

Aus dem Institut für Radiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Magnetische Nanopartikel mit therapeutisch wirksamen
zellpenetrierenden Peptiden für die zielgerichtete
Pharmakotherapie der Dysferlinopathie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alejandro Xavier León Betancourt

aus Guayaquil, Ecuador

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	XI
ABSTRACT	XIII
1 EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG	1
1.1 NANOTHERAPEUTIKA.....	2
1.2 DYSFERLINOPATHIE.....	2
1.1.1 KRANKHEITSBILD.....	2
1.1.2 DYSFERLIN.....	3
1.1.3 FUNKTION VON DYSFERLIN	4
1.1.4 PATHOPHYSIOLOGIE DER DYSFERLINOPATHIE	4
1.1.5 AKTUELLE BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN UND FORSCHUNGSSTAND	5
1.3 ZELLPENETRIERENDE PEPTIDE (CPP)	6
1.4 GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZ UND FLUORESZENZAUSLÖSCHUNG.....	9
1.5 GRUNDLAGEN DER MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE	10
1.6 SUPERPARAMAGNETISCHE NANOPARTIKEL.....	12
1.5.1 STABILITÄT NANOPARTIKEL-SUSPENSIONEN UND ZETA-POTENZIAL.....	13
1.5.2 UNTERSUCHTE NANOPARTIKEL.....	16
1.5.3 ANWENDUNGEN VON SPION	19
2 ZIELSTELLUNG	26
3 METHODEN.....	27
3.1 CHEMIKALIEN UND SUBSTANZEN.....	27
3.1.1 ZELLPENETRIERENDE PEPTIDE (CPP)	27
3.1.2 SUPERPARAMAGNETISCHE EISENOXID-NANOPARTIKEL (SPION)	29

3.2	GERÄTE UND MESSMETHODEN.....	30
3.2.1	DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG (DLS).....	30
3.2.2	ZETA-POTENZIAL	31
3.2.3	FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	31
3.2.4	RELAXIVITÄTSMESSUNGEN.....	32
3.2.5	AGAROSE-GEL.....	33
3.2.6	MIKROSKOPIE	35
3.2.7	ELEKTROSTATISCHE BELADUNG DER NANOPARTIKEL.....	36
3.2.8	ZELLKULTUREXPERIMENTE	37
3.2.9	TIERVERSUCHE	39
3.3	STATISTIK	41
4	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>43</u>
4.1	ELEKTROSTATISCHE BELADUNG DER NANOPARTIKEL.....	43
4.1.1	BELADUNG VON VSOP	43
4.1.2	BELADUNG VON FERUMOXYTOL	47
4.2	STABILITÄT IN IONISCHEN LÖSUNGEN.....	49
4.2.1	STABILITÄT UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.....	49
4.2.2	STABILITÄT UNTER ZUNEHMENDER IONENSTÄRKE	53
4.3	STABILITÄT IN SERUM-RELAXOMETRIE-MESSUNGEN	54
4.4	EINFLUSS DER SERUMPROTEINE AUF DIE PEPTIDFREISETZUNG.....	57
4.5	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	60
4.6	ZELLEXP. – PEPTIDABGABE UND -AUFNAHME	63
4.6.1	ZEIT BIS ZUM EINTRITT IN DIE ZELLEN.....	63
4.6.2	PEPTIDABGABE UND EINTRITT IN DIE ZELLEN.....	67
4.7	ORIENTIERENDE PHARMAKOKINETIK.....	73
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>79</u>
5.1	BELADUNG DER NANOPARTIKEL UND KOLLOIDALE STABILITÄT	79
5.2	ADSORPTIONS- UND SUSPENSIONSSTABILITÄT IN BIOLOGISCHEN MEDIEN	85
5.3	PEPTIDABGABE UND INTERNALISIERUNG.....	89
5.4	ORIENTIERENDE PHARMAKOKINETIK.....	91
5.5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	93

LITERATURVERZEICHNIS..... 95

LEBENS LAUF..... 119

DANKSAGUNG 121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Internalisierung von zellpenetrierenden Peptiden CPP	7
Abbildung 2: Interaktion der Guanidinium-Kationen der Seitenketten von Arginin mit den funktionellen Gruppen benachbarter Strukturen.....	8
Abbildung 3: Nanopartikel mit elektrochemischer Doppelschicht.....	14
Abbildung 4: Modell eines very small iron oxide particle (VSOP).....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Citrat-Ionen auf der Eisenoxid-Kernoberfläche	17
Abbildung 6: chemische Struktur des Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylethers (PSC) in Ferumoxytol.....	18
Abbildung 7: schematische Darstellung eines sterisch stabilisierten Nanopartikels mit Carboxy-Methyl-Dextran Ketten.....	18
Abbildung 8: SPION-Suspensionen	29
Abbildung 9: VSOP-Beladung mit ATTO495-TDP – Größe und Fluoreszenzintensität.....	43
Abbildung 10: Beispiel einer stabilen und einer instabilen Nanopartikel-Suspension.....	43
Abbildung 11: VSOP-Beladung mit Dy557-TDP – Größe und Fluoreszenzverhältnis	44
Abbildung 12: VSOP-Beladung mit cIDCC-TDP – Größe und Fluoreszenzverhältnis.....	45
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der makroskopischen Eigenschaften der Nanopartikel-Suspensionen von VSOP mit cIDCC-TDP.....	45
Abbildung 14: Ferumoxytol-Beladung mit ATTO495-TDP – Größe und Fluoreszenzintensität	47
Abbildung 15: Ferumoxytol-Beladung mit Dy557-TDP – Größe und Fluoreszenzverhältnis	47
Abbildung 16: Ferumoxytol-Beladung mit cIDCC-TDP – Größe und Fluoreszenzverhältnis	48
Abbildung 17: Größenänderung der VSOP im physiologischen Puffer bei unterschiedlicher Beladung mit ATTO495-TDP, Dy557-TDP oder cIDCC-TDP	50
Abbildung 18: Größenänderung der VSOP im physiologischen Puffer bei unterschiedlicher Beladung mit ATTO495-TDP oder Dy557-TDP	51
Abbildung 19: Größen- und Fluoreszenzänderung von ATTO-TDP:Ferumoxytol mit zunehmender Ionenstärke	52
Abbildung 20: Relation des hydrodynamischen Durchmessers und der transversalen Relaxivität r_2 von cIDCC-TDP:VSOP.....	53
Abbildung 21: Veränderung der transversalen Relaxivität r_2 von cIDCC-TDP:VSOP bei zunehmender Inkubationsdauer im fötalen Kalbsserum (FCS).....	54
Abbildung 22 Relation des hydrodynamischen Durchmessers und der transversalen Relaxivität r_2 von cIDCC-TDP:Ferumoxytol.....	54

Abbildung 23: Veränderung der transversalen Relaxivität r_2 von cIDCC-TDP:Ferumoxytol bei zunehmender Inkubationsdauer im fötalen Kalbsserum (FCS).....	55
Abbildung 24: Dy557-TDP:VSOP und cIDCC-TDP:VSOP nach Resuspension mit fötalem Kälberserum (FCS).....	55
Abbildung 25: Abnahme des Quenching-Effekts nach Resuspension der mit cIDCC-TDP beladenen Nanopartikel in fötalem Kälberserum	57
Abbildung 26: Zeitliche Änderung des Quenching-Effekts der cIDCC-TDP:VSOP Nanopartikel in fötalem Kälberserum (FCS) bei unterschiedlicher Beladung	57
Abbildung 27: Abnahme des Quenching-Effekts der cIDCC-TDP:VSOP (FCS) bei Zunahme der Ionenstärke.....	58
Abbildung 28: Agarose-Gelelektrophorese von ATTO495-TDP und Dy557-TDP als freie Peptide oder adsorbiert an SPION (VSOP bzw. Ferumoxytol)	59
Abbildung 29: Agarose-Gelelektrophorese von cIDCC-TDP als freie Peptide oder adsorbiert an SPION (VSOP bzw. Ferumoxytol)	60
Abbildung 30: Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese-Experimente der Ferumoxytol-Partikel.	61
Abbildung 31: Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese-Experimente der Very small iron oxide particle (VSOP).....	62
Abbildung 32: Verlauf der Internalisierung von cIDCC-TDP in Myotuben.....	63
Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der intrazellulären Akkumulation von cIDCC-TDP in gesunden Myotuben im zeitlichen Verlauf.....	64
Abbildung 34: Verlauf der Internalisierung von Dy557-TDP in Myotuben	65
Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der intrazellulären Akkumulation von Dy557-TDP in gesunden Myotuben im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 36: Intrazelluläre Akkumulation von cIDCC-TDP.....	67
Abbildung 37: Intrazelluläre Akkumulation von Dy557-TDP	67
Abbildung 38: Z-Stack Aufnahme einer Myotube mit freiem cIDCC-TDP (cIDCC-TDP gelb, Hoechst-Kernfärbung blau)	68
Abbildung 39: Z-Stack-Aufnahme einer Myotube mit freiem Dy557-TDP (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau)	68
Abbildung 40: Z-Stack Aufnahme einer Myotube mit cIDCC-TDP:Ferumoxytol (cIDCC-TDP gelb, Hoechst-Kernfärbung blau).....	69
Abbildung 41: Z-Stack-Aufnahme einer Myotube mit Dy557-TDP:Ferumoxytol (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau).....	69

Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme einer Myotube mit cIDCC-TDP:VSOP (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau).....	70
Abbildung 43: Z-Stack Aufnahme einer Myotube mit Dy557-TDP:VSOP (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau)	71
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Pharmakokinetik-Experimente	72
Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf der cIDCC-TDP:Ferumoxytol-Fluoreszenzintensität in Körperflüssigkeiten Dysferlin-defizienter Mäuse.....	74
Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf der cIDCC-TDP:VSOP-Fluoreszenzintensität in Körperflüssigkeiten Dysferlin-defizienter Mäuse.....	75
Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf der Dy557-TDP auf VSOP-Fluoreszenzintensität in Körperflüssigkeiten Dysferlin-defizienter Mäuse.....	76
Abbildung 48: Fluoreszenzphotometrischer Nachweis von cIDCC-TDP in lysiertem Muskelgewebe [100 µg Protein].....	77
Abbildung 49: Schematische Darstellung des Größen-Beladungsverhältnisses	81
Abbildung 50: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht nach dem Grahame-Modell.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TAT-Dysferlin-Peptid (TDP)	27
Tabelle 2: Fluorophor-markierte TAT-Dysferlin-Peptide (TDP)	28
Tabelle 3: Eigenschaften der Fluorophore	28
Tabelle 4: Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION).....	29
Tabelle 5: Physiologische Pufferlösung.....	30
Tabelle 6: Einstellungen Fluoreszenzphotometer	31
Tabelle 7: Verwendete beladene Nanopartikel mit Anzahl an Fluorophor-TDP pro SPION und Größe (hydrodynamischer Durchmesser in Aqua. dest.) der Partikel	43
Tabelle 8: Eigenschaften von VSOP.....	47
Tabelle 9: Halbwertszeit der TDP-SPION in Mäusen bei einer Dosis von 500µmol Fe/kg Körpergewicht.....	74
Tabelle 10: Ergebniszusammenfassung der untersuchten TDP-SPION	80

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\chi$	Suszeptibilitätsänderung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATTO495	Fluoreszenzfarbstoff ($\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$)
A/V-Verhältnis	Oberflächen/Volumen-Verhältnis
cIDCC	Fluoreszenzfarbstoff ($\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$)
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CPP	zellpenetrierende(s) Peptid(e)
Da	Dalton (Größeneinheit für Proteine)
DDS	Wirkstofftransportsystem
DLS	dynamische Lichtstreuung
Dy557	Fluoreszenzfarbstoff ($\lambda_{em}=578\text{nm}$)
DYSF	Bezeichnung für das Dysferlin-Gen
$\Delta\text{Fluo(i-e)}$	Differenz der Fluoreszenz intra- und extrazellulär
EPR	enhanced permeability and retention
ERAD	Endoplasmatisches Reticulum assoziierte Degradation
FDA	Food and Drug Administration
FCS	fötales Kälberserum
FID	free induction decay
Gd	Gadolinium
GRE	Gradienten-Echo Sequenz
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV-1	humanes Immundefizienz-Virus 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>I</i> oder IS	Ionenstärke
KG	Körpergewicht
ω_0	Lamor-Frequenz
Em	Anregungswellenlänge
Ex	Detektionswellenlänge
LGMD	Gliedergürtelmuskeldystrophie
B_0	Magnetfeld
MDD	magnetic drug delivery (magnetische Wirkstofflieferung)
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PGM	phase gradient mapping
PMO	Peptid Morpholino Oligomere
PSC	Polyglukose-Sorbitol Carboxymethylether (modifiziertes Carboxydextran von Ferumoxytol)
r_1	longitudinale Relaxivität
r_2	transversale Relaxivität
RF	Radiofrequenz
SMCGM	skeletal muscle cell growth medium
SE	Spin-Echo Sequenz
SGM	susceptibility gradient mapping
SI	Internationales Einheitensystem
SPION	superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel
SWI	susceptibility weighted imaging

T₁.....longitudinale (Spin-Gitter) Relaxationszeit
T₂.....transversale (Spin-Spin) Relaxationszeit
Tat Trans-Activator of Transcription (gesamtes Protein)
TAT..... zellpenetrierendes Peptid aus dem Protein Tat
TDP.....TAT-Dysferlin-Peptid
UPR..... unfolded protein response
VSOP.....very small iron oxide particles

Zusammenfassung

Hintergrund: Dysferlinopathie ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Muskelkrankheit verursacht durch Mutationen im Dysferlin-Gen. Das Membranprotein Dysferlin ist an Kalzium-abhängigen Reparaturprozessen von Membranmikroläsionen beteiligt. Ein Drittel der Mutationen sind Missense-Mutationen, die zur Fehlfaltung, zum vorzeitigen Abbau sowie zu einer intrazellulären Akkumulation von Proteinen führen können. Kleine (10 Aminosäuren) Dysferlin-spezifische Peptide mit einer angefügten zellpenetrierenden Sequenz (TAT-Sequenz) ermöglichen *in vitro* in Muskelzellen von Dysferlinopathie-Patienten eine Relokalisation des mutierten Dysferlins an die Muskelmembran und seine Funktionswiederherstellung. Systemisch applizierte TAT-Peptide zeigen jedoch eine unspezifische Biodistribution, einen schnellen Abbau und eine rasche Exkretion. Nanopartikel sollten in diesem Projekt als Wirkstofftransportsysteme untersucht werden. Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) ermöglichen zusätzlich die bildgebende Lokalisierung (Magnetresonanztomographie) und die magnetische Steuerung ins Zielgewebe.

Methodik: TAT-Peptide wurden an zwei unterschiedliche SPION gekoppelt: Very small iron oxide particles (VSOP) und Ferumoxytol. Die reversible Beladung basierte auf einer elektrostatischen Adsorption der Peptide auf den Nanopartikeln. Eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen diente der Detektion der Peptide im Zielgewebe bzw. in den Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und den *in-vitro*-Untersuchungen der Nanopartikel.

Für die Bestimmung der Beladungskapazität der Nanopartikel sowie deren Stabilität in Wasser und unter physiologischen Bedingungen (physiologische Pufferlösung, Serum) wurde die Größe sowie die Fluoreszenzauslöschung und Relaxivität der beladenen Nanopartikel in unterschiedlichen Suspensionsmedien *in vitro* untersucht. Die Nanopartikelstabilität wurde im Serum mittels Relaxivitäts- und Fluoreszenzmessungen sowie mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. In Zellkultur wurde die Verträglichkeit und Peptidabgabe *in vitro* analysiert. In einem Dysferlinopathie-Mausmodell wurde nach i.v.-Verabreichung eine orientierende Bluthalbwertszeit einzelner Nanopartikel fluoreszenzphotometrisch mit Blutproben ermittelt. Zusätzlich wurde der histologische Nachweis im Zielgewebe untersucht.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass eine Beladung durch elektrostatische Adsorption von kleinen TAT-Peptiden auf SPION möglich ist. VSOP und Ferumoxytol ließen sich mit je 3 und 16 Peptide stabil beladen. Die Suspensions- und Adsorptionsstabilität wurde stark von externen Faktoren (Ionenstärke, Serumproteine) beeinflusst. Die Peptidadsorption blieb rever-

sibel und diese wurden in biologischen Suspensionsmedien abgegeben. Beladene VSOP zeichnete sich im Vergleich zu Ferumoxytol durch eine stärkere Peptidadsorption aus, aber tendierte mehr zur Aggregation in biologischen Suspensionsmedien.

Die ermittelte Bluthalbwertszeit der SPION-Peptid-Partikel war kürzer als die der unbeladenen SPION. Histologisch ließen sich die Nanopartikel im Zielgewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht darstellen. Fluoreszenzphotometrisch gelang der Nachweis von geringen Mengen an Peptide in lysierten Muskelproben.

Schlussfolgerung: Trotz erfolgreicher elektrostatischer Peptidbeladung der Nanopartikel bleibt die Stabilität und kontrollierte Wirkstoffabgabe problematisch. Für den Einsatz *in vivo* stellen zusätzlich die Biodistribution und Bluthalbwertszeit der beladenen SPION große Herausforderungen dar. Zudem sind die spezifischen physiologischen Gegebenheiten im Zielgewebe entscheidend für den Erfolg des Wirkstofftransportes.

Abstract

Background: Mutations in the dysferlin gene cause Dysferlinopathy, a rare autosomal recessive muscle-disease. Dysferlin is a membrane-bound protein involved in the calcium-dependent repair of sarcolemmal microlesions. One third of all mutations are missense mutations leading to protein misfolding, premature protein degradation and intracellular protein accumulation. Small (10 amino-acids) dysferlin-specific peptides coupled to a cell-penetrating sequence (TAT-sequence) allow *in vitro* the reallocation to the sarcolemma and functional restoration of mutated dysferlin in myotubes from patients. Systemically administered TAT-peptides show nonselective biodistribution, as well as fast degradation and excretion. Therefore, nanoparticles were investigated for this project as drug-delivery-system. Particularly, iron oxide nanoparticles (SPION) allow localization with magnetic resonance imaging and magnetic steering to the targeted tissue.

Methods: TAT-peptides were loaded on two different SPION: VSOP and Ferumoxytol. Coupling was reversible by electrostatic adsorption to the SPION. A fluorescence-tag allowed their detection in tissue and cell culture with fluorescence microscopy and their analysis *in vitro*.

To determine the loading capacity of the nanoparticles and their stability in water and under physiological circumstances (physiological buffer, serum) the hydrodynamic diameter, fluorescence quenching and relaxivity of the loaded nanoparticles in different suspensions were assessed. The stability of the nanoparticles in serum was analyzed using relaxivity and fluorescence measurements additionally to agarose gel electrophoresis. In cell culture tolerability and peptide release *in vitro* were assessed. A preliminary blood half-life of selected nanoparticles was determined spectrofluorometric using blood probes from dysferlin-deficient mice after i.v.-administration. Additionally, the histological detection in the targeted tissue was evaluated.

Results: The results show that loading of SPION by electrostatic adsorption of small TAT-peptides is possible. VSOP and Ferumoxytol could be loaded with 3 and 16 peptides respectively. Nanoparticle stability was strongly dependent on external factors (ionic strength, serum proteins). The adsorption remained reversible and TAT-peptides detached in biological suspensions. Loaded VSOP showed compared to Ferumoxytol a stronger peptide binding but were prone to aggregation in biological suspensions.

The measured blood half-life of SPION-peptide-particles was shorter than that of unloaded SPION. Histologically TAT-peptides could not be detected in the targeted tissue with fluorescence microscopy, but spectrofluorometric analysis of lysed muscle tissue allowed detection of a small amount of peptide.

Conclusion: Despite successful electrostatic loading of nanoparticles with TAT-peptides stability and controlled drug-release remain challenging. The blood-half-life and biodistribution of the nanoparticles pose additional challenges for the in vivo application of loaded SPION. Moreover, the physiological properties of the targeted tissue are crucial for successful drug-delivery.

1 Einleitung und Stand der Forschung

Die meisten der geschätzt 6000–8000 [1] seltenen Erkrankungen sind genetischen Ursprungs. Eine Erkrankung wird als selten definiert, wenn sie bei weniger als einer von 2000 Personen (Definition der Europäische Arzneimittel-Agentur, EMA) [2] vorkommt. Weltweit sind ca. 400 Millionen Menschen von seltenen Erkrankungen betroffen [3]. Für die allermeisten dieser Entitäten fehlen kurative Therapien. Die Entwicklung von Therapien für aktuell nicht behandelbare seltene Erkrankungen stellt eine gesellschaftliche und wissenschaftliche Herausforderung dar.

Bei Fehlfaltungserkrankungen (z. B. zystische Fibrose, Transthyretin-assoziierte familiäre Polyneuropathie, Dysferlinopathie) wird an therapeutischen Strategien gearbeitet, die an unterschiedlichen Stufen des Proteinbildungsprozesses (Transkription – Translation – Proteinfaltung – Proteindegradation) ansetzen und einer Proteinfehlfaltung und einem vorzeitigen Abbau entgegenwirken [4,5].

Eine besondere Herausforderung solcher Therapieansätze ist der effiziente und selektive Transport der Wirkstoffe zum Zielgewebe. Eine unspezifische Verteilung des Medikamentes im Körper kann sich auf den Therapieerfolg auswirken oder vermehrt unerwünschte Wirkungen hervorrufen. Einige solcher gerichteten Wirkstofftransportsysteme (drug delivery system, DDS) basieren auf Nanopartikel [6,7].

Die meisten Muskeldystrophien sind seltene, genetisch bedingte Erkrankungen, für die bisher kaum erfolgreiche kausale oder krankheitsmodulierende Therapien existieren [8].

In der vorliegenden Arbeit wird ein auf Eisenoxid-Nanopartikel basierendes DDS für einen möglichen Therapieansatz bei der zu den Muskeldystrophien zählenden Dysferlinopathie untersucht.

1.1 Nanotherapeutika

Als Nanotherapeutika im erweiterten Sinne versteht man unterschiedliche Nanostrukturen, die eine Größe im Nanobereich aufweisen. Dazu zählen u. a. Nanoemulsionen, Liposomen, polymerische Mizellen, Virosomen, polymerische Nanopartikel, Dendrimere, Albumin-Nanopartikel, Nanokristalle, Quantumdots und Eisenoxid-Nanopartikel [7].

Je nach Anwendungsgebiet und Zielgewebe werden unterschiedliche Nanotherapeutika verwendet. Bei der Entscheidung für ein Nanotherapeutikum spielen die Biokompatibilität und die Nanotherapeutika-spezifischen Eigenschaften eine Rolle [9].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Verwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln in Kombination mit zellpenetrierenden Peptiden (CPP, intrazellulärer Wirkstofftransport) als DDS. Als Krankheitsmodell dient die derzeit nicht ursächlich behandelbare Muskeldystrophie Dysferlinopathie.

1.2 Dysferlinopathie

1.1.1 Krankheitsbild

Die Dysferlinopathie ist eine autosomal-rezessive Muskeldystrophie, die durch Mutationen im *DYSF*-Gen verursacht wird [10]. Die verschiedenen phänotypischen Ausprägungen sind durch unterschiedliche Verteilungsmuster und differente klinische Verläufe gekennzeichnet. Der häufigste Phänotyp ist die Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B) gefolgt von der Miyoshi-Myopathie [11]. Der Erkrankungsbeginn liegt klassischerweise nach einer unauffälligen motorischen Entwicklung in der Kindheit in der späten Adoleszenz bzw. im frühen Erwachsenenalter [12–14]. Zahlreiche Berichte belegen, dass viele Patienten mit Dysferlinopathie im Kindheitsalter vor Manifestationsbeginn sportlich erfolgreich waren. Das unterscheidet die Dysferlinopathie deutlich von anderen Muskeldystrophie-Formen [14]. Daneben wurden vereinzelt klinische Varianten mit Manifestation in der frühen Kindheit beschrieben [15]. Bei fehlender Phänotyp-Genotyp Korrelation [16] führt die Dysferlinopathie innerhalb von 10–15 Jahren [17,18] zum Verlust der Gehfähigkeit. Eine Herzbeteiligung wird diskutiert; jedoch ist die Herzfunktion bei der Mehrzahl der Patienten klinisch unauffällig [14,18–23].

Charakteristisch für eine Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B) ist eine proximal betonte Muskelschwäche und -atrophie. Initial ist v. a. die Beckenmuskulatur betroffen; die Beschwerden treten insbesondere beim Treppensteigen und Rennen auf [24,25]. Während des langsam progredienten Verlaufs kann es zu einem eingeschränkten Zehenspitzenangang sowie zu

einer Schwäche im Bereich des Schultergürtels bei weitgehender Aussparung der distalen Armmuskulatur kommen. Weiter wurde eine mittels Bildgebung darstellbare, frühe subklinische Mitbeteiligung der distalen Muskulatur der unteren Extremitäten nachgewiesen.

Die zu den distalen Myopathien zählende Miyoshi-Myopathie ist durch eine Muskeldystrophie der Wadenmuskulatur mit einer früheren Schwäche und einem eingeschränkten Zehengang bei noch erhaltenem Fersengang (Gastrocnemiusparese) charakterisiert [13,26].

Darüber hinaus wurde auch die „distal anterior compartment myopathy“ als Manifestationsvariante der Dysferlinopathie mit einer primären Fußheberschwäche (Musculus tibialis anterior) mit gestörtem Fersengang [27,28] beschrieben.

Die Ursache für die unterschiedlichen Phänotypen bei sogar identischen Mutationen liegt möglicherweise in der Interaktion mit anderen Faktoren [29]. Selbst unterschiedliche Ausprägungen bei einer Mutation innerhalb einer Familie sind möglich [30,31]

1.1.2 Dysferlin

Dysferlin ist ein 237 kD großes Protein [32,33], das durch das *DYSF*-Gen auf Chromosom 2p.13.3 kodiert wird [34]. Das 150 kb große *DYSF*-Gen besteht aus 55 Exons [35]. Aus der Exonsequenz lässt sich eine Proteinsequenz von 2088 Aminosäuren und eine komplementäre DNA (cDNA) von 6,5 kb ableiten [27,35]. Es sind 14 verschiedene Transkriptvarianten u. a. mit Exonvarianten von Exon 1 [36], 5a und 40a [37] bekannt.

Dysferlin wird vor allem im Skelett- und Herzmuskel exprimiert, darüber hinaus aber auch in der Niere, der Lunge, der Placenta und im Gehirn [38,39]. Trotz der hohen Expression im Herzmuskel ist eine kardiale Manifestation bei einer Dysferlinopathie eher selten. Dennoch ist beschrieben, dass Dysferlin im Herzmuskel wichtig für die Integrität des Sarkolemmas ist und für die Herzfunktion unter adrenergem Stress eine Rolle spielt [22,23,40,41]. Ferner scheint es an der Pathophysiologie der Myokarditis bei einer Coxsackie-Infektion beteiligt zu sein [42].

Dysferlin gehört zur Ferlin-Familie. Diese in Säugetieren vorkommenden Proteine zeigen eine hohe Sequenzhomologie zu Fer-1 in *Caenorhabditis elegans*. Das aus sechs C2-Domänen und einer transmembranären Domäne am Carboxy-Terminus bestehende Fer-1 [43] ist an der Plasmamembran sowie in zytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert. Die C2-Domänen enthalten β -Faltblätter und Aspartyl-Seitenketten, die auf Kalzium-abhängige Eigenschaften hindeuten [44].

C2-Domänen kommen auch in Proteinen wie Synaptotagmin vor und spielen beim Transport und bei der Fusion von Vesikeln sowie bei der Entstehung von second-messenger Lipiden eine

Rolle. Bei der Membranfusion können die C2-Domänen mit negativ geladenen Phospholipiden und Proteinen in Anwesenheit von Kalzium interagieren.

1.1.3 Funktion von Dysferlin

Dysferlin ist an der Reparatur des Sarkolemmas nach Mikrotraumen beteiligt. Aus dieser Funktion leitet sich der bislang einzige valide, anerkannte *in vitro* Assay zur funktionalen Testung des Proteins ab. Eine Wiederherstellung der Membranreparaturfunktion verlangsamt allerdings den muskeldystrophen Phänotyp kaum [45]. Dieser Befund deutet auf weitere Funktionen des Proteins hin [23,43,46–48]. Diskutiert wird eine Beteiligung an Vorgängen wie Membranfusion, Zell-Zell-Fusion, Biogenese und Erhalt der T-Tubuli sowie Zelladhäsion. Entsprechend ist Dysferlin hauptsächlich am Sarkolemma, an sich entwickelnde T-Tubuli, am sarkoplasmatischen Retikulum, sowie innerhalb der Fasern selbst lokalisiert [14,49].

Dysferlin interagiert mit verschiedenen Proteinen und Phospholipiden. Für die Funktion wichtige Interaktionspartner an der Zellmembran sind Caveolin-3, Calpain-3 und die Annexine 1 und 2. Co-Immunfluoreszenz- und -Immunpräzipitationsstudien belegen, dass Dysferlin sowie Annexin-1 und -2 Kalzium-abhängig interagieren und in Membranläsionen gemeinsam nachweisbar sind [48]. Mutationen im Gen für die muskelspezifische Cysteinprotease Calpain-3 führen zur Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ2A (LGMD2A) mit einer verminderten Expression von Dysferlin in der Zellmembran [50,51]. Ferner ist eine verminderte Expression von Calpain-3 bei Patienten mit Dysferlinopathie bekannt [52]. Es wird postuliert, dass Calpain Dysferlin spaltet, was zur Bildung von einem nur aus dem Carboxy-Terminus und zwei C2-Domänen bestehenden Peptid führt. Mit solchen „kleinen Dysferlinen“ angereicherte Vesikel sollen durch Mitsugumin 53 (MG53) zum Läsionsort von Muskelmembranen rekrutiert werden, dort durch Fusion den Defekt kitten und so die membranöse Integrität sicherstellen [53]. Ferner wurden auch Interaktionen zwischen Dysferlin und α -Tubulin [54] beschrieben.

1.1.4 Pathophysiologie der Dysferlinopathie

Die mehr als 1000 verschiedenen beschriebenen *DYSF*-Mutationen [55,56] sind über das gesamte Gen verteilt. Verschiedenste Arten von Mutationen (z. B. Nonsense-, Missense-, Readthrough-Mutationen) sind hierbei krankheitsverursachend.

Ein Drittel der krankheitsverursachenden Mutationen sind Missense-Mutationen, die zur Fehlfaltung, zum vorzeitigen Abbau sowie zu einer intrazellulären Akkumulation von Proteinen und zu einer extrazellulären Amyloid-Ablagerung führen können [55,57–59]. Einige Missense-Mu-

tationen führen dabei auch zu einer toxischen „gain-of-function“ durch Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR), der „endoplasmatic reticulum-associated degradation“ (ERAD) und der Fibrinbildung [57].

1.1.5 Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten und Forschungsstand

Die aktuelle Behandlung der meisten Muskeldystrophien inklusive der Dysferlinopathien besteht aus unterstützenden Maßnahmen und medikamentösen Therapien der Symptome. Kausale oder krankheitsmodulierende Therapieansätze befinden sich noch im Forschungsstadium.

Die Krankheitsprogression geht bei den Dysferlinopathien mit einer inflammatorischen Reaktion im Muskel einher, was zur Fehldiagnose einer Myositis führen kann. Analysen zur Wirksamkeit immunsuppressiver Therapien ergaben jedoch uneinheitliche Ergebnisse und gehören derzeit nicht zum evidenzbasierten Behandlungsregime [60,61].

Kausale genetische Therapien mittels adenoviraler Vektoren und der Bereitstellung von „gesunder cDNA“ in Form von Vektoren sind aufgrund der Größe von *DYSF* (237 kb) schwierig, da diese auf maximal 4 kb begrenzt sind [62]. Derzeit läuft im Nationwide Children's hospital (Columbus – Ohio, USA) eine Doppelblind-randomisierte Phase I Studie (NCT02710500) zur Gentherapie mit einem Adeno-assoziierten Virus (rAAV) als Vektor (rAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV), der direkt in den Musculus extensor digitorum longus (EDL) injiziert wird [63,64]. Um die Größenlimitation der Adenoviren zu umgehen, wird die cDNA (6,5 kb) in zwei Fragmente mit einem 1 kb großen überlappenden Segment aufgeteilt. Die Fragmente werden getrennt in zwei Vektoren eingefügt, die simultan in gleichem Verhältnis verabreicht werden. Die Fragmente sollten im Körper mittels homologer Rekombination zusammengefügt werden [63].

Eine alternative gentherapeutische Strategie, die sich bei Dystrophinopathien in Tierstudien und *in vitro* als erfolgreich erwiesen hat, ist das Skipping von Exons, wodurch für die Proteinfunktion funktionell entbehrliche Bereiche übersprungen werden und ein kleineres, aber funktionsfähiges Protein exprimiert wird [65–67]. Ferner wurden mittels Trans-Splicing mutierte Bereiche durch normale Sequenzen ersetzt [68]. Diese Ansätze wurden bisher nur präklinisch evaluiert.

Bei auf Proteinniveau ansetzenden Strategien führen an ein CPP gekoppelte Dysferlin-spezifische Peptide zu einer verminderten „unfolded protein response“ (UPR) und zu einer Relokalisation von anderenfalls fehlgefaltetem Dysferlin an die Zellmembran, wo Dysferlin seine Membran-reparierende Funktion wiedererlangt [46].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein systemisches DDS für diese Dysferlin-Peptide auf der Basis von Nanopartikeln zu entwickeln, um diese dann *in vivo* an einem Dysferlin-defizienten Mausmodell auf ihre Wirksamkeit zu testen. Zur Gewährleistung des intrazellulären Transportes waren die Peptide dabei an sogenannte zellpenetrierende Peptide gekoppelt.

1.3 Zellpenetrierende Peptide (CPP)

Die Phospholipid-Membran der Zellen stellt für die meisten bioaktiven Moleküle (z. B. Peptide, Proteine, Nukleinsäuren) eine impermeable Barriere dar. Substanzen größer als 600 Dalton [69] oder solche mit einer niedrigen Lipophilie können die Zellmembran oder die Membran von Endozytose-Vesikeln kaum durchdringen. Dies erschwert die intrazelluläre Anreicherung therapeutischer Substanzen. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Systeme entdeckt, die die Fähigkeit besitzen, Makromoleküle in die Zelle einzuschleusen. Dazu zählen bakterielle Toxine, stark geladene Proteine (Nativproteine oder Varianten mit vielen kationischen Resten) oder CPP.

CPP besitzen die Fähigkeit, Zellmembranen Rezeptor-unabhängig zu durchdringen und eignen sich somit zur Translokation von bioaktiven Substanzen durch die Zellmembran ins Zytoplasma.

In den vergangenen 20 Jahren wurden mehr als 100 verschiedene CPP-Sequenzen (5–40 Aminosäuren lang) identifiziert. Obwohl sich CPP für den intrazellulären Transport von therapeutischen Substanzen (Cargo) bewährt haben, sind ihre Aufnahmemechanismen noch nicht vollständig geklärt. Wie Abb. 1 zeigt, gibt es keinen universellen Aufnahmemechanismus für alle CPP. Der spezifische Aufnahmemechanismus hängt von der Membranstruktur, den membranständige Proteoglykanen [70], der CPP-Struktur, dem Cargo-Partner sowie von der Gesamtkonzentration ab [71,72]. Auch das Membranpotenzial hat einen relevanten Einfluss auf die Aufnahme von CPP in die Zelle [73].

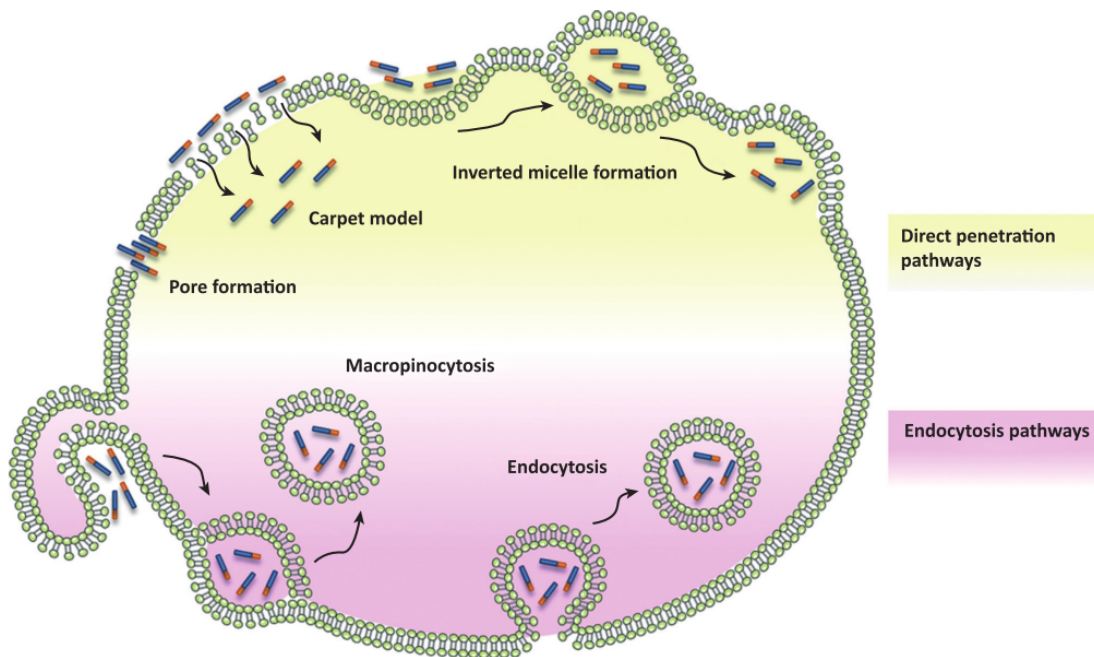


Abbildung 1: Internalisierung von zellpenetrierenden Peptiden (CPP) – Unterteilung in direkte Internalisierung (Energie unabhängig) und endozytische Aufnahme (Energie abhängig). Entnommen aus [74].

Trotz fehlender eindeutiger Klassifikation werden CPP anhand ihrer chemischen Eigenschaften oder ihrer Herkunft unterschieden. CPP können von einem einzelnen Nativproteinen abstammen, oder Sequenzen aus zwei Nativproteinen enthalten. Ferner gibt es synthetische Peptide, die auf der Basis von Struktur-Aktivitäts-Analysen entwickelt wurden.

Zu den ersten CPP aus Nativproteinen gehören das VP22 des Humanen Herpesvirus 1 (HHV-1) [75], das Tat (trans-activator of transcription) des Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) sowie das Penetratin aus der Homeobox-Domäne des Antennapedia-Proteins aus *Drosophila melanogaster* [76].

CPP sind meist kleine kationische (10–30 Aminosäuren) oder amphipathische, wasserlösliche Peptide, die reich an basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin) sind. Basierend darauf wurden synthetische CPP wie Arginin-Oligomere oder Poly-Arginin Peptide entwickelt [77,78].

Bereits 1988 wurde beobachtet, dass das Protein Tat aus HIV-1 direkt in die Zellen aufgenommen wird. Tat ist, in Abhängigkeit vom HIV-Stamm, 86–102 Aminosäuren lang. Das Regulationsprotein ist HIV-spezifisch und kommt in anderen Retroviren nicht vor [79]. Auch gekürzte Tat-Peptide können erfolgreich in die Zellen translozieren. 1997 zeigten Vivès et al., dass die 13 Aminosäuren lange Sequenz 48–60 (GRKKRRQRRRPPQ) für die Translokationsfähigkeit verantwortlich ist [80]. Park et al. konnten 2002 die verantwortliche Sequenz auf die Aminosäuren 49–57 (RKKRRQRRR) eingrenzen [81]. Die Arginin-reiche Sequenz beinhaltet die

RNA-Bindungsdomäne von Tat. Interessanterweise ist die α -Helix bildende Aminosäuresequenz 37–47 überflüssig für die Translokationsfähigkeit. [80]. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einem gekürzten Tat-Peptid gearbeitet wurde, wird diese zur Unterscheidung vom Tat-Protein als TAT bezeichnet.

Die Translokationsfähigkeit der Tat-Peptide korreliert mit der Anzahl an Arginin-Resten (s. Abb. 2). Die für eine effiziente Aufnahme benötigte Anzahl variiert zwischen sechs und zwölf Arginin-Resten [82]. Die Guanidin-Seitenkette des Arginins scheint entscheidend für die Aufnahme in die Zellen zu sein [83]. Basische Aminosäuren wie Arginin ($pK_s = 12,5$) und Lysin ($pK_s = 10,8$) sind bei physiologischem pH positiv geladen und hydrophil. Wie in Abb. 2 dargestellt, können die positiv geladenen Guanidin-Seitenketten (Guanidinium-Kationen) des Arginins Wasserstoffbrücken mit den negativ geladenen Phosphaten und Sulfaten der Zellmembranoberfläche bilden, was die Internalisierung begünstigt. Lysin-Reste sind trotz gleicher Nettoladung unter physiologischen Bedingungen für das Einschleusen weniger effizient.

