP-NH₂) mit 2.5 μg VEGF beladen (12.5 $\mu\text{g mg}^{-1}$). Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Nanopartikel zentrifugiert, mit PBS gewaschen und nach dem Entfernen der Waschlösung in 100 μL PBS wieder aufgenommen. Als Kontrolle dienten unbeladene Nanopartikel (300 μg), die entsprechend in 150 μL PBS dispergiert waren. Die angesetzten Nanopartikellösungen (2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) wurden anschließend in die zweite Fibrinschicht eingearbeitet (s. u.).

Für den *Tube*-Assay wurde zunächst der Boden von 22 Wells einer 96-Well-Platte mit einer Fibrinschicht bedeckt (Abbildung 3.7 A). Dazu wurde zuerst 1 μL Thrombin-Lösung in den entsprechenden Wells vorgelegt, dann erfolgte die Zugabe von 50 μL einer Fibrinogen-Lösung. Das Thrombin (Berioplast®) wurde kommerziell erworben und das Fibrinogen wurde aus Plasma, das vom Institut für Transfusionsmedizin der MHH bezogen wurde, isoliert. Die Volumenangaben zum Ansetzen der beiden Lösungen für 22 Wells sind in Tabelle 3.6 zu finden. Nach dem Vermischen der Lösungen belief sich die Zeit der Polymerisation auf 30 Minuten. Währenddessen wurden die zuvor expandierten Endothelzellen trypsiniert und ausgezählt, sodass nach der Wartezeit für die

Polymerisation 4 000 Zellen in 200 μL EGM-2-Medium (*endothelial growth medium 2* in Kombination mit einem BulletKit der Firma Lonza, Zusammensetzung siehe Anhang 7.2) auf die Gelschicht in jedem Well gegeben werden konnten. Zum Anwachsen der Zellen wurde die Platte für 8 Stunden in einen Inkubator (37 °C, 5 % CO_2) gestellt (Abbildung 3.7 B).

Tabelle 3.6: Volumenangaben zum Ansetzen der Fibrinogen- sowie der Thrombin-Lösung für den Tube-Assay.

	Chemikalie	Volumen / μL
Fibrinogen-Lösung (Insgesamt 1 100 μL)	Medium (Gibco TM M199)	110.00
	PBS	110.00
	NaOH (1 N)	3.30
	Fibrinogen	56.98
Thrombin-Lösung (Insgesamt 22 μL)	Thrombin (0.275 U/100 μL Stock)	6.05
	CaCl ₂ -Lösung (40 mM)	15.95

Für die obere Schicht wurde zunächst wieder 1 μL Thrombin-Lösung (Tabelle 3.6) in ein Well einer neuen 96-Well-Platte vorgelegt. Danach erfolgte die Zugabe von 50 μL Fibrinogen-Lösung, in die 20 μg der (VEGF-beladenen) Silica-Nanopartikel eingearbeitet waren. Für die verschiedenen Ansätze sind die Volumina in Tabelle 3.7 aufgelistet. Neben 20 μg unbeladener bzw. VEGF-beladener Silica-Nanopartikel wurde eine Mischung aus beiden in das Gel eingearbeitet, um den VEGF-Gehalt bei gleicher Partikelmenge zu variieren.

Tabelle 3.7: Volumenangaben für die einzelnen Ansätze der zweiten Fibrinschicht (Menge für sechs Wells).

	Kontrolle	125 ng VEGF sowie 20 μg NPSNPs pro Well	250 ng VEGF sowie 20 μg NPSNPs pro Well	0 ng VEGF sowie 20 μg NPSNPs pro Well
Chemikalie	Volumen / μL			
Medium (M199)	60.00	60.00	60.00	60.00
PBS	507.12	447.12	447.12	447.12
NaOH (1 N)	1.80	1.80	1.80	1.80
Fibrinogen	31.08	31.08	31.08	31.08
VEGF@NPSNPs	–	30.00	60.00	–
Unbeladene NPSNPs	–	30.00	–	60.00
Gesamtvolumen	600	600	600	600

Anschließend wurde die Fibrinogen-Lösung mit der Thrombin-Lösung vermischt und das Gemisch in die 96-Well-Plate mit den Zellen übertragen. Nach einer erneuten Polymerisationszeit von 30 Minuten wurden 200 μL Feeding-Medium (Rezeptur im Anhang) in

jedes Well gegeben. Bei den Kontrollen ohne Nanopartikel in der Fibrinschicht enthielt das Medium eine VEGF-Konzentration von 40 ng mL^{-1} . Zuletzt wurde die Platte in einen Inkubationsofen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 \% CO_2) gestellt. Die Zellen wurden für sieben Tage kultiviert, wobei alle zwei Tage das überstehende Medium gewechselt wurde. In regelmäßigen Abständen wurde der Fortschritt der *Tube*-Ausbildung visuell an einem Mikroskop (Nikon Eclipse TE300) beurteilt. Nach der Laufzeit wurden die Zellen in 2 \% -PFA-Lösung fixiert und bei 4°C gelagert. Die Auswertung der Mikroskopaufnahmen erfolgte mithilfe der Software AngioTool. Der *Tube*-Assay wurde von Sarah Zippusch (AG Vaskuläres *Tissue Engineering*, MHH) durchgeführt.

3.1.23 Untersuchung der VEGF-Freisetzung aus den Fibringelen

Da die Einarbeitung der VEGF-beladenen Nanopartikel in das Fibrin das Freisetzungverhalten des Wachstumsfaktors beeinflussen kann, wurde die VEGF-Abgabe aus dem Gel in das überstehende Medium untersucht. Für die Herstellung der Fibrinmatrix wurden, in Anlehnung an den zuvor beschriebenen *Tube*-Assay, zunächst $50 \text{ }\mu\text{L}$ einer Thrombin-Lösung in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von $50 \text{ }\mu\text{L}$ einer Fibrinogen-Lösung, in die $20 \text{ }\mu\text{g}$ der VEGF-beladenen Nanopartikel eingearbeitet waren. Bei einem zweiten Ansatz enthielt die Fibrinogen-Lösung $10 \text{ }\mu\text{g}$ VEGF-beladener Nanopartikel sowie $10 \text{ }\mu\text{g}$ unbeladene Nanopartikel, wodurch nur die halbierte VEGF-Menge vorhanden war. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurden $200 \text{ }\mu\text{L}$ Feeding-Medium ohne VEGF (Rezeptur siehe Anhang) auf die Gele gegeben. Analog zu dem *Tube*-Assay wurden nach zwei, vier und sieben Tagen die überstehenden Medien gewechselt. Die gesammelten Überstände wurden eingefroren und bis zur Quantifizierung mittels ELISA bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Untersuchung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Durchführung des Experiments erfolgte in Kooperation mit Sarah Zippusch (AG Vaskuläres *Tissue Engineering*, MHH).

3.1.24 *Tube*-Assay mit Endothelzellen (3D)

Der 3D-*Tube*-Assay basierte ebenfalls auf der Vorschrift von Lau *et al.*^[224] und die Durchführung erfolgte in abgewandelter Form zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen. Für diesen Versuch kamen neben den RFP-HUVECs (Passage 6) auch Stammzellen aus Fettgewebe (*adipose-derived stem cells*, ASCs) zum Einsatz.

Am Tag vor dem Start des *Tube*-Assay wurden 5 mg Silica-Nanopartikel (*sp*-NPSNP-NH₂) mit $2 \text{ }\mu\text{g}$ VEGF beladen ($0.4 \text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$, vgl. Abschnitt 3.1.18). Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Nanopartikel zentrifugiert, mit PBS gewaschen und nach dem Entfernen der Waschlösung in 1 mL Calciumchlorid-Lösung (40 mM) wieder aufgenommen. Als Kontrolle dienten unbeladene Nanopartikel, die einer gleichen Behandlung unterzogen wurden, allerdings ohne VEGF.

Für den *Tube*-Assay wurden zunächst 50 μL einer Thrombin-Lösung aus 1 920 μL Calciumchlorid-Lösung und 80 μL Thrombin ($0.5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) in den entsprechenden Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 8 μL der Nanopartikel-Lösung (40 μg) zu der Thrombin-Lösung gegeben. Die zuvor expandierten RFP-HUVECs bzw. ASCs wurden trypsinisiert und ausgezählt. 441 176 Zellen jeden Typs wurden in ein Mikroreaktionsgefäß (2 mL) überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Medium entfernt. Danach wurden 50 μL einer Fibrinogen-Lösung (s. Tabelle 3.6) zu dem Zellpellet gegeben und durch mehrfachen Auf- und Abpipettieren vermischt. Zuletzt wurde die Suspension zu der vorgelegten Thrombin-Lösung gegeben, wobei beim Vermischen darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstanden. Nach einer Polymerisationszeit von 20 Minuten bei 37 °C wurden 200 μL Feeding-Medium (Rezeptur im Anhang) auf die Fibrinlage in jedes Well gegeben. Bei den Kontrollen ohne Nanopartikel in der Fibrinschicht enthielt das Medium eine VEGF-Konzentration von 40 ng mL^{-1} . Zuletzt wurde die Platte in einen Inkubationsofen (37 °C, 5 % CO_2) gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen, wobei alle zwei Tage das überstehende Medium gewechselt wurde. In regelmäßigen Abständen wurde der Fortschritt der *Tube*-Formierung visuell an einem Mikroskop (Nikon Eclipse TE300) beurteilt. Auch dieser *Tube*-Assay wurde von Sarah Zippusch (AG Vasculäres *Tissue Engineering*, MHH) durchgeführt.

3.2 Physikochemische Charakterisierungsmethoden

Die verwendeten physikochemischen Charakterisierungsmethoden sind Standardmethoden, weswegen an dieser Stelle vornehmlich eine Darstellung der gewählten Messparameter erfolgt. Eine Ausnahme wird bei der konfokalen Laser-Rastermikroskopie sowie bei der Durchflusszytometrie gemacht. Sie werden ausführlicher vorgestellt, da es sich bei ihnen um weniger häufig genutzte Charakterisierungsmethoden handelt.

3.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie diente in dieser Arbeit als bildgebendes Verfahren, um die synthetisierten Nanopartikel hinsichtlich ihrer Größe und Morphologie zu untersuchen. Die Messungen wurden von Dawid P. Warwas und Arne Schierz an einem Tecnai G2 F20 TMP-Transmissionselektronenmikroskop (TEM) der Firma FEI Company am Laboratorium für Nano- und Quantenengineering Hannover (LNQE) durchgeführt, wobei eine Beschleunigungsspannung von 200 kV verwendet wurde. Zur Probenpräparation wurden die Partikel zuerst in Ethanol dispergiert, anschließend wurde die Dispersion auf ein Kupfernetz getropft und über Nacht getrocknet. Für die grafische Auswertung wurde die Software ImageJ 1.52b des National Institutes of Health verwendet.

3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Morphologie der Proben wurde an einem Rasterelektronenmikroskop (REM) vom Typ JSM-6700F der Firma JEOL untersucht. Zur Probenpräparation wurden die Nanopartikel in Ethanol dispergiert, auf einen Graphit-Träger getropft und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.3 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Mithilfe eines konfokalen Laser-Rastermikroskops (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) konnten in dieser Arbeit sowohl die mit einem Fluorophor markierten Silica-Nanopartikel als auch fluoreszenzmarkierte siRNAs in den Zellen lokalisiert und bildlich dargestellt werden. Der Vorteil beim Gebrauch eines CLSMs gegenüber einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop besteht darin, dass nur Signale aus der Fokusebene zur Bilddarstellung beitragen. Strahlung, die nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, kann dagegen über ein Blendensystem ausgeblendet werden, wodurch ein höheres Auflösungsvermögen resultiert. Für die Bildaufnahme wird die Anregungsstrahlung mithilfe eines beweglichen Spiegels rasterförmig über das unter dem Mikroskop liegende Objekt bewegt, sodass dieses Punkt für Punkt abgetastet wird. Über eine axiale Verschiebung der Fokusebene können zudem Informationen aus verschiedenen Ebenen einer Probe (bis zu 200 μm Eindringtiefe) erhalten und als 3D-Darstellung visualisiert werden.^[225]

Die Probenpräparation wurde mit den Durchführungen der Zellkultur bereits in Abschnitt 3.1.9 beschrieben und in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt. Bei dem verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein TPS SP8 der Firma Leica, das vom Arbeitskreis Stiesch (MHH) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Aufnahmen wurde ein Objektiv mit einer 40-fachen Vergrößerung verwendet.

3.2.4 UV/Vis-Photometrie

Die UV/Vis-Photometrie kann verwendet werden, um unbekannte Konzentrationen einer Substanz in Lösung unter Zuhilfenahme einer Kalibration zu bestimmen. In dieser Arbeit kam die Photometrie zum einen bei dem MTT-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität und bei dem ELISA zur Quantifizierung der VEGF-Konzentrationen zum Einsatz. Die dazugehörigen Messparameter werden in Abschnitt 3.3.1 bzw. 3.3.5 beschrieben. Zum anderen beruht ein Mikrovolumen-Spektralphotometer auf dieser Methode. Mit seiner Hilfe konnten siRNA-Konzentrationen über die spezifische Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm ermittelt werden. Das in dieser Arbeit dafür genutzte Gerät war ein NanoDrop™ 2000 der Thermo Fisher Scientific, bei dem zur siRNA-Quantifizierung 1.5 µL der zu untersuchenden Probe verwendet wurden.

3.2.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine Methode, die die Fluoreszenzeigenschaften von Substanzen ausnutzt, um sie qualitativ und quantitativ zu analysieren. In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie für unterschiedliche Experimente verwendet. Einerseits diente sie zur quantitativen Bestimmung fluoreszierender siRNA in den Proben der Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente. Dazu wurden 100 µL der Proben in eine schwarze Fluoreszenzplatte der Firma Greiner (GRE96fb_chimney) pipettiert und zusammen mit einer Kalibrationsreihe an einem Spark 10M Plattenreader der Firma Tecan mit dazugehöriger Software Sparkcontrol V 1.1 vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 535 nm, während die Emissionswelle bei 580 nm lag.

Andererseits wurde über die Fluoreszenz die Intensität der HS-5-GFP-Zellen sowie das Produkt des CellTiter-Blue®-Tests analysiert. Die dazugehörigen Beschreibungen mit den Angaben der Messparameter finden sich in den Durchführungen der Zellkulturexperimente in den Abschnitten 3.1.10 sowie 3.1.14.

3.2.6 Physisorption

Mithilfe von Sorptionsmessungen konnten die spezifischen Oberflächen, die Porenweitenverteilungen und die Porenvolumina der synthetisierten und modifizierten Nanopartikel untersucht werden. Dafür wurden zunächst ungefähr 30 mg der jeweiligen Probe in ein Messröhrchen gefüllt und vor der Messung für 24 Stunden bei 80 °C im Vakuum

ausgegast. Anschließend wurde das adsorbierte Volumen des Gases Stickstoff bei 77 K in Abhängigkeit des Relativdrucks gemessen.

Die Messungen wurden von Mandy Jahns, Songül Noyun, Alexander Mohmeyer und Malte Schäfer an einem Gassorptionssystem Autosorb-3 der Firma Quantachrome durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Anschluss unter Zuhilfenahme der Software ASi-Qwin 2.0 der Gerätefirma. Für die Berechnung der spezifischen Oberfläche wurde das BET-Modell (nach Brunauer, Emmett und Teller) verwendet. Außerdem wurde für die Bestimmung der Porenvolumina ein Relativdruck von $p/p_0 = 0.92\text{--}0.94$ gewählt, um somit das interpartikuläre Volumen auszuschließen. Eine Modellierung der jeweiligen Isotherme zur Bestimmung der Porenweitenverteilung erfolgte über die nichtlokale Dichtefunktionaltheorie (NLDFIT), wobei der Kernel „N₂ at 77 K on silica (cylindr. pore, NLDFIT equilibrium model)“ verwendet wurde.

3.2.7 Thermogravimetrie

Thermogravimetrische Messungen wurden verwendet, um Informationen über die thermische Stabilität und die Zusammensetzung ausgewählter Proben zu erhalten. Dabei wurde die Massenänderung der Testsubstanz in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit ermittelt.

Die Messungen dieser Arbeit wurden von Katharina Nolte und Arne Schierz an einem STA 429 CD Thermoanalytator der Firma Netzsch durchgeführt. Dazu wurden ungefähr 30 mg der jeweiligen Probe unter Luftatmosphäre bei einer Heizrate von 5 K min^{-1} bis 1000 °C erhitzt. Für die anschließende Auswertung der Messdaten wurde das Programm Proteus Thermal Analysis 4.3.1 des Geräteherstellers verwendet.

3.2.8 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist ein optisches Verfahren, das zur Bestimmung der Größe von dispergierten Partikeln im Bereich von 1 nm bis 1 μm herangezogen wurde. Dabei wird mithilfe eines Lasers, der die Probe während der Messung durchstrahlte, und unter Verwendung der Brown'schen Teilchenbewegung der hydrodynamische Durchmesser einer Probe ermittelt. In dieser Arbeit wurden die DLS-Messungen an einem Gerät Zetasizer Nano ZSP der Firma Malvern Instruments durchgeführt. Für die Messungen wurden die synthetisierten und modifizierten Nanopartikel in dem gewünschten Medium dispergiert und 1 mL der Dispersion wurde in eine Einwegküvette aus Kunststoff gefüllt. Für Untersuchungen, bei denen nur geringe Probenmengen verfügbar waren, wie z. B. bei den mit siRNA beladenen Silica-Nanopartikeln, wurden die Partikel in 70 μL Medium dispergiert und unter Verwendung einer Halb-Mikro-Einmalküvette vermessen.

3.2.9 Zeta-Potential-Messungen

Das Zeta-Potential, welches mit der Oberflächenladung der Nanopartikel in Dispersion korreliert, wurde mittels der elektrophoretischen Lichtstreuung gemessen. Dafür wurde ebenfalls ein Zetasizer Nano ZSP der Firma Malvern Instruments verwendet. Vor der jeweiligen Messung wurden die Nanopartikel in dem gewünschten Medium dispergiert und 1 mL der Dispersion wurde in eine Küvette des Typs DTS1070 gefüllt. Bei geringen Probenmengen wurden die Partikel in 70 μ L eines beliebigen Mediums dispergiert und mithilfe einer Kanüle in eine zuvor befüllte Küvette injiziert.

Für eine pH-Wert-abhängige Bestimmung des Zeta-Potentials wurde zusätzlich ein MPT2 Autotitratoren von Malvern Instruments verwendet. Als Probenpräparation wurden hierfür 10 mg der zu analysierenden Partikel in 20 mL Reinstwasser dispergiert. Danach wurde das Gerät mit 10 mL dieser Dispersion gespült. Die anderen 10 mL wurden in dem zur Messung benötigten Kunststoffbehälter am Gerät befestigt. Das Zeta-Potential wurde anschließend in einem pH-Bereich von 9 bis 2 gemessen. Zur Auswertung wurde für die Henry-Funktion die Smolouchski-Näherung der Software Malvern Zetasizer 7.11 verwendet.

3.2.10 Kohlenstoff-Elementaranalyse

Zur Bestimmung des Kohlenstoffgehalts der (modifizierten) Silica-Nanopartikel wurde eine Elementaranalyse herangezogen. Dabei wurde eine Probe in ein Keramikscheffchen eingewogen und kontrolliert in einem Sauerstoffstrom verbrannt. Der zu Kohlenstoffdioxid oxidierte Kohlenstoff konnte anschließend mithilfe einer IR-Zelle und unter Verwendung von Standards quantifiziert werden. Die Messungen wurden von Claudia Schulze an einem Analysator CS 2 000 der Firma Eltra durchgeführt. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung mit 30 mg Probe.

3.2.11 Kohlenstoff/Stickstoff-Elementaranalyse

Der Kohlenstoff- sowie der Stickstoffgehalt ausgewählter Proben wurde über eine C/N-Elementaranalyse bestimmt. Für die Messung wurden ca. 8 mg der Nanopartikel in ein Zinnscheffchen eingewogen und anschließend an einem Gerät (Elementar Vario EL) der Firma Elementar Analysensysteme GmbH vermessen. Die Analysen erfolgten als Dreifachbestimmung und wurden von Anne Herwig (Institut für Bodenkunde, Leibniz Universität Hannover) ausgeführt.

3.3 Biochemische Charakterisierungsmethoden

3.3.1 Zytokompatibilitätstests

Die Zytokompatibilität einer Substanz kann durch eine Bestimmung der Zellviabilität (Lebensfähigkeit) bei Zugabe der zu testenden Probe im Vergleich zu einer Positiv- und ggf. einer Negativkontrolle ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden die Zytokompatibilitäten der modifizierten bzw. funktionalisierten Nanopartikel einerseits mittels des MTT-Tests an HS-5-GFP-Zellen und andererseits via CellTiter-Blue®-Test an dentalen Pulpastammzellen untersucht. Beide Methoden beruhen auf der Fähigkeit von vitalen Zellen, den jeweils eingesetzten Farbstoff zu reduzieren. Dies kann unter anderem über das Coenzym Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) geschehen, dessen oxidierte Form als NAD^+ bezeichnet wird. Eine weitere Möglichkeit zur Evaluation der Zytokompatibilität einer Substanz bietet das Anfärben von apoptotischen Zellen mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) nach einer Inkubation mit der zu untersuchenden Probe. Da ausführliche Beschreibungen einzelner Durchführungen und Messparameter bereits in Abschnitt 3.1 erfolgten, werden an dieser Stelle lediglich die zugrundeliegenden Reaktionen beschrieben.

3.3.1.1 MTT-Test

Lebensfähige Zellen mit einem aktiven Metabolismus sind in der Lage, das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein purpurfarbenes Formazan-Produkt umzuwandeln (Abbildung 3.8). Diese Reaktion ist Grundlage des MTT-Tests, und da die Mitochondrienaktivität für die meisten Zellen konstant ist, kann über die Bestimmung des Formazan-Produkts auf die Zellviabilität geschlossen werden.^[226]

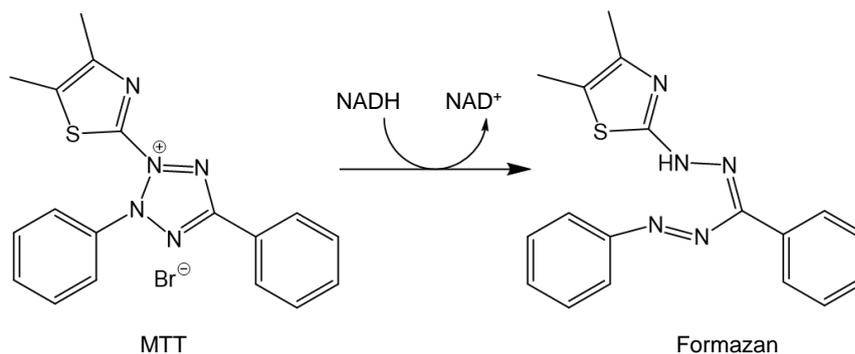


Abbildung 3.8: Chemische Strukturen von MTT und dem durch die Zelle gebildeten Formazan-Produkt.

3.3.1.2 CellTiter-Blue®

Der CellTiter-Blue®-Test basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen, den Redox-Farbstoff Resazurin in ein fluoreszierendes Endprodukt (Resorufin) umzuwandeln (Abbildung 3.9). Nicht lebensfähige Zellen verlieren schnell die metabolische Kapazität, den Indikatorfarbstoff zu reduzieren, und erzeugen somit kein Fluoreszenzsignal.^[227]

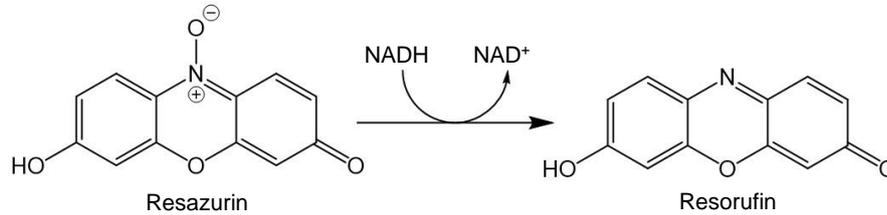


Abbildung 3.9: Reduktion von Resazurin zu Resorufin innerhalb einer Zelle.

3.3.1.3. 7-AAD-Test

7-Aminoactinomycin D (7-AAD) wird häufig zur Färbung und zum Ausschluss toter Zellen bei der Durchflusszytometrie verwendet. Dabei wird ausgenutzt, dass viable Zellen für 7-AAD (Abbildung 3.10) impermeabel sind. Bei apoptotischen Zellen mit beschädigter Zellmembran kann 7-AAD dagegen spezifisch zwischen Cytosin- und Guanin-reichen Regionen der DNA interkalieren und somit für ihre Färbung sorgen.^[228]

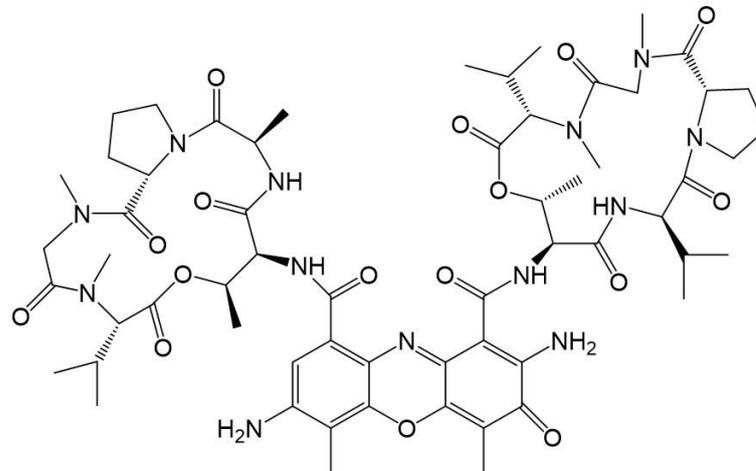


Abbildung 3.10: Strukturformel von 7-AAD.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit das Potential der mit siRNA beladenen und mit einer Lipidhülle versehenen Silica-Nanopartikel zur Herunterregulierung der Expression eines Proteins (und damit indirekt eines Genes) beurteilt.

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Messtechnik, die biophysikalische und biochemische Charakteristika einzelner Zellen einer Population erfassen kann, während sie in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander einen Laserstrahl passieren. Die Intensität der dabei erzeugten Streustrahlung kann mit Zellparametern wie der Größe oder

der Granularität von Zellen in Korrelation gesetzt werden. Darüber hinaus können Fluoreszenzeigenschaften über die Messung emittierter Strahlung untersucht werden.^[229–231] Ein schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

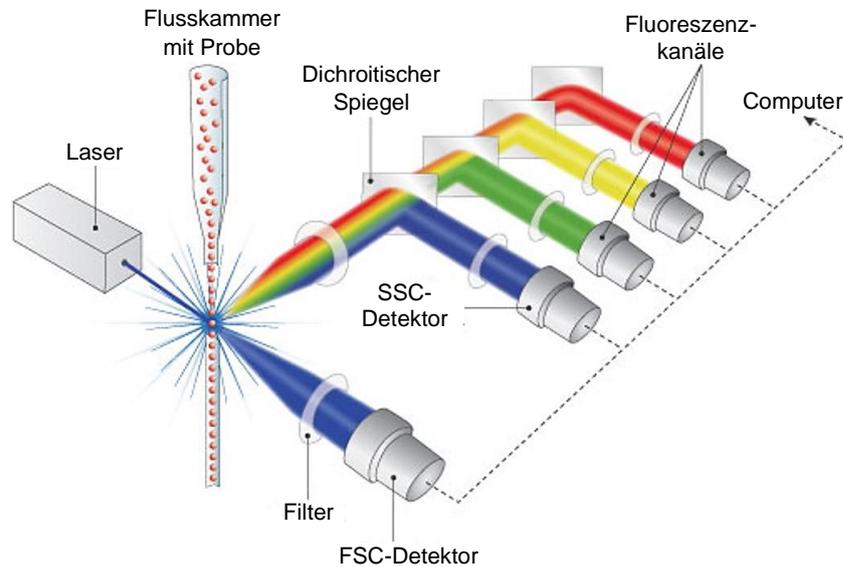


Abbildung 3.11: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (aus Lit.^[232]).

Für eine Messung werden die Zellen einer Probe zunächst über ein Flüssigkeitssystem in eine Flusskammer transportiert. Dort werden sie so fokussiert, dass sie in dem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl einzeln durchlaufen können. Infolgedessen treten Streu- bzw. bei Proben mit Fluorophoren auch Fluoreszenzstrahlungen auf, die über ein optisches System mit dichroitischen Spiegeln und Filtern zu verschiedenen Detektoren geleitet und in elektronische Signale umgewandelt werden können. Bei der Lichtstreuung wird zwischen zwei Arten unterschieden: Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC). Die Vorwärtsstreuung entsteht durch Beugung des Laserstrahls an einer Zelle. Sie wird entlang der Achse des Lasers detektiert und ist proportional zur Größe der Zellen. Im Gegensatz dazu resultiert die Seitwärtsstreuung meist aus gebrochener bzw. reflektierter Strahlung, weswegen sie in einem Winkel von ungefähr 90° zum Laserstrahl gesammelt wird. Aus der Seitwärtsstreuung können Aussagen über die Granularität und interne Komplexität einer Zelle gewonnen werden.^[229] Enthalten die zu analysierenden Zellen Fluorophore, ist es möglich, die aus der Anregung des Lasers resultierende Emission von Fluoreszenzstrahlung zur Charakterisierung der Zellen zu verwenden. Bei den Fluorophoren kann es sich einerseits um fluoreszenzmarkierte Antikörper handeln, mit denen die Zellen vorher versehen wurden. Andererseits können auch fluoreszierende Farbstoffe, die beispielsweise an DNA binden, oder fluoreszierende Proteine (z. B. GFP) nachgewiesen werden.

Die Analyse einer großen Anzahl von Zellen innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls ($> 1\,000$ Zellen pro Sekunde) bietet darüber hinaus die Möglichkeit, schnell repräsentative Informationen über individuelle Zellen einer Population zu erhalten.^[229–231]

Bei dem verwendeten Durchflusszytometer handelte es sich um einen MACSQuant Analyzer 10 der Firma Miltenyi Biotec. Üblicherweise wurden 100 μL der Zellsuspensionen in die vorgesehenen Messgefäße gefüllt. Zur Färbung mit 7-AAD wurde die Färbelösung (Miltenyi Biotec) in einem Verhältnis von 1:10 direkt vor der Messung der Probe hinzugegeben. Üblicherweise wurden 20 000 Zellen vermessen und zum Auswerten der Daten wurde die Software FlowLogic des gleichen Herstellers verwendet. Die Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Michael Pflaum (AG Bioartifizielle Lunge der Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, MHH) durchgeführt.

3.3.3 Alizarin-Rot-Färbung zur Untersuchung der odontogenen Differenzierung von DPSCs unter Einfluss von NPSNPs

Zur Untersuchung des Einflusses der nanoporösen Silica-Nanopartikel auf die Differenzierung von dentalen Pulpastammzellen wurde die Alizarin-Rot-Färbung herangezogen. DPSCs, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der odontogenen/osteogenen Differenzierung befinden, stellen extrazelluläre Matrixproteine her, in die sich Calcium- und Phosphationen einlagern. Eine Möglichkeit zur Beurteilung dieser Mineralisierung der Zellen bietet die Alizarin-Rot-Färbung. Bei Alizarin-Rot handelt es sich um ein 1,2-Dihydroxyanthrachinon (Abbildung 3.12), das Calciumkationen komplexieren kann, woraus eine nachweisbare intensive Rotfärbung resultiert.^[233,234]

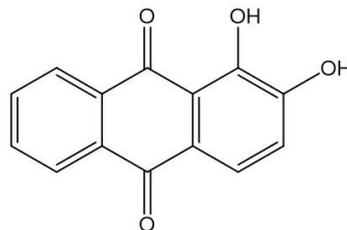


Abbildung 3.12: Strukturformel von Alizarin.

3.3.4 Alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung zur Untersuchung der odontogenen Differenzierung von DPSCs unter Einfluss von NPSNPs

Neben der Alizarin-Rot-Färbung wurde auch ein alkalische Phosphatase-Assay (ALP-Assay) zur Beurteilung der Differenzierung der DPSCs unter Einfluss von NPSNPs herangezogen. Das ALP-Gen gehört zu denjenigen, dessen Expression in einem frühen Stadium der odontogenen/osteogenen Differenzierung hochreguliert wird.^[235] ALP ist ein Enzym, das in der Lage ist, unter alkalischen Bedingungen Phosphorsäureester zu hydrolysieren und somit Phosphatgruppen von verschiedenen Molekülen zu entfernen. Bei dem verwendeten Assay wird zur Bestimmung das Substrat *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) von ALP in Phosphat und *p*-Nitrophenol (pNP) konvertiert (Abbildung 3.13). Letztgenanntes liegt bei basischen pH-Werten deprotoniert vor, besitzt dadurch eine gelbe Farbe und ist somit kolorimetrisch quantifizierbar. Das zeitliche Ausmaß der Spaltung ist proportional zur Enzymkonzentration.^[236]

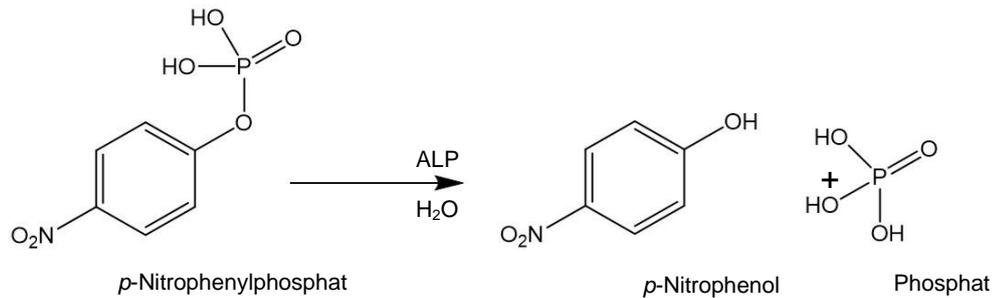


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Spaltung von *p*-Nitrophenylphosphat in Phosphat und *p*-Nitrophenol mithilfe von ALP.

3.3.5 ELISA zur Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten VEGF-Mengen

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das über eine enzymatische Farbreaktion zur Bestimmung von Proteinmengen dient. In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren zur Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten VEGF-Mengen sowie zur Untersuchung der Stabilität von VEGF unter den vorhandenen Bedingungen genutzt. Bei dem verwendeten ELISA handelte sich um einen sogenannten „Sandwich-ELISA“, bei dem zwei Antikörper an unterschiedliche Stellen des nachzuweisenden Antigens binden, sodass es zwischen ihnen „gefangen“ wird. Eine schematische Skizze ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

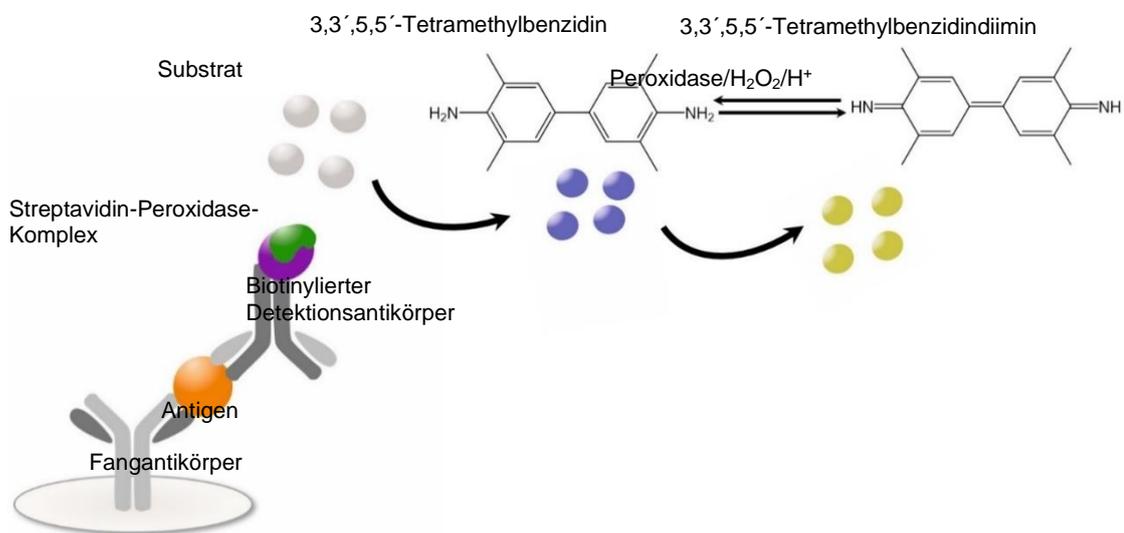


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung eines „Sandwich-ELISAs“ zur Quantifizierung von VEGF.

Zuerst wird der Boden einer Wellplatte mit einem primären Antikörper vorbeschichtet. An diesen können die Antigene, die sich in einer zu untersuchenden Probe befinden, binden. Anschließend bindet ein sekundärer, biotinylierter Antikörper an eine andere Stelle des Antigens und komplementiert damit das „Sandwich“. Im nächsten Schritt erfolgt die Anbindung eines Peroxidase-Komplexes an die biotinylierte Stelle. Dieser kann schließlich die enzymatische Farbreaktion des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (TMB), die zur Quantifizierung dient, katalysieren.

3.3.6 Tube-Assay

Bei einem *Tube*-Assay handelt es sich um einen *in vitro*-Test, mit dem der Einfluss einer Substanz auf die Bildung kapillarartiger Strukturen von Endothelzellen beurteilt werden kann. Bei der Durchführung des Assays werden Endothelzellen zunächst auf einer geeigneten Matrix ausgesät. Durch die Inkubation mit proangiogenen Faktoren bilden die Zellen daraufhin röhrenförmige Strukturen, deren Ausmaß (z. B. durchschnittliche Länge und Anzahl der Verzweigungspunkte) schließlich mikroskopisch und unter Zuhilfenahme einer geeigneten Software beurteilt werden kann.^[237] Eine Beschreibung der Vorgehensweise des in dieser Arbeit durchgeführten *Tube*-Assays erfolgte bereits in Abschnitt 3.1.22.

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel widmet sich der Auswertung der durchgeführten Experimente und der Diskussion der erhaltenen Ergebnisse. Zunächst erfolgt eine Vorstellung der synthetisierten und modifizierten Silica-Nanopartikel, die als Freisetzungsbasis für die Biomoleküle dienen. Anschließend werden nacheinander die entwickelten Freisetzungssysteme für siRNA und VEGF betrachtet und ihr Potential im Hinblick auf eine Anwendung in der regenerativen Medizin diskutiert.

4.1 Silica-Nanopartikel

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Sorten Silica-Nanopartikel als Plattform für die Freisetzung erprobt: zum einen die *small pore*-NPSNPs (*sp*-NPSNPs) und zum anderen die *large pore*-NPSNPs (*lp*-NPSNPs). In den folgenden zwei Unterkapiteln werden die Charakterisierungen dieser Nanopartikel vor und nach der Modifizierung mit Alkoxysilanen präsentiert.

4.1.1 Charakterisierung der un- und modifizierten *sp*-NPSNPs

Die *sp*-NPSNPs wurden nach einer modifizierten Vorschrift von Qiao *et al.* synthetisiert.^[36] Wie in der TEM- und der REM-Aufnahme in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, handelt es sich um sphärische und nanoporöse Partikel mit einem einheitlichen Partikeldurchmesser zwischen 40 nm und 50 nm.

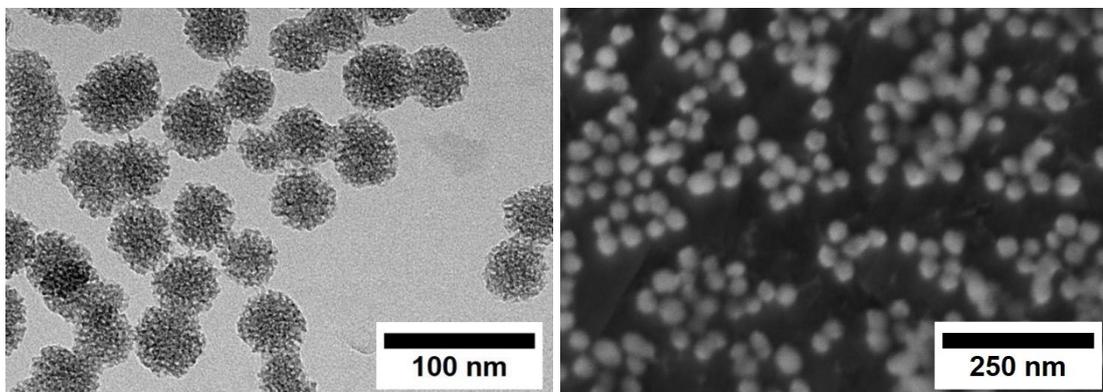


Abbildung 4.1: TEM-Aufnahme (links) und REM-Aufnahme (rechts) der unmodifizierten *sp*-NPSNPs.

Die Porosität wurde weiterhin mittels einer N_2 -Physisorptionsmessung untersucht und die dazugehörige Sorptionsisotherme ist links in Abbildung 4.2 dargestellt. Eine Berechnung der spezifischen Oberfläche mithilfe des BET-Modells ergab einen Wert von $950 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Diese hohe spezifische Oberfläche kann auf das vorhandene durchgängige Porensystem zurückgeführt werden, dessen durchschnittlicher Porendurchmesser, bestimmt über die DFT-Methode, bei 3 nm lag (s. Abbildung 4.2 rechts). Der Isothermenbeginn bei circa $200 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ deutet auf einen kleinen Anteil Mikroporen hin, der jedoch über die N_2 -Physisorption nicht weiter quantifiziert werden konnte. Ab einem Relativdruck von

$p/p_0 = 0.94$ ist die Isotherme nicht mehr dargestellt, da der ab diesem Wert auftretende steile Anstieg durch die Kondensation in interpartikulären Zwischenräumen verursacht wird. Das Porenvolumen bis zu dem dargestellten relativen Druck betrug $1.0 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

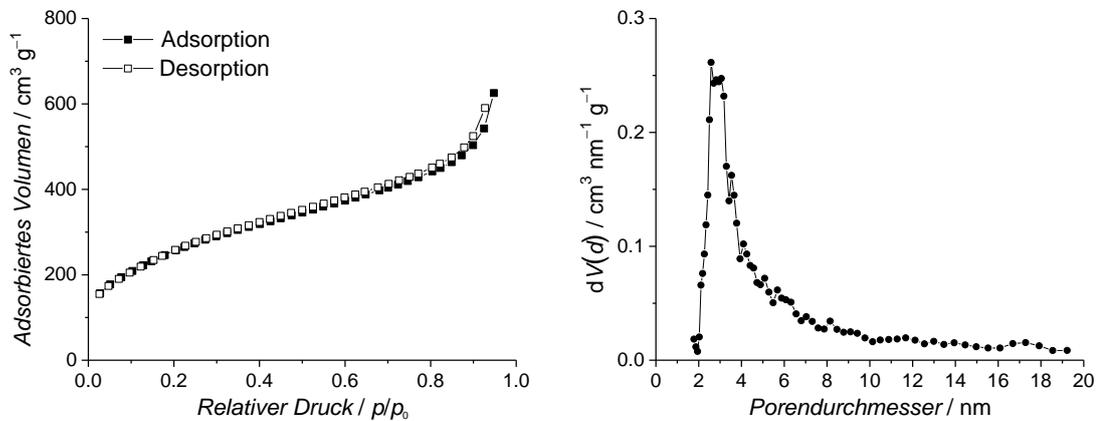


Abbildung 4.2: N_2 -Physisorptionsisotherme (links) und DFT-Porenweitenverteilung (rechts) der unmodifizierten *sp*-NPSNPs.

Um den Einfluss verschiedener funktioneller Gruppen auf die Immobilisierung und die Freisetzung der unterschiedlichen Biomoleküle zu untersuchen, wurde die Partikeloberfläche über eine *post-grafting*-Synthese modifiziert. Dazu wurde entweder nur ein Aminosilan (APTES) oder eine Kombination aus dem Aminosilan und einem Propylsilan (PTMS) in unterschiedlichen Verhältnissen verwendet. In Abbildung 4.3 ist exemplarisch eine TEM-Aufnahme der *sp*-NPSNPs nach einer solchen Aminomodifizierung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die modifizierten Nanopartikel in Bezug auf Größe und Morphologie nur marginal von den unmodifizierten *sp*-NPSNPs unterscheiden.

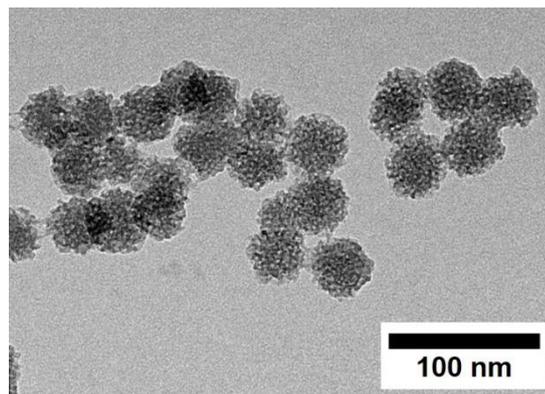


Abbildung 4.3: TEM-Aufnahme von *sp*-NPSNP- NH_2 -Propyl (50/50) als Beispielaufnahme für modifizierte *sp*-NPSNPs.

Im Gegensatz dazu zeigen sich bei den N_2 -Physisorptionsmessungen nach der Modifikation der *sp*-NPSNPs deutliche Unterschiede. In Tabelle 4.1 sind die berechneten spezifischen Oberflächen zusammen mit den Porenvolumina und der durchschnittlichen Porenweite für die einzelnen Modifizierungen zusammenfassend dargestellt. Die dazuge-

hörigen Stickstoffisothermen und Porenweitenverteilungen sind in Abbildung 7.1 bis Abbildung 7.4 im Anhang zu finden. Im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikeln zeigen alle modifizierten *sp*-NPSNPs eine um ca. 25 % geringere spezifische Oberfläche, wobei keine signifikanten Unterschiede bei der Art der Modifizierung zu erkennen sind. Eine ähnliche Abnahme lässt sich auch bei Betrachtung der Porenvolumina feststellen. Der Porendurchmesser bleibt dagegen durch die Modifizierung nahezu unbeeinflusst. Diese Befunde deuten auf ein sogenanntes *pore blocking* hin. Dieser Verschluss der Porenöffnungen kann durch eine anfänglich bevorzugte Reaktion der Organosilane an den Porenöffnungen und eine damit verbundene Verhinderung der Diffusion weiterer Moleküle in das Innere der Pore verursacht werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Porenöffnungen durch die Anlagerung von Homokondensaten der Organosilane blockiert werden.^[29,238]

Tabelle 4.1: Aus den N₂-Physisorptionsmessungen bestimmte spezifische Oberflächen (S_{BET}), Porenvolumina (V_{Poren}) und durchschnittliche Porendurchmesser (d_{Poren}) für die un- und modifizierten *sp*-NPSNPs.

	S_{BET} / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	V_{Poren} / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	d_{Poren} / nm
<i>sp</i> -NPSNP	950	1.00	3.0
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂	721	0.73	2.9
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	700	0.74	2.9
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	740	0.79	2.9
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	700	0.73	2.8

Zur weiteren Bestätigung einer erfolgreichen Modifizierung und zur Analyse der resultierenden Zusammensetzung wurden die (modifizierten) *sp*-NPSNPs mittels Thermogravimetrie sowie über die Elementaranalyse von Kohlenstoff und Stickstoff charakterisiert. Links in Abbildung 4.4 ist das Thermogramm der unmodifizierten *sp*-NPSNPs, das zwei Stufen enthält, dargestellt.

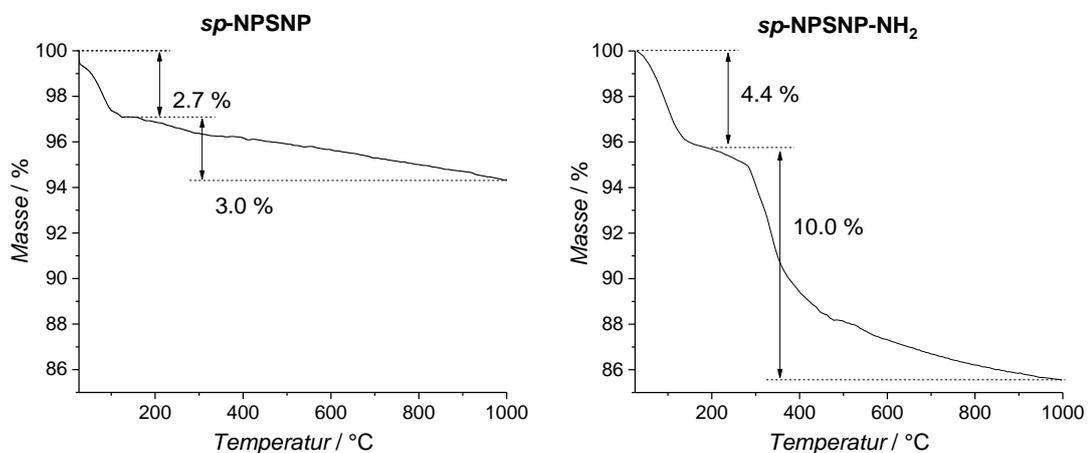


Abbildung 4.4: Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen der unmodifizierten (links) sowie der amino-modifizierten *sp*-NPSNPs (rechts).

Der Massenverlust bis ca. 150 °C ist der Entfernung verbliebener Lösungsmittelreste zuzuschreiben. Zusätzlich wird adsorbiertes Wasser von der Oberfläche entfernt. Der daran anschließende Verlust von ca. 3 % bis zu einer Temperatur von 1 000 °C kann durch eine Dehydroxylierung der Oberfläche der Silica-Nanopartikel erklärt werden.^[239,240] Stellvertretend für eine Veränderung der Messkurve nach einer Modifizierung ist auf der rechten Seite der Abbildung 4.4 das Thermogramm der amino-modifizierten Nanopartikel (*sp*-NPSNP-NH₂) abgebildet. Die Thermogramme der anderen Modifizierungen können in Abbildung 7.9 im Anhang gefunden werden. Die erste Stufe bis ca. 150 °C wird erneut durch den Verlust des restlichen Lösungsmittels sowie des adsorbierten Wassers verursacht. Zusätzlich ist im Thermogramm der modifizierten Partikel zwischen 150 °C und 1 000 °C eine eindeutige Stufe von 8–10 % zu erkennen, die sowohl auf die Verbrennung der funktionellen Gruppen als auch auf eine anschließende Dehydroxylierung zurückzuführen ist. Für eine Aussage hinsichtlich des Modifizierungsgrades wurde aus dieser Stufe (abzüglich der 3 % für die Dehydroxylierung) der Anteil der funktionellen Gruppen pro Gramm Nanopartikel berechnet (s. Tabelle 4.2). Dafür wurde angenommen, dass die Alkoxysilane über zwei der drei möglichen Bindungen kovalent an der Silica-Oberfläche verankert waren. Die sich daraus ergebenden Werte der einzelnen Modifizierungen unterscheiden sich kaum und liegen in einem Bereich von 0.4–0.5 mmol g⁻¹. Bei einem theoretisch eingesetzten Anteil der Alkoxysilane von 0.85 mmol g⁻¹ wurden somit Gesamtmodifizierungsgrade zwischen 50 % und 60 % erreicht, wobei nicht zwischen angebondenen APTES und PTMS-Molekülen unterschieden werden kann.

