Fakultät für Naturwissenschaften

Institut für Anorganische Chemie II (Synthese und Charakterisierung anorganischer Materialien)

Modulares Wirkstofftransportsystem auf Basis von Peptidnanofibrillen und mesoporösen Silikananopartikeln

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Melanie Gerstenberg

geboren in Freyung

2019

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Mika Lindén im Zeitraum von September 2015 bis September 2019 im Institut für Anorganische Chemie II der Universität Ulm angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thorsten Bernhardt

Erstgutachter: Prof. Dr. Mika Lindén

Zweitgutachter: Prof. Dr. Tanja Weil

Tag der Promotion: 30. Januar 2020

Universität Ulm, Institut für Anorganische Chemie II

Kurzfassung der Dissertation

Die Nanotechnologie in medizinischen Anwendungen hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Grund hierfür ist einerseits die Entwicklung hochauflösender Methoden, welche bei der Analyse und Entwicklung von Krankheiten Anwendung finden, und andererseits die Möglichkeit nanoskopische Systeme zu entwickeln, die spezifisch bestimmte Zell- und Gewebetypen adressieren und somit neue Technologien im Bereich des Wirkstofftransports ermöglichen. Als solches System haben sich mesoporöse Silikananopartikel (MSN) bereits mehrfach ausgezeichnet. Aufgrund ihres großen variablen Porenvolumens ist eine Wirkstoffbeladung mit hohen Beladungsgraden möglich. Zudem kann die Oberfläche der Partikel leicht funktionalisiert werden, um die Eigenschaften der Partikel sowie deren Selektivität einstellen zu können. Aufgrund der hydrolytischen Instabilität der mesoporösen Silikapartikel kann es jedoch zu einer schnellen Ablösung dieser Funktionalitäten kommen, was unter anderem mit einem Verlust der Selektivität einhergeht. Eine weitere Hürde ist die schnelle Ausscheidung der unfunktionalisierten Partikel aus dem Blutkreislauf. Um diese Hindernisse zu überwinden und gleichzeitig die Kontaktfläche für eine zelluläre Wechselwirkung zu erhöhen, sollen die Partikel nicht-kovalent an Peptidnanofibrillen (PNF) angebunden werden, welche die RGD-Sequenz als Selektivitätsmotiv aufweisen und somit an die auf vielen Krebszellen überexpressionierten Integrinrezeptoren binden können. In dieser Arbeit soll die Eignung dieses modularen Wirkstofftransportsystems für den selektiven Transport hydrophiler sowie hydrophober Wirkstoffe in A549-Lungenkrebszellen untersucht werden.

Hierfür wurden zunächst die Einzelkomponenten synthetisiert. Der verwendeten Synthese der MSN lag der Sol-Gel-Prozess in Kombination mit dem Endotemplatverfahren zugrunde. Hierdurch konnten Partikel mit einem mesoporösen Porensystem und unterschiedlichen Funktionalisierungen hergestellt werden. Um die spätere Anbindung an die PNF zu optimieren, wurden unfunktionalisierte Partikel als auch amin- und carboxyfunktionalisierte MSN synthetisiert und charakterisiert. Als zweite Komponente dienen die Peptide mit dem Grundgerüst KFKFEFEF in seiner unfunktionalisierten Form als auch mit der Sequenzerweiterung GGR(G/A)DS am *C*-Terminus, um ein Selektivitätsmotiv in das Fibrillennetzwerk einbringen zu können. Die Synthese wurde mittels Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield durchgeführt. Teil dieser Arbeit war zudem die Optimierung dieser Synthese zur Anwendung ohne den Einsatz eines mikrowellenassistierten Synthesizers. Im Anschluss an die erfolgreiche Synthese der Peptide mit und ohne den Einsatz von Mikrowellen, wurden die in wässrigem Medium ausgebildeten PNF mittels Dynamischer Lichtstreuung, Zetapotentialmessungen, transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen sowie Infrarotspektroskopie in ihrer Bildung und Beschaffenheit untersucht. Hierbei war es möglich durch Mischen der unfunktionalisierten und der

RGD-funktionalisierten Peptidstocklösung homogene Mischaggregate mit definiertem RGD-Anteil herzustellen. Über den Anteil des RGD-Peptids wird zudem das Zetapotential der Aggregate sowie deren Größe und Sekundärstruktur beeinflusst.

Nach der erfolgreichen Synthese und Charakterisierung der beiden Einzelbausteine, wurde die Anlagerung der unterschiedlich funktionalisierten MSN an die PNF analysiert. Da hierbei lediglich für die carboxylierten MSN neben einer homogenen Verteilung der Partikel über die Aggregate auch eine leichte Fluoreszenzmarkierung möglich war, wurden diese Partikel für die weiteren Experimente ausgewählt. Hierbei wurde mittels eines neuen Ansatzes der Durchflusszytometrie die MSN-Anlagerung an die unterschiedlichen PNF charakterisiert und diese transmissionselektronen- als auch konfokalmikroskopisch visualisiert. Hierbei wurde neben der Optimierung der Inkubationszeit auch eine mögliche Sättigung der PNF mit MSN untersucht. Nach 45 min Inkubation und bei einer MSN-Konzentration von 150 µg/µmol Peptid kam es für alle drei Fibrillen zu einer vollständigen Anlagerung der eingesetzten MSN an die PNF. In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob es ebenfalls möglich ist, die Partikel durch Zugabe zu den Fibrillen während ihrer Ausbildung in deren Netzwerk miteinzubauen. Dies konnte mittels transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen bestätigt werden, wobei es durch die Anwesenheit der MSNs bei Fibrillenausbildung zu einer veränderten Sekundärstruktur dieser kommt.

Um als Wirkstofftransportsystem geeignet zu sein, sind die Biokompatibilität sowie das Verhalten des Systems unter biologisch relevanten Bedingungen von großer Bedeutung. Um dies zu untersuchen, wurde der hydrolytische Abbau der Partikel in An- und Abwesenheit der Fibrillen mittels Untersuchungen der Überstände über ICP-OES analysiert, wobei die PNF keinen Einfluss auf den Abbau der Partikel nehmen. Zudem zeigten transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einen nahezu vollständigen Abbau der Partikel nach 48 h. Dieses Abbauverhalten der Partikel kann durch die Einlagerung der MSN in das Fibrillennetzwerk stark gehemmt werden, da diese hierbei vollkommen von Peptiden ummantelt vorliegen. Im Gegenzug hierzu beeinflussen die eingelagerten MSN den Abbau der ß-Faltblattstrukturen der PNF nicht, während die nachträglich an die Aggregate angelagerten MSN diesen proteolytischen Abbau verlangsamen. Alles in allem konnte gezeigt werden, dass die Komponenten eine gewisse Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen aufweisen, mit der Zeit aber dennoch abgebaut werden. Während die Proteinadsorption über Gelelektrophorese analysiert wurde, wurde die Biokompatibilität mittels Zellviabilitätsassays anhand von A549-Zellen untersucht. Hierbei konnte auch nach 48 h kein nennenswerter Einfluss der Einzelkomponenten als auch der Kombinationen aus PNF und MSN auf die Zellvitalität detektiert werden.

In einem letzten Schritt zur Untersuchung der Eignung als Wirkstofftransportsystem sollte die zelluläre Anbindung und somit die Selektivität des Systems genauer analysiert werden. Mittels durchflusszytometrischer Messungen und konfokalmikroskopischer Aufnahmen wurde die Anlagerung der PNF an die A549-Krebszellen untersucht. Hierbei konnte für die unfunktionalisierten PNF keinerlei Anbindung detektiert werden, während die funktionalisierten PNF mit steigendem RGD-Anteil einen Anstieg in ihrer Zellanlagerung detektieren ließen. Um die Selektivität weiter zu untermauern, wurden zusätzlich Messungen nach Sättigung der Zellen mit dem Peptid GGRGDS, welches das RGD-Bindungsmotiv der Integrinrezeptoren blockiert, durchgeführt. Nachdem die selektive Anbindung der RGD-PNF an die Zellen verifiziert worden war, wurden Daunorubicin- als auch DiO-beladene MSN an die PNF angelagert und deren Transporteigenschaften sowie die Freisetzungsmechanismen der Wirkstoffe mittels Konfokalmikroskopie genauer analysiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch eine sequenzielle Zugabe der beiden Komponenten eine Möglichkeit des Wirkstofftransportes darstellt. Hierbei wurden zunächst die PNF an die Zellen angelagert, während die MSN-Zugabe erst im Anschluss erfolgte. Hierdurch ergaben sich Änderungen in der freigesetzten DiO-Menge, was weitere Rückschlüsse über den möglichen Aufnahmemechanismus des DiO in das Zellinnere erlaubt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit erfolgreich ein System entwickelt wurde, welches als neuartiges modulares Wirkstofftransportsystem sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe selektiv zu Krebszellen mit überexpressionierten Integrinrezeptoren transportieren kann. Dieses System weist neben einer guten Biokompatibilität auch eine Bioabbaubarkeit auf. Mittels Variation einiger Parameter konnten zudem Einblicke in den Mechanismus des Wirkstofftransportes in die Zellen erlangt werden.

Abstract

Nanotechnology in medical applications has become increasingly important in recent years, due to the development of high-resolution methods used in the analysis and development of diseases and the possibility of developing nanoscopic systems that address specific cell and tissue types and thus enable new technologies in the field of drug delivery. Mesoporous silica nanoparticles (MSN) have already distinguished themselves several times as such systems. Due to their large, variable pore volume, it is possible to load active agents with high degrees of loading. In addition, the surface of the particles can be easily functionalized in order to adjust the properties of the particles and their selectivity. Due to the hydrolytic instability of the mesoporous silica particles, however, these functionalities can be quickly detached, which among other things results in a loss of selectivity. A further obstacle is the rapid elimination of the non-functionalized particles from the bloodstream. In order to overcome these obstacles and simultaneously increase the contact surface for cellular interaction, the particles are non-covalently bound to peptide nanofibrils (PNF), which exhibit the RGD sequence as a selectivity motif and can thus bind to the integrin receptors overexpressed on many cancer cells. In this thesis, the suitability of this modular drug delivery system for the selective transport of hydrophilic and hydrophobic drugs in A549 lung cancer cells will be investigated.

For this purpose, the individual components were first synthesized. The synthesis of the MSN was based on the sol-gel process in combination with the endotemplate process. This made it possible to produce particles with a mesoporous pore system and different functionalizations. In order to optimize the subsequenz binding to the PNF, unfunctionalized particles as well as amine- and carboxyfunctionalized MSN were synthesized and characterized. As a second component, the peptides with the basic structure KFKFEFEF in its unfunctionalized form as well as with the sequence extension GGR(G/A)DS at the C-terminus serve to introduce a selectivity motif into the fibrillar network. The synthesis was performed by solid phase peptide synthesis according to Merrifield. Part of this work was also the optimization of this synthesis for application without the use of a microwave assisted synthesizer. Following the successful synthesis of the peptides with and without the use of microwaves, the formation and properties of the PNFs formed in aqueous medium were investigated by means of dynamic light scattering, zeta potential measurements, transmissionelectron microscopic images and infrared spectroscopy. By mixing the unfunctionalized and the RGD-functionalized peptide stock solution it was possible to produce homogeneous mixing aggregates with a defined RGD content. The RGD peptide content also influences the zeta potential of the aggregates as well as their size and secondary structure.

After the successful synthesis and characterization of the two individual building blocks, the attachment of the differently functionalized MSN to the PNF was analyzed. Since only the carboxylated MSNs were able to be lightly fluorescently labelled in addition to a homogeneous distribution of the particles across the aggregates, these particles were selected for further experiments. A new approach of flow cytometry was used to characterize the MSN attachment to the different PNFs and to visualize these transmissionelectron and confocal microscopically. Besides the optimization of the incubation time, a possible saturation of the PNF with MSN was investigated. After 45 min incubation and at a MSN concentration of 150 µg/µmol peptide all three fibrils showed a complete adsorption of the MSN to the PNF. In a further experiment, it was to be investigated whether it is also possible to incorporate the particles into the network by adding them to the fibrils during their formation. This could be confirmed by transmissionelectron microscopic images, whereby the presence of MSN during fibril formation leads to a changed secondary structure of the fibrils.

Biocompatibility and the behaviour of the system under biologically relevant conditions are of great importance in order to be suitable as a drug delivery system. In order to investigate this, the hydrolytic degradation of the particles in the presence and absence of fibrils was analysed by means of ICP-OES measurements of the supernatants, whereby the PNF have no influence on the degradation of the particles. In addition, transmissionelectron microscopic images showed an almost complete degradation of the particles after 48 hours. This degradation behavior of the particles can be strongly inhibited by the incorporation of MSN into the fibrillar network, as these are completely encapsulated by peptides. On the other hand, the incorporated MSN do not influence the degradation of the ß-sheet structures of the PNF, whereas the MSN subsequenzly attached to the aggregates slow down this proteolytic degradation. All in all, it could be shown that the components show a certain stability under biologically relevant conditions, but are degraded over time. While protein adsorption was analyzed by gel electrophoresis, biocompatibility was investigated by means of cell viability assays using A549 cells. Even after 48 h, no significant influence of the individual components or the combinations of PNF and MSN on cell vitality could be detected.

In a final step to investigate the suitability as a drug delivery system, the cellular binding and thus the selectivity of the system should be analyzed in more detail. Flow cytometric measurements and confocal microscopic images were used to investigate the attachment of PNF to A549 cancer cells. No binding could be detected for the unfunctionalized PNF, while the functionalized PNF showed an increase in their cell attachment with increasing RGD content. In order to further underpin the selectivity, additional measurements were performed after saturation of the cells with the peptide GGRGDS that blocks the RGD binding motif of the integrin receptors. After the selective binding of the

RGD-PNF to the cells had been verified, daunorubicin- as well as DiO-loaded MSN were attached to the PNF and their transport properties as well as the release mechanisms of the active substances were analysed by confocal microscopy. In addition, it could be shown that the sequenzial addition of the two components is also a possibility for drug delivery. The first step was to attach the PNF to the cells, while the addition of MSN took place afterwards. This resulted in changes in the amount of DiO released, which allows further conclusions to be drawn about the possible absorption mechanism of DiO into the cell interior.

In summary, it can be said that in this work a system was successfully developed which, as a novel modular drug transport system, can selectively transport both hydrophilic and hydrophobic drugs to cancer cells with overexpressed integrin receptors. In addition to good biocompatibility, this system also exhibits biodegradability. By varying some parameters, it was also possible to gain insights into the mechanism of drug delivery into the cells.

Inhaltsverzeichnis

KURZFASSUNG DER DISSERTATION I

ABSTRACT IV

INHALTSVERZEICHNIS VII

ERLÄUTERUNGEN XII

I. EINLEITUNG 1

1. PEPTIDNANOFIBRILLEN 2
1.1. FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE 2
1.2. AUSBILDUNG VON PEPTIDNANOFIBRILLEN 5
1.3. PROTEOLYSESTABILITÄT 7
1.4. PEPTIDNANOFIBRILLEN IN BIOMEDIZINISCHEN ANWENDUNGEN 8
1.4.1. Interaktion von Peptidnanofibrillen mit biologischen Systemen 8
1.4.2. Gezielte Funktionalisierung für biologische Anwendungen 9
1.4.3. Möglichkeiten der Wirkstoffanbindung 11
2. WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PEPTIDEN UND SILIKAPARTIKELN 15
3. MESOPORÖSE SILIKAPARTIKEL 17
3.1. SYNTHESE VON MESOPORÖSEN SILIKAPARTIKELN 18
3.2. FUNKTIONALISIERUNG VON SILIKABASIERTEN MATERIALIEN 19
3.3. HYDROLYTISCHE STABILITÄT MESOPORÖSER SILIKAPARTIKEL 21
3.4. SILIKAPARTIKEL IN BIOMEDIZINISCHEN ANWENDUNGEN 23
3.4.1. Interaktion von mesoporösen Silikapartikeln mit biologischen Systemen 24
3.4.2. Gezielte Aufnahme in bestimmte Zellen 28
3.4.3. Gezielter Medikamententransport 30

II. ZIEL DER ARBEIT 34

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 39

1. SYNTHESE UND FUNKTIONALISIERUNG MESOPORÖSER SILIKAPARTIKEL 39
2. SYNTHESE DER PEPTIDE MITTELS FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE 46
3. AUSBILDUNG FIBRILLÄRER NETZWERKE 49
3.1. BILDUNGSKINETIK 50
3.2. CHARAKTERISIERUNG DER FERTIG AUSGEBILDETEN FIBRILLEN 55
3.3. VARIIEREN DES RGD-ANTEILS 61
3.4. ZUSAMMENFASSUNG DER AUSBILDUNG FIBRILLÄRER NETZWERKE 69
4. ANLAGERUNG DER SILIKAPARTIKEL AN DAS FIBRILLENNETZWERK 69

4.1. Auswahl der Partikelfunktionalisierung für die nicht-kovalente Anlagerung 70
4.2. Zugabe der Partikel nach Ausbildung des Fibrillennetzwerkes 72
4.2.1. Variierende RGD-Anteile 82
4.3. Zugabe der Partikel während Ausbildung des Fibrillennetzwerkes 86
5. Verhalten unter biologisch relevanten Bedingungen 96
5.1. Abbauverhalten der Partikel und Proteolyse der Fibrillen 97
5.1.1. Abbauverhalten der Partikel in wässrigen Medien 97
5.1.2. Proteolyseverhalten der Peptidnanofibrillen 105
5.1.3. Zusammenfassung des Abbauverhaltens der Partikel und der Peptidnanofibrillen 110
5.2. Proteinadsorption 110
6. Evaluation der Biokompatibilität 115
7. Anwendung als Wirkstofftransportsystem 117
7.1. Zelladhäsion an A549-Lungenkrebszellen 117
7.2. Applikation zur gezielten Medikamentenfreisetzung 123
7.3. Sequenzielle Zugabe der Komponenten 141

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 153

V. EXPERIMENTALTEIL 159

1. Materialien und Methoden 159
1.1. Verwendete Messgeräte 159
1.2. Verwendete Chemikalien 162
1.3. Verwendete (Puffer-)Lösungen 165
2. Partikelsynthese und –funktionalisierung 166
2.1. Synthese mesoporöser Silikapartikel 166
2.2. Postsynthestische Carboxylierung 167
2.3. Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff 167
3. Charakterisierung der Silikapartikel 168
3.1. Bestimmung der Größe mittels Transmissionselektronenmikroskopie 168
3.2. Bestimmung des Zetapotentials und der Größe mittels Dynamischer Lichtstreuung 168
3.3. Untersuchung der Aminfunktionen mit Ninhydrin 168
3.4. Untersuchung der Sinterprozesse 168
4. Peptidsynthese und -charakterisierung 169
4.1. Festphasenpeptidsynthese 169
4.2. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit „time of flight“-Analyse mit anschließender Massenspektroskopie (MALDI-TOF MS) 170
4.3. Fluoreszenzmarkierung der Peptide 170
5. Ausbildung fibrillärer Netzwerke 171
5.1. Untersuchung der Bildungskinetik 171
5.1.1. DLS und Zetapotential 171
5.1.2. Untersuchung der Morphologie mittels TEM 172
5.1.3. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR 172
5.1.4. Untersuchung des ß-Faltblattanteils mittels ProteoStat®-Einlagerung 172

5.2. Charakterisierung der fertig ausgebildeten Fibrillen 173
5.2.1. DLS und Zetapotential 173
5.2.2. Untersuchung der Morphologie mittels TEM 173
5.2.3. Sekundärstrukturanalysemittels FTIR 173
5.2.4. Untersuchung des ß-Faltblattanteils mittels ProteoStat®-Einlagerung 174
5.2.5. Peptidanzahl pro Fibrillenaggregat über Durchflusszytometrie 174
5.2.6. Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap 175
5.3. Variation des RGD-Anteils der Fibrillen 176
5.3.1. Untersuchung der Morphologie mittels TEM 176
5.3.2. DLS und Zetapotential 177
5.3.3. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR 177
5.3.4. Untersuchung der Homogenität der Fibrillenaggregate mittels Konfokalmikroskopie 177
5.3.5. Peptidanzahl pro Fibrillenaggregat über Durchflusszytometrie 178
5.3.6. Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap 178
6. Anlagerung der Silikapartikel an das Fibrillennetzwerk 178
6.1. Zugabe der Silikapartikel nach Ausbildung des Fibrillennetzwerkes 179
6.1.1. Untersuchung der Partikelanlagerung mittels TEM 179
6.1.2. Anlagerungskinetik mittels Durchflusszytometrie 179
6.1.3. Untersuchung der Partikelanlagerung mittels Durchflusszytometrie 180
6.1.4. Untersuchung der Partikelanlagerung mittels Konfokalmikroskopie 180
6.1.5. DLS und Zetapotential 180
6.1.6. Sekundärstrukturanalysemittels FTIR 180
6.1.7. Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap 181
6.1.8. Variation der zugegebenen Partikelkonzentration 181
6.1.9. Variation des RGD-Anteils 182
6.2. Zugabe der Silikapartikel während Ausbildung des Fibrillennetzwerkes 182
6.2.1. Bildungskinetik der Fibrillen mittels DLS und Zetapotential 182
6.2.2. Bildungskinetik der Fibrillen mittels TEM 182
6.2.3. Bildungsmechanismusuntersuchungen mittels DLS und Zetapotential 183
6.2.4. Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR 183
6.2.5. Untersuchung des ß-Faltblattanteils mittels ProteoStat®-Einlagerung 183
6.2.6. Peptidanzahl pro Fibrillenaggregat über Durchflusszytometrie 183
6.2.7. Untersuchung der Partikeleinlagerung mittels Durchflusszytometrie 184
6.2.8. Untersuchung der Partikeleinlagerung mittels Konfokalmikroskopie 184
6.2.9. Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap 184
7. Verhalten unter biologisch relevanten Bedingungen 185
7.1. Proteolyse der Fibrillen 185
7.1.1. Auswahl des geeigneten Mediums mittels ProteoStat® 185
7.1.2. Untersuchung der ß-Faltblattanteile mittels ProteoStat® 185
7.1.3. Morphologische Untersuchungen mittels TEM 186
7.2. Dispersionsstabilität der Silikapartikel 186
7.3. Auflösungsversuche der Silikapartikel 187
7.3.1. Bestimmung der Sättigungskonzentration des MSN mittels ICP-OES 187
7.3.2. Auflösungsuntersuchungen mittels ICP-OES und TEM 187

7.3.3. Untersuchungen des Zetapotentials während der Auflösung 188
7.3.4. Thermogravimetrische Untersuchungen der Auflösung 188
7.4. PROTEINADSORPTION 189
8. EVALUATION DER BIOKOMPATIBILITÄT 190
8.1. ZELLKULTUR 191
8.1.1. Zellkulturmedium 191
8.1.2. Kultivierung von A549-Lungenkrebszellen 191
8.1.3. Sättigung der Integrinrezeptoren auf der Zelloberfläche 191
8.2. ZELLVIABILITÄT MITTELS CELLTITERGLO® 192
9. ANWENDUNG ALS WIRKSTOFFTRANSPORTSYSTEM 193
9.1. ZELLADHÄSION AN A549-LUNGENKREBSZELLEN 193
9.1.1. Untersuchung der Zelladhäsion mittels Durchflusszytometrie 193
9.1.2. Quenchen der ATTO488-Fluoreszenz mittels Trypanblau 195
9.1.3. Untersuchung der Zelladhäsion mittels Konfokalmikroskopie 196
9.2. BELADUNG DER PARTIKEL 196
9.2.1. Beladung mit dem Modellwirkstoff DiO 196
9.2.2. Beladung mit dem Krebswirkstoff Daunorubicin 197
9.3. UNTERSUCHUNG DER WIRKSTOFFFREISETZUNG 197
9.3.1. Freisetzung des Modellwirkstoffs DiO und des Krebswirkstoffs Daunorubicin 198
9.3.2. Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Zetapotentials 198
9.3.3. Einfluss der Peptidnanofibrillen auf die Daunorubicinfreisetzung 198
9.3.4. Einlagerung des Daunorubicins in die Fibrillenstrukturen 199
9.4. UNTERSUCHUNG DES GEZIELTEN WIRKSTOFFTRANSPORTS IN A549-ZELLEN 199
9.4.1. Konfokalmikroskopische Untersuchungen 199
9.4.2. Durchflusszytometrische Untersuchungen 200
9.4.3. Einfluss der Partikelhydrolyse auf die DiO-Freisetzung 200
9.5. SEQUENZIELLE ZUGABE DER KOMPONENTEN 200
9.5.1. Durchflusszytometrie zur Anlagerung der MSN an mit 10% FCS inkubierte PNF 201
9.5.2. Konfokalmikroskopie zur Anlagerung der MSN an mit 10% FCS inkubierte PNF 201
9.5.3. Proteinadsorption mittels SDS-PAGE 201
9.5.4. Konfokalmikroskopie zur Untersuchung der Zelladhäsion 201
9.5.5. Untersuchung der Wirkstofffreisetzung in A549-Zellen mittels Konfokalmikroskopie 202

VI. LITERATURVERZEICHNIS 203

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 225

VIII. TABELLENVERZEICHNIS 241

IX. ANHANG 243

1. BREITE GRÖßENVERTEILUNG DER FIBRILLENAGGREGATE 243
2. PROTEINADSORPTION 245
3. FLUORESZENZMARKIERUNG DER MSN_{COOH} 247

4. DAUNORUBICINBELADUNG DER PARTIKEL UND PH-ABHÄNGIGE FREISETZUNG 248
5. MECHANISMUS DER DIO-FREISETZUNG INS INNERE DER ZELLEN 250

X. DANKSAGUNG 253

XI. CURRICULUM VITAE 255

XII. PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN 257

Erläuterungen

ERLÄUTERUNGEN

- Im Text vorhandene hochgestellte arabische Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis am Ende der Arbeit.

- Im Text, in den Abbildungen und in den Tabellen wurden die nachfolgenden Abkürzungen und Symbole sowie die nachfolgende Nomenklatur verwendet.

ABKÜRZUNGEN

AFM	Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*)
APTMS	(3-Aminopropyl)trimethoxysilan
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (*attenuated total reflection*)
BET	Methode nach Brunauer, Emmet und Teller
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe
BSA	Bovines Serumalbumin
C_{16}TAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cbz	Benzyloxycarbonyl-Gruppe
CD	Circulardichroismus
CES	Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz
CMC	Kritische Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration*)
CPP	Zellpenetrierendes Peptid (*cell penetrating peptide*)
DAPT	*N*-[*N*-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin-*tert*-butylester (γ-Sekretase-Inhibitor)
Dauno	Daunorubicin
DC	Dendritischen Zellen (*dentritic cells*)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat
DiPEA	Diisopropylethylamin

DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (Zellkulturmedium)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
EM	Elektronenmikroskopie
EPR	verbesserte Permeabilität und Rückhaltevermögen (*enhanced permeability and retention*)
et al.	und andere (*et alii*; *et aliae*; *et alia*)
FACS	Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*)
FBS	fötales Rinderserum (*fetal bovine serum*)
FCS	fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GSH	Glutathion
HBTU	2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HI-Virus	Humaner Immundefizienz-Virus
HIU	Helmholtz-Institut Ulm
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*optical emission spectrometry with inductively coupled plasma*)
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
MALDI-TOF MS	matrixunterstützten Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometrie (*matrix assisted Laser Desorption Ionization – time of flight Mass Spectrometry)*
MCM	*Mobil Composition of Matters*
MDR	Multiple Wirkstoffresistenz (*multiple drug resistance*)

MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPS	mononukleär-phagozytäre System
MSN	mesoporöse Silikananopartikel
MTS	4-[5-[3-(carboxymethoxy)phenyl]-3-(4,5-Dimethyl-1,3-thiazol-2-yl)tetrazol-3-ium-2-yl]benzolsulfonat (Zellproliferationsassay)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Zellviabilitätsassay)
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NL-DFT	nicht-lokale Dichtefunktionaltheorie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*)
Ova	Hühnerei-Ovalbumin-Protein
PBM2000	Poly(benzylmethacrylat)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline)*
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PNF	Peptidnanofibrillen
PZC	Nullladepunkt (*point of zero charge*)
RBC	Rote Blutkörperchen (*red blood cells*)
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenbeugung (*small angle X-ray scattering*)
SBA	*Santa Barbara Amorphous*
SDA	strukturdirigierende Agentien
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate)*
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	kleine eingreifende Ribonukleinsäure (*small interfering ribonuclein acid*)
SSC	Seitwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie (*side scattered light*)
Tat	Transaktivator für die Transkription
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid)*

TGA	thermogravimetrische Analyse
ThT	Thioflavin T
TiPS	Triisopropylsilan
TMOS	Tetramethylorthosilikat
TLCT	Echte Flüssigkristall-Templattierung (*true liquid crystal templating*)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolettstrahlung
Vis	Licht des sichtbaren (*visible*) Bereichs
WST	*water soluble tetrazolium* (Zellviabilitätsassay)
XRD	Röntgendiffraktion/-beugung (*X-ray diffraktion*)

SYMBOLE

d_{DLS}	Partikeldurchmesser bestimmt durch DLS-Messungen
d_{TEM}	Partikeldurchmesser bestimmt aus TEM Aufnahmen
Gew.%	Gewichtsprozent
M	Molmasse
p/p_0	Relativdruck
pK_S	Säurekonstante als Maß für die Stärke einer Säure
Q^2	zweifach über Oxidbrücken verknüpfte Silikaspezies
Q^3	dreifach über Oxidbrücken verknüpfte Silikaspezies
r	Radius
R^2	Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
V	Volumen
ζ-Potential	Zetapotential
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge (*emission*)

λ_{exc}	Anregungswellenlänge (*exc*itation)
π	Kreiszahl Pi ($\pi = 3{,}1415926 \ldots$)

AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

NOMENKLATUR

MSN_{OH}	kalzinierte MSN
MSN_{COOH}	carboxylierte MSN
MSN_{NH2}	aminfunktionalisierte MSN

$MSN_{OH/COOH/NH2}$_Dauno	Daunorubicin-beladene Partikel
MSN_{COOH}_DiO	DiO-beladene Partikel
PEP	Peptid mit der Primärsequenz KFKFEFEF
PEP_{RGD}	Peptid mit der Primärsequenz KFKFEFEFGGRGDS
PEP_{RAD}	Peptid mit der Primärsequenz KFKFEFEFGGRADS
PEP_{RGD}_IS	Inverses System, bei welchem die MSN_{COOH}-Zugabe bereits vor der Ausbildung der PNF erfolgt ist
PEP_{RGD}_SZ	Sequenzielle Zugabe, wobei die Zellen zunächst 3 h mit den PNF inkubiert wurden und anschließend erst die MSN-Zugabe erfolgte
RGD-cap	Peptid mit der Primärsequenz ATTO488-GG-*cyclo*-CWDDGWLCG, welches an RGD-Sequenzen binden kann

I. Einleitung

In den letzten Jahren hat die Nanotechnologie in medizinischen Anwendungen stark an Bedeutung gewonnen.[1] Grund hierfür ist neben der Entwicklung hochauflösender Methoden zur Analyse und Erkennung von Krankheiten auch die Möglichkeit, nanoskopische Systeme zu entwickeln, welche spezielle Zell- und Gewebetypen adressieren und neue Technologien im Bereich des Wirkstofftransports ermöglichen. Eine Einschränkung vieler konventioneller Wirkstoffe ist eine schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien sowie eine sehr geringe Selektivität gegenüber bestimmten Zell- und Gewebetypen.[2-4] Um die Effektivität einer Therapie zu erhöhen und gleichzeitig die Nebenwirkungen zu reduzieren, werden daher Wirkstofftransportsysteme benötigt, welche bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Hierzu zählen unter anderem eine hohe Biokompatibilität, eine hohe Beladungskapazität und eine zell- und gewebespezifische Wirkstofffreisetzung. Um eine frühzeitige Freisetzung des Wirkstoffes zu unterbinden, wird in der Literatur häufig auf eine Stimuli-gesteuerte Freisetzung zurückgegriffen. Als Stimuli dienen beispielsweise pH,[5,6] Temperatur,[7,8] Licht,[9] Enzyme[10] oder chemische Reaktionen.[11,12] Während des Transports schützt das nanoskopische Trägermaterial den Wirkstoff zudem vor Abbau und einer frühzeitigen Ausscheidung aus dem Blutkreislauf. Bisher untersuchte Systeme sind zum Beispiel anorganische Nanopartikel wie mesoporöse Silikananopartikel (MSN),[13] polymerbasierte Nanopartikel,[14,15] Liposomen,[16] Mizellen,[17,18] Kohlenstoffnanoröhrchen[19,20] und selbstassemblierende Peptide,[21,22] wobei die meisten eine sphärische Form aufweisen, wodurch sich lediglich eine geringe Kontaktfläche für die Interaktion mit der Zellmembran ergibt. Peptidnanofibrillen (PNF), welche sich aus selbstassemblierenden Peptiden ergeben, weisen durch ihre stäbchenförmige Struktur eine deutlich größere Kontaktfläche im Vergleich zu sphärischen Nanoträgern auf. Gegenstand dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung des Einflusses von PNF auf die Transporteigenschaften von MSN. Dabei werden die MSN nicht-kovalent an die RGD-funktionalisierten PNF angelagert. Aus diesen Gründen wird in den nachfolgenden Kapiteln genauer auf die Themen der Ausbildung und Funktionalisierung von PNF eingegangen, wobei ebenfalls die Eignung für den Wirkstofftransport und die Einführung von Selektivitätsmotiven aufgeführt werden. Zusätzlich werden auch die Synthese und Funktionalisierung von MSN und ihre Eignung als Wirkstofftransportsystem, darunter die Möglichkeit der Erhöhung der Selektivität sowie der Wirkstoffbeladung, besprochen.

1. Peptidnanofibrillen

Selbstassemblierende Peptide bilden sogenannte PNF aus, welche Wirkstoffe einlagern können und somit deren chemische, physikalische sowie biologische Integrität schützen können. Die hohe strukturelle Organisation ermöglicht eine kontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe über längere Zeiträume. Nachfolgend soll gezeigt werden, wie die Selbstassemblierung zu PNF abläuft und wie sie beeinflusst werden kann. Zudem soll erklärt werden, welche Rolle PNF in der Natur und im menschlichen Körper spielen und weshalb diese sich für den Transport verschiedener Wirkstoffe eignen.

1.1. Festphasenpeptidsynthese

Die erste erfolgreiche Peptidsynthese gelang durch den Nobelpreisträger Emil Fischer, welcher in den Jahren von 1902-1907 die Synthese verschiedenster Peptide durchführte.[23-25] Hierfür setzte er den Ester eines Dipeptids mit einem halogenierten Säurechlorid um, woraufhin er durch die Behandlung mit einer ammoniakalischen Lösung das entsprechende Tripeptid erhielt.[23] Auf diese Weise gelang ihm 1907 die Synthese des bis dahin längsten bekannten Polypeptids mit 18 Aminosäuren.[25] Während die Synthese langer Peptide durch Löslichkeit und Aufreinigung mit zunehmender Peptidlänge stark limitiert wurde, entwickelte Merrifield 1963 eine neue bahnbrechende Methode, welche die Peptidsynthese revolutionierte.[26] Nach dieser neuen Methode nach Merrifield erfolgte durch kovalente Anbindung der ersten Aminosäure an eine polymere unlösliche Festphase eine Immobilisierung des schrittweise aufgebauten Peptids, welches nach Fertigstellung von dieser abgespalten werden kann und ein Peptid in reiner Form erhalten wird. Die Anbindung des Peptids an die polymere Festphase ermöglicht es lösliche als auch unlösliche Nebenprodukte und überschüssige Reaktanden schnell und einfach über Filtration aus der Synthese zu entfernen, wodurch zeitaufwändige Umkristallisationsschritte zur Aufreinigung der Zwischenprodukte wegfielen. Als Festphase verwendete Merrifield ein in allen verwendeten Lösemitteln unlösliches Polystyrolharz, welches eine poröse Gelstruktur aufweist und somit besonders in gut quellenden Lösemitteln wie Dimethylformamid (DMF) ein leichtes Eindringen von Reagenzien ermöglicht. Diffusion und sterische Hinderung führen hierbei dennoch zu langsameren Reaktionsraten als es in Lösung der Fall wäre, welche allerdings durch Anpassung der Reaktionsbedingungen optimiert werden konnten. Durch diese Neuerung der Einführung einer Festphase zur Immobilisierung des herzustellenden Peptids erhielt diese neuartige Syntheseroute den Namen Festphasenpeptidsynthese. Um die erste Aminosäure an

das unlösliche Polystyrolharz anbinden zu können, wurde dieses zunächst teilweise chlormethyliert. Das Chlormethylpolystyrol reagiert anschließend unter Ausbildung einer Benzylesterbindung mit dem Triethylammoniumsalz der zu koppelnden Aminosäure. Alle nicht umgesetzten Chlormethylgruppen wurden anschließend mit einem Überschuss an Triethylammoniumacetat verestert. Um einen kontrollierten Aufbau der gewünschten Aminosäuresequenz vom *C*- zum *N*-Terminus zu gewährleisten, wurden die α-Aminogruppen der zu koppelnden Aminosäuren durch eine Schutzgruppe geschützt. In der ursprünglichen Synthese nach Merrifield kam hierbei die Benzyloxycarbonylschutzgruppe (Cbz) zum Einsatz, welche sich leicht mit Bromwasserstoff in Eisessig abspalten lässt. Allerdings führte die Umsetzung mit Bromwasserstoff auch zur teilweisen Spaltung der Esterbindung, welche das Peptid an die Festphase bindet, was zu Ausbeuteverlusten führte. Dieser Effekt konnte durch Nitrierung des Chlormethylpolystyrols vor der Anbindung der ersten Aminosäure minimiert werden, wodurch eine Entschützung mit 10% Bromwasserstoff und eine Abspaltung mit 30% Bromwasserstoff in Eisessig möglich wurde. Nach Neutralisation der Aminogruppe durch Triethylamin wurde die nächste zu koppelnde Aminosäure mit *N*,*N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) aktiviert und gekoppelt. Hierbei wurden bereits nach 30 min bei Raumtemperatur hohe Kopplungsausbeuten erhalten, während sich die schwer löslichen Nebenprodukte einfach durch Filtration abtrennen ließen. Nach der erfolgreichen Anbindung der Aminosäure wurde der Zyklus für alle weiteren Aminosäuren wiederholt und das fertige Peptid vom Harz abgespalten. In den nächsten Jahren optimierte Merrifield zusammen mit Erickson seine Methode zur Peptidsynthese weiter und wechselte dabei auf die *tert*-Butylcarbonylschutzgruppe (Boc) für die α-Aminogruppe.[27] Allerdings waren auch für diese Entschützung stark saure Bedingungen nötig, welche bei der Synthese langer Peptide durch eine hohe Gesamtbelastung durch Säuren zu Problemen führen konnten. 1978 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Sheppard und Williams eine Lösung für dieses Problem.[28] Anstelle einer säurelabilen Schutzgruppe führten sie die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) als Schutzgruppe für die α-Aminofunktion ein, welche sich sehr leicht unter milden basischen Bedingungen durch sekundäre Amine wie Morpholin, Piperazin oder Piperidin abspalten lässt. Weitere Optimierungen führten schließlich zu der heute häufig verwendeten Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie, welche in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.

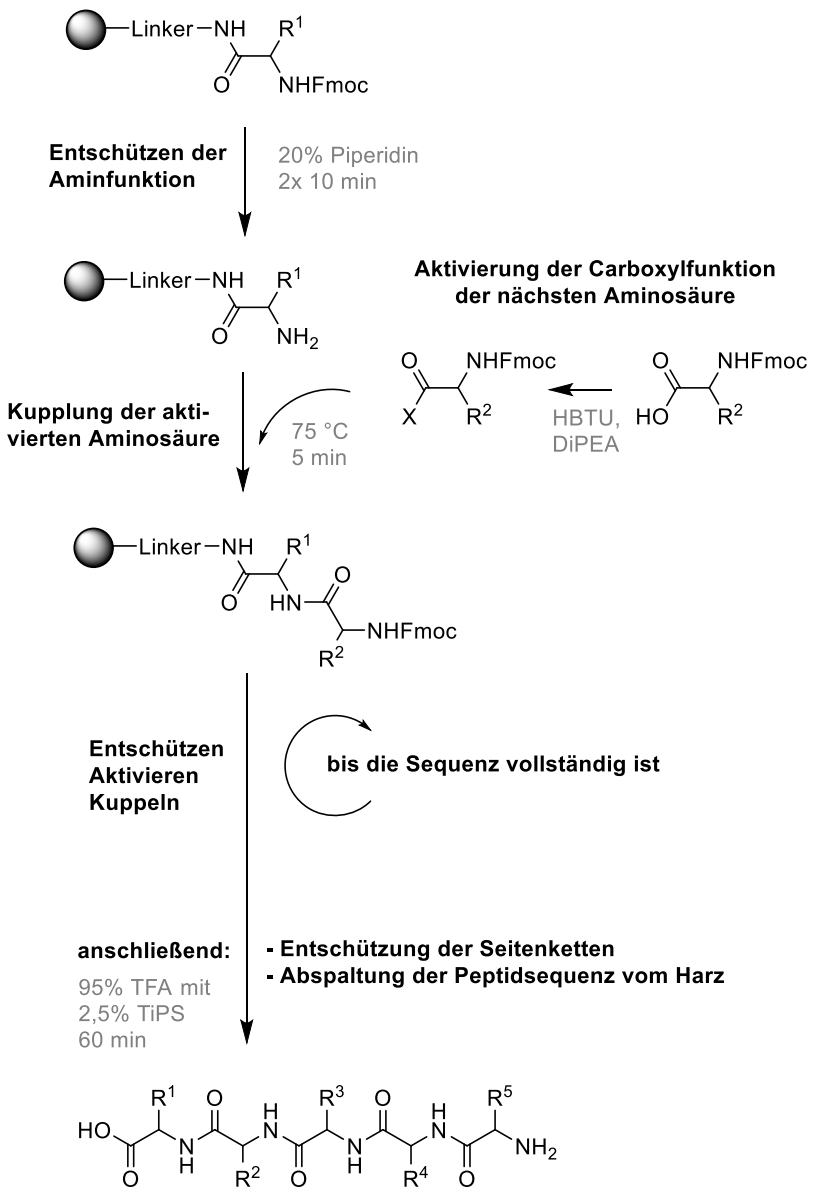


Abbildung 1: Schematische Darstellung der häufig angewendeten Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat (HBTU) sowie Diisopropylethylamin (DiPEA) als Aktivierungsreagenzien und 95%-iger Trifluoressigsäure (TFA) mit 2,5% Triisopropylsilan (TiPS) zur Abspaltung.

Hierbei liegen die funktionellen Gruppen der Seitenketten orthogonal zu der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe geschützt vor, um unerwünschte Verzweigungen in den Peptiden zu vermeiden. Durch geeignete Wahl der Schutzgruppen sowie der verwendeten Harze lassen sich sogar teilweise bis hin zu vollständig geschützte Peptide vom Harz abspalten.[29] Um die Kopplungszeiten weiter zu verkürzen, wird die Festphasenpeptidsynthese heutzutage in mikrowellenassistierten Synthesizern bei erhöhter Temperatur durchgeführt, wobei es nach Reaktionszeiten von 5 min bereits zu sehr hohen Kopplungsausbeuten kommt.

1.2. Ausbildung von Peptidnanofibrillen

Zhang *et al.* demonstrierten an einer Vielzahl von amphipatischen Peptiden, dass diese in der Lage sind ß-Faltblattstrukturen auszubilden.[30] Die Primärstrukturen der untersuchten kurzen Peptide sind angelehnt an sich wiederholende Muster in Sequenzen, welche in der Natur vorkommen. Hierbei handelt es sich um alternierende Muster aus hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. Dieser spezielle Aufbau führt aufgrund des Hydrophoben Effekts zur Ausbildung hochgeordneter Überstrukturen, den Peptidnanofibrillen. Dabei kommt es zur Ausbildung einer ß-Faltblatt-Doppelhelix, welche in ihrem Inneren die hydrophoben Seitenketten vor dem Wasser abschirmt, während die hydrophilen Seitenketten nach außen ragen (Abbildung 2A).[31]

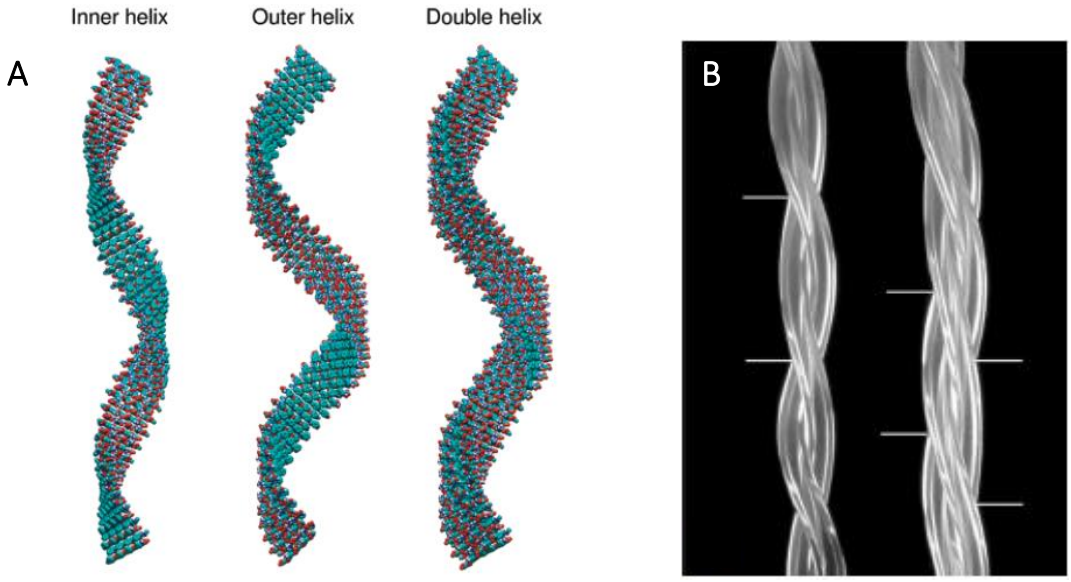


Abbildung 2: (A) Schematische Darstellung des Aufbaus einer ß-Faltblatt-Doppelhelix, aufgebaut aus amphipatischen Peptiden (blau: hydrophobe Seitenketten, rot: hydrophile Seitenketten) (Verändert mit freundlicher Genehmigung von D. M. Marini, W. Hwang, D. A. Lauffenburger, S. Zhang and R. D. Kamm, *„Left-Handed Helical Ribbon Intermediates in the Self-Assembly of a ß-Sheet Peptide" Nano Letters* 2002, *2*, 295-299. Copyright (2002) American Chemical Society). (B) Zusammenlagerung mehrerer Protofilamente zu Fibrillen (Verändert aus M. F. Perutz, J. T. Finch, J. Berriman and A. Lesk, *Amyloid fibers are water-filled nanotubes* 2002, *99*, 5591-5595. Copyright (2002) National Academy of Sciences, U.S.A.).

Dabei führen Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidrückgraten sowie hydrophobe, aromatische als auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten zur Stabilisierung dieser Strukturen, welche als Protofilamente bezeichnet werden und unter Ausbildung einer Fibrille zusammenlagern (Abbildung 2B).[32,33] Die Anzahl der Protofilamente, welche eine Fibrille bilden, variiert hierbei von der eingesetzten Peptidsequenz. So kommt es bei der SH3-Domäne der

Phosphotidylinositol-3'-kinase zur Zusammenlagerung von 4 Protofilamenten zu einer Fibrille,[34] während Insulin-, Lysozym- sowie Aß-Fibrillen aus 2-6 Protofilamenten aufgebaut sind.[35-37] Die ausgebildeten Fibrillen sind stabile, hochgeordnete Nanostrukturen, welche mehrere hundert Nanometer Länge und nur wenige Nanometer Durchmesser aufweisen.[33] Da die Fibrillen unlöslich und heterogen vorliegen, ist die Nutzung einiger generell zur Strukturaufklärung verwendeter Methoden schwierig, weshalb häufig auf Röntgendiffraktometrie (XRD), Feststoff-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Elektronenmikroskopie (EM) sowie Rasterkraftmikroskopie (AFM) zurückgegriffen wird.[38] So kann über EM- und AFM-Untersuchungen der Aufbau einer Fibrille aus mehreren individuellen Untereinheiten, den Protofilamenten, bestätigt werden.[32,34,39] Auch XRD-Messungen im Kleinwinkelbereich (SAXS) ergeben einen solchen Aufbau aus Protofilamenten, welche sich umeinander wringen und somit zu einer Fibrille zusammenlagern.[40] Den Hauptanteil dieser Protofilamente machen dabei ß-Faltblattstrukturen aus, welche mittels XRD und Feststoff-NMR genauer analysiert werden können. So können über NMR-Messungen der PNF Rückschlüsse über das Vorliegen paralleler oder antiparalleler ß-Faltblätter erhalten werden,[41-43] während über XRD Informationen über die Abstände zwischen den ß-Faltblättern und über die Packungsdichte der Seitengruppen anhand zweier charakteristischer Reflexe bei ~4,7° sowie ~9,7° erhalten werden können.[44-47] Allerdings handelt es sich bei den PNF keineswegs um eine statische Struktur, da an die Enden immer neue Monomere addieren, während gleichzeitig eine Fragmentierung eintritt, wodurch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomer und Fibrille entsteht.[48] Dieses Gleichgewicht liegt stark auf Seiten der Fibrillen. Wie schnell sich diese fibrillären Strukturen ausbilden, hängt dabei von der Peptidsequenz ab, da ihre Seitenketten, ihre Ladung, ihre Hydrophobizität als auch ihre Länge eine entscheidende Rolle spielen.[49,50] So fördern aromatische Seitenketten die Ausbildung fibrillärer Strukturen aufgrund von vorteilhaften π,π-Wechselwirkungen,[51] während der Einbau von Glycinen in die amphipatische Grundsequenz die Ausbildung fibrillärer Strukturen hemmt.[52] Caplan *et al.*[53] zeigten hierbei, dass die Zusammenlagerung der Peptide zu hochgeordneten Strukturen der DLVO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) folgt, wobei es zu einer Konkurrenz zwischen der repulsiven Wechselwirkungen der elektrochemischen Doppelschichten um die Peptide und der anziehenden Van der Waals-Kräfte zwischen den Peptiden selbst kommt. Nehmen die anziehenden Wechselwirkungen soweit zu, dass sie die repulsiven Kräfte übertreffen, kommt es zu einer Zusammenlagerung zu höher geordneten Strukturen. Anhand dieses Modells lassen sich zahlreiche Oligopeptide vorhersagen, welche zur Ausbildung von fibrillären Strukturen befähigt sind. So ergeben sich beispielsweise für das Peptid mit der Primärsequenz FKFEFKFE vorteilhafte elektrostatische sowie aromatische Wechselwirkungen, welche neben dem Hydrophoben Effekt einer schnellen Fibrillenbildung zugutekommen, wodurch Marini *et al.*[31] direkt nach Zugabe des Peptids in

wässriges Medium die Ausbildung von ß-Faltblattstrukturen mittels Circulardichroismus (CD) messen konnten. Während es dabei über die Zeit zu einer stetigen Zunahme dieser ß-Faltblattstrukturen aufgrund der Fibrillenbildung kommt, nimmt der Anteil an unstrukturierten Knäuelkonformationen stetig ab. Direkt zu Beginn der Messungen sind zudem helikale Strukturen detektierbar, welche von eventuellen Zwischenstufen bei der Fibrillenbildung herrühren, wodurch diese jedoch innerhalb kurzer Zeit wieder verschwinden. Der hochstrukturierte Aufbau solcher fibrillärer Strukturen gewährt diesen eine hohe Stabilität, welche sie im Vergleich zu monomeren Peptidmolekülen mit einer erhöhten Resistenz gegenüber rauen Bedingungen wie Hitze, pH, physikalischen Kräften und Proteasen ausstattet.[54,55]

1.3. Proteolysestabilität

Proteolyse leitet sich vom griechischen Wort *lysis* - *Auflösung* ab und steht für die Hydrolyse von Peptiden und Proteinen unter der Einwirkung von Proteasen oder chemischen Agenzien.[56] Bei der enzymatischen Proteolyse durch Proteasen kann eine schrittweise Hydrolyse von den Peptidenden durch Exopeptidasen[57] oder eine Spaltung im Inneren der Peptidketten in Peptidfragmente durch Endopeptidasen erfolgen.[58] Da Proteasen auch im Blut vorhanden sind, nehmen sie maßgeblich Einfluss auf die biologische Halbwertszeit von Proteinen und Peptiden, wodurch diese meist innerhalb weniger Sekunden abgebaut werden. Chen und Liang zeigten in ihren Untersuchungen zur proteolytischen Stabilität von Peptiden, dass diese eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber dem enzymatischen Abbau aufweisen, wenn sie in Form von höher geordneten Aggregaten vorliegen.[54] Hierbei beobachteten sie für das Peptid FLGALFRALSRLL eine gehemmte Proteolyse in humanem Serum, wenn dieses in Form ß-Amyloid-ähnlicher Strukturen vorliegt. Während das monomere Peptid nach 5 h bereits vollständig abgebaut wurde, weist die aggregierte Form eine Halbwertszeit von 8-9 h auf, weshalb sich nach 5 h über Massenspektrometrie noch über 95% der Peptide als intakt erwiesen. Dennoch kann es aufgrund des Vorliegens eines dynamischen Systems (Kapitel 1.2) zum Abbau der fibrillären Strukturen kommen, da die monomer vorliegenden Peptide des dynamischen Gleichgewichts von den Proteasen abgebaut werden können, wodurch es zur Verschiebung des Gleichgewichts kommt, gefolgt von einem langsamen Abbau der Fibrillen. Um diesem Abbau entgegenzuwirken, verwenden Nilsson *et al.* Peptide, welche aus D-Aminosäuren aufgebaut sind.[59] Diese kommen in der Natur seltener vor und werden daher von den Proteasen nicht abgebaut, wodurch sich die Halbwertszeit der fibrillären Aggregate deutlich erhöht. Während für Fibrillen der L-Form bereits nach 24 h etwa die Hälfte der Peptide abgebaut wurde und nach 5 Tagen lediglich

weniger als 5% der anfänglich eingesetzten Peptide noch intakt waren, erwiesen sich die Peptide der Fibrillen der D-Form als resistenter gegenüber den Proteasen und zeigten in massenspektrometrischen Untersuchungen auch nach 5 Tagen nur einen minimalen Abbau.

1.4. Peptidnanofibrillen in biomedizinischen Anwendungen

Viele PNF sind biokompatibel, biologisch abbaubar und nicht-immunogen, weshalb sie sich für *ex vivo*-Gewebekulturen,[60,61] Wirkstoff- und Proteintransport,[62-65] Unterstützung der Hämostase,[66,67] Zusatz für Bakterienaggregation,[68,69] Einsatz als Immunadjuvans,[70] Antibiotika[71] und Mikrobizide[72] eignen. Diese Beispiele zeigen das große Potential der kostengünstigen dynamischen Systeme.

1.4.1. *Interaktion von Peptidnanofibrillen mit biologischen Systemen*

Die Selbstassemblierung von Peptiden ist in der Natur weit verbreitet und wird häufig mit Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Typ II-Diabetes in Verbindung gebracht.[73,74] Dabei kommt es zu einer Fehlfaltung eines bestimmten Peptids oder Proteins, welche zur Ausbildung fibrillärer Strukturen führt und weitreichende Folgen haben kann. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass viel mehr oligomere Vorstufen die eigentlich toxische Spezies darstellt und die Fibrillen lediglich als Endprodukt resultieren.[75] Zudem konnten in Eukaryoten als auch in Prokaryoten bereits funktionelle Fibrillen entdeckt werden. So bilden *Escherichia coli*-Bakterien extrazelluläre *Curli*-Fibrillen aus, welche eine entscheidende Rolle für den Zell-Zell- sowie den Oberfläche-Zell-Kontakt spielen und somit die Kolonisation fördern.[76,77] Die auf den Melanosomen gefundenen fibrillären Strukturen von Pmel17 nehmen bedeutenden Anteil an der Melaninsynthese von Säugetieren, da vermutet wird, dass diese als Template dienen.[78] Des Weiteren werden Peptidhormone wie das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) vom Körper häufig in Sekretgranulaten mit amyloidähnlichen Strukturen gelagert.[79] Fibrilläre Strukturen sind also nicht immer gleich zelltoxisch.[70,80] So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Fibrillen der amphipatischen Peptide KFKFEFEF, KFKFEFEFGGRGDS und KFKFEFEFGGRADS auch nach 48 h keinerlei Einfluss auf die Viabilität von A549-Krebszellen nehmen.[80] Zudem weisen die untersuchten fibrillären Strukturen auch bei einer Konzentration von 100 µM keine hämolytische Aktivität auf, was sie als biokompatibles System für biomedizinische Anwendungen interessant macht.

In den späten 80er-Jahren wurde erstmals von sogenannten *Cell Penetrating Peptides* (CPPs) berichtet, welche entgegen der damaligen Erwartungen, dass Plasmamembranen für hydrophile Moleküle undurchlässig wären, ins Zellinnere vordringen konnten.[81,82] Dabei wurde die Aufnahme des *Trans-Activator of Transcription* (Tat)-Proteins in gewebekultivierte Zellen beobachtet, welches anschließend im Zellinneren die Genexpression fördert. Ein weiteres zellmembrandurchdringendes Protein ist das *Antennapedia homeodomain*-Protein, welches in Nervenzellen gelangen kann und dort die neurale Morphogenese reguliert.[83] Die Aufnahme dieser beiden Proteine ins Innere der Zellen führte zu weiteren Studien, wodurch die ersten CPPs hervorgebracht wurden, zu welchen unter anderen das Tat-Peptid[84,85] und das Pentratin[86] zählen. Die beiden Peptide leiten sich vom HIV 1-Tat-Protein und dem *Antennapedia homeodomain*-Protein ab und gehören somit der Klasse der Proteinabgeleiteten CPPs an. Neben dieser gibt es noch die Klassen der chimärischen CPPS, welche aus Fusion zweier natürlich vorkommender Sequenzen entstehen,[87-89] sowie der synthetischen CPPs.[90-93] Die meisten gängigen CPPs weisen hierbei eine positive Ladung auf, wodurch sie gut mit den negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran wechselwirken können.[94] Doch auch wenige anionische CPPs wurden bereits entdeckt. Einige der CPPs können zu PNF zusammenlagern, welche trotz der Ausbildung längerer Fasern von den Zellen aufgenommen werden können.[95,96] Formen die ausgebildeten PNF jedoch größere Netzwerke aus, wird die Aufnahme in die Zellen erschwert, wodurch es lediglich zu einer Anbindung der Aggregate an die äußere Zellmembran kommt.[80] Diese Art der äußeren Anbindung kann hierbei für den Transport von extrazellulär wirksamen Biomolekülen interessant sein.

1.4.2. *Gezielte Funktionalisierung für biologische Anwendungen*

Um als PNF für biologische Anwendungen genutzt werden zu können, müssen die verwendeten Peptide neben einer fibrillenbildenden Sequenz auch entsprechende Funktionalisierungen beinhalten, um ihre Eigenschaften für die jeweilige Anwendung zu optimieren. Hierbei ist es wichtig, dass die angebrachte Funktionalisierung die Selbstassemblierung nicht unterbindet. Zudem müssen die Funktionalitäten auf der Außenseite der Fibrillen dargestellt sein, um für Interaktionen mit dem System bereitzustehen.

Collier *et al.* arbeiten in ihren Studien für die Verwendung von PNF für biologische Anwendungen mit dem fibrillenbildenden Peptid Q11 (QQKFQFQFEQQ), wobei sie unterschiedliche Funktionalisierungen an den Q11-Grundkörper anbringen, um die Eigenschaften der gebildeten Fibrillen für die entsprechende Anwendung anzupassen.[70,97,98] Durch die Anbindung einer Sequenz aus

17 Aminosäuren, welche aus dem Hühnerei-Ovalbumin-Protein (Ova) stammt, konnte durch Injektion in Mäuse *in vivo* gezeigt werden, dass das funktionalisierte Ova-Q11 im Gegensatz zum nicht-immunogenen Q11 eine immunogene Wirkung aufweist, welche durch das Ova hervorgerufen wird und das Ova-Q11 als vielversprechendes Immunadjuvans hervorhebt.[70] In weiteren Arbeiten wurden die Adhäsionsmotive RGDS, IKVAV und YIGSR jeweils an den *N*-Terminus des Q11 angebunden.[98] Durch Ausbildung von Gelen, welche unterschiedliche Mengen an funktionalisierten Peptiden enthalten, konnte eine Abhängigkeit der Zelladhäsion von den jeweiligen Sequenzen beobachtet werden. Hierzu wurden HUVEC-Zellen in den Gelen angesiedelt und 64 h nach ihrem Wachstum über den MTS-Assay die Zellzahl untersucht. Um den Einfluss der Adhäsionsmotive weiter zu untermauern, wurden Gele hergestellt, welche mit Referenzsequenzen funktionalisiert waren, welche den Motiven ähnlich sind, aber zu keiner erhöhten Adhäsion und somit zu keiner erhöhten Zellzahl nach 64 h führen. Lee *et al.* befassen sich hingegen mit dem fibrillenbildenden Grundkörper FKFEFKFEF, welchen sie ebenfalls durch die Anbringung verschiedener Funktionalitäten für unterschiedliche biologische Anwendungen optimieren.[69,95] Durch die Funktionalisierung am *N*-Terminus mit mannosefunktioanlisierten Polyethylenglykol (PEG)-Ketten unterschiedlicher Länge (PEG_3, PEG_6, PEG_{12}), konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass der ß-Faltblattanteil der ausgebildeten Fibrillen gegenläufig proportional zur Länge des PEG-Linkers ist, was sie auf sterische Effekte zurückführen, wodurch es zu einer Störung der Selbstassemblierung kommt.[69] Ein ähnlicher Effekt konnte in Arbeiten der Arbeitsgruppe Weil für die Anbindung von Mannose an den *N*-Terminus des Grundkörpers KFKFEFEF gezeigt werden, wobei ab einem Anteil von 25 mol% mannosefunktionalisiertem Peptid die Fibrillenbildung stark beeinflusst wird.[80] Ergänzend konnte die Arbeitsgruppe von Lee eine Zunahme der Immobilisierung von Bakterien mit zunehmendem Mannoseanteil in den ausgebildeten Fibrillen beobachten.[69] Verifizieren konnten sie den Einfluss der Mannose auf dieses Phänomen durch den Einsatz von *Escherichia coli*-Bakterien vom ORN208-Stamm, welche keine Mannose binden und somit auch keine Immobilisierung zeigen. Auch galactosefunktionalisierte PNF wurden als Referenz untersucht und zeigten ebenfalls keinerlei Effekte der Bakterienimmobilisierung, wodurch der Einfluss der Mannose bestätigt werden konnte. In anderen Arbeiten befasst sich Lee mit der Verwendung der FKFEFKFE-PNF für den selektiven Zelltransport, indem der Grundkörper am *N*-Terminus mit zyklischem RGD oder als Negativkontrolle mit zyklischem RDD funktionalisiert wurde.[95] Die RGD-funktionalisierten PNF konnten nicht nur aufgrund von endozytotischer Aufnahme im Zytoplasma von Jurkat-Zellen nachgewiesen werden, sondern konnten auch das kleine hydrophobe Gastmolekül Nilrot erfolgreich ins Zellinnere transportieren, während die RDD-PNF deutlich schlechter aufgenommen wurden. Gras *et al.* untersuchten ebenfalls die RGD-Funktionalisierung von PNF, wobei sie als Grundkörper die TTR1-

Sequenz (YTIAALLSPYS) aus dem amyloidogenen Protein Transthyretin verwendeten.[99] Diese wurde am *C*-Terminus mit den Sequenzen GGRGDS oder GGRADS funktionalisiert. Durch die Anbringung des Dansyl-Fluorophores am *C*-Terminus der Sequenzen konnte über die Anbindung von Immunogold die Anwesenheit von RGD/RAD-Sequenzen auf der PNF-Außenseite verifiziert werden, wodurch 3T3-Zellen mit den RGD-Einheiten interagieren können. Dies hat zur Folge, dass 3T3-Zellen, welche mit den RGD-PNF behandelt wurden, anschließend weniger stark an eine Fibronektin-Oberfläche binden als es für die Referenzfibrillen TTR1 und TTR1-RAD der Fall ist, welche keinen Einfluss auf die Zelladhäsion an die Oberfläche haben. Auch Kasai *et al.* nutzen neben der IKVAV-Sequenz die RGD-Sequenz als Adhäsionsmotiv für die Zellanlagerung.[100] Hierzu verwenden sie das Peptid A208 (AAS**IKVAV**SADR), welches bereits die IKVAV-Einheit beinhaltet und zudem ß-Faltblattstrukturen ausbilden kann. Dieser Grundkörper wurde anschließend mit der Sequenz GRGDS oder RSGGD über einen Glycinlinker funktionalisiert. Die ausgebildeten Gele wurden mit Fibroblasten versetzt, deren Anlagerung aufgrund der IKVAV-Sequenz gefördert wurde. Durch die Zugabe von freiem IKVAV konnte daher die Zellanlagerung in allen Fällen abgeschwächt werden. Um eine zusätzliche Anlagerung über die Integrine anhand der RGD-Funktionalisierung zu zeigen, wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder freies GRGDS zugegeben, wodurch lediglich im Falle der RGD-funktionalisierten Gele eine Abnahme in der Zellanlagerung zu beobachten war. Hierdurch konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass es möglich ist multivalente Fibrillen herzustellen, welche Verwendung in biologischen Anwendungen finden können.

1.4.3. *Möglichkeiten der Wirkstoffanbindung*

Die Möglichkeiten Wirkstoffe mit Hilfe selbstassemblierender Strukturen zu transportieren sind vielseitig (Abbildung 3). So können viele Peptid- und Proteinhormone selbstständig oder durch äußere Einflüsse wie Animpfen mit selbstassemblierenden Peptiden oder Temperaturerhöhung zu höher geordneten fibrillären Strukturen zusammenlagern.[55,79,101,102] Durch das dynamische Gleichgewicht zwischen Monomer und Fibrille kommt es zu einer langsamen und kontinuierlichen Freisetzung der aktiven Hormone, wodurch eine Langzeitwirkung ermöglicht wird. Im Falle des Peptidhormons Oxyntornodulin, welches zur Behandlung von Fettleibigkeit und Diabetes eingesetzt wird, kann die Bioaktivität bei Gabe der selbstassemblierten Form unter die Haut von Ratten über 5 Tage konstant gehalten werden, während das monomer zugegebene Peptidhormon bereits nach 4 h im Serum nicht mehr detektierbar ist.[101] Auch das GnRH[55] und Insulin[102] sind Beispiele für selbstassemblierende

Peptidwirkstoffe, welche fibrilläre Strukturen ausbilden und somit als Langzeitdepot eingesetzt werden können, welches eine kontrollierte Freisetzung aktiver Peptide ermöglicht.

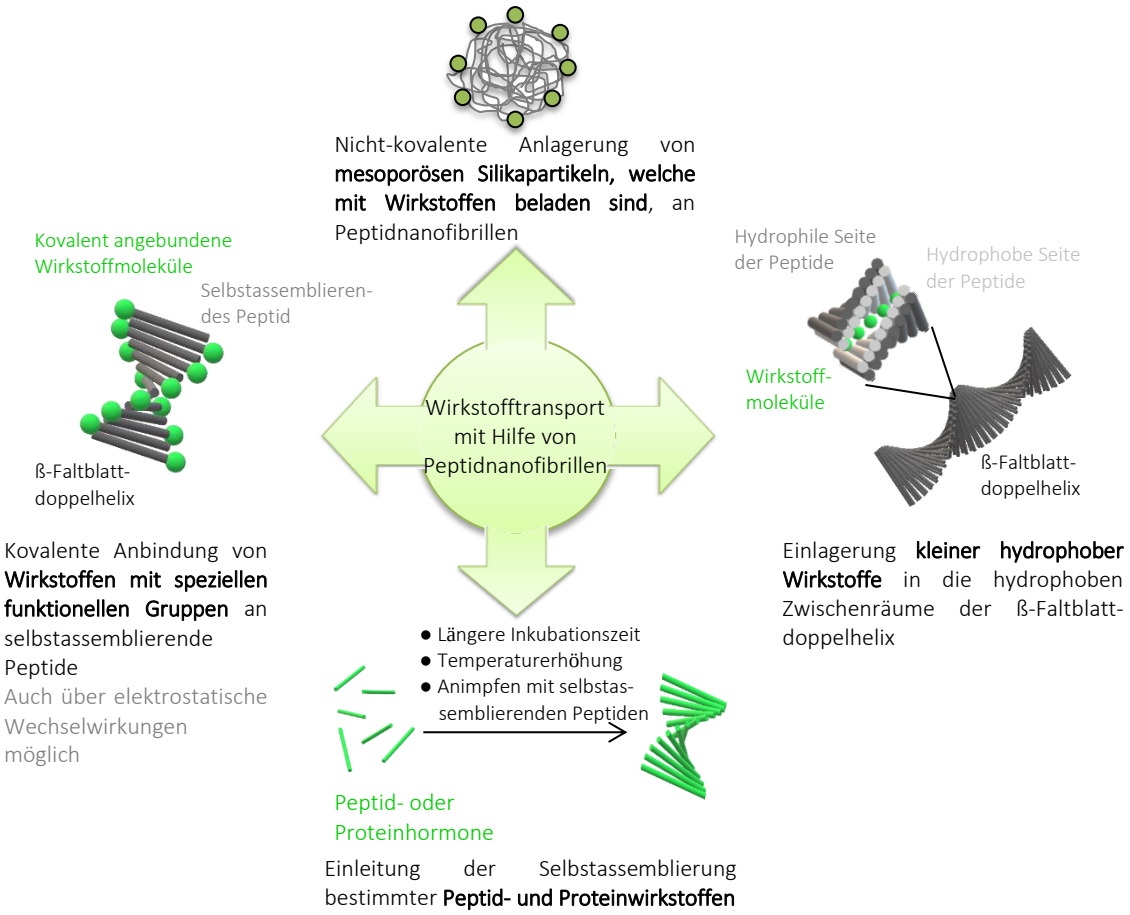


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten Wirkstoffe an Peptidnanofibrillen anzubinden bzw. einzulagern. Die Kombination von PNF und MSN ist hierbei noch ein theoretisches System, welches erst in dieser Arbeit auf seine Eignung als Wirkstofftransportsystem untersucht werden soll.

Weist der verwendete Wirkstoff spezielle funktionelle Gruppen auf, ist auch eine Anbindung an ein selbstassemblierendes Molekül über einen Linker möglich. So können beispielsweise Wirkstoffe wie Taxol,[12,103,104] Bortezomib,[5,105] Dexamethason,[12] Camptothecin[12,106] und Doxorubicin[107] über stimuli-gesteuerte Linker wie Ester,[12,103,104] Disulfidbrücken[12,106] und Hydrazine[107] angebunden und kontrolliert freigesetzt werden. Beispiele für eine solche Art der Wirkstoffanbindung ist die pH-reversible Anbindung von Bortezomib an catecholfunktionalisierte selbstassemblierende Grundkörper, wobei es im sauren Milieu zur Spaltung der Bindung kommt und der Wirkstoff freigesetzt wird.[5,105] Auch die Anbindung des Zytostatikums Doxorubicin über einen Hydrazinlinker stellt eine pH-reversible Möglichkeit der Wirkstoffanbindung dar.[107] Lyu *et al.* konnten diese Anbindung mit der Einlagerung des Wirkstoffes Verapamil in die hydrophoben Zwischenräume der Fmoc-GFLGG-Doxorubicin-Fibrillen

kombinieren, wodurch sie zeitgleich den Effekt der *Multiple Drug Resistance* (MDR) stark reduzieren konnten. Ein von Mao *et al.* untersuchtes System stellt das Peptid FFFKE dar, welches an seinem *N*-Terminus den Wirkstoff Dexamethason und an der Lysinseitenkette den Wirkstoff Taxol oder Hydroxycamptothecin jeweils über einen Bernsteinsäureanhydridlinker angebunden hat.[12] Am *C*-Terminus wurde über eine Disulfidbrücke die Sequenz EE angebunden, um die Löslichkeit und Hydrophilie zu erhöhen. Gelangt das Peptid in intrazelluläre Regionen, kann das dort vorhandene Glutathion (GSH) die Disulfidbrücke durch Reduktion spalten, wodurch die Hydrophilie des Peptides herabgesetzt wird und sich Hydrogelstrukturen ausbilden. Durch die langsame Hydrolyse der Esterbindungen werden anschließend nach und nach die Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum intrazellulär freigesetzt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Einlagerung hydrophober Wirkstoffe in die hydrophoben Zwischenräume der ß-Faltblattdoppelhelix (Kapitel 1.2). So konnten Lee *et al.* anhand von Peptiden mit dem fibrillenbildenden Grundkörper $(FKFE)_n$ nachweisen, dass sich kleine hydrophobe Gastmoleküle wie Nilrot oder Pyren in die fibrillären Strukturen einlagern können. [95,96] Die polaritätssensitiven Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe verdeutlichen eine Lokalisation der Gastmoleküle in einer stark unpolaren Umgebung, welche sich im Inneren der Fibrillen-Doppelhelix vorfinden lässt. Zudem konnte die Arbeitsgruppe leicht verbreiterte Strukturen der Fibrillenstränge unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) beobachten, was für eine Aufweitung aufgrund der eingelagerten Moleküle sprechen könnte.[96] Durch Funktionalisierung der Peptide mit Signalmotiven wie dem Tat CPP[96] oder der RGD-Sequenz[95] konnte zudem ein selektiver Transport des Nilrots in bestimmte Zelllinien bewerkstelligt werden. Auch Chen *et al.* gelang es einen hydrophoben Wirkstoff in fibrilläre Strukturen einzulagern.[108] Hierzu verwendeten sie den Antikrebswirkstoff Ellipticin, welcher sich aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften ebenfalls in den hydrophoben Zwischenräumen der Fibrillenstränge des Peptids FEFQFNFK nachweisen ließ. Nach 48 h Inkubation mit A549-Lungenkarzinomzellen und MCF7-Brustkrebszellen konnte für die wirkstoffbeladenen Fibrillen eine stark toxische Wirkung durch die stetige Freisetzung des Ellipticins beobachtet werden. In einer weiteren Studie von Lee *et al.* wurde das Peptid Glukose-GSGSGS-KKKKKKKK-GGSGGS-WKWEWKWEWKWEWG (Glu-KW) verwendet, um einen glukosefunktionalisierten künstlichen Virus herzustellen, welcher im hydrophoben Inneren seiner ß-Faltblattstrukturen den Wirkstoff Nilrot eingelagert hat und zeitgleich über die positiv geladene Lysinsequenz zum Gentransport von siRNA befähigt ist.[109] Die Wechselwirkung zwischen den siRNA und den Lysinen konnte hierbei mittels CD nachgewiesen werden und basiert auf elektrostatischen Interaktionen. Auf diese Weise lassen sich zwei unterschiedliche Moleküle über dasselbe Transportsystem in HeLa-

Krebszellen transportieren, wo sie anschließend freigesetzt werden. Auch Arbeiten der Weil-Gruppe zeigen eine elektrostatische Anlagerung eines Wirkstoffes an die Fibrillenstrukturen mit dem Peptidgrundkörper KFKFEFEF.[80] Hierbei kommt es zur Einlagerung des hydrophilen Doxorubicins während der Ausbildung der Fibrillen, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Säurefunktionen des verwendeten Peptids und der Menge an eingelagertem Doxorubicin beobachtet werden kann, was auf mögliche elektrostatische Wechselwirkungen hindeutet. Zudem weist das Doxorubicin ein π-System auf, welches zusätzlich eine Wechselwirkung mit den Phenylalaninen des Peptids ermöglicht.

Auch der Transport von metallischen Nanopartikeln wie Gold, Palladium und Silber in verschiedene Zellen läuft durch Anbringung dieser an PNF deutlich effizienter ab.[110] So konnte die Arbeitsgruppe um Mezzenga durch Umsetzung verschiedener Metallsalze mit Natriumborhydrid in Anwesenheit von ß-Lactoglobulin-Protein-PNF zeigen, dass sich Metallnanopartikel an den PNF ausbilden. Diese Partikel-PNF-Aggregate können anschließend mit Mausknochenmarkbasierten dendritischen Zellen (DCs) und menschlichen MCF7-Brustkrebszellen umgesetzt werden, wodurch eine erhöhte Anzahl an Partikeln in den Zellen bei Anwesenheit der PNF detektiert werden konnte. Durch die effizientere Partikelaufnahme kommt es aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften dieser zu einem erhöhten Zelltod.

In der Forschung auf dem Gebiet der Gewebezucht untersuchten Baumann *et al.*[111] ein injizierbares System, welches aus dem neutral geladenen selbststrukturierenden Peptid RADA16-I, wirkstoffbeladenen MSN sowie MC3T3-Stammzellen besteht und unter physiologischen Bedingungen schnell ein dreidimensionales Hydrogelnetzwerk ausbildet. Hierbei liegen die Partikel sowie die Zellen räumlich gleichmäßig verteilt über das RADA16-I-Hydrogel vor, in welchem es anschließend über die Zeit zu einer Aufnahme der Partikel in die Zellen kommt. Durch die Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Partikel konnte die Arbeitsgruppe die Kinetik der Partikelaufnahme durch die Zellen steuern. So kam es bei der Verwendung von carboxylierten Partikeln zu einer zeitlich verzögerten Aufnahme im Vergleich zu den schnell aufgenommenen aminfunktionalisierten Silikapartikeln. Angelehnt an dieses System soll in dieser Arbeit eine neuartige Art der Anlagerung hydrophober und hydrophiler Wirkstoffe über die nicht-kovalente Anbindung mesoporöser Silikapartikel an Peptidnanofibrillen mit dem Grundkörper KFKFEFEF gezeigt werden, welche ebenfalls vielversprechende Einsatzmöglichkeiten bereitstellt.

2. Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Silikapartikeln

Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und anorganischen Materialien wie Silikaoberflächen bestimmen wichtige Phänomene wie beispielsweise die Proteinadsorption und Zelladhäsion. Hierzu wurden in mehreren Studien die treibenden Kräfte für die Interaktion zwischen verschiedenen Peptiden und Silikaoberflächen analysiert und in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

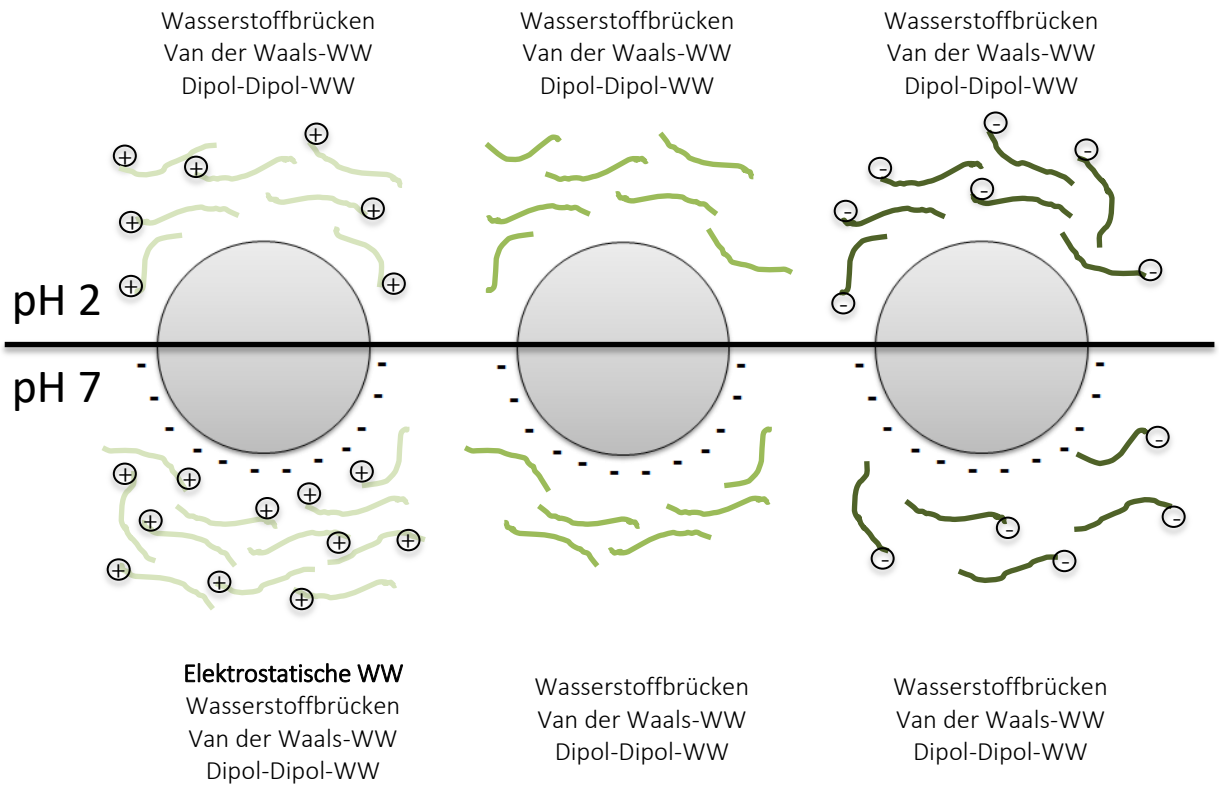


Abbildung 4: Treibende Kräfte für die Adsorption unterschiedlich geladener Peptide an eine Silikaoberfläche in Abhängigkeit vom pH.

Dabei kommt es zunächst zu einer entropiegetriebenen Adsorption der Peptide auf die Silikaoberfläche, wobei Wasser als auch Natriumionen in die Lösung freigesetzt werden.[112] Aufgrund der vielen Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen den Peptiden bilden sich anschließend Multilagen nach dem Freundlich-Modell aus.[113,114] Die Effektivität der Adsorption hängt hierbei von unterschiedlichen Faktoren ab, da Ladung und Hydrophobizität der Silikapartikel als auch der Peptide einen bedeutenden Einfluss auf den Adsorptionsmechanismus haben.[113-115] So konnten Puddu und Perry zeigen, dass Peptide mit einer positiven Ladung unter neutralen Bedingungen eine hohe Affinität zu Silikaoberflächen aufweisen,[113] welche durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den

positiven Ladungen der *N*-terminalen Amingruppe sowie der Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin mit den deprotonierten Silanolgruppen der Silikaoberfläche begründet werden kann.[114] Die pH-Abhängigkeit der Adsorption positiv geladener Peptide unterstreicht die Mitwirkung von Coulomb-Wechselwirkungen am Adsorptionsmechanismus.[113] Da die Peptidanlagerung auch unter aziden Bedingungen noch stark ausgeprägt ist, spielen neben den Coulomb-Interaktionen auch nicht-elektrostatische Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle bei der Adsorption von positiv geladenen Peptiden, welche auch bei neutral sowie negativ geladenen Peptiden zum Tragen kommen. Zu diesen Wechselwirkungen zählen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken sowie Dipol-Dipol- und hydrophobe Van der Waals-Wechselwirkungen.[114,116] Diese nicht-elektrostatischen Interaktionen führen auch bei Bedingungen, unter welchen es zu repulsiven Wechselwirkungen kommt, zu einer Peptidadsorption an die Silikaoberfläche.[113] Durch Anpassung der Peptidsequenz in ihrer Ladung und Hydrophobizität gelang es Imai *et al.*[115] Peptide an kalzinierte Silikagelpartikel zu adsorbieren und diese pH-abhängig wieder freizusetzen. Hierbei adsorbieren die hydrophoben, negativ geladenen Peptide im aziden pH-Bereich (pH 2) über Van der Waals-Wechselwirkungen an die Silikaoberfläche, welche aufgrund der Kalzinierung eine erhöhte Hydrophobizität aufweist. Da es in diesem pH-Bereich zu keiner Deprotonierung der Silanolgruppen auf der Partikeloberfläche kommt, spielen repulsive Wechselwirkungen erst bei pH-Werten oberhalb des *Point of Zero Charge* (PZC) von Silika (pH 2-3)[117] eine Rolle. Wird dieser jedoch überschritten, kommt es zur Desorption der Peptide aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Peptiden und den deprotonierten Silanolgruppen der Silikaoberfläche.[115] Zudem konnten Puddu und Perry neben dem Einfluss der Peptidladung einen analogen Effekt für die Ladung der verwendeten Silikapartikel beobachten.[114] So weisen unfunktionalisierte Partikel mit einem Zetapotential von -40 mV aufgrund starker elektrostatischer Wechselwirkungen eine höhere Affinität zu positiv geladenen Peptiden auf, während die Erhöhung des Zetapotentials auf +60 mV durch Einführung von Aminfunktionen auf der Partikeloberfläche diese absenkt und dafür die Adsorption negativ geladener Peptide bevorzugt wird. Dennoch ist auch für gleichgeladene Peptide und Partikel eine Peptidadsorption zu beobachten, was das Mitwirken nicht-elektrostatischer Wechselwirkungen am Adsorptionsprozess ebenfalls hervorhebt. Diese Beobachtungen legen den Rückschluss nahe, dass eine nicht-kovalente Anlagerung von Silikapartikeln an Peptidnanofibrillen, welche aus amphipatischen Peptiden aufgebaut sind, möglich sein sollte.

3. Mesoporöse Silikapartikel

Nanopartikel haben sich als ideale Transportsysteme für Medikamente,[118-122] Kontrastmittel,[123,124] Oligonukleotide,[125] Impfstoffe[126-128] und ähnliche Gastmoleküle erwiesen. Dabei finden sie Anwendung in den Bereichen der Prävention, der Therapie sowie der Diagnose von zahlreichen Krankheiten.[129-131] Um die Nebenwirkungen zu reduzieren, die benötigte Wirkstoffmenge herabzusetzen und die Administration von Medikamenten zu erleichtern, kommen Nanopartikel unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung zum Einsatz, welche sich in ihren chemischen als auch physikalischen Eigenschaften unterscheiden. Hierzu gehören die organischen Nanopartikel, welche aus Proteinen,[132,133] Polymeren[14,15] oder Liposomen[16] bestehen, die anorganischen Nanopartikel,[3,134-136] welche aus Metallen oder Metalloxiden aufgebaut sind, sowie die kohlenstoffbasierten Nanopartikel, zu welchen Fullerene,[137,138] Graphen[139,140] und Kohlenstoffnanoröhrchen[19,20] zählen. Seit Vallet-Regí *et al.*[13] im Jahr 2001 erstmals über den Einsatz von MSN als Wirkstofftransportsysteme berichteten, wurden diese in zahlreichen weiteren Studien für die Beladung und den Transport unterschiedlicher Wirkstoffe tiefergehend untersucht. Dabei ergeben sich aufgrund ihres großen Porenvolumens hohe Beladungskapazitäten,[2] während sich zeitgleich durch einfache Oberflächenfunktionalisierung bestimmte Zielgewebe ansteuern lassen[141-155] oder die Blutzirkulationszeit verlängert werden kann.[156,157] Wirkstoffanbindung als auch Funktionalisierung können hierbei kovalent oder adsorptiv stattfinden (Abbildung 5).

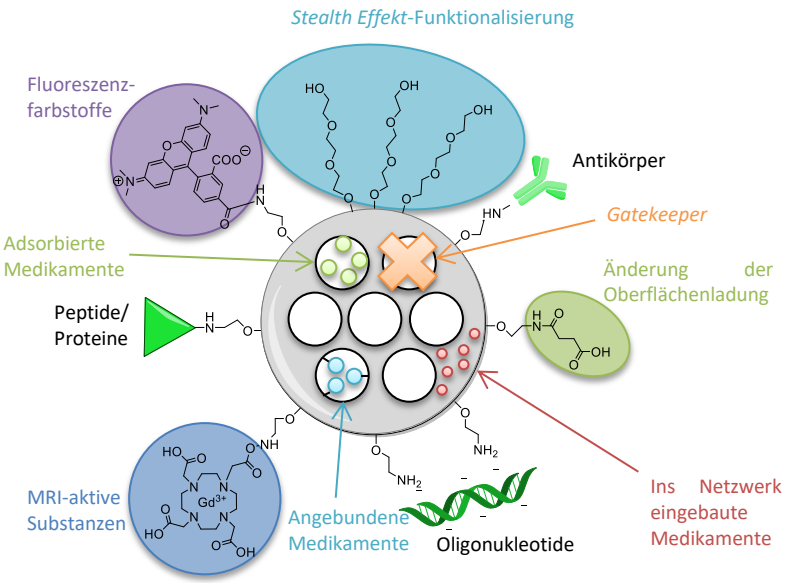


Abbildung 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Funktionalisierungs- und Beladungsmöglichkeiten von mesoporösen Silikapartikeln.

3.1. Synthese von mesoporösen Silikapartikeln

Für die Silikaherstellung unter Laborbedingungen kommt hauptsächlich der Sol-Gel-Prozess zum Einsatz, welcher auf der Entstehung eines oxidischen Netzwerkes durch stetige Polykondensation von Alkoxysilanen in einer wässrigen Lösung basiert.[158] Hierbei kommt es nach der Hydrolyse der Alkoxyreste zur Kondensation der Silanolgruppen, wodurch unter Wasser- und Alkoholabspaltung Siloxanbindungen gebildet werden. Die sukzessive Bildung kolloidaler Silikalösungen (Sole) und die anschließende Gelbildung sind dabei namensgebend für diesen Prozess, welcher chemisch durch Säure- oder Basenkatalyse kontrollierbar ist. Die Partikelgröße wird hierbei durch die Ostwald-Reifung definiert, welche auf der Auflösung kleinerer Partikel zu Gunsten des Wachstums größerer Partikel basiert.[158-160] Da es mit steigendem pH-Wert zu einer erhöhten Löslichkeit der Silikaspezies kommt, führt die Erhöhung des pH-Wertes zu größeren Partikeln.

1992 gelang Mobil Oil durch Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit dem Endotemplatverfahren die Herstellung mesoporöser Materialien mit definierter Porosität.[161] Bei diesem Verfahren lagern die Präkursoren an die Template an und bauen diese in die Netzwerkstrukturen ein, wodurch nach Templatentfernung eine charakteristische Porenstruktur erhalten wird. Bahnbrechend war hierbei der erstmalige Einsatz von geordneten Aggregaten aus Tensidmolekülen anstelle einzelner Moleküle als Endotemplat. Dies führte zu größeren Porendurchmessern von 2-10 nm und engen Porendurchmesserverteilungen, wodurch ein großes Porenvolumen sowie eine große spezifische Oberfläche der Materialen erhalten wurden. Die ersten mesoporösen Materialien sind die heute noch häufig verwendeten MCM (*Mobil Composition of Matters*)[161] und SBA (*Santa Barbara Amorphous*).[162] Durch Variation der strukturdirigierenden Agentien (SDA) sowie der Präkursoren kann eine Bandbreite an unterschiedlichen Porenradien und Mesostrukturen erzeugt werden.[161,163,164] So können beispielsweise durch Anpassung des SDA Porensysteme mit hexagonaler, kubischer oder lamellarer Struktur erhalten werden. Dabei werden für die Ausbildung solcher nanoorganisierter Materialien zwei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen. Der *True Liquid Crystal Templating*-Mechanismus (TLCT) wird für Tensidkonzentrationen oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) angenommen.[161] Nahe der CMC kommt es zur Ausbildung kugelförmiger Mizellen, welche sich bei weiterer Erhöhung der Tensidkonzentration zunächst zu zylinderförmigen Mizellen zusammenlagern und schließlich durch Aggregation eine lyotrope flüssigkristalline Phase ausbilden. In Abhängigkeit der Tensidkonzentration und der Reaktionstemperatur kommt es hierbei zur Ausbildung unterschiedlicher flüssigkristalliner Phasen. Nach der Zugabe der Präkursoren lagern diese an die Tensidaggregate der flüssigkristallinen Phase an und es kommt durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes. Bei

Tensidkonzentrationen unterhalb der CMC findet der kooperative Mechanismus Anwendung.[164,165] Hierbei kommt es erst durch die Wechselwirkung zwischen dem Präkursor und dem Templat zur Ausbildung einer hexagonal, kubisch oder lamellar strukturierten Phase. Für beide Mechanismen spielt jedoch die Wechselwirkung zwischen den Präkursor- und den Templatmolekülen eine entscheidende Rolle. Die attraktive Wechselwirkung zwischen diesen beiden Komponenten bildet die Grundlage dieses Prozesses, da es ohne sie zu einer Phasentrennung kommen würde.[165,166] Um eine ideale Wechselwirkung zu erzielen, wird die Kopfgruppe des eingesetzten Tensids an die verwendete anorganische Komponente angepasst. Unter den üblicherweise verwendeten basischen Bedingungen bilden die Alkoxysilane Oligoanionen (I^-) aus, welche besonders gut mit kationischen Tensiden (S^+) wie dem Cetyltrimethylammoniumbromid (C_{16}TAB) wechselwirken können (S^+I^-). Im Sauren bilden sich hingegen Oligokationen (I^+) aus den Alkoxysilanen, wodurch eine Interaktion mit anionischen Tensiden (S^-) wie beispielweise Natriumdodecylsulfat (SDS) bevorzugt wird (S^-I^+). Im pH-Bereich um den PZC von Silika (pH 2-3) liegen die Silikaspezies ungeladen vor (I^0). Dies führt zum Einsatz nicht-ionischer Tenside (S^0) wie dem Blockcopolymer Pluronic® P123 (S^0I^0). Hierbei wirken Wasserstoffbrücken als attraktive Wechselwirkungen zwischen den beiden Komponenten, während für die ionischen Tenside Coulomb-Interaktionen die Haupttriebkraft ausmachen. In manchen Fällen werden auch kationische Tenside im Sauren bzw. anionische Tenside im Basischen eingesetzt. Hierbei findet die Gegenionvermittelte Wechselwirkung Anwendung, wobei es durch den Einsatz von Alkalimetallionen (M^+) oder Halogenen (X^-) zur „vermittelten“ Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten Tensid und Silikaspezies kommt ($S^-M^+I^-$ oder $S^+X^-I^+$). Die Entfernung der Tenside erfolgt nach Vollendung der Netzwerkausbildung durch Kalzinierung oder durch Extraktion mit Lösemitteln, welche Kat- oder Anionen zum Austausch bereitstellen.[158,167]

3.2. Funktionalisierung von silikabasierten Materialien

Durch die Funktionalisierung des thermisch stabilen Grundgerüsts lassen sich anorganisch-organische Kompositmaterialien aufbauen, welche die Vorteile der Mesostruktur mit der Reaktivität verschiedenster organischer Funktionalitäten kombinieren und diese Materialien somit für eine Vielzahl an Anwendung äußerst attraktiv macht.[167,168] Hierzu gehören beispielsweise die Bereiche der Katalyse, Chromatographie sowie die Verwendung als Trägermaterial in biologischen Systemen.[122,169-173] Dabei ermöglicht die Vielzahl an Funktionalisierungsmöglichkeiten eine genaue Anpassung der Materialien an die geforderten Eigenschaften. So können beispielsweise durch die Einbringung von

Amino-,[154] Carboxy-,[174] Thiol-,[175] Cyano-[174] oder Chloro-Funktionalitäten[170] die Interaktion mit Medikamenten oder die Anbindung zellspezifischer Liganden begünstigt werden.[142- 155,176]

Die Funktionalisierung kann hierbei über zwei unterschiedliche Vorgehensweisen durchgeführt werden. Bei der Ersten handelt es sich um die postsynthetische Funktionalisierung des reinen Silikagerüsts, welche üblicherweise durch Refluxieren der mesoporösen Matrix in trockenen organischen Lösemitteln mit entsprechenden Organoalkoxysilanen oder seltener auch Chlorsilanen oder Silazanen erfolgt.[167] Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist der Erhalt der Mesostruktur der Silikamatrix.[177] Die begünstigte Silylierung an freien, geminalen Silanolgruppen trägt dazu bei, dass die Funktionalisierung der äußeren Partikeloberfläche kinetisch bevorzugt erfolgt.[178] Dabei kommt es bedingt durch Diffusionslimitierungen und sterischen Faktoren bevorzugt zur Kondensation an den Poreneingängen, wodurch es zu einer inhomogenen Verteilung der organischen Funktionalitäten auf der Partikeloberfläche und zur Verringerung bis hin zum Verlust der Porosität durch den von Stein *et al.*[178] beschriebenen Porenverschluss bei großen organischen Resten kommt.[158,167,178]

Die zweite Möglichkeit zur Funktionalisierung besteht in der Co-Kondensation der Alkoxysilane mit mono-, bi- oder trifunktionalisierten Organoalkoxysilanen, wobei die Funktionalisierungen *in situ* während der Silikanetzwerkbildung direkt in die Matrix eingebracht werden.[167] Dabei konnten Stein *et al.*[178] zeigen, dass es durch die Co-Kondensation zu einer homogenen Verteilung der Funktionalitäten im gesamten Netzwerk kommt. Dies hat allerdings zur Folge, dass ein Teil der funktionellen Gruppen in die anorganische Matrix eingebaut werden und somit nicht sichergestellt ist, dass diese für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Des Weiteren wird diese Methode der Funktionalisierung durch den ins Netzwerk eingebrachten Organikanteil limitiert, da es durch die Einbringung der Organoalkoxysilane zu Fehlstellen in der Verknüpfung der Silikamatrix kommt.[179] Durch diese fehlenden Verknüpfungsstellen nimmt die Wahrscheinlichkeit des Strukturverlusts durch Einbruch der Strukturierung mit steigendem Organikanteil zu. Zudem führen unterschiedliche Elektronendichten an den Siliziumatomen zwischen den Alkoxysilanen und den Organoalkoxysilanen zu Unterschieden in Hydrolyse- und Kondensationsgeschwindigkeit.[167] Ist dieser Unterschied zu groß, kann es zur Homokondensation der einzelnen Silane kommen. Außerdem können die Eigenschaften der einzubringenden organischen Reste ebenfalls Einfluss auf die Struktur des Netzwerkes nehmen.[180] So kann zum Beispiel die Basizität von Aminoresten eine katalytische Wirkung auf die Ausbildung des Netzwerkes haben. Während bei der postsynthetischen Funktionalisierung meist die Kalzinierung für die Tensidentfernung Verwendung findet, muss in diesem Fall behutsamer vorgegangen werden, um die organischen Funktionalitäten nicht durch zu hohe Temperaturen zu

verbrennen. Dabei kommt die Extraktion zum Einsatz, welche durch den Ionenaustausch zu einer Entfernung der Tenside aus dem Porennetzwerk führt.[177]

3.3. Hydrolytische Stabilität mesoporöser Silikapartikel

Ein wesentlicher Bestandteil, um als Trägermaterial für Wirkstoffe oder Kontrastmittel zu dienen, ist auf der einen Seite eine ausreichende Stabilität des Systems unter physiologischen Bedingungen, um diese ohne größere Verluste von Wirkstoff oder Liganden zum gewünschten Ziel zu transportieren. Auf der anderen Seite ist eine biologische Abbaubarkeit nach getaner Arbeit wünschenswert, um eine Anreicherung im Körper zu vermeiden. Die hydrolytische Stabilität von amorphem Silika hängt hierbei von verschiedenen Faktoren ab. So steigt mit der Temperatur auch die Löslichkeit an,[181-183] da durch die thermische Energie Aktivierungsenergien besser überwunden werden können. Zudem nimmt die Löslichkeit bei höheren pH-Werten deutlich zu,[181,184] da die relative Hydrolysegeschwindigkeit bei pH > 7 gegenüber der Kondensationsgeschwindigkeit ansteigt (Abbildung 6). Neben der Temperatur und dem pH spielen auch der Druck,[182,185] die Silikakonzentration[186] sowie die Art und Konzentration vorhandener Salze[183,187,188] eine große Rolle. So führt die Anwesenheit von Salzen zu einer Abnahme der Löslichkeit.

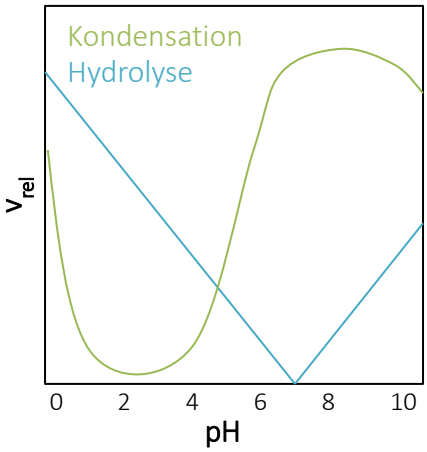


Abbildung 6: Änderung der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse und der Kondensation von Silikaspezies in Abhängigkeit vom pH-Wert (Verändert aus D. Schaefer *„Polymers Fractals, and Ceramic Materials“ Science* 1989, *234*, 1023-1027 mit freundlicher Genehmigung der AAAS & D. Schaefer).