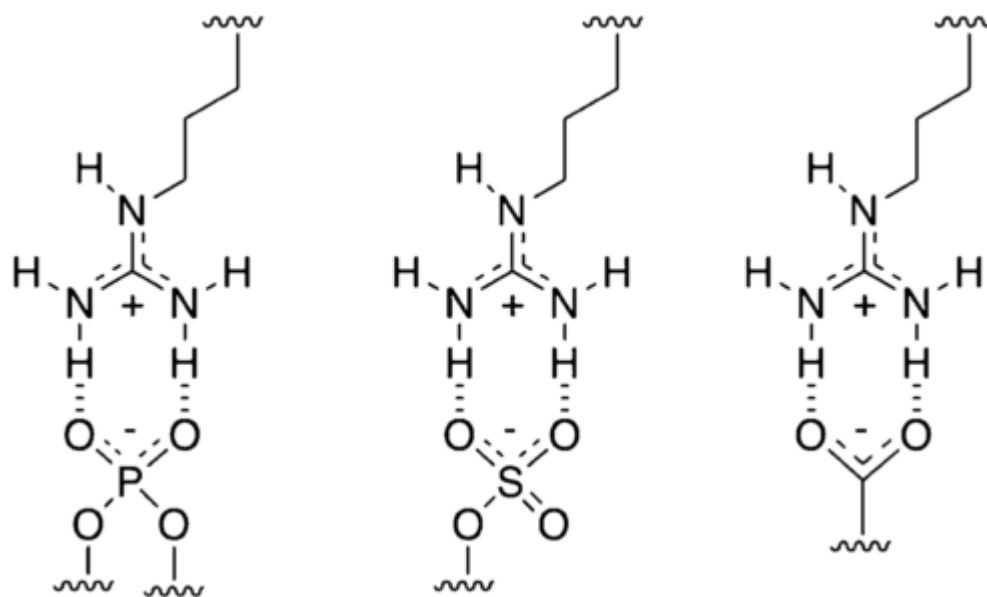


Abbildung 2: Interaktion der Guanidinium-Kationen der Seitenketten von Arginin mit den funktionellen Phosphat-, Sulfat- und Carboxy-Gruppen benachbarter Strukturen. Entnommen aus [83].

Derzeit befinden sich verschiedene CPP-enthaltende, therapeutisch wirksamen bioaktiven Substanzen in klinischen und präklinischen Studien [77,84–86]. Die fehlende Zellspezifität der energie-unabhängigen Membrantranslokationsfähigkeit ermöglicht die Aufnahme in alle Zellarten. Daher ist auch eine Aufnahme in unerwünschte Zellen möglich.

Viele Studien haben den Einsatz von CPP für topische Therapeutika untersucht. Dazu zählt beispielsweise ein Oligoarginin-Peptid (Psorban®) / Cyclosporin A Konstrukt für die Behandlung der Psoriasis, oder Konstrukte mit dem Botulinus-Toxin (RT001). Weiter wurde in einer Phase I/II-Studien der Firma KAI Pharmaceuticals ein Konjugat aus einem Inhibitor der Proteinkinase C delta [86] und TAT für den Einsatz bei Myokardinfarkten und Ischämien getestet. Andere Studien konjugierten zur Prävention von Restenosen nach aortokoronaren Bypassen CPP mit Antisense Peptide Morpholino Oligomeren (PMO). Solche Konjugate wurden auch für die Therapie der Muskeldystrophie Typ Duchenne getestet [87].

Trotz ihres hohen Potenzials wird der klinische Einsatz von CPP durch ihre fehlende Zellspezifität und kurze Halbwertszeit begrenzt. Die fehlende Spezifität erhöht die Toxizität von Medikamenten, indem sie sich in nicht therapierrelevantem Gewebe ablagern und dort unerwünschte Wirkungen hervorrufen. Kleine zirkulierende Peptide wie CPP werden darüber hinaus schnell durch Plasmaenzyme abgebaut, wodurch weniger Moleküle das Zielgewebe erreichen.

Es existieren mehrere Ansätze, um dem Abbau von zirkulierenden CPP entgegenzuwirken. Die Änderung der stereochemischen Konfiguration durch den Einsatz von Stereoisomeren (D- statt L-Aminosäuren) schützt CPP vor einem enzymatischen Abbau. Ferner können CPP an „nanocarrier delivery platforms“ angeheftet werden, wo die Enzyme sie nicht erkennen. In der vorliegenden Arbeit sollte der enzymatische Abbau der CPP im Blutkreislauf durch die Kopplung an Nanopartikeln verhindert werden. Die Konjugate wurden *in vivo* an einem Dysferlin-defizienten Mausmodell auf ihre Wirksamkeit hin getestet.

1.4 Grundlagen der Fluoreszenz und Fluoreszenzauslöschung

Als Fluoreszenz wird die Emission von Licht durch eine Substanz bezeichnet. Dabei gehen die angeregten Elektronen des Materials von einem höheren in ein niedrigeres Energieniveau über und geben dabei Energie in Form eines Photons ab [88]. Die Fluoreszenzintensität kann durch verschiedene Prozesse verringert werden. Diese Fluoreszenzauslöschung wird als Quenching bezeichnet. Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [88–91], einer Sonderform der Fluoreszenzauslöschung, wird die Fluoreszenz des ersten Fluorophors (Donor) gelöscht, indem die Anregungsenergie strahlungslos auf das benachbarte zweite Fluorophor (Akzeptor) übertragen wird. Dieser Transfer ist abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor sowie von der spektralen Überlappung der Donor-Fluoreszenz und der Akzeptor-Absorption. Befinden sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe (<10 nm) wird die Fluoreszenz des Donors gelöscht [88].

1.5 Grundlagen der Magnetresonanztomografie

Eisenoxid-Nanopartikel fungieren in der Magnetresonanztomografie (MRT) als Kontrastmittel. Zur Erklärung des Einsatzes als MRT-Kontrastmittel werden zunächst die MRT-Grundlagen vorgestellt [92].

Elementarteilchen besitzen als intrinsische Eigenschaft einen Eigendrehimpuls (Spin). Der Gesamtspin eines Atomkerns (Kernspin) hängt von der Anzahl an Protonen und Neutronen ab. Die Wasserstoffkerne besteht aus lediglich einem Proton (Massenzahl 1). Atomkerne mit ungerader Massenzahl weisen ein magnetisches Moment auf, das durch den Spin und die positive Ladung entsteht. Durch ihren Spin verhalten sich Wasserstoffkerne wie kleine Magnete, deren Dipol sich zufällig im Raum ausrichten. Dagegen haben Kerne mit einer geraden Zahl an Protonen einen Netto-Kernspin von 0, da sich die zwei gleichartigen Spins entgegengesetzt ausrichten. In Anwesenheit eines starken Magnetfeldes werden die Kernspins der Protonen (Wasserstoffkerne) entlang des Magnetfeldes ausgerichtet. Die Ausrichtung kann parallel (in Richtung des externen Magnetfeldes) oder antiparallel (entgegengesetzt zum Magnetfeld) erfolgen. Ersteres gilt als energetisch günstiger, sodass spontan eine parallele Ausrichtung der Kernspins überwiegt, was zu einer Nettomagnetisierung (M_0) entlang des Magnetfeldes (Longitudinalmagnetisierung, M_z) führt; diese ist aber ohne Weiteres nicht messbar [92].

Wasserstoffkerne drehen sich nicht nur um die eigene Achse, sondern auch um die Achse des externen Magnetfeldes (B_0). Diese Drehung nennt man Präzession. Ohne äußere Faktoren bewegen sich die Protonenspins während der Präzession ungeordnet, jedoch auf einem gleichen Weg (Präzessionsweg) und mit einer identischen Geschwindigkeit (= Präzessions- oder Larmor-Frequenz (ω_0)). Diese hängt von der örtlichen Feldstärke des angelegten Magnetfeldes sowie vom gyromagnetischen Verhältnis (Elementkonstante, γ_0) ab ($\omega_0 = \gamma_0 * B_0$) [93]. Bei einer Magnetfeldstärke von 1 T entspricht ω_0 von Wasserstoff 42,574 MHz [94].

Wird ein kurzer Hochfrequenzimpuls elektromagnetischer Strahlung im Radiofrequenz-Bereich (RF-Impuls) im rechten Winkel zum externen Magnetfeld (B_0) mit einer Frequenz, die mit der Larmor-Frequenz übereinstimmt, eingestrahlt, kommt es zu einer Resonanz. Hierdurch wird die Präzession der Protonenspins synchronisiert (in Phase). Dieses Phänomen der Phasenkohärenz wird als Magnetresonanz (MR) bezeichnet. Je nach Dauer und Amplitude des RF-Impulses klappen die Kernspins (Zunahme des Präzessionsweges) zunehmend in den höherenergetischen (antiparallelen) Zustand um. Dies führt zu einer Abnahme der Netto-Longitudinalmagnetisierung. Durch die Synchronisation der Präzessionen addieren sich die magnetischen Momente der Protonen, sodass es zu einer transversalen Magnetisierung (M_{xy}) kommt.

Die Synchronisation induziert ferner ein elektromagnetisches Wechselfeld, das als MR-Signal gemessen wird. Kommt es zu einer Dephasierung der Präzessionen, so nimmt das gemessene MR-Signal ab.

Der Winkel zwischen der entstandenen transversalen Magnetisierung (M_{xy}) und der Hauptachse (B_0) wird als Flipwinkel bezeichnet. Wenn genau die Hälfte der Spins in die antiparallele Lage umgeklappt sind, spricht man vom 90° RF-Impuls. Die parallelen und antiparallelen Spins gleichen sich aus, sodass die Nettomagnetisierung in die transversale Ebene (M_{xy}) umklappt.

Nach Abschalten des RF-Impulses kehren die Spins zunehmend in den energieärmeren Zustand zurück. Dieser Prozess bezeichnet man als Relaxation. Die Longitudinalmagnetisierung nimmt wieder zu, da die Protonen Energie an die Umgebung (Gitter) abgeben, um wieder ins energieärmere Niveau parallel zum Magnetfeld zu gelangen. Diese longitudinale Relaxation (T_1) wird auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Zeitgleich kommt es zunehmend zur Dephasierung der Präzessionen, sodass die transversale Magnetisierung abnimmt. Diese Abnahme der Dephasierung mit entsprechender Signal-Abnahme wird als free induction decay (FID) bezeichnet. Für die Dephasierung spielen sowohl Magnetfeld-Inhomogenitäten als auch die Interaktion zwischen den einzelnen Spins als einzelne Magnetfelder eine wichtige Rolle. Wegen dieser Spin-Spin-Interaktion wird diese auch als Spin-Spin-Relaxation (T_2) bezeichnet. Wie oben ausgeführt, ist die Präzessionsfrequenz für einen einzelnen Spin proportional zum lokalen Magnetfeld (Magnetfeld-Inhomogenitäten + angrenzende «Spin-Magnetfelder»). Phasenunterschiede, die durch statische Magnetfeld-Inhomogenitäten der Transversalmagnetisierung entstehen, können mithilfe eines refokussierenden 180° RF-Impulses kompensiert werden. Man bezeichnet diese Bildgebungssequenz als Spin-Echo-Sequenz. Die so gemessene transversale Relaxation entspricht der «echten» transversalen Relaxation des Gewebes (T_2). Werden die statischen Magnetfeld-Inhomogenitäten nicht kompensiert, bezeichnet man die gemessene transversale Relaxation als T_2^* [95].

Die Zunahme der longitudinalen Magnetisierung (T_1) und die Abnahme der transversalen Magnetisierung (T_2 , T_2^*) sind exponentielle Prozesse. T_1 entspricht einer exponentiellen Annäherung an das Magnetfeld (Ausgangswert). T_2 bzw. T_2^* zeichnen sich durch einen exponentiellen Zerfall des Signals aus.

Definitionsgemäß beschreibt die Konstante T_1 den Zeitpunkt, an dem die Longitudinalmagnetisierung wieder 63 % des Ausgangswertes beträgt und T_2 den Zeitpunkt, zu dem noch 37 % der transversalen Magnetisierung vorliegt.

Bei der MR-Bildgebung können unterschiedliche Relaxationszeiten unterschiedlicher Gewebe durch geeignete Messmethoden und -parameter dargestellt werden. Beispielsweise kann das Intervall der Messungen (Repetitionszeit, time to repetition; TR) und der Zeitpunkt der Signalmessung nach dem RF-Impuls (Echozeit, time to echo; TE) angepasst werden.

1.6 Superparamagnetische Nanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) besitzen einen Eisenoxid-Kern mit einer Magnetit (Fe_3O_4)- und/oder Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)-Kristallstruktur. Zur Generierung einer stabilen Suspension werden diese Kerne mit Stabilisatoren umhüllt. Diese Hülle verhindert eine Aggregation und Sedimentation der Partikel. Die Stabilisierung erfolgt sterisch oder elektrostatisch [96].

Eine sterische Stabilisierung beruht auf der räumlichen Abstoßung der Nanopartikel. Auf der Oberfläche sterisch stabilisierter Nanopartikel befinden sich adsorbierte Makromoleküle (z. B. Polysaccharide, andere (Bio-)Polymere). Bei Annäherung zweier Partikel überlappen sich diese Polymerhüllen. Die erhöhte Polymerkonzentration im Überlappungsbereich steigert den osmotischen Druck. Das daraufhin einströmende Lösungsmittel drängt die Teilchen wieder auseinander [97]. Zudem werden die Polymermoleküle im Überlappungsbereich in ihrer Konformation eingeschränkt. Diese Reduzierung der Entropie führt ebenfalls zur Abstoßung [96,98]. Bei der sterischen Stabilisierung durch die Polymerhülle spielt dieser Entropie-Effekt eine größere Rolle als physikalische Kräfte [99].

Eine elektrostatische Stabilisierung beruht auf der Abstoßung gleich geladener Partikel (Coulombsches Gesetz). An der Kernoberfläche adsorbierte Moleküle mit Carbon- oder Phosphorsäuren verleihen den Partikeln eine negative Ladung, die zu einer gegenseitigen Abstoßung führt [96].

Aufgrund der Ladung bildet sich eine elektrische Doppelschicht in der den Teilchen angrenzenden Flüssigkeit. Da das gesamte System elektrisch neutral ist, muss in der angrenzenden Flüssigkeit die entsprechende Anzahl Gegenionen vorhanden sein. Diese elektrische Doppelschicht setzt sich nach dem Modell von Stern aus einer adsorptiv gebundenen (Stern-Schicht) und einer diffusen Schicht zusammen [100,101].

Die superparamagnetischen Eigenschaften des Eisenoxid-Kerns beruhen auf der Besonderheit, dass nach Abschalten eines zuvor angelegten Magnetfeldes die Magnetisierung von nanometergroßen ferro- (Fe^{2+}) oder ferrimagnetischen (Fe^{3+}) Materialien nicht bestehen bleibt. Durch

die geringe Größe bestehen Nanopartikel nur aus einer einzigen magnetischen Domäne (Weiß-scher Bezirk) und werden einheitlich magnetisiert, sodass sie in einem Magnetfeld eine voll-ständige magnetische Sättigung mit hohen magnetischen Momenten aufweisen. Die Magneti-sierung geht, wie bei Paramagneten, beim Abschalten des Magnetfeldes verloren [102].

Bei der Größe der Nanopartikel wird zwischen der Größe des Eisenoxid-Kerns, der Größe der Partikeln mit Hülle und der Größe der Partikeln nach Solvatation (hydrodynamischer Durch-messer) unterschieden. Ferner ändert sich die Größe der Nanopartikel durch weitere Adsorption von Ionen oder Molekülen in biologischen Medien (Partikelkorona).

1.5.1 Stabilität Nanopartikel-Suspensionen und Zeta-Potenzial

1.5.1.1 Stabilität von Nanopartikel-Suspensionen

Nanopartikel-Suspensionen sind definitionsgemäß kolloidale Lösungen mit einer festen (Kol-loid) und einer flüssigen Phase (Dispersionsmedium) [103,104]. Die moderne Theorie für kol-loidale Lösungen wurde in den 1940er Jahren von Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey und Jan Overbeek (DVLO) unabhängig voneinander entwickelt. Sie gilt auch heute noch als Grundlage für das Verständnis der Interaktion von kolloidalen Partikeln und deren Aggregati-onsverhalten [105,106]. Gemäß dieser Theorie ist die Stabilität und Aggregation in Partikelsu-spensionen auf die Summe von anziehenden Dispersionswechselwirkungen (van der Waals-Kräfte) und abstoßenden elektrostatischen Kräften (durch die elektrische Doppelschicht) zwi-schen den einzelnen Partikeln zurückzuführen.

Dies kann vereinfacht mittels der Derjaguin-Approximation ausgedrückt werden. Diese be-schreibt die Kraft $F(h)$, die auf kolloidale Partikeln wirkt, die durch eine Entfernung h vonei-ander entfernt sind.

$$F(h) = 2\pi R_{eff} * W(h)$$

$W(h)$ steht für die freie Energie zweier planarer Flächen und R_{eff} für den effektiven Radius. Bei einem symmetrischen System mit ähnlich großen Partikeln ist $R_{eff} = R/2$.

$$W(h) = W_{dw}(h) + W_{dl}(h)$$

$W_{dw}(h)$ entspricht der anziehenden van der Waals-Interaktion und $W_{dl}(h)$ der Doppelschicht-Interaktion.

Van der Waals-Kräfte treten fast immer durch die Interaktion der rotierenden und fluktuieren- den Dipole der Atome und Molekülen auf. Sie sind indirekt proportional zum Quadrat der Ent- fernung (h^2). [107] $W_{dl}(h)$ ist direkt proportional zur Ladungsdichte (δ) der Partikeloberflächen

und indirekt proportional zur ionischen Stärke (I) der Lösung, in der die Partikel suspendiert vorliegen.

Bei höherer Ladungsdichte müssen die elektrostatischen Potentiale nach dem Poisson-Boltzmann-Gesetz berechnet werden, um genauere Werte für $Wdl(h)$ zu erhalten [108].

Die auf der Nanopartikel-Oberfläche assoziierten Gegenionen des elektrolythaltigen Mediums bilden eine diffuse Ionenschicht um die Partikel. Die Konzentration der Gegenionen erreicht an der Partikeloberfläche den Maximalwert (ψ_0 , Oberflächenpotential) und fällt exponentiell mit zunehmender Entfernung von der Partikeloberfläche ab. Die Dichte der Gegenionen (Kationen) sinkt solange, bis sie der Dichte der Koionen (Anionen) entspricht, d. h. ihre Konzentrationen gleich sind. Allgemein gilt, dass die diffuse Ionenschicht bei niedrigen Salzkonzentrationen weiter in die Lösung hinein reicht. Ihre Ausdehnung ist unabhängig von der Oberflächenladung bzw. dem Oberflächenpotential (ψ_0) [101]

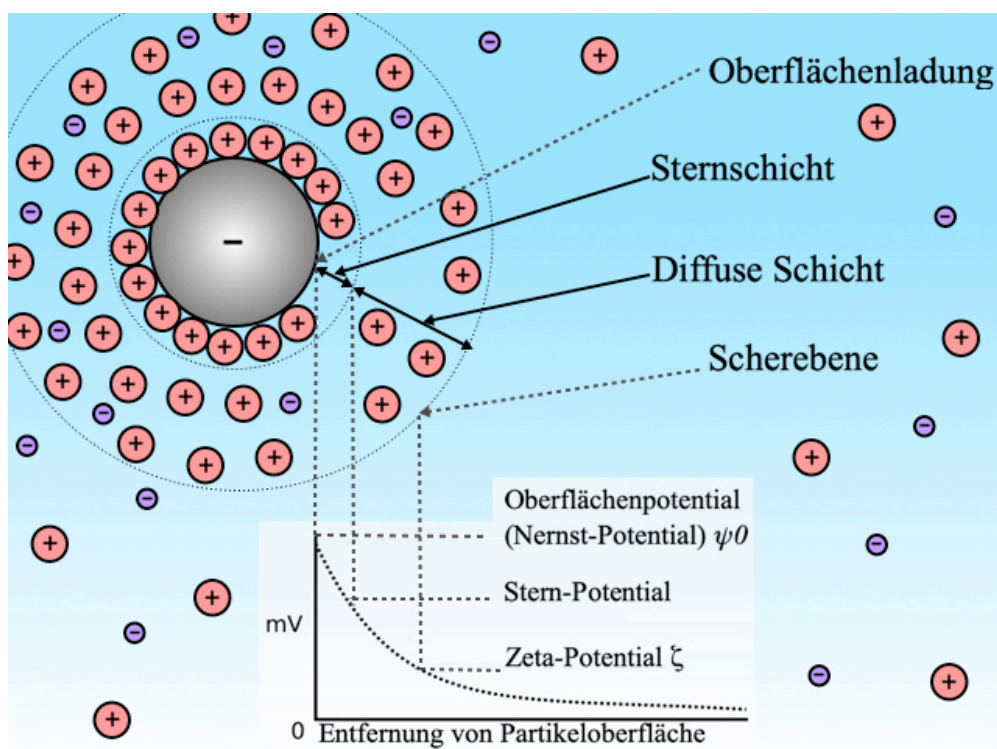


Abbildung 3: Nanopartikel mit elektrochemischer Doppelschicht und entstehenden Spannungen. In Anlehnung an Diagramm bei [109].

Abb. 3 stellt schematisch den Aufbau einer elektrischen Doppelschicht um eine gelöste Partikel dar. Das Potential an der Grenze der starren Stern-Schicht und der diffusen Schicht (Guoy-Chapmann-Schicht) wird als Stern-Potential (ψ_S) bezeichnet. Die Oberflächenladung wird durch den Ionisationsgrad bestimmt; ferner trägt die Adsorption von Ionen auf der Partikelober-

fläche zum Stern-Potenzial bei. Das Stern-Potenzial sinkt mit der Entfernung zur Partikeloberfläche exponentiell ab. Da ein exponentieller Verlauf sich dem Nullwert nur asymptotisch nähert, ist ein Abfall des Potenzials auf Null mathematisch nicht möglich [110], wodurch die diffuse Schicht (Guoy-Chapmann-Schicht) mathematisch unendlich wäre. Daher wird für Stabilitätsberechnungen die diffuse Schicht eindeutig über einen festgelegten Abfall des Potenzials gegenüber seinem Ausgangswert (Stern-Potenzial) definiert. Demnach entspricht die Ausdehnung der diffusen Schicht dem Abstand zwischen der Grenze der Stern-Schicht und der Entfernung, bei der das Potenzial etwa 37 % ($=1/e$) des Stern-Potenzials entspricht. Dieser Abstand wird als Debye-Länge ($1/\kappa$) bezeichnet [111]. Die rechnerisch ermittelte Schichtdicke ist geringer als die tatsächliche Ausdehnung der diffusen Schicht. Tatsächlich erstreckt sich die diffuse Schicht etwa über das Drei- bis Fünffache der Debye-Länge [112]. Bei reinem Wasser beträgt die Grenzschicht aufgrund der Autoprotolyse etwa $1\ \mu\text{m}$ [113]. Da κ (Debye-Hückel-Parameter) direkt proportional zur Ionenkonzentration im Dispersionsmedium und zur Wertigkeit dieser Ionen ist, ist die Debye-Länge und die Ausdehnung der diffusen Schicht bei höherer Ionenkonzentration kleiner.

Die elektrostatischen (abstoßenden) Kräften sind direkt proportional zur Ausdehnung der Doppelschicht und zum Zeta-Potenzial, sodass je größer die Doppelschicht ist, desto höher die abstoßende Interaktion und desto mehr es zur Stabilisierung beiträgt [101].

Das Schema in Abb. 3 weist einige Limitationen auf: 1) Da eine Spannung (Potenzial) erst infolge des lokalen Ladungsüberschusses zwischen Partikeloberfläche und umgebendem Medium entsteht, müssten die Potenzialverläufe in den dargestellten Schichten jeweils in der Ionenschichtmitte beginnen. 2) Das Oberflächenpotenzial sinkt bis zum Stern-Potenzial linear ab (entsprechend Helmholtz-Modell). Danach ist eine exponentielle Abnahme zu erwarten (entsprechend Guoy und Chapman-Modell). 3) Nach Grahame [114] wird die Sternschicht weiter in einer inneren und einer äußeren Helmholtz-Schicht unterteilt. Diese Charakteristika werden in der Darstellung zugunsten der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt.

1.5.1.2 Zeta-Potenzial

Die wichtigsten Eigenschaften der elektrischen Doppelschicht sind das Zeta-Potenzial und die Ausdehnung der diffusen Schicht [107]. Die diffuse Schicht und das umgebende Dispersionsmittel stellen kein starres Gebilde dar, sondern bestehen aus frei beweglichen Ionen. Aufgrund von Reibungskräften auf der Scherebene kommt es bei Diffusionsbewegungen des Partikels zu einem teilweise Abstreifen der diffusen Schicht [115]. Durch den resultierenden Mangel an Gegenionen im äußeren Teil der diffusen Schicht sind die Partikeln nach außen hin nicht mehr

neutral. Diese nach außen wirkende, messtechnisch erfassbare Nettoladung wird als Zeta-Potenzial ($\Psi\zeta$) bezeichnet. Da die Diffusionsbewegungen nur wenige Ionen der diffusen Schicht abscheren, ist die Potentialdifferenz zum Stern-Potenzial vergleichbar gering [101]. Wird das Abscheren durch mechanische oder elektrische Einflüsse verstärkt, nähert sich die Abriss- bzw. Scherebene zunehmend der Stern-Schicht. Das dabei steigende Zeta-Potenzial nähert sich dem Stern-Potenzial zunehmend an [115].

Wie oben ausgeführt, ist die Ausdehnung der diffusen Schicht indirekt proportional zur Ionenkonzentration. Weiter ist nicht nur die Konzentration der Elektrolytlösung relevant, sondern auch die Valenz der gelösten Ionen. Di- (z.B. Ca^{2+}) und trivalente Ionen (z. B. Al^{3+}) wirken sich bereits in niedrigeren Konzentrationen stärker auf die Doppelschicht aus.

Die Ionenstärke [IS] (mol/l) ist eine Summationsfunktion der Konzentration aller Ionen in einer Lösung:

$$IS = 0,5 * \sum_{B=i}^n C_B Z_B^2$$

B steht für die einzelnen Ionen in der Lösung, C_B für die molare Konzentration [mol/l] und Z_B für die Ladungszahl von Ion B. Die Konzentration der Ionen wird mit dem Quadrat der Ladungszahl multipliziert. Die Ionenstärke entspricht die Hälfte der Summe der Produkte aller Ionen.

Dies bedeutet, dass je dicker die Schicht ist, desto langsamer ist der Potenzialabfall. In dünneren diffusen Schichten ist der Potenzialabfall von Stern-Schicht zur Scherebene somit steiler. Daher kann bei extrem niedrig konzentrierten Elektrolytlösungen das Zeta-Potenzial mit dem Stern-Potenzial gleichgesetzt werden. Zusammengefasst ist das Zeta-Potenzial eine Funktion der Ausdehnung der diffusen Schicht und der Partikeloberflächenladung. Im Allgemeinen gilt ein Zeta-Potenzial oberhalb bzw. unterhalb ± 30 mV als elektrostatisch stabilisierend [115–117]. Für biologische Anwendungen müssen zusätzlich die negativen Ladungen der Proteine berücksichtigt werden, sodass negative Zeta-Potenziale (≤ -30 mV) von Vorteil sind.

1.5.2 Untersuchte Nanopartikel

1.5.2.1 Very small iron oxide particle (VSOP)

Der VSOP ist ein Monomer-beschichteter SPION (s. Abb. 4). Der kleine Eisenkern (5 nm) ist beschichtet von einer Hülle aus Zitrat-Molekülen (rot in Abb. 4), die die Partikel in Suspension stabilisieren. Die vergleichsweise dünne Hülle der VSOP hat zur Folge, dass sich die Größe des Eisenkerns, der in früheren Projekten mittels Transmissionselektronmikroskopie bestimmt

wurde, nur unwesentlich vom hydrodynamischen Durchmesser ($7,40 \pm 0,93$ nm) des Partikels unterscheidet.

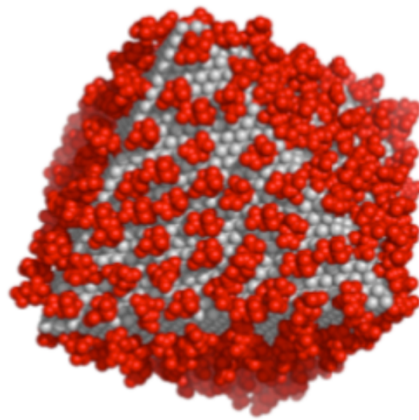


Abbildung 4: Modell eines Very small iron oxide particle (VSOP) (rot = Citrat-Moleküle) (CrystalMaker Version 8.6). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Eyk Schellenberger [98]

Basierend auf den VSOP-Kerndurchmessern wurde mit Hilfe des Programms CrystalMaker Version 8.6 ein Magnetitkristall modelliert und die Anzahl der Eisenatome pro VSOP auf 6500 abgeschätzt [118].

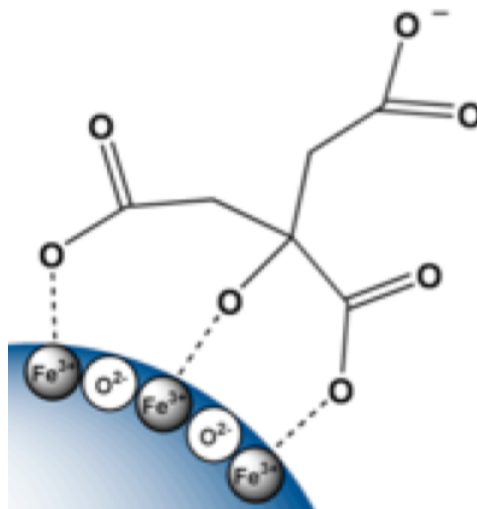


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Citrat-Ionen auf der Eisenoxid-Kernoberfläche. Aus [119].

In wässrigen Lösungen und unter physiologischen Bedingungen liegt der pH-Wert weit entfernt vom isoelektrischen Punkt der Zitronensäure, sodass die abstoßenden elektrostatischen Kräfte gegenüber den van der Waals-Kräften dominieren und die Nanopartikel in Suspension bleiben.

Die Halbwertszeit von VSOP im Blut ist dosisabhängig und liegt in Mäusen bei einer Dosis von 0,5 mmol Fe/kg Körpergewicht (KG) bei ca. 30 Minuten [120]. Bei Menschen beträgt die Halbwertszeit von VSOP im Blut dosisabhängig zwischen 30 Minuten und 1,5 Stunden (0,015–

0,075 mmol Fe/kg KG) [121]. Damit besitzen VSOP beim Menschen die kürzeste Halbwertszeit aller SPION. Da die Halbwertszeit bei Menschen die in Kleintieren immer übersteigt, weichen die gewählten Dosen bei Tieren (0,2–1 mmol Fe/kg KG) von denen in der klinischen Anwendung (0,05 mmol Fe/kg KG) ab. Bei längeren Zirkulationszeiten ist der Übergang in tiefere Kompartimente wahrscheinlicher [122].

1.5.2.2 Ferumoxytol (Feraheme®, Rienso®)

Bei sterisch stabilisierten Ferumoxytol-Partikeln handelt es sich um einen SPION, der mit carboxylierten Kohlenhydrat-Polymeren (Carboxymethyl-Dextran aus Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylether, PSC) umhüllt ist (s. Abb. 6 und 7).

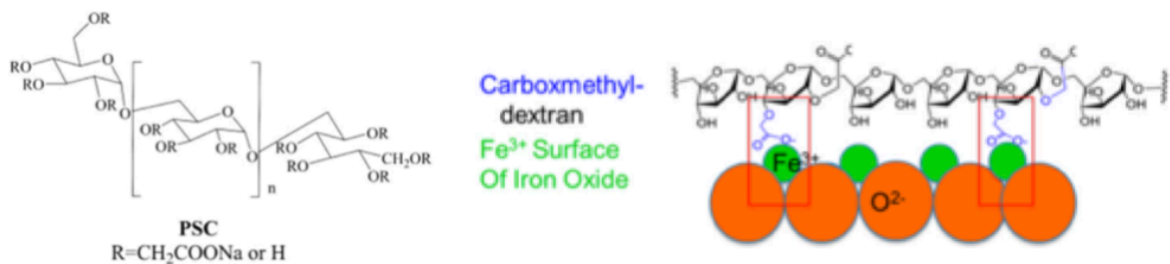


Abbildung 6: Chemische Struktur des Polyglucose-Sorbitol-Carboxymethylethers (PSC) in Ferumoxytol und der Interaktion mit den Fe³⁺-Kernionen (modifiziert nach [123,124]).

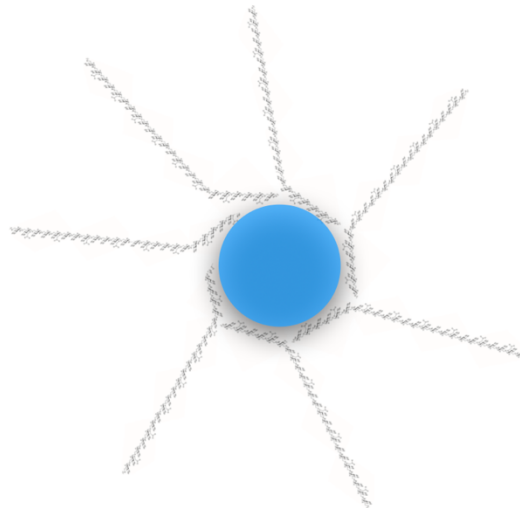


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines sterisch stabilisierten Nanopartikels mit Carboxymethyl-Dextran-Ketten

Ferumoxytol ist für die parenterale Therapie der Eisenmangelanämie im Rahmen einer Niereninsuffizienz in Deutschland und in den USA zugelassen [125]. Die Zulassung der Food and Drug Administration (FDA) wurde 2018 auf Eisenmangelanämien erweitert, bei denen eine orale Therapie nicht verträglich oder erfolgreich war. Die zugelassene Dosis entspricht einer unverdünnten Einzeldosis von 510 mg elementares Eisen als Ferumoxytol in 17 ml-Lösung.

Diese wird unverdünnt intravenös als Bolus über ca. 17 Sekunden gefolgt von einer zweiten Dosis nach ca. einer Woche. Nach der Gabe empfiehlt sich eine Überwachung für mindestens 30 Minuten, um Überempfindlichkeitsreaktionen auszuschließen. In Abhängigkeit vom Ansprechen kann das Vorgehen nach 30 Tagen wiederholt werden.

Ferumoxytol besitzt eine carboxylierte Hülle, die für die Funktionalisierung der Partikeloberfläche genutzt werden kann [126]. Anders als bei VSOP trägt diese Hülle maßgeblich zur Größe der Ferumoxytol-Nanopartikel bei. Der mittels Transmissionselektronmikroskopie ermittelte Durchmesser des Eisenkerns beträgt $6,5 \pm 0,4$ nm (bei ca. 5800 Eisenatome pro Kern) [123], wobei die Kerne teilweise irreguläre Formen besitzen. Auch kleinere Durchmesser von etwa 3,5 nm (entspricht ca. 1100 Eisenatome pro Kern laut Abschätzung mit Crystalmaker Version 8.6) sind möglich [127,128]. Der hydrodynamische Durchmesser von Ferumoxytol ist mit $17,85 \pm 2,24$ nm deutlich größer als der Kerndurchmesser. Mittels Elektronmikroskopie lässt sich nur der Kern der Eisenoxid-Nanopartikel messen, da dieser eine höhere Dichte als die karbonhaltige Hülle (Zitronensäure bei VSOP und Carboxymethyl-Dextran-Hülle bei Ferumoxytol) besitzt.

Bedingt durch die Carboxymethyl-Dextran-Hülle ist die Zirkulationszeit von Ferumoxytol im Vergleich zu der von VSOP deutlich länger. Die Beschichtung von Nanopartikeln mit Dextran- oder Polyethylenglykol-(PEG)-Hüllen wird oft als „stealth“-coating bezeichnet, da diese Hülle die Partikeln vor dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) schützt. Die hydrophile Polysaccharid- oder PEG-Hülle ist biologisch abbaubar und weist eine geringere Immunogenität sowie Toxizität auf. Die Carboxymethylierung der Dextransketten verringert die Immunogenität weiter und verlängert durch die negative Ladung bei physiologischem pH die Halbwertszeit. Die Halbwertszeit von Ferumoxytol beträgt in Mäusen bei Dosen zwischen 0,14 und 0,28 mmol Fe/kg KG (8–16 mg/kg KG) ca. 4 Stunden [129]. Auch bei anderen Nagetieren (Ratte, Kaninchen) liegt die Halbwertszeit bei 4 Stunden [130]. Bei Menschen beträgt die Halbwertszeit je nach Dosis 12–15 Stunden (0,04–0,08 mmol Fe/kg KG) [131].

1.5.3 Anwendungen von SPION

1.5.3.1 Klinische Anwendungen

Die Anwendung von SPION zeigt in den üblichen Dosierungen (20–50 mg Fe) keine signifikanten Nebenwirkungen [132]. Selten treten Kopfschmerzen, Vasodilatationen, eine Hypotension oder allergische Reaktionen (z. B. Urtikaria) [133] auf, die stark von der Art der Nanopartikel abhängen. In Tierexperimenten mit hoher Dosierung (bis 100 mg Fe/kg KG, d.h. ca. 1,8 mmol Fe/kg KG) wurden keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet [134].

Die Zirkulationszeit im Blut und die Elimination durch das MPS hängt maßgeblich von der Größe, der Dosis und den Oberflächeneigenschaften (u. a. Ladung) der Partikeln ab [135]. Die Aufnahme der zirkulierenden SPION erfolgt unabhängig von ihrer Größe und Ladung hauptsächlich in der Leber und Milz [136]. Der SPION-Kontrastmittel Endorem® (150 nm) wird beispielsweise zu ca. 80 % in der Leber, zu 5–10 % in der Milz und zu 1–2 % im Knochenmark aufgenommen [137,138]. Ultrakleine SPION (USPION) mit ca. 20 nm Durchmesser weisen eine lange Halbwertszeit im Blut auf und sind daher als Blutpool-Kontrastmittel geeignet [138]. Die steigende Zirkulationszeit mit zunehmender Dosis beruht auf einer Sättigung des MPS [139].

Die superparamagnetischen Eigenschaften und die Anreicherung in den erwähnten Organsystemen bestimmt die klinische und experimentelle Anwendung der Nanopartikel.

Aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften sind Nanopartikel als Kontrastmittel für die MRT geeignet. Sie beeinflussen sowohl die longitudinale (T_1) als auch die transversale Relaxation (T_2), wobei sie im Gegensatz zu konventionellen MRT-Kontrastmitteln letztere vorrangig modulieren. Aufgrund des hohen magnetischen Momentes verstärken SPION die Relaxation von Protonen, die sich den Partikeln nähern. Die Verkürzung der Relaxationszeiten durch die schnellere Relaxation erklärt, warum Nanopartikel primär die transversale Relaxationszeit (T_2) beeinflussen. Eine T_2 -Verkürzung bewirkt eine Signalabnahme, eine Verkürzung von T_1 dagegen eine Signalzunahme. Die Wirksamkeit eines Kontrastmittels bezüglich der Relaxationszeit wird über die Relaxivität (r_1 , r_2 oder r_2^*) ausgedrückt. Diese ist umgekehrt proportional zur Relaxationszeit und hängt von der Konzentration $[C]$ des Kontrastmittels ab. Weiter wird die Relaxivität von der Temperatur und der Feldstärke beeinflusst. Für klinische Anwendungen bezieht sich die Relaxivität standardisiert auf eine Körpertemperatur von 37° C und eine Feldstärke von 1,5 T.

$$[C] * r_n = \frac{1}{\Delta T_n}$$

Für die transversale Relaxation T_2 durch SPION gilt, dass r_2 bis zu einem Magnetfeld von 0,5 T linear mit der Größe des Nanopartikels zunimmt (Zunahme der Magnetisierung bis zur Sättigung gemäß der Funktion nach Langevin). Bei höheren Feldstärken ist r_2 unabhängig vom Magnetfeld [140].

Generell hängt die Auswirkung der Nanopartikel auf die Relaxationszeiten von mehreren Faktoren (z. B. Kristallzusammensetzung, Morphologie (sphärische vs. nicht-sphärische Partikeln), Größe) ab [140]. Der relative Einfluss eines Kontrastmittels auf r_1 oder r_2 wird mit dem

Relaxivitätsverhältnis (r_1/r_2) ausgedrückt. Die Relaxivität r_2 und r_2^* korreliert mit der Größe des Eisenoxid-Kerns. Größere Nanopartikel bewirken größere lokale Feldinhomogenitäten und einen stärkeren Verlust der transversalen Magnetisierung (Dephasierung) und damit einen größeren Suszeptibilitätseffekt. Für T_1 ist das Verhältnis komplizierter, da hier zwei Prinzipien (Néel-Relaxation, Curie-Relaxation) zusammenkommen [140]. Tendenziell wirken kleinere Kerndurchmesser stärker auf T_1 . Bei Nanopartikeln < 5 nm ist das magnetische Moment geringer, sodass r_2 abnimmt. Gleichzeitig kommt es durch das höhere Oberflächen-Volumen-Verhältnis (A/V-Verhältnis) zu einem größeren Effekt auf die Spin-Gitter-Relaxation (T_1), die mehr auf einer direkten Koordination der Wassermoleküle an der Metall-Austauschfläche beruht.

Verschiedene Modelle wie das von Gillis, Roch und Gossuin [141,142] beschäftigen sich mit dem Zusammenhang zwischen den Struktureigenschaften (Zusammensetzung, Kristallstruktur) der SPION und dem Einfluss auf das lokale Magnetfeld.