Neben der Thermogravimetrie wurde eine Kohlenstoff-Elementaranalyse durchgeführt, um die Zusammensetzung der Nanopartikel vor und nach dem Modifizierungsschritt zu untersuchen. Die Ergebnisse der Messungen sind zusammen mit den daraus berechneten Anteilen der funktionellen Gruppen ebenfalls in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Ergebnisse aus den Stufen der Thermogramme und aus den C-Elementaranalysen der jeweiligen Modifizierung der *sp*-NPSNPs. Zusätzliche Angabe der berechneten Anteile funktioneller Gruppen pro Gramm Nanopartikel über den Massenverlust aus der TGMessung (a) bzw. über den Kohlenstoffgehalt aus der C-Elementaranalysen (b).

	Thermogravimetrie		Elementaranalyse	
	Stufe (150 – 1 000 °C) / %	Funkt. Gruppen (a) / mmol g ⁻¹	C-Gehalt / %	Funkt. Gruppen (b) / mmol g ⁻¹
<i>sp</i> -NPSNP	3.0	–	–	–
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂	10.0	0.43	5.9 ± 0.1	0.98
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	9.7	0.50	6.1 ± 0.1	1.01
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	8.9	0.49	6.6 ± 0.1	1.10
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	7.7	0.49	6.6 ± 0.1	1.10

Ein Vergleich der Werte untereinander zeigt erneut keine gravierenden Unterschiede zwischen den einzelnen Modifizierungen. Mit ca. 1 mmol g^{-1} liegt die experimentell ermittelte Menge jedoch über der theoretisch vorhandenen (0.85 mmol g^{-1}). Diese Diskrepanz kann damit erklärt werden, dass bei den gemessenen Kohlenstoffgehalten nicht zwischen Kohlenstoff aus den funktionellen Gruppen und Kohlenstoff aus Lösungsmittelresten wie Ethanol differenziert werden kann. Die Thermogravimetrie bietet dahingehend genauere Angaben. Dennoch konnte über die Kohlenstoff-Elementaranalyse eine erfolgreiche Modifizierung nachgewiesen werden.

Mithilfe der beiden bisher vorgestellten Analysen ist lediglich eine Aussage über den gesamten Modifizierungsgrad, aber nicht über das Verhältnis der beiden Alkoxysilane (APTES und PTMS) möglich. Aus diesem Grund wurde von den unmodifizierten Nanopartikeln sowie von der NH_2 -Propyl (50/50)-Modifizierung, bei der beide verwendeten Alkoxysilane äquimolar vorlagen, zusätzlich eine C/N-Elementaranalyse durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Aus dem Stickstoffanteil wurden, nach Abzug des Wertes für unmodifizierte Nanopartikel als Referenz, 0.34 mmol g^{-1} für die Menge der Aminogruppen pro Gramm Nanopartikel berechnet. Diese korreliert mit der Anzahl kovalent gebundener APTES-Moleküle auf der Oberfläche (80 % des eingesetzten APTES). Über den Anteil des Kohlenstoffs wurde nach Abzug der Referenz (0.088 %) ein Gesamtmodifizierungsanteil von 0.68 mmol g^{-1} bestimmt und der dazugehörige Modifizierungsgrad entspricht ebenfalls 80 %. Dabei impliziert das Ergebnis, wie bei der zuvor beschriebenen Elementaranalyse, jedoch auch Kohlenstoff aus eventuell vorhandenen Lösungsmittelresten. Dennoch kann für eine Abschätzung der bestimmte APTES-Anteil mit dem Gesamtmodifizierungsanteil ins Verhältnis gesetzt werden, woraus resultiert, dass 50 % der Modifizierung dem Aminosilan zugesprochen werden können. Damit lägen beide Silane in äquimolaren Anteilen vor.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der C/N-Elementaranalyse zusammen mit den sich daraus ergebenden Anteilen der funktionellen Gruppen pro Gramm Nanopartikel.

	<i>sp</i> -NPSNP	<i>sp</i> -NPSNP- NH_2 -Propyl (50/50)
C-Gehalt / %	0.088 ± 0.016	4.137 ± 0.029
Funkt. Gruppen (ges.) / mmol g^{-1}	–	0.68
N-Gehalt / %	0.047 ± 0.029	0.559 ± 0.011
Aminogruppen / mmol g^{-1}	–	0.34

Der Modifizierungsschritt beeinflusst auch die Oberflächeneigenschaften der Silica-Nanopartikel. Um diese zu charakterisieren, wurde das Zeta-Potential der *sp*-NPSNPs, welches mit der Oberflächenladung korreliert, in Abhängigkeit des pH-Wertes gemessen (Abbildung 4.5). Die sich aus der Messung ergebenden isoelektrischen Punkte (IEPs) sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

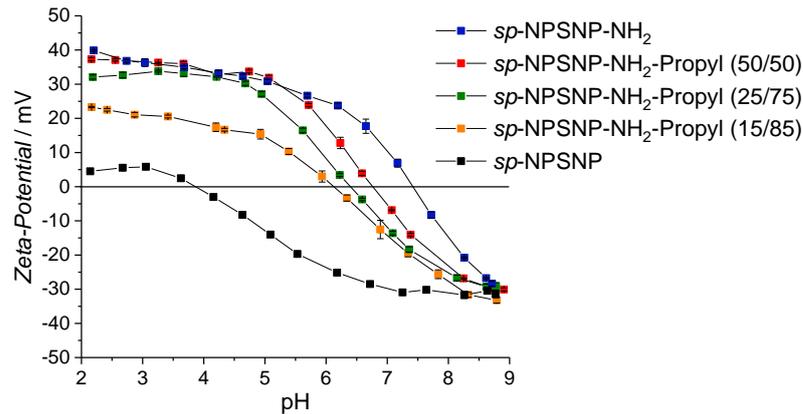


Abbildung 4.5: Zeta-Potential-Messungen für die unmodifizierten und modifizierten Silica-Nanopartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Tabelle 4.4: Isoelektrische Punkte für die unmodifizierten und modifizierten Nanopartikel aus den pH-Wert-abhängigen Zeta-Potential-Messungen sowie Zeta-Potentiale in PBS und MES.

	IEP	Zeta-Potential in PBS / mV	Zeta-Potential in MES / mV
<i>sp</i> -NPSNP	-3.9	-11.6	-9.7
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂	7.4	1.3	27.1
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	6.8	-2.6	15.7
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	6.4	-7.3	13.0
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	6.1	-9.3	4.5

Die unmodifizierten Silica-Nanopartikel zeigen mit -30 mV bei pH-Werten zwischen 6 und 9 ein stark negatives Zeta-Potential. Mit sinkendem pH-Wert wird dieses zunehmend positiver, bis bei pH 3.9 der isoelektrische Punkt erreicht ist. Bei noch kleineren pH-Werten besitzen die unmodifizierten Silica-Nanopartikel eine leicht positive Oberflächenladung. Ein solches Verhalten ist typisch für Silica-Nanopartikel, da die Silanolgruppen auf der Oberfläche einen schwach sauren Charakter aufweisen. Im Gegensatz zu den unmodifizierten *sp*-NPSNPs steigt bei den amino-modifizierten Nanopartikeln (*sp*-NPSNP-NH₂) das anfängliche Zeta-Potential von -30 mV bei pH 9 schon deutlich früher. Bereits bei einem pH-Wert von 7.4 ist der IEP erreicht und bei einem pH-Wert von 2 ist das Zeta-Potential bis auf $+30$ mV gestiegen. Auch dieses Verhalten entspricht den Erwartungen. Bei hohen pH-Werten liegen die Aminogruppen noch deprotoniert vor, sodass die Silanolgruppen die Oberflächenladung bestimmen. Bei der Titration auf niedrigere pH-Werte werden die Aminogruppen protoniert und sorgen für eine positive Oberflächenladung. Je geringer der Anteil der Aminogruppen bei den unterschiedlichen Modifizierungen ist, desto kleiner ist das resultierende Zeta-Potential bei niedrigen pH-Werten. Außerdem wird der isoelektrische Punkt mit sinkender Anzahl der Aminogruppen zu niedrigeren pH-Werten verschoben.

Zusätzlich zu den pH-abhängigen Messungen des Zeta-Potentials in Wasser wurde das Zeta-Potential in PBS (pH 7.4) zur Simulation für physiologische Flüssigkeiten bestimmt. Dies ist sinnvoll, da sich das Oberflächenpotential wegen der höheren Salzkonzentration in PBS zu der Messung in Wasser bei pH 7.4 unterscheiden kann. Für die Immobilisierung der siRNA auf den NPSNPs wurde ein MES-Puffer (pH 5) verwendet, weswegen das Zeta-Potential der Partikel in diesem Medium ebenfalls ermittelt wurde. Sämtliche Messergebnisse sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Es konnte festgestellt werden, dass die Zeta-Potentiale in PBS positiver ausfallen als in Wasser. Beispielsweise liegt das Zeta-Potential der unmodifizierten Nanopartikel in Wasser bei ca. -24 mV, in PBS dagegen nur bei ungefähr -12 mV. Gleiches war auch bei den modifizierten Nanopartikeln zu beobachten. Als Ursache kann die Veränderung der elektrochemischen Doppelschicht um die Nanopartikel aufgrund der Anwesenheit von einer erhöhten Ionenanzahl in PBS als Medium genannt werden.^[241,242] Die Silica-Nanopartikel mit einer alleinigen APTES-Modifizierung zeigten als einzige unter den Nanopartikelvarianten mit 1.3 mV ein leicht positives Zeta-Potential, alle anderen Modifizierungen lagen dagegen im negativen Bereich, da weniger protonierbare Aminogruppen vorhanden sind. Generell kann bei keiner der Modifizierungen von einer stabilen Dispersion gesprochen werden, da hierfür ein Wert von ± 30 mV überschritten werden müsste.^[241] Die gemessenen Zeta-Potentiale der modifizierten Nanopartikel in MES-Puffer (pH 5) weisen positive Werte zwischen 27 mV und 4 mV auf, wobei mit sinkendem Anteil der Aminogruppen auch die Oberflächenladung sinkt. Für die Immobilisierung der siRNA auf den modifizierten NPSNPs wurde dieses Medium gewählt, da über elektrostatische Wechselwirkungen die negativen Nukleinsäuren auf der positiven Oberfläche immobilisiert werden können.

Für eine Anwendung als Freisetzungsbasis für Biomoleküle in der regenerativen Medizin ist die Zytotoxizität der nanoporösen Silica-Nanopartikel ein entscheidender Aspekt. In vorherigen Studien, unter anderem auch vom Arbeitskreis Behrens, wurde die generelle Zytokompatibilität der *sp*-NPSNPs bereits analysiert.^[58,221,222] Da jedoch die Modifizierung und die Zellart einen Einfluss auf die Toxizität haben können, wurden in dieser Arbeit die Zellviabilität der *sp*-NPSNPs sowie der *sp*-NPSNPs-NH₂-Propyl (50/50) an dentalen Pulpastammzellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen für 24 Stunden inkubiert und nach zwei sowie nach sechs Tagen in Kultur erfolgte eine Bestimmung der Zellviabilitäten mittels eines CellTiter-Blue®-Tests. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

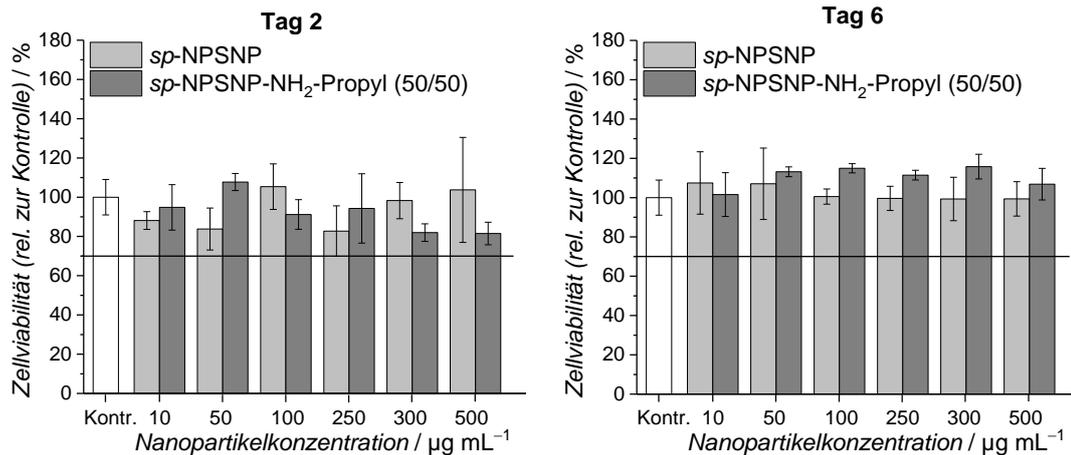


Abbildung 4.6: Mittels CTB-Test bestimmte relative Zellviabilitäten der dentalen Pulpastammzellen zwei (links) und sechs (rechts) Tage nach der Inkubation mit un- bzw. modifizierten Nanopartikeln (*sp*-NPSNP sowie *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)) in unterschiedlichen Konzentrationen. Zusätzliche Angabe der Viabilität der Kontrolle (Kontr.), bei der Zellen unter gleichen Bedingungen, aber ohne Silica-Nanopartikel kultiviert wurden.

Unabhängig von der Nanopartikelkonzentration liegen die relativen Zellviabilitäten an beiden Tagen über 70 %, sodass sie als zytokompatibel eingestuft werden können.^[243] Ein Vergleich der Ergebnisse der zwei Zeitpunkte zeigt, dass die Messwerte an Tag zwei deutlich größere Schwankungen aufweisen, wohingegen an Tag sechs die Zellviabilitäten vergleichbar mit denen von Zellen sind, die nur mit Medium behandelt wurden. Dieser Befund deutet auf einen akuten, beeinträchtigenden Effekt hin, der durch die Bedeckung der Zellen mit Nanopartikeln verursacht worden sein könnte. Durch die Bildung einer Nanopartikelschicht kann die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen zu den Zellen sowie die Entfernung der Zellabfälle gehemmt werden. Nach sechs Tagen ist diese negative Einwirkung nicht mehr auszumachen, da die bedeckende Schicht wahrscheinlich durch den zwischenzeitlichen Mediumwechsel sowie durch den Abbau der Partikel von den Zellen abgetragen wurde. Ähnliche Resultate zeigten sich im Arbeitskreis Behrens auch in vorherigen Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Silica-Nanopartikeln und Myoblasten.^[222]

4.1.2 Charakterisierung der un- und modifizierten *lp*-NPSNPs

Neben den im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Silica-Nanopartikeln mit einer Größe von 40–50 nm und einem Porendurchmesser von 3 nm (*sp*-NPSNPs) wurden auch nanoporöse Silica-Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 80 nm und Porendurchmessern von 3.5 nm und 7.5 nm synthetisiert (*lp*-NPSNPs). Um die Größe und die Morphologie der hergestellten Partikel zu beurteilen, wurden sowohl TEM- als auch REM-Aufnahmen angefertigt (Abbildung 4.7). In beiden Aufnahmen sind sphärische und poröse Partikel zu erkennen. Darüber hinaus lassen sich auch Poren mit einem Durchmesser von ca. 7.5 nm ausmachen.

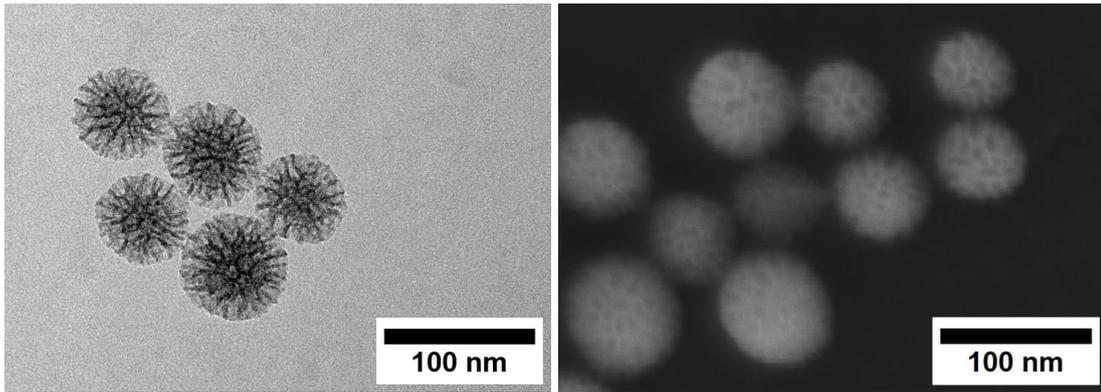


Abbildung 4.7: TEM-Aufnahme (links) und REM-Aufnahme (rechts) der unmodifizierten *lp*-NPSNPs.

Die Porosität wurde überdies mittels einer N_2 -Physisorptionsmessung analysiert und die dazugehörige Sorptionsisotherme ist links in Abbildung 4.8 dargestellt. Aus ihr wurde über das BET-Modell eine spezifische Oberfläche von $830 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ berechnet. Der Isothermenbeginn bei circa $150 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ deutet auf einen kleinen Anteil an Mikroporen hin, der jedoch nicht weiter quantifiziert werden konnte. Auch diese Isotherme ist ab einem Relativdruck von $p/p_0 = 0.94$ nicht mehr dargestellt, da der ab diesem Wert auftretende steile Anstieg durch die Kondensation in interpartikulären Zwischenräumen verursacht wird. Für das Porenvolumen wurde bis zu dem dargestellten relativen Druck ein Wert von $0.9 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ erhalten. Aus der Bestimmung der Porenweitenverteilung mithilfe der DFT-Methode resultierten zwei Maxima, eines bei 3.5 nm und eines bei 7.5 nm (s. Abbildung 4.8 rechts).

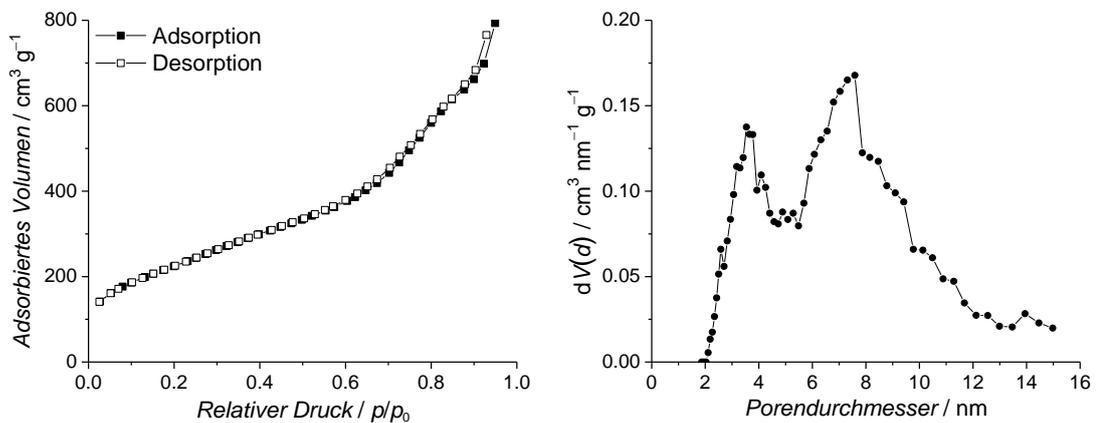


Abbildung 4.8: N_2 -Physisorptionsisotherme (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) der unmodifizierten *lp*-NPSNPs.

Auch diese Silica-Nanopartikelsorte wurde nach der Synthese über einen *post-grafting*-Schritt mit verschiedenen Alkoxysilanen modifiziert. Zur Bestätigung, dass die Modifizierung nur einen geringfügigen Einfluss auf die Größe und die Morphologie der Partikel hat, wurden TEM-Aufnahmen angefertigt. Beispielhaft ist eine solche Aufnahme der *lp*-NPSNP- NH_2 -Propyl (50/50) in Abbildung 4.9 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Modifizierungsschritt kaum einen Einfluss auf die Größe und die Form der Partikel hat.

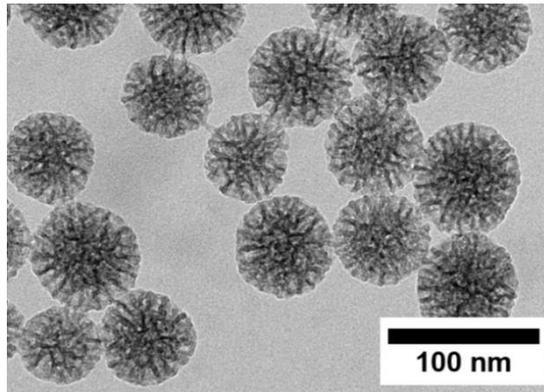


Abbildung 4.9: TEM-Aufnahme von *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) als Beispielaufnahme für modifizierte *lp*-NPSNPs.

Die Auswirkung der Modifizierung auf das Porensystem der Partikel wurde mithilfe von N₂-Physisorptionsmessungen untersucht. In Tabelle 4.5 sind die gemessenen spezifischen Oberflächen zusammen mit den Porenvolumina und den Porenweiten für die un- sowie modifizierten *lp*-NPSNPs aufgelistet. Die dazugehörigen Stickstoffisothermen sowie die Porenweitenverteilungen können in Abbildung 7.5 bis Abbildung 7.8 im Anhang gefunden werden. Die Sorptionsmessungen zeigen eine 20–25 %-ige Reduktion der spezifischen Oberfläche sowie des Porenvolumens durch die Oberflächenmodifizierung. Die Porendurchmesser werden dagegen kaum beeinflusst. Analog zu den bereits vorgestellten Ergebnissen der *sp*-NPSNPs (Abschnitt 4.1.1) können diese Ergebnisse durch ein *pore blocking* erklärt werden.

Tabelle 4.5: Aus den N₂-Physisorptionsmessungen bestimmte spezifische Oberflächen (S_{BET}), Porenvolumina (V_{Poren}) und durchschnittliche Porendurchmesser (d_{Poren}) für die modifizierten *lp*-NPSNPs.

	S_{BET} / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	V_{Poren} / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	d_{Poren} / nm
<i>lp</i> -NPSNP	830	0.94	3.5 und 7.5
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂	610	0.83	3.5 und 6.8
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	600	0.86	3.5 und 7.0
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	580	0.76	3.4 und 7.0
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	570	0.77	3.3 und 6.8

Auch für diese Nanopartikel wurden zur Bestätigung einer erfolgreichen Modifizierung und zur Charakterisierung der resultierenden Zusammensetzung die Thermogravimetrie sowie die Elementaranalyse herangezogen. Links in Abbildung 4.10 ist ein Thermogramm der unmodifizierten, rechts eines der modifizierten Silica-Nanopartikel (*lp*-NPSNP-NH₂) als Vergleich dargestellt. Die restlichen Thermogramme für die unterschiedlichen Modifizierungen sind in Abbildung 7.10 im Anhang zu finden. Auch hier kann bei den unmodifizierten Partikeln die erste Stufe bis 150 °C auf das Entfernen von

adsorbiertem Wasser sowie Lösungsmittelresten und die zweite Stufe auf eine Dehydroxylierung zurückgeführt werden. Die modifizierten Partikel besitzen im Gegensatz dazu zwischen 150 °C und 1 000 °C eine eindeutige zweite Stufe zwischen 6 % und 10 %. Diese kann sowohl von der Verbrennung der funktionellen Gruppen als auch von einer Dehydroxylierung stammen.

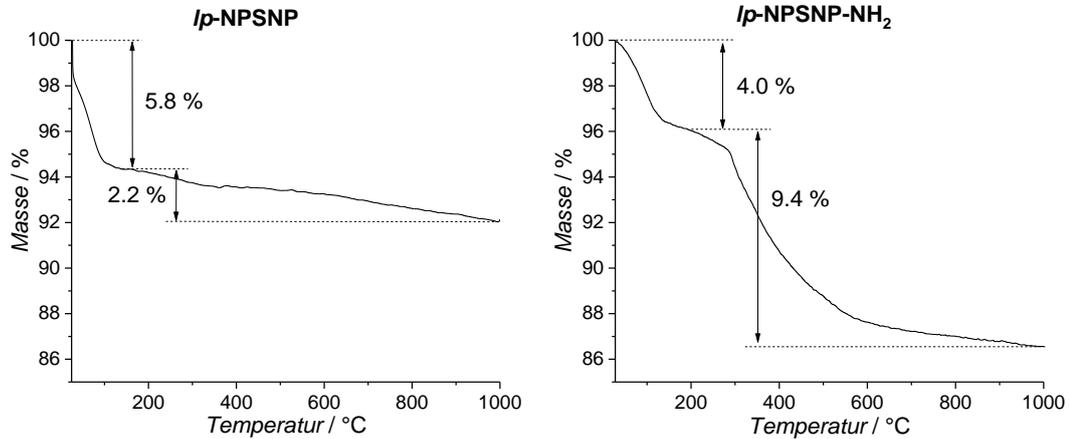


Abbildung 4.10: Ergebnisse der thermogravimetrischen Messungen der unmodifizierten (links) sowie der amino-modifizierten *lp*-NPSNPs (rechts).

Aus dieser Stufe (abzüglich der 2.2 % für die Dehydroxylierung) ist es möglich, den Anteil der funktionellen Gruppen pro Gramm Nanopartikel und somit auch den Modifizierungsgrad zu berechnen (s. Tabelle 4.6). Für die einzelnen Modifizierungen liegen die Werte zwischen 0.3 mmol g⁻¹ und 0.5 mmol g⁻¹. Unter Berücksichtigung des theoretisch maximalen Anteils der Alkoxysilane von 0.85 mmol g⁻¹ bei vollständiger Anbindung wurden somit Gesamtmodifizierungsgrade von ca. 40 % bis 60 % erreicht.

Tabelle 4.6: Ergebnisse aus den Stufen der Thermogramme und aus den C-Elementaranalysen der jeweiligen Modifizierung der *lp*-NPSNPs. Zusätzliche Angabe der berechneten Anteile funktioneller Gruppen pro Gramm Nanopartikel über den Massenverlust aus der TGMessung (a) bzw. über den Kohlenstoffgehalt aus der C-Elementaranalysen (b).

	Thermogravimetrie		Elementaranalyse	
	Stufe (150 – 1 000 °C) / %	Funkt. Gruppen (a) / mmol g ⁻¹	C-Gehalt / %	Funkt. Gruppen (b) / mmol g ⁻¹
<i>lp</i> -NPSNP	2.2	–	–	–
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂	9.4	0.44	6.9 ± 0.1	1.15
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	7.9	0.42	7.2 ± 0.2	1.20
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	8.4	0.52	6.3 ± 0.1	1.05
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	5.9	0.32	6.0 ± 0.1	1.00

Neben der Thermogravimetrie wurde eine Kohlenstoff-Elementaranalyse zur Untersuchung der Zusammensetzung der Nanopartikel vor und nach der Modifizierung herangezogen. Die Ergebnisse der Messungen können zusammen mit den daraus

berechneten Anteilen der funktionellen Gruppen ebenfalls in Tabelle 4.6 gefunden werden. Ein Vergleich der Werte untereinander zeigt keine maßgeblichen Unterschiede zwischen den einzelnen Modifizierungen. Mit ca. 1 mmol g^{-1} liegen auch für diese Nanopartikel die errechneten Anteile über dem theoretischen Wert von 0.85 mmol g^{-1} . Dieser Befund ist der Tatsache geschuldet, dass eine Unterscheidung zwischen Kohlenstoff aus den funktionellen Gruppen und Kohlenstoff aus Lösungsmittelresten (z. B. Ethanol) nicht möglich ist. Dennoch konnte über die Kohlenstoff-Elementaranalyse eine erfolgreiche Modifizierung nachgewiesen werden.

Für eine Aussage bezüglich der Verhältnisse zwischen APTES und PTMS nach dem Modifizierungsschritt wurde von den unmodifizierten Partikeln und denjenigen, bei denen die zwei Alkoxysilane im äquimolaren Verhältnis eingesetzt wurden (*lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)), zusätzlich eine C/N-Elementaranalyse durchgeführt. Die erhaltenen Messergebnisse sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Aus dem Stickstoffanteil wurde unter Berücksichtigung des Wertes der unmodifizierten Nanopartikel als Referenz ein Wert von 0.37 mmol g^{-1} für die Menge der Aminogruppen pro Gramm Nanopartikel berechnet, was einer Anbindung von 88 % des eingesetzten APTES entspräche. Über den Anteil des Kohlenstoffs wurde bei den modifizierten Partikeln ein Gesamtmodifizierungsanteil von 0.64 mmol g^{-1} bestimmt und der dazugehörige Modifizierungsgrad entspricht 76 % der eingesetzten Silanmengen. Dabei impliziert das Ergebnis, dass auch Kohlenstoff aus nicht entfernten Lösungsmittelresten vorhanden ist. Nichtsdestotrotz ist eine Abschätzung des APTES-Anteils möglich, wenn dieser mit dem Gesamtmodifizierungsanteil ins Verhältnis gesetzt wird. Der somit resultierende Anteil des Aminosilans beläuft sich auf 57 %.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der C/N-Elementaranalyse zusammen mit den sich daraus ergebenden Anteilen der funktionellen Gruppen pro Gramm Nanopartikel.

	<i>lp</i> -NPSNP	<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)
C-Gehalt / %	0.101 ± 0.013	3.096 ± 0.036
Funkt. Gruppen (ges.) / mmol g^{-1}	–	0.64
N-Gehalt / %	0.054 ± 0.039	0.615 ± 0.024
Aminogruppen / mmol g^{-1}	–	0.37

Auch bei diesen Silica-Nanopartikeln verändern sich die Oberflächeneigenschaften durch den Modifizierungsschritt. Zur Charakterisierung wurde eine pH-abhängige Messung des Zeta-Potentials herangezogen. Die Ergebnisse der Messungen für die unmodifizierten sowie modifizierten Nanopartikel sind in Abbildung 4.11 dargestellt, und die sich daraus ergebenden isoelektrischen Punkte (IEP) können der Tabelle 4.8 entnommen werden. Analog zu den bereits vorgestellten *sp*-NPSNPs zeigen die *lp*-NPSNPs eine für unmodifizierte Silica-Nanopartikel charakteristische Zeta-Potential-Kurve, die mit dem schwach sauren Charakter der Silanolgruppen auf der Partikeloberfläche erklärt werden

kann. Über die Oberflächenmodifizierung verschiebt sich in Abhängigkeit des Anteils eingebrachter Aminogruppen der IEP zu höheren pH-Werten.

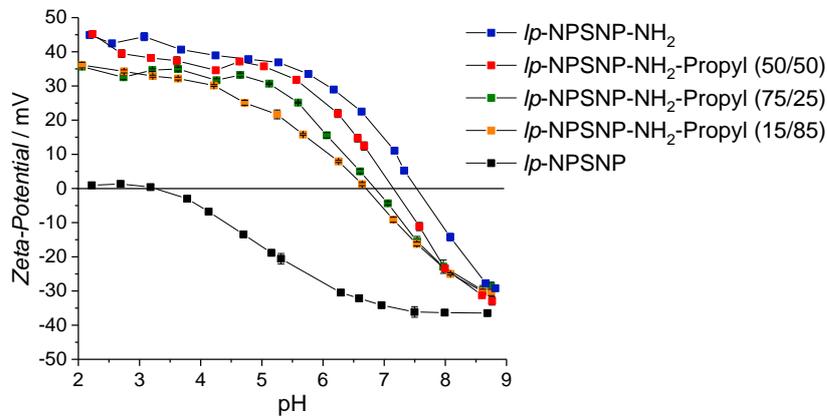


Abbildung 4.11: Zeta-Potential-Messungen für die unmodifizierten und modifizierten Nanopartikel in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Bei den Messungen des Zeta-Potentials in PBS (Tabelle 4.8) fallen auch für diese Nanopartikelsorte die gemessenen Werte positiver aus als in Wasser. Zum Beispiel liegt das Zeta-Potential der unmodifizierten Nanopartikel in Wasser bei ca. -32 mV, in PBS dagegen nur bei -15 mV. Gleiches war auch bei den modifizierten Nanopartikeln zu beobachten. Eine Erklärung liefert die Veränderung der Solvathülle um die Nanopartikel, die aus der Anwesenheit verschiedener Ionen in PBS resultiert.^[241,242] Im MES-Puffer bei pH 5 besitzen die modifizierten Nanopartikel ein positives Zeta-Potential (Tabelle 4.8). Dabei zeigt sich, je mehr Aminogruppen vorhanden sind, desto positiver ist das Zeta-Potential. Die positive Oberflächenladung bietet die Möglichkeit, über elektrostatische Wechselwirkungen entgegengesetzt geladene Nukleinsäuren zu immobilisieren. Wie bei den *sp*-NPSNPs liegen allerdings weder in PBS noch in MES stabile Dispersionen vor, da hierfür ein Zeta-Potential von ± 30 mV überschritten werden müsste.^[241,242]

Tabelle 4.8: Isoelektrische Punkte für die unmodifizierten und modifizierten Nanopartikel aus den pH-Wert-abhängigen Zeta-Potential-Messungen sowie bestimmte Zeta-Potentiale in PBS (pH 7.4) und MES (pH 5).

	IEP	Zeta-Potential in PBS / mV	Zeta-Potential in MES / mV
<i>lp</i> -NPSNP	-3.2	-15.1	-10.0
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂	7.6	2.8	22.8
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	7.1	-4.5	18.2
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	6.8	-7.9	16.7
<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	6.6	-8.4	10.3

Die Zytotoxizität hängt unter anderem von physikochemischen Eigenschaften wie Partikelgröße und -morphologie ab. Aus diesem Grund wurde die Zellverträglichkeit von den *lp*-NPSNPs sowie von einer der Modifizierungen (*lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50)) an dentalen Pulpastammzellen untersucht. Nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen für 24 Stunden inkubiert wurden, erfolgte nach zwei sowie nach sechs Tagen eine Bestimmung der Zellviabilitäten mithilfe des CellTiter-Blue®-Tests. In Abbildung 4.12 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Genau wie bei den *sp*-NPSNPs liegen die relativen Zellviabilitäten an beiden Tagen über 70 %, sodass sie als zytokompatibel eingestuft werden können.^[243] An Tag zwei weisen die Viabilitäten erhebliche Schwankungen auf, wohingegen sich die Zellviabilitäten an Tag sechs dem Niveau der Kontrolle angepasst haben. Dieser Befund kann erneut auf eine akute Beeinträchtigung der Viabilität hindeuten, die durch die Bedeckung der Zellen mit Nanopartikeln verursacht worden sein könnte.

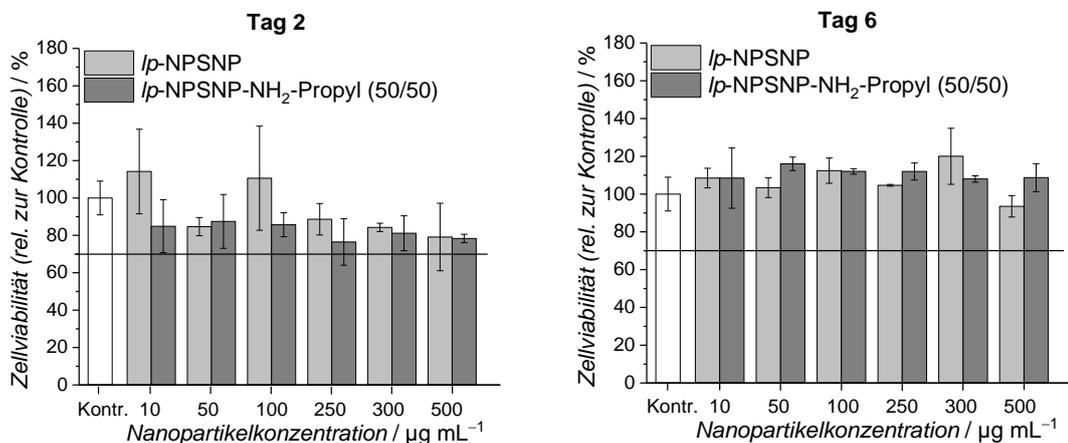


Abbildung 4.12: Mittels CTB-Test bestimmte relative Zellviabilitäten der dentalen Pulpastammzellen zwei (links) und sechs (rechts) Tage nach der Inkubation mit un- bzw. modifizierten Nanopartikeln (*lp*-NPSNP sowie *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl) in unterschiedlichen Konzentrationen. Zusätzliche Angabe der Viabilität der Kontrolle (Kontr.), bei der Zellen unter gleichen Bedingungen, aber ohne Silica-Nanopartikel kultiviert wurden.

4.1.3 Zusammenfassung

Es wurden erfolgreich zwei verschiedene Sorten Silica-Nanopartikel synthetisiert. Die *sp*-NPSNPs besitzen einen Partikeldurchmesser von ca. 45 nm und einen Porendurchmesser von ca. 3 nm. Im Vergleich dazu haben die *lp*-NPSNPs einen Durchmesser von ca. 80 nm und weisen Porengrößen von 3.5 nm und 7.5 nm auf.

Die hergestellten Nanopartikel wurden über ein *post-grafting* Verfahren mit Aminopropyl- sowie Propyltrialkoxysilanen in unterschiedlichen Verhältnissen modifiziert. Zur Bestätigung des Modifizierungsschritts wurden die Partikel umfassend über N₂-Physisorption, Thermogravimetrie sowie Elementaranalyse charakterisiert. Darüber hinaus konnten unterschiedliche Oberflächeneigenschaften mittels Zeta-Potential-Messungen nachgewiesen werden. Diese erlauben verschiedene Wechselwirkungen mit den Biomo-

lekülen, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird. Zuletzt konnte die Zytokompatibilität der NPSNPs und der NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierung jeder Sorte an dentalen Pulpastammzellen bestätigt werden. Ein Vergleich der einzelnen Modifizierungen der beiden Silica-Nanopartikelsorten zeigte geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Eigenschaften.

4.2 Entwicklung eines *Drug Delivery*-Systems für siRNA

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Freisetzungssystems für siRNA, wobei als Freisetzungsbasis die zuvor charakterisierten Silica-Nanopartikel funktionierten. Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Untersuchungen hinsichtlich der Immobilisierung von siRNA auf unterschiedlich modifizierte Silica-Nanopartikel und die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente vorgestellt, wobei auch auf die Degradation der Partikel während der Freisetzung eingegangen wird. Außerdem werden in diesem Abschnitt die Nanopartikel charakterisiert, die nach der Beladung mit siRNA mit einer Lipidhülle versehen wurden. Des Weiteren folgt eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen in Bezug auf Zytokompatibilität, Zellaufnahme und die Fähigkeit zur Herunterregulierung einer Genexpression. Im Hinblick auf eine Anwendung in der regenerativen Medizin werden die Ergebnisse zum Einfluss der Nanopartikel auf die Differenzierung von dentalen Pulpastammzellen präsentiert.

4.2.1 Immobilisierung von siRNAs auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln

Für die Immobilisierung fluoreszenzmarkierter siRNA auf den Silica-Nanopartikeln mit verschiedenen Oberflächenmodifizierungen wurden die jeweiligen Nanopartikel mit einer 50 µg mL⁻¹-siRNA-Lösung in MES-Puffer für 24 Stunden inkubiert. Die Immobilisierung sollte dabei durch elektrostatische Wechselwirkungen der bei pH 5 positiv geladenen Nanopartikel und der negativ geladenen siRNA erfolgen. Die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der modifizierten Partikel, die im vorangegangenen Abschnitt charakterisiert wurden, ermöglichten dabei ungleich starke Wechselwirkungen. Nach der Inkubation wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation vom überstehenden Medium getrennt. Von diesem Überstand wurde einerseits mittels Fluoreszenz und andererseits über die spezifische Absorption der siRNA (260 nm) mit einem Spektralphotometer (NanoDropTM) die siRNA-Konzentration quantifiziert und aus ihr indirekt die Beladung berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 für die jeweilige Partikelsorte dargestellt, wobei neben den bestimmten Konzentrationen auch die dazugehörigen Beladungseffizienzen angegeben sind.

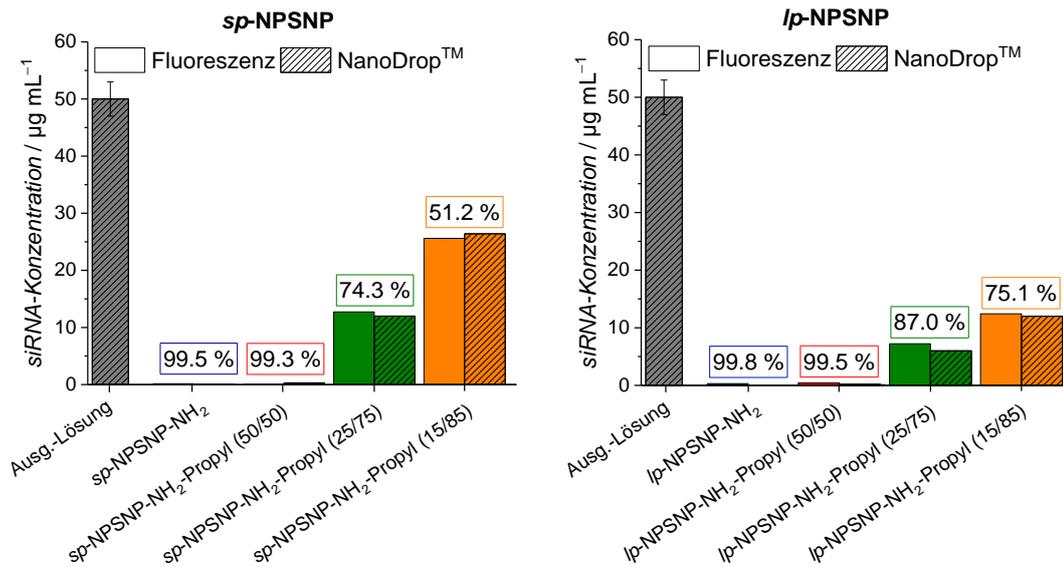


Abbildung 4.13: Darstellung der ermittelten siRNA-Konzentrationen in der Ausgangslösung (Ausg.-Lösung) und in den jeweiligen Inkubationsüberständen für die *sp*-NPSNPs (links) und die *lp*-NPSNPs (rechts) mit unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen. Zusätzlich die Angabe der Beladungseffizienzen als prozentualer Anteil.

Für beide Nanopartikelsorten zeigen sich in Abhängigkeit der Oberflächenmodifikation variierende Konzentrationen in den Überständen und damit auch unterschiedliche Beladungseffizienzen. Bei den *sp*-NPSNPs konnten für die NH_2 - sowie für die NH_2 -Propyl (50/50)-Modifikation mit beiden Quantifizierungsmethoden kaum siRNAs im Überstand detektiert werden. Unter der Annahme, dass sich die restliche siRNA auf der Nanopartikeloberfläche befand, wurde somit eine Beladung von ca. $55 \mu\text{g}$ siRNA pro Milligramm Nanopartikel erreicht, was einer Beladung über 99 % entspricht. Im Gegensatz dazu sinkt die immobilisierte siRNA-Menge mit abnehmendem APTES-Anteil bei der Modifizierung mit den zwei Silanen. Bei den Partikeln mit NH_2 -Propyl (25/75)-Modifizierung konnten nur ca. 74 % ($\approx 41 \mu\text{g mg}^{-1}$) und bei denen mit NH_2 -Propyl (15/85)-Modifizierung lediglich 51 % ($\approx 28 \mu\text{g mg}^{-1}$) der dargebotenen siRNA auf der Oberfläche immobilisiert werden.

Ein ähnlicher Trend lässt sich auch bei den Modifikationen der *lp*-NPSNPs feststellen. Bei Nanopartikeln mit NH_2 - sowie NH_2 -Propyl (50/50)-Modifikation konnte in den Überständen keine siRNA nachgewiesen werden, während die Beladungseffizienz der NH_2 -Propyl (25/75)-Partikel nur 87 % ($\approx 48 \mu\text{g mg}^{-1}$) bzw. die der NH_2 -Propyl (15/85)-Partikel nur 75 % ($\approx 41 \mu\text{g mg}^{-1}$) betrug.

Diese Ergebnisse der variierenden Beladungseffizienzen bei den Modifizierungen einer Sorte können mit den unterschiedlich starken elektrostatischen Wechselwirkungen der negativ geladenen siRNA mit den im MES-Puffer (pH 5) positiv geladenen Silica-Nanopartikeln erklärt werden. In Tabelle 4.9 sind dazu nochmals die bereits vorgestellten Zeta-Potentiale in MES-Puffer zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.9: Gegenüberstellung der gemessenen Zeta-Potentiale der NPSNPs mit unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen in MES-Puffer bei pH 5.

	<i>sp</i> -NPSNP Zeta-Potential / mV	<i>lp</i> -NPSNP Zeta-Potential / mV
NPSNP-NH ₂	27.1	22.8
NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50)	15.7	18.2
NPSNP-NH ₂ -Propyl (25/75)	13.0	16.7
NPSNP-NH ₂ -Propyl (15/85)	4.5	10.3

Es zeigt sich, je höher der Anteil der Aminogruppen bei der Oberflächenmodifizierung, desto positiver fällt das Zeta-Potential aus, und desto mehr siRNA adsorbierte auf der Oberfläche der Nanopartikel. Über diesen identifizierten Zusammenhang zwischen der Konzentration der protonierbaren Aminogruppen auf der Oberfläche von NPSNPs und immobilisierter siRNA berichteten auch Möller *et al.* Zusätzlich beschrieben sie, dass mit unmodifizierten NPSNPs sowie mit Cyano- oder Mercaptogruppen modifizierten NPSNPs, die ein negatives Oberflächenpotential besitzen, effektive siRNA-Immobilisierungen nicht möglich sind.^[72]

Der Unterschied zwischen den beiden Nanopartikelsorten könnte ebenfalls mit dem Oberflächenpotential begründet werden. Wie in Tabelle 4.9 ersichtlich, weisen die *lp*-NPSNPs bei gleicher Modifizierung meist ein leicht höheres Zeta-Potential auf. Dieses kann auf einen etwas höheren Anteil Aminogruppen bei der Oberflächenmodifizierung der *lp*-NPSNPs zurückgeführt werden, der für die NH₂-Propyl (50/50)-Modifikation über die C/N-Elementaranalyse detektiert wurde (Abschnitt 4.1). Neben dem Zeta-Potential kann aber auch die äußere Oberfläche, die durch die vorhandenen Poren geprägt ist, die Immobilisierung beeinflussen. Es ist möglich, dass die 7.5 nm-großen Poren der *lp*-NPSNPs eine vorteilhafte Positionierung der siRNA auf der Oberfläche bzw. in den Porenöffnungen begünstigen, sodass vergleichsweise mehr siRNA auf ihnen immobilisiert werden kann. In Abschnitt 4.2.4 wird dieser Aspekt im Hinblick auf die maximale siRNA-Beladungsmenge näher erläutert.

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss bedacht werden, dass es sich bei der Quantifizierung um Einzelmessungen handelt. Zwar wurden die Proben mit zwei verschiedenen Analysemethoden untersucht, jedoch wurde der Versuch als Einfachbestimmung durchgeführt, weswegen die Werte lediglich als grobe Einstufung dienen. Dennoch tragen die gewonnenen Erkenntnisse zusammen mit denen aus den folgenden Freisetzungsexperimenten dazu bei, die bestmögliche Modifizierung mit optimalen Beladungs- und Freisetzungseigenschaften für die *in vitro*-Experimente auszuwählen.

4.2.2 siRNA-Freisetzung von unterschiedlich modifizierten NPSNPs in PBS

Im Anschluss an die Immobilisierung folgten Experimente zur Freisetzung der siRNA von den Silica-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen in PBS (pH 7.4). Die über die Fluoreszenz quantifizierten siRNA-Mengen in den Freisetzungserständen sind als kumulative Auftragung für die *sp*-NPSNPs in Abbildung 4.14 und für die *lp*-NPSNPs in Abbildung 4.15 zu sehen. Zusätzlich ist jeweils auch der freigesetzte Anteil der ursprünglichen Immobilisierung in Prozent angegeben.

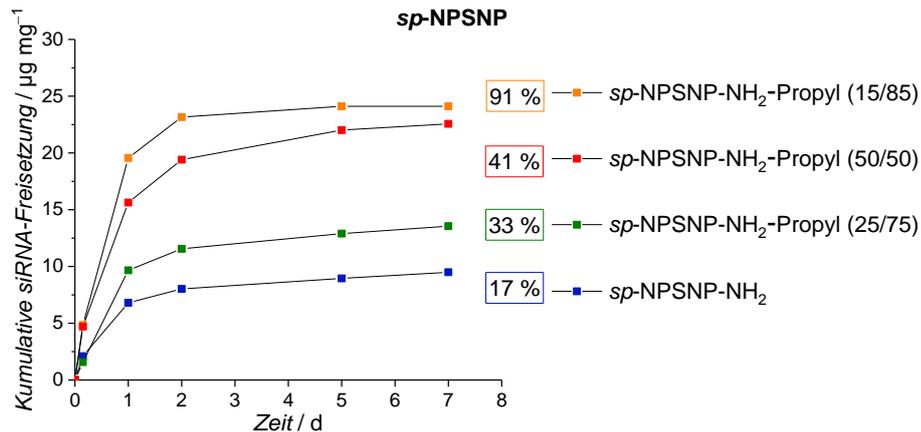


Abbildung 4.14: Kumulative siRNA-Freisetzung von unterschiedlich modifizierten *sp*-NPSNPs in PBS bei 37 °C. Zusätzliche Prozentangabe des freigesetzten Anteils bezogen auf die eingangs immobilisierte siRNA-Menge.

Für die unterschiedlichen Modifikationen der *sp*-NPSNPs zeigt sich als Freisetzungprofil jeweils ein *burst release*, bei dem in den ersten zwei Tagen nahezu die gesamte freigesetzte siRNA-Menge abgegeben wurde. Allein die absoluten Freisetzungsmengen der einzelnen Modifizierungstypen sind ungleich. Es lässt sich beobachten, dass tendenziell weniger siRNA von der ursprünglichen Beladung wieder abgegeben werden kann, je höher der Anteil der Aminogruppen ist. Beispielsweise wurden in dem beobachteten Freisetzungszeitraum von den *sp*-NPSNPs-NH₂ lediglich 17 % freigesetzt, während bei den *sp*-NPSNPs-NH₂-Propyl (15/85) der desorbierte Anteil 91 % betrug. Grundsätzlich ist die treibende Kraft für eine Freisetzung der siRNA-Konzentrationsgradient zwischen der Nanopartikeloberfläche und dem umgebenden Medium. Einen Einfluss haben aber unterschiedliche Faktoren wie z. B. die Wechselwirkungen der siRNA mit den funktionellen Gruppen der Nanopartikeloberfläche. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Aminogruppen und den Phosphatgruppen der siRNA entscheidend sind. Das Zeta-Potential der einzelnen Modifizierungen wird in PBS aufgrund der pH-Wert-Erhöhung deutlich negativer (vgl. Tabelle 4.4). Bei den Modifizierungen, bei denen neben APTES auch ein Propylsilan verwendet wurde, werden Werte zwischen -3 mV und -9 mV erreicht, was eine Freisetzung der negativen siRNA zu begünstigen scheint. Die Modifikation mit der höchsten Aminogruppendichte zeigt wiederum ein leicht positives Zeta-Potential in PBS (≈ 1 mV), welches die verhältnismäßig geringe Freigabe ins Medium verursachen könnte.

Ein ähnliches Verhalten beschrieben auch Möller *et al.* Sie synthetisierten zuerst über eine Co-Kondensationsreaktion 150 nm große Silica-Nanopartikel mit Porengrößen zwischen 3.9 und 4.9 nm sowie unterschiedlichen Amino- und Mercaptogruppenanteilen auf der Oberfläche. Anschließend untersuchten sie neben der Adsorption von siRNA in MES-Puffer (pH 5) auch die Freisetzung in PBS und zeigten, dass sich innerhalb der ersten zwei Tage ein *burst release* erzielen ließ, der umso höher ausfiel, desto weniger Aminogruppen bei der Oberflächenmodifizierung vorhanden waren.^[72]

Die einzige Ausnahme des beobachteten Trends bildet die (25/75)-Modifizierung. Mit 33 % siRNA-Freisetzung werden im Vergleich zu den anderen NH₂-Propyl-Modifikationen weniger Nukleinsäuren wieder abgegeben, obwohl der Anteil der Aminogruppen in der Oberflächenmodifizierung verhältnismäßig gering ist. Diese Abweichung könnte dadurch zustande gekommen sein, dass bei der experimentellen Durchführung des Mediumwechsels neben der Überstandlösung auch Nanopartikel mit abgenommen wurden. Von den verbliebenen Partikeln wurde folglich auch weniger freigesetzt.