Vogelsberger *et al.*[189] konnten bei ihren Untersuchungen der Auflösung von amorphem Silika oberhalb der Sättigungsgrenze zunächst einen starken initialen Anstieg der Silikaspezies in Lösung beobachten, welcher aufgrund der schnellen Monomerablösung den Sättigungswert von 120 µg/mL

(pH 7,3; 25 °C)[184] kurzzeitig überschreitet. Die anschließende Wiederanlagerung der Monomere durch Kondensation führt zur Senkung der Silikakonzentration in Lösung auf ihr Sättigungsniveau. Aufgrund dieses Vorgangs werden kleinere Partikel zu Gunsten größerer Partikel aufgelöst, was den Prozess der Ostwaldreifung beschreibt. *Ab initio* quantenmechanische Simulationen zur Beschreibung der Hydrolyse von Si-O-Si-Bindungen an Kieselsäuredimeren konnten dabei Aufschluss über den Ablauf der Hydrolyse auf molekularer Ebene geben (Abbildung 7A).[190] Aufgrund des PZC bei pH 2-3[117] liegen für Silikaspezies bei pH 7 basische Bedingungen vor, was zu einer Abspaltung eines Protons von der Silanolgruppe aufgrund einer Säure-Base-Reaktion führt.[190] Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff durch Wasser oder ein Hydroxidion, welcher über den ersten Übergangszustand zur Bildung einer fünffach koordinierten Silikaspezies führt, gefolgt von der Abspaltung monomerer Kieselsäure über den zweiten Übergangszustand. Da die Potentialenergie für die Überwindung des ersten Übergangszustandes nahezu viermal höher ist als die des zweiten, gilt die Bildung der fünffach koordinierten Silikaspezies aus thermodynamischer Sicht als bestimmender Schritt für die Löslichkeitsrate. Durch die Erhöhung der Temperatur wird dem System zusätzliche thermische Energie zugeführt, wodurch es zu einer erhöhten Löslichkeit von Silika bei höheren Temperaturen kommt.

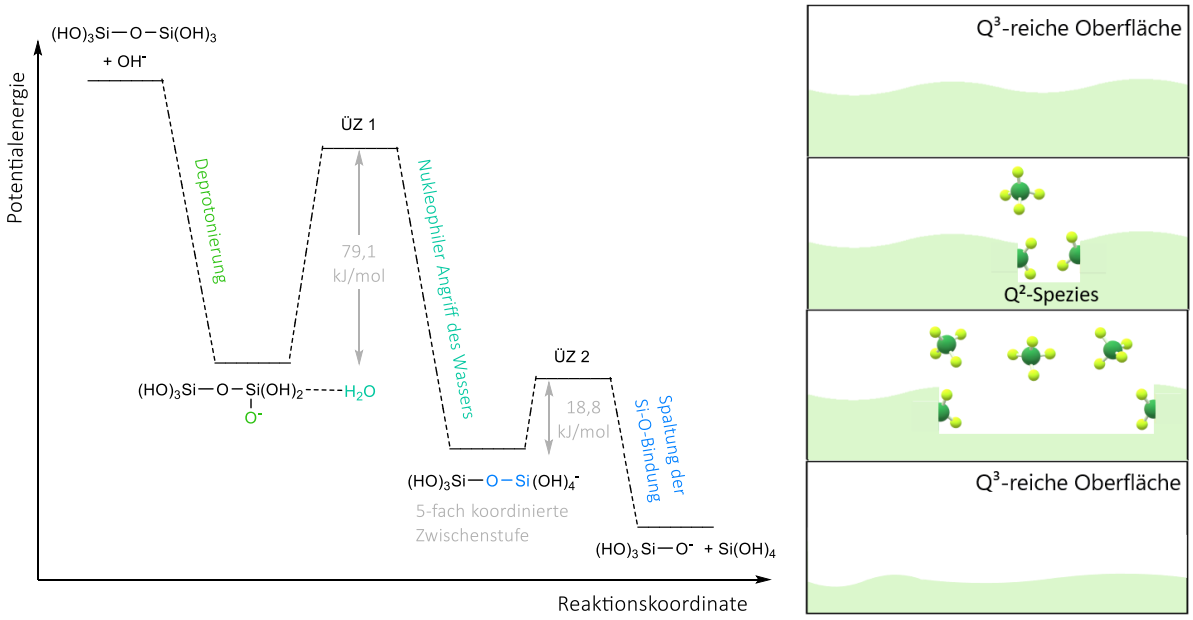


Abbildung 7: (A) Thermodynamische Beschreibung der Bildung freier Kieselsäure aus einem Dimer über eine fünffach koordinierte Silikaspezies. Die Reaktion läuft über die Ausbildung zweier Übergangszustände ab, wovon der erste Übergangszustand als bestimmender Schritt für die Löslichkeitsrate aufgrund der erhöhten Aktivierungsenergie anzusehen ist (verändert aus [190]). (B) Kinetische Beschreibung der Ablösung von energieärmeren Q^3-Spezies aus der Q^3-reichen Oberfläche, gefolgt von der Entstehung neuer Q^2-Spezies. Die neugebildeten Q^2-Einheiten sind energiereicher und werden leichter von der Oberfläche abgelöst, wodurch eine Q^3-reiche Oberfläche regeneriert wird (verändert aus [191]).

Durch die Abspaltung monomerer Kieselsäure ändert sich auch die Oberflächenbeschaffenheit. Zu Beginn weist die Oberfläche von amorphem Silika Q^2- als auch Q^3-Spezies auf.[191] Aufgrund der erhöhten Stabilität der Q^3-Spezies wegen ihrer dreifachen Verknüpfung ist deren Anteil höher und es kommt zu einer Q^3-reichen Oberfläche. In reinem Wasser ist die Aktivierungsenergie für die Abspaltung der Q^2-Spezies aufgrund der weniger starken Verknüpfung geringer, was zu einer bevorzugten Ablösung dieser Einheiten führt. Die Anwesenheit von Calcium- und Natriumionen senken hingegen die Aktivierungsenergie der Ablösung der energieärmeren Q^3-Spezies, wodurch es zur Ausbildung von Vakanzen auf der Oberfläche kommt, welche aufgrund des Herauslösens einer Einheit neugebildete Q^2-Spezies aufweisen (Abbildung 7B). Diese lösen sich aufgrund ihres energiereicheren Zustandes schneller ab, wodurch dieser Prozess abläuft bis sich eine Q^3-reiche Oberfläche regeneriert hat.

Liegt das amorphe Silika in Form von mesoporösen Silikapartikeln vor, kommt es mit steigender spezifischer Oberfläche zu einer schnelleren Auflösungskinetik.[192,193] Hierbei kommt es aufgrund der (partiellen) Zerstörung der Porenwände zu einer Verbreiterung der Porenradienverteilung und einem anschließenden Verlust der Mesoporenstruktur, wobei die sphärischen Form der Partikel jedoch erhalten bleibt.[186,193-195] Der Erhalt der Form spricht für eine Restrukturierung, wobei sich in den Poren gelöstes Silika an der Außenseite der Partikel wieder anlagert. Neben der spezifischen Oberfläche spielt auch die Funktionalisierung der Partikel eine entscheidende Rolle. So bilden angebundene Organosilane eine Schutzschicht auf der Silikaoberfläche, wodurch der nukleophile Angriff von Wasser oder Hydroxidionen gehemmt wird.[194] Zudem ändert sich durch die organischen Funktionalisierungen die Hydrophobizität der Partikeloberfläche, was den nukleophilen Angriff zusätzlich erschweren kann und auch die Proteinadsorption kann Einfluss auf die Auflösungskinetik nehmen.[196] Aufgrund der ständig ändernden Bedingungen, welche bei *in vivo*-Experimenten zu berücksichtigen sind, sind Rückschlüsse aus den *in vitro*-Vorversuchen lediglich bedingt möglich. Dabei kommt es neben wechselnden Körperflüssigkeiten mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen und pH-Werten auch zu einer Beeinflussung der lokalen Silikakonzentration durch die ständige Bewegung sowie die Aufnahme oder Ausscheidung von gelösten Silikaspezies durch den Organismus.[197]

3.4. Silikapartikel in biomedizinischen Anwendungen

Neben der biologischen Abbaubarkeit des Systems spielen für die Anwendung im biomedizinischen Bereich auch mögliche Interaktionen der MSNs mit dem biologischen System eine wichtige Rolle. So eignen sich diese lediglich als Wirkstoffträger, wenn diese neben einer geringen Hämolyseaktivität

eine hohe Biokompatibilität aufweisen, um Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Zudem nehmen Proteinadsorption und Partikelfunktionalisierung entscheidenden Einfluss auf die Bioverteilung der Partikel im Körper. Erst wenn die Partikel in der Lage sind, Wirkstoffe selektiv und sicher zu den gewünschten Zielzellen zu transportieren, eignen sie sich als Wirkstoffträger in biologischen Systemen. In den nachfolgenden Kapiteln soll auf diese Eigenschaften der MSNs genauer eingegangen werden.

3.4.1. *Interaktion von mesoporösen Silikapartikeln mit biologischen Systemen*

Ein wichtiger Faktor für die Eignung der MSNs als Trägermaterial in biologischen Systemen ist die Biokompatibilität. Hierbei können Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Zellen des Körpers zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Um den Einfluss silikabasierter Materialien auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde bereits eine Vielzahl an *in vitro*-Studien durchgeführt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeitsgruppen lassen sich nur schwer vereinheitlichen, da der Einfluss auf die Zellviabilität von verschiedensten Faktoren abhängt. Dabei scheinen die Größe der Partikel[198-203] sowie deren Oberflächenfunktionalisierung[204,205] eine wichtige Rolle zu spielen. Die Beobachtungen von Kurtz-Chalot *et al.*[205] zeigten hierbei eine geringere zelltoxische Wirkung von stark negativ geladenen Partikeln, während stark positiv geladene Partikel zu einer Reduzierung der Zellviabilität führen. Aufgrund der Unterschiede in der Partikelanlagerung und -aufnahme an bzw. in die Zellen, liegt die Vermutung nahe, dass die Partikelanlagerung einen größeren Einfluss auf die Zelltoxizität nimmt als es die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere tut. Durch ihre Untersuchungen der Zellviabilität in Ab- und Anwesenheit von Serumproteinen konnte die Arbeitsgruppe um Haase den Einfluss der Proteincorona auf die Zelltoxizität zeigen.[198] So wurde durch die Proteincorona neben der Aufnahme der unterschiedlich großen Partikel (15, 60 und 200 nm) in die Zellen auch deren zelltoxische Wirkung reduziert. Neben den Einflüssen, welche die Variation der Partikelparameter auf die Zellviabilität nimmt, spielen zudem die Eigenschaften der untersuchten Zelllinien eine entscheidende Rolle. So konnten große Unterschiede für die zelltoxischen Wechselwirkungen silikabasierter Partikel mit verschiedenen Zelllinien beobachtet werden.[198,199,204,206,207]

Zudem ist die Wechselwirkung zwischen den Partikeln und den Roten Blutkörperchen (RBC) ein wichtiger Bestandteil der Biokompatibilität. Während nicht-poröse Silikapartikel durch Beschädigung der RBCs zu einer hohen hämolytischen Aktivität führen, verringert die Einführung von Mesoporen deren Potential der Hämolyseaktivität deutlich.[208] Lin und Hynes legten den Rückschluss nahe, dass die durch die Poren entstehenden Unterbrechungen der äußeren Oberfläche in einer geringeren

Anzahl an Silanolgruppen, welche für den Kontakt mit RBCs zur Verfügung stehen, resultieren und den Rückgang der Hämolyse erklären. Dies passt auch zu den weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Lin, welche aufgrund der Variation der äußeren Oberfläche bei MCM41- und SBA15-Partikeln Unterschiede in der Hämolyse beobachten konnten.[209] Dabei weisen die MCM41-MSN besonders wenig Interaktion mit den Membranen der RBCs auf, wodurch es auch bei Konzentrationen von 100 µg/mL zu keiner Hämolyseaktivität kommt. Die SBA15-MSN hingegen wechselwirken stark mit der Membran der RBCs, wodurch es zu starken lokalen Membrandeformationen kommt, welche zur Zerstörung der RBCs führen kann. Verantwortlich für die hämolytische Aktivität sind zwei Hauptprozesse. Einerseits die Anbindung der silanolreichen MSN-Oberfläche an die RBC-Membran[210] und andererseits die Biegung der RBC-Membran zur Anpassung an die starre MSN-Oberfläche.[211-213] Da die hämolytische Aktivität stark von der Anzahl an Silanolgruppen auf der äußeren Oberfläche abhängt, kann diese durch Funktionalisierung mit organischen Gruppen stark abgesenkt werden,[208,209] wobei jedoch neue Wechselwirkungen zwischen den eingeführten funktionellen Gruppen und den Membranen der RBCs auftreten können.[214] Zudem führt die Ausbildung einer Proteincorona unabhängig von der mikrochemischen Oberflächenumgebung der MSNs zu einer Art Schutzschicht, wodurch die Hämolyseaktivität aufgrund der Abschirmung der Silanolgruppen auf ein Minimum reduziert werden kann.[214]

Für die therapeutische Effizienz eines Wirkstoffes ist nicht nur dessen intrinsische Aktivität von großer Bedeutung, sondern auch dessen Bioverfügbarkeit, welche wiederrum stark von der Bioverteilung des Trägermaterials und dessen Ausscheidung aus dem Körper abhängt. Bereits 30 min nach intravenöser Verabreichung der MSNs in Mäuse können diese zu hohen Anteilen in Leber und Milz lokalisiert nachgewiesen werden, wo es zum Abbau des Silikagerüsts zu löslicher Kieselsäure kommt, welche anschließend über den Urin ausgeschieden wird.[156,215] He *et al.*[156] konnten dabei eine Abhängigkeit der Aufnahme in Leber und Milz und der damit zusammenhängenden Blutzirkulationszeit von der Partikelgröße feststellen. Sie untersuchten Partikel mit Durchmessern von 80, 120, 200 und 360 nm und verabreichten diese den Mäusen intravenös. Während die kleineren Partikel länger in der Blutbahn zirkulieren, werden die größeren Partikel schneller von den Partikelausscheidenden Organen Leber und Milz aus dem Blutstrom gefiltert, was eine schnellere Ausscheidung der Partikel nach sich zieht. Doch nicht nur die Partikelgröße nimmt entscheidenden Einfluss auf die Bioverteilung im Körper. Auch die Funktionalisierung der Partikel spielt hierbei eine wichtige Rolle. So weisen carboxylierte Partikel eine geringere Blutzirkulationszeit auf als unfunktionalisierte MSN,[157] während die Einführung einer PEG-Funktionalisierung diese deutlich erhöht.[156,157]

Entscheidenden Einfluss auf den Verbleib der Transportsysteme im Körper nimmt zudem die Ausbildung einer Proteincorona in Anwesenheit von Serumproteinen,[216,217] welche ein wichtiger Bestandteil des Blutes sind und die unterschiedlichsten Funktionen wahrnehmen.[218] So kann die Adsorption von Dysopsoninen wie dem Albumin und den Apolipoproteinen zur Reduzierung der Aufnahme von Nanoträgern ins mononukleär-phagozytäre System (MPS) führen, wodurch sich deren Blutzirkulationszeit deutlich erhöht.[217] Aufgrund elektrostatischer Interaktionen und der Ausbildung von Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol- sowie Van der Waals-Wechselwirkungen kommt es in proteinreicher Umgebung zur Ausbildung einer Proteincorona (Kapitel 2), welche sich aus einer stark an die Partikeloberfläche gebundenen *hard* und einer schwächer gebundenen *soft corona* zusammensetzt.[219,220] Während es zunächst zu einer schnellen, meist schwachen Adsorption hoch konzentrierter Proteine wie dem Albumin kommt, werden diese sukzessive durch Proteine mit einer hohen Affinität zur Partikeloberfläche ersetzt (Vroman-Effekt),[221] welche schließlich die „hart" gebundene Proteinhülle bilden, während in der schwächer angebundenen *soft corona* ein schneller dynamischer Austausch der Proteine zwischen Medium und Teilchenoberfläche vorherrscht.[222] Entscheidend für die Zusammensetzung der Proteincorona ist hierbei die chemische Zusammensetzung, die Größe, die Hydrophobizität[219] sowie die Ladung[219,223,224] der verwendeten Partikel. So nimmt mit zunehmend positiver werdendem Zetapotential sowie mit steigender Hydrophobizität die Proteinadsorption zu. Die Adsorption an die Partikeloberfläche kann zu einer Konformationsänderung der Proteine führen, welche wiederrum Einfluss auf die Interaktion mit Zellen nehmen kann.[216] Zudem können die adsorbierten Proteine zur Abschirmung der Selektivitätsmotive führen, wodurch der selektive Transport beeinflusst werden kann.[225] So konnten Salvati *et al.* anhand von Transferrin-funktionalisierten Silikapartikeln zeigen, dass die Ausbildung einer Proteincorona die Interaktion mit dem Transferrinrezeptor der Zellen blockiert und es somit zu einem Verlust der Selektivität kommt. Beck *et al.*[223] beobachteten hingegen für die Aufnahme Antikörperfunktionalisierter Silikapartikel eine verbesserte Aufnahme dieser in Leukämiestammzellen in Anwesenheit einer Proteincorona. Um den Einfluss der Proteincorona zu minimieren, machen sich viele Arbeitsgruppen den *Stealth*-Effekt zu Nutze. Hierbei kommen Partikelfunktionalisierungen wie das biokompatible PEG,[208,226] Polysaccharide wie Glukose oder Galaktose,[227] Dextran,[228] Methylphosphonat[229] oder zwitterionische Strukturen[230] zum Einsatz. Für zwitterionische Strukturen wird dabei die Ausbildung einer Hydrathülle als Begründung herangezogen, welche den Partikel vor den Serumproteinen abschirmt, wodurch die Proteinadsorption stark reduziert wird.[231,232] Eine analoge Erklärung wird auch für das PEG aufgeführt, welches aufgrund seiner Hydrophilie große Mengen Wasser über Wasserstoffbrücken einlagern kann, allerdings macht die Arbeitsgruppe um Mailänder und Wurm nicht die Reduzierung der Proteinadsorption generell für den *Stealth*-Effekt des

PEG verantwortlich, sondern die Adsorption bestimmter Proteine, welche für eine Verlängerung der Blutzirkulationszeit sorgen.[226]

Für die Zellaufnahme von Partikeln spielt die Plasmamembran der Zellen eine wichtige Rolle, da sie eine dynamische Struktur ist, welche den Ein- und Austritt kleiner Moleküle über Membranproteinpumpen und -kanäle und großer Moleküle über Endozytose reguliert und koordiniert.[233] Bei der Endozytose handelt es sich um einen Mechanismus, bei welchem es aufgrund der Einstülpung der Zellmembran zur Ausbildung von Vesikeln kommt, welche die Moleküle ins Innere der Zelle transportieren. Für den Prozess der Endozytose steht die Freisetzung der Bindungsenergie der Deformationsenergie der Membran sowie dem Entropieverlust gegenüber (Abbildung 8).[234-236] Dabei spielen die Anzahl an Rezeptoren und Liganden als auch die Partikelgröße eine entscheidende Rolle.[198,234-242]

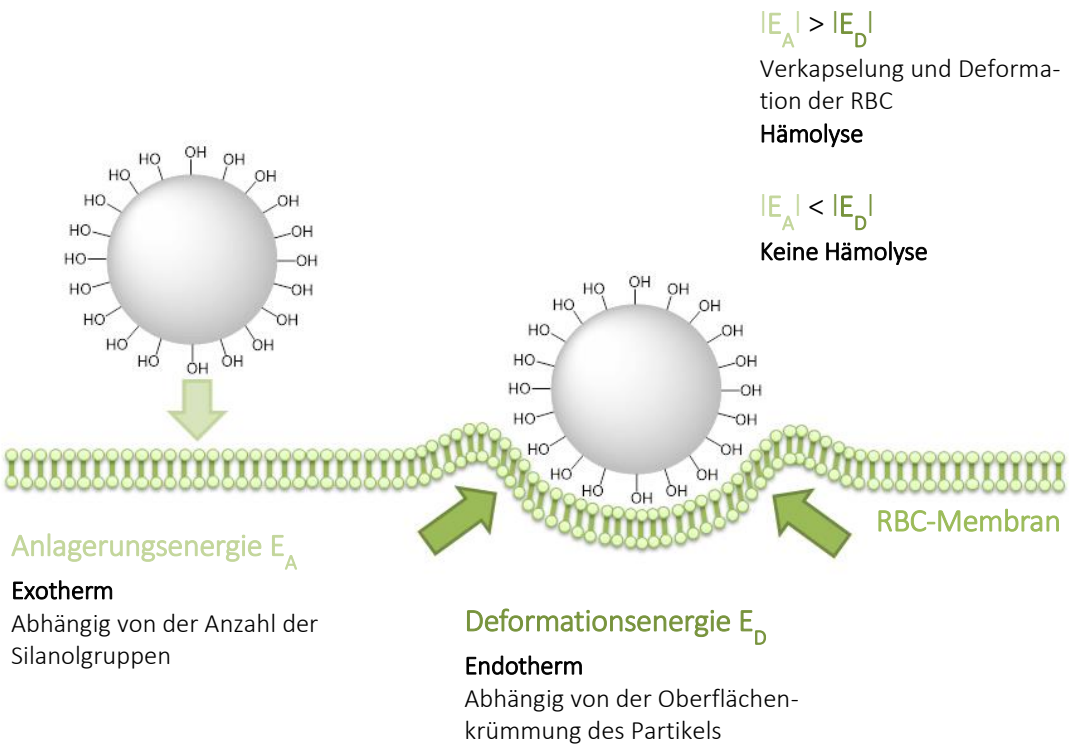


Abbildung 8: Darstellung der rezeptor-vermittelten Endozytose eines Partikels mit erfolgreicher Aufnahme des Partikels in die Zelle.

So zeigen viele Studien eine Größenabhängigkeit von Partikeln unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung in ihrer zellulären Aufnahme, wobei sich ein Durchmesser von 50-60 nm mehrfach als optimale Größe erwies,[236,238,240,242] was sich mit den Berechnungen nach Gao *et al.*[235] deckt, welche einen optimalen Durchmesser von 54-60 nm bestimmten. Da auf der Zelloberfläche bisher keine spezifischen Silikarezeptoren bekannt sind,[173] wird als Adhäsionsursprung die Wechselwirkung

mit den Kopfgruppen verschiedener Phospholipide der Membran angenommen.[243] Aufgrund dieser Wechselwirkungen kommt es zu einer ladungsabhängigen Partikelaufnahme. So werden positiv geladene Partikel deutlich besser von den Zellen aufgenommen als es für negativ geladene Partikel der Fall ist, was sich durch eine erhöhte Interaktion mit den negativ geladenen Zellmembranen erklären lässt.[244-246] Zudem nehmen unspezifisch adsorbierte Proteine ebenfalls Einfluss auf die Aufnahme der Partikel in die Zelle.[198,240,245] So konnten Shahabi *et al.*[245] eine Umkehr in der zellulären Aufnahme für positiv und negativ geladene Partikel in Anwesenheit von Serumproteinen beobachten. Um die Adhäsion an die Zellmembran zu optimieren, können zusätzlich spezifische Liganden an den Partikeln angebracht werden, welche mit Rezeptoren der Zellmembran interagieren können und somit die Endozytose fördern (Kapitel 3.4.2). Aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorarten und -dichten auf den Membranen der unterschiedlichen Zelllinien, läuft die Endozytose zelltypabhängig ab,[198,204,246] wobei ein Eindringen der Partikel in den Zellkern für keine der Zelllinien und Partikel mit einem Durchmesser größer 50 nm beobachtet werden konnte.[198,237-240]

3.4.2. *Gezielte Aufnahme in bestimmte Zellen*

Tumorgewebe weisen im Vergleich zu gesundem Gewebe deutliche Unterschiede auf. So besitzen sie eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, wodurch die Diffusion von Makromolekülen ins Gewebe erleichtert wird, während zeitgleich der Prozess der Auswaschung durch die Blutgefäße und die anschließende Entfernung über das Lymphsystem verlangsamt werden.[247,248] Aufgrund dieses EPR-Effekts (*enhanced permeability and retention*) kommt es zu einer passiven Anreicherung von Makromolekülen im Tumorgewebe. Da die vaskulären Poren der meisten soliden Tumore eine Größe zwischen 380 und 780 nm aufweisen[249] und Partikel mit einer Größe unter 80 nm durch die Kapillarporen schnell ausgewaschen werden, ergibt sich für die passive Akkumulation eine optimale Partikelgröße von 80-200 nm.[250] Des Weiteren ergeben sich Unterschiede in der Art und Anzahl an Oberflächenrezeptoren.[251-253] Um die Effizienz von Wirkstofftransportsystemen weiter zu steigern und Nebenwirkungen zu minimieren, können Oberflächenliganden an die Partikel angebracht werden, welche mit den Rezeptoren wechselwirken und somit über eine verstärkte Interaktion mit bestimmten Zelltypen eine erhöhte Selektivität mit sich bringen.[141] So besitzen Tumorzellen aufgrund einer erhöhten Proliferationstendenz einen höheren Energiebedarf als normales Gewebe, weshalb sie mehr Glucose- und Folatrezeptoren aufweisen, wodurch eine Funktionalisierung mit Zuckermolekülen[142-144] oder Folsäure[145-147] zu einer effektiven und selektiven Aufnahme führt. Auch die Anbringung von

Aptameren,[148,149] Peptiden[150-153] oder Antikörpern[154,155] kann zu einer Steigerung der Selektivität beitragen.

In ihren Studien für den Transport des Wirkstoffes Docetaxel erhöhten Khosravian *et al.*[147] die Aufnahme von aminfunktionalisierten MSN mit einer Größe von 50 nm in MCF7-Zellen durch die Anbringung von Methionin- oder Folsäureliganden. Dabei ergab sich für die folsäurefunktionalisierten Partikel die höchste Aufnahme in die Zelllinie. *Ex vivo*-Studien an Mäusen zeigten ebenfalls eine erhöhte Anreicherung für die Folsäure-MSN im Tumorgewebe, was die Annahme einer folsäure-unterstützten Aufnahme der Partikel unterstützt. Mandal und Beck *et al.*[154] setzten bei ihren Studien hingegen auf eine antikörper-vermittelte Aufnahme und funktionalisierten ihre MSN mit dem antiB220-Antikörper, welcher von den B220-positiven leukämischen Stammzellen erkannt wird und somit eine selektive Aufnahme in die Zellen ermöglicht. Dabei wurden die Kontrollpartikel mit einem antiCD9-Antikörper funktionalisiert, wodurch diese von den B220-positiven Zellen weniger gut aufgenommen wurden. Ergänzend konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Aufnahme der antiB220-funktionalisierten MSNs durch Blockieren der Rezeptoren durch freien antiB220-Antikörper gehemmt wird, wodurch die Beteiligung der Antikörper-Rezeptor-Interaktion an der Partikelaufnahme bestätigt werden konnte. Eine andere Herangehensweise ist das Anbringen funktioneller Peptide auf der Partikelaußenseite. Ein Beispiel für die Peptid-vermittelte Fokussierung bestimmter Zellen stellen die Studien von Wang *et al.*[152] dar, welche über die Funktionalisierung ihrer PEGylierten Partikel mit dem IP-Peptid den Interleukin-13-Rezeptor auf U251-Zellen ansteuern konnten, was zu einer erhöhten Aufnahme im Vergleich zu den reinen PEGylierten Partikeln führt. Zudem kam es zu keiner Partikelaufnahme in die Kontrollzelllinie der 1800-Zellen, welche keine Interleukin-13-Rezeptoren aufweisen, wodurch eine rezeptor-vermittelte Aufnahme über das IP-Peptid in die U251-Zellen gezeigt werden konnte. Der Arbeitsgruppe Pan *et al.*[153] gelang es mit Hilfe der Peptidfunktionalisierung kleine mesoporöse Partikel mit Größen von 25 und 50 nm in den Zellkern zu transportieren. Hierbei verwendeten sie das Tat-Peptid, welches zu einer erhöhten Aufnahme der MSNs in den Zellkern innerhalb von 8 h führt, während die unfunktionalisierten MSNs lediglich im Zytoplasma vorzufinden sind. Eine der gängigsten Peptidsequenzen für Rezeptorinteraktionen auf Krebszellen ist das Tripeptid RGD. Das Bindemotiv stammt aus dem Fibronektin und interagiert mit einer Vielzahl der Integrinrezeptoren in der Zellmembran. Li *et al.*[150] brachten das Peptid N_3-GRGDSGRGDS-NH_2 über Klickchemie mittels einer Disulfidbrücke an 100 nm große MSN an. Dabei fungiert die Peptidfunktionalisierung zunächst als ein Porenverschluss, wodurch das in die Poren geladene Doxorubicin bei einer Partikelkonzentration von 0,1 mg/mL in PBS mit pH 7,4 bei 37 °C lediglich zu 18% innerhalb der ersten 24 h freigesetzt werden kann. Die Freisetzungsstudien wurden hierbei in

Abwesenheit von Serumproteinen und Zellen durchgeführt. Bei der Untersuchung der Doxorubicinfreisetzung in Anwesenheit von Zellen, kommt es im Zellinneren aufgrund der reduzierenden Wirkung von intrazellulärem GSH zur Spaltung der Disulfidbrücke und somit zur Freisetzung des Doxorubicin ins Innere der Zellen. Hierbei kommt es aufgrund der angebrachten RGD-Sequenz zu einer erhöhten Aufnahme der Partikel und einer damit verbundenen erhöhten Doxorubicinfreisetzung in den U87 MG-Zellen, welche $\alpha_V ß_{III}$-Integrinrezeptoren in ihrer Membranstruktur beinhalten. Für $\alpha_V ß_{III}$-negative COS 7-Zellen konnte hingegen lediglich eine geringe Aufnahme der Partikel beobachtet werden. Um die rezeptor-vermittelte Aufnahme weiter zu untermauern, wurden die U87 MG-Zellen mit Kontrollpartikeln inkubiert, welche über Klickchemie mit dem Peptid N_3-GK_{11}-NH_2 funktionalisiert sind. Um eine elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Zellmembranen aufgrund der hohen positiven Ladung des Peptids auszuschließen, wurden die Aminogruppen acetyliert. Für die Kontrollpartikel wurde für die U87 MG-Zellen eine stark abgeschwächte Aufnahme in die Zellen detektiert. Auch die Gruppe Fang *et al.*[151] verwendete die RGD-Sequenz als Selektivitätsmotiv. Hierzu funktionalisierten sie 100-200 nm große MSNs mit Carbaminsäure, an welche sie in einem weiteren Schritt entweder das zyklische Peptid *c*-RGDFK oder das lineare Peptid K_7RGD kovalent anbanden. Nach 12 h Inkubation zeigte sich für die Aufnahme der RGD-funktionalisierten Partikel in HeLa- und MCF7-Zellen eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den Carbaminsäure-funktionalisierten Basispartikeln, wobei das zyklische RGD die beste Aufnahme detektieren ließ. Über die Reduzierung der Aufnahme RGD-funktionalisierter Partikel durch Zugabe der beiden RGD-Peptide in freier Form lässt sich eine rezeptor-vermittelte Aufnahme nachweisen.

All diese Studien sind nur ein kleiner Einblick in die Untersuchungen für den zielgerichteten Wirkstofftransport und sind ein Beleg für das große Potential der MSN in diesem Bereich, wobei eine Funktionalisierung zu einer selektiven Anreicherung in bestimmten Zelllinien oder sogar Zellkompartimenten genutzt werden kann, was durch *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen belegt werden konnte.

3.4.3. *Gezielter Medikamententransport*

Der Einsatz vieler Wirkstoffe ist durch deren schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien sowie einer geringen Stabilität unter biologisch relevanten Bedingungen limitiert, was eine verminderte Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes nach sich zieht.[2,254] Um diese Einschränkungen zu überwinden, können die Wirkstoffe in eine Matrix eingebracht werden, welche den Wirkstoff vor metabolischem Abbau schützt und gleichzeitig zu einer Löslichkeitserhöhung führt.[255-257] Wird diese Matrix zusätzlich

mit spezifischen Liganden funktionalisiert, welche mit bestimmten Zellrezeptoren interagieren können oder bestimmte Wechselwirkungen in biologischen Systemen eingehen oder unterbinden, werden neue Therapieansätze ermöglicht, welche Nebenwirkungen reduzieren und den Erfolg einer Therapie erhöhen können.[141,156,157] Als eine solche Matrix für den Wirkstofftransport haben sich MSN bereits mehrfach ausgezeichnet.[118-122] Grund hierfür ist einerseits ihr großes Porenvolumen, welches hohe Beladungskapazitäten ermöglicht und andererseits die Vielfalt an Möglichkeiten der Oberflächenfunktionalisierung, wodurch nicht nur die Transporteigenschaften der Partikel für den jeweiligen Verwendungszweck maßgeschneidert werden können, sondern auch die Wechselwirkung mit dem entsprechenden Wirkstoff beeinflusst werden kann. Die Beladung der Partikel kann hierbei *in situ*[118,258,259] oder postsynthetisch[118,120,186] durch Physi- oder Chemisorption erfolgen, wobei durch die postsynthetische Beladung Beladungsgrade bis zu 35 Gewichts-% möglich sind.[2] Für biologische Anwendungen werden allerdings häufig deutlich geringere Beladungskonzentrationen verwendet. Die Freisetzung der Wirkstoffe erfolgt hauptsächlich diffusionsbedingt und hängt stark von der Stärke der Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche ab.[260,261] Um eine frühzeitige Wirkstofffreisetzung zu unterbinden, können die Poreneingänge durch sogenannte *Gatekeeper* blockiert werden, welche die Poren Stimuli-gesteuert wieder freigeben und somit zu einer gezielten Wirkstofffreisetzung führen.[150,186,262] Häufig verwendete Stimuli sind hierbei pH- und Temperaturänderungen, Licht, Enzyme und chemische Reaktionen wie beispielsweise Redox-Reaktionen. Eine weitere Möglichkeit ist die kovalente Anbindung der Wirkstoffmoleküle über Linker, welche Stimuli-gesteuert gepalten werden können und somit ebenfalls zu einer gezielten Freisetzung beitragen.[135] Aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit und ihrer hohen Beladungskapazität kommen MSN neben der Krebstherapie auch in der Behandlung von HIV, Tuberkulose und Hepatitis zum Einsatz.[2,263,264]

In ihrer Studie zum gezielten Medikamententransport mit MSN synthetisierten Durand *et al.*[118] galactosefunktionalisierte Silikapartikel, welche *in situ* mit dem Photosensibilisator Porphyrin beladen wurden, wodurch sich dieser eingebaut im Silikanetzwerk befindet und durch Bestrahlung der Zellen deren Zelltod auslöst. Postsynthetisch wurde anschließend das Krebsmedikament Camptothecin mittels Physisorption in das Porensystem der mesoporösen Partikel geladen. Über *in vitro*-Studien konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass über die Galactosefunktionalisierung eine rezeptor-vermittelte Aufnahme der Partikel in verschiedene Zelllinien möglich war, welche durch die Freisetzung des Camptothecin zur Reduzierung der Zellviabilität führte. Dieser Effekt konnte durch Bestrahlung der Zellen aufgrund des eingebauten Porphyrins weiter erhöht werden. Die Arbeitsgruppe um Sahlgren *et al.*[120] befasste sich in ihren Untersuchungen hingegen mit dem Notch-Signalweg, welcher ein wichtiger Regulator von Stammzellen ist und in Krebsgewebe häufig überaktiviert vorliegt. Der

Notch-Signalweg kann durch die Behandlung mit γ-Sekretaseinhibitoren wie dem Peptid DAPT deaktiviert werden. Um einen zielgerichteten DAPT-Transport mit MSN zu bewerkstelligen, wurden Polyethylenimin (PEI)-funktionalisierte Silikapartikel mit Folsäure funktionalisiert, welche an die auf vielen Krebszellen überexpressionierten Folsäurerezeptoren binden kann. Über die postsynthetisch mittels Physisorption mit DAPT beladenen und Folsäure-funktionalisierten MSN war ein Wirkstofftransport in HeLa-Zellen möglich, welche eine Vielzahl an Folsäurerezeptoren aufweisen, während 293-Zellen mit wenig Folsäurerezeptoren von den Partikeln unbeeinflusst blieben. Neben den *in vitro*-Studien konnte die Arbeitsgruppe zudem durch *in vivo*-Studien an Mäusen zeigen, dass 72 h nach Injektion der Partikel eine erhöhte Lokalisation der Folsäurefunktionalisierten Partikel in den Tumoren beobachtet und zusätzlich das Wachstum der Tumore eingedämmt werden konnte. Zhang *et al.*[186] verwendeten in ihren Studien das Zytostatikum Doxorubicin, welches durch Interkalation in die DNA zum Zelltod führt. Um die Selektivität des Wirkstoffes zu erhöhen, wurde dieser in das Porensystem von MSN über Physisorption geladen. Eine frühzeitige Auswaschung des hydrophilen Wirkstoffes wurde durch die Funktionalisierung der äußeren Partikeloberfläche über Disulfidbrücken mit ß-Cyclodextrinen, welche die Poren verschließen und somit den Wirkstoff im Inneren der Partikel halten, unterbunden. Mittels Wirt-Gast-Wechselwirkung wurde ein Peptid, welches aus der Peptidsequenz RGD und der Sequenz PLGVR besteht, an die Cyclodextrine angelagert. Die RGD-Sequenz wirkt endozytosefördernd und unterstützt somit die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere, während die PLGVR-Sequenz von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) erkannt und gespalten wird. MMPs sind eine Gruppe von Enzymen, welche die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen katalysieren und besonders bei Prozessen des Gewebeumbaus wie dem Tumorwachstum auftreten. An das angelagerte Peptid wurde Polyasparaginsäure angebunden, welche abschließend eine Schutzschicht um den gesamten Partikel ausbildet, um dessen Liganden zu schützen und diesen vor der Aufnahme in gesundes Gewebe zu bewahren. *In vitro*-Studien zeigten, dass es in der Nähe der SCC 7-Tumorzellen zur Spaltung der Peptidbindung zwischen der RGD- und der PLGVR-Sequenz kommt und somit die RGD-Sequenz mit den Integrinrezeptoren der Zellmembran interagieren kann. Nach erfolgreicher Endozytose der Partikel kommt es intrazellulär zur GSH-induzierten Spaltung der Disulfidbrücken, wodurch die Poren freigegeben werden und es zur intrazellulären Freisetzung des Doxorubicins kommt. Bei Zugabe von MMP-Inhibitoren wurde keine Aufnahme der Partikel in die Zellen beobachtet, wodurch auch die Doxorubicinfreisetzung ausblieb. Einen ganz anderen Ansatz verfolgt die Arbeitsgruppe um Qu,[265] welche Phenylboronsäure-funktionalisierte MSN mit einem Thioflavin T-Derivat, Propargylglyzin und Ascorbinsäure beladen haben. Die Poren wurden mittels Immunoglobulin G verschlossen und die Partikel zu PC12-Zellen gegeben, die zuvor mit Kupfer-beladenen Amyloidfibrillen Aß40 der Alzheimererkrankung behandelt wurden. Die erhöhte H_2O_2-

Konzentration in Nähe der kupfer-beladenen Amyloidfibrillen spaltet hierbei die Boronatbindung, wodurch das Immunoglobulin G abgespalten wird und die Poren der Partikel freigegeben werden. Die beiden Komponenten Thioflavin T und Propargylglyzin reagieren hierbei in Anwesenheit der Ascorbinsäure und des Kupfers über eine Click-Reaktion zum eigentlichen aktiven Wirkstoff, welcher das Kupfer chelatisiert und durch Oxygenierung zum Abbau der Amyloidfibrillen führt. Durch den Abbau der Fibrillen, welche durch Änderung der Zellmorphologie zum Zelltod führen, konnte die Zellviabilität von 37% auf 82% gesteigert werden.

II. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll eine nicht-kovalente Funktionalisierung der Silikapartikel über Peptidnanofibrillen auf seine Eignung als mögliches Wirkstofftransportsystem untersucht werden, wobei die Wirkstoffbeladung der Partikel postsynthetisch über Physisorption erfolgt. Für die Selektivität wird die bereits gut untersuchte RGD-Sequenz eingesetzt, welche kovalent an die Grundstruktur der amphipatischen Peptide angebracht wird und somit die Ausbildung funktioneller PNF ermöglicht, an welche anschließend die wirkstoffbeladenen MSN adsorptiv angelagert werden, welche sie anschließend in Zellnähe bringen sollen, um eine selektive Wirkstofffreisetzung zu gewährleisten.

Mesoporöse Silikananopartikel (MSN) haben sich bereits mehrfach als geeignete Wirkstofftransportsysteme für kleine hydrophobe als auch hydrophile Wirkstoffe erwiesen.[118-122] Ihr großes variables Porenvolumen ermöglicht hierbei hohe Beladungsgrade, während die große spezifische Oberfläche leicht mit funktionellen Gruppen versehen werden kann, um Ladung und Funktionalität der Partikel anzupassen. Eine weitere bedeutende Eigenschaft als Wirkstofftransportsystem ist ihre geringe zelltoxische Wirkung sowie ihre hohe Biokompatibilität.[266] Unfunktionalisiert sind die Partikel jedoch unspezifisch in ihrer Zellanbindung und werden zudem zügig aus dem Blutkreislauf entfernt.[215,267,268] Die sphärischen sehr kleinen Nanopartikel weisen außerdem lediglich eine geringe Kontaktfläche für die Interaktion mit den Rezeptoren auf den Zellmembranen auf und es kann durch Hydrolyse zu einer schnellen Ablösung der auf der Silikaoberfläche angebrachten Funktionalitäten kommen, was einen Verlust der Selektivität bedeuten würde. Um diesen Faktoren entgegenzuwirken, wurden die MSN an Peptidnanofibrillen (PNF) nicht-kovalent angelagert. Diese bieten durch die Ausbildung größerer Aggregate eine deutlich höhere Kontaktfläche für die Zellinteraktion (Abbildung 9). Des Weiteren weisen PNF eine erhöhte Proteolysestabilität auf[54] und stellen somit die Verfügbarkeit von Selektivitätsmotiven über längere Zeit sicher.

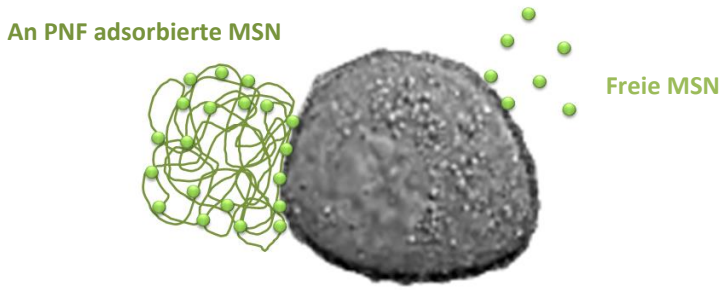


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Anlagerung von MSN im Vergleich zu PNF mit nicht-kovalent angebundenen MSN an die Membran einer Zelle.

PNF weisen Eigenschaften auf, welche sie als eine vielversprechende Basis für die Entwicklung neuartiger Wirkstofftransportsysteme auszeichnet. Allerdings eignen sich hierzu nicht alle Fibrillen. Während positiv geladene PNF neben einer guten Wasserlöslichkeit auch eine hohe Zellaffinität aufweisen, lagern diese aufgrund elektrostatischer Interaktionen unspezifisch an die negativ geladenen Zellmembranen aller Zellen an. Dies steht einem selektiven Wirkstofftransport im Wege. Verwendet man hingegen neutral geladene Peptide kann eine selektive Zellanlagerung an bestimmte Zelltypen durch Anbringung entsprechender Funktionalitäten gefördert werden. Allerdings führt die Verwendung neutral geladener Aminosäuren zu einer Absenkung der Wasserlöslichkeit. Die Lösung hierfür ist die Verwendung amphipatischer Peptide.[30] Diese weisen ein alternierendes Muster aus geladenen und unpolaren Aminosäuren auf, was in wässrigen Medien zu einer schnellen Ausbildung von gut wasserlöslichen PNF führt (Kapitel 1.1). Der in dieser Arbeit verwendete Grundkörper KFKFEFEF weist einen eben solchen amphipatischen Peptidcharakter auf und besitzt aufgrund der gewählten geladenen Aminosäuren eine neutrale Nettoladung. Um die Selektivität dieser Sequenz zu erhöhen, wurde die aus Fibronektin stammende RGD-Sequenz verwendet.[269] Diese ermöglicht eine leichte Anbringung der Funktionalität an den Grundkörper durch Festphasenpeptidsynthese und weist eine hohe Affinität zu den auf Krebszellen überexpressionierten Integrinrezeptoren auf (Kapitel 1.3). Um die Flexibilität der RGD-Sequenz bei der Interaktion mit den Zellrezeptoren zu erhöhen, wurden zwei Glycine als Linker eingebaut. Pierschbacher und Ruoslathi konnten zudem zeigen, dass die Anbindung eines Serins an den *C*-Terminus der RGD-Sequenz deren Aktivität weiter steigert.[270] Durch Anbindung dieser zusätzlichen Aminosäure ergab sich die finale Primärstruktur für die Anlagerung der Silikapartikel (Abbildung 10).



Abbildung 10: Aufbau und Funktion der einzelnen Aminosäuren in der untersuchten Primärsequenz KFKFEFEFGGRGDS.

Die Anbindung der Silikapartikel an das Fibrillennetzwerk erfolgte nicht-kovalent. Hierbei entsteht kein großer synthetischer Aufwand und eine erleichterte Aufnahme der Partikel in die Zellen wäre denkbar. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Zetapotentialmessungen, Durchflusszytometrie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die Kinetik sowie die Vollständigkeit der Anlagerung an die PNF untersucht, um die Anwesenheit freier Partikel zu vermeiden, welche zu einer unspezifischen

Zellaufnahme beitragen würden. Für die Anlagerung der Partikel wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Einerseits wurden die MSN nachträglich an die fertig ausgebildeten PNF angelagert, wodurch ein System entsteht, welches die MSN auf der Außenseite trägt und für die Zellaufnahme bereitstellt (Abbildung 11 – normales System). Andererseits wurden die MSN durch Zugabe während der Fibrillenausbildung in das Netzwerk miteingebaut (Abbildung 11 – Inverses System). Hierbei liegen die MSN geschützt durch das Fibrillennetzwerk über die gesamten Aggregate verteilt vor. Die beiden Systeme wurden neben ihrer Partikelan- bzw. -einlagerung auch hinsichtlich ihres Verhaltens unter biologisch relevanten Bedingungen untersucht. Hierzu wurde die Proteinadsorption mittels Gelelektrophorese untersucht, da die gebildete Proteincorona einen wesentlichen Einfluss auf die Transporteigenschaften des Systems haben kann. Zudem wurde das Abbauverhalten der Einzelkomponenten sowie der PNF-MSN-Aggregate unter diesen Bedingungen genauer analysiert. Hierbei wurde vor allem auf den hydrolytischen Partikelabbau in An- und Abwesenheit der PNF mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) sowie den Einfluss der MSN-Anlagerung auf den proteolytischen Abbau der Fibrillennetzwerke mittels ProteoStat®-Einlagerung eingegangen. Das Abbauverhalten des Systems unter biologischen Bedingungen ist von großer Bedeutung für den Transport von Wirkstoffen. Hierbei führt ein zu schneller Abbau zur frühzeitigen Freisetzung des Wirkstoffes, welcher somit unspezifisch in die Zellen diffundieren kann und zudem enzymatischem Abbau ausgesetzt ist. Ein zu geringer Abbau hingegen kann eine unerwünschte längerfristige Ansammlung der Komponenten im Körper verursachen.

In einem letzten Schritt sollte die Eigenschaft dieser neuartigen Transportsysteme untersucht werden, Wirkstoffe selektiv in Krebszellen zu transportieren. Hierfür wurden A549-Zellen verwendet, welche aus einem Adenokarzinom einer humanen Lunge stammen.[271] Sie weisen wie die meisten Krebszellen eine hohe Anzahl an Integrinrezeptoren auf. Als Wirkstoff wurde das hydrophile Zytostatikum Daunorubicin in die mesoporösen Partikel eingelagert. Neben den beiden oben vorgestellten Systemen wurde hierbei noch die Möglichkeit der sequenziellen Zugabe untersucht (Abbildung 11 – sequenzielle Zugabe). Bei dieser Zugabemethode wurden zunächst die PNF 3 h mit den Zellen vorinkubiert, um bereits an die Rezeptoren anzubinden. Anschließend wurden erst die beladenen MSN zu den Zellen gegeben, welche nun an die vorgebundenen PNF anlagern können. Die Untersuchung der Zellanbindung wurde hierbei durchflusszytometrisch sowie mittels Konfokalfluoreszenmikroskopie analysiert. Dank der leicht fluoreszierenden Eigenschaften des Daunorubicins war eine Beobachtung der Wirkstofffreisetzung in die A549-Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie möglich. Um den Mechanismus der Wirkstoffaufnahme in die Zellen besser verstehen zu können, wurden MSN mit dem hydrophoben Modellwirkstoff DiO beladen. Eine

Freisetzung dieses Wirkstoffmodells sollte lediglich durch Aufnahme der MSNs ins Innere der Zelle möglich sein. Andernfalls wäre eine Auswaschung des hydrophilen Zytostatikums Daunorubicin die treibende Kraft für die Wirkstoffaufnahme in die Zellen.

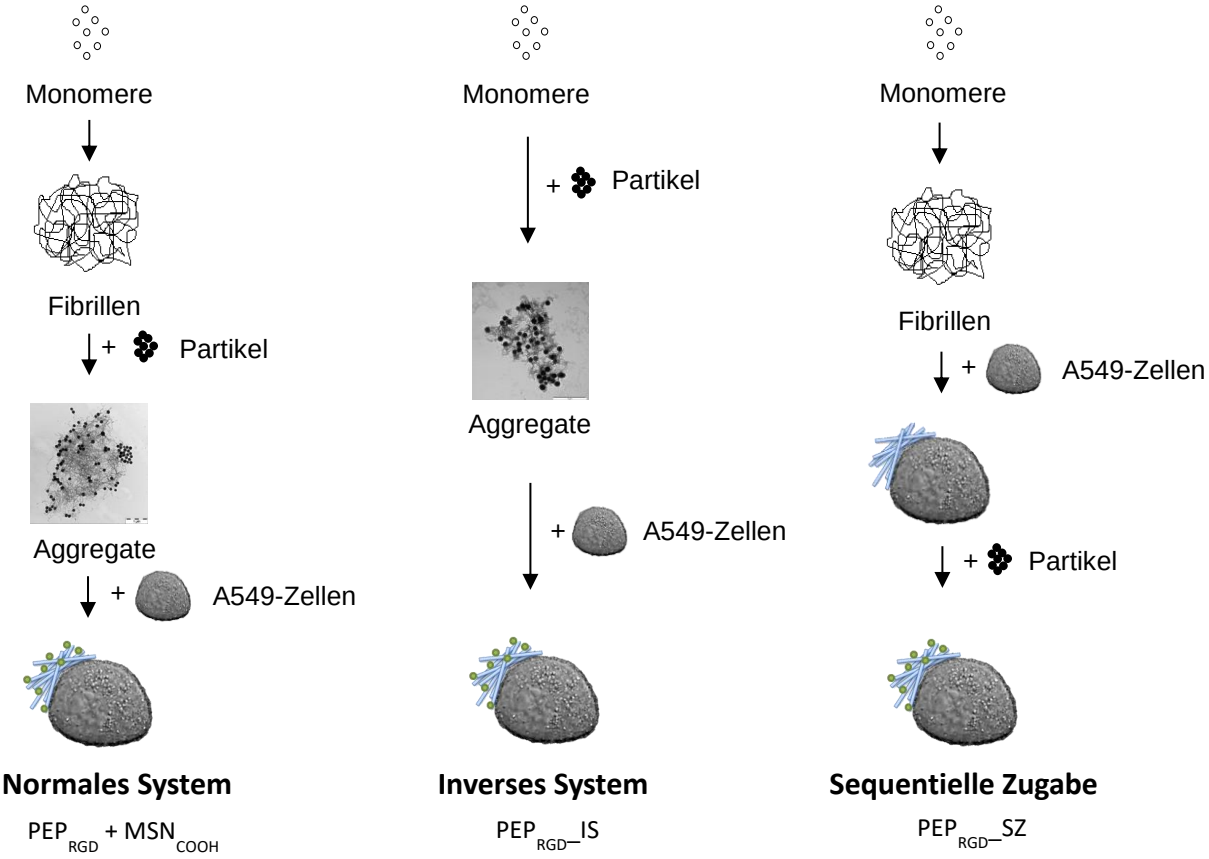


Abbildung 11: Schematische Übersicht der untersuchten nicht-kovalenten Kombinationen aus RGD-funktionalisierten Peptidnanofibrillen und mesoporösen Silikapartikeln als modulare Wirkstofftransportsysteme für A549-Krebszellen.

Die Experimente in dieser Arbeit sollen die Eignung von PNF in nicht-kovalenter Kombination mit MSNs als neuartiges modulares Wirkstofftransportsystem von hydrophilen als auch hydrophoben Wirkstoffen selektiv in Krebszellen aufzeigen. Hierzu wurden drei verschiedene Ansätze verwendet, um das System auf seine Eigenschaften als Wirkstofftransportsystem zu untersuchen und zu optimieren. Dies würde ein vielseitig einsetzbares, biokompatibles sowie kostengünstiges Wirkstofftransportsystem ermöglichen, welches für den Transport unterschiedlicher Wirkstoffe nutzbar ist.

III. Ergebnisse und Diskussion

Für die Untersuchung der Partikel-Fibrillen-Aggregate als potentielles Wirkstofftransportsystem wurden zunächst die beiden einzelnen Komponenten synthetisiert und charakterisiert. Anschließend wurde die Anlagerung der mesoporösen Silikapartikel (MSN) an die Peptidnanofibrillen (PNF) und die Eignung der gebildeten Aggregate als Transportsystem für das hydrophile Zytostatikum Daunorubicin (Dauno) sowie den hydrophoben Modellwirkstoff 3,3‘-Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO) untersucht.

1. Synthese und Funktionalisierung mesoporöser Silikapartikel

Für die Herstellung von monodispersen Silikapartikeln unter milden Bedingungen eignet sich der Sol-Gel-Prozess besonders gut.[272,273] Kombiniert man diesen mit dem Endotemplatverfahren, entstehen Partikel mit einem mesoporösen Porennetzwerk und einer großen spezifischen Oberfläche.[167,274] In dieser Arbeit erfolgte die Templatisierung über das kationische Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (C_{16}TAB), welches besonders gut mit den im Alkalischen negativ geladenen Silikaoligomeren wechselwirken kann (Kapitel I.3.1). Durch die Co-Kondensation von Tetramethylorthosilikat (TMOS) und (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) als Präkursoren in einer alkalischen Lösung von Wasser und Methanol konnten *in situ* Aminfunktionen in das entstehende Mesoporensystem eingebracht werden. Durch Extraktion mit einer ethanolischen Ammoniumnitratlösung können somit aminfunktionalisierte Partikel erhalten werden, während die Tensidentfernung durch Kalzinierung zur Entstehung unfunktionalisierter MSNs führte, welche durch anschließende Carboxylierung mit Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz (CES) in wässriger Lösung weiter funktionalisiert werden konnten. Durch die Verwendung dieses Verfahrens wurden unterschiedlich funktionalisierte Partikel erhalten, welche einen Durchmesser von etwa 150 nm und eine enge Größenverteilung aufweisen (Abbildung 12, Tabelle 1).

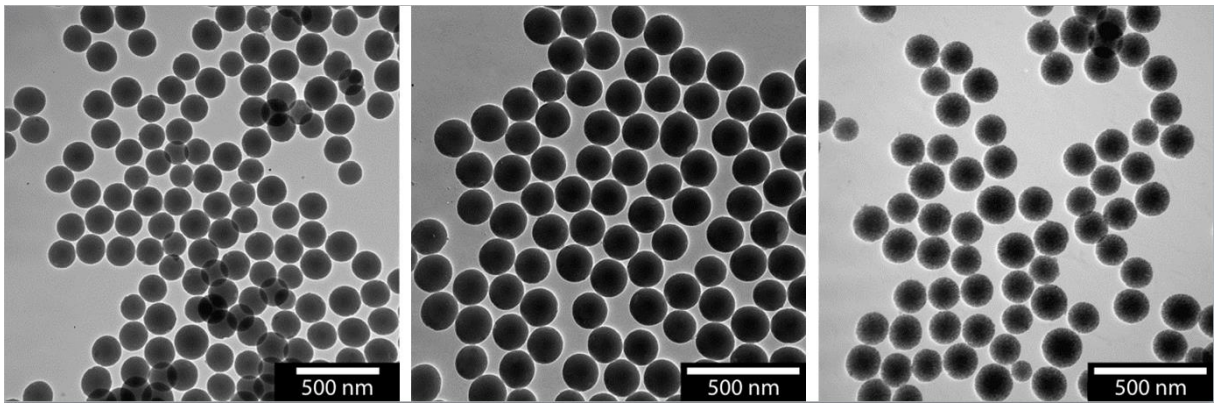


Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der sphärischen mesoporösen kalzinierten (MSN_{OH}), carboxylierten (MSN_{COOH}) und extrahierten aminfunktionalisierten (MSN_{NH2}) Silikapartikel mit einem Durchmesser von ~150 nm.

Auch durch Dynamische Lichtstreuung (DLS) konnte der Durchmesser der Partikel verifiziert werden (Tabelle 1). Die hierbei erhaltenen Durchmesser ergaben etwas höhere Werte als bei der Quantifizierung durch transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen. Dies liegt in der Solvathülle begründet, welche sich um solvatisierte Partikel ausbildet. Bei der DLS wird eben diese Solvathülle mitvermessen, wodurch der Hydrodynamische Durchmesser der Partikel erhalten wird. Dieser ist für weitere Untersuchungen von großer Bedeutung, da er die Größe angibt, in welcher die Partikel in einer Dispersion wahrgenommen werden, und somit Aussagen über das Erscheinen der Partikel in wässrigen Medien zulässt. TEM Aufnahmen können die Solvathülle nicht sichtbar machen, weshalb hierbei der tatsächliche Durchmesser der Silikapartikel vermessen wird, welcher für Aufnahmemechanismen im Körper eine wichtige Rolle spielt.

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der synthetisierten Silikapartikel. DLS und Zetapotentialmessungen wurden in 1 mM KCl (pH 5,5) durchgeführt.

	d_{TEM}	d_{DLS}	ζ-Potential	Funktionalisierung (TGA) / mmol/g
MSN_{OH}	154 ± 16 nm	206 ± 3 nm	-12 ± 0,5 mV	-
MSN_{COOH}	148 ± 18 nm	188 ± 5 nm	-34 ± 2 mV	0,7
MSN_{NH2}	161 ± 18 nm	215 ± 2 nm	29 ± 1 mV	2,4

Um das Tensid aus dem Netzwerk zu entfernen und somit das entstandene Porennetzwerk freizulegen, wurden die Partikel einerseits kalziniert und andererseits mit ethanolischer

Ammoniumnitratlösung extrahiert. Beim Kalzinieren werden die organischen Komponenten vollständig verbrannt, wodurch reine Silikapartikel (MSN_{OH}) entstehen, welche lediglich Hydroxygruppen auf ihrer Oberfläche aufweisen. Aufgrund dieser Hydroxygruppen weisen die kalzinierten Partikel in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) ein leicht negatives Zetapotential von -12 mV auf (Tabelle 1, Abbildung 14A). Durch die hohen Temperaturen kommt es jedoch auch zu einer Erhöhung des Kondensationsgrades der Silikawände.[273] Die Tensidentfernung mittels Extraktion erfolgt über das Prinzip des Ionenaustausches.[275] Hierbei wird das Tensid aus den Poren entfernt ohne die cokondensierten Aminopropylgruppen zu beeinflussen, wodurch aminfunktionalisierte Partikel (MSN_{NH2}) erhalten werden, welche in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) aufgrund der protonierten Aminfunktionen ein Zetapotential von 29 mV besitzen (Tabelle 1, Abbildung 14A). Durch die Umsetzung der beiden Partikel mit ethanolischer Ninhydrinlösung kann die Anwesenheit von Aminfunktionen auf der Oberfläche der extrahierten Partikel gezeigt werden (Abbildung 13). Da das Ninhydrin unter Umwandlung der primären Amine zu Aldehydgruppen selbst dimerisiert, kommt es zu einer starken Violettfärbung.[276] Bei den kalzinierten Partikeln ist eine Reaktion mit dem Ninhydrin aufgrund der fehlenden Aminfunktionen, welche beim Kalzinieren verbrannt wurden, nicht möglich und es kommt zu keiner Farbänderung.

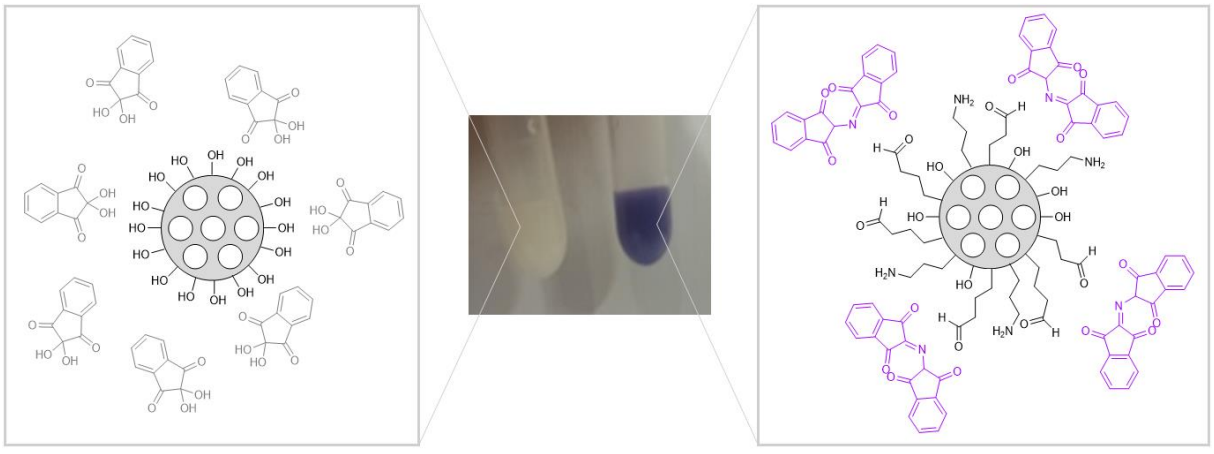


Abbildung 13: Umsetzung der MSN_{OH} (links) und der MSN_{NH2} (rechts) mit einer 1%-igen Ninhydrinlösung in Ethanol.

Durch 3-stündige postsynthetische Funktionalisierung der kalzinierten Partikel mit CES in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2) konnten diese mit Carboxyfunktionen auf der Oberfläche versehen werden (MSN_{COOH}), was zu einer Absenkung des Zetapotentials in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) hin zu -34 mV führt (Tabelle 1, Abbildung 14A). Betrachtet man die Zetapotentialverteilungen in Abbildung 14A genauer, so kann man eine leichte Verbreiterung in der Verteilungskurve für die beiden

funktionalisierten Partikel MSN_{COOH} und MSN_{NH2} erkennen, welche daher rührt, dass nicht auf allen Partikeln exakt gleich viele funktionelle Gruppen angebunden wurden. Die Verteilungskurven sind jedoch trotz leichter Verbreiterung sehr schmal in ihrem Verlauf, was auf eine relativ homogene Funktionalisierung durch die *in situ* Aminfunktionalisierung als auch die postsynthetische Carboxylierung hindeutet.

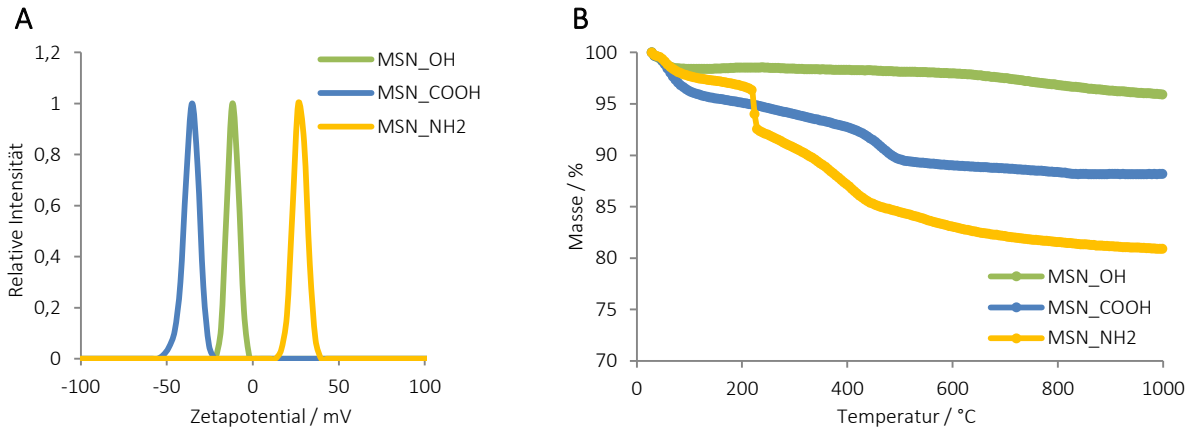


Abbildung 14: (A) Zetapotentialverteilung und (B) thermogravimetrische Analyse der MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} im Vergleich.

Um den Funktionalisierungsgrad der Partikel zu quantifizieren, wurden thermogravimetrische Analysen (TGA) der Partikel durchgeführt (Abbildung 14B). Da bis 200 °C auf der Oberfläche adsorbiertes Wasser verdampft wird, wurden die Graphen für die weitere Auswertung auf diese Temperatur normiert. Für die unfunktionalisierten MSN_{OH} kommt es in einem Temperaturbereich von 200-500 °C zu einem Massenverlust von 0,4%, welcher durch Kondensationsreaktionen im Silikanetzwerk zustande kommt. Durch die Kalzinierung der Partikel kommt es lediglich zu einer sehr geringen Massenabnahme, da es bereits beim Kalzinieren zu einer Verdichtung des Silikanetzwerkes durch Kondensation gekommen ist. Für die MSN_{COOH} ist in dem entsprechenden Temperaturbereich ein Masseverlust von 6,3% zu beobachten. Dieser Anteil ergibt sich zu einem geringen Anteil ebenfalls aus Kondensationsreaktionen. Den hauptsächlichen Einfluss haben jedoch die Carboxyethylgruppen, welche auf der Partikeloberfläche vorhanden sind. Diese organischen Bestandteile verbrennen in diesem Temperaturbereich und lassen die unfunktionalisierten Silikapartikel zurück, wodurch ab einer Temperatur von 500 °C kaum noch eine Massenänderung sichtbar ist. Da die MSN_{NH2} nicht wie die beiden anderen Partikel zuvor einer Kalzinierung unterzogen wurden, sind diese nicht direkt mit den anderen vergleichbar, da es in diesem Fall zu mehr Kondensationsreaktionen im Silikanetzwerk während des Aufheizens kommt. Insgesamt weisen die aminfunktionalisierten Partikel im

ausgewählten Temperaturbereich eine Massenänderung von 13,5% auf. Für die Berechnungen der Funktionalisierungsgrade wurden die Kondensationsreaktionen vernachlässigt. Auffällig ist, dass für die *in situ*-Aminfunktionalisierung mittels Co-Kondensation ein höherer Funktionalisierungsgrad erreicht wird als für die postsynthetische Carboxyfunktionalisierung (Tabelle 1). Dies lässt sich durch die Art der Funktionalisierung erklären. Bei Zugabe des Amin-Präkursors zur Syntheselösung kommt es zu einer Co-Kondensation, bei welcher das APTMS im gesamten Netzwerk eingebaut wird, während es bei der Postfunktionalisierung lediglich zu einer Carboxyfunktionalisierung der Oberfläche des Silikanetzwerkes kommt. Für alle drei Partikel wird ein weiterer leichter Abfall der Masse ab ungefähr 700 °C deutlich. Um den Grund dieses Massenverlustes genauer zu untersuchen, wurden die MSN_{OH} bis auf 1000 °C ausgeheizt und bei unterschiedlichen Temperaturen Stickstoffsorptionsisothermen aufgenommen, um die spezifische Oberfläche, den Porendurchmesser als auch das Volumen des Porensystems zu bestimmen (Abbildung 15).

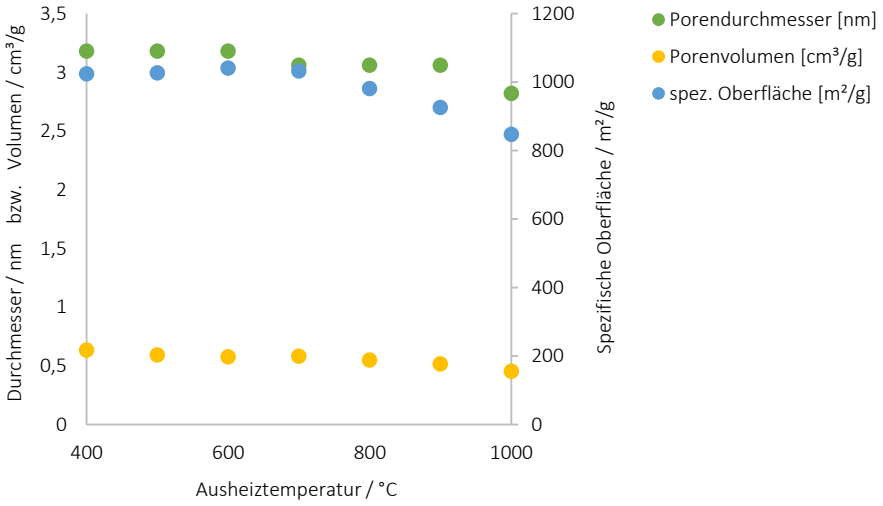


Abbildung 15: Untersuchung der spezifischen Oberfläche, des Porenvolumens und des Porendurchmessers der MSN_{OH} in Abhängigkeit der Ausheiztemperatur mittels Stickstoffsorptionsmessungen.

Hierbei wird ab einer Temperatur von 700-800 °C eine Abnahme im Porendurchmesser sowie im Porenvolumen sichtbar. Ebenfalls nimmt die spezifische Oberfläche in diesem Temperaturbereich deutlich ab. Diese Ergebnisse könnten auf Sinterprozesse im Silikanetzwerk zurückzuführen sein, welche zu Änderungen in der Partikelstruktur führen. Auch Kruk und Hui konnten anhand der Variation der Kalzinierungstemperatur Änderungen in der spezifischen Oberfläche und des Porensystems im Falle von geordneten mesoporösen Silikapartikeln beobachten.[277] Hierbei kommt es zwischen 800 und 900 °C zum Verschluss der Poren, wodurch die spezifische Oberfläche sowie das Porenvolumen stark abnehmen.

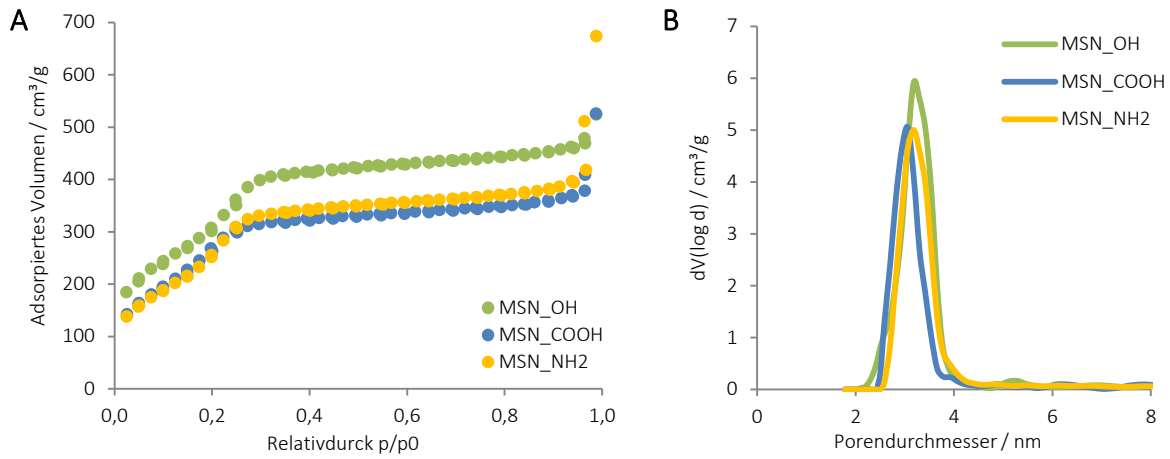


Abbildung 16: (A) Stickstoffsorptionsisothermen sowie (B) Porendurchmesserverteilung der MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2}. Die Porendurchmesser wurden hierbei mittels NL-DFT aus dem Desorptionszweig der Stickstoffisothermen ermittelt.

Nach Überprüfung der erfolgreichen Funktionalisierung wurde auch der Erfolg der Templatisierung untersucht. Hierzu wurden Stickstoffsorptionsisothermen der drei Partikel gemessen (Abbildung 16A), wobei für alle Partikel eine Isotherme des Typs IV nach IUPAC[278] erhalten wurde, was auf die Anwesenheit von Mesoporen hindeutet. Da es für Stickstoff bei 77 K lediglich oberhalb eines Relativdruckes von $p/p_0 > 0{,}42$ zur Kapillarkondensation kommt, ist für die hier untersuchten Partikel keine Hysterese sichtbar.[278, 279] Der relativ steile Verlauf der Porenfüllung lässt darauf schließen, dass eine enge Porengrößenverteilung vorliegt, da sich alle Poren innerhalb eines kleinen Druckbereiches füllen. Diese enge Porenverteilung konnte über die nicht-lokale Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT) bestätigt werden (Abbildung 16B). Der gemittelte Porendurchmesser liegt für alle drei Partikel im Bereich von 3-4 nm. Dies entspricht dem für die C_{16}TAB-Templatisierung erwarteten Wert aus der Literatur.[280] Der Porendurchmesser der kalzinierten Partikel ist minimal größer als die der beiden funktionalisierten Partikel, da hier keine Oberflächenfunktionalisierung vorhanden ist, welche die Poren einengen kann. Für die Bestimmung der Porendurchmesser sowie der Porenvolumina wurde lediglich der Bereich für Relativdrücke unterhalb von 0,9 untersucht, da der steile Anstieg der Isothermen für Relativdrücke größer 0,9 auf interpartikuläre Zwischenräume zurückzuführen ist, welche die erhaltenen Ergebnisse für Porendurchmesser und -volumen verfälschen würden.

Tabelle 2: Spezifische Oberfläche (BET), Porendurchmesser (NL-DFT) und Porenvolumen (NL-DFT) aus den Stickstoffsorptionsisothermen der MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2}.

	Spezifische Oberfläche / m^2/g	Porendurchmesser / nm	Porenvolumen / cm^3/g MSN	Porenvolumen / cm^3/g SiO_2
MSN_{OH}	1067	3,3	0,66	0,68
MSN_{COOH}	909	3,1	0,53	0,58
MSN_{NH2}	872	3,2	0,56	0,67

Die Bestimmung der spezifischen Oberfläche erfolgte nach der Methode von Brunauer, Emmet und Teller (BET).[281] Grundlage für die Berechnungen ist der lineare Anfangsbereich der Isothermen bei $0,05 \leq p/p_0 \leq 0,35$. Berechnet man die zu erwartende spezifische Oberfläche für nicht-poröse Partikel mit einem entsprechenden Durchmesser von 150 nm, so erhält man einen Wert von 15 m^2/g. Der Vergleich mit den erhaltenen Werten für die MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2}, welche bei knapp 1000 m^2/g liegen, zeigt eine erfolgreiche Templatisierung mittels C_{16}TAB (Tabelle 2). Durch die Funktionalisierung der Partikel nimmt die spezifische Oberfläche ab. Dies liegt einerseits an den funktionellen Gruppen, welche auf der Oberfläche angebunden sind und somit das Porenvolumen als auch die spezifische Oberfläche reduzieren. Andererseits spielt auch die Masse der Partikel eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Oberfläche sowie dem Porenvolumen. Mittels thermogravimetrischer Analyse wurde gezeigt, dass die Funktionalisierung 6,3% bzw. 13,5% der Gesamtmasse ausmacht (Abbildung 14B). Ein einzelner funktionalisierter Partikel besitzt somit eine höhere Masse als ein unfunktionalisierter Partikel, was ebenfalls bei der Interpretation dieser Werte berücksichtigt werden muss, da sich die spezifische Oberfläche und das Porenvolumen somit im Falle der funktionalisierten Partikel auf eine geringere Anzahl an Partikeln bezieht. Berücksichtigt man die erhaltenen Gewichtsprozente der Funktionalisierung aus der TGA, ergeben sich die ebenfalls in Tabelle 2 aufgeführten Porenvolumen bezogen auf den SiO_2-Gehalt der eingesetzten Partikel. Hierbei wird deutlich, dass sich die Porenvolumen der unfunktionalisierten und der aminfunktionalisierten MSN nicht unterscheiden, was darauf schließen lässt, dass die Kalzinierung keinen Einfluss auf das vorhandene Porensystem nimmt. Für die carboxylierten MSNs verringert sich hingegen das Porenvolumen, was sich durch die zusätzlich eingeführten funktionellen Gruppen erklären lässt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels Sol-Gel-Prozess in Kombination mit dem Endotemplatverfahren erfolgreich mesoporöse Silikapartikel mit einem Durchmesser von etwa 150 nm hergestellt wurden, welche einerseits amin- als auch carboxyfunktionalisiert werden konnten. Durch das mesoporöse Porensystem mit Porendurchmessern von ungefähr 3,2 nm konnten

spezifische Oberflächen von knapp 1000 m^2/g und ein Porenvolumen von um die 0,6-0,7 cm^3/g erhalten werden.

2. Synthese der Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte nach einem optimierten Protokoll für die Fmoc-Strategie[28] der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.[26] Hierzu wurden mit der ersten Aminosäure vorbeladene Wang-Harze in Dimethylformamid (DMF) gequollen, um das Porensystem des Harzes aufzuweiten. Die α-Aminogruppe liegt hierbei Fmoc-geschützt vor, wodurch eine kontrollierte Entschützung mittels 20% Piperidin-Lösung ermöglicht wird, ohne die orthogonalen Schutzgruppen der Seitenketten abzuspalten. Die Carboxyfunktion der nächsten zu koppelnden Aminosäure wurde mit Diisopropylethylamin (DiPEA) und 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat (HBTU) aktiviert und bei 75 °C gekoppelt. Durch die Verwendung von speziellen Synthesefilterspritzen können die überschüssigen Reaktanden sowie unerwünschte Nebenprodukte leicht durch mehrmaliges Waschen mit DMF entfernt werden. Heutzutage kommt bei der Festphasenpeptidsynthese meist ein Peptidsynthesizer zum Einsatz, welcher durch Mikrowellen kurze Kopplungszeiten sowie hohe Kopplungsausbeuten ermöglicht. Die Abspaltung der fertig synthetisierten Peptide vom Harz sowie der säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten erfolgte über 2-stündige Umsetzung mit 95%-iger Trifluoressigsäure (TFA) mit 2,5% Triisopropylsilan als Radikalfänger und 2,5% Wasser und anschließender Fällung der vollständig entschützten Peptide in kaltem Diethylether. Durch Waschen mit kaltem Ether wurden die Rest der TFA sowie der entstandenen Nebenprodukte der Schutzgruppenabspaltung entfernt und die Peptide im Anschluss in Wasser eingefroren und gefriergetrocknet. Die Peptide mit den Sequenzen KFKFEFEF (PEP), KFKFEFEFGGRGDS (PEP_{RGD}) und KFKFEFEFGGRADS (PEP_{RAD}) konnten auf diese Weise erfolgreich und mit hoher Reinheit hergestellt werden, wie die Ergebnisse der matrixunterstützten Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) mit Flugzeitmassenspektrometrie (*time of flight* – TOF MS) zeigen (Abbildung 17).

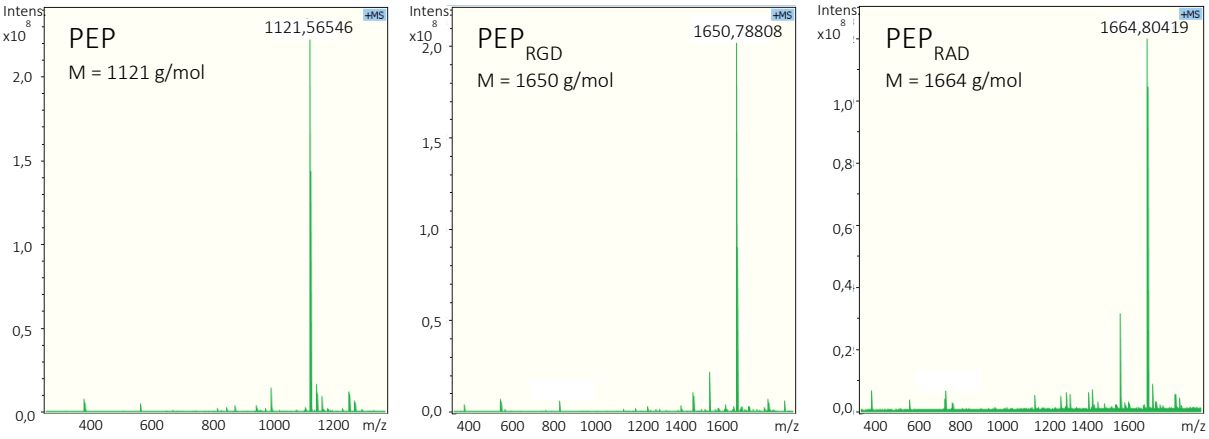


Abbildung 17: Ergebnisse der MALDI-TOF MS der im Peptidsynthesizer hergestellten Peptide PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}.

Um Peptide ohne die Nutzung eines Peptidsynthesizers herzustellen, wurde die Synthese ebenfalls bei 75 °C in einem Heizschrank ohne Mikrowellen durchgeführt. Dies ermöglicht die parallele Synthese von mehreren Peptiden, was eine bedeutende Zeitersparnis mit sich bringt. Für das Peptid PEP, welches mit acht Aminosäuren die geringste Länge aufweist, wurde auch ohne den Einsatz von Mikrowellen ein reines Produkt erhalten (Abbildung 18A). Für das sechs Aminosäuren längere Peptid PEP_{RGD} konnten zusätzliche Massen im Spektrum entdeckt werden (Abbildung 18B). Nach genauerer Analyse wird deutlich, dass es sich bei den Massen, um verschiedene Fragmente des Peptids PEP_{RGD} handelt. Bis zur zehnten Aminosäure scheinen die Kopplungsschritte einwandfrei abgelaufen zu sein, während es bei den späteren Aminosäuren zu unvollständigen Kopplungen kam. Grund für diese schlechteren Ausbeuten bei den späteren Kopplungsschritten könnte das Fehlen der Mikrowellen sein, welche zu einem schnelleren Aufheizen der Syntheselösung beitragen und somit kurze Kopplungszeiten mit sehr hohen Ausbeuten ermöglichen.

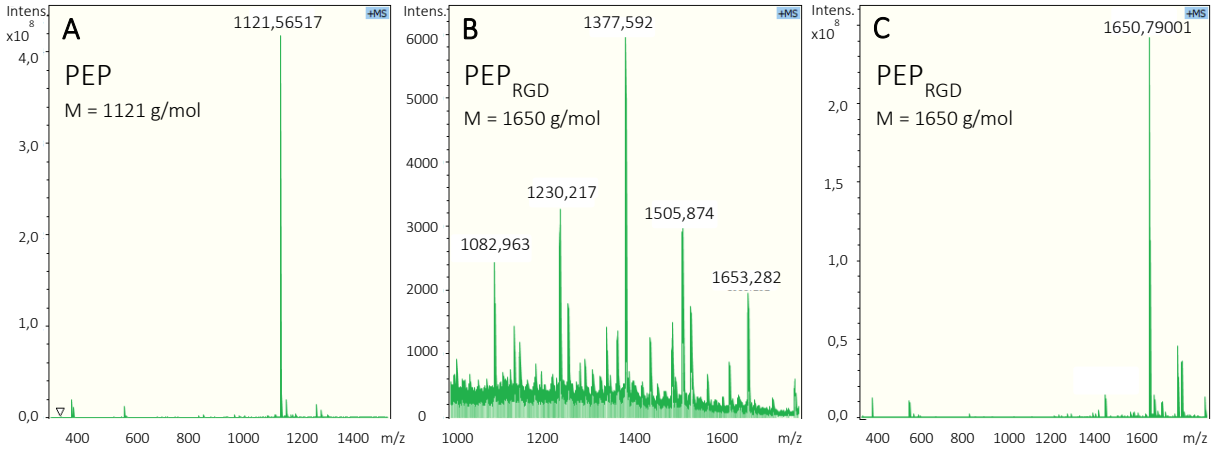


Abbildung 18: MALDI-TOF MS-Ergebnisse der hergestellten Peptide (A) PEP und (B) PEP_{RGD} ohne Mikrowellen. (C) Ergebnis für das Peptid PEP_{RGD} ohne Mikrowellensynthese mit doppelten Kopplungsschritten ab der achten Aminosäure.

Um den schlechter werdenden Kopplungsausbeuten entgegenzuwirken, wurden die Reaktionszeiten von 5 auf 10 min verdoppelt, um der Syntheselösung mehr Zeit für das Aufheizen auf 75 °C zu geben. Zudem wurden die Kopplungsschritte ab der achten Aminosäure doppelt durchgeführt. Das nach dieser optimierten Synthesevorschrift hergestellte PEP_{RGD} weist im Massenspektrum nun lediglich die erwünschte Masse der Sequenz KFKFEFEFGGRGDS auf (Abbildung 18C). In Tabelle 3 sind die beiden Peptidsynthesemethoden nochmals vergleichend dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die mikrowellenassistierte Synthese bezogen auf die Materialkosten eine Ersparnis ermöglicht, da sie keine doppelten Kopplungsschritte benötigt, die Festphasenpeptidsynthese ohne Mikrowellen hingegen eine deutliche Zeitersparnis einbringt, da sie die Synthese mehrerer Peptide zur gleichen Zeit zulässt.

Tabelle 3: Vergleich der verwendeten Peptidsynthesen mit und ohne den Einsatz von Mikrowellen.

	Peptidsynthesizer (mikrowellenassistiert)	Heizschrank (ohne Mikrowelle)
Kopplungstemperatur	75 °C	75 °C
Kopplungszeit	5 min	Erste 8 Aminosäuren: 5 min Ab der 8. Aminosäure: 2x 10 min
Nebenprodukte	keine	keine
Anzahl herstellbarer Peptide	1	unbegrenzt

In diesem Kapitel ist es gelungen, reine Peptide mit Hilfe eines Peptidsynthesizers unter Verwendung der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie herzustellen. Die erhaltenen Peptide waren

rein genug, um weitere Aufarbeitungsschritte überflüssig zu machen. Zudem konnte die Synthese der Peptide ohne die Nutzung von Mikrowellen soweit optimiert werden, dass ebenfalls reine Peptide synthetisiert werden konnten.

3. Ausbildung fibrillärer Netzwerke

Zhang *et al.* demonstrierten an einer Vielzahl von amphipatischen Peptiden, dass diese in der Lage sind ß-Faltblattstrukturen auszubilden.[30] Dieser amphipatische Aufbau findet sich auch im Grundkörper der hergestellten Peptidsequenzen KFKFEFEF wieder. Hierdurch entstehen jeweils eine hydrophile sowie eine hydrophobe Seite des Peptids (Abbildung 19). In wässrigen Medien sollte es aufgrund dieses strukturellen Aufbaus zu einer schnellen Ausbildung von Peptidnanofibrillen kommen, welche die charakteristische Ausbildung einer ß-Faltblattdoppelhelix aufweisen (Kapitel I.1.1). Um eine spätere Selektivität gegenüber Krebszellen zu erhalten, wurde dieser Grundkörper am *C*-Terminus um die GGRGDS-Sequenz ergänzt. Hierbei dienen zwei kleine Glycine als Linker, um die Flexibilität der RGD-Sequenz zu erhöhen, während das RGD ein Kopplungsmotiv für Integrinrezeptoren darstellt,[269] welche auf den meisten Krebszellen überexpressioniert vorliegen.[282] Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Anbindung einer zusätzlichen Aminosäure an die Asparaginsäure der RGD-Sequenz deren Aktivität weiter steigert.[270] Das Serin hat sich hierbei besonders hervorgetan und wurde daher in dieser Arbeit an den *C*-Terminus der RGD-Sequenz angebunden.

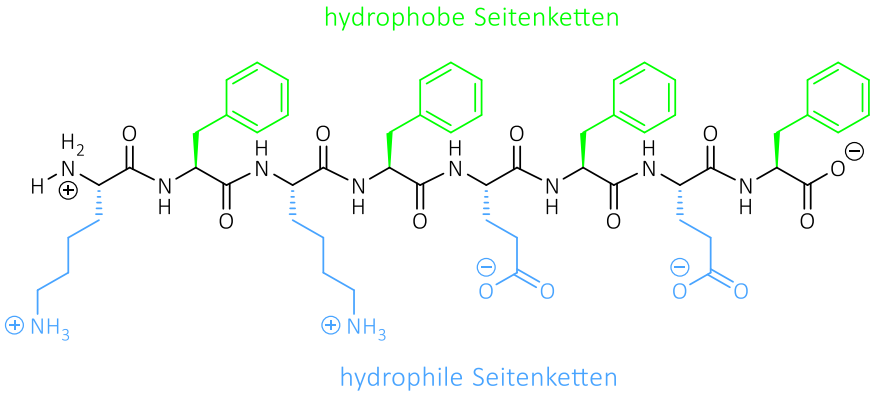


Abbildung 19: Strukturformel der Aminosäuresequenz KFKFEFEF.

Nachfolgend sollen die Bildungskinetiken der verwendeten PNF untersucht werden. Zudem sollen die fertig ausgebildeten Fibrillen nach ihren Sekundärstrukturen, ihrer Morphologie und der Größe sowie des Zetapotentials ihrer Aggregate charakterisiert werden. In einem letzten Kapitel sollen

Mischfibrillen mit unterschiedlichem Anteil des RGD-funktionalisierten Peptids PEP_{RGD} auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

3.1. Bildungskinetik

Zhang *et al.* konnten bereits für das ähnlich aufgebaute Peptid FKFEFKFE zeigen, dass sich direkt nach Zugabe in wässriges Medium ß-Faltblattstrukturen ausbilden.[31] Diese schnelle Ausbildung fibrillärer Strukturen beruht auf dem alternierenden Aufbau hydrophiler und hydrophober Aminosäuren, wobei der hydrophobe Effekt eine wichtige Rolle spielt. Durch das Ausbilden einer fibrillären ß-Faltblattdoppelhelix (Kapitel I.1.1) wird die Entropie des Wassers erhöht, da dieses in dieser Konformation nicht in Kontakt mit den hydrophoben Seitenketten der Peptide steht.[283] Doch auch die hydrophilen geladenen Aminosäuren tragen ihren Teil zur Ausbildung der Fibrillen bei, da diese über ionische Wechselwirkungen zur Stabilisierung der ß-Faltblattdoppelhelix beitragen.[53] Da diese Effekte auch für die hier gewählte Primärsequenz KFKFEFEF auftreten sollten, wäre eine ebenfalls sehr schnelle Fibrillenbildung zu erwarten. Da meist nur sehr kleine Peptidmengen benötigt werden, wurden Peptidstocklösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Konzentration von 10 mg/mL angesetzt, um Wägefehler möglichst gering zu halten. In DMSO sind die verwendeten Peptide gut löslich und bilden keine fibrillären Aggregate aus, wodurch eine Zugabe kleiner Mengen mit hoher Genauigkeit erzielt werden kann. Durch Zugabe geringer Mengen der DMSO-Stocklösungen in wässrige Puffersysteme sollte es anschließend zu einer relativ schnellen Ausbildung fibrillärer Strukturen kommen. Um dies zu untersuchen, kann die Einlagerung des Farbstoffes ProteoStat® analysiert werden, dessen Grundstruktur auf dem bisher gut untersuchten Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) basiert. Die ß-Faltblattstrukturen bieten hierbei ein geeignetes Umfeld zur Stabilisierung des elektronischen Grundzustands der Farbstoffe, weshalb es durch Einschränkung der Rotationsfreiheit des Farbstoffmoleküls zu einer charakteristischen hyperchromischen Fluoreszenzanregungsverschiebung kommt.[284] Im Falle von ThT verschiebt sich die Anregungswellenlänge hierbei von 336 nm auf 450 nm. Inkubiert man nun die Fibrillen in einer mit ProteoStat® versetzten Pufferlösung und misst die Entwicklung der ProteoStat®-Fluoreszenz bei der Anregungswellenlänge nach Einlagerung in die ß-Faltblattstrukturen (550 nm) über die Zeit, kann bereits direkt nach Zugabe der Peptidstocklösungen für alle der drei untersuchten Peptide PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} ein deutliches Fluoreszenzsignal bei 603 nm detektiert werden, welches über die Zeit zunimmt und sich schließlich einem Plateau nähert (Abbildung 20A). Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen von Zhang *et al.*, dessen Arbeitsgruppe mittels Circulardichroismus zu Beginn

einen Anstieg an ß-Faltblattstrukturen beobachten konnte. Bei der ProteoStat®-Einlagerung kommt es nach 30 min zu starken Schwankungen im Fluoreszenzsignal von PEP, welche sich auf die Entstehung größerer Aggregate und der daraus folgenden starken Inhomogenität der Suspension zurückführen lassen (Abbildung 20B).

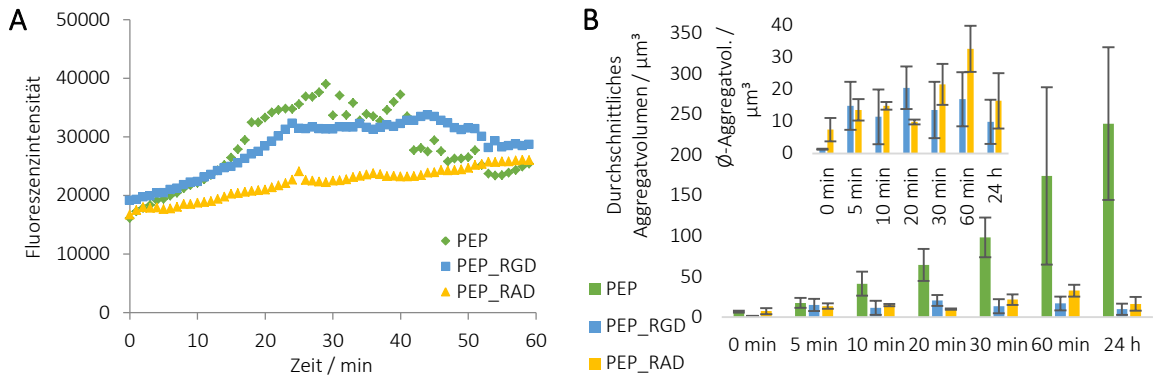


Abbildung 20: Untersuchung der Fibrillenbildungskinetik von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} (A) mittels Fluoreszenzspektroskopie der ProteoStat®-Einlagerung (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm) und (B) anhand des Aggregatvolumens mittels DLS in 1 mM KCl. Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können.

Die Zunahme der ß-Faltblattstrukturen steht im direkten Zusammenhang mit der Ausbildung fibrillärer Strukturen und kann einerseits bedeuten, dass sich stetig neue kleinere Aggregate ausbilden oder jedoch, dass die bereits nach Zugabe der Peptidstocklösung ausgebildeten Fibrillenkeime über die Zeit neue Peptidmonomere anlagern und wachsen. Mittels DLS können Rückschlüsse über das Wachstum der einzelnen Aggregate gezogen werden (Abbildung 20B). Bei der DLS wird die Bewegungsgeschwindigkeit der untersuchten Teilchen in einer Dispersion über die Rückstreuung des Lichts eines Lasers gemessen, welche wiederrum mit deren Größe korreliert. Dabei bewegen sich größere Teilchen langsamer durch das Dispersionsmedium als dies für kleinere Teilchen der Fall ist. Aus der Bewegungsgeschwindigkeit wird anschließend über die Annahme sphärischer Teilchen deren Hydrodynamischer Radius berechnet. Da es sich bei den PNF nicht um perfekt sphärische Aggregate handelt, wurde der Hydrodynamische Radius unter Verwendung der Formel $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ in das Hydrodynamische Volumen zurückgerechnet, um genauere Angaben machen zu können. Aufgrund der Messmethode der DLS führen nicht-sphärische Proben wie die PNF zu hohen Fehlerbalken, weshalb diese Werte nicht als absolut genommen werden sollten, sondern lediglich einen Hinweis auf den Trend der Größe geben. Aufgrund der hohen Inhomogenität der Aggregatgrößen in den TEM-Aufnahmen und den konfokalmikroskopischen Bildern wurde für die Bestimmung der

durchschnittlichen Aggregatgröße trotz hoher Fehlerbalken die DLS als Methode herangezogen. Für die Messungen der Aggregatgröße mittels DLS wurden die Peptidstocklösungen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) gegeben und bei RT inkubiert. Um Fehler durch Zusammenlagern der Aggregate zu unterbinden, wurden die Proben direkt vor der Messung mit 1 mM KCl-Lösung verdünnt. Zu Beginn ist für die drei untersuchten Peptide ein ähnliches Wachstumsverhalten zu beobachten. Während sich jedoch für PEP_{RGD} und PEP_{RAD} bereits nach 5 min ein konstantes Aggregatvolumen eingestellt hat, ist für die Fibrillen PEP ein stetiger Anstieg der Größe beobachtbar, welcher auch nach 60 min noch kein Plateau erreicht hat. Da es für die funktionalisierten Fibrillen bereits nach 5 min zu keinem weiteren Wachstum der Aggregate kommt, die Ausbildung neuer ß-Faltblattstrukturen jedoch erst nach etwa 25 min endet, werden hier vermutlich neben einem sehr schnell beendeten Wachstum auch viele neue Aggregate ausgebildet. Für die unfunktionalisierten Fibrillen ist nach etwa 30 min ebenfalls ein stagnieren der ProteoStat®-Fluoreszenz zu beobachten, obwohl es bei der DLS zu einem immer weiter ansteigenden Wachstum der Aggregate kommt. Dies lässt vermuten, dass es hierbei eventuell zur Zusammenlagerung einzelner kleinerer Aggregate zu größeren Netzwerken kommt, da es trotz keiner weiteren Ausbildung neuer ß-Faltblattstrukturen zum Wachstum der Aggregate kommt. Grund für dieses unterschiedliche Verhalten könnte das Zetapotential der ausgebildeten Aggregate sein (Abbildung 21). Die Proben wurden analog zu den DLS-Proben präpariert, wodurch in der Messküvette ein pH von 5,5 vorliegt.

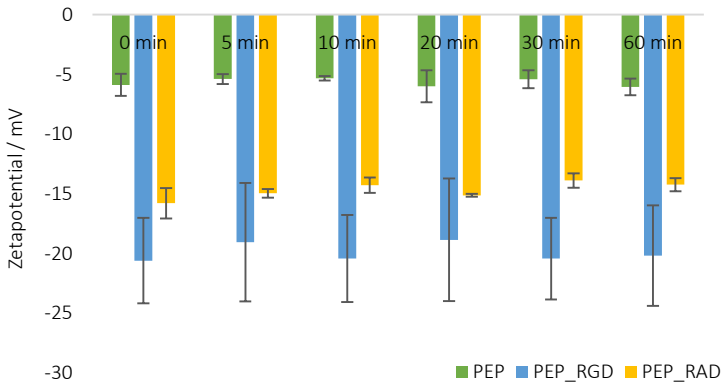


Abbildung 21: Entwicklung des Zetapotentials während der Ausbildung der fibrillären Aggregate in Natriumphosphatpuffer über die Zeit. Für die Messungen wurden die PNF-Ansätze mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt.