Die vorliegende Arbeit behandelt die verwendeten Nanopartikel vereinfacht als sphärische Strukturen, wobei weder der VSOP- noch der Ferumoxytol-Kern sphärisch sind. Die Kristallform (Anisotropie) beeinflusst das entstehende Magnetfeld um die Eisenoxid-Nanopartikel, was sich wiederum auf die magnetische Anisotropie-Energie und daher auch auf Magnetisierungseigenschaften wie die Relaxivitäten auswirkt. Sphärische Kristallkerne weisen eine schlechtere r_2 als polyedrische Nanopartikel bei gleicher Größe auf [140].

Im Vergleich zu den Standard-MRT-Kontrastmitteln, die auf paramagnetischen Gadolinium-(Gd)-Komplexen beruhen, ist die Sensitivität der auf Eisenoxid-basierenden Kontrastmittel höher. SPION können im mmol– μ mol-Bereich detektiert werden, während bei Gd-Kontrastmitteln Konzentrationen im mmol-Bereich erforderlich sind [143]. Beide Kontrastmittel unterscheiden sich in ihre Magnetisierungseigenschaften, so nimmt die longitudinale Relaxivität (r_1) des makrozyklischen Gd mit höheren Magnetfeldstärken ab, während bei Partikelsystemen die r_2 konstant bleibt [140]. Daraus ergeben sich weitere Vorteile von SPION gegenüber Gd-Kontrastmitteln, insbesondere für Forschungsanwendungen, wo aufgrund der Auflösung auch höhere Magnetfelder angewendet werden.

Die SPION-Nachweisgrenze hängt von den gewählten MRT-Sequenzen ab. Gradientenecho-(GRE)-Sequenzen sind sensitiver für Suszeptibilitätseffekte als Spin-Echo-(SE)-Sequenzen. Durch Anpassung der Sequenzparameter (Flipwinkel, Echozeit, Repetitionszeit) kann die Sensitivität weiter erhöht werden. Darüber hinaus erlauben Rekonstruktionsalgorithmen basierend

auf der Information aus komplexen Datensätzen hochauflösender 3D-Gradientenecho-Sequenzen besseren Darstellungen der magnetischen Suszeptibilitätsänderungen [144–148]. In solchen suszeptibilitätsgewichteten (SWI) Sequenzen zeigt sich die verkürzte T2* durch eine Signalreduktion (Hypointensität). Durch Nanopartikel erzeugte Hypointensitäten sind deutlich größer als ihr tatsächliches Volumen. Dieses Phänomen wird als «blooming effect» bezeichnet [149].

Darüber hinaus sind indirekte semiquantitative Eisenkonzentrationsbestimmungen möglich. Kartierungsalgorithmen aus gemessenen Suszeptibilitäts- und Phasengradienten-Karten (SGM/PGM)[150,151] steigern die Sensitivität für paramagnetische und superparamagnetische Substanzen. Da die magnetische Suszeptibilitätsänderung ($\Delta\chi$) von organischem Gewebe meist sehr niedrig ist (10^{-4}) [152], erlaubt eine höhere $\Delta\chi$ Aussagen zur Konzentration der eisenhaltigen Proteine/Materialien. Eine $\Delta\chi = 0,21$ ppm in SI-Einheiten im Vergleich zum Liquor entspricht einer Konzentration von ca. 60 μg Eisen pro g Gewebe [153].

Nicht alle Eisenformen lassen sich mittels MRT nachweisen. Bei Bindung von Sauerstoff an Fe^{2+} -Ionen zeigen diese eine $\Delta\chi = 0$. Durch diese Bindung kommt es zu einer Veränderung der Elektronenkonfiguration der äußersten Elektronenschale und Paarung der Elektronen. Gepaarte Elektronen lassen sich kaum durch ein Magnetfeld magnetisieren. Somit verhält sich oxygeniertes Hämoglobin diamagnetisch und desoxygeniertes Hämoglobin paramagnetisch [102].

Initial wurden SPION als Leber-Kontrastmittel entwickelt, da sich diese hauptsächlich in diesem Organ anreichern. Da SPION bezüglich der Detektion von Tumoren keine höhere Sensitivität aufweisen, wurde diese Anwendung weitestgehend verlassen [154]. Dennoch wird die Anreicherung in das MPS klinisch genutzt. Aktuell sind bestimmte SPION (z. B. Ferumoxytol) als intravenöse Eisensubstitutionstherapie zugelassen.

1.5.3.2 Experimentelle Anwendungen

Aufgrund des hohen A/V-Verhältnisses sind Nanopartikel auch als Transportmittel interessant. Für eine Kugel gilt:

$$\frac{A}{V} = \frac{4 * \pi * r^2}{\frac{4}{3} * \pi * r^3} = \frac{3}{r} = \frac{6}{d}$$

Durch Kürzen erhält man einen Quotienten aus 6 durch den Durchmesser (d). Da Eisenkerne eher eine polyedrische Form besitzen, ist das A/V-Verhältnis noch höher. Zur Vereinfachung werden die Partikeln und deren Kerne in dieser Arbeit als kugelförmige Strukturen betrachtet.

Für ihre Funktion als Transportmittel müssen Nanopartikel in Suspension bleiben. Dazu werden die Eisenoxid-Kerne der SPION mit einer Hülle versehen. Die Hülle stellt sicher, dass die Nanopartikel in einer stabilen Suspension bleiben, und verfügt über weitere nutzbare physikochemische Eigenschaften. Dazu zählen die Beladbarkeit der Nanopartikel und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften *in vivo*. Durch ihre superparamagnetischen Eigenschaften können SPION *in vivo* durch hochsensitive bildgebende Verfahren nachverfolgt werden.

Die besonderen pharmakokinetischen Eigenschaften der SPION können am Beispiel ihrer Zirkulationszeit veranschaulicht werden. Diese wird durch verschiedene Faktoren bestimmt und spielt für den Transport z. B. von therapeutischen Wirkstoffen eine wichtige Rolle. Als wichtigste Parameter gelten die Größe der Nanopartikel sowie die physikochemischen Eigenschaften der Hülle, die für die Interaktion mit den biologischen Komponenten (z. B. Plasmaproteine, Monozyten) sowie der Verträglichkeit der Nanopartikel relevant ist.

Nanopartikel > 100 nm werden rasch vom MPS erkannt. Die Leber und die Milz spielen als Ausscheidungsorgane eine wichtige Rolle. Kleinere Nanopartikel (<10 nm) können zusätzlich renal ausgeschieden werden. Somit gilt eine Größe von 10–100 nm als idealer Bereich für den Einsatz im Organismus. Für reproduzierbare Ergebnisse ist eine uniforme monodisperse Distribution der Partikelgröße erforderlich.

Die Hülle verhindert die Agglomeration und interagiert mit Plasmaproteinen [155]. Eine negative Nettoladung der Nanopartikel verringert die Affinität zu Plasmaproteinen und die Phagozytoserate, wodurch sich die Zirkulationszeit der Nanopartikel verlängert [156,157]. Die Interaktion der Partikel mit den Plasmaproteinen führt zur Bildung einer Proteinkorona und zur Opsonisierung der Nanopartikel, was die Phagozytose begünstigt [158]. Nanopartikel mit einer Polymerhülle aus PEG oder Dextran sollen weniger mit Plasmaproteinen interagieren [98], was sie vor der Erkennung durch das MPS «maskiert» [159,160]. Die Bildung einer Proteinkorona um die Nanopartikel herum kann auch protektiv wirken. Beispielsweise reduziert sich dadurch die Thrombogenität und das Hämolyse-Potenzial mancher Nanopartikel [161]. Obwohl Albumin das häufigste Plasmaprotein ist, bildet es nur einen kleinen Anteil der Proteinkorona, da es nur kurz adsorbiert bleibt [156]. Nach einer initialen Anlagerung insbesondere von Albumin und Fibrinogen werden sie im Verlauf durch andere Proteine abgelöst, die trotz geringerer Konzentration eine höhere Affinität für die Nanopartikeloberfläche aufweisen [161–163].

Die physikochemischen Eigenschaften der Hülle können auch zur Beladung der Nanopartikel mit Wirkstoffen genutzt werden. Beispielsweise können Wirkstoffe kovalent an funktionelle

Gruppen der Hülle gekoppelt werden. Auch eine elektrostatische Adsorption ist möglich. Partikeln mit einer Hülle aus positiv geladenem Polyethylenimin (PEI) werden zum Transport von DNA-Plasmiden für die Gentherapie getestet [164].

SPION eignen sich aufgrund ihres großen A/V-Verhältnisses als Arzneistoff-Trägersysteme für eine magnetische Anreicherung durch externe Magnetfelder (magnetic drug delivery, MDD). Die gute Biokompatibilität beruht auf der Einschleusung der Eisenoxid-Kerne in den endogenen Eisenmetabolismus. Nach Aufnahme in leberspezifische Makrophagen (Kupffer-Zellen) werden SPION lysosomal abgebaut und das Eisen aus dem Kern gelangt in den Eisenpool (als Hämosiderin oder Ferritin). Im Vergleich zur Gesamteisenkonzentration im Körper (ca. 4–5 g) ist die übliche Eisendosis bei der diagnostischen Bildgebung (50–200 mg Eisen) gering. Für eine chronische Eisentoxizität in der Leber sind minimal 4 mg Fe/g Gewebe erforderlich (Normwert: 0,2 mg Fe/g Gewebe). Die abbaubare Hülle ist metabolisch ein geringes Problem. Beispielsweise werden Dextrane über Dextranasen abgebaut und anschließend renale eliminiert [165]. Auf der anderen Seite stellt die Hülle eine immunologische Herausforderung dar. Dextrane weisen im Vergleich zu Sucrose oder Carboxymaltose eine höhere Antigenizität auf, die das Risiko für anaphylaktische Reaktionen erhöht [166].

Auch eine Kontrastmittel-Anreicherung durch „undichte“ Gefäße ist möglich. Dieser enhanced permeability and retention (EPR) Effekt spielt insbesondere bei entzündlichen Prozessen (u. a. bei Infarkten) sowie bei neoplastischen Prozessen mit anormaler Angiogenese eine Rolle.

Für den Transport von Wirkstoffen ist es erforderlich, dass der Cargo bis zum Erreichen des Zielgewebes stabil auf den Nanopartikeln (Nanocarrier) verbleibt. Die Nanopartikel sollen im Blut stabil bleiben und nicht aggregieren, sich auflösen oder den Cargo vorzeitig verlieren [116]. Ein häufiges Problem ist die vorzeitige burst-artige intravaskuläre Entladung des Nanocarriers [167]. Nach dem Transport zum Zielgewebe müssen Nanopartikel den Wirkstoff möglichst kontrolliert abgeben.

Daher gibt es Ansätze zur Entwicklung von Stimulus-sensitiven pharmazeutischen Nanocarrier [168], die den Einsatz von niedrigeren Dosen erlauben und damit die Effekte außerhalb des Zielgewebes minimieren. Weitere Herausforderungen sind die Abgabe des Wirkstoffs vor der Endo-/Phagozytose im Zielgewebe und die Vermeidung der Internalisierung der Nanopartikel. Nach der Endo-/Phagozytose des Gesamtkonstruktes muss gewährleistet werden, dass der Wirkstoff die Endosomen verlässt, um in das gewünschte intrazelluläre Kompartiment zu gelangen [169].

Die SPION-Internalisierung hängt von der Ladungsdichte und der Größe ab [170]. Generell scheinen Partikeln < 100 nm internalisiert werden zu können, Partikeln < 40 nm gelangen in den Zellkern und Partikeln < 35 nm können die Blut-Hirn-Schranke durchqueren [170]. Die Internalisierung erfolgt über Pinozytose oder Rezeptor-vermittelt über Clathrin- und Caveolin-abhängige Mechanismen [171]. Studien an Liposomen belegen, dass die Phasenänderung der Lipidmembran bei einer Interaktion mit Nanopartikeln von der Ladungsdichte der Partikeln abhängt. Positiv geladene Partikeln verflüssigen die Membran, während negativ geladene Partikeln zu einer Gelatinierung führen. Diese Gelatinierung ist umso stärker, je dichter die negativen Ladungen beieinander liegen [172]. Obwohl SPION von den Zellen im Allgemeinen gut vertragen werden, kann die Internalisierung zu höherem oxidativen Stress führen, der sich letztendlich auf die Proteinexpression sowie Zellproliferation und -differenzierung auswirkt [135].

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Analyse von SPION zum Transport von therapeutisch wirksamen CPP in Muskelzellen. Als Beispiel für SPION wurden VSOP und Ferumoxytol aufgrund ihrer Nanopartikel-spezifischen Eigenschaften gewählt. CPP sind aufgrund ihrer Fähigkeit ins Zellinnere zu gelangen für die Forschung und Therapieentwicklung zunehmend von Interesse. Ihre fehlende Zellspezifität und geringe Halbwertszeit erschweren ihren klinischen Einsatz. Ziel des Transports mittels Nanopartikel ist eine Erhöhung der Steuerbarkeit des Transports *in vivo* und eine Verlängerung der Halbwertszeit.

Vor ihrer Anwendung *in vivo* wurden die Nanopartikel ausführlich *in vitro* untersucht. So wurden die Nanopartikel hinsichtlich Peptidadsorption bzw. Partikelbeladung und Suspensionsstabilität *in vitro* untersucht und charakterisiert. Die Wirkstoffabgabe aus den Nanopartikeln und Peptidaufnahme in die Zelle wurde *in vitro* untersucht. Anschließend wurde der Transport von CPP mittels SPION als möglicher Therapieansatz für die Dysferlinopathie an einem etablierten Mausmodell untersucht. *In vitro* konnte bereits ein therapeutischer Effekt dieser Dysferlin-spezifische CPP in Dysferlin-defizienten humanen Muskelzellen gezeigt werden.

3 Methoden

3.1 Chemikalien und Substanzen

Für alle wässrigen Lösungen wurde destilliertes Wasser (Aqua dest.) verwendet. Die Wasseraufbereitung erfolgte mit einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland). Wenn nicht anderes angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma-Aldrich bezogen.

3.1.1 Zellpenetrierende Peptide (CPP)

Das 20 Aminosäuren lange CPP (s. Tab. 1) enthielt zehn Aminosäuren aus der Sequenz des mutierten Dysferlins und eine zehn Aminosäuren lange tat-Sequenz (TAT). Dieses TAT-Dysferlin-Peptid (TDP) konnte *in vitro* an Myotuben von Dysferlin-Patienten die Funktion von Dysferlin wiederherstellen [46].

Tabelle 1: TAT-Dysferlin-Peptid (TDP)

Die Sequenz YGRKKRRQRRR entspricht die TAT-Sequenz. Die Carboxy-terminale Sequenz LAWGPRNMKS stammt aus dem mutierten Dysferlin.

Peptid: (Sequenz)	Nettoladung	Größe (Da)
TAT-Dysferlin-Peptid (YGRKKRRQRRRCLAWGPRNMKS)	+10	2804

Zum Nachweis im Zielgewebe wurde das TDP mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Es wurden drei Fluorophore mit unterschiedlichen chemischen Charakteristika und Fluoreszenzeigenschaften untersucht (s. Tab. 2 und 3). Die verwendeten Fluorophore werden vor der Abkürzung TDP genannt (z. B. ATTO495-TDP). Die kovalente Kopplung der Fluorophore erfolgte über eine Maleimid-Gruppe an einem Cystein-Rest, der in die Peptidsequenz zwischen der penetrierenden Sequenz und dem Dysferlin-Peptid eingebaut wurde. Die Synthese der Peptide sowie deren kovalente Markierung mit dem Fluorophor wurde von der Firma BIOSYNTAN GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Peptide wurden als Trifluoressigsäure-Salze geliefert und trugen am Carboxy-Terminus eine Amidgruppe. Die Reinheit der Peptide von mindestens 95 % wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und Massenspektrometrie vom Hersteller überprüft.

Als Prototyp für die Beladung wurde zunächst ATTO495-TDP (s. Tab. 2 und 3) getestet. Die Verträglichkeit dieses markierten Peptids in humanen Muskelzellen wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe belegt [46]. In Vorexperimenten stellte sich ATTO495-TDP jedoch als ungeeignet für den Nachweis im Muskelgewebe (Zielgewebe) heraus.

Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der beiden anderen Farbstoffe erlaubten die Evaluation der Empfindlichkeit der elektrostatischen Adsorption an den Nanopartikeln. Die Oxidationsresistenz der Dysferlin-Sequenz von Dy557-TDP und cIDCC-TDP wurde durch den Austausch von Methionin durch Norleucin erhöht [173,174]. Die von der Firma Biosyntan durchgeführte HPLC ergab, dass während der Lagerung (-20° oder +4°C) ein Teil des Methionins des ATTO495-TDP zu Methionin-Sulfoxid oxidiert wurde.

Tabelle 2: Fluorophor-markierte TAT-Dysferlin-Peptide (TDP)

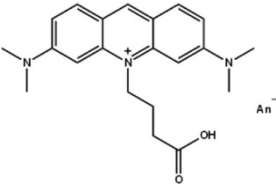

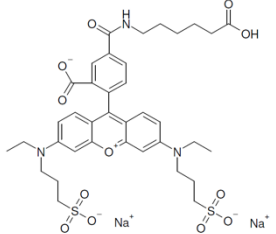
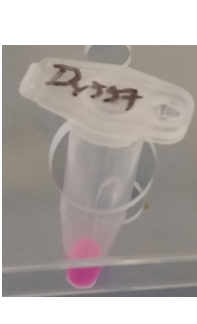
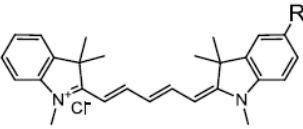
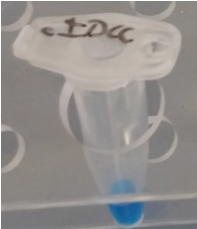
<p>YGRKKRRQRRR-C(ATTO495-ME)-LAWGPRNMKS-AMID</p> <p>ATTO495 (Firma: ATTO-TEC GmbH)</p>		
<p>YGRKKRRQRRR-C(Dy557-ME)-LAWGPRN-Nle-KS-AMID</p> <p>Dy557 (Firma: Dyomics GmbH)</p>		
<p>YGRKKRRQRRR-C(cIDCC-ME)-LAWGPRN-Nle-KS-AMID</p> <p>cIDCC (Firma: IC Discovery GmbH)</p>		

Tabelle 3: Eigenschaften der Fluorophore

Fluorophor	Absorptionsmaximum (λ_{abs})	Emissionsmaximum (λ_{em})	Ladung	Größe (g/mol)
ATTO495	498	525	positiv (Acridinderivat)	474
Dy557	556	578	negativ (Carboxy- und Sulfonsäuren)	953,98
cIDCC	640	660	positiv (Indolgruppe)	550

3.1.2. Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION)



Abbildung 8: SPION-Suspensionen – Eppendorfgefäße mit den unverdünnten VSOP- (links) und Ferumoxytol-Lösungen (rechts) (Eisenkonzentration 409 bzw. 537 mM)

VSOP

Die verwendeten VSOP (s. Abb. 8 und Tab. 4) wurden von Frau Monika Ebert in der Abteilung Experimentelle Radiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Berlin, Deutschland) hergestellt und charakterisiert [175].

Ferumoxytol (Feraheme®, Rienso®)

Ferumoxytol (Feraheme®) wird von der Firma AMAG Pharmaceuticals, Inc. (Massachusetts, USA) produziert. Die benutzte Charge wurde über die Apotheke der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Berlin, Deutschland) bezogen (s. Abb. 8 und Tab. 4).

Tabelle 4: Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) und deren Eigenschaften (Ref: ¹[123], ²[129], ³[120])

SPION	Kerngröße (Fe-Atome)	Hydro- dynamischer Durchmesser	Hülle (Stabilisierung)	Zeta-Po- tenzial (ζ)	Halbwerts- zeit (Maus)
VSOP	5 nm (6500)	7,40 nm ($\pm 0,93$)	Zitronensäure (elektrostatisch)	-36,5 mV (pH 7,4)	0,5 h ³
Ferum- oxytol	6,5 nm (5784) ¹	17,85 nm ($\pm 2,24$)	Carboxymethyl- Dextran (elektrosterisch)	-37,2 mV (pH 7,4) ¹	4 h ²

3.2 Geräte und Messmethoden

3.2.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die DLS ist eine verbreitete Technik zur Größenbestimmung von Nanopartikeln in Suspension basierend auf der temporalen Intensitätsfluktuation der Lichtstreuung durch die Brownsche Bewegung. Die Größe der Nanopartikel wird mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung anhand ihrer Diffusionskoeffizienten ermittelt [176]. Der gemessene hydrodynamische Durchmesser gibt die Größe der Nanopartikel (Kern und Hülle) zusammen mit der umgebenden Solvathülle wieder.

Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers der Eisenoxid-Nanopartikel (Größenbestimmung) erfolgte mit dem Gerät Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland). Das DLS-Gerät war mit einem Standard Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm ausgestattet.

Als Software wurde die Zetasizer Version 6.20 verwendet. Die Messungen wurden mit einer Ultramikroküvette (105.251.005-QS, 3 x 3 mm) der Firma Hellma Analytics (Müllheim, Deutschland) durchgeführt und erfolgten bei einer Temperatur von 23°C sowie einem Messwinkel von 173° (Rückstreuung). Pro Probe erfolgten 6 aufeinander folgenden Messungen.

Die Größenbestimmung der Nanopartikel erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, direkt nach der Konjugation in Aqua dest. (Milli-Q-Pore).

Zur Untersuchung der Suspensionsstabilität unter physiologischen Salzkonzentrationen erfolgte zusätzlich auch die Messung des hydrodynamischen Durchmessers nach Resuspension der Partikellösung in einem Verhältnis von 1 zu 10 in einer physiologischen Pufferlösung (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Physiologische Pufferlösung

Pufferzusammensetzung (pH 7,4)	
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,35 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM

3.2.2 Zeta-Potenzial

Die Messung des Zeta-Potenzials beruht auf einer Elektrophorese der Suspension, die an den Laser-Doppler-Effekt gekoppelt wird. Wie oben ausgeführt, können Diffusionsbewegungen der Partikeln zu einem Abstreifen der diffusen Schicht führen. Nach Verstärkung dieser Diffusionsbewegungen durch Elektrophorese wird die elektrophoretische Mobilität der suspendierten Nanopartikel im Medium mittels Laser-Doppler gemessen. Dabei wird das elektrische Potenzial auf der äußeren Grenze der Außenschicht bestimmt. Die Ionenstärke und die Valenz gelöster Ionen tragen zur Ausdehnung der diffusen Schicht bei. Das pH beeinflusst die Ladung der Nanopartikel durch die Wasserstoffionen-Konzentration. Ein Zeta-Potenzial von < -30 mV gilt allgemein als elektrostatisch stabilisierend [116,117].

Das Zeta-Potenzial wurde bestimmt, um einen Eindruck über die Gesamtladung der Nanopartikel zu gewinnen. Auch hier wurde das Gerät Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland) verwendet. Für die Messung wurden 1 ml der zu untersuchenden Nanopartikel-Suspension in einer Konzentration von 1 mM Fe (in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) Puffer, 5 mM, pH 7,4) vorsichtig mit einer 1 ml Spritze in eine gefaltete Einweg-Kapillarzelle (Malvern) gegeben. Dabei galt es, die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden. Für die Bestimmung wurde die Methode „Smoluchowski“ im Zeta-Potenzial-Modus der Software Zetasizer gewählt.

3.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit dem Gerät Fluorescence Spectrophotometer F-7000 der Firma Hitachi (Tokyo, Japan) mit der Software FL solutions Version 2.1 durchgeführt (s. Tab. 6). Die Messungen erfolgten in einer Halbmikroküvette (104F-QS, 4 x 10 mm) der Firma Hellma Analytics (Müllheim, Deutschland).

Tabelle 6: Einstellungen Fluoreszenzphotometer

	ATTO495	Dy557	cIDCC
Schlitzbreite SlitEx	5 nm		
Schlitzbreite SlitEm	5 nm		
PMT Voltage	400 V		
Anregungswellenlänge (Ex)	500 nm	560 nm	640 nm
Detektionswellenlänge (Em)	515–545 nm	570–670 nm	650–750 nm

Die Nähe der Fluoreszenzmoleküle zueinander und zur Metalloberfläche des Nanopartikelkerns führt zu einem Fluoreszenz-Quenching durch direkten Energietransfer [177]. Das Quenching ist nur über kurze Distanzen möglich, sodass sich mit zunehmender Entfernung des Fluorophors von der Eisenoxid-Kernoberfläche das Quenching verringert und die Fluoreszenzintensität zunimmt. Überschüssige, nicht an Nanopartikeln gebundene TDP werden nicht vollständig gequenchet, wodurch die Fluoreszenzintensität ansteigt.

3.2.4 Relaxivitätsmessungen

Im Allgemeinen gelten Nanopartikel als stabil, wenn sie sich über die Zeit konstant in einem Größenbereich befinden. Da der hydrodynamische Durchmesser (s. Kap. 3.2.1) in proteinhaltigen biologischen Medien nur schwer gemessen werden kann, da Proteine selber als Kolloide das Licht streuen [178], wurde die Suspensionsstabilität in biologischen Medien anhand der transversalen Relaxivität (r_2) der Eisenoxid-Nanopartikel gemessen. r_2 (Umkehrwert der transversalen Relaxationszeit) korreliert direkt mit der Größe der Nanopartikel. Laut Literatur zeigen einige Nanopartikel (in Abhängigkeit von der Struktur und äußeren Hülle) eine lineare Korrelation zwischen r_2 und der Größe [140,179]. Die Relaxivität ist ein Maß für die Wirksamkeit eines Kontrastmittels und hängt von der Temperatur, der Viskosität sowie der Beweglichkeit der Teilchen ab [180,181].

Eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Suspensionsstabilität von Eisenoxidnanopartikeln ist die Messung der Relaxationszeit bei unterschiedlichen Konzentrationen. Zwischen der Relaxivität und der Eisenkonzentration besteht eine lineare Korrelation [182]. Ein fehlender linearer Zusammenhang deutet auf instabile Messwerte und somit auf eine Instabilität der suspendierten Nanopartikel hin.

Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden in einer orientierenden Messung ausgewählte Nanopartikel untersucht. Weiter wurde die zeitliche Änderung der transversalen Relaxivität (r_2) in fötalem Kälberserum (FCS) bei gleicher Konzentration untersucht. Als Vergleich dienten unbeladenen SPION bei gleicher Eisenkonzentration.

Die Untersuchung erfolgte an dem Gerät minispec nq40 NMR analyzer (40 MHz, 0,94 T) der Firma Bruker BioSpin (Karlsruhe, Deutschland) mit der Software minispec Version 2.51 bei einer konstanten Temperatur von 37°C. Das Probevolumen betrug 300 µl. Als Proberöhrchen dienten Kernspinresonanz-(NMR)-Proberöhrchen (5 mm x 203 mm, dünnwandig) der Firma VWR (Pennsylvania, USA). Vor der Messung wurden die Proben im Wasserbad auf 40°C temperiert.

3.2.5 Agarose-Gel

Zur direkten Analyse der Dissoziations- bzw. Desorptionstendenz der an den Nanopartikeln adsorbierten TDP wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wandern gelöste Moleküle und Kolloiden in Abhängigkeit von ihrer Nettoladung in einem elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode.

Physikalisch entsteht die Ladung, die die Teilchen in Bewegung setzt, durch Scherkräfte auf der Ebene der elektrischen Doppelschicht der Nanopartikel. Die Scherkräfte entstehen durch die Bewegung der im Trägermilieu gelösten Ionen. Solche beweglichen Ladungsträger sind Voraussetzung für eine elektrophoretische Trennung. Faktoren wie die Viskosität, Porenweite und Ionenstärke des Trägermilieus sind für alle Teilchen gleich. Die Porenweite ist indirekt proportional zur Agarose-Konzentration im Gel.

Mathematisch kann die Kraft F , die die gelösten Teilchen in Bewegung setzt, als Produkt der Ladung q und des elektrischen Feldes E ausgedrückt werden.

$$F = q * E$$

Als Widerstand wirkt die Reibungskraft, die sich nach dem Gesetz von Stokes berechnet und direkt proportional zur Geschwindigkeit der Teilchen v , deren Größe r und der Viskosität η des Trägermediums ist.

$$F_w = 6 * \pi * r * \eta * v$$

Somit ist die Wanderung der Ionen direkt proportional zu ihrer Nettoladung und indirekt proportional zu ihrer Größe.

Für die vorliegenden Experimente wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1 %igen (m/v) Agarose-Gel als Träger durchgeführt. Weitere Faktoren (z. B. Wanderungsgeschwindigkeit v umgekehrt proportional zum Teilchenradius) spielten für die Fragestellung eine untergeordnete Rolle. Dieses Trennverfahren wurde bereits an unbeladenen Gold-Nanopartikel getestet [183].

Die Agarose BroadRange Rotigarose (Roth, Deutschland) wurde in einem Verhältnis von 1 zu 100 in HEPES-Puffer als Trennpuffer (140 mM NaCl, 10 mM HEPES) aufgelöst. Nach dem Mischen wurde das Gel (ca. 95–100 ml) vorsichtig und luftblasenfrei in einen Gelträger (Firma: neoLab, Heidelberg Deutschland) gegossen. Der Kamm (21 Taschen mit ca. 25 μ l Maximalvolumen) wurde in die Mitte des Gels platziert. Nach dem Festwerden wurde das Gel in die Gelelektrophorese-Kammer (Midi-I, neoLab) gelegt. Die Elektrophoresekammer wurde mit ca.

850 ml HEPES-Puffer (140 mM NaCl, 30 mM HEPES) als Laufpuffer aufgefüllt. Die Nanopartikel-Proben wurden nach der Konjugation mit 1–2 µl Glycerin gemischt, um eine freie Diffusion nach dem Einbringen in die Taschen zu vermeiden. Um den Einfluss der Serumproteine auf die Nanopartikel zu untersuchen, wurde die beladenen Nanopartikel teilweise mit FCS in einem Verhältnis von 1 zu 5 (Endvolumen 20 µl) gemischt. Anschließend wurden 2 µl Glycerin hinzugefügt. In jede Probetasche wurden 22 µl Probe gegeben. Die Kammer wurde dann mit dem an das Power Supply (PowerPac Basic der Firma BioRad, USA) angeschlossenen Deckel verschlossen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 33 V. Der Gellauf wurde nach erfolgreicher Auftrennung und maximal nach 3 Stunden beendet. Nach dem Entfernen aus der Kammer wurde das Gel mit einer UV-Handlampe (Hersteller Benda, Typ NU-6 KL, mit $\lambda = 254$ und 366 nm) analysiert.

Bei der Auftrennung wurde darauf geachtet, ob die Proben von den mittig liegenden Probetaaschen zur Anode (positive Elektrode) oder zur Kathode (negative Elektrode) wanderten.

Für die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzunterschiede der Proben mit den Farbstoffen ATTO495 (Ex 500 nm; Em 525 nm) und Dy557 (Ex 560 nm, Em 570 nm) wurde das Geldokumentationssystem G-Box EF-2 der Firma VWR (USA) und das Aufnahmeprogramm GeneSYS verwendet. Für die Anregung mit dem UV-Transiluminator ($\lambda = 240$ nm) wurde der Filter auf UV032 (572–630 nm) eingestellt. Andere verfügbare Anregungslampen waren die LED-Lampen Green (540 nm) oder Red (640 nm)

Für eine semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzunterschiede der Proben mit dem Farbstoff cIDCC (Ex 640 nm; Em 660 nm) wurde das Geldokumentationssystem Odyssey Infrared Imaging System der Firma Licor (USA) verwendet. Für die Darstellung wurde der Channel 700 eingestellt (Ex 685 nm; Em 700 nm).

Die Dateien der Dokumentationssystemen Syngene und Li-Cor wurden im Format tif exportiert und mit ImageJ ausgewertet.

Für die Auswertung der entstandenen Elektrophorese-Säulen nach der Auftrennung wurde bei allen Elektrophoresensäulen ein gleichgroßer Bereich auf der gleichen Höhe auf der Kathoden- und Anodenseite gewählt. Als Referenz für die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität des jeweiligen Farbstoffes diente die Fluoreszenzintensität der Säulen mit dem freien TDP. Die gemessenen Werte auf der Kathoden- und Anodenseite der Partikel-Säulen wurden mit dem Referenzwert (gleiche Farbstoff-Konzentration) verglichen, um den relativen Anteil an TDP zu bestimmen, der frei (Kathode) oder an die Nanopartikel gebunden (Anode) gewandert ist. Die

Differenz, die durch die Messung nicht erfasst wurde, wurde als der Signalanteil interpretiert, der durch die Nanopartikel gequencht wurde. Die Summe der drei Anteile – Intensität auf der Kathodenseite, Intensität auf der Anodenseite und der gequenchte Anteil – entsprach 100 %. Der Fluoreszenzanteil auf der Anodenseite sowie der «gequenchte» Anteil wurden als der adsorbierte TDP-Anteil interpretiert, der an die Nanopartikel gebunden war.

3.2.6 Mikroskopie

3.2.6.1 Konfokales Laser Scan Mikroskop

Um die in den Myotuben eingeschleusten CPP darzustellen, wurden Aufnahmen mithilfe eines konfokalen Laser Scan Mikroskops (CLSM, Zeiss LSM 700 confocal microscope) mit dem 40 x Objektiv und mit dem LCI Plan-NEOFLUAR 63x/1.3 Objektiv mit Immersion in Glycerol (Zeiss, Deutschland) angefertigt. Das Mikroskop verfügt über vier Laser (405 nm, 488 nm, 555 nm, 639 nm). Für die Experimente wurden der 405 nm Laser für die Darstellung der Kernfärbung mit Hoechst, der 555 nm für die Darstellung des Fluorophors Dy557 und der 639 nm Laser für die Darstellung des Fluorophors cIDCC verwendet. Die Laser wurden auf 3–5 % der Maximalkapazität eingestellt, um einerseits eine gute Darstellung zu gewährleisten und andererseits ein Bleaching der Fluoreszenz zu vermeiden.

Die Aufnahmen wurden von lebenden oder von mit 3,7 % Formaldehyd fixierten Zellen gemacht. Nach der Fixierung erfolgte eine Kernfärbung mit Hoechst, das in einem 1:1000-Verhältnis in Phosphat buffered saline (PBS) (Thermofisher, USA) verdünnt wurde.

Für die Verarbeitung der Bilder wurde die Software von Zeiss LSM ZEN 2011 (black edition, 64 bit, version 7.0) verwendet.

Zur Analyse der CPP-Aufnahme in die Zellen wurden mehrere Bilder der gleichen Zelle mit dem 63 x Objektiv und unterschiedlichen Brechentfernungen (Z-Stacking) aufgenommen. Die Bilder wurden mit dem Programm ImageJ analysiert: Für die semiquantitative Messung der intrazellulären Fluoreszenzintensität wurde der Plugin segmentation editor verwendet. Dabei wurde ausschließlich in der Ebene gemessen, in der die Hoechst-Fluoreszenzintensität ihr Maximum hatte, um eine intrazelluläre Lokalisation des gemessenen CPP-konjugierten Fluorophors sicherzustellen.

3.2.6.2 Evos

Zusätzlich zu den Aufnahmen mit dem konfokalen Laser Scan Mikroskop wurden die Zellen im Rahmen ihrer Kultivierung mit einem Fluoreszenzmikroskop Evos FL Cell imaging system

(Invitrogen Thermofisher, Massachusetts USA) regelmäßig kontrolliert. Die weniger aufwendigen Phasenkontrastbilder erlaubten schnellere Rückschlüsse auf eine toxizitätsbedingte Apoptose.

3.2.6.3 Fluoreszenzmikroskopie

Zur histologischen Untersuchung der Gewebeproben (s. Kap. 3.2.9) wurde das Fluoreszenzmikroskop Mikroskop Axio Observer.Z1 (Zeiss, Deutschland) ausgestattet mit einem Apoptome-Gerät (Zeiss, Deutschland) und einem motorisierten Tisch (Zeiss, Deutschland) verwendet. Der motorisierte Tisch erlaubte die Aufnahme von einem größeren Sichtfeld durch das Zusammenfügen von mehreren Bildern aus einem ausgewählten Region of Interest. Als Filtersätze wurden die Filtersätze von Zeiss 49 (Anregungswellenlänge 365 nm, Detektionswellenlänge 445 nm) für DAPI, 45 (Anregungswellenlänge 560 nm, Detektionswellenlänge 630 nm) für Dy557 und 50 (Anregungswellenlänge 640 nm, Detektionswellenlänge 690 nm) für cIDCC. Für die Verarbeitung der Bilder wurde die Software von Zeiss ZEN 2012 verwendet

3.2.7 Elektrostatische Beladung der Nanopartikel

Die elektrostatische Beladung der SPION (VSOP, Ferumoxytol) erfolgte stöchiometrisch. Dazu wurde die SPION-Suspension im gleichen Volumenverhältnis zur TDP-Lösung gegeben. Die Ansätze wurden zunächst mit der Pipette und anschließend mit einem Vortex-Gerät vermischt. Um äußere Faktoren auszuschließen, erfolgte die Beladung in Aqua dest. (Milli-Q-Pore).

Durch die hohe Anzahl an basischen Aminosäuren (s. Tab. 1, Arginin- (R) pKs-Wert = 12,5; und Lysin-Seitenketten (K) pKs-Wert = 10,8) ist TDP unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) positiv geladen. Diese Ladung interagiert mit der negativ geladenen Hülle der Nanopartikel (deprotonierte Carbonsäure-Resten) (Zeta-Potenzial < -30 mV für beide Partikeln) und gewährleistet die Adsorption.

Die berechnete Eisenkonzentration nach Beladung betrug 210 mg/l (3,74 mM Fe in H₂O) für VSOP und 48,2 bzw. 35,2 mg/l (0,86 mM bzw. 0,63 mM Fe in H₂O) für Ferumoxytol.

Charakterisierung der mit den TDP beladenen Nanopartikeln erfolgte durch Größenmessung (s. Kap. 3.2.1) und Messung der Fluoreszenzintensität (s. Kap. 3.2.5). Als Kriterien für die Suspensionsstabilität wurden die Größen- und Relaxivitätsmessungen (s. Kap. 3.2.4) in verschiedenen Medien verwendet. Die Reversibilität der Beladung wurde anhand der Quenchingfähigkeit in FCS und mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.2.5) untersucht. Die Abgabe der Peptide und deren Aufnahme in Muskelzellen wurde *in vitro* an Myotuben (s. Kap. 3.2.6

und 3.2.8) untersucht. Die Pharmakokinetik wurde orientierend für ausgewählte Nanopartikel untersucht (s. Kap. 3.2.9).

Vor jedem Experiment wurden die Nanopartikel frisch angesetzt. Die Nanopartikel wurden nach der Nomenklatur – Fluorophor-Peptid:SPION – bezeichnet.

3.2.8 Zellkulturexperimente

Für die Experimente zur CPP-Internalisierung in Muskelzellen wurden gesunde humane Myotuben verwendet. Diese wurden durch die Fusion primärer, aus humanem Muskelgewebe isolierter Myoblasten generiert. Die Verwendung des humanen Muskelgewebes zu Forschungszwecken wurde durch die Ethikkommission genehmigt (EA1/203/08, EA2/051/10, Charité Universitätsmedizin Berlin).

3.2.8.1 Zellkulturbedingungen

Die nach dem vorab beschriebenen Verfahren [46] isolierten Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator (BBD 6220, Thermo Scientific) bei 37°C, 5 % CO₂ und 96 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Proliferationsmedium wurde Skeletal Muscle Cell Growth Medium (SMCGM) (Provitro, Berlin) mit 10 % FCS (Biochrom, Berlin), 1,5 % GlutaMax (Thermofisher, USA) und 40 µg/ml Gentamycin verwendet. Die Myoblasten für die Experimente befanden sich maximal in der neunten Passage und wurden bis zu 60–70 % Konfluenz kultiviert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Myoblasten mit 0,25 % Trypsin-Lösung (Thermofisher, USA) für 3–5 Minuten bei 37°C vom Kulturboden gelöst. Die Trypsin-Wirkung wurde anschließend durch Zugabe von SMCGM (9:1) gehemmt. Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte pipettiert, wo sie ohne Mediumwechsel für mindestens 24 Stunden belassen wurden. Zur Bestimmung der Zellmenge wurden 25 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld-Superior) pipettiert. Die Zellen in den neun Quadraten (Fläche 9 mm²) wurden über folgende Formel quantifiziert:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl gezählte Zellen}}{\text{Fläche (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe (mm)} * \text{Verdünnung}}$$

Für die Experimente wurde die gewünschte Anzahl an Zellen (2500–5000 Zellen) in ein Well eines 8 Well µ-Slides mit Glasboden (Ibidi, Martinsried, Deutschland) überführt, das anschließend mit 300 µl Proliferationsmedium aufgefüllt wurde.

3.2.8.2 Differenzierung

Bei einer Konfluenz der Myoblasten von 70 % wurden die Zellen zu Myotuben differenziert. Als Differenzierungsmedium wurde Opti-MEM® (Thermofisher, USA) mit 40 µg/ml

Gentamycin verwendet. Laut Herstellerangaben enthält Opti-MEM®: Hypoxanthin, Thymidin, Natrium-Pyruvat, L-Glutamin, Transferrin, Insulin sowie Spurenelemente. Der pH-Wert wurde mithilfe von Phenolrot kontrolliert und mit HEPES und Natrium-Hydrogencarbonat (NaHCO_3) ($2,4 \text{ g l}^{-1}$) gepuffert.