Die Freisetzungsprofile der Modifikationen der *lp*-NPSNPs (Abbildung 4.15) entsprechen ebenfalls einem *burst release* mit variierenden absoluten Freisetzungsmengen. In Übereinstimmung mit den Versuchen mit den *sp*-NPSNPs bietet das Zeta-Potential eine Erklärung für die resultierenden Verläufe. Je geringer die Dichte der Aminogruppen, desto negativer wird das Zeta-Potential in PBS und desto mehr siRNA wird freigesetzt. Am wenigsten wird von den NH₂-modifizierten Nanopartikeln ins Medium abgegeben. Dies könnte daran liegen, dass diese Partikel im Gegensatz zu den anderen Modifikationen mit 2 mV ein positives Zeta-Potential in PBS besaßen. Im Vergleich zu den *sp*-NPSNPs fällt auf, dass der prozentuale Anteil freigesetzter siRNA bei den *lp*-NPSNPs höher ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass neben der Oberflächenladung auch die Porengeometrie einen Einfluss auf die Freisetzung der siRNA hat. Auf diese Thematik wird in Unterkapitel 4.2.4 näher eingegangen.

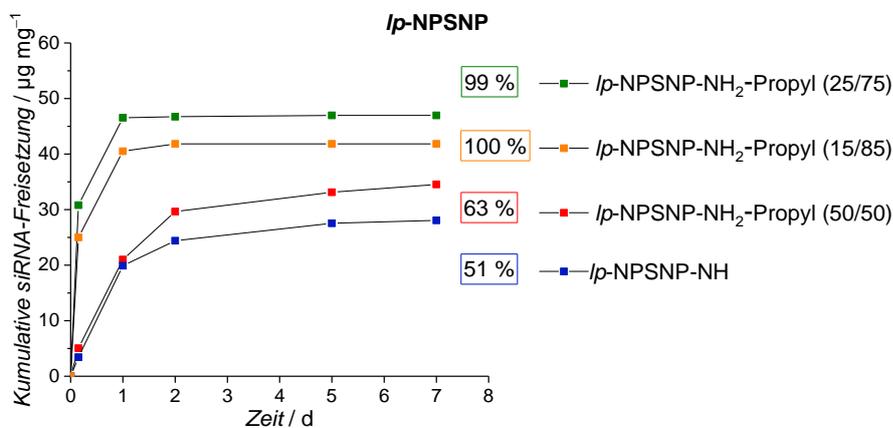


Abbildung 4.15: Kumulative siRNA-Freisetzung von unterschiedlich modifizierten *lp*-NPSNPs in PBS bei 37 °C. Zusätzliche Prozentangabe des freigesetzten Anteils bezogen auf die eingangs immobilisierte siRNA-Menge.

Zusammenfassend ist aus den Freisetzungsexperimenten festzuhalten, dass sich für alle getesteten Modifikationen der *sp*- und der *lp*-NPSNPs das Freisetzungsprofil eines *burst release* zeigt, wobei die absolut freigesetzten siRNA-Mengen variieren. Generell wird unter den gegebenen Bedingungen eine höhere Freisetzung erzielt, wenn der Anteil der Aminogruppen bei der Modifizierung der Oberfläche geringer war. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei der Quantifizierung um Einzelmessungen handelt. Nichtsdestotrotz verdeutlichen die Untersuchungen den Zusammenhang zwischen der Dichte der Aminogruppen und der siRNA-Menge, die immobilisiert und anschließend wieder freigegeben werden kann. Mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse wurden die NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierungen beider Nanopartikelsorten für die *in vitro*-Experimente ausgewählt. Auf ihnen konnte einerseits die offerierte siRNA-Menge vollständig immobilisiert werden, andererseits wurde in den anschließenden Freisetzungsversuchen deutlich mehr wieder abgegeben als es bei den NPSNP-NH₂ der Fall war, bei denen ebenfalls eine vollständige Immobilisierung möglich war.

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

Die Degradation von NPSNPs unter physiologischen Bedingungen ist ein intensiv erforschter Bereich, jedoch lassen sich aufgrund der Vielzahl von Parametern, die das Degradationsverhalten beeinflussen, keine allgemeinen Aussagen treffen (vgl. Abschnitt 2.2.1). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Degradationsverhalten der verwendeten Silica-Nanopartikel unter den gegebenen Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen untersucht. Da sich die NH₂-Propyl (50/50)-Modifikation in Bezug auf die siRNA-Immobilisierung und die anschließende Freisetzung als vielversprechend herausstellte und diese bei den *in vitro*-Untersuchungen zum Einsatz kam, wurde das Degradationsverhalten anhand dieser Modifizierung analysiert. Die Partikel wurden zur Simulation der Immobilisierung zuerst für 24 Stunden mit MES-Puffer (pH 5) behandelt und danach für sieben Tage in PBS (37 °C) gelagert. Analog zu den Freisetzungsexperimenten mit siRNA wurde nach 1, 2, 5 und 7 Tagen das überstehende Medium gewechselt. Die Charakterisierung der Partikel nach verschiedenen Lagerungsdauern erfolgte mithilfe von TEM-Aufnahmen (Abbildung 4.16). Mit ihnen konnte die Morphologie und das Porensystem beurteilt sowie der durchschnittliche Partikeldurchmesser bestimmt werden. Letzterer ist für die unterschiedlichen Zeitpunkte in Tabelle 4.10 zusammengestellt.

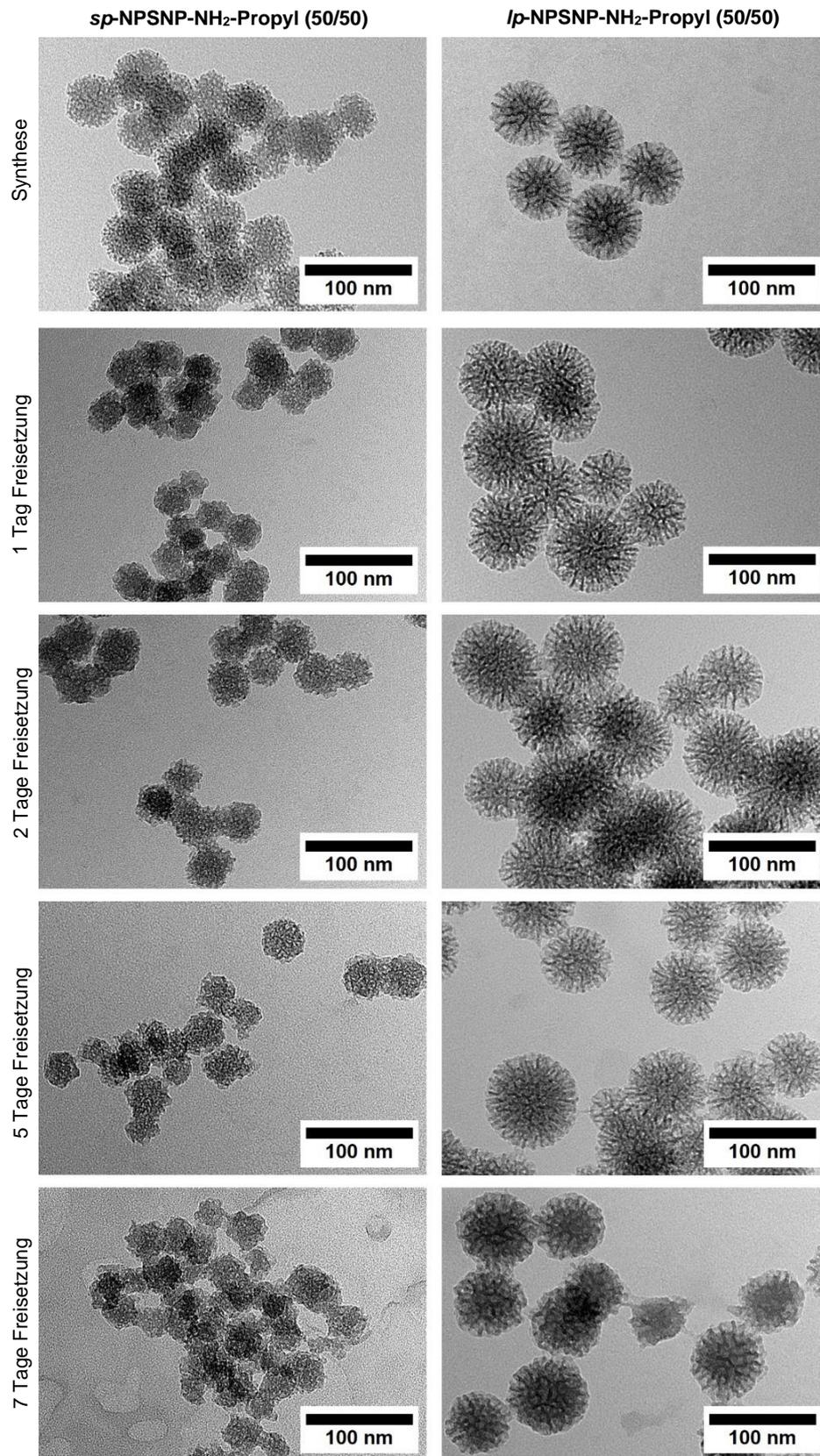


Abbildung 4.16: TEM-Aufnahmen der Nanopartikel nach der Synthese sowie nach einem simulierten Freisetzungszeitraum von 1, 2, 5 und 7 Tagen. Links: *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50); rechts: *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50).

Tabelle 4.10: Ermittelte Größe der modifizierten NPSNPs nach einer simulierten Freisetzung. Die Größe wurde anhand von TEM-Aufnahmen bestimmt, indem 20 Nanopartikel vermessen und daraus die Mittelwerte berechnet wurden.

	<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50) / nm	<i>lp</i> -NPSNP-NH ₂ -Propyl (50/50) / nm
Synthese	46 ± 3	80 ± 10
1 Tag	45 ± 6	79 ± 9
2 Tage	42 ± 5	77 ± 10
5 Tage	40 ± 6	76 ± 7
7 Tage	33 ± 4	73 ± 9

Im Vergleich zu frisch synthetisierten Partikeln zeigen sich für die *sp*-NPSNPs nach dem simulierten Immobilisierungsschritt im MES-Puffer und einer darauffolgenden eintägigen Lagerung unter Freisetzungsbedingungen nur geringe sichtbare Veränderungen hinsichtlich der Morphologie und des vorhandenen Porensystems. Es ist eine leichte Abnahme des Partikeldurchmessers um zwei Nanometer zu verzeichnen und die Porenstruktur wirkt diffuser. Nach zwei Tagen simulierter Freisetzung sind ebenfalls nur schwach ausgeprägte Unterschiede auszumachen, allerdings sinkt der Durchmesser der Partikel um weitere zwei Nanometer. Anders verhält es sich nach fünf Tagen unter einer simulierten Freisetzung. Zu diesem Zeitpunkt ist eine merklich veränderte Morphologie der Nanopartikel zu erkennen. Die gleichmäßige sphärische Struktur geht verloren und die Partikel werden zunehmend kleiner und unförmiger. Nach sieben Tagen ist die Veränderung noch markanter. Der Partikeldurchmesser ist von ursprünglich 46 nm auf ca. 33 nm gesunken. Zusätzlich ist das Porensystem nicht mehr deutlich erkennbar und es treten Verwachsungen der Partikel auf.

Ein ähnlicher Trend lässt sich auch bei den *lp*-NPSNPs beobachten. Auch bei dieser Partikelsorte ist bis zum zweiten Tag unter einer simulierten Freisetzung nur eine kleine Abnahme des Partikeldurchmessers zu verzeichnen. Nach fünf Tagen beginnt dagegen die sphärische Form in eine weniger definierte überzugehen. Wie bei den *sp*-NPSNPs ist die Veränderung nach sieben Tagen einer simulierten Freisetzung am auffälligsten. Die Partikel besitzen anstatt der anfänglichen 80 nm nur noch einen Durchmesser von ca. 73 nm. Außerdem wirkt das Porensystem diffuser und die Morphologie unstrukturierter, wobei die Degradation von außen nach innen stattzufinden scheint. Darüber hinaus sind Verschmelzungen zwischen einzelnen Partikel sichtbar.

Die Degradationsuntersuchungen anhand der TEM-Aufnahmen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Immobilisierungsbedingungen (24 Stunden in MES-Puffer (pH 5), 7 °C) und ein Tag Lagerung unter Freisetzungsbedingungen anscheinend nur geringfügige Auswirkungen auf die Morphologie und Porosität der Nanopartikel beider Sorten haben. Erst im Verlauf einer Woche kommt es zu merklichen Degradationserscheinungen. Die ermittelten Größenabnahmen, Verformungen und Verwachsungen der Partikel können dabei

auf eine Auflösung der Silica-Nanopartikel und eine Wiederabscheidung des gelösten Silicas zurückgeführt werden. Entsprechend einer Ostwald-Reifung, bei der die Auflösungsrate eines Materials von der Oberflächenkrümmung abhängig ist, lösen sich zunächst vorzugsweise kleinere Partikel, während sich gelöstes Material auf den größeren, weniger löslichen Partikeln oder an Kontaktpunkten wieder ablagert. Dies führt dazu, dass die spezifische Oberfläche und damit auch die Oberflächenenergie des Systems minimiert wird.^[244,245]

Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Behrens ausgemacht werden.^[221] Dagegen konnte eine vollständige Degradation der Nanopartikel innerhalb von wenigen Tagen, wie sie beispielsweise in einer Studie von Möller *et al.*^[45] gezeigt wurde, bei den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen nicht beobachtet werden. Begründet werden kann dies mit der Konzentration der Nanopartikel, die mit 0.9 mg mL^{-1} über der Löslichkeit poröser Silica-Nanopartikel in PBS liegt (0.120 mg mL^{-1}).^[47] Das Medium wurde im Verlauf des Freisetzungsexperiments fünfmal gewechselt, sodass sich max. 30 mg Silica-Material von den eingesetzten 45 mg hätten auflösen können. Inwieweit sich das Ausmaß der Degradation zwischen den beiden Nanopartikelsorten unterscheidet, kann mit den durchgeführten Untersuchungen nicht beurteilt werden. Für eine umfassendere Bestimmung des Degradationsverhaltens der Nanopartikel sollten deswegen neben TEM-Aufnahmen auch ICP-Messungen zur Ermittlung des Si-Gehaltes im Medium herangezogen werden. Zusätzlich könnte eine Aussage über die Veränderung des Porensystems mit Sorptionsmessungen gemacht werden. Des Weiteren böte es sich an, Bedingungen zu wählen, die einer *in vitro*-Anwendung näherkommen. Dazu wäre es sinnvoll, das Degradationsexperiment mit siRNA-beladenen NPSNPs in Zellkulturmedium und mit geringeren Partikelkonzentrationen durchzuführen, da sich Einflüsse wie die Anwesenheit von Proteinen sowie die Konzentration auf die Degradationskinetik auswirken (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Dennoch konnten die vorgestellten Degradationsuntersuchungen zeigen, dass die Nanopartikel über den Freisetzungszeitraum von sieben Tagen teilweise degradieren und daher die Freisetzung der siRNA begünstigen können.

4.2.4 Bestimmung der maximalen Beladung auf NPSNPs

Um eine Aussage über die maximale siRNA-Menge zu treffen, die auf beiden Silica-Nanopartikelsorten mit ausgewählten Modifizierungen immobilisiert werden kann, wurden $100 \mu\text{g}$ der NH_2 -Propyl (50/50)-modifizierten NPSNPs mit siRNA-Lösungen variierender Konzentration inkubiert (24 Stunden, 7°C). Nach dem Abtrennen der beladenen Partikel von der Inkubationslösung wurde die verbliebene siRNA im Überstand quantifiziert und somit indirekt auf die immobilisierte Menge geschlossen. Die Quantifizierung erfolgte wiederum über die Fluoreszenz der eingesetzten siRNA sowie über ihre spezifische Absorption am NanoDropTM. Die auf der Oberfläche adsorbierten siRNA-Mengen

sind für beide Nanopartikelsorten in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration in Abbildung 4.17 dargestellt.

Für die *sp*-NPSNPs zeigt sich, dass bis zu einer Konzentration von $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ nahezu die gesamte offerierte siRNA auf den Partikeln immobilisiert werden konnte. Bei Verwendung einer noch höheren Konzentration ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) wird nach Bildung des Mittelwertes aus beiden Analysemethoden wieder eine Beladung von ca. $140 \mu\text{g mg}^{-1}$ erreicht, was darauf hindeutet, dass dieser Wert der maximalen Beladung unter den gegebenen Bedingungen entspricht. Bei den *lp*-NPSNPs ist ein ähnlicher Trend zu beobachten. Bei einer Immobilisierungskonzentration von $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ wird eine Beladung von ca. $140 \mu\text{g mg}^{-1}$ erreicht, womit die maximale Beladungsmenge mit derjenigen der *sp*-NPSNPs übereinstimmt.

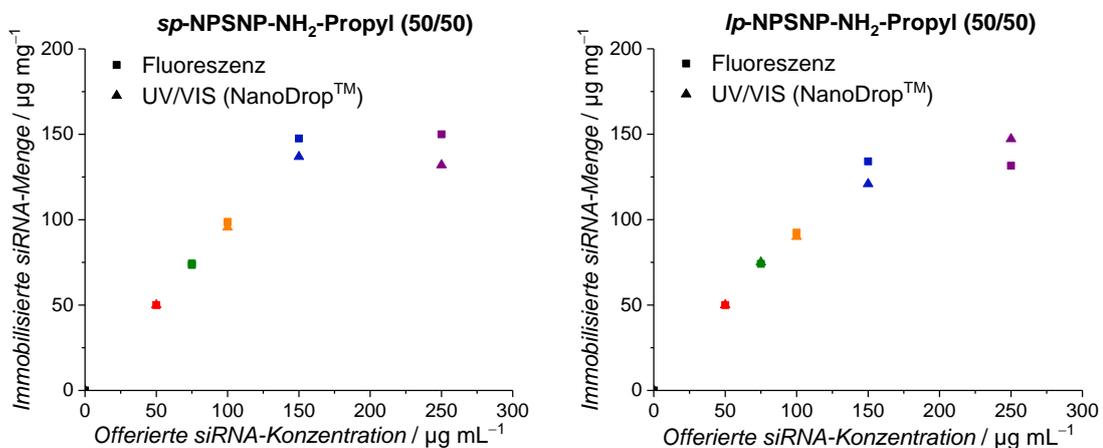


Abbildung 4.17: Immobilisierte siRNA-Mengen auf NPSNPs in Abhängigkeit unterschiedlicher Inkubationskonzentrationen. Links: *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50); rechts: *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50).

Zusätzlich zu den experimentell ermittelten maximalen Beladungsmengen wurde über theoretische Berechnungen die siRNA-Menge abgeschätzt, die auf der Oberfläche der beiden NPSNPs in einer Monoschicht adsorbieren kann. Dafür wurde angenommen, dass die Dichte der nanoporösen Silica-Nanopartikel 1 g cm^{-3} beträgt. Dieser Wert wurde aus dem Literaturwert für Stöber-Partikel (2 g cm^{-3})^[246] unter Berücksichtigung einer Porosität von 50 % abgeleitet. Überdies wurde der Wert der zweidimensionalen Ausdehnung eines siRNA-Moleküls ($2.0 \text{ nm} \times 7.5 \text{ nm}$) der Literatur entnommen.^[122] Die einzelnen Schritte der Rechnung fanden in Anlehnung an Berechnungen zur maximalen Immobilisation von Proteinen auf NPSNPs von N. Schmidt^[221] statt und sind im Anhang zu finden. Für die *sp*-NPSNPs resultiert daraus eine Immobilisierungsmenge von $193 \mu\text{g mg}^{-1}$ mit 443 siRNA-Molekülen pro Partikel. Im Gegensatz dazu ergibt sich für die fast doppelt so großen *lp*-NPSNPs eine maximale Beladung von $110 \mu\text{g mg}^{-1}$ bzw. 1 340 siRNAs pro Partikel.

Wird die zweidimensionale Ausdehnung der siRNAs auf 7.8 nm x 2.3 nm vergrößert, was durchaus der Fall sein kann, wenn die siRNAs teilweise von einer Hydrathülle umgeben sind und nicht exakt aneinander liegen, sinkt die Beladungsmenge entsprechend auf $161 \mu\text{g mg}^{-1}$ (*sp*-NPSNPs) und $93 \mu\text{g mg}^{-1}$ (*lp*-NPSNPs). Damit befindet sich die berechnete Immobilisierungsmenge für die *sp*-NPSNPs in guter Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten von ca. $140 \mu\text{g mg}^{-1}$. Dagegen konnte auf die *lp*-NPSNPs mit ebenfalls $140 \mu\text{g mg}^{-1}$ mehr siRNA auf der Oberfläche immobilisiert werden, als theoretisch möglich sein sollte. Eine Erklärung dafür könnte ihre Morphologie bieten. Die *lp*-NPSNPs weisen mit 7.5 nm relativ große Poren auf, in die sich die siRNAs einlagern können, sodass höhere Immobilisationsmengen erzielt werden (s. Abbildung 4.18). Bei den *sp*-NPSNPs liegt dagegen der Porendurchmesser mit 3 nm sehr nah am Durchmesser der siRNA, wodurch ein Eindiffundieren in die Poren erschwert ist.

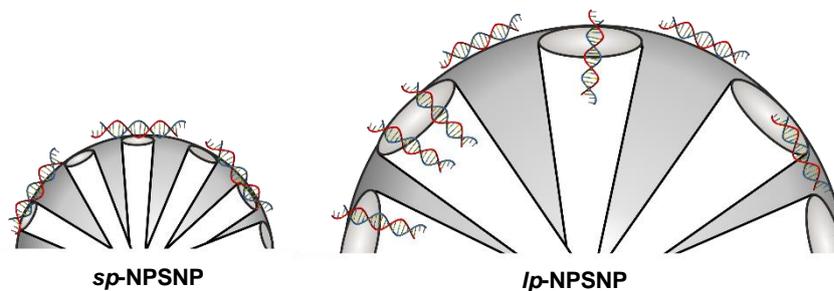


Abbildung 4.18: Schematische Darstellung der möglichen Positionierung der siRNAs auf der Oberfläche der verschiedenen Silica-Nanopartikel.

Im Anschluss an die Immobilisierung verschiedener siRNA-Mengen auf $100 \mu\text{g}$ NPSNPs erfolgten Freisetzungsexperimente in PBS bei 37°C . Für die *sp*-NPSNPs sind die freigesetzten siRNA-Mengen, bestimmt über die Fluoreszenz der eingesetzten siRNA, kumulativ in Abbildung 4.19 aufgetragen.

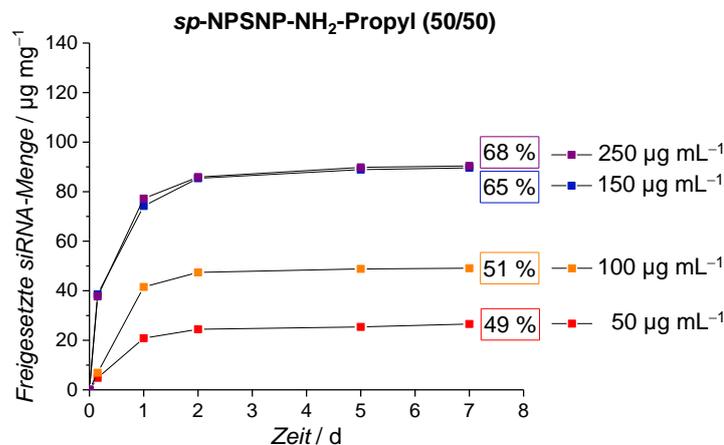


Abbildung 4.19: Kumulative siRNA-Freisetzung von *sp*-NPSNPs-NH₂-Propyl (50/50) mit unterschiedlichen Immobilisierungsmengen, die durch verschiedene Inkubationskonzentrationen erreicht wurden. Zusätzliche Prozentangabe des freigesetzten Anteils bezogen auf die eingangs immobilisierte siRNA-Menge.

In Abhängigkeit von der zuvor verwendeten Immobilisierungskonzentration zeigen sich unterschiedliche Freisetzungsmengen, die sich auf 50 % bis 70 % des immobilisierten Anteils belaufen. Das Freisetzungsprofil entspricht in allen Fällen, wie bei den Ergebnissen zur Freisetzung von verschiedenen modifizierten NPSNPs (vgl. Abschnitt 4.2.2), einem *burst release*.

Die Freisetzung der siRNAs von den *lp*-NPSNPs (Abbildung 4.20) ähnelt derjenigen der *sp*-NPSNPs, allerdings liegen hier die abgegebenen Anteile zwischen 70 % und 96 %.

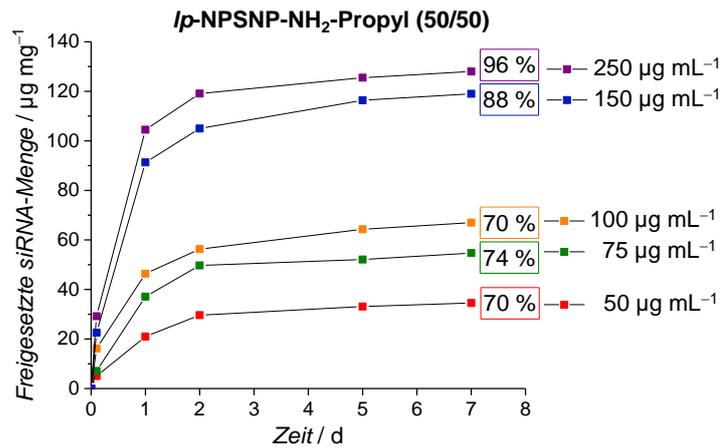


Abbildung 4.20: Kumulative siRNA-Freisetzung von *lp*-NPSNPs-NH₂-Propyl (50/50) mit unterschiedlichen Immobilisierungsmengen, die durch verschiedene Inkubationskonzentrationen erreicht wurden. Zusätzliche Prozentangabe des freigesetzten Anteils bezogen auf die eingangs immobilisierte siRNA-Menge.

In beiden Fällen kann als Triebkraft für die Freisetzung der Konzentrationsgradient genannt werden. Unterstützend wirkt zudem die Veränderung des Zeta-Potentials der modifizierten Partikel, die durch den Wechsel des Mediums von MES (pH 5.0) auf PBS (pH 7.4) bedingt wird. Bei den *sp*-NPSNPs sinkt infolgedessen das Zeta-Potential von ca. 16 mV auf -3 mV, während bei den *lp*-NPSNPs eine Erniedrigung des Potentials von ungefähr 18 mV auf -5 mV auftritt. Die resultierende negative Oberflächenladung kann dazu beitragen, dass durch elektrostatische Abstoßungen zwischen der Partikeloberfläche und den negativen Phosphatgruppen der Nukleinsäuremoleküle die siRNA besser freigesetzt wird. Zusätzlich kann die Degradation der Partikel (vgl. Abschnitt 4.2.3) die Abgabe begünstigen. Die Morphologie der *lp*-NPSNPs erscheint förderlicher als diejenige der *sp*-NPSNPs, was zeigt, dass die Morphologie in Kombination mit der Dichte der Aminogruppen Parameter sind, die für das Design effektiver Nanoträger für siRNA berücksichtigt werden müssen. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen auch Möller *et al.* In ihren Untersuchungen verglichen sie das Adsorptions- bzw. das Desorptionsverhalten von siRNA an Silica-Nanopartikeln mit ca. 4 nm- sowie mit 10 nm-großen Poren und berichteten über eine schlechtere Freisetzung von den großporigen Partikeln. Begründet wurde dieser Befund damit, dass die Porenmorphologie der Proben mit großen Poren eine hohe Aminogruppendichte erforderte, um eine wesentliche siRNA-Immobilisierung (auch im Inneren der Poren) zu erreichen. Dies begünstigt wiederum eine enge Bindung

der Moleküle und hemmt eine Freisetzung.^[72] Die in dieser Arbeit verwendeten *lp*-NPSNPs scheinen mit ihrer Porengeometrie bzw. -größe zusammen mit der verwendeten Oberflächenmodifizierung in Hinblick auf eine Freisetzung unter den gegebenen Bedingungen vorteilhaftere Eigenschaften zu besitzen.

Die Untersuchungen zur maximalen siRNA-Beladung an NH₂-Propyl (50/50)-modifizierten NPSNPs haben gezeigt, dass nach einer 24-stündigen Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen bis zu 140 µg mg⁻¹ immobilisiert werden können. Die anschließenden Freisetzungen in PBS zeigen einen *burst release* der siRNA, wobei sich die freigesetzten Mengen unterscheiden. Tendenziell ist die abgegebene Menge bei den *lp*-NPSNPs um ca. 20 % höher als bei den *sp*-NPSNPs. Die Untersuchungen verdeutlichen, dass neben der Oberflächenladung die Porenstruktur bzw. die äußere Oberfläche einen Einfluss auf die Immobilisierung und die Freisetzung der siRNAs haben.

4.2.5 Charakterisierung der siRNA-beladenen und Lipid-umhüllten NPSNPs

Zur Verhinderung einer vorzeitigen Freisetzung sowie zur Verbesserung der Zellaufnahme und des endosomalen *Escapes* wurden die mit siRNA beladenen Silica-Nanopartikel zusätzlich mit einer Hülle aus Lipiden versehen. Die Einkapselung erfolgte direkt nach der Beladung der Partikel über einen Lösungsmittelaustausch. Dabei wurde ausgenutzt, dass in ethanolischer Lösung gelöste Lipide als Monomere vorliegen, während sie sich zu Doppelschichten zusammenlagern, wenn der Wassergehalt der Lösung in Richtung 100 Volumenprozent verschoben wird.^[12,247] Nach diesem Prinzip wurden in dieser Arbeit die siRNA-beladenen NPSNPs mit Lipiden umhüllt. Für die Formulierungen wurde zum einen DOTAP und DOPE in äquimolaren Anteilen verwendet, zum anderen kamen DOTAP, DOPE und PEG2000 in einem 60/35/5-Verhältnis zum Einsatz. Die erstgenannte Formulierung wurde in Anlehnung an Versuche von Lechanteur *et al.* ausgewählt, die mit DOTAP/DOPE-Lipoplexen (ohne Kern aus NPSNPs) eine erfolgreiche siRNA-Transfektion und einen effektiven *Knockdown* erzielen konnten.^[9] Bei der zweiten Formulierung wurde zusätzlich PEG2000 verwendet. PEG-Ketten werden eingesetzt, um die Stabilität und die Zellverträglichkeit von Partikeln in physiologischen Flüssigkeiten zu erhöhen und somit die pharmakokinetischen Eigenschaften verschiedener Nanoträger zu verbessern (vgl. Abschnitt 2.2.2).^[248,249]

Zur Beurteilung der Morphologie der resultierenden funktionalisierten Nanopartikel wurden TEM- sowie REM-Aufnahmen herangezogen. Sie sind für die *sp*-NPSNPs in Abbildung 4.21 und für die *lp*-NPSNPs in Abbildung 4.22 dargestellt.

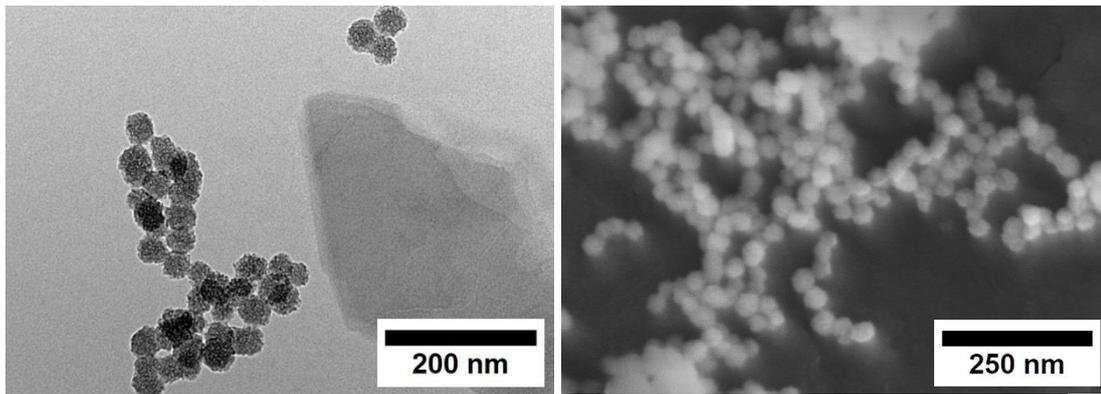


Abbildung 4.21: TEM-Aufnahme (links) und REM-Aufnahme (rechts) von *sp*-NPSNPs, die mit siRNA beladen und mit einer Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (50/50/0) umhüllt wurden.

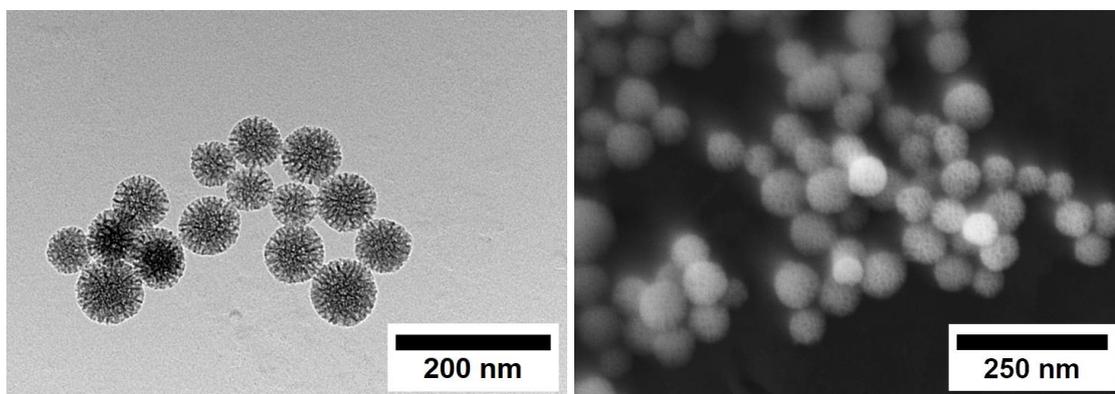


Abbildung 4.22: TEM-Aufnahme (links) und REM-Aufnahme (rechts) von *lp*-NPSNPs, die mit siRNA beladen und mit einer Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (50/50/0) umhüllt wurden.

Für beide Nanopartikelsorten sind nach der Beladungs- und Umhüllungsprozedur optisch kaum Unterschiede zur nicht-funktionalisierten Variante der jeweiligen NPSNPs auszumachen. Sie besitzen weiterhin eine sphärische Form und das Porensystem ist deutlich erkennbar. Zur Beurteilung der Größe wurde der Partikeldurchmesser von 20 Partikeln vermessen. Mit Werten von 44 ± 3 nm für die *sp*-NPSNPs und 80 ± 8 nm für die *lp*-NPSNPs stimmen die ermittelten Durchmesser mit denen un behandelter Partikel überein (vgl. Tabelle 4.10). Daraus kann gefolgert werden, dass die zwei Schritte der Beladung und der Umhüllung keinen gravierenden Einfluss auf die Morphologie der Nanopartikel haben. Die Lipidhülle ist über diese Analysemethoden nicht nachweisbar, da die organische Hülle durch den Elektronenstrahl im REM bzw. im TEM zerstört wird. Für ihre Visualisierung müsste die Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) herangezogen werden, die es ermöglicht, durch tiefe Arbeitstemperaturen die Strahlungsschäden an organischen Komponenten zu reduzieren.

Zur Bestätigung einer erfolgreichen Umhüllung und zur weiteren Charakterisierung wurden die Zeta-Potentiale der Partikel sowohl vor als auch nach der Immobilisierung sowie der Einkapselung mit Lipiden gemessen (Abbildung 4.23).

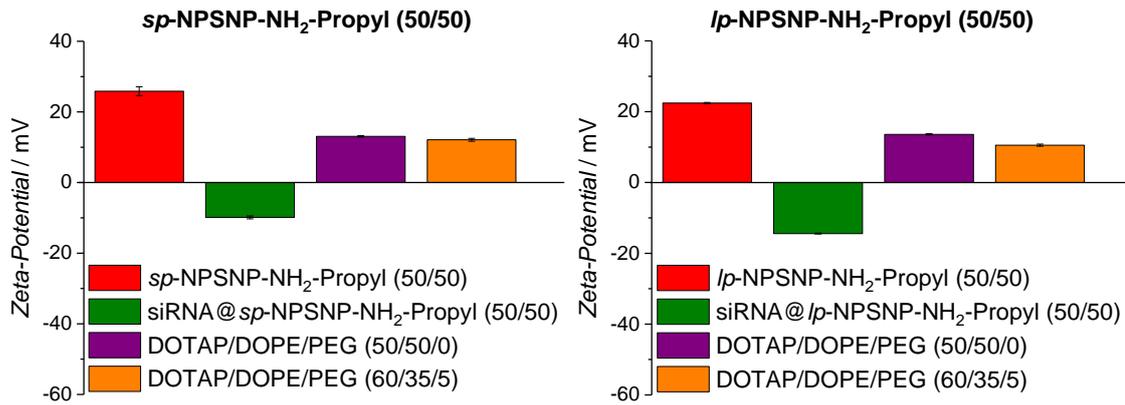


Abbildung 4.23: In Wasser gemessene Zeta-Potentiale vor und nach der Immobilisierung von siRNA sowie der Umhüllung mit Lipiden. Links: *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50); rechts: *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50).

Vor der Beladung mit siRNA besitzen die Nanopartikel mit NH₂-Propyl (50/50)-Modifikation beider Sorten ein positives Zeta-Potential, das durch die protonierten Aminogruppen im verwendeten MES-Puffer (pH 5) verursacht wird. Nach der Immobilisierung der siRNA und einem zweimaligen Waschen mit Wasser weisen die Nanopartikel ein negatives Zeta-Potential auf. Dieses kann auf den anionischen Charakter der Phosphatgruppen der auf der Oberfläche immobilisierten Nukleinsäuren zurückgeführt werden. Die darauffolgende Lipidumhüllung bewirkt einen erneuten Vorzeichenwechsel, da die (kationischen) Lipide die negative Ladung der siRNA kompensieren und schließlich das Zeta-Potential bestimmen. Zwischen den beiden untersuchten Lipidformulierungen können keine Unterschiede bei der resultierenden Oberflächenladung festgestellt werden und mit Werten um die 15 mV handelt es sich nicht um stabile Dispersionen. Dennoch tragen die Zeta-Potential-Messungen dazu bei, die Anwesenheit der Lipidhülle zu bestätigen. Neben den Zeta-Potentialen wurden die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel nach Durchführung eines jeden Schrittes bestimmt. Sie sind für die *sp*-NPSNPs als Basis links und für die *lp*-NPSNPs rechts in Abbildung 4.24 dargestellt.

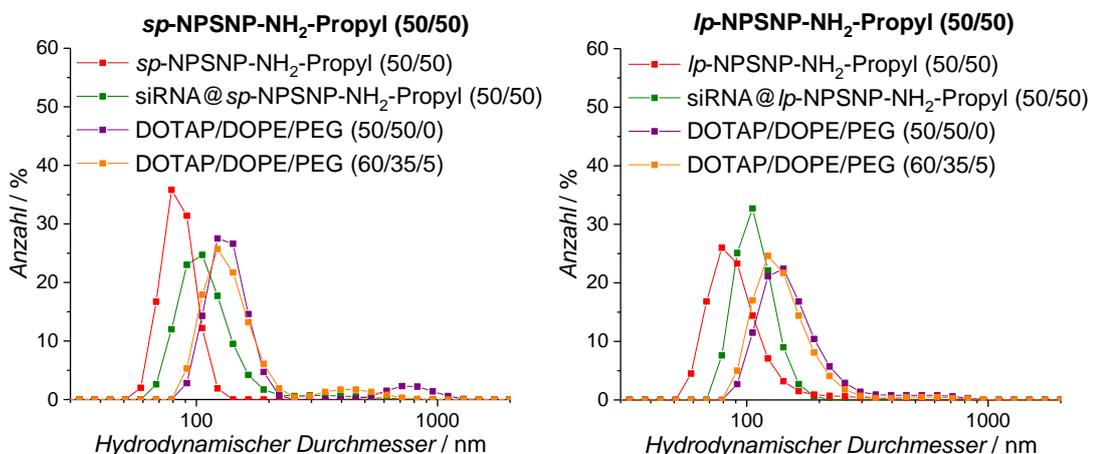


Abbildung 4.24: In Wasser gemessene hydrodynamische Durchmesser vor und nach der Immobilisierung von siRNAs sowie der Umhüllung mit Lipiden. Links: *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50); rechts: *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50).

Vor der Beladung der *sp*-NPSNPs liegt das Maximum der ermittelten hydrodynamischen Durchmesser bei ca. 80 nm. Dieser Wert steigt nach jedem Schritt, sodass nach der siRNA-Immobilisierung ein hydrodynamischer Durchmesser von 105 nm und schließlich mit der Lipidhülle einer von 125 nm erreicht wird. Zusätzlich zeigt sich bei den lipidumhüllten Partikeln ein weiteres, durchaus kleineres Maximum bei Durchmessern größer als 500 nm. Das zusätzliche Maximum könnte einerseits durch Agglomerate verursacht werden. Die vorangegangenen Zeta-Potential-Messungen würden diese These unterstützen, da die Dispersionen nicht ladungsstabilisiert sind. Andererseits ist es auch möglich, dass mehr als ein Partikel von einer Lipidhülle umgeben wurde, woraus ebenfalls größere hydrodynamische Durchmesser resultieren könnten. Für die *lp*-NPSNPs zeigt sich ein ähnlicher Trend, allerdings sind die gemessenen Werte zu größeren Durchmessern hin verschoben, da die Partikel von vornherein einen größeren Durchmesser besaßen. Die hydrodynamischen Durchmesser der umhüllten Partikel sind trotz unterschiedlicher Lipidformulierung annähernd gleich. Über ähnliche Befunde wurde auch von Durfee *et al.* berichtet, die für eine Hülle um Silica-Nanopartikel ebenfalls Lipide mit und ohne PEGylierung verwendeten.^[250] Die sich ändernden hydrodynamischen Durchmesser tragen dazu bei, das Vorhandensein einer Lipidhülle zu bekräftigen. Gleichermaßen konnten Katagiri *et al.* nach einer Lipidumhüllung von Silica-Nanopartikeln einen um 20 nm größeren hydrodynamischen Durchmesser verzeichnen, wobei die eigentliche Lipiddoppelschicht nur 10 nm umfasste.^[251] Weitere Publikationen berichten über Lipidschichtdicken um nanoporöse Silica-Nanopartikel zwischen 4 nm^[252] und 10–15 nm^[253]. Um die exakte Dicke der Lipidschicht der hergestellten Partikel zu bestimmen, sollten deswegen Kryo-EM-Aufnahmen angefertigt werden.

Insgesamt konnte mithilfe der durchgeführten REM- und TEM-Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die Morphologie nach der siRNA-Beladung und der Lipidumhüllung für beide Nanopartikelsorten kaum verändert. Die Zeta-Potential- sowie die DLS-Messungen vor und nach der Einkapselung bestätigen die Anwesenheit einer Lipidhülle um die Partikel, wobei keine Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften zwischen den zwei verwendeten Lipidformulierungen erkennbar sind. Darüber hinaus zeigen beide Nanopartikelsorten ein ähnliches Verhalten mit leicht variierenden Werten.

4.2.6 Zellaufnahmeuntersuchungen

Die Zellaufnahme der hier konzipierten siRNA-Freisetzungssysteme auf Basis von Silica-Nanopartikeln wurde in dieser Arbeit mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop (CLSM) analysiert. Dazu wurden HS5-GFP-Zellen auf 4-Kammer-Objektträgern kultiviert und für 24 Stunden mit den Nanopartikeln, die mit fluoreszierender siRNA beladen ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) und ggf. mit einer Lipidhülle versehen wurden, inkubiert. Nachdem die Zellen gewaschen, fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt waren, erfolgte die Evaluation der Zellaufnahme an einem CLSM. Auf der linken Seite in Abbildung 4.25

sind die CLSM-Aufnahmen für eine Transfektion von siRNAs mit *sp*-NPSNPs -NH₂-Propyl (50/50) ohne Lipidhülle dargestellt. Es ist zu erkennen, dass vereinzelt siRNA in den Zellen lokalisiert werden kann. Im Vergleich dazu sind in der Mitte und auf der rechten Seite der gleichen Abbildung Aufnahmen für eine Transfektion mit Nanopartikeln mit einer zusätzlichen Lipidhülle zu sehen. Hierbei kann deutlich mehr siRNA in den Zellen ausgemacht werden, wobei die Zellaufnahme mit einer Lipidformulierung aus äquimolaren Anteilen DOTAP und DOPE höher erscheint als bei einer aus DOTAP/DOPE/PEG2000. Der Unterschied der siRNA-Transfektionsraten ist besonders bei Betrachtung des roten und blauen Fluoreszenzkanals (Abbildung 4.25 untere Zeile) zu erkennen. Obwohl in allen Fällen die eingesetzte siRNA-Konzentration im Zellkulturmedium 75 nM betrug, können mit den Silica-Nanoträgern mit Lipidhülle deutlich gesteigerte Zellaufnahmen verzeichnet werden.

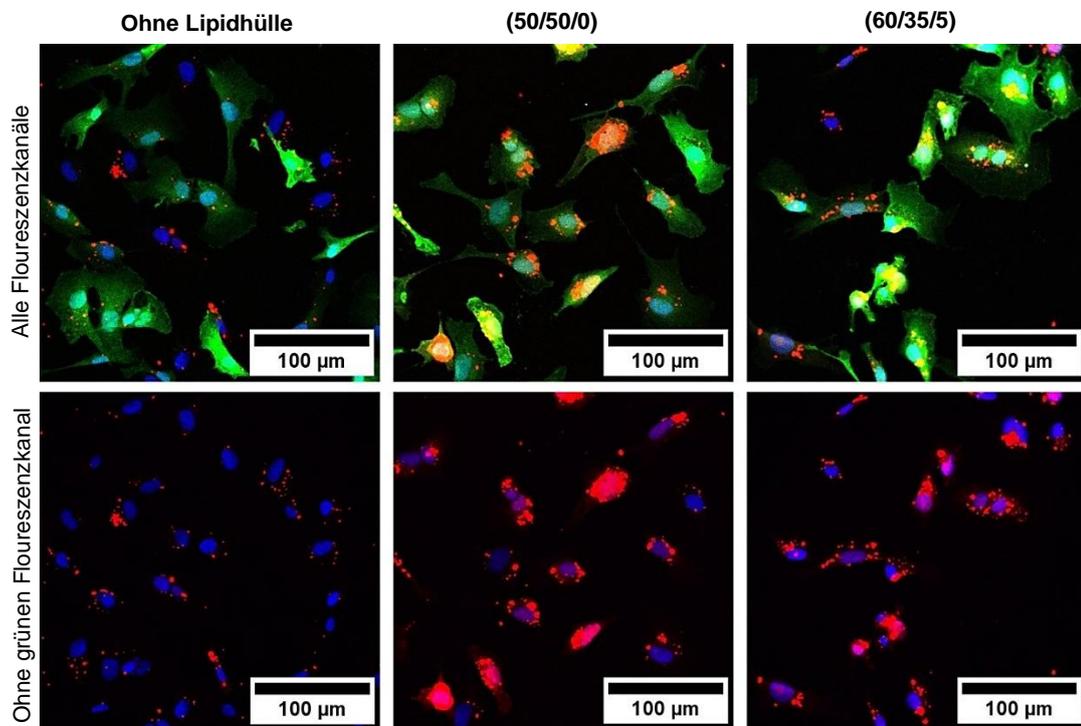


Abbildung 4.25: CLSM-Aufnahmen 24 Stunden nach der Transfektion fluoreszierender siRNAs (rot) mit *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) an HS5-GFP-Zellen (grün) mit DAPI-gefärbtem Zellkern (blau). Linke Spalte: Transfektion ohne Lipidhülle; mittlere Spalte: Transfektion mit Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (50/50/0); rechte Spalte: Transfektion mit Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (60/35/5).

Analog zu den Experimenten mit den modifizierten *sp*-NPSNPs wurde das Einschleusen der siRNAs mit den *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) an HS5-GFP-Zellen untersucht. Die betreffenden CLSM-Aufnahmen sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Auch hierbei können bei gleicher dargebotener siRNA-Konzentration bei Nanopartikeln mit Lipidumhülle erhöhte Mengen der fluoreszenten siRNAs in den Zellen ausgemacht werden. Außerdem scheint die Transfektion mit einer Lipidformulierung aus DOTAP und DOPE, wie bei

den *sp*-NPSNPs, höher zu sein als mit der Formulierung aus DOTAP, DOPE und PEG2000.

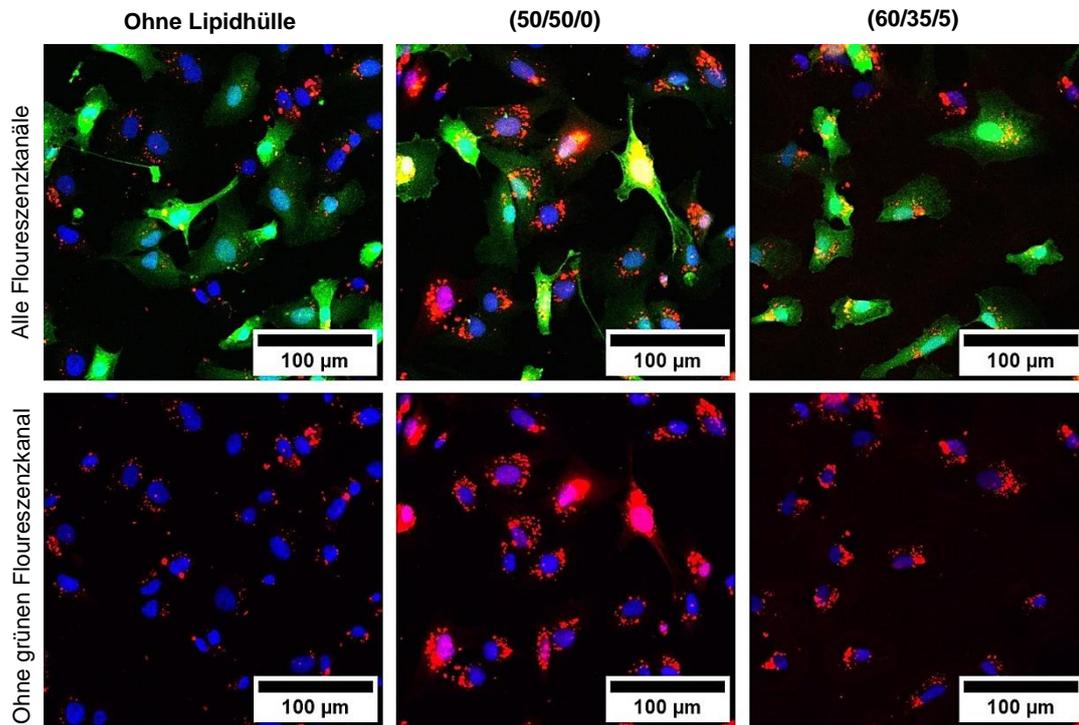


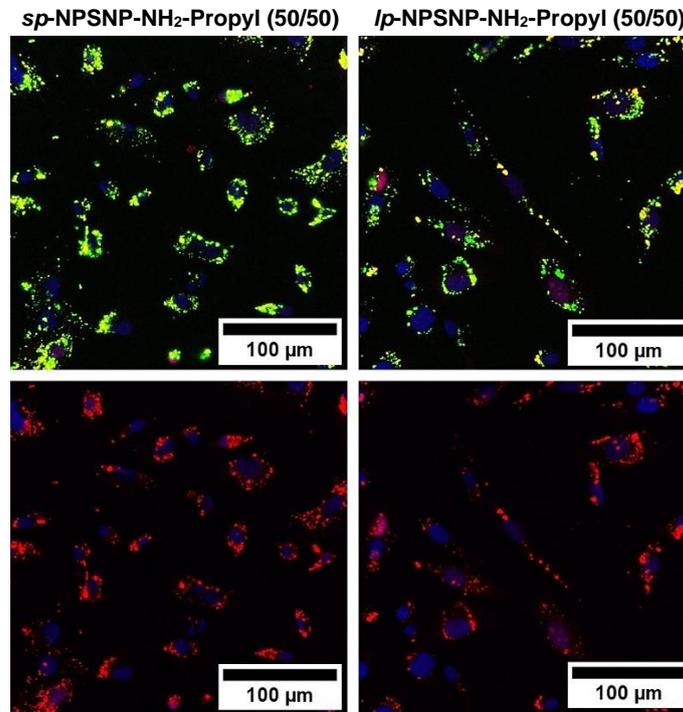
Abbildung 4.26: CLSM-Aufnahmen 24 Stunden nach der Transfektion fluoreszierender siRNA (rot) mit *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50) an HS5-GFP-Zellen (grün) mit DAPI-gefärbtem Zellkern (blau). Linke Spalte: Transfektion ohne Lipidhülle; mittlere Spalte: Transfektion mit Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (50/50/0); rechte Spalte: Transfektion mit Lipidhülle aus DOTAP/DOPE/PEG2000 (60/35/5).