Während die unfunktionalisierten Fibrillen aufgrund der gegenseitigen Aufhebung der vorhandenen Ladungen im Gesamten ein neutrales Zetapotential aufweisen, liegt für die funktionalisierten Fibrillen bei neutralem pH ein deutlich negatives Zetapotential vor. Das Zetapotential ändert sich hierbei über

die Zeit nicht, was den schnellen Abbruch des Wachstums für die funktionalisierten Fibrillen erklärt, da bereits kleinere Aggregate ein deutlich negatives Zetapotential aufweisen.

Während es also zu Beginn der Fibrillenbildung zu einer schnellen Ausbildung von Fibrillenkeimen kommt, welche in allen drei Fällen zunächst gleichermaßen wachsen, kommt es bei den funktionalisierten Fibrillen bereits nach 5 min zu einem Abbruch des Wachstums, während die unfunktionalisierten Fibrillen stetig weiterwachsen. Dies legt die Vermutung nahe, dass direkt nach Zugabe der Peptidstocklösungen zunächst der hydrophobe Effekt sowie die ionischen Wechselwirkungen zwischen den geladenen Aminosäuren den größten Einfluss haben, da sie die Triebkraft der Fibrillenbildung sind. Erreichen die Aggregate eine bestimmte Größe, kommen die repulsiven Wechselwirkungen zum Tragen, welche dafür sorgen, dass monomere Peptide bevorzugt neue Aggregate ausbilden anstatt an bereits bestehende negativ geladene Aggregate anzulagern. Im Falle der neutral geladenen PEP-Fibrillen ist dies nicht der Fall, da hierbei aufgrund des neutralen Zetapotentials der Aggregate keinerlei abstoßende Wechselwirkungen auftreten. Dies ermöglicht es den Aggregaten zu größeren Netzwerken heranzuwachsen und sich zusammenzulagern.

Aufgrund der Beobachtung der Arbeitsgruppe von Zhang, dass sich nach Zugabe des Peptids FKFEFKFE zu Beginn helikale Strukturen ausbilden, welche unter Umständen als Vorstufe für die ß-Fibrillen zu sehen sein könnten,[31] wurden die Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mittels TEM auf ihre Morphologie sowie infrarotspektroskopisch auf ihre Sekundärstruktur untersucht (Abbildung 22). Hierbei wurden die PNF in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) bei RT inkubiert und anschließend auf TEM-Trägernetzchen pipettiert, welche zur Verbesserung des Kontrasts der fibrillären Strukturen mit 2%-iger Uranylacetatlösung 2 min kontrastiert wurden. Die Proben für die infrarotspektroskopische Untersuchung wurden hingegen lyophilisiert und im Anschluss vermessen.

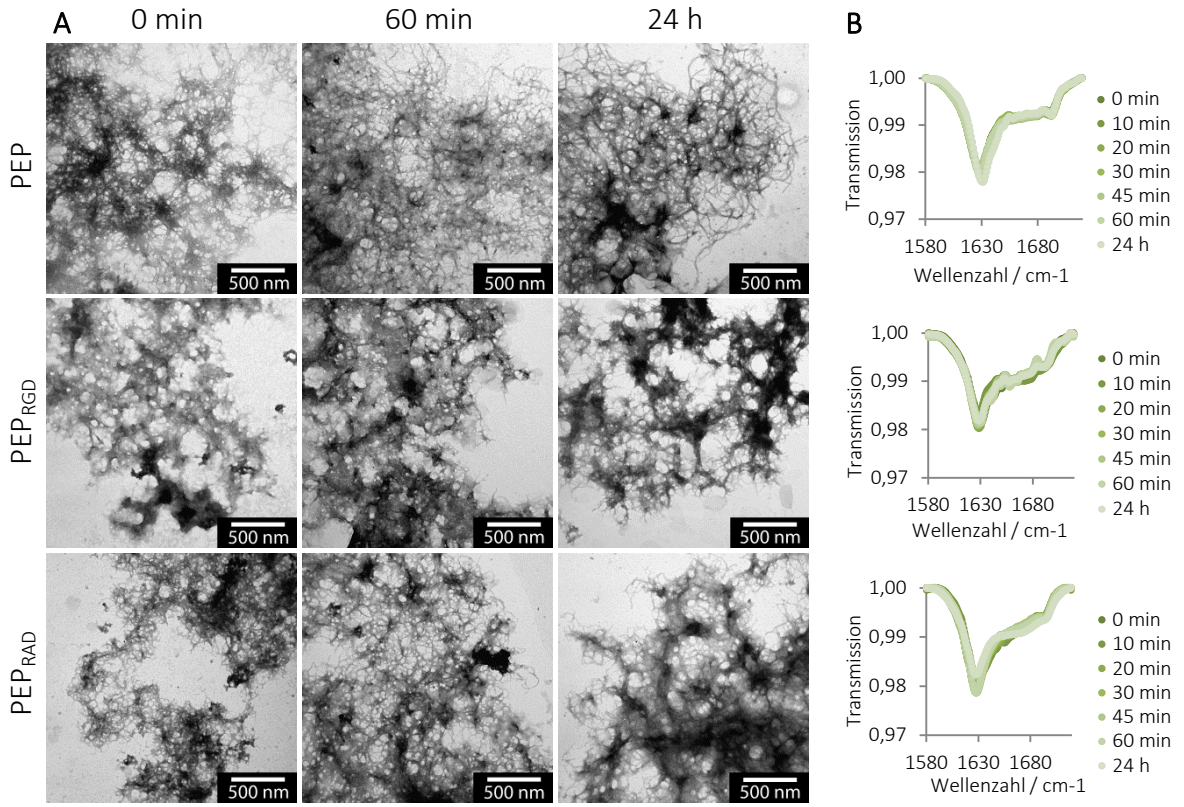


Abbildung 22: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach 0 min, 60 min und 24 h sowie (B) kinetische Untersuchungen der Sekundärstruktur der gefriergetrockneten Fibrillen mittels FTIR-Analyse der Amid I-Bande. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Bereits direkt nach der Zugabe der Peptidstocklösungen in Puffer können im TEM fibrilläre Strukturen gefunden werden, welche zu größeren Netzwerken zusammenlagern, die sich in ihrer Morphologie weder von den Fibrillen nach 60 min noch von den fertig ausgebildeten Fibrillenaggregaten nach 24 h unterscheiden. Trägt man nun die flächennormierten Amid I-Banden unterschiedlicher Inkubationszeiten in einem Graphen auf (Abbildung 22B), so ist eine gleichbleibende Sekundärstruktur für alle Fibrillen über die Zeit erkennbar. Bereits die zu Beginn ausgebildeten kleineren Aggregate weisen demnach dieselbe Sekundärstrukturzusammensetzung auf wie die fertig ausgebildeten Fibrillen nach 24 h. Die zu Beginn von der Arbeitsgruppe Zhang detektierten helikalen Strukturen konnten bei der Analyse mittels FTIR nicht beobachtet werden.[31] Dies kann mehrere Gründe haben. Einerseits kann es durch die Sublimation des Wassers während des Gefriertrocknens zu einer Änderung der Sekundärstruktur kommen, was sich allerdings aufgrund der geringen Schwankungen in den Messungen sowie des geringen Anteils ungeordneter Strukturen ausschließen lassen kann. Ein anderer Grund könnte ein eventuelles Antauen der Probe im Gefriertrockner sein. Hierbei würden sich die Fibrillen während des Vorgangs des Gefriertrocknens weiter ausbilden können und somit spätere Zeitpunkte repräsentieren. Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wurden kleine

Probenmengen angesetzt, welche für jeweils 30 min in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, um sicherzustellen, dass die Proben komplett durchgefroren waren. Ein weiterer Punkt ist die leicht abgeänderte Primärstruktur des verwendeten Grundkörpers im Vergleich zu dem von Zhang *et al.*[31] verwendeten Peptids sowie das Anhängen der GGR(G/A)DS-Sequenz. Bereits kleine Änderungen in der Primärsequenz von Peptiden können großen Einfluss auf die Ausbildung von höher geordneten Strukturen sowie deren Bildungskinetik haben (Kapitel I.1.1).

Zusammenfassend bilden die verwendeten Peptide mit dem amphipatischen Grundkörper KFKFEFEF direkt nach Zugabe in wässriges Medium ß-Faltblattstrukturen aus, welche lange fibrilläre Fasern ausbilden, die sich zu größeren Netzwerken zusammenlagern. Hierbei kommt es zu Beginn zur Ausbildung kleinerer Aggregate, welche im Anschluss durch weitere Monomeranlagerungen wachsen bis sie nach einer kurzen Wachstumsphase entweder ihre Größe beibehalten oder im Falle der PEP-PNF zu größeren Aggregaten zusammenlagern.

3.2. Charakterisierung der fertig ausgebildeten Fibrillen

Zhang *et al.*[31] konnten zeigen, dass das amphipatische Peptid FKFEFKFE aufgrund seines alternierenden Musters aus hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren bereits direkt nach Zugabe in wässriges Medium ß-Faltblattstrukturen ausbildet, welche sich zu einer Doppelhelix zusammenlagern (Kapitel I.1.1). Die aromatischen π,π-Wechselwirkungen der Phenylalanine stabilisieren hierbei die ß-Faltblatt-Doppelhelix und erhöhen somit die Fibrillenlänge.[285,286] Der Grundkörper der hier verwendeten PNF weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu dem von Zhang *et al.* untersuchten amphipatischen Peptid auf. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Peptide wurden diese zunächst in DMSO gelöst, um eine Peptidstocklösung (10 mg/mL) zu erhalten. Durch Zugabe geringer Mengen dieser Stocklösungen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) bilden sich fibrilläre Strukturen aus, wodurch in TEM Aufnahmen analog zu den Beobachtungen von Zhang *et al.* lange dünne fibrilläre Fasern erkennbar sind (Abbildung 23), welche eine Breite von etwa 3-4 nm im Falle von PEP und 6-8 nm im Falle von PEP_{RGD} und PEP_{RAD} aufweisen. Die Breite der einzelnen Fasern korreliert hierbei gut mit der Länge der eingesetzten Peptide (PEP: ~3,6 nm; PEP_{RGD}/PEP_{RAD}: ~6,3 nm). Um den geringen Kontrast der fibrillären Strukturen in den TEM-Aufnahmen zu erhöhen, wurden die TEM-Trägernetzchen nach Aufbringen der PNF mit 2%-iger Uranylacetatlösung für 2 min inkubiert.

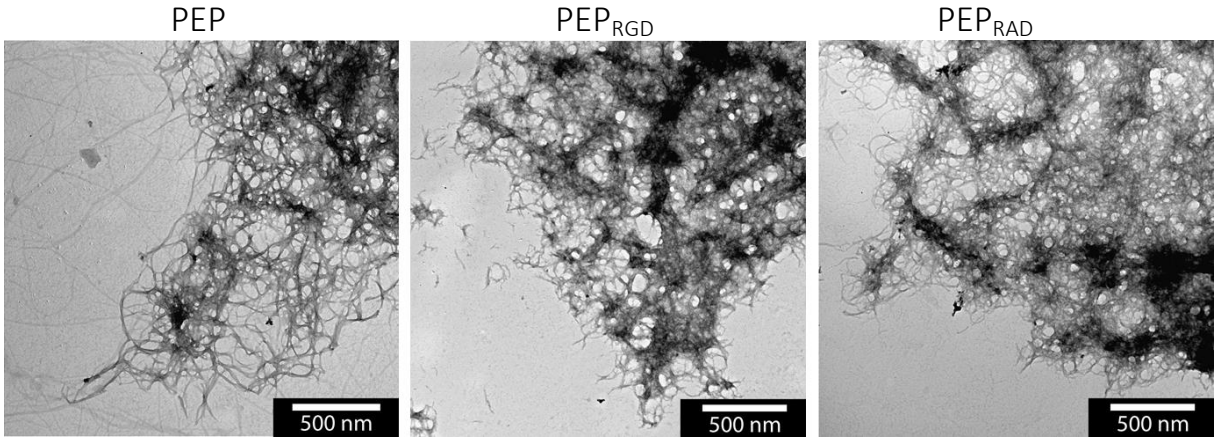


Abbildung 23: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Peptidnanofibrillen PEP, PEP$_{RGD}$ und PEP$_{RAD}$, welche sich nach 24 h Inkubation in Natriumphosphatpuffer ausgebildet haben. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Die einzelnen Fibrillen lagern zudem zu größeren dichten Netzwerken zusammen. Neben den stabilisierenden π,π-Wechselwirkungen kommt es zu einer Stabilisierung durch ionische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure, welche bei neutralem pH beide gegensätzlich geladen vorliegen.[30] Bei genauerem Blick auf die ausgebildeten Fibrillenaggregate sind sehr dichte Netzwerke im Inneren der Strukturen erkennbar, während nach außen lange einzelne Fibrillen den Rand säumen.

Um genauere Aufschlüsse über die Strukturen der gebildeten Fibrillen zu erhalten, wurde eine Sekundärstrukturanalyse mittels Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Messungen der Amid I-Bande durchgeführt (Abbildung 24A und B). Die Amid I-Bande der Spektren ergibt sich aus der C=O-Valenzschwingung. Für die ß-Faltblattstrukturen ergeben sich starke Wasserstoffbrücken zwischen den C=O- und den N-H-Gruppen der Peptidrückgräder, wodurch diese Bindungen gestreckt werden. Diese Dehnung beeinflusst die Federkonstante der Schwingung und ermöglicht somit eine energetisch niedrigere Anregung dieser Schwingung. Bei einer α-Helix sind die Wasserstoffbrücken weniger stark ausgeprägt, wodurch diese Schwingung bei höheren Wellenzahlen absorbiert als die des ß-Faltblatts. In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Sekundärstrukturelemente unterschieden.

Tabelle 4: Bandenpositionen der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente in der Amid I-Bande.[287]

Sekundärstrukturelement	Frequenz in der Amid I-Bande / cm^{-1}
ß-Faltblatt	1623-1641, 1674-1695
Ungeordnete Strukturen	1642-1657
Helices	1648-1657
Schleifen	1662-1686

Für die Sekundärstrukturanalyse wurde zunächst die Amid I-Bande der einzelnen lyophilisierten PNF basislinienkorrigiert und deren Gesamtfläche bestimmt (Abbildung 24A). Anschließend wurden die Banden der einzelnen Sekundärstrukturanteile unter Verwendung des Levenberg-Marquardt-Berechnungsalgorithmus in Form einer Lorentz-Kurve an die Amid I-Bande gefittet und deren Flächenanteile an der Gesamtfläche bestimmt. Der jeweilige Anteil einer integrierten Bande an der Gesamtfläche der Amid I-Bande kann mit dem Anteil der Aminosäuren einer Konformation gleichgesetzt werden, da pro Aminosäure genau eine C=O-Streckschwingung des Rückgrads existiert. Der molare Extinktionskoeffinzient wurde für alle Sekundärstrukturanteile als annähernd gleich angenommen, da bisher noch keine allgemeingültige Quantifizierung der Extinktionskoeffizienten einzelner Sekundärstrukturelemente gelang.

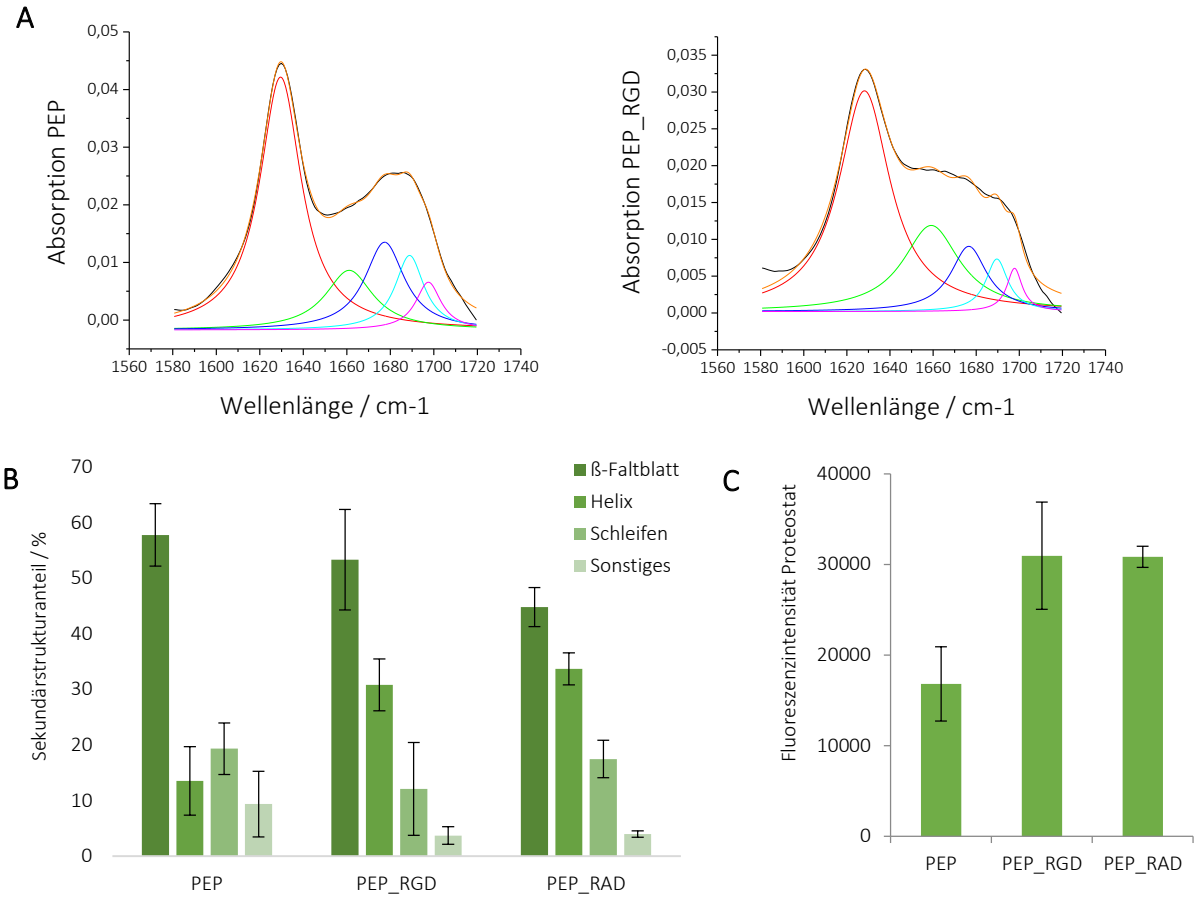


Abbildung 24: (A) Lorentz-Fit nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus der Amid I-Bande für die Sekundärstrukturelemente am Beispiel der gefriergetrockneten Fibrillen von PEP und PEP_{RGD}. (B) Mittels FTIR-Analyse der Amid I-Bande ermittelte prozentuale Anteile der Sekundärstrukturelemente in den untersuchten Peptidnanofibrillen. (C) Messung der Fluoreszenz des in die ß-Faltblattstrukturen der nach 24 h fertig inkubierten Fibrillen eingelagerten ProteoStats® (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

Für die drei unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen ist zunächst als Hauptstruktur das ß-Faltblatt erkennbar, welche das Grundgerüst der Fibrillen bildet (Abbildung 24B). Da die Peptide in den ß-Faltblättern in ihrer gestreckten Form vorliegen, weisen die erhaltenen fibrillären Fasern eine Breite auf, welche etwa der Länge der jeweils eingesetzten Peptidkette entspricht (Abbildung 23). Die Ausbildung dieser ß-Faltblätter wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Amidrückgratgruppen der benachbarten Peptide sowie durch hydrophobe, aromatische und Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Peptide stabilisiert (Kapitel I.1.2).[32,33] Aufgrund des Aufbaus des verwendeten Grundkörpers bilden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bevorzugt antiparallele ß-Faltblätter aus, da es hierbei zu stabilisierenden ionischen Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlich geladenen Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure kommt. Der amphipatischen Aufbau der Peptide führt zudem zur Ausbildung von ß-Faltblattsträngen, welche ebenfalls helikale Anteile aufweisen. Diese helikalen Sekundärstrukturanteile sind auch in den Infrarotspektren der drei Fibrillen

erkennbar. Theoretische Modellierungen zeigen, dass diese helikalen Strukturanteile durch die Ausbildung einer Doppelhelix entstehen, wobei die hydrophobe Seite der ß-Faltblätter im Inneren der doppelschichtigen Helix liegen, während die hydrophilen Seitengruppen nach außen zeigen, wodurch die Fibrillen im Wässrigen nicht ausfallen (Kapitel I.1.1).[110] Für die beiden funktionalisierten Fibrillen PEP_{RGD} und PEP_{RAD} ergeben sich hierbei höhere relative Anteile an helikalen Strukturen als es für das unfunktionalisierte PEP der Fall ist. Grund für diese erhöhten helikalen Anteile kann die angehängte GGR(G/A)DS-Sequenz sein. Aufgrund der Asparaginsäure und des Serins weisen diese Sequenzen in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) ein negatives Zetapotential auf (Abbildung 25B), was zu einer repulsiven Wechselwirkung zwischen diesen Aminosäuregruppen führt. Diese Abstoßung könnte zu einer stärkeren Verdrehung der gebildeten Doppelhelix führen, um einen größeren Abstand zwischen den Sequenzen zu schaffen. Andere Strukturelemente wie Schleifen, Kehren und ungeordnete Strukturen werden lediglich zu geringen Anteilen ausgebildet und unterscheiden sich in den drei Fibrillentypen kaum in ihren Anteilen.

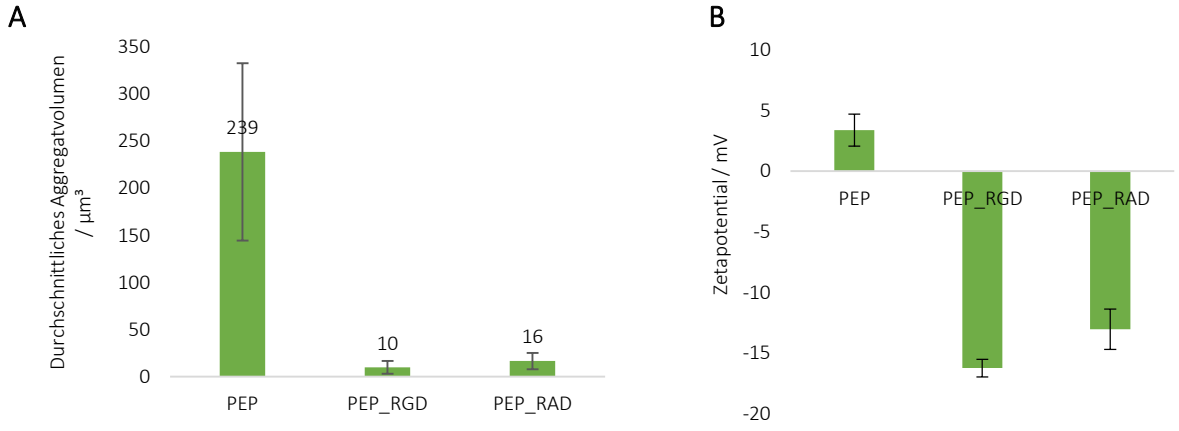


Abbildung 25: (A) Ermittelte Volumen der Fibrillenaggregate mittels DLS und (B) deren Zetapotentiale in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5). Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können.

Da die aus der FTIR-Analyse berechneten Sekundärstrukturanteile den prozentualen Anteil der Strukturen an der Gesamtheit der Sekundärstruktur darstellen, geben sie keinerlei Aufschluss darüber, ob sich die Anteile in den unterschiedlichen Fibrillen im absoluten Wert unterscheiden. Um einen Einblick in die absoluten Werte der ß-Faltblattstrukturen zu erhalten, wurde das Molekül ProteoStat® in die ß-Faltblattstrukturen eingelagert. Hierzu wurden die Peptidstocklösungen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) gegeben und 24 h inkubiert, bevor sie für weitere 10 min bei RT mit einer ProteoStat®-Stocklösung versetzt und fluoreszenzspektroskopisch vermessen wurden. In Abbildung 24C ist ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität für die ProteoStat®-

Einlagerung für die unterschiedlichen Fibrillen erkennbar. Hierbei weisen die Fibrillen PEP_{RGD} und PEP_{RAD} eine nahezu doppelt so hohe Fluoreszenz auf als die Fibrillen PEP. Ein Grund für diesen Unterschied könnten die starken Schwankungen im Fluoreszenzsignal des eingelagerten ProteoStat® für PEP sein (Abbildung 20A), welche auf die großen Volumen der PEP-Aggregate zurückzuführen sind (Abbildung 25A), welche sich aus den Hydrodynamischen Radien aus der DLS berechnen lassen (Kapitel 3.1). Überschreiten die Aggregate hierbei eine entsprechende Größe, kommt es zu einer stark inhomogenen Verteilung in der Suspension, weshalb hohe Abweichungen in den Messungen detektiert werden. Diese Unterschiede in der Größe der Aggregate können sich durch Ladungseffekte der Funktionalitäten von PEP_{RGD} und PEP_{RAD} erklären lassen. Die Grundkörpersequenz KFKFEFEF bietet ideale Grundvoraussetzungen für die Ausbildung langer Fasern, welche untereinander wechselwirken können (Kapitel I.1.1). Bei neutralem pH liegen die Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure geladen vor,[30] wodurch sich ein Zetapotential von nahezu 0 mV ergibt (Abbildung 25B). Im Falle von PEP_{RGD} und PEP_{RAD} kommt jedoch der sterisch anspruchsvolle Baustein GGRGDS bzw. GGRADS an den Seiten der ß-Faltblätter hinzu. Durch Anbinden dieser Aminosäuren an den Grundkörper senkt sich das Zetapotential der entstandenen Fibrillen deutlich ab. Da die ß-Stränge nun ein negatives Zetapotential aufweisen, nehmen die repulsiven Coulomb-Wechselwirkungen stark zu, wodurch die Zusammenlagerung von einzelnen Strängen zu größeren Aggregaten gehemmt abläuft.

Die Ausbildung höher geordneter Strukturen hat zur Folge, dass im Aggregat nicht mehr alle RGD-Sequenzen für die Integrinrezeptoren der Zellen zur Verfügung stehen. Um die Verfügbarkeit der RGD-Sequenzen untersuchen zu können, wurden die PNF mit einem Peptid umgesetzt, welches an die RGD-Sequenzen bindet. Ruoslahti und Pasqualini[288] patentierten 1999 ihre Entdeckung, dass cyclische Peptide mit der Sequenz (W/P)DD(G/L)(W/L)(W/L/M) an Fibronektin und verwandten Proteinen, welche eine RGD-Sequenz enthalten, binden. Als besonders vielversprechend tritt das Molekül *cyclo*-CWDDGWLC hervor, welches über eine Disulfidbrücke cyclisiert vorliegt. Um eine mögliche Anbindung an die Fibrillen messbar zu machen, wurde die Sequenz ATTO488-GG-*cyclo*-CWDDGWLCG (RGD-cap) synthetisiert und für 1 h mit den Fibrillenaggregaten inkubiert. Nach dem Waschen der Fibrillen konnten diese fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden (Abbildung 26). Über die Fluoreszenz der Aggregate konnte die Anzahl der für das RGD-cap erreichbaren RGD-Sequenzen errechnet werden.

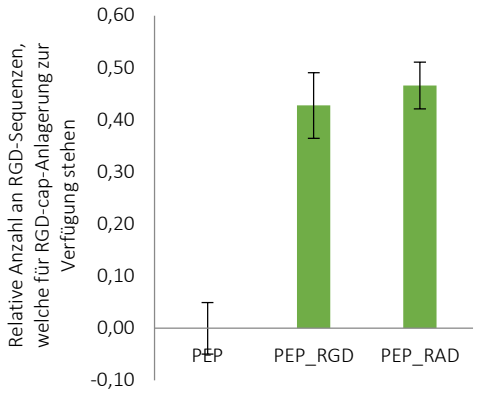


Abbildung 26: Verfügbarkeit an RGD-Sequenzen an den Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche durch fluoreszenzspektroskopische Auswertung der Anlagerung des Peptids RGD-cap an die fertig ausgebildeten PNF bestimmt wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm).

Für PEP_{RGD} stehen lediglich etwa 0,5% der RGD-Sequenzen an den Fibrillenaggregaten zur Verfügung. Obwohl diese gut zugänglich auf der Außenseite der ß-Stränge vorliegen, erschwert die Zusammenlagerung der einzelnen ß-Stränge zu größeren Netzwerken die Zugänglichkeit der RGD-Sequenzen. Das RGD-cap scheint trotz der zusätzlichen Methylgruppe ebenfalls an die RAD-Sequenz zu binden, weshalb sich für PEP_{RAD} ein ähnlicher Wert wie für PEP_{RGD} ergibt. Hieraus ergibt sich also keine eindeutige Selektivität für die RGD-Sequenz bei den verwendeten PNF, weshalb die Selektivität des RGD-cap-Peptids hier nicht als schwarz-weiß betrachtet werden darf.

Die fertig ausgebildeten PNF weisen alle ß-Faltblattreiche fibrilläre Strukturen auf, welche zu größeren Netzwerken zusammenlagern. Hierbei nimmt die Anbringung der RGD-Sequenz an den *C*-Terminus des Peptidgrundgerüsts starken Einfluss auf die Größe, Zetapotential, Morphologie sowie Sekundärstruktur der ausgebildeten PNF.

3.3. Variieren des RGD-Anteils

Da es aufgrund des negativen Zetapotentials der RGD-funktionalisierten Fibrillen PEP_{RGD} (Abbildung 25B) eventuell zu einer Abstoßung der ebenfalls negativ geladenen MSN_{COOH} (Tabelle 1) kommen kann, wurden Mischfibrillen aus unterschiedlichen molaren Verhältnissen von PEP und PEP_{RGD} hergestellt. Ziel ist es ein Optimum zwischen Partikelanlagerung an die Fibrillen und der Anlagerung der Aggregate an die Zellen mittels RGD-Rezeptor-Interaktion zu finden. Für die Herstellung solcher Mischfibrillen wurden die DMSO-Peptidstocklösungen der Peptide PEP und PEP_{RGD} in unterschiedlichen Verhältnissen vermengt, um auf einen RGD-Peptidanteil von 1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol% zu gelangen. Diese Stocklösungen können analog zu den reinen Peptidstocklösungen in wässrige

Puffersysteme gegeben und 24 h inkubiert werden, um PNF zu erhalten. In mit Uranylacetat kontrastierten TEM Aufnahmen kann für alle verwendeten Mischverhältnisse eine Ausbildung fibrillärer Strukturen verifiziert werden (Abbildung 27A).

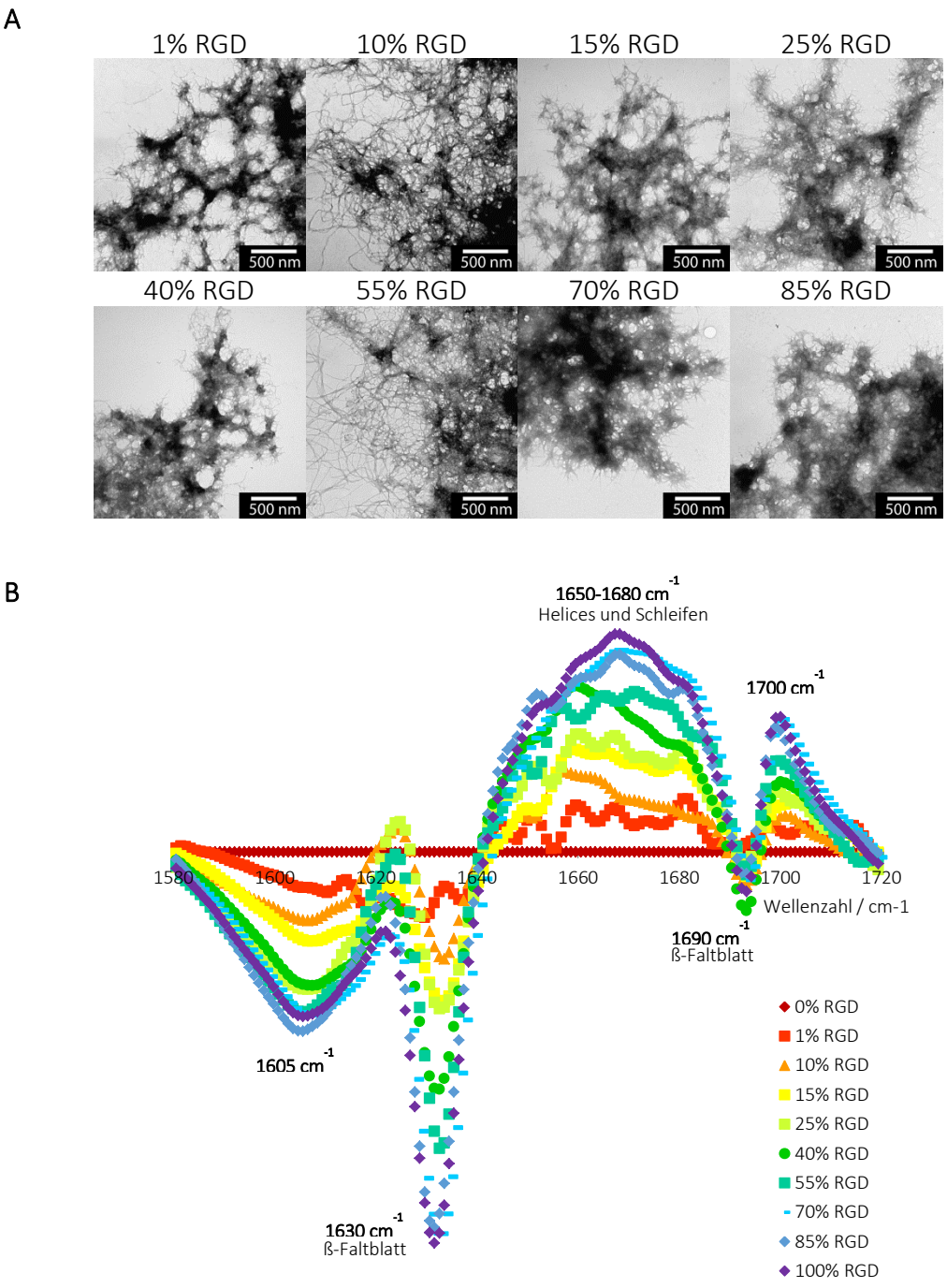


Abbildung 27: (A) TEM Aufnahmen der PNF mit variierendem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid. Für einen stärkeren Kontrast der PNF wurden diese nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. (B) Einfluss der Variation des RGD-Anteils auf die Amid I-Bande im FTIR-Spektrum anhand der Auftragung der Differenzspektren.

Alle weisen hierbei eine Zusammenlagerung der Fibrillen zu größeren Netzwerken auf, welche dicht vernetzte innere Kernstrukturen und nach außen einzelne lange Fasern besitzen. Dieses Verhalten ist für die Mischfibrillen nicht verwunderlich, da für die beiden reinen Fibrillen PEP und PEP_{RGD} dieselben Aggregatcharakteristika beobachtet werden können (Abbildung 23). Obwohl die ausgebildeten Fibrillen optisch sehr ähnliche Morphologien aufweisen, unterscheiden sich die Fibrillen PEP und PEP_{RGD} in ihren Sekundärstrukturanteilen. Um die genaue Struktur der Mischfibrillen zu untersuchen, wurden diese in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) 24 h inkubiert, anschließend lyophilisiert und die Amid I-Banden in den FTIR-Spektren der Fibrillen nach ihren Sekundärstrukturanteilen analysiert (Kapitel 3.2). Um Änderungen in der Struktur der Amid I-Bande deutlich zu machen, wurden in Abbildung 27B die Differenzspektren der flächennormierten Amid I-Banden aufgetragen. Während es im Bereich der ß-Faltblattbanden mit zunehmendem RGD-Anteil zu einer Abnahme der Bandenintensität kommt, nehmen die prozentualen Anteile an helikalen Sekundärstrukturen sowie Schleifen zu. Zudem entsteht im Bereich 1700 cm^{-1} eine zusätzliche Bande, während die Bande im Bereich 1605 cm^{-1} abnimmt. Diese Änderungen in der Sekundärstruktur können sich durch die negative Ladung der GGRGDS-Sequenz erklären lassen, welche zu repulsiven Wechselwirkungen in der ausgebildeten ß-Faltblattdoppelhelix führt. Da die GGRGDS-Gruppen nicht Teil der ß-Faltblattbildenden Einheit sind und sich somit an der Außenseite der Helix befinden, können diese abstoßenden Wechselwirkungen zu einer stärkeren Verdrehung der Helix führen. Die Aminosäuren Glycin, Asparaginsäure und Serin, welche den Hauptbestandteil der zusätzlichen Sequenz GGRGDS ausmachen, bilden zudem bevorzugt schleifenartige Strukturen aus,[289] weshalb sich diese Sequenz am Rande der Doppelhelix vermutlich in einer Schleifenkonformation wiederfindet und somit für einen Anstieg der Bande im Bereich 1662-1686 cm^{-1} sorgt. Da sich über die Analyse der Amid I-Bande lediglich der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturanteile bestimmen lässt, nimmt der über diese Methode bestimmte ß-Faltblattanteil mit Zunahme der anderen Strukturen ab. Dies bedeutet jedoch nicht, dass sich auch der absolute Anteil der ß-Faltblattstrukturen ändert.

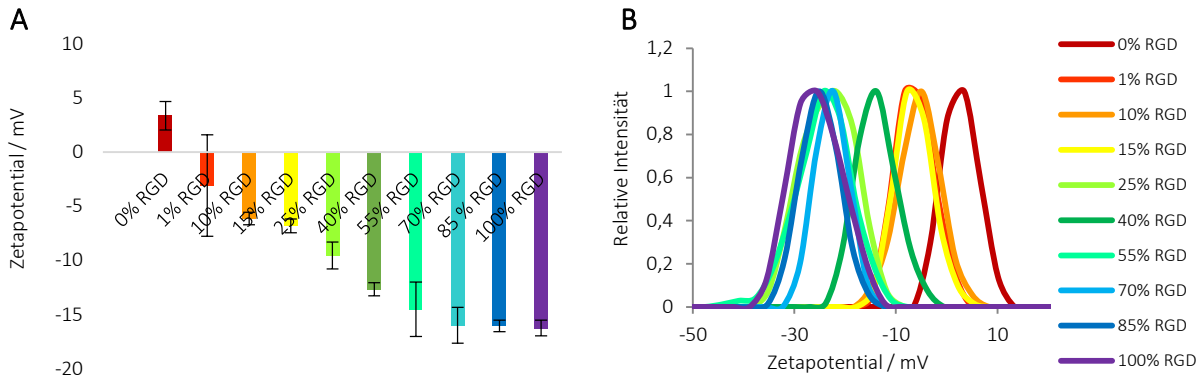
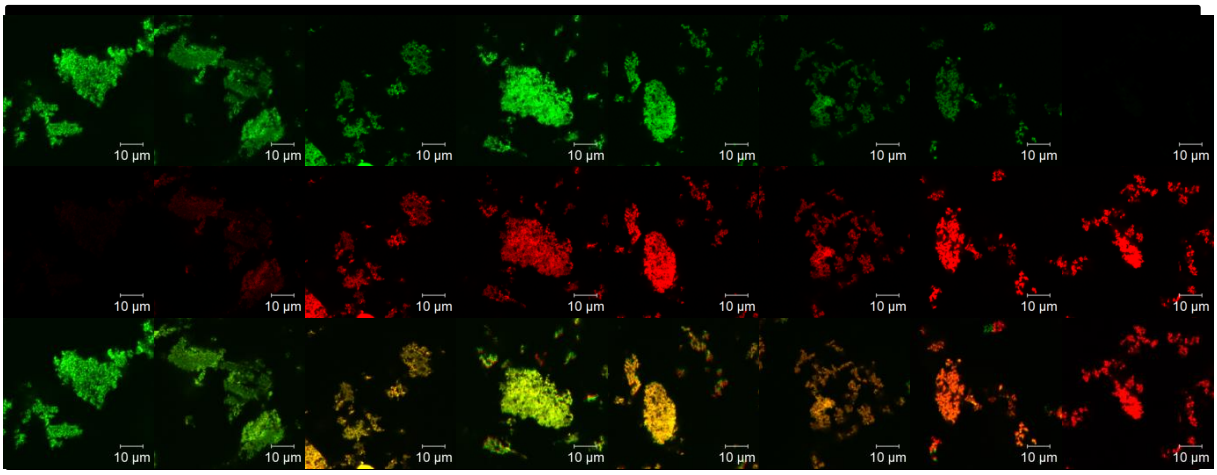


Abbildung 28: (A) Zetapotentiale der nach 24 h Inkubation in Natriumphosphatpuffer ausgebildeten PNF mit unterschiedlichem molarem Anteil an PEP_{RGD} und (B) deren Zetapotentialverteilungskurven in 1 mM KCl (pH 5,5).

Wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben, sorgt die Einführung der GGRGDS-Sequenz für die Absenkung des Zetapotentials der Fibrillenaggregate. Erhöht man nun den molaren Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid in den Aggregaten, senkt sich wie erwartet das Zetapotential der resultierenden Fibrillennetzwerke in Abhängigkeit der eingesetzten RGD-Menge ab (Abbildung 28A). Auffällig ist, dass es ab einem RGD-Anteil von 55 mol% zu keiner weiteren Absenkung des Zetapotentials kommt. Ursache für die Ausbildung dieses Plateaus könnte die unterschiedliche Dichte der ausgebildeten Aggregate sein. Wie in den TEM Aufnahmen (Abbildung 23, Abbildung 27A) erkennbar ist, bilden sich mit steigendem RGD-Anteil dichtere Netzwerkstrukturen aus, wodurch immer mehr Peptide im Inneren der Aggregate verbaut vorliegen und somit keinen Einfluss mehr auf das Zetapotential nehmen. So kann die Entwicklung des Zetapotentials mit steigendem RGD-Anteil durch das Zusammenspiel zwischen Zunahme der Anzahl an verbauten RGD-Sequenzen mit steigendem RGD-Anteil und gleichzeitiger Abnahme der am Zetapotential mitwirkenden Peptide durch die zunehmende Aggregatdichte erklärt werden. Da das Zetapotential stark von der äußeren Oberfläche der Aggregate abhängt, spielt diese eine entscheidende Rolle. Betrachtet man die Zetapotentialverteilungskurven genauer, so lässt sich eine Verbreiterung für die Fibrillen mit höherem RGD-Anteil feststellen (Abbildung 28B). Diese deutet darauf hin, dass eine breitere Verteilung an Aggregaten mit unterschiedlichen Zetapotentialen vorliegt. Bei der Fibrillenbildung kommt es zur Ausbildung von Aggregaten mit unterschiedlicher Größe, was sich über hohe Polydispersitätsindizes bei der DLS (Anhang Abbildung 88) sowie in TEM- und konfokalmikroskopischen Aufnahmen beobachten lässt (Anhang Abbildung 89). Unterschiedlich große Aggregate führen zu einer variierenden Anzahl an auf der Außenseite der PNF befindlichen RGD-Sequenzen, welche das Zetapotential maßgeblich beeinflussen, woraus für die Fibrillen mit hohem RGD-Anteil Aggregate mit unterschiedlichen Zetapotentialen und somit leicht verbreiterte Zetapotentialverteilungskurven resultieren. Da es sich bei den reinen PEP-Fibrillen um neutral geladene Aggregate handelt, spielt die

Größe bei den Fibrillen mit geringerem RGD-Anteil keine so große Rolle mehr. Der Einfluss von Aggregatgröße und -oberfläche nimmt mit steigender Anzahl an RGD-Sequenzen stetig zu.



1% RGD 10% RGD 15% RGD 25% RGD 40% RGD 55% RGD 70% RGD 85% RGD

Abbildung 29: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Mischfibrillen aus PEP (10 mol% ATTO488-markiertes Peptid, grün) und PEP_{RGD} (10 mol% ATTO647N-markiertes Peptid, rot). Dargestellt sind zum einen die Einzelkanäle sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle.

Ein weiterer Einfluss für die Verbreiterung der Zetapotentialverteilungskurven könnte eine inhomogene Verteilung der beiden Peptide in den Mischaggregaten sein. Um die Homogenität der ausgebildeten Mischfibrillen zu untersuchen, können die beiden Peptide PEP und PEP_{RGD} mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und die gebildeten Fibrillen anschließend konfokalmikroskopisch visualisiert werden (Abbildung 29). Für die Fluoreszenzmarkierung der Peptide wurden die DMSO-Peptidstocklösungen mit einer ATTO-NHS-Ester-Stocklösung in DMSO (10 mg/mL) für 1 h unter Lichtausschluss unter ständiger Bewegung umgesetzt. Der NHS-Ester des jeweiligen ATTO-Farbstoffes reagiert hierbei mit den Aminfunktionen der Peptide, wodurch diese kovalent fluoreszenzmarkiert werden. Aufgrund der hohen Leuchtkraft der gewählten Farbstoffe und um den Einfluss der Farbstoffe auf die Fibrillenbildung zu minimieren, wurden die fluoreszenten Stocklösungen mit den nicht-fluoreszierenden Stocklösungen verdünnt, um auf eine 10 mol% fluoreszenzmarkierte Stocklösung zu kommen. Anschließend wurde die 10 mol% ATTO647N-markierte PEP_{RGD}-Stocklösung mit der 10 mol% ATTO488-markierten PEP-Stocklösung in verschiedenen Molverhältnissen vermengt, in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) für 24 h inkubiert und konfokalmikroskopisch analysiert. Wie zu erwarten, ist zunächst mit Erhöhung des RGD-Anteils eine Zunahme der rotfluoreszierenden PEP_{RGD}-Peptide in den Aggregaten zu beobachten, während es bei dem grünfluoreszierenden PEP-Peptid zu einer Abnahme kommt. Es fällt auf, dass die beiden Farbsignale durchgängig kolokalisiert vorliegen. Es sind also keinerlei Bereiche oder gar ganze Aggregate mit lediglich einem

Fluoreszenzsignal erkennbar. Dies bedeutet, dass sich ausschließlich Aggregate mit einer homogenen Verteilung der beiden Peptide ausbilden. Die Ursache für diese homogene Verteilung der Peptide könnte energetischer Natur sein, da die repulsiven Interaktionen zwischen den RGD-funktionalisierten PEP_{RGD}-Peptiden durch den größtmöglichen Abstand untereinander auf diese Weise minimiert werden.

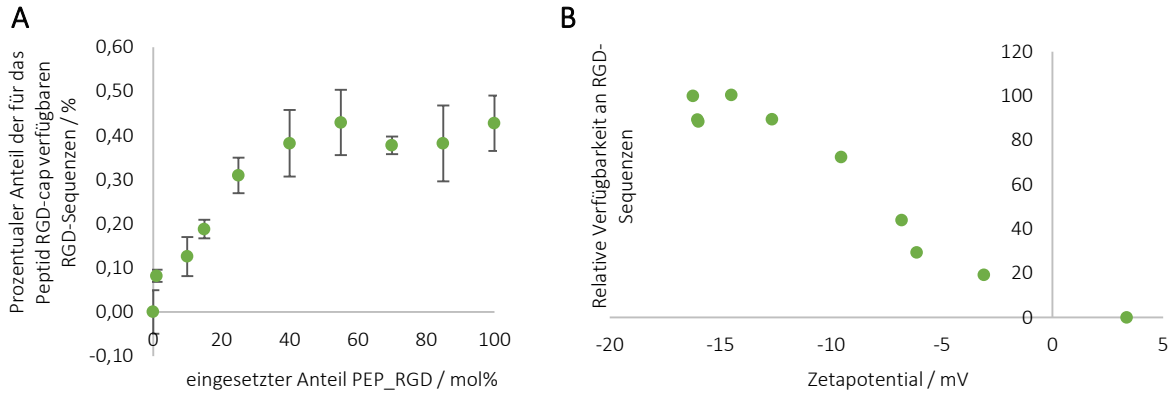


Abbildung 30: (A) Prozentualer Anteil an verfügbaren RGD-Sequenzen der Mischfibrillen mit variierendem RGD-Peptid-Anteil, welche durch fluoreszenzspektroskopische Auswertung der Anlagerung des ATTO488-markierten Peptids RGD-cap an die PNF bestimmt wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm). (B) Zusammenhang zwischen relativer Anzahl der an den PNF-Aggregaten verfügbaren RGD-Sequenzen und dem Zetapotential der Fibrillenaggregate in 1 mM KCl (pH 5,5).

Untersucht man nun anhand der Anlagerung des Peptid RGD-cap analog zu den reinen Fibrillen in Kapitel 3.2 die relative Anzahl der an der Außenseite der Aggregate befindlichen RGD-Sequenzen (Abbildung 30A), lässt sich zunächst ein linearer Anstieg mit Zunahme des molaren RGD-Anteils beobachten. Ab einer RGD-Konzentration von 55 mol% ergibt sich ein Plateau und es kommt zu keiner weiteren Zunahme an RGD-Sequenzen auf der PNF-Aggregataußenseite. Diese Beobachtung deckt sich mit der Entwicklung des Zetapotentials bei Erhöhung der RGD-Menge. Trägt man die relative Anzahl der verfügbaren RGD-Sequenzen gegen das Zetapotential der unterschiedlichen Mischfibrillen auf (Abbildung 30B), wird ein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen ersichtlich. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus den Ladungen der Aminosäuren in der GGRGDS-Primärsequenz bei neutralem pH, welche zu einer negativen Gesamtladung dieser Einheit führen, wodurch das Zetapotential in Abhängigkeit der Anzahl an RGD-Sequenzen auf der Oberfläche der Aggregate abnimmt. Die etwas breiteren Fehlerbalken für die Mischfibrillen ab einem RGD-Anteil von 40 mol% weisen auf unregelmäßigere Aggregate hin, welche nicht alle eine einheitliche Anzahl an nach außen gerichteten RGD-Funktionen aufweisen. Diese Vermutung deckt sich mit der Verbreiterung der Zetapotentialverteilungskurven für die Fibrillen mit höherem RGD-Anteil (Abbildung 28B).

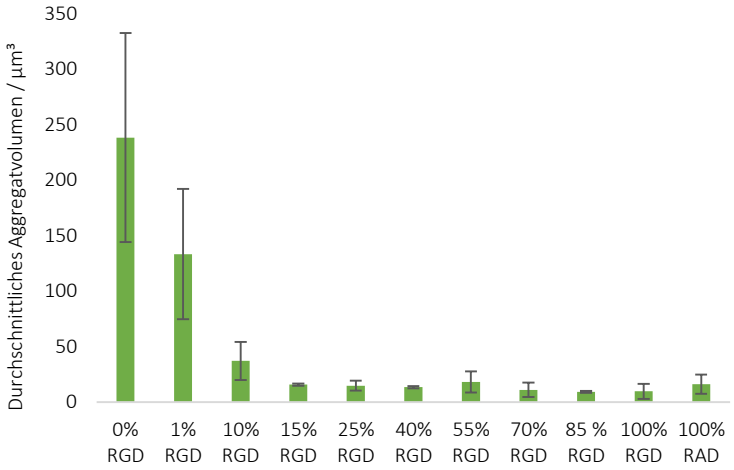


Abbildung 31: Ermittelte Volumen der Fibrillenaggregate mit unterschiedlichen Anteilen an RGD-funktionalisiertem Peptid mittels DLS. Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können.

Die Zunahme der tendenziell negativ geladenen RGD-funktionalisierten Peptide führt nicht nur zu einer Absenkung des Zetapotentials, sondern auch zur Erhöhung der repulsiven Wechselwirkungen in den Aggregaten. Je mehr Peptide mit negativer Gesamtladung in den Aggregaten enthalten sind, desto stärker werden auch die abstoßenden Interaktionen, welche in den Aggregaten wirken. Dies führt zu einer geringeren Größe der ausgebildeten Aggregate, was mittels DLS bestätigt werden konnte (Abbildung 31). Die Peptidstocklösungen wurden hierfür erneut 24 h in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) bei RT inkubiert, die erhaltenen PNF mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt und mittels DLS vermessen. Aufgrund der nicht-sphärischen Aggregate wurde der erhaltene Hydrodynamische Durchmesser analog zu Kapitel 3.1 in das Hydrodynamische Aggregatvolumen umgerechnet. Hierbei kommt es bereits nach Zugabe von lediglich 1 mol% RGD-Peptid zu einer deutlichen Absenkung des Aggregatvolumens. Erhöht man den RGD-Anteil weiter, verringert sich das Volumen weiter. Nach einer zunächst sehr starken Änderung des Volumens kommt es ab einem Anteil von 15 mol% PEP_{RGD} nur noch zu einer minimalen Absenkung der Aggregatgröße, welche sich schließlich ab 70 mol% RGD-Peptid bei etwa 10 µm³ einpendelt.

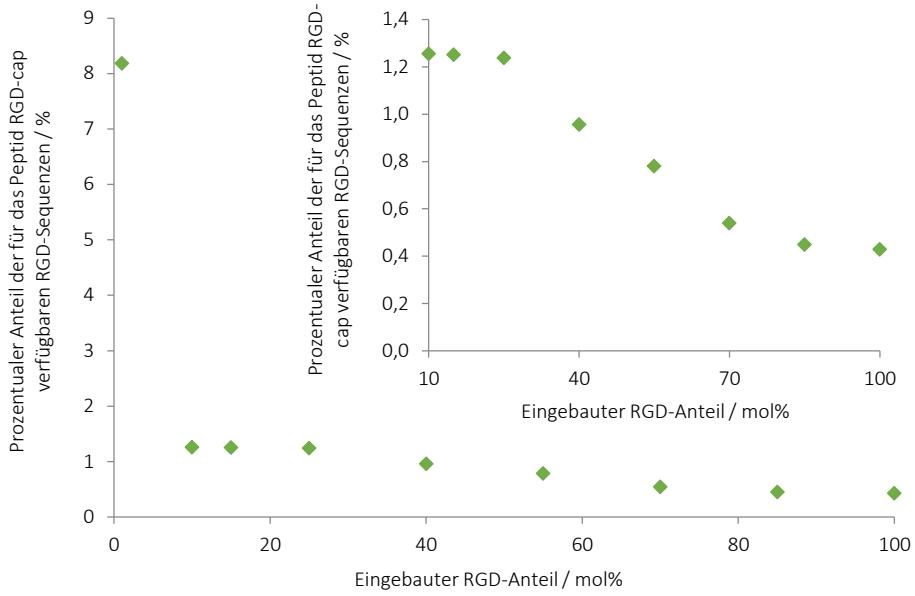


Abbildung 32: Prozentuale Verfügbarkeit der eingebauten RGD-Sequenzen an den PNF-Aggregaten, welche über die fluoreszenzspektroskopische Auswertung der Anlagerung des ATTO488-markierten Peptids RGD-cap an die PNF bestimmt wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm), aufgetragen gegen die Menge an insgesamt eingebautem RGD-Peptid.

Diese repulsiven Wechselwirkungen spielen dabei nicht nur bei der Aggregatgröße eine Rolle, sondern können auch bei der Dichte der ausgebildeten Netzwerke mitwirken, was eine Änderung in der Verfügbarkeit der RGD-Sequenzen an den PNF-Aggregaten zur Folge hätte. Vergleicht man nun, wie viel Prozent der eingebauten RGD-Sequenzen in den unterschiedlichen Mischfibrillen auf der Außenseite der PNF für die RGD-cap-Anbindung verfügbar sind (Abbildung 32), stehen nach Zugabe von 1 mol% PEP_{RGD} etwa 8% der eingebauten RGD-Sequenzen an den PNF für eine mögliche Anbindung zur Verfügung. Bei Erhöhung des molaren Anteils an RGD-Peptid auf 10 mol% fällt dieser Wert stark ab und ergibt lediglich knapp 1,5% der RGD-Sequenzen auf der Oberfläche. Mit weiterer Zunahme an eingebauten RGD-Peptiden nimmt die prozentuale Verfügbarkeit der eingesetzten RGD-Menge an den PNF weiter ab und endet bei 100 mol% PEP_{RGD} schließlich bei 0,4%. Betrachtet man die mit zunehmendem RGD-Anteil immer kleiner werdenden Aggregate, wäre bei gleichbleibender Dichte der Netzwerke ein ansteigender prozentualer Anteil an verfügbaren RGD-Sequenzen zu erwarten. Das dies hier nicht beobachtet werden kann, könnte auf die Ausbildung dichterer Netzwerke im Falle der PNF mit hohem RGD-Anteil zurückzuführen sein. Die immer dichter werdenden Netzwerkstrukturen lassen sich auch in den TEM Aufnahmen erkennen (Abbildung 27A). Durch diese dichte Zusammenlagerung der einzelnen Fibrillenfasern liegen prozentual gesehen mehr Peptide im Inneren der Fibrillennetzwerke vor als es bei weniger dichten Netzwerken der Fall wäre. Zudem erleichtern offenere Aggregatstrukturen das Vordringen des RGD-cap ins Innere der Aggregate, wodurch auch

eine Anbindung an RGD-Sequenzen stattfinden kann, welche weiter im Inneren des Aggregatnetzwerks liegen. Eine inhomogene Verteilung der Peptide in den Aggregaten konnte durch konfokalmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 29) als Ursache für diese Unterschiede ausgeschlossen werden.

Durch Mischen der Peptidstocklösungen von PEP und PEP_{RGD} in unterschiedlichen molaren Verhältnissen, konnten Mischfibrillen mit variierendem RGD-Anteil hergestellt werden. Diese weisen eine homogene Verteilung der beiden Peptide über die Aggregate auf und bilden in Abhängigkeit des eingebauten RGD-Anteils unterschiedlich große PNF-Aggregate aus, welche sich auch in Zetapotential, Sekundärstruktur und relativer Menge RGD an der PNF-Oberfläche unterscheiden.

3.4. Zusammenfassung der Ausbildung fibrillärer Netzwerke

Alles in allem konnten mit Hilfe der amphipatischen Primärstruktur KFKFEFEF erfolgreich sowohl unfunktionalisierte als auch RGD- bzw. RAD-funktionalisierte Fibrillennetzwerke ausgebildet werden. Wie erwartet, bilden sich die ß-Faltblattstrukturen direkt nach Zugabe in wässriges Medium aus und führen zu einem schnellen Wachstum auf die finale Größe der Aggregate. Durch Mischen der Peptidstocklösungen wurden Mischfibrillen mit variierendem RGD-Anteil hergestellt, welche den Einfluss der RGD-Sequenz auf die Eigenschaften der ausgebildeten PNF aufzeigen. Hierbei kam es mit Zunahme des molaren RGD-Anteils zu einem Anstieg der auf der Oberfläche befindlichen RGD-Sequenzen, was ein Absenken des Zetapotentials zur Folge hat und somit eine Abnahme der ausgebildeten Aggregatgröße bewirkt. Des Weiteren führt die Einführung unterschiedlicher Mengen RGD zu Änderungen in der Sekundärstruktur sowie der Morphologie der PNF.

4. Anlagerung der Silikapartikel an das Fibrillennetzwerk

Mezzenga *et al.*[110] konnten bereits zeigen, dass der Transport von metallischen Nanopartikeln aus Gold, Silber und Palladium in verschiedene Zellen in Anwesenheit von PNF deutlich effizienter abläuft. Und auch in der Virologie werden PNF charakterisiert, welche Viren wie den HI-Virus nicht-kovalent anbinden und somit die Aufnahme in Zellen erhöhen.[290] Die Beobachtungen, welche Puddu und Perry[113] für die Adsorption unterschiedlich geladener Peptide an negativ geladene Silikapartikel machen konnten, legen den Rückschluss nahe, dass Silikapartikel ebenfalls nicht-kovalent an PNF

anlagern können und hierdurch ein effizienter Partikeltransport in die Zellen erfolgt. In diesem Kapitel soll zunächst die nicht-kovalente Anlagerung der MSNs an die PNF untersucht werden (Abbildung 33).

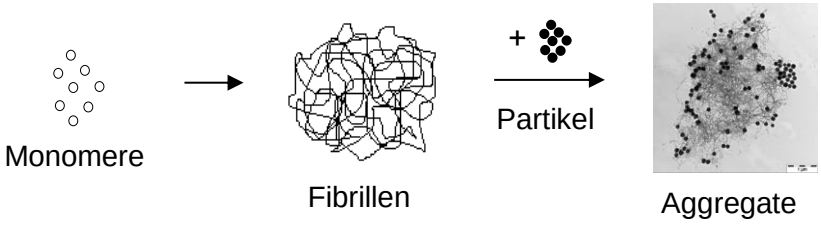


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Herstellung von PNF-Aggregaten mit nachträglich nicht-kovalent angelagerten MSN_{COOH}.

4.1. Auswahl der Partikelfunktionalisierung für die nicht-kovalente Anlagerung

Die nicht-kovalente Anbindung benötigt aus synthetischer Sicht keinen großen Aufwand, ist leicht durchzuführen und ermöglicht den MSNs unter Umständen eine leichtere Ablösung von den Aggregaten und unterstützt somit die Aufnahme der MSNs in die Zellen. Für die Verwendung als Wirkstofftransportsystem wären eine homogene Verteilung sowie eine starke Wechselwirkung zwischen den MSN und den PNF wünschenswert. Um die nicht-kovalente Anlagerung der MSNs an die PNF genauer zu untersuchen, wurden die PNF in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine MSN-Dispersion zu den PNF gegeben, um eine Partikelkonzentration von 150 µg MSN/µmol Peptid zu erhalten. Für die Anlagerung wurden die Proben 45 min bei RT stehen gelassen und im Anschluss auf TEM-Trägernetzchen präpariert. Vergleicht man die mit 2%-iger Uranylacetatlösung kontrastierten TEM Aufnahmen der Anlagerung der unterschiedlich funktionalisierten Silikapartikel an die PNF, erkennt man deutliche Unterschiede (Abbildung 34).

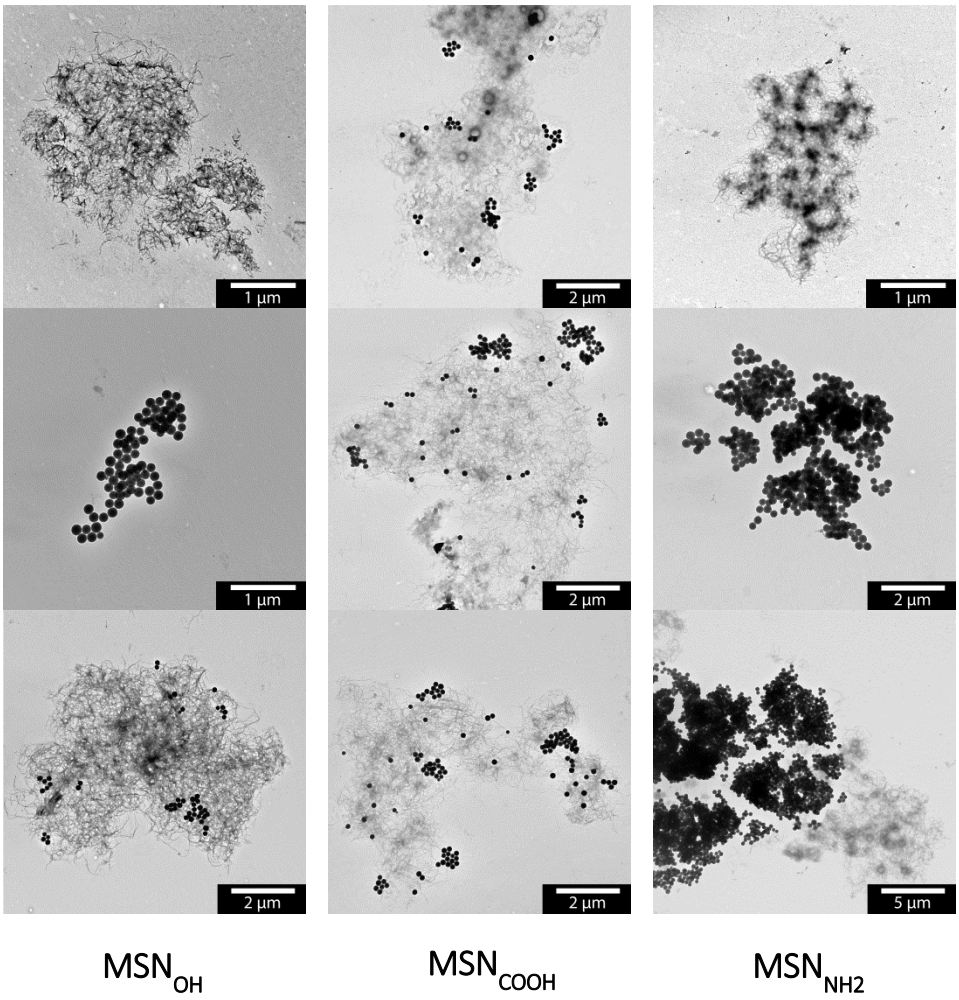


Abbildung 34: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der nicht-kovalenten Anlagerung der unfunktionalisierten Silikapartikel (MSN_{OH}) sowie der carboxylierten (MSN_{COOH}) und aminfunktionalisierten Silikapartikel (MSN_{NH2}) an Peptidnanofibrillen nach 45 min Inkubation in Natriumphosphatpuffer (pH 7,0). Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Für die unfunktionalisierten Partikel MSN_{OH} ist hierbei lediglich eine schwache Anlagerung der Partikel an das Fibrillennetzwerk zu beobachten. Zudem finden sich auch einige Fibrillenaggregate, welche keinerlei Partikel anhaften haben. Dies führt ebenso zu freien Partikeln, welche nicht an die Fibrillen gebunden sind. Grund hierfür könnte die lediglich schwache Wechselwirkung zwischen den Hydroxygruppen auf der Partikeloberfläche und den funktionellen Gruppen der Peptidseitenketten und des Peptidrückgrads sein. Die Beobachtungen von Puddu und Perry[113] zur pH-Abhängigkeit der Wechselwirkung zwischen unfunktionalisierten MSN und negativ geladenen Peptiden lassen eine bessere Anlagerung bei pH-Werten kleiner 2 vermuten (Kapitel I.2). Da das System später jedoch in neutrales Medium gegeben werden soll, würde es hierbei vermutlich zu einer frühzeitigen Ablösung der Partikel von den PNF aufgrund der Abschwächung der Wechselwirkungen bedingt durch die

Änderung des pH-Wertes kommen. Zudem kann der pH-Wert auch ungewollten Einfluss auf die Ausbildung der PNF nehmen. Die funktionalisierten Partikel MSN_{COOH} und MSN_{NH2} können hingegen sehr gut mit den Amin- und den Carbonsäuregruppen der Peptide wechselwirken, wodurch es zu einer erhöhten Anlagerung kommt. Dies ergibt für die MSN_{COOH} eine gleichmäßige Verteilung der Partikel über die Fibrillenaggregate. Bei den MSN_{NH2} kommt es zu einer starken Agglomeration der Partikel, weshalb es zu sehr großen Partikelaggregaten kommt, welche teilweise an die Fibrillen anlagern. Auch nach Intensivierung des Dispersionsschrittes kommt es zu einer schnellen Zusammenlagerung der Partikel. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Untersuchungen lediglich die MSN_{COOH} weiterverwendet.

4.2. Zugabe der Partikel nach Ausbildung des Fibrillennetzwerkes

Für die genauere Untersuchung der Partikelanlagerung wurden zunächst für die Fibrillen von PEP und PEP_{RGD} Kinetikstudien durchgeführt. Hierbei werden die Fibrillen als nicht-fluoreszente Ereignisse vom Durchflusszytometer erkannt (Abbildung 35A). Der auf der Y-Achse aufgetragene Wert SSC (*side scattered light*) korreliert hierbei mit der Größe der gemessenen Ereignisse, wobei ein geringerer SSC-Wert auch für eine geringere Ereignisgröße spricht.

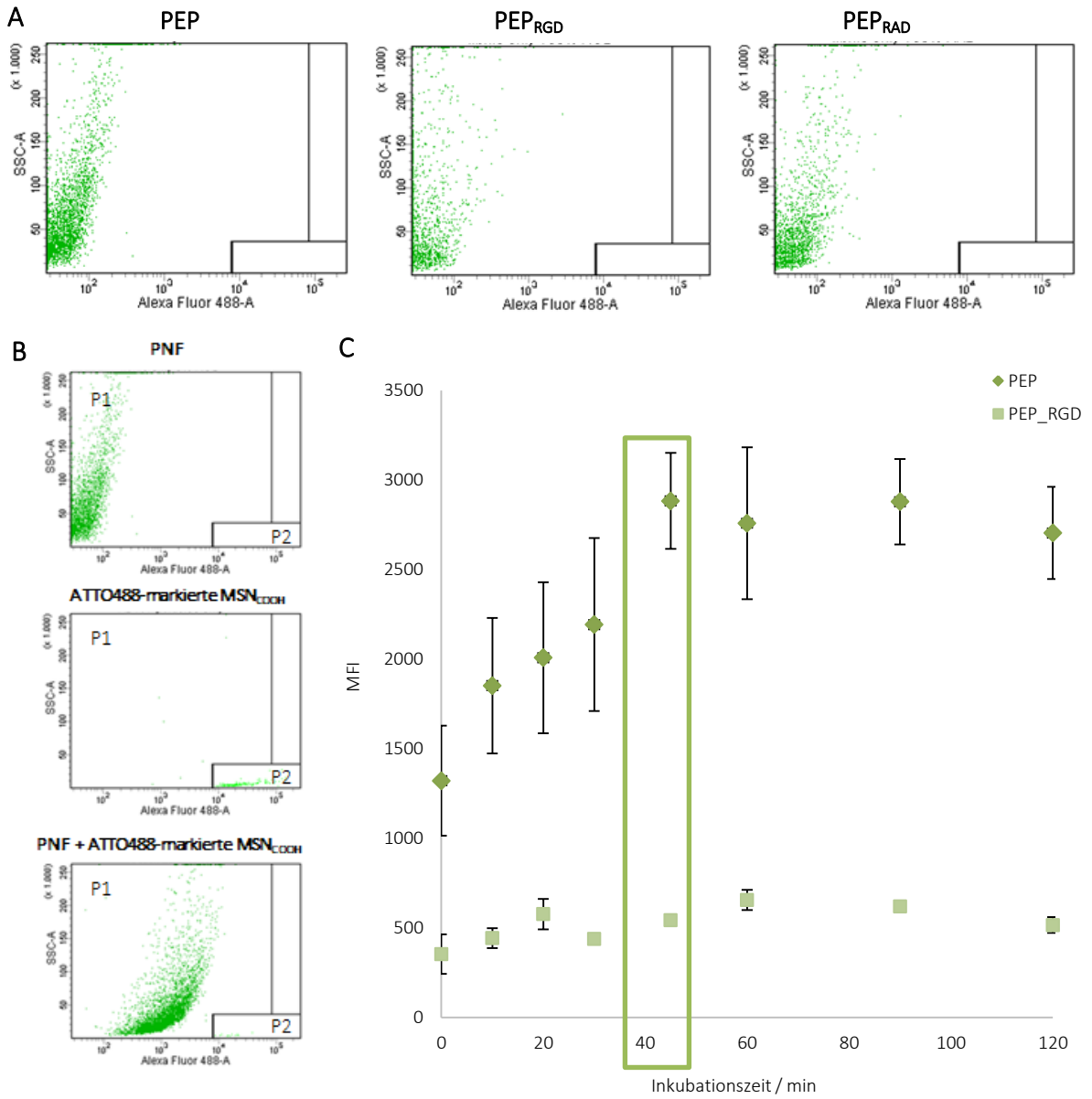


Abbildung 35: (A) Piktogramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der reinen nicht-markierten Fibrillen von PEP, PEP$_{RGD}$ und PEP$_{RAD}$ sowie (B) der reinen nicht-markierten Fibrillen von PEP, der reinen ATTO488-markierten Partikel MSN$_{COOH}$ sowie der Partikel-Fibrillen-Aggregate. Hierbei stellt der Bereich P1 den Bereich dar, welcher den PNF zugeordnet werden kann, während P2 die detektierten Aggregate der fluoreszenzmarkierten freien MSN$_{COOH}$ darstellt. (C) Zeitliche Entwicklung der Anlagerung der ATTO488-markierten MSN$_{COOH}$ an die Fibrillen von PEP und PEP$_{RGD}$, bestimmt durch Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des Bereichs P1 aus Messungen der Durchflusszytometrie.

Für alle drei PNF ist hierbei eine breitere Verteilung der Aggregatgrößen zu beobachten, was sich mit den Beobachtungen aus den TEM- und konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Anhang Abbildung 89) sowie den hohen Polydispersitätsindizes aus der DLS deckt (Anhang Abbildung 88). Zudem ist analog zu den mittels DLS bestimmten Volumen (Abbildung 25A) eine deutliche Abnahme in der Aggregatgröße durch die Einbringung der GGR(G/A)DS-Sequenzen zu beobachten. Um die Anlagerung

der MSN_{COOH} an die PNF untersuchen zu können, wurden die MSN mittels EDC/NHS-Aktivierung mit dem Farbstoff ATTO488-Amin (1,8 µg/mg MSN; 2,1 nmol/mg MSN) fluoreszenzmarkiert. Lagern nun die fluoreszenzmarkierten Partikel an die Fibrillen an, ergibt sich für die gemessenen Ereignisse ebenfalls eine Fluoreszenz, welche am Durchflusszytometer vermessen wird. Aufgrund der nicht-kovalenten Anbindung kann der Ansaugdruck des Durchflusszytometers unter Umständen ausreichen, um zu einer Ablösung der MSN_{COOH} von den Fibrillen zu führen, welche anschließend als freie Partikelaggregate detektiert werden (Abbildung 35B, Bereich P2). Um eine Verfälschung der Daten zu vermeiden, wurden diese Ereignisse aus den Auswertungen enthalten und lediglich die Ereignisse im Bereich P1 für die Auswertung berücksichtigt. Die Kinetikstudie zeigt bereits direkt nach der Zugabe der MSN_{COOH} zu den PEP-Fibrillen einen Anstieg der Fluoreszenz, was auf eine schnelle Wechselwirkung zwischen den Partikeln und den Fibrillen schließen lässt (Abbildung 35C). Nach einem zunächst linearen Anstieg der MSN_{COOH}-Anlagerung kommt es nach 45 min zur Ausbildung eines Plateaus. Ein analoger Verlauf ließ sich auch für die Fibrillen von PEP_{RGD} für die Anlagerung der MSN_{COOH} detektieren. Auffällig ist die deutlich geringere Fluoreszenz im Falle der PEP_{RGD}-PNF, auf welche später noch genauer eingegangen wird. Die Ausbildung eines Plateaus kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits können nach 45 min alle MSN_{COOH} an die Fibrillen adsorbiert sein, andererseits kann auch eine mit Partikeln gesättigte Oberfläche der Fibrillenaggregate der Grund sein, dass keine weiteren Partikel anlagern. Um hier eine genauere Aussage treffen zu können, wurden die Zetapotentialverteilungen der Partikel-Fibrillen-Aggregate untersucht (Abbildung 36). Die für 24 h bei RT in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) angesetzten PNF wurden hierfür mit einer MSN_{COOH}-Dispersion in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt, um zu einer Partikelkonzentration von 150 µg/µmol Peptid zu gelangen. Nach 45 min Inkubation bei RT wurden die Proben mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt und deren Zetapotential vermessen.

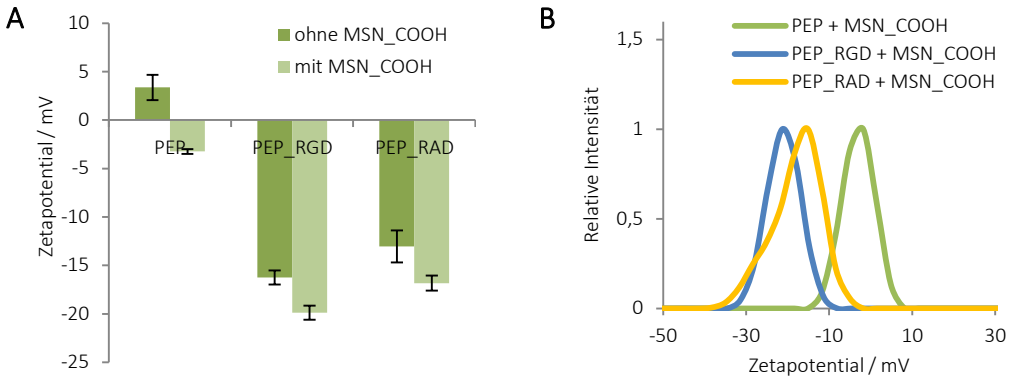


Abbildung 36: (A) Zetapotentiale der PNF-Aggregate in 1 mM KCl (pH 5,5) vor und nach 45-minütiger nicht-kovalenter Anlagerung der MSN_{COOH} sowie (B) die Zetapotentialverteilungskurven der PNF-MSN_{COOH}-Aggregate zur Überprüfung der Vollständigkeit der Partikelanlagerung.

Da die MSN_{COOH} in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) ein Zetapotential von -34 mV aufweisen, verschieben sich die Zetapotentiale der Fibrillen durch die Anlagerung der Partikel hin zu leicht negativeren Werten. Die Verteilungen der Zetapotentiale für die Partikel-Fibrillen-Aggregate ergeben hierbei jeweils lediglich ein breiteres Signal und es zeichnet sich kein weiteres Maximum bei -34 mV ab, welches durch freie MSN_{COOH} verursacht werden würde. Das Plateau entsteht also durch eine vollständige Anlagerung der MSN_{COOH} an die unterschiedlichen Fibrillen. Dies sollte durch Erhöhung der Partikelkonzentration zu einem Anstieg der Partikelanlagerung an die unterschiedlichen Fibrillen führen. Werden die Fibrillen mit unterschiedlichen Mengen ATTO488-markierter MSN_{COOH} inkubiert (0, 50, 100, 150, 200, 250 und 300 µg/µmol Peptid) und durchflusszytometrisch vermessen, ergibt sich eine stetig ansteigende Fluoreszenz der Aggregate durch die ansteigende Adsorption von fluoreszenzmarkierten Partikeln an die Fibrillen (Abbildung 37A).

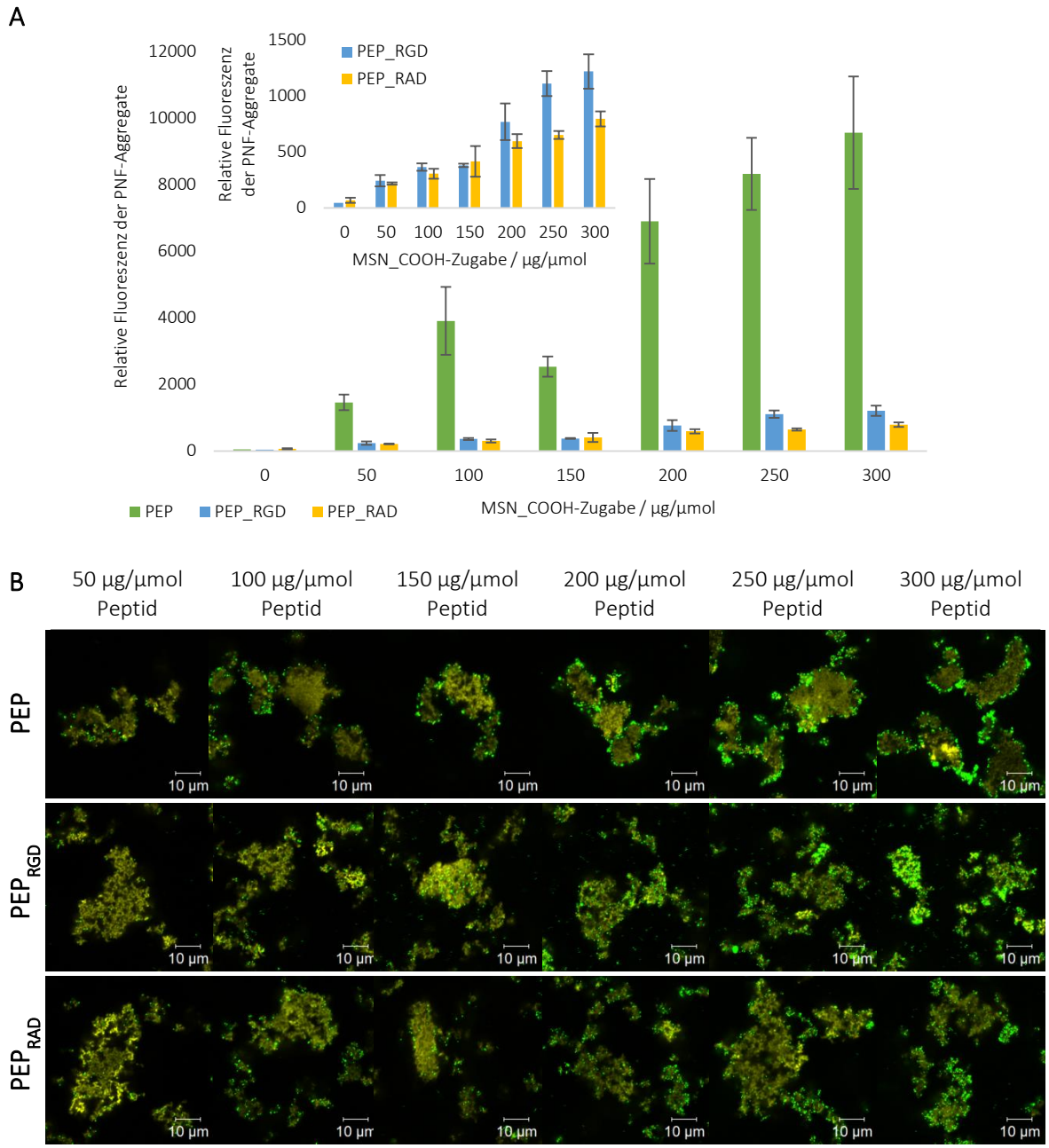


Abbildung 37: Untersuchung der Anlagerung unterschiedlicher Mengen an MSN_{COOH} (50, 100, 150, 200, 250 und 300 µg MSN/µmol Peptid) an die unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen (PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}) bei einer Inkubationszeit von 45 min mittels (A) Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des P1-Bereichs (PNF) der Durchflusszytometriemessungen (PNF: nicht-fluoreszent; MSN_{COOH}: ATTO488) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün).

Da es im untersuchten Bereich zu keiner Sättigung kommt, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Homogenität der Partikelanlagerung genauer zu betrachten (Abbildung 37B). Hierzu wurden ATTO488-markierte MSN_{COOH} an 10 mol% ATTO647N-markierte PNF adsorptiv für 45 min bei RT angelagert und unter einem Konfokalmikroskop betrachtet. Hierbei liegt in allen Fällen eine gleichmäßige Verteilung der Partikel vor. Für PEP kommt es bei den höheren

Partikelkonzentrationen hin und wieder zu kleineren Partikelaggregaten, welche an den Fibrillen haften. Dies deutet daraufhin, dass es nach Sättigung der Fibrillenoberfläche zur Ausbildung von Partikelagglomeraten bzw. zu Mehrlagenbildung kommt und die Partikelanlagerung hierdurch nicht abgebrochen wird. Zetapotentialmessungen können genaueren Aufschluss über das Vorliegen freier MSN_{COOH} geben. Inkubiert man die 24 h in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) angesetzten Fibrillen für 45 min mit unterschiedlich konzentrierten Partikelstocklösungen, um Partikelkonzentrationen von 150, 200, 250 und 300 µg/µmol Peptid zu erhalten, so ergeben sich nach dem Verdünnen mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) charakteristische Intensitätsverteilungskurven (Abbildung 38).

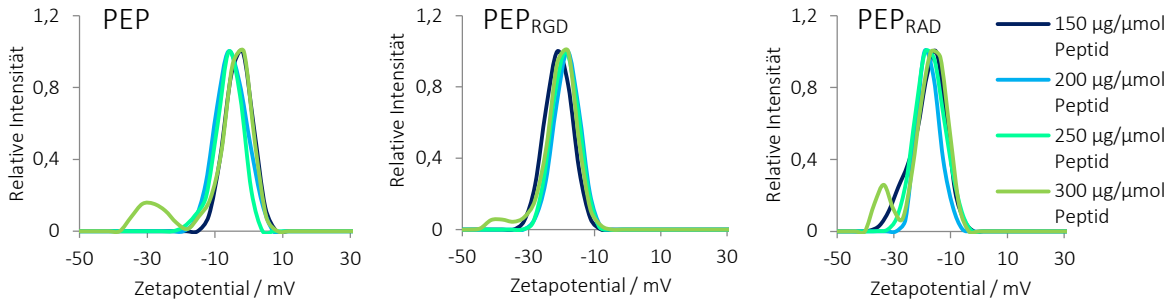


Abbildung 38: Zetapotentialverteilungskurven der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche mit unterschiedlichen Mengen an carboxylierten Partikeln für 45 min inkubiert wurden. Die Proben wurden vor der Vermessung mit 1 mM KCl (pH 5,5) verdünnt.

Für die Partikelkonzentrationen von 150-250 µg/µmol Peptid ist hierbei für alle drei Fälle eine monomodale Verteilung erkennbar. Das Maximum resultiert aus den Fibrillenaggregaten mit angelagerten Partikeln und liegt minimal zu negativeren Werten hin verschoben im Vergleich zu den reinen Fibrillen. Für eine Partikelkonzentration von 300 µg/µmol Fibrillen wird jedoch bei allen drei Fibrillen ein zusätzliches kleineres Maximum bei -35 bis -30 mV sichtbar. Das Zetapotential dieses zweiten lokalen Maximums entspricht dem der freien carboxylierten Silikapartikel MSN_{COOH}. Ab dieser Partikelkonzentration scheint es also zu einer Sättigung der Fibrillen mit Partikeln zu kommen und es können nicht mehr alle Partikel an die Fibrillenoberfläche angelagert werden. Es befinden sich hierbei also freie Partikel in der Probe. Die Sättigung tritt für alle drei Fibrillensorten bei einer ähnlichen Partikelkonzentration ein. Für alle weiteren Untersuchungen wurde eine Partikelkonzentration von 150 µg/µmol Peptid gewählt, um das Auftreten freier Partikel ausschließen zu können.

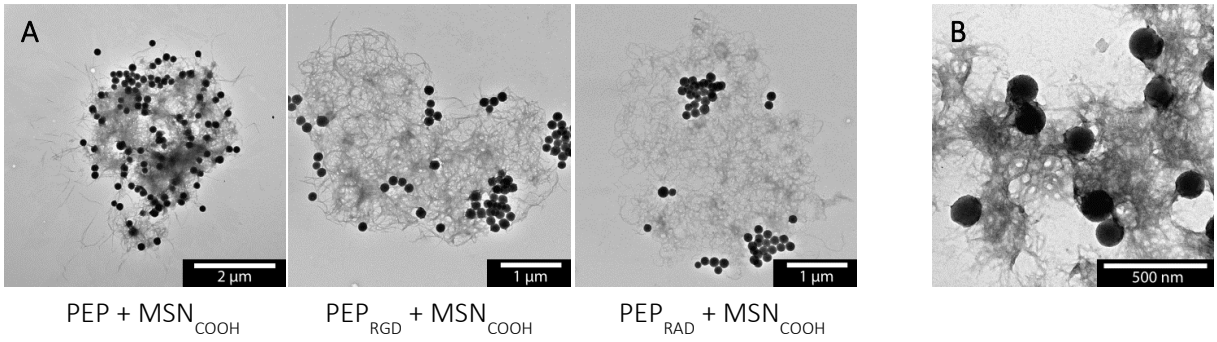


Abbildung 39: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der 45-minütigen nicht-kovalenten Anlagerung der carboxylierten Silikapartikel (MSN_{COOH}) an die unfunktionalisierten (PEP), die RGD-funktionalisierten (PEP_{RGD}) sowie die RAD-funktionalisierten PNF (PEP_{RAD}). (B) Vergrößerung der angelagerten MSN_{COOH} an die PEP-PNF. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Um die Anlagerung der MSN_{COOH} an die unterschiedlichen PNF genauer zu untersuchen, wurden TEM Aufnahmen der Aggregate mit 150 µg MSN_{COOH}/µmol Peptid gemacht (Abbildung 39). Die TEM-Trägernetzchen wurden analog zu den Proben in Kapitel 4.1 präpariert und kontrastiert. Während für PEP eine relativ dichte Anlagerung der carboxylierten Silikapartikel beobachtet werden kann, kommt es bei den beiden funktionalisierten Fibrillen PEP_{RGD} und PEP_{RAD} zu weniger angelagerten Partikeln pro Aggregat. Allerdings kann über die genaue Lokalisation der Partikel mittels TEM Aufnahmen keine Aussage getroffen werden, da hierbei nicht deutlich wird, ob sich die Partikel auf der Außenseite oder im Inneren der Aggregate befinden. Grund hierfür ist die Aufnahme des Kontrastes durch das gesamte Aggregat und nicht eines einzelnen Querschnittes. Für eine Quantifizierung der Anlagerung wurden die Fibrillen mit den nach 45 min angelagerten ATTO488-markierten MSN_{COOH} durchflusszytometrisch untersucht. Vergleicht man nun die erhaltene Fluoreszenz der Fibrillen-Partikel-Aggregate (Abbildung 40A), bestätigen sich auch hier die Beobachtungen aus den TEM Untersuchungen.

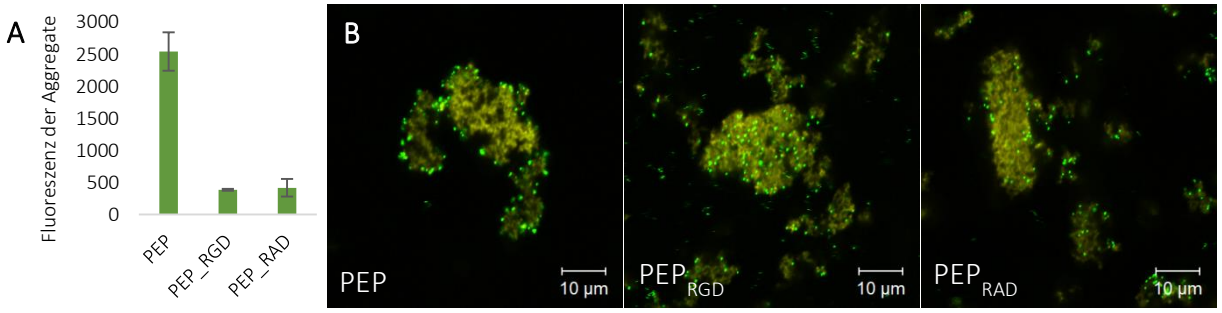


Abbildung 40: Untersuchung der nach 45 min Inkubation angelagerten Partikelmenge an die unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mittels (A) Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des P1-Bereichs (PNF) der Durchflusszytometriemessungen (PNF: nicht-fluoreszent; MSN_{COOH}: ATTO488) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün).

Grund für diese Unterschiede in der Anlagerung können die Unterschiede im Zetapotential der Fibrillen sein (Abbildung 25). Die neutral geladenen Fibrillen PEP können mit den negativ geladenen Silikapartikeln MSN_{COOH} über Wasserstoffbrücken wechselwirken,[113] während es bei den funktionalisierten Fibrillen zusätzlich aufgrund der negativen Nettoladung der Aggregate zu einer repulsiven Wechselwirkung zwischen den Fibrillen und den Carboxyfunktionen der Partikel kommt. Dies hätte eine Verringerung der Partikelanlagerung zur Folge. Die Zetapotentialverteilungskurven zeigen allerdings keinerlei freie MSN_{COOH} auf (Abbildung 36B), was Ladungseffekte als Ursache für die unterschiedliche Anlagerung ausschließt. Ein weiterer Grund für die geringere Anlagerung ist durch die unterschiedliche Größe der Fibrillenaggregate gegeben. Die Aggregate von PEP_{RGD} und PEP_{RAD} weisen deutlich kleinere Volumen auf als es für PEP der Fall ist (Abbildung 25). Dies führt im Umkehrschluss zu einer kleineren äußeren Oberfläche der Aggregate für PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, wodurch weniger Oberfläche pro Aggregat für eine Anlagerung zur Verfügung steht. Für die Gesamtheit der Aggregate ergibt sich für diese beiden hierdurch eine größere Anzahl an kleineren Aggregaten, woraus bei gleicher molarer Ansatzgröße eine größere zur Verfügung stehende äußere Oberfläche für die Partikelanlagerung resultiert.

Die Lokalisation der Partikel an den Fibrillenaggregaten kann mittels konfokalmikroskopischer Aufnahmen der 10 mol% ATTO647N-markierten PNF nach 45-minütiger Anlagerung ATTO488-markierter MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) genauer untersucht werden (Abbildung 40B). Für die Aggregate von PEP sieht man auch hier eine dichte, gleichmäßige Verteilung an MSN_{COOH} auf der Oberfläche der Fibrillen. Bei PEP_{RGD} und PEP_{RAD} sind analog zu den TEM Aufnahmen auch in diesem Fall weniger MSN_{COOH} an den Aggregaten sichtbar. Während bei TEM Aufnahmen, wie bereits erwähnt, eine genaue Lokalisation der MSN_{COOH} nicht möglich ist, kann durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich gemacht werden, dass sich keinerlei Partikel im Inneren der Fibrillennetzwerke befinden. Grund hierfür sind vermutlich die engen Maschengrößen der Netzwerke (Kapitel 3.2), welche ein Eindringen der Partikel ins Fibrilleninnere verhindern. Da es sich bei Fibrillen um dynamische Systeme handelt, welche sich durch Anlagerung und Abspaltung von Monomeren stets im Wandel befinden,[291] wäre eine Umlagerung der Fibrillen nach Anlagerung der Partikel aufgrund der Wechselwirkung mit diesen denkbar. Die Lokalisation der Partikel ausschließlich auf der Außenseite der Fibrillen lässt jedoch den Rückschluss zu, dass sich die Fibrillen nicht umstrukturieren, da in diesem Fall auch Partikel ins Innere der Aggregate gelangen würden. Zudem bestätigen diese Aufnahmen die Beobachtungen aus den TEM Untersuchungen, dass es sich um eine gleichmäßige homogene Verteilung der MSN_{COOH} über die Fibrillenaggregate handelt und es zu keiner frühzeitigen Aggregation der Partikel kommt.

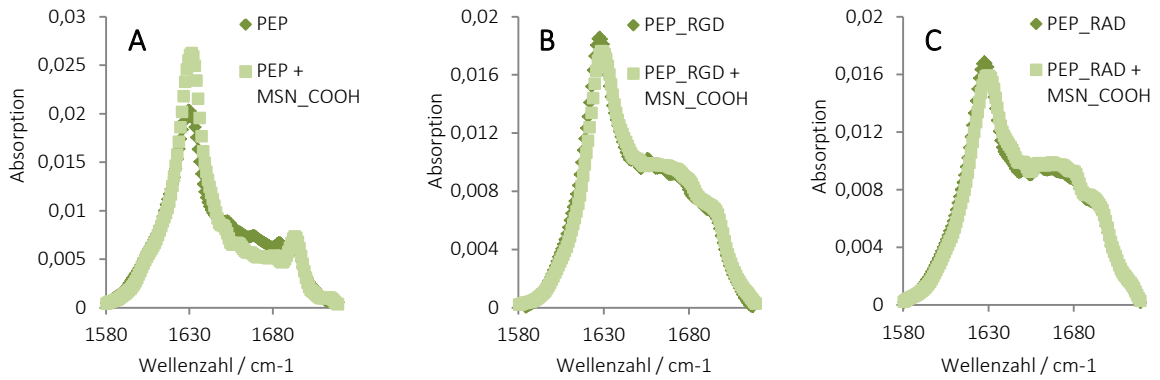


Abbildung 41: Einfluss der 45 min adsorptiv angelagerten MSN_{COOH} auf die flächennormierten Amid I-Banden der FTIR-Spektren der untersuchten gefriergetrockneten Peptidnanofibrillen (A) PEP, (B) PEP_{RGD} sowie (C) PEP_{RAD}. Die Amid I-Bande gibt Aufschluss über die Sekundärstruktur der untersuchten PNF.

Um mögliche Umstrukturierungseffekte der Fibrillen genauer zu untersuchen, wurden infrarotspektroskopische Messungen für die gefriergetrockneten PNF ohne sowie mit adsorptiv angelagerten MSN_{COOH} durchgeführt. Die Amid I-Banden wurden flächennormiert und sind in Abbildung 41 dargestellt. Während sich für die funktionalisierten PNF PEP_{RGD} und PEP_{RAD} keine Änderungen in der Amid I-Bande abzeichnen, nimmt im Falle der PEP-Fibrillen der prozentuale Anteil der ß-Faltblattstrukturen zu, während es zu einer leichten Absenkung der Anteile für Helices und Schleifen kommt. Grund für dieses Verhalten können die Wechselwirkungen zwischen den Peptiden am Rande der PNF-Aggregate mit den angelagerten MSN_{COOH} sein, wodurch diese ihre Konformation ändern können, um eine bessere Interaktion mit der Partikeloberfläche zu gewährleisten. Da im Falle der PEP-PNF deutlich mehr MSN_{COOH} pro Aggregat angelagert sind, würde dieser Effekt hier deutlicher zum Tragen kommen als es für die beiden anderen PNF der Fall wäre. Diese Umstrukturierung der PEP-PNF kann ebenso Einfluss auf andere Eigenschaften der PNF haben wie beispielsweise die Aggregatgröße. Diese Annahme lässt sich durch DLS verifizieren (Abbildung 42A), wobei die nach 24 h Inkubation in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) erhaltenen PNF zunächst mit einer MSN_{COOH}-Dispersion in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt, nach 45 min mit einer 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt und vermessen wurden.

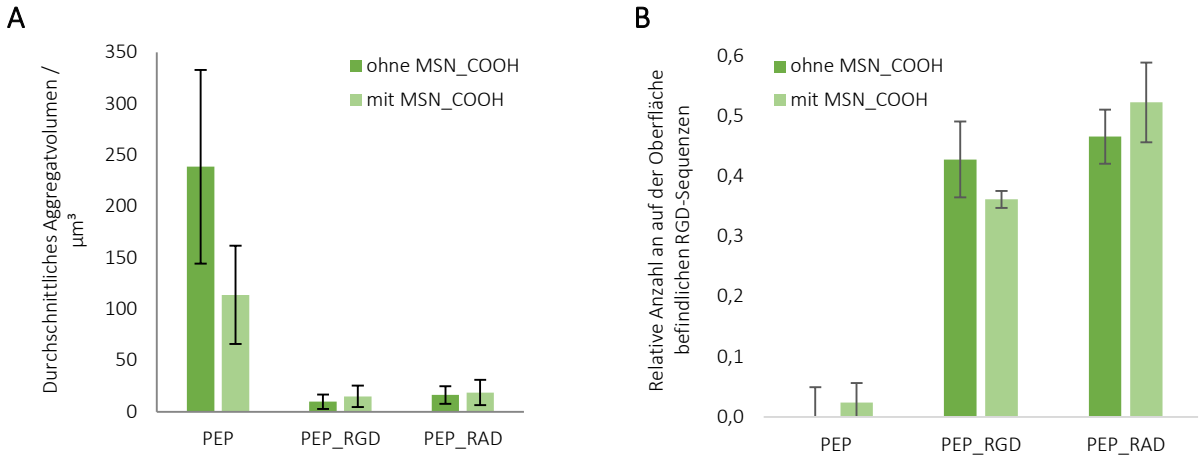


Abbildung 42: (A) Bestimmung des Aggregatvolumens der Fibrillenaggregate vor und nach 45-minütiger nicht-kovalenter Partikelanlagerung mittels DLS. Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können. (B) Relative zur RGD-cap-Anlagerung zur Verfügung stehende Anzahl an RGD-Sequenzen an den Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} vor und nach 45-minütiger adsorptiver Partikelanlagerung bestimmt mittels fluoreszenzspektroskopischer Auswertung der Anlagerung des cyclischen ATTO488-markierten Peptids RGD-cap (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm).

Vergleicht man die erhaltenen Volumen für die Aggregate vor und nach MSN_{COOH}-Anlagerung, ist im Falle von PEP_{RGD} und PEP_{RAD} keine nennenswerte Änderung detektierbar, während die Aggregate der PEP-PNF in ihrem Volumen deutlich abnehmen, wobei die Abnahme aufgrund der hohen Fehlerbalken bedingt durch das Vorliegen nicht-sphärischer Aggregate immer noch im Fehlerbereich liegt. Gründe für eine Abnahme der Aggregatgröße kann die Teilung der Aggregate in kleinere Aggregate sein, welche durch die Partikelanlagerung und der daraus resultierenden Sekundärstrukturänderung (Abbildung 41A) ausgelöst werden kann, aber auch die Verdichtung der bestehenden Aggregate durch die Änderungen in der Sekundärstruktur kann Einfluss auf das resultierende Aggregatvolumen haben. Des Weiteren kann die Anlagerung der MSN_{COOH} an die PNF zu einer Änderung der in wässrigen Medien ausgebildeten Hydrathülle führen, welche bei der DLS mitgemessen wird und somit als Teil des Hydrodynamischen Radius erhalten wird.