Die Fusion von gesunden Myoblasten zu mindestens 3-kernigen Myotuben dauerte 2–3 Tage.

3.2.8.3 Dissoziations- und Aufnahmeexperimente

Für die Carrier-Funktion müssen Nanopartikel stabil beladen werden und im Blut zirkulieren können. Beim Erreichen des Zielgewebes muss das Peptid von den SPION abgegeben werden und in die Zielzellen eindringen. Für die *in vitro* Analyse der Internalisierung wurden gesunde humane Myotuben verwendet, in deren Kulturmedium CPP, Nanopartikel oder CCP-Nanopartikel gegeben wurden. Als Kontrolle dienten Ansätze nur mit Kulturmedium. Zur Analyse des zeitlichen Verlaufs der Internalisierung wurde die Fluoreszenzintensität im Zytosol und im Kulturmedium verglichen. Überstieg die intrazelluläre Fluoreszenzintensität die des Kulturmediums, wurde dies als eine intrazelluläre Akkumulation des Fluorophors gewertet. Die Differenz der Fluoreszenzintensität ($\Delta\text{Fluo}(i-e) = \text{Fluoreszenzintensität Zytosol } (F_i) - \text{Fluoreszenzintensität Medium } (F_e)$) diente als Surrogatparameter für die Latenzzeit bis zur Internalisierung.

Zur Untersuchung der zeitlichen Translokation der CPP (s. Kap. 4.6.1) wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen zu fünf Zeitpunkten innerhalb der ersten Stunde (5, 10, 20, 30, 45, 60 Minuten) nach Zugabe der Substanzen für die Internalisierungsexperimente angefertigt. Nach 40 Minuten wurde mit der Untersuchung des nächsten Wells begonnen. Es folgten weitere Aufnahmen nach 70–80 und 120 Minuten. Insgesamt befanden sich die Slides während des Experimentes für 2 Stunden außerhalb des Inkubators. Die Zellkammern blieben dabei die ganze Zeit verschlossen, um eine Kontamination zu vermeiden. Die Öffnung des Deckels der Ibidi-Slides und die Zugabe der Peptid- bzw. Partikel-Lösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Nach Beendigung der Zeitreihe-Experimente wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd (Roth, Deutschland) für 20 Minuten fixiert. Danach schloss sich eine Kernfärbung mit Hoechst für 3 Minuten an. Die Zellen wurden abschließend mit PBS bedeckt und bei 4°C für maximal 2 Wochen aufbewahrt.

Weiter (s. Kap. 4.6.2.) wurden Z-Stack-Aufnahmen von Myotuben nach einer Inkubation von 4 Stunden durchgeführt. Der lange Zeitraum wurde gewählt, um einen maximalen Unterschied zwischen der intra- und extrazellulären Fluoreszenz zu erzielen und so die Internalisierung der

Peptide und deren Freisetzung aus den Nanopartikeln besser zu differenzieren. Das intrazelluläre Kompartiment wurde auf mehreren Ebenen mit einem eingestellten Abstand als Z-Stack im konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten nach Fixation und Kernfärbung der Zellen.

Die Z-Stacks wurden mit einem für die jeweilige Zelle erstellten Atlas in ImageJ ausgewertet. Zur Orientierung diente die Fluoreszenz der Kernfärbung. So wurde die Differenz der Fluoreszenz intrazellulär und extrazellulär auf der gleichen Höhe berechnet.

Für die Experimente wurde das Differenzierungsmedium (152 µl) aufgefrischt. Danach wurde die in sterilem Aqua dest. aufgelöste Peptid- und Nanopartikel-Suspension (18 µl), hinzugegeben.

3.2.9 Tierversuche

3.2.9.1 Injektion und Gewebeentnahme

Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Die durchgeführten Versuche wurden beim Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales beantragt und genehmigt (Tierversuchsvorhaben G0028/15, Erweiterung des Antrages mit Genehmigung vom 17.05.2016).

Für die Experimente wurde ein neuer Mausstamm (MMex38) verwendet, bei dem die Dysferlinopathie durch eine Missense-Mutation hervorgerufen wird (*Dysf* c.4079T > C (NCBI Genbank: NM_001077694.1) in Exon 38, *Dysf* p.Leu1360Pro (NCBI GenPept: NP_001071162.1)). Dieser Aminosäureaustausch entspricht dem der humanen Mutation *DYSF* p.L1341P. Bei Patienten führt diese Mutation zu einer Fehlfaltung des Proteins, zur Aggregation im Zellinneren und zu vorzeitigem Abbau des Proteins. Klinisch ruft die Mutation das Vollbild der Muskelkrankheit (Dysferlinopathie) hervor. Der Mausstamm wurde ausführlich charakterisiert und es findet sich auch hier das Vollbild der Erkrankung mit all den Spezifika, die durch die Missense Mutation bedingt sind [184].

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Nanopartikel im Blut wurden MMex38-Mäuse (n = 1 pro Gruppe) systemisch injiziert. Die Halbwertszeit der zirkulierenden Nanopartikel wurde anhand der Fluktuation der Fluoreszenzintensität des TDP im Blut ermittelt. Nachdem die Tiere unter Verwendung eines Anästhesiegeräts (Völker) mit 1–2%-haltigem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch anästhetisiert worden waren, wurden die Nanopartikel-Suspensionen in einer Dosis von 500 µmol Fe/kg intravenös appliziert (Schwanzvene). 150 Minuten nach der Injektion wur-

den die Mäuse schmerzlos getötet. Anschließend wurden Blutproben sowie Proben aus der Gallenflüssigkeit und dem Urin entnommen. Verschiedene Gewebe (Oberschenkelmuskulatur, Triiceps surae, Leber, Milz, Lunge, Niere) wurden nach der Entnahme in vorgekühltem Isopentan eingefroren. Während des gesamten Zeitraums wurde ein Neodym-Magnet an ein Bein angebracht, um den Einfluss eines anziehenden magnetischen Feldes auf die Halbwertszeit und die Möglichkeit einer Anreicherung der beladenen Nanopartikel zu analysieren.

3.2.9.2 Blutentnahme

Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde Blut vor der Injektion der Nanopartikel und (5, 15, 30, 45 und 90 Minuten je 15-20 µl (Gesamtvolumen 75 µl bis max. 100 µl) nach der Injektion aus der Schwanzvene entnommen. Für die Blutentnahmen während der ersten Stunde wurde ein Verweilkatheter verwendet. Dabei wurde die Maus mittels Isofluran-Inhalation in kontrollierter Narkose gehalten. Um die Narkose nicht unnötig zu verlängern, erfolgte die Blutentnahme nach 90 Minuten mittels Einmalpunktion. Während der 60-minütigen Narkose wurden die Mäuse temperiert (Wärmematte, 37°C). Die Blutproben wurden in einem 1:1-Verhältnis mit Heparin (Endkonzentration 1250 IE/ml) gemischt, um die Gerinnung zu inhibieren. Anschließend wurde das Blut zentrifugiert (4°C, 5 Minuten, 1000G), um den korpuskularen Anteil vom Plasma zu trennen. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:10 mit 0,9%ige NaCl verdünnt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Fluoreszenzphotometer gemessen. Anhand der zeitlichen Änderung der Fluoreszenzintensität des Fluorophors im Blut wurde die Halbwertszeit ermittelt. Diese wurde mit der in der Literatur beschriebenen Halbwertszeit für VSOP und Ferumoxytol verglichen [120,129]. Mit dieser Methode sollte der Einfluss des Cargos (TDP) auf die Halbwertszeit ermittelt werden und Rückschlüsse auf eine mögliche frühzeitige Peptidfreisetzung bzw. -desorption gezogen werden.

3.2.9.3 Histologie

Nach der Entnahme der Muskelproben wurden diese mit *Gum Tragacanth*, auf Korkplättchen fixiert, für zehn Sekunden in halbgefrorenem Isopentan (Roth, Deutschland) geschwenkt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Herstellung vom *Gum Tragacanth* wurde Tragacanth-Pulver (Merck, Deutschland) und Glycerin (Roth, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

Mit dem Cryostat 2800 Frigocut-E (Leica, Deutschland) wurden zum Zweck der histologischen Untersuchung Cryoschnitte angefertigt. Für die Suche der Nanopartikel wurden unterschiedliche Schnittdurchmesser (6-12 µm) gewählt, um ein größeres Gewebsvolumen zu untersuchen. Die Gewebsschnitte wurden mit dem Eindeckmedium mit DAPI-Färbung Fluoroshield (Merck,

Deutschland) auf Objektträger verfestigt und dann mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (s. Kap. 3.2.6.3).

3.2.9.4 Fluoreszenzspektrometrie Gewebslysate

Um die Sensitivität für den Nachweis des Peptides im Muskelgewebe zu erhöhen, wurden Gewebsschnitte mit einem Tris-Triton-Lysispuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton-x100, 1 mM EDTA, 0,5 % Na-Deoxychelate, 1 mM Vanadat, 50 mM NaF) verdaut. Zum Tris-Triton-Lysispuffer wurde Phenylmethylsulfonylfluorid (Roth, Deutschland) und das Protease-Inhibitor-Cocktail Complete (Merck, Deutschland) je 1:10 hinzugefügt. Die Muskeln wurden im hergestellten Lysispuffer mit dem Handvortexer verkleinert. Anschließend wurden sie nach einer 30 Minuten Lagerung auf Eis zentrifugiert (4°C, 1300RPM). Der Überstand wurde abpipetiert. Für die Proteinbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer, USA) verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte gemäß Protokoll vom Hersteller. Hierfür wurde die zu untersuchende Probe 1:20 mit der Arbeitslösung (Reagenz A und Reagenz B in einem Verhältnis 50:1) gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung der Proteinintensität erfolgte bei 562 nm mit einem Photometer-Gerät. 100 µg des Proteinlysats wurden für eine fluoreszenzphotometrische Analyse verwendet (Endvolumen 100 µl). Die Einstellungen für die fluoreszenzphotometrische Messungen erfolgten wie oben ausgeführt (s. Kap. 3.2.3).

3.3 Statistik

Die graphische Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung wurde mit der Statistik-Software Graphpad Prism Version 8.2.1 (GraphPad Software, Californien, USA) durchgeführt. Für die gemessenen Partikeldurchmesser (s. Kap. 4.1 und 4.2) wurde der Mittelwert und Standardfehler (SEM) berechnet und dargestellt. Für die Messung der Partikeldurchmesser von ATTO495-TDP:Ferumoxytol in zunehmender Salzkonzentration (s. Kap. 3.2.4 und 4.2.2.) wurde ein nicht-lineares Regressionsmodell mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls verwendet. Die gemessene Partikeldurchmesser in Wasser sowie die Relaxometrie-Messungen in Serum (s. Kap. 4.3) wurden über Spline-Interpolation verbunden. Die gemessene Fluoreszenz aus den Elektrophorese-Experimenten (s. Kap. 3.2.5 und 4.5) wurde mit Balken dargestellt. Zur Untersuchung der freien Peptidanteile (s. Abb. 30 und 31) wurde einen Zweistichproben t-Test mit Welch-Korrektur verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet und ausgeführt. Für die Auswertung der intrazellulären Translokation in den Zellen (s. Kap. 3.2.8 und 4.6) wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Bei Planung der Tierversuche wurde durch einen externen Statistiker (Dr. Andreas Busjahn, HealthTwist GmbH, Berlin) eine Fallzahlanalyse durchgeführt. Die Messungen aus den orientierenden Pharmakokinetik-Experimenten (s. Kap. 4.7) wurden mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit einer einphasigen exponentiellen Zerfallsfunktion (one-phase exponential decay) untersucht. Zur Auswertung des Nachweises mittels Fluoreszenzspektrometer (s. Kap. 4.7, Abb. 52) aus den lysierten Muskelproben wurde ein Einstichproben t-Test verwendet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Elektrostatische Beladung der Nanopartikel

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses zwischen Peptid und SPION wurden die Nanopartikel zu verschiedenen konzentrierten Peptidlösungen gegeben (s. Tab. 7). Anschließend wurde die Größe der konjugierten Partikel (s. Kap. 3.2.1) sowie die Fluoreszenz (s. Kap. 3.2.5) gemessen. Zur Kontrolle wurden die Partikeldurchmesser der SPION und die Fluoreszenz der Peptide alleine (in den gleichen Konzentrationen) bestimmt. Verhältnisse, bei denen die Fluoreszenz vollständig oder nahezu vollständig gelöscht wurde und sich die Partikeldurchmesser nicht änderten, wurden als optimal gewertet.

Tabelle 7: Verwendete beladene Nanopartikel mit Anzahl an Fluorophor-TDP pro SPION und Größe (hydrodynamischer Durchmesser in Aqua. dest.) der Partikel

SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; ATTO495, Dy557, cIDCC = Fluorophore

Beladung (Größe) SPION:	ATTO495-TDP	Dy557-TDP	cIDCC-TDP
VSOP	2 (11,5nm)	3 (6,5nm)	2 (9,9nm)
Feraheme	11 (13nm)	16 (26nm)	16 (26nm)

4.1.1 Beladung von VSOP

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Größenmessungen (linke y-Achse) und der Fluoreszenzmessungen (s. Abb. 9, rechte y-Achse) bzw. der relativen Fluoreszenzmessungen (s. Abb. 11 und 12, Quotient aus Fluoreszenz der konjugierten Partikeln / Fluoreszenz der freien Peptide, rechte y-Achse) in Abhängigkeit vom VSOP/Peptid-Verhältnis zusammengefasst. Ein geringes Verhältnis entspricht eine hohe Fluoreszenzauslöschung (Quenching) durch die VSOP.

4.1.1.1 ATTO495-TDP:VSOP

Das ATTO495-TDP diente als Beispielpeptid für die Fähigkeit von VSOP mit einem markierten TDP beladen zu werden. Die Beladung erfolgte bei einer VSOP-Endkonzentration von 0,2 μM (1,3 mM Fe). Bis zu einer Beladung von 2 Peptide pro VSOP blieb die Partikelgröße relativ konstant (11.5 nm). Diese nahm danach mit zunehmender Beladungszahl zu und wurde instabil (s. Abb. 10). Erst ab einer Beladung von 12 Peptide pro VSOP wurden die Partikel erneut stabil und die Partikelgröße blieb konstant bei 17,85 nm (s. Abb. 9).

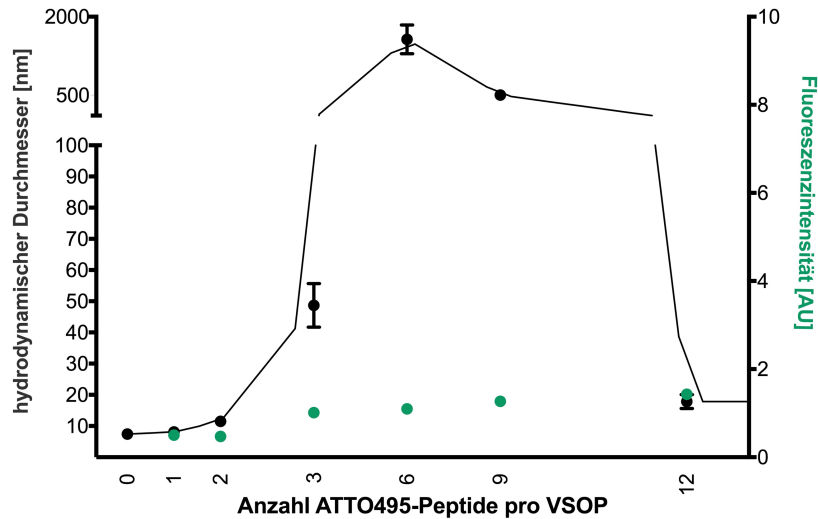


Abbildung 9: VSOP-Beladung mit unterschiedlichen Mengen an ATTO495-TDP – Größe (links, schwarze Symbole) und Fluoreszenzintensität (rechts, grüne Symbole) der beladenen Nanopartikel (n=2 Proben)

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen siehe Kapitel 4.1.1. Methodik siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; ATTO495 = Fluorophor

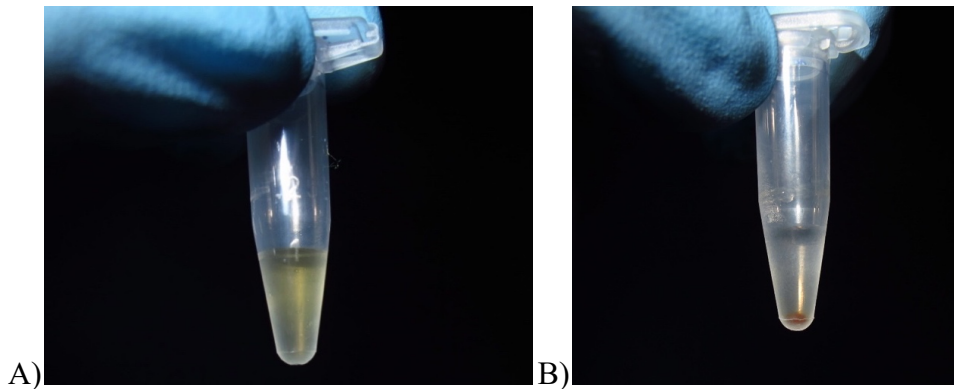


Abbildung 10: Beispiel einer stabilen (A) und einer instabilen (B) Nanopartikel-Suspension

A) stabile Beladung bei 3 ATTO495-TDP pro Very small iron oxide particle (VSOP) in Aqua dest. B) aggregierte Partikel bei 9 ATTO495-TDP pro VSOP in Aqua dest. (Eisenkonzentration 73 mg Fe/l TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; ATTO495 = Fluorophor

4.1.1.2 Dy557-TDP:VSOP

Die Beladung der VSOP mit Dy557-TDP fand bei einer Partikel-Endkonzentration von 0,6 μM (3,75 mM Fe) statt. Bei einer Beladung von 15 Peptiden pro VSOP wurden die Nanopartikel instabil; die Größe und Größenverteilung nahmen zu (s. Abb. 11). Es blieben mehr freie ungebundene Peptide in der Suspension, sodass die Fluoreszenzauslöschung abnahm. Bis zu einer Beladung von 3 Peptide pro VSOP blieb die Partikelgröße relativ konstant (6.5 nm)

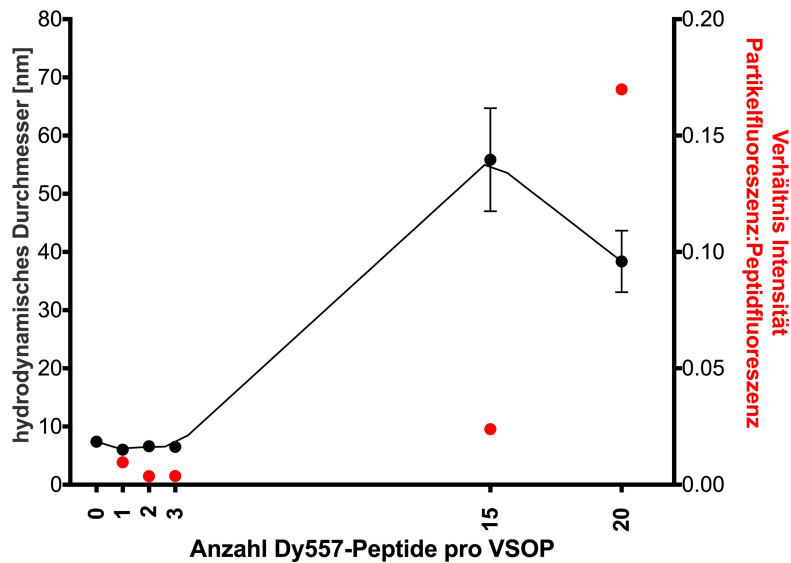


Abbildung 11: VSOP-Beladung mit unterschiedlichen Mengen an Dy557-TDP – Größe (links, schwarze Symbole) und Fluoreszenzverhältnis (rechts, rote Symbole) der beladenen Nanopartikel ($n=2$ Proben)

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen siehe Abschnitt 4.1.1. Methodik siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557 = Fluorophor

4.1.1.3 cIDCC-TDP:VSOP

Die Beladung der VSOP mit cIDCC-TDP erfolgte wie mit Dy557-TDP bei einer Partikel-Endkonzentration von $0,6 \mu\text{M}$ ($3,75 \text{ mM Fe}$). Die Nanopartikel zeigten bereits bei einer Beladung von drei Peptide pro VSOP eine abnehmende Suspensionstabilität, unter anderem auch mit einer breiteren Größendispersion (s. Abb. 12). Wie bei ATTO495-TDP blieb die Partikelgröße bis zu einer Beladung von 2 Peptide pro VSOP relativ konstant (9.9 nm). Makroskopisch konnte eine Instabilität bei einer Beladung von 5 Peptide pro VSOP (s. Abb. 13) beobachtet werden.

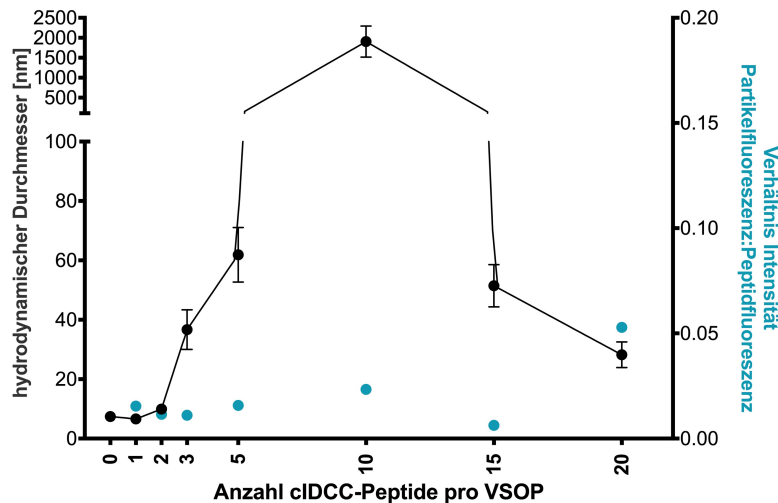


Abbildung 12: VSOP-Beladung mit unterschiedlichen Mengen an cIDCC-TDP – Größe (links, schwarze Symbole) und Fluoreszenzverhältnis (rechts, türkise Symbole) der beladenen Nanopartikel (n=2 Proben)

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen siehe Abschnitt 4.1.1. Methodik siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

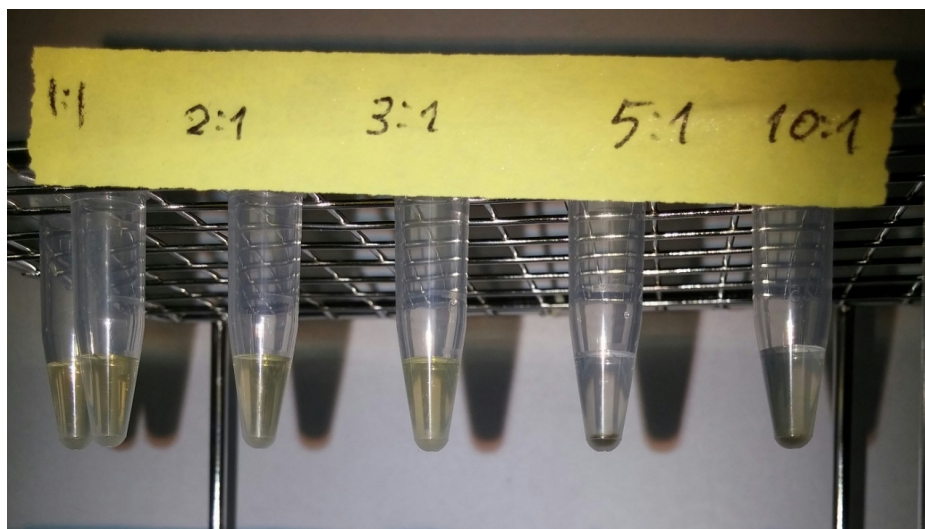


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der makroskopischen Eigenschaften der Nanopartikel-Suspensionen – Beladung von VSOP mit cIDCC-TDP

Instabile Nanopartikel bilden makroskopisch Aggregate, die im Gefäßboden sedimentieren. An diesem Beispiel erkennt man dieses Phänomen bei einer Beladung mit fünf Peptiden pro VSOP.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

4.1.1.4 Zeta-Potenzial

Wie bereits erwähnt, ist das Zeta-Potenzial insbesondere für rein elektrostatisch stabilisierte Nanopartikel relevant. Die Messung des Zeta-Potenzials erfolgte an beladenen und nicht-beladenen VSOP. Es wurden nur TDP-VSOP untersucht, die für die weitere Anwendungen stabil genug waren (Dy557-TDP:VSOP und cIDCC-TDP:VSOP). Alle untersuchten Nanopartikel behielten ein negatives Zeta-Potenzial von < -30 mV (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Eigenschaften von VSOP

Aufgeführt sind das Zeta-Potenzial [mV] und der hydrodynamische Durchmesser (Größe) [nm] in Aqua dest. für die Nanopartikel Dy557-TDP:VSOP und cIDCC-TDP:VSOP mit einer Beladung von drei bzw. zwei Peptiden pro VSOP.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

Zetapotential Beladung (Größe) SPION:	unbeladen	Dy557-TDP	cIDCC-TDP
VSOP	-36,5mV - (7,40nm)	-33mV 3 (6,5nm)	-45,9mV 2 (9,9nm)

4.1.2 Beladung von Ferumoxytol

Im Folgenden wird die Beladung der Ferumoxytol-Partikel (Feraheme®) mit den drei Peptiden analysiert. Die Ferumoxytol-Partikel ließen sich maximal mit 16 Peptiden beladen, bevor ihre Größe relevant zunahm und sie instabil wurden.

Die Erläuterung der Abbildungen (Abb. 14–16) entspricht den Anmerkungen zu den VSOP-Beladungen (s. Kap. 4.1.1; linke y-Achse: Ergebnisse der Größenmessungen, rechte y-Achse: Ergebnisse der (relativen) Fluoreszenzmessungen). Auch hier kennzeichnet ein niedriges Fluoreszenzverhältnis eine starke Fluoreszenzauslöschung (Quenching) durch die Nanopartikel.

4.1.2.1 ATTO495-TDP: Ferumoxytol

Wie bei den VSOP diente auch die Beladung von Ferumoxytol mit ATTO495-TDP als Prototyp der Analyse, ob der Nanopartikel mit einem fluoreszierenden TDP beladen werden kann (s. Abb. 14). Die Beladung erfolgte bei einer Partikel-Endkonzentration von 0,03 μM (0,2 mM Fe). Als ideales Beladungsverhältnis wurde eine Beladung von 11 Peptide pro Ferumoxytol gewählt (s. Tab. 7).

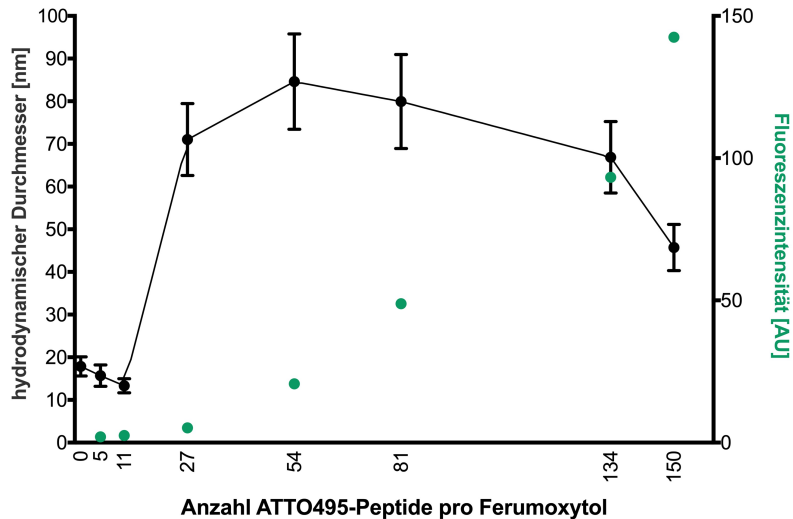


Abbildung 14: Ferumoxytol-Beladung mit unterschiedlichen Mengen an ATTO495-TDP – Größe (links, schwarze Symbole) und Fluoreszenzintensität (rechts, grüne Symbole) der beladenen Nanopartikel ($n=2$ Proben)

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen siehe Kapitel 4.1.1. Methodik siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; ATTO495 = Fluorophor

4.1.2.2 Dy557-TDP:Ferumoxytol

Die Beladung von Ferumoxytol mit Dy557-TDP erfolgte bei einer Partikel-Endkonzentration von $0,71 \mu\text{M}$ ($4,6 \text{ mM Fe}$) (s. Abb. 15). Als ideales Beladungsverhältnis wurde eine Beladung von 16 Peptide pro Ferumoxytol gewählt (s. Tab. 7).

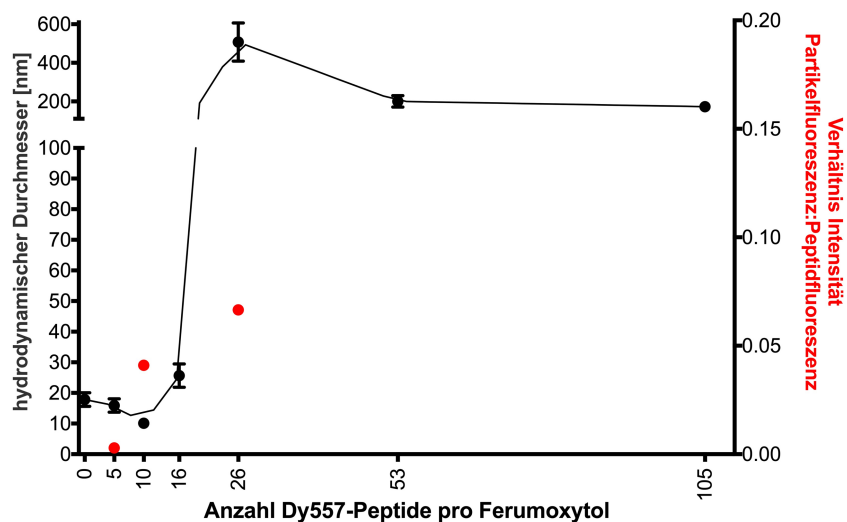


Abbildung 15: Ferumoxytol-Beladung mit unterschiedlichen Mengen an Dy557-TDP – Größe (links, schwarze Symbole) und Fluoreszenzverhältnis (rechts, rote Symbole) der beladenen Nanopartikel ($n=2$ Proben)

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen siehe Kapitel 4.1.1. Methodik siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; Dy557 = Fluorophor

4.1.2.3 cIDCC-TDP:Ferumoxytol

Die Beladung von Ferumoxytol mit cIDCC-TDP erfolgte bei einer Partikel-Endkonzentration von 0,5 μM (3,33 mM Fe). Bedingt durch das Messverfahren mit dem DLS-Gerät war die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers ab einer Beladung von 30 Peptiden pro Nanopartikel methodisch nicht mehr möglich (s. Abb. 16). Die Fluoreszenzemission der angeregten cIDCC-Moleküle (650–750 nm) überlagerte sich mit dem Laser (λ 633 nm) des DLS-Geräts und verfälschte das Messverfahren. Dieses Problem war bei der Beladung von VSOP nicht zu beobachten.

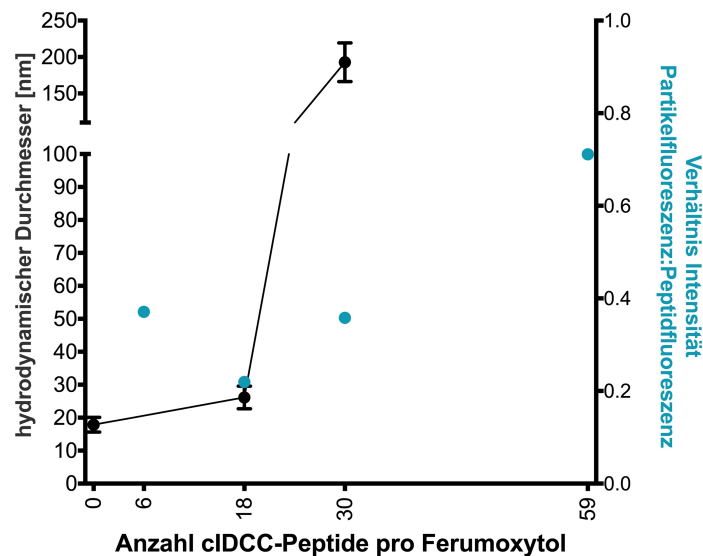


Abbildung 16: Ferumoxytol-Beladung mit unterschiedlichen Mengen an cIDCC-TDP – Größe (links, schwarze Symbole) und Fluoreszenzverhältnis (rechts, blaue Symbole) der beladenen Nanopartikel ($n=2$ Proben)

Erläuterungen der Achsenbeschriftungen siehe Kapitel 4.1.1. Methodik siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor

4.2 Stabilität in ionischen Lösungen

4.2.1 Stabilität unter physiologischen Bedingungen

Neben der Beladungsdichte wurde auch die Suspensionsstabilität der beladenen Partikel analysiert. Die Beladung der Partikel erfolgte in Aqua dest., sodass der Einfluss von Proteinen oder Ionen ausgeschlossen werden konnte. Da die Partikel für den Einsatz im biologischen Organismus vorgesehen waren, musste ihre Suspensionsstabilität auch unter physiologischen Bedingungen getestet werden.

Daher wurde die Größenmessung der Partikeln mittels DLS zur Untersuchung der Suspensionsstabilität nicht nur in Aqua dest., sondern auch in einem 10 mM HEPES-Puffer bei einem

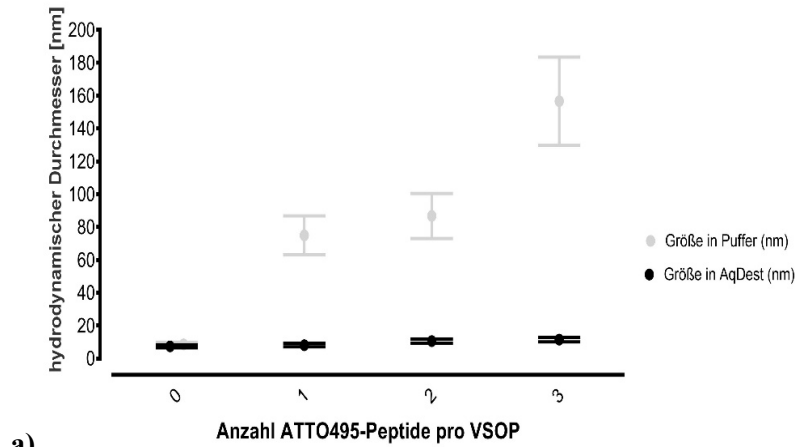
physiologischen pH (pH = 7,4) und einer physiologischen Konzentration aller zentralen Salze durchgeführt (Tab. 5).

Auf Messungen im Serum wurde verzichtet. In Voruntersuchungen ergaben sich inkonstante Größenwerte im Serum mittels DLS aufgrund des hohen Gehalts an Serumproteinen. Die im Serum enthaltenen Proteine verursachten selber eine Lichtstreuung.

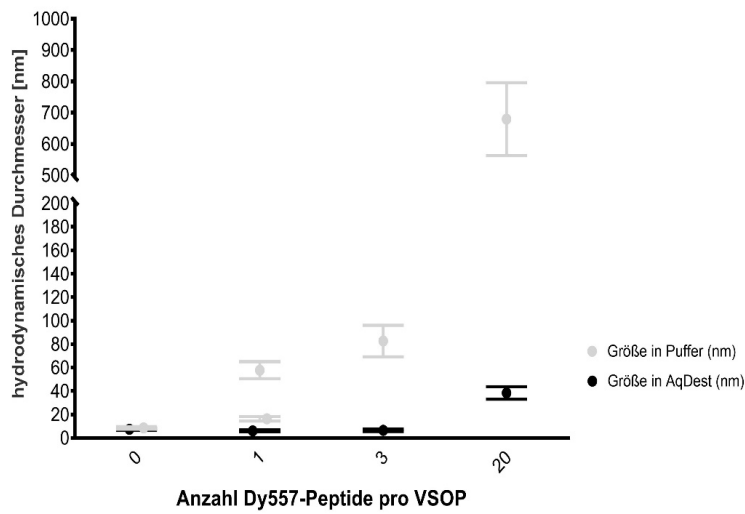
Bei sehr instabilen Lösungen war makroskopisch eine sofortige oder zunehmende Ausfällung der Partikel mit Bildung von sichtbaren Ablagerungen im Eppendorf Gefäß zu beobachten (s. z.B. Abb. 24).

Beim Mischen der beladenen Nanopartikel mit der Puffer-Lösung trat eine Änderung des hydrodynamischen Durchmessers in Abhängigkeit von der Beladungsdichte auf. Tendenziell war die Änderung unabhängig vom verwendeten SPION bei höherer Beladung größer. Ohne Beladung zeigten weder VSOP noch Ferumoxytol veränderte hydrodynamische Durchmesser bei Zugabe der Puffer-Lösung.

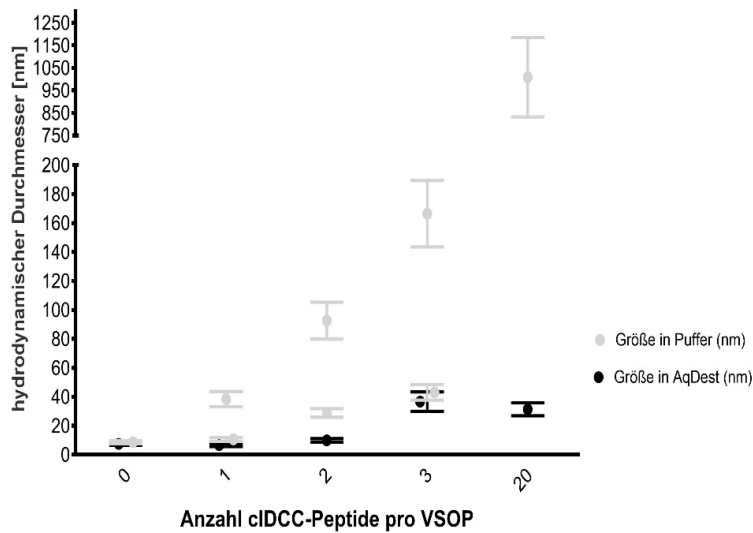
Insgesamt waren die beladenen VSOP-Partikel empfindlicher. Es kam zu einer Zunahme der Partikelgröße und Größenvarianz der Partikelpopulation (größere Standardabweichungen) bis zur Bildung von zwei unterschiedlichen Partikelfraktionen (Abb. 17b-1, c-3).



a)



b)



c)

Abbildung 17: Größenänderung der VSOP im physiologischen Puffer bei unterschiedlicher Beladung mit ATTO495-TDP:VSOP (a) Dy557-TDP:VSOP (b) cIDCC-TDP:VSOP (c)

Die y-Achse zeigt die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser der Partikeln. Dargestellt werden die Durchmesser in Aqua dest. (schwarze Punkte) und nach Zugabe der Pufferlösung in einem Verhältnis von 1 zu 10 (graue Punkte). Wenn die Messwerte zwei Maxima ergaben (polydisperse Nanopartikel-Suspension) (in grau, Abb. b und c), wurden beide aufgetragen.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; ATTO495, Dy557, cIDCC = Fluorophore

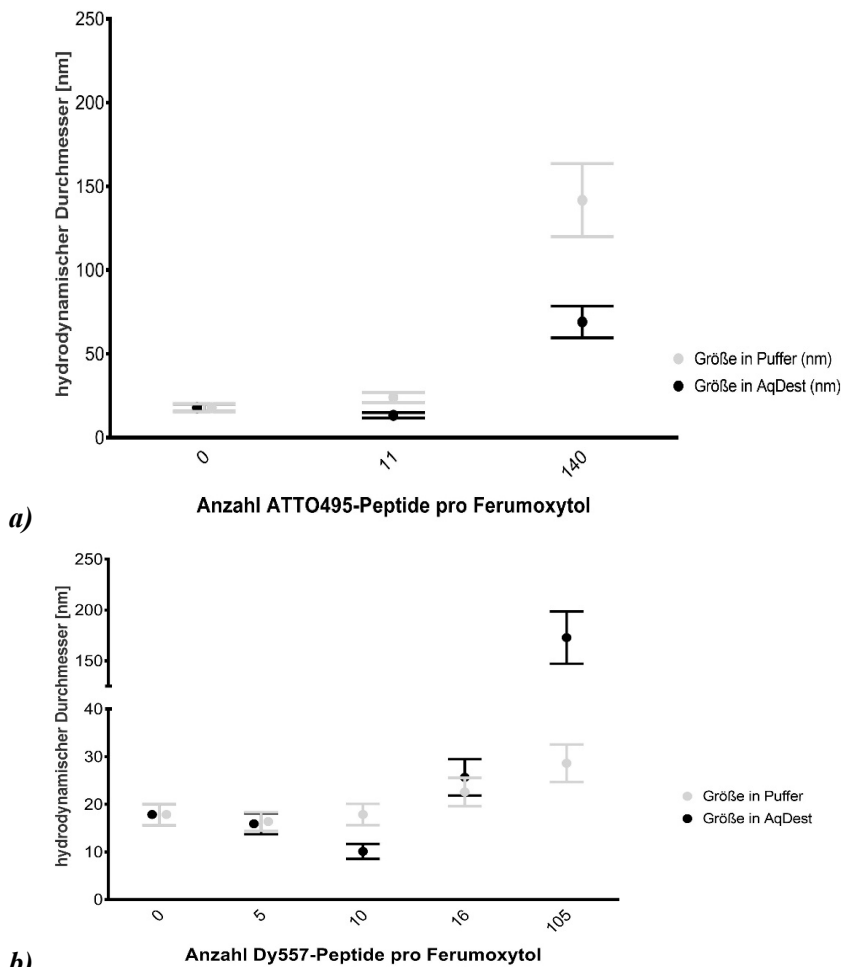


Abbildung 18: Größenänderung der Ferumoxytol-Partikeln im physiologischen Puffer bei unterschiedlicher Beladung mit ATTO495-TDP:Ferumoxytol (a) Dy557-TDP:Ferumoxytol (b)
 Die y-Achse zeigt die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser der Partikeln. Dargestellt werden die Durchmesser in Aqua dest. (schwarze Punkte) und nach Zugabe der Pufferlösung in einem Verhältnis von 1 zu 10 (graue Punkte).
 cIDCC-TDP:Ferumoxytol konnte mit dieser Methode nicht untersucht werden (siehe oben).
 TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; ATTO495, Dy557, cIDCC = Fluorophore

Die Ferumoxytol-Nanopartikel erwiesen sich im Vergleich zu den VSOP-Partikeln als stabiler in der Pufferlösung. Die Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers wies auf eine Abnahme der Hydrathülle hin. Dieses Phänomen trat insbesondere bei Dy557-TDP:Ferumoxytol auf. Bei den cIDCC-TDP:Ferumoxytol-Partikeln kam es nach Zugabe der Pufferlösung zu Fehlmessungen aufgrund der Zunahme der Fluoreszenz von cIDCC.