Die vergleichsweise geringe Aufnahmeeffizienz der Partikel ohne Lipidhülle kann hauptsächlich auf die elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen und hydrophilen siRNA auf der Oberfläche der NPSNPs und der ebenfalls negativen aber hydrophoben Zellmembran zurückgeführt werden. Eine Umhüllung der beladenen Nanopartikel mit Lipiden fördert dagegen die zelluläre Aufnahme. Begründet werden kann dies über die inhärente Affinität der Lipide zur Zellmembran, da sie ähnliche Strukturen aufweisen. Zusätzlich kann auch die positive Ladung des kationischen Lipids DOTAP dafür sorgen, dass die negativ geladene Zelloberfläche leichter erreicht wird.^[254] Die geringeren Aufnahmemengen bei einer Formulierung mit PEG2000 im Vergleich zu derjenigen aus lediglich DOTAP/DOPE können mit dem sogenannten „PEG-Dilemma“ erklärt werden. PEG wird eingesetzt, um die Stabilität von Partikeln (besonders *in vivo*) zu erhöhen. Gleichzeitig führt die Einführung des hydrophilen Moleküls zu einer Abschirmung der Ladung der Partikel und sorgt für eine repulsiv wirkende Hydrathülle, welche die Wechselwirkungen mit der Zellmembran und damit auch die Partikelaufnahme verringern kann.^[250]

Um sowohl die fluoreszierende siRNA als auch die Silica-Nanopartikel innerhalb der Zelle zu lokalisieren, kamen siRNA-beladene FITC-funktionalisierte NPSNPs zuzüglich

einer Lipidhülle für eine Transfektion zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte analog zu den bereits vorgestellten Zellaufnahmeuntersuchungen, allerdings wurden HS-5-Zellen, die kein eGFP-Gen besaßen, anstelle der HS5-GFP-Zellen verwendet. In Abbildung 4.27 sind die dazugehörigen CLSM-Aufnahmen beider Silica-Nanopartikelsorten dargestellt.

A DOPE/DOTAP/PEG (50/50/0)



B DOPE/DOTAP/PEG (60/35/5)

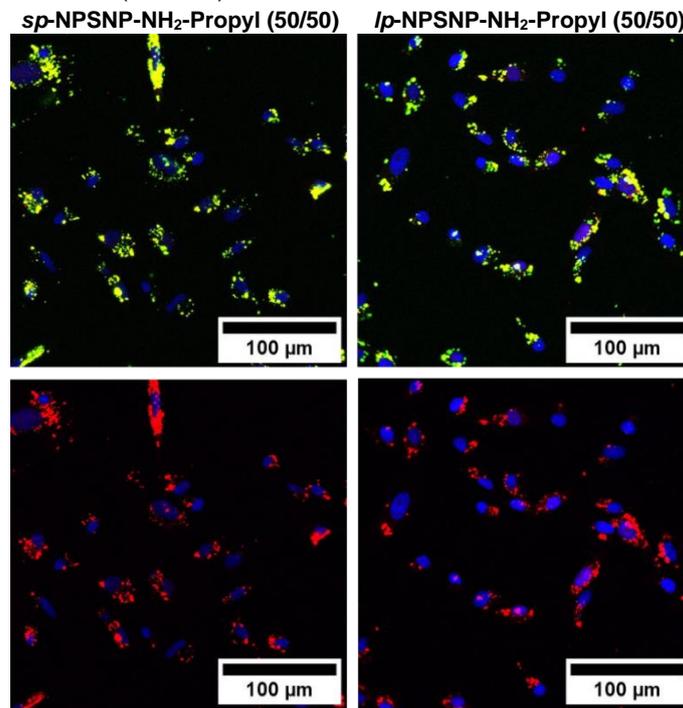


Abbildung 4.27: CLSM-Aufnahmen 24 Stunden nach der Transfektion fluoreszierender siRNA (rot) mit FITC-funktionalisierten Silica-Nanopartikeln (grün) und einer der beiden untersuchten Lipidhüllen an HS5-Zellen mit DAPI-gefärbtem Zellkern (blau).

Eine Gegenüberstellung der CLSM-Aufnahmen mit und ohne grünen Fluoreszenzkanal, der die Nanopartikel visualisiert, zeigt sowohl bei den *sp*-NPSNPs als auch bei den *lp*-NPSNPs für beide Lipidformulierungen eine Kollokalisierung der Nanopartikel mit der siRNA. Es ist anhand der Aufnahmen nicht eindeutig auszumachen, ob siRNA von den Nanopartikeln ins Zytoplasma abgegeben wurde. Dies kann einerseits bedeuten, dass kein endosomaler *Escape* stattgefunden hat und die Nanopartikel zusammen mit der siRNA in einem Endosom eingekapselt sind. Andererseits ist es möglich, dass lediglich geringe siRNA-Mengen ins Zytoplasma abgegeben wurden, diese aber aufgrund von Verdünnungseffekten nicht visualisiert werden konnten. Über Letzteres berichten unter anderem Möller *et al.*^[72]

Die zuvor deutlich bemerkbaren Unterschiede bei den Aufnahmeraten der beiden Lipidformulierungen sind bei diesen Experimenten nicht nachweisbar. Außerdem sind mit den durchgeführten Untersuchungen keine Unterschiede zwischen den beiden Silica-Nanopartikelsorten zu erkennen. Hierfür sind ausführlichere Analysen der Zellaufnahme nötig, für die weitere Färbungen sowie Quantifizierungsmethoden infrage kommen. Beispielsweise können zur Überprüfung, ob die Nanopartikel aus dem Endosom entkommen können, mithilfe von Lysotrackern saure Zellorganellen, wie späte Endosomen, angefärbt werden.^[255] Außerdem können fluoreszenzmarkierte Lipide eingesetzt werden, um deren Verbleiben zu lokalisieren. In diesem Zusammenhang berichteten Liu *et al.* über ein partielles Ablösen der Lipide von dem Kern aus Silica-Nanopartikeln, das nach der Endozytose entweder durch Lipidaustausch oder Membranfusion verursacht wurde.^[256] Zeitaufgelöste CLSM-Aufnahmen könnten ebenfalls herangezogen werden, um die Lokalisation der einzelnen Komponenten zu verfolgen. Unter anderem transfizierten Mora-Raimundo *et al.* fluoreszente siRNA mit PEI-beschichteten und Rhodamin-markierten Silica-Nanopartikeln in Fibroblasten und konnten nach 48 h über CLSM-Aufnahmen eine visuelle Freisetzung der siRNA von den Silica-Nanopartikeln beobachten.^[159] Zum Quantifizieren der Zellaufnahmerate der FITC-Nanopartikel bietet sich die Durchflusszytometrie an. Neben einem Vergleich der aufgenommenen Mengen kann damit zusätzlich der prozentuale Anteil transfizierter Zellen ausgemacht werden.^[84,159] Eine weitere Möglichkeit besteht im Auflösen der von den Zellen aufgenommenen Silica-Nanopartikel mit Flusssäure (HF) und eine Bestimmung des Gehaltes mittels ICP.^[94]

Als Kontrolle wurde in dieser Arbeit Lipofectamine® als kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz verwendet. Die Visualisierung der damit transfizierten Zellen ist im Anhang (Abbildung 7.11) zu finden.

Alles in allem bieten die Untersuchungen zur Zellaufnahme erste vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer Anwendung der designten Freisetzungssysteme als Transfektionsvehikel für siRNA. Es konnte gezeigt werden, dass beide NPSNP-Sorten in der Lage waren, fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren in HS-5-GFP-Zellen zu schleusen. Dabei war eine Erhöhung der Zellaufnahme beladener Nanopartikel mit Lipidhülle im Vergleich zu

jenen ohne zu verzeichnen. Mithilfe von FITC-markierten Nanopartikeln konnte 24 Stunden nach der Transfektion eine Kolokalisation mit fluoreszenter siRNA identifiziert werden.

4.2.7 Zytokompatibilitätsuntersuchungen an HS-5-GFP-Zellen

Für die Anwendung eines *Drug Delivery*-Systems im biomedizinischen Bereich ist die Zytokompatibilität des verwendeten Materials essentiell. Aus diesem Grund wurden die Zytokompatibilitäten der designten siRNA-Freisetzungssysteme an HS-5-GFP-Zellen, an denen auch die *Knockdown*-Untersuchungen stattfanden, mittels eines MTT-Tests beurteilt. Zum Einsatz kam dabei anstelle der bisher verwendeten fluoreszenten siRNA einerseits Kontroll-siRNA (siNEG), die laut Hersteller keine signifikanten Auswirkungen auf die Proliferation, Lebensfähigkeit oder Morphologie der Zellen haben sollte, und andererseits siRNA gegen eGFP (siGFP). Ein Test beider siRNAs ist nötig, da sie sequenzabhängige toxische Effekte hervorrufen können.^[257] Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transfektion wurde in dieser Arbeit das kommerziell erhältliche Lipofectamine®-2000 verwendet und zunächst wurde die Zellviabilität in Gegenwart dieses Transfektionsreagenzes untersucht. Dabei kamen die als Standard gesetzte siRNA-Konzentration von 25 nM sowie die doppelte Menge zum Einsatz. Nach einer 24-stündigen Inkubation der HS-5-Zellen mit den siNEG- bzw. siGFP-Lipofectamine®-Komplexen erfolgte ein Medienwechsel. Der MTT-Test wurde dann entweder zwei oder sechs Tage nach dem Start der Inkubation durchgeführt. Die ermittelten Zellviabilitäten sind relativ zu denen von Kontrollzellen, die nur mit Medium kultiviert wurden, in Abbildung 4.28 dargestellt.

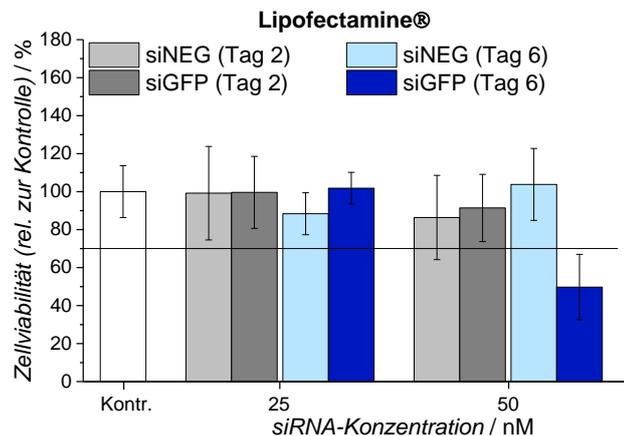


Abbildung 4.28: Mittels MTT-Test bestimmte relative Viabilitäten von HS-5-GFP-Zellen nach der Transfektion von siNEG bzw. siGFP mit Lipofectamine® zwei und sechs Tage nach dem Start der Inkubation.

Für eine siRNA-Konzentration von 25 nM liegen die Viabilitäten der HS-5-GFP-Zellen für die zwei siRNA-Typen nach zwei und nach sechs Tagen zwischen 90 % und 100 %, sodass das Transfektionsreagenz als zytokompatibel eingestuft werden kann. Eine Verdopplung der dargebotenen Menge auf 50 nM zeigt bei der Transfektion von siNEG nur eine geringfügige Beeinflussung der Viabilität zu den untersuchten Zeitpunkten. Für

siGFP liegt die Zellviabilität nach zwei Tagen noch bei ca. 90 %, sie sinkt sechs Tage nach der Transfektion aber auf ca. 50 %. Die Beobachtung lässt vermuten, dass siGFP einen toxischen Effekt auf die Zellen hat, der nach einigen Tagen in Kultur bemerkbar wird. Weil bei dem Einsatz von 50 nM siNEG die Viabilitäten der Zellen ähnlich zur Kontrolle bleiben, ist wahrscheinlich Lipofectamine® in der doppelten Konzentration nicht ausschlaggebend für die Verringerung der Lebensfähigkeit.

Um diese zeitverzögerte Wirkung zu berücksichtigen, erfolgte die Evaluation der Viabilitäten der HS-5-GFP-Zellen nach einer Inkubation mit den designten Freisetzungssystemen auf Basis von Silica-Nanopartikeln nach sechs Tagen. Für den MTT-Test wurden Nanopartikel beider Sorten zunächst mit den jeweiligen siRNAs ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) beladen und mit einer der zwei Lipidformulierungen umhüllt. Danach erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Anschließend wurde das überstehende Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere fünf Tage kultiviert, bevor der MTT-Test durchgeführt wurde. Für *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl sind die ermittelten Zellviabilitäten relativ zu unbehandelten Kontrollzellen in Abbildung 4.29 dargestellt.

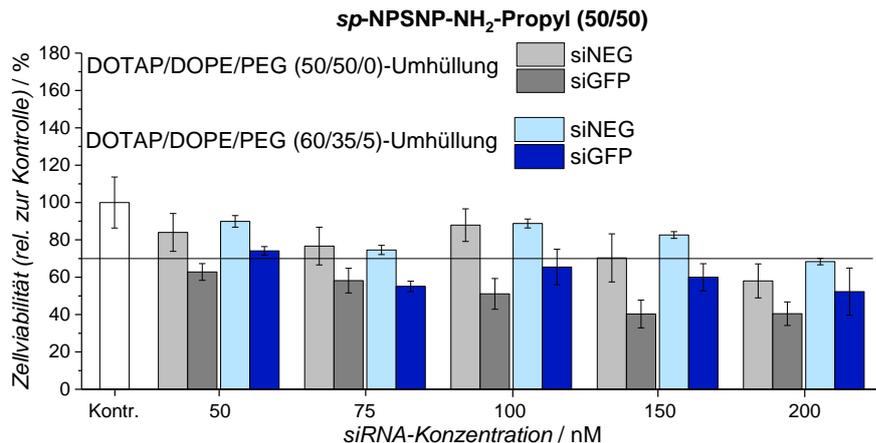


Abbildung 4.29: Mittels MTT-Test bestimmte relative Viabilitäten von HS-5-GFP-Zellen sechs Tage nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen *sp*-NPSNPs-NH₂-Propyl (50/50), die mit siNEG bzw. siGFP ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) beladen und mit einer der beiden erprobten Lipidformulierungen umhüllt wurden.

Aus der Datenauftragung werden einige Trends ersichtlich. Zunächst fällt auf, dass sich die Zellviabilitäten zwischen dem Einsatz von siNEG und siGFP bei identischer Lipidformulierung und Konzentration unterscheiden. Dabei zeigen die Nanopartikel, die mit siGFP beladen waren, tendenziell eine geringere Viabilität als solche, bei denen eine Immobilisierung mit siNEG stattgefunden hat. Bei gleicher dargebotener siRNA-Konzentration zeichnet sich ab, dass bei einer Beladung mit siGFP höhere Zellviabilitäten resultieren, wenn die Lipidformulierung PEG enthält. Für die siNEG gilt dies erst ab einer Konzentration von 150 nM, vorher liegen die Viabilitäten für beide Lipidformulierungen

ungefähr auf dem gleichen Niveau. Zudem fallen mit steigenden eingesetzten Konzentrationen die Viabilitäten geringer aus. Am zellverträglichsten erscheinen siRNA-Konzentrationen von 50 nM. Dabei besitzen die Zellen für beide Lipidformulierungen bei Verwendung der Kontroll-siRNA Viabilitäten zwischen 84 % und 90 %. Wird dagegen siGFP eingesetzt, liegen die Viabilitäten bei 62 % mit DOTAP/DOPE und bei 74 %, wenn zusätzlich PEG2000 verarbeitet wurde. Mit der Annahme, dass es bei der Herstellungs- und Waschprozedur der Nanoträger weder zu Verlusten bei der siRNA noch bei den Silica-Nanopartikeln kam, entspricht die dargebotene Menge Silica-Nanopartikel bei 100 μL -Gesamtvolumen 0.89 μg (8.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Für die siRNAs ergibt sich unter den Voraussetzungen ein Wert von 67 ng (0.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. 50 nM). Die Mengen der anderen Ansätze sind entsprechend höher.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die eingesetzten siRNAs unterschiedliche Zytotoxizitäten ausweisen, wobei verschiedene *Off-Target*-Effekte (vgl. Abschnitt 2.4.3) als Begründung möglich sind. Die Unterschiede in der Viabilität liefern aber auch erste Hinweise für eine Freisetzung der siRNA ins Zytoplasma, was im Hinblick auf einen *Knockdown* von Bedeutung ist. Neben der siRNA können auch die eingesetzten Lipide zu den beobachteten zytotoxischen Effekten beitragen. Dies ist der molekularen Struktur der Lipide zuzuschreiben, die derjenigen eines Detergenzes ähnelt. In hohen Konzentrationen kann die Anwesenheit (besonders von kationischen Lipiden) die Membranintegrität beeinträchtigen, was zur Zelllyse führt. Bei subletalen Konzentrationen können die Lipide wiederum eine Reizung der Zellen induzieren, die sich in einer Zellschrumpfung, einer Vakuolisierung des Zytoplasmas oder einer verringerten Zellteilungsrate äußert.^[258] Zusätzlich neigen kationische Lipide dazu, über ihre positiven Kopfgruppen Wechselwirkungen mit zellulären Enzymen einzugehen und somit deren Funktion zu stören.^[259] Der Befund, dass die Partikel mit einem PEGylierten Lipid vergleichsweise höhere Zellviabilitäten aufweisen, steht im Einklang mit der verminderten Zellaufnahme, die in den vorangegangenen Zellaufnahmeuntersuchungen bemerkt wurde. Zudem wird der endosomale *Escape* von den PEG-Gruppen beeinflusst (ausführlichere Erklärungen dazu finden sich in Abschnitt 4.2.8). Aus einer verminderten Anwesenheit von toxisch wirkender siGFP im Zytoplasma würden demnach höhere Viabilitäten resultieren. Da bei der Verwendung von siNEG bis zu einer Konzentration von 150 nM die Viabilitäten der Zellen über 70 % liegen, können die beladenen und lipidumhüllten Nanopartikel unter diesen Bedingungen generell als zytokompatibel eingestuft werden.

Analog zu den Experimenten mit den *sp*-NPSNPs wurden MTT-Tests nach einer Inkubation mit siRNA-Nanoträgern auf Basis der *lp*-NPSNPs durchgeführt (Abbildung 4.30). Die ermittelte Lebensfähigkeit der Zellen unterscheidet sich deutlich von den vorherigen Experimenten. Bis zu einer Konzentration von 100 nM besaßen die Zellen Viabilitäten zwischen 95 % und 130 %, unabhängig von der verwendeten siRNA und der Lipidumhüllung. Erst ab einer Konzentration von 150 nM lässt sich der zuvor beschriebene Trend

erkennen, dass eine Lipidformulierung mit PEG die Viabilität im Vergleich zu einer DOTAP/DOPE-Formulierung verbessert. Zudem zeigt sich bei höheren Konzentrationen, dass eine Transfektion von siGFP einen deutlicheren toxischen Effekt hervorruft. Dies lässt vermuten, dass ein Teil der siRNA ins Zytoplasma abgegeben wurde. Dazu kommt, dass von den Lipiden in höheren Konzentrationen eine gewisse Toxizität ausgehen kann.

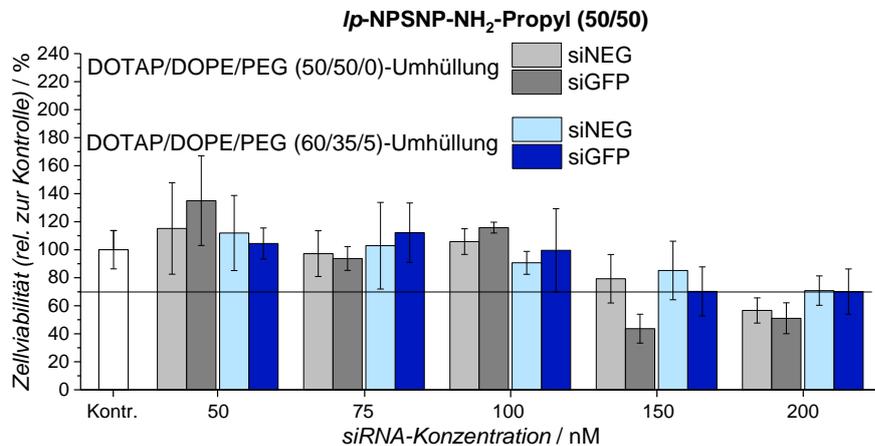


Abbildung 4.30: Mittels MTT-Test bestimmte relative Viabilitäten von HS-5-GFP-Zellen sechs Tage nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50), die mit siNEG bzw. siGFP (75 µg mg⁻¹) beladen und einer der beiden erprobten Lipidformulierungen umhüllt wurden.

Nichtsdestotrotz scheinen die größeren Nanopartikel (besonders bei geringeren Konzentrationen) bei gleicher Beladung und Umhüllung im Vergleich zu den *sp*-NPSNPs weniger zelltoxisch zu sein. Eine mögliche Erklärung könnten unterschiedliche Zellaufnahmeraten sein. Nanopartikel mit einem Durchmesser von 50 nm werden effektiver von Zellen aufgenommen als deutlich größere (siehe Abschnitt 2.3.2). In der Literatur wird zudem über eine höhere Zytotoxizität kleiner Silica-Nanopartikel berichtet.^[260] Nicht zuletzt sollten auch andere Einflussfaktoren wie variierende Lipidzusammensetzungen aufgrund der Partikelgröße nicht vernachlässigt werden. Da diese Unterschiede mit den durchgeführten Charakterisierungsmethoden jedoch nicht ausgemacht werden konnten, bedarf es weiterer Untersuchungen für die Aufklärung der Ursache der Toxizität, die insbesondere bei höheren Konzentrationen zu beobachten war.

Um den Einfluss der Lipidhülle auf die Zytotoxizität zu untersuchen, wurden als Vergleich siRNA-beladene NPSNPs ohne Lipidhülle in unterschiedlichen Konzentrationen für die Transfektion von siNEG bzw. siGFP verwendet. Analog zu den bereits vorgestellten Experimenten wurden die HS5-GFP-Zellen sechs Tage nach dem Start der Inkubation einem MTT-Test unterzogen (Abbildung 4.31). Die ermittelten relativen Viabilitäten liegen für beide Nanopartikelsorten unabhängig von der eingesetzten siRNA-Sorte und der Konzentration bei 70–95 %. Diese vergleichsweise hohen Zellviabilitäten lassen vermuten, dass die Lipide ihren Teil zur Zytotoxizität beitragen. Mit den Ergebnissen ist allerdings nicht erklärbar, ob letztendlich die Lipide, die siGFP oder ihre Kombinationen für

die vorangegangene Zytotoxizität der Nanoträger verantwortlich sind. Ohne Lipidumhüllung war anhand der CLSM-Aufnahmen eine verminderte Zellaufnahme (vgl. Abschnitt 4.2.7) zu verzeichnen, woraus weniger siGFP in der Zelle resultiert. Außerdem ist fraglich, ob von den wenigen aufgenommenen Partikeln zytotoxisch wirkende siGFP über einen endosomal *Escape* ins Zytoplasma abgegeben werden kann. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Abschnitt bei der Behandlung des *Knockdowns* näher eingegangen.

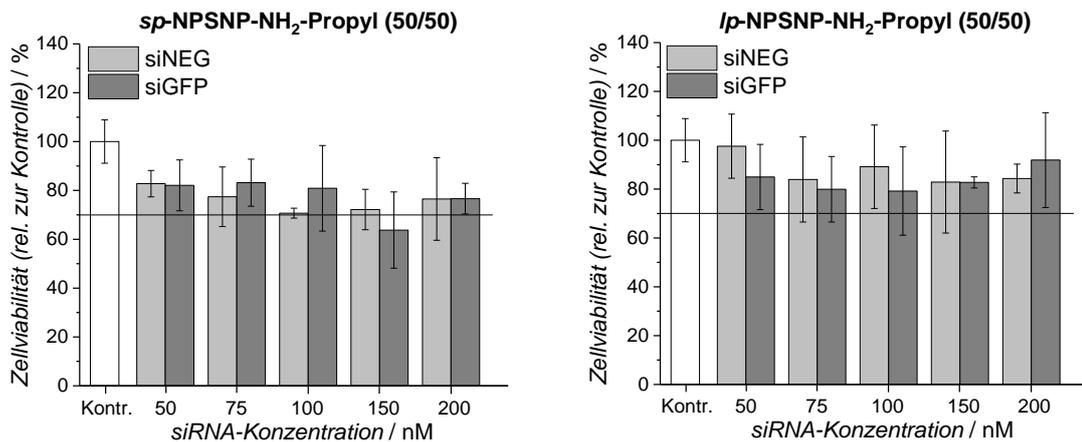


Abbildung 4.31: Mittels MTT-Test bestimmte relative Viabilitäten von HS-5-GFP-Zellen sechs Tage nach der Inkubation mit siRNA-beladenen NPSNPs ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) ohne Lipidumhüllung.

Insgesamt lassen sich aus den Untersuchungen zur Zytokompatibilität einige Schlussfolgerungen ableiten, die für das Design von effektiven Nanoträgern für siRNA grundlegend sind.

Die Unterschiede zwischen siNEG und siGFP bei der Untersuchung zur Transfektion mit Lipofectamine® lassen vermuten, dass die siRNA gegen eGFP in höheren Konzentrationen einen toxischen Effekt auf HS-5-GFP-Zellen hat, der sich aber erst einige Tage nach der Inkubation bemerkbar macht. Außerdem zeigte sich, dass Parameter wie die Partikelgröße, die Zusammensetzung der Lipidumhüllung und die Konzentration der funktionalisierten NPSNPs die Zellverträglichkeit beeinflussen. Im direkten Vergleich stellten sich bei der Verwendung von siGFP die Lipidformulierungen mit PEG2000 als zellkompatibler heraus als solche, in denen nur DOTAP und DOPE verwendet wurde. Außerdem sank bei letztgenannter Formulierung die Viabilität der Zellen mit steigender Konzentration. Bei einer Gegenüberstellung der Zellviabilitäten nach einer Inkubation mit den beiden Silica-Nanopartikelsorten mit gleicher Lipidformulierung erschienen die *lp*-NPSNPs weniger zytotoxisch als die *sp*-NPSNPs. Da die Zellviabilitäten nach einer Inkubation mit den lipidumhüllten Nanopartikeln, beladen mit siNEG, nach sechs Tagen bis zu einer eingesetzten Konzentration von 150 nM über 70 % lagen, können die entwickelten Nanoträger unter den vorherrschenden Bedingungen generell als zytokompatibel eingestuft werden.

4.2.8 *Knockdown*-Untersuchungen an HS-5-GFP-Zellen

Auf Basis der beiden Silica-Nanopartikelsorten wurden Freisetzungssysteme für siRNAs entwickelt, die bisher *in vitro* hinsichtlich ihrer Zellaufnahme und ihrer Zytotoxizität untersucht wurden. In diesem Abschnitt wird schließlich die intrazelluläre Freigabe der siRNA und damit das Potential zur Herunterregulierung einer Genexpression beurteilt. Als Testprotein, dessen Produktion mithilfe von siRNA inhibiert werden sollte, diente das fluoreszierende eGFP, das von HS-5-Zellen exprimiert wurde. Der *Knockdown* wurde über eine Messung der Fluoreszenzintensität evaluiert. Diese kann mit der produzierten Proteinmenge in der Zelle in Korrelation gesetzt werden. Die Bestimmung erfolgte zum einen von der Gesamtheit aller Zellen in einem Well an einem Multiplattenreader und zum anderen mithilfe eines Durchflusszytometers. Letztgenanntes bot die Möglichkeit, die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle einer Population zu ermitteln.

***Knockdown*-Untersuchungen am Multiplattenreader.** Für die Untersuchungen am Multiplattenreader wurden die HS-5-GFP-Zellen in einer schwarzen 96-Well-Platte mit Glasboden ausgesät. Anschließend erfolgte die Transfektion von siGFP und von siNEG mit den NH₂-Propyl (50/50)-modifizierten *sp*-NPSNPs bzw. *lp*-NPSNPs (Beladung: 75 µg mg⁻¹) eingekapselt in einer der beiden vorgestellten Lipidumhüllungen. Es wurden, analog zu den Zytotoxizitätsuntersuchungen, verschiedene siRNA- und damit auch NPSNP-Konzentrationen auf die Zellen gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden in Kultur erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensität am Multiplattenreader. In Abbildung 4.32 ist diese relativ zur Intensität, die nur mit Medium behandelte Zellen erzeugten, für die *sp*-NPSNPs als Basis dargestellt. Dabei wurde der Mittelwert aus drei individuellen Experimenten gebildet, bei denen jeweils eine Dreifachbestimmung stattfand. Zusätzlich wurde auch eine Transfektion der siRNAs mit Lipofectamine® als Vergleich durchgeführt, und die dabei ermittelten Fluoreszenzintensitäten befinden sich ebenfalls in dem untenstehenden Diagramm. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen zwei Tage nach der Transfektion sind im Anhang in Abbildung 7.12 zu finden.

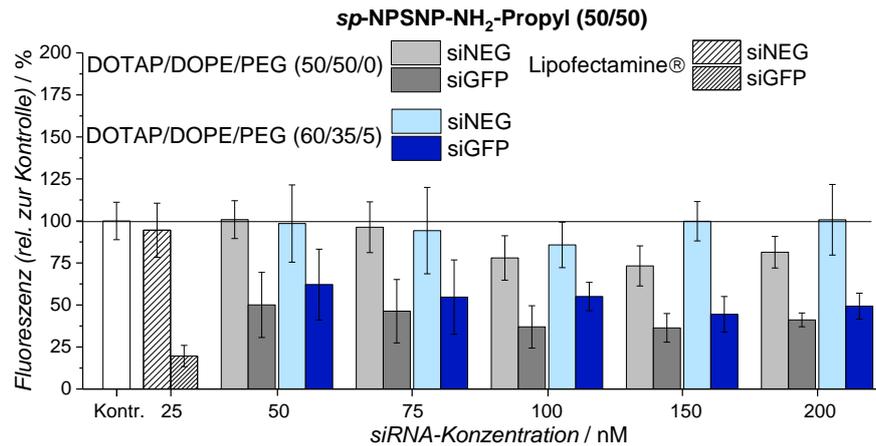


Abbildung 4.32: Zur Bestimmung des Knockdowns anhand von Fluoreszenzintensitäten: Über einen Multiplattenreader ermittelte relative Fluoreszenzintensitäten zwei Tage nach der Inkubation von HS-5-GFP-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen *sp*-NPSNPs, die mit siNEG bzw. siGFP beladen ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) und mit einer der beiden Lipidformulierungen umhüllt wurden ($N=3, n=3$).

Aus der konzentrationsabhängigen Darstellung der Fluoreszenzintensität lassen sich erneut einige Tendenzen ableiten. Bei einer siRNA-Konzentration von 50 nM liegen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei der Transfektion von siNEG mit beiden Lipidformulierungen bei nahezu 100 %. Im Vergleich dazu sinkt die Intensität bei Verwendung von siGFP und einer DOTAP/DOPE-Formulierung um 50 % und bei der Formulierung mit einem PEG-Anteil um ca. 40 %. Mit steigender Konzentration reduziert sich für siNEG und dem Einsatz der Lipide in äquimolaren Anteilen (DOTAP/DOPE) die relative Fluoreszenzintensität bis auf 75 %. Gleichzeitig fällt die Signalstärke bei siGFP auf 40 %. Demgegenüber entspricht die Fluoreszenzintensität bei siNEG und den drei Lipiden DOTAP/DOPE/PEG2000 selbst in hohen Konzentrationen ungefähr derjenigen der Kontrolle. Bei einem Einsatz von siGFP sinkt die Intensität bis zu einer siRNA-Konzentration von 200 nM auf 50 %. Mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz Lipofectamine® kann mit siGFP gegenüber siNEG eine Reduktion um ca. 80 % verzeichnet werden, wobei die siRNA-Konzentration lediglich 25 nM betrug.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern erste Indizien für eine erfolgreiche Freisetzung der siRNAs von den NPSNPs ins Zytoplasma und einen *Knockdown* des eGFP-Gens, da eine Intensitätsverminderung des Fluoreszenzsignals bei Verwendung von siGFP im Vergleich zu siNEG auftritt. Die vergleichsweise geringere Intensitätssenkung beim Einsatz der Lipidformulierung mit drei Lipiden kann zum einen auf die Anwesenheit von PEG zurückgeführt werden. Neben der schon beschriebenen Verminderung der Zellaufnahme hat PEG auch einen Einfluss auf den endosomal *Escape*. PEG-Ketten beeinträchtigen dabei den Kontakt zwischen der Lipidumhüllung und der Membran des Endosoms. Gleichzeitig wirken sie stabilisierend auf die Organisation der Lipide. Allerdings ist eine Destabilisierung der endosomal Membran, die mit einer Reorganisation der beteiligten

Lipide einhergeht, maßgeblich für den endosomalen *Escape* von siRNA und für die Freisetzung der Nukleinsäuren ins Zytoplasma.^[77] Zum anderen hat sich in den vorangegangenen Zytokompatibilitätsuntersuchungen herausgestellt, dass von Nanoträgern mit DOTAP/DOPE eine höhere Viabilitätsbeeinträchtigung ausgeht. Eine damit verbundene Abnahme der Zellzahl kann einen höheren *Knockdown* vortäuschen, weil die Signalstärke mit der Anzahl der Zellen verbunden ist. Die beobachtete Reduktion des gemessenen Fluoreszenzsignals mit siNEG unterstützt diese These. Um eine solche Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen, wurde die Durchflusszytometrie zur Beurteilung des *Knockdowns* herangezogen (s. u.). Dessen ungeachtet sprechen die Ergebnisse für die Funktionsfähigkeit der Freisetzungssysteme schon bei siRNA-Konzentrationen von 50 nM.

Analog zu den Versuchen mit den *sp*-NPSNPs als Plattform wurden identische Experimente mit *lp*-NPSNPs durchgeführt. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten relativ zur Kontrolle sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Auch hierbei lassen sich ähnliche Trends erkennen, insgesamt fällt die Verminderung der Fluoreszenzintensität aber geringer aus. Beispielsweise ist die Reduktion bei 50 nM für DOTAP/DOPE nur ca. 20 % und bei DOTAP/DOPE/PEG2000 lediglich 15 %. Dies ist ein Indiz, dass die Größe und die Morphologie der Partikel einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben. Die Resultate können zudem mit den vorangegangenen Zytotoxizitätsuntersuchungen in Zusammenhang gebracht werden. Besonders bei dem Einsatz von siGFP ließen sich dort im Vergleich zu den *sp*-NPSNPs höhere Viabilitäten verzeichnen. Zusammen mit den *Knockdown*-Untersuchungen liegt deswegen die Schlussfolgerung nahe, dass weniger (teilweise toxisch wirkende) siRNA bei einer Transfektion mit den *lp*-NPSNPs in das Zytoplasma freigesetzt wird, was die höhere Fluoreszenzintensität und Viabilität erklären würde.

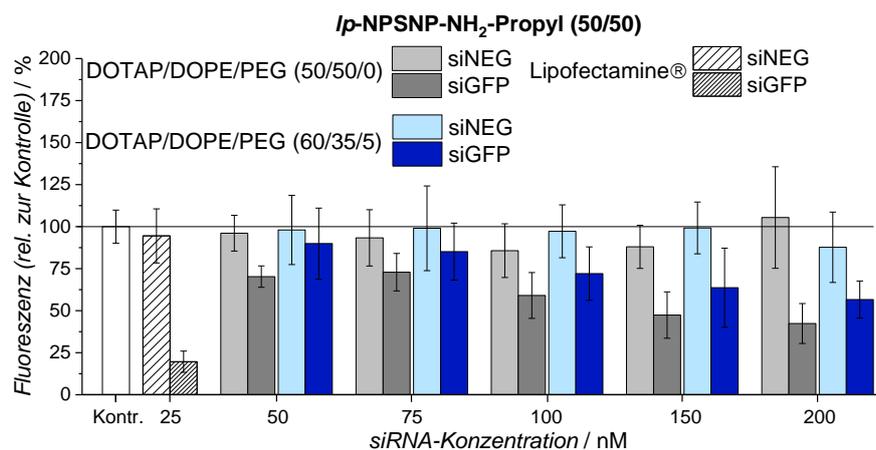


Abbildung 4.33: Zur Bestimmung des Knockdowns anhand von Fluoreszenzintensitäten: Über einen Multiplattenreader ermittelte relative Fluoreszenzintensitäten zwei Tage nach einer Inkubation von HS-5-GFP-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen *lp*-NPSNPs, die mit siNEG bzw. siGFP beladen ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) und einer der beiden erprobten Lipidformulierungen umhüllt wurden. (N=3, n=3)

Zur Untersuchung, ob ein *Knockdown* auch ohne Einkapselung mit Lipiden erzielt werden kann, wurden Transfektionen mit siRNA-beladenen NPSNPs ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) ohne Lipidhülle ausgeführt. Die ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten sind für beide Nanopartikelsorten in Abbildung 4.34 zu sehen.

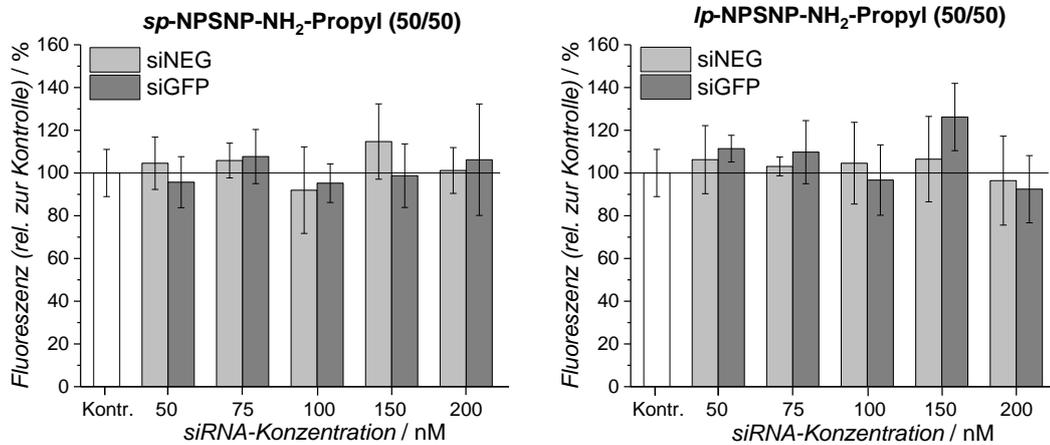


Abbildung 4.34: Zur Bestimmung des Knockdowns anhand von Fluoreszenzintensitäten: Ermittelte relative Fluoreszenzintensitäten zwei Tage nach einer Inkubation von HS-5-GFP-Zellen mit siRNA-beladenen Nanopartikeln ohne Lipidhülle (N=2, n=3).

Sowohl für die *sp*-NPSNPs als auch für die *lp*-NPSNPs sind unabhängig von der eingesetzten siRNA-Konzentration keine eindeutigen Verminderungen der Fluoreszenzintensitäten bei der Verwendung von siGFP im Vergleich zu siNEG auszumachen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zu keiner ausreichenden siRNA-Freisetzung ins Zytoplasma und damit auch zu keiner Herunterregulation der Expression des eGFP-Gens kam. Einerseits kann als Grund die verschlechterte Zellaufnahme genannt werden, die anhand der CLSM-Aufnahmen ausgemacht wurde (vgl. Abschnitt 4.2.6). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass von den wenigen in die Zellen aufgenommenen Partikeln eine Abgabe der siRNAs über einen endosomalen *Escape* nicht möglich ist. Zur Induktion des endosomalen *Escapes* sind keine Lipide vorhanden und für einen Protonenschwammefekt ist die Dichte der Aminogruppen wahrscheinlich zu gering. Das Ausbleiben einer Freisetzung ins Zytoplasma würde auch die relativ hohen Zellviabilitäten bei der Verwendung von siGFP erklären (Abschnitt 4.2.7).

Durchflusszytometrie. Zusätzlich zu der Beurteilung des eGFP-*Knockdowns* über einen Multiplattenreader wurde die Durchflusszytometrie angewandt, um die Abschwächung der Fluoreszenzintensität, die mit der produzierten Proteinmenge korreliert, zu bewerten. Für die Untersuchungen wurden die HS-5-GFP-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät, da eine höhere Zellzahl pro Messung benötigt wurde. Dem damit verbundenen erhöhten Kultivierungsvolumen (1 mL im Vergleich zu 100 μL in einer 96-Well-Platte) war es auch geschuldet, dass lediglich eine Transfektion mit einer siRNA-Konzentration von 75 nM durchgeführt wurde. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde das Medium der

Zellen gewechselt, 48 Stunden später wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und die Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. In Abbildung 4.35 sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Zellen relativ zur Kontrolle (Zellen, die nur in Medium kultiviert wurden) dargestellt. Zusätzlich sind auch die Ergebnisse von Transfektionen der siNEG und siGFP mit Lipofectamine® zu sehen (25 nM).

Der Graphik ist zu entnehmen, dass bei einer Transfektion von siGFP mit *sp*-NPSNPs als Basis und einer DOTAP/DOPE-Lipidumhüllung die Fluoreszenzintensität der HS-5-GFP-Zellen im Vergleich zu einer Transfektion mit siNEG um ca. 40 % sinkt. Bei der Verwendung von DOTAP/DOPE/PEG2000 liegt die Reduktion sogar bei 46 %. Im Gegensatz dazu beläuft sich die Abnahme der Fluoreszenzintensität mit *lp*-NPSNPs als Freisetzungsbasis unabhängig von der Lipidformulierung auf ca. 25 %. Die über den Multiplattenreader beobachteten eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Lipidformulierungen sind bei der Messung am Durchflusszytometer nicht vorhanden. Dies lässt vermuten, dass die stärkere Abschwächung des Signals mit einer Hülle aus DOTAP/DOPE auf eine Verminderung der Zellzahl aufgrund zytotoxischer Effekte zurückzuführen ist. Eine Transfektion mit Lipofectamine® bewirkte eine Herunterregulation von 80 %, wobei die siRNA-Konzentration anstatt 75 nM lediglich 25 nM betrug.

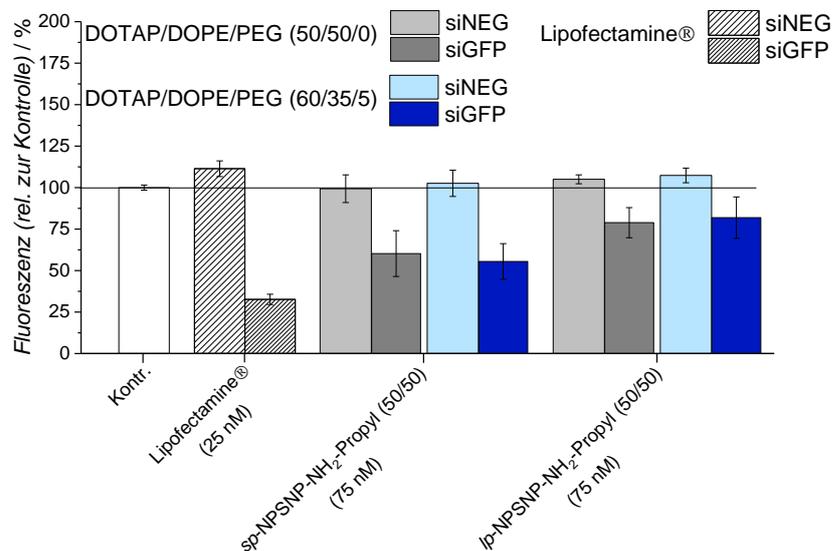


Abbildung 4.35: Zur Bestimmung des Knockdowns anhand von Fluoreszenzintensitäten: Mittels Durchflusszytometrie ermittelte relative Fluoreszenzintensitäten von HS-5-GFP-Zellen zwei Tage nach der Transfektion von siRNAs mit den designten Silica-Nanopartikeln sowie mit Lipofectamine® als Vergleich (N=3, n=1).

Mit einer 7-AAD-Färbung sollte ausgeschlossen werden, dass membrangeschädigte Zellen über einen membrandurchlässigen Verlust des eGFPs zur Verminderung des Fluoreszenzsignals beitragen und somit einen falsch positiven *Knockdown* suggerieren. Dafür wurde bei einem Versuch während der Messung am Durchflusszytometer neben der Fluoreszenzintensität auch die Viabilität der Zellen mithilfe von 7-AAD bestimmt.

7-AAD kann spezifisch zwischen Cytosin- und Guanin-reichen Regionen der DNA von apoptotischen Zellen interkalieren, während vitale Zellen für 7-AAD impermeabel sind. In Abbildung 4.36 sind exemplarisch die erhaltenen Ergebnisse für die *sp*-NPSNPs und einer DOTAP/DOPE-Formulierung im Vergleich mit einer Negativ- sowie einer Positivkontrolle dargestellt. Dabei wurden für jede Probe die Signalintensitäten der Vorwärtsstreuung gegen die des 7-AAD aufgetragen.

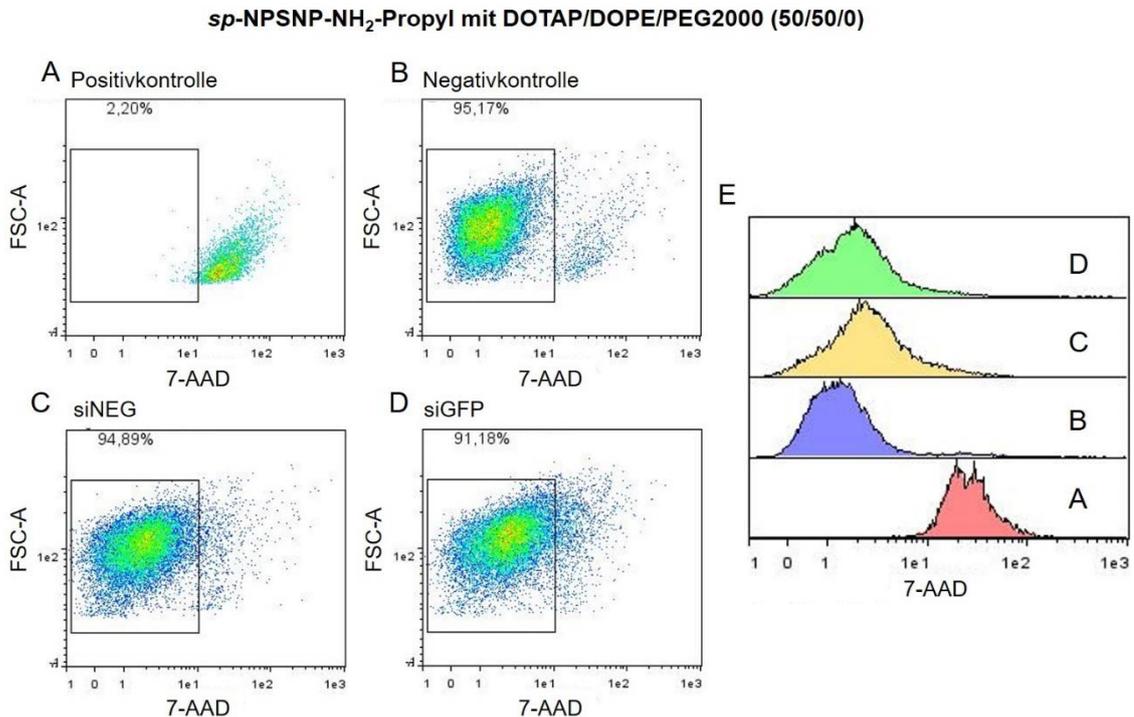


Abbildung 4.36: Graphen der 7-AAD-Messung am Durchflusszytometer. A: Mit Triton X-100 behandelte Zellen als Positivkontrolle; B: Zellen der Negativkontrolle, die nur mit Medium behandelt wurden; C: Zellen nach einer Inkubation mit siNEG-beladenen *sp*-NPSNPs und einer Lipidhülle aus DOTAP/DOPE; D: Zellen nach einer Inkubation mit siGFP-beladenen *sp*-NPSNPs und einer Lipidhülle aus DOTAP/DOPE; E: Normierte Ergebnisse zur Bestimmung der 7-AAD-Intensität.

Mit Triton X-100 behandelte, permeabilisierte Zellen (Positivkontrolle) erzeugen ein starkes 7-AAD-Signal, da die 7-AAD-Moleküle ins Zellinnere gelangen und an die DNA binden konnten (Abbildung 4.36 A). Im Vergleich dazu zeigen viable Zellen der Negativkontrolle, die nur mit Medium behandelt wurden, eine geringe Intensität, weil 7-AAD nur eine geringe Membranpermeabilität besitzt (Abbildung 4.36 B). Bei den Zellen, die mit siRNA-beladenen Nanopartikeln inkubiert wurden, steigt die Signalintensität des 7-AAD ein wenig, wobei immer noch über 90 % der Zellen im ausgewählten *Gate* der Negativkontrolle liegen (Abbildung 4.36 C–E). Bei den Bestimmungen der 7-AAD-Intensitäten der anderen Proben ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 7.13 im Anhang). Zwischen 88–97 % der transfizierten Zellen lagen im ausgewählten Bereich der Kontrollzellen, wobei tendenziell mit siGFP behandelte Zellen einen geringeren prozentualen Anteil besaßen. Diese Messungen zeigen, dass nach zwei Tagen der überwiegende

Anteil der am Durchflusszytometer untersuchten Zellen noch kein apoptotisches Verhalten aufweist. Somit wurde eine Reduktion der GFP-Intensität durch Membranschädigung ausgeschlossen.