Die 1-stündige Anlagerung des ATTO488-markierten Peptids RGD-cap an die Fibrillen mit und ohne angelagerte MSN_{COOH} (Kapitel 3.2) zeigt, dass diese keinen nennenswerten Einfluss auf die RGD-Verfügbarkeit haben (Abbildung 42B). Dies lässt sich durch die lediglich geringe Anlagerung von Partikeln an PEP_{RGD} und PEP_{RAD} erklären. Während für PEP die erhöhte Adsorption von Partikeln keine Rolle spielt, da hier keinerlei RGD-Sequenzen vorhanden sind, kommt es bei den funktionalisierten Fibrillen nur zu einer geringen Anlagerung von MSN_{COOH}.

4.2.1. Variierende RGD-Anteile

Basierend auf den Ergebnissen für PEP und PEP_{RGD} wird für die Mischfibrillen mit variierendem RGD-Anteil (Kapitel 3.3) ebenfalls eine Anlagerung der MSN_{COOH} erwartet. Bestätigt wurde diese Vermutung durch TEM Aufnahmen der Fibrillenaggregate nach 45 min Inkubation mit den Partikeln (Abbildung 43). Hierbei ist eine nicht-kovalente Anlagerung in allen Fällen zu beobachten. Zudem fällt auf, dass die MSN_{COOH} für alle untersuchten Mischverhältnisse homogen über die Fibrillenaggregate verteilt vorliegen.

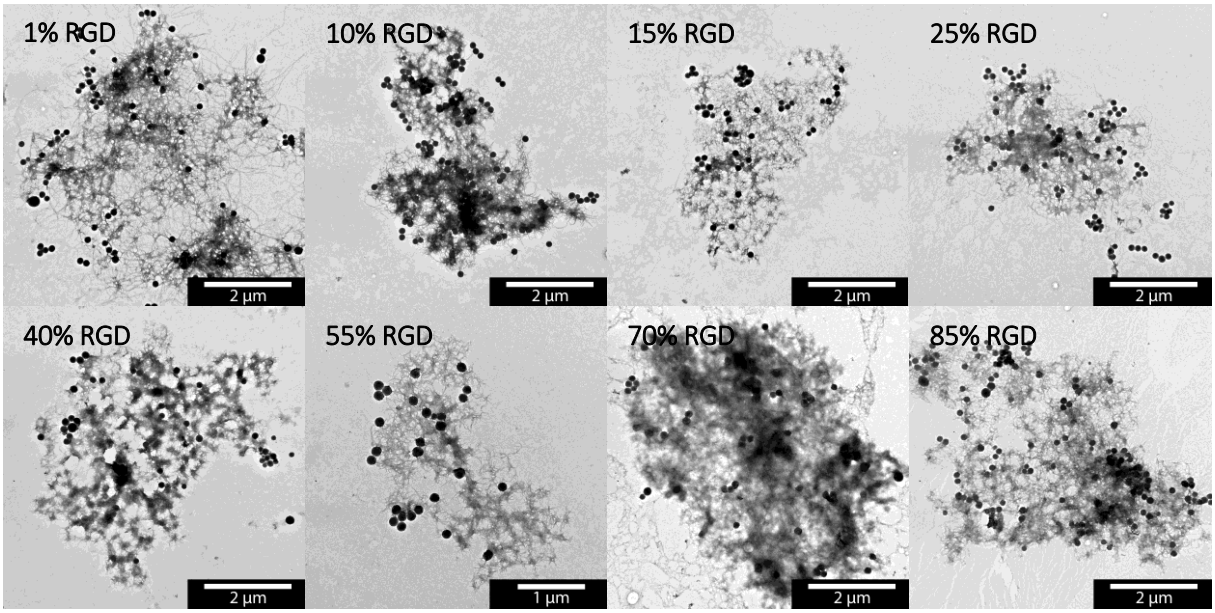


Abbildung 43: TEM Aufnahmen der 45-minütigen nicht-kovalenten Anlagerung der carboxylierten Silikapartikel (MSN_{COOH}) an die Mischfibrillen aus PEP und PEP_{RGD} mit variierendem RGD-Anteil (1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol% RGD-Peptid). Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Um ein besseres Bild über die Partikelanlagerung zu erhalten, wurden auch hier analog zu Kapitel 4.2 durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung der relativen angelagerten Partikelmenge pro Aggregat durchgeführt (Abbildung 44). Nach einem ersten Anstieg der angelagerten Partikelmenge pro Aggregat mit steigendem RGD-Anteil nimmt die Partikelanlagerung ab einem RGD-Anteil von 10 mol% mit Zunahme des Anteils an RGD-Peptid ab. Ab einem Anteil von 55 mol% bleibt die Anzahl angelagerter Partikel schließlich konstant.

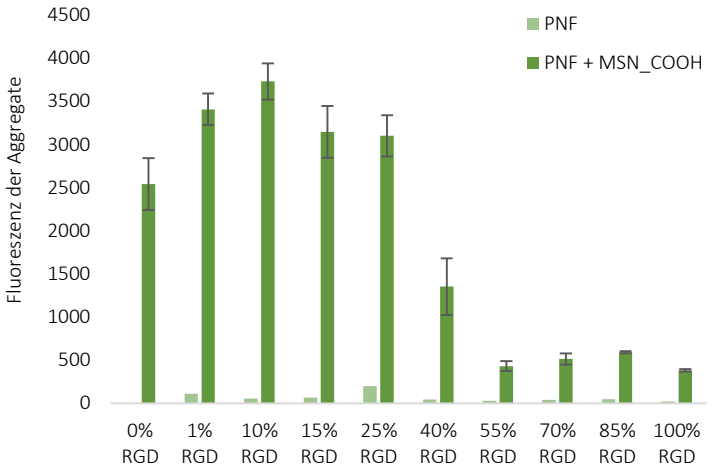


Abbildung 44: Untersuchung der 45-minütigen adsorptiven Anlagerung von ATTO488-markierten MSN_{COOH} an die Mischfibrillen aus PEP und PEP_{RGD} mit variierendem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid (1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol%) mittels Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des P1-Bereichs (PNF) der Durchflusszytometriemessungen (PNF: nicht-fluoreszent; MSN_{COOH}: ATTO488).

Zieht man das Zetapotential der Aggregate als Begründung heran, wird deutlich, dass sich ab einem RGD-Anteil von 55 mol% auch das Zetapotential nicht mehr stark verändert. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass das Zetapotential eine wichtige Rolle bei der Partikelanlagerung spielen könnte. Trägt man das Zetapotential gegen die relative Menge an angelagerten MSN_{COOH} auf, so ist ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen ersichtlich (Abbildung 45A), welcher sich durch die repulsiven Kräfte zwischen den negativ geladenen MSN_{COOH} und den PNF mit steigender Negativität der Nettoladung erklären lassen kann. Allerdings konnten für die PEP- und die PEP_{RGD}-Fibrillen keine freien Partikel detektiert werden, was einem Einfluss des Zetapotentials widerspricht (Abbildung 38).

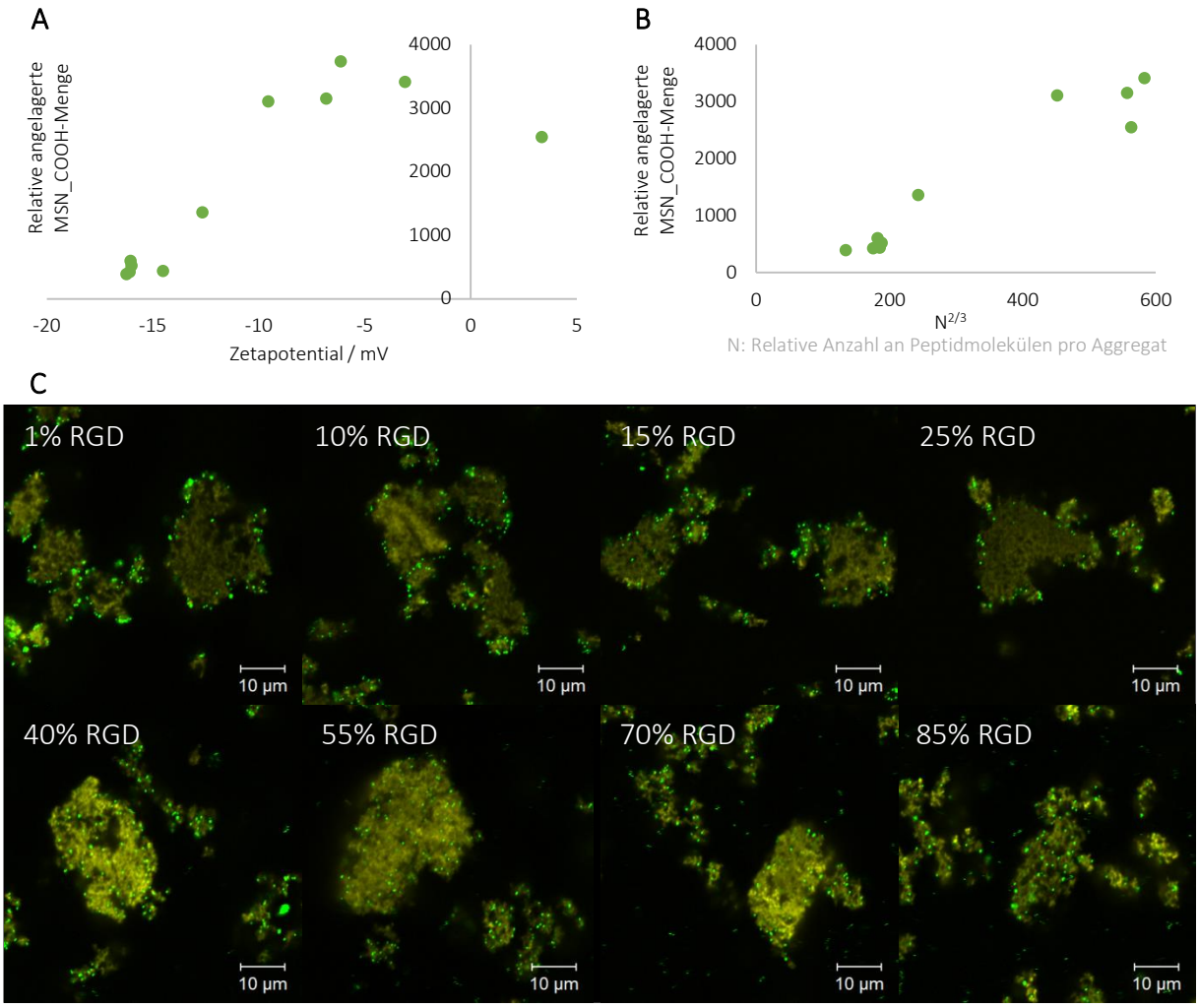


Abbildung 45: Zusammenhang zwischen relativer angelagerter Partikelmenge pro Aggregat und (A) Zetapotential in 1 mM KCl (pH 5,5) sowie (B) der äußeren Oberfläche der Aggregate, welche von der Peptidmolekülanzahl pro Aggregat N abgeschätzt wurde ($N^{2/3}$). Die Anzahl der Peptidmoleküle wurde hierbei mittels durchflusszytometrischer Messungen der PNF mit 1 mol% ATTO647N-markierten Peptiden ermittelt. Dabei ist die erhaltene durchschnittliche Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Peptidmoleküle pro Aggregat. (C) Untersuchung der 45-minütigen adsorptiven Anlagerung von MSN_{COOH} an die Mischfibrillen aus PEP und PEP_{RGD} mit variierendem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid (1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol%) mittels Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün).

Ein weiterer Grund könnte wie schon bei den Fibrillen von den reinen Peptiden PEP und PEP_{RGD} auch das Aggregatvolumen und die damit verbundene äußere Aggregatoberfläche sein. Geht man von homogenen, etwa sphärischen Aggregaten aus, so kann eine Abschätzung der äußeren Aggregatoberfläche anhand der relativen Anzahl an Peptidmolekülen pro Aggregat vorgenommen werden. Hierbei ist die Anzahl der Peptidmoleküle proportional zum Aggregatvolumen. Um von diesem auf die äußere Oberfläche schließen zu können, muss zunächst die 3. Wurzel genommen werden, um vom relativen Volumen auf den relativen Radius zu schließen. Anschließend wird der Radius quadriert, um die relative äußere Oberfläche der Aggregate zu erhalten. Somit sollte die äußere

Oberfläche proportional zu $N^{2/3}$ sein. Die Anzahl der Peptidmoleküle in den jeweiligen Aggregaten wurde hierbei mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die Peptide PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO647N-NHS-Ester umgesetzt und Stocklösungen mit jeweils 1 mol% fluoreszenzmarkierten Peptiden hergestellt. Nach 24 h Inkubation bei RT in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) wurden die erhaltenen PNF am Durchflusszytometer vermessen, wobei die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Peptide in den Aggregaten ist. Trägt man die relative Menge an angelagerten MSN_{COOH} pro Aggregat gegen die Werte für die relative äußere Oberfläche der Aggregate auf (Abbildung 45B), ist ein linearer Zusammenhang erkennbar, welcher darauf hindeutet, dass eine Korrelation zwischen diesen beiden Größen besteht. Setzt man die Aggregatvolumen der mit MSN_{COOH}-angelagerten PEP- und PEP_{RGD}-PNF ins Verhältnis, ergibt sich für die RGD-funktionalisierten PNF eine Aggregatgröße, welche 15 ± 11% der Größe der unfunktionalisierten Aggregate ausmacht. Hierzu wurde jeder erhaltene Wert für das Aggregatvolumen der PEP-PNF aus den Einzelmessungen der DLS mit jedem erhaltenen Wert für die Einzelmessungen der PEP_{RGD}-PNF ins Verhältnis gesetzt und aus diesen Werten Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Der angegebene Fehler fällt aufgrund des hohen Fehlers bei der Bestimmung der Aggregatvolumen mittels DLS etwas größer aus. Vergleicht man diesen Wert mit der relativen Anzahl angelagerter MSN_{COOH} pro Aggregat für PEP-PNF im Vergleich zu der der PEP_{RGD}-PNF, für welchen sich ein Bereich von 15 ± 2% ergibt, liegen die beiden Werte in der gleichen Größenordnung und zeigen deutlich, dass es sich bei der geringeren Partikelanlagerung pro Aggregat um einen Größeneffekt der Aggregate handelt. Die Partikelanlagerung pro Aggregat nimmt also mit steigender Anzahl an Peptiden im Aggregat und der damit verbundenen äußeren Aggregatoberfläche sowie der Aggregatgröße zu. Da für die Aggregate mit hoher Peptidanzahl insgesamt weniger größere Aggregate vorliegen, verkleinert sich hierbei auch die zur Anlagerung insgesamt zur Verfügung stehende Oberfläche der Fibrillen, was zu einer dichteren Partikelanlagerung führt, wie es auf den konfokalmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 45C zu sehen ist. Durch diese Aufnahmen können zudem Rückschlüsse auf die Lokalisation der Partikel gezogen werden. Während für die Fibrillen mit geringerem RGD-Anteil noch eine ziemlich dichte Partikelanlagerung auf der Außenseite der Aggregate beobachtet werden kann, nimmt die Dichte der angelagerten Partikel mit steigendem Anteil an RGD-Peptid immer weiter ab bis lediglich vereinzelte homogen verteilte Partikel sichtbar sind. Für alle Fibrillen liegen die Partikel gleichmäßig verteilt über die äußere Aggregatoberfläche vor und es kommt zu keiner ersichtlichen Agglomeration von Partikeln. Diese Beobachtung deckt sich mit denen aus den TEM Aufnahmen (Abbildung 43) und fügt sich auch sehr gut zu den Ergebnissen, welche für die reinen PEP- und PEP_{RGD}-Fibrillen erhalten wurden (Kapitel 4.2).

Zusammenfassend lässt sich eine erfolgreiche Anlagerung von MSN_{COOH} an die unterschiedlichen PNF nach 45 min festhalten, welche vom Zetapotential der Aggregate unabhängig zu sein scheint. Zudem konnte das Vorliegen freier Partikel bei MSN_{COOH}-Konzentrationen bis 250 µg/µmol Peptid ausgeschlossen werden. Konfokale sowie TEM Aufnahmen konnten hierbei eine homogene Verteilung der MSN_{COOH} über die äußere Oberfläche der PNF-Aggregate aufzeigen, welche zu einer leichten Absenkung des Zetapotentials führt.

4.3. Zugabe der Partikel während Ausbildung des Fibrillennetzwerkes

Da die Silikapartikel bei Zugabe zu den fertig ausgebildeten Fibrillen lediglich an die Außenseite der Aggregate adsorbieren, legt dies die Vermutung nahe, dass bei Anwesenheit der Partikel während der Fibrillenbildung auch Partikel im Inneren der Fibrillenaggregate eingelagert werden und somit die Partikelanlagerung erhöht werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden die DMSO-Peptidstocklösungen direkt zu einer Partikeldispersion gegeben und diese anschließend bei RT inkubiert (Abbildung 46A). Um Einflüsse durch Konzentrationsunterschiede der Partikel oder der Peptide auszuschließen, wurde ebenfalls eine Partikelkonzentration von 150 µg/µmol Peptid gewählt. Die Partikel wurden in einem Puffervolumen analog zum Volumen für die PNF-Inkubation in Kapitel 4.2 dispergiert und anschließend die Peptidstocklösung zugegeben. Der Inkubationszeitraum wurde hierbei nicht wie bei den reinen Fibrillen mit 24 h gewählt, sondern auf maximal 1 h verkürzt, da es in dem verwendeten Konzentrationsbereich in wässriger Umgebung zu einer Auflösung der Partikel kommt (Kapitel 5.1). Um das Inverse System aus PEP_{RGD} und MSN_{COOH} (PEP_{RGD}_IS) mit dem vorinkubierten PEP_{RGD}-System mit angelagerten MSN_{COOH} vergleichbarer zu machen, wurde das PEP_{RGD}_IS anschließend mit der gleichen Menge Puffer verdünnt, welche beim vorinkubierten System für die Partikelzugabe verwendet wurde.

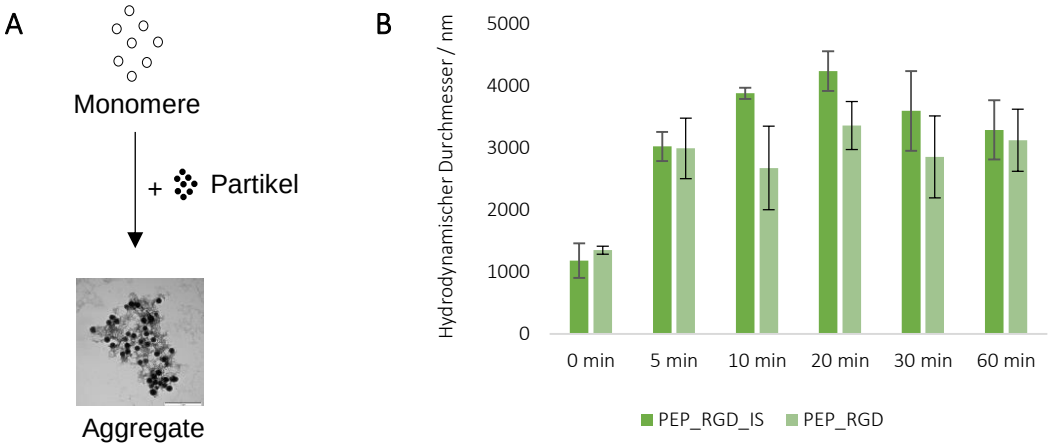


Abbildung 46: (A) Schematische Darstellung der Ausbildung fibrillärer Netzwerke mit MSN_{COOH}-Einlagerung während der Fibrillenbildung (Inverses System (PEP_{RGD}_IS)). (B) Untersuchung der Entwicklung des Hydrodynamischen Durchmessers der Aggregate bei An- und Abwesenheit der Partikel während der Fibrillenausbildung mittels DLS.

Betrachtet man die Entwicklung der Aggregatgröße mittels DLS, so sind wie bereits bei den reinen Fibrillen direkt nach Zugabe der Peptidstocklösung Aggregate detektierbar (Abbildung 46A). Hierbei wurden die Proben wie bereits beschrieben angesetzt und nach der entsprechenden Inkubationszeit mit Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt und DLS sowie Zetapotentialmessungen durchgeführt. Der Verlauf der Größenentwicklung der Aggregate über Zeit weist für die beiden Systeme eine hohe Ähnlichkeit auf. So liegen gleich zu Beginn in beiden Fällen Aggregate mit einem durchschnittlichen Hydrodynamischen Durchmesser von etwa 1200 nm vor, welche ein schnelles Wachstum zeigen und nach einer halben Stunde einen konstanten Wert von ungefähr 3200 nm erreichen. Die Partikel scheinen die Fibrillenbildung weder zu reduzieren noch zu fördern. Betrachtet man das Zetapotential während der Ausbildung des Inversen Systems (PEP_{RGD}_IS), sind keine Änderungen über die Zeit detektierbar (Abbildung 47A). Das Zetapotential liegt hierbei durchgehend zwischen dem Zetapotential der reinen Fibrillen und der reinen MSN_{COOH}.

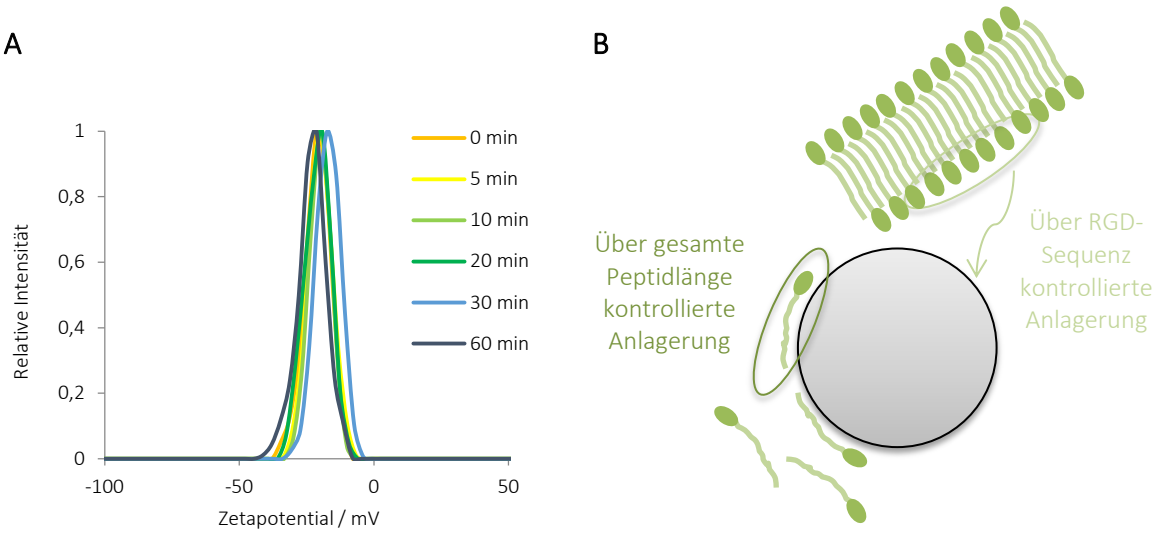


Abbildung 47: (A) Entwicklung des Zetapotentials der Aggregate in 1 mM KCl (pH 5,5) bei Zugabe der MSN_{COOH} während der PNF-Ausbildung über die Zeit sowie (B) die schematische Darstellung der Triebkräfte bei der Anlagerung von fertig ausgebildeten PNF und monomeren Peptiden.

Bei einem genaueren Blick auf die Zetapotentialverteilungen, erkennt man zu jedem Zeitpunkt lediglich ein Maximum. Dies zeigt, dass bereits direkt nach der Zugabe der Peptidstocklösung keinerlei frei vorliegende Partikel mehr vorhanden sind (Abbildung 47A). Es kommt also zu einer sehr schnellen Wechselwirkung zwischen den Peptiden und den Partikeln. Dieser schnellen Wechselwirkung sollten wie bereits bei der nachträglichen Partikelanlagerung die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den RGD-Peptiden und den MSN_{COOH} entgegenwirken. Während jedoch bei den fertig ausgebildeten ß-Faltblattstrukturen die RGD-Sequenzen nach außen stehen und somit die Anlagerung an die negativ geladene Partikeloberfläche erschweren, steht im Falle der monomeren Peptide die gesamte Peptidlänge für eine Wechselwirkung zur Verfügung (Abbildung 47B). Hierbei kann es zu stabilisierenden Wasserstoffbrücken zwischen den funktionellen Gruppen der Partikeloberfläche und dem Peptidrückgrad sowie den geladenen funktionellen Gruppen der Peptidseitenketten kommen, welche eine Anlagerung der Peptide an die Silikapartikel begünstigen. Die an die Partikel adsorbierten Peptide wechselwirken wiederum mit weiteren monomeren Peptiden oder kleineren bereits gebildeten Aggregaten und wachsen somit zu größeren Aggregaten zusammen.

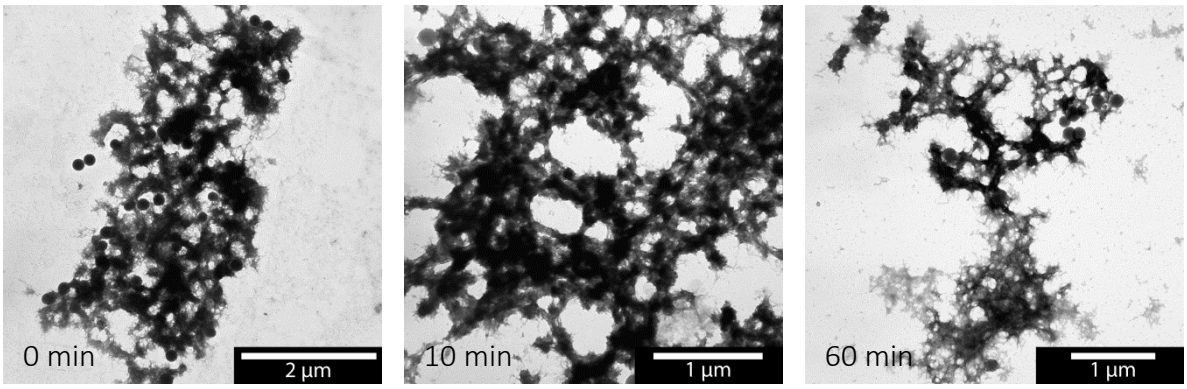


Abbildung 48: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen PEP_{RGD}_IS nach 0 min, 10 min und 60 min. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Verfolgt man den kinetischen Verlauf der Fibrillenausbildung mittels TEM Aufnahmen, welche zu verschiedenen Zeiten (0, 10 und 60 min) nach Zugabe der Peptidstocklösung zur Partikeldispersion und anschließender Pufferzugabe präpariert und mit Uranylacetat kontrastiert wurden, so sind bereits direkt nach der Zugabe der Peptidstocklösung Strukturen erkennbar, welche eine starke Ähnlichkeit mit den fertig ausgebildeten Fibrillen nach 10 bzw. 60 min aufweisen (Abbildung 48). Diese Beobachtung bestätigt eine starke Wechselwirkung zwischen den Partikeln und den zugesetzten Peptiden, wodurch es zu einer Einlagerung der MSN_{COOH} in das fibrilläre Netzwerk kommt. Nach längerer Inkubationszeit bilden sich zudem fibrilläre Strukturen, welche keinerlei Partikel eingelagert haben und sich in ihrer Morphologie deutlich von denen mit eingelagerten Partikeln unterscheiden. Dies legt nahe, dass es zunächst zu einer Wechselwirkung zwischen den Peptiden mit den MSN_{COOH} kommt, wodurch sich Netzwerke ausbilden, welche sich um die Partikel herum ausbreiten. Durch die schnelle Wechselwirkung kommt es zu einer hohen Partikeldichte in diesen Strukturen, was dazu führt, dass nach kurzer Zeit bereits alle Partikel in die Netzwerke eingesponnen wurden. Die nun verbleibenden monomeren Peptide, bilden fibrilläre Strukturen ohne MSN_{COOH} aus, welche in ihrer Morphologie den reinen PEP_{RGD}-PNF sehr ähnlich sind (Abbildung 23). Zudem führt der amphipatische Charakter des PEP_{RGD}-Peptids zu einer schnellen Zusammenlagerung zu fibrillären Strukturen (Kapitel 3.1). Dies kann dazu führen, dass sich Fibrillen ohne eingelagerte MSN_{COOH} in Bereichen mit einer niedrigeren Partikeldichte ausbilden, welche im Laufe der Zeit mit anderen Aggregaten zusammenwachsen können, wodurch eine zweigeteilte Struktur wie in Abbildung 48 entsteht.

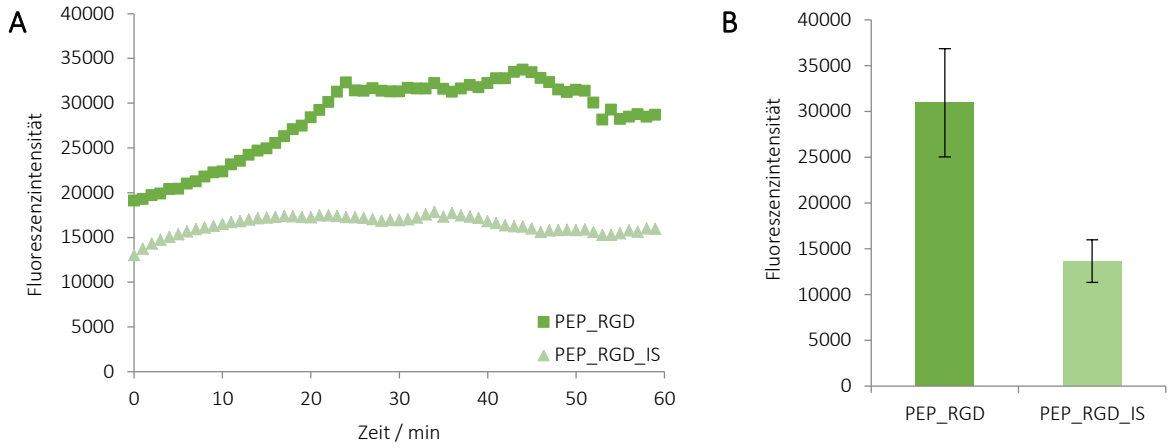


Abbildung 49: (A) Die zeitliche Entwicklung der ß-Faltblattstrukturen während der PNF-Ausbildung bei An- und Abwesenheit von MSN_{COOH} und (B) die Bestimmung der relativen Menge an ß-Faltblattstrukturen mittels der Fluoreszenzzunahme bei Einlagerung von ProteoStat® (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

Bei Betrachtung der ProteoStat®-Einlagerung während der Fibrillenausbildung, wobei das ProteoStat® bereits in der Partikeldispersion vorgelegt wird, wird für das Inverse System wie schon bei den PNF ohne MSN_{COOH} bereits direkt nach Peptidstocklösungszugabe ein Signal detektiert (Abbildung 49A). Es bilden sich also direkt nach Peptidzugabe ß-Faltblattstrukturen aus. Dieser Wert bleibt für die PNF des Inversen Systems nach einem kurzen Anstieg allerdings durchgehend konstant. Diese Daten unterstützen die Beobachtungen in den TEM- und Konfokalmikroskopaufnahmen und stützen somit die These, dass es zu einer schnellen Wechselwirkung der Peptide mit den Partikeln unter Ausbildung kleinerer Aggregate kommt, welche anschließend zu größeren Aggregaten zusammenwachsen und es nicht hauptsächlich durch die Anlagerung monomerer Peptide zum Aggregatwachstum kommt, was eine Fibrillennetzwerkhülle ohne eingelagerte MSN_{COOH} sowie einen Anstieg in den ß-Faltblattstrukturen zur Folge hätte. Zudem weist die deutlich niedrigere Fluoreszenzintensität nach 60 min im Falle des Inversen Systems (Abbildung 49B) daraufhin, dass es zu Änderungen in den Anteilen der ß-Faltblattstrukturen kommt, welche durch mögliche Änderungen in der Sekundärstruktur zustande kommen.

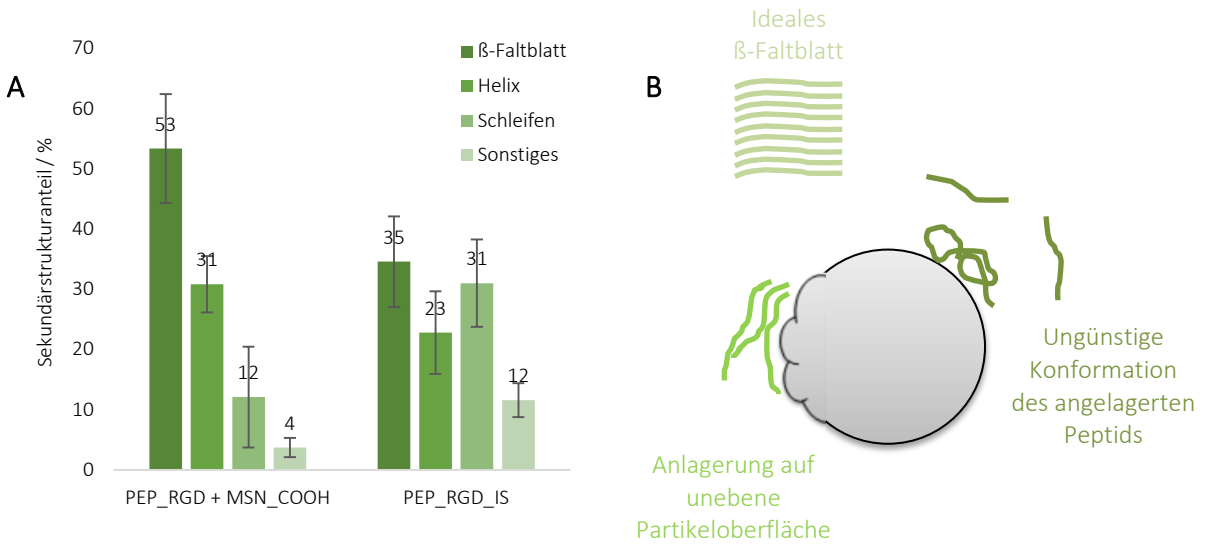


Abbildung 50: (A) Mittels FTIR-Analyse der Amid I-Bande ermittelte Anteile der Sekundärstrukturelemente in den RGD-funktionalisierten PNF in Ab- (PEP_{RGD}) und Anwesenheit (PEP_{RGD}_IS) der MSN_{COOH} während der Fibrillenbildung. Für die Vermessung der Proben wurden diese gefriergetrocknet. (B) Schematische Darstellung der möglichen Anlagerung der monomeren Peptide auf der Partikeloberfläche und deren Probleme bei der Ausbildung von ß-Faltblattstrukturen.

Um die Unterschiede in der Sekundärstruktur genauer hervorzuheben, wurde das PEP_{RGD}_IS 60 min nach Zugabe der Peptidstocklösung mit Puffer verdünnt und lyophilisiert, um eine Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR-Messungen der Amid I-Bande durchzuführen (Kapitel 3.2). Bestimmt man nun die jeweiligen prozentualen Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente an der Amid I-Bande (Abbildung 50A), sind klare Unterschiede erkennbar. Am auffälligsten ist der auch hier deutlich geringere Anteil an ß-Faltblattstrukturen für das Inverse System. Diese bilden die Grundstruktur der fibrillären Fasern aus, welche in den TEM Aufnahmen für PEP_{RGD} in Abwesenheit von Partikeln als lange einzelne Fäden sichtbar sind, welche unter Ausbildung größerer Aggregate zusammenlagern. Für PEP_{RGD}_IS sind die Fasern jedoch nicht mehr so deutlich zu erkennen und es liegen eher kürzere zu dickeren Strängen zusammengelagerte Fasern vor. Die Partikel scheinen also keinen ersichtlichen Einfluss auf die Bildungskinetik der Fibrillen zu haben, dafür jedoch einen umso größeren auf deren Sekundärstruktur. Diese Unterschiede können durch die Wechselwirkung mit den Silikapartikeln entstehen. Zwei unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen könnten hierbei zum Tragen kommen. Einerseits können die Peptide, wenn sie an die Oberfläche der Silikapartikel anlagern, in einer Konformation vorliegen, welche die Ausbildung von ß-Faltblattstrukturen erschwert (Abbildung 50B). Für die Sekundärstruktur des Inversen Systems ist ein hoher prozentualer Anteil an Schleifen detektierbar im Vergleich zu den Fibrillen, welche sich in Abwesenheit der MSN_{COOH} ausgebildet haben (Abbildung 50A). Ein Grund hierfür könnte der verringerte Anteil an ß-Faltblattstrukturen sein. Zudem werden die Aminosäuren Glycin, Asparaginsäure und Serin, welche

den Hauptteil der GGRGDS-Sequenz ausmachen, in ihrer relativen Häufigkeit bevorzugt in Kehrenstrukturen vorgefunden.[289] Diese Präferenz ist jedoch stark von der näheren Umgebung der Aminosäuren abhängig. Im Falle der ohne MSN_{COOH} ausgebildeten PNF kommt es zu einem hohen Anteil an ß-Faltblattstrukturen. Durch die enge Zusammenlagerung der einzelnen Peptide in dieser Konformation wird die Ausbildung der Schleifenstrukturen für die GGRGDS-Sequenz unter Umständen erschwert. Sind während der PNF-Ausbildung bereits MSN_{COOH} vorhanden, nehmen der prozentuale Anteil sowie der absolute Anteil (Abbildung 49A) an ß-Faltblattstrukturen deutlich ab. Dies kann der GGRGDS-Sequenz die Ausbildung der bevorzugten Schleifenkonformation erleichtern. Der ebenfalls erhöhte Anteil an sonstigen Strukturen rührt vermutlich von der schnellen Anlagerung der Peptide an die Silikaoberfläche her, da es hierbei zu mehr ungeordneten Strukturen der Peptide kommen kann, da wie bereits beschrieben die Ausbildung von ß-Faltblättern durch die Wölbung der Partikeloberfläche und durch dort vorhandene Unebenheiten gehemmt werden kann (Abbildung 50B). Auch das Verhältnis zwischen Schleifen- und Helix-Strukturen ändert sich, wenn während der Fibrillenausbildung Partikel anwesend sind. Dies kann durch die weniger starke Ausbildung von ß-Faltblattsträngen im Falle des PEP_{RGD}_IS erklärt werden, welche aufgrund der Ausbildung einer ß-Faltblattdoppelhelix einen großen Anteil der helikalen Strukturen im Falle der PEP_{RGD}-PNF ausmachen. Bilden sich weniger dieser Stränge aus, senkt sich auch der Anteil an helikalen Strukturen.

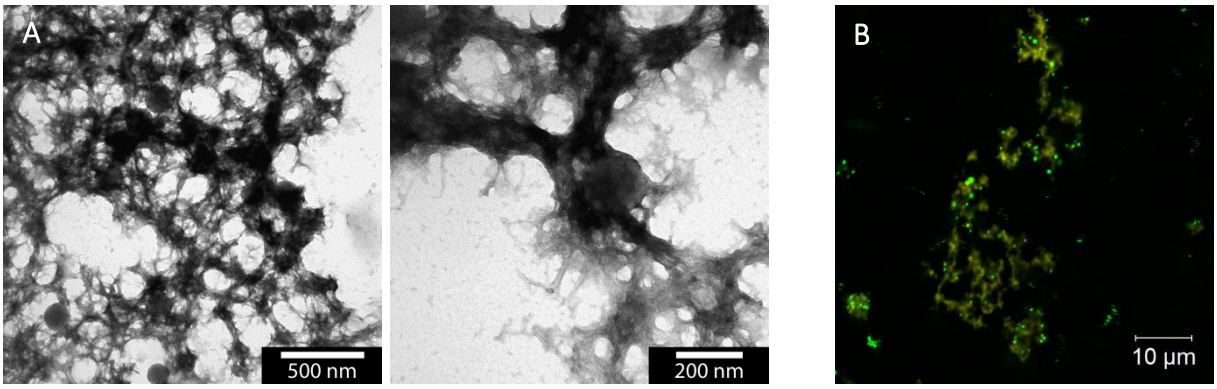


Abbildung 51: Untersuchung der Einlagerung von MSN_{COOH} in die RGD-funktionalisierten Fibrillen bei MSN_{COOH}-Zugabe während der Fibrillenbildung mittels (A) TEM und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Um eine genauere Aussage über die Verteilung der Partikel in den Aggregaten treffen zu können, wurden die Aggregate transmissionselektronen- sowie konfokalmikroskopisch untersucht (Abbildung 51), wobei für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen ATTO488-markierte MSN_{COOH} und eine 10 mol% ATTO647N-markierte PEP_{RGD}-Stocklösung zum Einsatz kamen. Über beide Methoden ist eine

homogene Verteilung der Partikel über das gesamte Aggregat zu erkennen. Dies lässt die Annahme zu, dass sich zunächst viele kleine Fibrillenaggregate mit eingelagerten Partikeln ausbilden, welche im Laufe der Zeit zusammenlagern und somit größere Aggregate ausbilden. Zudem ist in den TEM-Aufnahmen bei Anwesenheit der Partikel während der Fibrillenbildung eine deutlich veränderte Morphologie in den fibrillären Strukturen zu erkennen. Es sind weniger feine lange einzelne Fasern zu erkennen und dafür mehr in dickeren Strängen gebündelte Strukturen, was zu einem sehr dichten Netzwerk führt, in welches die MSN_{COOH} eingelagert sind. Betrachtet man die Einlagerung eines Partikels genauer, so kann man eine nahezu vollständige Ummantelung des Partikels mit fibrillären Strukturen erkennen. Die TEM Aufnahmen lassen vermuten, dass es hierbei zu einer starken Wechselwirkung zwischen den Peptiden und den Partikeln kommt und es nicht lediglich zu einem Einschluss der MSN_{COOH} in das Netzwerk kommt.

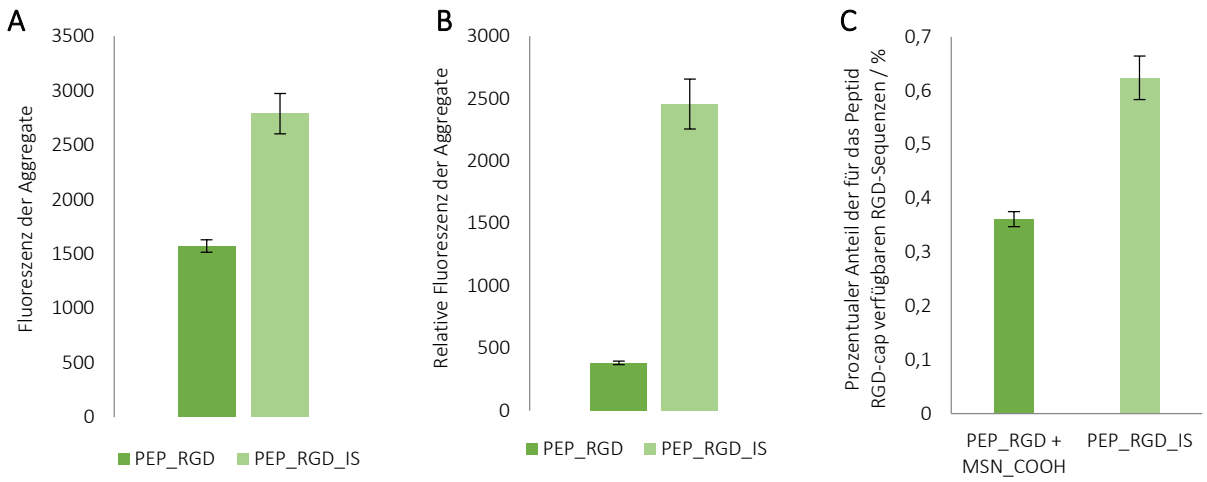


Abbildung 52: Vergleich der ausgebildeten PNF bei An- und Abwesenheit der MSN_{COOH} während der Fibrillenausbildung in Bezug auf (A) die mittels Durchflusszytometrie bestimmte relative Anzahl der Peptidmoleküle pro PNF-Aggregat (1 mol% ATTO647N-markierte Peptide), (B) die mittels Durchflusszytometrie bestimmte relative Anzahl der an- bzw. eingelagerten ATTO488-markierten MSN_{COOH} sowie (C) der über fluoreszenzspektroskopische Analyse der RGD-cap-Anbindung (ATTO488-markiert) bestimmten relativen RGD-Menge, welche auf den Aggregaten für Rezeptorinteraktionen zur Verfügung steht (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm).

Bestimmt man für die fertig ausgebildeten Aggregate mit und ohne eingelagerte MSN_{COOH} mittels Durchflusszytometrie die relative Anzahl der Peptidmoleküle, welche pro Aggregat verbaut wurden (Kapitel 4.2.1), wird für die PNF des Inversen Systems eine nahezu doppelt so hohe Menge an Peptiden pro Aggregat erhalten wie für die ohne MSN_{COOH} inkubierten PNF PEP_{RGD} (Abbildung 52A). Da die über DLS bestimmten Aggregatgrößen der beiden unterschiedlichen Systeme sich jedoch kaum unterscheiden, ergibt sich für das Inverse System eine dichtere Zusammenlagerung der Peptide, was die Beobachtungen aus den TEM Aufnahmen ergänzt (Abbildung 51A). Da mehr Peptide in einem

Aggregat verbaut werden, kommt es somit auch zur Verringerung der Aggregatanzahl. Die Zetapotentialverteilungskurven zeigen keinerlei frei vorliegende MSN_{COOH} (Abbildung 47A), was eine höhere Partikelanzahl pro Aggregat im Falle des Inversen Systems nach sich ziehen sollte. Diese Vermutung konnte mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden (Abbildung 52B). Hierbei liegt für das Inverse System etwa die fünffache Menge an ATTO488-markierten MSN_{COOH} pro Aggregat vor im Vergleich zu den PNF mit nachträglich angelagerten Partikeln. Aufgrund der starken Änderungen in Morphologie und Sekundärstruktur der PNF kann es auch zu Änderungen in der relativen Anzahl der auf der Oberfläche verfügbaren RGD-Sequenzen kommen. Untersucht man die 1-stündige Anbindung des RGD-bindenden und ATTO488-markierten RGD-cap, kann man über die ATTO488-Fluoreszenz der Aggregate für das Inverse System im Vergleich zu PEP_{RGD} eine erhöhte Menge für Rezeptorinteraktionen zur Verfügung stehendes RGD messen. Dies kann zum einen in der veränderten Morphologie begründet liegen, welche bei den PNF des Inversen Systems mehr größere Zwischenräume bietet, in welche das relativ kleine RGD-cap-Peptid hineindiffundieren kann, als im Falle der PEP_{RGD}-PNF und somit eine größere äußere Oberfläche für die RGD-cap-Anbindung zur Verfügung stellt (Abbildung 23; Abbildung 51A). Zum anderen kann die stark unterschiedliche Sekundärstruktur bedeutenden Einfluss auf die Anordnung der RGD-Sequenzen innerhalb der Aggregate nehmen. So kann beispielsweise die bevorzugte Schleifenkonformation zu einer besseren Erkennung der RGD-Sequenz führen, da die Schleifenstruktur der in der Natur vorkommenden zyklischen Form des RGD näher kommt.

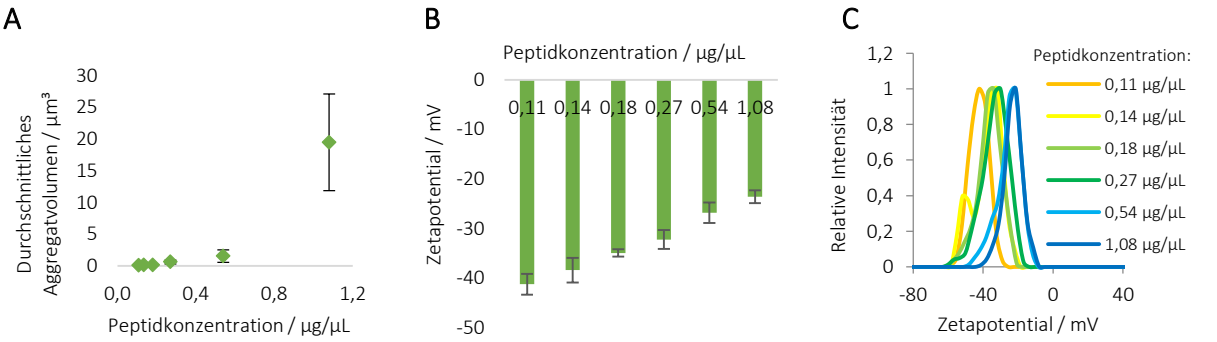


Abbildung 53: Untersuchung des Bildungsmechanismus der PNF des Inversen Systems anhand der Zugabe unterschiedlicher Peptidkonzentrationen zu den MSN_{COOH} mittels (A) DLS und (B) Zetapotentialmessungen in 1 mM KCl (pH 5,5). (C) Auftragung der Zetapotentialverteilungskurven in 1 mM KCl (pH 5,5) nach Zugabe unterschiedlich konzentrierter Peptidstocklösungen (0,11, 0,14, 0,18, 0,27, 0,54 und 1,08 µg/µL Peptidendkonzentration) zur Untersuchung des Bildungsmechanismus des Inversen Systems.

Um den Einfluss der MSN_{COOH} bei der Ausbildung der PNF zu untersuchen, wurde ein genauerer Blick auf den Bildungsmechanismus geworfen. Hierfür wurden zu den MSN_{COOH} unterschiedliche

Verdünnungen der Peptidstocklösung in DMSO gegeben und für 60 min inkubiert. Dieses Vorgehen ermöglicht eine Art „Zeitlupenbetrachtung“ der PNF-Ausbildung um die Partikel herum. Nach Pufferzugabe wurden die Proben hierbei mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt und über DLS als auch Zetapotentialmessungen vermessen. Die DLS ergibt hierbei für geringe Peptidkonzentrationen lediglich einen geringen Größenzuwachs (Abbildung 53A). Erst ab einer Peptidkonzentration von 0,27 µg/µL kommt es zu einer verstärkten Zunahme der Aggregatvolumina. Betrachtet man hingegen das Zetapotential, ist eine stetige Zunahme zu erkennen (Abbildung 53B). Bei einem Blick auf die Zetapotentialverteilungskurven wird deutlich, dass bei einer Peptidkonzentration von 0,11 µg/µL lediglich ein Maximum bei etwa -40 mV vorliegt (Abbildung 53C). Dieses entspricht dem Zetapotential der reinen MSN_{COOH} ohne Peptidzugabe. Auch die Aggregatgröße liegt hierbei im Größenbereich der MSN_{COOH}. Diese geringe Peptidkonzentration scheint also keinen großen Einfluss auf diese Parameter der Partikel zu haben. Erhöht man die Peptidkonzentration ist zunächst die Entstehung eines zweiten Maximums in der Zetapotentialverteilung erkennbar, welches bei -25 mV erscheint und eine Verschiebung des Gesamtzetapotentials hin zu neutraleren Werten mit sich bringt. Die Aggregatgröße steigt in diesem Bereich jedoch lediglich um ein Minimum an. Hier kommt es zur Anlagerung der Peptide an die MSN_{COOH}-Oberfläche. Die Peptidkonzentration ist hierbei noch zu gering, um eine Adsorption an alle Partikel zu gewährleisten, weshalb ein lokales Maximum bei einem Zetapotential von -40 mV bestehen bleibt. Bei weiterer Erhöhung der Peptidkonzentration geht das Zetapotentialsignal bei -40 mV verloren und es entsteht lediglich ein lokales Maximum, welches mit Zunahme der Peptidkonzentration hin zu neutraleren Werten wandert. Für eine Peptidkonzentration von 1,08 µg/µL erreicht es schließlich einen Wert von etwa -20 mV. Diese monomodale Verteilung deutet darauf hin, dass sich keine freien Partikel mehr vorfinden lassen (Abbildung 25B). Die stetige Zunahme des Zetapotentials kann durch den wachsenden Einfluss der angelagerten Peptide erklärt werden (Abbildung 54).

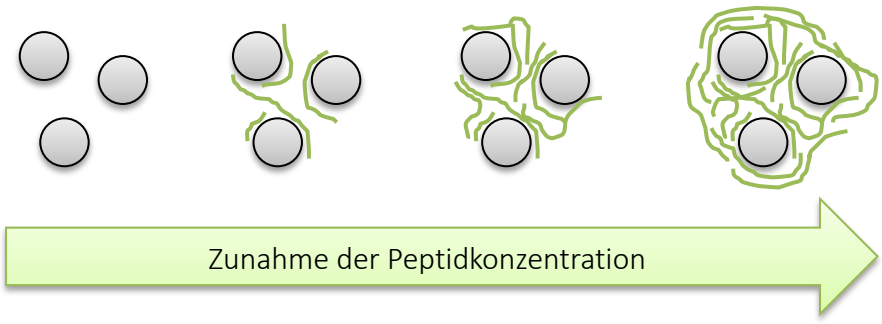


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Peptidanlagerung an die MSNs bei zunehmender Peptidkonzentration.

Während bei geringeren Peptidkonzentrationen einige der Partikel noch an der Oberfläche der Aggregate vorzufinden sein sollten, wo sie einen entscheidenden Einfluss auf das Zetapotential der Aggregate haben, werden diese bei Erhöhung der Peptidkonzentration immer stärker von den fibrillären Strukturen ummantelt, wodurch die Ladungen der Carboxylgruppen auf deren Oberfläche nach außen hin abgeschirmt werden. Zudem kann die zusätzliche Anlagerung neuer Peptide durch starke Wechselwirkungen mit den anderen Peptiden zu einer Verdichtung des ausgebildeten Fibrillennetzwerkes führen, was eine Abschirmung der innen liegenden Peptide zur Folge hätte und somit weniger Ladungen am Zetapotential beteiligt wären, wodurch dieses neutralere Werte annimmt.

Fasst man den Einfluss der MSN_{COOH} auf die Fibrillenausbildung zusammen, so kann gesagt werden, dass das Vorliegen von MSN_{COOH} während der Ausbildung von PNF-Strukturen einen bedeutenden Einfluss auf deren Sekundärstruktur sowie Morphologie hat, während sich Bildungskinetik, Aggregatgröße und Zetapotential nicht stark verändern. Durch eine erhöhte Anzahl an Peptiden pro Aggregat ergibt sich insgesamt eine geringere Anzahl an Aggregaten, welche jedoch nahezu die fünffache Menge MSN_{COOH} eingelagert haben als die PNF mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH}. Mittels der obigen Experimente konnten zudem Rückschlüsse über den Bildungsmechanismus gezogen werden, welche nahelegen, dass sich zunächst Peptide an die MSN_{COOH}-Oberfläche anlagern, welche im Anschluss mit weiteren Peptiden wechselwirken und somit zu einem Wachstum der Aggregate führen, welches die MSN_{COOH} als Wachstumszentren aufweist.

5. Verhalten unter biologisch relevanten Bedingungen

Wird das Wirkstofftransportsystem in den Körper injiziert, ist es den im Körper vorherrschenden Bedingungen ausgesetzt. Zu diesen biologisch relevanten Bedingungen zählen eine erhöhte Temperatur von 37 °C sowie das Vorliegen von Serumproteinen im Blut, welche zu einem neutralen physiologischen pH-Wert führen. Um das Verhalten des Wirkstofftransportsystems basierend auf PNF und MSN_{COOH} im Körper zu untersuchen, wurden das Abbauverhalten der Komponenten sowie die Adsorption von Proteinen unter Ausbildung einer Proteincorona genauer untersucht. Diese Untersuchungen lassen Rückschlüsse über den Verbleib des Wirkstoffträgers im Körper zu und somit auch auf dessen Wirkstofftransporteigenschaften.

5.1. Abbauverhalten der Partikel und Proteolyse der Fibrillen

Um einen effizienten Wirkstofftransport zu gewährleisten, muss das Transportsystem eine gewisse Stabilität unter den physiologischen Bedingungen, welche im Körper vorherrschen, aufweisen. Wird das Wirkstofftransportsystem zu schnell abgebaut, kommt es zur frühzeitigen Freisetzung des Wirkstoffes, was den möglichen proteolytischen Abbau sowie eine unspezifische Aufnahme durch die Zellen als Nebenwirkungen haben kann. Allerdings sollte das Transportsystem auch nicht zu lange im Körper verweilen, um eine ungewollte Ansammlung zu vermeiden. Um einen Einblick in den genauen Ablauf des Abbaus der Partikel und der PNF zu erhalten und den Einfluss der Kombination dieser beiden Komponenten zu analysieren, wurden zunächst die Einzelkomponenten auf ihren Abbau unter physiologischen Bedingungen untersucht und anschließend die PNF-MSN_{COOH}-Aggregate.

5.1.1. Abbauverhalten der Partikel in wässrigen Medien

Die hydrolytische Auflösung der mesoporösen Silikapartikel ist ein wichtiger Punkt für den sicheren Transport von Wirkstoffen im Körper. Hierbei ist eine Stabilität in den ersten Stunden wünschenswert, dass der Wirkstoff ohne größere Verluste zum Zielgewebe transportiert werden kann. Am Wirkungsort angekommen, kann eine Auflösung des Silikagerüsts von Vorteil sein, da die Wirkstofffreisetzung durch Diffusions- und/oder Auflösungsprozesse gesteuert wird.[292] Zur Untersuchung der hydrolytischen Stabilität der MSN_{COOH} wurden diese mit einer Konzentration von 100 µg/mL in Natriumphosphatpuffer mit pH 7,0 unter der Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C inkubiert. Die FCS-Zugabe erfolgte erst nach 45 min Inkubation bei RT, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den später präparierten an PNF angelagerten MSN_{COOH} zu gewährleisten. Der pH 7,0 wurde hierbei stellvertretend für den neutralen pH-Bereich im Blut gewählt. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden die nicht aufgelösten Silikapartikel durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) auf den Siliziumgehalt untersucht (Abbildung 55A).

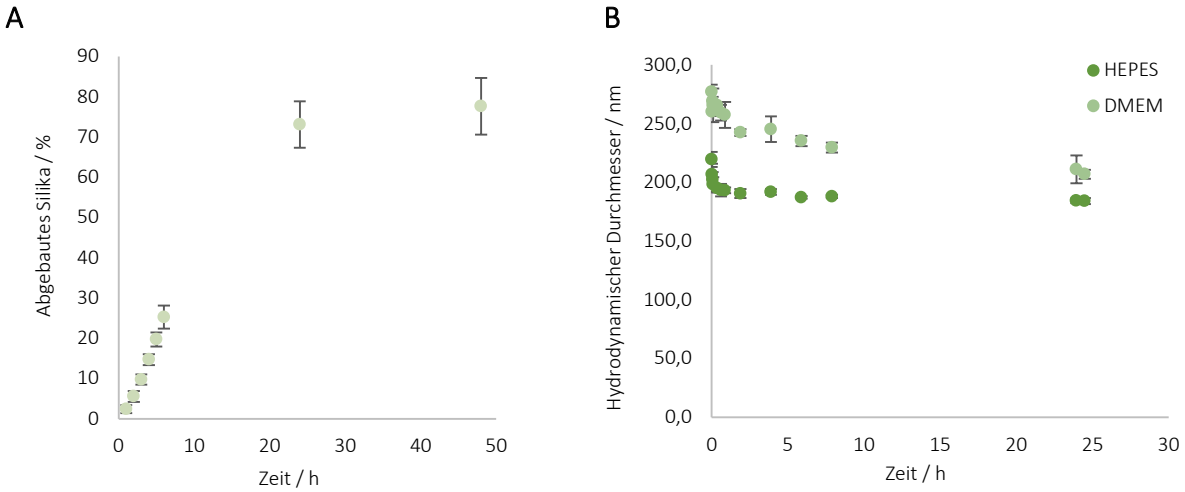


Abbildung 55: (A) Untersuchung des hydrolytischen Abbaus der MSN_{COOH} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C mittels ICP-OES-Analyse der Überstände. (B) Messungen der Stabilität der Partikeldispersion in HEPES-Puffer und Medium mit 10% FCS bei jeweils 37 °C über 24 h mittels DLS. Die verwendete Partikelkonzentration liegt für beide Experimente bei 100 µg/mL.

Hierbei wurde bewusst eine Silikakonzentration unterhalb der Löslichkeitsgrenze für amorphes Silika von 120 µg/mL (25 °C; pH 7,3)[184] gewählt, um den Einfluss möglicher Rückreaktionen zu unterbinden. Für die Bestimmung des prozentualen Anteils der gelösten Silikaspezies am ursprünglich eingesetzten Gesamtsilikagehalt wurde von vollkondensierten Silikaspezies ausgegangen. Dies führt zu einem geringeren Gesamtsilikagehalt als es tatsächlich der Fall ist. Einen genaueren Anhaltspunkt für den tatsächlichen Silikagehalt der Partikel gibt die TGA der MSN_{COOH} (Abbildung 14B). Hierbei liegen bei 1000 °C vollständig kondensierte Silikapartikel vor, was für die carboxylierten Partikel einen Silikagehalt von etwa 90% ergibt. Betrachtet man die zeitliche Entwicklung des Anteils an gelöstem Silika, ist ein zu Beginn langsamer Anstieg zu beobachten, welcher erst nach 24 h ein Maximum bei knapp 80% erreicht. Um zu untersuchen, ob die unvollständige Auflösung der Partikel durch eine Sättigung der Lösung verursacht wurde, wurde die Löslichkeitsgrenze durch ICP-OES-Analyse des Überstandes einer Partikeldispersion mit einer Partikelkonzentration von 1 mg/mL in Natriumphosphatpuffer mit pH 7,0 mit 10% FCS nach Inkubation bei 37 °C für 7 Tage bestimmt. Hierbei ergab sich ein Wert von 87±2 µg/mL, welcher unterhalb der zuvor angenommenen Löslichkeitsgrenze von 120 µg/mL liegt. Da der pH-Wert in diesem Experiment mit pH 7,0 kaum vom in der Literatur verwendeten pH von 7,3 abweicht, spielen vermutlich die Unterschiede in der Ionenkonzentration sowie die Zugabe von Serumproteinen eine entscheidende Rolle, wodurch es zu einer reduzierten Silikalöslichkeit unter den gegebenen Bedingungen kommt im Vergleich zur Löslichkeit unter den Bedingungen in der Literatur. Durch das Überschreiten der Löslichkeitsgrenze kann es zu Rückreaktionen des gelösten Silikas kommen. Zudem erfolgt der hier beobachtete Abbau

langsamer als in der Literatur bisher für Konzentrationen unterhalb der Löslichkeitsgrenze beschrieben, was sich ebenfalls durch die reduzierte Silikalöslichkeit erklären lässt.[186,192] So konnten Braun *et al.*[192] beispielsweise bei einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL einen nahezu vollständigen Abbau der MSN mit einem Durchmesser von 200 nm in simulierter Lungen- und Körperflüssigkeit sowie in PBS bereits nach 6 h beobachten, während für die hier untersuchten Partikel bei gleicher Konzentration in Natriumphosphatpuffer mit 10% FCS zu diesem Zeitpunkt gerade einmal etwa 25% abgebaut wurden. Dieser langsamere Abbau könnte neben dem Überschreiten der Silikalöslichkeit durch einen höheren Kondensationsgrad der Partikel durch die Kalzinierung erhalten werden, da in diesem Fall weniger Silanolgruppen auf der Partikeloberfläche für den nukleophilen Angriff des Wassers zur Verfügung stehen, wodurch es zu einer langsameren Auflösungskinetik kommt. Hierbei nehmen neben der Tensidentfernung auch die verwendete Silikaquelle sowie Reaktionstemperatur und pH entscheidenden Einfluss auf den Kondensationsgrad.[293] Eine weitere Ursache für die gehemmte Auflösung könnte die Oberflächenfunktionalisierung der Partikel mit Carboxyethylgruppen sein. So konnten Izquierdo-Barba *et al.*[196] zeigen, dass organische Funktionalisierungen eine Schutzschicht bilden, wodurch der nukleophile Angriff des Wassers ebenfalls gehemmt wird. Auch Unterschiede in der spezifischen Oberfläche sowie den Porendurchmessern nehmen Einfluss auf die Auflösungskinetik der Partikel.[192,195,294,295] Zudem wäre denkbar, dass die Zugabe von Serumproteinen durch Ausbildung einer Proteincorona ebenfalls zu einer Schutzschicht auf den Partikeln führt und somit den Auflösungsprozess verlangsamt. Dies würde auch zu den Ergebnissen von Izquierdo-Barba *et al.*[196] passen, welche ebenfalls eine geringere Auflösung in Anwesenheit von Serumproteinen beobachten konnten. Hao *et al.*[294] detektierten allerdings einen gegenläufigen Prozess, wobei es durch die Zugabe von fötalem Rinderserum (FBS) zu einer schnelleren Auflösung der verwendeten MSN kam.

Um einen genaueren Blick auf die Auflösung der Partikel zu werfen, wurden Langzeitmessungen mittels DLS in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2) und Zellmedium mit 10% FCS bei 37 °C durchgeführt. Hierbei wurde der Hydrodynamische Durchmesser der Partikel über einen Zeitraum von 24 h bei einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL vermessen (Abbildung 55B). Es fällt auf, dass der Hydrodynamische Durchmesser der Partikel bei Anwesenheit von Serumproteinen größer ist als es in serumfreiem HEPES-Puffer der Fall ist. Grund hierfür kann die Proteincorona sein, welche sich in Anwesenheit von Serumproteinen ausbildet und Einfluss auf die Hydrathülle nehmen kann. Nach einem kurzen initialen Abfall in der Größe des Hydrodynamischen Durchmessers bleibt dieser anschließend über die Zeit von 24 h konstant bei etwa 200-220 nm. Diese Beobachtung legt den Rückschluss nahe, dass es zunächst bevorzugt zu Löslichkeitsvorgängen an der Grenzfläche zu den

inneren Porenoberflächen kommt, wodurch die Partikel ihre ursprüngliche Größe beibehalten und es lediglich zu einer Porenerweiterung kommt. Bei der Betrachtung dieser Daten ist jedoch zu beachten, dass mittels DLS lediglich Informationen über die Größe nicht aber über die Anzahl der Partikel erhalten werden.

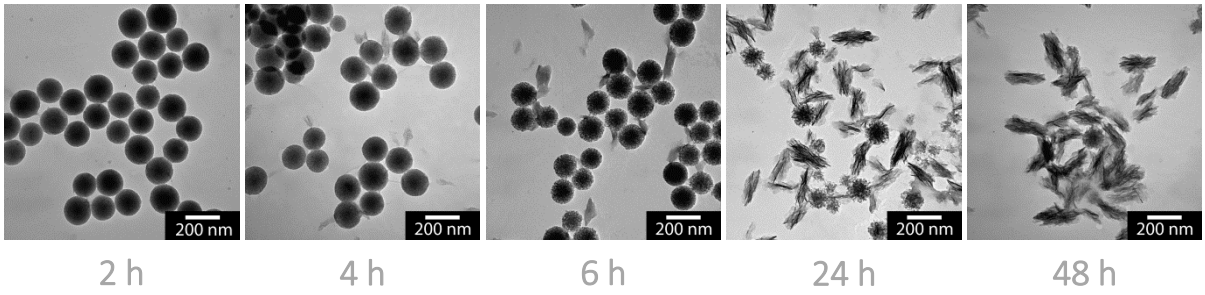


Abbildung 56: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des Partikelabbaus bei einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL in Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C über die Zeit.

Um die Auflösung der Silikapartikel genauer zu analysieren, wurden die Partikel der Rückstände aus den ICP-OES-Proben mittels TEM Aufnahmen untersucht (Abbildung 56). Hierbei sind nach 2 h kaum Änderungen in der Morphologie der Partikel zu erkennen, während mit steigender Inkubationszeit eine Abnahme des Kontrasts sowie eine Zunahme der Unebenheiten der Partikeloberfläche sichtbar werden. Diese lassen sich durch Auflösungsprozesse der Partikel erklären, wobei es durch Ablösen der Silikaspezies auf der großen inneren als auch äußeren Oberfläche des MSN zu einer unebeneren Oberflächenstruktur kommt, was ein weniger dichtes Silikanetzwerk zur Folge hat. Die mit längeren Inkubationszeiten vermehrt auftretenden ungeordneten Strukturen können mögliche Kondensationsprodukte der gelösten Silikaspezies sein, welche aufgrund der Überschreitung der Löslichkeitsgrenze sowie bei der Probenpräparation entstehen können. Hierbei werden die Partikel in Aceton resuspendiert und anschließend auf ein TEM-Trägernetzchen gegeben. Verdunstet das Aceton, kommt es zur Aufkonzentration der gelösten Silikaspezies, wodurch Kondensationsaggregate ausgebildet werden können. Um den Ursprung der Kondensate genauer zu untersuchen, könnten zusätzliche Waschschritte vor der Probenpräparation durchgeführt werden, um gelöstes Silika vollständig zu entfernen. Die TEM Aufnahmen zeigen nach 24 h ebenfalls nur noch wenige sphärische Partikelstrukturen, welche nach 48 h nahezu vollständig verschwunden sind. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der ICP-OES-Ergebnisse, welche ebenfalls eine fast vollständige Auflösung der Silikapartikel nach 24 h ergeben.

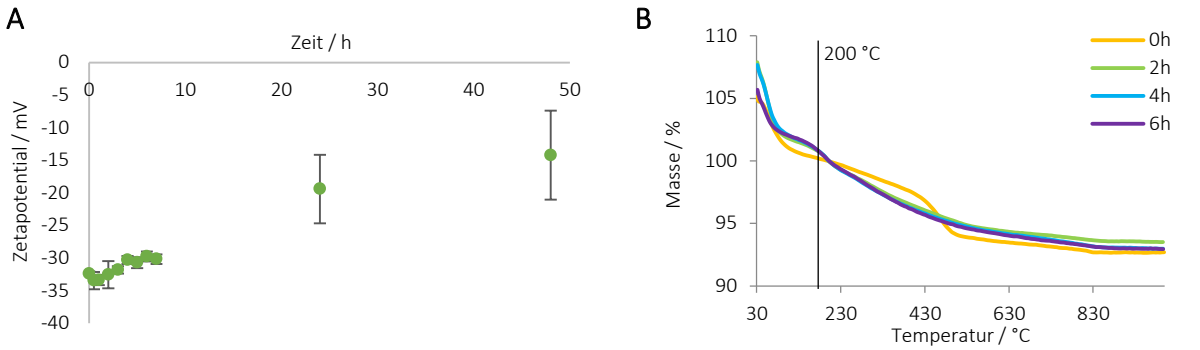


Abbildung 57: Zeitliche Entwicklung des (A) Zetapotentials und der (B) Massenänderung (gemessen mittels TGA) der Partikel MSN_{COOH} bei Inkubation bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) bei einer Konzentration von 100 µg/mL. Für die Zetapotentialmessungen wurden die Partikel zentrifugiert und in 1 mM KCl (pH 5,5) redispergiert.

Um den Einfluss der hydrolytischen Auflösung auf die Funktionalitäten der Silikapartikel zu untersuchen, wurden diese mit einer Konzentration von 100 µg/mL bei physiologisch relevanten Bedingungen (pH 7,0; 37 °C) inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf ihr Zetapotential untersucht, wobei die Partikel zunächst zentrifugiert und anschließend in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) redispergiert und vermessen wurden. Da es durch die Adsorption von Proteinen auf der Partikeloberfläche zur Beeinflussung des Zetapotentials kommt, wurden diese Messungen in Abwesenheit von FCS durchgeführt. In Abbildung 57A ist die zeitliche Entwicklung des Zetapotentials der MSN_{COOH} aufgetragen. Während es zu Beginn lediglich zu einer geringen Änderung der Nettoladung der Partikel kommt, nähert sich diese nach 2 h langsam hin zu weniger negativen Werten bis sie nach 48 h schließlich einen Wert von etwa -15 mV annimmt. Dieser Wert liegt im Größenbereich des Zetapotentials der unfunktionalisierten MSN_{OH} (Tabelle 1). Diese Änderung des Zetapotentials kann sich durch das Ablösen von Silikaspezies und somit der Carboxyfunktionen erklären lassen. Um zu untersuchen, ob sich die geringe Änderung des Zetapotentials in den ersten 7 h auf noch vorhandene Carboxylgruppen zurückführen lässt, wurden die Partikel thermogravimetrisch analysiert. Hierzu wurden nach 2, 4 und 6 h Inkubation bei pH 7,0 und 37 °C die Partikel bei einer Konzentration von 100 µg/mL mittels Zentrifugation abgetrennt, gewaschen und getrocknet, bevor sie schließlich mittels TGA untersucht wurden. Die Massenänderungsverläufe, welche sich ab 200 °C hieraus ergeben, sind in Abbildung 57B dargestellt und weisen deutliche Unterschiede zwischen den unbehandelten und den für unterschiedliche Zeiten in Puffer inkubierten Partikeln auf. Während die MSN_{COOH} zu Beginn einen steilen Massenverlust von etwa 5% bei knapp 500 °C aufweisen, welcher durch die auf der Oberfläche angebrachten Carboxylgruppen verursacht werden kann, ist dieser bereits nach einer Inkubation von 2 h nicht mehr zu beobachten. Der Massenverlauf für die 2, 4 und

6 h-Zeitpunkte sieht hingegen identisch aus und ergibt eine kontinuierliche Massenabnahme mit steigender Temperatur. Die erhaltene Restmasse ergibt für die unbehandelten sowie die angelösten Partikel einen Wert von ungefähr 93%, wobei die unterschiedlichen Verläufe auf unterschiedliche Ursachen für den Masseverlust hindeuten. Eine mögliche Erklärung für diese Messergebnisse könnte der von Lucas *et al.* postulierte Abbaumechanismus für amorphes Silika sein.[296] Während das Silikanetzwerk im Inneren der Materialien bevorzugt vierfachverknüpfte Q^4-Spezies aufweist, liegen auf der Oberfläche hauptsächlich weniger stark verknüpfte Q^3- und Q^2-Einheiten vor. Das Herauslösen von Silikaspezies aus dem Silikanetzwerk erfolgt hierbei durch einen nukleophilen Angriff von Wasser oder Hydroxidionen, was über einen fünffachkoordinieren Silikaübergangszustand zur Abspaltung von monomerer Kieselsäure führt.[190] Die Aktivierungsenergie der hauptsächlich auf der Oberfläche vorliegenden Q^3-Spezies wird durch die in hohen Konzentrationen vorliegenden Natriumionen des Natriumphosphatpuffers gesenkt, wodurch das Herauslösen dieser erleichtert wird.[188] Durch das Ablösen einer Q^3-Einheit aus der Oberfläche kommt es zur Bildung energiereicherer Q^2-Einheiten, welche durch ihre weniger starke Vernetzung eine geringere Aktivierungsenergie für den Ablösungsvorgang aufweisen. Es lösen sich also anschließend Q^2-Spezies aus der Silikaoberfläche heraus bis sich der energieärmere Q^3-Zustand regeneriert hat und der Prozess von vorne beginnt. Das vermehrte Auftreten von Q^2-Silikaspezies in diesem Abbauvorgang führt zu einer erhöhten Anzahl an Silanolgruppen auf der Oberfläche, welche bei neutralem pH deprotoniert vorliegen und somit zu einem deutlich negativeren Zetapotential als das der kalzinierten Partikel führen, da das Kalzinieren der Silikapartikel zu einem erhöhten Kondensationsgrad des Silikanetzwerkes führt, was in einem hohen Anteil an Q^3-Einheiten auf der Oberfläche resultiert und somit die Anzahl an Silanolgruppen senkt. Zudem kommt es im Falle der hydrolysierten Partikel zu einer erhöhten Kondensation von Silanolgruppen auf der Silikaoberfläche im thermogravimetrisch untersuchten Temperaturbereich, was den kontinuierlichen Masseverlust über die Zeit erklärt. Es scheinen also bereits nach 2 h keinerlei detektierbare Carboxylgruppen mehr auf der Partikeloberfläche vorhanden zu sein.

Für eine direkte Anbindung eines Selektivitätsmotivs wie dem RGD an die Partikeloberfläche wäre somit ein sehr schneller Verlust der Zellselektivität zu erwarten. Um diesem Selektivitätsverlust entgegenzuwirken, wurden die Partikel nicht-kovalent an PNF angelagert, welche über längere Zeiträume das Selektivitätsmotiv RGD zur Verfügung stellen sollen. Da die Immobilisierung der Partikel an den fibrillären Strukturen auch Einfluss auf den Partikelabbau nehmen kann, wurde der hydrolytische Abbau der an die Fibrillen angelagerten Partikel ebenfalls untersucht (Abbildung 58). Hierzu wurden die PNF in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) 24 h bei RT inkubiert und anschließend eine Partikeldispersion zugegeben. Es wurde mit einer Partikelkonzentration von

100 µg/mL Medium und 150 µg/µmol Peptid gearbeitet. Nach 45-minütiger Anlagerungsphase wurden 10% FCS zugegeben und die Proben bei 37 °C unter Rotation inkubiert. Der 0 h-Zeitpunkt wurde direkt nach Zugabe der Partikel zu den PNF gewählt, da bereits hier die Auflösung der Partikel beginnt.

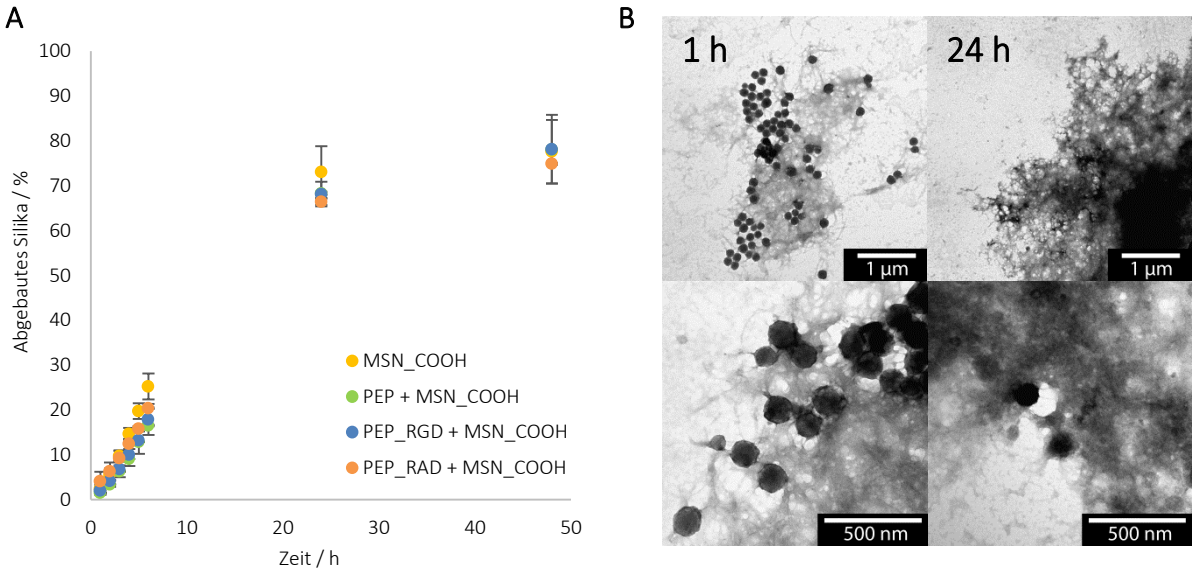


Abbildung 58: Untersuchung des Abbaus der MSN_{COOH} in Anwesenheit der unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C mittels (A) ICP-OES-Analyse der Überstände sowie (B) transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen nach 1 h und 24 h. Die verwendete Partikelkonzentration lag in beiden Experimenten bei 100 µg/mL und 150 µg/µmol Peptid. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Hierbei wird bei der ICP-OES-Analyse der Überstände deutlich, dass die Anlagerung an die unterschiedlichen Fibrillen keinen Einfluss auf den Abbau der Partikel nimmt. TEM Aufnahmen zeigen, dass nach 1 h Inkubation noch zahlreiche Partikel in ihrer ursprünglichen Form an den Fibrillenaggregaten vorzufinden sind, während diese nach 24 h nur noch vereinzelt und in stark abgebauter Form vorgefunden werden können. Grund für diese Beobachtungen ist vermutlich die Anlagerung der Partikel an die äußere Oberfläche der Fibrillenaggregate. Zudem scheint es zu keiner Ummantelung der Partikel mit Peptiden zu kommen, wodurch diese nicht vor dem Abbau durch Hydrolyse geschützt sind und analog zu den freien Partikeln innerhalb von 24 h nahezu vollständig aufgelöst werden.

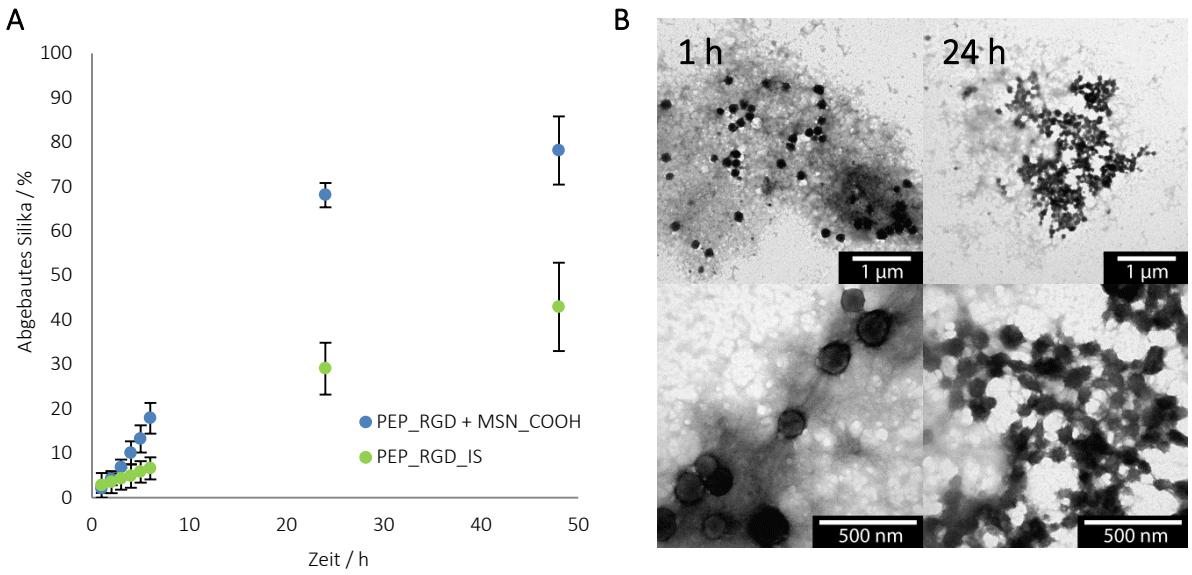


Abbildung 59: Untersuchung des Abbaus der MSN_{COOH} für das PEP_{RGD}_IS sowie das vorinkubierte System PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C mittels (A) ICP-OES-Analyse der Überstände sowie (B) transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen für das PEP_{RGD}_IS nach 1 h und 24 h. Die verwendete Partikelkonzentration lag in beiden Experimenten bei 100 µg/mL und 150 µg/µmol Peptid. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Da im Falle des Inversen Systems eine Einlagerung der Partikel in das dichte Fibrillennetzwerk erfolgt, wurde dieses System analog zu den freien Partikeln auf den Partikelabbau untersucht (Abbildung 59). Die Partikel wurden in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) dispergiert und direkt mit PEP_{RGD}-Stocklösung versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation wurde die Probe mit 10% FCS vermengt und die Probe bei 37 °C rotiert. Der 0 h-Zeitpunkt wurde direkt nach der Dispersion der Partikel in Puffer gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Auflösung startet. Die Partikelkonzentration lag in diesem Experiment ebenfalls bei 100 µg/mL Medium und 150 µg/µmol Peptid, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit mit den anderen Systemen zu erhalten. Im Falle des PEP_{RGD}_IS scheinen die fibrillären Strukturen eine Art Schutzschicht um die Partikel zu bilden, was eine Abnahme des hydrolytischen Abbaus der Partikel nach sich zieht. Selbst nach 48 h ist keine vollständige Auflösung der Partikel beobachtbar. TEM Aufnahmen zeigen auch nach 24 h noch eine Vielzahl vollständig erhaltener Partikel im Fibrillennetzwerk. Grund für diesen gehemmten Abbau kann die starke Anlagerung der Peptide an die Partikeloberfläche sein, wodurch der Kontakt der Partikel mit der wässrigen Phase unterbrochen wird. Zudem erfolgt durch die Ausbildung fibrillärer Netzwerke um die Partikel herum unter Umständen ein Verschluss der Poren, wodurch die große Oberfläche, welche durch das Porensystem entsteht, für den hydrolytischen Abbau nicht zur Verfügung steht. Diese Beobachtungen stärken die Vermutung, dass es durch die Anwesenheit von Proteinen bereits zu einer Absenkung der

Auflösungskinetik kommt, da die Ausbildung einer Proteincorona ebenfalls die Oberfläche vor hydrolytischem Abbau schützen und zudem zu einem Verschluss des Porensystems führen kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die verwendeten MSN_{COOH} die Anforderung an ein biologisch abbaubares System erfüllen. Hierbei kommt es bereits nach wenigen Stunden zu einem deutlichen Abbau der Partikel und innerhalb von 48 h kommt es schließlich zur nahezu vollständigen Auflösung der untersuchten MSN_{COOH}. Der Verlust der Carboxyfunktionalisierung innerhalb der ersten beiden Stunden sowie der Erhalt des Hydrodynamischen Radius der Partikel über 24 h untermauern den von Lucas *et al.*[296] postulierten Abbaumechanismus für amorphes Silika. Auch die nicht-kovalente Anlagerung an die unterschiedlichen Peptidnanofibrillen führte zu einem analogen Abbau der Partikel und zeigte keinen Einfluss auf die Auflösungskinetik dieser. Einen deutlichen Einfluss hierauf hat allerdings die Einlagerung der Partikel in das Fibrillennetzwerk. Hierbei kommt es aufgrund der Abschirmung der Partikel zu einem deutlich langsameren Abbau der Partikel, wobei auch nach 48 h noch eine Vielzahl von Partikeln im Netzwerk beobachtet werden kann.

5.1.2. Proteolyseverhalten der Peptidnanofibrillen

Da auch das Proteolyseverhalten der PNF von großer Bedeutung für die Eignung als Wirkstofftransportsystem ist, wurde der Farbstoff ProteoStat® in die ß-Faltblattstrukturen eingelagert und die Fluoreszenz dieses Farbstoffes bei einer Emissionswellenlänge von 603 nm über die Zeit detektiert, um Rückschlüsse über den noch vorhandenen Anteil an fibrillären Strukturen zu erhalten. Da die Proteine und Proteasen, welche sich im Blutserum befinden, ebenfalls Sekundärstrukturen ausbilden, wurde zunächst die Wechselwirkung von ProteoStat® mit verschiedenen Systemen untersucht. Hierzu wurden PBS, Trypsin (0,05% in PBS), Protease K (100 µg/mL in PBS mit 55 mM $CaCl_2$ zur Aktivierung) und PBS mit 10% FCS mit einer ProteoStat®-Lösung versetzt und über einen Zeitraum von 2 h inkubiert und die Fluoreszenz des Farbstoffes vermessen (Abbildung 60).

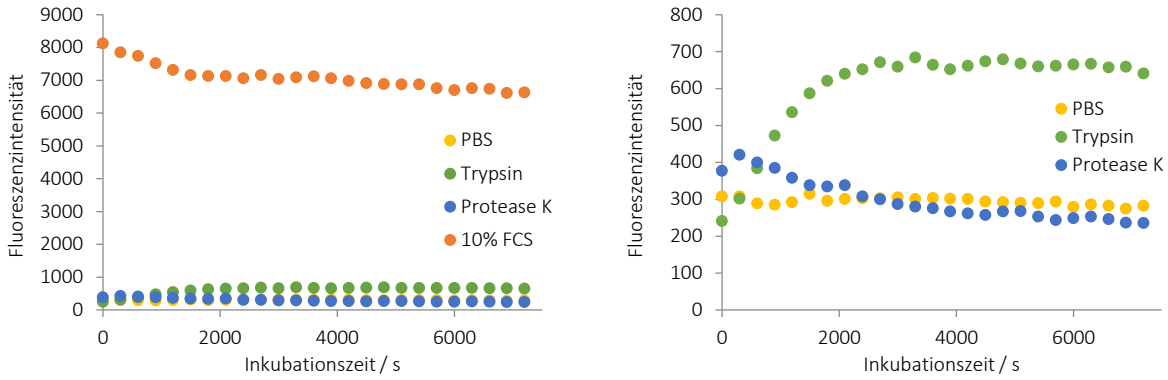


Abbildung 60: Untersuchung der Fluoreszenzintensität des ProteoStat® in PBS, welches mit Trypsin (0,05%), Protease K (100 µg/mL mit 55 mM $CaCl_2$ zur Aktivierung) sowie 10% FCS versetzt wurde, über eine Zeitspanne von 2 h (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

Während die Probe mit 10% FCS eine starke Fluoreszenz aufweist, liegt die Fluoreszenz der anderen Proben bei deutlich niedrigeren Werten. Diese hohen Fluoreszenzintensitäten für die FCS-Probe kommen vermutlich von dem hohen Anteil an Proteinen, welche selbst ß-Faltblattstrukturen ausbilden können und somit ebenfalls zur Einlagerung von ProteoStat® befähigt sind. Betrachtet man die anderen drei Proben, so ist für die Probe mit Trypsin ebenfalls ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtbar bis sich nach etwa 30 min ein Maximum einstellt. Dieses Maximum liegt ebenfalls deutlich oberhalb der Referenzprobe PBS, welche keinerlei Proteine beinhaltet. Lediglich für Protease K wird keinerlei Einlagerung des Farbstoffes detektiert. Da die Einlagerung des ProteoStat® in die Sekundärstrukturen anderer Proteine Rückschlüsse auf den Anteil vorhandener fibrillärer Strukturen unmöglich macht, wurde der Abbau der Fibrillen mittels Inkubation mit der Serinproteinase Protease K untersucht.

Während monomere Peptide häufig Halbwertszeiten von wenigen Sekunden in Anwesenheit von Proteasen aufweisen, kann die Ausbildung von größeren Netzwerken aufgrund von Wechselwirkungen zwischen einzelnen Peptiden zu einer erhöhten proteolytischen Stabilität der Peptide führen.[54] Inkubiert man nun die in PBS nach 24 h bei RT fertig ausgebildeten Fibrillen mit einer ProteoStat®-Lösung und versetzt diese anschließend mit einer Protease K-Lösung (100 µg/mL in PBS mit 55 mM $CaCl_2$ zur Aktivierung der Protease K), kann man den Abbau der fibrillären Strukturen durch Messung der Fluoreszenz des Farbstoffes bei einer Emissionswellenlänge von 603 nm über eine Zeit von 2 h verfolgen. Für die Fibrillen wurden Konzentrationen von 26,2 µM analog zu den späteren Zellexperimenten verwendet. Um den physiologischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden die Proben über den gesamten Zeitraum bei 37 °C inkubiert. Abbildung 61A zeigt den Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Fibrillen.

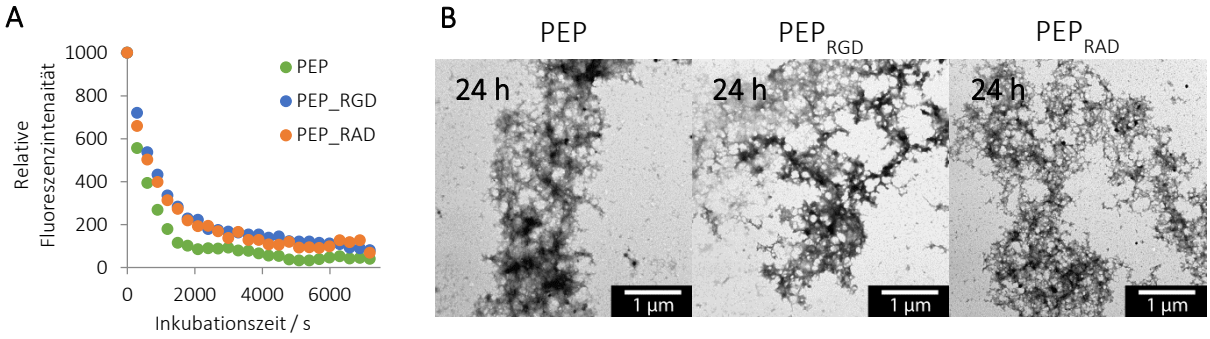


Abbildung 61: Untersuchung des proteolytischen Abbaus der fibrillären Strukturen bei Zugabe von Protease K und $CaCl_2$ zur Aktivierung bei 37 °C durch (A) Änderung der Fluoreszenz des in die Fibrillen eingelagerten ProteoStat® über eine Zeit von 2 h (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm) und (B) durch Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop nach 24 h. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert.

Hierbei ist direkt zu Beginn eine starke Abnahme der Fluoreszenz für alle drei Fibrillen zu beobachten. Dieser Fluoreszenzabfall ist für die unfunktionalisierten Fibrillen PEP stärker ausgeprägt als für die beiden funktionalisierten PEP_{RGD} und PEP_{RAD}. Grund für diese schnelle Abnahme der Fluoreszenz ist vermutlich ein Zusammenspiel aus Umstrukturierungen des dynamischen Fibrillensystems und der Abbau dieser durch die zugesetzte Protease. So sind die fibrillären Netzwerke häufig stabiler gegenüber proteolytischem Abbau, aber durch das Vorliegen eines dynamischen Systems kommt es zur ständigen Assoziation und Dissoziation monomerer Peptide, welche in ihrer freien Form leicht von den Proteasen abgebaut werden können. Da die zusätzlichen Aminosäuren der Peptide PEP_{RGD} und PEP_{RAD} die Wechselwirkungen mit anderen Peptiden im fibrillären Netzwerk verstärken können, erfolgt hierbei möglicherweise eine langsamere Dissoziation der monomeren Peptide, wodurch es zu einem langsameren Abbau dieser kommt. Zudem bilden die PEP-PNF weniger dichte Aggregatestrukturen aus (Abbildung 23), wodurch der proteolytische Abbau schneller ablaufen kann, da im Inneren der Aggregate freigesetzte monomere Peptide durch Diffusion ebenfalls durch die Proteasen schnell abgebaut werden können. Auch die Unterschiede in den Sekundärstrukturen der untersuchten Fibrillen (Abbildung 24B) dürfen hierbei nicht außer Acht gelassen werden, da diese ebenfalls Einfluss auf das Gleichgewicht Monomer-Fibrille haben kann und somit auch mit dem proteolytischen Abbau der Fibrillen gekoppelt wäre. Trotz der starken initialen Abnahme der Fluoreszenz ist aber auch nach 2 h für alle Peptide noch ein Fluoreszenzsignal detektierbar, welches sich auf knapp 10% der ursprünglichen Fluoreszenz beläuft. Da das Grundsignal des ProteoStat® in der Protease K-Lösung von den erhaltenen Werten abgezogen worden ist, kann diese Fluoreszenz noch vorhandenen fibrillären Strukturen zugeordnet werden. Dies deckt sich auch mit Beobachtungen von TEM Aufnahmen der mit Protease K inkubierten Fibrillen (Abbildung 61B), welche selbst nach 24 h noch Fibrillennetzwerke

zeigen. Dieser relativ schnelle initiale Abbau der Peptide konnte auch von Swanekamp *et al.*[59] für das strukturell sehr ähnliche Peptid L-Ac-FKFEFKFE-NH_2 beobachtet werden. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass Swanekamp *et al.* über massenspektrometrische Messungen den Abbau der einzelnen Peptide untersucht haben, nicht aber den Anteil an noch ausgebildeten fibrillären Strukturen. Auch die Abbauprodukte der monomeren Peptide können unter Umständen noch Fibrillenstrukturen ausbilden.

Um einen möglichen Einfluss der nicht-kovalent angelagerten Partikel auf den Abbau der fibrillären Strukturen zu untersuchen, wurden die PNF 45 min mit Partikeln inkubiert und die erhaltenen Fibrillen-Partikel-Aggregate analog zu den reinen Fibrillen mit ProteoStat® und Protease K inkubiert und fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abbildung 62A).

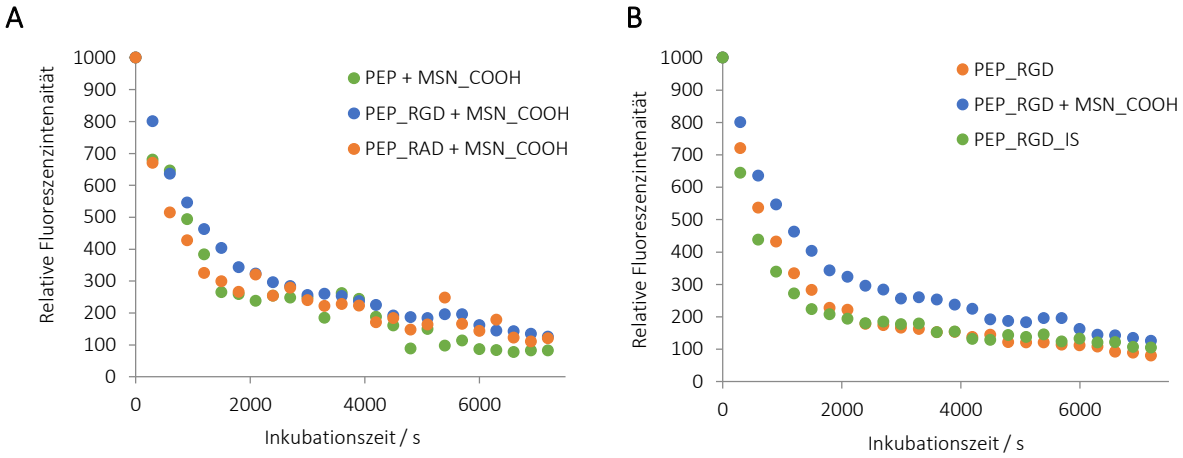


Abbildung 62: Untersuchung des proteolytischen Abbaus der fibrillären Strukturen mit (A) angelagerten MSN_{COOH} für PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} und (B) eingelagerten MSN_{COOH} (PEP_{RGD}_IS) bei Zugabe von Protease K und $CaCl_2$ zur Aktivierung bei 37 °C durch Änderung der Fluoreszenz des in die Fibrillen eingelagerten ProteoStat® über eine Zeit von 2 h (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

Vergleicht man die Kinetik des Abbaus der reinen Fibrillen mit denen der Fibrillen-Partikel-Aggregate, so wird deutlich, dass der initiale Abfall der Fluoreszenz mit angelagerten Partikeln abnimmt. Zudem sind hierbei keine Unterschiede zwischen den drei unterschiedlichen Fibrillen mehr detektierbar. Grund für diesen Angleich der Kinetiken sowie der Abnahme des initialen Abbaus kann die Abschirmung der Fibrillen durch die angelagerten Partikel sein. So kann es bei Dissoziation von monomeren Peptiden zu einer Wechselwirkung mit den angelagerten Partikeln kommen, welche diese vor dem Abbau durch die Proteasen schützen kann. Die Partikel fangen somit die freien monomeren Peptide ab und verlangsamen hierdurch den dynamischen Prozess der Fibrillen, welcher zu ihrem kontinuierlichen Abbau führt. Zusätzlich kann zudem eine Wechselwirkung zwischen den Partikeln und

der Protease K auftreten, wodurch diese auf der Partikeloberfläche immobilisiert wird und die Abbaukinetik der PNF somit verlangsamt wird. In Kapitel 4.2 wurde zudem eine leichte Änderung der Sekundärstruktur für die PEP-PNF nach Anlagerung der Partikel sowie eine Abnahme in der Aggregatgröße beschrieben. Diese beiden Faktoren können ebenfalls Einfluss auf den Abbau der fibrillären Strukturen von PEP nehmen.