4.2.2 Stabilität unter zunehmender Ionenstärke

Die rein elektrostatisch stabilisierten TDP-VSOP erwiesen sich bereits bei einer physiologischen Ionenstärke als instabil (s. Abb 17). Der in den Experimenten verwendete physiologische Puffer (s. Tab. 5) hatte eine Ionenstärke von 304,1 mM.

Um die Rolle der sterischen Stabilisierung bei den elektrosterisch stabilisierten Ferumoxytol-Nanopartikeln zu untersuchen, wurde die Ionenstärke des Dispersionsmediums stetig erhöht. dazu wurden die Nanopartikel in NaCl-Lösungen mit zunehmenden molaren Konzentrationen gelöst. NaCl verändert nicht den pH, so dass auf diese Weise die Ionenstärke isoliert untersucht werden konnte. Für die Versuche wurden exemplarisch ATTO495-TDP:Ferumoxytol Nanopartikel (10 Peptide pro Partikel) verwendet. Die initiale Ionenstärke betrug 100 mM, die maximale Ionenstärke 500 mM.

Der hydrodynamische Durchmesser blieb bei steigender Ionenstärke durchgehend konstant (ca. 18 nm). Interessanterweise kam es bei den gleichen Nanopartikeln im physiologischen Puffer (314 mM Ionenstärke) zu einer leichten Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers auf 24 nm (s. Abb. 18).

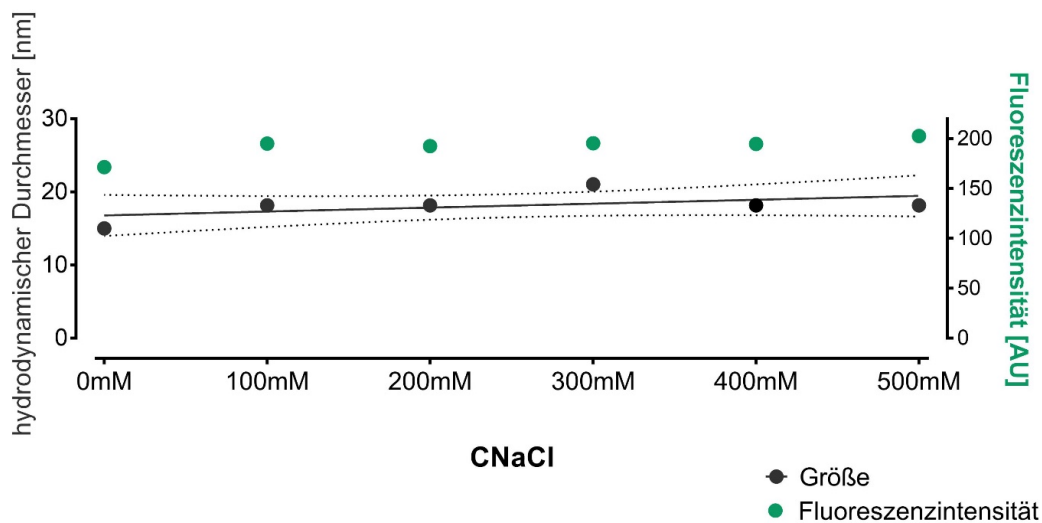


Abbildung 19 Größen- und Fluoreszenzänderung von ATTO495-TDP:Ferumoxytol mit zunehmender Ionenstärke (zunehmende NaCl-Konzentration) (10 ATTO495-TDP pro Partikel).

Die linke y-Achse zeigt den hydrodynamischen Durchmesser der Partikeln (schwarze Punkte). Die rechte y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität (grüne Punkte). Die hydrodynamischen Durchmesser wurden mit einem nicht-linearen Regressionsmodell berechnet. Gezeigt werden die Mittelwerte (16,8 nm, schwarze Linie) und das 95 %-Konfidenzintervall (13,1-20,4 nm, gestrichelte Linie) ($r^2 = 0.274$).

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; ATTO495 = Fluorophor

4.3 Stabilität in Serum-Relaxometrie-Messungen

Zur Untersuchung der Suspensionsstabilität der Nanopartikel im Serum wurden Relaxometrie-Messungen durchgeführt. Bei 37°C und einem magnetischen Feld von 0,94 T zeigt VSOP eine r_2 von 45 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ferumoxytol hatte bei gleicher Konzentration (in Aqua dest. als Dispersionsmedium) eine r_2 von 89 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Mit zunehmender Beladung von VSOP mit cIDCC-TDP kam es zu einer Zunahme des Durchmessers in Wasser und von r_2 in FCS (s. Abb. 20). Die Änderung von r_2 war direkt proportional zur Änderung des Partikeldurchmessers. Bei Ferumoxytol führte die Beladung durch cIDCC-TDP zu keiner wesentlichen Änderung in r_2 trotz der Zunahme im Durchmesser (s. Abb. 22). Die verlängerte Inkubationszeit (24 Stunden) in FCS bei 37°C führte weder bei cIDCC-TDP:VSOP noch bei cIDCC-TDP:Ferumoxytol zu einer signifikanten Änderung von r_2 (s. Abb. 21, 23).

Im Vergleich zu Dy557-TDP:VSOP erwies sich cIDCC-TDP:VSOP schon makroskopisch in FCS als instabiler (s. Abb. 24).

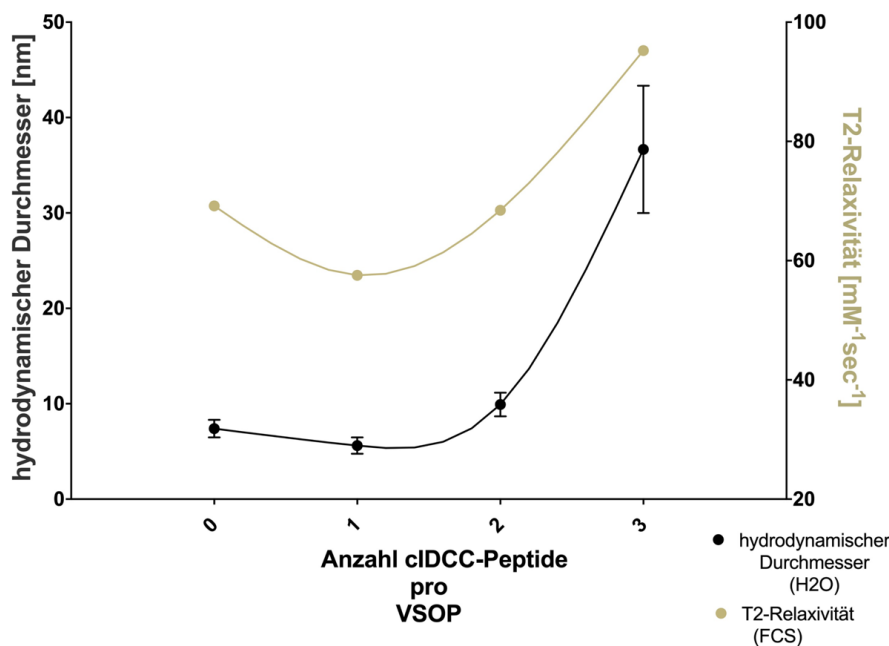


Abbildung 20: Relation des hydrodynamischen Durchmessers und der transversalen Relaxivität (r_2) von cIDCC-TDP:VSOP

Die linke y-Achse zeigt den hydrodynamischen Durchmesser der Partikeln in Aqua. dest (schwarze Punkte). Die rechte y-Achse zeigt r_2 in FCS (gelbe Punkte).

FCS = fötales Kälberserum; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle, cIDCC = Fluorophor

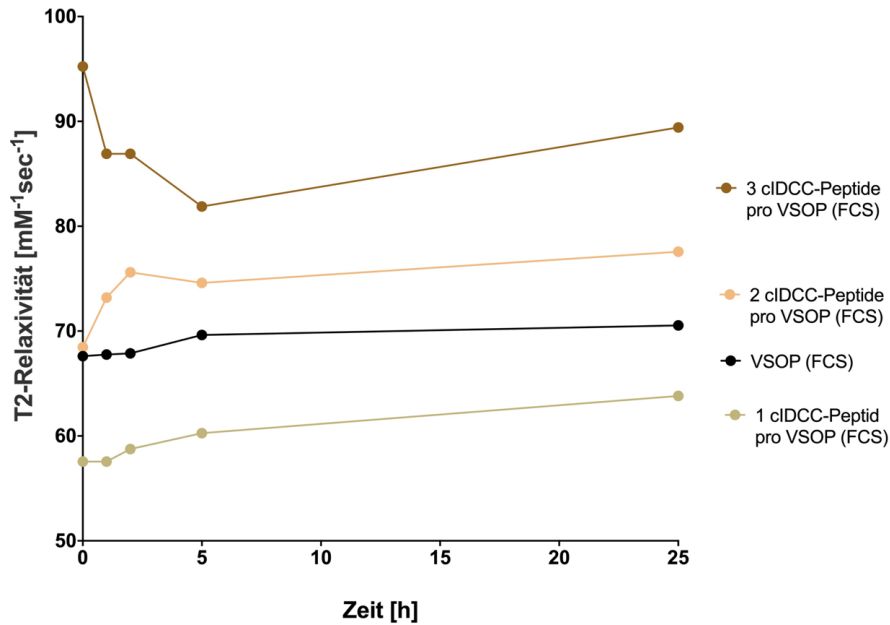


Abbildung 21: Veränderung der transversalen Relaxivität (r_2) von cIDCC-TDP:VSOP bei zunehmender Inkubationsdauer im fötalen Kalbsserum (FCS)

Dargestellt wird r_2 von drei unterschiedlichen Beladungen von VSOP mit cIDCC-TDP (0, 1 und 2 Moleküle) nach Resuspension in FCS. Die Nanopartikel-Suspensionen wurden durchgehend bei 37°C gehalten.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle, cIDCC = Fluorophor

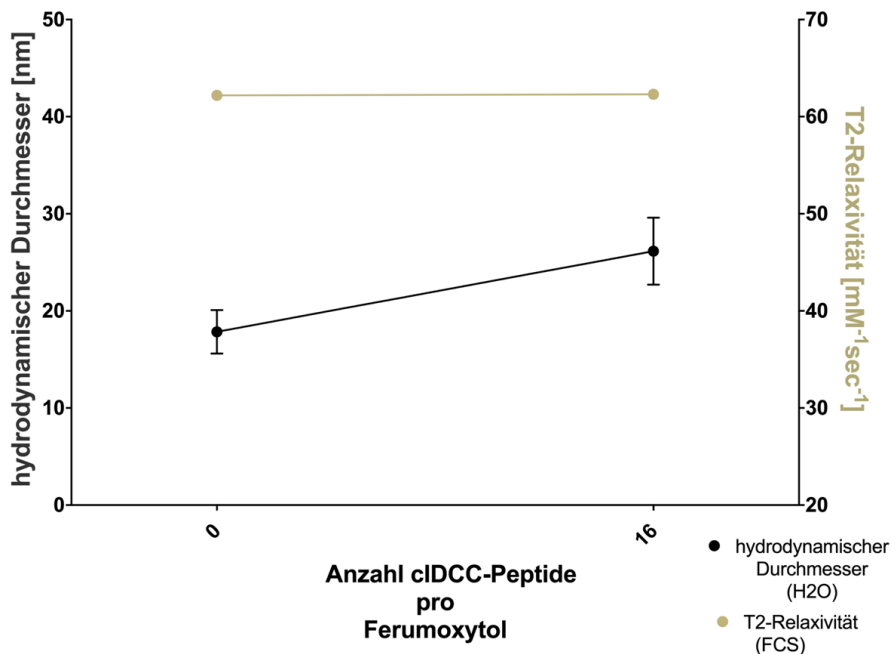


Abbildung 22: Relation des hydrodynamischen Durchmessers und der transversalen Relaxivität (r_2) von cIDCC-TDP:Ferumoxytol

Die linke y-Achse zeigt den hydrodynamischen Durchmesser der Partikeln in Aqua. dest (schwarze Punkte). Die rechte y-Achse zeigt r_2 in FCS (gelbe Punkte).

FCS = fötales Kälberserum; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor

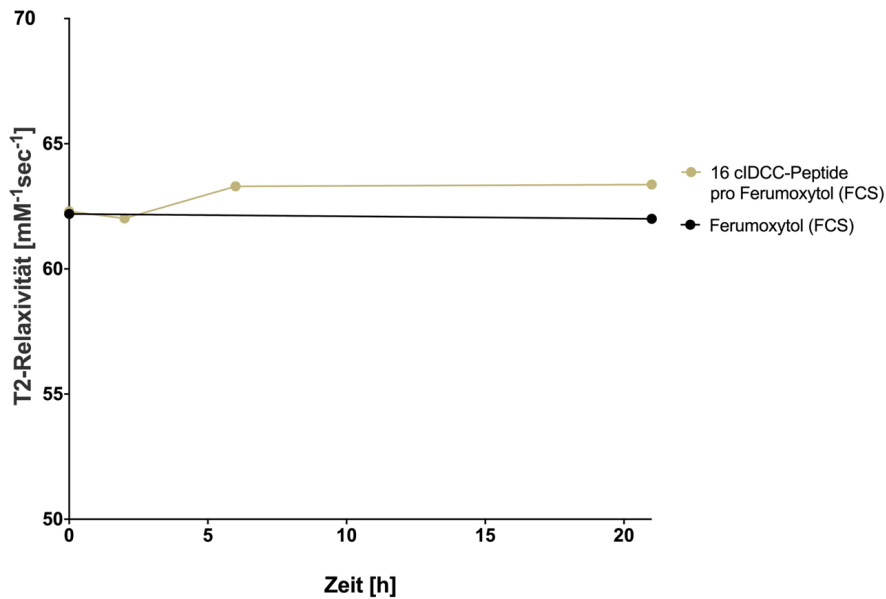


Abbildung 23: Veränderung der transversalen Relaxivität (r_2) von cIDCC-TDP:Ferumoxytol bei zunehmender Inkubationsdauer im fötalen Kalbsserum (FCS)

Dargestellt wird r_2 von cIDCC-TDP:Ferumoxytol (16 Peptide pro Partikel) und von Ferumoxytol alleine nach Resuspension im FCS. Die Nanopartikel-Suspensionen wurden durchgehend bei 37°C gehalten.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor



Abbildung 24: Dy557-TDP:VSOP und cIDCC-TDP:VSOP nach Resuspension mit fötalem Kälberserum (FCS)

Verwendet wurden je 20 Peptide pro Partikel.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC, Dy557 = Fluorophore

4.4 Einfluss der Serumproteine auf die Peptidfreisetzung

Bei der Beladung der SPION mit den fluoreszierenden Peptiden kam es zu einem Quenching der Fluoreszenz durch direkten Energietransfer auf der Metalloberfläche und zwischen den Farbstoffen [177].

Serum ist als Dispersionsmedium interessant, da es sowohl Ionen, die sich auf die elektrische Doppelschicht auswirken, als auch Proteine enthält, die als Kolloide agieren. Da die Größen- und Relaxivitätsmessungen keine validen Ergebnisse hinsichtlich der Stabilität der Peptidadsorption lieferten, wurde die Adsorptionsstabilität durch Änderung des Quenching-Verhaltens der Nanopartikel in FCS als Dispersionsmedium getestet. Um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, wurde das FCS auf 37°C erwärmt. Anhand der Änderung des Quenching-Verhaltens über die Zeit sollte der Einfluss der Inkubation in FCS auf das Dissoziations- bzw. Desorptionspotenzial der TDP-SPION-Konstrukte beurteilt werden. Der Einfluss der laminaren und turbulenten Ströme im Gefäßsystem wurde nicht berücksichtigt.

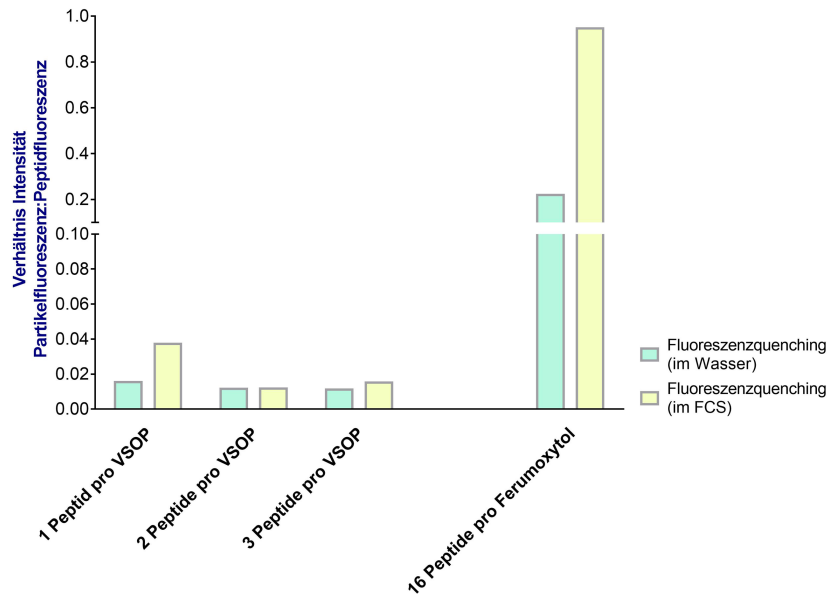


Abbildung 25: Abnahme des Quenching-Effekts nach Resuspension der mit cIDCC-TDP beladenen Nanopartikel in fötalem Kälberserum (FCS)

Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Peptid-Nanopartikel-Konstrukte gegenüber dem freien Peptid bei gleicher Konzentration in Aqua dest. (grün) und FCS (gelb). Ein geringes Verhältnis steht für ein hohes Quenching der Fluoreszenz durch die Beladung.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

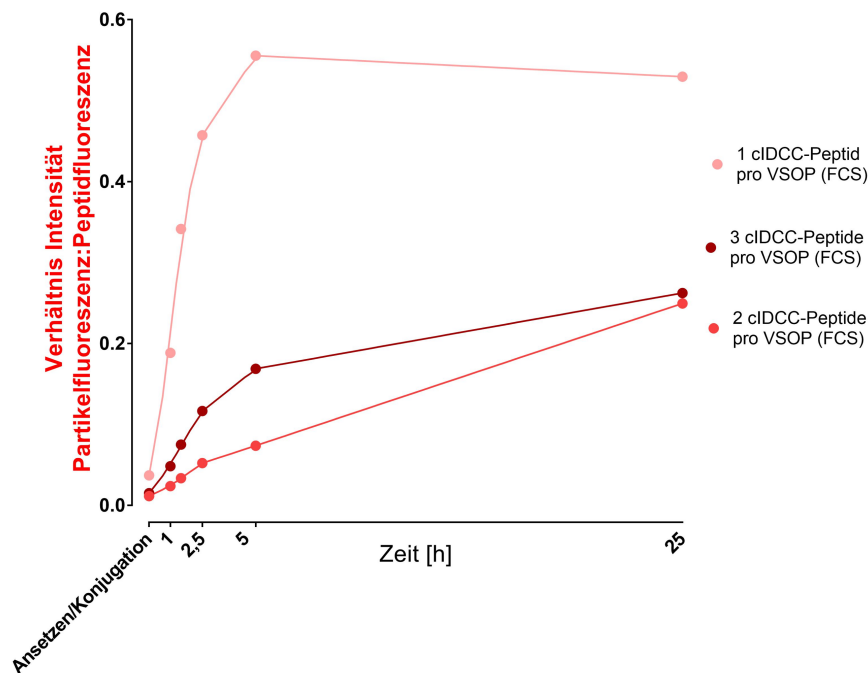


Abbildung 26: Zeitliche Änderung des Quenching-Effektes der cIDCC-TDP:VSOP Nanopartikel in fötalem Kälberserum (FCS) bei unterschiedlicher Beladung

Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der der Peptid-Nanopartikel-Konstrukte gegenüber dem freien Peptid bei gleicher Konzentration. Ein geringes Verhältnis entspricht ein hohes Quenching der Fluoreszenz durch die Beladung. Die Nanopartikel-Suspensionen wurde bei Raumtemperatur inkubiert.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

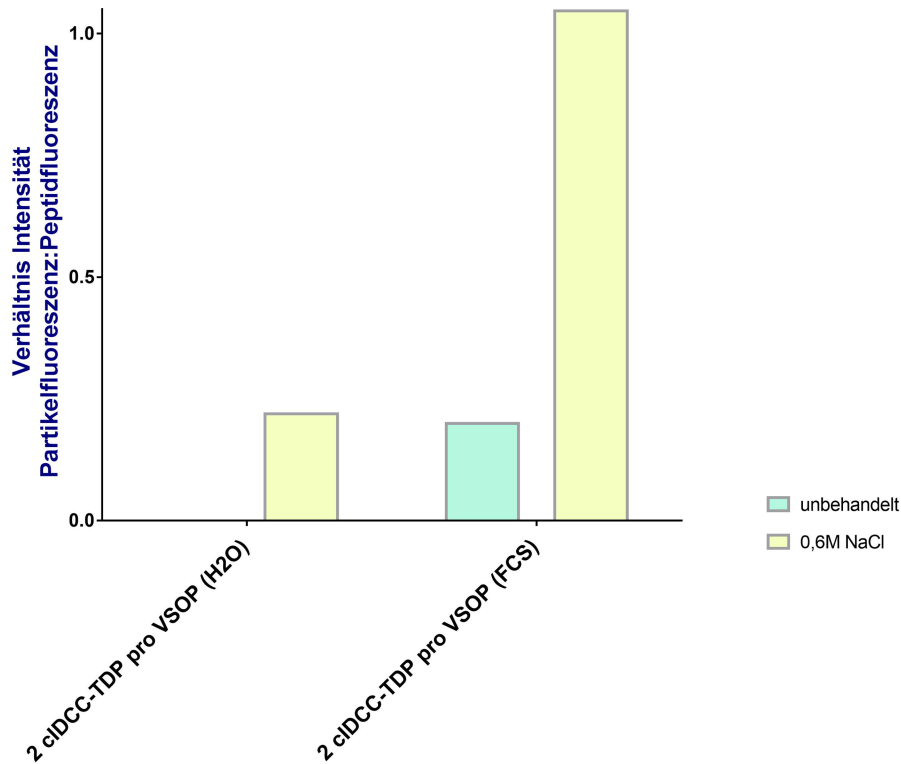


Abbildung 27: Abnahme des Quenching-Effektes der cIDCC-TDP:VSOP (FCS) bei Zunahme der Ionenstärke

Die Ionenstärke wurde durch Zugabe einer NaCl-Lösung erhöht (0,6 M NaCl). Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Peptid-Nanopartikel-Konstrukte gegenüber dem freien Peptid bei gleicher Konzentration. Ein geringes Verhältnis steht für ein hohes Quenching der Fluoreszenz durch die Beladung. Messungen in Wasser (links) und Messungen in fötalem Kälberserum (FCS, rechts). Messungen ohne NaCl (grün), Messungen mit NaCl (gelb)

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

Die Inkubation in FCS führte zu einer Abnahme des Quenchings des Fluoreszenzfarbstoffes cIDCC. Bei cIDCC-TDP:Ferumoxytol war die Abnahme am stärksten (s. Abb. 25). Bei VSOP war die Quenching-Abnahme bei einer Einzelbeladung (ein cIDCC-TDP pro VSOP) am höchsten (s. Abb. 26, rosa). Am stabilsten zeigte sich die Beladung von 2 cIDCC-TDP pro VSOP (s. Abb. 26, rot). Insgesamt nahm mit zunehmender Inkubationszeit in FCS das Quenching bei cIDCC-TDP:VSOP ab (s. Abb. 26).

Durch eine Zunahme der Ionenstärke um 600 mM wurde das Quenching von cIDCC-TDP:VSOP aufgehoben (s. Abb. 27 zweite Säule). Im Wasser führte die Zunahme der Ionenstärke zu einer Freisetzung von ca. 21 % der adsorbierten Peptide. In FCS kam es bereits ohne Zugabe von NaCl zu einer Freisetzung von ca. 20 % der adsorbierten Peptide (s. Abb. 27 dritte Säule). Nach Zunahme der Ionenstärke um 600 mM setzte eine vollständige Desorption der Peptide ein (s. Abb. 27 vierte Säule).

4.5 Agarose-Gelelektrophorese

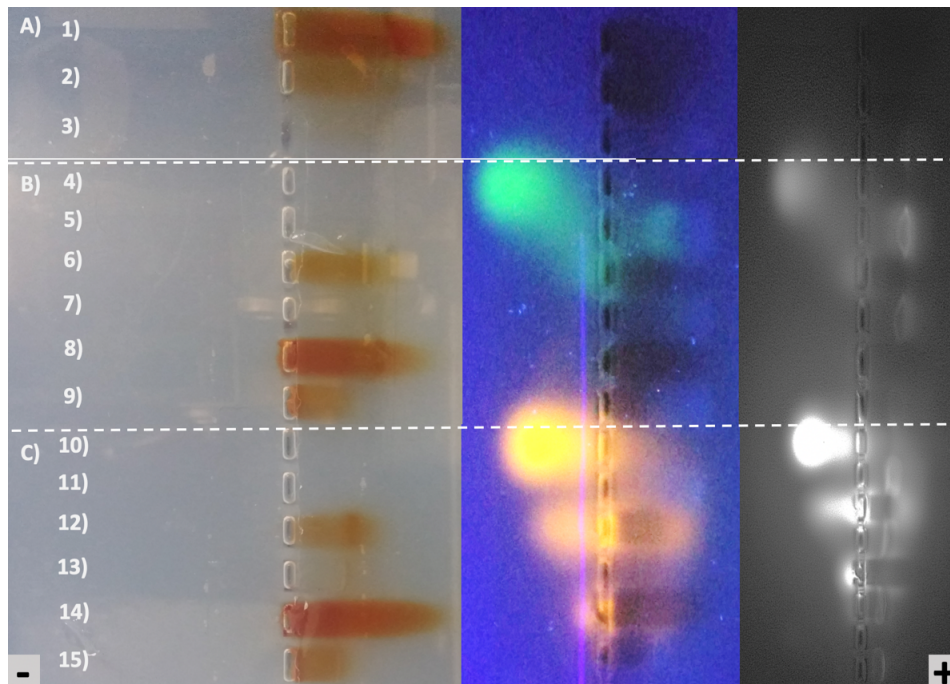


Abbildung 28: Agarose-Gelelektrophorese von ATTO495-TDP und Dy557-TDP als freie Peptide oder adsorbiert an SPION (VSOP bzw. Ferumoxytol)

Die Probetaschen lagen in der Mitte des Gels. Während der Elektrophorese wanderten die positiv-geladenen Peptide zur Kathode (Minuszeichen) und die negativ-geladenen Partikeln zur Anode (Pluszeichen). Die Konzentration der in FCS resuspendierten Partikel und Peptide (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) entsprach 10 % der initialen Peptid- bzw. Partikelkonzentration. Von links nach rechts: normale Lichtbildaufnahme, Lichtbildaufnahme unter UV-Beleuchtung, Aufnahme im Geldokumentationssystem (Syngene G:BOX).

A) SPION alleine: 1) VSOP, 2) Ferumoxytol, 3) Ferumoxytol in FCS

B) ATTO495-TDP: 4) ATTO495-TDP, 5) ATTO495-TDP in FCS, 6) ATTO495-TDP:Ferumoxytol, 7) ATTO495-TDP:Ferumoxytol in FCS, 8) ATTO495-TDP:VSOP, 9) ATTO495-TDP:VSOP in FCS.

C) Dy557-TDP: 10) Dy557-TDP, 11) Dy557-TDP in FCS, 12) Dy557-TDP:Ferumoxytol, 13) Dy557-TDP:Ferumoxytol in FCS, 14) Dy557-TDP:VSOP, 15) Dy557-TDP:VSOP in FCS

FCS = fötales Kälberserum; SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; ATTO495, Dy557 = Fluorophore

Zur Untersuchung der Stabilität der Peptidadsorption wurden die SPION-Peptid-Partikel bzw. die freien Peptide mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Abb. 28 und 29). Die gleichen Versuche wurden in Aqua dest. und FCS durchgeführt, um den Einfluss der Serumproteine auf die adsorbierten Peptide zu analysieren.

Dy557 wies eine stärkere Fluoreszenzintensität als ATTO495 auf (s. Abb. 28 Felder 4 und 10 im Vergleich). Wie die Lichtbildaufnahmen unter UV-Beleuchtung erkennen ließen, beruhte der Unterschied teilweise auf den Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes. Zum anderen spielte die Methodik eine Rolle, da der Sensor mit dem eingebauten Filter UV032 (572–630 nm) den Fluoreszenzbereich von Dy557 besser abdeckte. Insgesamt war die Anregung mit dem UV-Transilluminator (240 nm) stärker als mit den anderen verfügbaren LED-Lampen (s.

Kap. 3.2.5). m. Das Fluorophor cIDCC ließ sich nur mit dem Infrarotdokumentationssystem Li-Cor darstellen.

Die konjugierten Ferumoxytol-Nanopartikel (s. Abb. 28 Felder 6 und 12) ließen sich elektrophoretisch einfacher abtrennen als die VSOP-Nanopartikel (s. Abb. 28 Felder 8 und 14). Die Resuspension in FCS wirkte sich auf die Konjugation und Eigenschaften der Peptide sowie der Nanopartikel aus. So führte die Resuspension vom freien Peptid im FCS zu einer Abwanderung von diesem Richtung Kathode (s. Abb. 28 Felder 5 und 11, sowie Abb. 29 Feld 5). Durch Resuspension von VSOP (s. Abb. 28 Feld 1 und Abb. 29 Feld 2) im FCS legten diese eine geringere Strecke zurück (s. Abb. 28 Felder 9 und 15, sowie Abb. 29 Felder 3 und 7). FCS führte auch zu einer Dekonjugation der Peptide. Dies fiel insbesondere bei cIDCC (s. Abb. 29 Felder 7 und 9).

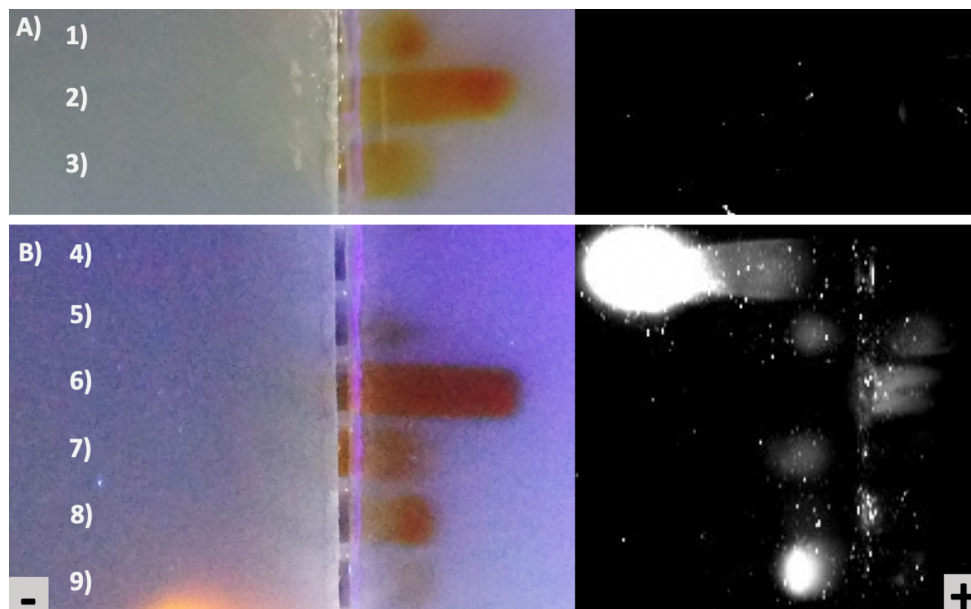


Abbildung 29: Agarose-Gelelektrophorese von cIDCC-TDP als freies oder adsorbiert an SPION (VSOP bzw. Ferumoxytol)

Die Probetaschen lagen in der Mitte des Gels. Während der Elektrophorese wanderten die positiv-geladenen Peptide zur Kathode (Minuszeichen) und die negativ-geladenen Partikeln zur Anode (Pluszeichen). Die Konzentration der in FCS resuspendierten Partikel und Peptide (3, 5, 7) entsprach 10 % der initialen Peptid- bzw. Partikelkonzentration. Von links nach rechts: Lichtbildaufnahme unter UV-Beleuchtung, Aufnahme im Infrarot-Dokumentationssystem (Li-Cor, Odyssey).

A) SPION alleine: 1) Ferumoxytol, 2) VSOP, 3) VSOP in FCS).

B) cIDCC-TDP: 4) cIDCC-TDP, 5) cIDCC-TDP in FCS), 6) cIDCC-TDP:VSOP, 7) cIDCC-TDP:VSOP in FCS), 8) cIDCC-TDP:Ferumoxytol, 9) cIDCC-TDP:Ferumoxytol in FCS). FCS = fötales Kälberserum; SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

Die Auswertung mittels ImageJ zeigte auch, dass unter wässrigen Bedingungen sich Dy557-TDP in der Gelelektrophorese stärker als cIDCC-TDP von den Nanopartikeln abtrennen ließ (s. Abb. 30 und 31). Dieser Effekt war bei den beladenen Ferumoxytol-Nanopartikeln stärker

(s. Abb. 30). Der Anteil an freiem Peptid, der ohne weitere Faktoren desorbierte, war bei Dy557-TDP:Ferumoxytol (ca. 31 %, s. Abb. 30 Säule 1) signifikant mehr als bei cIDCC-TDP:Ferumoxytol (ca. 6 %, s. Abb. 30 Säule 3) (Zweistichproben t-Test, $p = 0,0397$). Bei den beladenen VSOP war die Differenz deutlich geringer und statistisch nicht signifikant ($p = 0,31$). Auch hier war aber der Anteil an desorbiertem freiem Peptid bei Dy557-TDP:VSOP (ca. 8%, s. Abb. 31 Säule 1) höher als bei cIDCC-TDP:VSOP (ca. 2,6%, s. Abb. 31 Säule 3).

Der Einfluss von FCS war bei den Ferumoxytol-Nanopartikeln größer als bei den VSOP-Nanopartikeln. Insgesamt wirkte sich FCS stärker auf die mit cIDCC-TDP beladenen Nanopartikel aus. Der Anteil an freiem Peptid betrug im FCS 25% bei cIDCC-TDP:VSOP (Zunahme von 22,5%, s. Abb. 31 Säule 3 und 4) und 40% bei cIDCC-TDP:Ferumoxytol (Zunahme von 34%, s. Abb. 30 Säule 3 und 4). Bei Dy557-TDP:Ferumoxytol kam es zu einer Abnahme des freien Peptides um ca. 10 % (s. Abb. 30 Säule 1 und 2). Dy557-TDP:VSOP zeigte keine wesentliche Änderung durch die Inkubation mit FCS (s. Abb. 31 Säule 1 und 2).

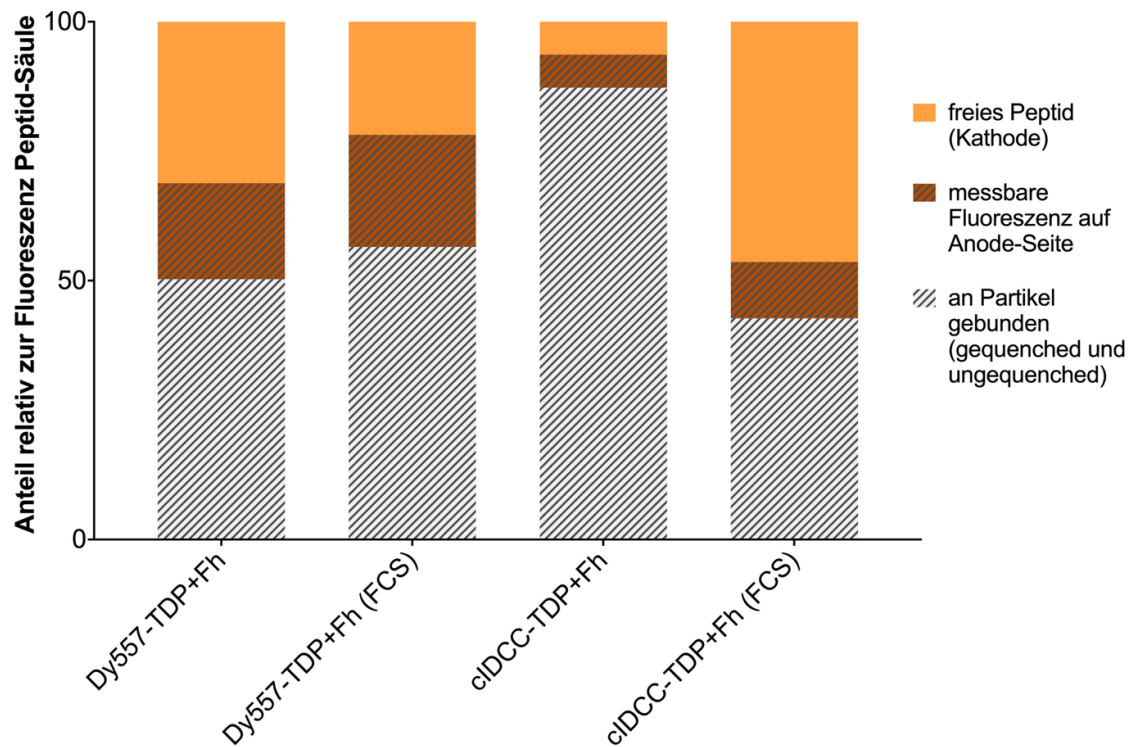


Abbildung 30: Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese-Experimente der Peptid-beladenen Ferumoxytol-Partikel

Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der SPION-Peptid-Konjugate gegenüber der Fluoreszenzintensität der freien Peptide. Für die Auswertung wurde die Kathoden- und die Anodenseite getrennt voneinander gemessen. Das freie Peptid wanderte ausschließlich zur Kathode, sodass die Anodenseite nicht berücksichtigt wurde. Die nicht beladenen SPION wanderten ausschließlich zur Anode. Die Fluoreszenz auf der Kathodenseite der SPION-Peptid-Konjugat-Spuren wurden als freies Peptid (orange) und die Fluoreszenz auf der Anodenseite als SPION (braun) bewertet. Die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der Peptidspuren und der zugehörigen SPION-Peptid-Konjugat-

Spuren entsprach der gequenchten Fluoreszenz und wurde als SPION-Peptid-Konjugat bewertet (Striche). Die Versuche wurden in Aqua dest. und in fötalem Kälberserum (FCS) durchgeführt. FH = Ferumoxytol; SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; Dy557, cIDCC = Fluorophore

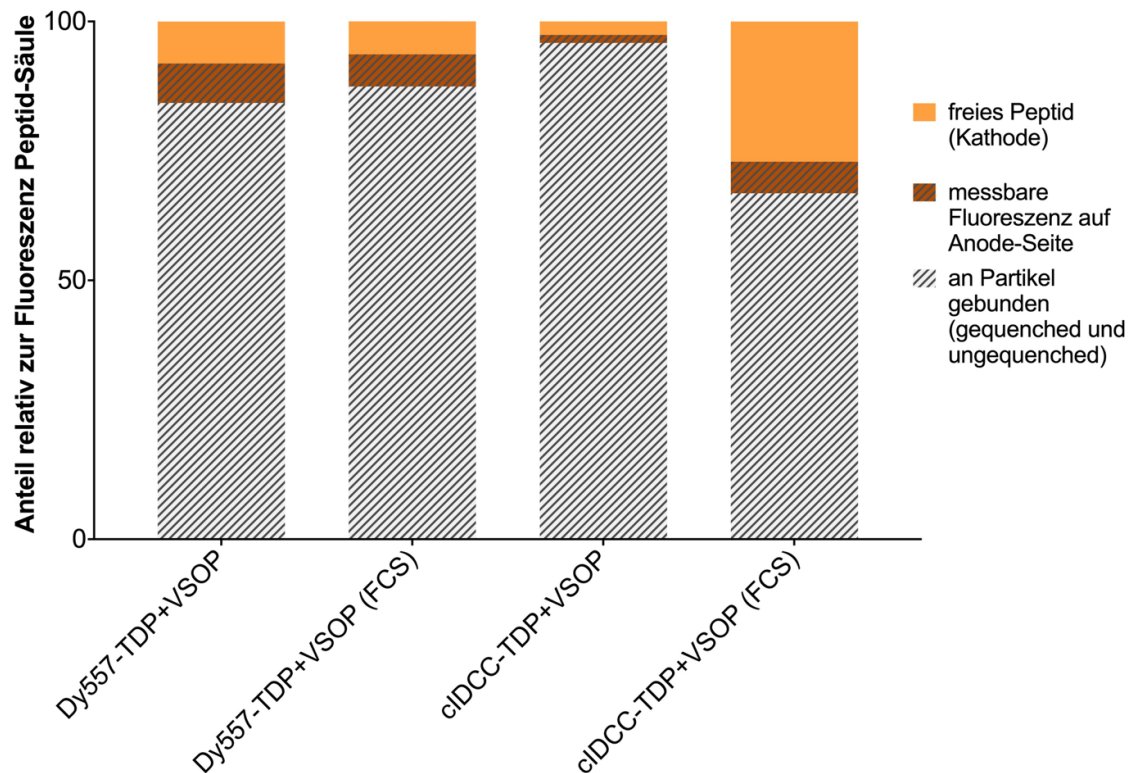


Abbildung 31: Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese Auswertung der Peptid-beladenen Very small iron oxide particle (VSOP)

Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der SPION-Peptid-Konjugate gegenüber der Fluoreszenzintensität der freien Peptide. Für die Auswertung wurde die Kathoden- und die Anodenseite getrennt voneinander gemessen. Das freie Peptid wanderte ausschließlich zur Kathode, sodass die Anodenseite nicht berücksichtigt wurde. Die nicht beladenen SPION wanderten ausschließlich zur Anode. Die Fluoreszenz auf der Kathodenseite der SPION-Peptid-Konjugat-Spuren wurden als freies Peptid (orange) und die Fluoreszenz auf der Anodenseite als SPION (braun) bewertet. Die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der Peptidspuren und der zugehörigen SPION-Peptid-Konjugat-Spuren entsprach der gequenchten Fluoreszenz und wurde als SPION-Peptid-Konjugat bewertet (Striche). Die Versuche wurden in Aqua dest. und in fötalem Kälberserum (FCS) durchgeführt.

SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557, cIDCC = Fluorophore

4.6 Zellexperimente – Peptidabgabe und -aufnahme

4.6.1 Zeit bis zum Eintritt in die Zellen

Die Internalisierung (Zeit bis zum Eintritt in die Zelle) und Akkumulation (Zeit bis das intrazelluläre Fluoreszenzsignal das extrazelluläre Fluoreszenzsignal überschritt) der fluoreszierenden Peptide unterschied sich in Abhängigkeit vom Fluoreszenzfarbstoff und vom Nanopartikel, auf dem sie beladen wurden.

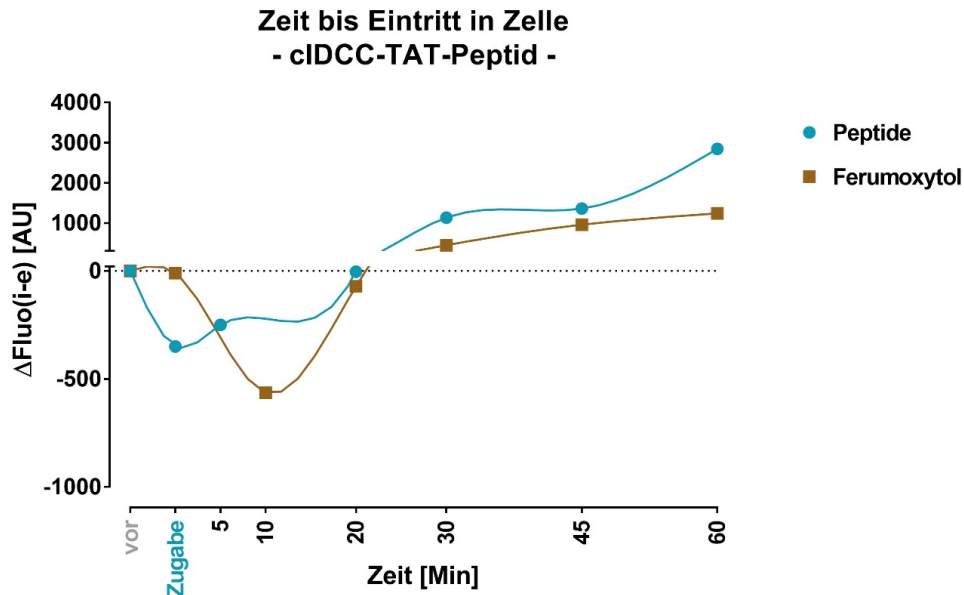


Abbildung 32: Verlauf der Internalisierung von cIDCC-TDP in Myotuben

Auf der y-Achse ist die Differenz der intrazellulären und extrazellulären Fluoreszenz aufgetragen. Ein $\Delta\text{Fluo}(i-e) > 0$ wurde als intrazelluläre Akkumulation gewertet. Dargestellt wird die Akkumulation von cIDCC-TDP alleine (türkis) und cIDCC-TDP:Ferumoxytol (braun). TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor

Die Akkumulation von cIDCC-TDP trat erst nach 20 Minuten ein. Dies galt sowohl für das freie Peptid als auch für cIDCC-TDP:Ferumoxytol (s. Abb. 32). Mit zunehmender Zeit flachte die Akkumulationstendenz von cIDCC-TDP:Ferumoxytol ab, wogegen das freie cIDCC-TDP weiterhin exponentiell akkumulierte. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass ein Teil des Peptides, wie bereits in den vorangegangenen Experimenten erkennbar, noch mit dem Nanopartikel verbunden war, was die Internalisierung verhinderte. Ansätze mit cIDCC-TDP:VSOP erwiesen sich als zelltoxisch. Es blieben wenige überlebende Zellen. Diese zeigten keine intrazelluläre Fluoreszenz (s. Abb. 42) und wurden für Abbildung 32 nicht berücksichtigt.

Intrazellulär verteilte sich das freie cIDCC-TDP besser als das cIDCC-TDP aus den Ferumoxytol-Nanopartikeln (s. Abb. 33). cIDCC-TDP:Ferumoxytol verblieb vorwiegend in intrazellulären Einschlüssen. Eine Eisenfärbung mit der Berliner Blau-Reaktion war relativ schwach, sodass die entstandene Eisencyanat-Komplexe mit dem Mikroskop kaum dargestellt werden konnten.

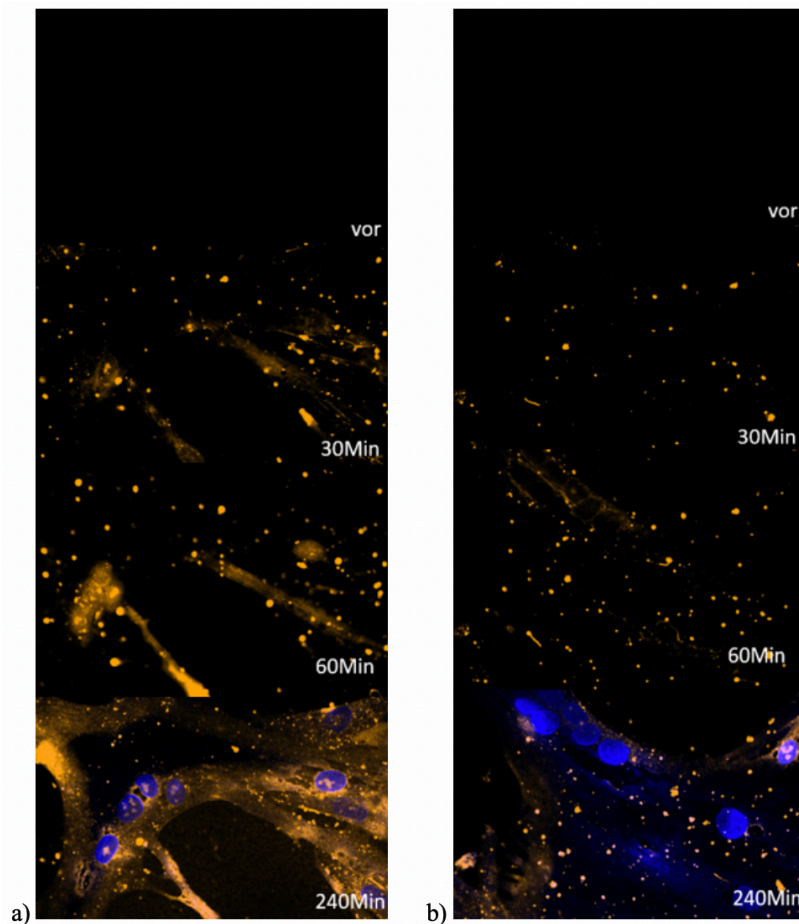


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der intrazellulären Akkumulation von cIDCC-TDP in gesunden Myotuben im zeitlichen Verlauf
a) freies cIDCC-TDP, b) cIDCC-TDP:Ferumoxytol.
 TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor

Bei Dy557-TDP setzte die Internalisierung in die Zellen aus den Ferumoxytol-Nanopartikeln verzögert ein (5 Minuten vs. 10 Minuten) (flachere Kurve mit absolute $\Delta\text{Fluo}(i-e)$ für Dy557-TDP kleiner als für Dy557-TDP:Ferumoxytol, s. Abb. 34). Intrazellulär akkumulierte es dann früher als das freie Dy557-TDP ($\Delta\text{Fluo}(i-e) > 0$ bei 27 Minuten vs. 32 Minuten nach Zugabe, s. Abb. 34 dunkelrot und hellbraun). Bei Dy557-TDP:VSOP kam es zu keiner signifikanten intrazellulären Akkumulation (s. 34 grau und Abb 35c). Die Fluoreszenzintensität blieb extrazellulär durchgehend höher als intrazellulär (s. Abb. 34 und 36). Interessanterweise ließen sich die VSOP intrazellulär in den Durchlichtbildern (s. Abb. 43) erkennen.

Dy557-TDP aus Dy557-TDP:Ferumoxytol verteilten sich besser intrazellulär als das freie Peptid alleine (s. Abb. 35). Im Vergleich zu cIDCC-TDP:Ferumoxytol (s. Abb. 33b) ließen sich weniger Zelleinschlüsse mit Dy557-TDP (s. Abb. 35b) als Inhalt nachweisen.

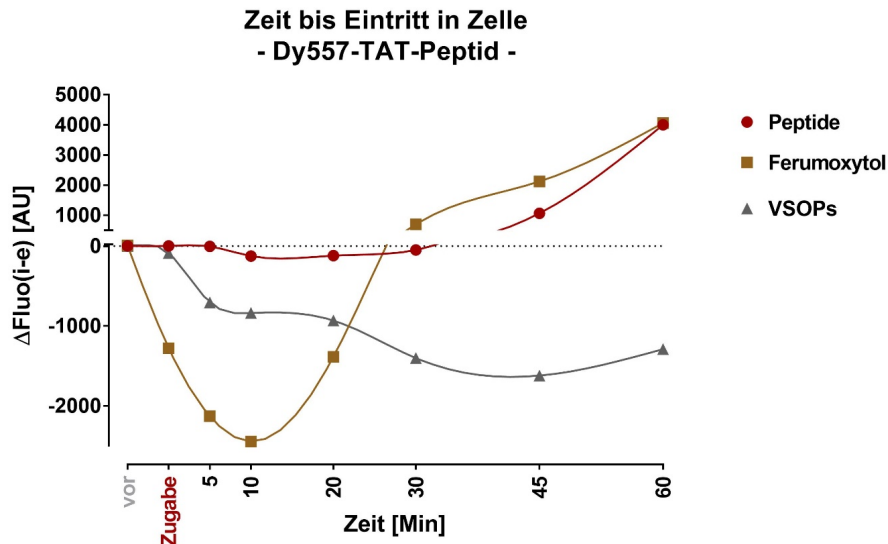


Abbildung 34: Verlauf der Internalisierung von Dy557-TDP in Myotuben
 Auf der y-Achse ist die Differenz der intrazellulären und extrazellulären Fluoreszenz aufgetragen. Ein $\Delta\text{Fluo}(i-e) > 0$ wurde als intrazelluläre Akkumulation gewertet. Dargestellt wird die Akkumulation von Dy557-TDP alleine (Peptide, rot), Dy557-TDP:Ferumoxytol (Ferumoxytol braun), Dy557-TDP:VSOP (VSOPs, grau)
 TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557 = Fluorophor

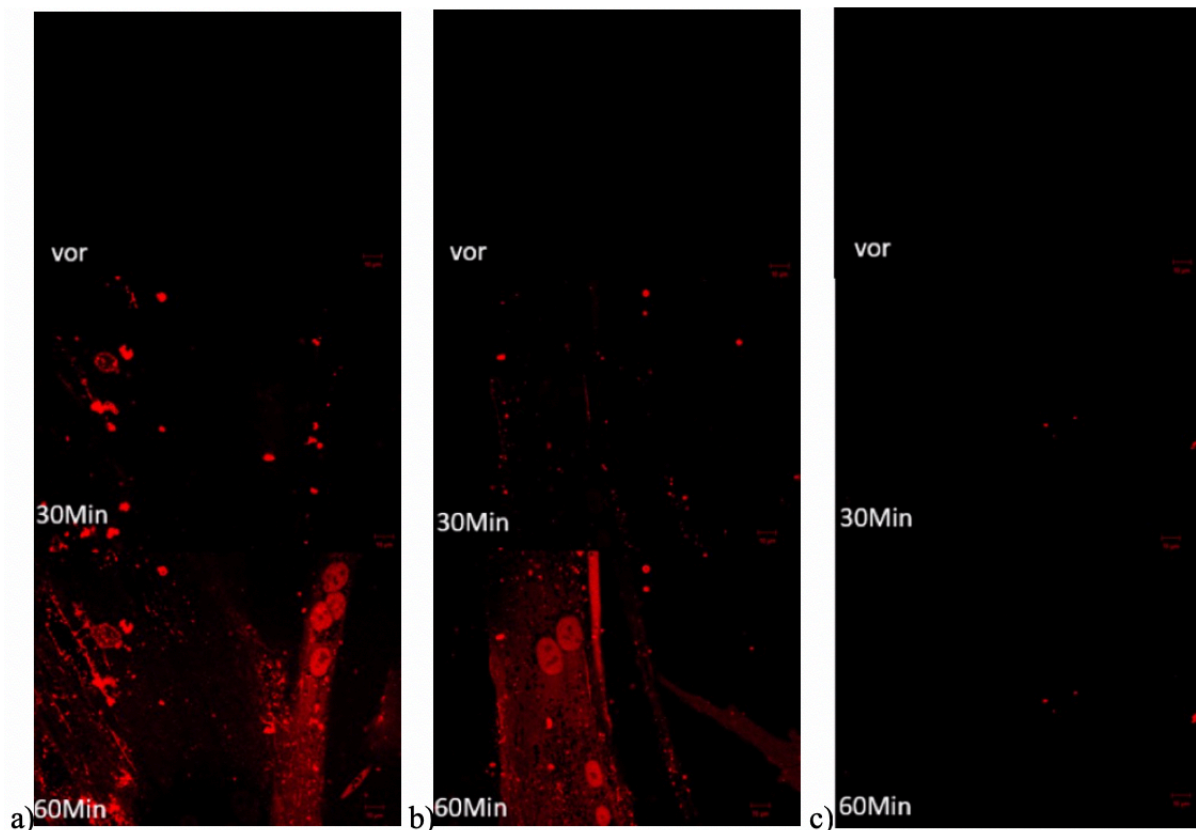


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der intrazellulären Akkumulation von Dy557-TDP in gesunden Myotuben im zeitlichen Verlauf
 a) freies Dy557-TDP, b) Dy557-TDP:Ferumoxytol, c) Dy557-TDP:VSOP.
 Dy557-TDP aus Dy557-TDP:Ferumoxytol verteilte sich besser als freies Dy557-TDP. Dy557-TDP aus VSOP-Nanopartikeln ließ sich mit dieser Methode nicht nachweisen.
 TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557 = Fluorophor

4.6.2 Peptidabgabe und Eintritt in die Zellen

Zur Untersuchung der intrazellulären Akkumulation der Peptide wurden auch gewaschene und fixierte Zellen (4 Stunden nach Peptid- bzw. Partikel-Zugabe) untersucht. Durch dieses Vorgehen ließen sich intrazelluläre und auf der Zellmembran adsorbierten Peptide unterscheiden. Mittels des Z-Stack-Verfahrens konnte zusätzlich die intrazelluläre Verteilung dargestellt und das intrazelluläre Kompartiment gegenüber dem extrazellulären Medium abgegrenzt werden.

Die Ergebnisse entsprachen weitgehend den Resultaten aus den Zeitreihe-Experimenten (s. Abb. 32, 34). Auch hier war die intrazelluläre Akkumulation von cIDCC-TDP am höchsten, wenn das freie Peptid zugegeben wurde (s. Abb. 36). Auch die intrazelluläre Verteilung war für das freie cIDCC-TDP besser als für cIDCC-TDP aus Ferumoxytol-Nanopartikeln (s. Abb. 38, 40). cIDCC-TDP:Ferumoxytol ließ sich vorwiegend in intrazellulären Einschlüssen nachweisen (s. Abb. 40). Nach Inkubation der Zellen mit cIDCC-TDP:VSOP ließ sich auch mit dieser Methode kein intrazelluläres cIDCC-TDP nachweisen, obwohl es extrazellulär am Gefäßboden vorhanden war. Intrazellulär fiel bei den Lichtbildaufnahmen die Akkumulation von VSOP in intrazellulären Einschlüssen auf (s. Abb. 42).

In den Ansätzen mit Dy557-TDP war auch mit dieser Methode die intrazelluläre Akkumulation des Peptids aus den Ferumoxytol-Nanopartikeln höher als die des freien Peptids (s. Abb. 37). Zudem zeigten die Z-Stack-Aufnahmen eine bessere Verteilung des Peptides aus den Ferumoxytol-Nanopartikeln (s. Abb. 39, 41). In den Ansätzen mit Dy557-TDP:VSOP ließen sich intrazellulär sowohl Dy557-TDP als auch VSOP nachweisen (s. Abb. 43). Dy557 konnte sowohl in intrazellulären Einschlüssen als auch im Zytosol nachgewiesen werden.

intrazelluläre Akkumulation von cIDCC-TDP

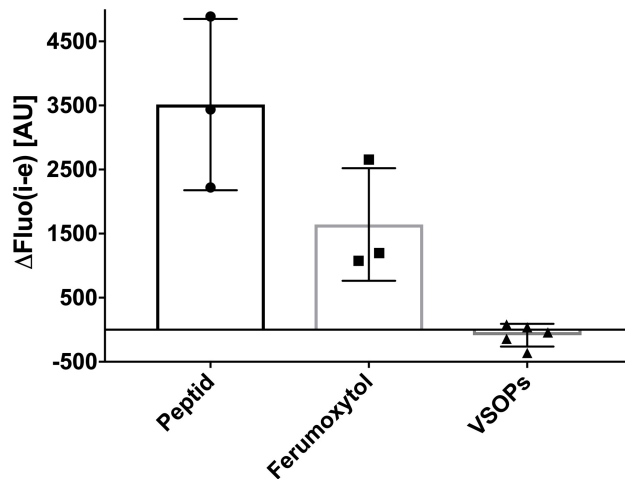


Abbildung 36: Intrazelluläre Akkumulation von cIDCC-TDP

Auf der y-Achse ist die Differenz der intrazellulären und extrazellulären Fluoreszenz (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$) in den Mikroskopie-Aufnahmen aufgetragen. Ein $\Delta\text{Fluo}(i-e) > 0$ wurde als intrazelluläre Akkumulation gewertet. Berücksichtigt wurden nur Zellen aus Ansätzen, in denen die Fluoreszenz des extrazellulären Mediums dargestellt werden konnte. (Inkubationszeit = 4 Stunden).

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557 = Fluorophor

intrazelluläre Akkumulation von Dy557-TDP

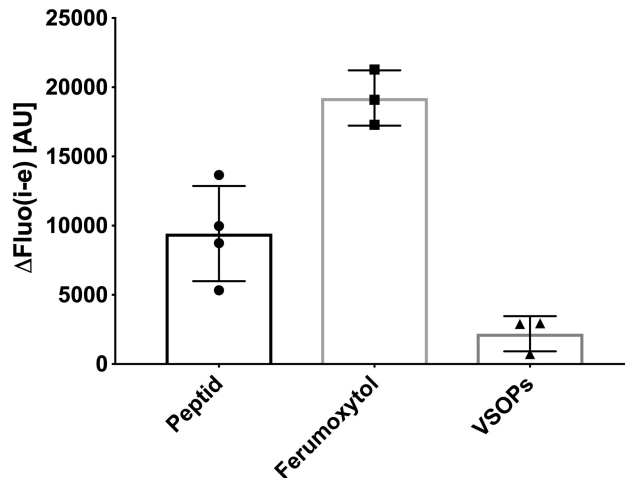


Abbildung 37: Intrazelluläre Akkumulation von Dy557-TDP

Die Akkumulation entspricht ein Überschreiten der Fluoreszenzintensität intrazellulär gegenüber extrazellulär in Mikroskopieaufnahmen. Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzdifferenz ($\Delta\text{Fluo}(i-e)$) und die Standardabweichung ($n = 3$). Jeder Punkt entspricht eine Zelle. Berücksichtigt wurden nur Zellen, wo in der gleichen Aufnahme das extrazelluläre Medium als Kontrolle dargestellt werden konnte. (Inkubationszeit = 4 Stunden)

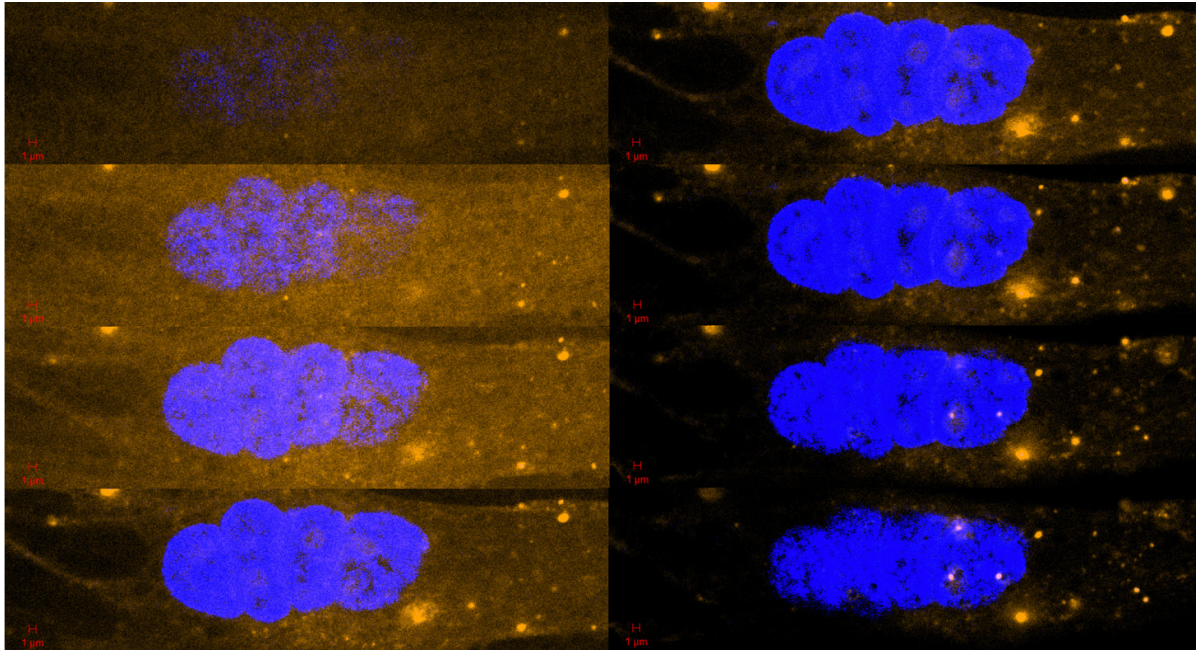


Abbildung 38: Z-Stack-Aufnahme einer Myotube mit freiem cIDCC-TDP (cIDCC-TDP gelb, Hoechst-Kernfärbung blau)

Die Aufnahme erfolgte nach 240 Minuten. Ein Teil des cIDCC-TDP blieb an der Membran haften. Ein Teil verteilte sich im Zytosol. Es ließen sich auch intrazelluläre Einschlüsse erkennen.

Zoomfokus: 63 x. Die Skala stellt 1 µm dar.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor

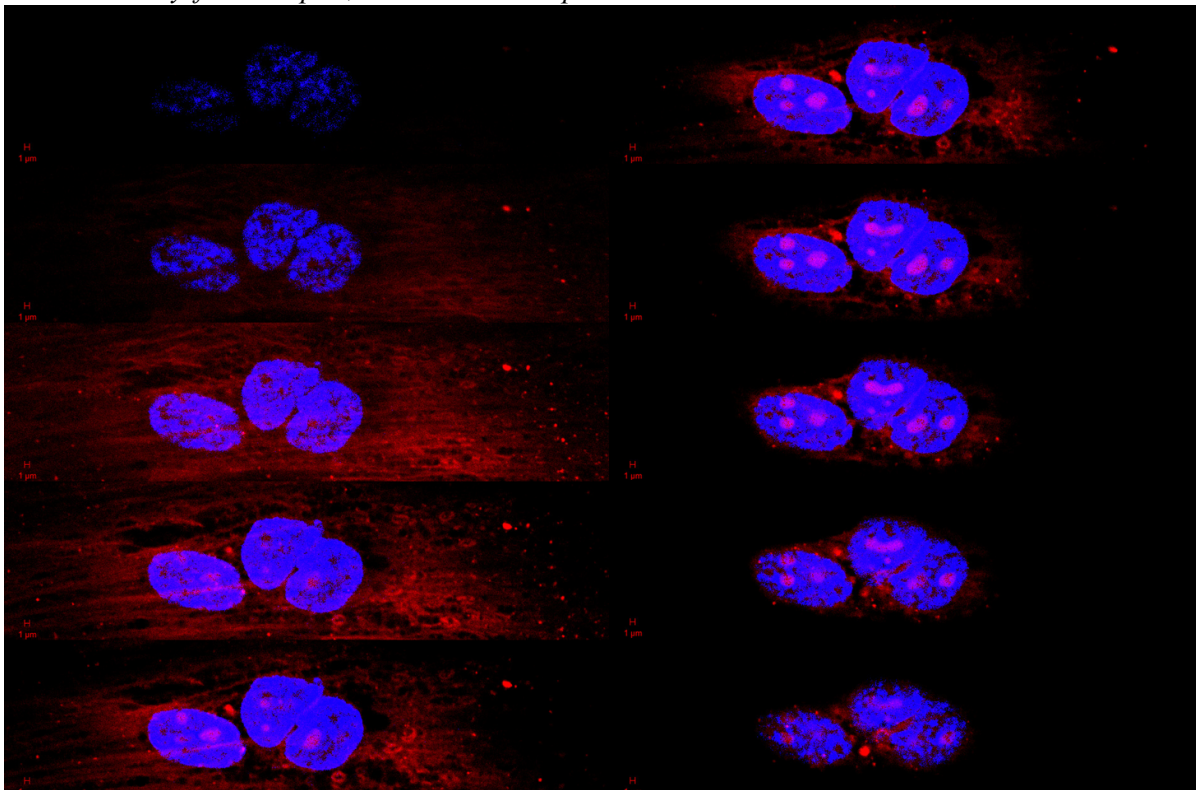


Abbildung 39: Z-Stack-Aufnahme einer Myotube mit freiem Dy557-TDP (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau)

Die Aufnahme erfolgte nach 240 Minuten. Ein Teil des Dy557-TDP blieb an der Membran haften. Ein Teil verteilte sich im Zytosol. Die Verteilungsmuster von Dy557-TDP und cIDCC-TDP waren verschieden (vgl. Abb. 40). Es ließen sich vereinzelte intrazelluläre Einschlüsse erkennen.

Zoomfokus: 63 x. Die Skala stellt 1 µm dar.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC, Dy557 = Fluorophore

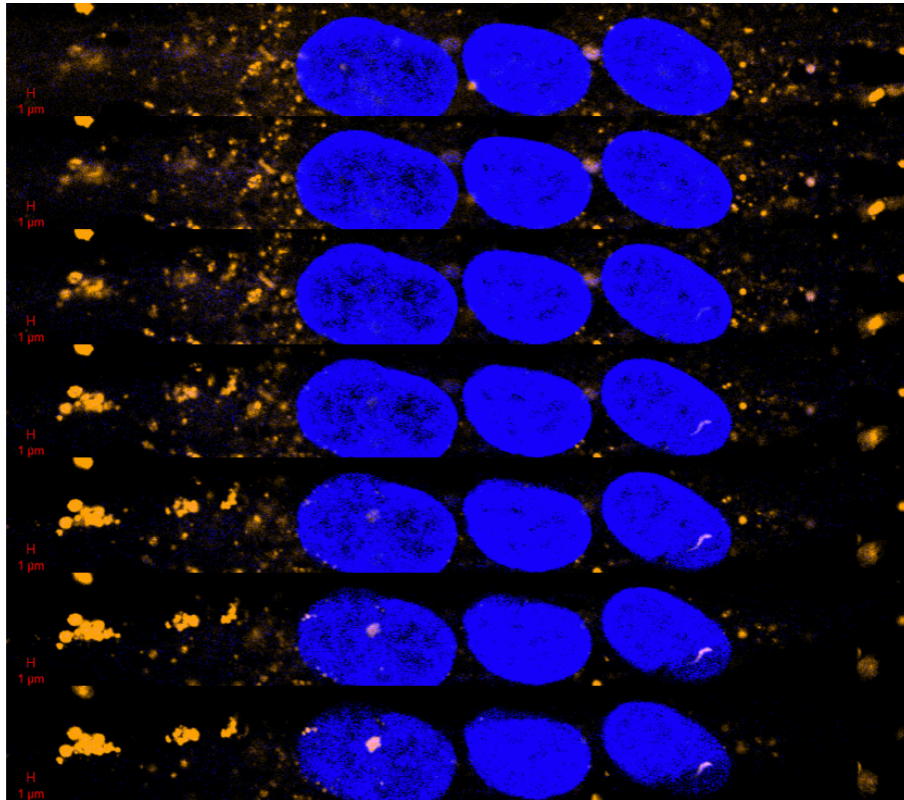


Abbildung 40: Z-Stack Aufnahme einer Myotube mit *cidCC-TDP:ferumoxytol* (*cidCC-TDP* gelb, *Hoechst-Kernfärbung* blau)

Die Aufnahme erfolgte nach 240 Minuten. *cidCC-TDP:ferumoxytol* verblieb vorwiegend in intrazellulären Einschlüssen. Nur ein kleiner Anteil von *cidCC-TDP* verteilte sich im Zytosol.

Zoomfokus: 63 x. Die Skala stellt 1 µm dar.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; *cidCC* = Fluorophor

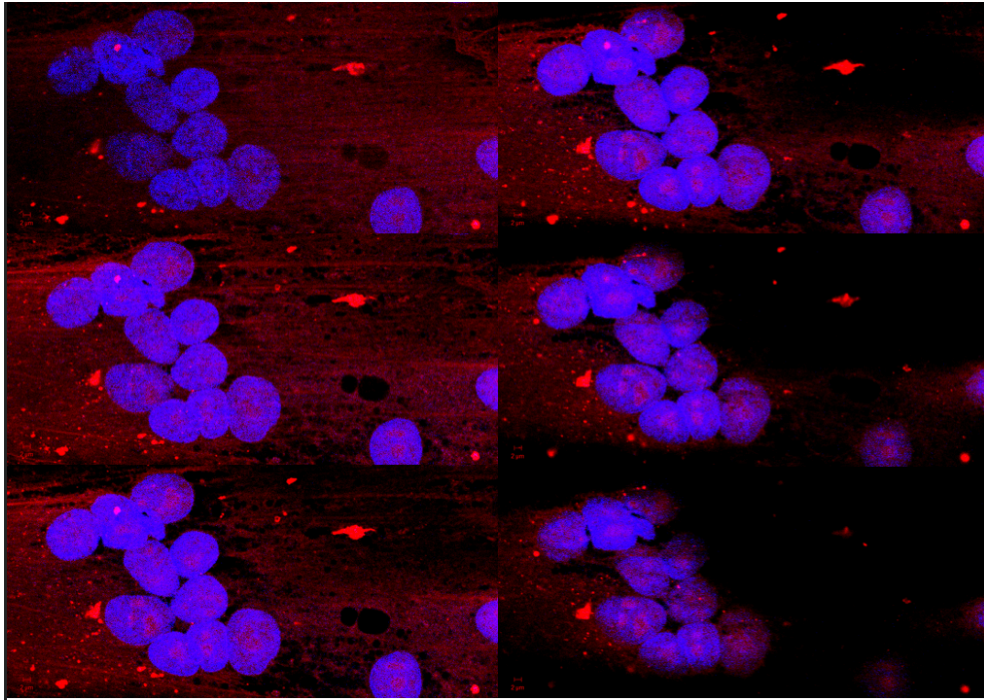


Abbildung 41: Z-Stack Aufnahme einer Myotube mit Dy557-TDP:Ferumoxytol (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau)

Die Aufnahme erfolgte nach 240 Minuten. Ein Teil von Dy557-TDP blieb an der Membran haften. Ein Großteil verteilte sich im Zytosol. Es ließ sich im Vergleich zur Abbildung 43 mehr Dy557-TDP intrazellulär nachweisen. Vereinzelt zeigten sich auch intrazelluläre Einschlüsse. Zoomfokus: 63 x. Die Skala stellt 1 μm dar.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; Dy557 = Fluorophor

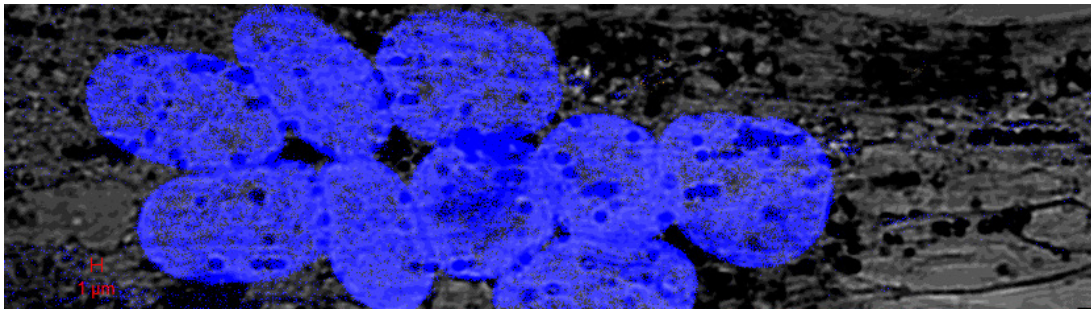


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme einer Myotube mit cIDCC-TDP:VSOP (cIDCC-TDP gelb, Hoechst-Kernfärbung blau)

In der Durchlichtaufnahme erkennt man eine große Anzahl an intrazellulären Einschlüssen mit Nanopartikeln. Eine Fluoreszenz von cIDCC-TDP ließ sich nicht nachweisen.

Zoomfokus: 63 x. Die Skala stellt 1 μm dar.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

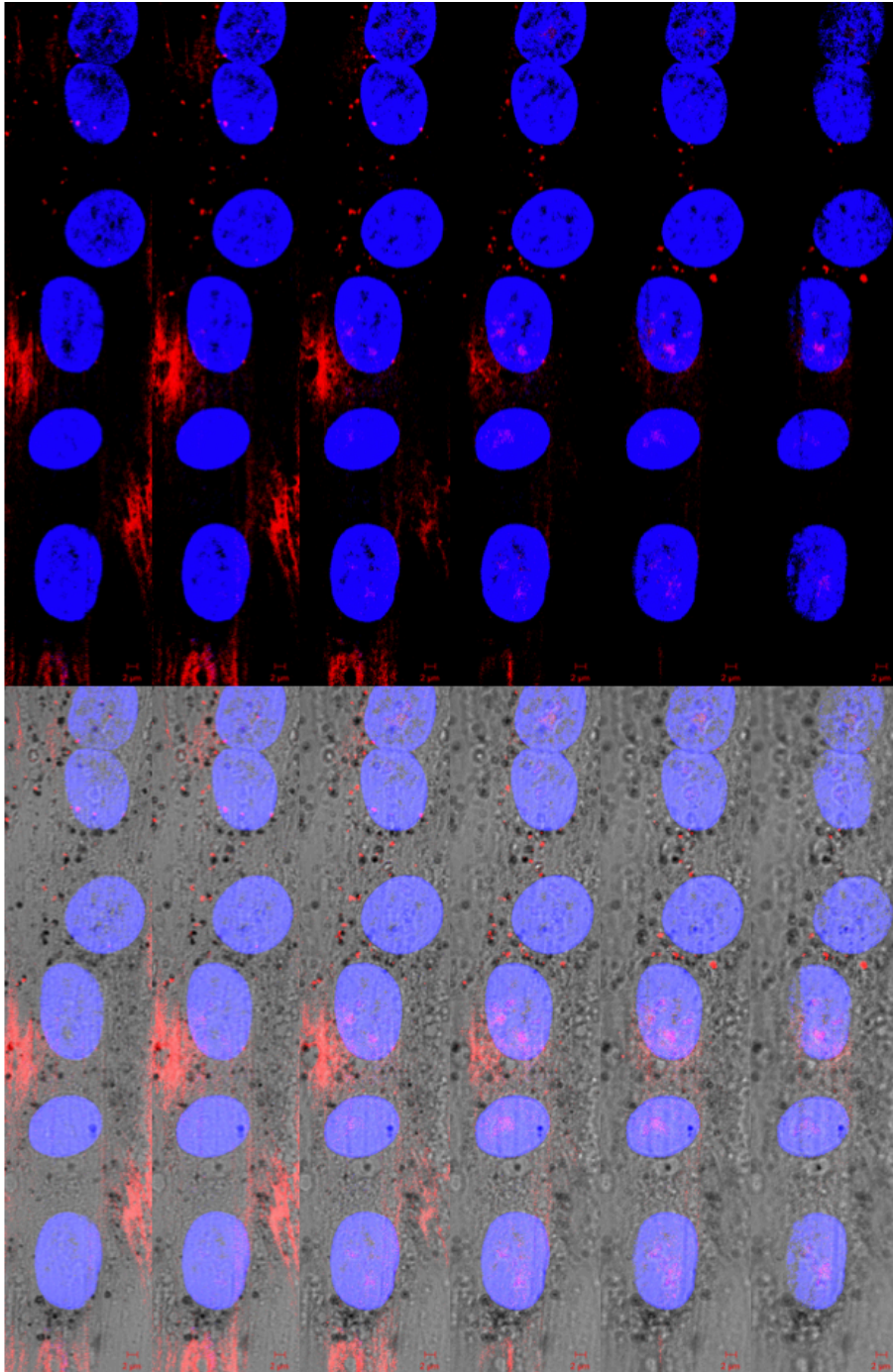


Abbildung 43: Z-Stack Aufnahme einer Myotube mit Dy557-TDP:VSOP (Dy557-TDP rot, Hoechst-Kernfärbung blau)

Oben Fluoreszenzaufnahme ohne Durchlichtbild. Unten Fluoreszenzaufnahme mit zusätzlichem Durchlichtbild. Die Aufnahme erfolgte nach 240 Minuten. Gezeigt sind Durchlichtbild die intrazellulären Einschlüsse mit VSOP. In einigen dieser Einschlüsse ließ sich die Fluoreszenz von Dy557-TDP nachweisen. Ein Teil von Dy557-TDP blieb an der Membran haften oder verteilte sich über kürzere Strecken im Zytosol.

Zoomfokus: 63 x. Die Skala stellt 1 μm dar.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557 = Fluorophor

4.7 Orientierende Pharmakokinetik

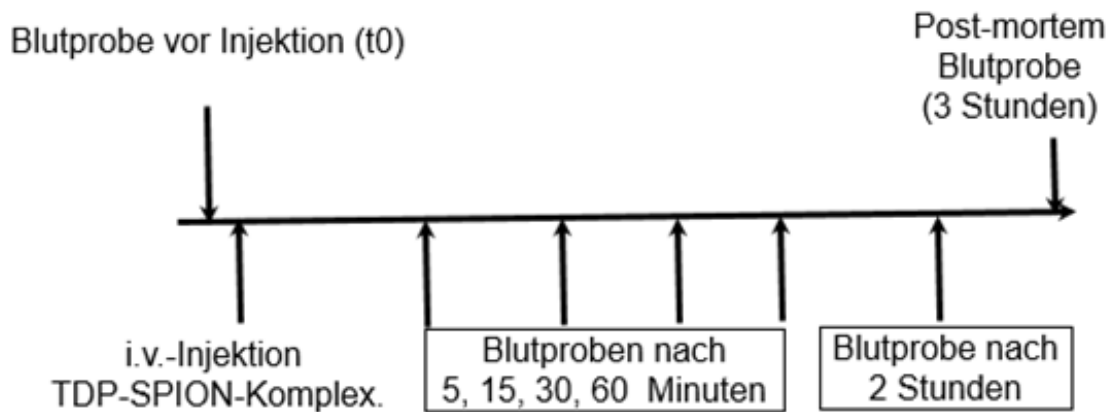


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Pharmakokinetik-Experimente

Für die Pharmakokinetik-Experimente wurden Dysferlin-defiziente Mäuse (MMex38-Mäuse) im Alter von 20–24 Wochen verwendet. Pro TDP-SPION wurden vier Mäuse behandelt.

SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid

Die zu untersuchenden Nanopartikel wurden basierend auf den *in vitro* Ergebnissen ausgewählt, Bestimmt werden sollte die Bluthalbwertszeit und die Nachweisbarkeit im Zielgewebe.

Dysferlin-defiziente Mäuse (MMex38) wurden mit den Nanopartikeln cIDCC-TDP:VSOP, cIDCC-TDP:Ferumoxytol oder Dy557-TDP:VSOP mit einer Eisendosis von 500 $\mu\text{mol/kg KG}$ intravenös injiziert. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen, um die Peptide fluoreszenzphotometrisch nachzuweisen (s. Abb. 44).

Tabelle 9: Halbwertszeit der TDP-SPION in Mäusen bei einer Dosis von 500µmol Fe/kg Körpergewicht

Aufgeführt sind die Halbwertszeit [Minuten], der hydrodynamische Durchmesser (Größe) [Nanometer] in Aqua dest. Die Daten der untersuchten Nanopartikel-Peptid-Konstrukte wurden mit aus der Literatur stammenden Halbwertszeiten für VSOP (500µmol Fe/kg KG) und Ferumoxytol (280 µmol Fe/kg KG) verglichen [120,129].

KG = Körpergewicht; SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557, cIDCC = Fluorophore

Halbwertszeit Beladung (Größe)	unbeladen	Dy557-TDP	cIDCC-TDP
SPION:			
VSOP	30Min - (7,40nm)	17Min 3 (6,5nm)	4Min 2 (9,9nm)
Feraheme	4h - (17,85nm)	- 16 (26nm)	ca.1,5h 16 (26nm)

Um die gleiche Eisendosis zu erreichen, musste cIDCC-TDP:Ferumoxytol im Vergleich zu cIDCC-TDP:VSOP in einer zehnfach höheren Dosis (179µg vs. 18,5µg) appliziert werden (s. Abb. 45 und 46). Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der Blutproben ergab für alle Partikel einen exponentiellen Abbau der intravaskulären Konzentration (s. Abb. 45–47). Weiter ließ sich eine höhere Konzentration in den *post-mortem* entnommenen Ausscheidungsflüssigkeiten (s. Kap. 3.2.9), Galle (hepatische Elimination) und Urin (renale Elimination), nachweisen. Die Peptide wurden vornehmlich renal ausgeschieden.

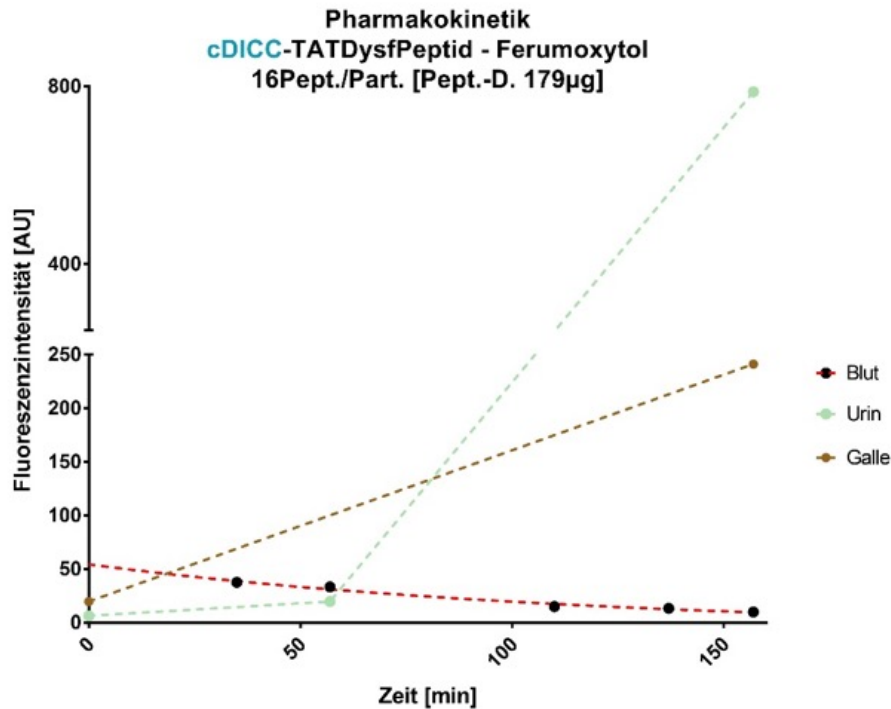


Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf der cIDCC-TDP:Ferumoxytol-Fluoreszenzintensität in Körperflüssigkeiten Dysferlin-defizienter Mäuse

Es wurden Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (schwarze Symbole) (s. Kap. 3.2.9). Zusätzlich wurde einmalig Urin (grüne Symbole) nach einer Stunde gesammelt. Am Ende des Experimentes wurden zusätzlich zum Blut auch Urin- (grün) und Gallenproben (braune Symbole) entnommen. Als Negativkontrolle für Urin und Galle dienten Proben von einer Peptid-naiven Maus entnommen. Peptiddosis 179 µg (16 Peptide pro Nanopartikel) bei einer Eisendosis von 500 µmol/kg Körpergewicht.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; cIDCC = Fluorophor

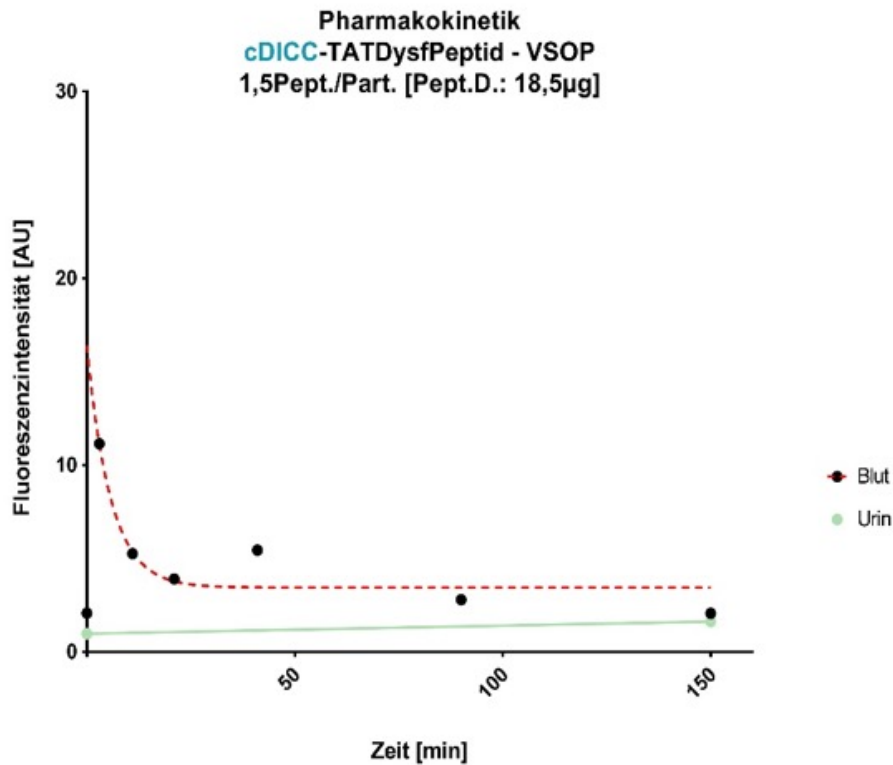


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf der cIDCC-TDP:VSOP-Fluoreszenzintensität in Körperflüssigkeiten Dysferlin-defizienter Mäuse

Es wurden Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (schwarze Symbole) (s. Kap. 3.2.9). Am Ende des Experimentes wurde zusätzlich eine Urinprobe entnommen. Gallenflüssigkeit konnte hier nicht entnommen werden (Gallenblase durchstoßen). Als Negativkontrolle für Urin und Galle dienten Proben von einer Peptid-naiven Maus entnommen. Peptiddosis ca. 19 µg (ca. 2 Peptide pro Nanopartikel) bei einer Eisendosis von 500 µmol/kg Körpergewicht.

TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

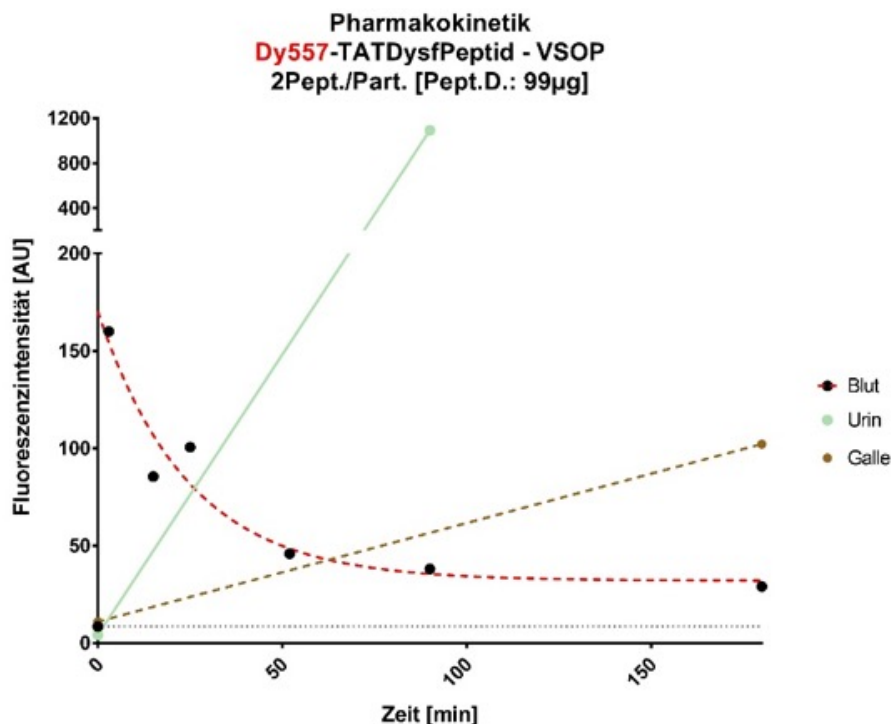


Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf der Dy557-TDP auf VSOP-Fluoreszenzintensität in Körperflüssigkeiten Dysferlin-defizienter Mäuse

Es wurden Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (schwarze Symbole) (s. Kap. 3.2.9). Zusätzlich wurde einmalig Urin (grüne Symbole) nach einer Stunde gesammelt. Am Ende des Experimentes wurden zusätzlich zum Blut auch eine Gallenprobe (braune Symbole) entnommen. Eine Urinprobe konnte bei leerer Harnblase am Ende des Experiments nicht entnommen werden. Als Negativkontrolle für Urin und Galle dienten Proben von einer Peptid-naiven Maus entnommen. Peptid-dosis 99 µg (2 Peptide pro Nanopartikel) bei einer Eisendosis von 500 µmol/kg Körpergewicht. TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557 = Fluorophor

Post-mortem wurden die Quadriceps-Muskeln sowie die restliche Muskulatur der Oberschenkel entnommen. Diese Muskeln sind bei einer Dysferlin-Defizienz bevorzugt betroffen [19].

In Kryoschnitten der Muskeln (s. Kap. 3.2.9.3) konnten, unabhängig von der Schnittdicke, die fluoreszierenden Peptide aller drei verwendeten Nanopartikel nicht nachgewiesen werden (Bilder nicht gezeigt). Die Verdauung von Gewebsschnitten (s. Kap. 3.2.9.4) zeichnete sich wie erwartet, durch eine hohe Sensitivität aus. Mit dieser Methode war ein Nachweis von cIDCC möglich (s. Abb. 48). Die gemessene Fluoreszenzintensität ($\lambda_{Ex}=640$ nm, $\lambda_{Em}=670$ nm) war signifikant höher als bei den Negativkontrollen (One sample t-test, $p=0,015$).

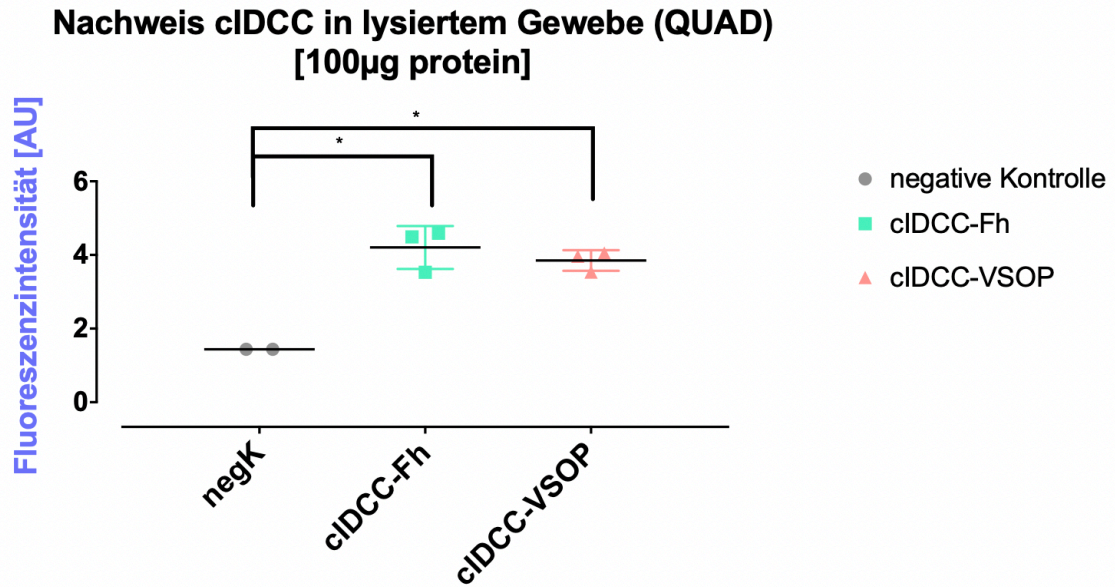


Abbildung 48: Fluoreszenzphotometrischer Nachweis von cIDCC in lysiertem Muskelgewebe [100 µg Protein]. Pro Nanopartikel wurden drei Proben lysiert und aufbereitet. Der Scatter-Plot zeigt die Mittelwerte und das 95 %-Konfidenzintervall der Messungen. (one sample t test, * $p < 0,005$).
 negK = Quadriceps von MMex38 nach Ferumoxytol-Injektion i.v.; cIDCC-Fh = cIDCC-TDP:Ferumoxytol; cIDCC-VSOP = cIDCC-TDP:VSOP
 TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; cIDCC = Fluorophor

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines Wirkstoffabgabesystems (Drug Delivery System, DDS) für CPP, das nach systemischer Applikation eine Anreicherung und Abgabe im Skelettmuskel ermöglicht. Als Krankheitsmodell für das gezielte DDS wurde die Dysferlinopathie gewählt. Da diese genetisch bedingte, progressive Muskelkrankheit aktuell nicht behandelbar ist, ist das Interesse an innovativen neuen Therapieoptionen hoch. Die Entwicklung von Therapieansätzen mit CPP stehen aktuell im Fokus medizinischer Forschung [74]. Ein intravasculäres DDS, das eine schnelle Clearance und unspezifische Verteilung der CPP verhindert, ist für die Arzneimittelentwicklung von hoher Relevanz. Eine dabei vielfach angewendete Strategie in diesem Kontext ist die Nutzung von Nanopartikeln als intravasculäres DDS. In der klinischen Anwendung werden bereits liposomale Nanostrukturen eingesetzt [185]. Sie ermöglichen eine gezielte Verteilung in spezifischen Kompartimenten und verringern so die Toxizität der transportierten Wirkstoffe. Beispielsweise lässt sich mit AmBisome® (Gilead Sciences Ltd.) das nephrotoxische Fungizid Amphotericin B gezielt zur Leber und Milz transportieren, was gleichzeitig die Nieren und Lungen schont [186].

Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) als DDS befinden sich derzeit noch in der präklinischen Erprobung [187]. Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften können SPION mittels MRT verfolgt und mithilfe externer Magnetfelder in Kompartimente geleitet werden, was die Spezifität des Cargos erhöht und seine Toxizität verringert. Ein weiterer angestrebter Einsatzbereich, ist die gleichzeitige Steuerung der intravasculären Nanopartikel im Rahmen des MRT [188,189]. Bereits in den 1960er-Jahren wurde die Verwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln als DDS postuliert [190]. Mitte der 1990er-Jahre wurde erstmals eine klinische Phase I Studie mit einem „magnetic drug delivery“ System mit elektrostatisch beladenen Epirubicin-SPION durchgeführt [191]. Anfang der 2000er-Jahre wurde ein Doxorubicin-SPION an vier Patienten mit hepatozellulären Karzinomen getestet [192]. Dazu wurden die Partikeln intraarteriell über konventionelle Angiografie appliziert und mittels eines im Zieltumor eingebauten externen Magneten angezogen [192].

5.1 Beladung der Nanopartikel und kolloidale Stabilität

Eisenoxid-Nanopartikelkerne neigen bei neutralem pH stark zur Aggregation, sodass sie mittels Oberflächenbeschichtungen stabilisiert werden müssen [139]. Durch elektrische Ladungen (elektrostatische) und/oder räumliche (sterische) Abstoßung wird den anziehenden Van-der-Waals-Kräfte entgegengewirkt, wodurch sich die Nanopartikel-Suspension stabilisiert. Solche Oberflächenbeschichtungen können auch als Ankerpunkte für die Beladung mit Cargo-Material

genutzt werden, vorausgesetzt, dass die abstoßenden gegenüber den anziehenden Kräften überwiegen.

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Analyse der Stabilität elektrostatisch stabilisierter, mit CPP beladener Eisenoxid-Nanopartikel. Bei der Beladung sollten die Nanopartikel eine homogene monodisperse Größenverteilung aufweisen. Um den Einfluss weiterer Faktoren zu minimieren, wurde die Beladung (d.h. die Peptidadsorption) in Aqua dest. (pH 7,0) und bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei neutralem pH liegt ein Teil der Carboxy-Gruppen der Nanopartikel-Beschichtungen deprotoniert vor, während die Seitenketten der basischen Aminosäuren protoniert sind. Das führt zu einer elektrostatischen Interaktion der Nanopartikel-Oberflächen und der CPP. Ein negatives Zeta-Potenzial (≤ -30 mV) ist eine Grundvoraussetzung [95, 105] für elektrostatisch stabilisierte Nanopartikel. Eine negativere Ladung als -30 mV erhöht das Abstoßungspotenzial und somit die Suspensionsstabilität. In der vorliegenden Studie erlaubte die Interaktion der CPP mit den elektrostatisch stabilisierten VSOP die Beibehaltung eines stabilisierenden Zeta-Potenzials in neutralem Milieu (pH 7,0) ohne den Einfluss weiterer Ionen. Für die weitere Experimente wurden nur Partikel ausgewählt, die stabil beladen werden konnten, ohne dass ein Präzipitat auftrat und ein Peptid-Überschuss notwendig war. In Tabelle 10 fasse ich meine Ergebnisse zu den Charakteristika der hier jeweils gebildeten TDP-SPION Komplexe zusammen.

Tabelle 10: Ergebniszusammenfassung der untersuchten TDP-SPION

Die Suspensionsstabilität der Nanopartikel bezieht sich auf die makroskopische Aggregationstendenz bzw. Größenänderung im entsprechenden Suspensionsmedium (s. Kap. 4.1, 4.2 und 4.3) (Makroskopisch zeigte sich keine Aggregation, aber eine Messung des hydrodynamischen Durchmessers von cIDCC-TDP-Ferumoxytol im physiologischen Puffer war technisch bedingt nicht aussagekräftig, s. Kap. 4.2.1) (** Trotz der konstanten Relaxivität cIDCC-TDP:VSOP mit zunehmender Inkubationsdauer im FCS zeigten sich diese im Vergleich zu den anderen Nanopartikeln makroskopisch instabiler im Serum, s. Kap. 4.3. und Abb. 24). Die Adsorptionsstabilität bezeichnet die Tendenz der Peptide stabil auf die SPION gebunden zu bleiben und hängt mit der Stärke der Adsorption zusammen (Adsorptionsstärke). Diese ist reziprok zur festgestellten Desorptions- oder Dissoziationstendenz der Peptide aus den SPION in der Gelelektrophorese oder durch Resuspension im Serum (s. Kap. 4.4 und 4.5). Die Wirkstoffabgabe bezeichnet die gewünschte spontane Freisetzung bzw. Dissoziation vom Peptid aus den Nanopartikeln vor Internalisation desselben in den Zellen (s. Kap. 4.6). Die in die Zellkultur zugefügten TDP-SPION erlaubten auch die Untersuchung deren Toxizität. Bei cIDCC-TDP:VSOP wurde repetitiv das zunehmende Absterben von ein Großteil der Zellen beobachtet. Bei Dy557-TDP:VSOP zeigte sich hingegen eine zunehmende Vakuolisierung der Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt), was auf eine mögliche Unverträglichkeit derselben hindeutet. Die orientierende Halbwertszeit bezeichnet die ermittelte Bluthalbwertszeit an Mäusen durch fluoreszenzphotometrische Messungen von Blutproben nach i.v.-Injektion der Nanopartikel. Diese war bei allen TDP-SPION kürzer als die der unbeladenen SPION (s. Kap. 4.7). Der Nachweis im Zielgewebe entspricht den fluoreszenzmikroskopischen oder -photometrischen Nachweis der Nanopartikel im Zielgewebe. Dabei wurden fluoreszenzphotometrisch geringe Mengen an cIDCC in lysierten Muskelproben sowohl nach cIDCC-TDP:VSOP als auch nach cIDCC-TDP:Ferumoxytol i.v. nachgewiesen. Ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis gelang nicht.*

SPION = superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel; TDP = TAT-Dysferlin-Peptid; VSOP = Very small iron oxide particle; Dy557, cIDCC = Fluorophore

Nanopartikel (Peptide pro Nanopartikel)	Dy557-TDP:SPION		cIDCC-TDP:SPION	
	VSOP (3)	Ferumoxytol (16)	VSOP (2)	Ferumoxytol (16)
Suspensionsstabilität (Aq. dest)	ja	ja	ja	ja
Suspensionsstabilität (Puffer)	nein	ja	nein	(-)*
Suspensionsstabilität (Serum)	stabil	stabil	(instabil)**	stabil
Adsorptionsstabilität	hoch	gering	hoch	gering
Wirkstoffabgabe	schlecht/nein	ja	schlecht/nein	ja
Zelltoxizität	unklar/möglich	nein	ja	nein
Bluthalbwertszeit (verglichen zu SPION)	kürzer	kürzer	kürzer	kürzer
Nachweis Zielgewebe	nein	nein	gering	gering

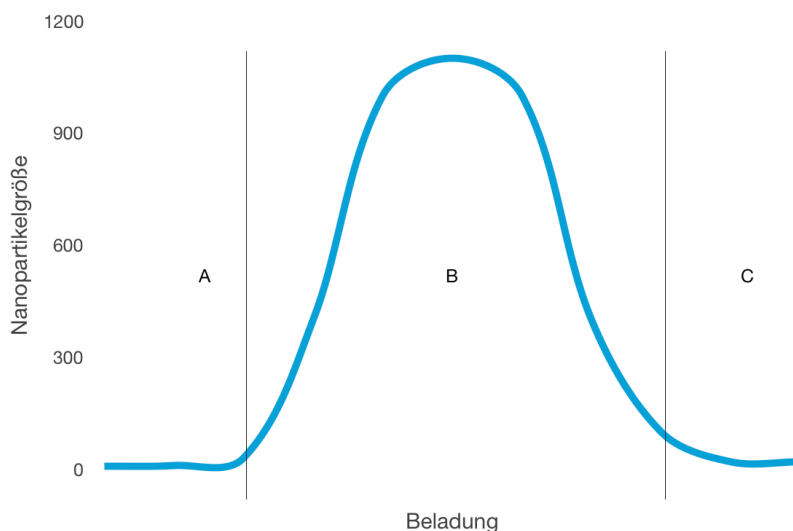


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Größen-Beladungsverhältnisses. A=stabile Nanopartikel mit niedriger Beladung. B=instabile Nanopartikel. C=voll beladene Nanopartikel mit Ladungsumkehr und überschüssigem Cargo im Dispersionsmedium.

Bei der Beladung der Nanopartikel besteht ein annähernd glockenförmiges Verhältnis zwischen Nanopartikelgröße und Beladung (s. Abb. 49). Bei einer geringen Beladung sind die Partikel klein und stabil (s. Abb. 49, A) und zeigen eine monodisperse Verteilung. Ab einem bestimmten

Verhältnis zwischen Nanopartikel und Peptid nimmt die Aggregationstendenz der Partikel zu, sodass größere Partikelaggregate entstehen und die Lösung eintrübt (s. Abb. 49, B). Ein zweites kritisches Verhältnis wird bei der vollständigen Beladung der Nanopartikeloberfläche erreicht. Dies hat eine homogene Potenzialumkehr der Nanopartikeloberfläche zur Folge, wodurch die Nanopartikel wieder eine stabile Suspension bilden (s. Abb. 49, C). Zur vollständigen Nanopartikelbeladung wird ein Überschuss an Peptid eingesetzt, der nach der Beladung beispielsweise durch Ultrafiltration mit einer Filtrationsmembran abgetrennt wird. Dies ist möglich, weil die Peptide kleiner als die Nanopartikel sind. Der Versuch, während der vorliegenden Experimente nicht gebundene Peptide von den Nanopartikeln mittels Ultrazentrifugation mit einer Filtrationsmembran aus regenerierter Zellulose (Amicon Ultra-4 der Firma Millipore, Eschborn Deutschland) aufzutrennen und wiederzugewinnen, gelang nicht, da sich Peptide und Nanopartikel an die Membran anlagerten (Daten nicht gezeigt). Die Anlagerung von Peptiden und Proteinen stellt ein allgemein häufiges Problem von Filtrationsmembranen dar [193,194].

Wegen des hohen Peptidbedarfs und -verlusts wurde auf eine überschüssige bzw. vollständige Beladung verzichtet. Stattdessen wurde ein geringes Beladungsverhältnis, bei dem die Partikel stabil blieben, ausgewählt (s. Abb. 49, A). ATTO495-TDP diente als CCP-Prototyp zur Beladung der ausgewählten SPION. Die Experimente ergaben das bereits beschriebene glockenförmige Verhältnis von Partikelbeladung und Aggregationspotenzial (s. Kap. 4.1., 4.2).

Die SPION konnten stabil und ohne Überschuss mit maximal je 16 Peptiden pro Ferumoxytol-Nanopartikel (s. Tab. 10, Abb. 14-16) und 3 Peptiden pro VSOP (s. Tab. 10 und Abb. 9, 10, 12) beladen werden. Die effektive Adsorptionsoberfläche erwies sich bei den Ferumoxytol-Nanopartikeln durch die voluminösere Carboxymethyl-Dextranhülle fünfmal größer als bei VSOP. Die Kohlenhydrathülle bietet eine größere effektive Oberfläche für die Adsorption der positiv geladenen Peptide. Bei VSOP hingegen entspricht die Adsorptionsoberfläche der Nanopartikel-Oberfläche (d. h. $A=\pi*r^2$ für kugelförmige Nanopartikel). Die Beladungsdichte von Ferumoxytol in der vorliegenden Studie war vergleichbar mit der in anderen Analysen. Bei der kovalenten Bindung eines Fluorochroms an Ferumoxytol wurde beispielsweise eine Beladungsdichte von 18 Molekülen erreicht [123].

Das glockenförmige Größen-Beladungsverhalten wurde nicht nur beim CPP-Prototyp ATTO495-TDP beobachtet. Das beobachtete Verhalten ließ sich auch bei der Verwendung von Dy557-TDP und cIDCC-TDP reproduzieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe Dy557 und cIDCC wurden als Alternative getestet, da sich ATTO495 für die weiteren Experimente dieser Studie erwies. Muskelfasern weisen eine starke Autofluoreszenz auf, die der Fluoreszenz des green

fluorescent protein (GFP) ähneln. Geringe Konzentrationen an Fluorophoren mit ähnlichem Emissionsspektrum [195] wie ATTO495 sind daher im Muskelgewebe kaum nachweisbar. Insgesamt ähnelte das Größen-Beladungsverhalten der cIDCC-TDP:VSOP (s. Abb. 12) stärker dem der ATTO495-TDP:VSOP (s. Abb. 9) als das Größen-Beladungsverhalten von Dy557-TDP:VSOP (s. Abb. 11).

Bei den Ferumoxytol-Nanopartikeln ließen sich die Ergebnisse von ATTO495-TDP (s. Abb. 14) mit den anderen Peptiden nur eingeschränkt reproduzieren. Bei niedrigen Beladungsverhältnissen zeigten die Ferumoxytol-Nanopartikel ähnliche hydrodynamische Durchmesser. Bei höheren Beladungsverhältnissen verhielten sie sich in Abhängigkeit vom untersuchten Fluorophor verschieden (s. Abb. 14-16). Bei cIDCC-TDP wurde die Untersuchung durch das geringere Quenching und die Wellenlängenüberlappungen des DLS-Detektors mit der Fluoreszenz des Farbstoffes erschwert (s. Abb. 16). Daher konnten die mit cIDCC-TDP vollständig beladenen Ferumoxytol-Partikeln nicht mittels DLS untersucht werden.

Die negative Ladung der Nanopartikel blieb trotz Adsorption der positiv geladenen Peptide unterhalb von -30 mV. Anders als erwartet führte die Interaktion des «negativeren» Dy557-TDP mit VSOP zu einer leichten (absoluten) Abnahme des Zeta-Potenzials (von -37 mV auf -33 mV), während das positivere cIDCC-TDP eine (absolute) Zunahme des Zeta-Potenzials (auf ca. -46 mV) bewirkte. Das Zeta-Potenzial wird durch die Änderung des Oberflächenpotenzials, des Stern-Potenzials (durch die Änderung der Besatzdichte von Anionen bzw. Kationen an der inneren Helmholtz-Schicht, s. Abb. 50) und der Elektrolytkonzentration des Dispersionsmediums [115] beeinflusst. Vorstellbar wäre, dass das adsorbierte cIDCC-TDP einen Teil der Stern-Schicht gebildet und zu einer Zunahme der Besatzdichte von Anionen in der diffusen Schicht geführt hat, was das negativere Zeta-Potenzial erklärt. Die höhere Anzahl an Anionen in der diffusen Schicht könnte auch die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers erklären (von 7,4 nm auf 9,9 nm).

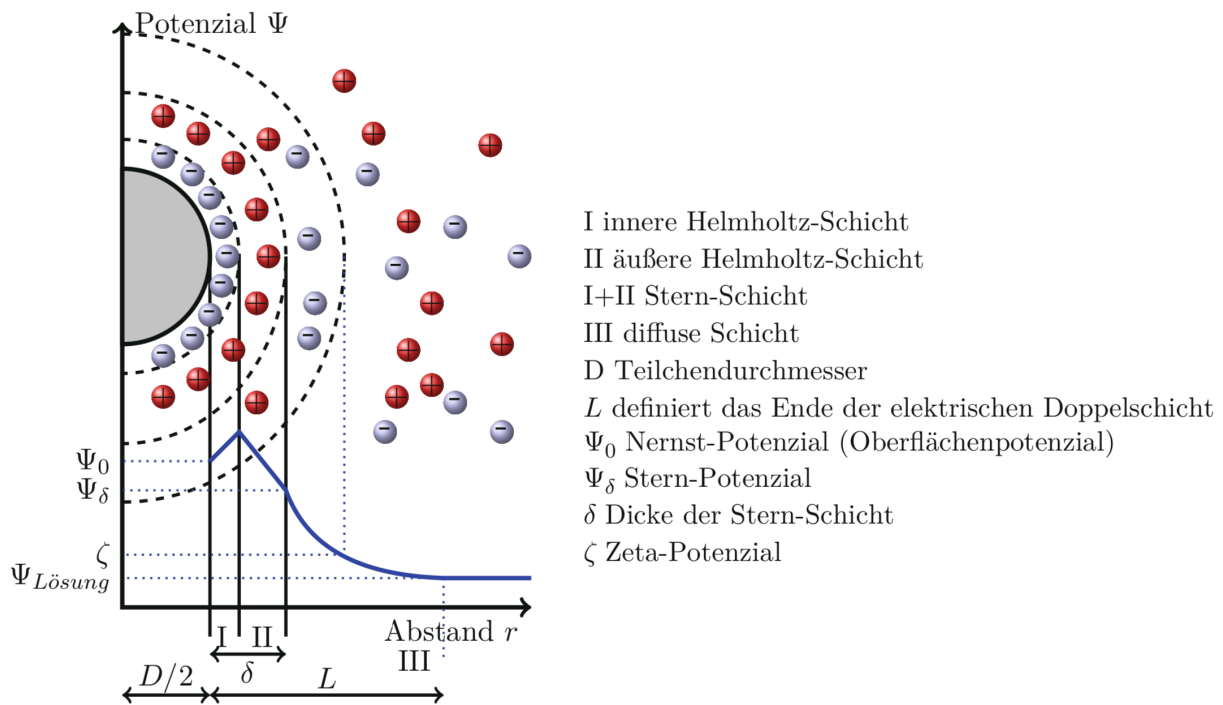


Abbildung 50: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht nach dem Grahame-Modell

Entnommen aus [196]

Mit der physiologischen Pufferlösung (s. Tab. 5) wurde die Suspensionsstabilität der Nanopartikel gegenüber Änderungen der Elektrolytkonzentration geprüft. Eine Zunahme der Elektrolytkonzentration oder der ionischen Stärke führt zu einer Verkleinerung der Hydrathülle der beladenen Nanopartikel, wodurch die Nanopartikel näher miteinander in Kontakt kommen und über die CPP aneinanderhaften können. Diese Überlegungen spiegeln sich in der gemessenen Änderung des hydrodynamischen Durchmessers (s. Abb. 17-18) wider.

Es wäre plausibel, dass sich die negative Ladung vom Dy557 nach Adsorption auf der VSOP-Oberfläche nach außen ausrichtet und zu einer elektrostatischen Abschirmung und Stabilisierung der beladenen VSOP führt. Makroskopisch und über die Messung des hydrodynamischen Durchmessers ließ sich eine höhere Labilität der cIDCC-TDP:VSOP im Vergleich zu den Dy557-TDP:VSOP nachweisen (s. Abb. 20). Auch im physiologischen Puffer (s. Tab. 5) zeigte sich eine geringere Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers der Dy557-TDP:VSOP im Vergleich zu den cIDCC-TDP:VSOP (s. Abb. 17). Darüber hinaus erwiesen sich vollständig beladene Dy557-TDP:VSOP als stabiler als cIDCC-TDP:VSOP. Bei Letzteren kam es zu einer stärkeren Aggregation und Präzipitation (s. Abb. 12, 13).

Beladene Ferumoxytol-Partikel erwiesen sich als weniger empfindlich gegenüber einer Änderung der Elektrolytkonzentration (s. Tab. 10). Die auf sterische Mechanismen beruhende Sus-

pensionstabilität der Ferumoxytol-Nanopartikel macht sie weniger sensitiv für eine Aggregation durch eine mit der Zunahme der Ionenstärke assoziierten Abnahme der Hydrathülle (s. Abb. 19). Bei den niedrig beladenen Dy557-TDP:Ferumoxytol blieb der hydrodynamische Durchmesser trotz Zunahme der Ionenstärke (s. Abb. 18b) sogar in einem konstanten Bereich. Die Adsorptionsstabilität in diesen Experimenten wurde nicht überprüft. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass Dy557-TDP bereits vor der Messung abgegeben wurde. Dann wäre nur die Suspensionsstabilität von Ferumoxytol bei einer hohen Ionenstärke dargestellt worden. Bei ATTO495-TDP:Ferumoxytol (s. Abb. 18a) kam es unter den gleichen Bedingungen zu einer höheren Differenz des hydrodynamischen Durchmessers zwischen niedrig und vollständig beladenen Nanopartikeln. Dieses Ergebnis könnte auf einen unterschiedlichen Beladungsvorgang beider Peptide hindeuten.

5.2 Adsorptions- und Suspensionsstabilität in biologischen Medien

Wie dargestellt, ist die Ultrafiltration durch Zentrifugation eine häufig verwendete Methode zur Trennung nicht gebundener Cargo-Molekülen und Nanopartikel. Peptide und Nanopartikel lagerten sich an den Filtermembranen an, was diese Methode zur Überprüfung der Adsorptionsstabilität der Peptide auf den Nanopartikeln ungeeignet machte und nicht reproduzierbare Messwerte lieferte.

Zur Analyse der Stabilität der Peptidadsorption wurden die beladenen Nanopartikel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelelektrophorese mit einem 1 %igen Agarose-Gel stellte eine gute Methode dar, um nicht beladene Peptide von den Nanopartikeln zu trennen. Agarose zeichnet sich durch eine inerte Ladung und konzentrationsabhängige Porengröße aus. Die Gelelektrophorese-Experimente belegten, dass Dy557-TDP:Ferumoxytol (s. Abb. 30, 31) die instabilste Peptidadsorption auswies. Ca. 30 % des Peptides blieb ungebunden bzw. konnte ohne weitere Einflussfaktoren abgekoppelt werden (s. Abb. 30). Etwas stabiler erwies sich cIDCC-TDP:Ferumoxytol, wo aber durch Suspension in FCS ca. 50 % vom Peptid aus den Partikeln desorbierte (s. Abb. 30).

Nanopartikel mit einer raschen Wirkstoffabgabe sind als DDS ungeeignet, da dieses Verhalten im Organismus zu einem «drug burst release» intravaskulär führt und das DDS ineffektiv macht. Insgesamt war, wie erwartet, die Adsorption der Peptide an VSOP stabiler als an Ferumoxytol. Die negativen Ladungen der VSOP liegen unmittelbar als eine dünne Citrat-Hülle auf der Eisenkern-Oberfläche. Daraus resultiert eine hohe Ladungsdichte (negative Ladungen sind auf einer kleinen Fläche verteilt) und eine geringere Entfernung der direkt auf der Nanopartikeloberfläche von VSOP adsorbierten Peptide zu den negativen Ladungen. Dies lässt sich

anhand des Coulombschen Gesetzes, das die Kraft zwischen zwei Punktladungen darstellt, beschreiben. Bei der Punktladung wird die räumliche Ausdehnung von elektrischen Ladungen nicht berücksichtigt. Das Coulombsche Gesetz besagt, dass die elektrostatische Kraft (F) proportional zum Produkt beider Ladungsmengen ($Q_1 * Q_2$) und indirekt proportional zum Quadrat der Entfernung beider Punktladungen (d^2) ist. Je nach Vorzeichen des Produktes werden die Punktladungen zum Zentrum der Verbindungsgerade beider Punkte gezogen (negatives Vorzeichen) oder von diesem abgestoßen (positives Vorzeichen). Entgegengesetzte Ladungen ziehen einander mit der Kraft (F) als Produkt der Ladungen und Quotient der Entfernung an.

$$F = \frac{Q_1 * Q_2}{d^2}$$

Die höhere Ladungsdichte der Citrat-Monoschicht auf den VSOP bewirkt, dass sich die negativen Einzelladungen der Citratmoleküle symmetrisch verteilen und auf der Partikeloberfläche konzentrieren. Durch die konzentrierte Oberflächenladung (Q_2) und die dichte Adsorption (kleine d) ist die anziehende Kraft zwischen Peptid und VSOP stark. Dagegen liegen die negativen Ladungen auf der Carboxymethyl-Dextranhülle von Ferumoxytol weiter voneinander entfernt. Die Gesamtladung verteilt sich über ein größeres Volumen, sodass sich auf der Adsorptionsoberfläche eine geringere Ladung auswirkt. Die Einzelladung Q_2 ist geringer und die Entfernung d vom Zentrum der Gesamtladung größer. Zusammengefasst ist die Anziehungskraft F bei Ferumoxytol-Nanopartikel geringer, obwohl sich die Partikel aufgrund der Beweglichkeit der Ketten an die Konformation des Peptides anpassen können. Diese Beweglichkeit führt hingegen möglicherweise auch dazu, dass kinetische Faktoren die Adsorptionsstabilität zusätzlich beeinträchtigen.

Die stabile Adsorption zeigte sich auch im Quenching der Fluoreszenzmoleküle. Der Abstand des Farbstoffes von der Eisenkern-Oberfläche bei Ferumoxytol ist deutlich höher als bei VSOP und somit der Quenching-Effekt [177] geringer. Auch der Abstand der Peptide voneinander ist größer, was den Quenching-Effekt durch benachbarte Fluoreszenzmoleküle vermindert.