Um dies noch genauer zu untersuchen, würden sich Messungen von Zellen nach weiteren Tagen in Kultur anbieten, da sich bei den Zytokompatibilitätsuntersuchungen herausstellte, dass die Toxizität erst einige Tage nach Transfektion auftritt. Zusätzlich zur Färbung mit 7-AAD, das spätapoptotische Zellen markiert, könnte auch fluoreszenzmarkiertes Annexin V zum Einsatz kommen, mit dem frühapoptotische Zellen identifiziert werden können.^[228]

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie die vorangegangene Beurteilung am Multiplattenreader. Zum Vergleich wurden von jedem Experiment die Differenzen zwischen siNEG und siGFP als *Knockdown* definiert, der jeweilige Mittelwert mit Standardabweichung gebildet und als Gegenüberstellung in Abbildung 4.37 dargestellt. Es zeigt sich, dass mit den *sp*-NPSNPs als Basis für beide erprobten Lipidformulierungen ein *Knockdown* von rund 45 % bei einer siRNA-Konzentration von 75 nM erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu liegt der prozentuale Anteil mit den *lp*-NPSNPs als Freisetzungsplattform bei ca. 25 %. Mit Lipofectamine® war eine Reduktion von 75 % zu beobachten, wobei die siRNA-Konzentration 25 nM betrug.

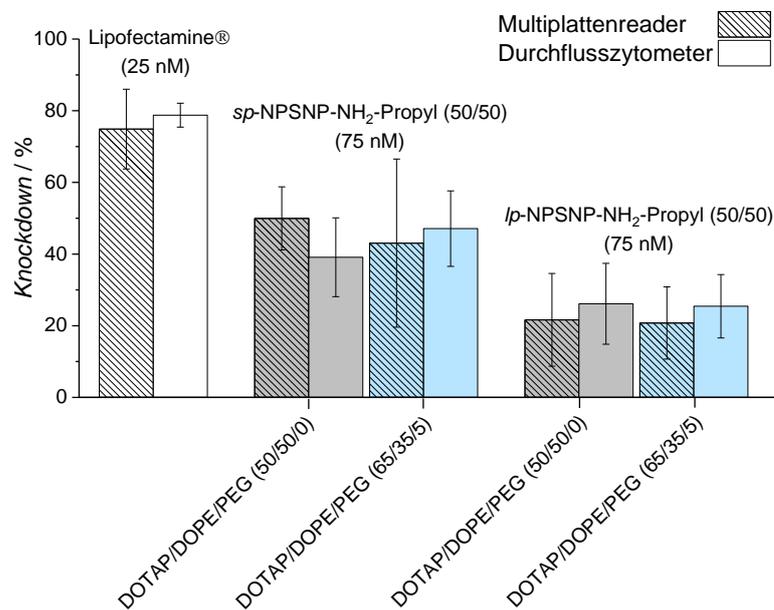


Abbildung 4.37: Vergleich der *Knockdown*-Ergebnisse des Multiplattenreaders (N=3, n=3) mit denen des Durchflusszytometers (N=3, n=1).

Der prozentuale *Knockdown* beider Analysemethoden befindet sich in guter Übereinstimmung mit Abweichungen bis zu 10 %, lediglich die Fehlerbalken der Daten des Multiplattenreaders fallen etwas größer aus. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Fluoreszenzintensität eines kompletten Wells bestimmt wurde und Unterschiede in der Zellzahl,

die z. T. mit zytotoxischen Effekten in Verbindung gebracht werden können, das Fluoreszenzsignal mitbestimmen. Dahingehend sind die Werte vom Durchflusszytometer genauer, da hierbei stets die gleiche Zellzahl vermessen wurde. Sowohl für die *sp*-NPSNPs als auch für die *lp*-NPSNPs zeigen die beiden erprobten Lipidformulierungen untereinander kaum Unterschiede. Dies spricht dafür, dass die Transfektionseffizienz durch den Einfluss des PEG2000 auf den endosomalen *Escape* nicht vermindert wird. Werden die Ergebnisse aus den Zytokompatibilitätsuntersuchungen berücksichtigt, ist eine Verwendung der Formulierung mit PEG2000 empfehlenswert, da die Zellverträglichkeit vergleichsweise höher ausfiel. Während der *Knockdown* zwischen den beiden Lipidformulierungen jeder Sorte annähernd gleich ist, können dagegen beim Vergleich der zwei Nanopartikelsorten untereinander gravierende Unterschiede ausgemacht werden. Die Ursache für diese Differenz lässt sich über die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht direkt ausmachen. Es können lediglich Vermutungen aufgestellt werden, die mit weiterführenden Analysen bestätigt werden müssten. Einen Einfluss auf die Zellaufnahme hat beispielsweise die Größe der Partikel. In Hinblick auf Silica-Nanopartikel zeigte sich, dass kleinere Partikel deutlich besser aufgenommen werden als größere.^[66] Auch die Porenmorphologie kann mitentscheidend sein. Obwohl in den vorangegangenen Freisetzungsexperimenten in PBS (Abschnitt 4.2.4) die *lp*-NPSNPs vorteilhaft erschienen, können daraus keine Rückschlüsse auf die Freisetzung der siRNA innerhalb der Zelle geschlossen werden. In dem Zusammenhang wären Untersuchungen mit 40 nm großen Nanopartikeln und 7.5 nm Poren sowie mit 80 nm großen Nanopartikeln mit kleinen Poren (3 nm) interessant. Darüber hinaus können geringe Unterschiede in Bezug auf die Zusammensetzung der Oberflächenmodifizierung und der Lipidhülle zwischen den einzelnen Nanoträgern ursächlich für die erhaltenen Ergebnisse sein.

Die Transfektionseffizienz der entwickelten Nanoträger ist geringer als die von Lipofectime®. Ein Grund könnten geringere Freisetzungsmengen der siRNA ins Zytoplasma darstellen. Der pH-Wert von Endosomen sinkt mit ihrer Reifung. Diese pH-Wert-Erniedrigung führt allerdings zu einer Protonierung der Aminogruppen der Modifizierung. Die damit verbundene Erhöhung des Oberflächenpotentials der Partikel könnte einer Freisetzung der siRNA entgegenwirken. Darüber hinaus zeigten die Zeta-Potential-Messungen der lipidumhüllten Partikel, dass in Wasser keine stabilen Dispersionen vorlagen. Im Zellkulturmedium könnte es zur Agglomeration der Partikel kommen, wodurch die Transfektionseffizienz beeinträchtigt werden würde. In Zukunft sollten deswegen die Eigenschaften des Freisetzungssystems noch weiter optimiert werden.

Zusammengefasst bestätigen die durchgeführten Experimente zum *Knockdown* die Funktionsfähigkeit der designten Freisetzungssysteme für siRNA und verdeutlichen, dass die Effektivität der entworfenen Systeme von Parametern wie der Größe abhängt. Die zwei verschiedenen Silica-Nanopartikelsorten wiesen trotz gleicher Oberflächenmodifizierung, siRNA-Beladung und Umhüllung deutliche Unterschiede hinsichtlich der

Herunterregulierung des eGFP-Gens auf. Während sich mit den *lp*-NPSNPs als Basis lediglich ein *Knockdown* von 25 % verzeichnen ließ, betrug der *Knockdown* mit den *sp*-NPSNPs als Plattform ca. 45 %. Unterschiede zwischen den beiden erprobten Lipidformulierungen konnten nicht ausgemacht werden. Im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Lipofectamine® besitzen die entwickelten Systeme allerdings geringe Transfektionseffizienzen, sodass zukünftig Optimierungen erfolgen müssen.

4.2.9 Anwendung der designten Freisetzungssysteme in der regenerativen Medizin

Die bisherigen *in vitro*-Experimente zur Inhibierung einer Genexpression lieferten vielversprechende Ergebnisse. Als konkrete Anwendung im Bereich der regenerativen Medizin wurden deswegen die designten Freisetzungssysteme für siRNA an dentalen Pulpastammzellen (DPSCs) erprobt. Diese Zellen können zu einer Vielzahl von Zelltypen, wie Osteoblasten, Odontoblasten, Adipozyten oder Myoblasten differenzieren und werden deswegen für verschiedenste Geweberegenerationen im Bereich des *Tissue Engineering*s eingesetzt. Für die Regeneration von Zahngewebe spielt dabei die osteogene/odontogene Differenzierung dieser Zellen eine entscheidende Rolle, weswegen eine gezielte Beeinflussung bzw. Kontrolle in diese Richtung erstrebenswert ist.^[261–263] In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Behrens konnte gezeigt werden, dass amino-modifizierte nanoporöse Silica-Nanopartikel einen osteoinduktiven Effekt auf mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) haben können.^[58] In Anlehnung an diese Versuche wurden deswegen in dieser Arbeit die Auswirkungen einer Inkubation mit modifizierten Silica-Nanopartikeln auf die Differenzierung von DPSCs untersucht. Der Fortschritt der Differenzierung wurde dabei mithilfe einer Alizarin-Rot-Färbung sowie eines ALP-Assays bewertet. Darüber hinaus wurde auch das Potential zum *Knockdown* eines Gens mit den designten Freisetzungssystemen an den DPSCs erprobt.

Einfluss der NPSNPs auf die Differenzierung von DPSCs. Für diese Untersuchungen wurden humane DPSCs mit NH₂-Propyl (50/50)-modifizierten Silica-Nanopartikeln beider Sorten inkubiert, da diese Partikel die Plattform der siRNA-Freisetzungssysteme darstellten. Die vorliegenden Konzentrationen der Nanopartikel beliefen sich auf 25 µg mL⁻¹ und 100 µg mL⁻¹. Außerdem wurden auch Zellen mit unmodifizierten *sp*-NPSNPs mit einer Konzentration von 100 µg mL⁻¹ behandelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde das jeweilige Zellmedium gewechselt und durch ein zur Osteogenese anregendes Medium (Osteo-Medium) ersetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Nanopartikeln behandelt wurden. Zusätzlich wurde ein gleicher Ansatz durchgeführt, bei dem die DPSCs weiterhin mit „normalem“ Medium (α -MEM mit FCS und Pen/Strep) kultiviert wurden. Nach weiteren 12 Tagen in Kultur erfolgte die Evaluation des Stadiums der Differenzierung einerseits über eine Alizarin-Rot-Färbung und andererseits über einen ALP-Assay.

Alizarin Rot besitzt die Fähigkeit, Calciumionen zu komplexieren. Da Zellen, die sich in der osteogenen Differenzierung befinden, eine Calcium-reiche Matrix bilden, kann über eine Alizarin-Rot-Färbung der Fortschritt dieser Mineralisierung beurteilt werden. In Abbildung 4.38 sind Photographien der Wells nach einer Inkubation mit Silica-Nanopartikeln ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt. Die quantitative Bestimmung des Alizarin-Rot-Anteils ist in Abbildung 4.39 zu sehen.

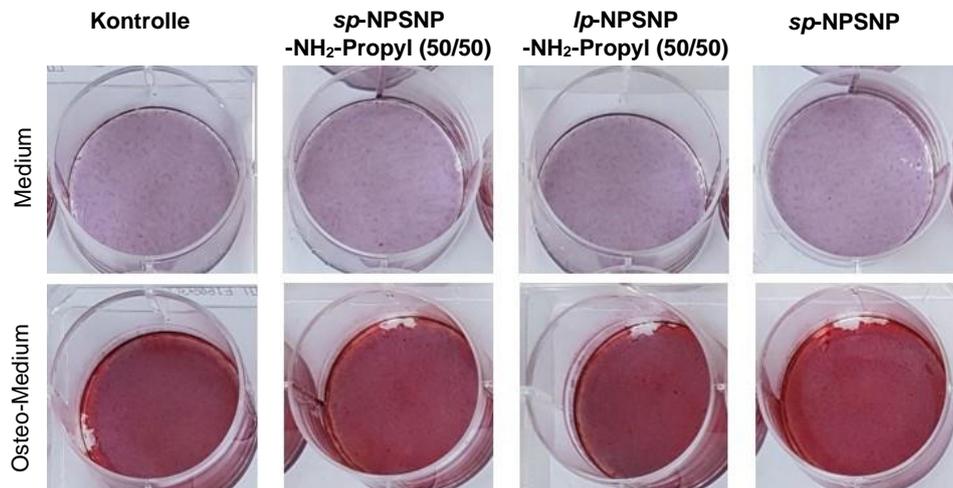


Abbildung 4.38: Photographien der Wells nach einer Alizarin-Rot-Färbung an DPSCs 12 Tage nach der Inkubation mit NPSNPs ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) kultiviert mit Medium (oben) oder Osteo-Medium (unten).

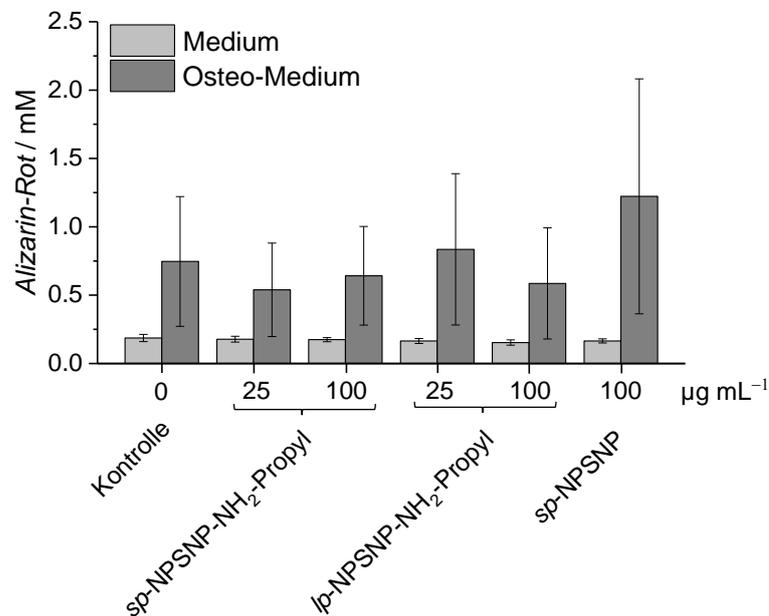


Abbildung 4.39: Ergebnisse der Quantifizierung von Alizarin-Rot 12 Tage nach der Inkubation der DPSCs mit verschiedenen Sorten NPSNPs. (N=3, n=1).

Sowohl die photographischen Aufnahmen als auch die quantitative Bestimmung des Alizarin-Rot-Anteils zeigen, dass die Farbstoffmenge bei Zellen, die mit Osteo-Medium kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen mit „normalem“ Medium deutlich erhöht ist. Dies spricht für einen Beginn der osteogenen Differenzierung. Allerdings sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen DPSCs, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, und solchen ohne Nanopartikel zu erkennen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass der Einfluss der NPSNPs auf die Differenzierung unter den gegebenen Bedingungen gering ausfällt. Neben den gezeigten Konzentrationen fand eine Inkubation mit Nanopartikelkonzentrationen von $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ als Einfachbestimmung statt. Da eher eine Reduktion des Alizarin-Rot-Anteils zu verzeichnen war, was für eine Inhibierung der osteogenen Differenzierung spricht, sind die Ergebnisse im Anhang (Abbildung 7.14) zu finden.

Als zweite Methode zur Beurteilung des Fortschritts der Differenzierung der DPSCs wurde ein ALP-Assay durchgeführt, da die Expression des Enzyms ALP in einem frühen Stadium der Osteogenese hochreguliert wird.^[235] Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Assay wurde zur Bestimmung des ALP-Anteils das Substrat p-Nitrophenylphosphat (pNPP) verwendet, das das Enzym in Phosphat und p-Nitrophenol (pNP) umsetzt. In Abbildung 4.40 sind die ermittelten pNP-Gehalte 12 Tage nach der Inkubation der DPSCs mit verschiedenen Silica-Nanopartikelsorten bzw. -konzentrationen bei einer Kultivierung in Medium oder Osteo-Medium dargestellt.

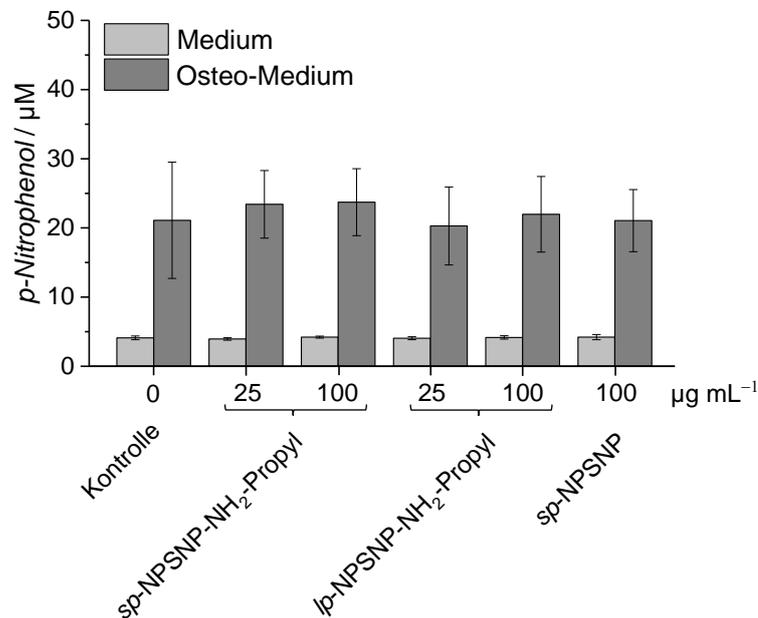


Abbildung 4.40: Ergebnisse des ALP-Assays 12 Tage nach der Inkubation der DPSCs mit verschiedenen Silica-Nanopartikelsorten und -konzentrationen. (N=3, n=1).

Der Graphik ist zu entnehmen, dass durch eine Kultivierung mit Osteo-Medium die pNP-Konzentration im Vergleich zu einer Zellkultur mit „normalem“ Medium gesteigert wird. Die damit einhergehenden erhöhten ALP-Aktivitäten können mit einem Beginn der oste-

ogenen Differenzierung in Zusammenhang gebracht werden. Es sind jedoch keine Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Nanopartikelinkubation zu erkennen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Alizarin-Rot-Färbung, bei der ebenfalls kein Effekt der Nanopartikel auf die Differenzierung der DPSCs festgestellt werden konnte. Das Ausbleiben des osteoinduktiven Effekts kann einerseits am Zelltyp liegen, der sich anders als MSCs verhält. Andererseits ist es möglich, dass die Kultivierungsbedingungen nicht optimal gewählt wurden. Für genauere Untersuchungen könnte deswegen die Inkubationszeit verlängert oder eine mehrfache Zugabe verschiedener Silica-Nanopartikelkonzentrationen erprobt werden. Darüber hinaus könnten die Silica-Nanopartikel mit Calciumionen dotiert werden. Diesbezüglich zeigten Lee *et al.* in einer Studie, dass amino-funktionalisierte und Calcium-dotierte nanoporöse Silica-Nanopartikel (160 nm) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ die odontogene Differenzierung von dentalen Pulpastammzellen von Ratten induzieren können.^[264]

Knockdown-Untersuchungen an DPSCs. Neben dem Einfluss der modifizierten, aber unbeladenen Silica-Nanopartikel auf die Differenzierung der DPSCs wurde mit den entwickelten siRNA-Freisetzungssystemen die Herunterregulierung einer Genexpression an diesem Zelltyp erprobt. Dazu wurde der Oberflächenmarker CD73 ausgewählt. Die dentalen Pulpastammzellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und analog zu den Versuchen an den HS-5-GFP-Zellen für 24 Stunden mit den designten Nanoträgern inkubiert. Zum Einsatz kamen dabei die *sp*-NPSNPs bzw. *lp*-NPSNPs mit einer NH_2 -Propyl (50/50)-Modifizierung, die mit siNEG oder siNT5E ($75 \mu\text{g mg}^{-1}$) beladen und mit einer DOTAP/DOPE-Hülle versehen waren. Mit den *sp*-NPSNPs wurde mit einer siRNA-Konzentration im Well von 50 nM gearbeitet. Die Konzentration der *lp*-NPSNPs wurde mit 75 nM etwas höher gewählt, da sie in den *Knockdown*-Untersuchungen an den HS-5-GFP-Zellen geringere Effizienzen aufwiesen. Zur Kontrolle wurden die siRNAs mit Lipofectamine® transfiziert (25 nM). Einen Tag nach der Inkubation wurde das Medium gewechselt und zwei Tage später erfolgte die Quantifizierung des *Knockdowns* am Durchflusszytometer. Dafür wurden die verbliebenen CD73-Moleküle auf der Oberfläche der Zellen mit einem PE-markierten Antikörper gefärbt (vgl. Abschnitt 2.4.6). In Abbildung 4.41 sind die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten relativ zu Zellen, die nur mit Medium kultiviert wurden, dargestellt.

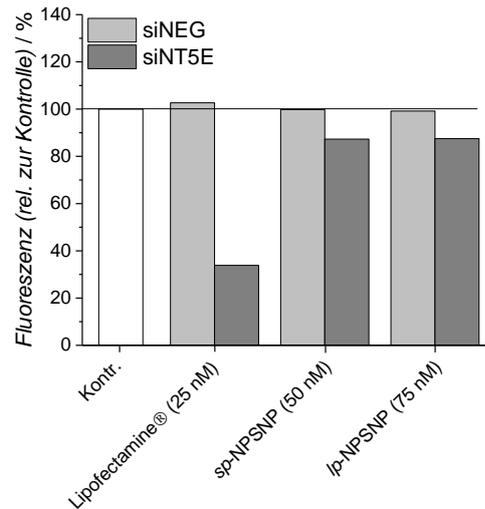


Abbildung 4.41: Mittels Durchflusszytometrie bestimmte relative Fluoreszenzintensitäten von CD73-markierten DPSCs zwei Tage nach der Transfektion von siRNAs mit den designten Silica-Nanopartikeln sowie mit Lipofectamine® als Vergleich (N=1, n=1).

Für die *sp*-NPSNPs ist eine Reduktion der Fluoreszenzintensität um 12 % bei Verwendung von 50 nM siNT5E im Vergleich zu siNEG zu verzeichnen. Ein gleicher Wert wurde mit den *lp*-NPSNPs erreicht, allerdings wurde hier mit einer Konzentration von 75 nM gearbeitet. Dies zeigt, dass die kleineren *sp*-NPSNPs eine höhere Transfektionseffizienz aufweisen als die fast doppelt so großen *lp*-NPSNPs. Mit Lipofectamine® sinkt die Signalstärke um 70 %. Die Ergebnisse bestätigen die Funktionsfähigkeit der designten Nanoträger. Der *Knockdown* fällt im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen an den HS-5-GFP-Zellen jedoch deutlich geringer aus. Dies könnte daran liegen, dass Zelllinien unterschiedlich auf verschiedene Transfektionsreagenzien reagieren und die Zellaufnahme sich zwischen den Zelltypen unterscheiden kann.^[164] Darüber hinaus wurden die Zellen unter anderen Bedingungen (Zellzahl, Zellmedium, Volumen des Mediums) kultiviert, was einen Vergleich zusätzlich erschwert.

Insgesamt besteht noch Optimierungspotential für den Einsatz der nanoporösen Silica-Nanopartikel an dentalen Pulpastammzellen. Ein positiver Einfluss der NPSNPs auf die Differenzierung der DPSCs konnte mit den durchgeführten Untersuchungen nicht erkannt werden. Sowohl die Alizarin-Rot-Färbung als auch der ALP-Assay zeigten nach einer 24-stündigen Inkubation keine gravierenden Auswirkungen auf den Fortschritt der Osteogenese. Im Hinblick auf die Herunterregulation von CD73 konnte mit den modifizierten NPSNPs und einer Lipidumhüllung aus DOTAP/DOPE ein *Knockdown* verzeichnet werden. Dieser fiel jedoch, genau wie bei den Versuchen an HS-5-GFP-Zellen, deutlich geringer aus als mit Lipofectamine®. Dennoch war der *Knockdown* mit den *sp*-NPSNPs mit 50 nM genauso hoch wie bei den *lp*-NPSNPs, bei denen eine siRNA-Konzentration von 75 nM verwendet wurde. Dies unterstützt die These, dass Größe und Morphologie der Nanopartikel einen Einfluss auf die Effektivität haben, sodass für eine zukünftige Anwendung die Eigenschaften der Nanoträger noch weiter optimiert werden können.

4.2.10 Zusammenfassung

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für ein effektives siRNA-Freisetzungssystem basierend auf nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) gelegt. Als Plattform dienten dabei die zwei synthetisierten Nanopartikelsorten (*sp*- und *lp*-NPSNPs), deren Charakterisierung in Abschnitt 4.1 erfolgte.

Zunächst wurde die Immobilisierung von siRNA auf *sp*- sowie *lp*-NPSNPs mit unterschiedlichen Aminogruppenanteilen in ihrer Oberflächenmodifizierung in MES-Puffer (pH 5) untersucht. Es wurden für beide Sorten in Abhängigkeit von der Modifikation variierende Konzentrationen in den Inkubationsüberständen und damit auch unterschiedliche Beladungseffizienzen verzeichnet. Die Immobilisierungsmenge konnte in Korrelation mit der vorhandenen Anzahl protonierbarer Aminogruppen gesetzt werden, und es zeigte sich: Je höher dieser Anteil war, desto mehr siRNA adsorbierte auf der Oberfläche der Silica-Nanopartikel.

Bei den anschließenden Freisetzungsexperimenten in PBS (pH 7.4) wiesen alle getesteten Modifikationen der *sp*- und der *lp*-NPSNPs das Freisetzungsprofil eines *burst release* auf, wobei sich die absolut freigesetzten siRNA-Mengen unterschieden und tendenziell mehr von den *lp*-NPSNPs freigesetzt werden konnte. Auch der Vorgang der Desorption scheint mit der internen Oberflächenladung im Verhältnis zu stehen. Zusätzlich wird vermutet, dass die Partikelmorphologie und die Porengröße das Adsorptions- und Freisetzungsverhalten beeinflussen. Mit den erhaltenen Ergebnissen wurden die NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierungen beider Nanopartikelsorten für die folgenden *in vitro*-Untersuchungen ausgewählt. Dies war der Tatsache geschuldet, dass mit dieser Zusammensetzung sowohl die offerierte siRNA-Menge komplett immobilisiert werden konnte als auch ein angemessener Anteil wieder freigesetzt wurde.

Mit den NPSNPs-NH₂-Propyl (50/50) wurde anschließend die maximale siRNA-Beladungsmenge experimentell ermittelt. Gleichzeitig wurde über theoretische Berechnungen die siRNA-Menge abgeschätzt, die als Monoschicht auf der Nanopartikeloberfläche adsorbieren konnte. Für beide Nanopartikelsorten wurde praktisch ein Wert von ca. 140 µg siRNA pro Milligramm NPSNP bestimmt. Bei den *sp*-NPSNPs stand dieser Wert in guter Übereinstimmung mit der kalkulierten siRNA-Menge von 161 µg mg⁻¹. Im Gegensatz dazu lag die berechnete Immobilisierungsmenge bei den *lp*-NPSNPs bei 91 µg mg⁻¹, was weniger als der experimentelle Wert war. Der Befund deutete auf eine Einlagerung der siRNAs in die 7.5 nm-großen Poren der *lp*-NPSNPs hin. Bei den *sp*-NPSNPs, die lediglich 3 nm-große Poren besaßen, schien dies aufgrund der Ausmaße der siRNA-Moleküle (2 nm x 7.5 nm) nicht möglich zu sein.

Bei den Freisetzungsexperimenten mit unterschiedlichen Beladungsmengen ließ sich zum einen erneut ein *burst release* verzeichnen. Zum anderen zeigte sich, dass unter den gegebenen Bedingungen mehr siRNA von den *lp*-NPSNPs freigesetzt werden konnte als

von den *sp*-NPSNPs. Die Untersuchungen bekräftigten die These, dass neben der Oberflächenladung auch die Morphologie einen entscheidenden Einfluss auf das Adsorptions- und Desorptionsverhalten der Nukleinsäuren hat.

Zum Schutz der siRNA auf der Oberfläche der NPSNPs und zur Verbesserung der Zellaufnahme bzw. des endosomalen *Escapes* wurden die beladenen Nanopartikel in Liposomen eingekapselt. Dafür kamen zwei Lipidformulierungen zum Einsatz, die entweder ein DOTAP/DOPE/PEG2000-Verhältnis von (50/50/0) oder eines von (60/35/5) aufwiesen. Die Umhüllung erfolgte hierbei direkt nach der Beladung der Partikel mit siRNA durch einen Lösungsmittelaustausch. Über die Änderungen des Zeta-Potentials und die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers konnte die Anwesenheit der Lipide um die Partikel bestätigt werden.

In vitro wurde zunächst die Zellaufnahme der entwickelten Nanoträger an HS-5-GFP-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation bewertet. Dabei konnte mithilfe von fluoreszenzmarkierter siRNA eine gesteigerte Aufnahme beobachtet werden, wenn die siRNA-Nanoträger zusätzlich eine Lipidumhüllung besaßen. Außerdem ließ sich mit FITC-markierten Silica-Nanopartikeln, die mit fluoreszenter siRNA beladen und mit Lipiden umhüllt waren, eine Kollokalisierung der Partikel mit den Nukleinsäuren ausmachen. Eindeutige Unterschiede zwischen den Nanopartikelsorten konnten aber über die angewandten Methoden nicht erkannt werden.

Bei den Versuchen zur Transfektion mit Lipofectamine® zeichneten sich Unterschiede zwischen siNEG und siGFP ab, die auf einen zytotoxischen Effekt der siGFP in höheren Konzentrationen auf die HS-5-GFP-Zellen hindeuteten. Dieser Effekt war auch bei den eingesetzten Nanoträgern auf Basis der Silica-Nanopartikel zu beobachten. Bei der Verwendung von siNEG lagen die ermittelten Viabilitäten für die zwei Nanopartikelsorten mit beiden Lipidformulierungen bis zu einer siRNA-Konzentration von 150 nM über 70 %. Bei der Verwendung von siGFP zeigte sich, dass Parameter wie die Partikelgröße, die Zusammensetzung der Lipidumhüllung und die Konzentration der funktionalisierten NPSNPs die Zellverträglichkeit beeinflussten. Im direkten Vergleich bei einer Verwendung von siGFP stellten sich die Lipidformulierungen mit PEG2000 als zellkompatibler heraus als solche, in denen nur DOTAP und DOPE verwendet wurde. Außerdem sank bei letztgenannter Formulierung die Viabilität der Zellen mit steigender Konzentration. Bei einer Gegenüberstellung der Zellviabilitäten nach einer Inkubation mit den beiden Silica-Nanopartikelsorten mit gleicher Lipidformulierung schienen die *lp*-NPSNPs mit siGFP weniger zytotoxisch als die *sp*-NPSNPs zu sein. Dagegen waren beide siRNA-beladenen Nanoträger ohne Lipidhülle unabhängig von der Konzentration als zytokompatibel einzustufen.

Das Potential der designten Nanoträger, die siRNAs in das Zytoplasma freizusetzen, sodass sie eine RNA-Interferenz induzieren und die Produktion eines bestimmten Proteins

inhibieren können, wurde an HS-5-Zellen untersucht, die eGFP exprimierten. Der *Knockdown* wurde über eine Messung der Fluoreszenzintensität, die mit der vorhandenen eGFP-Menge in der Zelle in Korrelation gesetzt wurde, evaluiert. Die Bestimmung erfolgte einerseits von der Gesamtheit aller Zellen in einem Well an einem Multiplattenreader und andererseits mithilfe eines Durchflusszytometers. Der ermittelte *Knockdown* über beide Analysemethoden stimmte in den Grenzen üblicher Schwankungen überein. Zudem waren keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden erprobten Lipidformulierungen einer Nanopartikelsorte zu erkennen. Allerdings variierte das Potential zum Herunterregulieren des eGFP-Gens zwischen den zwei verschiedenen Silica-Nanopartikelsorten trotz gleicher Oberflächenmodifizierung, siRNA-Beladung und Umhüllung deutlich. Während mit den *lp*-NPSNPs lediglich ein *Knockdown* von ca. 25 % zu verzeichnen war, betrug der *Knockdown* mit den *sp*-NPSNPs ca. 45 %. Im Vergleich zu Lipofectamine® besteht für die Silica-Nanopartikel jedoch Optimierungspotential.

Zuletzt wurden Pilotversuche bezüglich einer potentiellen Anwendung in der regenerativen Medizin vorgestellt. Es wurde der Einfluss der modifizierten Silica-Nanopartikel auf die osteogene Differenzierung dentaler Pulpastammzellen untersucht. Dabei konnte für beide Nanopartikelsorten mit NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierung sowohl bei einer Alizarin-Rot-Färbung als auch bei einem ALP-Assay kein Einfluss auf die Differenzierung der DPSCs bemerkt werden. Damit konnte der publizierte osteoinduktive Effekt der NPSNPs auf MSCs für diese Zellsorte nicht bestätigt werden.

Ferner wurden über die Bestimmung des *Knockdowns* von CD73 die Silica-Nanopartikelbasierten siRNA-Freisetzungssysteme an den DPSCs erprobt. Dafür wurden die NH₂-Propyl (50/50)-Modifizierungen beider Sorten mit einer DOTAP/DOPE-Hülle eingesetzt. Wie bei den *Knockdown*-Untersuchungen an den HS-5-GFP-Zellen fiel die Transfektionseffizienz der entwickelten Nanoträger im Vergleich zu Lipofectamine® geringer aus. Nichtsdestotrotz wurde die generelle Funktionsfähigkeit bestätigt und eine höhere Effizienz der *sp*-NPSNPs als Freisetzungsplattform im Vergleich zu *lp*-NPSNPs festgestellt.

Die aus den Versuchen gewonnenen Erkenntnisse bieten eine Grundlage für die Entwicklung effizienter Freisetzungssysteme für siRNA auf Basis von nanoporösen Silica-Nanopartikeln. Mit dem Wissen, dass Parameter wie die Partikelgröße, die Morphologie, die Oberflächenmodifizierung sowie die Zusammensetzung der Lipidformulierung die Transfektionseffizienz und die Zellviabilität der Nanoträger beeinflusst, können zukünftig vielversprechende intrazelluläre *Drug Delivery*-Systeme mit Silica-Nanopartikeln als Plattform designt werden. Ein offensichtlicher Vorteil bei der Verwendung von NPSNPs ist dabei die simple Anpassung der Eigenschaften durch Variation der Reaktionsparameter. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, das vorhandene Porensystem für ein *Co-Delivery* von niedermolekularen Wirkstoffen zu verwenden, sodass mit einer kombinatorischen Freisetzung synergistische Effekte erzielt werden können.

4.3 Entwicklung eines Freisetzungssystems für VEGF

Der folgende Themenblock befasst sich mit der Entwicklung eines Freisetzungssystems für den Wachstumsfaktor VEGF auf Basis nanoporöser Silica-Nanopartikel. Diese VEGF-beladenen Nanopartikel sollen als Füllmaterial in ein Implantat aus Fibrin eingearbeitet werden, um dort durch eine lokale und kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors die Aussprossung von Endothelzellen in das Innere des Fibringerüsts zu verbessern, sodass ein prävasikularisiertes Implantat entstehen kann. Als Freisetzungsplattform wurden ausschließlich *sp*-NPSNPs verwendet, da in vorangegangenen Arbeiten von A. Satalov und N. Schmidt aus der Arbeitsgruppe Behrens bereits mit der gleichen Nanopartikelsorte Freisetzungssysteme für die Wachstumsfaktoren BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und TGF- β 3 (*transforming growth factor- β 3*) entwickelt wurden.^[221,222]

In diesem Unterkapitel werden zunächst die Untersuchungen bezüglich des Aggregationsverhaltens von VEGF in Wasser sowie in PBS vorgestellt. Anschließend erfolgt die Darstellung der Ergebnisse zur Quantifizierung der immobilisierten und freigesetzten VEGF-Mengen, wobei auch auf die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Nanopartikeln eingegangen wird. Des Weiteren werden die Auswirkungen der Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen auf die Stabilität des VEGF und der NPSNPs präsentiert. Um den Einfluss der entwickelten Freisetzungssysteme zur potentiellen Anwendung zu bestimmen, folgt eine Darstellung der Resultate aus den *in vitro*-Untersuchungen zusammen mit einer Diskussion zur potentiellen Anwendung. Die dafür notwendigen Arbeiten wurden in Kooperation mit Sarah Zippusch aus der Arbeitsgruppe Böer der MHH durchgeführt.

4.3.1 Untersuchung des Aggregationsverhaltens von VEGF mittels DLS

Generell stellen Proteinaggregationen einen unerwünschten Störfaktor in der therapeutischen Anwendung von Proteinen dar, da neben einer Verringerung der Aktivität auch eine veränderte Pharmakokinetik inklusive unerwünschter Immunreaktionen als Folge aus der Zusammenlagerung resultieren können.^[265] Aus diesen Gründen wurde der hydrodynamische Durchmesser von VEGF in Wasser sowie in PBS (pH 7.4) bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen mithilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht, sodass eine Aussage hinsichtlich des Aggregationsverhaltens von VEGF in verschiedenen Medien getroffen werden konnte. Links in Abbildung 4.42 sind die hydrodynamischen Durchmesser des Proteins mit unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser als Medium dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich bei den drei untersuchten Konzentrationen das Maximum der Messkurve bei ungefähr 3 nm befindet. Demnach liegen unter diesen Bedingungen keine größeren Proteinaggregate vor. Die Untersuchungen in PBS (Abbildung 4.42 rechts) ergaben ein anderes Ergebnis. Im Vergleich zu den Messungen in Wasser ist das Maximum des hydrodynamischen Durchmessers bei einer Konzentration von

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS bei 79 nm zu finden. Bei einer Konzentration von 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ liegen zwei Maxima vor, eines bei 79 nm und eines bei 4 nm. Die Messkurve der geringsten untersuchten Konzentration von 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ besitzt nur ein Maximum bei 4 nm. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es bei höheren Konzentrationen in PBS zur Aggregation des Proteins kommt. Mit sinkender Konzentration scheint sich diese Aggregation zu vermindern. Da im Rahmen dieser Arbeit mit Konzentrationen bis maximal 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gearbeitet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass eine Proteinaggregation während der Versuche zu vernachlässigen ist. Hinsichtlich des Aggregationsverhaltens unterscheidet sich damit das VEGF deutlich vom BMP-2, mit dem ähnliche Untersuchungen in vorherigen Arbeiten durchgeführt wurden. Letztgenanntes neigt in PBS schon bei geringeren Konzentrationen (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) zur Bildung größerer Aggregate.^[222]

Bei Betrachtung des absoluten Wertes des hydrodynamischen Durchmessers fällt auf, dass dieser deutlich kleiner ist, als die Dimerstruktur des VEGFs vermuten lässt. Die exakten Ausmaße des Proteins sind nicht bekannt, aber wegen seiner Ähnlichkeit zum PlGF, dessen Ausmaße 7 nm x 3.5 nm x 2.5 nm umfassen, würde ein hydrodynamischer Durchmesser über 7 nm erwartet werden. Diese Diskrepanz kann auf Messungenauigkeiten des DLS-Geräts zurückgeführt werden. Für die Kalkulation des hydrodynamischen Radius´ aus der Fluktuation der Lichtstreuung werden einerseits sphärische Partikel angenommen, was für das VEGF nicht gegeben ist. Andererseits sind die eingesetzten Konzentrationen sehr gering, was ebenfalls die fehlerhaften Absolutwerte verursachen könnte. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse, dass sowohl die Proteinkonzentration als auch das Medium einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des VEGFs haben.

Zusätzlich wurde das Zeta-Potential bei der Probe mit der VEGF-Konzentration von 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Wasser gemessen. Der Wert belief sich auf 17 ± 6 mV.

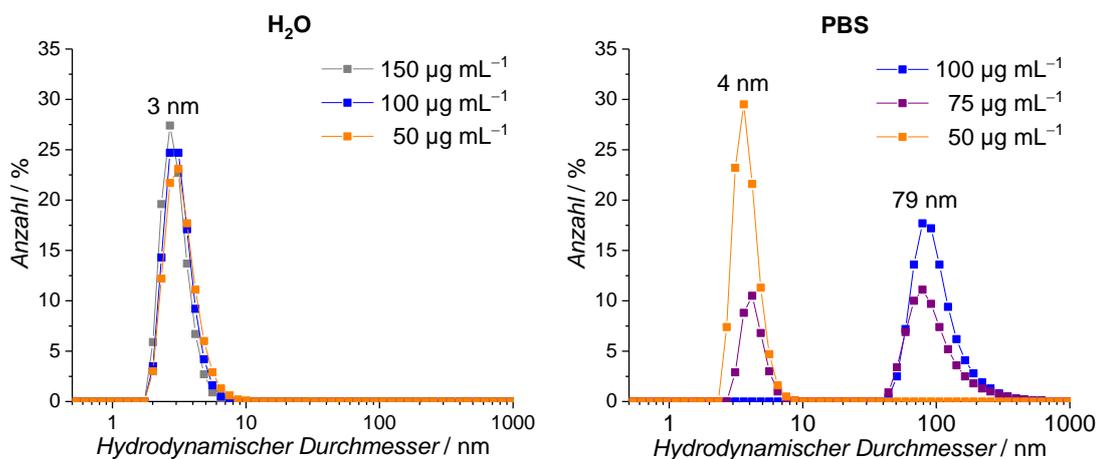


Abbildung 4.42: Ergebnisse der DLS-Messungen von VEGF-Lösungen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Links: Hydrodynamischer Durchmesser mit Wasser als Medium; rechts: Hydrodynamischer Durchmesser mit PBS als Medium.

4.3.2 Mögliche Wechselwirkungen zwischen VEGF und NPSNPs

Die Experimente zur Immobilisierung von VEGF auf den *sp*-NPSNPs sowie die anschließende Freisetzung fanden in PBS (pH 7.4) statt. VEGF besitzt seinen isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von etwa 8.5 und ist somit ein basisches Protein, dessen positiv geladene Bereiche unter den genannten Freisetzungsbedingungen überwiegen. Für die Immobilisierung des Wachstumsfaktors auf der Oberfläche der nanoporösen Silica-Nanopartikel spielen die Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der Oberflächenmodifizierung und dem VEGF eine entscheidende Rolle. Dabei kann es in Abhängigkeit der Modifizierung beispielsweise zu Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen oder zu einer Kombination aus mehreren dieser Interaktionen kommen. In Abbildung 4.43 sind diese für die erprobten Silica-Oberflächen zusammen mit einem VEGF-Monomer, bei dem die hydrophoben und polaren Bereiche farblich visualisiert wurden, schematisch dargestellt.

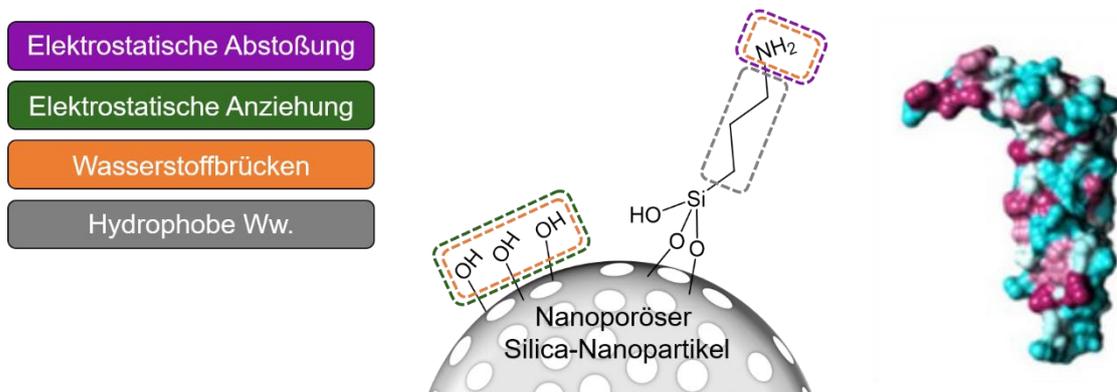


Abbildung 4.43: Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkungen zwischen VEGF und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten (NPSNP) und amino-modifizierten (NPSNP-NH₂) Silica-Nanopartikel. Zusätzlich ist eine farblich codierte Darstellung der hydrophoben (cyan) und polaren (magenta) Bereiche eines VEGF-Monomers zu sehen.^[266]

Die unmodifizierten Silica-Nanopartikel verfügen über zahlreiche Silanolgruppen auf der Oberfläche, mit denen in PBS neben schwachen Wasserstoffbrückenbindungen auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Nanopartikeloberfläche und den positiv geladenen Bereichen des Proteins möglich sind.

Im Vergleich dazu besitzen die amino-modifizierten NPSNPs in PBS ein leicht positives Zeta-Potential, das auf die eingeführten Aminogruppen zurückzuführen ist. Eine Immobilisierung über elektrostatische Anziehungskräfte kann nur mit negativ geladenen Bereichen des Proteins stattfinden. Da diese jedoch auf der Oberfläche des VEGFs bei einem pH-Wert von 7.4 kaum vorliegen, sind andere Wechselwirkungen für die Adsorption des Wachstumsfaktors verantwortlich. Mittels der Propylen-Kette in den funktionellen Gruppen sind hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Regionen des Proteins möglich. Zusätzlich kann es zu Wasserstoffbrückenbindungen kommen.

Darüber hinaus beeinflusst die Anwesenheit von BSA im verwendeten Immobilisierungsmedium die möglichen Wechselwirkungen. BSA hat einen isoelektrischen Punkt von 4.7^[267] und besitzt unter den Bedingungen eine negative Oberflächenladung. Damit sind elektrostatische Anziehungskräfte zum VEGF-Dimer möglich.

Diese Argumentationen zeigen, dass die nicht-kovalente Anbindungen von Proteinen über physikalische Interaktionen sehr komplex sind und sich deren tatsächliche Einflüsse nur schwer vorhersagen und quantifizieren lassen.^[221]

4.3.3 Quantifizierung der immobilisierten VEGF-Mengen

Die Immobilisierung von VEGF auf unmodifizierte sowie amino-modifizierte *sp*-NPSNPs erfolgte durch Inkubation von 4 mg der jeweiligen Nanopartikelsorte mit einer VEGF-Lösung, deren Konzentration $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ oder $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS (0.1 % BSA) betrug. Die immobilisierten VEGF-Mengen auf den entsprechenden *sp*-NPSNPs wurden anschließend indirekt mithilfe der ELISA-Methode bestimmt. Dafür wurden die VEGF-Konzentrationen in dem jeweiligen Immobilisierungsüberstand und in der Waschlösung quantifiziert und von den bekannten Ausgangskonzentrationen subtrahiert. In Abbildung 4.44 sind diese Konzentrationen zusammen mit den Konzentrationen der Ausgangslösungen und den sich daraus ergebenden Beladungseffizienzen dargestellt.

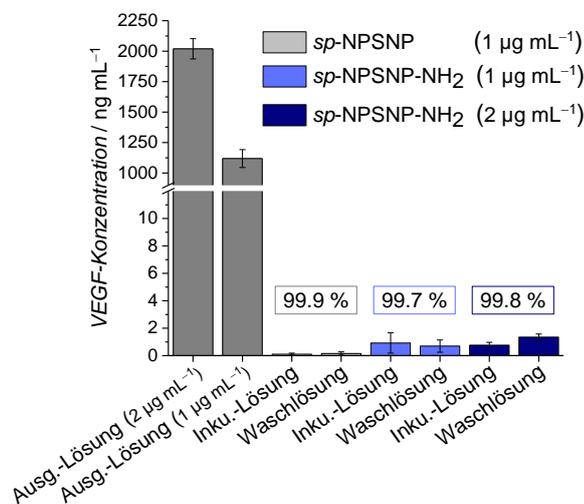


Abbildung 4.44: Darstellung der ermittelten VEGF-Konzentrationen in den Ausgangslösungen und den jeweiligen Inkubations- bzw. Waschlösungen sowie Angaben zu den verwendeten Inkubationskonzentrationen des VEGFs in PBS (0.1 % BSA) und den Beladungseffizienzen.

Der Abbildung 4.44 ist zu entnehmen, dass die ermittelten Konzentrationen der VEGF-Ausgangslösung gut mit den theoretischen Konzentrationen von 2000 ng mL^{-1} bzw. 1000 ng mL^{-1} übereinstimmen. Die VEGF-Gehalte in den Immobilisierungsüberständen und in den Waschlösungen liegen im unteren ng mL^{-1} -Bereich. Damit ergeben sich sowohl für die unmodifizierten als auch für die amino-modifizierten Silica-Nanopartikel Beladungseffizienzen von über 99 %. Eine Erhöhung der Immobilisierungskonzentration von 1000 ng mL^{-1} auf 2000 ng mL^{-1} bei den amino-modifizierten Silica-Nanopartikeln

zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Beladungseffizienz. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentrationen ergeben sich bei einer Ausgangskonzentration von $1\,000\text{ ng mL}^{-1}$ Beladungen von $200\text{ ng VEGF pro Milligramm Nanopartikel}$. Demgemäß ist der Wert für eine Ausgangskonzentration von $2\,000\text{ ng mL}^{-1}$ doppelt so groß (400 ng mg^{-1}). Diese Angaben gelten allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Proteinmoleküle keinen Denaturierungseffekten unterliegen, welche die immunologische Aktivität beeinträchtigen. Nicht immobilisierte, aber denaturierte VEGF-Moleküle könnten nicht zum ELISA-Signal beitragen und somit die indirekt bestimmten Immobilisierungsmengen erhöhen.

Die theoretisch mögliche VEGF-Menge, die an die Oberfläche der nanoporösen Silica-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 46 nm in einer Monoschicht adsorbieren kann, lässt sich mithilfe einiger Annahmen abschätzen (s. Abschnitt 7.3.4 im Anhang, vgl. Berechnungen von Huang *et al.*^[268] sowie Schmidt^[221]). Analog zu den Berechnungen für die maximale siRNA-Immobilisierungsmenge wurde dabei angenommen, dass die Dichte der nanoporösen Silica-Nanopartikel 1 g cm^{-3} beträgt. Dieser Wert wurde aus dem Literaturwert für Stöber-Partikel (2 g cm^{-3})^[246] unter Berücksichtigung einer Porosität von 50% abgeleitet. Da die exakte Größe des verwendeten VEGF₁₆₅-Dimers nicht bekannt ist, wurde die zweidimensionale Abmessung eines PlGF-Dimers ($7\text{ nm} \times 3.5\text{ nm}$)^[269] wegen seiner Zugehörigkeit zur VEGF-Familie verwendet. Die resultierende maximale VEGF-Immobilisierungsmenge beläuft sich auf $338\text{ }\mu\text{g VEGF pro Milligramm Nano-partikel}$ ($271\text{ VEGF-Moleküle pro Nanopartikel}$). Im Vergleich zu der immobilisierten Menge von $0.4\text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$, die bei einer Inkubationskonzentration von $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ erhalten wurde, könnte demnach nach Bedarf noch deutlich mehr VEGF auf der Oberfläche immobilisiert werden.

Unter den gegebenen Immobilisierungsbedingungen lag neben dem VEGF mit einer Konzentration von $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ das Protein BSA in Lösung vor, welches ebenfalls an der Oberfläche der Silica-Nanopartikel adsorbieren konnte (insgesamt $80\text{ }\mu\text{g}$ in 0.8 mL). Aus diesem Grund wurden zusätzliche Berechnungen für eine Immobilisierung des BSAs auf die Silica-Nanopartikel durchgeführt (ebenfalls Anhang 7.3.4). Dabei ergab sich ein Wert von $258\text{ }\mu\text{g Protein pro Milligramm Nanopartikel}$. Da die Summe der bei den Versuchen vorhandenen Proteine ($0.4\text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$ VEGF und $20\text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$ BSA) deutlich unterhalb der maximalen Beladungsmenge liegt, sollte die vollständige Immobilisierung von VEGF durch die Anwesenheit von BSA nicht beeinträchtigt werden.