Das Inverse System PEP_{RGD}_IS weist deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur im Vergleich zu den PEP_{RGD}-PNF auf, wodurch es zu einem abgeänderten proteolytischen Abbauverhalten kommen kann. Zudem sollte der Einfluss der Partikel bei PEP_{RGD}_IS geringer sein, da diese im Inneren des Netzwerkes vorliegen und bereits eine mit Peptiden besetzte Oberfläche aufweisen. Die nach außen ragenden Fibrillenstrukturen unterliegen somit dem ungehemmten dynamischen Prozess von Assoziation und Dissoziation. Vergleicht man die relativen Fluoreszenzwerte von PEP_{RGD} mit angelagerten Partikeln und PEP_{RGD}_IS (Abbildung 62B), so erkennt man im Falle des Inversen Systems zu Beginn wie erwartet einen schnelleren Abfall der Fluoreszenz. Obwohl das System PEP_{RGD}_IS im Vergleich zu den PEP_{RGD}-PNF deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur aufweist, scheint der Abbau der fibrillären Strukturen dennoch analog zu den reinen PEP_{RGD}-Fibrillen abzulaufen. Begründet liegen kann diese Beobachtung in der Anzahl der Wechselwirkungen zwischen den Peptiden. Da es sich in beiden Fällen um das gleiche Peptid handelt, sind die möglichen Wechselwirkungen zwischen den Peptiden in den ß-Faltblattstrukturen gleich. Da über die ProteoStat®-Einlagerung lediglich der Abbau der ß-faltblattreichen Anteile der Fibrillen detektiert werden kann, ergeben sich übereinstimmende Kinetiken für die beiden Systeme. Betrachtet man nun die bestimmten Halbwertszeiten der untersuchten PNF, spiegeln diese nochmals die bereits beschriebenen Beobachtungen wieder (Tabelle 5).

Tabelle 5: Halbwertszeiten der untersuchten Systeme in Protease K-haltigem PBS (Aktivierung durch Zugabe von $CaCl_2$) bei 37 °C.

Halbwertszeiten	PEP	PEP_{RGD}	PEP_{RAD}	PEP_{RGD}_IS
ohne MSN_{COOH}	7,1 ± 0,3 min	10,8 ± 1,2 min	9,2 ± 1,8 min	-
mit MSN_{COOH}	11,8 ± 3,4 min	15,8 ± 3,9 min	11,2 ± 2,8 min	8,7 ± 2,3 min

Während Peptide in ihrer freien Form oftmals innerhalb weniger Sekunden von Proteasen metabolisiert werden, ergibt sich im Falle der fibrillären Strukturen eine Halbwertszeit von bis zu 15 min. Dennoch handelt es sich um einen schnellen Abbau der Strukturen, welchen auch Swanekamp *et al.*[59] beobachten konnten. Um die Halbwertszeiten der untersuchten Fibrillen weiter

zu erhöhen, wäre der Einsatz von D-Aminosäuren denkbar. Diese kommen in der Natur deutlich seltener vor als die L-Aminosäuren und weisen häufig eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen auf. Verwendet man für die Fibrilleninkubation Gemische aus L- und D-Peptid, so ergeben sich proteolytisch sehr viel stabilere Fibrillennetzwerke.[59]

5.1.3. Zusammenfassung des Abbauverhaltens der Partikel und der Peptidnanofibrillen

Auch wenn die Fibrillen auf den Abbau der Partikel keinen Einfluss zu haben scheinen, verlangsamen die angelagerten Partikel dennoch die Abbaukinetik der fibrillären Strukturen. Grund könnte unter Umständen das Abfangen der frei werdenden monomeren Peptide sowie der Protease K durch die Partikel sein, wodurch deren Abbau gehemmt wird. Im Falle des Systems PEP_{RGD}_IS kommt dieser Effekt durch die in das Netzwerk eingelagerten Partikel nicht mehr zum Tragen, weshalb es hierbei zu keiner Hemmung des proteolytischen Abbaus der ß-Faltblattstrukturen kommt. Allerdings muss beim Vergleich mit den PEP_{RGD}-Fibrillen die unterschiedliche Sekundärstruktur berücksichtigt werden. Diese Einlagerung der Partikel nimmt zwar keinen Einfluss auf den proteolytischen Abbau der ß-Faltblattstrukturen, bringt jedoch eine Hemmung des hydrolytischen Abbaus der Partikel mit sich, wodurch diese auch nach 48 h noch nicht vollständig abgebaut werden. Alles in allem ergibt sich aus den beiden Komponenten ein biologisch abbaubares System, welches lange genug unter physiologischen Bedingungen stabil vorliegt, um sich als Wirkstofftransportsystem zu qualifizieren.

5.2. Proteinadsorption

Ein wichtiger Bestandteil des Blutes sind die darin befindlichen Proteine, welche als Serum- oder Plasmaproteine bezeichnet werden und im Körper die unterschiedlichsten Funktionen wahrnehmen.[218] Die Triebkraft für die Adsorption der Proteine an Festkörperoberflächen kann dabei elektrostatischer Natur sein, aber auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken sowie Van der Waals-Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle.[113] Um die Proteincorona der hier untersuchten Wirkstofftransportsysteme genauer zu analysieren, wurden die PNF 24 h unter Rotation bei 37 °C in Puffer mit 10% FCS inkubiert. Die lose gebundenen Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt.[297] Die Proteine der sogenannten *hard corona* wurden anschließend mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Normalerweise führt die Denaturierung der Proteine zur Ablösung dieser von der Festkörperoberfläche. Da die PNF jedoch auf denselben Wechselwirkungen basieren, welche zur Faltung der Proteine führen, kommt es durch die Zugabe von SDS ebenfalls zur

Auflösung der fibrillären Strukturen. Um zu untersuchen, ob die denaturierten PNF eventuell zusätzliche Banden in der Größenordnung der untersuchten Proteine aufweisen, welche durch kleinere Aggregate verursacht werden könnten, wurden die PNF 24 h bei 37 °C ohne FCS inkubiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Proben analog zu den Proben mit FCS behandelt. Die Proteinlösungen wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Abbildung 63). Die erhaltenen Gele (12%-ig) wurden mit Coomassie-Färbelösung nach Kang *et al.*[298] für 2 h angefärbt, um die Peptide und Proteine sichtbar zu machen.

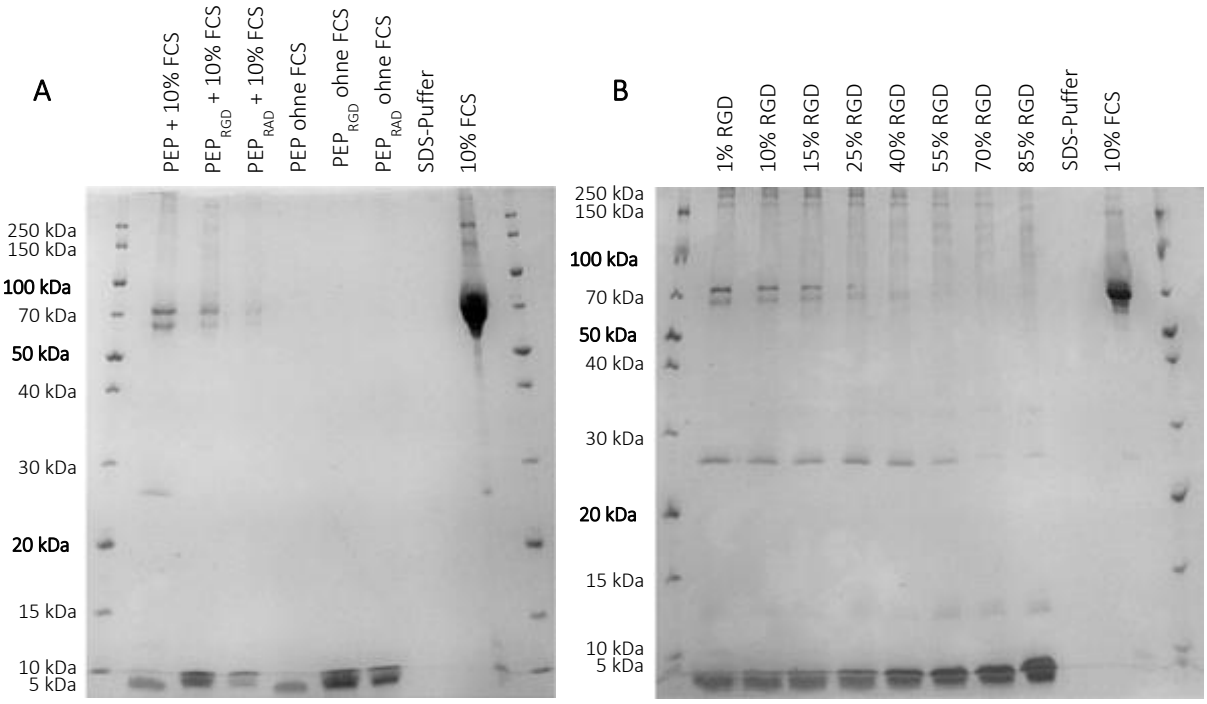


Abbildung 63: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. (A) Gele der Fibrillen von PEP, PEP$_{RGD}$ und PEP$_{RAD}$ nach Inkubation mit und ohne 10% FCS. (B) Gele der Proteinadsorption der Fibrillen in Abhängigkeit des RGD-Anteils. Es wurde je ein repräsentatives Gel aus dreien dargestellt (andere Gele siehe Anhang Abbildung 90 und Abbildung 91).

Betrachtet man die Banden der denaturierten PNF ohne Zusatz von FCS ist lediglich eine breite Bande in der Lauffront des Gels zu erkennen. Diese Bande liegt für die PEP-PNF etwas tiefer und weist eine schmalere Aufspaltung auf als es für die PNF PEP$_{RGD}$ und PEP$_{RAD}$ der Fall ist. Diese Bande liegt bei Molekulargewichten unterhalb 5 kDa und rührt vermutlich von den denaturierten Peptiden mit molekularen Gewichten von 1121-1665 Da her. Für PEP$_{RGD}$ und PEP$_{RAD}$ beginnen die Banden bereits bei der 5 kDa-Bande des Ladders, was durch die Ausbildung kleinerer Aggregate der Peptide verursacht werden kann. Ein weiterer Grund für die verbreiterte Bande könnte auch eine Überladung durch eine

zu hohe Konzentration denaturierter Peptide sein. Aufgrund der schlechten Auftrennung der Bande in der Lauffront können genauere Aussagen hierzu jedoch lediglich durch die Auftrennung auf einem stärker quervernetzten Gel getroffen werden. Da hier das Hauptaugenmerk auf die adsorbierten Proteine der *hard corona* gelegt werden soll und in diesem Bereich keinerlei zusätzliche Banden auftreten, wurde auf die Bande in der Lauffront nicht weiter eingegangen. Alle beobachteten Banden wurden mittels der UniProtKB-Datenbank[299] entsprechenden Proteinen aus dem FCS zugeordnet. Hierbei ist zu beachten, dass die Banden nicht immer Einzelproteinen zuzuordnen sein müssen, sondern auch von einer Mischung unterschiedlicher Proteine herrühren können. Eine genauere Analyse wäre durch die Auftrennung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten mittels 2D-SDS-PAGE mit anschließender massenspektrometrischer Analyse möglich. Diese fortgeschrittene Analyse der gebildeten Proteincorona wurde allerdings im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Betrachtet man die adsorbierten Proteine auf den PNF mit ansteigendem RGD-Anteil, so ist auffällig, dass die Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen mit Zunahme des RGD-Anteils abnimmt. Die stärkste Bande bei 70 kDa resultiert hierbei aus dem Serum Albumin (BSA) (69 kDa), welches mit 50-60% den Hauptbestandteil der Serumproteine ausmacht.[300] Mit steigendem RGD-Anteil nimmt die Intensität der Bande deutlich ab, was sich über das Zetapotential der Aggregate erklären lässt. Shahabi *et al.* konnten einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Zetapotential und BSA-Adsorption für das System der Silikananopartikel beobachten.[224] Zusätzlich treten Banden bei 190, 60 und 25 kDa auf, welche sich dem Immunoglobulin lgE (190 kDa) sowie dem Apolipoprotein A-I (30 kDa) und dem Faktor XIIa Inhibitor (56 kDa) zuordnen lassen. All diese Banden nehmen in ihrer Intensität mit steigendem Anteil an RGD-Peptid ab. Lediglich die lgE-Bande scheint in ihrer Intensität unabhängig von der Zusammensetzung der PNF zu sein. Ab einem RGD-Anteil von 40 mol% wird eine schwache Bande bei 12 kDa sichtbar, welche mit steigendem RGD-Anteil intensiver wird, insgesamt jedoch nur eine schwache Ausprägung der Bande auftritt. Diese könnte von der Hämoglobinuntereinheit α (16 kDa) oder dem Apolipoprotein A-II (11 kDa) hervorgerufen werden. Da die Proteinadsorption auf der Aggregataußenseite stattfindet, hat diese auch einen Einfluss auf das Zetapotential dieser, was sich mittels Zetapotentialmessungen nach Inkubation in Puffer mit 10% FCS nachweisen lässt (Tabelle 6). Um den Einfluss der frei vorliegenden Proteine zu reduzieren, wurden die Proben für 1 h mit 10% FCS inkubiert und anschließend mit Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Durch die Zugabe von FCS kommt es bei den Partikeln als auch bei den Fibrillen zur Proteinadsorption, welche eine Angleichung des Zetapotentials mit sich bringt. Unabhängig vom ursprünglichen Zetapotential und der Menge an adsorbierten Proteinen weisen nach der Proteinadsorption alle Proben einheitliche Werte von -15 bis -18 mV auf.

Tabelle 6: Zetapotentiale der PNF-Aggregate in Puffer mit pH 7,0 und Puffer mit pH 7,0 mit 10% FCS im Vergleich.

	Puffer pH 7,0	Puffer pH 7,0 + 10% FCS
	ζ-Pot / mV	ζ-Pot / mV
PEP	3 ± 1 nm	-15 ± 0,4 mV
PEP_{RGD}	-16 ± 1 nm	-17 ± 2 mV
PEP_{RAD}	-13 ± 2 nm	-18 ± 1 mV
PEP_{RGD}_IS	-24 ± 1 mV	-18 ± 3 mV
MSN_{COOH}	-34 ± 2 mV	-16 ± 1 mV

Da es bei Silikananopartikeln ebenfalls zur Adsorption von Serumproteinen kommt,[219,301] wurde der Einfluss der nicht-kovalent angelagerten MSN_{COOH} auf die *hard corona* der Aggregate untersucht (Abbildung 64A). Hierfür wurden die PNF vor der Zugabe von FCS mit einer Partikeldispersion versetzt und 45 min bei RT inkubiert, um eine Anlagerung der MSN_{COOH} zu gewährleisten.

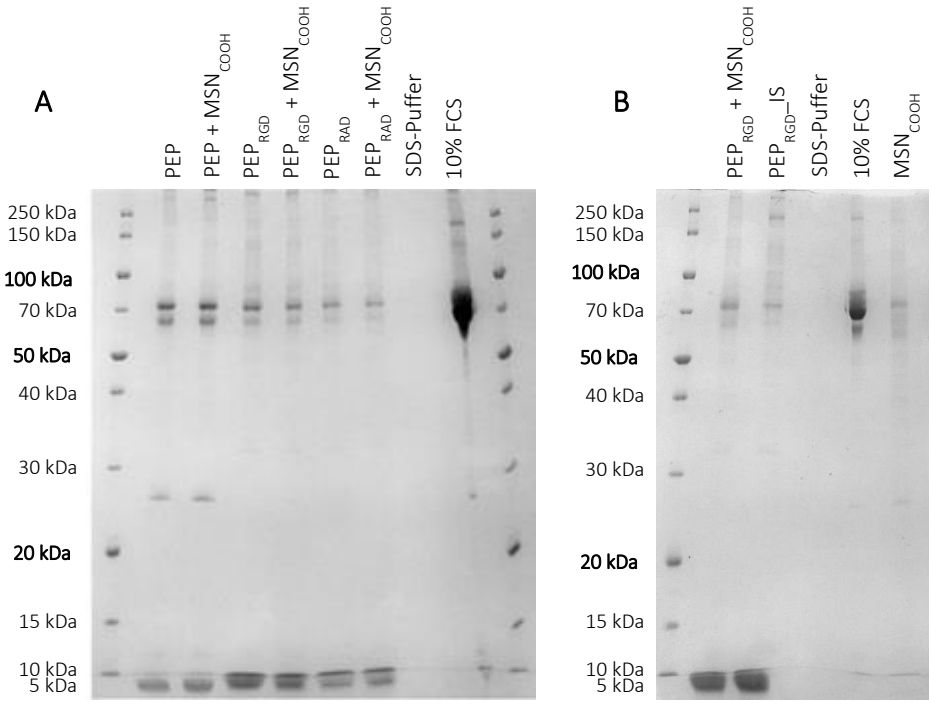


Abbildung 64: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. (A) Untersuchung des Einflusses der nachträglich angelagerten Silikapartikel (MSN_{COOH}) auf die Proteinadsorption. (B) Vergleich der Proteinadsorption von PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} und bei Anwesenheit der Partikel bei Inkubation der Fibrillen (PEP_{RGD}_IS). Es wurde je ein repräsentatives Gel aus dreien dargestellt (andere Gele siehe Anhang Abbildung 92 und Abbildung 93).

Hierbei ist zwischen den Banden der reinen PNF-Aggregate und der Aggregate mit MSN_{COOH} kein Unterschied erkennbar. Dies lässt sich durch die ohnehin schon geringere Proteinadsorption von Partikeln mit stark negativem Zetapotential[224] sowie durch die geringe Konzentration an angelagerten Partikeln (150 µg MSN_{COOH}/µmol Peptid; 90 µg MSN_{COOH}/mL) begründen. In Abbildung 64B ist die Proteinadsorption der MSN_{COOH} ohne PNF dargestellt. Die hierbei verwendete Partikelkonzentration lag etwa 20 Mal höher als bei den Proben mit PNF. Es ist lediglich eine geringe Proteinadsorption zu beobachten, was die Vermutung nahelegt, dass die Partikel an den Aggregaten keinen großen Einfluss auf die Proteincorona haben. Auch wenn es zur Einlagerung der Partikel während der PNF-Ausbildung kommt, nimmt dies keinen deutlichen Einfluss auf die Proteinadsorption auf der Aggregataußenseite. Lediglich die Bande im Bereich 190 kDa (Immunoglobulin lgE) nimmt in ihrer Intensität ein wenig zu. Da die Netzwerke des Inversen Systems dichtere Strukturen ausbilden und somit bei gleichem molaren Ansatz weniger gleich große Aggregate ausbilden als es für die PEP_{RGD}-PNF ohne MSN_{COOH} der Fall ist (Kapitel 4.3), scheint beim Inversen System pro Aggregat eine stärkere Proteinadsorption aufzutreten. Dies kann eventuell die Unterschiede in der Sekundärstruktur sowie der Oberflächenbeschaffenheit der gebildeten PNF als Ursache haben (Kapitel 4.3), da die Anwesenheit der MSN_{COOH} während der PNF-Ausbildung zu Aggregaten mit größeren Zwischenräumen und offeneren Strukturen führt, wodurch es zu einer größeren für die Proteinadsorption zur Verfügung stehenden Oberfläche kommt, obwohl das Aggregatvolumen geringer ist.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass eine Analyse der auf der PNF-Aggregatoberfläche ausgebildeten *hard corona* mittels SDS-PAGE möglich war. Hierbei kam es zu keinen zusätzlichen Banden durch die denaturierten PNF im untersuchten Bereich. Es war eine Abnahme der Gesamtmenge der adsorbierten Proteine mit Zunahme des molaren Anteils an RGD-Peptid detektierbar, welche sich über das Zetapotential erklären lässt. Lediglich im niedermolekulareren Bereich von 12 kDa kam es zur Zunahme der Bandenintensität. Die Anlagerung der MSN_{COOH} zeigte hierbei keinen detektierbaren Unterschied aufgrund der sehr geringen Partikelkonzentration und der geringen Proteinadsorption an die carboxylierten Partikel. Im Falle des Inversen Systems wurde eine zusätzliche Bande im Bereich 190 kDa sichtbar, während die Gesamtintensität der Proteincorona ähnlich zu den PEP_{RGD} mit angelagerten MSN_{COOH} ausfällt, was aufgrund der dichteren Aggregate im Falle des PEP_{RGD}_IS jedoch pro Aggregat eine dickere Proteincorona im Vergleich zu den PEP_{RGD} mit angelagerten MSN_{COOH} zur Folge hat.

6. Evaluation der Biokompatibilität

Geeignete Wirkstofftransportsysteme sollten im Körper möglichst geringe Einflüsse auf das gesunde Gewebe haben. Um die Eignung der Peptidnanofibrillen in Kombination mit den Silikapartikeln als Transportsystem zu testen, wurde die Biokompatibilität genauer untersucht. Hierzu wurde der Einfluss der Komponenten auf die Zellvitalität mittels Zellvitalitätsassay betrachtet.

Da das Wirkstofftransportsystem in reiner Form keine zelltoxischen Effekte hervorrufen sollte, wurde zunächst der Einfluss der Einzelkomponenten auf die Zellvitalität von A549-Zellen mittels Zellvitalitätsassay untersucht (Abbildung 65). Braun *et al.*[302] konnten zeigen, dass sich für Zellvitalitätsuntersuchungen mit Silikapartikeln der CellTiterGlo®-Assay besonders gut eignet, da er eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Zellzählungen im Vergleich zu den MTT- und WST-Assays ergibt. Aus diesem Grund wurden alle Zellvitalitäten unter Verwendung des CellTiterGlo® durchgeführt.

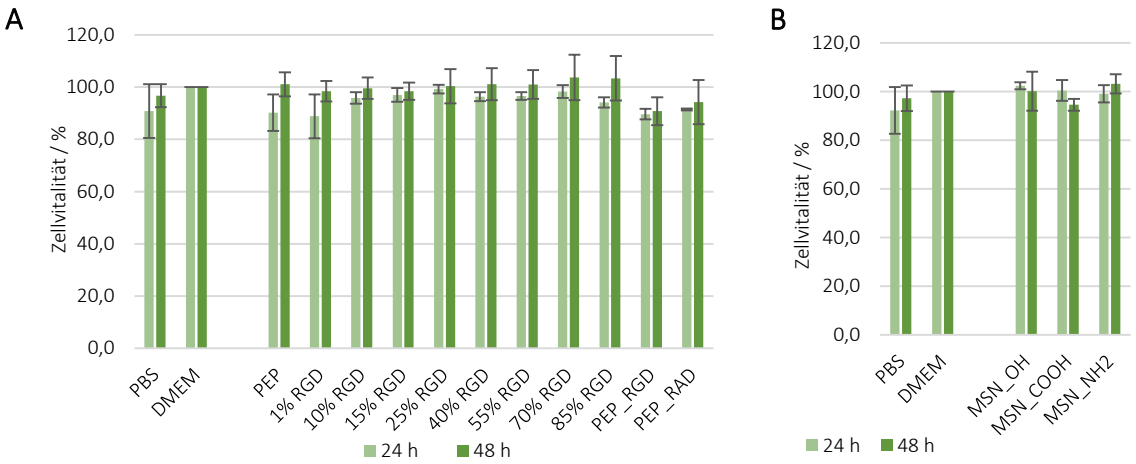


Abbildung 65: Bestimmung des Einflusses der (A) Fibrillen (26,2 µM) und der (B) Partikel (50 µg/mL) auf die Zellvitalität von A549-Zellen nach 24 und 48 h Inkubationszeit. Bestimmt wurde die Zellvitalität mittels CellTiterGlo®.

Betrachtet man die erhaltenen Zellvitalitäten der Fibrillen sowie der unterschiedlich funktionalisierten MSN, sind weder nach 24 noch nach 48 h zelltoxische Effekte zu beobachten. Für diese Untersuchungen wurden die Peptidstocklösungen in PBS für 24 h bei RT inkubiert und anschließend mit Zellmedium auf eine Konzentration von 26,2 µM verdünnt, da diese für alle weiteren Zellexperimente verwendet wurde. Für die Untersuchung der Silikapartikel wurde eine Konzentration von 50 µg/mL gewählt, um den zelltoxischen Einfluss der Partikel auszuschließen. Um einen möglichen Einfluss der Partikelfunktionalisierung auf die Zellvitalität zu untersuchen, wurden die A549-Zellen mit

den unterschiedlich funktionalisierten Partikeln MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} inkubiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Haase *et al.*,[198] welche ebenfalls für unfunktionalisierte Silikapartikel mit 200 nm Durchmesser in diesem Konzentrationsbereich keinerlei toxische Effekte auf A549-Zellen beobachten konnten.

Um die Eignung der Kombination von Silikapartikeln und PNF als Transportsystem zu untersuchen, wurden von den Partikel-Fibrillen-Aggregaten ebenfalls Zellvitalitätsbestimmungen durchgeführt (Abbildung 66A). Hierzu wurden die PNF erneut für 24 h bei RT in PBS angesetzt und anschließend mit einer Partikeldispersion in PBS versetzt (150 µg MSN_{COOH}/µmol Peptid). Nach 45 min Inkubation bei RT wurden die Proben ebenfalls mit Zellmedium auf eine Peptidkonzentration von 26,2 µM verdünnt und zu den Zellen gegeben. Das PEP_{RGD}_IS wurde analog angesetzt, lediglich mit dem Unterschied, dass die Partikel bereits bei der Peptidstocklösungszugabe vorhanden waren und die PNF nur für 60 min inkubiert wurden. Nach 24 bzw. 48 h bei 37 °C wurde die Zellvitalität mittels CellTiterGlo® bestimmt.

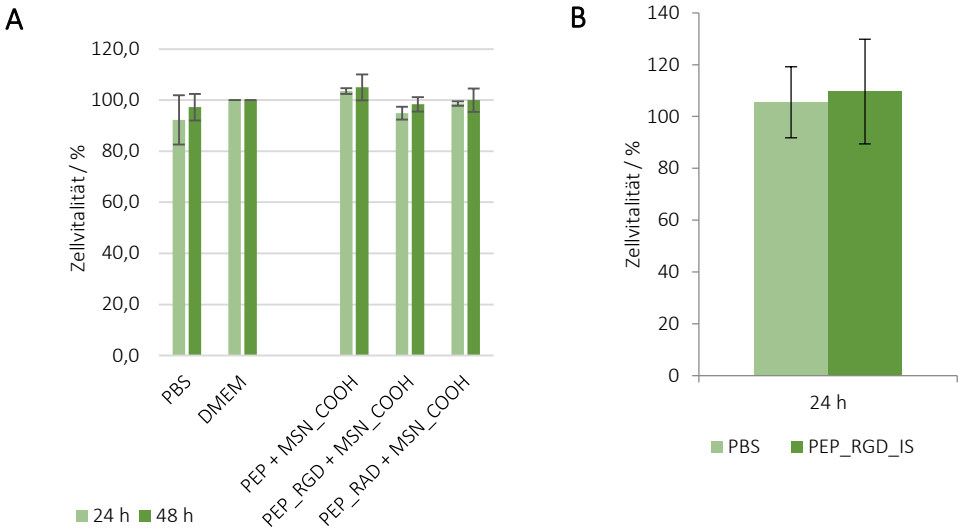


Abbildung 66: (A) Bestimmung des Einflusses der Partikel-Fibrillen-Aggregate auf die Zellvitalität von A549-Zellen nach 24 und 48 h Inkubationszeit und (B) des Einflusses des Systems PEP_{RGD}_IS auf die Zellvitalität von A549-Zellen nach 24 h Inkubationszeit. Bestimmt wurde die Zellvitalität mittels CellTiterGlo®.

Die Aggregate weisen wie schon die Einzelkomponenten auch in Kombination keine zelltoxischen Eigenschaften auf. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da es sich hierbei um eine Kombination zweier nicht-zelltoxischer Einzelbausteine handelt. Da die Anlagerung der Partikel an die Fibrillen keinen Einfluss auf die beiden Einzelsysteme zu haben scheint (Kapitel 4.2), wären durch die nicht-kovalente Kombination der beiden Komponenten auch keine zelltoxischen Einflüsse auf die A549-Zellen zu

erwarten. Auch im Falle des Inversen Systems tritt nach 24 h Inkubationszeit keinerlei Zelltoxizität auf (Abbildung 66B).

Neben ihrer biologischen Abbaubarkeit weisen die untersuchten Systeme auch keinerlei zelltoxische Effekte nach 24 bzw. 48 h auf. Dabei kommt es weder bei den Einzelkomponenten noch bei den unterschiedlichen Aggregaten zu einem Einfluss auf die Zellvitalität. Auch eine Erhöhung der Zellviabilität bleibt aus, welche einen Hinweis auf eine mögliche Stresssituation der Zellen sein kann. Dies qualifiziert diese Systeme für den Einsatz als Wirkstofftransportsysteme.

7. Anwendung als Wirkstofftransportsystem

Neben der biologischen Abbaubarkeit und der Biokompatibilität spielt für die Eignung als Wirkstofftransportsystem auch die Selektivität eine große Rolle. In diesem Kapitel soll zunächst die Zelladhäsion und deren Triebkräfte genauer untersucht werden und anschließend der Transport von hydrophilen und hydrophoben Wirkstoffen analysiert werden. Hierzu wurden Daunorubicin als hydrophiles Zytostatikum sowie DiO als hydrophober Modellwirkstoff eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der Wirkstoffe in wässrigen Medien, können über ihre unterschiedliche Aufnahme ins Zellinnere Rückschlüsse über den Aufnahmemechanismus gezogen werden.

7.1. Zelladhäsion an A549-Lungenkrebszellen

Das in dieser Arbeit untersuchte Selektivitätsmotiv RGD kommt ursprünglich aus dem natürlich vorkommenden Fibronektin, welches an bestimmte Integrinrezeptoren auf Zellmembranen bindet.[303] Integrinrezeptoren sind Transmembranproteine, welche sich jeweils aus einer α- und einer ß-Untereinheit zusammensetzen.[304] Dies führt zu aktuell 24 bekannten unterschiedlichen Heterodimeren, welche aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten sowie ihrer Affinität zu bestimmten endogenen Liganden aus der extrazellulären Matrix in Unterfamilien eingeteilt werden. 8 dieser Heterodimere weisen hierbei eine erhöhte Affinität zum bereits erwähnten Fibronektin auf, wobei 5 dieser Integrinrezeptoren die αV-Untereinheit beinhalten. Um eine RGD-gesteuerte Anbindung an die untersuchte Zelllinie zu gewährleisten, wurden A549-Lungenkrebszellen herangezogen, welche bekanntlich RGD-bindende Integrinrezeptoren auf ihrer Membranoberfläche aufweisen.[271] Um die Anwesenheit dieser Heterodimere zu verifizieren, wurden die Zellen bei 4 °C für 30 min mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, welcher selektiv an die αV-Untereinheit bindet, inkubiert und

durchflusszytometrisch als auch konfokalmikroskopisch untersucht (Abbildung 67). Hierbei wird eine Anlagerung des Antikörpers an die untersuchten A549-Zellen deutlich, welche die Ergebnisse von Giard *et al.*[271] bestätigt. Mit Hilfe konfokalmikroskopischer Aufnahmen kann auch die Lokalisation der Rezeptoren in der Zellmembran visualisiert werden, was eine Internalisierung des Antikörpers anstelle einer Anbindung ausschließt.

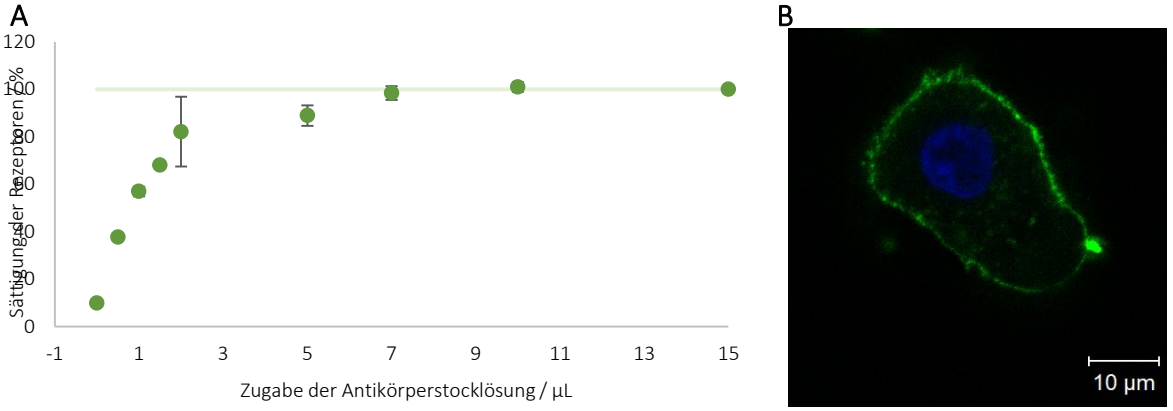


Abbildung 67: (A) Aufnahme einer Sättigungskurve der A549-Zellen mit einem ATTO488-markierten αV-Antikörper bei 4 °C mittels Durchflusszytometrie sowie (B) eine konfokalmikroskopische Aufnahme der bei 4 °C mit ATTO488-markiertem Antikörper gesättigten A549-Zellen (Zellkern: Hoechst - blau; αV-Antikörper: ATTO488 - grün). Die Zellen wurden für beide Experimente nach einer Inkubationszeit von 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung für 30 min fixiert.

Da die A549-Zelllinie befähigt sein sollte, die RGD-Sequenz der PEP_{RGD}-Fibrillen zu erkennen und über ihre Integrinrezeptoren anzubinden, wurden die unterschiedlichen ATTO647N-markierten (1 mol%) Fibrillen für 3 h bei 37 °C bei einer PNF-Konzentration von 52,5 µM mit den A549-Zellen inkubiert, mit 4%-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Abbildung 68A zeigt hierbei die Anlagerung der unterschiedlichen Fibrillenaggregate an die Zellen in Abhängigkeit ihres RGD-Anteils. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der verschiedenen Fibrillenaggregate (Kapitel 3.3), weisen die fluoreszenzmarkierten Fibrillenaggregate starke Unterschiede in ihrer Fluoreszenzintensität auf. Um mögliche Fehlinterpretationen durch diesen Effekt zu minimieren, wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte der durchflusszytometrischen Messung mit der relativen Fluoreszenz der einzelnen Fibrillenaggregate verrechnet und sind daher in Abbildung 68A als relative Fluoreszenzwerte wiedergegeben.

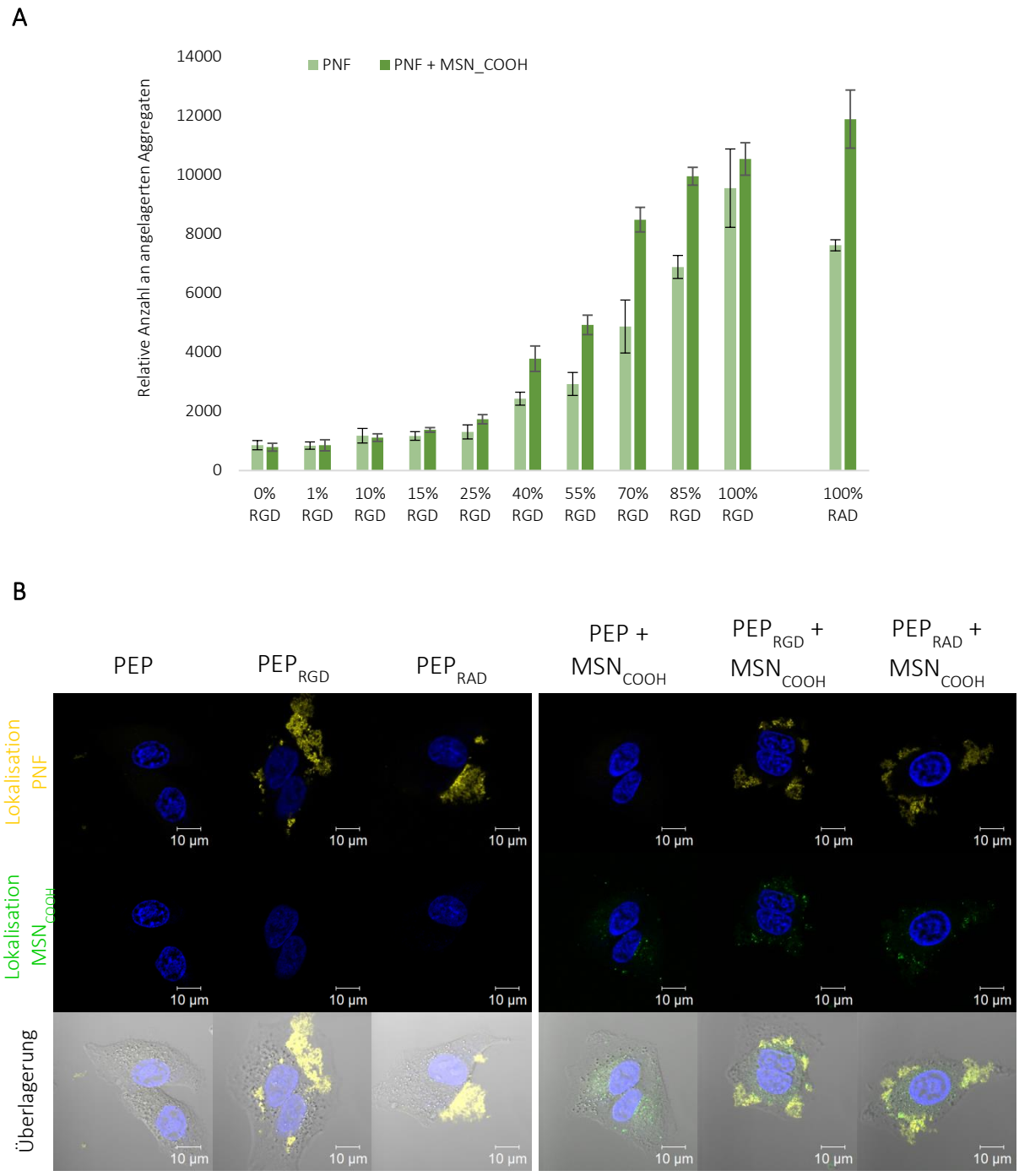


Abbildung 68: Bestimmung der relativen Anzahl nach 3 h bei 37 °C angelagerter Fibrillenaggregate an die A549-Zellen mit und ohne angelagerte MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) über (A) Durchflusszytometrie (PNF: 52,5 µM aufgrund doppelter Zelldichte im Vergleich zur Konfokalmikroskopie) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: 26,2 µM) (Zellkern: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). Die Zellen wurden für beide Experimente mit 4%-iger PFA-Lösung für 30 min fixiert.

Mit Zunahme des RGD-Anteils kann hierbei auch eine Zunahme der Fibrillenanlagerung an die Zellen beobachtet werden. Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen kommt es für die PEP-PNF, welche keinerlei Selektivitätsmotiv aufweisen, dennoch zu einer geringen Anlagerung an die A549-Zellen. Während es zunächst bei geringen RGD-Mengen lediglich zu einer leichten Zunahme der

Zellanlagerung kommt, steigt diese ab einem Anteil von 40 mol% steil an bis sie bei den reinen PEP_{RGD}-PNF ihr Maximum erreicht. Dabei können Ladungseffekte für die Unterschiede in der Anlagerung ausgeschlossen werden, da mit zunehmender Menge an RGD-Peptid das Zetapotential zunehmends negativer wird (Kapitel 3.3), was zu einer zunehmenden elektrostatischen Abstoßung zwischen den Fibrillen und den tendenziell negativ geladenen Zellmembranen führt. Neben einer möglichen rezeptorvermittelten Selektivität aufgrund der RGD-Sequenz könnte auch die Proteinadsorption für diese Unterschiede eine Rolle spielen. So adsorbieren die unfunktionalisierten PEP-PNF deutlich mehr Proteine als die funktionalisierten und auch leichte Änderungen in der Coronazusammensetzung sind beobachtbar (Kapitel 5.2). Durch das Vorliegen der Proteine auf der Aggregataußenseite können diese einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion mit den Zellen nehmen. Zudem weisen die untersuchten Fibrillen Unterschiede in ihrer Sekundärstruktur auf (Kapitel 3.2), was ebenfalls zu Änderungen in der Zelladhäsion beitragen kann. Für die RAD-funktionalisierten PNF ergibt sich eine leichte Abnahme in der Anlagerung an die Zellen im Vergleich zu den PEP_{RGD}-PNF. Diese bietet einen Hinweis auf eine mögliche rezeptorvermittelte Anlagerung der PNF über die RGD-Sequenz, da die RAD-Sequenz aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe am Alanin eine abgeschwächte Anbindung an die Integrine aufweist.[305] Um diesen Effekt zu verstärken, wäre die Verwendung der RGE- anstelle der RAD-Sequenz möglich, welche die Erkennung durch die Integrinrezeptoren nochmals weiter senkt. Die Studien von Kasai *et al.*[100] beschreiben ebenfalls eine rezeptorvermittelte Anbindung RGD-funktionalisierter Fibrillen an Zellen mit Integrinrezeptoren. Auch hier konnte eine Abnahme der Anbindung durch Fehlen der RGD-Einheit bzw. durch Ersetzen dieser durch eine RAD-Sequenz beobachtet werden. Die Arbeiten von Lee mit FKFEFKFE-PNF, welche am *N*-Terminus mit zyklischem RGD bzw. als Negativkontrolle mit zyklischem RDD funktionalisiert sind, zeigen ebenfalls eine bessere zelluläre Aufnahme in Jurkat-Zellen in Anwesenheit der RGD-Sequenz im Vergleich zur verwendeten Negativkontrolle.[95] Die Aufnahme erfolgte hierbei durch Endozytose und ermöglichte es der Arbeitsgruppe hydrophobe kleine Gastmoleküle wie das Nilrot erfolgreich ins Zellinnere zu transportieren. Des Weiteren ergibt sich im Falle der Aggregate mit angelagerten MSN_{COOH} (45 min Anlagerung an PNF; 150 µg/µmol Peptid) eine etwas höhere Fluoreszenz als für die PNF ohne MSN_{COOH}. Ein Grund hierfür könnte der langsamere proteolystische Abbau der fibrillären Strukturen in Anwesenheit der Partikel sein (Kapitel 5.1.2). Nach einer Inkubationszeit von 3 h kommt es hierbei bereits zum Abbau der PNF. Verläuft die Proteolyse durch die Anlagerung der Partikel gehemmt, so weisen die an die Zellen angelagerten Aggregate eine höhere Fluoreszenz auf als es für die reinen PNF der Fall ist, für welche der Abbau bereits weiter vorangeschritten ist. Mit Hilfe konfokalmikroskopischer Aufnahmen konnte die Anbindung der ATTO647N-markierten (10 mol%) PEP-, PEP_{RGD}- sowie PEP_{RAD}-Fibrillen visualisiert werden. Aufgrund einer geringeren Zelldichte im

Vergleich zu den durchflusszytometrischen Experimenten wurde hierbei eine PNF-Konzentration von 26,2 µM eingesetzt, um das Verhältnis zwischen Zellzahl und PNF-Menge konstant zu halten. In Abbildung 68B wird deutlich, dass für die unfunktionalisierten Fibrillen PEP in An- und Abwesenheit der ATTO488-markierten MSN_{COOH} keinerlei Anbindung an die A549-Zellen beobachtet werden kann, was sich auch mit der lediglich geringen Fluoreszenz in den durchflusszytometrischen Messungen für diese PNF deckt. Für die beiden funktionalisierten Fibrillen PEP_{RGD} und PEP_{RAD} kommt es hingegen zur Anlagerung mehrerer Aggregate pro Zelle, wodurch auch am Durchflusszytometer eine deutliche Fluoreszenz für die PNF detektiert werden konnte. Betrachtet man die Partikellokalisation, fällt auf, dass diese nach 3 h Inkubationszeit kolokalisiert mit den PNF vorliegen, was daraufhindeutet, dass die nicht-kovalente Anbindung stark genug ist, um die Partikel an den Fibrillen zu halten, wodurch ein gezielter Transport der Partikel über die PNF in die Zellnähe gewährleistet werden kann.

Aufgrund der geringen Partikelkonzentration an den Fibrillenaggregaten konnte die an die Zellen angelagerte Anzahl an MSN_{COOH} über Durchflusszytometrie trotz ATTO488-Markierung der Partikel nicht bestimmt werden. Und auch konfokalmikroskopische Aufnahmen lassen nur schwer quantitative Rückschlüsse auf die genaue Partikelzahl zu. Da jedoch die Partikel später den Wirkstoff beinhalten, spielen sie eine entscheidende Rolle in der Effektivität des Systems. Da die PEP_{RGD}-Fibrillen deutlich kleinere Aggregate ausbilden und daher auch weniger Partikel pro Aggregat transportieren als es für die PEP-PNF der Fall ist, wurde die über Durchflusszytometrie bestimmte relative Anzahl angelagerter Partikel pro Aggregat (Abbildung 44) mit der durchflusszytometrisch bestimmten relativen Anzahl angelagerter Aggregate pro Zelle (Abbildung 68A) multipliziert, um ein Maß für die relative Anzahl angelagerter Partikel pro Zelle zu erhalten (Abbildung 69).

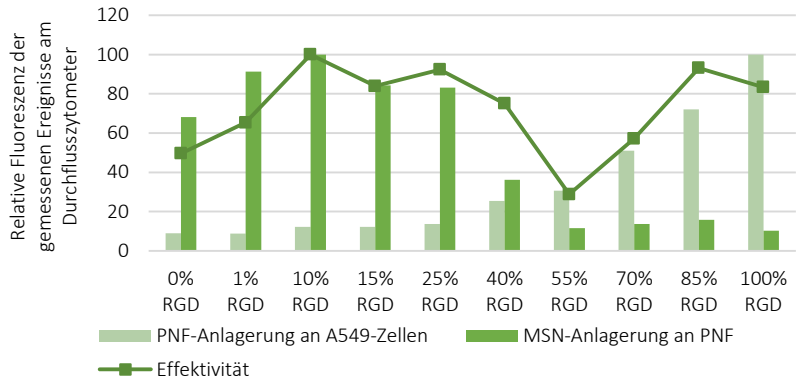


Abbildung 69: Auftragung der MSN_{COOH}-Anlagerung nach 45 min bei RT an die PNF sowie der Anlagerung der PNF an die A549-Zellen nach 3 h bei 37 °C gegen den verwendeten RGD-Anteil der PNF. Die Messungen erfolgten hierbei am Durchflusszytometer unter Verwendung von ATTO488-markierten MSN_{COOH} bzw. ATTO647N-markierten PNF. Durch Multiplikation der beiden Werte kann eine Effektivitätskurve erhalten werden, welche angibt, welche relative Anzahl an MSN_{COOH} in Abhängigkeit vom RGD-Anteil der PNF zu den Zellen transportiert wurde.

Der Verlauf der Effektivitätskurve ergibt für die Fibrillen mit geringem RGD-Gehalt eine starke Abhängigkeit von der Anzahl angelagerter Partikel an die Fibrillen, während mit zunehmendem RGD-Anteil immer mehr die Anlagerung der Fibrillen an die Zellen eine tragende Rolle bei der Effektivität spielt. Am effektivsten für den Partikeltransport zu den Zellen erweisen sich hierbei die Fibrillen mit 10%, 15%, 25%, 85% und 100% RGD-Anteil. Da die Fibrillenanbindung an die Zellen für die Mischfibrillen mit 10%, 15% und 25% RGD-Peptid jedoch im Bereich der unspezifischen Anbindung von PEP liegt und eine Selektivität somit nicht sicher gewährleistet werden kann, wurden für weitere Experimente die reinen PEP_{RGD}-Fibrillen verwendet.

Da die eingelagerten MSN_{COOH} im Falle des Inversen Systems PEP_{RGD}_IS starken Einfluss auf die Sekundärstruktur dieser nehmen, könnten diese auch die Zellanbindung beeinflussen. Hierzu wurden die A549-Zellen ebenfalls für 3 h bei 37 °C mit den PEP_{RGD}- und den PEP_{RGD}_IS-Fibrillen inkubiert und untersucht.

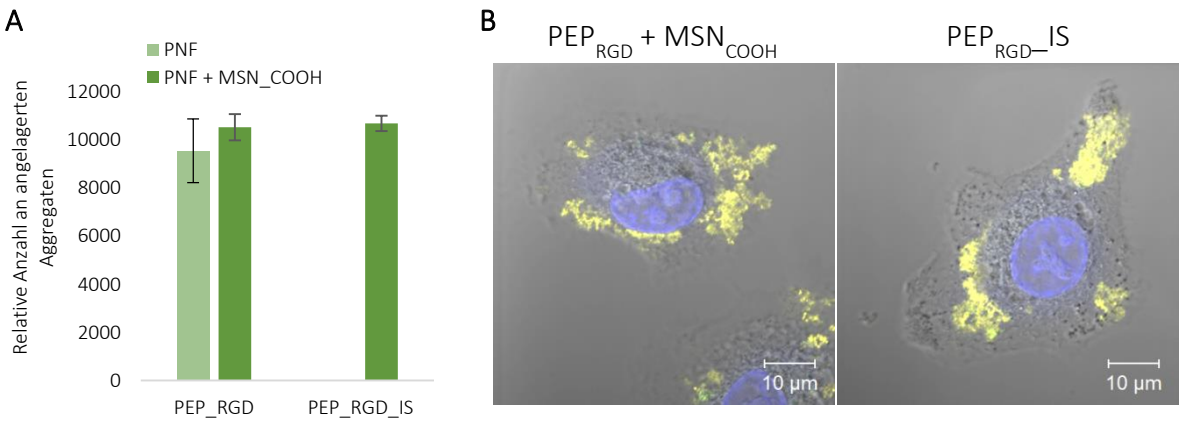


Abbildung 70: Bestimmung der relativen Anzahl nach 3 h bei 37 °C angelagerter Fibrillenaggregate an die A549-Zellen mit und ohne angelagerte MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) im Vergleich zu PEP_{RGD}_IS über (A) Durchflusszytometrie (PNF: 52,5 µM aufgrund doppelter Zelldichte im Vergleich zur Konfokalmikroskopie) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: 26,2 µM) (Zellkern: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb). Die Zellen wurden für beide Experimente mit 4%-iger PFA-Lösung für 30 min fixiert.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen eine vergleichbare Anbindung der beiden Systeme an die Zellen und auch in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen sind keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 70). Obwohl sich die beiden Fibrillenaggregate in ihrer Sekundärstruktur sowie in der Anzahl an- bzw. eingelagerter Partikel und Peptide deutlich voneinander unterscheiden, weisen sie dennoch beide ähnliche Aggregatgrößen und Proteinadsorptionen auf und besitzen eine erhöhte Menge an auf der Oberfläche verfügbaren RGD-Funktionen (Kapitel 4.3). Aufgrund der deutlich höheren Partikelmenge in den PEP_{RGD}_IS-Fibrillen im Vergleich zu den PEP_{RGD}- MSN_{COOH}-Aggregaten ermöglicht der Einsatz des Inversen Systems eine deutlich höhere Partikeltransporteffizienz zu den

A549-Zellen. Allerdings muss in späteren Experimenten noch geklärt werden, was die Einlagerung der Partikel ins Innere der Fibrillennetzwerke für Auswirkungen auf die Wirkstofffreisetzung sowie die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere hat (Kapitel 7.2).

Um eine rezeptorvermittelte Anbindung an die Zellen über die RGD-Sequenz zu verifizieren, wurden die Zellen mit dem kurzen GGRGDS-Peptid für 1 h bei 4 °C gesättigt und anschließend jeweils die Anbindung der PEP_{RGD}- sowie der PEP_{RGD}_IS-Fibrillen untersucht. Um eine Internalisierung der angebundenen GGRGDS-Peptide durch die Integrinrezeptoren zu vermeiden, wurde die Inkubationstemperatur in diesem Experiment durchgehend auf 4 °C gehalten. Da es aufgrund der Inkubationsbedingungen zu sehr starken Schwankungen in den Ergebnissen kam, konnten keine aussagekräftigen Resultate erhalten werden, weshalb nicht sicher gesagt werden kann, ob es zu aktivem Targeting kommt oder ob unspezifische Wechselwirkungen aufgrund des Größeneffekts eine Rolle spielen. Dennoch ist eine deutlich bessere Anlagerung für die RGD-funktionalisierten PNF erkennbar im Vergleich zu den PEP-PNF.

7.2. Applikation zur gezielten Medikamentenfreisetzung

Neben der fehlenden Selektivität vieler Wirkstoffe, kommt es häufig zu weiteren Hindernissen wie einer schlechten Löslichkeit sowie schnellem metabolischem Abbau. Durch den Einsatz von Nanoträgermaterialien wie den MSN können diese überwunden werden.[255-257] Zudem kann mit Hilfe dieser Wirkstoffträger häufig eine effizientere Therapie mit weniger eingesetzter Wirkstoffmenge erreicht werden. Häufig in der Krebstherapie angewendete Wirkstoffe sind die beiden artverwandten Zytostatika Doxorubicin und Daunorubicin. Ihr Wirkmechanismus beruht hierbei auf der Interkalation zwischen die Basenpaare der DNA, wodurch die DNA-Replikation blockiert wird und es somit zum Zelltod kommt.[306] Um die Wasserlöslichkeit des kommerziell erhältlichen Daunorubicinhydrochlorids zu senken, um eine extrazelluläre Freisetzung zu minimieren sowie den Beladungsgrad zu erhöhen, wurde dieses zunächst in wässriger Lösung für 10 min mit Triethylamin neutralisiert und durch Extraktion mit Dichlormethan in die organische Phase überführt. Nach Entfernen des Dichlormethans wurde das neutralisierte Daunorubicin getrocknet. Anschließend wurden die carboxylierten Partikel für 3 h bei 100 °C im Vakuum von adsorbiertem Wasser befreit und in trockenem Dichlormethan für 24 h bei Raumtemperatur mit dem neutralisierten Daunorubicin beladen. Nicht-eingelagertes Daunorubicin wurde durch zweimaliges Waschen mit trockenem Dichlormethan von den Partikeln abgewaschen. Zur Bestimmung des Beladungsgrades wurden die Stocklösung sowie die Überstände

der Beladung und der Waschschritte UV/Vis-spektroskopisch untersucht (λ = 499 nm). Der erhaltene Beladungsgrad ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Für MSN_{COOH} erhaltener Beladungsgrad an neutralisiertem Daunorubicin bei Beladung in trockenem Dichlormethan für 24 h.

Daunorubicinbeladung	MSN_{COOH}
Beladung / µg/mg	37,1 ± 6,5
Beladung / nmol/mg	70,3 ± 12,3

Durch diese Beladungsvorschrift war eine hohe Beladung der carboxylierten Partikel möglich, da es zu einer Vielzahl an Wasserstoffbrücken zwischen den Partikeln und dem Daunorubicin (Abbildung 71B) kommen kann. Zudem kann die Aminfunktion des Zytostatikums mit den deprotonierten Carboxy- und Silanolgruppen der Partikel elektrostatisch wechselwirken.

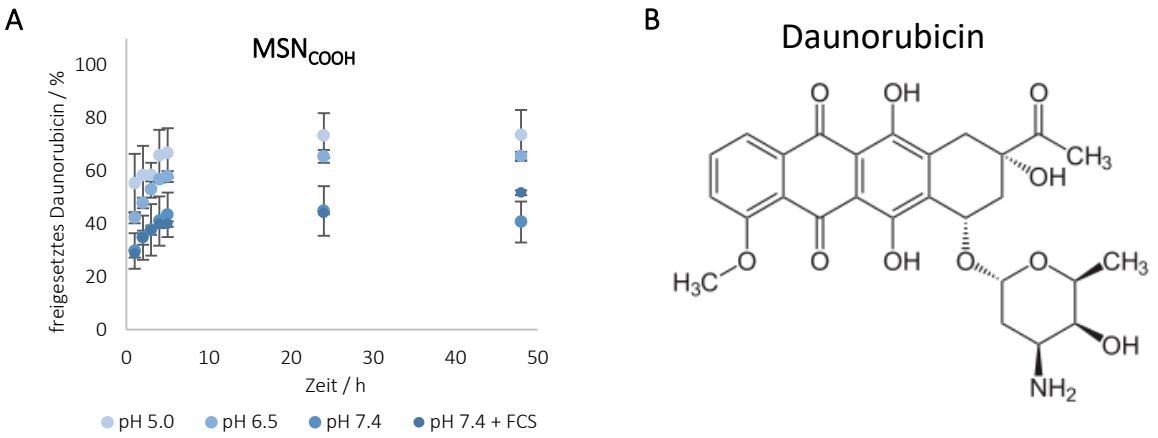


Abbildung 71: (A) Untersuchung der pH-abhängigen Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{COOH} bei pH 5,0; 6,5 und 7,4 sowie bei pH 7,4 unter Zugabe von 10% FCS bei 37 °C durch UV/Vis-Messungen (λ = 481 nm) der Überstände zu bestimmten Zeitpunkten. Es wurde eine Partikelkonzentration von 1 mg/mL verwendet. (B) Strukturformel des neutralisierten Daunorubicins.

Da die Wechselwirkungen zwischen dem Zytostatikum Daunorubicin und den Partikeln hauptsächlich elektrostatischer Natur sind, sollte eine pH-Abhängigkeit der Freisetzung, wie für das Doxorubicin bereits beschrieben, zu beobachten sein.[307] Hierbei können protische Lösemittel wie beispielsweise HEPES-Pufferlösung je nach pH zur Protonierung des Daunorubicins (pK_S = 8,5[308]) führen und somit dessen Wasserlöslichkeit erhöhen, was eine erhöhte Freisetzung zur Folge hat. Um diesen Effekt für das Daunorubicin genauer zu untersuchen, wurden die Partikel MSN_{COOH}_Dauno mit einer Konzentration von 1 mg/mL in HEPES-Puffern mit den pH-Werten von 7,4, 6,5 und 5,0 dispergiert, bei

37 °C inkubiert und zu bestimmten Zeiten der Anteil an freigesetztem Daunorubicin im Überstand UV/Vis-spektroskopisch (λ = 481 nm) bestimmt (Abbildung 71A). Hierbei ist eine Freisetzung des Wirkstoffes in Abhängigkeit des pH-Wertes zu beobachten, welche nach 24 h jeweils ein Plateau erreicht. Im Falle der MSN_{COOH} können die deprotonierten Hydroxyl- sowie Carboxylgruppen mit der protonierten Aminfunktion des Daunorubicins sehr gut wechselwirken, wodurch es zu einer abgeschwächten Freisetzung bei neutralem pH kommt. Erst durch Herabsetzen des pH-Wertes kommt es zunächst zur Protonierung der Hydroxylgruppen und anschließend der Carboxylgruppen. Hierdurch werden die Wechselwirkungen abgeschwächt, wodurch eine Freisetzung des Wirkstoffes hervorgerufen wird, welche nach 5 h bereits nahezu ihr Maximum erreicht hat. Dies deckt sich mit den Beobachtungen für das strukturell sehr ähnliche Doxorubicin, welches sein Freisetzungsmaximum zwischen 6 und 8 h erreicht.[215,307,309] Dass die Freisetzung des Doxorubicins stark mit dem Zetapotential der Partikel korreliert, wird auch für das Daunorubicin durch die Freisetzungskurven für die MSN_{OH}_Dauno und MSN_{NH2}_Dauno bestätigt (Anhang Abbildung 95; Anhang Tabelle 23). Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Faktor für die Wirkstofffreisetzung ist neben der Auswaschung zudem der hydrolytische Abbau der MSNs in wässrigen Medien, welcher ebenfalls zu einer Freisetzung des Wirkstoffes führt und eine starke pH-Abhängigkeit aufweist. So konnten Braun *et al.*[192] zeigen, dass sich Partikel in sauren Medien langsamer auflösen als sie es in neutralen und alkalischen Medien tun, was die Daunorubicinfreisetzung bei niedrigeren pH-Werten hemmt. Da in diesem Experiment die Partikelkonzentration jedoch weit über der Löslichkeitsgrenze von amorphem Silika gewählt wurde, kann dieser Effekt hierbei vernachlässigt werden und spielt lediglich in späteren Wirkstofffreisetzungsexperimenten in die Zellen eine Rolle. Um den Einfluss der im Blut vorhandenen Proteine auf die Wirkstofffreisetzung zu untersuchen, wurden die beladenen Partikel ebenfalls in HEPES-Puffer mit pH 7,4 und 10% FCS dispergiert und die Freisetzung vermessen. Während Shahabi *et al.*[310] durch die Zugabe von Serumproteinen eine leichte Verzögerung der Doxorubicinfreisetzung verzeichnen konnten, für welche sie die ausgebildete Proteincorona als Begründung in Betracht ziehen, konnte für die hier untersuchten MSN_{COOH} kein signifikanter Einfluss auf die Freisetzung beobachtet werden. Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte eine schwächer ausgeprägte Proteincorona im Falle der hier untersuchten größeren Partikel sein. So nutzen Shahabi und seine Arbeitsgruppe Partikel mit einem Durchmesser von etwa 40 nm, während die hier verwendeten MSN einen Durchmesser von 150 nm aufweisen. Die Vermutung einer schwächer ausgeprägten Proteincorona basiert auf den Untersuchungen von Clemments *et al.*[311], welche feststellen konnten, dass Partikel mit kleineren Durchmessern mehr Proteine anlagern als größere Partikel. Diese Größenunterschiede führen zudem zu Änderungen in der Oberflächenkrümmung der Partikel, wodurch auch die Zusammensetzung der Proteincorona

beeinflusst werden kann.[311] So lagern kleinere Proteine bevorzugt an kleinere Partikel mit einer größeren Oberflächenkrümmung an, während die geringere Krümmung der Oberfläche größerer Partikel bevorzugt zur Adsorption größerer Proteine führt. Diese Änderung der Coronazusammensetzung kann ebenfalls Änderungen im Freisetzungsverhalten nach sich ziehen.

Um einen Einfluss der Fibrillen auf die Wirkstofffreisetzung zu untersuchen, wurden Aggregate der PEP_{RGD}-Fibrillen sowie des Systems PEP_{RGD}_IS mit einer MSN_{COOH}-Konzentration von jeweils 250 µg/µmol Peptid hergestellt. Die Partikelkonzentration an den Fibrillen wurde hierbei im Vergleich zu den bisherigen Experimenten erhöht, um eine Hydrogelbildung der PNF bei einer Partikelendkonzentration von 1 mg/mL zu vermeiden. Die Proben wurden hierbei in HEPES-Puffer mit pH 7,4 und 10% FCS bei 37 °C inkubiert und die freigesetzten Mengen an Daunorubicin im Überstand UV/Vis-spektroskopisch (λ = 481 nm) untersucht.

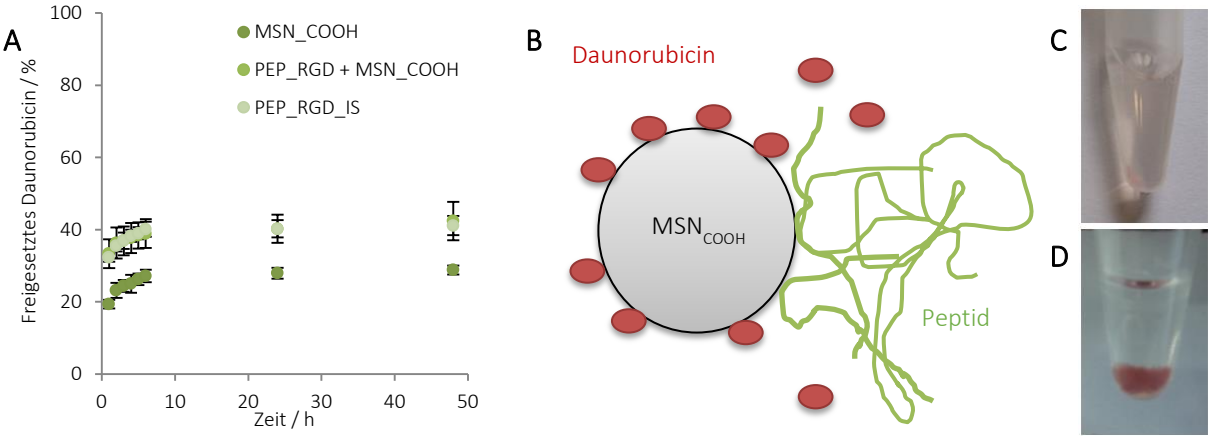


Abbildung 72: (A) Untersuchung der Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{COOH} in An- und Abwesenheit der PEP_{RGD}-PNF sowie im Falle des PEP_{RGD}_IS bei pH 7,4 inklusive 10% FCS bei 37 °C durch UV/Vis-Messungen (λ = 481 nm) der Überstände zu bestimmten Zeitpunkten. Es wurde eine Partikelkonzentration von 1 mg/mL verwendet. (B) Schematische Darstellung der Verdrängung an der Partikeloberfläche adsorbierten Daunorubicins durch die Anlagerung von Peptiden. (C) Fertig ausgebildete Fibrillen, welche für 24 h mit Daunorubicin inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen wurden. (D) Fibrillen, welche sich in der Anwesenheit von Daunorubicin ausgebildet haben und anschließend mehrfach gewaschen wurden. Es wurde jeweils so oft gewaschen, bis der Waschpuffer kein sichtbares Daunorubicin mehr enthielt.

Abbildung 72A zeigt die unterschiedlichen zeitlichen Verläufe der Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{COOH}. Es ist deutlich zu sehen, dass die Anwesenheit der Fibrillen zu einer leichten Zunahme der freigesetzten Daunorubicinmenge im Überstand von etwa 10% führt, während der zeitliche Verlauf ansonsten analog verläuft. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob die Partikel in das Fibrillennetzwerk eingelagert vorliegen oder ob sie lediglich auf deren Oberfläche adsorbieren. Grund für diese initiale Freisetzungserhöhung könnte eine mögliche Verdrängung auf der äußeren

Partikeloberfläche adsorbierter Daunorubicinmoleküle durch die Wechselwirkungen mit den Peptiden sein (Abbildung 72B). Diese würden direkt zu Beginn von den Peptiden verdrängt werden, was zu einer erhöhten Freisetzung in der Anfangsphase führt. Im Anschluss erfolgt eine normale Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Partikelinneren. Erstaunlicherweise bieten die Fibrillen im Falle des Systems PEP_{RGD}_IS keinen zusätzlichen Schutz vor der Wirkstoffauswaschung, obwohl die Partikel nahezu vollständig mit Peptiden bedeckt vorliegen. Zudem legen diese Ergebnisse nahe, dass es zu keiner Wechselwirkung zwischen den fibrillären Strukturen und dem freigesetzten Daunorubicin kommt, da dies die Daunorubicinfreisetzung deutlich verringern würde. Inkubiert man die fertig ausgebildeten Fibrillen für 24 h mit Daunorubicin und wäscht diese anschließend bis das Waschwasser farblos ist, wird ein nahezu farbloses Fibrillenpellet erhalten (Abbildung 72C). Aufgrund der Struktur des Daunorubicins wäre eine Einlagerung in die ß-Faltblattstrukturen durchaus denkbar, wodurch es bei Vorliegen des Daunorubicin im Puffer während der Ausbildung der Fibrillen zu einer hohen Einlagerung in die Fibrillennetzwerke kommt (Abbildung 72D). Allerdings scheinen diese Wechselwirkungen bei Zugabe des Wirkstoffes nach der Ausbildung der Fibrillen nicht mehr aufzutreten, was ein Hinweis auf einen Einbau in die Sekundärstrukturen wie die ß-Faltblätter der PNF sein könnte.

Da eine bloße Freisetzung des Daunorubicin noch nicht zum Zelltod führt, sondern auch die zelluläre Aufnahme und Lokalisation im Zellinneren eine wichtige Rolle spielen, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen durchgeführt (Abbildung 73). Hierzu wurden die unterschiedlichen Systeme mit den Daunorubicinbeladenen MSN_{COOH}_Dauno für 3 h mit den A549-Zellen bei 37 °C bei einer PNF-Konzentration von 26,2 µM und einer Partikelkonzentration von 150 µg/µmol Peptid inkubiert, mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert und anschließend mittels konfokaler Fluoreszenz untersucht.

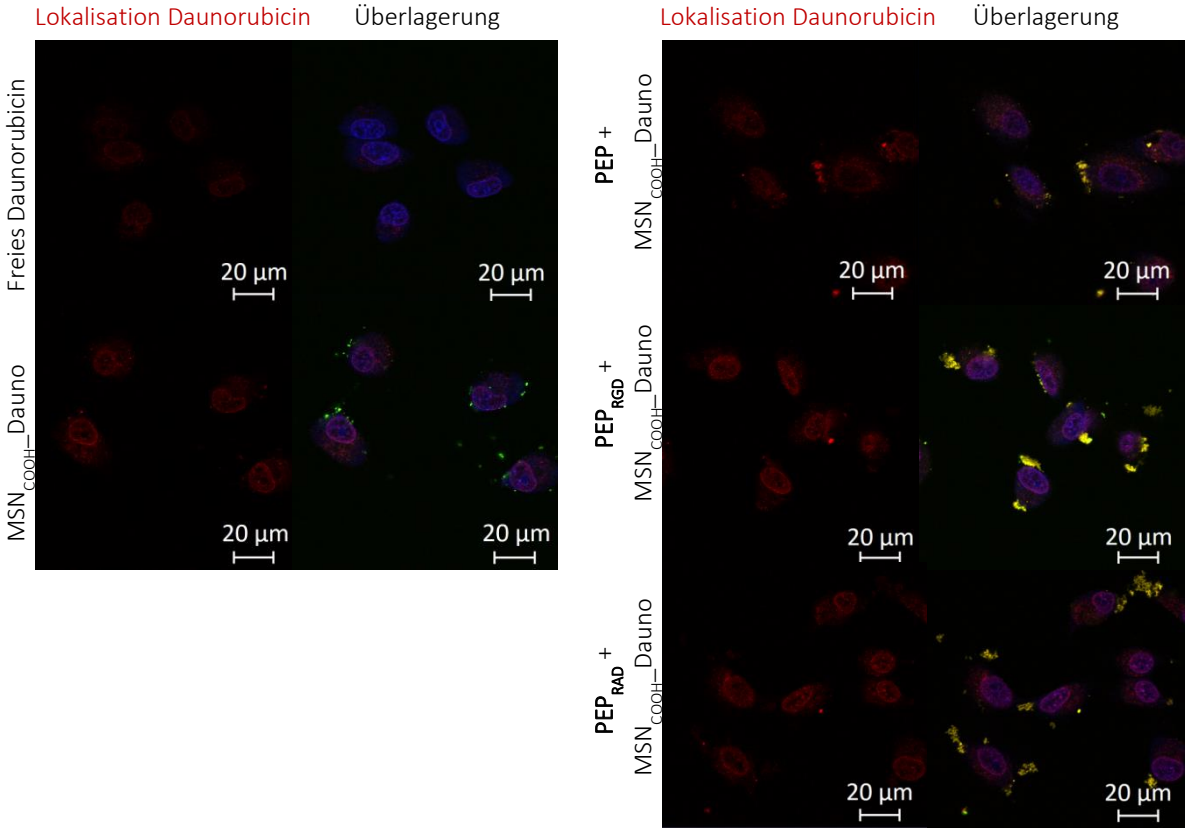


Abbildung 73: Untersuchung der Daunorubicinfreisetzung nach 3 h in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die daunorubicin-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; Daunorubicin - rot). Aufnahme freien Daunorubicins in die A549-Zellen. Freisetzung des Daunorubicins über MSN_{COOH}, PEP-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RAD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Während das freie Daunorubicin aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit lediglich schwach von den Zellen aufgenommen wird, erhöhen die als Nanoträger eingesetzten MSN_{COOH} den Transport des Zytostatikums in die Zellen. Da den freien MSN_{COOH}-Partikeln jedoch das Selektivitätsmotiv fehlt, wurden auch die PNF-Aggregate mit angelagerten MSN_{COOH} auf ihre Freisetzung untersucht. Hierbei kommt es wie in Kapitel 7.1 beschrieben zu einer deutlich stärkeren Anlagerung der Aggregate PEP_{RGD} und PEP_{RAD} im Vergleich zu den PEP-PNF. Somit gelangen mehr Daunorubicinbeladene Partikel in unmittelbare Zellnähe, wo sie von den Zellen entweder aufgenommen werden können oder der Wirkstoff über Diffusion ins Zellinnere gelangen kann. Aufgrund der Auswaschungseffekte ist in allen Fällen Daunorubicin im Zellinneren detektierbar. Dabei lokalisiert sich das Zytostatikum direkt in Nähe des Zellkerns, wo es später in die DNA interkaliert und somit durch Blockierung der DNA-Replikation den Zelltod herbeiführt.[306] Durch die schlechte Anlagerung der PEP-Aggregate kommt es hier zu einer schwächeren Freisetzung des Daunorubicins ins Zellinnere als es für PEP_{RGD} und PEP_{RAD} der Fall ist. Die

über die RGD-Sequenz herbeigeführte Zellnähe der Partikel durch die PEP_{RGD}-PNF führt hierbei nicht nur zu einer leicht verstärkten Freisetzung des Wirkstoffes im Vergleich zu den freien MSN_{COOH}_Dauno, sondern sollte auch zu einer Erhöhung des selektiven Wirkstofftransports beitragen.

Da für die Wirkstofffreisetzung im Falle des hydrophilen Daunorubicins zwei mögliche Wege für die zelluläre Aufnahme in Frage kommen, wurde das Experiment mit DiO-beladenen Partikeln wiederholt. DiO schließt aufgrund seiner Hydrophobizität den Weg der Freisetzung in der extrazellulären Matrix mit anschließender Diffusion ins Zellinnere aus. Daher können über die Freisetzungsuntersuchungen des DiO genauere Rückschlüsse über die Aufnahme des Daunorubicins ins Innere der Zelle gezogen werden. Für die Beladung der MSN_{COOH} mit dem hydrophoben Farbstoff DiO wurden diese zunächst bei 100 °C für 3 h von adsorbiertem Wasser befreit und anschließend für 24 h mit DiO in trockenem Cyclohexan beladen. Hierbei wurde eine molare Beladung äquivalent zu den MSN_{COOH}_Dauno angestrebt. Aufgrund der gehemmten Löslichkeit des DiO in Cyclohexan wurde die DiO-Stocklösung vor Zugabe zu den Partikeln auf 60 °C erwärmt bis es zu einer vollständigen Lösung des DiO kam. Nach einmaligem Waschen mit trockenem Cyclohexan wurde der Erfolg der Beladung mittels UV/Vis-Spektroskopie der Stocklösung sowie der Überstände der Beladung und des Waschschrittes überprüft (Abbildung 74A).

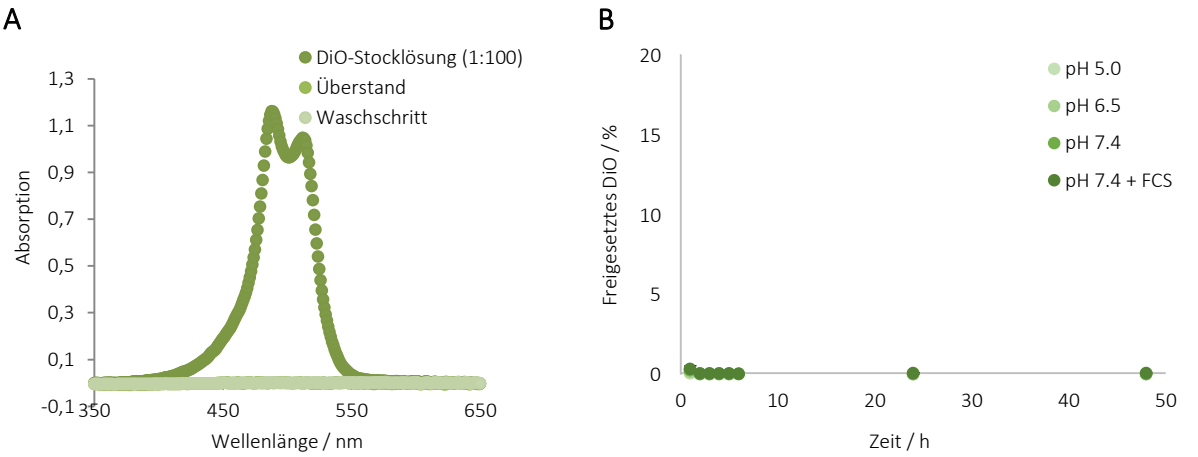


Abbildung 74: (A) Bestimmung des Beladungserfolgs der MSN_{COOH} mit DiO in trockenem Cyclohexan für 24 h durch UV/Vis-Messungen einer 1:100-Verdünnung der für die Beladung verwendeten DiO-Stocklösung sowie der Überstände der Beladung und des Waschschrittes. (B) Untersuchung der pH-abhängigen Freisetzung des DiOs aus den MSN_{COOH} in wässrigen Medien bei pH 5,0; 6,5 und 7,4 sowie bei pH 7,4 unter Zugabe von 10% FCS bei 37 °C durch fluoreszenzspektroskopische Messungen (λ_{exc} = 475 nm; λ_{em} = 520 nm) der Überstände zu bestimmten Zeitpunkten. Für die Freisetzungsversuche wurde eine Partikelkonzentration von 1 mg/mL verwendet.

Es ergab sich eine Beladung von 75 nmol DiO/mg Partikel, welche nahe an die 70,3 nmol Daunorubicin/mg Partikel der MSN_{COOH}_Dauno herankommt. Eine vergleichbare Beladung wurde hierbei für eine bessere Vergleichbarkeit der Freisetzungen angestrebt. Betrachtet man die DiO-Freisetzung bei 37 °C in HEPES-Puffern mit pH-Werten von 7,4, 6,5 und 5,0, so ist bei einer Partikelkonzentration von 1 mg/mL aufgrund der Hydrophobizität des DiO wie erwartet unabhängig vom pH-Wert keine Freisetzung des Farbstoffes in wässrige Medien zu beobachten (Abbildung 74B). Auch die Zugabe von 10% FCS führt zu keiner detektierbaren Freisetzung.

Inkubiert man nun die A549-Zellen für 3 h bei 37 °C mit den DiO-beladenen Systemen analog zu den Experimenten mit Daunorubicin-beladenen Partikeln und untersucht diese konfokalmikroskopisch, ergeben sich die Aufnahmen, welche in Abbildung 75 zu sehen sind.

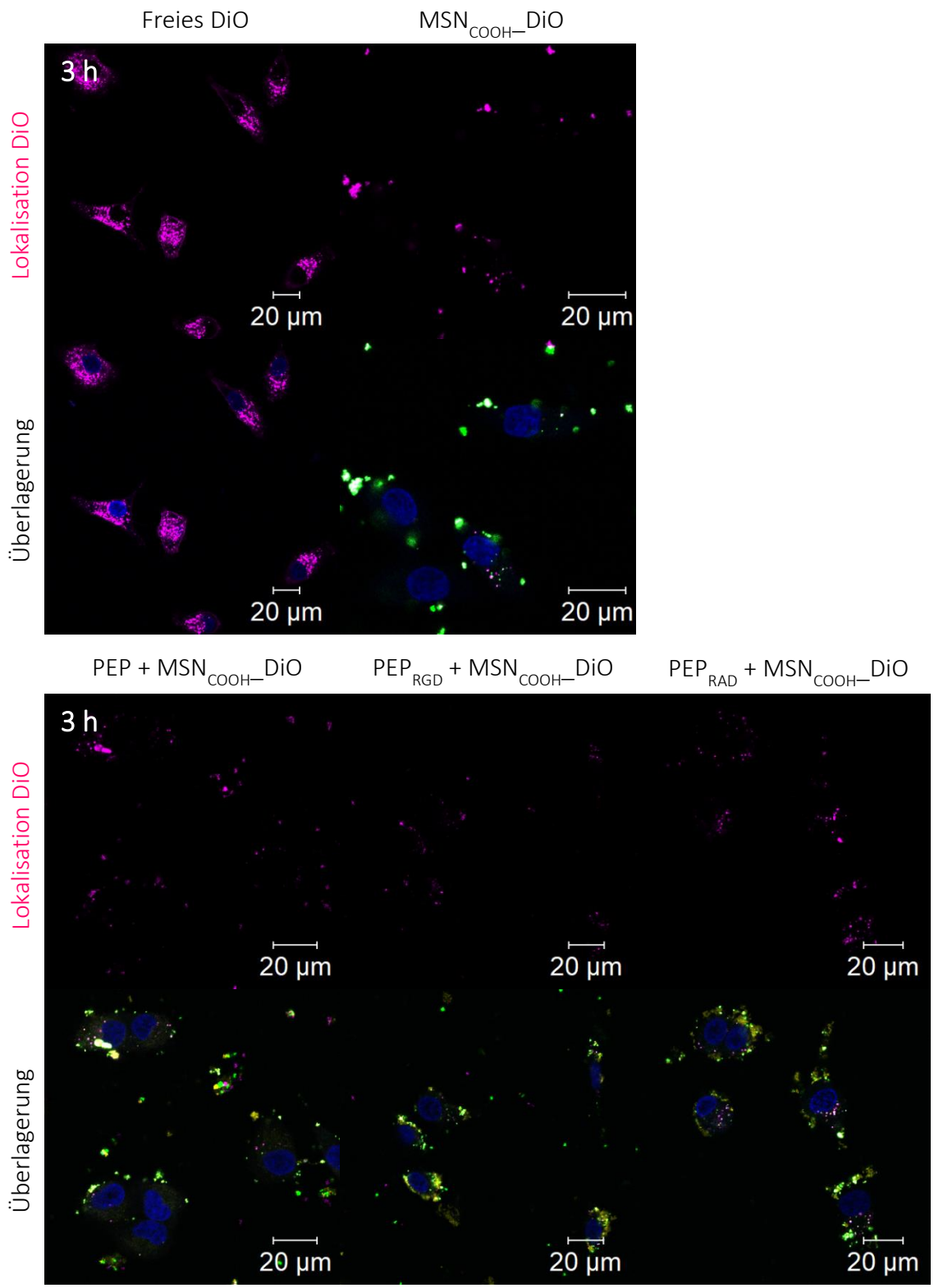


Abbildung 75: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Aufnahme freien DiOs in die A549-Zellen. Freisetzung des DiOs über MSN_{COOH}, PEP-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RAD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Während das hydrophobe DiO in seiner freien Form bereits nach 3 h durch seine Lokalisation im Zellinneren diesem eine deutliche Fluoreszenz verleiht, wird im Falle der DiO-beladenen MSN_{COOH} kaum DiO detektiert. Auch in Anwesenheit der Fibrillen kommt es zu kaum einer Freisetzung des Farbstoffes ins Innere der Zellen. Grund für diese gehemmte Aufnahme ist die starke Wechselwirkung des Farbstoffes mit den Partikeln sowie die gehemmte Aufnahme der carboxylierten Partikel aufgrund repulsiver Wechselwirkungen mit der ebenfalls tendenziell negativ geladenen Zellmembran ins Zellinnere. Da nach 3 h Inkubationszeit noch keine DiO-Lokalisation innerhalb der Zellen zu beobachten ist, lässt dies Rückschlüsse über den Freisetzungsmechanismus zu. Hierbei kommt es nach den gewählten 3 h noch zu keiner Internalisierung der Partikel durch die Zellen. Dies lässt sich durch das negative Zetapotential der MSN_{COOH} sowie durch die Anbindung an die Fibrillen erklären. So konnten Kralj *et al.*[246] ebenfalls zeigen, dass Silikananopartikel mit negativem Zetapotential von MCF10A- und PC-3-Zellen deutlich schlechter aufgenommen werden als es für die positiv geladenen Partikel der Fall ist. Da die Partikel lediglich an der Außenseite der Zellen lokalisiert sind, kommt es zu keiner Freisetzung des hydrophoben DiO in die wässrige extrazelluläre Matrix und somit auch zu keiner Diffusion in die Zellen.

Um zu untersuchen, ob sich das untersuchte System dennoch auch zum Transport hydrophober Wirkstoffe in die Zellen eignet, wurde die Inkubationszeit auf 24 h erhöht. Die Verlängerung der Inkubation führt schließlich zur Aufnahme der freien DiO-beladenen Partikel, was zu einer lokalen DiO-Freisetzung im Inneren der Zellen führt (Abbildung 76).

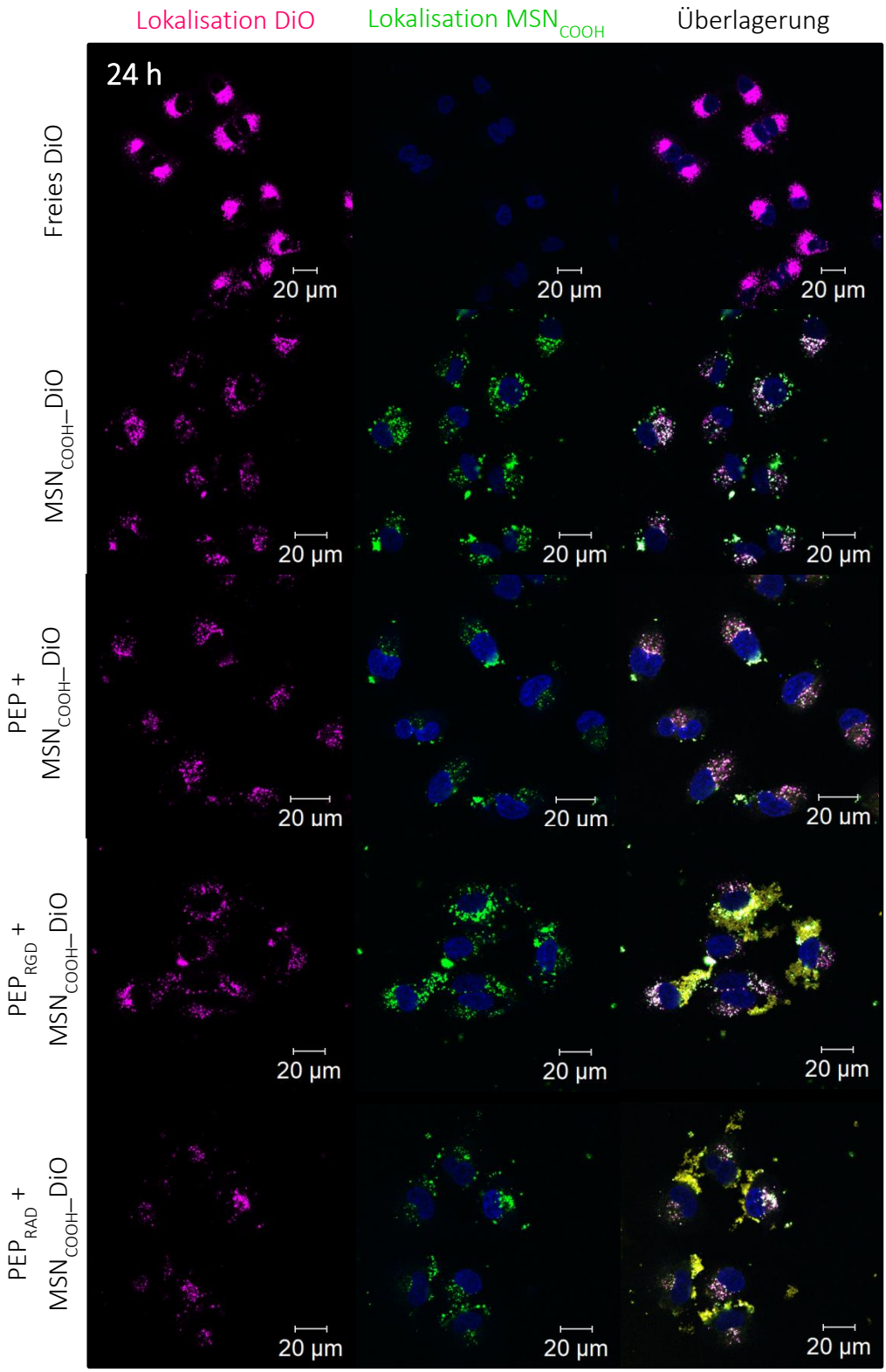


Abbildung 76: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Aufnahme freien DiOs in die A549-Zellen. Freisetzung des DiOs über MSN_{COOH}, PEP-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RAD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 24 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Auch im Falle der PEP_{RGD}- und der PEP_{RAD}-Fibrillen ist eine deutliche Lokalisation von Partikeln in den Zellen detektierbar, was zu einer Freisetzung des DiO führt. Wie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, finden sich auch hier aufgrund ihrer Größe keinerlei Partikel im Zellkern vor.[198,237-240] Durch die Ablösung der Partikel von den fibrillären Netzwerken und deren anschließende zelluläre Aufnahme liegen die Fibrillen und die MSN_{COOH} nicht mehr vollständig kolokalisiert vor. Die nicht-kovalente Anbindung der Partikel an die Fibrillen scheint somit stark genug zu sein, um eine frühzeitige Ablösung der Partikel von den Netzwerken zu verhindern. Andererseits ermöglicht sie nach längerer Inkubationszeit eine Ablösung der MSN_{COOH}, wodurch diese ins Zellinnere aufgenommen werden können. Im Falle der unfunktionalisierten PEP-Fibrillen kommt es aufgrund der ausbleibenden Anbindung der Fibrillen an die Zellmembran lediglich zu einer sehr geringen Aufnahme von MSN_{COOH} ins Innere der Zellen. Trotz der gehemmten Partikelaufnahme kann in den Zellen auch hier eine gewisse Menge an DiO in den Zellen detektiert werden. Dies liegt vermutlich am hydrolytischen Abbau der Partikel, welcher nach 24 h bereits stark fortgeschritten ist (Kapitel 5.1.1). Durch den Abbau der Partikel liegen gewisse Mengen des DiO in freier Form im Medium vor, wo es aufgrund seiner Hydrophobizität schnell ins Zellinnere aufgenommen wird.

Die Ergebnisse der konfokalmikroskopischen Aufnahmen konnten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Hierzu wurden die A549-Zellen 24 h bei 37 °C mit den jeweiligen Systemen inkubiert und anschließend gewaschen und fixiert. Da für die durchflusszytometrischen Experimente eine höhere Zelldichte verwendet wurde als in den konfokalmikroskopischen Experimenten, wurde die PNF-Konzentration auf 52,5 µM erhöht, während die Partikelkonzentration bei 150 µg/µmol Peptid blieb. Am Durchflusszytometer konnte anschließend die durch das DiO hervorgerufene Fluoreszenz der Zellen gemessen werden, welche in Abbildung 77 dargestellt ist. Parallel wurde ein Experiment mit ATTO488-markierten unbeladenen Partikeln durchgeführt, bei welchem aufgrund des geringen Partikelfluoreszenzsignals die Partikelkonzentration von 150 auf 250 µg/µmol Peptid erhöht wurde. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz der extrazellulär lokalisierten Partikel mittels 15-minütiger Trypanblaubehandlung bei RT gequencht, um lediglich das Signal der intrazellulären Partikel zu erhalten (Anhang Abbildung 96). Die erhaltenen durchflusszytometrischen Daten sind in Abbildung 77 aufgetragen.

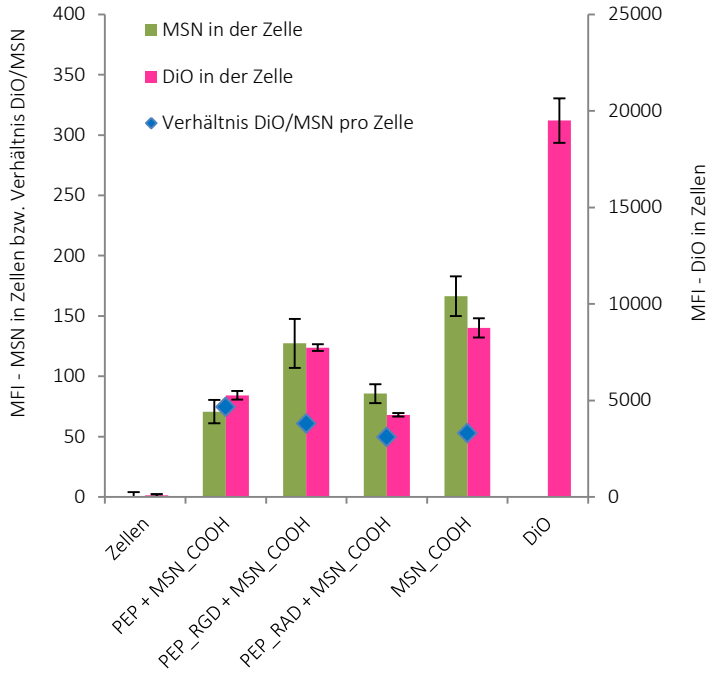


Abbildung 77: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) sowie der Aufnahme von ATTO488-markierten MSN_{COOH} in A549-Zellen nach 24 h bei 37 °C in An- und Abwesenheit der unterschiedlich funktionalisierten PNF PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mittels Durchflusszytometrie. Es wurde eine PNF-Konzentration von 52,5 µM verwendet. Aufgrund des geringen Fluoreszenzsignals durch die ATTO488-markierten MSN_{COOH} aufgrund der geringen Partikelkonzentration wurde diese für das Experiment zur MSN-Aufnahme auf 250 µg/µmol Peptid erhöht. Extrazellulär lokalisierte MSN wurden über Behandlung mit Trypanblau in ihrer Fluoreszenz gequencht.

Die durchflusszytometrisch erhaltenen Daten bestätigen die Beobachtungen der konfokalmikroskopischen Aufnahmen und zeigen eine erhöhte intrazelluläre Lokalisation von Partikeln im Falle der RGD-funktionalisierten PNF sowie der freien MSN_{COOH}. Im Falle der PEP- und der PEP_{RAD}-PNF werden weniger Partikel ins Zellinnere transportiert, was sich auch mit den Mengen an freigesetztem DiO deckt. Wie bereits erwähnt, kommt es hierbei zu einer starken Aufnahme des freivorliegenden hydrophoben DiO ins Innere der Zellen, wobei der Einsatz von MSN_{COOH} diese Aufnahme deutlich absenkt. Die gehemmte Aufnahme der PEP- und der PEP_{RAD}-PNF ins Zellinnere und die damit verbundene reduzierte DiO-Freisetzung legen den Rückschluss nahe, dass diese die Zellen vor den beladenen Partikeln schützen. Betrachtet man das Verhältnis der DiO- zur MSN-Menge in den Zellen für die unterschiedlichen Systeme, wird deutlich, dass sich diese proportional zueinander verhalten, was die Partikelaufnahme als Hauptursache für die DiO-Freisetzung auszeichnet. Um dies weiter zu verifizieren, wurden die MSN_{COOH}_DiO in Zellkulturmedium dispergiert und 24 h einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt. Die Partikelkonzentration wurde hierbei mit 8 µg/mL an die

Partikelkonzentrationen in den bisherigen Zellversuchen mit 150 µg MSN_{COOH}/µmol Peptid am Durchflusszytometer angepasst. Die Partikel wurden anschließend zentrifugiert und lediglich der Überstand zu den Zellen gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Die durch durchflusszytometrische Vermessung der Zellen erhaltenen Daten zeigen lediglich vernachlässigbar kleine Mengen an DiO in den Zellen (Anhang Abbildung 97). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass lediglich geringste Mengen an DiO aufgrund der Partikelauflösung in das Zellinnere gelangen und der Haupteinfluss durch die Partikelaufnahme in die Zelle gegeben ist.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sich das untersuchte modulare Wirkstofftransportsystem für den Transport hydrophiler als auch hydrophober Wirkstoffe eignet. Hierbei kommt es im Falle der hydrophilen Wirkstoffe zu einer schnellen diffusionsgetriebenen Freisetzung in die Zellen, während es für hydrophobe Wirkstoffe zu einer Ablösung der Partikel von den PNF kommt, was eine zelluläre Aufnahme der MSN_{COOH} mit sich bringt. Die Freisetzung der Wirkstoffe ins Zellinnere läuft somit über zwei unterschiedliche Mechanismen ab, was zu einer zeitlich versetzten Freisetzung führt. Diese Beobachtungen zeigen die Möglichkeit auf, das hier untersuchte System als multivalentes Wirkstofftransportsystem zu nutzen, welches nach einer schnellen Freisetzung eines hydrophilen Wirkstoffes eine zeitlich verzögerte Wirkstofffreisetzung eines zweiten Wirkstoffes mit hydrophoben Eigenschaften ermöglicht.

Für das System PEP_{RGD}_IS liegen die MSN_{COOH} im Inneren der Fibrillennetzwerke vor, wodurch die Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden kann. Da die Daunorubicinfreisetzung im Falle des vorinkubierten als auch des Inversen Systems den gleichen Verlauf aufweist (Abbildung 72), wäre eine vergleichbare Freisetzung ins Zellinnere zu vermuten. Allerdings weisen konfokalmikroskopische Aufnahmen auf eine gehemmte Aufnahme des Daunorubicins ins Zellinnere im Falle des PEP_{RGD}_IS hin (Abbildung 78).

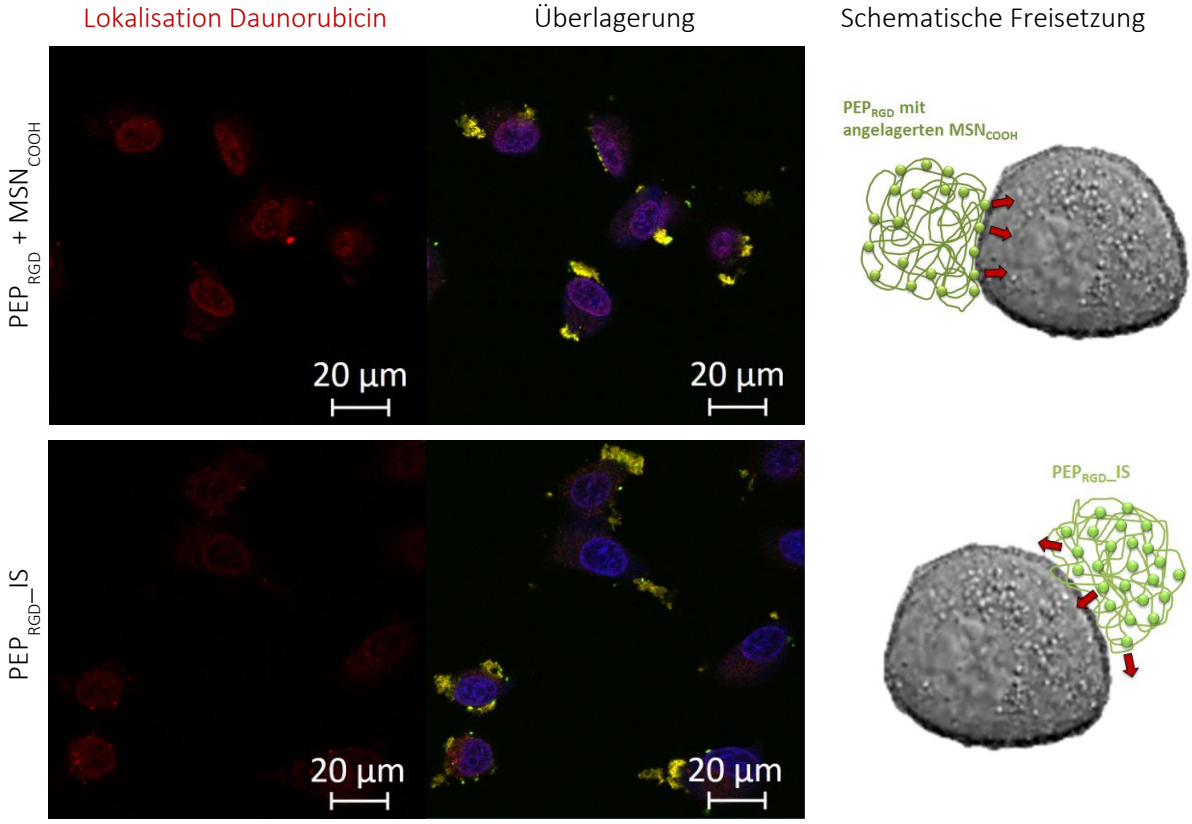


Abbildung 78: Untersuchung der Daunorubicinfreisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die daunorubicin-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert bzw. eingelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; Daunorubicin - rot). Freisetzung des Daunorubicins über PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RGD}_IS mit eingelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. Zudem ist eine schematische Darstellung der möglichen Daunorubicinfreisetzung (rote Pfeile) aus den MSN_{COOH} in den beiden Systemen aufgeführt.

Dieses Phänomen kann durch die Lokalisation der Partikel während der Daunorubicinfreisetzung erklärt werden. Hierbei liegt der Großteil der MSN_{COOH} bei den PEP_{RGD}_IS im Inneren der fibrillären Strukturen. Diese nehmen zwar keinen Einfluss auf die Auswaschung des Daunorubicin aus den MSN_{COOH}, allerdings ist der Abstand zwischen den Zellmembranen und den Partikeln durch diesen strukturellen Aufbau erhöht. Das Daunorubicin ist sehr gut wasserlöslich, wodurch eine Daunorubicinfreisetzung lediglich in unmittelbarer Nähe zu den Zellmembranen zu einer erhöhten Aufnahme ins Zellinnere führt. Zudem bietet das Fibrillennetzwerk einen Schutz vor dem hydrolytischen Abbau der Silikapartikel (Kapitel 5.1.1). Da das Daunorubicin durch Auswaschung als auch durch Auflösung der Silikastrukturen nach und nach freigesetzt wird, verringert sich die insgesamt freigesetzte Menge an Wirkstoff im Falle des schützenden PEP_{RGD}_IS.