Die Ergebnisse einer vollständigen Immobilisierung des dargebotenen Wachstumsfaktors stehen im Einklang mit vorherigen Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe Behrens. Unter ähnlichen Bedingungen wurde bereits gezeigt, dass sich BMP-2, BDNF und TGF- β 3 auf NPSNPs immobilisieren lassen.^[221,222]

4.3.4 Freisetzung von VEGF von *sp*-NPSNPs

Das Freisetzungsverhalten von VEGF wurde im Anschluss an die Immobilisierung untersucht. Dazu wurden zu den VEGF-beladenen nanoporösen Silica-Nanopartikeln (4 mg *sp*-NPSNP bzw. *sp*-NPSNP-NH₂) 800 µL PBS (0.1 % BSA) gegeben und für bestimmte Zeit bei 37 °C gelagert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Silica-Partikel durch Zentrifugation vom überstehenden Medium separiert, die Medien abgenommen und durch frische PBS-Lösungen ersetzt. Anschließend wurden die ins Medium abgegebenen Proteinmengen über einen ELISA quantifiziert und kumulativ aufgetragen (Abbildung 4.45). Die ermittelten Freisetzungsmengen nach 99 Tagen sind in Tabelle 4.11 mit dem sich daraus ergebenden prozentualen Anteil bezogen auf die Immobilisierung aufgelistet.

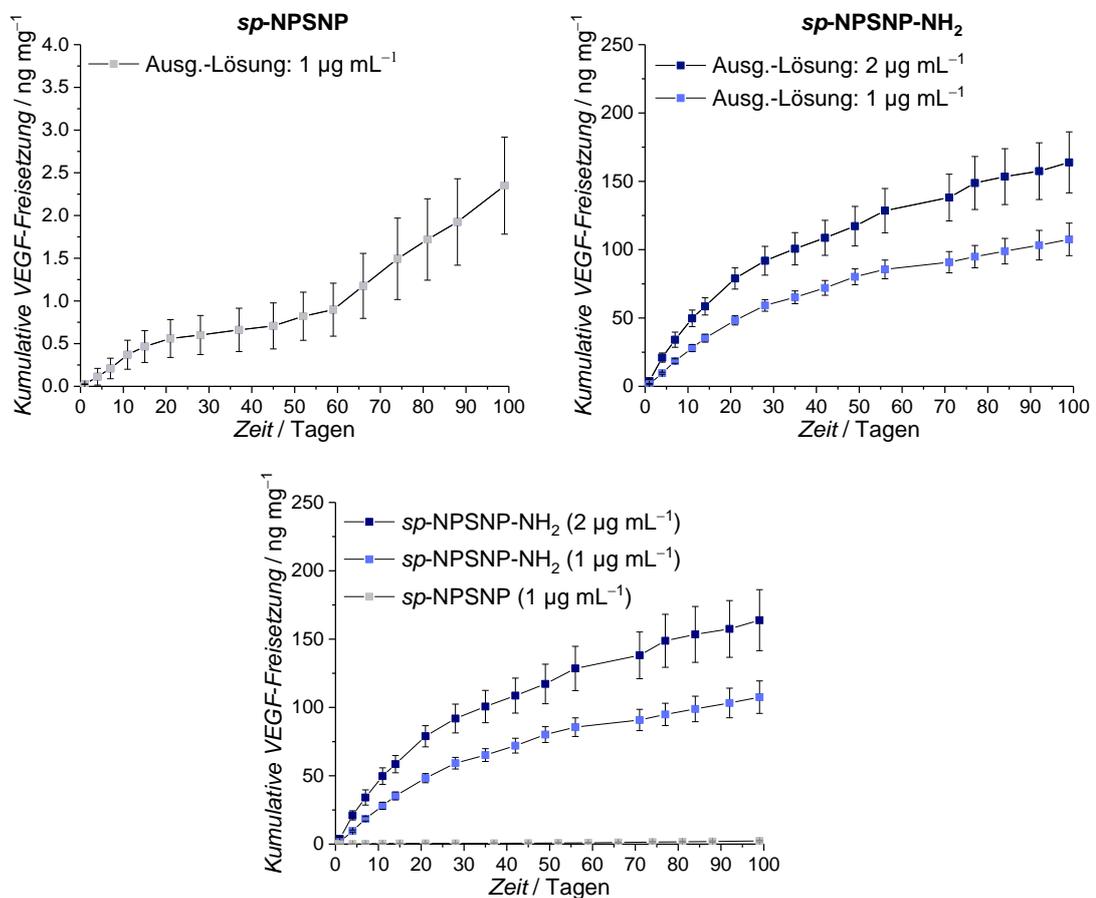


Abbildung 4.45: Auftragung der kumulativen VEGF-Freisetzung von unmodifizierten *sp*-NPSNPs (oben links) und von amino-modifizierten *sp*-NPSNPs (oben rechts) in PBS (0.1 % BSA) bei 37 °C über einen Zeitraum von 99 Tagen. Zusätzlich ist eine kombinierte Darstellung der einzelnen Graphen (unten) zu sehen.

Tabelle 4.11: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Freisetzungsexperimenten.

	Immobilisierte VEGF-Menge / ng mg ⁻¹	Freigesetzte VEGF-Menge / ng mg ⁻¹	Freigesetzter Anteil / %
<i>sp</i> -NPSNP	200	2.4 ± 0.6	2 ± 1
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂	200	107.5 ± 11.9	54 ± 6
<i>sp</i> -NPSNP-NH ₂	400	163.8 ± 22.4	41 ± 6

Die Diagramme zeigen, dass sich sowohl die Freisetzungsprofile als auch die freigesetzten VEGF-Mengen der unmodifizierten und der amino-modifizierten *sp*-NPSNPs deutlich unterscheiden. Bei den unmodifizierten *sp*-NPSNPs wurden in den ersten 60 Tagen 0.9 ng mg⁻¹ abgegeben. Danach erhöhte sich die freigesetzte Menge in den folgenden Tagen fast linear, sodass nach 99 Tagen 2.4 ng mg⁻¹ (2 %) abgegeben wurden. Der Anstieg zum Ende des Freisetzungsexperiments lässt vermuten, dass die Abgabe des Proteins noch nicht beendet ist. Im Vergleich zu den unmodifizierten *sp*-NPSNPs wurden insgesamt 107.5 ng mg⁻¹ (54 %) von den amino-modifizierten Nanopartikeln mit gleicher Beladungsmenge nach 99 Tagen freigesetzt. Bei dem Ansatz mit doppelter Immobilisierungsmenge konnten in dem gleichen Zeitraum 163.8 ng mg⁻¹ (41 %) abgegeben werden, wobei der Verlauf des Freisetzungsprofils gleich blieb. Auch diese Freisetzungskurven zeigen noch keine Sättigung. Bei der Freisetzung von den amino-modifizierten Nanopartikeln verringern sich die Freisetzungsraten des VEGFs mit der Zeit kontinuierlich. Während bei Partikeln mit einer Beladung von 0.2 µg mg⁻¹ in der ersten Woche noch 2.6 ng mg⁻¹ pro Freisetzungstag abgegeben wurden, sinkt diese Rate auf 0.9 ng mg⁻¹ pro Tag in den letzten sieben Tagen des Freisetzungszeitraums. Für die doppelte Beladungsmenge belaufen sich die Raten am Anfang auf 4.9 ng pro Tag bzw. am Ende auf 0.6 ng pro Tag. Diese Freisetzungsprofile können einer Kinetik erster Ordnung zugeordnet werden, bei der die Freisetzung durch die Diffusion, die Auflösung der Matrix und durch Wechselwirkung zwischen Protein und Trägermaterial beeinflusst wird.^[270]

Wie bei der siRNA-Freisetzung beruht die treibende Kraft für eine Freisetzung auf dem VEGF-Konzentrationsgradienten zwischen der Nanopartikeloberfläche und dem umgebenden Medium. Das Maß der Freisetzung wird allerdings von den Wechselwirkungen des VEGFs mit der Nanopartikeloberfläche beeinflusst. Die Ergebnisse der VEGF-Freisetzung deuten darauf hin, dass insbesondere die elektrostatische Anziehungskraft zwischen den unmodifizierten Nanopartikeln und dem VEGF für eine stärkere Anhaftung auf der Oberfläche sorgt, wodurch die Freisetzung vermindert wird. Im Gegensatz dazu ist die elektrostatische Anziehung zwischen den amino-modifizierten Nanopartikeln und dem VEGF vermutlich schwächer ausgeprägt, da beide Komponenten ein positives Zeta-Potential in PBS aufweisen. In diesem Fall wird die Freisetzung wahrscheinlich über die

hydrophoben Wechselwirkungen reguliert und durch die elektrostatische Abstoßung begünstigt. Angesichts der erhaltenen Ergebnisse kann demnach gefolgert werden, dass die APTES-Modifizierung der Silica-Oberfläche eine kontinuierliche VEGF-Freisetzung über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Ähnliches wurde bereits in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Behrens festgestellt.^[221,222] Beispielsweise konnte für den Wachstumsfaktor TGF- β 3 unter ähnlichen Bedingungen mit amino-modifizierten NPSNPs eine Menge von 115 ng mg^{-1} (58 % der Immobilisierungsmenge) innerhalb von 77 Tagen freigesetzt werden.^[221] Die in dieser Arbeit erhaltenen VEGF-Freisetzungsmengen für amino-modifizierte NPSNPs mit gleicher Beladung ($0.2 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$) lagen nach 77 Tagen bei 95 ng mg^{-1} (48 %), was derselben Größenordnung entspricht.

Neben der Oberflächenmodifizierung hat die Degradation der Nanopartikel unter den gegebenen Bedingungen einen Einfluss auf die Freisetzung des Wachstumsfaktors. Dabei kann eine Auflösung der Partikel die Abgabe des Wachstumsfaktors begünstigen. Um die Morphologie, die Größe und das Porensystem der Partikel nach der 99-tägigen Freisetzung zu beurteilen, wurden deswegen TEM-Aufnahmen angefertigt. Sie sind in Abbildung 4.46 zusammen mit TEM-Aufnahmen der Partikel nach der Synthese dargestellt.

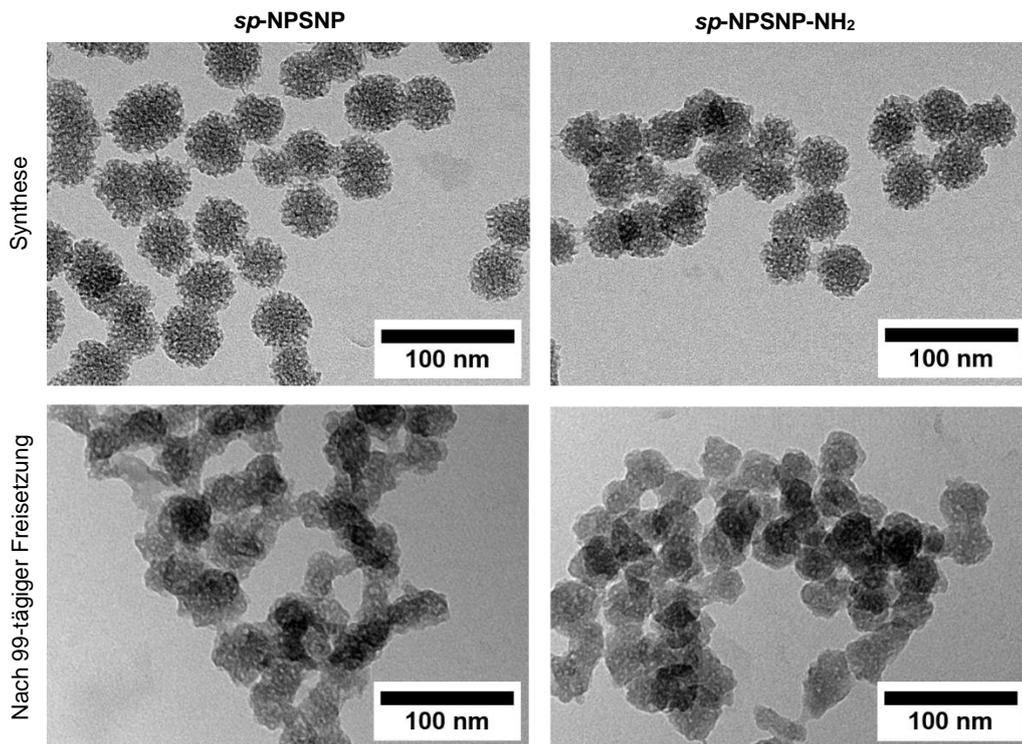


Abbildung 4.46: TEM-Aufnahmen der unmodifizierten (links) und der amino-modifizierten *sp*-NPSNPs (rechts) nach der Synthese und nach einer 99-tägigen Freisetzung von VEGF.

Im Vergleich zu den frisch synthetisierten Partikeln zeigen sowohl die unmodifizierten als auch die amino-modifizierten Nanopartikel nach der Freisetzung deutliche Degradationserscheinungen. Die anfangs sphärische Struktur der Partikel ist nunmehr unförmig.

Es sind auch Verwachsungen zwischen den Partikeln zu beobachten, die auf eine Ostwald-Reifung zurückzuführen sind (vgl. Abschnitt 4.2.3). Der Partikeldurchmesser der anfänglich 46 ± 3 nm großen Partikel ist auf 34 ± 4 nm (*sp*-NPSNPs) bzw. auf 37 ± 6 nm (*sp*-NPSNPs-NH₂) gesunken. Außerdem erscheint das Porensystem deutlich diffuser, was für eine Umstrukturierung der Silica-Matrix spricht. Hinsichtlich des Fortschritts der Degradation sind zwischen den beiden Nanopartikelsorten keine offensichtlichen Unterschiede auszumachen. Trotz der langen Versuchslaufzeit von 99 Tagen ist keine vollständige Degradation zu verzeichnen. Dies kann auf die verwendete Konzentration der Nanopartikel zurückgeführt werden, die mit 5 mg mL^{-1} erheblich über der Löslichkeit von porösen Silica-Nanopartikeln in PBS lag (0.120 mg mL^{-1}).^[47] Das Medium wurde im Verlauf des Freisetzungsexperiments fünfzehnmal gewechselt, sodass sich max. 1.4 mg Silica-Material der eingangs 4 mg in 800 μL Medium hätten lösen können. Die unvollständige Degradation der Nanopartikel unter diesen Bedingungen könnte auch die nicht beendete Freisetzung erklären. Nach 99 Tagen Freisetzung besteht demnach immer noch die Möglichkeit, dass VEGF-beladene Nanopartikel im Medium vorliegen und das Protein abgeben können.

Ausführlichere Untersuchungen zum Auflösungsverhalten der Nanopartikel unter den gegebenen Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen wurden von N. Schmidt der Arbeitsgruppe Behrens durchgeführt. Sie konnte anhand von TEM-Aufnahmen zeigen, dass die Immobilisierungsbedingungen (24 Stunden in PBS (0.1 % BSA) bei 4 °C) keine Auswirkungen auf die Morphologie und Größe der un- und amino-modifizierten Nanopartikel haben. Über Physisorptionsmessungen der Nanopartikel nach der simulierten Immobilisierung zeigte sich jedoch eine Verringerung der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens. Des Weiteren wurde festgestellt, dass sich das Degradationsverhalten der un- und amino-modifizierten Nanopartikel kaum voneinander unterschied.^[221]

Für eine ausführlichere Bestimmung der Degradationskinetik sollten neben TEM-Aufnahmen auch ICP-Messungen zur Ermittlung des Si-Gehaltes im Medium herangezogen werden. Ferner würde es sich anbieten, Bedingungen zu wählen, welche der Anwendung in einer Zellkultur näherkommen, da Einflüsse wie die Anwesenheit von Proteinen sowie die Konzentration einen Einfluss auf die Degradationskinetik haben (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Ein weiterer Aspekt, der sich entscheidend auf die VEGF-Freisetzungsmenge auswirken könnte, ist die Stabilität des Proteins unter den verwendeten Bedingungen, auf die im Unterkapitel 4.3.5 eingegangen wird.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich trotz gleicher Immobilisierungsmengen für die unmodifizierten und amino-modifizierten *sp*-NPSNPs ein anderes Freisetzungsprofil sowie unterschiedliche Freisetzungsmengen ergeben. Während von den *sp*-NPSNPs lediglich 2 % der anfänglichen Beladung wieder abgegeben wurden, belief sich die Menge bei den *sp*-NPSNP-NH₂ auf 65 %. Mit einer Verdopplung der Beladungsmenge bei den

amino-modifizierten Nanopartikeln konnte auch die abgegebene Menge gesteigert werden. Alle Freisetzungen sind nach diesem Zeitraum noch nicht beendet. Dies konnte mit einer noch nicht vollständigen Degradation in Zusammenhang gebracht werden.

4.3.5 Degradationsverhalten von VEGF unter den Immobilisierungs- und Freisetzungsbedingungen

Für eine Aussage hinsichtlich der Degradation des VEGFs während der Immobilisierung bzw. der Freisetzung wurden VEGF-Lösungen mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ohne Zusatz von Nanopartikeln unter ähnlichen Bedingungen behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten der Beladungs- und Freisetzungsprozedur wurden jeweils drei VEGF-Aliquote erst eingefroren und anschließend gesammelt hinsichtlich ihres VEGF-Gehalts untersucht. Die mit einem ELISA ermittelten Konzentrationen sind in Abbildung 4.47 dargestellt.

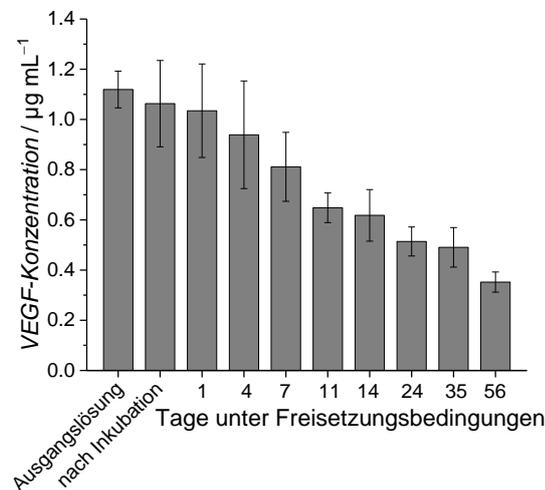


Abbildung 4.47: Mittels ELISA bestimmte VEGF-Konzentrationen einer $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ VEGF-Lösung nach einer Simulation des Immobilisierungsprotokolls und nach unterschiedlich langer Lagerung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ zur Nachahmung der Freisetzungsbedingungen.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Inkubationsbedingungen, d. h. 24 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Thermoschüttler mit anschließender Zentrifugation, kaum Auswirkungen auf die Stabilität der VEGF-Moleküle hatten. Die ermittelte Konzentration der Ausgangslösung von ca. $1.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ entspricht unter Berücksichtigung der Standardabweichung ($\pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) der Konzentration von $1.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ nach 24-stündiger simulierter Immobilisierung. Auch nach einem Tag der Lagerung unter Freisetzungsbedingungen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) konnte eine ähnliche Konzentration detektiert werden. Dies änderte sich allerdings im weiteren Verlauf, und die Konzentration des nachweisbaren VEGF sank stetig. Nach vier Tagen konnten bereits nur noch 84 % und nach 24 Tagen lediglich 46 % nachgewiesen werden. Nach 56 Tagen ist der quantifizierte VEGF-Gehalt mit $0.35 \mu\text{g mL}^{-1}$ auf 31 % der eingesetzten Menge gesunken. Die Ergebnisse deuten auf eine graduelle Denaturierung bzw. Degradation des VEGFs mit der Zeit hin. Die Denaturierung kann mit einer Konformationsänderung des Proteins in Lösung erklärt werden, da die native

Struktur eines Proteins üblicherweise nur eine geringe thermodynamische Stabilität aufweist.^[271] Die von den Nanopartikeln freigesetzten VEGF-Moleküle unterliegen zwar auch solchen strukturellen Veränderungen, dass jedoch über einen Zeitraum von 99 Tagen kontinuierlich VEGF freigesetzt werden konnte, spricht für einen stabilisierenden Effekt der Nanopartikel auf die Proteine. Ein ähnliches Verhalten wurde auch von N. Schmidt mit den gleichen Nanopartikeln und den Wachstumsfaktoren BDNF und TGF- β 3 beobachtet.^[221] Dies bestätigt die bereits in der Literatur beschriebene Stabilisation von Proteinen durch die Immobilisierung auf nanoskaligen Materialien.^[272]

4.4.6 *Tube-Assay*

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die entwickelten VEGF-Nanoträger in ein Fibringerüst einzuarbeiten, sodass durch eine graduierte und kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors von den Nanopartikeln die *Tube*-Bildung von Endothelzellen in das Gerüst hinein unterstützt wird. Nachdem die Immobilisierung des VEGFs und die anschließende Freisetzung untersucht wurde, folgen in diesem Abschnitt die *in vitro*-Testungen des entwickelten Freisetzungssystems. Da sich die amino-modifizierten im Vergleich zu den unmodifizierten NPSNPs durch eine langfristige VEGF-Freisetzung auszeichneten, wurden ausschließlich diese Nanopartikel verwendet. Das Potential einer Substanz, die Kapillarbildung von Endothelzellen und damit auch die Angiogenese zu unterstützen, wird häufig mit einem *Tube*-Assay bewertet. Dabei wird anhand von mikroskopischen Bildern das Ausmaß der Kapillarbildung von Endothelzellen nach der Inkubation mit dem zu testenden Stoff bewertet. Der erste *Tube*-Assay, der im Rahmen dieser Arbeit mit den nanoporösen Silica-Nanopartikeln durchgeführt wurde, verlief nach einer Vorschrift von Lau *et al.* in einer 3D-Kultur mit rot fluoreszierenden Endothelzellen (RFP-HUVECs) in Kokultur mit Stammzellen aus Fettgewebe (*adipose-derived stem cells*, ASCs). Letztgenannte sollten durch die Sekretion von proangiogenen Wachstumsfaktoren (darunter auch VEGF) bzw. Mediatoren (Botenstoffe) die *Tube*-Bildung unterstützen.^[273] Für den Assay wurde zunächst eine Thrombin-Lösungen vorgelegt. Anschließend wurde eine Fibrinogen-Lösung, in der sowohl die RFP-HUVECs als auch ASCs in einem 1:1-Verhältnis vorlagen, mit der Thrombin-Lösung vermischt. Um den Einfluss der VEGF-beladenen Silica-Nanopartikel zu untersuchen, wurden 20 μg NPSNPs (Beladung: 0.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$) ebenfalls in die Fibrinogen-Lösung eingearbeitet. Nach der Polymerisation wurde Zellkulturmedium auf das entstandene Fibrin gegeben. Dabei enthielt das Medium bei Ansätzen mit Silica-Nanopartikeln kein VEGF, während bei den Kontrollen eine VEGF-Konzentration von 40 ng mL^{-1} VEGF im Medium vorlag. Es wurden zwei verschiedene Fibrinogen-Konzentrationen untersucht (1 mg mL^{-1} sowie 5 mg mL^{-1}), wodurch sich verschiedene Polymerisierungsgrade und damit auch verschiedene Festigkeiten ergaben. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde die *Tube*-Bildung nach zwei sowie nach fünf Tagen beurteilt (Abbildung 4.49 und Abbildung 4.50).

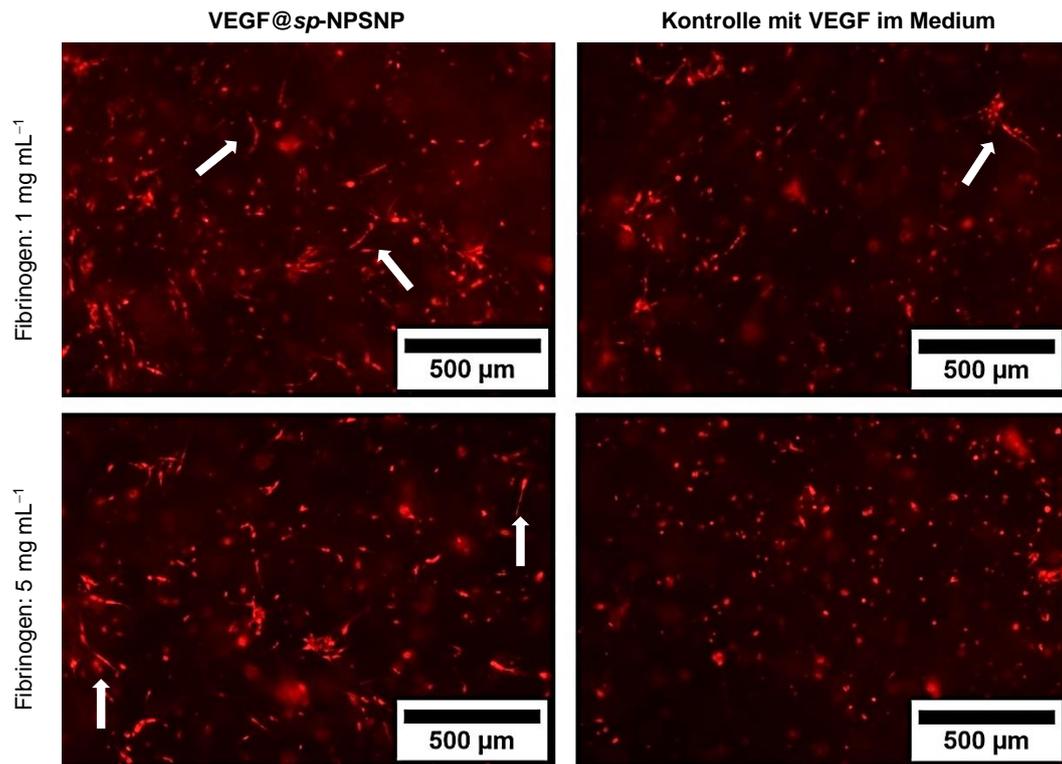


Abbildung 4.49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *Tube*-Assays mit RFP-HUVECs zwei Tage nach dem Start. Links: Fibrin-Gel mit VEGF-beladenen Silica-Nanopartikeln; rechts: Kontrolle ohne Nanopartikel, aber mit VEGF im Medium.

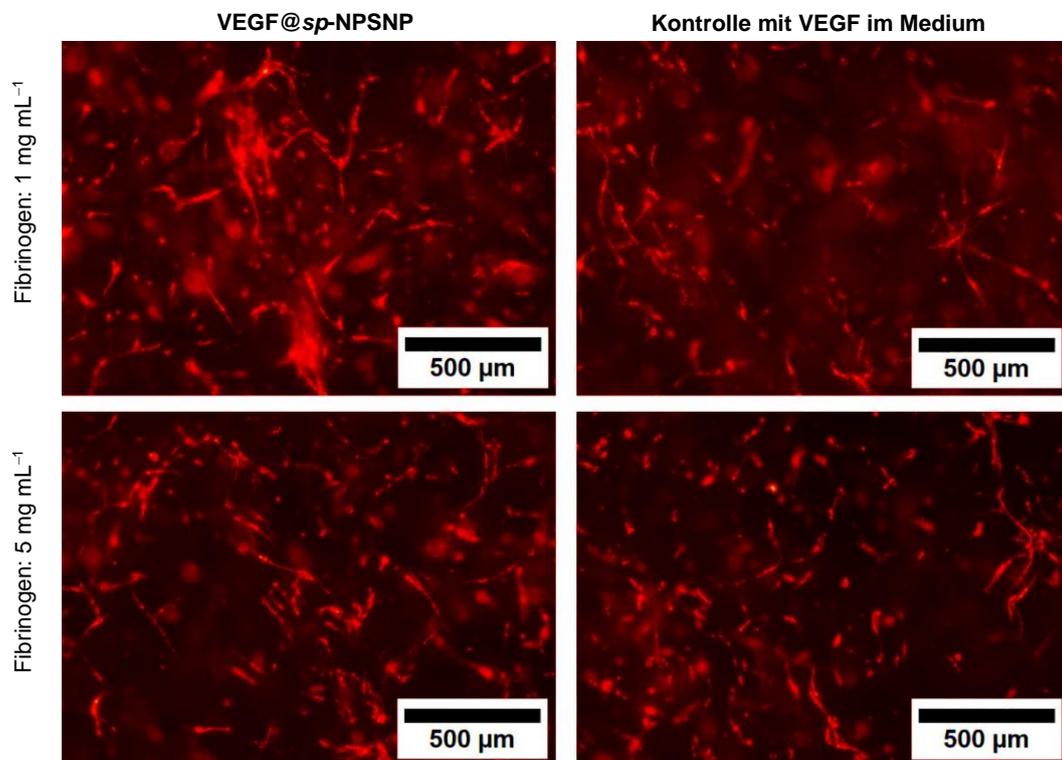


Abbildung 4.50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *Tube*-Assays fünf Tage nach dem Start. Links: Fibrin-Gel mit VEGF-beladenen Silica-Nanopartikeln; rechts: Kontrolle ohne Nanopartikel, aber mit VEGF im Medium. Zusätzliche Angabe der Fibrinogen-Konzentration.

Es ist zu erkennen, dass sich nach zwei Tagen zum Teil kleine *Tubes* gebildet haben (mit Pfeilen gekennzeichnet). Für beide Fibrinogen-Konzentrationen erscheint die Ausbildung der *Tubes* bei den Proben mit VEGF-beladenen Silica-Nanopartikeln im Fibrin stärker ausgeprägt: Bei einer Fibrinogen-Konzentration von 1 mg mL^{-1} können mit NPSNPs mehr dünne Kapillaren ausgemacht werden als bei der Kontrolle mit VEGF im Medium. Bei dem Fibringel mit 5 mg mL^{-1} -Fibrinogen sind bei der Probe mit Nanopartikeln ebenfalls schon einige *Tubes* zu sehen, im Vergleich mit der geringeren Fibrinogen-Konzentration fällt deren Anzahl aber geringer aus. Bei der Kontrolle mit VEGF im Medium sind noch keine Kapillaren zu erkennen. Nach fünf Tagen haben sich bereits deutlich erkennbare netzwerkartige Kapillaren gebildet. In dem geringer konzentrierten Gel wirken diese länger und dicker. Außerdem scheinen die *Tubes* bei den Fibringelen mit VEGF-beladenen Nanopartikeln besser ausgeprägt zu sein als bei den Gelen mit löslichem VEGF im Medium, wobei die Unterschiede untereinander im Vergleich zu Abbildung 4.49 geringer ausfallen.

Die Beobachtung einer schlechteren Ausbildung der *Tubes* in höher konzentrierten Fibringelen kann auf einen gehemmten Transport der proangiogenen Faktoren durch die Matrix zurückgeführt werden.^[274] Zudem könnte ein dichteres Gel eine räumliche Restriktion für die migrierenden Zellen darstellen, sodass die Aussprossung teilweise inhibiert wird. Dass die Kapillarbildung mit VEGF-beladenen Nanopartikeln im Fibrin besser erscheint als bei der exogenen Zugabe von VEGF, kann mehrere Ursachen haben. Einerseits könnte das von den NPSNPs freigesetzte VEGF kürzere Diffusionswege besitzen und somit besser für die HUVECs zugänglich sein als VEGF, welches im überstehenden Medium zugesetzt wurde. Andererseits ist es möglich, dass neben dem VEGF auch die durch die Degradation der NPSNPs freigesetzten Si^{4+} -Ionen die Zellen positiv beeinflussen. Einige Studien deuten darauf hin, dass Si^{4+} -Ionen die Angiogenese fördern können. Es wird berichtet, dass diese Ionen hypoxische Zustände in Zellen imitieren und dadurch die Expression proangiogener Faktoren erhöhen.^[205,275,276] Darüber hinaus verändern die Silica-Nanopartikel die mechanischen Eigenschaften des Fibrins, was sich ebenfalls auf das Zellverhalten auswirken kann.^[277] Mit den Nanopartikeln wurden den Zellen insgesamt 8 ng VEGF dargeboten, während durch die verschiedenen Medienwechsel 24 ng lösliches VEGF bei den Kontrollen zur Verfügung standen. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf einen positiven Effekt von VEGF-beladenen Nanopartikeln auf die *Tube*-Bildung von Endothelzellen. Nichtsdestotrotz besteht die Herausforderung bei einem dreidimensionalen *Tube*-Assay in der Visualisierung des gebildeten Kapillarnetzwerks, welches sich aufgrund der Einbettung der Zellen in das Gel in alle drei Raumrichtungen erstreckt. Das verwendete Fluoreszenzmikroskop ermöglicht allerdings nur Aufnahmen einer Ebene, sodass sich viele Zellen außerhalb der Fokusebene befinden und nicht dargestellt werden können. Dies macht wiederum eine Beurteilung bzw. Auswertung anhand von Aufnahmen schwierig. Aus diesem Grund wurde der Aufbau abgewandelt und ein

2D-Assay durchgeführt. Zusätzlich wurde auch auf die Kokultur mit ASCs verzichtet, um lediglich die Auswirkungen einer Nanopartikelzugabe auf die Endothelzellen zu betrachten und zusätzliche Einflussfaktoren auszuschließen. Überdies wurde die VEGF-Beladung der Silica-Nanopartikel erhöht, um die von den Nanopartikeln abgegebenen VEGF-Mengen den exogen zugesetzten Mengen anzupassen. Dazu wurden folgende Überlegungen getätigt: Die Menge, die dem überstehenden Medium zugesetzt wird, beläuft sich auf 8 ng pro Medienwechsel, womit insgesamt 24 ng über einen Zeitraum von einer Woche zugegeben werden. Gemäß der Freisetzungskinetik aus Abschnitt 4.3.5 werden von den amino-modifizierten Silica-Nanopartikeln innerhalb der ersten fünf Tage ca. 5 % der VEGF-Beladungsmenge wieder freigesetzt. Um mit einer Beladung von $0.4 \mu\text{g mg}^{-1}$ auf die 24 ng zu kommen, müssten demnach ca. 1 mg Nanopartikel pro Fibringel verarbeitet werden, was experimentell allerdings nicht realisierbar ist. Aus Vorversuchen wurde eine praktikable Füllmenge von 30–40 μg Nanopartikel pro 50 μL Gel ermittelt. Mit der Annahme, dass von 38 μg Nanopartikel 24 ng VEGF freigesetzt werden und diese Menge 5 % der Beladung entspricht, müsste eine Immobilisierungsmenge von 12.5 μg VEGF pro Milligramm Nanopartikel vorliegen.

Mit den geänderten Immobilisierungsmengen wurden ebenfalls Beladungs- und Freisetzungsexperimente durchgeführt. Aus ökonomischen Gründen wurde der Ansatz von 4 mg Silica-Nanopartikel auf 200 μg Nanopartikel herunterskaliert. Außerdem wurde ein Freisetzungsvolumen von 200 μL gewählt, da dieses Volumen über den Fibringelen bei dem *Tube*-Assay in einer 96-Well-Platte vorlag. Die Nanopartikelkonzentration in Lösung sank damit von 5 mg mL^{-1} auf 1 mg mL^{-1} . Aus der Subtraktion der bestimmten Konzentration der Inkubationslösung und der Waschlösung von der theoretischen Ausgangskonzentration wurde schließlich indirekt auf die Immobilisierung geschlossen (Abbildung 4.51).

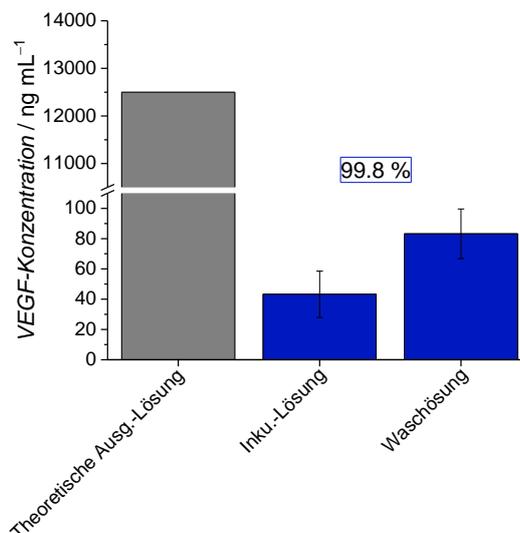


Abbildung 4.51: Theoretische Ausgangskonzentration für die Immobilisierungslösung zusammen mit den über einen ELISA ermittelten Konzentrationen der Inkubations- und der Waschlösung. Zusätzliche Angabe der Beladungseffizienz.

Die ermittelten Konzentrationen in der Inkubations- sowie der Waschlösung liegen im ng mL^{-1} -Bereich, womit die Immobilisierung bei über 99 % liegt und eine Beladung von $12.5 \mu\text{g}$ pro Milligramm erreicht wurde. Diese Angaben gelten allerdings nur unter der Bedingung, dass die Proteinmoleküle keinen Denaturierungseffekten unterliegen, welche die immunologische Aktivität beeinträchtigen. Die erhaltene Beladungsmenge liegt immer noch deutlich unterhalb der theoretisch berechneten von $338 \mu\text{g}$ VEGF pro Milligramm Nanopartikel (vgl. Anhang 7.3.4).

Im Anschluss an die Immobilisierung des Wachstumsfaktors an die Oberfläche der Nanopartikel erfolgten erneut Freisetzungsexperimente. In Anlehnung an die *in vitro*-Experimente wurde dabei alle zwei Tage das überstehende Medium gewechselt und durch frisches PBS (0.1 % BSA) ersetzt. Die kumulative Auftragung der via ELISA ermittelten VEGF-Mengen aus den Freisetzungüberständen ist in Abbildung 4.52 zu sehen.

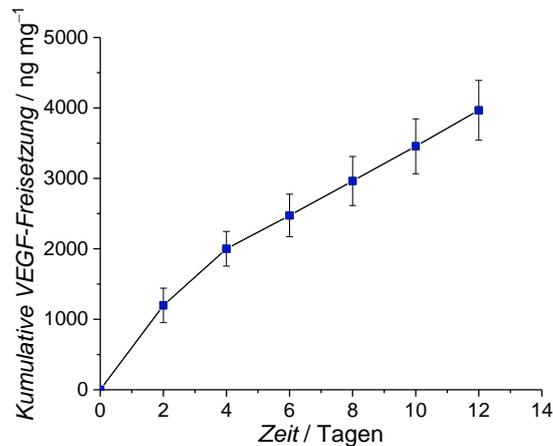


Abbildung 4.52: Kumulative VEGF-Freisetzung von amino-modifizierten *sp*-NPSNPs (Beladung: $12.5 \mu\text{g mg}^{-1}$) in PBS (0.1 % BSA) bei 37°C über einen Zeitraum von 12 Tagen.

Das Freisetzungsprofil verläuft fast linear mit einer VEGF-Abgabe von ca. 330 ng mg^{-1} pro Tag. Nach 12 Tagen wurden $3966 \pm 424 \text{ ng mg}^{-1}$ freigesetzt, was $32 \pm 3 \%$ der theoretischen Beladung entspricht. Bei den vorherigen Versuchen mit geringeren Beladungsmengen ($0.4 \mu\text{g mg}^{-1}$) waren es nach 11 Tagen $50 \pm 6 \text{ ng mg}^{-1}$ ($13 \pm 2 \%$) der zuvor immobilisierten Menge. Die Freisetzung kann wieder mit dem vorhandenen VEGF-Konzentrationsgradienten zwischen der Partikeloberfläche und dem umgebenden Medium erklärt werden. Die gesteigerten Mengen im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3.5 können einerseits auf den größeren Konzentrationsgradienten zurückgeführt werden, der dafür sorgt, dass mehr VEGF ins Medium abgegeben wird, andererseits ist die Partikelkonzentration in Lösung um ein Fünftel kleiner und das Medium wurde häufiger gewechselt. Diese Veränderung beschleunigt wahrscheinlich die Degradation der Partikel und begünstigt damit die VEGF-Abgabe.

Bei dem folgenden zweidimensionalen *Tube*-Assay wurde der Boden der Wells einer 96-Well-Platte mit einer Fibrinschicht ausgekleidet. Auf diese wurden in einem zweiten Schritt RFP-HUVECs (ohne ASCs) ausgesät. Danach wurden die Zellen mit einer zweiten Fibrinschicht bedeckt, wobei insgesamt vier verschiedene Ansätze als Dreifachbestimmung untersucht wurden. Bei dem ersten Ansatz enthielt die obere Fibrinschicht 20 μg VEGF-beladene Silica-Nanopartikel ($12.5 \mu\text{g mg}^{-1}$). Darüber hinaus wurden in einem Ansatz 10 μg VEGF-beladene sowie 10 μg unbeladene Nanopartikel eingearbeitet, um eine Variation in der dargebotenen VEGF-Menge zu erhalten. Als Kontrolle dienten Fibringele, in die keine Nanopartikel eingearbeitet waren. Bei diesen Proben wurde das VEGF über das überstehende Medium hinzugefügt. Zusätzlich wurden Fibringele untersucht, die 20 μg unbeladene NPSNPs-NH₂ enthielten. Bei diesen Proben wurde das VEGF ebenfalls über das Kulturmedium zugeführt. In Abbildung 5.54 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der vier verschiedenen Ansätze nach vier Tagen in Kultur dargestellt. Mithilfe der Software AngioTool wurden anhand der Aufnahmen die gebildeten *Tubes* hinsichtlich ihrer Dichte und ihrer Länge ausgewertet (Abbildung 5.55). Exemplarische Darstellungen einer solchen Auswertung befinden sich im Anhang (Abbildung 7.15). Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Ansätze sind keine auffälligen Unterschiede in Bezug auf die Dichte und die Länge der ausgebildeten *Tubes* auszumachen. Mit den beladenen Nanopartikeln im Fibrin konnten annähernd gleiche Ergebnisse erzielt werden wie mit exogen zugegebenem VEGF. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Anwesenheit der VEGF-beladenen Silica-Nanopartikel die Kapillarbildung der HUVECs bei dem zweidimensionalen *Tube*-Assay nicht beeinflusst. Allerdings unterschieden sich die insgesamt offerierten VEGF-Mengen der unterschiedlichen Ansätze deutlich voneinander. Während bei der exogenen Zugabe nach vier Tagen insgesamt 16 ng VEGF dargeboten wurde, belief sich die theoretische VEGF-Menge im Fibringel mit Silica-Nanopartikeln auf 250 ng bzw. 125 ng.

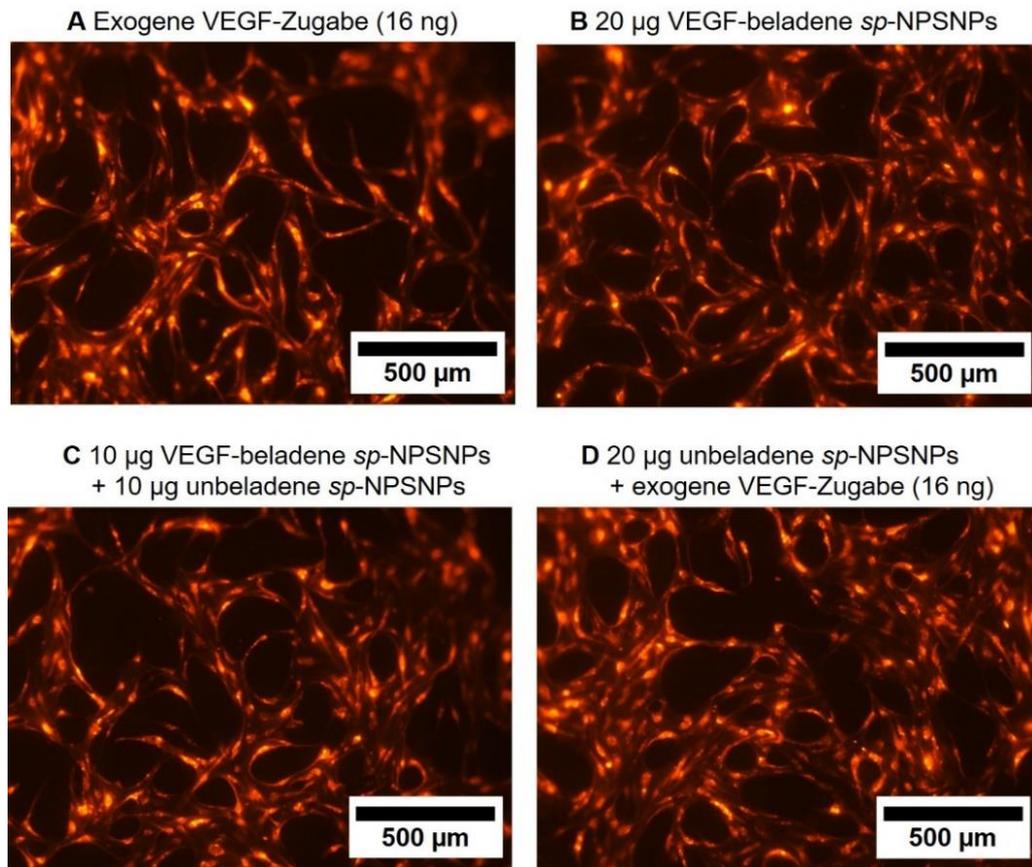


Abbildung 5.54: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines zweidimensionalen *Tube*-Assays vier Tage nach der Aussaat der Zellen.

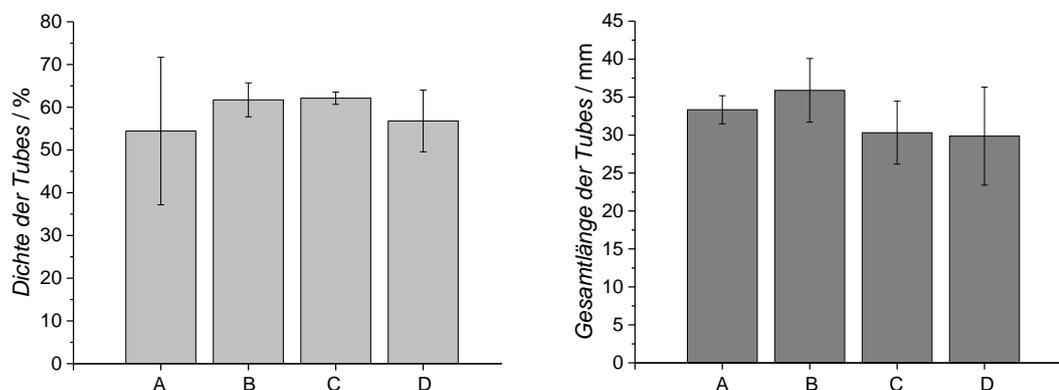


Abbildung 5.55: Resultate der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit der Software AngioTool. Links: Dichte der *Tubes*; rechts: Gesamtlänge der *Tubes* (N=2, n=3).

Um eine Aussage über die abgegebene VEGF-Menge von den Nanopartikeln im Fibrin-gel treffen zu können, wurde deswegen ein Freisetzungsexperiment unter ähnlichen Bedingungen wie bei dem *Tube*-Assay durchgeführt. Dazu wurden in Fibrin-gel VEGF-beladene Silica-Nanopartikel eingearbeitet und mit 200 µL Medium überschichtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Medien gewechselt und das VEGF in dem Überständen mittels ELISA quantifiziert. In Abbildung 5.56 sind die freigesetzten Mengen als kumulative Darstellung zu sehen.

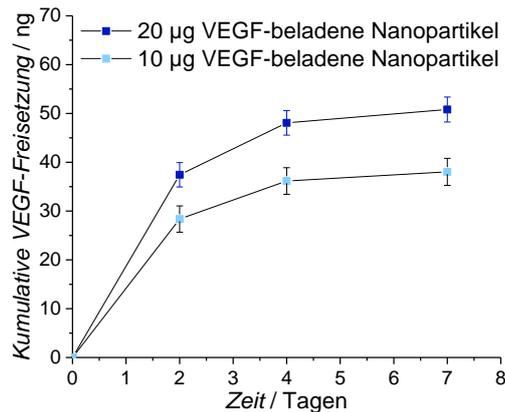


Abbildung 5.56: Kumulative VEGF-Freisetzung von Silica-Nanopartikeln, die in ein Fibringel eingearbeitet wurden.

Mit 20 µg VEGF-beladenen Silica-Nanopartikeln im Fibringel wurden über einen Zeitraum von einer Woche ca. 51 ± 3 ng VEGF ins Medium abgegeben. Dies entspricht mit $2.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ ca. 20 % der theoretisch vorhandenen VEGF-Menge. Ein Vergleich des Wertes mit der simulierten Freisetzung ohne Fibrin (Abbildung 5.52) zeigt eine gute Übereinstimmung. Bei letztgenanntem Experiment wurden nach sechs Tagen ca. $2.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ freigesetzt. Auffällig ist der Unterschied der Kurvenverläufe. Während bei der Freisetzung ohne Fibrin ein fast lineares Freisetzungsprofil erhalten wurde, das nach 12 Tagen noch keine Sättigung zeigt, flacht die Freisetzung aus dem Fibrin bereits nach sieben Tagen merklich ab. Dies spricht dafür, dass das umgebene Fibrin das Freisetzungsprofil des Wachstumsfaktors beeinflusst. Mit einer Verringerung der eingearbeiteten Menge VEGF-beladener Nanopartikel wurden nach einer Woche $38 \text{ ng} \pm 3 \text{ ng}$ VEGF (30 %) freigesetzt, was verdeutlicht, dass über den Anteil der Silica-Nanopartikel im Gel die Freisetzungsmenge gezielt den Anforderungen angepasst werden kann.

Mit der Annahme, dass die freigesetzte VEGF-Menge aus der simulierten Freisetzung ohne Zellen mit den Mengen bei dem zweidimensionalen *Tube*-Assay mit Endothelzellen übereinstimmt, würden sich deutliche Unterschiede bei der VEGF-Menge ergeben, die den Zellen zur Verfügung stand. Bei den Proben mit 20 µg VEGF-beladener NPSNP-NH₂ im Fibrin wären es gemäß des Freisetzungsprofils nach vier Tagen 48 ng. Dagegen wurden bei den Kontrollen lediglich 16 ng VEGF exogen hinzugegeben. Dies würde bedeuten, dass trotz deutlich erhöhter VEGF-Mengen die Kapillarbildung in einer zweidimensionalen Zellkultur nicht beeinflusst wird. In weiterführenden Untersuchungen sollte deswegen das System optimiert sowie der Einfluss des VEGF und der Nanopartikel auf die Zellen noch umfassender analysiert werden. Zur Untersuchung der Degradation der Silica-Nanopartikel im Fibringel könnten beispielsweise nach verschiedenen Zeitpunkten in Kultur REM-Aufnahmen von getrockneten Gelen angefertigt werden. Darüber hinaus könnte eine Bestimmung des Siliciumgehalts mithilfe von ICP-Messungen erfolgen, um den Fortschritt der Degradation zu verfolgen. FITC-markierte Nanopartikel könnten

ebenfalls zur Visualisierung und zur Beurteilung der Verteilung der Partikel im Fibrin herangezogen werden. Diesbezüglich wurden im Rahmen der Arbeit bereits erste Vorversuche durchgeführt. In Abbildung 7.16 im Anhang ist ein Schnitt durch ein Fibringel dargestellt, in das FITC-gelabelte NPSNPs-NH₂ eingearbeitet wurden. Zusätzlich enthielt das Fibrin Kanäle, die mit RFP-HUVECs besiedelt wurden. In Kombination mit fluoreszenzmarkiertem VEGF könnte zukünftig mithilfe von solchen Aufnahmen die Lokalisation des Wachstumsfaktors, der Nanopartikel und der Zellen zeitaufgelöst analysiert werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der erforscht werden sollte, ist die Auswirkung der Nanopartikel bzw. der freigesetzten Ionen auf die Genexpression der beteiligten Zellen. Zum Beispiel berichten Dashnyam *et al.* über einen stabilisierenden Effekt von Silicationen auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 α , welcher u. a. die Expression von VEGF reguliert.^[205]

4.3.7 Zusammenfassung

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Freisetzungssystem für den Wachstumsfaktor VEGF auf Basis nanoporöser Silica-Nanopartikel (NPSNPs) entwickelt, das seine Anwendung als Füllmaterial für die Herstellung eines prävasikularisierten Implantats aus Fibrin fand.

Als Plattform wurden die synthetisierten *sp*-NPSNPs verwendet, deren Charakterisierung in Abschnitt 4.1.1 erfolgte. Die 40–50 nm großen Partikel mit einem Porendurchmesser von 3 nm wurden über ein *post-grafting* mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) modifiziert, da sich diese Modifizierung bereits in vorherigen Studien als vielversprechend für eine kontrollierte und langfristige Freigabe von Wachstumsfaktoren herausstellte.^[221,222] Die Immobilisierungsexperimente von VEGF auf unmodifizierte sowie auf amino-modifizierte *sp*-NPSNPs wurden in PBS (0.1 % BSA) durchgeführt. Nach der indirekten Bestimmung der Beladungsmengen über die Überstands- und Waschlösungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Spezies. Die dargebotene Menge VEGF von 0.2 μ g pro Milligramm Nanopartikel konnte vollständig immobilisiert werden. Dies war mit der relativ geringen Menge an eingesetztem VEGF zu begründen, da theoretische Berechnungen eine maximal mögliche Immobilisierungsmenge von 338 μ g VEGF pro Milligramm Nanopartikel ergaben.

Im Gegensatz zur Immobilisierung zeigten sich deutliche Kontraste beim Freisetzungverhalten von VEGF von den un- sowie amino-modifizierten *sp*-NPSNPs. Während über einen Zeitraum von 99 Tagen von den unmodifizierten *sp*-NPSNPs lediglich 2 % freigesetzt wurden, belief sich die Menge bei den *sp*-NPSNPs-NH₂ auf 65 %. Mit einer Verdopplung der Beladungsmenge bei den amino-modifizierten Nanopartikeln konnte auch die abgegebene Menge gesteigert werden. Trotz des verhältnismäßig langen Freisetzungszeitraum von 99 Tagen schienen die Freisetzen noch nicht beendet. Dies konnte mit einer noch nicht vollständigen Degradation, die mittels von TEM-Aufnahmen

ausgemacht werden konnte, in Zusammenhang gebracht werden. Aufgrund der kontinuierlichen Freisetzung angemessener VEGF-Mengen wurden die amino-modifizierten Silica-Nanopartikel für die folgenden *in vitro*-Untersuchungen ausgewählt.

Das Potential der Freisetzungssysteme, innerhalb einer Fibrinmatrix die Kapillarbildung von Endothelzellen zu verbessern, wurde mithilfe von *Tube*-Assays beurteilt. Bei einem dreidimensionalen Assay, der in Kokultur mit ASCs durchgeführt wurde, konnte eine verbesserte Ausbildung von kapillarartigen Strukturen ausgemacht werden, wenn VEGF-beladene Silica-Nanopartikel im Fibrin verarbeitet waren. Da die Visualisierung der sich gebildeten *Tubes* einige Herausforderungen beinhaltete, wurde der Versuchsaufbau auf eine zweidimensionale Kultur abgewandelt. Zusätzlich wurde die Beladungsmenge der NPSNPs auf $12.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ erhöht und auf die Kokultur mit ASCs verzichtet. Über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mithilfe der Software AngioTool die Dichte der *Tubes* und ihre Gesamtlänge ausgewertet. Es zeigten sich keine Unterschiede der untersuchten Ansätze, womit der positive Effekt der NPSNPs im Fibrin bei der zweidimensionalen Zellkultur nicht bestätigt werden konnte.

Insgesamt bieten die durchgeführten Versuche eine erfolgversprechende Grundlage für den Aufbau eines Freisetzungssystems für VEGF auf Basis von nanoporösen Silica-Nanopartikeln und seinen Einsatz als Füllmaterial eines Fibrinimplantats, das prävascularisiert werden soll. Die (modifizierten) NPSNPs besitzen eine große Oberfläche, die es erlaubt, hohe Mengen des Wachstumsfaktors zu immobilisieren. Über die Oberflächenmodifizierung und die Beladungsmenge kann das Freisetzungsverhalten gezielt gesteuert und der Anwendung entsprechend angepasst werden. Die ersten *in vitro*-Untersuchungen zeigten erste vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Bildung von *Tubes* von Endothelzellen in einer dreidimensionalen Zellkultur. Dieses Kapillarnetzwerk ist essentiell für die Entwicklung eines prävascularisierten Implantats, bei dem das Fibrinimplantat vollständig mit Blutgefäßen durchzogen sein soll.

5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden für zwei verschiedene Typen von Biomolekülen maßgeschneiderte Freisetzungssysteme auf Basis von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNPs) entwickelt und ihre Funktionalität im Hinblick auf ihre Anwendung in der regenerativen Medizin evaluiert.

Im ersten Teil wurden erfolgreich zwei verschiedene Sorten nanoporöser Silica-Nanopartikel synthetisiert, die als Freisetzungsplattform dienten. Die *small pore (sp)*-NPSNPs besaßen einen Partikeldurchmesser von ca. 45 nm und einen Porendurchmesser von ca. 3 nm. Im Vergleich dazu hatten die *large pore (lp)*-NPSNPs einen Durchmesser von ungefähr 80 nm und wiesen Porengrößen von 3.5 nm und 7.5 nm auf. Die Oberflächen der Nanopartikel wurden im Anschluss über ein *post-grafting*-Verfahren modifiziert, wobei Aminopropyl- sowie Propyltrialkoxysilane in unterschiedlichen Verhältnissen zum Einsatz kamen. Diese Variation der Oberflächeneigenschaften ermöglichte verschiedenartige Wechselwirkungen mit den Biomolekülen zum Steuern des Immobilisierungs- und Freisetzungsverhaltens.

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Entwicklung eines intrazellulären Freisetzungssystems für siRNA auf Basis der hergestellten Silica-Nanopartikel und in Kombination mit einer Hülle aus Lipiden. Mit den designten Nanoträgern war es möglich, die Nukleinsäuren in HS-5-GFP-Zellen zu schleusen und den gezielten *Knockdown* des GFP-Gens über RNA-Interferenz zu erwirken. Der Vorteil dieser nanopartikulären Systeme besteht in ihrem modularen Aufbau, mit dem sich Eigenschaften gezielt anpassen lassen. Die gewonnenen Erkenntnisse während der schrittweisen Entwicklung des Freisetzungssystems tragen dazu bei, zukünftige siRNA-Nanoträger auf Basis von Silica-Nanopartikeln zu verbessern.

Die durchgeführten Versuche zeigten beispielsweise, dass das Adsorptions- und Desorptionsverhalten der siRNA über die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen eingestellt werden kann: Die vorhandene Anzahl protonierbarer Aminogruppen bei der Oberflächenmodifizierung der NPSNPs war einerseits entscheidend für die Immobilisierung großer siRNA-Mengen, andererseits hatte eine hohe Dichte dieser Aminogruppen aufgrund von elektrostatischen Anziehungen geringe Freisetzungsmengen zur Folge. Zusätzlich beeinflussten Partikelmorphologie und Porengröße das Adsorptions- und Desorptionsverhalten, sodass die genaue Einstellung dieser Parameter künftig helfen könnte, die Transfektionseffizienz zu steigern. Dabei sollte sichergestellt werden, dass bei hohen Immobilisierungsmengen auch ein angemessener Anteil siRNA innerhalb der Zellen wieder freigesetzt werden kann. Eine Alternative zu den verwendeten Alkoxysilanen könnten Oberflächengruppen sein, deren Bindungen in endosomaler Umgebung mit sinkendem pH-Wert gespalten werden, sodass eine Freigabe der siRNA begünstigt wird.^[278]

Bei den *in vitro*-Versuchen wurde mit einer Immobilisierungsmenge von 75 µg siRNA pro Milligramm Nanopartikel gearbeitet. Dies entsprach in etwa der Hälfte der bestimmten maximalen Beladung von 140 µg mg⁻¹. Um das vorhandene Potential voll auszuschöpfen, könnte erprobt werden, wie sich eine höhere Beladung auf die Transfektionseffizienz auswirkt.

Zum Schutz der siRNAs und zur Verbesserung der Zellaufnahme sowie des endosomalen *Escapes* wurden die siRNA-beladenen Nanopartikel in einer Hülle aus Lipiden eingekapselt. Dazu wurden DOTAP/DOPE/PEG2000 in einem (50/50/0)- und einem (60/35/5)-Verhältnis verwendet. Der sich ergebende *Knockdown* war mit beiden Lipidformulierungen annähernd gleich. Dennoch stellt die Zusammensetzung der Lipidhülle einen weiteren Parameter dar, der zur Einstellung der Eigenschaften variiert werden kann. Unter anderem könnten abgewandelte Verhältnisse oder andere Lipide mit z. B. verschiedenen PEG-Kettenlängen zum Einsatz kommen. In dem Zusammenhang sollte die Stabilität der resultierenden Nanopartikel in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung näher betrachtet werden. In dieser Arbeit deuteten die Zeta-Potential-Messungen in Wasser auf keine stabilen Dispersionen hin. Agglomerierte Partikel mit undefinierter Größe werden allerdings schlechter von Zellen aufgenommen und können somit die Transfektionseffizienz beeinträchtigen.^[89,279] Weiterführende Untersuchungen sollten deswegen in PBS zur Simulation von Körperflüssigkeiten oder direkt in Zellkulturmedium erfolgen. Bei der Verwendung von proteinhaltigen Medien könnte zudem eine Analyse der Proteinarten, die auf der Nanopartikeloberfläche adsorbieren, von großer Bedeutung sein, da sich die Proteinkorona auf die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln auswirkt. Um diese Adsorption gezielt zu steuern, würde es sich auch anbieten, die Oberfläche der Nanoträger direkt mit *Targeting*-Proteinen auszustatten. Alternativ können *Targeting*-Liganden wie Folsäure, die eine Zellaufnahme verbessern können, auf der Oberfläche verankert werden.

Die beschriebenen Parameter beeinflussen die Zytotoxizität der Systeme. Bei der Verwendung von Kontroll-siRNA (siNEG) zeigten die entwickelten Nanoträger unabhängig von der Nanopartikelsorte bzw. der Lipidformulierung bis zu einer siRNA-Konzentration von 150 nM Zellviabilitäten über 70 %, sodass die funktionalisierten NPSNPs unter diesen Bedingungen generell als zytokompatibel eingestuft wurden. Mit siGFP kam es nach sechs Tagen in Kultur zu einer weitaus stärkeren Reduktion der Viabilität der HS-5-GFP-Zellen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die siRNA gegen eGFP in höheren Konzentrationen eine beeinträchtigende Wirkung auf diese Zellen hat. Da eGFP allerdings nur als Testprotein diente, mit dessen *Knockdown* die Funktionsfähigkeit der Nanoträger evaluiert wurde, spielt die Zytotoxizität dieser siRNA eine eher untergeordnete Rolle. Nichtsdestotrotz zeigt das Ergebnis, dass der verzögerte zytotoxische Effekt von siRNAs in künftigen Experimenten berücksichtigt werden sollte. In vielen publizierten Studien wird die Zellviabilität nur ein bis zwei Tage nach der Inkubation mit den entwickelten

Systemen analysiert, wodurch eine evtl. verspätete zytotoxische Wirkung übersehen würde.

Bei den *Knockdown*-Untersuchungen zeigten die kleinporigen *sp*-NPSNPs mit einem *Knockdown* von ca. 45 % eine deutlich höhere Transfektionseffizienz als die großporigen *lp*-NPSNPs (25 %). Um die Ursache dafür näher zu spezifizieren und den Einfluss von Partikelgröße und von Porengeometrie zu analysieren, wären Experimente mit 45 nm großen Nanopartikeln und 7.5 nm Poren sowie mit 80 nm großen Nanopartikeln mit kleinen 3 nm-Poren interessant. Im Vergleich zu Lipofectamine® wiesen die entwickelten Nanoträger eine geringere Transfektionseffizienz auf, sodass zukünftig die beschriebenen Parameter einer Optimierung bedürfen. Mit nanoporösen Silica-Nanopartikeln als Plattform ist dies durch eine simple Abwandlung der Synthesebedingungen realisierbar. Einen zusätzlichen Vorteil der NPSNPs stellt das noch weitgehend unbelegte durchgängige Porensystem dar, welches für ein *Co-Delivery* von *small molecule drugs* oder von niedermolekularen Verbindungen zur Verbesserung des endosomalen *Escapes* (z. B. Chloroquin)^[102] genutzt werden kann.

Im Hinblick auf die durchgeführten Experimente zur Anwendung in der regenerativen Medizin konnte der in der Literatur beschriebene osteoinduktive Effekt von NPSNPs auf MSCs^[58] für dentale Pulpastammzellen nicht bestätigt werden. Die Dotierung der Nanopartikel mit Calciumionen stellt dahingehend einen attraktiven Ansatz dar. Darüber hinaus könnte die eingeführte positive Ladung den Schritt der Oberflächenmodifizierung überflüssig machen, da die siRNA direkt an der Oberfläche adsorbieren könnte.^[161]

Dessen ungeachtet konnte die Funktionsfähigkeit der entwickelten *Drug Delivery*-Systeme für siRNA basierend auf NPSNPs in den durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen demonstriert werden. Die Betrachtung bisheriger Forschungsarbeiten über die Verwendung von NPSNPs mit Lipidhülle als Freisetzungssysteme für siRNA zeigt, dass der Einfluss von Größe und Morphologie der Nanopartikel in diesem Bereich nur wenig Beachtung erhalten hat. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Parameter zur Effizienzsteigerung von nanopartikulären Systemen sollten für das künftige Design von *Drug Delivery*-Systemen für siRNA in Betracht gezogen werden. Die Verwendung von Lipiden zur Herstellung von Hybridsystemen für die Transfektion von Nukleinsäuren ist weitaus weniger verbreitet als der Einsatz von polykationischen Polymeren.^[162] Diese Arbeit zeigt, dass Lipide für den modularen Aufbau eine vielversprechende Alternative darstellen. Nicht zuletzt ist das *Drug Delivery*-Potential der Nanoträger nicht nur auf siRNAs beschränkt. Auf ähnliche Weise könnten Nukleinsäuren wie miRNAs oder sogar erhebliche größere Plasmide in Zellen geschleust werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde auf Basis der *sp*-NPSNPs ein Freisetzungssystem für ein Protein, den Wachstumsfaktor VEGF, entwickelt. In Anlehnung an vorangegangene Arbeiten, in denen mit der gleichen Nanopartikelsorte Freisetzungssysteme für BMP-2,

TGF- β 3 und BDNF aufgebaut wurden, konnte das System in dieser Arbeit erfolgreich an VEGF angepasst werden. Mit amino-modifizierten Nanopartikeln wurde eine kontinuierliche und langfristige Freisetzung über 99 Tage erzielt, wobei sich die freigesetzten Mengen mit der Immobilisierungsmenge einstellen lassen konnten. Die VEGF-beladenen Nanopartikel wurden in ein Fibringerüst eingearbeitet, um dort durch eine kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors die Kapillarbildung von Endothelzellen in das Gerüst zu unterstützen. Die *in vitro*-Untersuchungen lieferten erste vielversprechende Ergebnisse und sprachen für eine positive Beeinflussung der Endothelzellen hinsichtlich der Ausbildung von *Tubes* in einer dreidimensionalen Zellkultur. Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit bieten somit eine Grundlage für den Einsatz VEGF-beladener Silica-Nanopartikel als Füllmaterial für ein Fibrinimplantat, das mithilfe von Endothelzellen prävascularisiert werden soll. Zukünftig sollte das entwickelte System noch optimiert und umfassender charakterisiert werden. TEM-Aufnahmen von getrockneten Fibringelen mit eingearbeiteten NPSNPs würden sich anbieten, um die Degradation der Nanopartikel im Gel zu analysieren. Zusätzlich könnten die Nanopartikelmengen variiert werden und die resultierenden mechanischen Eigenschaften des Kompositmaterials analysiert werden, da diese auch einen Einfluss auf das Zellverhalten haben. FITC-markierte Nanopartikel in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem VEGF könnten zur besseren Visualisierung der einzelnen Komponenten herangezogen werden. Im Hinblick auf die Herstellung eines prävascularisierten Implantats sollte eine dreidimensionale Zellkultur verwendet werden, da diese die *in vivo*-Bedingungen besser nachahmen.^[280] Zur besseren Visualisierung der sich bildenden *Tubes* könnten 3D-Volumenschnittbilder mithilfe der scannenden laser-optischen Tomographie (SLOT) angefertigt werden.^[281] Ferner bedarf es einer umfassenden Analyse des Einflusses der Nanopartikel und der freigesetzten VEGF-Mengen auf das Zellverhalten und deren Genexpression.

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren stellt einen therapeutischen Ansatz dar, um Systeme für die regenerative Medizin zu entwickeln. Dennoch bringt das Arbeiten mit Wachstumsfaktoren einige Herausforderungen mit sich, da sie unter ungeeigneten Bedingungen schnell denaturieren können. Angesichts der komplexen Struktur ist das Verhalten der Wachstumsfaktoren schwer vorhersagbar und durch viele äußere Bedingungen beeinflussbar. Nicht zuletzt sollten aus ökonomischen Gründen Alternativen gesucht werden. Eine Möglichkeit stellen *small molecule drugs* dar, welche die zelleigene Produktion von Wachstumsfaktoren induzieren können. Ein solcher Faktor für VEGF ist das Dimethyl-oxalylglycin (DMOG).^[282–284] Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Vorversuche für einen Einsatz durchgeführt. Dabei wurde zunächst die VEGF-Sekretion von ASCs nach Inkubation mit verschiedenen DMOG-Konzentrationen in Kombination mit der resultierenden Zellviabilität untersucht (Anhang, Abbildung 7.17). In weiterführenden Arbeiten kann auch ein Freisetzungssystem dieses Moleküls auf Basis von nanoporösen

Silica-Nanopartikeln entwickelt werden, welches eine kontinuierliche Abgabe angemessener Mengen ermöglicht.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass sich auf Basis von nanoporösen Silica-Nanopartikeln maßgeschneiderte Freisetzungssysteme für verschiedene Biomoleküle entwickeln lassen, die potentiell in der regenerativen Medizin verwendet werden können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Rosenholm, J. Zhang, M. Linden, C. Sahlgren, *Nanomedicine* **2016**, *11*, 391–402.
- [2] S. van Rijt, P. Habibovic, *J. R. Soc. Interface* **2017**, *14*, 1–10.
- [3] E. Engel, A. Michiardi, M. Navarro, D. Lacroix, J. A. Planell, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 39–47.
- [4] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, INC, **2011**, pp. 20–100.
- [5] K. Möller, T. Bein, *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 371–388.
- [6] Q. He, J. Shi, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 5845–5855.
- [7] M. O. Andersen, J. V. Nygaard, J. S. Burns, M. K. Raarup, J. R. Nyengaard, C. Bünger, F. Besenbacher, K. A. Howard, M. Kassem, J. Kjems, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 2018–2027.
- [8] M. K. Riley, W. Vermerris, *Nanomaterials* **2017**, *7*, 1–19.
- [9] A. Lechanteur, V. Sanna, A. Duchemin, B. Evrard, D. Mottet, G. Piel, *Nanomaterials* **2018**, *8*, 1–12.
- [10] B. Kim, J.-H. Park, M. J. Sailor, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1–23.
- [11] W. Ho, X.-Q. Zhang, X. Xu, *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 2715–2731.
- [12] K. S. Butler, P. N. Durfee, C. Theron, C. E. Ashley, E. C. Carnes, C. J. Brinker, *small* **2016**, *12*, 2173–2185.
- [13] M. W. Laschke, M. D. Menger, *Eur. Surg. Res.* **2012**, *48*, 85–92.
- [14] P. W. B. Alberts, A. Johnson, J. Lweis, M. Raff, K. Roberts, *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley, **2011**, pp. 444–490.
- [15] D. Boujard, B. Anselme, C. Cullin, C. Raguenes-Nicol, *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*, Springer Spektrum, **2014**, pp. 1–54.
- [16] M. W. Laschke, M. D. Menger, *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 112–121.
- [17] J. Rouwkema, N. C. Rivron, C. A. van Blitterswijk, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 434–441.
- [18] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- [19] 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.
- [20] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710–712.
- [21] M. Grün, I. Lauer, K. Unger, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 254–257.
- [22] E. Yamamoto, K. Kuroda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2016**, *89*, 501–539.
- [23] 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.
- [24] P. Behrens, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 127–132.
- [25] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, S. Garg, *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 1–49.

- [26] E. L. Margelefsky, R. K. Zeidan, M. E. Davis, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1118–1126.
- [27] N. Na, X. Cui, T. de Beer, T. Liu, T. Tang, M. Sajid, J. Ouyang, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4552–4558.
- [28] 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.
- [29] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chemie* **2006**, *118*, 3290–3328.
- [30] T. Asefa, Z. Tao, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265–2284.
- [31] J. L. Paris, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, M. Vallet-Regí, *J. Mater. Sci.* **2017**, *52*, 8761–8771.
- [32] N. Hao, L. Li, F. Tang, *Int. Mater. Rev.* **2017**, *62*, 57–77.
- [33] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7924–7937.
- [34] C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau, S. Mann, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 649–652.
- [35] K. Suzuki, K. Ikari, H. Imai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 462–463.
- [36] Z. A. Qiao, L. Zhang, M. Guo, Y. Liu, Q. Huo, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3823–3829.
- [37] T. Yokoi, Y. Sakamoto, O. Terasaki, Y. Kubota, T. Okubo, T. Tatsumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13664–13665.
- [38] M. Qhobosheane, S. Santra, P. Zhang, W. Tan, *Analyst* **2001**, *126*, 1274–1278.
- [39] H.-K. Na, M.-H. Kim, K. Park, S.-R. Ryoo, K. E. Lee, H. Jeon, R. Ryoo, C. Hyeon, D.-H. Min, *Small* **2012**, *8*, 1752–1761.
- [40] A. B. D. Nandiyanto, S.-G. Kim, F. Iskandar, K. Okuyama, *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *120*, 447–453.
- [41] A. Mehmood, H. Ghafar, S. Yaqoob, U. F. Gohar, B. Ahmad, *J. Dev. Drugs* **2017**, *6*, 1–14.
- [42] D. Tarn, C. E. Ashley, M. Xue, E. C. Carnes, J. I. Zink, C. J. Brinker, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 792–801.
- [43] S. Williams, A. Neumann, I. Bremer, Y. Su, G. Dräger, C. Kasper, P. Behrens, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 1–16.
- [44] M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, *Molecules* **2018**, *23*, 1–19.
- [45] K. Möller, T. Bein, *Chem. Mater.* **2019**, *31*, 4364–4378.
- [46] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, N. M. Khashab, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1–51.
- [47] K. S. Finnie, D. J. Waller, F. L. Perret, A. M. Krause-Heuer, H. Q. Lin, J. V. Hanna, C. J. Barbé, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, *49*, 12–18.
- [48] Q. He, J. Shi, M. Zhu, Y. Chen, F. Chen, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *131*, 314–320.
- [49] K. Braun, A. Pochert, M. Beck, R. Fiedler, J. Gruber, M. Lindén, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2016**, *79*, 319–327.

- [50] J. G. Croissant, Y. Fatieiev, A. Almalik, N. M. Khashab, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1–75.
- [51] H. Yamada, C. Urata, Y. Aoyama, S. Osada, Y. Yamauchi, K. Kuroda, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 1462–1471.
- [52] V. Cauda, A. Schlossbauer, T. Bein, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *132*, 60–71.
- [53] D. F. Williams, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941–2953.
- [54] D. F. Williams, *Engineering* **2018**, *4*, 286–290.
- [55] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
- [56] R. E. Yanes, D. Tarn, A. A. Hwang, D. P. Ferris, S. P. Sherman, C. R. Thomas, J. Lu, A. D. Pyle, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Small* **2013**, *9*, 697–704.
- [57] A. Watermann, J. Brieger, *Nanomaterials* **2017**, *7*, 1–17.
- [58] A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, P. Behrens, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 24222–24230.
- [59] J. Blechinger, A. T. Bauer, A. A. Torrano, C. Gorzelanny, C. Bräuchle, S. W. Schneider, *Small* **2013**, *9*, 3970–3980.
- [60] M. Lindén, in *Enzym.*, Elsevier Inc., **2018**, pp. 155–180.
- [61] A. Albanese, P. S. Tang, W. C. W. Chan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1–16.
- [62] V. H. Nguyen, B. J. Lee, *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 3137–3151.
- [63] M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, M. Mahmoudi, in *Protein-Nanoparticle Interact.* (Ed.: B. Martinac), Springer, **2013**, pp. 1–84.
- [64] E. Phillips, P. B. Zanzonico, O. Penate-Medina, R. D. Carvajal, P. Mohan, Y. Ye, J. Humm, M. Gönen, H. Kalaigian, H. Schöder, et al., *Sci Transl Med* **2014**, *6*, 260–283.
- [65] A. C. Anselmo, S. Mitragotri, *AAPS J.* **2015**, *17*, 1041–1054.
- [66] J. Zhao, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 259–272.
- [67] L. Y. T. Chou, K. Ming, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 233–245.
- [68] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R. P. Del Real, J. Pérez-Pariente, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308–311.
- [69] A. M. Chen, M. Zhang, D. Wei, D. Stueber, O. Taratula, T. Minko, H. He, *Small* **2009**, *5*, 2673–2677.
- [70] A. L. Doadrio, E. M. B. Sousa, J. C. Doadrio, J. Pérez Pariente, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, *J. Control. Release* **2004**, *97*, 125–132.
- [71] W. Zeng, X.-F. Qian, Y.-B. Zhang, J. Yin, Z.-K. Zhu, *Mater. Res. Bull.* **2005**, *40*, 766–772.
- [72] K. Möller, K. Müller, H. Engelke, C. Bräuchle, E. Wagner, T. Bein, *Nanoscale* **2016**, *8*, 4007–4019.
- [73] N. Schmidt, J. Schulze, D. P. Warwas, N. Ehlert, T. Lenarz, A. Warnecke, P. Behrens, *PLoS One* **2018**, *13*, 1–23.

- [74] 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.
- [75] S. Giret, M. Wong Chi Man, C. Carcel, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 13850–13865.
- [76] J. Florek, R. Caillard, F. Kleitz, *Nanoscale* **2017**, *9*, 15252–15277.
- [77] A. C. N. Oliveira, J. Fernandes, A. Gonçalves, A. C. Gomes, *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 1–22.
- [78] C. Argyo, V. Weiss, C. Bräuchle, T. Bein, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 435–451.
- [79] Z. Zhou, L. Yang, J. Gao, X. Chen, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1–32.
- [80] H. C. Janßen, D. P. Warwas, D. Dahlhaus, J. Meißner, P. Taptimthong, M. Kietzmann, P. Behrens, J. Reifenrath, N. Angrisani, *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 1–19.
- [81] X. Zhou, L. Chen, W. Nie, W. Wang, M. Qin, X. Mo, H. Wang, C. He, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 22375–22387.
- [82] L. Chen, X. She, T. Wang, S. Shigdar, W. Duan, L. Kong, *J. Nanoparticle Res.* **2018**, *20*, 1–13.
- [83] L. Li, W. Wang, J. Tang, Y. Wang, J. Liu, L. Huang, Y. Wang, F. Guo, J. Wang, W. Shen, et al., *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14*, 1–23.
- [84] X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He, *Biomaterials* **2010**, *31*, 438–448.
- [85] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873–2896.
- [86] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37–43.
- [87] R. M. Pearson, H. Hsu, J. Bugno, S. Hong, *MRS Bull.* **2014**, *39*, 227–237.
- [88] D. Ma, *Nanoscale* **2014**, *6*, 6415–6424.
- [89] K. Kettler, K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel, A. J. Hendriks, *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33*, 481–492.
- [90] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Control. Release* **2010**, *145*, 182–195.
- [91] J. P. Lim, P. A. Gleeson, *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89*, 836–843.
- [92] L. M. Bareford, P. W. Swaan, *Adv Drug Deliv Rev.* **2007**, *59*, 748–758.
- [93] S. Mayor, R. E. Pagano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 603–612.
- [94] F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung, C.-Y. Mou, *Small* **2009**, *5*, 1408–1413.
- [95] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–668.
- [96] F. Osaki, T. Kanamori, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6520–6521.
- [97] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11613–11618.
- [98] H. Herd, N. Daum, A. T. Jones, H. Huwer, H. Ghandehari, C.-M. Lehr, *ACS Nano* **2013**, *7*, 1961–1973.
- [99] Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang, L. Xu, R. Bai, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, Y. Li, C. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7606–7619.

- [100] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Small* **2010**, *6*, 1952–1967.
- [101] L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such, A. P. R. Johnston, *WIREs Nanomed and Nanobiotechnol* **2017**, *9*, 1–23.
- [102] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Strom, H. J. Haisma, *J. Control. Release* **2011**, *151*, 220–228.
- [103] A. M. Funhoff, C. F. van Nostrum, G. A. Koning, N. M. E. Schuurmans-Nieuwenbroek, D. J. A. Crommelin, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 32–39.
- [104] I. M. S. Degors, C. Wang, Z. U. Rehman, I. S. Zuhorn, *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1750–1760.
- [105] A. Erazo-Oliveras, N. Muthukrishnan, R. Baker, T.-Y. Wang, J.-P. Pellois, *Pharmaceuticals* **2012**, *5*, 1177–1209.
- [106] J. Nguyen, F. C. Szoka, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1153–1162.
- [107] S. Reissmann, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 760–784.
- [108] K. G. de Bruin, C. Fella, M. Ogris, E. Wagner, N. Ruthardt, C. Bräuchle, *J. Control. Release* **2008**, *130*, 175–182.
- [109] A. Schloßbauer, A. M. Sauer, V. Cauda, A. Schmidt, H. Engelke, U. Rothbauer, K. Zolghadr, H. Leonhardt, C. Bräuchle, T. Bein, *Adv. Healthc. Mater.* **2012**, *1*, 316–320.
- [110] J. O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J. P. A. Barcellos, R. J. Lee, J. M. Marchetti, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *123*, 345–363.
- [111] K. Tatiparti, S. Sau, S. K. Kashaw, A. K. Iyer, *Nanomaterials* **2017**, *7*, 1–17.
- [112] M. S. Draz, B. A. Fang, P. Zhang, Z. Hu, S. Gu, K. C. Weng, J. W. Gray, F. F. Chen, *Theranostics* **2014**, *4*, 872–892.
- [113] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemie*, Springer Spektrum, **2018**, pp. 127–163.
- [114] H. Siomi, M. C. Siomi, *Nature* **2009**, *457*, 396–404.
- [115] C. E. Ashley, E. C. Carnes, K. E. Epler, D. P. Padilla, G. K. Phillips, R. E. Castillo, D. C. Wilkinson, B. S. Wilkinson, C. a Burgard, R. M. Kalinich, et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 2174–2188.
- [116] J. Chery, *Postdoc J.* **2016**, *4*, 35–50.
- [117] K. Weber, T. Tuschl, S. M. Elbashir, A. Yalcin, W. Lendeckel, J. Harborth, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [118] M. R. Lares, J. J. Rossi, D. L. Ouellet, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 570–579.
- [119] J. Kurreck, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 1404–1426.
- [120] A. Wittrup, J. Lieberman, **2016**, *16*, 543–552.
- [121] J. Shen, W. Zhang, R. Qi, Z.-W. Mao, H. Shen, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1969–1995.
- [122] P. Kesharwani, V. Gajbhiye, N. K. Jain, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7138–7150.

- [123] J. Shen, W. Zhang, R. Qi, Z. W. Mao, H. Shen, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1969–1995.
- [124] M. W. Amjad, P. Kesharwani, M. C. I. Mohd Amin, A. K. Iyer, *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *64*, 154–181.
- [125] S. Rietwyk, D. Peer, *ACS Nano* **2017**, *11*, 7572–7586.
- [126] S. M. Hoy, *Drugs* **2018**, *78*, 1625–1631.
- [127] D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W. D. O’Riordan, C. C. Yang, M. Ueda, A. V. Kristen, I. Tournev, H. H. Schmidt, T. Coelho, J. L. Berk, et al., *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 11–21.
- [128] O. B. Suhr, T. Coelho, J. Buades, J. Pouget, I. Conceicao, J. Berk, H. Schmidt, M. Waddington-Cruz, J. M. Campistol, B. R. Bettencourt, et al., *Orphanet J. Rare Dis.* **2015**, *10*, 1–9.
- [129] P. Resnier, T. Montier, V. Mathieu, J.-P. Benoit, C. Passirani, *Biomaterials* **2013**, *34*, 6429–6443.
- [130] R. Kamegawa, M. Naito, K. Miyata, *Nano Res.* **2018**, *11*, 5219–5239.
- [131] A. Alagia, R. Eritja, *WIREs RNA* **2016**, *7*, 316–329.
- [132] H. Y. Xue, S. Liu, H. L. Wong, *Nanomedicine* **2014**, *9*, 295–312.
- [133] C. Tschuch, A. Schulz, A. Pscherer, W. Werft, A. Benner, A. Hotz-Wagenblatt, L. Barrionuevo, P. Lichter, D. Mertens, *BMC Mol. Biol.* **2008**, *9*, 1–14.
- [134] J. K. W. Lam, M. Y. T. Chow, Y. Zhang, S. W. S. Leung, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2015**, *4*, 1–20.
- [135] J.-X. Wei, J. Yang, J.-F. Sun, L.-T. Jia, Y. Zhang, H.-Z. Zhang, X. Li, Y.-L. Meng, L.-B. Yao, A.-G. Yang, *PLoS One* **2009**, *4*, 5382–5292.
- [136] A. Witttrup, J. Lieberman, *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *16*, 543–552.
- [137] T. P. Prakash, C. R. Allerson, P. Dande, T. A. Vickers, N. Sioufi, R. Jarres, B. F. Baker, E. E. Swayze, R. H. Griffey, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247–4253.
- [138] C. Sarisozen, G. Salzano, V. P. Torchilin, *BioMol Concepts* **2015**, *6*, 321–341.
- [139] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Gelck, P. Hadwiger, J. Harborth, et al., *Nature* **2004**, *432*, 173–178.
- [140] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734–740.
- [141] T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, M. Levy, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1–6.
- [142] C.-F. Xia, R. J. Boado, W. M. Pardridge, *Mol Pharm.* **2009**, *6*, 747–751.
- [143] J. H. Jeong, H. Mok, Y.-K. Oh, T. G. Park, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 5–14.
- [144] M. Alameh, M. Lavertu, N. Tran-Khanh, C.-Y. Chang, F. Lesage, M. Bail, V. Darras, A. Chevrier, M. D. Buschmann, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 112–131.
- [145] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S. Y. Lin, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7924–7937.
- [146] C. Ganas, A. Weiß, M. Nazareus, S. Rösler, T. Kissel, P. Rivera Gil, W. J. Parak, *J. Control. Release* **2014**, *196*, 132–138.

- [147] Y. Xia, J. Tian, X. Chen, *Biomaterials* **2016**, *79*, 56–68.
- [148] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7413–7417.
- [149] W. P. Swaney, F. L. Sorgi, A. B. Bahnson, J. A. Barranger, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1379–1386.
- [150] A. Elbakry, A. Zaky, R. Liebl, R. Rachel, A. Goepferich, M. Breunig, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2059–2064.
- [151] A. Slita, A. Egorova, E. Casals, A. Kiselev, J. M. Rosenholm, *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, *13*, 592–599.
- [152] H. Meng, W. X. Mai, H. Zhang, M. Xue, T. Xia, S. Lin, X. Wang, Y. Zhao, Z. Ji, J. I. Zink, et al., *ACS Nano* **2013**, *7*, 994–1005.
- [153] C. Hom, J. Lu, M. Liong, H. Luo, Z. Li, J. I. Zink, F. Tamanoi, *Small* **2010**, *6*, 1185–1190.
- [154] C. E. Ashley, E. C. Carnes, K. E. Epler, D. P. Padilla, G. K. Phillips, R. E. Castillo, D. C. Wilkinson, B. S. Wilkinson, C. A. Burgard, R. M. Kalinich, et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 2174–2188.
- [155] S. B. Hartono, W. Gu, F. Kleitz, J. Liu, L. He, A. P. J. Middelberg, C. Yu, G. Q. Lu, S. Z. Qiao, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2104–2117.
- [156] J. Shen, H. C. Kim, H. Su, F. Wang, J. Wolfram, D. Kirui, J. Mai, C. Mu, L. N. Ji, Z. W. Mao, et al., *Theranostics* **2014**, *4*, 487–497.
- [157] X. Li, Y. Chen, M. Wang, Y. Ma, W. Xia, H. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 1391–1401.
- [158] Y. Chen, H. Gu, D. S.-Z. Zhang, F. Li, T. Liu, W. Xia, *Biomaterials* **2014**, *35*, 10058–10069.
- [159] P. Mora-Raimundo, D. Lozano, M. Manzano, M. Vallet-Regí, *ACS Nano* **2019**, *13*, 5451–5464.
- [160] L. Xiong, J. Bi, Y. Tang, S.-Z. Qiao, *Small* **2016**, *12*, 4735–4742.
- [161] M. Yu, Y. Xue, P. X. Ma, C. Mao, B. Lei, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 8460–8470.
- [162] N. A. Keasberry, C. W. Yapp, A. Idris, *Biochem.* **2017**, *82*, 655–662.
- [163] X. Ma, Y. Zhao, K. W. Ng, Y. Zhao, *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 15593–15603.
- [164] S. Mocellin, M. Provenzano, *J. Transl. Med.* **2004**, *2*, 1–6.
- [165] H.-J. Müller, D. R. Prange, *PCR - Polym.*, Springer Spektrum, **2016**, pp. 1–20.
- [166] L. Xiong, Y. Wen, X. Miao, Z. Yang, *Cell Tissue Res.* **2014**, *355*, 365–374.
- [167] J. Liu, G. Chen, H. Xu, K. Hu, J. Sun, M. Liu, F. Zhang, N. Gu, *NPG Asia Mater.* **2018**, *10*, 827–839.
- [168] H. C. H. Ko, B. K. Milthorpe, C. D. McFarland, *Eur. Cells Mater.* **2007**, *14*, 1–19.
- [169] F. Hillen, A. W. Griffioen, *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 489–502.
- [170] Y. A. Muller, H. W. Christinger, B. A. Keyt, A. M. de Vos, *Structure* **1997**, *5*, 1325–1338.

- [171] C. Kalka, T. Asahara, W. Krone, J. M. Isner, *Herz* **2000**, *25*, 611–622.
- [172] P. Carmeliet, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 389–395.
- [173] H. Gerhardt, C. Betsholtz, *Cell Tissue Res.* **2003**, *314*, 15–23.
- [174] F. Bussolino, A. Mantovani, G. Persico, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 251–254.
- [175] S. Liekens, E. De Clercq, J. Neyts, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 253–270.
- [176] L. Treps, J. Gavard, *médecine/science* **2015**, 989–995.
- [177] M. Potente, H. Gerhardt, P. Carmeliet, *Cell* **2011**, *146*, 873–887.
- [178] H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, et al., *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 1163–1177.
- [179] L.-K. Phng, H. Gerhardt, *Dev. Cell* **2009**, *16*, 196–208.
- [180] R. Blanco, H. Gerhardt, *Cold Spring Harb Perspect Med* **2013**, *3*, 1–19.
- [181] A. M. Jousen, B. Kirchhof, C. Gottstein, *Ophthalmologe* **2003**, *100*, 284–291.
- [182] B. Ranchoux, L. D. Harvey, R. J. Ayon, A. Babicheva, S. Bonnet, S. Y. Chan, J. X.-J. Yuan, V. de J. Perez, *Pulm. Circ.* **2018**, *8*, 1–17.
- [183] H. F. Dvorak, A. M. Dvorak, E. J. Manseau, L. Wlberg, W. H. Churchill, *J. Natl. Cancer Inst.* **1979**, *62*, 1459–1472.
- [184] G. D. Yancopoulos, N. W. Gale, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, J. Holash, *Nature* **2000**, *407*, 242–248.
- [185] N. Ferrara, *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 581–611.
- [186] L. Yadav, N. Puri, V. Rastogi, P. Satpute, V. Sharma, *J. Clin. Diagnostic Res.* **2015**, *9*, 1–5.
- [187] Y. A. Muller, B. Li, H. W. Christinger, J. A. Wells, B. C. Cunningham, A. M. de Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 7192–7197.
- [188] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. van Oosterom, E. A. de Bruijn, *Pharmacol Rev* **2004**, *56*, 549–580.
- [189] F. S. Grünewald, A. E. Prota, A. Giese, K. Ballmer-Hofer, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 567–580.
- [190] H. Karvinen, E. Pasanen, T. T. Rissanen, P. Korpisalo, E. Vähäkangas, A. Jazwa, M. Giacca, S. Ylä-Herttuala, *Gene Ther.* **2011**, *18*, 1166–1172.
- [191] S. Ylä-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto, J. Hartikainen, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 1015–1026.
- [192] M. M. Martino, S. Brkic, E. Bovo, M. Burger, D. J. Schaefer, T. Wolff, L. Gürke, P. S. Briquez, H. M. Larsson, R. Gianni-Barrera, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 1–8.
- [193] M. C. Peters, P. J. Polverini, D. J. Mooney, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 668–678.
- [194] D. F. Lazarous, M. Shou, M. Scheinowitz, E. Hodge, V. Thirumurthi, A. N. Kitsiou, J. A. Stiber, A. D. Lobo, S. Hunsberger, E. Guetta, et al., *Circulation* **1996**, *94*, 1074–1082.

- [195] N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Abe, *J Mater Sci Mater Med* **2010**, *21*, 1891–1898.
- [196] M. H. Sheridan, L. D. Shea, M. C. Peters, D. J. Mooney, *J. Control. Release* **2000**, *64*, 91–102.
- [197] J. S. Golub, Y.-T. Kim, C. L. Duvall, R. V. Bellamkonda, D. Gupta, A. S. Lin, D. Weiss, W. R. Taylor, R. E. Guldborg, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2010**, *298*, 1959–1965.
- [198] H. H. P. Yiu, P. A. Wright, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3690–3700.
- [199] J. Livage, T. Coradin, C. Roux, *J. Phys. Condens. Matter* **2001**, *13*, 573–691.
- [200] A. S. Hoffman, J. A. Hubbell, in *Biomater. Sci.* (Eds.: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons), **2004**, pp. 225–237.
- [201] J. F. Díaz, K. J. Balkus, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1996**, *2*, 115–126.
- [202] M. Hajimiri, S. Shahverdi, G. Kamalinia, R. Dinarvand, *J Biomed Mater Res Part A* **2015**, *103*, 819–838.
- [203] K. C. Dee, D. A. Pule, R. Bizias, in *An Introd. to Tissue-Biomaterial Interact.*, John Wiley & Sons, INC, **2002**, pp. 27–52.
- [204] J.-H. Kim, T.-H. Kim, M. S. Kang, H. Kim, *Biomed Res. Int.* **2016**, *1*, 1–8.
- [205] K. Dashnyam, G.-Z. Jin, J.-H. Kim, R. Perez, J.-H. Jang, H. W. Kim, *Biomaterials* **2017**, *116*, 145–157.
- [206] S. M. Jay, W. M. Saltzman, *J. Control. Release* **2009**, *134*, 26–34.
- [207] E. A. Silva, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1235–1241.
- [208] L. Zhang, L. Zhang, X. Lan, M. Xu, Z. Mao, H. Lv, Q. Yao, P. Tang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 1165–1172.
- [209] Y. Il Chung, S. K. Kim, Y. K. Lee, S. J. Park, K. O. Cho, S. H. Yuk, G. Tae, Y. H. Kim, *J. Control. Release* **2010**, *143*, 282–289.
- [210] Y. I. Chung, G. Tae, S. Hong Yuk, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2621–2626.
- [211] S. M. Jay, B. R. Shepherd, J. W. Andrejcsk, T. R. Kyriakides, J. S. Pober, W. M. Saltzman, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3054–3062.
- [212] T. P. Richardson, M. C. Peters, A. B. Ennett, D. J. Mooney, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1029–1034.
- [213] P. S. Wolfe, S. A. Sell, G. L. Bowlin, *Tissue Eng. - From Lab to Clin.* (Eds.: N. Pallua, C.S. Suschek), Springer, **2011**, pp. 41–67.
- [214] N. Laurens, P. Koolwijk, M. P. de Maat, *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 932–939.
- [215] M. W. Mosesson, *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1894–1904.
- [216] A. Noori, S. J. Ashrafi, R. Vaez-Ghaemi, A. Hatamian-Zaremi, T. J. Webster, *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 4937–4961.
- [217] T. A. E. Ahmed, E. V. Dare, M. Hincke, *Tissue Eng. - Part B Rev.* **2008**, *14*, 199–215.
- [218] X. Chen, A. S. Aledia, C. M. Ghajar, C. K. Griffith, A. J. Putnam, C. C. W. Hughes, S. C. George, *Tissue Eng. - Part A* **2009**, *15*, 1363–1371.

- [219] F. Verseijden, S. J. Posthumus-van Sluijs, J. W. van Neck, S. O. P. Hofer, S. E. R. Hovius, G. J. V. M. van Osch, *J Tissue Eng Regen Med* **2012**, *6*, 169–178.
- [220] K. S. Thomson, S. K. Dupras, C. E. Murry, M. Scatena, M. Regnier, *Angiogenesis* **2014**, *17*, 195–205.
- [221] N. Schmidt, *Entwicklung von Auf Nanoporösen Silica-Nanopartikeln Basierenden Implantat-Assoziierten Freisetzungssystemen Für Wachstumsfaktoren*, Leibniz Universität Hannover, **2019**.
- [222] A. Satalov, *Nanoporous Silica Nanoparticles and Bone Morphogenetic Protein 2 for Bone Regeneration*, Leibniz Universität Hannover, **2017**.
- [223] X. Li, Y. Su, S. Liu, L. Tan, X. Mo, S. Ramakrishna, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 418–424.
- [224] S. Lau, C. Schrimpf, M. Klingenberg, F. Helfritz, T. Aper, A. Haverich, M. Wilhelmi, U. Böer, *BioNanoMaterials* **2015**, *16*, 309–321.
- [225] Q. H., E. Bock, *Int. Zeitschrift für Bauinstandsetz.* **1995**, *4*, 295–304.
- [226] M. Thompson, L.-E. Cheran, S. Sadeghi, I. A. Cree, *Cancer Cell Culture Protocols*, **2013**, pp. 25–51.
- [227] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, *Assay Guid. Man.* **2004**, 1–25.
- [228] N. C. L. Zembruski, V. Stache, W. E. Haefeli, J. Weiss, *Anal. Biochem.* **2012**, *429*, 79–81.
- [229] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*, 163–176.
- [230] M. Díaz, M. Herrero, L. A. García, C. Quirós, *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48*, 385–407.
- [231] F. Reggeti, D. Bienzle, *Vet. Pathol.* **2011**, *48*, 223–235.
- [232] <https://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>, Zugriff am **15.03.2020**
- [233] H. Puchtler, S. N. Meloan, M. S. Terry, *J. Histochem. Cytochem.* **1969**, *17*, 110–124.
- [234] C. A. Gregory, W. G. Gunn, A. Peister, D. J. Prockop, *Anal. Biochem.* **2004**, *329*, 77–84.
- [235] K. Narayanan, R. Srinivas, A. Ramachandran, J. Hao, B. Quinn, A. George, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4516–4521.
- [236] O. A. Bessey, O. H. Lowry, M. J. Brock, *J. Biol. Chem* **1946**, 321–329.
- [237] I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, G. Benton, *Angiogenesis* **2009**, *12*, 267–274.
- [238] H. I. Meléndez-Ortiz, Y. Perera-Mercado, J. A. Mercado-Silva, Y. Olivares-Maldonado, G. Castruita, L. A. García-Cerda, *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 9701–9707.
- [239] L. T. Zhuravlev, *React. Kinet. Catal. Lett.* **1993**, *50*, 15–25.
- [240] V. Dugas, Y. Chevalier, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *264*, 354–361.
- [241] S. Bhattacharjee, *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351.
- [242] J. Kim, D. F. Lawler, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 1083–1089.

- [243] A. Wenz, K. Janke, E. Hoch, G. E. M. Tovar, K. Borchers, P. J. Kluger, *BioNanoMaterials* **2016**, *17*, 179–184.
- [244] A. Lazaro, M. C. van de Griend, H. J. H. Brouwers, J. W. Geus, *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *181*, 254–261.
- [245] C. Turner, B. C. Donose, Kezia, G. Birkett, S. Pratt, *Water Res.* **2020**, *168*, 1–9.
- [246] N. C. Bell, C. Minelli, J. Tompkins, M. M. Stevens, A. G. Shard, *Langmuir* **2012**, *28*, 10860–10872.
- [247] V. Cauda, H. Engelke, A. Sauer, D. Arcizet, C. Bräuchle, J. Rädler, T. Bein, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2484–2492.
- [248] L. C. Gomes-Da-Silva, N. A. Fonseca, V. Moura, M. C. Pedroso De Lima, S. Simões, J. N. Moreira, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1163–1171.
- [249] A. Lechanteur, T. Furst, B. Evrard, P. Delvenne, P. Hubert, G. Piel, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *93*, 493–503.
- [250] P. N. Durfee, Y. S. Lin, D. R. Dunphy, A. J. Muñoz, K. S. Butler, K. R. Humphrey, A. J. Lokke, J. O. Agola, S. S. Chou, I. M. Chen, et al., *ACS Nano* **2016**, *10*, 8325–8345.
- [251] K. Katagiri, M. Hashizume, J.-I. Kikuchi, Y. Taketani, M. Murakami, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2004**, *38*, 149–153.
- [252] 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.
- [253] J. Lina, Q. Caib, Y. Tanga, Y. Xuc, Qian Wanga, T. Lia, H. Xua, S. Wanga, K. Fana, L. Zhongjie, et al., *Int. J. Pharm.* **2018**, *536*, 272–282.
- [254] N. Han, Y. Wang, J. Bai, J. Liu, Y. Wang, Y. Gao, T. Jiang, W. Kang, S. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *219*, 209–218.
- [255] N. Hao, L. Li, Q. Zhang, X. Huang, X. Meng, Y. Zhang, D. Chen, F. Tang, L. Li, *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *162*, 14–23.
- [256] J. Liu, A. Stace-Naughton, X. Jiang, C. J. Brinker, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1354–1355.
- [257] Y. Fedorov, E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall, A. Khvorova, *RNA* **2006**, *12*, 1188–1196.
- [258] H. Y. Xue, S. Liu, H. L. Wong, *Nanomedicine* **2014**, *9*, 295–312.
- [259] H. Xue, P. Guo, W.-C. Wen, H. Wong, *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 3140–3147.
- [260] D. Napierska, L. C. J. Thomassen, V. Rabolli, D. Lison, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, J. A. Martens, P. H. Hoet, *Small* **2009**, *5*, 846–853.
- [261] M. Nakashima, K. Iohara, M. Murakami, *Endod. Top.* **2013**, *28*, 38–50.
- [262] R. D’Aquino, G. Papaccio, G. Laino, A. Graziano, *Stem Cell Rev.* **2008**, *4*, 21–26.
- [263] K. Kolind, D. Kraft, T. Bøggild, M. Duch, J. Lovmand, F. S. Pedersen, D. A. Bindslev, C. E. Bünger, M. Foss, F. Besenbacher, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 641–650.
- [264] J. H. Lee, M.-S. Kang, C. Mahapatra, H. Kim, *PLoS One* **2016**, *11*, 1–22.