Die Partikelablösung von den Fibrillen spielt eine große Rolle bei der Aufnahme hydrophober Wirkstoffe ins Innere der Zellen. Da sich im System PEP_{RGD}_IS das Fibrillennetzwerk um die MSN_{COOH} herum ausgebildet hat, bietet dieses einerseits den Partikel einen gewissen Schutz vor hydrolytischem Abbau, was eine frühzeitige unkontrollierte Freisetzung des DiO minimiert, führt aber andererseits auch zu einer stärkeren Verankerung der Partikel im fibrillären Netzwerk, wodurch es zu einer gehemmten Ablösung dieser kommen kann und somit die zelluläre Aufnahme beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurde das konfokalmikroskopische Experiment zur Wirkstofffreisetzung mit den DiO-beladenen Partikeln mit Inkubationszeiten von 3 bzw. 24 h wiederholt (Abbildung 79).

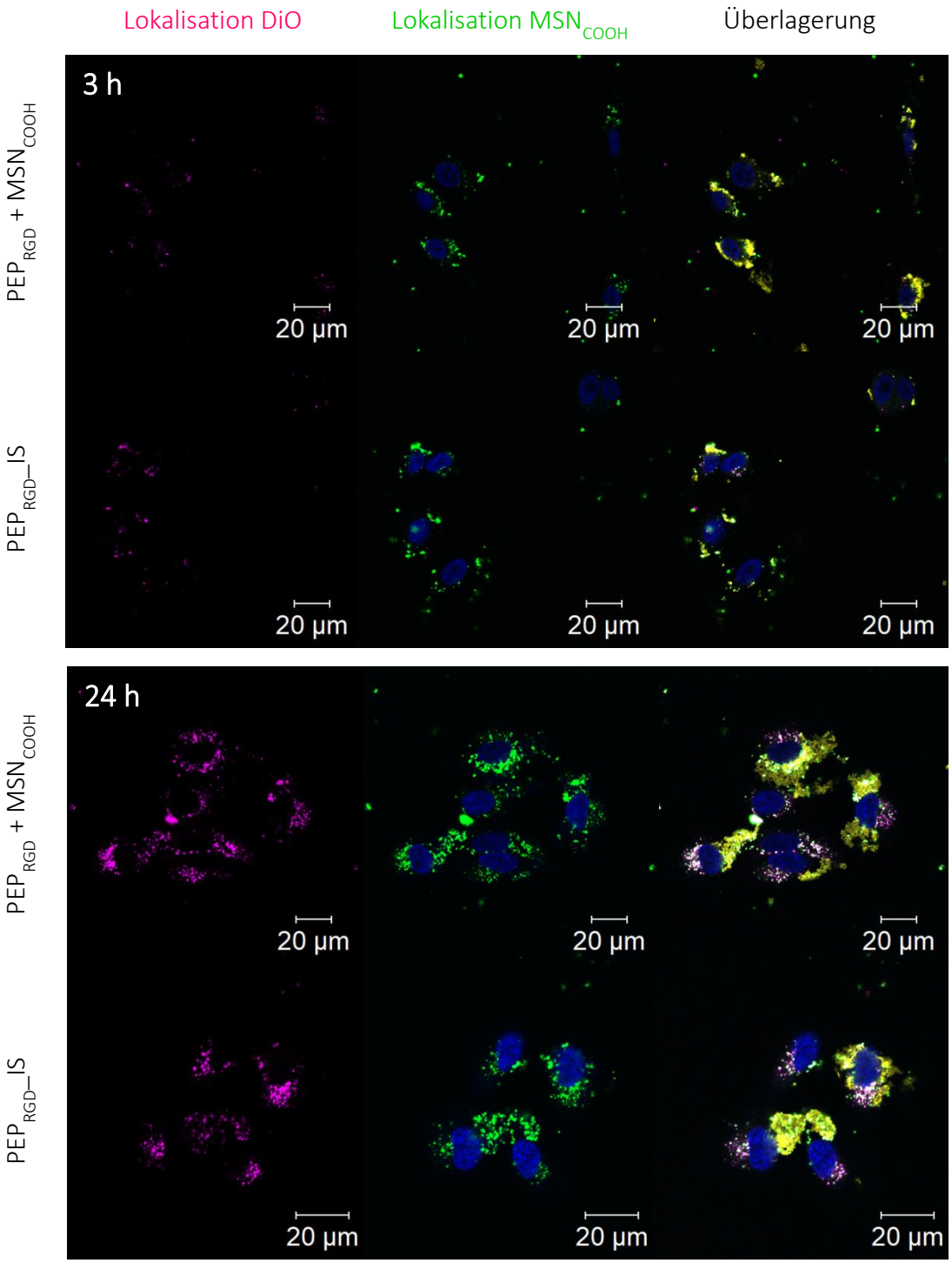


Abbildung 79: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 3 bzw. 24 h in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert bzw. eingelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Freisetzung des DiOs nach 3 h und nach 24 h über PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RGD}_IS mit eingelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 bzw. 24 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Vergleicht man das vorinkubierte mit dem Inversen System nach 3 h Inkubationszeit, erkennt man in beiden Fällen keine detektierbare Freisetzung des hydrophoben DiO in das Innere der Zellen. Dies entspricht den erwarteten Ergebnissen, da die negative Nettoladung der Partikel zu repulsiven Wechselwirkungen mit der Zellmembran führt und somit die Aufnahme durch die Zellen hemmt. Erhöht man die Inkubationszeit auf 24 h werden deutliche Unterschiede zwischen den beiden Systemen erkennbar. Während für das vorinkubierte System eine deutliche Fluoreszenz des DiO im Zellinneren detektiert werden kann, führt die Anwendung des PEP_{RGD}_IS lediglich zu einer geringen Freisetzung des DiO ins Innere der Zellen. Die Partikel weisen für das Inverse System eine Kolokalisation mit den fibrillären Strukturen auf, was darauf hindeutet, dass es zu kaum einer Ablösung der Partikel von diesen kommt. Lediglich wenige freie Partikel sind in den Zellen vorzufinden, welche sich von den PNF isolieren konnten.

Auch in diesem Fall wurde analog zu den vorinkubierten Systemen die nach 24 h intrazellulär lokalisierte Menge an DiO und Partikeln mittels Durchflusszytometrie bestimmt und in Abbildung 80 dargestellt.

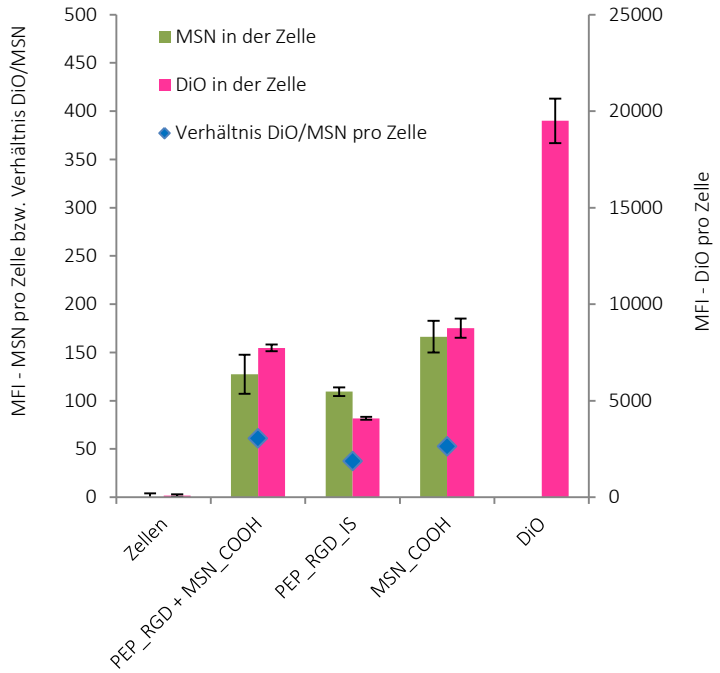


Abbildung 80: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv an- bzw. eingelagert haben (150 µg/µmol Peptid) sowie der Aufnahme von ATTO488-markierten MSN_{COOH} in A549-Zellen nach 24 h bei 37 °C bei An- bzw. Einlagerung in die fibrillären Strukturen von PEP_{RGD} mittels Durchflusszytometrie. Es wurde eine PNF-Konzentration von 52,5 µM verwendet. Aufgrund des geringen Fluoreszenzsignals durch die ATTO488-markierten MSN_{COOH} aufgrund der geringen Partikelkonzentration wurde diese in diesem Experiment auf 250 µg/µmol Peptid erhöht. Extrazellulär lokalisierte MSN wurden über Behandlung mit Trypanblau in ihrer Fluoreszenz gequencht.

Hierbei wird für das Inverse System eine ähnliche Anzahl an Partikeln wie schon für das vorinkubierte System innerhalb der Zellen detektiert, allerdings wird im Falle des PEP_{RGD}_IS lediglich halb so viel DiO ins Zellinnere freigesetzt. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, welche bereits in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen sichtbar wurden, wobei auch hier der erhöhte Einfluss der Partikelaufnahme im Vergleich zur Partikelauflösung auf die DiO-Aufnahme in die Zellen durch 24 h Vorinkubation bei 37 °C der DiO-beladenen Partikel in Zellkulturmedium (8 µg/mL) und Zugabe des Überstandes zu den Zellen für 24 h bei 37 °C gezeigt werden konnte (Anhang Abbildung 97). Hierbei wird deutlich, dass die Diffusion zwar lediglich zu einem geringeren Anteil zur DiO-Aufnahme in die Zellen beiträgt, aber dennoch nicht vernachlässigt werden darf. So fällt im Falle der PEP_{RGD}-PNF mit nachträglich adsorbierten MSN_{COOH} der Anteil an DiO durch Partikelauflösung in den Zellen höher aus als es für PEP_{RGD}_IS der Fall ist. Auch wenn dieser Anteil eher gering ausfällt, führt die gehemmte Partikelauflösung im Falle des PEP_{RGD}_IS zu einem geringeren DiO/MSN-Verhältnis in den Zellen, da hierbei durch die geringere Hydrolyse der Partikel auch die Diffusion des DiO in die Zellen limitiert wird, weshalb die Partikelaufnahme für die DiO-Aufnahme mehr ins Gewicht fällt.

Auch das System PEP_{RGD}_IS, welches die MSN_{COOH} in seine fibrillären Netzwerke eingelagert hat, eignet sich prinzipiell zum Transport von Wirkstoffen. Durch die Einlagerung der Partikel ins Innere der Fibrillen kommt es zu einer gehemmten Freisetzung der Partikel aus diesen Strukturen, wodurch auch die DiO-Freisetzung ins Zellinnere etwas geringer ausfällt als im Falle des vorinkubierten Systems. Interessant wäre hier die Untersuchung weiterer Zeitpunkte, um einen möglichen Einsatz als Langzeitdepot zu untersuchen. Hierbei könnte der langsame Abbau der fibrillären Strukturen nach und nach zur Freisetzung der eingelagerten Partikel führen, welche dann von den Zellen aufgenommen werden und den hydrophoben Wirkstoff freisetzen können.

7.3. Sequenzielle Zugabe der Komponenten

Aufgrund der hohen Affinität der Silikapartikel zu den PNF besteht die Möglichkeit einer sequenziellen Zugabe der beiden Komponenten (Abbildung 81B). Hierbei würden in einem ersten Schritt die RGD-funktionalisierten Fibrillen lokal in das Gewebe injiziert, welche anschließend an das Tumorgewebe anlagern können. Ist die Anlagerung erfolgt, würden die wirkstoffbeladenen Partikel nachträglich injiziert werden, wo sie dann an die bereits vorgebundenen Fibrillen anlagern können und somit über indirektes Targeting zum Zielgewebe gelangen. Im Folgenden soll über ausgewählte Vorversuche sowie *in vitro* Experimente die Eignung dieses Modells für den Wirkstofftransport untersucht werden. Zudem wäre eine Anwendung dieses Systems in der Diagnostik denkbar, da die Anlagerung von

Partikeln an fibrilläre Strukturen, welche aus Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson resultieren (Kapitel I.1.4.1), eventuell genutzt werden könnte, um diese detektierbar zu machen. Und auch die Behandlung solcher Krankheiten wäre anhand dieses Modells realisierbar wie es die Arbeitsgruppe um Qu[265] bereits für die Auflösung von Amyloidfibrillen der Alzheimererkrankung zeigen konnte (Kapitel I.3.4.3).

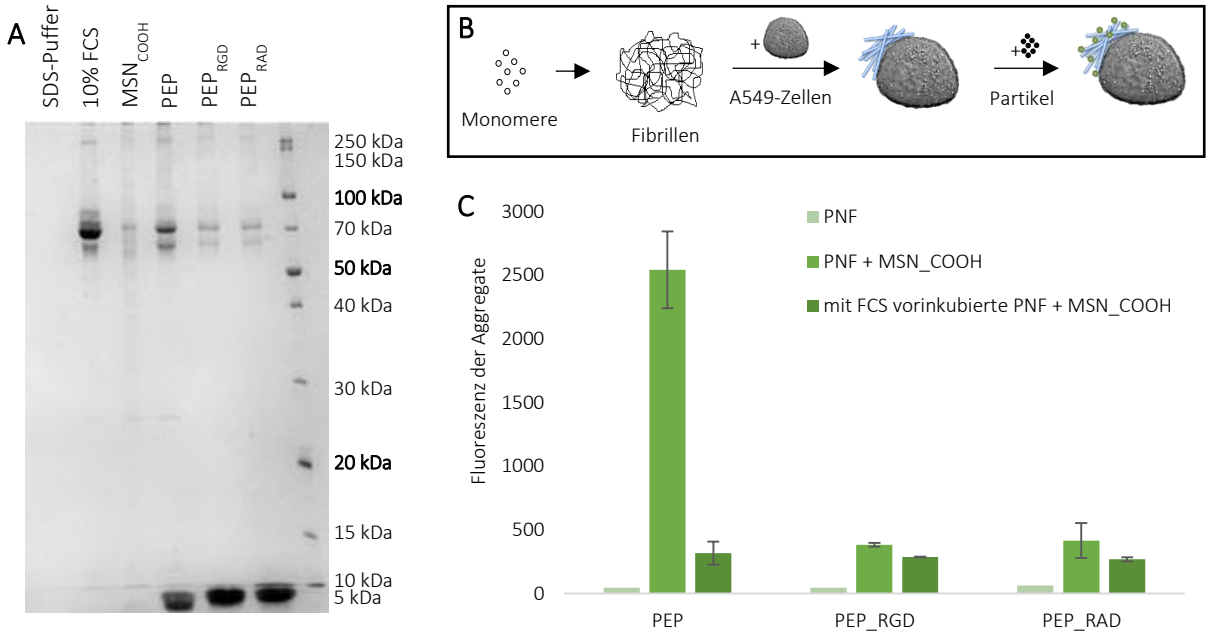


Abbildung 81: (A) Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach Inkubation für 3 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. (B) Schematische Darstellung der sequenziellen Zugabe von PNF und MSN_{COOH} zu den A549-Zellen. (C) Relative Anzahl an nach 45 min Inkubation angelagerten ATTO488-markierten MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) an die nicht-markierten PNF mit und ohne dreistündige Vorinkubation mit 10% FCS bei 37 °C, bestimmt über die durchschnittliche Fluoreszenz des P1-Bereichs der Durchflusszytometriemessungen (Kapitel 4.2). Angegeben ist jeweils die relative MSN_{COOH}-Menge pro Aggregat.

Da bei der sequenziellen Zugabe die Fibrillen bereits vor der Partikelanlagerung mit Blutproteinen in Kontakt kommen, besteht zum Zeitpunkt dieser bereits eine Proteincorona um die Fibrillenaggregate. Um diese für die unterschiedlichen Fibrillen zu untersuchen, wurden diese 3 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS inkubiert und anschließend durch dreimaliges Waschen mit Wasser von schwach gebundenen Proteinen befreit. Hierbei wurde eine Inkubationszeit von 3 h gewählt, da es nach dieser Zeit bereits zu einer detektierbaren Anlagerung der RGD-funktionalisierten PNF an die Zellen kam und in späteren Zellexperimenten daher eine dreistündige Vorinkubation mit den Fibrillen stattfand. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten und mit Coomassie

gefärbten Proteine sind in Abbildung 81A dargestellt. Hierbei zeigen die Fibrillenaggregate der Peptide PEP_{RGD} und PEP_{RAD} lediglich eine schwach ausgeprägte Proteinadsorption, während die Fibrillen des unfunktionalisierten PEP etwas intensivere Bandenintensitäten aufweisen. Die Zusammensetzung der adsorbierten Proteine ist identisch mit der nach 24 h ausgebildeten und in Kapitel 5.2 beschriebenen Proteincorona und wird daher an dieser Stelle nicht weiter diskutiert. Da die Adsorption von Proteinen Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit der Aggregate nimmt, kann sie auch Änderungen im Zetapotential dieser bewirken. In Kapitel 5.2 wurde bereits eine Änderung der Nettogesamtladung der Aggregate für eine 24-stündige Inkubation mit 10% FCS beschrieben. Aufgrund ähnlich intensiver Banden nach dreistündiger Inkubationsphase können hierbei analoge Ergebnisse erwartet werden. Da nach der Ausbildung der Proteincorona die Menge und Zusammensetzung dieser das Zetapotential maßgeblich beeinflussen, führt dies zur Angleichung der Zetapotentiale der drei untersuchten Fibrillen. Im Falle der PEP_{RGD}- und PEP_{RAD}-Fibrillen kommt es hierbei zu keiner nennenswerten Änderung, während das Zetapotential der PEP-Fibrillen von +3 auf -15 mV absinkt. Diese Absenkung kann zu einer Erhöhung der repulsiven Wechselwirkungen zwischen den carboxylierten MSN_{COOH} und den Fibrillen führen und somit die Partikelanlagerung beeinflussen.

Um den Einfluss der Proteincorona auf die Partikeladsorption an die mit FCS vorinkubierten Fibrillen zu untersuchen, wurden diese durchflusszytometrisch vermessen. Hierzu wurden die Fibrillen 3 h bei 37 °C mit 10% FCS und anschließend mit ATTO488-markierten MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) für weitere 45 min inkubiert. Durch die Anlagerung der Partikel ergibt sich eine Fluoreszenz der Aggregate, welche am Durchflusszytometer gemessen werden kann. Abbildung 81C zeigt die relative Partikelmenge pro Aggregat für die unterschiedlichen Fibrillen in An- und Abwesenheit einer Proteincorona. Während sich in der Partikelanlagerung im Falle der Fibrillen PEP_{RGD} und PEP_{RAD} kaum eine Änderung zeigt, nimmt diese im Falle der PEP-Fibrillen stark ab, wodurch lediglich etwa 10% der ohne Proteincorona angelagerten Partikel an den Aggregaten vorgefunden werden können. Um zu sehen, wo sich die restlichen 90% der Partikel befinden, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen der ATTO647N-markierten (10 mol%) PNF mit angelagerten ATTO488-markierten MSN_{COOH} aufgenommen (Abbildung 82).

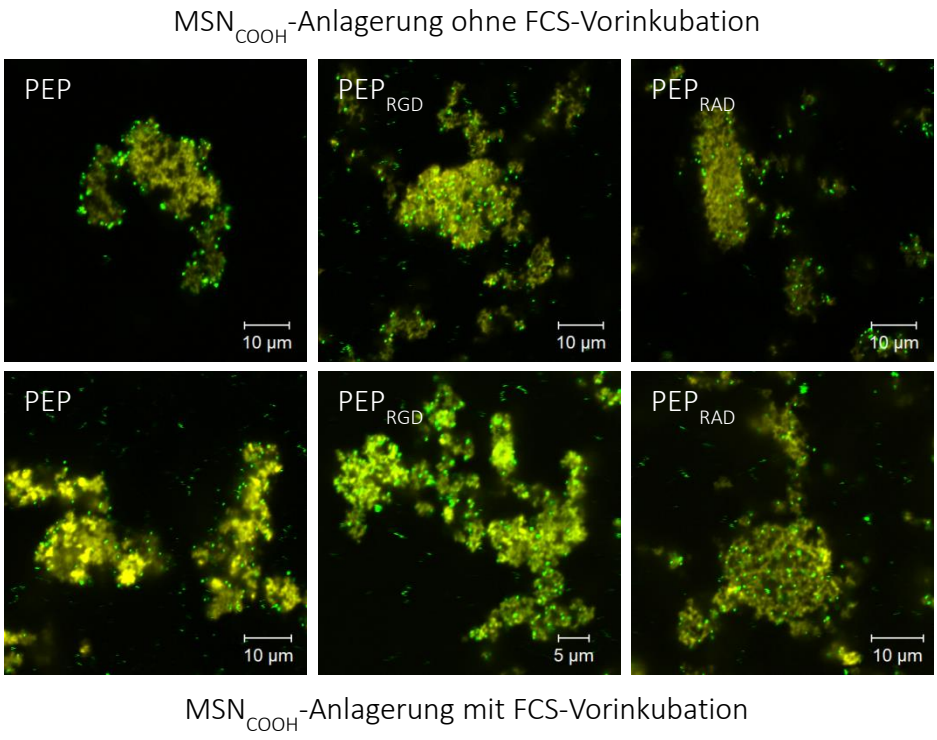


Abbildung 82: Untersuchung der 45-minütigen adsorptiven Anlagerung der MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) an die unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mit und ohne dreistündige Vorinkubation mit 10% FCS bei 37 °C mittels Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün).

Vergleicht man die Aufnahmen ohne Vorinkubation mit FCS mit denen mit Vorinkubation, spiegelt sich das Ergebnis der Durchflusszytometriemessungen wider. Hierbei ist für die beiden funktionalisierten Fibrillen eine vergleichbare Verteilung der Partikel über die Aggregate beobachtbar. Lediglich wenige freie Partikelaggregate können im Falle der vorinkubierten Fibrillen detektiert werden. Für die PEP-Fibrillen sieht dies anders aus. Hier ist die Oberfläche der Fibrillen ohne Proteincorona nahezu vollständig mit Partikeln übersäht. Durch Vorinkubation der Fibrillen mit FCS nimmt die Partikelanlagerung ab und es kommt zu einer äquivalenten Partikelverteilung wie für die Fibrillen PEP_{RGD} und PEP_{RAD}. Die übrigen nicht-angelagerten Partikel sind als frei umherschwimmende Partikelaggregate in einer Vielzahl detektierbar. Ein Grund für diese Abschwächung der Partikelanlagerung an die Außenseite der PEP-Fibrillen könnte die starke Zetapotentialänderung sein, welche aufgrund der Proteinadsorption entsteht und somit zu stärkeren repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und den Fibrillen führt. Allerdings sollte dieser Effekt dann auch Einfluss auf die Sättigungskonzentration der unterschiedlichen Fibrillen mit Partikeln nehmen. In Kapitel 4.2 konnte allerdings gezeigt werden, dass diese für alle drei Fibrillen im selben Bereich zwischen 250 und 300 µg/µmol Peptid liegt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass das Zetapotential keinen allzu großen Einfluss auf die Partikelanlagerung hat. Auch wenn die Fibrillen in ihrer Gesamtheit ein

negatives Zetapotential aufweisen, stehen für Interaktionen mit den carboxylierten Partikeln dennoch eine Vielzahl von Aminfunktionen zur Verfügung, welche sich ebenfalls an der Aggregatoberfläche befinden können. Wenn nun jedoch das Zetapotential lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Partikelanlagerung spielt, stellt sich die Frage, was der Absenkung der Partikeladsorption zu Grunde liegt. Eine naheliegende Erklärung ist die Proteincorona selbst. Sie ändert nicht nur das Zetapotential der Aggregate, sondern auch deren Oberflächenbeschaffenheit und zur Interaktion zur Verfügung stehende funktionelle Gruppen. Da die freien MSN_{COOH} bereits eine sehr schwache Wechselwirkung mit den Proteinen des FCS aufweisen (Abbildung 81A), kann auch die Anlagerung an die Fibrillenaggregate gehemmt werden, wenn diese mit Proteinen aus dem FCS überzogen vorliegen.

Da für einen selektiven Transport die PEP_{RGD}-Fibrillen von entscheidender Bedeutung sind und deren verbesserte Anlagerung an A549-Zellen im Vergleich zu den PEP-PNF in Kapitel 7.1 bereits nachgewiesen werden konnte, wurden die weiteren Experimente lediglich mit diesen durchgeführt. Proben, welche über die sequenzielle Zugabe präpariert wurden, werden im Folgenden als PEP_{RGD}_SZ bezeichnet. Für die Selektivität spielt zudem die Lokalisation der Partikel nach Inkubation mit den Zellen eine wichtige Rolle, da die reinen MSN_{COOH} kein eigenes Selektivitätsmotiv aufweisen und somit unspezifisch von den Zellen aufgenommen werden können. Wünschenswert wäre hingegen eine Anlagerung der Partikel an die PNF, welche selektiv an die Krebszellen angelagert vorliegen. Um dies genauer zu betrachten, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen herangezogen. Hierzu wurden die A549-Zellen mit den ATTO647N-markierten (10 mol%) PNF (26,2 µM) 3 h bei 37 °C vorinkubiert und anschließend die ATTO488-markierten MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) zugegeben und für weitere 45 min ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Abbildung 83 zeigt die Lokalisation der MSN_{COOH} im Falle der mit Partikeln vorinkubierten PEP_{RGD}-Fibrillen sowie bei der sequenziellen Zugabe.

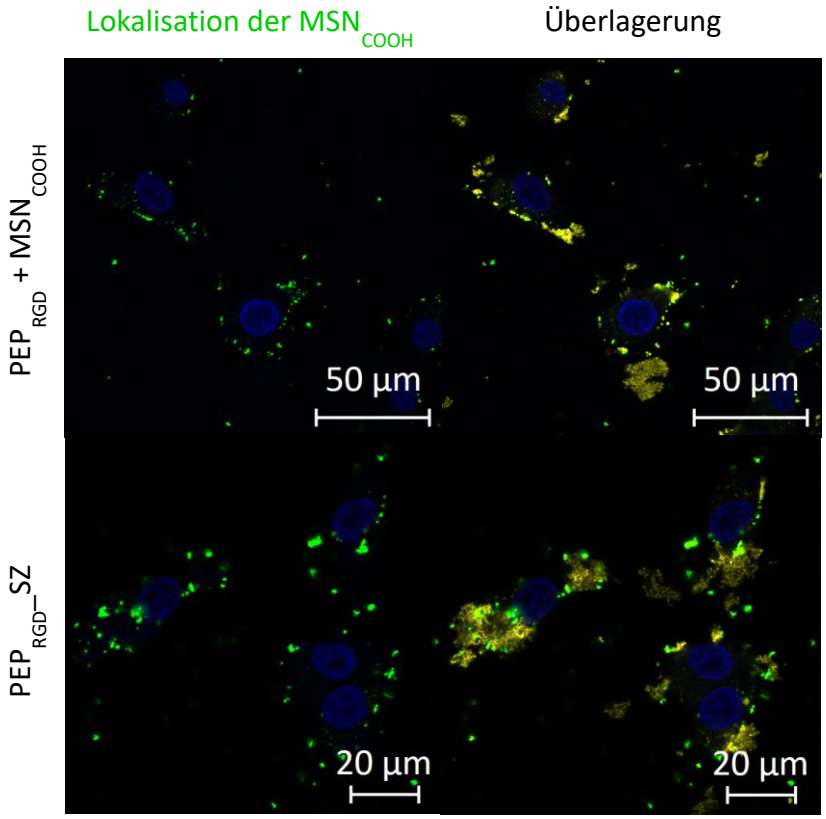


Abbildung 83: Untersuchung der Lokalisation der MSN_{COOH} bei Zugabe als 45 min vorinkubierte MSN_{COOH}-PNF-Aggregate (PNF: 26,2 µM; MSN: 150 µg/µmol Peptid; Inkubationszeit mit Zellen: 3 h) und Zugabe der MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) zu den bereits 3 h bei 37 °C mit den Zellen vorinkubierten und bereits angelagerten Fibrillenaggregaten (26,2 µM) an die A549-Zellen (Inkubationszeit nach Partikelzugabe: 45 min) über Konfokalmikroskopie (Zellkern: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

In beiden Fällen ist eine klare Kolokalisation der Partikel mit den angelagerten Fibrillen zu erkennen. Des Weiteren liegen die MSN_{COOH} sowohl bei der Vorinkubation der PNF mit den Partikeln als auch bei der sequenziellen Zugabe homogen über die Fibrillenaggregate verteilt vor und es kommt zu keiner übermäßigen Aggregation der Partikel, was durch die Langzeitstabilitätsmessungen der MSN_{COOH}-Dispersion in Zellmedium mit 10% FCS über DLS in Kapitel 5.1.1 bestätigt werden kann.

Ein weiterer essentieller Punkt ist die Wirkstofffreisetzung. Während die Selektivität des Partikeltransports im Falle der vorinkubierten Aggregate durch die Anlagerung der Fibrillen an die Zellen als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gesteuert wird, ist bei der sequenziellen Zugabe die Anlagerung der Partikel an die bereits an die Zellen gebundenen Fibrillen für die Kinetik entscheidend. Dieser Unterschied kann somit auch die Selektivität sowie die Kinetik der Wirkstofffreisetzung beeinflussen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden die Zellen mit den ATTO647N-markierten (10 mol%) PEP_{RGD}-PNF (26,2 µM) erneut für 3 h bei 37 °C vorinkubiert und anschließend für weitere

3 h mit den ATTO565-markierten MSN_{COOH}_Dauno (150 µg/µmol Peptid) versetzt. Vergleicht man die in Abbildung 84 dargestellten konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Daunorubicinfreisetzung ins Innere der Zellen, so sind klare Unterschiede erkennbar.

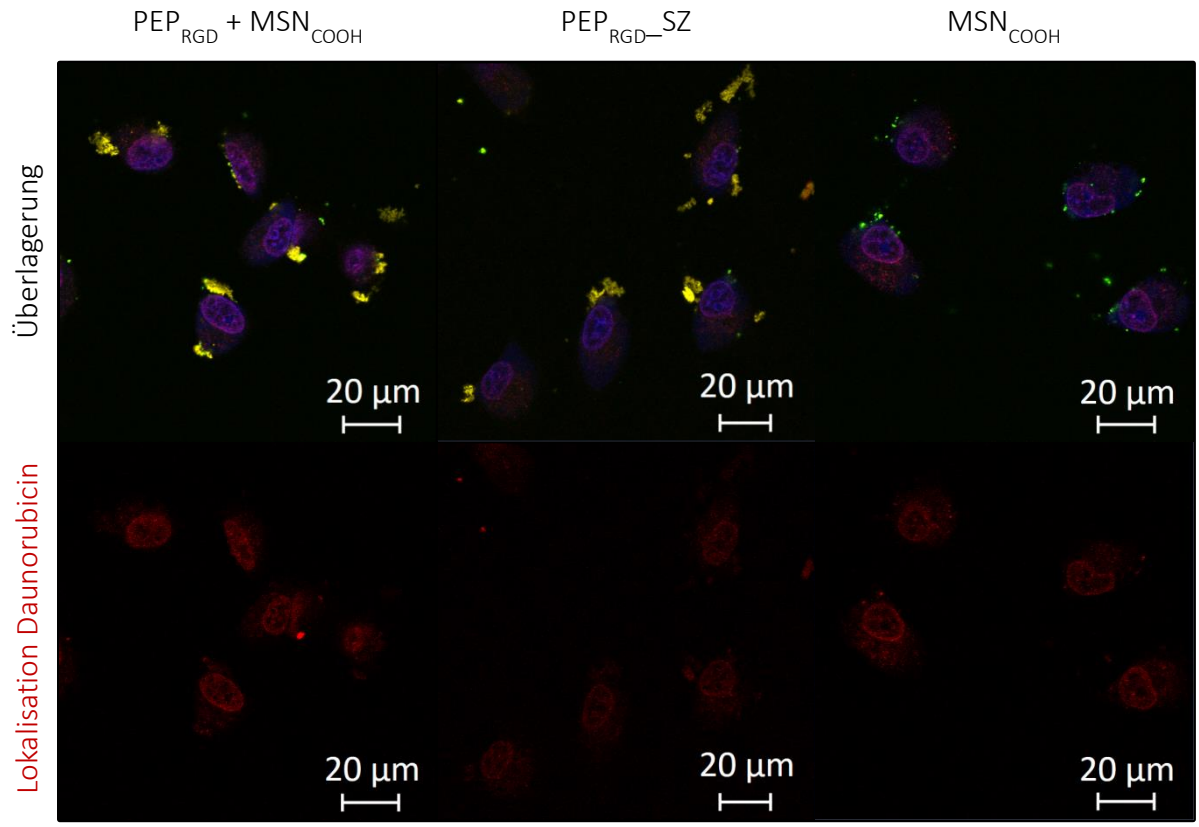


Abbildung 84: Untersuchung der Daunorubicinfreisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die daunorubicin-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; Daunorubicin - rot). Freisetzung des Daunorubicins über (A) PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, (B) Zugabe der MSN_{COOH} zu Zellen, welche bereits 3 h mit den PEP_{RGD}-PNF vorinkubiert wurden und (C) MSN_{COOH}. Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Während sich für das vorinkubierte System aus PEP_{RGD}-PNF mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} die stärkste Daunorubicinfreisetzung beobachten lässt, weisen die freien MSN_{COOH}_Dauno sowie das System PEP_{RGD}_SZ eine geschwächte Lokalisation des Wirkstoffes im Zellinneren auf. Hierbei wird durch die sequenzielle Zugabe am wenigsten Wirkstoff im Zellinneren vorgefunden. Da in Kapitel 7.2 gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Daunorubicinfreisetzung um eine diffusionsgetriebene Freisetzung handelt und in allen drei Fällen die gleichen Partikel verwendet wurden, liegen die Unterschiede vermutlich in der zellulären Aufnahme des Daunorubicins. Für das System mit den bereits angelagerten MSN_{COOH} wird das Daunorubicin durch die Wechselwirkung der Fibrillen mit den

Integrinrezeptoren in Zellnähe gebracht, wo es aus den Partikeln ausgewaschen wird und von den Zellen aufgenommen wird. Da die freien MSN_{COOH} keine spezifischen Wechselwirkungen mit den Zellen eingehen können und durch ihr negatives Zetapotential repulsive Kräfte zwischen den Partikeln und den Zellmembranen wirken, ist die Anlagerung der Partikel an die Zellen nach 3 h noch deutlich gehemmt, wodurch das Daunorubicin im gesamten Medium freigesetzt wird und erst nach und nach langsam in die Zellen diffundiert. Für das sequenzielle System ergibt sich hierbei die schwächste zelluläre Aufnahme des Daunorubicins. Da die Partikel bereits nach 45 min in Zellnähe lokalisiert vorliegen, wäre eigentlich eine analoge Freisetzung des Wirkstoffes zum vorinkubierten System zu erwarten. Da die Fibrillen allerdings große Teile der Zellmembran überlagern und die Partikel somit nicht in direkter Nähe zur Zellmembran angelagert werden können, liegen zwischen den Partikeln, welche das Daunorubicin freisetzen und der Zellmembran die sterisch anspruchsvollen fibrillären Netzwerke.

Für die Aufnahme hydrophober Substanzen wie dem Farbstoff DiO spielt die Diffusion eine untergeordnete Rolle, da die Wirkstofffreisetzung hierbei durch die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere vonstattengeht. Die Untersuchung der DiO-Freisetzung erfolgte hierbei wie für die Daunorubicinfreisetzung durch Vorinkubation der Zellen mit den ATTO647N-markierten (10 mol%) PEP_{RGD}-PNF (26,2 µM) und anschließender Zugabe der ATTO565-markierten MSN_{COOH}_DiO (150 µg/µmol Peptid), welche für weitere 3 bzw. 24 h inkubiert wurden (Abbildung 85 und Abbildung 86).

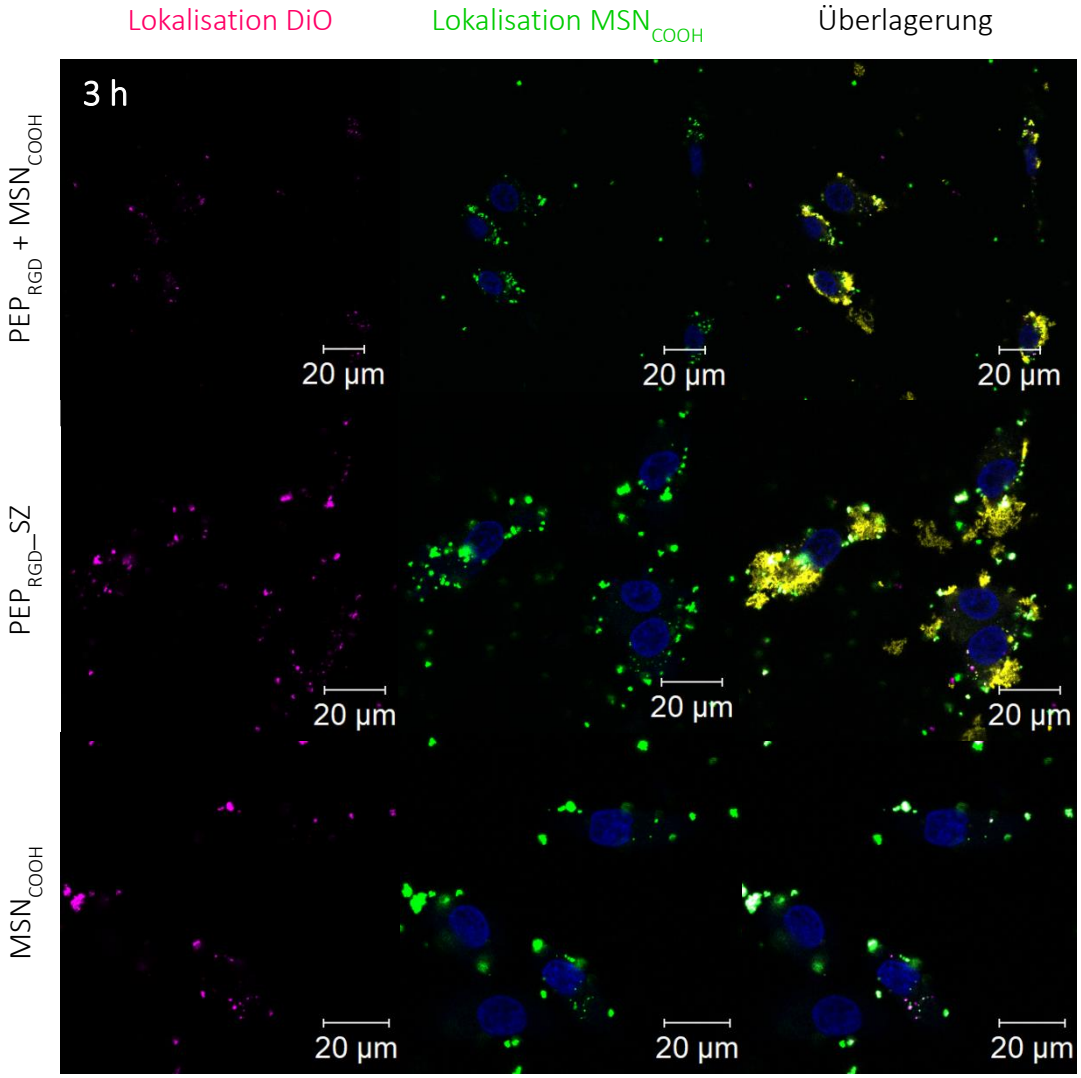


Abbildung 85: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Freisetzung des DiOs über (A) PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, (B) Zugabe der MSN_{COOH} zu Zellen, welche bereits 3 h mit den PEP_{RGD}-PNF vorinkubiert wurden und (C) MSN_{COOH}. Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Wie bereits für alle anderen untersuchten Systeme ist auch in diesem Fall nach 3 h Inkubation keinerlei DiO-Freisetzung in die Zellen zu beobachten. Obwohl sich eine Vielzahl der Partikel bereits in Zellnähe befindet, kommt es auch hier nach 3 h noch zu keiner detektierbaren Partikelaufnahme durch die Zellen.

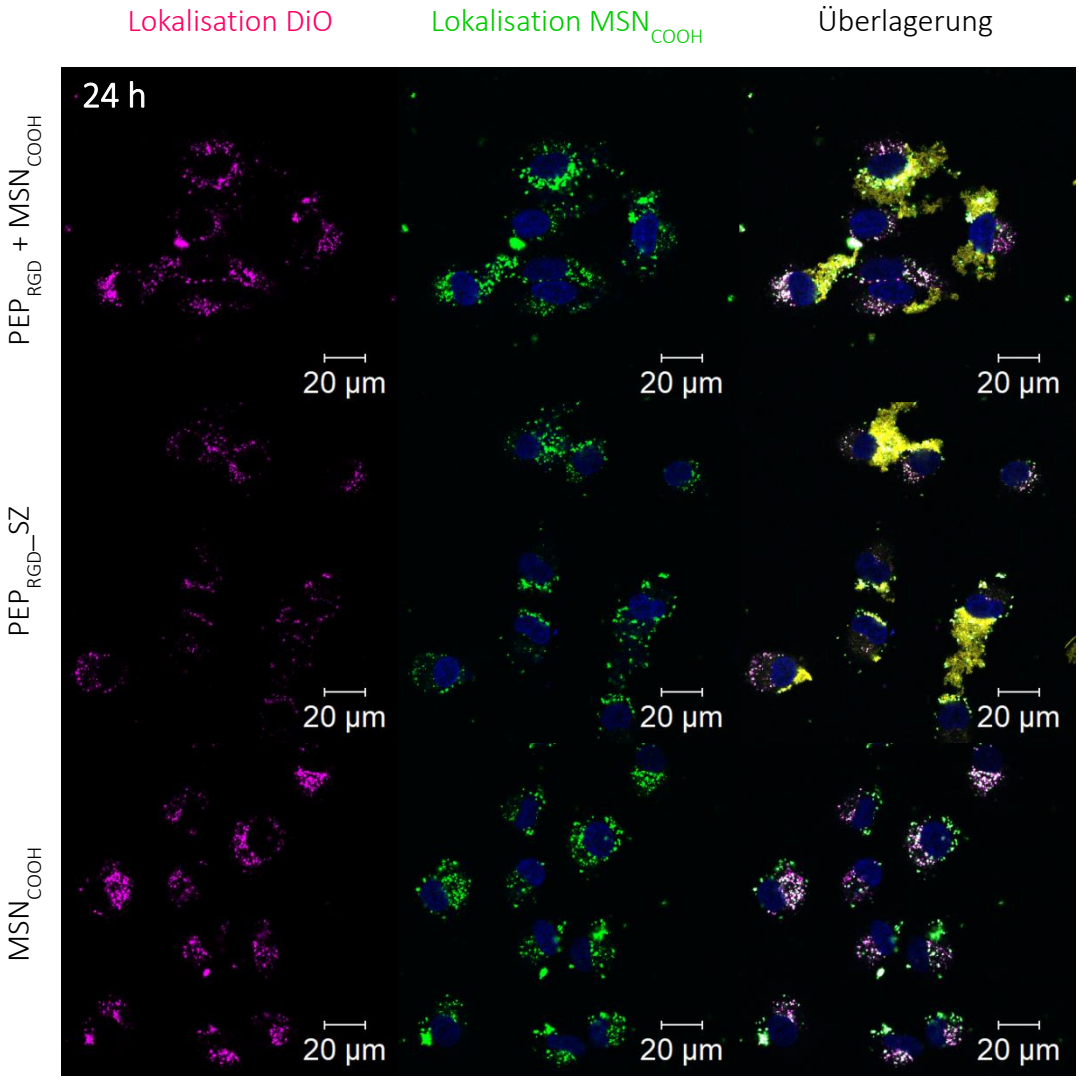


Abbildung 86: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Freisetzung des DiOs über (A) PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, (B) Zugabe der MSN_{COOH} zu Zellen, welche bereits 3 h mit den PEP_{RGD}-PNF vorinkubiert wurden und (C) MSN_{COOH}. Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert.

Nach längerer Inkubationszeit kommt es schließlich zur Freisetzung des hydrophoben DiO ins Zellinnere. Für das sequenziell zugegebene PEP_{RGD}_SZ wird hierbei eine deutlich schwächere Freisetzung beobachtet als für die Systeme mit freien MSN_{COOH} und PEP_{RGD} mit vorinkubierten MSN_{COOH}. Auch die Anzahl an Partikeln in Zellnähe ist für diese beiden Systeme deutlich höher als im Falle von PEP_{RGD}_SZ. Die Kolokalisation der Partikel und des DiO unterstützt hierbei die Vermutung einer Freisetzung durch Partikelaufnahme in die Zellen. Dass die freien MSN_{COOH} eine erhöhte Aufnahme im Vergleich zu den Partikeln des Systems PEP_{RGD}_SZ zeigen, deutet auf ein Abfangen der Partikel durch die zuvor angelagerten PEP_{RGD}-PNF hin, wodurch weniger Partikel ins Zellinnere

aufgenommen werden. Zudem liegen einige Partikel in den Zellen vor ohne sich in direkter Nähe zu Fibrillen zu befinden. Dies spricht ebenfalls für eine Ablösung einzelner Partikel von den Fibrillen und die Aufnahme dieser ins Zellinnere. Insgesamt finden sich an den von den Zellen wegweisenden Oberflächen der Fibrillen deutlich weniger Partikel nach 24 h. Ursache hierfür kann der Partikelabbau sein, welcher nach 24 h beträchtlich vorangeschritten ist (Kapitel 5.1.1).

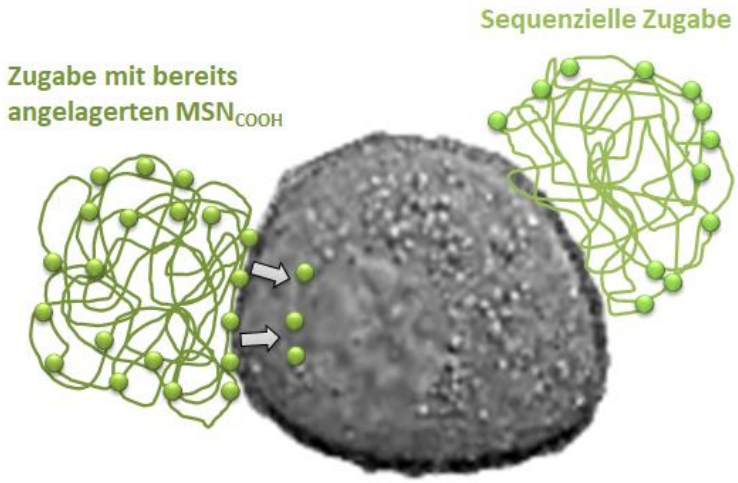


Abbildung 87: Schematische Darstellung der Partikelaufnahme durch die Zellen im Falle des vorinkubierten sowie des sequenziell zugegebenen Systems.

Betrachtet man die schematische Lokalisation der Partikel an den Aggregaten im Falle des vorinkubierten und des sequenziell zugegebenen Systems, wird deutlich, dass die Zellnähe der Partikel für PEP_{RGD}_SZ deutlich abnimmt im Vergleich zu den PEP_{RGD}-Fibrillen mit bereits angelagerten MSN_{COOH} (Abbildung 87). Durch die Vorinkubation der Fibrillen mit den Partikeln liegen diese auf der gesamten Oberfläche gleichmäßig verteilt vor. Lagern die Fibrillen nun an die Zellen an, wird sich ein Teil der Partikel zwischen Fibrillennetzwerk und Zellmembran vorfinden. Diese Partikel liegen in unmittelbarer Nähe zur Zelle und können von dieser mit der Zeit gut aufgenommen werden. Zudem führt der Einschluss der Partikel womöglich zu einem verringerten Abbau der Partikel, da diese durch die Zellmembran und die Fibrillen unter Umständen einen gewissen Schutz vor Hydrolyse erfahren. Dies würde die Tatsache erklären, dass im Falle von PEP_{RGD}_SZ insgesamt deutlich weniger Partikel nach 24 h detektiert werden können, obwohl es nach 3 h zu einer starken Anlagerung der MSN_{COOH} an die PNF kommt. Für das sequenziell zugegebene System kommt es zu keinem Einschluss der Partikel zwischen Zellmembran und Aggregat, sondern lediglich zu einer Anlagerung der Partikel an die bereits angebundenen Fibrillen. Dies führt zu einem nahezu vollständigen hydrolytischen Abbau der Partikel innerhalb der ersten 24 h. Zudem ist die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere gehemmt, da die direkte

Zellnähe durch den Abstandshalter Fibrille nicht gegeben ist, was eine abgeschwächte DiO-Freisetzung im Zellinneren zur Folge hat.

Insgesamt kann gesagt werden, dass eine sequenzielle Zugabe der Komponenten durchaus möglich ist, allerdings wird die Wirkstofffreisetzung im Falle von hydrophilen als auch hydrophoben Substanzen gehemmt. Als Grund hierfür kann die fehlende Zellnähe aufgrund der nachträglichen Anlagerung der Partikel an die Fibrillen aufgeführt werden. Weitere Schwierigkeiten, welche sich bei *in vivo*-Anwendungen ergeben könnten, sind eine frühzeitige Ausscheidung der freien Partikel aus dem Blutkreislauf sowie eine unspezifische Aufnahme der Partikel in andere Gewebetypen aufgrund der fehlenden Selektivität in Abwesenheit der Fibrillen.[215,267,268] Hierzu wäre der Einsatz von Partikeln denkbar, welche einen sogenannten *Stealth*-Effekt aufweisen. Die Arbeitsgruppe um Mailänder und Wurm konnte zeigen, dass es möglich ist, Nanoträgermaterialien durch bestimmte Funktionalisierungen wie beispielsweise durch das biokompatible Polyethylenglykol (PEG) eine Art Tarnkappe aufzusetzen.[226] Hierbei kommt es durch diese Funktionalisierung zur Adsorption bestimmter Proteine, welche den Nanoträger vor der Ausscheidung aus dem Blutkreislauf und somit aus dem Körper schützen. Auch He *et al.*[268] konnten zeigen, dass eine PEGylierung der Partikel zur Verlängerung der Blutzirkulation führt. Ein ebenso nicht vernachlässigbarer Einfluss ist der Blutstrom. Dieser sorgt für eine stetige Bewegung des Blutserums, wodurch unter Umständen eine Anlagerung an die Fibrillen unterbunden wird, da diese Anlagerung eine gewisse Zeit benötigt (Kapitel 4.2), um vollständig abzulaufen. Werden die freien Partikel zu schnell vom Blutstrom weitertransportiert, kann eine Anbindung an die Fibrillen nicht stattfinden.

IV. Zusammenfassung und Ausblick

Für medizinische Anwendungen spielt die Nanotechnologie zunehmend eine wichtige Rolle, da sie unter anderem nanoskopische Systeme bereitstellt, welche spezifisch bestimmte Zell- und Gewebetypen adressieren können und sich somit besonders für den Wirkstofftransport eignen. Ein bereits sehr bewehrtes nanoskopisches System sind mesoporöse Silikapartikel (MSN), welche jedoch aufgrund ihrer hydrolytischen Instabilität einer schnellen Ablösung ihrer Funktionalitäten unterliegen, was unter anderem den Verlust der Selektivität nach sich ziehen kann. Zudem stellen eine schnelle Ausscheidung aus dem Blutkreislauf sowie eine geringe Kontaktfläche für die Zellanlagerung aufgrund ihrer sphärischen Form weitere Hürden dar. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Partikel im Zuge dieser Arbeit nicht-kovalent an Peptidnanofibrillen (PNF) angebunden, welche für eine erhöhte Selektivität gegenüber Krebszellen mit der RGD-Sequenz versehen wurden. In dieser Arbeit soll dieses modulare Wirkstofftransportsystem auf seine Eignung für den selektiven Transport hydrophiler sowie hydrophober Wirkstoffe in A549-Lungenkrebszellen untersucht werden.

Durch die Kombination des Sol-Gel-Prozesses mit dem Endotemplatverfahren konnten unter der Verwendung des Tensids C_{16}TAB MSN mit einem Durchmesser von etwa 150 nm synthetisiert werden, welche einen Porendurchmesser von ungefähr 3 nm aufweisen. Aufgrund des Porensystems konnten mittels BET-Analyse der Stickstoffsorptionsisothermen spezifische Oberflächen von knapp 1000 m^2/g ermittelt werden. Durch die Tensidentfernung mittels Extraktion oder Kalzinierung konnten amin- als auch unfunktionalisierte MSNs erhalten werden, wobei die unfunktionalisierten MSN durch Umsetzen mit Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz erfolgreich carboxyliert werden konnten. Die Charakterisierung der Partikel erfolgte hierbei über Transelektronenmikroskopie (TEM), Dynamische Lichtstreuung (DLS), thermogravimetrische Analyse (TGA), Zetapotential- und Stickstoffsorptionsmessungen.

In einem weiteren Schritt wurde das Peptid PEP (KFKFEFEF) sowie dessen RGD- und RAD-funktionalisierten Derivate PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt und über matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) mit Flugzeitmassenspektrometrie (*time of flight* – TOF MS) charakterisiert. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Methode der Festphasenpeptidsynthese zudem soweit optimiert, dass eine Synthese ohne den Einsatz von Mikrowellen möglich wurde. Hierzu wurden die Kopplungsschritte bei ebenfalls 75 °C durchgeführt, wobei ab der achten Aminosäure jedoch die Kopplungszeiten verdoppelt werden mussten und die Kopplungsschritte doppelt durchgeführt wurden, um den schlechteren Kopplungsausbeuten aufgrund der fehlenden Mikrowellen entgegenzuwirken. Mit Hilfe dieser Methode konnten reine Peptide mit hohen Ausbeuten erhalten werden, welche keiner weiteren Aufreinigung unterzogen werden

mussten. Die über Festphasenpeptidsynthese hergestellten Peptide wurden anschließend auf ihre Eignung zur Ausbildung von Peptidnanofibrillen untersucht. Hierbei konnte durch die Kombination der Ergebnisse aus DLS und ProteoStat®-Einlagerung in die ß-Faltblattstrukturen die schnelle Ausbildung fibrillärer Strukturen in wässrigen Medien beobachtet werden, welche bereits nach 1 h nahezu vollständig abgeschlossen ist. Die resultierenden PNF liegen dabei als lange unverzweigte dünne Fasern vor, welche zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Durch die Einführung der RGD- bzw. RAD-Sequenz konnte mittels TEM im Vergleich zu den PEP-Fibrillen die Ausbildung kleinerer Aggregate beobachtet werden, welche zu dichteren Netzwerken zusammenlagern. Zudem führen die zusätzlichen Aminosäuren zur Absenkung des Zetapotentials der ausgebildeten PNF. Durch die Mischung der Peptidstocklösungen von PEP und PEP_{RGD} in unterschiedlichen Molverhältnissen gelang es, PNF mit unterschiedlichen Anteilen an RGD-Sequenzen herzustellen, welche mit zunehmendem RGD-Anteil einen höheren prozentualen Anteil an helikalen Strukturen und einen abnehmenden prozentualen Anteil an ß-Faltblattstrukturen aufweisen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass es sich hierbei um homogene PNF-Aggregate handelt und es zu keiner Separation der beiden Peptide kommt.

Basierend auf den Beobachtungen von Puddu und Perry[113] wurden die MSN nicht-kovalent an die PNF angelagert, wobei sich in TEM Aufnahmen lediglich für die carboxylierten MSN eine homogene Verteilung der Partikel über die PNF-Aggregate zeigte, während es für die MSN_{OH} zu einigen frei vorliegenden Partikeln und für die MSN_{NH2} zu starker Partikelaggregation kam. Aus diesem Grund wurden für weitere Untersuchungen lediglich die MSN_{COOH} verwendet. Da die PNF-Aggregate aufgrund ihrer Größe durchflusszytometrisch detektiert werden können, wurden fluoreszenzmarkierte MSN_{COOH} an die PNF angelagert und diese an einem Durchflusszytometer vermessen, wobei sich eine schnelle Wechselwirkung zwischen den Partikeln und den PNF beobachten lässt, welche nach 45 min vollständig abgelaufen ist. Sättigungsuntersuchungen mittels Zetapotential, Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie ergaben eine vollständige Anlagerung der Partikel bis zu 250 µg MSN/µmol Peptid, wobei konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass es zwischen den unterschiedlichen PNF zu Unterschieden in der Dichte der Partikelanlagerung auf der Außenseite der Fibrillennetzwerke kommt, welche sich durch die Unterschiede in der Größe der Aggregate begründen lassen. Die Charakterisierung mittels TEM, DLS, Zetapotentialmessungen und Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Analyse erbrachte kaum einen Einfluss der MSN_{COOH} auf die PNF-Aggregate. Während die Partikelanlagerung zu einer leichten Absenkung des Zetapotentials für alle drei PNF führt, kommt es lediglich für PEP zu einer leichten Änderung der Sekundärstrukturanteile und zu einer deutlichen Abnahme in der Hydrodynamischen Aggregatgröße. Des Weiteren wurde die Einlagerung der MSN_{COOH}

in das Fibrillennetzwerk PEP_{RGD} untersucht. Hierzu lagen die Partikel bereits während der Fibrillenbildung im Medium vor und konnten erfolgreich in das fibrilläre Netzwerk eingebettet werden, wobei die ausgebildeten Fibrillen eine stark veränderte Sekundärstruktur mit geringerem ß-Faltblattanteil als auch eine veränderte Morphologie aufweisen im Vergleich zu den PNF ohne Partikel. Aufgrund kinetischer Untersuchungen mittels DLS, TEM und Zetapotentialmessungen kann von einer schnellen Wechselwirkung zwischen den Partikeln und den Peptiden ausgegangen werden, welche den Grund für die veränderte Struktur der Fibrillen liefern kann.

Um die Eignung als Wirkstofftransportsystem zu testen, wurden das Verhalten unter biologisch relevanten Bedingungen als auch die Biokompatibilität genauer untersucht. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Bioabbaubarkeit analysiert, was in wässrigen Medien mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C innerhalb von 48 h zu einem nahezu vollständigen Abbau der MSN_{COOH} führt, wobei mittels TGA nach den ersten 2 h bereits keine Funktionalisierungen mehr auf den Partikeln nachgewiesen werden konnten. Auch die nicht-kovalente Anlagerung an die PNF nimmt keinen Einfluss auf die Auflösung der Partikel, was sich durch die Lokalisation der Partikel an der Außenseite der Aggregate erklären lässt. Da die Partikel im Falle des PEP_{RGD}_IS innerhalb der Fibrillenstrukturen liegen, kann hierdurch die Hydrolyse der Partikel stark abgeschwächt werden, wodurch es nach 48 h lediglich zu einer Auflösung von knapp 50% kommt. Untersucht man die Proteolyse der PNF durch Protease K über die Abnahme des ProteoStat®-Fluoreszenzsignals, ergeben sich Halbwertszeiten zwischen 7 und 11 min., welche sich durch die Anlagerung der Partikel um etwa 5 min. erhöhen lassen. In allen Fällen lassen sich mittels TEM nach 24 h immer noch fibrilläre Strukturen finden, welche zu Aggregaten zusammengelagert vorliegen. Kombiniert man die Peptide aus L-Aminosäuren mit Peptiden, welche aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, können die Halbwertszeiten unter Umständen weiter erhöht werden, was in weiteren Untersuchungen getestet werden sollte. Ebenfalls von Interesse ist die Ausbildung einer Proteincorona, da Proteine im Körper ubiquitär sind. Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte die Zusammensetzung der *hard corona* untersucht werden, wobei sich für alle Fibrillen eine ähnliche Zusammensetzung ergab, während die Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen mit steigendem RGD-Anteil abnimmt. Die nicht-kovalent angelagerten MSN_{COOH} nehmen hierbei keinen Einfluss auf die Proteinadsorption, was einerseits an der geringen eingesetzten Partikelkonzentration und andererseits an der sowieso schon eher geringen Proteinadsorption der carboxylierten Partikel liegen kann. Für das PEP_{RGD}_IS ergibt sich ebenfalls nur eine geringe Änderung in der Zusammensetzung der Corona. Um in einem letzten Schritt die Toxizität der verwendeten Komponenten auf die Zellen auszuschließen, wurden Zellvitalitätsassays mit A549-Zellen durchgeführt. Hierbei ergab sich nach 24 und 48 h weder für die Einzelkomponenten

noch für die unterschiedlichen Kombinationen aus Partikeln und Fibrillen eine detektierbare Zelltoxizität.

Die Anwendung als Wirkstofftransportsystem bringt weitere Anforderungen mit sich. Im Zuge dessen wurde unter anderem die Anlagerung der Aggregate an A549-Zellen untersucht. Hierbei konnte anhand von durchflusszytometrischen Messungen eine Zunahme der angelagerten PNF mit steigendem RGD-Anteil beobachtet werden. Auch die Anlagerung der MSN_{COOH} führte zu keiner Änderung dieses Trends. Für das PEP_{RGD}_IS ergibt sich eine analoge Anlagerung zu den PEP_{RGD}-Fibrillen mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH}. Durchflusszytometrische Experimente, bei welchen die außerhalb der Zelle befindlichen Partikel in ihrer Fluoreszenz gequencht wurden, zeigen nach 24 h für die PEP_{RGD}-Aggregate die höchste Anzahl an in die Zellen transportierten Partikeln. Im Falle der in die Fibrillen eingebetteten Partikel scheint eine Ablösung dieser erschwert, wodurch trotz gleich starker Zellanlagerung der Aggregate weniger Partikel in den Zellen detektiert werden können als es für PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN der Fall ist. Konfokalmikroskopische Aufnahmen nach 3 h Inkubation weisen hingegen noch für keines der Systeme Partikel im Inneren der Zellen auf. Um die Partikelablösung zu beschleunigen, könnten PEGylierte Partikel verwendet werden, welche schwächere Wechselwirkungen mit den Peptiden ausbilden und somit leichter abgelöst werden könnten. Allerdings zeigen Vorarbeiten in der Masterarbeit von Florian Fiesinger[312] bereits, dass bei zu hohem PEGylierungsgrad die Partikelanlagerung an die Fibrillennetzwerke nicht mehr stattfindet, weshalb hierbei weitergehende Optimierungsarbeiten und Untersuchungen nötig wären.

In einem weiteren Schritt wurden die Partikel mit dem hydrophilen Zytostatikum Daunorubicin und dem hydrophobem Modellwirkstoff DiO beladen, um die Wirkstofffreisetzung in die Zellen genauer zu untersuchen. Während für das hydrophile Daunorubicin hohe Auswaschungseffekte aufgrund der guten Wasserlöslichkeit auftreten, wird das DiO ausschließlich durch die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere sowie durch deren Abbau freigesetzt. Dies hat zur Folge, dass nach 3-stündiger Inkubation für keines der Systeme freies DiO in den Zellen vorzufinden ist, während in allen Fällen Daunorubicin im Zellinneren detektiert werden kann. Hierbei erhöht die Einführung der RGD-Sequenz zwar die Menge an Daunorubicin in den Zellen, dennoch sind die Unterschiede aufgrund der hohen Auswaschung aus den Partikeln eher gering. Um diese frühzeitige Wirkstofffreisetzung zu minimieren, könnten die Partikelporen reversibel verschlossen werden, wodurch sich eine höhere Selektivität für hydrophile Wirkstoffe ergeben könnte. Erhöht man die Inkubationszeit auf 24 h, wird auch für das DiO ein Fluoreszenzsignal im Zellinneren sichtbar, wobei dieses für die RGD-funktionalisierten PNF und die freien Partikel am höchsten ausfällt, was sich mit den erhaltenen Daten für die Partikelanzahl in den Zellen deckt. Die Einbettung der Partikel in das Fibrillennetzwerk führt ebenfalls zu einer Absenkung

der Freisetzung von hydrophilen als auch hydrophoben Wirkstoffen. Grund hierfür ist einerseits der geringere hydrolytische Abbau der Partikel sowie andererseits die erschwerte Ablösung der Partikel von den PNF für PEP_{RGD}_IS. Diese Ergebnisse legen den Rückschluss nahe, dass sich das PEP_{RGD}_IS als Langzeitdepot für hydrophobe Wirkstoffe eignen könnte, was in weiteren Untersuchungen mit längeren Inkubationszeiten weiter untersucht werden sollte.

Die schnelle Wechselwirkung zwischen den Partikeln und den Peptiden eröffnet die Möglichkeit einer sequenziellen Zugabe der beiden Komponenten. Hierbei werden in einem ersten Schritt die Fibrillen mit den A549-Zellen für 3 h inkubiert und anschließend die MSN_{COOH} zugegeben, welche nun an die bereits an die Zellen angebundenen Fibrillen nicht-kovalent anlagern können und diese somit in Zellnähe lokalisieren. Mittels durchflusszytometrischer als auch konfokalmikroskopischer Messungen kann gezeigt werden, dass die Ausbildung einer Proteincorona um die Fibrillenaggregate Einfluss auf die Partikelanlagerung nimmt, was eine Absenkung der Partikelanlagerung nach sich zieht. Diese fällt für die PEP-Fibrillen am stärksten aus, was mit der höheren Gesamtmenge an adsorbierten Proteinen zusammenhängen kann, während für PEP_{RGD} und PEP_{RAD} lediglich wenige freie Partikel vorhanden sind. Konfokalmikroskopische Bilder für die Umsetzung mit Zellen weisen eine hohe Affinität der Partikel zu den Fibrillen auf, da 3 h nach Partikelzugabe kaum freie Partikel in den Zellen detektiert werden, was für ein Abfangen der Partikel durch die angelagerten Fibrillen spricht. Allerdings handelt es sich bei diesen Untersuchungen lediglich um *in vitro*-Experimente, welche sich in einigen Punkten grundlegend von den *in vivo*-Bedingungen unterscheiden. So sollten weitere Untersuchungen angestellt werden, welche den Einfluss des Blutstroms auf die Partikelanlagerung untersuchen. Ebenso kann es zu einer sehr schnellen Ausscheidung der unfunktionalisierten Partikel aus dem Blutkreislauf kommen. Hierbei würde ebenfalls die Einführung einer PEG-Funktionalisierung helfen, welche aber auch in diesem Fall für eine erfolgreiche Anbindung an die PNF optimiert werden müsste. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die mögliche unspezifische Aufnahme der freien unfunktionalisierten Partikel durch das gesunde Gewebe, was ebenfalls genauer analysiert werden müsste.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuartiges modulares Wirkstofftransportsystem auf Basis von mesoporösen Silikapartikeln und Peptidnanofibrillen vorgestellt werden, welches hydrophobe als auch hydrophile Wirkstoffe selektiv zu Krebszellen mit überexpressionierten Integrinrezeptoren transportieren kann. Neben einer guten Biokompatibilität weist sich dieses System auch mit einer Bioabbaubarkeit aus, was es als potentielles Wirkstofftransportsystem auszeichnet. Im Zuge dieser Arbeit konnte zudem anhand von *in vitro*-Untersuchungen ein tiefergehender Einblick in die Mechanismen der Partikelanbindung an die Fibrillen sowie die Freisetzung der Wirkstoffe in die Zellen erlangt werden.

V. Experimentalteil

Hier werden die verwendeten Materialien und Geräte beschrieben. Ebenso wird in diesem Kapitel auf die genaue Durchführung der in Kapitel III diskutierten Experimente eingegangen.

1. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Messgeräte und Chemikalien samt ihrer Hersteller aufgelistet. Zudem werden die verwendeten Einstellungen für die durchgeführten Messungen aufgeführt. In einem letzten Kapitel wird die Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen beschrieben.

1.1. Verwendete Messgeräte

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential

DLS und Zetapotential wurden an einem Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600 der Firma Malvern Instruments am Institut für Anorganische Chemie II mittels Rückstreuung bei 173 ° und einer Wellenlänge von 633 nm gemessen. Der Mittelwert der Proben ergibt sich aus drei Messungen im Automatikmodus. Für die Fibrillen wurde darüber hinaus jede Probe dreifach bestimmt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM Aufnahmen wurden an einem JEM-1400 der Firma Joel in der Zentralen Einrichtung für Elektronenmikroskopie durchgeführt. Das Elektronenmikroskop weist eine Beschleunigungsspannung von 120 kV auf. Als Probenträger wurden Kupfernetzchen mit aufgedampfter Lochfolie aus Kohlenstoff verwendet.

Thermogravimetrische Analyse (TGA)

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

Stickstoffsorptionsmessungen

Für die Stickstoffsorptionsmessungen kam eine Quadrasorb-SI der Firma Quantachrome Instruments am Institut für Anorganische Chemie II zum Einsatz. Hierzu wurden die Proben zunächst bei 140 °C für 20 h im Vakuum ausgeheizt und anschließen vermessen. Für die Berechnung der spezifischen Oberfläche wurde die Methode nach Brunauer, Emmet und Teller (BET)[281] verwendet. Die Porendurchmesser wurden nach der nicht-lokalen Dichtefunktionaltheorie (NL-DFT)[313] berechnet. Hierzu wurde das *equilibrium*-Kernel für Stickstoff bei 77 K auf Silika-basierten Materialien mit zylindrischen Poren verwendet.

Peptidsynthesizer

Die Peptidsynthese wurde nach der Fmoc-Strategie nach Merrifield[26] an einem mikrowellenassistierten Initiator+ SP Wave der Firma Biotage am Institut für Organische Chemie III durchgeführt. Hierbei wurden standardmäßig 0,1 mM Ansätze in 10 mL-Synthesespritzen angesetzt.

Freezedryer

Für die Lyophilisierung wurden die Proben in Wasser suspendiert und anschließend für 20 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lyophilisierung erfolgte schließlich an einem Alpha 2-4 LD der Firma Christ Gefriertrocknungsanlagen am Institut für Organische Chemie III.

Massenspektrometrie – MALDI-TOF MS

Die massenspektrometrische Analyse der Peptide wurde an einem SolariX Hybrid 7T FT-ICR der Firma Bruker am Institut für Organische Chemie III durchgeführt. Hierbei wurde die matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) mit Flugzeitmassenspektrometrie (*time of flight* – TOF MS). Als Matrix wurde eine gesättigte α-Cyano-4-hydroxyzimtsäurelösung in einem 1:1-Gemisch aus Wasser und Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure verwendet. Poly(benzylmethacrylat) (PBM 2000) gelöst in einer gesättigten Matrixlösung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Tetrahydrofuran diente als Standard.

Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR)

Die Infrarot-Bandenspektren wurden an einem Tensor 27 der Firma Bruker am Institut für Anorganische Chemie II aufgenommen. Es wurde mit einem Diamantkristall als ATR-Element (Platinum Diamond) und einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} gearbeitet.

Fluoreszenzspektroskopie

Für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen kam ein Multiplate Reader Spark® 10M der Firma Tecan am Institut für Anorganische Chemie II zum Einsatz. Hierbei wurden 96-Well-Fluoreszenzplatten für die Messungen verwendet.

Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem BD FACSCanto™ II Cell Analyzer der Firma BD Biosciences am Institut für Molekulare Virologie durchgeführt.

Konfokalmikroskopie

Lasermikroskopische Aufnahmen wurden an einem LSM710 der Firma Zeiss am Institut für Molekulare Virologie aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde das dazugehörige Programm *LSM-710 Release Version 5.5 SP1* verwendet.

Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

Der Siliziumgehalt wurde über ICP-OES an einem ARCOS SOP der Firma Spectro Analytical Instruments GmbH am Helmholtz-Institut Ulm (HIU) bestimmt. Es wurde mit einer Plasmaleistung von 1400 W gemessen. Der Kühlgasstrom betrug 12 L/min und der Zerstäubungsgasstrom 0,75 L/min. Die untere Detektionsgrenze für Silizium liegt bei 0,01 mg/L.

Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer PROTEAN II XL Gelelektrophoresekammer der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH bei einer konstanten Spannung von 300 V. Als Molekulargewichtsstandard wurde der *PageRuler Unstained Protein Ladder* verwendet. Die Coomassie-gefärbten Gele wurden an einem *biorad™ geldoc system* ebenfalls der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH am Institut für Biophysik visualisiert und mit dem Programm *image lab 5.0* analysiert.

Mikroskopie

Für die Zellexperimente wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer an einem Vert. A1-Mikroskop der Firma Zeiss ausgezählt.

Luminometer

Lumineszenzintensitäten wurden an einem Orion Microplate Luminometer der Firma Berthold Detection Systems in 96-Well-Lumineszenzplatten am Institut für Molekulare Virologie vermessen.

UV/Vis-Spektralphotometrie

UV/Vis-Spektralphotometrische Messungen wurden an einem NanoDrop 2000c der Firma Thermo Scientific am Institut für Anorganische Chemie II.

1.2. Verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Tabelle 8) wurden, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufarbeitungsschritte verwendet. Das Trocknen des Dichlormethans erfolgte über Phosphorpentoxid unter Rückfluss und anschließender Destillation. Gelagert wurde das trockene Dichlormethan über Molsieb 4 Å.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
(3-Aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS) (97%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1,4-Dithiothreit (≥99%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat (HBTU)	Carbolution Chemicals GmbH
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure-Natrium-salz (HEPES) (99,3%)	Merck KGaA
3,3‘-Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Aceton (technisch)	VWR International GmbH
Acrylamid (2x krist.) (≥98%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose (low melt)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat (≥95%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumnitrat (99,0%)	Merck KGaA
Ammoniumperoxodisulfat (≥98%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
ATTO488-Amin	ATTO-TEC GmbH
ATTO488-NHS-Ester	ATTO-TEC GmbH

Chemikalie	Hersteller
ATTO565-Amin	ATTO-TEC GmbH
ATTO647N-NHS-Ester	ATTO-TEC GmbH
Bromphenolblau	Merck KGaA
Calciumchlorid	
Carboxyethylsilantriol-Natriumsalz (25% in Wasser) (CES)	abcr GmbH
CellTiterGlo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation
Cetyltrimethylammoniumbromid (C_{16}TAB) (99,0%)	VWR International GmbH
Coomassie® Brilliant Blau G-250	Carl Roth GmbH & Co. KG
Cyclohexan (wasserfrei; 99,5%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Daunorubicin-Hydrochlorid (98%)	CHEMOS GmbH
Dichlormethan (≥99,9%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Diethylether	VWR International GmbH
Diisopropylethylamin (DiPEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylformamid	VWR International GmbH
Dimethylsulfoxid (wasserfrei)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka BioChemika
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Essigsäure (99-100%)	Merck KGaA
Ethanol (technisch; Methylethylketon vergällt)	VWR International GmbH
Flüssiger Stickstoff	VWR International GmbH
Fmoc-Ala-OH·H_2O	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Gly-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Gly-Wangharz LL (100-200 Netz)	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Leu-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Phe-OH	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Phe-Wangharz LL (100-200 Netz)	Novabiochem (Merck)

Chemikalie	Hersteller
Fmoc-Ser(tBu)-Wangharz LL (100-200 Netz)	Novabiochem (Merck)
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Novabiochem (Merck)
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Glycerin (wasserfrei; 99,0-101,0%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycin (≥99%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hoechst	
Kaliumchlorid	Fluka BioChemika
Methanol (technisch)	VWR International GmbH
N,N'-Methylen-bis-acrylamid (≥98%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumazid (≥99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS) (≥99,5%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid (99,0%)	VWR International GmbH
N-Hydroxysuccinimid (NHS) (98%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ninhydrin	Merck KGaA
ortho-Phosphorsäure (85%)	VWR International GmbH
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies Corporation
Piperidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Proteinase K from Tritirchium album	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ProteoStat®	Enzo Life Sciences, Inc.
Salzsäure (32%)	Merck KGaA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	VWR International GmbH
Tetramethylorthosilikat (TMOS) (≥98,0%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triethylamin (≥99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triisopropylsilan (TiPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (≥99%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS)	PAN-Biotech GmbH
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH

1.3. Verwendete (Puffer-)Lösungen

Für die Herstellung der Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, alle Komponenten in demineralisiertem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert eingestellt.

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

6,5 g/L (25 mmol/L) HEPES-Natriumsalz

pH-Wert mit konz. HCl oder Natronlauge einstellen

Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0)

1,38 g/L (7,74 mmol/L) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

1,91 g/L (12,3 mmol/L) Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat

pH-Wert mit konz. Phosphorsäure oder Natronlauge einstellen

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

181,5 g/L (1,500 mol/L) Tris

pH-Wert mit konz. HCl einstellen

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

60,5 g/L (0,500 mol/L) Tris

pH-Wert mit konz. HCl einstellen

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

292,0 g/L (4,100 mol/L) Acrylamid

8,0 g/L (52 mmol/L) *N,N'*-Methylen-bis-acrylamid

SDS-Puffer (10%)

100,0 g/L (346,7 mmol/L) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Laemmli-Puffer

1,2 mL (0,6 mmol) Tris-Puffer (0,5 M; pH 6,8)

1,2 g (4,2 mmol) SDS

6,0 mg (9,0 µmol) Bromphenolblau

4,7 mL (64 mmol) Glycerin

2,9 mL (160 mmol) Wasser

0,9 g (6,0 mmol) 1,4-Dithiothreit

Laufpuffer

1,0 mg/L (3,5 mmol/L) SDS

6,0 g/L (50 mmol/L) Tris

28,8 g/L (384 mmol/L) Glycin

(0,2 g/L (3,0 mmol/L) Natriumazid)*

*Natriumazid wurde lediglich zu dem in der Elektrophoresekammer befindlichen Puffer hinzugegeben.

Coomassie-Färbelösung nach Kang et al.[298]

50,0 g/L (79,3 mmol/L) Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat

20,0 g/L (174 mmol/L) *ortho*-Phosphorsäure (85%)

100,0 mL/L (1,700 mol/L) Ethanol

200 mg/L (234 µmol/L) Coomassie® Brilliant Blau G-250

Das Aluminiumsulfat wurde zunächst in Wasser gelöst und anschließend mit Ethanol versetzt, bevor das Coomassie® Brilliant Blau G-250 zugegeben wurde. Zuletzt wurde die Phosphorsäure hinzugefügt und die Lösung mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 L aufgefüllt.

2. Partikelsynthese und –funktionalisierung

Zunächst wurden Partikel nach der Sol-Gel-Synthese hergestellt und *in situ* als auch postsynthetisch mit unterschiedlichen Funktionalitäten versehen.

2.1. Synthese mesoporöser Silikapartikel

Mesoporöse Silikapartikel wurden in Anlehnung an die Synthesevorschrift nach Rosenholm *et al.*[314] über den Sol-Gel-Prozess hergestellt. Als strukturdirigierendes Agens für die Porenbildung wurde Cetyltrimethylammoniumbromid (7,90 g; 21,7 mmol) in Methanol (640,0 mL; 19,98 mol) und demineralisiertem Wasser (962,3 g; 53,43 mol) gelöst. Nach Zugabe von Natronlaugelösung (4,56 mL; 1 M; 4,56 mmol) wurden zu den gebildeten Mizellen die unter Inertgas vorgemischten Präkursoren Tetramethylorthosilikat (2,18 mL; 13,9 mmol) und (3-Aminopropyl)trimethoxysilan (360,0 µL;

1,955 mmol) zügig unter ständigem Rühren zugegeben. Das Sol wurde 45 min mit 500 Upm gerührt und anschließend für weitere 20 h bei Raumtemperatur und einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm gealtert. Die Partikel wurden mit Ammoniumnitrat (60,0 g; 750 mmol) zur Fällung gebracht und mittels Zentrifugation abgetrennt. Um unfunktionalisierte Partikel zu erhalten, wurden die Partikel zwei Mal mit Ethanol gewaschen und 6 h bei 550 °C kalziniert. Für den Erhalt der Aminfunktionen wurden die Partikel hingegen zwei Mal mit Ethanol gewaschen und anschließend drei Mal für 60 min im Ultraschallbad mit ethanolischer Ammoniumnitratlösung (6 g/L) extrahiert, um das Tensid aus dem Porennetzwerk zu entfernen. Die Partikel wurden abschließend nochmals mit Ethanol gewaschen und bei 60 °C getrocknet.

2.2. Postsynthestische Carboxylierung

Um carboxyfunktionalisierte Partikel zu erhalten, wurden kalzinierte Partikel einer postsynthetischen Carboxylierung unterzogen. Hierzu wurden die zuvor kalzinierten Partikel in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2; 4 mg/mL) im Ultraschallbad dispergiert, gefolgt von der Zugabe von Carboxyethylsilantriolnatriumsalz (25% in Wasser; 2,3 µL/mg; 2,9 µmol/mg). Nach 3 h kontinuierlicher Bewegung wurden die Partikel mittels Zentrifugation abgetrennt und einmal mit demineralisiertem Wasser und zwei Mal mit Ethanol gewaschen, bevor sie bei 60 °C getrocknet wurden.

2.3. Markierung der Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff

Um die Partikel mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierbar zu machen, wurden diese mit ATTO-Farbstoffen fluoreszenzmarkiert. Hierfür wurden die carboxyfunktionalisierten Partikel MSN_{COOH} in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2; 10 mg/mL) dispergiert. Durch Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, EDC, (1,7 µL/mg MSN; 9,6 µmol/mg) und N-Hydroxysuccinimid, NHS, (1,15 µg/mg MSN; 9,99 µmol/mg) wurden die Carboxyfunktionen für die Farbstoffanbindung aktiviert. Nach 3 h kontinuierlicher Bewegung wurden die Partikel einmal mit HEPES-Puffer gewaschen und erneut in diesem dispergiert (10 mg/mL). Zusätzlich wurde eine 1 mg/mL-Lösung von ATTO488-Amin (1,8 µg/mg MSN; 2,1 nmol/mg) bzw. ATTO565-Amin (1,8 µg/mg MSN; 2,3 nmol/mg) in DMSO zugegeben und für 1 h bewegt. Nachdem die Partikel mittels Zentrifugation abgetrennt wurden, wurden sie zwei Mal mit Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3. Charakterisierung der Silikapartikel

Die Charakterisierung der unterschiedlich funktionalisierten Partikel erfolgte mittels TEM, DLS, Zetapotentialmessungen, TGA sowie Stickstoffsorptionsmessungen. Die letzten beiden Analysemethoden sind im Kapitel 1.1 genauer beschrieben.

3.1. Bestimmung der Größe mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Größenbestimmung der Partikel mittels TEM wurden die Partikel in Aceton dispergiert und auf ein mit einer Kohlelochfolie beschichtetes Kupferträgernetzchen gegeben.

3.2. Bestimmung des Zetapotentials und der Größe mittels Dynamischer Lichtstreuung

Für die Messung des hydrodynamischen Radius sowie des Zetapotentials wurden die Partikel in einer KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 100 µg/mL) in einem Hochultraschallbad dispergiert.

3.3. Untersuchung der Aminfunktionen mit Ninhydrin

Um die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Aminfunktionen auf der Partikeloberfläche zu untersuchen, wurden die MSN_{OH} und die MSN_{NH2} in Ethanol (5 mg/mL) dispergiert. Anschließend wurde eine Ninhydrinlösung (1%, 10 µL/mg MSN) in Ethanol zugegeben und die Partikel für weitere 10 min im Ultraschallbad behandelt.

3.4. Untersuchung der Sinterprozesse

Zur Untersuchung der Sinterprozesse der MSN wurden diese zunächst auf unterschiedliche Temperaturen (400, 500, 600, 700, 800, 900 und 1000 °C) aufgeheizt und anschließend mittels Stickstoffsorptionsmessungen die spezifische Oberfläche, der Porendurchmesser sowie das Porenvolumen bestimmt.

4. Peptidsynthese und -charakterisierung

Die verwendeten Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese an Wang-Harzen synthetisiert. Die Charakterisierung der fertig hergestellten Peptide erfolgte anschließend über matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit anschließender Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF MS).

4.1. Festphasenpeptidsynthese

Die Peptide KFKFEFEF, KFKFEFEFGGRGDS und KFKFEFEFGGRADS wurden nach einem optimierten Protokoll für die Fmoc-Strategie[28] der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield[26] synthetisiert. Hierzu wurden 0,1 M Ansätze eines vorbeladenen Wang-Harzes in 10 mL-Synthesespritzen verwendet. Nach der zweimaligen Fmoc-Entschützung mittels 20% Piperidin in DMF für jeweils 5 min, wurde das Harz drei Mal mit DMF gewaschen. Als Aktivierungsreagenzien wurden eine 0,5 M Lösung von 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat, HBTU, (2,0 mL/µmol Aminosäure; 1,0 mmol/µmol) in DMF und Diisopropylethylamin, DiPEA, (400 µL/µmol Aminosäure; 1,18 µmol/µmol) zu einer Aminosäurelösung (0,2 mM) in DMF gegeben. Die aktivierte Aminosäure (5 µmol/µmol Aminosäure auf Harz) wurde für 5 min bei 75 °C in einer Mikrowelle an das Harz gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit DMF wurde erneut Fmoc-entschützt. Da für die Aminosäure Arginin schlechtere Kopplungsausbeuten erhalten werden, wurde für diese Aminosäure der Kopplungsschritt zwei Mal durchgeführt. Für die Glutaminsäure wurde die Reaktionszeit verdoppelt, um bessere Kopplungsausbeuten zu erhalten. Das fertig synthetisierte Peptid wurde mit 95% TFA, welche 2,5% Triisopropylsilan als Radikalfänger sowie 2,5% demineralisiertes Wasser enthält, für 2 h bei Raumtemperatur vom Harz abgespalten. Gleichzeitig werden unter diesen stark sauren Bedingungen die Schutzgruppen der Seitenketten der Peptide abgespalten. Das vollständig entschützte Peptid wurde in kaltem Diethylether gefällt und nach einmaligem Waschen mit kaltem Diethylether lyophilisiert.

Die Peptide wurden ebenfalls ohne die Verwendung einer Mikrowelle synthetisiert. Hierfür wurden die Reaktionszeiten verdoppelt, um bei den Kopplungsschritten bessere Ausbeuten zu erhalten. Zudem wurde für alle Aminosäuren ab der achten angebundenen Aminosäure der Kopplungsschritt zwei Mal durchgeführt, um die fehlende Mikrowellenstrahlung auszugleichen.

Für die weitere Verwendung wurden von allen Peptiden Stocklösungen in DMSO (10 mg/mL) angesetzt.

Das Peptid RGD-cap (ATTO488-GG-*cyclo*-CWDDGWLCG) wurde ebenfalls über Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Die Kopplung des Farbstoffes erfolgte hierbei unter Verwendung des ATTO488-NHS-Esters. Hierzu wurde dieser in DMSO (10 mg/mL) gelöst, 60 µL in 2,5 mL DMF zu einem 1 mM Ansatz gegeben und für 1 h bei RT kontinuierlich bewegt. Nach sorgfältigem Waschen bis das Waschmedium farblos war, wurde das Peptid vom Harz abgespalten, in Diethylether gefällt und lyophilisiert.

4.2. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit „time of flight"-Analyse mit anschließender Massenspektroskopie (MALDI-TOF MS)

Eine sehr geringe Menge der Peptide wurde in demineralisiertem Wasser gelöst. Als Matrix wurde eine gesättigte α-Cyano-4-hydroxyzimtsäurelösung in einem 1:1-Gemisch aus Wasser und Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure verwendet. Die Probenlösung (1,0 µL) wurde mit der Matrixlösung (1,0 µL) vermengt und das Gemisch (1,0 µL) auf eine Target-Platte pipettiert. Die verbleibende Menge des Gemisches wurde nochmals mit Matrixlösung (1,0 µL) verdünnt und ebenfalls auf die Platte präpariert. Poly(benzylmethacrylat) (PBM 2000) wurde in einer gesättigten Matrixlösung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Tetrahydrofuran gelöst und diente als Standard.

4.3. Fluoreszenzmarkierung der Peptide

Für die Fluoreszenzmarkierung der Peptide wurden die DMSO-Stocklösungen mit einer ATTO488-NHS-Ester- bzw. ATTO647N-NHS-Ester-Stocklösung (10 mg/mL) in DMSO versetzt und 1 h bei RT unter Lichtausschluss kontinuierlich bewegt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde für die Fluoreszenzmarkierung der molare Markierungsgrad konstant gehalten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ansatzmengen der Fibrillen mit variierendem RGD-Anteil zur Fluoreszenzmarkierung mit ATTO488 bzw. ATTO647N.

	Peptidstock-lösung / µL	Menge an Peptid / nmol	ATTO-Stock-lösung / µL
PEP	13,6	121	2,0
PEP_{RGD}	20,0	121	2,0
PEP_{RAD}	20,2	121	2,0

5. Ausbildung fibrillärer Netzwerke

In diesem Kapitel wird auf die Ausbildung fibrillärer Netzwerke genauer eingegangen. Hierzu wird zunächst die Bildungskinetik dieser Strukturen eingegangen. Anschließend werden die fertig ausgebildeten Fibrillen in ihrer Struktur, Morphologie, Größe, Zetapotential sowie Verfügbarkeit der RGD-Sequenzen charakterisiert, wobei auch auf den Einfluss der Variation des RGD-Anteils in den Fibrillennetzwerken eingegangen wird.

5.1. Untersuchung der Bildungskinetik

Die Bildungskinetik der fibrillären Strukturen wurde mittels DLS, Zetapotentialmessungen sowie TEM Aufnahmen verfolgt. Zudem werden die Sekundärstrukturanalyse mittels Infrarotspektroskopie und ProteoStat®-Einlagerung aufgeführt.

5.1.1. *DLS und Zetapotential*

Zur Untersuchung der Bildungskinetik der fibrillären Strukturen wurden die Peptidstocklösungen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt (Tabelle 10). Nach 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min und 24 h wurde je ein Ansatz mit KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 1,0 mL) verdünnt und DLS sowie Zetapotentialmessungen durchgeführt.

Tabelle 10: Ansatzmengen für die Untersuchung der Fibrillenbildung mittels DLS und Zetapotential.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	3,30	29,5	41,70	45,0
PEP_{RGD}	4,86	29,5	40,14	45,0
PEP_{RAD}	4,89	29,5	40,11	45,0

Zudem wurden Proben präpariert, welche nach Ausbildung der PNF mit 10% FCS für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden. Um nicht-gebundene Proteine zu entfernen, wurden die PNF mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) gewaschen und anschließend in 45,0 µL Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) resuspendiert. Vor dem Messen der Proben wurden diese

mit KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 1,0 mL) verdünnt und anschließend Zetapotentialmessungen durchgeführt

5.1.2. *Untersuchung der Morphologie mittels TEM*

Um die Fibrillenbildung mittels TEM zu untersuchen, wurden die Fibrillen mit einem Drittel der Ansatzgröße aus Tabelle 10 angesetzt. Nach 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min und 24 h wurden die Fibrillensuspensionen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 60,0 µL) verdünnt, je 5 µL auf Kupferträgernetzchen mit Kohlelochfoliebeschichtung aufgetragen und 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Netzchen drei Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Da die Fibrillen lediglich einen schwachen Kontrast bieten, wurden die Trägernetzchen anschließend für 2 min mit einer Uranylacetatlösung (2% in Wasser) kontrastiert. Nach dreimaligem Waschen mit demineralisiertem Wasser wurden die Netzchen getrocknet und mittels TEM untersucht.

5.1.3. *Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR*

Die Sekundärstrukturanalyse mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie erfolgte mit dem fünffachen Ansatz aus Tabelle 10. Nach 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min und 24 h wurden die Fibrillensuspensionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die erhaltenen Pulver wurden infrarotspektroskopisch untersucht.

5.1.4. *Untersuchung des ß-Faltblattanteils mittels ProteoStat®-Einlagerung*

Um die Ausbildung der ß-Faltblattanteile in den Fibrillenstrukturen sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff ProteoStat® in die ß-Faltblattstrukturen interkaliert. Zunächst wurde Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; Tabelle 11) vorgelegt und mit einer ProteoStat®-Lösung (1:50-verdünnt; 10,0 µL) versetzt. Anschließend wurden die Peptidstocklösungen (Tabelle 11) in DMSO zu den ProteoStat®-Lösungen gegeben und diese fluoreszenzmikroskopisch für 1 h jede Minute vermessen (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

Tabelle 11: Ansatzmengen der Fibrillen zur Untersuchung der ß-Faltblattanteile während der Bildung.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	ProteoStat®-Lösung / µL	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	0,59	5,2	10,0	189,4	200,0
PEP_{RGD}	0,86	5,2	10,0	189,1	200,0
PEP_{RAD}	0,87	5,2	10,0	189,1	200,0

5.2. Charakterisierung der fertig ausgebildeten Fibrillen

Nachfolgend werden die fertig ausgebildeten Fibrillen charakterisiert. Diese Charakterisierung erfolgt analog zu den Methoden zur Untersuchung der Bildungskinetik (Kapitel 5.1). Um den Abschluss der Fibrillenausbildung zu gewährleisten, wurden hier jedoch Inkubationszeiten von 24 h gewählt. Zudem wird in diesem Kapitel auf die relative Peptidanzahl der unterschiedlichen Fibrillenaggregate sowie die Verfügbarkeit der RGD-Sequenzen eingegangen.

5.2.1. *DLS und Zetapotential*

Die Untersuchungen mittels DLS und Zetapotentialmessungen erfolgte analog zur Untersuchung der Bildungskinetik (Kapitel 5.1.1). Als Inkubationszeit wurde 24 h gewählt.

5.2.2. *Untersuchung der Morphologie mittels TEM*

Die TEM Untersuchung erfolgte analog zur Untersuchung der Bildungskinetik (Kapitel 5.1.2). Als Inkubationszeit wurde 24 h gewählt.

5.2.3. *Sekundärstrukturanalysemittels FTIR*

Die Sekundärstrukturanalyse erfolgte analog zur Untersuchung der Bildungskinetik (Kapitel 5.1.3). Als Inkubationszeit wurde 24 h gewählt.

5.2.4. *Untersuchung des ß-Faltblattanteils mittels ProteoStat®-Einlagerung*

Um die ß-Faltblattanteile der fertig ausgebildeten Fibrillen zu untersuchen, wurden diese mit einem Drittel der Ansatzgröße aus Tabelle 10 für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Fibrillen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 50,0 µL) und einer ProteoStat®-Lösung (1:50-verdünnt; 10,0 µL) verdünnt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben (40,0 µL) wurden in eine 96-Well-Fluoreszenzplatte pipettiert und mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 160,0 µL) versetzt. Das ProteoStat® ändert seine Fluoreszenzeigenschaften, wenn es in die ß-Faltblattstrukturen der Fibrillen interkaliert, und kann fluoreszenzspektroskopisch vermessen werden (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

5.2.5. *Peptidanzahl pro Fibrillenaggregat über Durchflusszytometrie*

Um die durchschnittliche Anzahl der in einem Fibrillenaggregat verbauten Peptide bestimmen zu können, wurden die Peptide zunächst mit einem ATTO-Farbstoff fluoreszenzmarkiert. Um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurden die Peptide zu gleichen Mol-Äquivalenten markiert. Hierzu wurden die Peptidstocklösungen in DMSO (10 mg/mL) mit einer ATTO647N-NHS-Lösung (10 mg/mL) in DMSO versetzt und 1 h durchmischt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Eingesetzte Mengen zur Fluoreszenzmarkierung der Peptide.

	Peptidstocklösung / µL	ATTO647N-Stocklösung / µL
PEP	20,0	2,9
PEP_{RGD}	20,0	2,0
PEP_{RAD}	20,0	2,0

Die fluoreszenzmarkierte Peptidstocklösung wurde anschließend 1:100 mit der nicht-markierten Stocklösung verdünnt, um eine 1 mol%-markierte Stocklösung zu erhalten. Die Fibrillen wurden in Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,0) gebildet (Tabelle 13). Nach 24 h Inkubation wurden die Fibrillen mit Natriumphosphatpuffer (447,5 µL) verdünnt und zur Bestimmung der Fluoreszenz der einzelnen Aggregate durchflusszytometrische Messungen durchgeführt.

Tabelle 13: Ansatzmengen für die durchflusszytometrische Untersuchung der Fibrillenaggregate.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	7,70	68,8	44,80	52,50
PEP_{RGD}	11,34	68,8	41,16	52,50
PEP_{RAD}	11,44	68,8	41,06	52,50

5.2.6. *Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap*

Zunächst wurde mittels Festphasenpeptidsynthese die Sequenz GGCWDDGWLCG synthetisiert (Kapitel 4.1). Hierbei wurden die Cysteine aufgrund ihrer thermischen Instabilität bei 50 °C gekoppelt. Nach der letzten Fmoc-Entschützung wurde zur Fluoreszenzmarkierung ein ATTO-Farbstoff an die terminale Aminfunktion des Peptids gebunden. Hierzu wurde eine ATTO488-NHS-Stocklösung (10 mg/mL; 60 µL; 0,6 µmol) in DMSO mit DMF vermengt und für 1,5 h mit dem Peptid inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DMF wurde das Peptid analog zu Kapitel 4.1 abgespalten. Das lyophilisierte Peptid wurde in 5%iger Essigsäurelösung (pH 6,0; 0,5 mg/mL) gelöst und mit DMSO (20 Vol%) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Lyophilisierung wurde der Ringschluss der beiden Cysteine durch Massenspektrometrie untersucht (Kapitel 4.2).

Zur Untersuchung der verfügbaren RGD-Sequenzen auf der Fibrillenoberfläche wurden die achtfachen Ansatzmengen aus Tabelle 10 verwendet. Die Fibrillen wurden 24 h inkubiert und anschließend zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min). Anschließend wurden die Fibrillen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 95,0 µL) resuspendiert, mit einer RGD-cap-Stocklösung (10 mg/mL; 5,0 µL) in DMSO versetzt und 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Natriumphosphatpuffer wurden die Fibrillen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 100,0 µL) resuspendiert und fluoreszenzspektroskopisch untersucht (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm; Kalibriergerade: $y = 445{,}7\ mL/mg \cdot x$; $R^2 = 0{,}9894$; n = 3).

5.3. Variation des RGD-Anteils der Fibrillen

Für die weiteren Untersuchungen wurden Fibrillen mit unterschiedlichem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid eingesetzt. Hierzu wurden die Peptidstocklösungen der Peptide PEP und PEP_{RGD} in den entsprechenden mol-Verhältnissen gemischt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ansatzmengen der Peptidstocklösungen mit variierendem RGD-Anteil.

	PEP-Stocklösung / µL	PEP_{RGD}-Stocklösung / µL	Gesamtmenge / µL	Mittlere molare Masse / g/mol
PEP	100,0	0,0	100,0	1121
1% RGD	98,5	1,5	100,0	1126
10% RGD	85,9	14,1	100,0	1174
15% RGD	79,4	20,6	100,0	1201
25% RGD	67,1	32,9	100,0	1254
40% RGD	50,5	49,5	100,0	1333
55% RGD	35,7	64,3	100,0	1413
70% RGD	22,5	77,5	100,0	1492
85% RGD	10,7	89,3	100,0	1572
PEP_{RGD}	0,0	100,0	100,0	1651

5.3.1. *Untersuchung der Morphologie mittels TEM*

Für die morphologische Untersuchung der Fibrillen wurden TEM Aufnahmen gemacht. Hierfür wurden Fibrillen mit den Ansatzmengen aus Tabelle 15 für 24 h inkubiert. Die Präparation und Kontrastierung der Kupferträgernetzchen erfolgte analog zu Kapitel 5.1.2.

Tabelle 15: Ansatzmengen der Fibrillen mit variierendem RGD-Anteil für transmissionselektronenmikroskopische Messungen.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
1% RGD	1,11	9,8	13,89	15,0
10% RGD	1,15	9,8	13,85	15,0
15% RGD	1,18	9,8	13,82	15,0

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
25% RGD	1,23	9,8	13,77	15,0
40% RGD	1,31	9,8	13,69	15,0
55% RGD	1,39	9,8	13,61	15,0
70% RGD	1,46	9,8	13,54	15,0
85% RGD	1,54	9,8	13,46	15,0

5.3.2. *DLS und Zetapotential*

Für die Messung des Hydrodynamischen Radius und des Zetapotentials wurden die dreifachen Ansatzmengen aus Tabelle 14 verwendet. Die Fibrillen wurden 24 h bei Raumtemperatur inkubiert, mit KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 1,0 mL) verdünnt und DLS sowie Zetapotentialmessungen durchgeführt.

5.3.3. *Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR*

Die Sekundärstrukturanalyse wurde wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Fibrillen wurden mit der fünfzehnfachen Ansatzgröße aus Tabelle 15 angesetzt und als Inkubationszeit 24 h gewählt.