- [265] M. E. M. Cromwell, E. Hilario, F. Jacobson, *AAPS J.* **2006**, *8*, 1–8.
- [266] G. A. Smith, G. W. Fearnley, D. C. Tomlinson, M. A. Harrison, S. Ponnambalam, *Biosci. Rep.* **2015**, *35*, 1–15.
- [267] Z. G. Peng, K. Hidajat, M. S. Uddin, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *271*, 277–283.
- [268] X. Huang, N. P. Young, H. E. Townley, *Nanomater. Nanotechnol.* **2014**, *4*, 1–15.
- [269] H. W. Christinger, G. Fuh, A. M. de Vos, C. Wiesmann, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10382–10388.
- [270] G. Singhvi, S. Mahaveer, *Int. J. Pharm. Stud. Res.* **2011**, *2*, 77–84.
- [271] E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1325–1336.
- [272] P. Asuri, S. S. Karajanagi, H. Yang, T.-J. Yim, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Langmuir* **2006**, *22*, 5833–5836.
- [273] M. Handel, T. R. Hammer, P. Nooeaid, A. R. Boccaccini, D. Hoefler, *Tissue Eng. - Part A* **2013**, *19*, 2703–2712.
- [274] C. M. Ghajar, X. Chen, J. W. Harris, V. Suresh, C. C. W. Hughes, N. L. Jeon, A. J. Putnam, S. C. George, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1930–1941.
- [275] W. Zhai, H. Lu, L. Chen, X. Lin, Y. Huang, K. Dai, K. Naoki, G. Chen, J. Chang, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 341–349.
- [276] K. Dashnyam, A. El-Fiqi, J. O. Buitrago, R. A. Perez, J. C. Knowles, H.-W. Kim, *J. Tissue Eng.* **2017**, *8*, 1–13.
- [277] D. E. Ingber, *Circ. Res.* **2002**, *91*, 877–887.
- [278] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003.
- [279] S. Ota, Y. Takahashi, A. Tomitaka, T. Yamada, D. Kami, M. Watanabe, Y. Takemura, *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*, 1–12.
- [280] C. A. Staton, C. Lewis, R. Bicknell, *Angiogenesis Assays*, John Wiley & Sons, INC, **2006**, pp. 1–20.
- [281] M. Kellner, M. Heidrich, R. Beigel, R.-A. Lorbeer, L. Knudsen, T. Ripken, A. Heisterkamp, H. Meyer, M. P. Kühnel, M. Ochs, *J. Appl. Physiol.* **2012**, *113*, 975–983.
- [282] J. Zhang, J. Guan, X. Qi, H. Ding, H. Yuan, Z. Xie, C. Chen, X. Li, C. Zhang, Y. Huang, *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 639–652.
- [283] H. Ding, S. Chen, W.-Q. Song, Y.-S. Gao, J.-J. Guan, Y. Wang, Y. Sun, C.-Q. Zhang, *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 746–756.
- [284] C. Wu, Y. Zhou, J. Chang, Y. Xiao, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 9159–9168.
- [285] W. Koh, A. N. Stratman, A. Sacharidou, G. E. Davis, *Methods Enzymol.* **2008**, *443*, 83–101.

7 Anhang

7.1 Chemikalienverzeichnis

Tabelle 7.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Bezugsquelle
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	99.0 %	Sigma-Aldrich
3-Aminopropyltriethoxysilan	99.0 %	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol	–	Thermo Fisher Scientific
7-AAD-Lösung	–	Miltenyi Biotec
AIBA	97.0 %	Sigma-Aldrich
BSA	≥98.0 %	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	≥99.9 %	Sigma-Aldrich
CD73-PE	–	Miltenyi Biotec
CellTiter-Blue® Reagent	–	Promega
CTAB	≥99.0 %	Sigma-Aldrich
Diethanolamin	≥99.0 %	Sigma-Aldrich
DOPE	≥98.0 %	Avanti®
DOTAP	≥98.0 %	Avanti®
EDTA	≥98.0 %	Sigma-Aldrich
Essigsäure	≥99.5 %	Sigma-Aldrich
Ethanol (absolut)	≥99.5 %	Merck KGaA
FITC	≥90.0 %	Sigma-Aldrich
Fluoromount-G™	–	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine®-2000	–	Thermo Fisher Scientific
<i>L</i> -Lysin	>98.0 %	Sigma-Aldrich
Methanol	≥99.9 %	Sigma-Aldrich
MTT-Assay-Kit	–	Roche
Natriumhydroxid	>99.0 %	Merck KGaA
Natriumsulfat	≥99.0 %	Sigma-Aldrich
Octan	≥98.0 %	Honeywell
Paraformaldehyd	95.0 %	Sigma-Aldrich
PBS (Dulbecco's L1820)	–	Merck KGaA
PEG2000	≥98.0 %	Avanti®
Propyltrimethoxysilan	97.0 %	Sigma-Aldrich
REA-PE	–	Miltenyi Biotec
siGFP	–	Thermo Fisher Scientific
siGLO Red Transfection Indicator	–	horizon Dharmacon
Silencer®Select Negative Control	–	Invitrogen™
siNT5E	–	Thermo Fisher Scientific
Styrol	≥99.0 %	Sigma-Aldrich
Tetraethylorthosilicat	≥99.0 %	Sigma-Aldrich
Toluol	99.7 %	Honeywell
Trimethoxy(propyl)silan	97.0 %	Sigma-Aldrich
Trypsin	–	Sigma-Aldrich
VEGF	≥98.0 %	Peprtech

7.2 Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Tabelle 7.2: Zusammensetzungen (Endkonzentrationen) der verwendeten Zellkulturmedien.

Bezeichnung	Reagenz	Menge
Medium HS-5- (GFP)-Zellen	DMEM (Biochrom, FG 0415)	500 mL
	HyClone-FCS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 % (100 µg mL ⁻¹)
	HEPES	25 mM
	FGF-2	2 ng mL ⁻¹
	(Doxycyclin)	1 µg mL ⁻¹
DPSC-Medium	α-MEM	500 mL
	FCS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 % (100 µg mL ⁻¹)
Osteo-Medium	α-MEM	500 mL
	Natriumascorbat	0.1 mM
	β-Glycerophosphat	5.0 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1.8 mM
	Dexamethason	10 nM
	FCS	15 %
	Penicillin/Streptomycin	1 % (100 µg mL ⁻¹)
EGM-2-Medium	EGM-2-Medium (Lonza)	500 mL
	FCS	10 mL
Bulletkit (Lonza)	Hydrocortison	0.2 mL
	Human FGF-B	2.0 mL
	VEGF	0.5 mL
	IGF-1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>)	0.5 mL
	Ascorbic Acid	0.5 mL
	Human EGF	0.5 mL
	Heparin	0.5 mL
Feeding-Medium (HUVECs)	M199-Medium	1 mL
	FGF-2 (40 ng µL ⁻¹)	1 µL
	Vitamin C (50 µg mL ⁻¹)	5 µL
	Aprotinin (100 KIE mL ⁻¹)	1 µL
	<i>Reduced-serum supplement</i> (1:250) ^[285]	4 µL
	Tetradecanoylphorbolacetat (50 ng mL ⁻¹)	5 µL
	(VEGF 40 ng µL ⁻¹)	(1 µL)

7.3 Zusatzinformationen

7.3.1 Charakterisierung der Silica-Nanopartikel

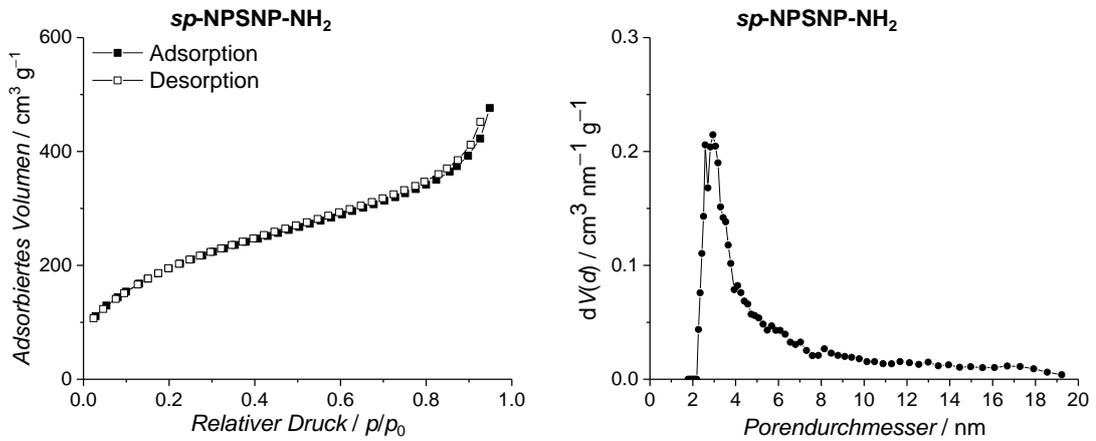


Abbildung 7.1: N_2 -Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von sp -NPSNP- NH_2 .

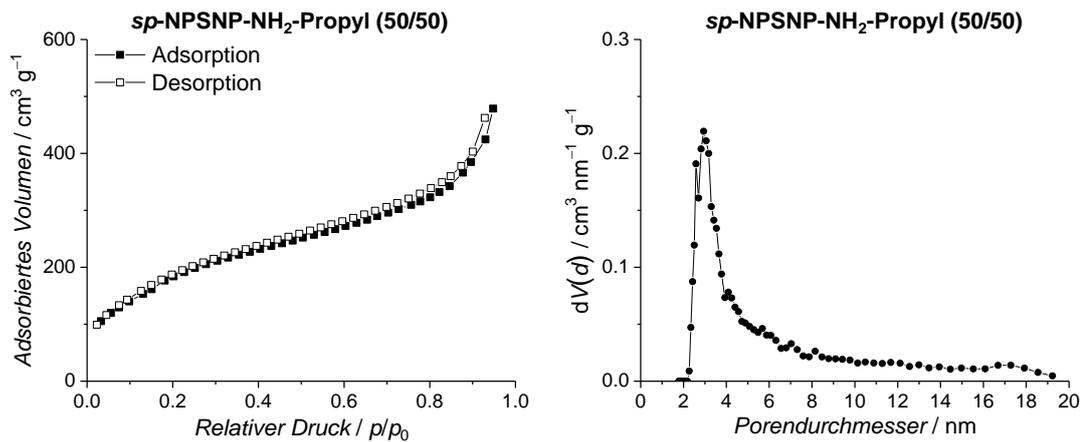


Abbildung 7.2: N_2 -Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von sp -NPSNP- NH_2 -Propyl (50/50).

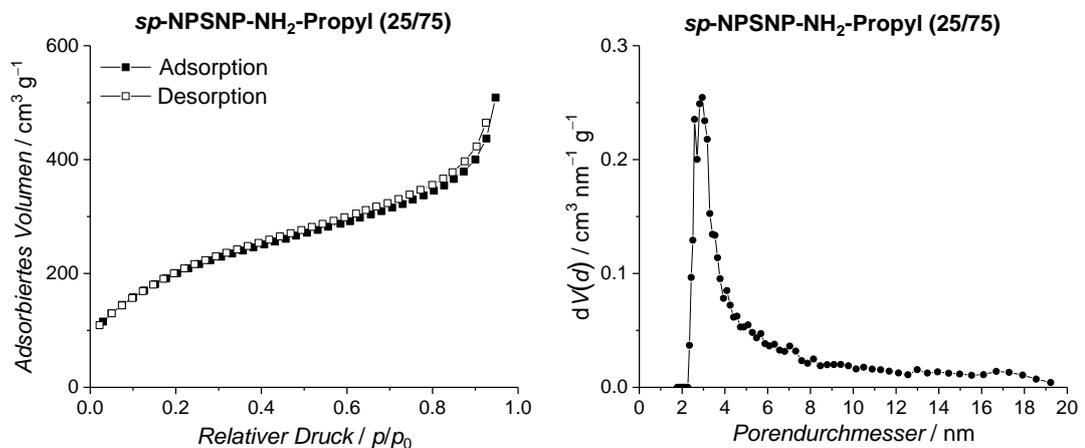


Abbildung 7.3: N_2 -Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von sp -NPSNP- NH_2 -Propyl (25/75).

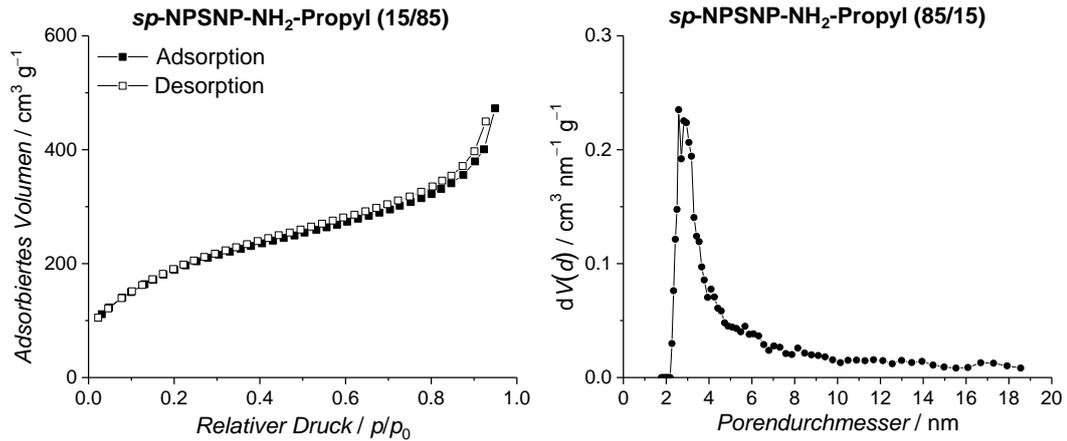


Abbildung 7.4: N₂-Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von *sp*-NPSNP-NH₂-Propyl (15/85).

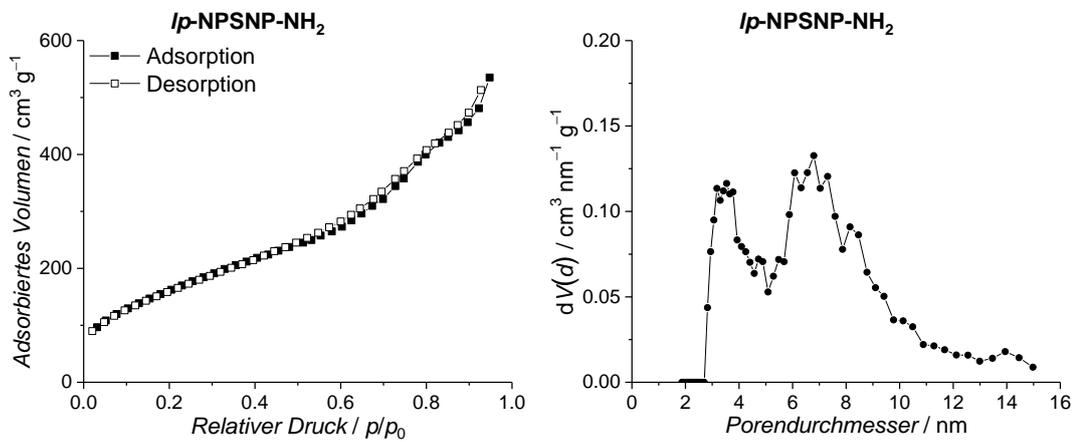


Abbildung 7.5: N₂-Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von *lp*-NPSNP-NH₂.

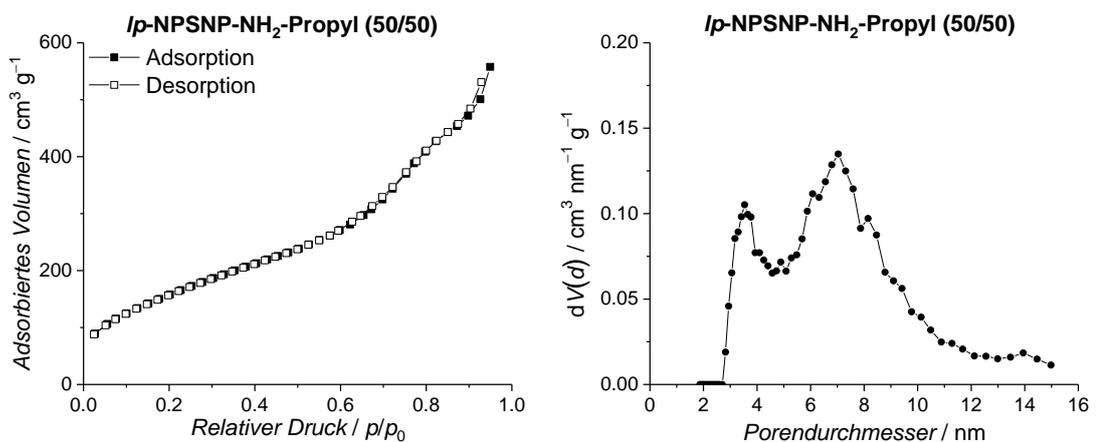


Abbildung 7.6: N₂-Physisorptionsisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (50/50).

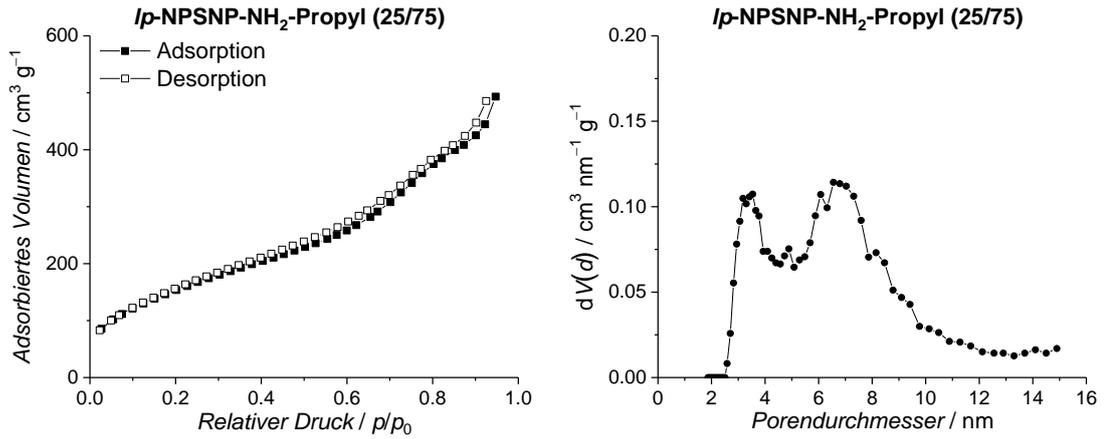


Abbildung 7.7: N₂-Physorptionisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (25/75).

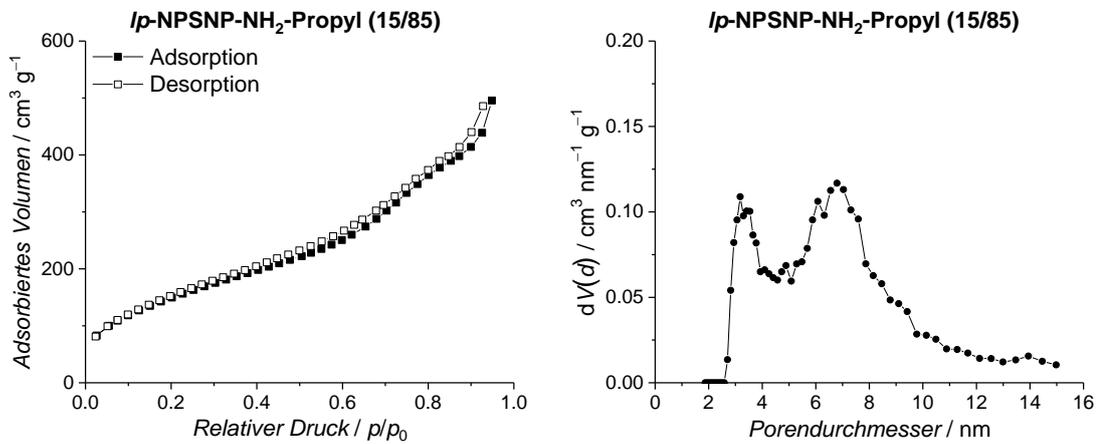


Abbildung 7.8: N₂-Physorptionisothermen (links) und DFT-Porenweitenverteilungen (rechts) von *lp*-NPSNP-NH₂-Propyl (15/85).

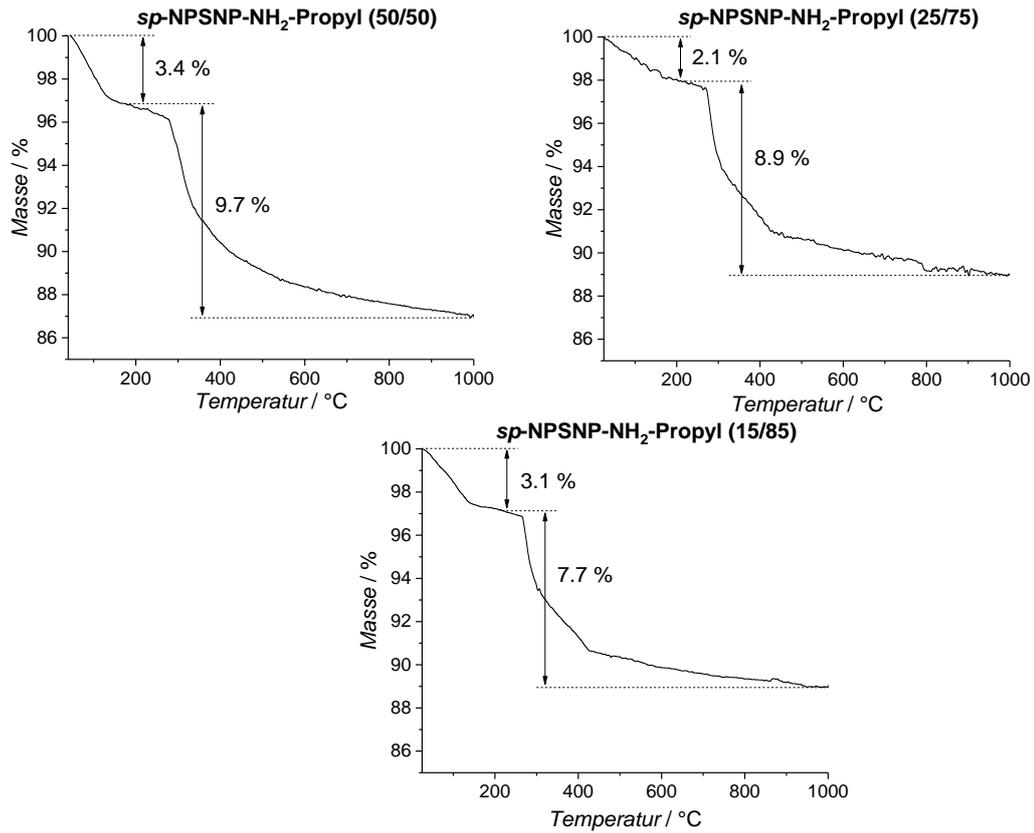


Abbildung 7.9: Messkurven der thermogravimetrischen Analysen der unmodifizierten sowie der unterschiedlich modifizierten *sp*-NPSNP.

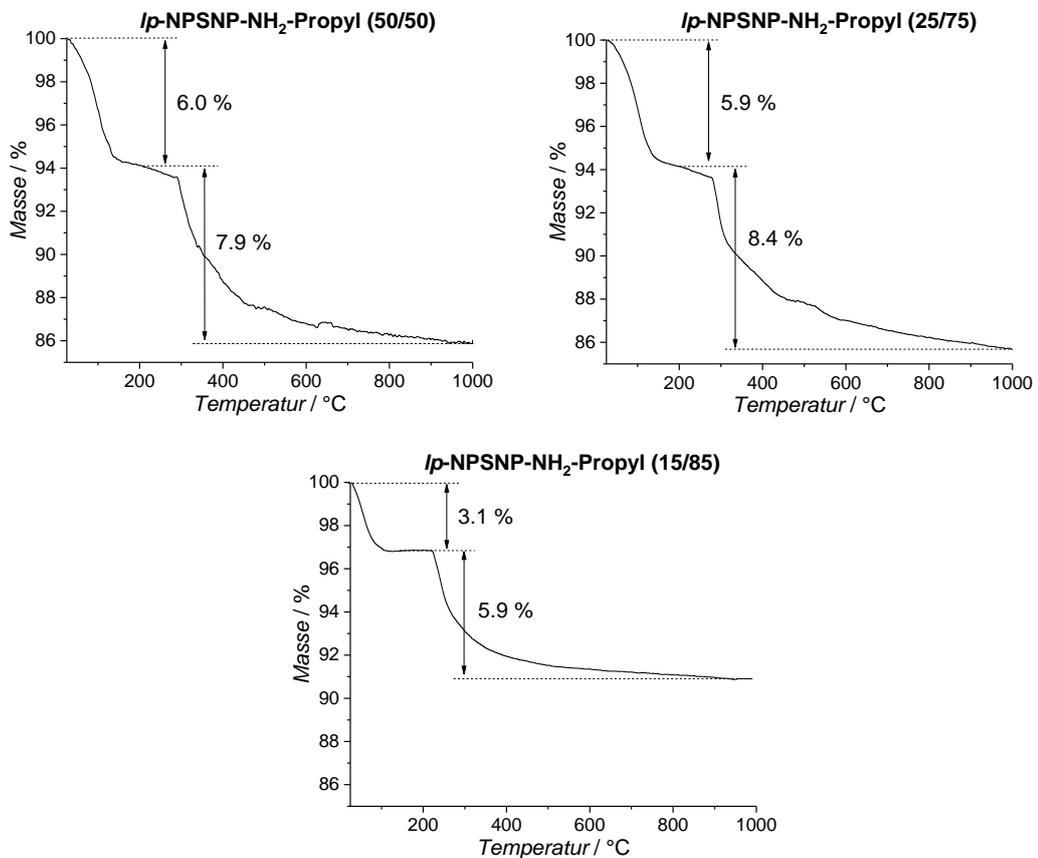


Abbildung 7.10: Messkurven der thermogravimetrischen Analysen der unmodifizierten sowie der unterschiedlich modifizierten *lp*-NPSNP.

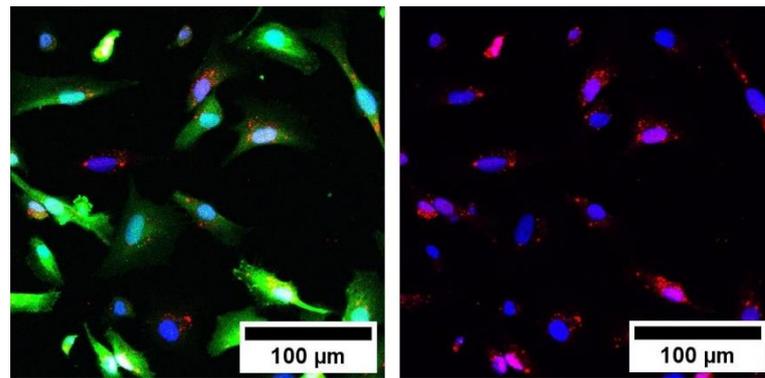
7.3.2 *In vitro*-Untersuchungen

Abbildung 7.11: CLSM-Aufnahmen 24 Stunden nach der Transfektion von fluoreszenter siRNA (rot) mit Lipofectamine® an HS5-GFP-Zellen (grün) mit DAPI-gefärbten Zellkern (blau). Links: Übereinandergelegte Aufnahmen aller drei Fluoreszenzkanäle; rechts: Aufnahme ohne grünen Fluoreszenzkanal.

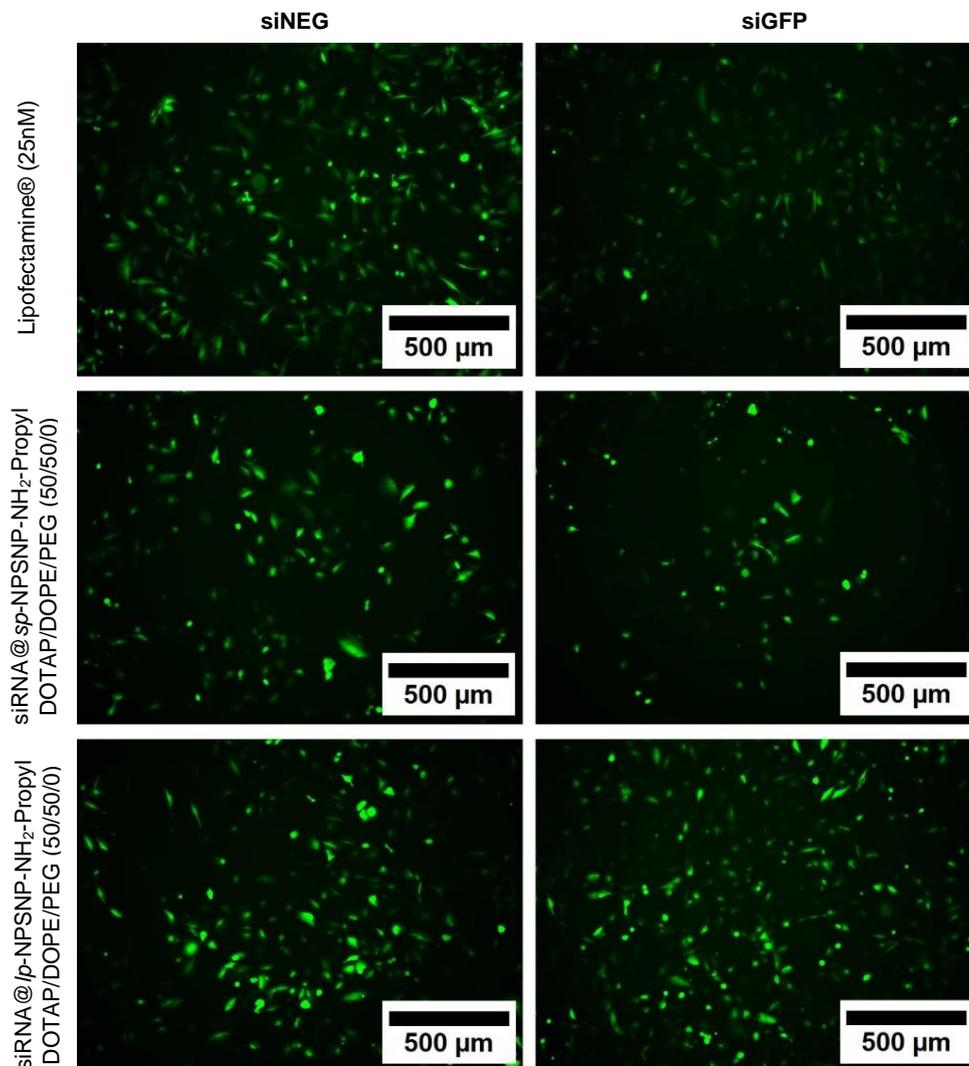


Abbildung 7.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zwei Tage nach der Transfektion von HS-5-GFP-Zellen mit NPSNPs, die mit siNEG bzw. siGFP beladen und einer DOTAP/DOPE/PEG (50/50/0)-Umhüllung versehen wurden. Zusätzlich sind die Aufnahmen von einer Transfektion mit Lipofectamine® gezeigt.

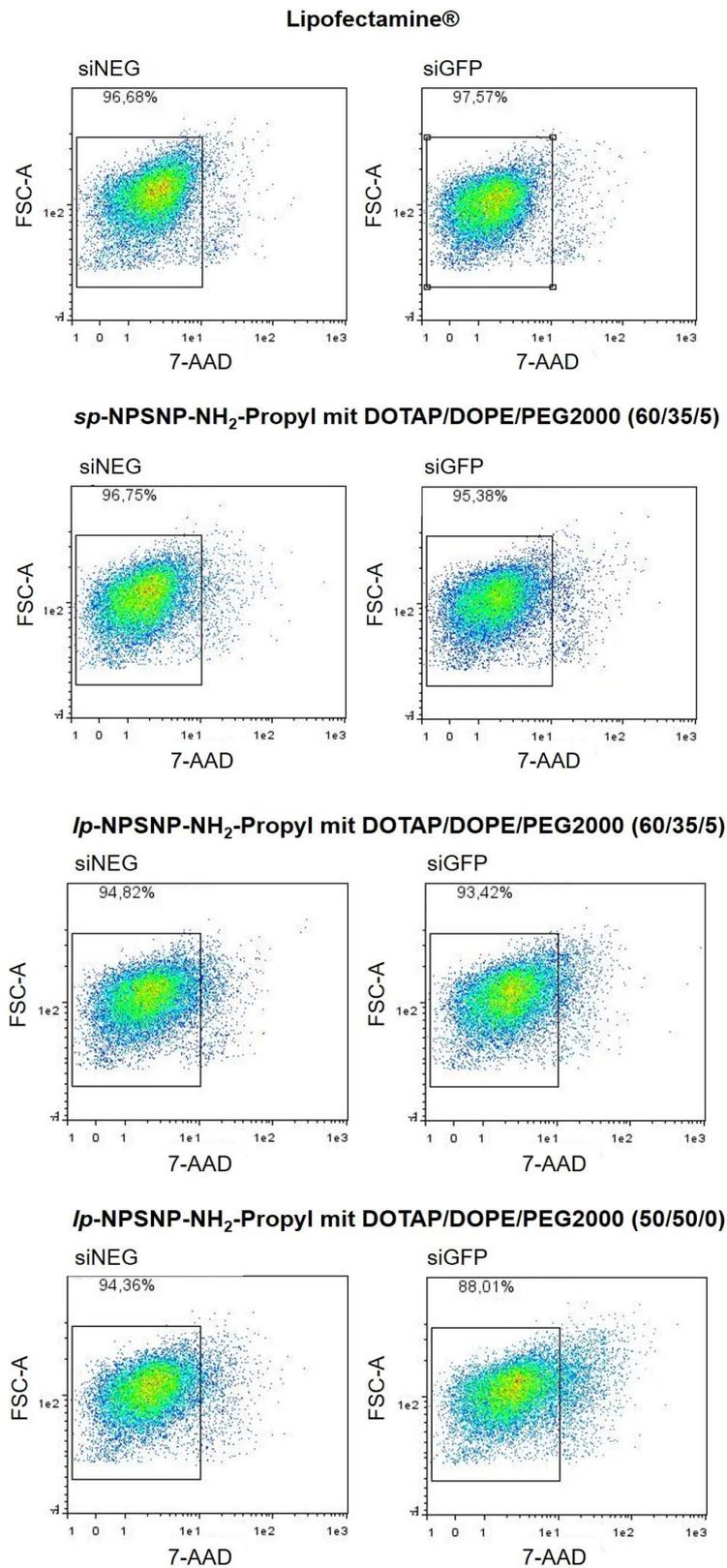


Abbildung 7.13: Darstellungen der 7-AAD-Messungen am Durchflusszytometer.

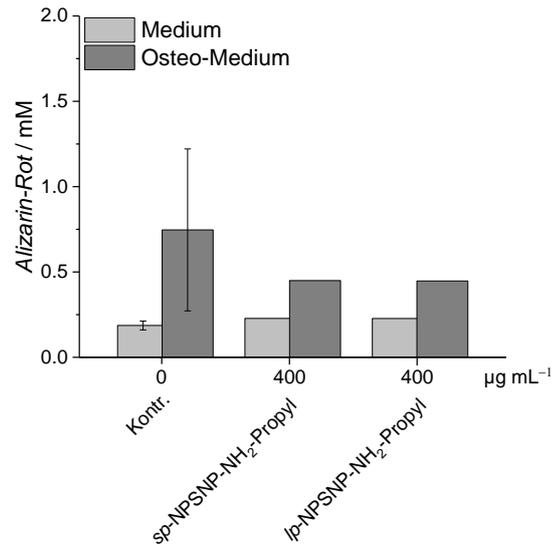


Abbildung 7.14: Ergebnisse der Quantifizierung von Alizarin-Rot 12 Tage nach der Inkubation der DPSCs mit verschiedenen Sorten NPSNPs.

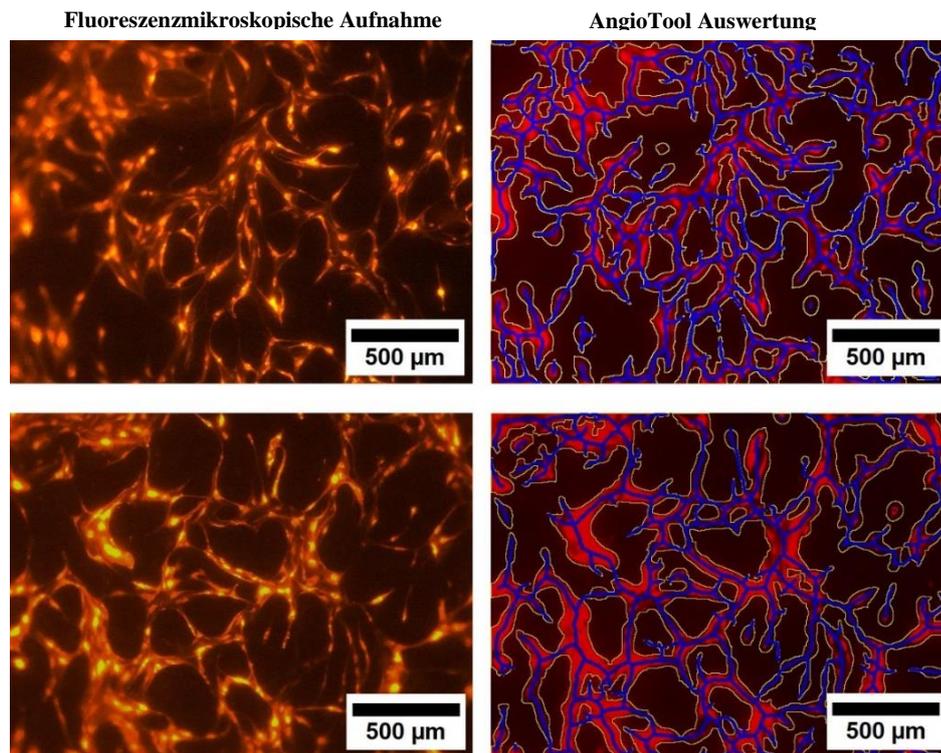


Abbildung 7.15: Exemplarische Darstellung der Auswertung des 2D-Tube-Assays mit der Software AngioTool. Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen; rechts: Mit AngioTool ausgewertete Aufnahme; oben: Kontrolle mit VEGF im Medium; unten: Fibrin gel mit 20 µg VEGF-beladener Nanopartikel;

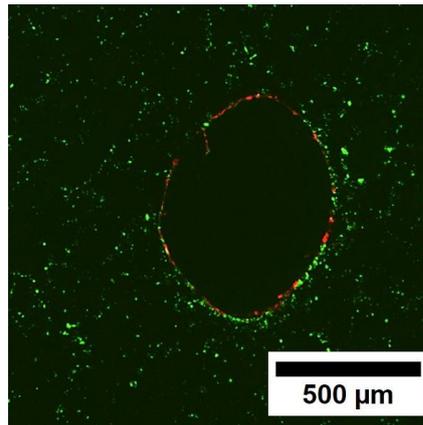


Abbildung 7.16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Fibringels mit FITC-markierten Silica-Nanopartikeln (grün) und RFP-HUVECs (rot), die in einen der vorgefertigten Kanäle ausgesät wurden.

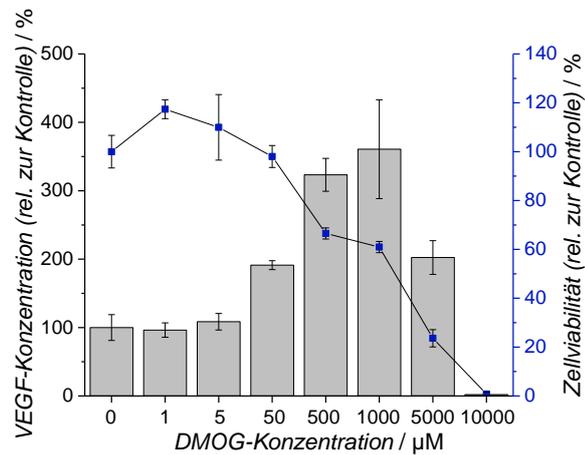


Abbildung 7.17: Bestimmte relative VEGF-Konzentration im Zellkulturmedium sowie Zellviabilität von ASCs nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen DMOG.

7.3.3 Berechnung der theoretischen Immobilisierungsmenge von siRNAs auf *sp*-NPSNPs sowie *lp*-NPSNPs

a) Dichte der *sp*-NPSNPs:

$$\rho_{(\text{Stöber})} = 2 \text{ g cm}^{-3}$$

Annahme: 50 % Porosität der *sp*-NPSNPs $\rightarrow \rho_{(\text{sp-NPSNPs})} = 1 \text{ g cm}^{-3}$

b) Volumen pro *sp*-NPSNP:

$$V = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3 = 4/3 \cdot \pi \cdot (46 \text{ nm}/2)^3 = 50\,965 \text{ nm}^3$$

c) Masse pro *sp*-NPSNP:

$$m = V \cdot \rho = 33\,510 \text{ nm}^3 \cdot 1 \text{ g cm}^{-3} = 5.0965 \cdot 10^{-14} \text{ mg}$$

d) Anzahl Partikel in 0.1 mg:

$$N_{(\text{sp-NPSNP})} = 0.1 \text{ mg} / 5.0965 \cdot 10^{-14} \text{ mg} = 1.96 \cdot 10^{12}$$

e) Oberfläche pro Partikel der *sp*-NPSNP:

$$O_{(\text{sp-NPSNP})} = 4 \cdot \pi \cdot r^2 = 4 \cdot \pi \cdot (46 \text{ nm}/2)^2 = 6\,648 \text{ nm}^2$$

f) Oberfläche der siRNA

$$O_{(\text{siRNA})} = 7.5 \text{ nm} \cdot 2.0 \text{ nm} = 15 \text{ nm}^2$$

g) Masse eines siRNA-Moleküls:

$$m_{(\text{siRNA})} = M/N_A = 13\,300 \text{ g mol}^{-1} / (6 \cdot 10^{23}) = 2.21 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

h) Menge von siRNA-Molekülen auf der Partikeloberfläche

$$N_{(\text{siRNA@sp-NPSNP})} = O_{(\text{sp-NPSNP})} / O_{(\text{siRNA})} = 6\,648 \text{ nm}^2 / 15 \text{ nm}^2 = 443.17$$

i) Maximale Masse von siRNA auf 0.1 mg *sp*-NPSNPs

$$\begin{aligned} m_{(\text{siRNA, max.})} &= N_{(\text{siRNA@sp-NPSNP})} m_{(\text{siRNA})} N_{(\text{sp-NPSNP})} \\ &= 443.17 \cdot 2.21 \cdot 10^{-20} \text{ g} \cdot 1.96 \cdot 10^{12} = 19.20 \text{ } \mu\text{g} \end{aligned}$$

j) Maximale Masse von siRNA auf 1 mg NPSNPs

$$m_{(\text{VEGF, max.})} = 19.20 \text{ } \mu\text{g} / 0.1 = 192.00 \text{ } \mu\text{g}$$

aa) Dichte der *lp*-NPSNPs:

$$\rho_{(\text{Stöber})} = 2 \text{ g cm}^{-3}$$

bb) Volumen pro *lp*-NPSNP:

$$V = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3 = 4/3 \cdot \pi \cdot (80 \text{ nm}/2)^3 = 168\,083 \text{ nm}^3$$

cc) Masse pro *lp*-NPSNP:

$$m = V \cdot \rho = 168\,083 \text{ nm}^3 \cdot 1 \text{ g cm}^{-3} = 26.808 \cdot 10^{-14} \text{ mg}$$

dd) Anzahl *lp*-NPSNP in 0.1 mg:

$$N_{(\text{lp-NPSNP})} = 0.1 \text{ mg} / 26.808 \cdot 10^{-14} \text{ mg} = 3.73 \cdot 10^{11}$$

ee) Oberfläche pro Partikel der *lp*-NPSNP:

$$O_{(\text{lp-NPSNP})} = 4 \cdot \pi \cdot r^2 = 4 \cdot \pi \cdot (80 \text{ nm}/2)^2 = 20\,106 \text{ nm}^2$$

hh) Menge von siRNA-Molekülen auf der Partikeloberfläche (*lp*-NPSNP)

$$N_{(\text{siRNA@lp-NPSNP})} = O_{(\text{lp-NPSNP})} / O_{(\text{siRNA})} = 20\,106 \text{ nm}^2 / 15 \text{ nm}^2 = 1\,340.40$$

ii) Maximale Masse von siRNA auf 0.1 mg *lp*-NPSNPs

$$\begin{aligned} m_{(\text{siRNA, max.})} &= N_{(\text{siRNA@lp-NPSNP})} m_{(\text{siRNA})} N_{(\text{lp-NPSNP})} \\ &= 1\,340.40 \cdot 6.34 \cdot 10^{-20} \text{ g} \cdot 3.73 \cdot 10^{11} = 11.08 \text{ } \mu\text{g} \end{aligned}$$

jj) Maximale Masse von siRNA auf 1 mg NPSNPs

$$m_{(\text{siRNA, max.})} = 11.08 \text{ } \mu\text{g} / 0.1 = 110.80 \text{ } \mu\text{g}$$

7.3.4 Berechnung der theoretischen Immobilisierungsmengen von VEGF auf *sp*-NPSNPs

a) Dichte der *sp*-NPSNPs:

$$\rho_{(\text{Stöber})} = 2 \text{ g cm}^{-3}$$

Annahme: 50 % Porosität der *sp*-NPSNPs $\rightarrow \rho_{(\text{sp-NPSNPs})} = 1 \text{ g cm}^{-3}$

b) Volumen der Partikel:

$$V = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3 = 4/3 \cdot \pi \cdot (46 \text{ nm}/2)^3 = 50\,965 \text{ nm}^3$$

c) Masse pro Partikel:

$$m = V \cdot \rho = 50\,965 \text{ nm}^3 \cdot 1 \text{ g cm}^{-3} = 5.0965 \cdot 10^{-14} \text{ mg}$$

d) Anzahl Partikel in 4 mg:

$$N_{(\text{sp-NPSNP})} = 4 \text{ mg} / 5.0965 \cdot 10^{-14} \text{ mg} = 7.849 \cdot 10^{13}$$

e) Oberfläche der Partikel:

$$O_{(\text{sp-NPSNP})} = 4 \cdot \pi \cdot r^2 = 4 \cdot \pi \cdot (46 \text{ nm}/2)^2 = 6\,648 \text{ nm}^2$$

f) Oberfläche des VEGFs:

$$O_{(\text{VEGF})} = 7 \text{ nm} \cdot 3.5 \text{ nm} = 24.5 \text{ nm}^2$$

g) Masse eines VEGF-Moleküls:

$$m_{(\text{VEGF})} = M/N_A = 38\,200 \text{ g mol}^{-1} / (6 \cdot 10^{23}) = 6.34 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

h) Menge von VEGF-Molekülen auf der Partikeloberfläche

$$N_{(\text{VEGF@ sp-NPSNP})} = O_{(\text{sp-NPSNP})} / O_{(\text{VEGF})} = 6\,648 \text{ nm}^2 / 24.5 \text{ nm}^2 = 271.35$$

i) Maximale Masse von VEGF auf 4 mg NPSNPs

$$\begin{aligned} m_{(\text{VEGF, max.})} &= N_{(\text{VEGF@ sp-NPSNP})} \cdot m_{(\text{VEGF})} \cdot N_{(\text{sp-NPSNP})} \\ &= 271.35 \cdot 6.34 \cdot 10^{-20} \text{ g} \cdot 7.849 \cdot 10^{13} = 1.35 \text{ mg} \end{aligned}$$

j) Maximale Masse von VEGF auf 1 mg NPSNPs

$$m_{(\text{VEGF, max.})} = 1.35 \text{ mg} / 4 = 0.338 \text{ mg}$$

Zusätzliche Berechnung für BSA:

ff.) Oberfläche des BSAs:

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

gg) Masse eines BSA-Moleküls:

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

hh) Menge von BSA auf Partikeloberfläche:

$$N_{(\text{BSA@ sp-NPSNP})} = O_{(\text{sp-NPSNP})} / O_{(\text{BSA})} = 6\,648 \text{ nm}^2 / 56 \text{ nm}^2 = 118.71$$

ii) Masse von BSA maximal auf 4 mg NPSNPs:

$$\begin{aligned} m_{(\text{BSA, max.})} &= N_{(\text{BSA@ sp-NPSNP})} \cdot m_{(\text{BSA})} \cdot N_{(\text{sp-NPSNP})} = 118.71 \cdot 1.1 \cdot 10^{-19} \text{ g} \cdot 7.849 \cdot 10^{13} = \\ &= 1.03 \text{ mg} \end{aligned}$$

jj) Masse von BSA maximal auf 1 mg NPSNP:

$$m_{(\text{BSA, max.})} = 1.03 \text{ mg} / 4 = 0.258 \text{ mg}$$

7.4 Veröffentlichungen

Artikel

siRNA-delivery with nanoporous silica nanoparticles

K. F. W. Besecke, H. Hartwig, F. Klodwig, P. Dillschneider, M. Stiesch, A. Hoffmann, P. Behrens, in preparation.

Fluorescent properties of rhodamine modified magnetic nanoporous core-shell nanoparticles

D. P. Warwas, F. Lübke, D. Pluta, K. F. W. Besecke, M. Schäfer, S. Noyun, M. Jahns, M. R. Krey, P. Taptimthong, M. C. Wurz, N.-C. Bigall, D. Dorfs, P. Behrens, in preparation.

Vorträge

Inorganic nanoparticles mediated delivery of siRNA

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
5th European Symposium and Exhibition on Biomaterials and Related Areas (EuroBio-MAT), **2019**, Weimar

Design of inorganic nanoparticle for siRNA delivery

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), **2018**, Braunschweig

Posterbeiträge (als Hauptautorin)

siRNA delivery with designed inorganic nanocarriers based on nanoporous silica nanoparticles

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), **2019**, Dresden

Designing inorganic nanocarriers for siRNA delivery

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (HYMA), **2019**, Sitges

siRNA-transfection with designed inorganic nanocarriers

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
31. Deutsche Zeolith-Tagung (DZT), 2019, Dresden

Design of inorganic nanoparticle for siRNA delivery

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), **2018**,
Braunschweig

Design of inorganic nanocarriers for the delivery of siRNAs

K. Besecke, P. Dillschneider, H. Hartwig, A. Hoffmann, M. Stiesch, P. Behrens
14. NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering, **2018**, Hannover

Fabrication of porous and multifunctional composite materials for bone regeneration

K. Besecke, N. Ehlert, L. Burmeister, A. Hoffmann, P. Behrens
23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), **2017**,
Würzburg

Nanoporous silica nanoparticles as delivery vehicle for siRNA

K. Besecke, P. Dillschneider, M. Stiesch, P. Behrens
13. NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering, **2017**, Hannover

siRNA-delivery with nanoporous silica-nanoparticles

K. Besecke, P. Dillschneider, D. P. Warwas, D. Nettelroth, M. Jahns, M. Stiesch, P. Behrens
2. International Symposium of BioFabrication for NIFE, **2017**, Hannover

7.5 Lebenslauf

	Karen Fabienne Wilhelmine Besecke
Geburtsdatum	05.10.1992
Geburtsort	Hannover
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
04/2017 – 03/2020	Arbeiten zur 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 Freisetzungssystemen für Biomoleküle für regenerative Anwendungen</i>
10/2014 – 09/2016	M. Sc. Material- und Nanochemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Masterarbeit: <i>Synthese makroporöser Materialien für die Herstellung osteoinduktiver Gerüste</i>
09/2015– 01/2016	ERASMUS Forschungspraktikum im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. J. Thomas an der Bangor University in Wales (UK) Thema der Forschung: <i>Application of Noble Metal Nanocrystals at the Water/Oil Interface in Catalysis</i>
10/2011 – 09/2014	B. Sc. Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Bachelorarbeit: <i>Herstellung von Kompositen aus Kollagen und magnetischen Nanopartikeln</i>
06/2011	Abitur am Gymnasium Lutherschule Hannover