5.3.4. *Untersuchung der Homogenität der Fibrillenaggregate mittels Konfokalmikroskopie*

Die Peptidstocklösungen für die Untersuchung der Verteilung der beiden Peptide in den Fibrillenaggregaten wurden mit ATTO488-markierter PEP-Stocklösung (10 mol%) und ATTO647N-markierter PEP_{RGD}-Stocklösung (10 mol%) angesetzt. Die Fibrillen wurden nach Tabelle 16 angesetzt und 24 h inkubiert. Danach wurden sie mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 25,0 µL) verdünnt und die Proben (25,0 µL) auf eine 18-Well-Ibidi-Platte pipettiert. Vor der Untersuchung am Konfokalmikroskop wurden die Fibrillen für 2 min absinken gelassen.

Tabelle 16: Ansatzmengen der Fibrillen mit variierendem RGD-Anteil für konfokalmikroskopische Untersuchungen.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	3,85	34,4	22,40	26,25
1% RGD	3,87	34,4	22,38	26,25
10% RGD	4,03	34,4	22,22	26,25
15% RGD	4,12	34,4	22,13	26,25
25% RGD	4,31	34,4	21,94	26,25
40% RGD	4,58	34,4	21,67	26,25
55% RGD	4,85	34,4	21,40	26,25
70% RGD	5,12	34,4	21,13	26,25
85% RGD	5,40	34,4	20,85	26,25
PEP_{RGD}	5,67	34,4	20,58	26,25

5.3.5. *Peptidanzahl pro Fibrillenaggregat über Durchflusszytometrie*

Das Experiment zur Bestimmung der relativen Anzahl an Peptiden in den Fibrillenaggregaten wurde analog zu Kapitel 5.2.5 präpariert. Für die verwendeten Peptide ergeben sich hierfür die in Tabelle 16 aufgeführten Ansatzmengen. Es wurden ebenfalls ATTO647N-markierte Peptidstocklösungen (1 mol%) verwendet.

5.3.6. *Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap*

Zur Untersuchung der Verfügbarkeit der RGD-Sequenzen der unterschiedlichen Fibrillenaggregate wurden Fibrillen mit der 24-fachen Ansatzgröße aus Tabelle 15 für 24 h inkubiert und die Proben anschließend wie in Kapitel 5.2.6 beschrieben weiterbehandelt.

6. Anlagerung der Silikapartikel an das Fibrillennetzwerk

In diesem Kapitel wird auf die nicht-kovalente Anlagerung der MSN an die PNF genauer eingegangen. Hierzu werden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen mittels TEM, DLS, Zetapotentialmessungen, Durchflusszytometrie, Konfokalmikroskopie und FTIR-Analyse untersucht. Während bei der ersten

Herangehensweise zunächst die PNF fertig ausgebildet werden und anschließend die MSN angelagert werden, liegen die MSN bei der zweiten Variante bereits während der PNF-Ausbildung im Puffer vor.

6.1. Zugabe der Silikapartikel nach Ausbildung des Fibrillennetzwerkes

Die nicht-kovalente Anlagerung der unterschiedlich funktionalisierten MSNs an die fertig ausgebildeten PNF wird zunächst mittels TEM untersucht und anschließend die Anlagerungskinetik über Durchflusszytometrie analysiert. Zudem wird eine mögliche Sättigung der PNF mit MSN über Zetapotentialmessungen, Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie betrachtet.

6.1.1. *Untersuchung der Partikelanlagerung mittels TEM*

Die nicht-kovalente Anlagerung der verschiedenen MSNs an die Fibrillen wurde zunächst mittels TEM untersucht. Hierzu wurden die Fibrillen mit einem Drittel der Ansatzgröße aus Tabelle 10 angesetzt und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Dispersion (24,7 µg/mL; 60,0 µL) der unterschiedlich funktionalisierten MSN (MSN_{OH}, MSN_{COOH}, MSN_{NH2}) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) zu den Fibrillen gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden je 5 µL der Proben auf Kupferträgernetzchen gegeben und für 5 min inkubiert, bevor sie drei Mal mit Wasser gewaschen und 2 min mit Uranylacetatlösung (2% in Wasser; 5 µL) kontrastiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser und anschließendem Trocknen wurden die Proben am TEM untersucht.

6.1.2. *Anlagerungskinetik mittels Durchflusszytometrie*

Um die Anlagerungskinetik der MSN_{COOH} an die Fibrillen zu untersuchen, wurden PEP-Fibrillen mit der Ansatzgröße aus Tabelle 13 für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde eine Dispersion (18,4 µg/mL; 447,5 µL) der ATTO488-markierten MSN_{COOH} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) zu den Fibrillen gegeben und für 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min und 120 min inkubiert. Die Vermessung der Anlagerung erfolgte über Durchflusszytometrie.

6.1.3. *Untersuchung der Partikelanlagerung mittels Durchflusszytometrie*

Unterschiede in der Anlagerung der MSN_{COOH} zwischen den unterschiedlichen Fibrillen wurden ebenfalls mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ansatzgröße der verschiedenen Fibrillen wurde analog zu den vorhergegangenen durchflusszytometrischen Messungen wie in Tabelle 13 gewählt. Nach 24 h Inkubation wurden die Fibrillen mit einer ATTO488-markierten MSN_{COOH}-Dispersion (18,4 µg/mL; 447,5 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt und für 45 min inkubiert, bevor die Fluoreszenz der Aggregate mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde.

6.1.4. *Untersuchung der Partikelanlagerung mittels Konfokalmikroskopie*

Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden ATTO647N-markierte Fibrillen (10 mol%) verwendet. Die Fibrillen wurden mit der Hälfte der Ansatzgröße aus Tabelle 13 für 24 h angesetzt und anschließend mit einer ATTO488-markierten MSN_{COOH}-Dispersion (208 µg/mL; 25,0 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) für weitere 45 min inkubiert. Zur Aufnahme an einem Konfokalmikroskop wurden die Proben (25,0 µL) auf eine 18-Well-Ibidi-Platte pipettiert und für 2 min zum Absetzen der Fibrillenaggregate ruhen gelassen.

6.1.5. *DLS und Zetapotential*

Zur Untersuchung der Partikelanlagerung an die fibrillären Strukturen wurden die Peptidstocklösungen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt (Tabelle 10). Nach 24 h wurden die Ansätze mit einer MSN_{COOH}-Dispersion (24,7 µg/mL; 180 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vermengt und weitere 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 1,0 mL) verdünnt und DLS sowie Zetapotentialmessungen durchgeführt.

6.1.6. *Sekundärstrukturanalysemittels FTIR*

Die Sekundärstrukturanalyse mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie erfolgte mit dem fünffachen Ansatz aus Tabelle 10. Nach 24 h wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (24,7 µg/mL; 900 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) zu den PNF gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Fibrillensuspensionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die erhaltenen Pulver wurden infrarotspektroskopisch untersucht.

6.1.7. *Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap*

Die verfügbaren RGD-Sequenzen nach der Partikelanlagerung wurden analog zu Kapitel 5.2.6 bestimmt. Es wurden die achtfachen Ansatzmengen aus Tabelle 10 verwendet und für 24 h inkubiert, bevor zu den Fibrillen eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 321,2 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) gegeben wurde, die Proben 45 min inkubiert und anschließend zentrifugiert wurden (14.800 Upm; 10 min). Die Fibrillen wurden in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 95,0 µL) resuspendiert, mit einer RGD-cap-Stocklösung (10 mg/mL; 5,0 µL) in DMSO versetzt und 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Natriumphosphatpuffer wurden die Fibrillen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 100,0 µL) resuspendiert und fluoreszenzspektroskopisch untersucht (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm; Kalibriergerade: y = 445,7 mL/mg · x; R^2 = 0,9894; n = 3).

6.1.8. *Variation der zugegebenen Partikelkonzentration*

Es wurden Partikeldispersionen unterschiedlicher Konzentration zu den Fibrillen gegeben und die Anlagerung mittels Zetapotentialmessungen, Durchflusszytometrie (FACS) sowie Konfokalmikroskopie untersucht. Die Experimente wurden analog zu den Kapiteln 6.1.3, 6.1.4 und 6.1.5 durchgeführt. Lediglich die Partikeldispersionskonzentrationen wurden variiert (Tabelle 17). Zudem wurde analog zu Kapitel 6.1.7 die Verfügbarkeit der RGD-Sequenzen nach der Partikelanlagerung untersucht.

Tabelle 17: Eingesetzte Partikeldispersionen zur Untersuchung der Sättigung der Partikelanlagerung an die Fibrillen.

µg MSN_{COOH} / µmol Fibrillen	Dispersionskonz. TEM / µg/mL	Dispersionskonz. FACS / µg/mL	Dispersionskonz. Konfokalmikroskop / µg/mL	Dispersionskonz. RGD-cap / µg/mL
50	8,2	6,1	69	37
100	16,5	12,3	139	74
150*	24,7	18,4	208	111
200	32,9	24,5	277	148
250	41,2	30,7	347	185
300	49,4	36,8	416	222

* in bisherigen Experimenten verwendete Partikelkonzentration

6.1.9. Variation des RGD-Anteils

Zudem wurde die MSN_{COOH}-Anlagerung an die PNF mit variierenden RGD-Anteilen (Kapitel 5.3)mittels TEM (Kapitel 6.1.1) untersucht. Hierzu wurden die dreifachen Ansatzmengen aus Tabelle 15 verwendet. Auch die Untersuchung der Anlagerung mittels Durchflusszytometrie (Kapitel 6.1.3) und Konfokalmikroskopie (Kapitel 6.1.4) wurden für diese PNF durchgeführt. Hierbei wurde die doppelte Ansatzmenge aus Tabelle 16 verwendet.

6.2. Zugabe der Silikapartikel während Ausbildung des Fibrillennetzwerkes

Analog zur nachträglichen Partikelanlagerung wird das System untersucht, bei welchem die MSN bereits bei der PNF-Ausbildung in der Pufferlösung vorliegen. Hierzu wurde der Einfluss der MSNs auf die PNF-Ausbildung sowie die Unterschiede in der Partikelanlagerung zwischen MSN-Zugabe vor und nach PNF-Ausbildung mittels DLS, Zetapotential, Durchflusszytometrie, Konfokalmikroskopie, TEM und FTIR-Analyse analysiert.

6.2.1. *Bildungskinetik der Fibrillen mittels DLS und Zetapotential*

Zur Untersuchung der Bildungskinetik der fibrillären Strukturen wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 40,14 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit einer PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 4,86 µL) in DMSO versetzt. Nach Inkubationszeiten von 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min und 60 min wurde je ein Ansatz mit KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 1,0 mL) verdünnt und DLS als auch Zetapotentialmessungen durchgeführt.

6.2.2. *Bildungskinetik der Fibrillen mittels TEM*

Die Ausbildung der fibrillären Strukturen wurde ebenfalls mittels TEM Aufnahmen untersucht. Hierfür wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 13,38 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit einer PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 1,62 µL) in DMSO versetzt und nach 0 min; 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min und 60 min je ein Ansatz mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 60,0 µL) verdünnt. Die Proben (5,0 µL) wurden auf Trägernetzchen aus Kupfer präpariert, für 5 min inkubiert und nach dreimaligem Wasser mit Wasser mit Uranylacetatlösung (2% in Wasser; 5,0 µL) für 2 min kontrastiert.

6.2.3. *Bildungsmechanismusuntersuchungen mittels DLS und Zetapotential*

Um den Bildungsmechanismus genauer untersuchen zu können, wurden zunächst 1:1-; 1:3-; 1:5-; 1:7- und 1:9-Verdünnungen der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL in DMSO) mit DMSO hergestellt. Anschließend wurde eine Dispersion der MSN_{COOH} (111 µg/mL; 40,14 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit je einer Verdünnung (4,86 µL) versetzt und für 60 min inkubiert. Nach Verdünnen der Proben mit KCl-Lösung (1 mM; pH 5,5; 1,0 mL) wurden DLS und Zetapotentialmessungen durchgeführt.

6.2.4. *Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR*

Die Untersuchung der Sekundärstruktur erfolgte mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie. Hierzu wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 200,7 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 24,3 µL) in DMSO versetzt. Nach 60 min Inkubation wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die pulvrigen Proben wurden anschließend infrarotspektroskopisch untersucht.

6.2.5. *Untersuchung des ß-Faltblattanteils mittels ProteoStat®-Einlagerung*

Um die Ausbildung der ß-Faltblattanteile in den Fibrillenstrukturen sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff ProteoStat® in die ß-Faltblattstrukturen interkaliert. Zunächst wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (22,8 µg/mL; 189,1 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit einer ProteoStat®-Lösung (1:50-verdünnt; 10,0 µL) versetzt. Anschließend wurde die Peptidstocklösung (0,86 µL; 5,2 nmol) in DMSO zu der partikelhaltigen ProteoStat®-Lösung gegeben und diese fluoreszenzmikroskopisch für 1 h jede Minute vermessen (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

6.2.6. *Peptidanzahl pro Fibrillenaggregat über Durchflusszytometrie*

Um die durchschnittliche Anzahl der in einem Fibrillenaggregat verbauten Peptide bestimmen zu können, wurde das Peptid PEP_{RGD} zunächst mit einem ATTO-Farbstoff fluoreszenzmarkiert. Hierzu wurde die Peptidstocklösung in DMSO (10 mg/mL; 20,0 µL) mit einer ATTO647N-NHS-Lösung (10 mg/mL; 2,0 µL) in DMSO versetzt und 1 h bei RT unter Lichtausschluss durchmischt. Die fluoreszenzmarkierte Peptidstocklösung wurde anschließend 1:100 mit der nicht-markierten

Stocklösung verdünnt, um eine 1 mol%-markierte Stocklösung zu erhalten. Zunächst wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (252 µg/mL; 41,2 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,0) mit der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 11,34 µL) versetzt und 60 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Fibrillen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 447,5 µL) verdünnt und zur Bestimmung der Fluoreszenz der einzelnen Aggregate durchflusszytometrische Messungen durchgeführt.

6.2.7. *Untersuchung der Partikeleinlagerung mittels Durchflusszytometrie*

Um die Partikeleinlagerung mit den Aggregaten mit nachträglich angelagerten Partikeln (Kapitel 6.1.3) vergleichen zu können, wurden auch hier durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Zunächst wurde eine Dispersion der ATTO488-markierten MSN_{COOH} (252 µg/mL; 41,2 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) hergestellt und mit der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 11,34 µL) für 60 min inkubiert. Abschließend wurden die Proben mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 447,5 µL) verdünnt und die Fluoreszenz der Aggregate mittels Durchflusszytometrie untersucht.

6.2.8. *Untersuchung der Partikeleinlagerung mittels Konfokalmikroskopie*

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden mit ATTO647N-markiertem PEP_{RGD}-Peptid (10 mol%) und ATTO488-markierten MSN_{COOH} durchgeführt. Zu Beginn wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (252 µg/mL; 20,58 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 5,67 µL) in DMSO versetzt. Nach 60 min Inkubationszeit wurde die Probe mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 25,0 µL) verdünnt, zur Untersuchung am Konfokalmikroskop auf eine 18-Well-Ibidi-Platte pipettiert (25,0 µL) und für 2 min zum Absetzen der Fibrillenaggregate ruhen gelassen.

6.2.9. *Ermittlung des verfügbaren RGD-Anteils mit Hilfe des Peptids RGD-cap*

Die verfügbaren RGD-Sequenzen auf der Aggregatoberfläche wurden mit Hilfe des Peptids RGD-cap untersucht. Es wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 321 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit der PEP_{RGD} -Peptidstocklösung (10 mg/mL; 38,9 µL) in DMSO versetzt und 60 min

inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min), in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 95,0 µL) resuspendiert und mit einer RGD-cap-Stocklösung (10 mg/mL; 5,0 µL) in DMSO versetzt. Nach 1 h Inkubationszeit unter Lichtausschluss wurden die Proben zwei Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 100,0 µL) resuspendiert, bevor die Fluoreszenz der Proben vermessen wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm; Kalibriergerade: y = 445,7 mL/mg · x; R^2 = 0,9894; n = 3).

7. Verhalten unter biologisch relevanten Bedingungen

Nachfolgend wird das Verhalten der Einzelkomponenten sowie der Aggregate auf ihr Verhalten unter biologisch relevanten Bedingungen untersucht. Dabei wird sowohl auf die Proteolyse der PNF und der Einfluss der MSNs auf diese als auch auf die Hydrolyse der MSNs und der Einfluss der PNF auf diesen eingegangen.

7.1. Proteolyse der Fibrillen

Um die Proteolyse der PNF zu untersuchen, wurden diese unter biologisch relevanten Bedingungen inkubiert und die Proteolyse mittels der Fluoreszenz des Farbstoffes ProteoStat® bestimmt. Dabei wurde auch auf den Einfluss der MSN-Anlagerung an und in die PNF-Strukturen eingegangen.

7.1.1. *Auswahl des geeigneten Mediums mittels ProteoStat®*

Um die Eignung der untersuchten Medien für die Untersuchung des PNF-Abbaus mittels ProteoStat® zu gewährleisten, wurden zunächst je 160,0 µL der Medien PBS, Trypsin (0,05% in PBS), Protease K (100 µg/mL in PBS mit 55 mM $CaCl_2$ zur Aktivierung) und PBS mit 10% FCS mit einer ProteoStat®-Lösung (1:50-verdünnt; 10,0 µL) und PBS (30,0 µL) versetzt und über einen Zeitraum von 2 h bei 37 °C inkubiert und die Fluoreszenz des Farbstoffes vermessen (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

7.1.2. *Untersuchung der ß-Faltblattanteile mittels ProteoStat®*

Um den Abbau der fibrillären ß-Faltblattstrukturen durch die Proteolyse zu untersuchen, wurden zunächst Fibrillen mit einem Drittel der Ansatzgröße aus Tabelle 10 angesetzt und für 24 h inkubiert.

Anschließend wurden die Fibrillen mit einer MSN_{COOH}-Dispersion (29,8 µg/mL; 50,0 µL) oder mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 50,0 µL) verdünnt, für weitere 45 min inkubiert und mit einer ProteoStat®-Lösung (1:50-verdünnt; 10,0 µL) versetzt. Nach 10 min wurden die Fibrillen (40,0 µL) in eine 96-Well-Fluoreszenzplatte zu einer Protease K-Lösung (100 µg/mL + 55 mM $CaCl_2$; 160,0 µL) gegeben und direkt bei 37 °C für 2 h alle 5 min fluoreszenzspektroskopisch vermessen (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

Das PEP_{RGD}_IS wurde ebenfalls mittels ProteoStat® auf seinen Abbau untersucht. Hierzu wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 13,4 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) angesetzt und mit der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 1,62 µL) in DMSO versetzt. Nach 60 min Inkubation wurden Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 50,0 µL) und eine ProteoStat®-Lösung (1:50-verdünnt; 10,0 µL) zu den Proben gegeben und diese für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Fibrillen (40,0 µL) in eine 96-Well-Fluoreszenzplatte zu einer Protease K-Lösung (100 µg/mL + 55 mM $CaCl_2$; 160,0 µL) gegeben und direkt bei 37 °C für 2 h alle 5 min fluoreszenzspektroskopisch vermessen (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm).

7.1.3. *Morphologische Untersuchungen mittels TEM*

Die morphologischen Änderungen während der Proteolyse und des hydrolytischen Partikelabbaus wurden mittels TEM untersucht. Es wurden Fibrillen mit einem Drittel der Ansatzgröße aus Tabelle 10 angesetzt und 24 h inkubiert. Die Fibrillen wurden mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 52,5 µL) oder einer Dispersion von MSN_{COOH} (25,0 µg/mL; 52,5 µL) in Natriumphosphatpuffer für 45 min inkubiert und mit FCS (7,5 µL) versetzt. Die Fibrillen wurden bei 37 °C kontinuierlich bewegt, während nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h und 48 h jeweils ein Aliquot der Probe (5,0 µL) auf ein Kupferträgernetzchen gegeben wurde. Die Präparation und das Kontrastieren der Netzchen erfolgte nach Kapitel 5.1.2.

7.2. Dispersionsstabilität der Silikapartikel

Dispersionsstabilitätsuntersuchungen wurden mit einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL durchgeführt. Hierzu wurde eine Dispersion der MSN_{COOH} in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2) in einem Hochultraschallbad (20 min) angesetzt und mittels DLS über 24 h bei 37 °C vermessen. Um den

Einfluss von Proteinen auf die Dispersionsstabilität zu untersuchen, wurde das Experiment mit Nährmedium (Kapitel 8.1.1) wiederholt.

7.3. Auflösungsversuche der Silikapartikel

Der hydrolytische Abbau der MSNs wurde über ICP-OES und TEM beobachtet und über Thermogravimetrische Analyse und Zetapotentialmessungen genauer analysiert, um Aussagen über den Abbaumechanismus treffen zu können. Der Einfluss der PNF auf diesen Abbau wurde ebenfalls mittels ICP-OES und TEM untersucht.

7.3.1. *Bestimmung der Sättigungskonzentration des MSN mittels ICP-OES*

Zur Bestimmung der Sättigungskonzentration des MSN_{COOH} unter den gewählten Bedingungen wurden diese bei einer Partikelkonzentration von 1 mg/mL in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS dispergiert und für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (14.800 Upm; 60 min) und der Überstand entnommen. Vor der Messung wurde der Überstand 1:1 mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) verdünnt und die Proben an das Helmholtz-Institut Ulm gegeben.

7.3.2. *Auflösungsuntersuchungen mittels ICP-OES und TEM*

Eine MSN_{COOH}-Dispersion (100 µg/mL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) wurde mit 10% FCS versetzt und bei 37 °C kontinuierlich bewegt. Nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h und 48 h Inkubationszeit wurde ein Teil der Dispersion entnommen und zentrifugiert (14.800 Upm; 60 min). Der Überstand wurde entnommen und 1:1 mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) verdünnt. Für die Messungen wurden die Proben an das HIU gegeben. Das Partikelpellet wurde anschließend in Aceton resuspendiert und für TEM Aufnahmen auf Kupferträgernetzchen gegeben.

Um den Einfluss der Fibrillen auf die Partikelauflösung genauer zu untersuchen, wurden zunächst Fibrillen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) für 24 h inkubiert (Tabelle 18). Anschließend wurden die Fibrillen mit einer MSN_{COOH}-Dispersion (278 µg/mL; 18,00 mL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) verdünnt, 45 min inkubiert und im Anschluss mit FCS (4,80 mL) versetzt und bei 37 °C kontinuierlich bewegt. Nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h und 48 h wurden Aliquote der Proben

entnommen und zentrifugiert (14.800 Upm; 60 min). Der Überstand wurde mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) 1:1-verdünnt und an das Helmholtz-Institut Ulm für Messungen weitergegeben. Die TEM Untersuchung der Fibrillen-Partikel-Aggregate erfolgte wie in Kapitel 7.1.3 beschrieben.

Tabelle 18: Ansatzmengen der Fibrillen für die Untersuchung des Partikelabbaus mittels ICP und TEM.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / µmol	DMSO / µL	Natriumphosphat-puffer / mL	Gesamt-menge / mL
Ohne PNF	0,0	0,0	5490,0	19,71	25,20
PEP	3696,0	33,0	1794,0	19,71	25,20
PEP_{RGD}	5443,0	33,0	46,0	19,71	25,20
PEP_{RAD}	5490,0	33,0	0,0	19,71	25,20

Für das PEP_{RGD}_IS wurde eine Partikeldispersion (133 µg/mL; 37,71 mL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) hergestellt und diese mit der PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 5443,0 µL; 33,0 µmol) und DMSO (46,0 µL) versetzt. Nach 60 min Inkubation wurde FCS (4,80 mL) zugegeben und bei 37 °C kontinuierlich bewegt. Nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h und 48 h wurden Aliquote der Proben entnommen und zentrifugiert (14.800 Upm; 60 min). Der Überstand wurde mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) 1:1-verdünnt und an das Helmholtz-Institut Ulm für Messungen weitergegeben. Die TEM Untersuchung der Fibrillen-Partikel-Aggregate erfolgte wie in Kapitel 7.1.3 beschrieben.

7.3.3. *Untersuchungen des Zetapotentials während der Auflösung*

Für die Untersuchung des Zetapotentials wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (100 µg/mL) in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,2) für 10 min im Hochultraschallbad dispergiert und bei 37 °C kontinuierlich bewegt. Nach 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 24 h und 48 h wurden Zetapotentialmessungen durchgeführt.

7.3.4. *Thermogravimetrische Untersuchungen der Auflösung*

Es wurde eine Partikeldispersion von MSN_{COOH} (100 µg/mL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) hergestellt und bei 37 °C kontinuierlich bewegt. Nach 2 h, 4 h ,6 h und 24 h wurde ein Teil der Partikel

zentrifugiert (10.000 Upm; 10 min) und zwei Mal mit Aceton gewaschen. Nachdem die Partikel bei 60 °C getrocknet wurden, wurden sie thermogravimetrisch vermessen.

7.4. Proteinadsorption

Für die Proteinadsorptionsmessungen wurden Fibrillen in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit den Ansatzmengen aus Tabelle 19 für 24 h inkubiert. Die fertig ausgebildeten Fibrillen wurden zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min), ein Teil des Überstandes (250,0 µL) entnommen und mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 250,0 µL) oder MSN_{COOH}-Dispersion (540,0 µg/mL; 250,0 µL) wieder aufgefüllt, resuspendiert und 45 min inkubiert. Für PEP_{RGD}_IS wurde zunächst eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 250,0 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit PEP_{RGD}-Stocklösung (10 mg/mL; 147,3 µL) für 60 min inkubiert. Zur Untersuchung der Partikel ohne Fibrillen wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (5 mg/mL; 1364,0 µL) angesetzt. Im Anschluss wurde FCS (136,4 µL) zu allen Proben gegeben. Nach 24 h kontinuierlicher Bewegung bei 37 °C wurden die Proben von schwach gebundenen Proteinen durch dreimaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser befreit und die Pellets für 30 min mit SDS-Puffer (10% in Wasser; 250,0 µL) bei Raumtemperatur behandelt. Die Proben wurden zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min) und der proteinhaltige Überstand (20,0 µL) mit Laemmli-Puffer (4,0 µL) verdünnt. Als Referenzen dienten eine 10%ige FCS-Lösung sowie der verwendete SDS-Puffer (10% in Wasser).

Tabelle 19: Ansatzmengen der Fibrillen für die Proteinadsorption.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	100,0	892	1264,0	1364,0
1% RGD	100,5	892	1263,5	1364,0
10% RGD	104,7	892	1259,3	1364,0
15% RGD	107,1	892	1256,9	1364,0
25% RGD	111,8	892	1252,2	1364,0
40% RGD	118,9	892	1245,1	1364,0
55% RGD	126,0	892	1238,0	1364,0
70% RGD	133,1	892	1230,9	1364,0
85% RGD	140,2	892	1223,8	1364,0
PEP_{RGD}	147,3	892	1216,7	1364,0

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	Natriumphosphat-puffer / µL	Gesamt-menge / µL
PEP_{RAD}	148,5	892	1215,5	1364,0

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Trenngel: 12%; Sammelgel: 5%; Zusammensetzung: Tabelle 20). Als Molekulargewichtsstandard diente der *PageRuler Unstained Protein Ladder* (10,0 µL). Zudem wurden die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben (10,0 µL) sowie die FCS-Referenz (10,0 µL) und die SDS-Negativkontrolle (30,0 µL) in die Gelkammern pipettiert. Die Gele wurden bei einer konstanten Spannung von 300 V behandelt und anschließend vier Mal mit Wasser gewaschen, bevor sie mit einer Coomassie-Färbelösung nach Kang *et al.*[298] für 2 h angefärbt wurden. Anschließend wurden die Gele in Wasser für 24 h von unspezifisch gebundenem Farbstoff befreit.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/N,N'-Methylen-bis-acrylamid	16,0 mL	1,7 mL
Tris-Puffer (1,5 M; pH 8,8)	10,0 mL	0,0 mL
Tris-Puffer (0,5 M; pH 6,8)	0,0 mL	2,5 mL
Wasser	13,8 mL	5,8 mL
10 Gew.% Ammoniumperoxodisulfat	200,0 µL	50,0 µL
Tetramethylethylendiamin	20,0 µL	10,0 µL

8. Evaluation der Biokompatibilität

Für die Evaluation der Biokompatibilität wurde die Lungenkrebszelllinie A549 verwendet und die Zellviabilität über *CellTiterGlo®*-Assay bestimmt. Zudem wurde die Anwesenheit von αV-Integrinrezeptoren auf der Zellmembran über Antikörperanbindung nachgewiesen.

8.1. Zellkultur

Für zelluläre Untersuchungen wurden A549-Lungenkrebszellen herangezogen. Hierbei handelt es sich um eine humane Zelllinie, welche aus einem explantierten Adenokarzinom der Lunge eines 58-jährigen weißen Amerikaners stammt. Sie wurde 1972 durch Donald J. Giard etabliert[271].

8.1.1. *Zellkulturmedium*

Für das Nährmedium für A549-Lungenkrebszellen kam *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem D-Glukoseanteil von 4,5 g/L als Basismedium zum Einsatz, welches mit 10 Vol% hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum und 1 Vol% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde.

8.1.2. *Kultivierung von A549-Lungenkrebszellen*

Die A549-Lungenkrebszellen wurden bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte in Nährmedium inkubiert. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt und beim Erreichen einer Konfluenz von etwa 75% wurden die Zellen passagiert. Zur Zellpassagierung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}) bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte für 8 min inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mittels Mikroskopie optisch überprüft. Die enzymatische Ablösung der Zellen wurde durch Zugabe des fünffachen Überschusses an Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit Nährmedium verdünnt und ein Zehntel der verdünnten Suspension in die Zellkulturflasche ausgesät.

8.1.3. *Sättigung der Integrinrezeptoren auf der Zelloberfläche*

Zur Untersuchung der Sättigung der Integrinrezeptoren wurden die A549-Zellen in eine 24-Well-Absorptionplatte angesetzt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Konzentration von 100.000 Zellen pro Well in Nährmedium (2,0 mL) ausgesät und 24 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es wurden unterschiedliche Mengen (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 5, 7, 10 und 15 µL) einer Stocklösung (200 µg/mL) eines ATTO488-markierten αV-spezifischen Antikörpers zu den Zellen gegeben und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen und mit einem Zellschaber vom Wellboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (1.000 Upm; 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in

Paraformaldehydlösung (4% in demineralisiertem Wasser; 100,0 µL) resuspendiert. Vor der Messung wurden die Proben im Institut für Molekulare Virologie mit PBS (100,0 µL) 1:1-verdünnt.

Um die Sättigung der Zellen mit dem αV-Antikörper visuell zu untersuchen, wurden diese fluoreszenzmikroskopisch an einem Konfokalmikroskop betrachtet. Die A549-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5000 Zellen pro Well in eine 8-Well-Ibidi-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nachdem die Zellen mit einer Antikörper-Stocklösung (200 µg/mL; 2,0 µL) versetzt und für 1 h inkubiert wurden, wurden diese zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (2,0 µL) für 5 min fluoreszenzmarkiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und für 30 min mit Paraformaldehydlösung (4% in PBS; 200,0 µL) fixiert. Die Vermessung und Lagerung der Proben erfolgte in PBS mit 1% FCS (200,0 µL).

8.2. Zellviabilität mittels CellTiterGlo®

Der Einfluss der verwendeten Systeme auf die Zellvitalität wurde mittels *CellTiterGlo®* bestimmt. A549-Zellen wurden in einer weißen 96-Well-Mikroplatte in Nährmedium (200,0 µL) mit einer Konzentration von 5000 Zellen pro Well für 24 h kultiviert. Die Peptidstocklösungen wurden mit PBS versetzt (Tabelle 21) und für 24 h inkubiert. Vor Zugabe zu den Zellen wurden die Fibrillen mit PBS (180,0 µL) oder mit einer Partikeldispersion von MSN_{OH}, MSN_{COOH} oder MSN_{NH2} (24,7 µg/mL; 180,0 µL) in PBS verdünnt und 45 min inkubiert. Von den Partikeln MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} wurden zudem Dispersionen (0,05 mg/mL) in PBS hergestellt. Für die Untersuchung des inversen Systems PEP_{RGD}_IS wurde eine Dispersion von MSN_{COOH} (111 µg/mL; 40,14 µL) in PBS mit einer PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 4,86 µL) in DMSO versetzt und 60 min inkubiert, bevor sie mit PBS (180,0 µL) verdünnt wurde. Die Proben (40,0 µL; Triplikate) wurden mit Nährmedium (160,0 µL) zu den Zellen pipettiert und für 24 bzw. 48 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Überstände aus den Wells entfernt und eine 1:1-Verdünnung der *CellTiterGlo®*-Stocklösung mit Nährmedium (100,0 µL) zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 12 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Zellvitalität an einem Luminometer ausgelesen.

Tabelle 21: Ansatzmengen der Fibrillen für die Zellvitalitätsuntersuchungen mittels *CellTiterGlo®*.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	PBS / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	3,30	29,5	41,70	45,0
1% RGD	3,32	29,5	41,68	45,0

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	PBS / µL	Gesamt-menge / µL
10% RGD	3,46	29,5	41,54	45,0
15% RGD	3,53	29,5	41,47	45,0
25% RGD	3,69	29,5	41,31	45,0
40% RGD	3,92	29,5	41,08	45,0
55% RGD	4,16	29,5	40,84	45,0
70% RGD	4,39	29,5	40,61	45,0
85% RGD	4,63	29,5	40,37	45,0
PEP_{RGD}	4,86	29,5	40,14	45,0
PEP_{RAD}	4,89	29,5	40,11	45,0

9. Anwendung als Wirkstofftransportsystem

Für die Anwendung als Wirkstofftransportsystem wurde zunächst die Zelladhäsion der unterschiedlichen Systeme an A549-Krebszellen mittels Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie untersucht. Anschließend wurde zudem die Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln sowie die Aufnahme des Wirkstoffs Daunorubicin und des Modellwirkstoffs DiO in die Krebszellen genauer analysiert.

9.1. Zelladhäsion an A549-Lungenkrebszellen

Zur Untersuchung der Zelladhäsion wurden die Methoden der Durchflusszytometrie sowie der Konfokalmikroskopie herangezogen. Hierbei wurde die Zelladhäsion der unterschiedlichen Systeme an die A549-Krebszellen untersucht und die Lokalisation der PNF sowie der MSN_{COOH} über Fluoreszenzmarkierung bestimmt.

9.1.1. *Untersuchung der Zelladhäsion mittels Durchflusszytometrie*

Die Proben für die durchflusszytometrischen Messungen wurden in 24-Well-Absorptionplatten angesetzt. Hierzu wurden A549-Zellen mit einer Konzentration von 100.000 Zellen pro Well in

Nährmedium (2,0 mL) ausgesät und 24 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Fibrillen wurden nach den Ansatzmengen in Tabelle 22 in PBS angesetzt und ebenfalls 24 h inkubiert. Um die Fibrillen detektieren zu können wurden ATTO647N-markierte Peptidstocklösungen (1 mol%) verwendet. Nach den 24 h Inkubationszeit wurden die Fibrillen mit PBS (779,0 µL) oder einer MSN_{COOH}-Dispersion (66,0 µg/mL; 779,0 µL) versetzt und 45 min inkubiert. Für die Untersuchung des inversen Systems PEP_{RGD}_IS wurde eine MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 464,6 µL) in PBS vorgelegt und mit einer PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 56,2 µL) in DMSO für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe ebenfalls mit PBS (779,0 µL) verdünnt. Die Proben (400,0 µL) wurden mit Nährmedium (1600,0 µL) zu den Zellen gegeben und 3 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen und mit einem Zellschaber vom Wellboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (1.000 Upm; 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Paraformaldehydlösung (4% in demineralisiertem Wasser; 100,0 µL) resuspendiert. Vor der Messung wurden die Proben im Institut für Molekulare Virologie mit PBS (100,0 µL) 1:1-verdünnt.

Tabelle 22: Ansatzmengen der Fibrillen zur Untersuchung der Zelladhäsion mittels Durchflusszytometrie.

	Peptidstock-lösung / µL	Peptidmenge / nmol	PBS / µL	Gesamt-menge / µL
PEP	38,2	341,5	482,7	520,9
1% RGD	38,4	341,5	482,5	520,9
10% RGD	40,0	341,5	480,9	520,9
15% RGD	40,9	341,5	480,0	520,9
25% RGD	42,7	341,5	478,2	520,9
40% RGD	45,4	341,5	475,5	520,9
55% RGD	48,1	341,5	472,8	520,9
70% RGD	50,8	341,5	470,1	520,9
85% RGD	53,6	341,5	467,3	520,9
PEP_{RGD}	56,3	341,5	464,6	520,9
PEP_{RAD}	56,7	341,5	464,2	520,9

Um den Einfluss der RGD-Sequenz auf die Anbindung an die Zellen genauer zu untersuchen, wurde das Experiment wiederholt. Hierbei wurden vor Zugabe der Proben zu den Zellen die Integrinrezeptoren der A549-Krebszellen mit der Peptidsequenz GGRGDS gesättigt. Die Sättigung erfolgte durch Zugabe einer GGRGDS-Stocklösung (200 µM; 2000 µL) in Nährmedium und

anschließender Inkubation für 60 min bei 4 °C. Vor Zugabe der Proben wurden die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen.

Zudem wurde das Experiment mit einer Partikelkonzentration von 250 µg/µL und einer Inkubationszeit von 24 h wiederholt. Um die Fluoreszenz der extrazellulär lokalisierten MSN_{COOH} zu quenchen, wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit für 15 min bei RT mit einer Trypanblaustocklösung inkubiert (0,5 mg/mL; 1 mL). Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Wellboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (1.000 Upm; 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Paraformaldehydlösung (4% in demineralisiertem Wasser; 100,0 µL) resuspendiert. Vor der Messung wurden die Proben im Institut für Molekulare Virologie mit PBS (100,0 µL) 1:1-verdünnt.

9.1.2. *Quenchen der ATTO488-Fluoreszenz mittels Trypanblau*

Zur Untersuchung der Eignung von Trypanblau als Quencher für den Farbstoff ATTO488 wurden die Peptidstocklösungen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt (Tabelle 10). Nach 24 h wurden die Ansätze mit einer ATTO488-markierten MSN_{COOH}-Dispersion (24,7 µg/mL; 180 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vermengt und weitere 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit unterschiedlich konzentrierten Trypanblaulösungen (0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL oder 0,5 mg/mL; 400 µL) verdünnt und die Fluoreszenzintensität der Proben vermessen.

Die reinen Partikel wurden ebenfalls untersucht. Hierzu wurde eine ATTO488-markierte Partikeldispersion (19,8 µg/mL; 225 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit unterschiedlich konzentrierten Trypanblaulösungen (0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL oder 0,5 mg/mL; 400 µL) verdünnt und die Fluoreszenzintensität der Proben vermessen.

Für das PEP_{RGD}_IS wurde eine ATTO488-markierte MSN_{COOH}-Dispersion (111 µg/mL; 40,14 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) vorgelegt und mit einer PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 4,86 µL) in DMSO versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die Proben mit unterschiedlich konzentrierten Trypanblaulösungen (0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL oder 0,5 mg/mL; 400 µL) verdünnt und die Fluoreszenzintensität der Proben vermessen.

9.1.3. *Untersuchung der Zelladhäsion mittels Konfokalmikroskopie*

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden A549-Zellen in Nährmedium (200,0 µL) in eine 8-Well-Ibidi-Platte ausgesät. Die Zelldichte betrug 5000 Zellen pro Well. Nach 24 h Kultivierung bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit erfolgte die Probenzugabe. Hierzu wurden ATTO647N-funktionalisierte Peptidstocklösungen (10 mol%) mit PBS versetzt und für 24 h inkubiert. Als Ansatzgröße wurde ein Drittel der Mengen aus Tabelle 10 verwendet. Bevor die Proben zu den Zellen gegeben wurden, wurden die Fibrillen mit PBS (60,0 µL) oder mit einer Partikeldispersion von ATTO488-markierten MSN_{COOH} (24,7 µg/mL; 60,0 µL) in PBS für 45 min inkubiert. Für das inverse System PEP_{RGD}_IS wurde eine Partikeldispersion von ATTO488-markierten MSN_{COOH} (111 µg/mL; 13,38 µL) in PBS vorgelegt und 60 min mit einer PEP_{RGD}-Peptidstocklösung (10 mg/mL; 1,62 µL) in DMSO inkubiert. Anschließend wurde die Probe ebenfalls mit PBS (60,0 µL) verdünnt. Die Proben (40,0 µL) wurden mit Nährmedium (160,0 µL) zu den Zellen gegeben und 3 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (2,0 µL) für 5 min fluoreszenzmarkiert. Die Zellen wurden einmal mit Nährmedium gewaschen und anschließend 30 min mit Paraformaldehydlösung (4% in PBS; 200,0 µL) fixiert. Die Vermessung sowie die Lagerung der Zellen erfolgte in PBS mit 1% FCS (200,0 µL).

9.2. Beladung der Partikel

Für den Wirkstofftransport wurden die Partikel zunächst mit Gastmolekülen beladen. Hierzu wurden das hydrophile Zytostatikum Daunorubicin sowie der Fluoreszenzfarbstoff DiO als hydrophober Modellwirkstoff verwendet. Die Beladung erfolgte in wasserfreien Medien über 20 h unter Lichtausschluss. Der Erfolg der Beladungen konnte mittels UV/Vis-spektroskopischer Messungen bestätigt werden.

9.2.1. *Beladung mit dem Modellwirkstoff DiO*

Für die Beladung der Partikel mit dem hydrophoben Modellwirkstoff DiO wurde zunächst eine DiO-Stocklösung (1 mg/mL) in trockenem Cyclohexan hergestellt. Aufgrund der gehemmten Löslichkeit des DiO wurde die Stocklösung bei 60 °C behandelt. Die DiO-Stocklösung wurde durch Zugabe von trockenem Cyclohexan verdünnt, um eine DiO-Konzentration von 709 µg/mL zu erhalten. Die MSN_{COOH} wurden vor der Beladung für 3 h im Vakuum bei 100 °C ausgeheizt und anschließend eine Dispersion

(10,7 mg/mL) in der DiO-Lösung präpariert. Für die Beladung wurden die Partikel für 20 h unter Lichtausschluss über Kopf gedreht. Die beladenen Partikel wurden mittels Zentrifugation (3.500 Upm; 10 min) abgetrennt und einmal mit trockenem Cyclohexan gewaschen, bevor sie im Vakuum getrocknet wurden. Der Beladungsgrad wurde durch UV/Vis-spektroskopische Messungen der eingesetzten DiO-Lösung (1:100-Verdünnung) sowie der Überstande der Beladung und des Waschschrittes ermittelt.

Für konfokalmikroskopische Untersuchungen wurden auch ATTO565-markierte MSN_{COOH} (Kapitel 2.3) mit DiO beladen.

9.2.2. *Beladung mit dem Krebswirkstoff Daunorubicin*

Die Neutralisation des Daunorubicin-Hydrochlorids erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Wu *et al.*[315], wobei Daunorubicin-Hydrochlorid (2,0 mg/mL; 3,5 µmol/mL) in Wasser gelöst und unter Rühren für 10 min mit Triethylamin (0,3 µL/mg Daunorubicin-Hydrochlorid; 2,1 µmol/mg) neutralisiert wurde. Durch Extraktion mit Dichlormethan wurde das neutralisierte Daunorubicin aus der wässrigen in die organische Phase überführt und anschließend das Dichlormethan im Vakuum entfernt. Vor der Beladung der Partikel mit neutralisiertem Daunorubicin wurden diese zuerst bei 100 °C für 3 h im Vakuum getrocknet. Des Weiteren wurde eine Daunorubicin-Stocklösung (238 µg/mL; 451 nmol/mL) in trockenem Dichlormethan angesetzt, in welcher die MSN_{COOH} (6,5 mg/mL) dispergiert und für 20 h bei Raumtemperatur bewegt wurden. Nach der Beladung der Partikel wurden diese zwei Mal mit trockenem Dichlormethan gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Grad der Daunorubicinbeladung wurde durch UV/Vis-spektroskopische Messungen der Daunorubicin-Stocklösung (1:10-Verdünnung) sowie der Überstände der Beladung und der Waschschritte (λ = 499 nm; Kalibriergerade: $y = 0{,}0101\ mL/nmol \cdot x + 0{,}0375$; $R^2 = 0{,}9984$; n = 3).

Es wurden für konfokalmikroskopische Untersuchungen auch ATTO565-markierte MSN_{COOH} (Kapitel 2.3) mit Daunorubicin beladen.

9.3. Untersuchung der Wirkstofffreisetzung

Die Wirkstofffreisetzung wurde bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht, um die variierenden pH-Bereiche im Laufe des Wirkstofftransports zu simulieren. Zudem wurde der Einfluss der PNF auf die Freisetzung der Wirkstoffe untersucht.

9.3.1. *Freisetzung des Modellwirkstoffs DiO und des Krebswirkstoffs Daunorubicin*

Die Freisetzung der beladenen Partikel erfolgte bei einer Konzentration von 1,0 mg/mL. Es wurden Partikeldispersionen von MSN_{OH} _Dauno, MSN_{COOH}_Dauno, MSN_{NH2}_Dauno (Kapitel 9.2.2) sowie MSN_{COOH}_DiO (Kapitel 9.2.1) in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4/ 6,5/ 5,0) angesetzt. Zudem wurde jeweils eine Dispersion in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4) mit 10% FCS präpariert. Die Proben wurden bei 37 °C kontinuierlich bewegt und nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 24 h und 48 h je ein Aliquot (120,0 µL) zentrifugiert (14.800 Upm; 45 min). Der Überstand (100,0 µL) wurde entnommen und UV/Vis-spektroskopisch untersucht (λ_{Dauno} = 481 nm; Kalibriergerade: y = 0,0115 mL/nmol · x + 0,0203; R^2 = 0,9997; n = 3; λ_{DiO} = 488 nm; Kalibriergerade: y = 14318 mL/µg · x + 706,26; R^2 = 0,9943; n = 3).

9.3.2. *Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Zetapotentials*

Zur Bestimmung der Zetapotentiale der unterschiedlich funktionalisierten Partikel in den zur Freisetzung verwendeten pH-Bereichen, wurden Partikeldispersionen von MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} (50 µg/mL) in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4/ 6,5/ 5,0) präpariert und Zetapotentialmessungen durchgeführt.

9.3.3. *Einfluss der Peptidnanofibrillen auf die Daunorubicinfreisetzung*

Der Einfluss der PNF auf die Daunorubicinfreisetzung aus den Partikeln wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurde analog zur Freisetzung aus den reinen MSN_{COOH} eine Partikelkonzentration von 1,0 mg/mL gewählt. Zunächst wurde die PEP_{RGD}-Stocklösung (50 mg/mL; 89,7 µL) in DMSO mit HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4/ 6,5/ 5,0; 910 µL) angesetzt und 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min), 500 µL Überstand entnommen und mit Partikeldispersionen von MSN_{COOH}_Dauno (2 mg/mL; 500 µL) in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4/ 6,5/ 5,0) versetzt. Zudem wurde eine Probe in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4) mit 10% FCS präpariert. Für das PEP_{RGD}_IS wurde eine MSN_{COOH}_Dauno-Dispersion (1,1 mg/mL; 910 µL) in HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,4/ 6,5/ 5,0) vorgelegt und mit einer PEP_{RGD}-Stocklösung (30 mg/mL; 89,7 µL) in DMSO versetzt. Die Proben wurden bei 37 °C kontinuierlich bewegt und nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 24 h und 48 h je ein Aliquot (120,0 µL) zentrifugiert (14.800 Upm; 45 min). Der Überstand (100,0 µL) wurde entnommen und UV/Vis-spektroskopisch untersucht (λ_{Dauno} = 481 nm; Kalibriergerade: y = 0,0115 mL/nmol · x + 0,0203; R^2 = 0,9997; n = 3).

9.3.4. *Einlagerung des Daunorubicins in die Fibrillenstrukturen*

Zur Untersuchung der Einlagerung des Daunorubicins in die Fibrillenstrukturen wurde die PEP_{RGD}-Stocklösung (10 mg/mL; 9,7 µL) in DMSO mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 80,3 µL) versetzt und 24 h inkubiert. Anschließend wurde eine Daunorubicinlösung (65 mg/mL; 11,6 µL) in DMSO und Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 348 µL) zu den Fibrillen gegeben und weitere 24 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0), bis zu einem farblosen Waschüberstand, wurden die Proben zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min) und das Fibrillenpellet auf seine Farbigkeit untersucht.

Zusätzlich wurde die PEP_{RGD}-Stocklösung (10 mg/mL; 9,7 µL) in DMSO mit einer Daunorubicinlösung (65 mg/mL; 11,6 µL) in DMSO und Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 68,7 µL) für 60 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert und anschließend mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 360 µL) verdünnt. Nach sorgfältigem Waschen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0), bis zu einem farblosen Waschüberstand, wurden auch diese Proben zentrifugiert (14.800 Upm; 10 min) und das Fibrillenpellet auf seine Farbigkeit untersucht.

9.4. Untersuchung des gezielten Wirkstofftransports in A549-Zellen

Die Untersuchung des gezielten Wirkstofftransports in A549-Zellen erfolgte neben konfokalmikroskopischen Experimenten auch durch Durchflusszytometrie. Hierbei wurde auf die Wirkstofftransporteigenschaften der unterschiedlichen Systeme eingegangen und zudem der Einfluss der Hydrolyse der Partikel auf die Wirkstofffreisetzung in die Zellen untersucht.

9.4.1. *Konfokalmikroskopische Untersuchungen*

Die konfokalmikroskopische Untersuchung der Wirkstofffreisetzungen in die Zellen wurden analog zu Kapitel 9.1.3 durchgeführt. Anstelle der ATTO488-markierten MSN_{COOH} kamen hierbei die ATTO565-markierten MSN_{COOH}_Dauno sowie die ATTO565-markierten MSN_{COOH}_DiO zum Einsatz. Zudem wurde das Experiment für die DiO-beladenen Partikel zusätzlich für eine Inkubationszeit von 24 h wiederholt.

9.4.2. *Durchflusszytometrische Untersuchungen*

Die durchflusszytometrischen Messungen zur DiO-Freisetzung wurden analog zu den Experimenten der Zelladhäsion (Kapitel 9.1.1) durchgeführt. Anstelle der MSN_{COOH} wurden hierbei jedoch die MSN_{COOH}_DiO eingesetzt und die Inkubationszeit auf 24 h erhöht. Am Durchflusszytometer wurde die DiO-Fluoreszenz der Zellen bestimmt.

9.4.3. *Einfluss der Partikelhydrolyse auf die DiO-Freisetzung*

Die Proben für die durchflusszytometrischen Messungen wurden in 24-Well-Absorptionplatten angesetzt. Hierzu wurden A549-Zellen mit einer Konzentration von 100.000 Zellen pro Well in Nährmedium (2,0 mL) ausgesät und 24 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um den Einfluss der Partikelhydrolyse auf die DiO-Freisetzung zu untersuchen, wurde eine MSN_{COOH}_DiO-Dispersion (39,5 µg/mL; 433 µL) in PBS vorgelegt und mit Nährmedium mit 10% FCS (1733 µL) verdünnt. Für das PEP_{RGD}_IS wurde eine MSN_{COOH}_DiO-Dispersion (110 µg/mL; 154,8 µL) in PBS vorgelegt und mit einer PEP_{RGD}-Stocklösung (10 mg/mL; 18,7 µL) in DMSO versetzt. Nach 60 min Inkubation wurden die Proben mit PBS (259,7 µL) und Nährmedium mit 10% FCS (1733 µL) verdünnt. Nach 24 h Inkubation der Proben mit den reinen MSN_{COOH} sowie mit dem PEP_{RGD}_IS bei 37 °C unter Lichtausschluss wurden diese zentrifugiert (14.800 Upm; 60 min) und der Überstand (2,0 mL) zu den A549-Zellen gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen und mit einem Zellschaber vom Wellboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (1.000 Upm; 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Paraformaldehydlösung (4% in demineralisiertem Wasser; 100,0 µL) resuspendiert. Vor der Messung wurden die Proben im Institut für Molekulare Virologie mit PBS (100,0 µL) 1:1-verdünnt.

9.5. Sequenzielle Zugabe der Komponenten

Bei der Sequenziellen Zugabe wurde zunächst der Einfluss der Anwesenheit einer Proteincorona um die PNF auf die Partikelanlagerung untersucht. Zudem wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung der Zelladhäsion sowie der Wirkstofffreisetzung in die A549-Zellen gemacht.

9.5.1. *Durchflusszytometrie zur Anlagerung der MSN an mit 10% FCS inkubierte PNF*

Die Fibrillen für die Untersuchung der Anlagerung der MSN_{COOH} an die mit FCS vorinkubierten Fibrillen wurden nach Tabelle 13 für 24 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Fibrillen mit Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0; 172,5 µL) und FCS (25,0 µL) versetzt und 3 h inkubiert. Anschließend wurde eine Dispersion von ATTO488-markierten MSN_{COOH} (41,6 µg/mL; 250,0 µL) zu den Fibrillen gegeben und weitere 45 min inkubiert. Die Vermessung der Anlagerung erfolgte über Durchflusszytometrie.

9.5.2. *Konfokalmikroskopie zur Anlagerung der MSN an mit 10% FCS inkubierte PNF*

Zur visuellen Untersuchung der MSN_{COOH}-Anlagerung an die mit FCS vorinkubierten Fibrillen wurden ATTO647N-markierte Fibrillen (10 mol%), welche nach Tabelle 13 für 24 h angesetzt wurden, verwendet. Die Fibrillen wurden mit FCS (2,63 µL) für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einer ATTO488-markierten MSN_{COOH}-Dispersion (208 µg/mL; 25,0 µL) in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) versetzt und für weitere 45 min inkubiert. Zur Aufnahme an einem Konfokalmikroskop wurden die Proben (25,0 µL) auf eine 18-Well-Ibidi-Platte pipettiert und für 2 min zum Absetzen der Fibrillenaggregate ruhen gelassen.

9.5.3. *Proteinadsorption mittels SDS-PAGE*

Die Proteinadsorption an die Fibrillen im Falle der sequenziellen Zugabe wurde analog zu Kapitel 7.4 ohne MSN_{COOH} durchgeführt. Die Inkubationszeit der Fibrillen mit FCS wurde hierbei jedoch auf 3 h verkürzt. Die adsorbierten Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

9.5.4. *Konfokalmikroskopie zur Untersuchung der Zelladhäsion*

Für die Visualisierung der Zelladhäsion bei der sequenziellen Zugabe wurden A549-Zellen in einer 8-Well-Ibidi-Platte mit einer Zelldichte von 5.000 Zellen pro Well in Nährmedium (200,0 µL) ausgesät und 24 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Fibrillen wurden mit einem Drittel der Ansatzgröße aus Tabelle 10 mit den ATTO647N-markierten Peptidstocklösungen (10 mol%) angesetzt, bevor sie nach 24 h Inkubationszeit mit PBS (22,5 µL) verdünnt und zu den Zellen pipettiert wurden (20,0 µL Probe + 160,0 µL Nährmedium). Nach 3 h Kultivierung bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit wurde eine ATTO488-markierte MSN_{COOH}-Dispersion (39,5 µg/mL; 20,0 µL) zu den

Zellen gegeben und diese für weitere 3 h bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hoechst-Farbstoff (2,0 µL) für 5 min fluoreszenzmarkiert, bevor die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen und anschließend 30 min mit Paraformaldehydlösung (4% in PBS; 200,0 µL) fixiert wurden. Die Vermessung sowie die Lagerung der Zellen erfolgte in PBS mit 1% FCS (200,0 µL).

9.5.5. *Untersuchung der Wirkstofffreisetzung in A549-Zellen mittels Konfokalmikroskopie*

Die konfokalmikroskopische Untersuchung der Wirkstofffreisetzungen in die Zellen wurden analog zu Kapitel 9.5.4 durchgeführt. Anstelle der ATTO488-markierten MSN_{COOH} kamen hierbei die ATTO565-markierten MSN_{COOH}-Dauno sowie die ATTO565-markierten MSN_{COOH}_DiO zum Einsatz.

VI. Literaturverzeichnis

1. Iden R., Josel H.-P., Megelski S., Steinbach C., Tovar G., Weltring K.-M. Forschungsbedarf und Rahmenbedingungen zur Integration der Nanotechnologie in biomedizinische Anwendungen. *ProzessNet Temporärer Arbeitskreis NanoBioMedizin* 2015.

2. Mamaeva V., Sahlgren C., Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013, *65,* 689-702. doi:10.1016/j.addr.2012.07.018

3. Zhang Y., Wang J., Bai X., Jiang T., Zhang Q., Wang S. Mesoporous silica nanoparticles for increasing the oral bioavailability and permeation of poorly water soluble drugs. *Mol Pharm*. 2012, *9,* 505-513. doi:10.1021/mp200287c

4. Moorthi C., Manavalan R., Kathiresan K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *J Pharm Pharm Sci*. 2011, *14*, 67-77.

5. Su J., Chen F., Cryns V. L., Messersmith P. B. Catechol polymers for pH-responsive, targeted drug delivery to cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2011, *133*, 11850-11853. doi:10.1021/ja203077x

6. Markland P., Zhang Y., Amidon G. L., Yang V. C. A pH- and ionic strength-responsive polypeptide hydrogel: Synthesis, characterization, and preliminary protein release studies. *J Biomed Mater Res*. 1999, *47*, 595-602. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19991215)47:4<595::AID-JBM17>3.0.CO;2-I

7. Karimi M., Sahandi Zangabad P., Ghasemi A. *et al.* Temperature-Responsive Smart Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Agents: Applications and Recent Advances. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016, *8*, 21107-21133. doi:10.1021/acsami.6b00371

8. Bromberg L. E., Ron E. S. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998, *31*, 197-221. doi:10.1016/S0169-409X(97)00121-X

9. Mal N. K., Fujiwara M., Tanaka Y. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature*. 2003, *421*, 350-353. doi:10.1038/nature01362

10. Ghadiali J. E., Stevens M. M. Enzyme-responsive nanoparticle systems. *Adv Mater*. 2008, *20*, 4359-4363. doi:10.1002/adma.200703158

11. Lai C. Y., Trewyn B. G., Jeftinija D. M. *et al.* A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of neurotransmitters and drug molecules. *J Am Chem Soc*. 2003, *125*, 4451-4459. doi:10.1021/ja028650l

12. Mao L., Wang H., Tan M., Ou L., Kong D., Yang Z. Conjugation of two complementary anti-cancer drugs confers molecular hydrogels as a co-delivery system. *Chem Commun*. 2012, *48*, 395-397. doi:10.1039/c1cc16250k

13. Vallet-Regi M., Rámila A., Del Real R. P., Pérez-Pariente J. A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem Mater*. 2001, *13*, 308-311. doi:10.1021/cm0011559

14. Chan J. M., Valencia P. M., Zhang L., Langer R., Farokhzad O. C. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Methods Mol Biol.* 2010, *624*, 163-175. doi:10.1007/978-1-60761-609-2_11

15. Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010, *75*, 1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

16. Kulkarni P. R., Yadav J. D., Vaidya K. A. LIPOSOMES: A NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEM. *Int J Curr Pharm Res*. 2011, 3, 10-18.

17. Aliabadi H. M., Lavasanifar A. Polymeric micelles for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006, *3*, 139-162. doi:10.1517/17425247.3.1.139

18. Ahmad Z., Shah A., Siddiq M., Kraatz H. B. Polymeric micelles as drug delivery vehicles. *RSC Adv*. 2014, *4*, 17028-17038. doi:10.1039/c3ra47370h

19. Zhang W., Zhang Z., Zhang Y. The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. *Nanoscale Res Lett*. 2011, *6*, 1-22. doi:10.1186/1556-276X-6-555

20. Bianco A., Kostarelos K., Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*. 2005, *9*, 674-679. doi:10.1016/j.cbpa.2005.10.005

21. Fan T., Yu X., Shen B., Sun L. Peptide Self-Assembled Nanostructures for Drug Delivery Applications. *J Nanomater*. 2017, *2017*. doi:10.1155/2017/4562474

22. Wang Q., Jiang N., Fu B., Huang F., Liu J. Self-assembling peptide-based nanodrug delivery systems. *Biomater Sci*. 2019. doi:10.1039/c9bm01212e

23. Fischer E. Synthese von Polypeptiden. I. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (EurJIC)* 1903, *36*, 2982-2992. doi:10.1002/cber.19030360356

24. Fischer E. Synthese von Polypeptiden. II. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (EurJIC)* 1904, *37*, 2486-2511. doi:10.1002/cber.190403702197

25. Fischer E. Synthese von Polypeptiden. XVII. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (EurJIC)* 1907, *40*, 1754-1767. doi:10.1002/cber.19070400273

26. Merrifield R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1963, *85*, 2149-2154. doi:10.1021/ja00897a025

27. Erickson S. W., Merrifield R. B. In 'The Proteins' (Eds) Neurath H., Hills R. L. and Boeder C.-L. *Academic Press New York*. 1976, *11*, 257-528.

28. Atherton E., Fox H., Harkiss D., Logan C. J., Sheppard R. C., Williams B. J. A Mild Procedure for Solid Phase Peptide Synthesis: Use of Fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J. C. S. Chem. Comm.* 1978, 537-539.

29. Bollhagen R., Schmiedberger M., Barlos K., Grell E. A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides synthesised on 2-Chlorotrityl Chlorine Resin. *J. Chem. Soc.* 1994, 2559-2560.

30. Zhang S., Holmest T., Lockshin C., Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, *90*, 3334-3338.

31. Marini D. M., Hwang W., Lauffenburger D. A., Zhang S., Kamm R. D. Left-Handed Helical Ribbon Intermediates in the Self-Assembly of a -Sheet Peptide. *Nano Lett.* 2002, *2*, 295-299. doi:10.1021/nl015697g

32. Serpell L. C., Sunde M., Benson M. D., Tennent G. A., Pepys M. B., Fraser P. E. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol*. 2000, *300*, 1033-1039. doi:10.1006/jmbi.2000.3908

33. Sunde M., Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and x-ray diffraction. *Adv Protein Chem*. 1997, *50*, 123-159.

34. Jiménez J. L., Guijarro J. I., Orlova E. *et al.* Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J*. 1999, *18*, 815-821. doi:10.1093/emboj/18.4.815

35. Sachse C., Xu C., Wieligmann K., Diekmann S., Grigorieff N., Fändrich M. Quaternary Structure of a Mature Amyloid Fibril from Alzheimer's Aβ(1-40) Peptide. *J Mol Biol*. 2006, *362*, 347-354. doi:10.1016/j.jmb.2006.07.011

36. Jiménez J. L., Tennent G., Pepys M., Saibil H. R. Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*. 2001, *311*, 241-247. doi:10.1006/jmbi.2001.4863

37. Jiménez J. L., Nettleton E. J., Bouchard M., Robinson C. V., Dobson C. M., Saibil H. R. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, *99*, 9196-9201. doi:10.1073/pnas.142459399

38. Rambaran R. N., Serpell L. C. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion.* 2008, *2*, 112-117.

39. Goldsbury C., Kistler J., Aebi U., Arvinte T., Cooper G. J. S. Watching amyloid fibrils grow by timelapse atomic force microscopy. *Journal of Molecular Biology* 1999, *285*, 33-39. doi:10.1006/jmbi.1998.2299

40. Vestergaard B., Groenning M., Roessle M. *et al.* A helical structural nucleus is the primary elongating unit of insulin amyloid fibrils. *PLoS Biol*. 2007, *5*, 1089-1097. doi:10.1371/journal.pbio.0050134

41. Balbach J. J., Petkova A. T., Oyler N. A. *et al.* Supramolecular structure in full-length Alzheimer's β-amyloid fibrils: Evidence for a parallel β-sheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J*. 2002, *83*, 1205-1216. doi:10.1016/S0006-3495(02)75244-2

42. Petkova A. T., Buntkowsky G., Dyda F., Leapman R. D., Yau W. M., Tycko R. Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel β-sheet registry in fibrils formed by a β-amyloid peptide. *J Mol Biol*. 2004, *335*, 247-260. doi:10.1016/j.jmb.2003.10.044

43. Naito A., Kamihira M., Inoue R., Saitô H. Structural diversity of amyloid fibril formed in human calcitonin as revealed by site-directed 13C solid-state NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem*. 2004, *42*, 247-257. doi:10.1002/mrc.1323

44. Geddes A. J., Parker K. D., Atkins E. D. T., Beighton E. "Cross-β" conformation in proteins. *J Mol Biol*. 1968, *32*, 343-344. doi.org/10.1016/0022-2836(68)90014-4

45. Anderson J. M., Chen H. H., Rippon W. B., Walton A. G. Characterization of three sequential polydipeptides containing glycine. *J Mol Biol*. 1972, *67*, 459-466. doi:10.1016/0022-2836(72)90463-9

46. Brack A., Orgel L. E. ß Structures of Alternating Polypeptides and Their Possible Prebiotic Significance. *Nature*. 1975, *256*, 383-387. doi:10.1038/256383a0

47. Perutz M. F., Finch J. T., Berriman J., Lesk A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, *99*, 5591-5595. doi:10.1073/pnas.042681399

48. Knowles T. P. J., Buehler M. J. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nat Nanotechnol*. 2011, *6*, 469-479. doi:10.1038/nnano.2011.102

49. Zhang S., Altman M. Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering. *React Funct Polym*. 1999, *41*, 91-102. doi:10.1016/S1381-5148(99)00031-0

50. Zhang S., Lockshin C., Cook R., Rich A. Unusually stable β-sheet formation in an ionic self-complementary oligopeptide. *Biopolymers*. 1994, *34*, 663-672. doi:10.1002/bip.360340508

51. Gazit E. A possible role for π-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J*. 2002, *16*, 77-83. doi:10.1096/fj.01-0442hyp

52. Brack A., Caille A. Synthesis and ß-conformation of Copolypeptides with alternating hydrophilic and hydrophobic residues. *Znt J Peptidehotein Res.* 1978, *11*, 128-139.

53. Caplan M. R., Moore P. N., Zhang S., Kamm R. D., Lauffenburger D. A. Self-Assembly of a ß-Sheet Protein Governed by Relief of Electrostatic Repulsion Relative to van der Waals Attraction. *Biomacromolecules.* 2000, 1, 627-631. doi:10.1021/bm005586w

54. Chen L., Liang J. F. Peptide fibrils with altered stability, activity, and cell selectivity. *Biomacromolecules.* 2013, *14*, 2326-2331. doi:10.1021/bm400618m.Peptide

55. Maji S. K., Schubert D., Rivier C., Lee S., Rivier J. E., Riek R. Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs. *PLoS Biol*. 2008, *6*, 240-252. doi:10.1371/journal.pbio.0060017

56. "https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteolyse/54191 (zuletzt abgerufen am 29.10.2019)"

57. "https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/exopeptidasen/23279 (zuletzt abgerufen am 29.10.2019)"

58. "https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/endopeptidasen/21257 (zuletzt abgerufen am 29.10.2019)"

59. Swanekamp R. J., Welch J. J., Nilsson B. L. Proteolytic stability of amphipathic peptide hydrogels composed of self-assembled pleated ß-sheet or coassembled rippled ß-sheet fibrils. *Chem Commun.* 2014, *50*, 10133-10136. doi:10.1039/c4cc04644g

60. Giano M. C., Pochan D. J., Schneider J. P. Controlled Biodegradation of Self-Assembling ß-hairpin Peptide Hydrogels by Proteolysis with Matrix Metalloproteinase-13. *Biomaterials.* 2011, *32*, 6471-6477. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.052

61. Jung J. P., Nagaraj A. K., Fox E. K., Rudra J. S., Devgun J. M., Collier J. H. Co-assembling peptides as defined matrices for endothelial cells. *Biomaterials*. 2009, *30*, 2400-2410. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.033

62. Altunbas A., Lee S. J., Rajasekaran S. A., Schneider J. P., Pochan D. J. Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. *Biomaterials*. 2011, *32*, 5906-5914. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.069

63. Pereira M. P., Kelley S. O. Maximizing the therapeutic window of an antimicrobial drug by imparting mitochondrial sequestration in human cells. *J Am Chem Soc*. 2011, *133*, 3260-3263. doi:10.1021/ja110246u

64. Wu M., Ye Z., Liu Y., Liu B., Zhao X. Release of hydrophobic anticancer drug from a newly designed self-assembling peptide. *Mol Biosyst*. 2011, *7*, 2040-2047. doi:10.1039/c0mb00271b

65. Fung S. Y., Yang H., Chen P. Sequence effect of self-assembling peptides on the complexation and in vitro delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine. *PLoS One*. 2008, *3*, e1956. doi:10.1371/journal.pone.0001956

66. Ellis-Behnke R. G., Liang Y. X., Tay D. K. C. *et al.* Nano hemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006, *2*, 207-215. doi:10.1016/j.nano.2006.08.001

67. Luo Z., Wang S., Zhang S. Fabrication of self-assembling D-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis. *Biomaterials*. 2011, *32*, 2013-2020. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.049

68. Lim Y. B., Park S., Lee E. *et al.* Glycoconjugate nanoribbons from the self-assembly of carbohydrate - Peptide block molecules for controllable bacterial cell cluster formation. *Biomacromolecules*. 2007, *8*, 1404-1408. doi:10.1021/bm0700901

69. Lim Y., Park S., Lee E. *et al.* Tunable bacterial agglutination and motility inhibition by self-assembled glyco-nanoribbons. *Chem - An Asian J*. 2007, *2*, 1363-1369. doi:10.1002/asia.200700163

70. Rudra J. S., Tian Y. F., Jung J. P., Collier J. H. A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proc Natl Acad Sci*. 2010, *107*, 622-627. doi:10.1073/pnas.0912124107

71. Salick D. A., Pochan D. J., Schneider J. P. Design of an injectable ß-hairpin peptide hydrogel that kills methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Adv Mater*. 2009, *21*, 4120-4123. doi:10.1002/adma.200900189

72. Easterhoff D., DiMaio J. T. M., Doran T. M., Dewhurst S., Nilsson B. L. Enhancement of HIV-1 infectivity by simple, self-assembling modular peptides. *Biophys J*. 2011, *100*, 1325-1334. doi:10.1016/j.bpj.2011.01.037

73. Chiti F., Dobson C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem*. 2006, *75*, 333-366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901

74. Selkoe D. J. Folding proteins in fatal ways. *Nature*. 2003, *426*, 900-904.

75. Cerf E., Gustot A., Goormaghtigh E., Ruysschaert J.-M., Raussens V. High ability of apolipoprotein E4 to stabilize amyloid-β peptide oligomers, the pathological entities responsible for Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2011, *25*, 1585-1595. doi:10.1096/fj.10-175976

76. Bokranz W., Wang X., Tschäpe H., Römling U. Expression of cellulose and curli fimbriae by Escherichia coli isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol*. 2005, *54*, 1171-1182. doi:10.1099/jmm.0.46064-0

77. Gophna U., Barlev M., Seijffers R., Oelschlager T. A., Hacker J., Ron E. Z. Curli Fibers Mediate Internalization of. *Infect Immun*. 2001, *69*, 2659-2665. doi:10.1128/IAI.69.4.2659

78. Fowler D. M., Koulov A. V., Alory-Jost C., Marks M. S., Balch W. E., Kelly J. W. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol*. 2006, *4*, 100-107. doi:10.1371/journal.pbio.0040006

79. Maji S. K., Perrin M. H., Sawaya M. R. *et al.* Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 2009, *325*, 328-332. doi:10.1126/science.1173155

80. Gerstenberg M. *Peptidnanofibrillen als Wirkstofftransportsystem für Doxorubicin und als Optimierung des Transports durch Silikananopartikel*, Masterarbeit, Universität Ulm, 2015.

81. Frankel A. D., Pabo C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988, *55*, 1189-1193. doi:10.1016/0092-8674(88)90263-2

82. Green M., Loewenstein P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 1988, *55*, 1179-1188. doi:10.1016/0092-8674(88)90262-0

83. Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, *88*, 1864-1868. doi:10.1073/pnas.88.5.1864

84. Green M., Ishino M., Loewenstein P. M. Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: Identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell*. 1989, *58*, 215-223. doi:10.1016/0092-8674(89)90417-0

85. Vivès E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 1997, *272*, 16010-16017. doi:10.1074/jbc.272.25.16010

86. Derossi D., Joliot A. H., Chassaing G., Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994, 269, 10444-10450.

87. Pooga M., Hällbrink M., Zorko M., Langel Ü. Cell penetration by transportan. *FASEB J*. 1998, *12*, 67-77.

88. Morris M. C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F., Divita G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1997, *25*, 2730-2736. doi:10.1093/nar/25.14.2730

89. Morris M. C., Depollier J., Heitz F., Divita G. A Peptide Carrier for the Delivery of Biologically Active Proteins into Mammalian Cells: Application to the Delivery of Antibodies and Therapeutic Proteins. *Nature Biol.* 2006, *4*, 13-18. doi:10.1016/B978-012164730-8/50187-8

90. Mitchell D. J., Steinman L., Kim D. T., Fathman C. G., Rothbard J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*. 2000, *56*, 318-325. doi:10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x

91. Futaki S., Suzuki T., Ohashi W. *et al.* Arginine-rich peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*. 2001, *276*, 5836-5840. doi:10.1074/jbc.M007540200

92. Oehlke J., Scheller A., Wiesner B. *et al.* Cellular uptake of an α-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta.* 1998, *1414*, 127-139. doi:10.1016/S0005-2736(98)00161-8

93. Delaroche D., Aussedat B., Aubry S., Chassaing G., Burlina F., Clodic G., Bolbach G., Lavielle S., Sagan S. Tracking a New Cell - Penetrating (W/R) Nonapeptide , through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag. *Anal Chem.* 2007, *79*, 1932-1938. doi:10.1021/ac061108l

94. Bechara C., Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett*. 2013, *587*, 1693-1702. doi:10.1016/j.febslet.2013.04.031

95. Lim Y. B., Kwon O. J., Lee E., Kim P. H., Yun C. O., Lee M. A cyclic RGD-coated peptide nanoribbon as a selective intracellular nanocarrier. *Org Biomol Chem*. 2008, *6*, 1944-1948. doi:10.1039/b802470g

96. Lim Y. B., Lee E., Lee M. Cell-penetrating-peptide-coated nanoribbons for intracellular nanocarriers. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007, *46*, 3475-3478. doi:10.1002/anie.200604576

97. Jung J. P., Jones J. L., Cronier S. A., Collier J. H. Modulating the mechanical properties of self-assembled peptide hydrogels via native chemical ligation. *Biomaterials*. 2008, *29*, 2143-2151. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.008

98. Jung J. P., Moyano J. V., Collier J. H. Multifactorial optimization of endothelial cell growth using modular synthetic extracellular matrices. *Integr Biol*. 2011, *3*, 185-196. doi:10.1039/c0ib00112k

99. Gras S. L., Tickler A. K., Squires A. M. *et al.* Functionalised amyloid fibrils for roles in cell adhesion. *Biomaterials*. 2008, *29*, 1553-1562. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.11.028

100. Kasai S., Ohga Y., Mochizuki M., Nishi N., Kadoya Y., Nomizu M. Multifunctional peptide fibrils for Biomedical Materials. *Peptide Science.* 2004, *76*, 27-33. doi.org/10.1002/bip.10565

101. Ouberai M. M., Dos Santos A. L. G., Kinna S. *et al.* Controlling the bioactivity of a peptide hormone in vivo by reversible self-assembly. *Nat Commun*. 2017, *8*. doi:10.1038/s41467-017-01114-1

102. Bouchard M., Zurdo J., Nettleton E. J., Dobson C. M., Robinson C. V. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci*. 2000, *9*, 1960-1967. doi:10.1110/ps.9.10.1960

103. Gao Y., Kuang Y., Guo Z. F., Guo Z., Krauss I. J., Xu B. Enzyme-instructed molecular self-assembly confers nanofibers and a supramolecular hydrogel of taxol derivative. *J Am Chem Soc*. 2009, *131*, 13576-13577. doi:10.1021/ja904411z

104. Wang H., Wei J., Yang C. *et al.* The inhibition of tumor growth and metastasis by self-assembled nanofibers of taxol. *Biomaterials*. 2012, *33*, 5848-5853. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.047

105. Pu G., Ren C., Li D., Wang L., Sun J. A supramolecular hydrogel for the delivery of bortezomib. *RSC Adv*. 2014, *4*, 50145-50147. doi:10.1039/c4ra08011d

106. Cheetham A. G., Ou Y. C., Zhang P., Cui H. Linker-determined drug release mechanism of free camptothecin from self-assembling drug amphiphiles. *Chem Commun*. 2014, *50*, 6039-6042. doi:10.1039/c3cc49453e

107. Lyu L., Liu F., Wang X. *et al.* Stimulus-Responsive Short Peptide Nanogels for Controlled Intracellular Drug Release and for Overcoming Tumor Resistance. *Chem - An Asian J*. 2017, *12*, 744-752. doi:10.1002/asia.201601704

108. Fung S. Y., Yang H., Sadatmousavi P. *et al.* Amino acid pairing for de novo design of self-assembling peptides and their drug delivery potential. *Adv Funct Mater*. 2011, *21*, 2456-2464. doi:10.1002/adfm.201002497

109. Lim Y. B., Lee E., Yoon Y. R., Lee M. S., Lee M. Filamentous artificial virus from a self-assembled discrete nanoribbon. *Angew Chemie - Int Ed*. 2008, *47*, 4525-4528. doi:10.1002/anie.200800266

110. Bolisetty S., Boddupalli C. S., Handschin S. *et al.* Amyloid Fibrils Enhance Transport of Metal Nanoparticles in Living Cells and Induced Cytotoxicity. *Biomacromolecules.* 2014, *15*, 2793-2799. doi:10.1021/bm500647n

111. Baumann B., Wittig R., Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in injectable hydrogels: Factors influencing cellular uptake and viability. *Nanoscale*. 2017, *9*, 12379-12390. doi:10.1039/c7nr02015e

112. Parida S. K., Dash S., Patel S., Mishra B. K. Adsorption of organic molecules on silica surface. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006, *121*, 77-110. doi:10.1016/j.cis.2006.05.028

113. Puddu V., Perry C. C. Peptide adsorption on silica nanoparticles: Evidence of hydrophobic interactions. *ACS Nano*. 2012, *6*, 6356-6363. doi:10.1021/nn301866q

114. Puddu V., Perry C. C. Interactions at the silica-peptide interface: The influence of particle size and surface functionality. *Langmuir*. 2014, *30*, 227-233. doi:10.1021/la403242f

115. Imai K., Shimizu K., Kamimura M., Honda H. Interaction between porous silica gel microcarriers and peptides for oral administration of functional peptides. *Sci Rep*. 2018, *8*, 1-10. doi:10.1038/s41598-018-29345-2

116. Patwardhan S. V., Emami F. S., Berry R. J. *et al.* Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption. *J Am Chem Soc*. 2012, *134*, 6244-6256. doi:10.1021/ja211307u

117. Sabia R., Ukrainczyk L. Surface chemistry of SiO2 and TiO2-SiO2 glasses as determined by titration of soot particles. *J Non Cryst Solids*. 2000, *277*, 1-9. doi:10.1016/S0022-3093(00)00237-4

118. Gary-Bobo M., Hocine O., Brevet D. *et al.* Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting , drug delivery and PDT. *Int J Pharm*. 2012, *423*, 509-515. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.11.045

119. Baptista L., Freitas D. O., De Melo L., De Sousa B. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for cancer-targeted , controlled drug delivery and imaging. *Micropporous and Mesoporous Materials*. 2017, *242,* 271-283. doi:10.1016/j.micromeso.2017.01.036

120. Mamaeva V., Rosenholm J. M., Bate-Eya L. T. *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Targeted Inhibition of Notch Signaling in Cancer. *Mol Ther*. 2011, *19*, 1538-1546. doi:10.1038/mt.2011.105

121. Halamova D., Zelenak V. NSAID naproxen in mesoporous matrix MCM-41 : drug uptake and release properties. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2012, *72*, 15-23. doi:10.1007/s10847-011-9990-x

122. Zhang J., Yuan Z., Wang Y. *et al.* Multifunctional Envelope-Type Mesoporous Silica Nanoparticles for Tumor-Triggered Targeting Drug Delivery. *J Am Chem Soc.* 2013, *135*, 5068-5073. doi:10.1021/ja312004m

123. Eddy D. R., Anggraeni A., Fauauzia R. P. *et al.* Gadolinium-mesoporous silica as a potential magnetic resonance imaging contrast agent. *Orient J Chem*. 2018, *34*, 2603-2607. doi:10.13005/ojc/340550

124. Taylor K. M. L., Kim J. S., Rieter W. J., An H., Lin W., Lin W. Mesoporous Silica Nanospheres as Highly Efficient MRI Contrast Agents, *J Am chem Soc*. 2008, *130*, 2154-2155. doi:10.1021/ja710193c

125. Zhang J., Niemelä M., Westermarck J., Rosenholm J. M. Mesoporous silica nanoparticles with redox-responsive surface linkers for charge-reversible loading and release of short oligonucleotides. *Dalt Trans*. 2014, *43*, 4115-4126. doi:10.1039/c3dt53071j

126. De Oliveira D. C. P., De Barros A. L. B., Belardi R. M., De Goes A. M., De Oliveira S. B. K., Soares D. C. F. Mesoporous silica nanoparticles as a potential vaccine adjuvant against Schistosoma mansoni. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2016, *35*, 234-240. doi:10.1016/j.jddst.2016.07.002

127. Liu Z., Ru J., Sun S., Teng Z., Dong H., Song P. Uniform dendrimer-like mesoporous silica nanoparticles as nano-adjuvant for foot-and-mouth disease virus-like particles vaccine. *J Mater Chem B.* 2019, *7*, 3446-3454. doi:10.1039/C8TB03315C

128. Soares F. D. C., Soares L. M., De Goes M. A. *et al.* Mesoporous SBA-16 silica nanoparticles as a potential vaccine adjuvant against Paracoccidioides brasiliensis. *Microporous Mesoporous Mater*. 2020, *291*, 109676. doi:10.1016/j.micromeso.2019.109676

129. Jafari S., Derakhshankhah H., Alaei L., Fattahi A., Varnamkhasti B. S., Saboury A. A. Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications. *Biomed Pharmacother*. 2019, *109*, 1100-1111. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.167

130. Şen Karaman D., Manner S., Rosenholm J. M. Mesoporous silica nanoparticles as diagnostic and therapeutic tools: How can they combat bacterial infection? *Ther Deliv*. 2018, *9*, 241-244. doi:10.4155/tde-2017-0111

131. Bai M., Dong H., Su X. *et al.* Hollow mesoporous silica nanoparticles as delivery vehicle of foot-and mouth disease virus-like particles induce persistent immune responses in guinea pigs. *J Med Virol*. 2019, *91*, 941-948. doi:10.1002/jmv.25417

132. Lohcharoenkal W., Wang L., Chen Y. C., Rojanasakul Y. Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2014, *2014*. doi:10.1155/2014/180549

133. Lammel A., Hu X., Park S. *et al.* Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* 2010, *31*, 4583-4591. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.024

134. Liong M., Lu J., Kovochich M. *et al.* Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009, *2*, 889-896. doi:10.1021/nn800072t

135. Rzigalinski B. A., Strobl J. S. Cadmium-Containing Nanoparticles: Perspectives on Pharmacology & Toxicology of Quantum Dots. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009, *238*, 280-288. doi:10.1038/jid.2014.371

136. Chertok B., Moffat B. A., David A. E. *et al.* Iron Oxide Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle for MRI Monitored Magnetic Targeting of Brain Tumors. *Biomaterials*. 2009, *29*, 487-496. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.050

137. Shi J., Zhang H., Wang L. *et al.* PEI-derivatized fullerene drug delivery using folate as a homing device targeting to tumor. *Biomaterials*. 2013, *34*, 251-261. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.039

138. Montellano A., Da Ros T., Bianco A., Prato M. Fullerene C60 as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*. 2011, *3*, 4035-4041. doi:10.1039/c1nr10783f

139. Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater*. 2013, *9*, 9243-9257. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.016

140. Goenka S., Sant V., Sant S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J Con Rel.* 2014, *173*, 75-88. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.017

141. Bazak R., Houri M., El Achy S. *et al.* Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016, *141*, 769-784. doi:10.1007/s00432-014-1767-3

142. Park I. Y., Kim I. Y., Yoo M. K., Choi Y. J., Cho M. H., Cho C. S. Mannosylated polyethylenimine coupled mesoporous silica nanoparticles for receptor-mediated gene delivery. *Int J Pharm*. 2008, *359*, 280-287. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.04.010

143. Brevet D., Gary-Bobo M., Raehm L. *et al.* Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem Commun*. 2009, 1475-1477. doi:10.1039/b900427k

144. Gary-Bobo M., Mir Y., Rouxel C. *et al.* Mannose-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient two-photon photodynamic therapy of solid tumors. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011, *50*, 11425-11429. doi:10.1002/anie.201104765

145. Sahu S., Sinha N., Bhutia S. K., Majhi M., Mohapatra S. Luminescent magnetic hollow mesoporous silica nanotheranostics for camptothecin delivery and multimodal imaging. *J Mater Chem B*. 2014, *2*, 3799-3808. doi:10.1039/c3tb21669a

146. Nakamura T., Sugihara F., Matsushita H., Yoshioka Y., Mizukami S., Kikuchi K. Mesoporous silica nanoparticles for 19F magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. *Chem Sci*. 2015, *6*, 1986-1990. doi:10.1039/c4sc03549f

147. Khosravian P., Ardestani M. S., Khoobi M. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *Onco Targets Ther*. 2016, *9*, 7315-7330. doi:10.2147/OTT.S113815

148. Xie X., Li F., Zhang H. *et al.* EpCAM aptamer-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient colon cancer cell-targeted drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2016, *83*, 28-35. doi:10.1016/j.ejps.2015.12.014

149. Tang Y., Hu H., Zhang M. G. *et al.* An aptamer-targeting photoresponsive drug delivery system using “off-on” graphene oxide wrapped mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale*. 2015, *7*, 6304-6310. doi:10.1039/c4nr07493a

150. Li Z. Y., Hu J. J., Xu Q. *et al.* A redox-responsive drug delivery system based on RGD containing peptide-capped mesoporous silica nanoparticles. *J Mater Chem B*. 2015, *3*, 39-44. doi:10.1039/c4tb01533a

151. Fang I. J., Slowing I. I., Wu K. C. W., Lin V. S. Y., Trewyn B. G. Ligand conformation dictates membrane and endosomal trafficking of arginine-glycine-aspartate (RGD)-functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Chem - A Eur J*. 2012, *18*, 7787-7792. doi:10.1002/chem.201200023

152. Wang Y., Shi W., Song W. *et al.* Tumor cell targeted delivery by specific peptide-modified mesoporous silica nanoparticles. *J Mater Chem*. 2012, *22*, 14608-14616. doi:10.1039/c2jm32398b

153. Pan L., He Q., Liu J., Chen Y., Zhang L., Shi J. Nuclear-Targeted Drug Delivery of TAT Peptide-Conjugated Monodisperse Mesoporous Silica Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2012, *134*, 5722-5725. doi:10.1021/ja211035w

154. Mandal T., Beck M., Kirsten N., Lindén M., Buske C. Targeting murine leukemic stem cells by antibody functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Sci Rep*. 2018, *8*, 2-9. doi:10.1038/s41598-017-18932-4

155. Tsai C. P., Chen C. Y., Hung Y., Chang F. H., Mou C. Y. Monoclonal antibody-functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN) for selective targeting breast cancer cells. *J Mater Chem*. 2009, *19*, 5737-5743. doi:10.1039/b905158a

156. He Q., Zhang Z., Gao F., Li Y., Shi J. *In vivo* biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: Effects of particle size and PEGylation. *Small*. 2011, *7*, 271-280. doi:10.1002/smll.201001459

157. Chen M., He X., Shi B., Wang K., Chen S., Zhou B. *In vivo* study of biodistribution and urinary excretion of silica nanoparticles with different size . *Anal Chem.* 2008, *80*, 9597-9603. doi:10.1021/ac801882g

158. Schubert U., Hüsing N., *Synthesis of Inorganic Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

159. Brinker C. J., Scherer G. W., *Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Inc., San Diego, 1990.

160. Klein L., Aparicio M., Jitianu A., *Handbook of Science and Technology - Prrocessing, Characterization and Applications*, Springer International Publishing AG (Springer Nature), Cham, 2005.

161. Kresge C. T., Leonowicz M. E., Roth W. J., Vartuli J. C., Beck J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992, *359*, 710-712.

162. Zhao D., Huo Q., Feng J., Chmelka B. F., Stucky G. D. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric sufactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc*. 1998, *120*, 6024-6036. doi:10.1021/ja974025i

163. Wilson W. B., England T. R., LaBauve R. J., Mitchell J. A. Calculated radionuclide inventories of high-exposure LWR fuels. *Nucl Saf*. 1988, *29*, 177-193. doi:10.1021/ja00053a020

164. Monnier A., Schüth F., Huo Q. *et al.* Cooperative formation of inorganic-organic interfaces in the synthesis of silicate mesostructures. *Science.* 1993, *261*, 1299-1303. doi:10.1126/science.261.5126.1299

165. Huo Q., Margolese D. I., Ciesla U. *et al.* Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase Arrays. *Chem Mater*. 1994, *6*, 1176-1191. doi:10.1021/cm00044a016

166. Huo Q., Margolese D. I., Ciesla U. *et al.* Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials. *Nature*. 1994, *368*, 317-321. doi:10.1038/368317a0

167. Hoffmann F., Cornelius M., Morell J., Fröba M. Mesoporöse organisch-anorganische Hybridmaterialien auf Silicabasis. *Angew Chemie*. 2006, *118*, 3290-3328. doi:10.1002/ange.200503075

168. Hatton B., Landskron K., Whitnall W., Perovic D., Ozin G. A. Past, present, and future of periodic mesoporous organosilicas - The PMOs. *Acc Chem Res*. 2005, *38*, 305-312. doi:10.1021/ar040164a

169. Tanaka Y., Sawamura N., Iwamoto M. Highly effective acetalization of aldehydes and ketones with methanol on siliceous mesoporous material. *Tetrahedron Lett*. 1998, *39*, 9457-9460. doi:10.1016/S0040-4039(98)02144-3

170. Zhu K., Hu J., Richards R. Aerobic oxidation of cyclohexane by gold nanoparticles immobilized upon mesoporous silica. *Catal Letters*. 2005, *100*, 195-199. doi:10.1007/s10562-004-3454-5

171. Gallis K. W., Eklund A. G., Jull S. T., Araujo J. T., Moore J. G., Landry C. C. The use of mesoporous silica in liquid chromatography. *Stud Surf Sci Catal*. 2000, *129*, 747-755. doi:10.1016/S0167-2991(00)80279-7

172. Shen J., He Q., Gao Y., Shi J. Li Y. Mesoporous silica nanoparticles loading doxorubicin reverse multidrug resistance: performance and mechanism. *Nanoscale.* 2011, 3, 4314-4322. doi:10.1039/c1nr10580a

173. Slowing I. I., Vivero-Escoto J. L., Wu C. W., Lin V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008, *60*, 1278-1288. doi:10.1016/j.addr.2008.03.012

174. Tang Q., Xu Y., Wu D., Sun Y. A study of carboxylic-modified mesoporous silica in controlled delivery for drug famotidine. *J Solid State Chem*. 2006, *179*, 1513-1520. doi:10.1016/j.jssc.2006.02.004

175. Lim M. H., Blanford C. F., Stein A. Synthesis of Ordered Microporous Silicates with Organosulfur Surface Groups and Their Applications as Solid Acid Catalysts. *Chem Mater*. 1998, *10*, 467-470. doi:10.1021/cm970713p

176. Méndez J., Monteagudo A., Griebenow K. Stimulus-responsive controlled release system by covalent immobilization of an enzyme into mesoporous silica nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2012, *23*, 698-704. doi:10.1021/bc200301a

177. Burleigh M. C., Markowitz M. A., Spector M. S., Gaber B. P. Direct synthesis of periodic mesoporous organosilicas: Functional incorporation by co-condensation with organosilanes. *J Phys Chem B*. 2001, *105*, 9935-9942. doi:10.1021/jp011814k

178. Lim M. H., Stein A. Comparative studies of grafting and direct syntheses of inorganic-organic hybrid mesoporous materials. *Chem Mater*. 1999, *11*, 3285-3295. doi:10.1021/cm990369r

179. Huh S., Wiench J. W., Yoo J. C., Pruski M., Lin V. S. Y. Organic Functionalization and Morphology Control of Mesoporous Silicas via a Co-Condensation Synthesis Method. *Chem Mater*. 2003, *15*, 4247-4256. doi:10.1021/cm0210041

180. Hartono S. B., Qiao S. Z., Jack K., Ladewig B. P., Hao Z., Lu G.Q. Improving adsorbent properties of cage-like ordered amine functionalized mesoporous silica with very large pores for bioadsorption. *Langmuir*. 2009, *25*, 6413-6424. doi:10.1021/la900023p

181. Okamoto G., Okura T., Goto K. Properties of silica in water. *Geochim Cosmochim Acta*. 1957, *12*, 123-132. doi:10.1016/0016-7037(57)90023-6

182. Jou F. Y., Carroll J. J., Mather A. E., Otto F. D. The Solubility of Nitrous Oxide in Water at High Temperatures and Pressures. *Zeitschrift fur Phys Chemie*. 1992, *177*, 225-239. doi:10.1524/zpch.1992.177.Part_2.225

183. Marshall W. L. Amorphous silica solubilities-III. Activity coefficient relations and predictions of solubility behavior in salt solutions, 0-350°C. *Geochim Cosmochim Acta*. 1980, *44*, 925-931. doi:10.1016/0016-7037(80)90282-3

184. Alexander B. G. B., Heston W. M. The Solubility of Amorphous Silica in Water. *J Phys Chem.* 1954, *58*, 453-455. doi:10.1021/j150516a002

185. Millero F. J. The effect of pressure on the solubility of calcite in seawater at 25°C. *Geochim Cosmochim Acta*. 1976, *40*, 983-985. doi:10.1016/0016-7037(76)90147-2

186. Choi Y., Lee J. E., Lee J. H., Jeong J. H., Kim J. A Biodegradation Study of SBA-15 Microparticles in Simulated Body Fluid and *in Vivo*. *Langmuir.* 2015, *31*, 6457-6462. doi:10.1021/acs.langmuir.5b01316

187. Marshall W. L., Warakomski J. M. Effect of aqueous salt solutions at 25°C. *Geochim Cosmochim Acta*. 1980, *44*, 915-924.

188. Vogelsberger W., Löbbus M., Sonnefeld J., Seidel A. The Influence of ionic strength on the dissolution process of silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects.* 1999, *159*, 311-319.

189. Vogelsberger W., Schmidt J., Roelofs F. Dissolution kinetics of oxidic nanoparticles: The observation of an unusual behaviour. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2008, *324*, 51-57. doi:10.1016/j.colsurfa.2008.03.032

190. Xiao Y., Lasaga A. C. *Ab initio* quantum mechanical studies of the kinetics and mechanisms of quartz dissolution: OH - catalysis. *Geochim Cosmochim Acta.* 1996, *60*, 2283-2295.

191. Dove P. M., Han N., Wallace A. F., De Yoreo J. J. Kinetics of amorphous silica dissolution and the paradox of the silica polymorphs. *Proc Natl Acad Sci*. 2008, *105*, 9903-9908. doi:10.1073/pnas.0803798105

192. Braun K., Pochert A., Beck M., Fiedler R., Gruber J., Lindén M. Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2016, *79*, 319-327. doi:10.1007/s10971-016-4053-9

193. He Q., Shi J., Zhu M., Chen Y., Chen F. The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid. *Microporous Mesoporous Mater.* 2010, *131*, 314-320. doi:10.1016/j.micromeso.2010.01.009

194. Cauda V., Schlossbauer A., Bein T. Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol). *Microporous Mesoporous Mater.* 2010, *132*, 60-71. doi:10.1016/j.micromeso.2009.11.015

195. Gouze B., Cambedouzou J., Parrès-Maynadié S., Rébiscoul D. How hexagonal mesoporous silica evolves in water on short and long term: Role of pore size and silica wall porosity. *Microporous Mesoporous Mater*. 2014, *183*, 168-176. doi:10.1016/j.micromeso.2013.08.041

196. Colilla M., Manzano M. *In vitro* stability of SBA-15 under physiological conditions. *Microporous Mesoporous Mater*. 2010, *132*, 442-452. doi:10.1016/j.micromeso.2010.03.025

197. Rosenholm J. M., Mamaeva V., Sahlgren C., Lindén M. Nanoparticles in targeted cancer therapy: Mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage. *Nanomedicine*. 2012, *7*, 111-120. doi:10.2217/nnm.11.166

198. Hsiao I., Gramatke A. M., Joksimovic R., Sokolowski M., Gradzielski M., Haase A. Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles. *J Nanomed Nanotechnol*. 2014, *5*, 1000248 doi:10.4172/2157-7439.1000248

199. Kim I. Y., Joachim E., Choi H., Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *J Nanomed Nanotechnol, Biol Med*. 2015, *11*, 1407-1416. doi:10.1016/j.nano.2015.03.004

200. Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol Vitr*. 2009, *23*, 808-815. doi:10.1016/j.tiv.2009.04.009

201. Kipen H. M., Laskin D. L. Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2005, *289*, L696-L697. doi:10.1152/ajplung.00277.2005

202. Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science.* 2015, *311*, 622-628. doi:10.1126/science.1114397

203. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005, *113*, 823-839. doi:10.1289/ehp.7339

204. Chung T. H., Wu S. H., Yao M. *et al.* The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007, *28*, 2959-2966. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.006

205. Kurtz-Chalot A., Klein J. P., Pourchez J. *et al.* Adsorption at cell surface and cellular uptake of silica nanoparticles with different surface chemical functionalizations: impact on cytotoxicity. *J Nanoparticle Res*. 2014, *16*, 2738. doi:10.1007/s11051-014-2738-y

206. Hudson S. P., Padera R. F., Langer R., Kohane D. S. The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials*. 2008, *29*, 4045-4055. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.007

207. Kettiger H., Karaman D. S., Schiesser L., Rosenholm J. M., Huwyler J. Comparative safety evaluation of silica-based particles. *Toxicol Vitr*. 2015, *30*, 355-363. doi:10.1016/j.tiv.2015.09.030

208. Lin Y., Haynes C. L. Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity. *J Am Chem Soc.* 2010, *132*, 4834-4842. doi:10.1021/ja910846q

209. Zhao Y., Sun X., Zhang G., Trewyn B. G., Slowing I. I., Lin V. S. Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects. *ACS Nano* 2011, *5*, 1366-1375. doi:10.1021/nn103077k

210. Slowing I. I., Wu C., Vivero-Escoto J. L., Lin V. S. Mesoporous Silica Nanoparticles for Reducing Hemolytic Activity Towards Mammalian Red Blood Cells. *Small.* 2009, *5*, 57-62. doi:10.1002/smll.200800926

211. Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A. R., Balakrishnan J., Heine D. R., Minko S. Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane. *Nano Lett.* 2008, *8*, 941-944. doi:10.1021/nl080080l

212. Lipowsky R., Döbereiner H.-G., Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhys Lett.* 1998, *43*, 219-225.

213. Kremer K., Deserno M., Reynwar B. J., Illya G., Harmandaris V. A., Mu M. M. Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature.* 2007, *447*, 461-464. doi:10.1038/nature05840

214. Paula A. J., Filho A. G. S., Alves O. L. Suppression of the Hemolytic Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles after Protein Corona Interaction: Independence of the Surface Microchemical Environment. *J Braz Chem Soc.* 2012, *23*, 1807-1814.

215. Park J., Gu L., Von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S. N., Sailor M. J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for *in vivo* applications. *Nat Mater*. 2009, *8*, 331-336. doi:10.1038/nmat2398

216. Fleischer C. C., Payne C. K. Secondary Structure of Corona Proteins Determines the Cell Surface Receptors Used by Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 2014, *118*, 14017-14026. doi:10.1021/jp502624n

217. Ritz S., Scho S., Kotman N. *et al.* Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake. *Biomacromolecules.* 2015, *16*, 1311-1321. doi:10.1021/acs.biomac.5b00108

218. "https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/serumproteine/61230 (zuletzt abgerufen am 29.10.2019)"

219. Cedervall T., Lynch I., Lindman S. *et al.* Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *PNAS.* 2007, *104*, 2050-2055. doi:10.1073/pnas.0608582104

220. Cedervall T., Lynch I., Foy M. *et al.* Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007, *46*, 5754-5756. doi:10.1002/anie.200700465

221. Vroman L., Adams A. L. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surf Sci*. 1969, *16*, 438-446. doi:10.1016/0039-6028(69)90037-5

222. Çukurovali A., Yilmaz I., Özmen H. Antimicrobial activity studies of the metal complexes derived from substituted cyclobutane substituted thiazole Schiff base ligands. *Transit Met Chem*. 2001, *26*, 619-624. doi:10.1023/A:1012006404144

223. Beck M., Mandal T., Buske C., Lindén M. Serum Protein Adsorption Enhances Active Leukemia Stem Cell Targeting of Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017, *9*, 18566-18574. doi:10.1021/acsami.7b04742

224. Shahabi S., Treccani L., Dringen R., Rezwan K. Modulation of Silica Nanoparticle Uptake into Human Osteoblast Cells by Variation of the Ratio of Amino and Sulfonate Surface Groups : Effects of Serum. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015, *7*, 13821-13833. doi:10.1021/acsami.5b01900

225. Salvati A., Pitek A. S., Monopoli M. P. *et al.* Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol*. 2013, *8*, 137-143. doi:10.1038/nnano.2012.237

226. Schöttler S., Becker G., Winzen S. *et al.* Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol*. 2016, *11*, 372-377. doi:10.1038/nnano.2015.330

227. Lemarchand C., Gref R., Couvreur P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004, *58*, 327-341. doi:10.1016/j.ejpb.2004.02.016

228. Villemson A., Couvreur P., Gillet B., Larionova N., Gref R. Dextran-poly-ε-caprolactone micro- and nanoparticles: Preparation, characterization and tamoxifen solubilization. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2006, *16*, 307-313. doi:10.1016/S1773-2247(06)50055-3

229. Yildirim A., Ozgur E., Bayindir M. Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption. *J Mater Chem B*. 2013, *1*, 1909-1920. doi:10.1039/c3tb20139b

230. García K. P., Zarschler K., Barbaro L. *et al.* Zwitterionic-coated "stealth" nanoparticles for biomedical applications: Recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. *Small*. 2014, *10*, 2516-2529. doi:10.1002/smll.201303540

231. Jiang S., Cao Z. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Adv Mater*. 2010, *22*, 920-932. doi:10.1002/adma.200901407

232. Chen S., Li L., Zhao C., Zheng J. Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer (Guildf)*. 2010, *51*, 5283-5293. doi:10.1016/j.polymer.2010.08.022

233. Conner S. D., Schmid S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003, *422*, 37-44. doi:10.1038/nature01451

234. Yuan H., Li J., Bao G., Zhang S. Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake. *Phys Rev Lett*. 2010, *105*, 138101. doi:10.1103/PhysRevLett.105.138101

235. Gao H., Shi W., Freund L. B. From The Cover: Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2005, *102*, 9469-9474. doi:10.1073/pnas.0503879102

236. Vedantam P., Huang G., Tzeng T. R. J. Size-dependent cellular toxicity and uptake of commercial colloidal gold nanoparticles in DU-145 cells. *Cancer Nanotechnol*. 2013, *4*, 13-20. doi:10.1007/s12645-013-0033-8

237. Vivero-Escoto J. L., Slowing I. I., Lin V. S. Y. Tuning the cellular uptake and cytotoxicity properties of oligonucleotide intercalator-functionalized mesoporous silica nanoparticles with human cervical cancer cells HeLa. *Biomaterials*. 2010, *31*, 1325-1333. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.009

238. Lu F., Wu S. H., Hung Y., Mou C. Y. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*. 2009, *5*, 1408-1413. doi:10.1002/smll.200900005

239. Zhang Y., Hu L., Yu D., Gao C. Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts. *Biomaterials*. 2010, *31*, 8465-8474. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.060

240. Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006, *6*, 662-668. doi:10.1021/nl052396o

241. Huang J., Bu L., Xie J. *et al.* Effects of Nanoparticle Size on Cellular Uptake and Liver MRI with Polyvinylpyrrolidone-Coated Iton Oxide Nanoparticles. *ACS Nano*. 2010, *4*, 7151-7160.

242. Varela J. A., Mariana G. Bexiga C. A., Simpson J. C., Dawson K. A. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 1996, *5*, 267-267. doi:10.1002/pds.2630050402

243. Mornet S., Lambert O., Duguet E., Brisson A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett*. 2005, *5*, 281-285. doi:10.1021/nl048153y

244. Slowing I. I., Trewyn B. G., Lin V. S. Y. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2006, *128*, 14792-14793. doi:10.1021/ja0645943

245. Shahabi S., Treccani L., Dringen R., Rezwan K. Modulation of Silica Nanoparticle Uptake into Human Osteoblast Cells by Variation of the Ratio of Amino and Sulfonate Surface Groups: Effects of Serum. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015, *7*, 13821-13833. doi:10.1021/acsami.5b01900

246. Kralj S., Rojnik M., Romih R., Jagodic M., Kos J., Makovec D. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *J Nanopart Res.* 2012, *14*, 1151. doi:10.1007/s11051-012-1151-7

247. Maeda H., Matsumura Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986, *46*, 6387-6392. doi:10.1021/bc100070g

248. Li Y., Zhang Y., Wang L. *et al.* Autophagy impairment mediated by S-nitrosation of ATG4B leads to neurotoxicity in response to hyperglycemia. *Autophagy*. 2017, *13*, 1145-1160. doi:10.1080/15548627.2017.1320467

249. Hobbs S. K., Monsky W. L., Yuan F. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, *95*, 4607-4612.

250. Arruebo M., Valladares M., González-Fernández Á. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Nanomater*. 2009, *2009*, 1-24. doi:10.1155/2009/439389

251. Sudimack J., Lee R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000, *41*, 147-162. doi:10.1016/S0169-409X(99)00062-9

252. Shaw R. J. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2006, *18*, 598-608. doi:10.1016/j.ceb.2006.10.005

253. Locasale J. W., Cantley L. C. Altered metabolism in cancer. *BMC Biology.* 2010, *8*, 88.

254. Lipinski C. Poor aqueous solubility - An industry wide problem in drug discovery. *Am Pharm Rev*. 2002, *5*, 82-85.

255. Zhang Y., Wang J., Bai X., Jiang T., Zhang Q., Wang S. Mesoporous Silica Nanoparticles for Increasing the Oral Bioavailability and Permeation of Poorly Water Soluble Drugs. *Mol Pharmaceutics.* 2012, *93*, 505-513. doi:10.1021/mp200287c

256. Davis M. E., Chen Z. G., Shin D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008, *7*, 771-782. doi:10.1038/nrd2614

257. He Q., Shi J. MSN Anti-Cancer Nanomedicines: Chemotherapy Enhancement , Overcoming of Drug Resistance, and Metastasis Inhibition. *Adv Mater.* 2013, *26*, 391-411. doi:10.1002/adma.201303123

258. Wan M. M., Li Y. Y., Yang T., Zhang T., Sun X. D., Zhu J. H. *In Situ* Loading of Drugs into Mesoporous Silica SBA-15. *Chem - A Eur J*. 2016, *22*, 6294-6301. doi:10.1002/chem.201504532

259. Zhang J., Postovit L. M., Wang D. *et al. In situ* loading of basic fibroblast growth factor within porous silica nanoparticles for a prolonged release. *Nanoscale Res Lett*. 2009, *4*, 1297-1302. doi:10.1007/s11671-009-9395-6

260. Cheng K., Landry C. C. Diffusion-based deprotection in mesoporous materials: A strategy for differential functionalization of porous silica particles. *J Am Chem Soc*. 2007, *129*, 9674-9685. doi:10.1021/ja070598b

261. Ng J. B. S., Kamali-Zare P., Brismar H., Bergström L. Release and molecular transport of cationic and anionic fluorescent molecules in mesoporous silica spheres. *Langmuir*. 2008, *24*, 11096-11102. doi:10.1021/la801179v

262. Giménez C., De La Torre C., Gorbe M. *et al.* Gated mesoporous silica nanoparticles for the controlled delivery of drugs in cancer cells. *Langmuir*. 2015, *31*, 3753-3762. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00139

263. Tenland E., Pochert A., Krishnan N. *et al.* Effective delivery of the anti-mycobacterial peptide NZX in mesoporous silica nanoparticles. *PLoS One*. 2019, *14*, 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0212858

264. Cheng K., El-Boubbou K., Landry C. C. Binding of HIV-1 gp120 glycoprotein to silica nanoparticles modified with CD4 glycoprotein and CD4 peptide fragments. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012, *4*, 235-243. doi:10.1021/am2013008

265. Du Z., Yu D., Du X., Scott P., Ren J., Qu X. Self-triggered click reaction in an Alzheimer's disease model: *in situ* bifunctional drug synthesis catalyzed by neurotoxic copper accumulated in amyloid-β plaques . *Chem Sci*. 2019, Advanced Article. doi:10.1039/c9sc04387j

266. Slowing I. I., Vivero-Escoto J. L., Wu C. W., Lin V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008, *60*, 1278-1288. doi:10.1016/j.addr.2008.03.012

267. Tamba B. I., Dondas A., Leon M. *et al.* Silica nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro*/*in vivo* biodistribution studies. *Eur J Pharm Sci*. 2015, *71*, 46-55. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.002

268. He Q., Zhang Z., Gao F., Li Y., Shi J. *In vivo* biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: Effects of particle size and PEGylation. *Small*. 2011, *7*, 271-280. doi:10.1002/smll.201001459

269. Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 1984, *309*,30-33.

270. Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984, *81*, 5985-5988. doi:10.1073/pnas.81.19.5985

271. Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Parks W. P. *In Vitro* Cultivation of Human Tumorsfile: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *J Nat Cancer Inst.* 1973, *51*, 1417-1423.

272. Hongmei J., Zhen Z., Zhiming L., Xinling W. Effects of temperature and solvent on the hydrolysis of alkoxysilane under alkaline conditions. *Ind Eng Chem Res*. 2006, *45*, 8617-8622. doi:10.1021/ie0607550

273. Liberman A., Mendez N., Trogler W. C., Kummel A. C. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surf Sci Rep.* 2014, *69*, 132-158. doi:10.1016/j.surfrep.2014.07.001

274. Schüth F. Endo- und Exotemplate zur Erzeugung von anorganischen Materialien mit großer spezifischer Oberfläche. *Angew Chemie*. 2003, *115*, 3730-3750. doi:10.1002/ange.200300593

275. Behrens P. Löcher in chemisch variabler Umgebung: mesoporöse Metalloxide. *Angew Chemie*. 1996, *108*, 561-564. doi:10.1002/ange.19961080507

276. Friedmann M., Williams L. D. Stoichiometry of Formation of Ruhemann's Purple in the Ninhydrin Reaction. *Bioorg Chem.* 1974, *3*, 267-280.

277. Kruk M., Hui C. M. Thermally induced transition between open and closed spherical pores in ordered mesoporous silicas. *J Am Chem Soc*. 2008, *130*, 1528-1529. doi:10.1021/ja0749035

278. Sing K. S. W., Everett D. H., Haul R. A. W., Moscou L., Pierotti R. A., Rouquérol J., Siemieniewska T. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity, *Pure & Appl Chem.* 1985, 57, 603-619. doi:10.1351/pac198557040603

279. Sing K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2001, *187-188*, 3-9. doi:10.1016/S0927-7757(01)00612-4

280. Beck J. S., Vartuli J. C., Roth W. J. *et al.* A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *J Am Chem Soc*. 1992, *114*, 10834-10843.

281. Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc*. 1938, *60*, 309-319. doi:10.1021/ja01269a023

282. Lafremie R. M., Gallo S., Podor T. J., Buchanan M. R., Orr F. W. The Relative Roles of Vitronectin Receptor, E-selectim and $\alpha_4ß_1$ in Cancer Cell Adhesion to Interleukin-l-treated Endothelial Cells. *European J Cancer.* 1994, *30*, 2151-2158. doi:10.1016/0959-8049(94)00354-8

283. Tanford C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley-Interscience, New York, 1980.

284. LeVine H. Thioflavine T interacts with amyloid ß-sheet structures. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest.* 2009, *2*, 1-6. doi:10.3109/13506129509031881

285. Nyrkova I. A., Semenov A. N., Aggeli A., Boden N. Fibril stability in solutions of twisted β-sheet peptides: A new kind of micellization in chiral systems. *Eur Phys J B*. 2000, *17*, 481-497. doi:10.1007/s100510070127

286. Aggeli A., Nyrkova I. A., Bell M. *et al.* Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide ß-sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Appl Phys Sci.* 2001, *98*, 11857-11862.

287. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruysschaert J.-M., *Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy - III . Secondary Structures,* In: Hilderson H.J., Ralston G.B. (eds) Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes, Subcellular Biochemistry, vol 23, Springer, Boston, 1994.

288. Ruoslahti E., Pasqualini R. (1999), U. S. Patent No. 5,955,572.

289. Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto Jr. G. J., Stryer L., *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, Heidelberg, 2017.

290. Wojtowicz W. M., Farzan M., Joyal J. L. *et al.* Stimulation of enveloped virus infection by β-amyloid fibrils. *J Biol Chem*. 2002, *277*, 35019-35024. doi:10.1074/jbc.M203518200

291. Collins S. R., Douglass A., Vale R. D., Weissman J. S. Mechanism of Prion Propagation: Amyloid Growth Occurs by Monomer Addition. *PLoS Biology.* 2004, *2*, 1582-1590. doi:10.1371/journal.pbio.0020321

292. Barbo B. C., Bartlett J., Kong L. *et al.* Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System. *Adv Mater.* 2004, *16*, 1959-1966. doi:10.1002/adma.200400771

293. Milea C. A., Bogatu C., Duta A. The Influence of Parameters in Silica Sol-Gel Process. *Bulletin of the TransilvaniaUniversity of Brasov.* 2011, *4*, 59-66.

294. Hao N., Liu H., Li L., Chen D., Li L., Tang F. *In Vitro* Degradation Behavior of Silica Nanoparticles Under Physiological Conditions. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012, *12*, 6346-6354. doi:10.1166/jnn.2012.6199

295. Paper R., Huang X., Young N. P., Townley H. E. Characterization and Comparison of Mesoporous Silica Particles for Optimized Drug Delivery. *Nanomater Nanotecnol.* 2014, *4*, 1-15. doi:10.5772/58290

296. Lucas S., Tognonvi M. T., Gelet J., Soro J., Rossignol S. Interactions between silica sand and sodium silicate solution during consolidation process. *J Non-Cryst Solids.* 2011, *357*, 1310-1318. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2010.12.016

297. Mortensen N. P., Hurst G. B., Wang W., Foster C. M., Nallathamby P. D., Retterer S. T. Dynamic development of the protein corona on silicananoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale.* 2013, *5*, 6372-6380. doi:10.1039/c3nr33280b

298. Kang D., Gho Y. S., Suh M., Kang C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*. 2002, *23*, 1509-1510. doi:10.5012/bkcs.2002.23.11.1509

299. "https://www.uniprot.org/uniprot/ (zuletzt abgerufen am 29.10.2019)"

300. Marrack J. R., Hoch H. Serum Proteins: A Review. *J Clin Path.* 1949, *2*, 161-192.

301. Andrade J. D., Hlady V. Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses. *Adv Polymer Sci.* 1986, *79*, 1-63. doi:10.1007/3-540-16422-7

302. Braun K., Stürzel C. M., Biskupek J., Kaiser U., Kirchhoff F., Lindén M. Comparison of different cytotoxicity assays for in vitro evaluation of mesoporous silica nanoparticles. *Toxicol in Vitro* 2018, *52*, 214-221. doi:10.1016/j.tiv.2018.06.019

303. Plow E. F., Haas T. A., Zhang L., Loftus J., Smith J. W. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*. 2000, *275*, 21785-21788. doi:10.1074/jbc.R000003200

304. Hatley R. J. D., Macdonald S. J. F., Slack R. J., Le J., Ludbrook S. B., Lukey P. T. Ein Instrumentarium von αv-RGD-Integrin-Inhibitoren: Wirkstoffsuche, Herausforderungen und Möglichkeiten. *Angew Chem.* 2018, *130*, 3354-3379. doi:10.1002/ange.201707948

305. Hautanen A., Gailit J., Mann D. M., Ruoslahti E. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J Biol Chem*. 1989, *264*, 1437-1442.

306. Wilhelm M., Mukherjee A., Bouvier B., Zakrzewska K., Hynes J. T., Lavery R. Multistep Drug Intercalation: Molecular Dynamics and Free Energy Studies of the Binding of Daunomycin to DNA. *J Am Chem Soc.* 2012, *134*, 8588-8596. doi:10.1021/ja301649k

307. Wang Y., Sun Y., Wang J. *et al.* Charge-Reversal APTES-Modi fi ed Mesoporous Silica Nanoparticles with High Drug Loading and Release Controllability. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016, *8*, 17166-17175. doi:10.1021/acsami.6b05370

308. Yu S.-C., Guijun H., Guisheng Q., Yuying L., Guoming W., Ruiling G. Efficacy of Chemotherapeutic Agents Under Hypoxic Conditions in Pulmonary Adenocarcinoma Multidrug Resistant Cell Line. *J Chemotherapy* 2007, *19*, 34-42. doi:10.1179/joc.2007.19.2.203

309. Cheng Y., Luo G., Zhu J. *et al.* Enzyme-Induced and Tumor-Targeted Drug Delivery System Based on Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015, *7*, 9078-9087. doi:10.1021/acsami.5b00752

310. Shahabi S., Do S., Bollhorst T. *et al.* Enhancing Cellular Uptake and Doxorubicin Delivery of Mesoporous Silica Nanoparticles via Surface Functionalization: Effects of Serum. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015, *7*, 26880-26891. doi:10.1021/acsami.5b09483

311. Clemments A. M., Botella P., Landry C. C. Analysis as a Function of Particle Diameter and Porosity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015, *7*, 21682-21689. doi:10.1021/acsami.5b07631

312. Fiesinger F. *Influence of a PEG functionalization on silica nanoparticles on the transport properties with the help of nanofibrils*, Masterarbeit, Universität Ulm, 2017.

313. Olivier J. P. Modeling physical adsorption on porous and nonporous solids using density functional theory. *J Porous Mater*. 1995, *2*, 9-17. doi:10.1007/BF00486565

314. Rosenholm J. M., Meinander A., Peuhu E. *et al.* Targeting of porous hybrid silica nanoparticles to cancer cells. *ACS Nano*. 2009, *3*, 197-206. doi:10.1021/nn800781r

315. Wu Y., Shih E. K., Ramanathan A., Vasudevan S., Weil T. Nano-sized albumin-copolymer micelles for efficient doxorubicin delivery. *Biointerphases*. 2012, *7*. doi:10.1007/s13758-011-0005-7

VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der häufig angewendeten Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat (HBTU) sowie Diisopropylethylamin (DiPEA) als Aktivierungsreagenzien und 95%-iger Trifluoressigsäure (TFA) mit 2,5% Triisopropylsilan (TiPS) zur Abspaltung. 4

Abbildung 2: (A) Schematische Darstellung des Aufbaus einer ß-Faltblatt-Doppelhelix, aufgebaut aus amphipatischen Peptiden (blau: hydrophobe Seitenketten, rot: hydrophile Seitenketten) (Verändert mit freundlicher Genehmigung von D. M. Marini, W. Hwang, D. A. Lauffenburger, S. Zhang and R. D. Kamm, *„Left-Handed Helical Ribbon Intermediates in the Self-Assembly of a ß-Sheet Peptide" Nano Letters* 2002, *2*, 295-299. Copyright (2002) American Chemical Society). (B) Zusammenlagerung mehrerer Protofilamente zu Fibrillen (Verändert aus M. F. Perutz, J. T. Finch, J. Berriman and A. Lesk, *Amyloid fibers are water-filled nanotubes* 2002, *99*, 5591-5595. Copyright (2002) National Academy of Sciences, U.S.A.). 5

Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten Wirkstoffe an Peptidnanofibrillen anzubinden bzw. einzulagern. Die Kombination von PNF und MSN ist hierbei noch ein theoretisches System, welches erst in dieser Arbeit auf seine Eignung als Wirkstofftransportsystem untersucht werden soll. 12

Abbildung 4: Treibende Kräfte für die Adsorption unterschiedlich geladener Peptide an eine Silikaoberfläche in Abhängigkeit vom pH. 15

Abbildung 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Funktionalisierungs- und Beladungsmöglichkeiten von mesoporösen Silikapartikeln. 17

Abbildung 6: Änderung der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolyse und der Kondensation von Silikaspezies in Abhängigkeit vom pH-Wert (Verändert aus D. Schaefer *„Polymers Fractals, and Ceramic Materials" Science* 1989, *234*, 1023-1027 mit freundlicher Genehmigung der AAAS & D. Schaefer). 21

Abbildung 7: (A) Thermodynamische Beschreibung der Bildung freier Kieselsäure aus einem Dimer über eine fünffach koordinierte Silikaspezies. Die Reaktion läuft über die Ausbildung zweier Übergangszustände ab, wovon der erste Übergangszustand als bestimmender Schritt für die Löslichkeitsrate aufgrund der erhöhten Aktivierungsenergie anzusehen ist (verändert aus [189]). (B)

Kinetische Beschreibung der Ablösung von energieärmeren Q^3-Spezies aus der Q^3-reichen Oberfläche, gefolgt von der Entstehung neuer Q^2-Spezies. Die neugebildeten Q^2-Einheiten sind energiereicher und werden leichter von der Oberfläche abgelöst, wodurch eine Q^3-reiche Oberfläche regeneriert wird (verändert aus [190]). 22

Abbildung 8: Darstellung der rezeptor-vermittelten Endozytose eines Partikels mit erfolgreicher Aufnahme des Partikels in die Zelle. 27

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Anlagerung von MSN im Vergleich zu PNF mit nicht-kovalent angebundenen MSN an die Membran einer Zelle. 34

Abbildung 10: Aufbau und Funktion der einzelnen Aminosäuren in der untersuchten Primärsequenz KFKFEFEFGGRGDS. 35

Abbildung 11: Schematische Übersicht der untersuchten nicht-kovalenten Kombinationen aus RGD-funktionalisierten Peptidnanofibrillen und mesoporösen Silikapartikeln als modulare Wirkstofftransportsysteme für A549-Krebszellen. 37

Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der sphärischen mesoporösen kalzinierten (MSN_{OH}), carboxylierten (MSN_{COOH}) und extrahierten aminfunktionalisierten (MSN_{NH2}) Silikapartikel mit einem Durchmesser von ~150 nm. 40

Abbildung 13: Umsetzung der MSN_{OH} (links) und der MSN_{NH2} (rechts) mit einer 1%-igen Ninhydrinlösung in Ethanol. 41

Abbildung 14: (A) Zetapotentialverteilung und (B) thermogravimetrische Analyse der MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} im Vergleich. 42

Abbildung 15: Untersuchung der spezifischen Oberfläche, des Porenvolumens und des Porendurchmessers der MSN_{OH} in Abhängigkeit der Ausheiztemperatur mittels Stickstoffsorptionsmessungen. 43

Abbildung 16: (A) Stickstoffsorptionsisothermen sowie (B) Porendurchmesserverteilung der MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2}. Die Porendurchmesser wurden hierbei mittels NL-DFT aus dem Desorptionszweig der Stickstoffisothermen ermittelt. 44

Abbildung 17: Ergebnisse der MALDI-TOF MS der im Peptidsynthesizer hergestellten Peptide PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}. 47

Abbildung 18: MALDI-TOF MS-Ergebnisse der hergestellten Peptide (A) PEP und (B) PEP_{RGD} ohne Mikrowellen. (C) Ergebnis für das Peptid PEP_{RGD} ohne Mikrowellensynthese mit doppelten Kopplungsschritten ab der achten Aminosäure. 48

Abbildung 19: Strukturformel der Aminosäuresequenz KFKFEFEF..... 49

Abbildung 20: Untersuchung der Fibrillenbildungskinetik von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} (A) mittels Fluoreszenzspektroskopie der ProteoStat®-Einlagerung (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm) und (B) anhand des Aggregatvolumens mittels DLS in 1 mM KCl. Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können. 51

Abbildung 21: Entwicklung des Zetapotentials während der Ausbildung der fibrillären Aggregate in Natriumphosphatpuffer über die Zeit. Für die Messungen wurden die PNF-Ansätze mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt. 52

Abbildung 22: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach 0 min, 60 min und 24 h sowie (B) kinetische Untersuchungen der Sekundärstruktur der gefriergetrockneten Fibrillen mittels FTIR-Analyse der Amid I-Bande. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert..... 54

Abbildung 23: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Peptidnanofibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche sich nach 24 h Inkubation in Natriumphosphatpuffer ausgebildet haben. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert..... 56

Abbildung 24: (A) Lorentz-Fit nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus der Amid I-Bande für die Sekundärstrukturelemente am Beispiel der gefriergetrockneten Fibrillen von PEP und PEP_{RGD}. (B) Mittels FTIR-Analyse der Amid I-Bande ermittelte prozentuale Anteile der Sekundärstrukturelemente in den untersuchten Peptidnanofibrillen. (C) Messung der Fluoreszenz des in die ß-Faltblattstrukturen der nach 24 h fertig inkubierten Fibrillen eingelagerten ProteoStats® (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm). . 58

Abbildung 25: (A) Ermittelte Volumen der Fibrillenaggregate mittels DLS und (B) deren Zetapotentiale in 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5). Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können..... 59

Abbildung 26: Verfügbarkeit an RGD-Sequenzen an den Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche durch fluoreszenzspektroskopische Auswertung der Anlagerung des Peptids RGD-cap an die fertig ausgebildeten PNF bestimmt wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm). 61

Abbildung 27: (A) TEM Aufnahmen der PNF mit variierendem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid. Für einen stärkeren Kontrast der PNF wurden diese nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. (B) Einfluss der Variation des RGD-Anteils auf die Amid I-Bande im FTIR-Spektrum anhand der Auftragung der Differenzspektren. 62

Abbildung 28: (A) Zetapotentiale der nach 24 h Inkubation in Natriumphosphatpuffer ausgebildeten PNF mit unterschiedlichem molarem Anteil an PEP_{RGD} und (B) deren Zetapotentialverteilungskurven in 1 mM KCl (pH 5,5). 64

Abbildung 29: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Mischfibrillen aus PEP (10 mol% ATTO488-markiertes Peptid, grün) und PEP_{RGD} (10 mol% ATTO647N-markiertes Peptid, rot). Dargestellt sind zum einen die Einzelkanäle sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle. 65

Abbildung 30: (A) Prozentualer Anteil an verfügbaren RGD-Sequenzen der Mischfibrillen mit variierendem RGD-Peptid-Anteil, welche durch fluoreszenzspektroskopische Auswertung der Anlagerung des ATTO488-markierten Peptids RGD-cap an die PNF bestimmt wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm). (B) Zusammenhang zwischen relativer Anzahl der an den PNF-Aggregaten verfügbaren RGD-Sequenzen und dem Zetapotential der Fibrillenaggregate in 1 mM KCl (pH 5,5). 66

Abbildung 31: Ermittelte Volumen der Fibrillenaggregate mit unterschiedlichen Anteilen an RGD-funktionalisiertem Peptid mittels DLS. Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können. 67

Abbildung 32: Prozentuale Verfügbarkeit der eingebauten RGD-Sequenzen an den PNF-Aggregaten, welche über die fluoreszenzspektroskopische Auswertung der Anlagerung des ATTO488-markierten Peptids RGD-cap an die PNF bestimmt wurde (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm), aufgetragen gegen die Menge an insgesamt eingebautem RGD-Peptid. 68

Abbildung 33: Schematische Darstellung der Herstellung von PNF-Aggregaten mit nachträglich nicht-kovalent angelagerten MSN_{COOH}. 70

Abbildung 34: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der nicht-kovalenten Anlagerung der unfunktionalisierten Silikapartikel (MSN_{OH}) sowie der carboxylierten (MSN_{COOH}) und aminfunktionalisierten Silikapartikel (MSN_{NH2}) an Peptidnanofibrillen nach 45 min Inkubation in Natriumphosphatpuffer (pH 7,0). Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 71

Abbildung 35: (A) Piktogramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der reinen nicht-markierten Fibrillen von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} sowie (B) der reinen nicht-markierten Fibrillen von PEP, der reinen ATTO488-markierten Partikel MSN_{COOH} sowie der Partikel-Fibrillen-Aggregate. Hierbei stellt der Bereich P1 den Bereich dar, welcher den PNF zugeordnet werden kann, während P2 die detektierten Aggregate der fluoreszenzmarkierten freien MSN_{COOH} darstellt. (C) Zeitliche Entwicklung der Anlagerung der ATTO488-markierten MSN_{COOH} an die Fibrillen von PEP und PEP_{RGD}, bestimmt durch Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des Bereichs P1 aus Messungen der Durchflusszytometrie..... 73

Abbildung 36: (A) Zetapotentiale der PNF-Aggregate in 1 mM KCl (pH 5,5) vor und nach 45-minütiger nicht-kovalenter Anlagerung der MSN_{COOH} sowie (B) die Zetapotentialverteilungskurven der PNF-MSN_{COOH}-Aggregate zur Überprüfung der Vollständigkeit der Partikelanlagerung. 75

Abbildung 37: Untersuchung der Anlagerung unterschiedlicher Mengen an MSN_{COOH} (50, 100, 150, 200, 250 und 300 µg MSN/µmol Peptid) an die unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen (PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}) bei einer Inkubationszeit von 45 min mittels (A) Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des P1-Bereichs (PNF) der Durchflusszytometriemessungen (PNF: nicht-fluoreszent; MSN_{COOH}: ATTO488) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). 76

Abbildung 38: Zetapotentialverteilungskurven der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche mit unterschiedlichen Mengen an carboxylierten Partikeln für 45 min inkubiert wurden. Die Proben wurden vor der Vermessung mit 1 mM KCl (pH 5,5) verdünnt..... 77

Abbildung 39: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der 45-minütigen nicht-kovalenten Anlagerung der carboxylierten Silikapartikel (MSN_{COOH}) an die unfunktionalisierten (PEP), die RGD-funktionalisierten (PEP_{RGD}) sowie die RAD-funktionalisierten PNF (PEP_{RAD}). (B) Vergrößerung der angelagerten MSN_{COOH} an die PEP-PNF. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 78

Abbildung 40: Untersuchung der nach 45 min Inkubation angelagerten Partikelmenge an die unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mittels (A) Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des P1-Bereichs (PNF) der Durchflusszytometriemessungen (PNF: nicht-fluoreszent; MSN_{COOH}: ATTO488) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). 78

Abbildung 41: Einfluss der 45 min adsorptiv angelagerten MSN_{COOH} auf die flächennormierten Amid I-Banden der FTIR-Spektren der untersuchten gefriergetrockneten Peptidnanofibrillen (A) PEP, (B) PEP_{RGD} sowie (C) PEP_{RAD}. Die Amid I-Bande gibt Aufschluss über die Sekundärstruktur der untersuchten PNF. 80

Abbildung 42: (A) Bestimmung des Aggregatvolumens der Fibrillenaggregate vor und nach 45-minütiger nicht-kovalenter Partikelanlagerung mittels DLS. Aufgrund der nicht-sphärischen Form der PNF-Aggregate wurde aus den mittels DLS erhaltenen Hydrodynamischen Radien unter Verwendung der Volumenformel für sphärische Proben auf das Aggregatvolumen zurückgerechnet, um genauere Aussagen treffen zu können. (B) Relative zur RGD-cap-Anlagerung zur Verfügung stehende Anzahl an RGD-Sequenzen an den Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} vor und nach 45-minütiger adsorptiver Partikelanlagerung bestimmt mittels fluoreszenzspektroskopischer Auswertung der Anlagerung des cyclischen ATTO488-markierten Peptids RGD-cap (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm). 81

Abbildung 43: TEM Aufnahmen der 45-minütigen nicht-kovalenten Anlagerung der carboxylierten Silikapartikel (MSN_{COOH}) an die Mischfibrillen aus PEP und PEP_{RGD} mit variierendem RGD-Anteil (1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol% RGD-Peptid). Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 82

Abbildung 44: Untersuchung der 45-minütigen adsorptiven Anlagerung von ATTO488-markierten MSN_{COOH} an die Mischfibrillen aus PEP und PEP_{RGD} mit variierendem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid (1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol%) mittels Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenz des P1-Bereichs (PNF) der Durchflusszytometriemessungen (PNF: nicht-fluoreszent; MSN_{COOH}: ATTO488). 83

Abbildung 45: Zusammenhang zwischen relativer angelagerter Partikelmenge pro Aggregat und (A) Zetapotential in 1 mM KCl (pH 5,5) sowie (B) der äußeren Oberfläche der Aggregate, welche von der Peptidmolekülanzahl pro Aggregat N abgeschätzt wurde ($N^{2/3}$). Die Anzahl der Peptidmoleküle wurde hierbei mittels durchflusszytometrischer Messungen der PNF mit 1 mol% ATTO647N-markierten Peptiden ermittelt. Dabei ist die erhaltene durchschnittliche Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Peptidmoleküle pro Aggregat. (C) Untersuchung der 45-minütigen adsorptiven Anlagerung von MSN_{COOH} an die Mischfibrillen aus PEP und PEP_{RGD} mit variierendem Anteil an RGD-funktionalisiertem Peptid (1, 10, 15, 25, 40, 55, 70 und 85 mol%) mittels Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). 84

Abbildung 46: (A) Schematische Darstellung der Ausbildung fibrillärer Netzwerke mit MSN_{COOH}-Einlagerung während der Fibrillenbildung (Inverses System (PEP_{RGD}_IS)). (B) Untersuchung der Entwicklung des Hydrodynamischen Durchmessers der Aggregate bei An- und Abwesenheit der Partikel während der Fibrillenausbildung mittels DLS. 87

Abbildung 47: (A) Entwicklung des Zetapotentials der Aggregate in 1 mM KCl (pH 5,5) bei Zugabe der MSN_{COOH} während der PNF-Ausbildung über die Zeit sowie (B) die schematische Darstellung der Triebkräfte bei der Anlagerung von fertig ausgebildeten PNF und monomeren Peptiden..... 88

Abbildung 48: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen PEP_{RGD}_IS nach 0 min, 10 min und 60 min. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 89

Abbildung 49: (A) Die zeitliche Entwicklung der ß-Faltblattstrukturen während der PNF-Ausbildung bei An- und Abwesenheit von MSN_{COOH} und (B) die Bestimmung der relativen Menge an ß-Faltblattstrukturen mittels der Fluoreszenzzunahme bei Einlagerung von ProteoStat® (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm)..... 90

Abbildung 50: (A) Mittels FTIR-Analyse der Amid I-Bande ermittelte Anteile der Sekundärstrukturelemente in den RGD-funktionalisierten PNF in Ab- (PEP_{RGD}) und Anwesenheit (PEP_{RGD}_IS) der MSN_{COOH} während der Fibrillenbildung. Für die Vermessung der Proben wurden diese gefriergetrocknet. (B) Schematische Darstellung der möglichen Anlagerung der monomeren Peptide auf der Partikeloberfläche und deren Probleme bei der Ausbildung von ß-Faltblattstrukturen. 91

Abbildung 51: Untersuchung der Einlagerung von MSN_{COOH} in die RGD-funktionalisierten Fibrillen bei MSN_{COOH}-Zugabe während der Fibrillenbildung mittels (A) TEM und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 92

Abbildung 52: Vergleich der ausgebildeten PNF bei An- und Abwesenheit der MSN_{COOH} während der Fibrillenausbildung in Bezug auf (A) die mittels Durchflusszytometrie bestimmte relative Anzahl der Peptidmoleküle pro PNF-Aggregat (1 mol% ATTO647N-markierte Peptide), (B) die mittels Durchflusszytometrie bestimmte relative Anzahl der an- bzw. eingelagerten ATTO488-markierten MSN_{COOH} sowie (C) der über fluoreszenzspektroskopische Analyse der RGD-cap-Anbindung (ATTO488-markiert) bestimmten relativen RGD-Menge, welche auf den Aggregaten für Rezeptorinteraktionen zur Verfügung steht (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm)..... 93

Abbildung 53: Untersuchung des Bildungsmechanismus der PNF des Inversen Systems anhand der Zugabe unterschiedlicher Peptidkonzentrationen zu den MSN_{COOH} mittels (A) DLS und (B) Zetapotentialmessungen in 1 mM KCl (pH 5,5). (C) Auftragung der Zetapotentialverteilungskurven in 1 mM KCl (pH 5,5) nach Zugabe unterschiedlich konzentrierter Peptidstocklösungen (0,11, 0,14, 0,18, 0,27, 0,54 und 1,08 µg/µL Peptidendkonzentration) zur Untersuchung des Bildungsmechanismus des Inversen Systems. 94

Abbildung 54: Schematische Darstellung der Peptidanlagerung an die MSNs bei zunehmender Peptidkonzentration. 95

Abbildung 55: (A) Untersuchung des hydrolytischen Abbaus der MSN_{COOH} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C mittels ICP-OES-Analyse der Überstände. (B) Messungen der Stabilität der Partikeldispersion in HEPES-Puffer und Medium mit 10% FCS bei jeweils 37 °C über 24 h mittels DLS. Die verwendete Partikelkonzentration liegt für beide Experimente bei 100 µg/mL. 98

Abbildung 56: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des Partikelabbaus bei einer Partikelkonzentration von 100 µg/mL in Natriumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C über die Zeit. 100

Abbildung 57: Zeitliche Entwicklung des (A) Zetapotentials und der (B) Massenänderung (gemessen mittels TGA) der Partikel MSN_{COOH} bei Inkubation bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) bei einer Konzentration von 100 µg/mL. Für die Zetapotentialmessungen wurden die Partikel zentrifugiert und in 1 mM KCl (pH 5,5) redispergiert. 101

Abbildung 58: Untersuchung des Abbaus der MSN_{COOH} in Anwesenheit der unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C mittels (A) ICP-OES-Analyse der Überstände sowie (B) transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen nach 1 h und 24 h. Die verwendete Partikelkonzentration lag in beiden Experimenten bei 100 µg/mL und 150 µg/µmol Peptid. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 103

Abbildung 59: Untersuchung des Abbaus der MSN_{COOH} für das PEP_{RGD}_IS sowie das vorinkubierte System PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS bei 37 °C mittels (A) ICP-OES-Analyse der Überstände sowie (B) transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen für das PEP_{RGD}_IS nach 1 h und 24 h. Die verwendete Partikelkonzentration lag in beiden Experimenten bei 100 µg/mL und 150 µg/µmol Peptid.

Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 104

Abbildung 60: Untersuchung der Fluoreszenzintensität des ProteoStat® in PBS, welches mit Trypsin (0,05%), Protease K (100 µg/mL mit 55 mM $CaCl_2$ zur Aktivierung) sowie 10% FCS versetzt wurde, über eine Zeitspanne von 2 h (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm). 106

Abbildung 61: Untersuchung des proteolytischen Abbaus der fibrillären Strukturen bei Zugabe von Protease K und $CaCl_2$ zur Aktivierung bei 37 °C durch (A) Änderung der Fluoreszenz des in die Fibrillen eingelagerten ProteoStat® über eine Zeit von 2 h (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm) und (B) durch Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop nach 24 h. Für einen besseren Kontrast wurden die PNF nach Aufbringen auf die TEM-Trägernetzchen mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung für 2 min kontrastiert. 107

Abbildung 62: Untersuchung des proteolytischen Abbaus der fibrillären Strukturen mit (A) angelagerten MSN_{COOH} für PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} und (B) eingelagerten MSN_{COOH} (PEP_{RGD}_IS) bei Zugabe von Protease K und $CaCl_2$ zur Aktivierung bei 37 °C durch Änderung der Fluoreszenz des in die Fibrillen eingelagerten ProteoStat® über eine Zeit von 2 h (λ_{exc} = 550 nm; λ_{em} = 603 nm). 108

Abbildung 63: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. (A) Gele der Fibrillen von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach Inkubation mit und ohne 10% FCS. (B) Gele der Proteinadsorption der Fibrillen in Abhängigkeit des RGD-Anteils. Es wurde je ein repräsentatives Gel aus dreien dargestellt (andere Gele siehe Anhang Abbildung 90 und Abbildung 91). 111

Abbildung 64: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. (A) Untersuchung des Einflusses der nachträglich angelagerten Silikapartikel (MSN_{COOH}) auf die Proteinadsorption. (B) Vergleich der Proteinadsorption von PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} und bei Anwesenheit der Partikel bei Inkubation der Fibrillen (PEP_{RGD}_IS). Es wurde je ein repräsentatives Gel aus dreien dargestellt (andere Gele siehe Anhang Abbildung 92 und Abbildung 93). 113

Abbildung 65: Bestimmung des Einflusses der (A) Fibrillen (26,2 µM) und der (B) Partikel (50 µg/mL) auf die Zellvitalität von A549-Zellen nach 24 und 48 h Inkubationszeit. Bestimmt wurde die Zellvitalität mittels CellTiterGlo®. 115

Abbildung 66: (A) Bestimmung des Einflusses der Partikel-Fibrillen-Aggregate auf die Zellvitalität von A549-Zellen nach 24 und 48 h Inkubationszeit und (B) des Einflusses des Systems PEP_{RGD}_IS auf die Zellvitalität von A549-Zellen nach 24 h Inkubationszeit. Bestimmt wurde die Zellvitalität mittels CellTiterGlo®. 116

Abbildung 67: (A) Aufnahme einer Sättigungskurve der A549-Zellen mit einem ATTO488-markierten αV-Antikörper bei 4 °C mittels Durchflusszytometrie sowie (B) eine konfokalmikroskopische Aufnahme der bei 4 °C mit ATTO488-markiertem Antikörper gesättigten A549-Zellen (Zellkern: Hoechst - blau; αV-Antikörper: ATTO488 - grün). Die Zellen wurden für beide Experimente nach einer Inkubationszeit von 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung für 30 min fixiert..... 118

Abbildung 68: Bestimmung der relativen Anzahl nach 3 h bei 37 °C angelagerter Fibrillenaggregate an die A549-Zellen mit und ohne angelagerte MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) über (A) Durchflusszytometrie (PNF: 52,5 µM aufgrund doppelter Zelldichte im Vergleich zur Konfokalmikroskopie) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: 26,2 µM) (Zellkern: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). Die Zellen wurden für beide Experimente mit 4%-iger PFA-Lösung für 30 min fixiert..... 119

Abbildung 69: Auftragung der MSN_{COOH}-Anlagerung nach 45 min bei RT an die PNF sowie der Anlagerung der PNF an die A549-Zellen nach 3 h bei 37 °C gegen den verwendeten RGD-Anteil der PNF. Die Messungen erfolgten hierbei am Durchflusszytometer unter Verwendung von ATTO488-markierten MSN_{COOH} bzw. ATTO647N-markierten PNF. Durch Multiplikation der beiden Werte kann eine Effektivitätskurve erhalten werden, welche angibt, welche relative Anzahl an MSN_{COOH} in Abhängigkeit vom RGD-Anteil der PNF zu den Zellen transportiert wurde. 121

Abbildung 70: Bestimmung der relativen Anzahl nach 3 h bei 37 °C angelagerter Fibrillenaggregate an die A549-Zellen mit und ohne angelagerte MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) im Vergleich zu PEP_{RGD}_IS über (A) Durchflusszytometrie (PNF: 52,5 µM aufgrund doppelter Zelldichte im Vergleich zur Konfokalmikroskopie) und (B) Konfokalmikroskopie (PNF: 26,2 µM) (Zellkern: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb). Die Zellen wurden für beide Experimente mit 4%-iger PFA-Lösung für 30 min fixiert. 122

Abbildung 71: (A) Untersuchung der pH-abhängigen Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{COOH} bei pH 5,0; 6,5 und 7,4 sowie bei pH 7,4 unter Zugabe von 10% FCS bei 37 °C durch UV/Vis-Messungen (λ = 481 nm) der Überstände zu bestimmten Zeitpunkten. Es wurde eine Partikelkonzentration von 1 mg/mL verwendet. (B) Strukturformel des neutralisierten Daunorubicins..... 124

Abbildung 72: (A) Untersuchung der Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{COOH} in An- und Abwesenheit der PEP_{RGD}-PNF sowie im Falle des PEP_{RGD}_IS bei pH 7,4 inklusive 10% FCS bei 37 °C durch UV/Vis-Messungen (λ = 481 nm) der Überstände zu bestimmten Zeitpunkten. Es wurde eine Partikelkonzentration von 1 mg/mL verwendet. (B) Schematische Darstellung der Verdrängung an der Partikeloberfläche adsorbierten Daunorubicins durch die Anlagerung von Peptiden. (C) Fertig ausgebildete Fibrillen, welche für 24 h mit Daunorubicin inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen wurden. (D) Fibrillen, welche sich in der Anwesenheit von Daunorubicin ausgebildet haben und anschließend mehrfach gewaschen wurden. Es wurde jeweils so oft gewaschen, bis der Waschpuffer kein sichtbares Daunorubicin mehr enthielt. 126

Abbildung 73: Untersuchung der Daunorubicinfreisetzung nach 3 h in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die daunorubicin-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; Daunorubicin - rot). Aufnahme freien Daunorubicins in die A549-Zellen. Freisetzung des Daunorubicins über MSN_{COOH}, PEP-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RAD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 128

Abbildung 74: (A) Bestimmung des Beladungserfolgs der MSN_{COOH} mit DiO in trockenem Cyclohexan für 24 h durch UV/Vis-Messungen einer 1:100-Verdünnung der für die Beladung verwendeten DiO-Stocklösung sowie der Überstände der Beladung und des Waschschrittes. (B) Untersuchung der pH-abhängigen Freisetzung des DiOs aus den MSN_{COOH} in wässrigen Medien bei pH 5,0; 6,5 und 7,4 sowie bei pH 7,4 unter Zugabe von 10% FCS bei 37 °C durch fluoreszenzspektroskopische Messungen (λ_{exc} = 475 nm; λ_{em} = 520 nm) der Überstände zu bestimmten Zeitpunkten. Für die Freisetzungsversuche wurde eine Partikelkonzentration von 1 mg/mL verwendet. 129

Abbildung 75: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Aufnahme freien DiOs in die A549-Zellen. Freisetzung des DiOs über MSN_{COOH}, PEP-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RAD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 131

Abbildung 76: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb;

MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Aufnahme freien DiOs in die A549-Zellen. Freisetzung des DiOs über MSN_{COOH}, PEP-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RAD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 24 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 133

Abbildung 77: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) sowie der Aufnahme von ATTO488-markierten MSN_{COOH} in A549-Zellen nach 24 h bei 37 °C in An- und Abwesenheit der unterschiedlich funktionalisierten PNF PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mittels Durchflusszytometrie. Es wurde eine PNF-Konzentration von 26,2 µM verwendet. Aufgrund des geringen Fluoreszenzsignals durch die ATTO488-markierten MSN_{COOH} aufgrund der geringen Partikelkonzentration wurde diese für das Experiment zur MSN-Aufnahme auf 250 µg/µmol Peptid erhöht. Extrazellulär lokalisierte MSN wurden über Behandlung mit Trypanblau in ihrer Fluoreszenz gequencht. 135

Abbildung 78: Untersuchung der Daunorubicinfreisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die daunorubicin-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert bzw. eingelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; Daunorubicin - rot). Freisetzung des Daunorubicins über PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RGD}_IS mit eingelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. Zudem ist eine schematische Darstellung der möglichen Daunorubicinfreisetzung (rote Pfeile) aus den MSN_{COOH} in den beiden Systemen aufgeführt. 137

Abbildung 79: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 3 bzw. 24 h in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert bzw. eingelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Freisetzung des DiOs nach 3 h und nach 24 h über PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH} und PEP_{RGD}_IS mit eingelagerten MSN_{COOH}. Die Zellen wurden nach 3 bzw. 24 h Inkubation bei 37 °C mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 139

Abbildung 80: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv an- bzw. eingelagert haben (150 µg/µmol Peptid) sowie der Aufnahme von ATTO488-markierten MSN_{COOH} in A549-Zellen nach 24 h bei 37 °C bei An- bzw. Einlagerung in die fibrillären Strukturen von PEP_{RGD} mittels Durchflusszytometrie. Es wurde eine PNF-Konzentration von 26,2 µM verwendet. Aufgrund des

geringen Fluoreszenzsignals durch die ATTO488-markierten MSN_{COOH} aufgrund der geringen Partikelkonzentration wurde diese in diesem Experiment auf 250 µg/µmol Peptid erhöht. Extrazellulär lokalisierte MSN wurden über Behandlung mit Trypanblau in ihrer Fluoreszenz gequencht. 140

Abbildung 81: (A) Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach Inkubation für 3 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. (B) Schematische Darstellung der sequenziellen Zugabe von PNF und MSN_{COOH} zu den A549-Zellen. (C) Relative Anzahl an nach 45 min Inkubation angelagerten ATTO488-markierten MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) an die nicht-markierten PNF mit und ohne dreistündige Vorinkubation mit 10% FCS bei 37 °C, bestimmt über die durchschnittliche Fluoreszenz des P1-Bereichs der Durchflusszytometriemessungen (Kapitel 4.2). Angegeben ist jeweils die relative MSN_{COOH}-Menge pro Aggregat. 142

Abbildung 82: Untersuchung der 45-minütigen adsorptiven Anlagerung der MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) an die unterschiedlich funktionalisierten Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mit und ohne dreistündige Vorinkubation mit 10% FCS bei 37 °C mittels Konfokalmikroskopie (PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). 144

Abbildung 83: Untersuchung der Lokalisation der MSN_{COOH} bei Zugabe als 45 min vorinkubierte MSN_{COOH}-PNF-Aggregate (PNF: 26,2 µM; MSN: 150 µg/µmol Peptid; Inkubationszeit mit Zellen: 3 h) und Zugabe der MSN_{COOH} (150 µg/µmol Peptid) zu den bereits 3 h bei 37 °C mit den Zellen vorinkubierten und bereits angelagerten Fibrillenaggregaten (26,2 µM) an die A549-Zellen (Inkubationszeit nach Partikelzugabe: 45 min) über Konfokalmikroskopie (Zellkern: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO488 - grün). Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 146

Abbildung 84: Untersuchung der Daunorubicinfreisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die daunorubicin-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; Daunorubicin - rot). Freisetzung des Daunorubicins über (A) PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, (B) Zugabe der MSN_{COOH} zu Zellen, welche bereits 3 h mit den PEP_{RGD}-PNF vorinkubiert wurden und (C) MSN_{COOH}. Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 147

Abbildung 85: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 3 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol

Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Freisetzung des DiOs über (A) PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, (B) Zugabe der MSN_{COOH} zu Zellen, welche bereits 3 h mit den PEP_{RGD}-PNF vorinkubiert wurden und (C) MSN_{COOH}. Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert..... 149

Abbildung 86: Untersuchung der DiO-Freisetzung nach 24 h bei 37 °C in A549-Zellen über den Transport mit den PNF (26,2 µM), welche die DiO-beladenen MSN_{COOH} adsorptiv angelagert haben (150 µg/µmol Peptid) mittels Konfokalmikroskopie (Zellkerne: Hoechst – blau; PNF: ATTO647N - gelb; MSN_{COOH}: ATTO565 – grün; DiO - violett). Freisetzung des DiOs über (A) PEP_{RGD}-PNF mit angelagerten MSN_{COOH}, (B) Zugabe der MSN_{COOH} zu Zellen, welche bereits 3 h mit den PEP_{RGD}-PNF vorinkubiert wurden und (C) MSN_{COOH}. Vor dem Messen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert. 150

Abbildung 87: Schematische Darstellung der Partikelaufnahme durch die Zellen im Falle des vorinkubierten sowie des sequenziell zugegebenen Systems. 151

Abbildung 88: Verlauf der Korrelationskurven der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} sowie deren Polydispersitätsindizes aus den DLS-Messungen. 243

Abbildung 89: (A) TEM Aufnahmen der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche mit 2%-iger Uranylacetatlösung kontrastiert wurden, um einen stärkeren Kontrast der Fibrillen zu erhalten. (B) Konfokalmikroskopische Aufnahmen der ATTO647N-markierten (10 mol%) PNF von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}..... 244

Abbildung 90: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Gele der Fibrillen von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach Inkubation mit und ohne 10% FCS. 245

Abbildung 91: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Gele der Proteinadsorption der Fibrillen in Abhängigkeit des RGD-Anteils..... 246

Abbildung 92: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele.

Untersuchung des Einflusses der nachträglich angelagerten Silikapartikel (MSN_{COOH}) auf die Proteinadsorption. 246

Abbildung 93: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Vergleich der Proteinadsorption von PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} und bei Anwesenheit der Partikel bei Inkubation der Fibrillen (PEP_{RGD}_IS). 247

Abbildung 94: Fluoreszenzemissionsspektren der MSN_{COOH}, welche (A) ATTO488-markiert (λ_{exc} = 450 nm) bzw. (B) ATTO565-markiert (λ_{exc} = 561 nm) wurden. 248

Abbildung 95: (A) Untersuchung der pH-abhängigen Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{OH} und MSN_{NH2} bei pH 5,0; 6,5 und 7,4 sowie bei Zugabe von 10% FCS bei 37 °C durch UV/Vis-Messungen (λ = 481 nm) der Überstände zu bestimmten Zeiten. (B) Auftragung der nach 48 h freigesetzten Daunorubicinmenge gegen das Zetapotential der Partikel beim jeweiligen pH-Wert. 249

Abbildung 96: Untersuchung des *Quenching*-Effekts von unterschiedlich konzentrierten Trypanblaulösungen auf die Fluoreszenzintensität von ATTO488-markierten MSN_{COOH} in den Systemen der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mit jeweils nachträglich angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}_IS sowie der reinen MSN_{COOH}. Die Proben wurden für 10 min bei RT mit den Trypanblaulösungen inkubiert und anschließend fluoreszenzspektroskopisch untersucht (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm). 251

Abbildung 97: Untersuchung der DiO-Freisetzung in A549-Zellen durch die Auflösung der Partikel. Hierzu wurden die MSN_{COOH} sowie PEP_{RGD}_IS mit einer Partikelkonzentration von 8 µg/mL in Zellmedium für 24 h bei 37 °C inkubiert, anschließend zentrifugiert und die Überstande bzw. freies DiO als Referenz zu den Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation mit den Zellen bei 37 °C wurden die Proben für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert und durchflusszytometrisch vermessen. 252

VIII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der synthetisierten Silikapartikel. DLS und Zetapotentialmessungen wurden in 1 mM KCl (pH 5,5) durchgeführt. 40

Tabelle 2: Spezifische Oberfläche (BET), Porendurchmesser (NL-DFT) und Porenvolumen (NL-DFT) aus den Stickstoffsorptionsisothermen der MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2}..... 45

Tabelle 3: Vergleich der verwendeten Peptidsynthesen mit und ohne den Einsatz von Mikrowellen. . 48

Tabelle 4: Bandenpositionen der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente in der Amid I-Bande.[285] 57

Tabelle 5: Halbwertszeiten der untersuchten Systeme in Protease K-haltigem PBS (Aktivierung durch Zugabe von $CaCl_2$) bei 37 °C. 109

Tabelle 6: Zetapotentiale der PNF-Aggregate in Puffer mit pH 7,0 und Puffer mit pH 7,0 mit 10% FCS im Vergleich. 113

Tabelle 7: Für MSN_{COOH} erhaltener Beladungsgrad an neutralisiertem Daunorubicin bei Beladung in trockenem Dichlormethan für 24 h. 124

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Chemikalien. 162

Tabelle 9: Ansatzmengen der Fibrillen mit variierendem RGD-Anteil zur Fluoreszenzmarkierung mit ATTO488 bzw. ATTO647N..... 170

Tabelle 10: Ansatzmengen für die Untersuchung der Fibrillenbildung mittels DLS und Zetapotential. 171

Tabelle 11: Ansatzmengen der Fibrillen zur Untersuchung der ß-Faltblattanteile während der Bildung. 173

Tabelle 12: Eingesetzte Mengen zur Fluoreszenzmarkierung der Peptide. 174

Tabelle 13: Ansatzmengen für die durchflusszytometrische Untersuchung der Fibrillenaggregate. ... 175

Tabelle 14: Ansatzmengen der Peptidstocklösungen mit variierendem RGD-Anteil..... 176

Tabelle 15: Ansatzmengen der Fibrillen mit variierendem RGD-Anteil für transmissions-elektronenmikroskopische Messungen. 176

Tabelle 16: Ansatzmengen der Fibrillen mit variierendem RGD-Anteil für konfokalmikroskopische Untersuchungen. 178

Tabelle 17: Eingesetzte Partikeldispersionen zur Untersuchung der Sättigung der Partikelanlagerung an die Fibrillen. 181

Tabelle 18: Ansatzmengen der Fibrillen für die Untersuchung des Partikelabbaus mittels ICP und TEM. 188

Tabelle 19: Ansatzmengen der Fibrillen für die Proteinadsorption. 189

Tabelle 20: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE. 190

Tabelle 21: Ansatzmengen der Fibrillen für die Zellvitalitätsuntersuchungen mittels *CellTiterGlo®*. 192

Tabelle 22: Ansatzmengen der Fibrillen zur Untersuchung der Zelladhäsion mittels Durchflusszytometrie. 194

Tabelle 23: Für die Partikel MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} erhaltene Beladungsgrade an neutralisiertem Daunorubicin bei Beladung in trockenem Dichlormethan. 248

IX. Anhang

1. Breite Größenverteilung der Fibrillenaggregate

Die breite Größenverteilung der Fibrillenaggregate zeigt sich deutlich in den hohen Polydispersitätsindizes der DLS-Messungen, welche mit 0,25-0,50 auf eine sehr polydisperse Probe hindeuten. Für die DLS-Messungen wurden die PNF für 24 h bei RT in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) angesetzt und anschließend mit 1 mM KCl-Lösung (pH 5,5) verdünnt. Betrachtet man die Korrelationskurven in Abbildung 88, wird zunächst wie erwartet ein linearer Bereich mit einem Korrelationskoeffizienten von 1,0 sichtbar, gefolgt von einem steilen Abfall des Korrelationskoeffizienten, welcher mit der Zeit jedoch abflacht und in den Verlauf einer polydispersen Probe überläuft. Verursacht wird das Abflachen des Abfalls durch den Einfluss größerer Aggregate, wobei der steile Verlauf der Kurve zu Beginn des Abfalls dafür spricht, dass der Hauptteil der Aggregate in diesem Größenbereich vorzufinden ist.

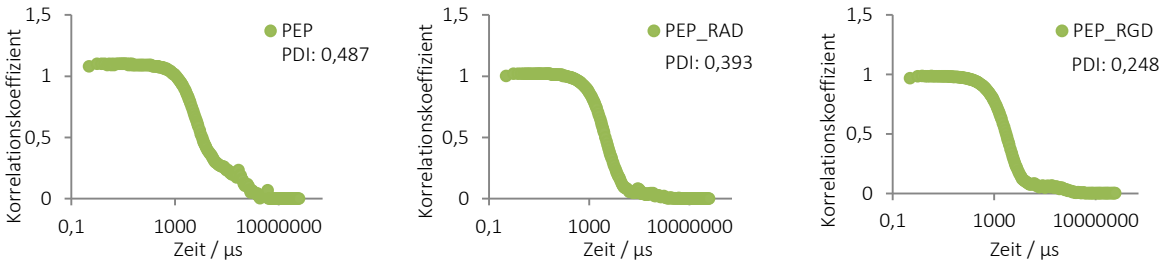


Abbildung 88: Verlauf der Korrelationskurven der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} sowie deren Polydispersitätsindizes aus den DLS-Messungen.

Auch TEM und konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen starke Unterschiede in der Größe der einzelnen Aggregate auf. Hierzu wurden die PNF in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) angesetzt und 24 h bei RT inkubiert. Für die Untersuchungen am Konfokalmikroskop wurden 10 mol% ATTO647N-markierte Peptidstocklösungen verwendet, um die PNF am Fluoreszenzmikroskop sichtbarzumachen. Die Proben für die TEM Aufnahmen wurden für einen stärkeren Kontrast der PNF für 2 min mit einer 2%-igen Uranylacetatlösung kontrastiert und anschließend vermessen. In Abbildung 89 sind für beide Messmethoden große Unterschiede in der Größe der ausgebildeten Aggregate für die einzelnen Peptide beobachtbar. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass konfokalmikroskopische Aufnahmen einen Querschnitt der Aggregate zeigen und somit nur schwer

eine Aussage über die tatsächliche Größe der Aggregate getroffen werden kann, da es über Verbindungen außerhalb der untersuchten Ebene zur Verbrückung der einzelnen sichtbaren Aggregate zu einem größeren Aggregat kommen kann.

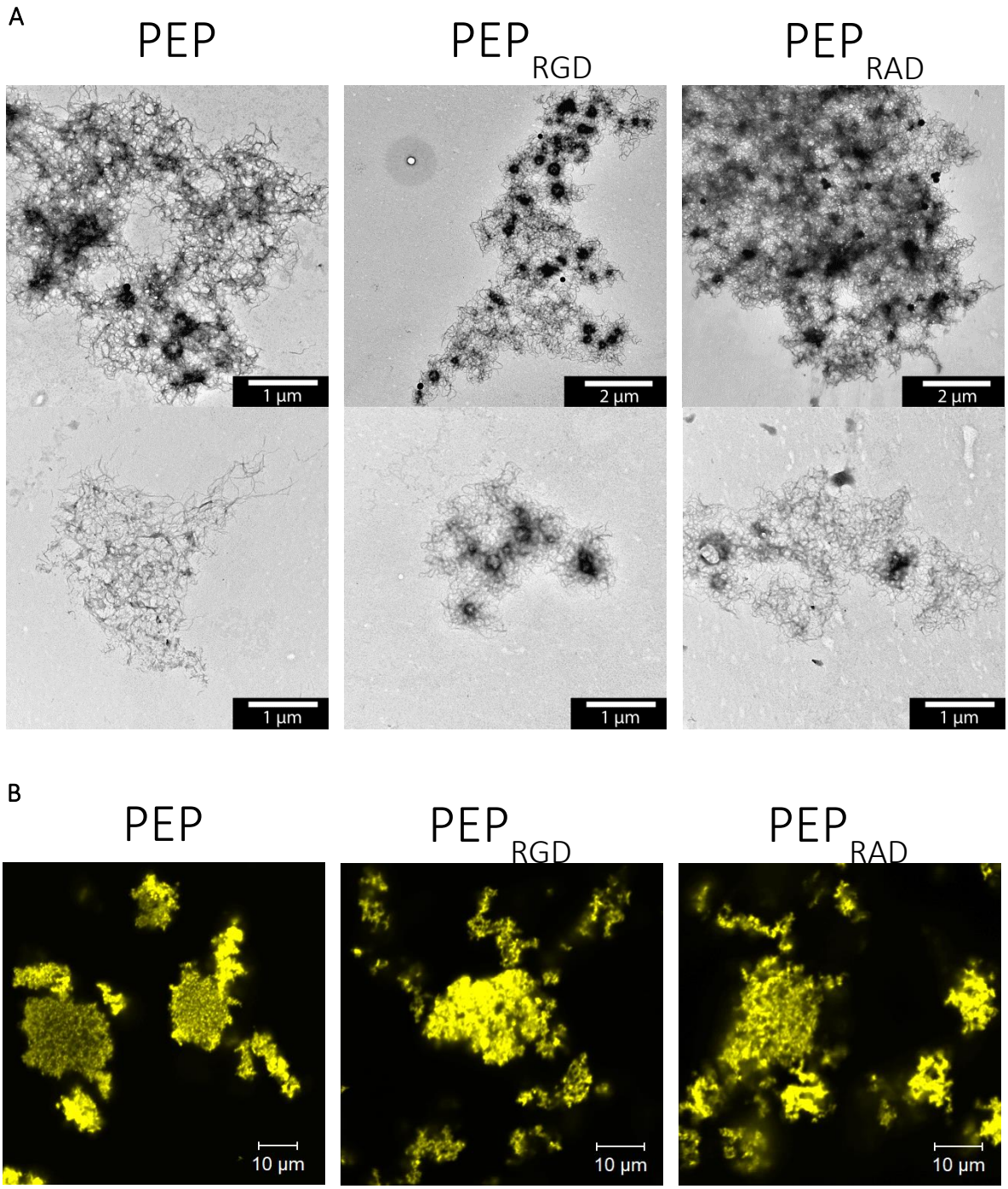


Abbildung 89: (A) TEM Aufnahmen der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}, welche mit 2%-iger Uranylacetatlösung kontrastiert wurden, um einen stärkeren Kontrast der Fibrillen zu erhalten. (B) Konfokalmikroskopische Aufnahmen der ATTO647N-markierten (10 mol%) PNF von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD}.

2. Proteinadsorption

Zur Untersuchung der Proteinadsorption an die unterschiedlichen Systeme wurden diese 24 h bei 37 °C in Puffer mit 10% FCS inkubiert. Lose gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt und die *hard corona* durch Zugabe von SDS abgetrennt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um die Proteine auf den Gelen sichtbar zu machen, wurden diese mit Coomassie-Lösung angefärbt.

In Abbildung 90 sind die beiden nicht gezeigten Gele für die Inkubation der Fibrillen von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mit und ohne 10% FCS dargestellt.

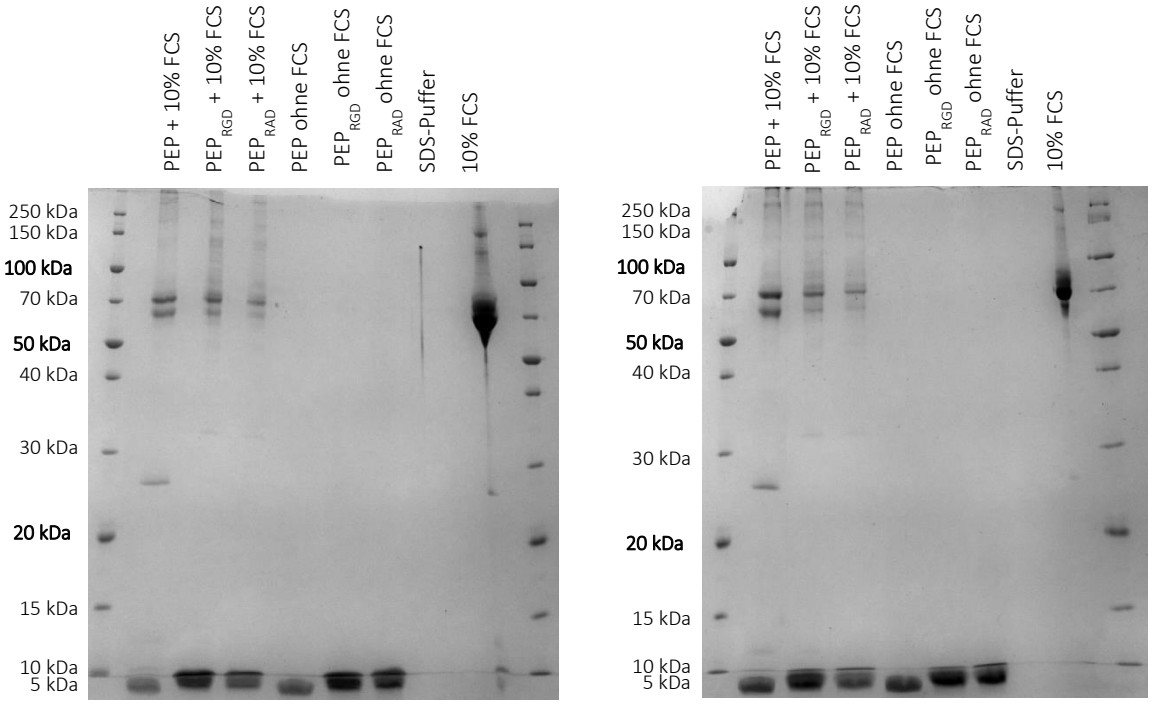


Abbildung 90: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Gele der Fibrillen von PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} nach Inkubation mit und ohne 10% FCS.

Abbildung 91 zeigt die in Kapitel III.5.2 nicht gezeigten Gele für die Proteinadsorption der Fibrillen in Abhängigkeit des eingesetzten RGD-Anteils.

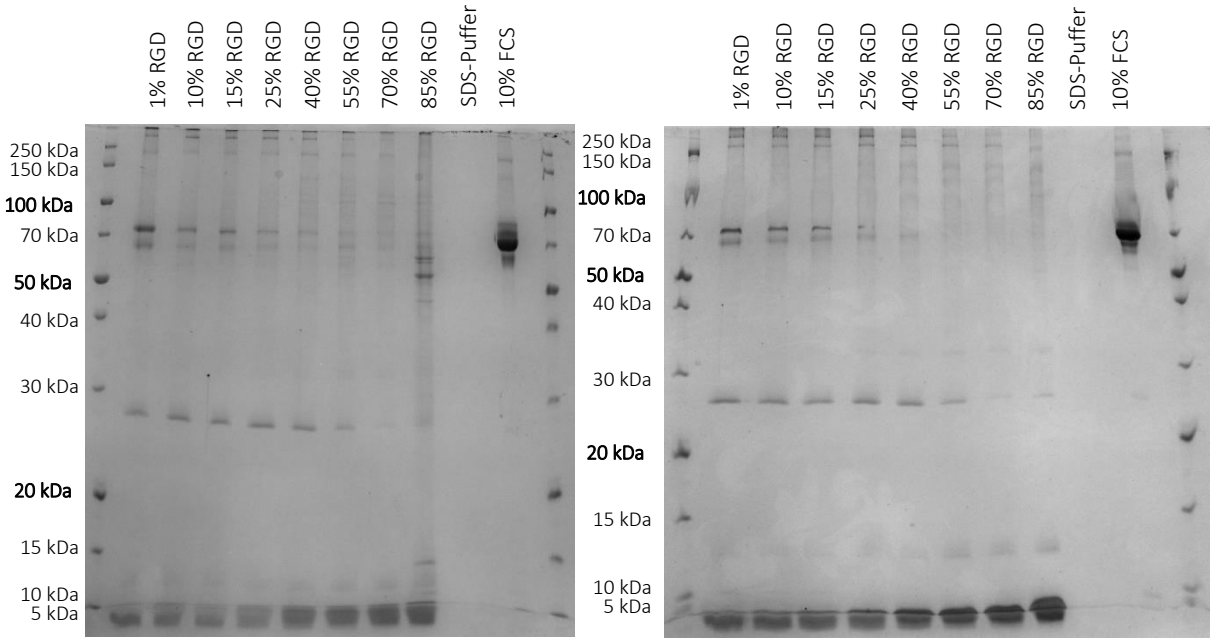


Abbildung 91: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Gele der Proteinadsorption der Fibrillen in Abhängigkeit des RGD-Anteils.

Die Gele zur Untersuchung des Einflusses der nachträglich angelagerten MSN_{COOH} auf die Proteinadsorption an die PNF sind in Abbildung 92 dargestellt.

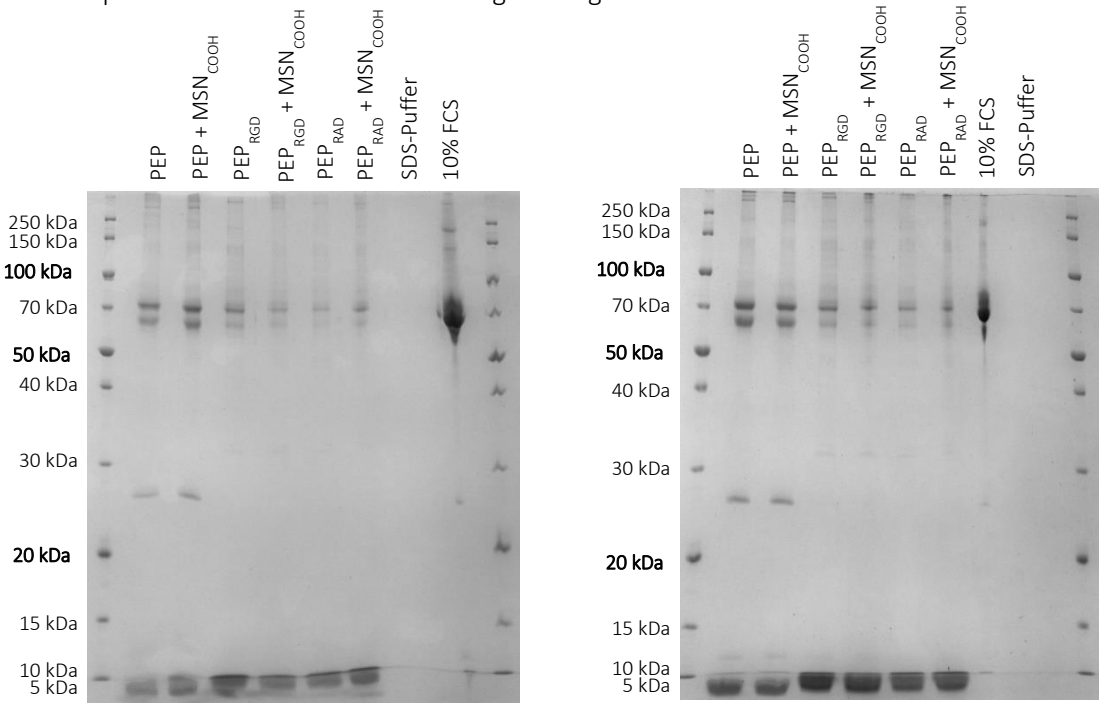


Abbildung 92: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Untersuchung des Einflusses der nachträglich angelagerten Silikapartikel (MSN_{COOH}) auf die Proteinadsorption.

Die Gele der Proteinadsorption von PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}_IS und der reinen MSN_{COOH} werden in Abbildung 93 gezeigt.

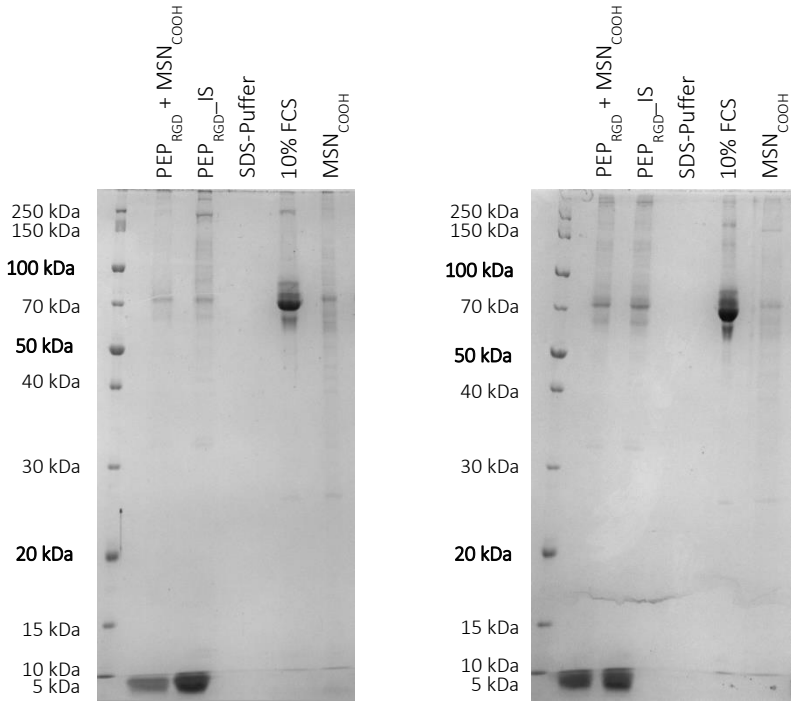


Abbildung 93: Analyse der Zusammensetzung der Proteincorona der Peptidnanofibrillen nach Inkubation für 24 h bei 37 °C in Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,0) mit 10% FCS. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele. Vergleich der Proteinadsorption von PEP_{RGD} mit nachträglich angelagerten MSN_{COOH} und bei Anwesenheit der Partikel bei Inkubation der Fibrillen (PEP_{RGD}_IS).

3. Fluoreszenzmarkierung der MSN_{COOH}

Nachfolgend sind in Abbildung 94 die Fluoreszenzemissionsspektren der ATTO488- (λ_{exc} = 450 nm) und ATTO565-markierten (λ_{exc} = 561 nm) MSN_{COOH} aufgetragen, wobei für beide Partikel ein deutliches Fluoreszenzsignal im erwarteten Wellenlängenbereich erhalten wird.

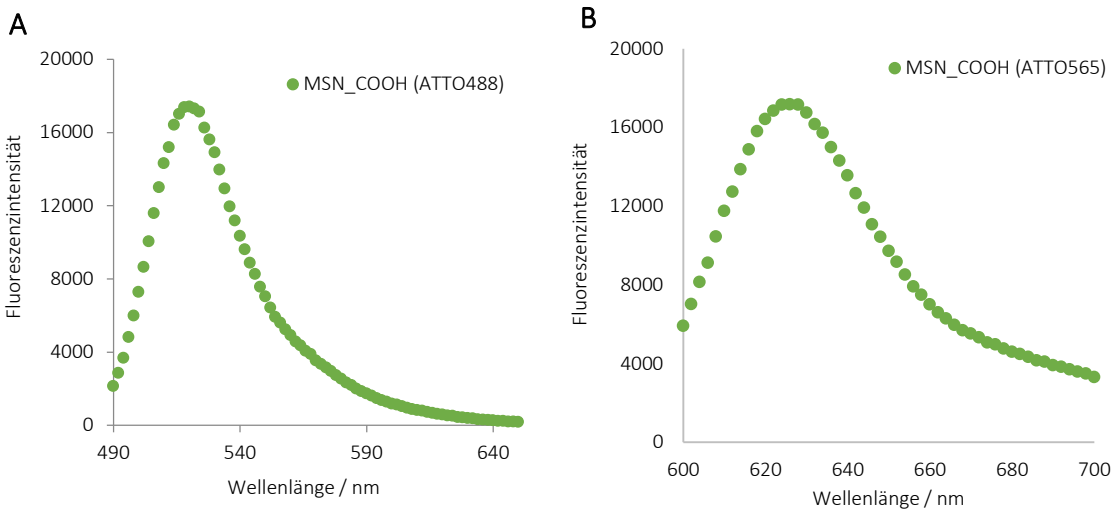


Abbildung 94: Fluoreszenzemissionsspektren der MSN_{COOH}, welche (A) ATTO488-markiert (λ_{exc} = 450 nm) bzw. (B) ATTO565-markiert (λ_{exc} = 561 nm) wurden.

4. Daunorubicinbeladung der Partikel und pH-abhängige Freisetzung

Um die unterschiedlich funktionalisierten Partikel MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} mit Daunorubicin zu beladen, wurden diese 3 h bei 100 °C im Vakuum von adsorbiertem Wasser befreit und anschließend für 24 h bei RT unter ständiger Bewegung mit einer Daunorubicinlösung in trockenem Dichlormethan versetzt. Nach Zentrifugation wurden die Partikel zweimal mit trockenem Dichlormethan gewaschen und die Beladungsgrade der MSNs über UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen der eingesetzten Daunorubicinstocklösung und der Überstände der Beladung sowie der Waschschritte bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 23 aufgelistet. Durch diese Beladungsvorschrift war eine äquivalente Beladung der drei unterschiedlich funktionalisierten Partikel möglich.

Tabelle 23: Für die Partikel MSN_{OH}, MSN_{COOH} und MSN_{NH2} erhaltene Beladungsgrade an neutralisiertem Daunorubicin bei Beladung in trockenem Dichlormethan.

Daunorubicinbeladung	MSN_{OH}	MSN_{COOH}	MSN_{NH2}
Beladung / µg/mg	37,1 ± 4,2	37,1 ± 6,5	37,7 ± 3,2
Beladung / nmol/mg	70,3 ± 8,0	70,3 ± 12,3	71,5 ± 6,0

Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen als Haupttriebkraft für die Wechselwirkung zwischen dem Daunorubicin und den MSNs, sollte eine pH-abhängige Freisetzung beobachtet werden können. In Abbildung 95A ist die Daunorubicinfreisetzung bei einer Partikelkonzentration von 1 mg/mL

bei 37 °C in HEPES-Puffern mit den pH-Werten 7,4, 6,5 und 5,0 dargestellt. Zudem wurde die Freisetzung in HEPES-Puffer mit pH 7,4 und 10% FCS durchgeführt, um den Einfluss von Serumproteinen zu untersuchen.

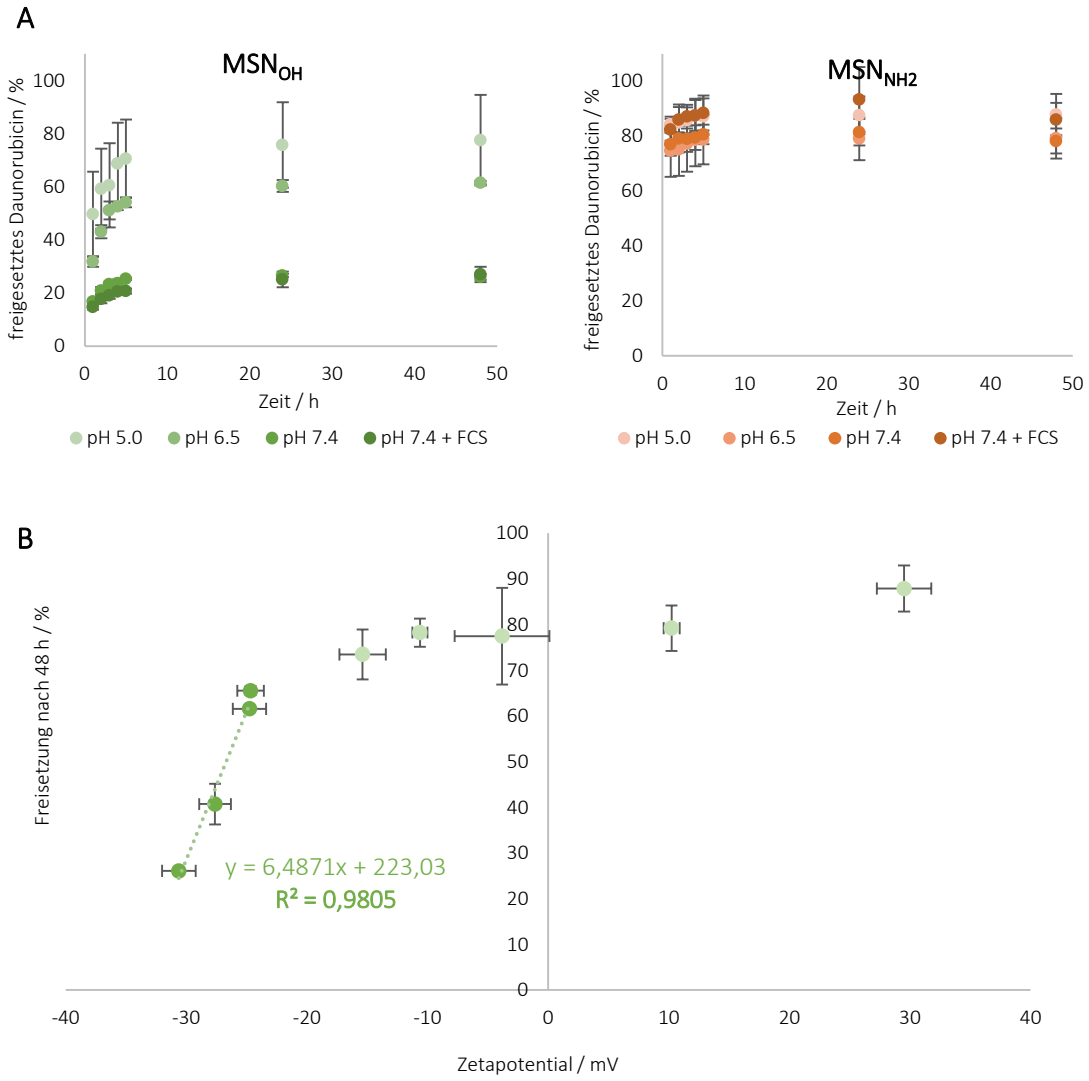


Abbildung 95: (A) Untersuchung der pH-abhängigen Freisetzung des Daunorubicins aus den MSN_{OH} und MSN_{NH2} bei pH 5,0; 6,5 und 7,4 sowie bei Zugabe von 10% FCS bei 37 °C durch UV/Vis-Messungen (λ = 481 nm) der Überstände zu bestimmten Zeiten. (B) Auftragung der nach 48 h freigesetzten Daunorubicinmenge gegen das Zetapotential der Partikel beim jeweiligen pH-Wert.

Während für die Partikel MSN_{OH}_Dauno und MSN_{COOH}_Dauno eine Freisetzung in Abhängigkeit vom pH-Wert der verwendeten Pufferlösung beobachtet werden kann, wird dieses im Falle der MSN_{NH2}_Dauno-Partikel pH-unabhängig freigesetzt. Hierbei kommt es bereits innerhalb der ersten Stunde zu einer nahezu vollständigen Auswaschung des Wirkstoffes für alle untersuchten pH-Werte.

Grund für diese schnelle Auswaschung aus den aminfunktionalisierten Partikeln kann die positive Oberflächenladung dieser sein. Diese kann mit den Sauerstoffen des Daunorubicins gut wechselwirken, was zu einem relativ hohen Beladungsgrad der Partikel führt. Kommen die Partikel allerdings mit dem protischen Lösemittel HEPES-Puffer in Kontakt, kann es zur Protonierung der primären Aminfunktion des Daunorubicins kommen, was starke repulsive Wechselwirkungen zwischen dem protonierten Daunorubicin und den Aminfunktionen der MSN_{NH2} hervorruft und zusätzlich die Wasserlöslichkeit des Daunorubicins erhöht, was in einer schnellen Freisetzung des Zytostatikums resultiert. Im Falle der MSN_{OH} und MSN_{COOH} können die deprotonierten Hydroxyl- sowie Carboxylgruppen mit der protonierten Aminfunktion des Daunorubicins sehr gut wechselwirken, wodurch es zu einer abgeschwächten Freisetzung bei neutralem pH kommt. Erst durch Herabsetzen des pH-Wertes kommt es zunächst zur Protonierung der Hydroxylgruppen und anschließend der Carboxylgruppen. Hierdurch werden die Wechselwirkungen abgeschwächt, wodurch eine Freisetzung des Wirkstoffes hervorgerufen wird, welche nach 5 h bereits nahezu ihr Maximum erreicht hat. Trägt man nun die Zetapotentiale der unterschiedlichen Partikel gegen die nach 48 h jeweils freigesetzte Menge an Daunorubicin auf (Abbildung 95B), so wird zu Beginn ein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen deutlich, welcher schließlich in ein Sättigungsplateau überläuft. Hierbei kommt es zu einer maximalen Freisetzung von ungefähr 80% des eingelagerten Wirkstoffes, sobald das Zetapotential der Partikel über -15 mV steigt.

5. Mechanismus der DiO-Freisetzung ins Innere der Zellen

Um die Partikelanzahl zu bestimmen, welche von den A549-Zellen aufgenommen wurden, ist es sinnvoll die extrazellulär angebundenen fluoreszenzmarkierten Partikel in ihrer Fluoreszenz zu hemmen, indem man sogenannte *Quencher* hinzugibt. Für die hier verwendeten ATTO488-markierten MSN_{COOH} wurde Trypanblau auf seine Eignung als *Quencher* untersucht. Hierzu wurden die Partikel in An- und in Abwesenheit der PNF für 10 min bei RT mit unterschiedlich stark konzentrierten Trypanblaulösungen inkubiert und anschließend deren Fluoreszenz (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm) vermessen. In Abbildung 96 ist eine deutliche Abnahme in den Fluorezenzeigenschaften der Partikel in Abhängigkeit der verwendeten Trypanblaukonzentration zu beobachten. Dabei scheinen die Fibrillen die Partikel keineswegs vor dem Quencheffekt zu schützen. Da Trypanblau von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird, bleiben Partikel im Inneren der Zellen von diesem Effekt unbeeinflusst.

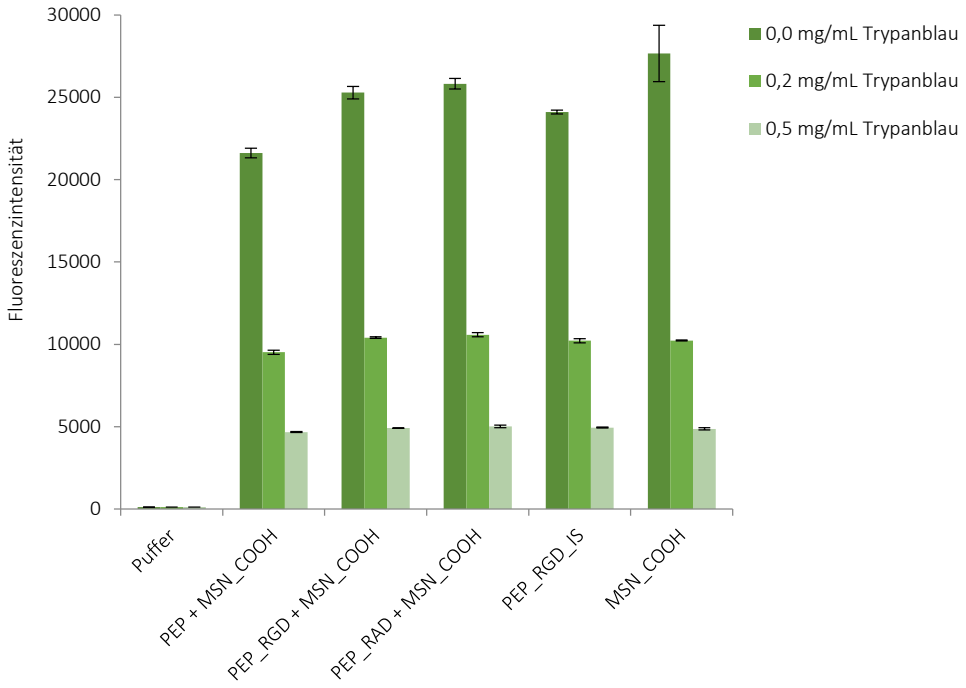


Abbildung 96: Untersuchung des *Quenching*-Effekts von unterschiedlich konzentrierten Trypanblaulösungen auf die Fluoreszenzintensität von ATTO488-markierten MSN_{COOH} in den Systemen der Fibrillen PEP, PEP_{RGD} und PEP_{RAD} mit jeweils nachträglich angelagerten MSN_{COOH}, PEP_{RGD}_IS sowie der reinen MSN_{COOH}. Die Proben wurden für 10 min bei RT mit den Trypanblaulösungen inkubiert und anschließend fluoreszenzspektroskopisch untersucht (λ_{exc} = 485 nm; λ_{em} = 535 nm).

Der Einfluss der Partikelauflösung und die daraus folgende DiO-Freisetzung und -Diffusion ins Zellinnere kann anhand eines einfachen Zellexperiments überprüft werden. Hierzu wurden die Partikel bei einer Konzentration von 8 µg/mL in Zellmedium für 24 h bei 37 °C gedreht. Anschließend wurden die Partikel über Zentrifugation abgetrennt und die Überstände zu den A549-Zellen gegeben und weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Da der hydrolytische Abbau im Falle des PEP_{RGD}_IS gehemmt wird, wurde dieses System analog zu den reinen Partikeln untersucht. In Abbildung 97 sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse der DiO-Menge in den Zellen dargestellt.

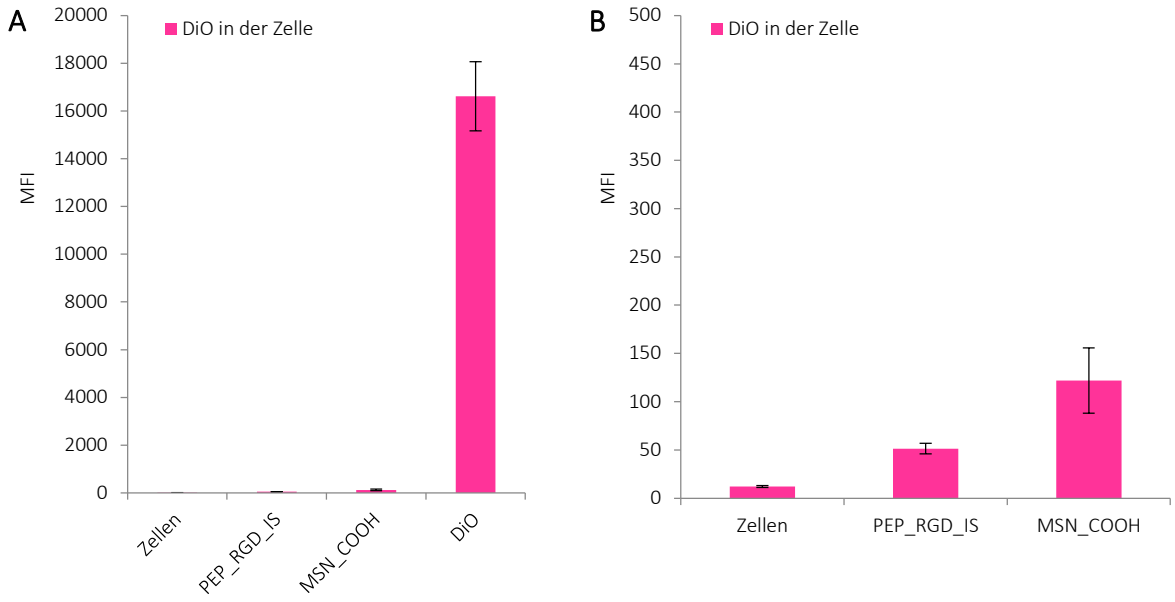


Abbildung 97: Untersuchung der DiO-Freisetzung in A549-Zellen durch die Auflösung der Partikel. Hierzu wurden die MSN_{COOH} sowie PEP_{RGD}_IS mit einer Partikelkonzentration von 8 µg/mL in Zellmedium für 24 h bei 37 °C inkubiert, anschließend zentrifugiert und die Überstande bzw. freies DiO als Referenz zu den Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation mit den Zellen bei 37 °C wurden die Proben für 30 min mit 4%-iger PFA-Lösung fixiert und durchflusszytometrisch vermessen. (A) Darstellung inklusive DiO als Referenz und (B) ohne DiO-Referenz.

In Abbildung 97A wird im Vergleich mit der intrazellulären DiO-Menge bei Einsatz von freiem DiO schnell ersichtlich, dass kaum DiO durch Partikelauflösung und anschließende Diffusion in die Zellen gelangt. Betrachtet man die minimalen Mengen durch Partikelauflösung in die Zellen gelangten DiOs genauer (Abbildung 97B), wird deutlich, dass im Fall der freien MSN_{COOH}_DiO mehr DiO in den Zellen vorzufinden ist als für das PEP_{RGD}_IS. Dies kann auf den herabgesetzten hydrolytischen Abbau der Partikel im Inneren der Fibrillennetzwerke zurückgeführt werden. Da der Partikelabbau für PEP_{RGD}_IS nach 24 h lediglich bei der Hälfte der abgebauten Menge im Falle der freien MSN_{COOH} liegt (Kapitel III.5.1.1), wird auch lediglich halb so viel DiO für die Diffusion in die Zellen freigesetzt, was sich sehr gut mit den erhaltenen durchflusszytometrischen Ergebnissen deckt.

X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank folgenden Personen:

- Prof. Dr. Mika Lindén, der mir ermöglicht hat, dieses interessante Thema meiner Promotion bearbeiten zu können und mir durch die Bereitstellung der verschiedenen Untersuchungsmethoden die Möglichkeit gab, diese Aufgabe bestmöglich zu bearbeiten. Vielen Dank auch für die stets offen stehende Tür für jegliche wissenschaftliche Diskussion oder Hilfestellung und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

- Prof. Dr. Tanja Weil als Kooperationspartnerin meiner Promotionsarbeit sowie für die Übernahme meines Zweitgutachtens.

- Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Anorganische Chemie II für die tolle Arbeitsatmosphäre und eine wunderschöne Promotionszeit. Zudem möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft bedanken, welche mir viel geholfen hat. Danke auch an all meine Studenten, die im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten oder Projektpraktika einen bedeutenden Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

- Meinen Laborpartner Markus, der mir stets bei Fragen zur Seite stand und für eine lustige und schöne Zeit im Labor gesorgt hat. Dankeschön!

- Zusätzlich möchte ich Christina Stürzel für die Unterstützung und das Messen meiner FACS-Proben, Tobias Braun für die Messung meiner ICP-Proben sowie Felix Pascher für die Hilfestellung bei der Durchführung der Gelelektrophorese danken. Ein großer Dank geht auch an die Zentrale Einrichtung für Elektronenmikroskopie der Universität Ulm sowie dem Institut für Molekulare Virologie für die Bereitstellung und Einarbeitung an ihren Geräten.

- Außerdem möchte ich meinen Studienfreunden für die vielen tollen Filmabende und die tolle Zeit während des Studiums danken. Und auch an meine Freunde aus dem privaten Umfeld geht ein großes Dankeschön.

- Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für die großartige Unterstützung und Motivation während meiner gesamten Studienzeit und vor allem während meiner Promotion. Dankeschön! ♥

XI. Curriculum Vitae

Melanie Gerstenberg
geboren 1991 in Freyung (Deutschland)

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

09/2015-09/2019	Promotion an der Universität Ulm, Institut für Anorganische Chemie II Abschluss: *Doktor rerum naturalium (Chemie)* Doktorarbeit: Modulares Wirkstofftransportsystem auf Basis von Peptidnanofibrillen und mesoporösen Silikananopartikeln
10/2013-06/2015	Studium im Masterstudiengang Chemie an der Universität Ulm Abschluss: *Master of Science (Chemie)* Masterarbeit: Peptidnanofibrillen als Wirkstofftransportsystem für Doxorubicin und als Optimierung des Transports durch Silikananopartikel
10/2010-10/2013	Studium im Bachelorstudiengang Chemie an der Universität Ulm Abschluss: *Bachelor of Science (Chemie)* Bachelorarbeit: Synthese und Übergangsmetallkatalysierte carbenoide Folgereaktionen neuer 2-Diazo-3-oxo-5-(alkylthio)pentansäureethylester

SCHULAUSBILDUNG

2000-2010	Joachim-Hahn-Gymnasium, Blaubeuren → Allgemeine Hochschulreife
1997-2000	Heinrich-Kaim-Schule, Schelklingen

BERUFSPRAXIS

seit 11/2019	Manager Project Analytics bei Vetter Pharma Ravensburg Leitung von (Teil-)Projekten
04/2014-06/2020	Externer Dienstleister bei der BASF Illertissen Programmierungen mit Excel, Einführung von OSI-PI, Erstellung von automatisierten Herstell- und Abfüllprotokollen
09/2015-09/2019	Lehrassistenz: Seminare und Praktika in der anorganischen Chemie
09/2015-09/2019	Betreuung von Bachelor- und Masterstudenten
09/2013	Ferienarbeit bei der BASF Illertissen Programmierungen mit Excel, Einführung von OSI-PI, Erstellung von automatisierten Herstell- und Abfüllprotokollen
08/2012-10/2012	Praktikum bei der BASF Illertissen Programmierungen mit Excel, Einführung von OSI-PI, Einblick in verschiedene Chemielabore
05/2010-08/2012	Bürohilfskraft bei IZS Personal Ehingen

QUALIFIKATIONEN

07/2019	„GMP Basisschulung Pharma“ Interaktive Schulung der Concept Heidelberg GmbH
10/2012-04/2013	„Entwicklung, Zulassung und Überwachung von Arzneimitteln“ Seminar des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
09/2008-02/2009	„Entwicklung einer Werbekampagne“ Jugendbegleitprogramm der IHK Ulm

XII. Publikationen und Posterpräsentationen

PUBLIKATIONEN

- *„In vitro Targetability Validation of Peptide-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles in the Presence of Serum Proteins“*, V. M. Paramonov, M. Gerstenberg, C. Sahlgren, M. Lindén, A. Rivero-Müller, Front. Chem., **2020**, *8*:603616. doi: 10.3389/fchem.2020.603616

POSTERPRÄSENTATIONEN

- *28. Deutsche Zeolith-Tagung in Gießen*, 02.03.-04.03.2016
  Titel: Modular drug delivery systems based on peptide nanofibrils and mesoporous silica nanoparticles
- *29. Deutsche Zeolith-Tagung in Frankfurt am Main*, 01.03.-03.03.2017
  Titel: Modular drug delivery systems based on peptide nanofibrils and mesoporous silica nanoparticles
- *31. Deutsche Zeolith-Tagung in Dresden*, 06.03.-08.03.2019
  Titel: Modular drug delivery systems based on peptide nanofibrils and mesoporous silica nanoparticles