Zur weiteren Überprüfung der Stabilität, sowohl der Peptidadsorption als auch der Fähigkeit der Nanopartikel in Suspension zu bleiben, erfolgte eine Inkubation der beladenen SPION im Serum. Für alle Wirkstoffe ist die präklinische Testung mit Plasma und / oder Serum für das Verständnis der Pharmakokinetik (Plasmaproteinbindung, Sicherheit, Biodistribution) und Pharmakodynamik unverzichtbar. Das Serum enthält Elektrolyte, Proteine, Fette und andere Biomoleküle. Es stellt lediglich ein Modell dar, da es nicht die gleiche Protein- ($65-89 \text{ g l}^{-1}$)

oder Fettkonzentration bzw. -zusammensetzung wie menschliches Plasma aufweist [98]. Dennoch kann es bei der vorliegenden Fragestellung als physiologischer *in vitro* Stresstest für die Adsorptionsstabilität verwendet werden. Neben der Ionenstärke sind auch Serumproteine ein Stressfaktor für die Nanopartikel. Zunächst muss die Adsorption von Serumproteinen auf die suspendierten Nanopartikel berücksichtigt werden. Durch die Interaktion mit den Serumproteinen verkleinert sich die elektrische Doppelschicht und es kommt zur Bildung einer äußeren Schicht um die Partikel (Proteinkorona) [158,161,197,198]. Weiter wird die Suspensionsstabilität der Nanopartikel in biologischen Medien durch eine schwer zu simulierende, mögliche Quervernetzung mit biologischen Bestandteilen (z. B. Serumproteine) beeinflusst [98,161,199].

Darüber hinaus sind Proteine wie auch die SPION Kolloide, die durch elektrostatische und sterische Stabilisierungsmechanismen in Suspension gehalten werden. Serumproteine besitzen generell eine negative Nettoladung [200], die zur elektrostatischen Interaktion beiträgt. Im Plasma sind sie mit $15\text{--}25\text{ mEq l}^{-1}$ das dritt wichtigste Anion [200]. Darüber hinaus können sie in Abhängigkeit von ihrer Größe ein hohes A/V-Verhältnis aufweisen. Die Oberfläche eines Proteins kann über seine molekulare Masse berechnet werden ($A = 6,3 * M^{0,73}$) [201]. Generell gilt, dass die Oberfläche weniger schnell abnimmt als die Größe. Durch ein hohes A/V-Verhältnis weisen einzelne Proteine eine hohe Adsorptionskapazität auf und stellen potentielle kompetitive Bindungspartner für den Cargo der Nanopartikel dar. Die negative Ladung macht sie zu potenziellen Alternativbindungspartnern insbesondere für positiv geladene Wirkstoffe [202,203], wie das in der vorliegenden Studie untersuchte TDP. Am Beispiel von Albumin (580–585 Aminosäuren, isoelektrischer Punkt 5,5, Nettoladung -15 bei physiologischen pH) [204,205] lassen sich diese Zusammenhänge verdeutlichen. Albumin macht mehr als 50 % (40 g l^{-1}) der Serumproteine aus und gehört mit ca. 13 negativen Extraladungen zu den negativsten Serumproteinen [204]. Zusätzlich ist es auch eines der kleinsten Proteine im Serum (Durchmesser ca. 10 nm in globulärer Konformation) [200]. Daraus folgt, dass kleine Proteine wie Albumin ein vergleichsweise hohes A/V-Verhältnis aufweisen, wodurch sie zu kompetitiven Bindungspartnern von elektrostatisch beladenen Nanopartikeln werden. Interessanterweise zeigten frühere Publikationen, dass Ferumoxytol auch mit Molekülen mit neutraler Ladung (z. B. Doxorubicin) [207] beladen werden kann. Diese Nanopartikel erreichten erfolgreich ihr Zielgewebe [207].

In den vorliegenden Experimenten führten Serumproteine prinzipiell zu einer Desorption der TDP von den Nanopartikeln. Bei Ferumoxytol und sehr niedrig beladenen VSOP fand dieser Vorgang deutlich schneller, im Sinne eines «burst-release», statt (s. Abb. 25, 26). Die einfache

Abtrennbarkeit vom Peptid aus cIDCC-TDP:Ferumoxytol wurde die Elektrophorese-Experimente (s. Abb. 30) bestätigt, wobei der Effekt weniger stark ausgeprägt war als in den Fluoreszenzphotometrischen Experimenten (s. Abb. 25). Darüber hinaus deutet die Zunahme an Fehlmessungen mit cIDCC-TDP:Ferumoxytol in der physiologischen Pufferlösung (s. Kap. 4.2) auf eine durch die Zunahme der Ionenstärke bedingte Peptiddesorption hin – insbesondere, da die DLS-Messung der Nanopartikel in Aqua dest. (s. Kap. 4.1.2.3) zuverlässig war.

Bei einer Beladung von VSOP mit cIDCC-TDP 1:1 wurde eine instabile Beladung beobachtet. Es zu einer zeitlich progredienten Peptiddesorption im FCS (s. Abb. 26). Es ist davon auszugehen, dass die dichtere Adsorption an der VSOP-Oberfläche die Oberflächenladung lokal ändert und daher bei einer Beladung mit einem einzelnen Peptid auf der Nanopartikel möglicherweise zur Bildung eines Dipols führt. Dadurch wird das Peptid zugänglicher für Serumproteine, die deren Desorption aus der Nanopartikeloberfläche begünstigen.

Die Relaxivitätsmessungen in FCS ergaben, dass es zu einer Zunahme des Durchmessers und des Gewichtes der Nanopartikel im Serum kam (s. Abb. 23), möglicherweise als Folge der sich bildende Proteinkorona. Größere (schwerere) Nanopartikel bewegen sich langsamer, sodass lokal der Einfluss auf die umliegenden Protonen (größere magnetische Inhomogenität) steigt, was anhand der Zunahme von r_2 (transversale Relaxivität) im Serum nachweisbar ist [179].

Das komplette Plasma-Proteom beinhaltet circa 3700 Proteine [155]. Von ca. 50 Proteinen ist bekannt, dass sie mit Nanopartikeln interagieren [198]. Die Interaktion wird durch die Größe, die Ladung sowie die Oberflächengruppen der Nanopartikel beeinflusst [208]. Am häufigsten wurden Albumin, Immunglobuline vom Typ G (IgG), Fibrinogen, Komplementfaktoren (insbesondere C3) und Apolipoproteine als Proteine der Proteinkorona identifiziert [161]. Die Proteinkorona ist jedoch stetig im Wandel [193].

Die Ausprägung der Proteinkorona beeinflusst die Suspensionsstabilität der Nanopartikel. Sie kann sowohl stabilisierend als auch destabilisierend wirken [98]. Die vorliegenden Untersuchungen im Serum ergaben eine höhere Aggregationstendenz von cIDCC-TDP:VSOP im Vergleich zu Dy557-TDP:VSOP (s. Abb. 24, s. Tab. 10), bei denen Dy557 möglicherweise die Bildung einer Proteinkorona erschwert. Eine vergleichbare Tendenz wurde bei den Ferumoxytol-Nanopartikeln nicht beobachtet. Frühere Publikationen zeigten bereits, dass die mit Citrat-Ionen beschichtete SPION deutlich häufiger als SPION mit carboxylierten Polymeren mit biologischen Medien aggregieren [209].

Zusammenfassend ist die elektrostatische Beladung auf Ferumoxytol-Nanopartikel deutlich instabiler als auf VSOP in biologischen Suspensionsmedien, aber letztere bleiben weniger in Suspension und aggregieren vermehrt (s. Tab. 10).

5.3 Peptidabgabe und Internalisierung

Bei einer Verwendung von Nanopartikeln als DDS ist es für viele nicht-onkologische Indikationen erstrebenswert, dass sich die Wirkstoffe nach Erreichen des Zielgewebes ablösen und alleine ins Innere der Zielzellen gelangen. Eine Internalisierung der SPION ist in solchen Kontexten nicht wünschenswert, da sie den oxidativen Stress in den Zellen erhöhen können [210].

Eine Wirkstofffreisetzung kann in unterschiedlicher Weise erreicht werden [168]. Bei einer kovalenten Bindung der Wirkstoffe an die Nanopartikeloberfläche sind pH-abhängige hydrolytische oder Redox-Vorgänge möglich [168]. Alternativ kann die zielgewebsspezifische Expression von Enzymen genutzt werden, um den Wirkstoff im gewünschten Gewebe von den Nanopartikeln zu separieren [168].

Bei einer elektrostatischen Adsorption des Wirkstoffs mit der Nanopartikeloberfläche dissoziiert der Cargo gemäß einer von der Stärke der anziehenden Kräfte auf der Nanopartikeloberfläche abhängigen Dissoziations- oder Desorptionskonstante. Um die Rolle der anziehenden Kräfte auf der Nanopartikeloberfläche zu verdeutlichen, wurden in der vorliegenden Studie die hinsichtlich dieses Merkmals stark voneinander abweichenden SPION VSOP und Ferumoxytol ausgewählt. Wie ausgeführt, sind die Anziehungskräfte für Peptide bei VSOP deutlich stärker. Die Wirkstoffabgabe und Internalisierungspotential wurde unter Zellkulturbedingungen an humanen Muskelzellen untersucht.

Da die Zeit bis zur Internalisierung der untersuchten freien CPP nicht bekannt war, wurde der zeitliche Verlauf der Internalisierung freier Peptide und an SPION assoziierter Peptide verglichen. Darüber hinaus sollte die Effizienz der Peptidfreisetzung aus den beladenen SPION untersucht werden und erste Daten zum zeitlichen Ablauf der Internalisierung der Peptide nach Desorption aus den Partikeln gewonnen werden. Die hierfür gewählte Methode (s. Kap. 4.6) weist jedoch verschiedene Limitationen auf. 1) Es wurde lediglich die «Internalisierung» des Farbstoffes bestimmt. 2) Ein direkter Nachweis der Lokalisation der SPION erfolgte nicht. Die Durchlichtbilder erlaubten keine sichere Unterscheidung zwischen an der Membran haftenden und internalisierten SPION. 3) Bei einer Internalisierung der Nanopartikel gemeinsam mit dem Peptid verringerte das starke Quenching durch die Eisenoxid-Kerne bei VSOP das Signal der fluoreszierenden Peptide. Damit kann bei einem fehlenden Nachweis von intrazellulärem

Fluorophor-TDP:VSOP nicht ausgeschlossen werden, dass Fluorophor-TDP in den Zellen vorlag. Möglicherweise hatte nur keine Peptidfreisetzung stattgefunden. Das verwendete Suspensionsmedium (Opti-MEM + L-Glutamin) weist eine deutliche geringere Konzentration an Proteinen auf als das Blutserum auf und wurde auch nicht mit FCS supplementiert. Ein übliches Zellkulturmedium mit 10 % FCS enthält $3,0\text{--}4,5\text{ g l}^{-1}$ Protein [98]. Trat vermehrt Zelldetritus auf, wurden die Zellen vor dem Austausch des Zellmediums mit PBS kurz gespült. PBS enthält im Vergleich zu Plasma die zehnfache Konzentration an Phosphat [98], sodass das benutzte Frischmedium nach dem Waschen möglicherweise eine höhere Phosphat-Konzentration aufwies. Das mehrwertige Phosphat wirkt sich erheblich auf die Ionenstärke. Damit hatte das verwendete Suspensionsmedium zwar eine niedrigere Proteinkonzentration, aber möglicherweise eine höhere Ionenstärke.

Für die freien Peptide cIDCC-TDP (s. Abb. 32) und Dy557-TDP (s. Abb. 34) betrug die ermittelten Internalisierungszeiten ca. 20 Minuten, wobei, wie erwartet, cIDCC-TDP schneller in die Zelle gelangte. Über die internalisierte Menge lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore keine Aussagen machen.

Die Internalisierung von Dy557-TDP:Ferumoxytol war im Vergleich zu Dy557-TDP langsamer (s. Abb. 34). Dieses Phänomen wurde bei cIDCC-TDP nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich die negative Ladung des Dy557 auf die Internalisierung von TDP auswirkt. In weiterführenden Experimenten (Daten nicht gezeigt) war Dy557-TDP nach einer intramuskulären Injektion in Mäusen auch nach drei Tagen im Inneren der Muskelfasern nicht nachweisbar. Ferumoxytol-Nanopartikel können über Endozytose ins Zellinnere gelangen [207]. Dies erklärt möglicherweise die erhöhte, jedoch verzögerte, Internalisierung von Dy557-TDP:Ferumoxytol. Warum dieser Mechanismus bei der Internalisierung von cIDCC-TDP:Ferumoxytol nicht greift (längere Internalisierungszeiten als das freie Peptid), lässt sich auf den ersten Blick nicht erklären. Man könnte postulieren, dass die negative Ladung, die die Internalisierung von Dy557-TDP behindert, zur negativen Oberflächenladung von Ferumoxytol beiträgt.

Laut Wilhelm et al. [211] binden negative Ladungen von Nanopartikeln in kationischen Bereichen der Zellmembran und «clustern» diese. Die negativen Ladungen der Nanopartikel agieren simultan repulsiv auf die negativen Ladungen der Zellmembran, was zu einem Biegen der Membran führt und die Internalisierung fördert [211]. Des Weiteren führen die abstoßenden Kräfte der negativen Ladungen zur Reduktion der Ladungsdichte auf der Zelloberfläche, was

die Adsorption von weiteren Nanopartikeln begünstigt, sodass es zur Formation von Nanopartikel-«Clusters» kommt [211].

Zu den potenziellen Internalisierungsmechanismen über die Nanopartikel ins Zellinnere gelangen könnten, zählen die Pinozytose, die Endozytose (unspezifisch bzw. Rezeptor-abhängig) und die Phagozytose. Eine Phagozytose ist bei den hier untersuchten Myotuben und bei Muskelfasern im Muskelgewebe unwahrscheinlich [169].

Aggregierte Nanopartikel kommen aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichtes häufiger mit den Zellen in Kontakt. Die äußere Schicht aus Proteinen und anderen Biomolekülen interagiert mit der Zellmembran, was zur Internalisierung führen kann. Laut Safi et al. werden Citrat-beschichtete Nanopartikel möglicherweise aufgrund ihrer stärkeren Aggregationstendenz besser als Polymer-beschichtete Nanopartikel internalisiert [209,212].

Zusammenfassend (s. Tab. 10) ließ sich das Peptid intrazellulär nachweisen, wenn es alleine oder beladen auf Ferumoxytol-Nanopartikeln hinzugegeben wurde. Das beladene VSOP ließ sich hingegen intrazellulär kaum bis gar nicht nachweisen (s. Abb. 36, 37), was auf eine fehlende Peptidfreisetzung bzw. -desorption in der Zellkultur und möglicherweise im Zielgewebe zurückgeführt werden könnte.

5.4 Orientierende Pharmakokinetik

Die hier aufgeführten *in vivo* Experimente stellen nur einen Teil der im Rahmen des Tierversuchsantrags G0028/15 durchgeführten Experimente dar. Die dargestellten Versuche dienten einer ersten Orientierung in Vorbereitung auf zukünftige Experimente zur Analyse der therapeutischen Wirkung des intravenös injizierten TDP-SPION. Dazu wurde zunächst das TDP-SPION als Konstrukt und die Eignung des SPION als DDS untersucht. Für die Entwicklung einer Therapiestrategie ist es erforderlich, die TDP-SPION im Zielgewebe detektieren und eine erfolgreiche Peptidabgabe nachweisen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste orientierende pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt. Als Zeitpunkt für den histologischen Nachweis der Nanopartikel im Gewebe wurde das Vierfache der Bluthalbwertszeit (intravaskuläre Zirkulation) gewählt.

Abbildungen 45–47 zeigen die gemessenen Bluthalbwertszeiten der Nanopartikel. Da in den *in vitro* Experimenten Dy557-TDP sehr schnell aus den beladenen Ferumoxytol-Nanopartikeln freigesetzt wurde (s. Kap. 4.4 und 4.5), wurde bei diesen SPION keine Bluthalbwertszeit bestimmt.

Die gemessenen Bluthalbwertszeiten der beladenen TDP:SPION-Konstrukte waren erwartungsgemäß deutlich geringer als die der nichtmodifizierten SPION (s. Tab. 10). Betont werden sollte aber, dass die Werte für die Bluthalbwertszeit ausschließlich auf Fluoreszenzmessungen des Fluorophors im Blut beruhen. Eine Desorption vom Peptid und anschließende Zirkulation der nicht-beladenen SPION lässt sich nicht ausschließen.

Die Verkürzung der TDP:VSOP-Konstrukte war am ausgeprägten bei cIDCC-TDP:VSOP (30 vs. 4 Minuten) (s. Tab. 9). Bei Dy557-TDP:VSOP hingegen war diese Verkürzung weniger ausgeprägt (17 min vs. 30 min) (s. Tab. 9) und die Bluthalbwertszeit war sogar viermal länger als die von cIDCC-TDP:VSOP (17 Minuten vs. 4 Minuten). Diese Befunde unterstützen den aufgrund der negativen Ladungen beobachteten und postulierten positiven Einfluss von Dy557 auf die Beladung.

In den entnommenen Muskelproben konnten die Nanopartikel bzw. der Fluoreszenzfarbstoff (sowohl cIDCC als auch Dy557) trotz Analyse von Gewebeschnitten unterschiedlicher Muskeln und unterschiedlicher Schnittdicke mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht nachgewiesen werden (s. Tab. 10). Aus diesem Grund wurden lysierte Muskelproben analysiert (s. Abb. 48). Dieses Vorgehen sollte der Entscheidungsfindung dienen, ob weitere Versuchstiere in das laufende Projekt eingeschlossen werden.

Das cIDCC ließ sich fluoreszenzphotometrisch in den Gewebelysaten (100 µg Protein) nachweisen. Die Fluoreszenzintensität der Proben zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied verglichen mit der Negativkontrolle. Insgesamt war die gemessene Fluoreszenz jedoch sehr gering, so dass der Schluss, dass die Peptide *in vivo* in ausreichender Menge das Zielgewebe (die Muskelfasern) tatsächlich erreichen, nicht zulässig ist. Dies gilt insbesondere, da die therapeutische Effizienz des Peptides eher als gering eingeschätzt wird. Zudem wurden keine Versuche zum Nachweis der intravenös injizierten freien Peptide durchgeführt.

Bei Dy557-TDP wurde auf eine fluoreszenzphotometrische Analyse von Muskelgewebelysaten nach Dy557-TDP:VSOP *i.v.* verzichtet. Hierfür gab es zwei Gründe. 1) Dy557-TDP ließ sich, wie bereits oben erwähnt, in weiterführenden Experimenten (Daten nicht gezeigt) nach einer intramuskulären Injektion in Mäusen auch nach drei Tagen im Inneren der Muskelfasern nicht nachweisen. 2) Die negative Ladung von Dy557 unterscheidet Dy557-TDP maßgeblich vom therapeutisch wirksamen nicht-fluoreszierenden TAT-Dysferlin-Peptid [46]. Dieser Ladungsunterschied hat zur Folge, dass Ergebnisse aus *in vivo* Versuche mit Dy557-TDP:VSOP nicht zur funktionellen Evaluierung vom nicht-fluoreszierenden TDP:VSOP herangezogen werden können.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Kernbestreben dieser Arbeit war die Entwicklung und Analyse von SPION zum Transport von therapeutisch wirksamen CPP in Muskelzellen. Es bestätigte sich die Hypothese, dass sich SPION mit kleinen CPP basierend auf einer elektrostatischen Interaktion gut beladen lassen. Solche CPP:SPION-Konstrukte erwiesen sich aber als zu instabil für die Anwendung *in vivo*. Biologische Organismen sind komplexe Systeme mit zahlreichen Charakteristika, die eine Anwendung labiler Therapeutika erschweren. Aus diesem Grund war eine Evaluation der therapeutischen Effektivität des TDP:SPION *in vivo* nicht möglich.

Neben einer Destabilisierung der Beladung können diese Charakteristika auch die Zirkulationszeit beeinträchtigen. Laut Literatur werden ca. 95 % der Dosis von systemisch applizierten Nanomaterialien in der Leber und Milz sequestriert und erreichen nicht die Zielorgane [213–215]. Diese Einschränkungen stellen insbesondere bei Nanosystemen mit reversiblen Beladungsvorgängen und unbekannter Wirkeffizienz ein großes Problem dar. Auch eine vorzeitige Wirkstoffabgabe kann einen erfolgreichen Transport des Wirkstoffes zum Zielgewebe (teilweise) verhindern. Geringe Wirkstoffmengen reichen dann bei einer insgesamt geringen spezifischen Wirksamkeit des Wirkstoffes möglicherweise nicht aus.

Diese Arbeit beinhaltet orientierende Versuche für zukünftige Experimente, da Eisenoxid-Nanopartikel und CPP weiterhin interessante Komponenten im Kontext von DDS darstellen.

Elektrostatische Beladungsansätze führen zwar zu empfindlichen Konstrukten, zeichnen sich aber durch ihre unkomplizierte Herstellung und Cargo-Freisetzung aus. Laut Literatur, der vorliegenden Ergebnisse sowie der Kolloid-Theorien sind insbesondere Polymerhüllen-Nanopartikel ideale Nanopartikel-Kandidaten. Für eine stabilere Beladung wären Modifikationen der CPP vorstellbar, die die elektrostatische Interaktion mit der Hülle verbessern und diese vor einer vorzeitigen Freisetzung schützen. Relevant wäre aber, dass diese Modifikationen den transzellulären Transport des Peptides nicht verhindern. Ein Beispiel für ein erfolgreiches DDS auf der Basis einer elektrostatische Beladung ist Ferumoxytol mit Doxorubicin [207].

Darüber hinaus spielt das zu therapierende Gewebe eine Schlüsselrolle für die Effizienz der Therapie. Die Wand der versorgenden Gefäße des Zielgewebes stellt eine erhebliche Barriere für die Anreicherung dar. Erkrankungen mit erhöhter Permeabilität der Gefäßwand eignen sich daher besonders, da sich dadurch die Wirkstofflieferung durch das DDS ins Zielgewebe verbessert. Beispiele hierfür sind Therapieansätze bei soliden Tumoren und Entzündungsvorgängen, die sich durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität auszeichnen [216]. Im Vergleich hierzu

weist die Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur eine deutlich niedrigere Gefäßpermeabilität auf [217,218].

Ist das DDS in der Lage, den Wirkstoff ins Zielgewebe zu transportieren, kann bei magnetischen Nanopartikeln durch magnetic drug delivery die Anreicherung verstärkt werden. Dazu müssen die einwirkenden magnetischen Kräfte stark genug sein, um die hydrodynamischen Kräfte im zirkulierenden Blut zu überwinden. Ferner kann es zur Kettenbildung («chaining») der durch das Feld zirkulierenden Nanopartikeln kommen [219].

Insgesamt ist das DDS basierend auf Eisenoxid-Nanopartikeln ein interessanter Ansatz mit hohem Potenzial aber auch zahlreichen Herausforderungen. Die derzeit auf dem Markt erhältlichen, auf Nanopartikeln basierenden Wirkstoffe lassen die Prognose zu, dass vermutlich in Zukunft auch Eisenoxid-Nanopartikeln als DSS im klinischen Kontext verwendet werden.

Literaturverzeichnis

1. Khosla N, Valdez R. A compilation of national plans, policies and government actions for rare diseases in 23 countries. *Intractable Rare Dis Res.* 2018;7(4):213–22.
2. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, Hughes DA. Rare disease terminology and definitions-A systematic global review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Heal.* 2015;18(6):906–14.
3. de Vruet R, Baekelandt ERF, de Haan JMH. Update on 2004 Background Paper 6.19. Rare diseases. [Internet]. 2013. [cited 2019 Sep 30] Available from: https://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_19Rare.pdf
4. Baranczak A, Kelly JW. A current pharmacologic agent versus the promise of next generation therapeutics to ameliorate protein misfolding and/or aggregation diseases. *Curr Opin Chem Biol.* 2016;32:10–21.
5. Denny RA, Gavrin LK, Saiah E. Recent developments in targeting protein misfolding diseases. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2013;23(7):1935–44.
6. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Reports.* 2012;64:1020–37.
7. Hafner A, Lovrić J, Lakoš GP, Pepić I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:1005–23.
8. Mendell J, Goemans N, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Lowes L, Alfano L, Berry K, Peterson E, Lewis S, Shontz K, Shao J, Duda P, Donoghue C, Schnell F, Dworzak J, Wentworth B, Kaye E, Mercuri E, Italian Network DMD. Eteplirsen, a Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer (PMO) for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): Clinical update and longitudinal comparison to external controls on Six-Minute Walk Test (6MWT) (S28.001). *Neurology.* 2016;86(16 Supplement):S28.001.
9. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release.* 2012;166(2):182–94.
10. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira E de S, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K. A gene related to *Caenorhabditis elegans*

- spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 1998;20(1):37–42.
11. Aoki M. Dysferlinopathy [Internet]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al. eds. GeneReviews®. 1993 [cited 2017 Dec 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301480>
 12. Mahjneh I, Passos-Bueno M-R, Zatz M, Vainzof M, Marconi G, Nashef L, Bashir R, Bushby K. The phenotype of chromosome 2p-linked limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1996;6(6):483–90.
 13. Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain.* 1986;109 (Pt 1):31–54.
 14. Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, Charlton R, Roberts M, Straub V, Barresi R, Lochmüller H, Bushby K. New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010; 81(9):946–53.
 15. Paradas C, González-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, García-Consuegra I, Gómez H, Cabello A, Illa I, Gallano P. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord.* 2009;19(1):21–5.
 16. Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-García R, De Luna N, Iturriaga C, Márquez C, Usón M, Hankiewicz K, Gallardo E, Illa I. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology.* 2010;75(4):316–23.
 17. Linssen WH, Notermans NC, Van der Graaf Y, Wokke JH, Van Doorn PA, Höweler CJ, Busch HF, De Jager AE, De Visser M. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain.* 1997;120 (Pt 11):1989–96.
 18. Woudt L, Di Capua GA, Krahn M, Castiglioni C, Hughes R, Campero M, Trangulao A, González-Hormazábal P, Godoy-Herrera R, Lévy N, Urtizberea JA, Jara L, Bevilacqua JA. Toward an objective measure of functional disability in dysferlinopathy. *Muscle Nerve.* 2016;53(1):49–57.
 19. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforêt P, Labelle V, Urtizberea JA, Figarella-Branger D, Romero N, Attarian S, Leturcq F, Pouget J, Lévy N, Eymard B. Phenotypic study in 40 patients with Dysferlin gene mutations. *Arch Neurol.*

2007;64(8):1176.

20. Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Ito M, Abe-Kondo E, Shimakura N, Ibi T, Kuru S, Wakayama T, Sobue G, Fujii N, Saito T, Matsumura T, Funakawa I, Mukai E, Kawanami T, Morita M, Yamazaki M, Hasegawa T, Shimizu J, Tsuji S, Kuzuhara S, Tanaka H, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Itoyama Y. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(4):433–40.
21. Choi J-H, Park Y-E, Kim S-I, Kim J-I, Lee C-H, Park K-H, Kim D-S. Differential Immunohistological features of inflammatory myopathies and Dysferlinopathy. *J Korean Med Sci*. 2009;24(6):1015.
22. Choi ER, Park S-J, Choe YH, Ryu DR, Chang S-A, Choi J-O, Lee S-C, Park SW, Kim BJ, Kim D-K, Oh JK. Early detection of cardiac involvement in Miyoshi myopathy: 2D strain echocardiography and late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2010;12(1):31.
23. Han R, Bansal D, Miyake K, Muniz VP, Weiss RM, McNeil PL, Campbell KP. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1805–13.
24. Bashlr R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KMD. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet*. 1994;3(3):455–7.
25. Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. MUSCULAR DYSTROPHY, LIMB-GIRDLE, TYPE 2B. MIM Number: 253601. [cited 2019 Sep 30]. Available from: <https://www.omim.org/entry/253601?search=253601&highlight=253601>
26. Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. Johns Hopkins University, Baltimore M. MIYOSHI MUSCULAR DYSTROPHY 1. MIM Number: 254130. [cited 2019 Sep 30]. Available from: <https://www.omim.org/entry/254130?search=254130&highlight=254130>
27. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida M Ben, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular

- dystrophy. *Nat Genet.* 1998;20(1):31–6.
28. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol.* 2001;49(1):130–4.
 29. Weiler T, Bashir R, Anderson L V, Davison K, Moss JA, Britton S, Nylén E, Keers S, Vafiadaki E, Greenberg CR, Bushby CR, Wrogemann K. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):871–7.
 30. Weiler T, Greenberg CR, Nylén E, Halliday W, Morgan K, Eggertson D, Wrogemann K. Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet.* 1996;59(4):872–8.
 31. Ueyama H, Kumamoto T, Horinouchi H, Fujimoto S, Aono H, Tsuda T. Clinical heterogeneity in dysferlinopathy. *Intern Med.* 2002;41(7):532–6.
 32. Anderson L V, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougerousse F, Beckmann JS, Bushby KM. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):855–61.
 33. Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology.* 1999;53(5):1119–22.
 34. Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KM. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet.* 1994;3(3):455–7.
 35. Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, Oeltjen J, Brown HE, Marchand S, Bourg N, Beley C, McKenna-Yasek D, Arahata K, Bohlega S, Cupler E, Illa I, Mahjneh I, Barohn RJ, Urtizberea JA, Fardeau M, Amato A, Angelini C, Bushby K, Beckmann JS, Brown RH. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology.* 2001;57(2):271–8.
 36. Pramono ZA, Lai PS, Tan CL, Takeda S, Yee WC. Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1. *Hum Genet.* 2006;120(3):410–9.

37. Pramono ZA, Tan CL, Seah IAL, See JSL, Kam SY, Lai PS, Yee WC. Identification and characterisation of human dysferlin transcript variants: implications for dysferlin mutational screening and isoforms. *Hum Genet.* 2009;125(4):413–20.
38. Galvin JE, Palamand D, Strider J, Milone M, Pestronk A. The muscle protein dysferlin accumulates in the Alzheimer brain. *Acta Neuropathol.* 2006;112(6):665–71.
39. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, Korosec T, Kutzelnigg A, Berger JJ, Bradl M, Bittner RE, Lassmann H. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(9):855–65.
40. Wenzel K, Geier C, Qadri F, Hubner N, Schulz H, Erdmann B, Gross V, Bauer D, Dechend R, Dietz R, Osterziel KJ, Spuler S, Özcelik C. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med.* 2007;85(11):1203–14.
41. Wei B, Wei H, Jin J-P. Dysferlin deficiency blunts β -adrenergic-dependent lusitropic function of mouse heart. *J Physiol.* 2015;593(23):5127–44.
42. Wang C, Wong J, Fung G, Shi J, Deng H, Zhang J, Bernatchez P, Luo H. Dysferlin deficiency confers increased susceptibility to coxsackievirus-induced cardiomyopathy. *Cell Microbiol.* 2015;17(10):1423–30.
43. Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 2004;14(4):206–13.
44. Rizo J, Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} -binding domain. *J Biol Chem.* 1998;273(26):15879–82.
45. Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, Bourg N, Krahn M, Pryadkina M, Borel P, Suel L, Roche JA, Stockholm D, Bloch RJ, Levy N, Bashir R, Richard I. Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in Dysferlinopathy. McNeil P, editor. *PLoS One.* 2012;7(5):e38036.
46. Schoewel V, Marg A, Kunz S, Overkamp T, Siegert Carrazedo R, Zacharias U, Daniel PT, Spuler S. Dysferlin-Peptides reallocate mutated Dysferlin thereby restoring function. *PLoS One.* 2012;7(11):e49603.
47. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen C-C, Williamson R, McNeil PL, Campbell

- KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*. 2003;423(6936):168–72.
48. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50466–73.
49. Klinge L, Laval S, Keers S, Haldane F, Straub V, Barresi R, Bushby K. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J*. 2007;21(8):1768–76.
50. Chrobáková T, Hermanová M, Kroupová I, Vondráček P, Maríková T, Mazanec R, Zámecník J, Stanek J, Havlová M, Fajkusová L. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(10):659–65.
51. Vainzof M, Anderson LVB, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Vallw G, Moreira ES, Pavanello RCM, Passos-Bueno MR, Zatz M. Dysferlin Protein Analysis in Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *J Mol Neurosci*. 2001;17(1):71–80.
52. Anderson L V, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KM. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord*. 2000;10(8):553–9.
53. Lek A, Evesson FJ, Lemckert FA, Redpath GMI, Lueders A-K, Turnbull L, Whitchurch CB, North KN, Cooper ST. Calpains, Cleaved Mini-DysferlinC72, and L-Type channels underpin calcium-dependent Muscle Membrane Repair. *J Neurosci*. 2013;33(12):5085–94.
54. Azakir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Sinnreich M. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 2010;5(4):e10122.
55. Wenzel K, Carl M, Perrot A, Zabojszcza J, Assadi M, Ebeling M, Geier C, Robinson PN, Kress W, Osterziel K-J, Spuler S. Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. *Hum Mutat*. 2006;27(6):599–600.
56. Krahn M, Bérout C, Labelle V, Nguyen K, Bernard R, Bassez G, Figarella-Branger D,

- Fernandez C, Bouvenot J, Richard I, Ollagnon-Roman E, Bevilacqua JA, Salvo E, Attarian S, Chapon F, Pellissier J-F, Pouget J, Hammouda EH, Laforêt P, Urtizberea JA, Eymard B, Leturcq F, Lévy N. Analysis of the *DYSF* mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E345–75.
57. Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet.* 2007;16(6):618–29.
58. Spuler S, Carl M, Zabojszcza J, Straub V, Bushby K, Moore SA, Bähring S, Wenzel K, Vinkemeier U, Rocken C. Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol.* 2008;63(3):323–8.
59. Blandin G, Bérout C, Labelle V, Nguyen K, Wein N, Hamroun D, Williams B, Monnier N, Rufibach LE, Urtizberea JA. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Hum Mutat.* 2012;33(3).
60. Rayavarapu S, Van der Meulen JH, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Nagaraju K, Knobloch SM. Characterization of dysferlin deficient SJL/J mice to assess preclinical drug efficacy: fasudil exacerbates muscle disease phenotype. Feany MB, editor. *PLoS One.* 2010;5(9):e12981.
61. Lerario A, Cogiமானian F, Marchesi C, Belicchi M, Bresolin N, Porretti L, Torrente Y. Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11(1):157.
62. Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Mol Ther.* 2010;18(1):80–6.
63. Sondergaard PC, Griffin DA, Pozsgai ER, Johnson RW, Grose WE, Heller KN, Shontz KM, Montgomery CL, Liu J, Clark KR, Sahenk Z, Mendell JR, Rodino-Klapac LR. AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(3):256–70.
64. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017;31(4):317–34.
65. Aartsma-Rus A, den Dunnen JT, van Ommen G-JB. New insights in gene-derived

- therapy: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214(1):199–212.
66. Barthélémy F, Blouin C, Wein N, Mouly V, Courrier S, Dionnet E, Kergourlay V, Mathieu Y, Garcia L, Butler-Browne G, Lamaze C, Lévy N, Krahn M, Bartoli M. Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells. *J Neuromuscul Dis.* 2015;2(3):281–90.
 67. Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, Laforêt P, Behin A, Butler-Browne G, Mouly V, Krahn M, Garcia L, Lévy N. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum Mutat.* 2010;31(2):136–42.
 68. Philippi S, Lorain S, Beley C, Peccate C, Précigout G, Spuler S, Garcia L. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Hum Mol Genet.* 2015;24(14):4049–60.
 69. van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of Blood-Brain Barrier Crossing of Drugs Using Molecular Size and Shape, and H-Bonding Descriptors. *J Drug Target.* 1998;6(2):151–65.
 70. Poon GMK, Gariépy J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(4):788–93.
 71. Brock R. The Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Putting the Puzzle Together. *Bioconjug Chem.* 2014;25(5):863–8.
 72. Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic.* 2007;8(7):848–66.
 73. Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA, Wender PA. Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *J Am Chem Soc.* 2004;126(31):9506–7.
 74. Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(4):406–24.
 75. Aints A, Dilber MS, Smith CIE. Intercellular spread of GFP-VP22. *J Gene Med.* 1999;1(4):275–9.
 76. Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell

- internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem.* 1996;271(30):18188–93.
77. Rothbard JB, Garlington S, Lin Q, Kirschberg T, Kreider E, McGrane PL, Wender PA, Khavari PA. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med.* 2000;6(11):1253–7.
 78. Stanzl EG, Trantow BM, Vargas JR, Wender PA. Fifteen Years of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, and Clinical Applications. *Acc Chem Res.* 2013;46(12):2944–54.
 79. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988;55(6):1189–93.
 80. 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(25):16010–7.
 81. Choi SY, Choi EY, Han K, Park J, Kim K-A, Bahn JH, Kwon HY, Lee HJ, Ryu J, Lee KS. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J Gen Virol.* 2002;83(5):1173–81.
 82. Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res.* 2000;56(5):318–25.
 83. Futaki S, Nakase I. Cell-Surface Interactions on Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Allow for Multiplex Modes of Internalization. *Acc Chem Res.* 2017;50(10):2449–56.
 84. Moulton HM, Moulton JD. Morpholinos and their peptide conjugates: Therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2010;1798(12):2296–303.
 85. Wu B, Lu P, Cloer C, Shaban M, Grewal S, Milazi S, Shah SN, Moulton HM, Lu QL. Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino. *Am J Pathol.* 2012;181(2):392–400.
 86. Bates E, Bode C, Costa M, Gibson CM, Granger C, Green C, Grimes K, Harrington R, Huber K, Kleiman N, Mochly-Rosen D, Roe MT, Sadowski Z, Solomon S, Widimsky

- P. Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117(7):886–96.
87. Moulton HM, Moulton JD. Morpholinos and their peptide conjugates: Therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2010;1798(12):2296–303.
 88. Lakowicz JR. Introduction to Fluorescence. In: Lakowicz JR, editor. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 1–26.
 89. Sekar RB, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*. 2003;160(5):629–33.
 90. Vogel SS, Thaler C, Koushik S V. Fanciful FRET. *Sci STKE*. 2006;2006(331):re2.
 91. Waters JC. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol*. 2009;185(7):1135–48.
 92. Plewes DB, Kucharczyk W. Physics of MRI: A primer. *J Magn Reson Imaging*. 2012;35(5):1038–54.
 93. Westbrook C, Roth CK, Talbot J. *MRI in Practice*. Hoboken (NJ): Wiley & Sons; 2011.
 94. Rosen BR, Brady TJ. Principles of nuclear magnetic resonance for medical application. *Semin Nucl Med*. 1983;13(4):308–18.
 95. Chavhan B, Babyn PS, Thomas B, Shroff MM, Haacke EM. Principles, techniques, and applications of T2*-based MR imaging and its special applications. *Radiographics*. 2009;29(5):1433-49.
 96. Shi J. [Internet] Steric Stabilization. 2002 [cited 2019 Sep 30]. Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/0455/bb654b4d4cc40803ea39d48815a5dfa50035.pdf?_ga=2.110040069.1436732320.1569746798-1707116219.1560938268
 97. Worthen AJ, Tran V, Cornell KA, Truskett TM, Johnston KP. Steric stabilization of nanoparticles with grafted low molecular weight ligands in highly concentrated brines including divalent ions. *Soft Matter*. 2016;12(7):2025–39.
 98. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, Rothen-Rutishauser B, Lattuada M, Petri-Fink A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem Soc Rev*. 2015;44(17):6287–305.

99. Ott LS, Finke RG. Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis: A critical review of ranking methods and putative stabilizers. *Coord Chem Rev.* 2007;251(9–10):1075–100.
100. Lyklema J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Vol. I: Fundamentals.* London: Academic Press; 1991.
101. Hunter RJ. *Foundations of Colloid Science. Vol. I and II.* Oxford: Clarendon; 1987.
102. Saini S, Frankel RB, Stark DD, Ferrucci JT. Magnetism: a primer and review. *AJR Am J Roentgenol.* 1988;150(4):735–43.
103. Bhandari S, Pereira D, Chappell H, Drakesmith H. *Intravenous Irons: From Basic Science to Clinical Practice. Pharmaceuticals.* 2018;11(3):82.
104. Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;209:8–39.
105. Derjaguin, B. and Landau LD. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Phys Chim.* 1941;(14):633–62.
106. Verwey EJW, Overbeek JTG. *Theory of Stability of Lyophobic Colloids.* Amsterdam: Elsevier; 1948.
107. Morrison ID, Ross S. *Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams.* Hoboken (NJ): Wiley-Interscience; 2002.
108. Attard P. Recent advances in the electric double layer in colloid science. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2001;6(4):366–71.
109. Mjones1984; Larryisgood [Internet] Diagram of zeta potential and slipping planeV2 - File:Zeta Potential for a particle in dispersion medium.png - Wikipedia [Internet]. Creative Commons BY-SA 3.0. 2012 [cited 2019 Sep 30]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Zeta_Potential_for_a_particle_in_dispersion_medium.png#/media/File:Diagram_of_zeta_potential_and_slipping_planeV2.svg
110. Remington JP. *The science and practice of pharmacy.* 21st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
111. Israelachvili JN, Israelachvili JN. Electrostatic Forces between Surfaces in Liquids. *Intermol Surf Forces.* 2011;291–340.

112. Li D. *Electrokinetics in microfluidics*. Amsterdam: Elsevier; 2004.
113. Barz DPJ, Ehrhard P. Model and verification of electrokinetic flow and transport in a micro-electrophoresis device. *Lab Chip*. 2005;5(9):949.
114. Grahame DC. The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity. *Chem Rev* [Internet]. 1947 Dec [cited 2019 Jan 30];41(3):441–501. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr60130a002>
115. Hunter RJ. *Zeta potential in colloid science : principles and applications*. 386 p.
116. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm*. 2013;10(6):2093–110.
117. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanoparticle Res*. 2009;11(1):77–89.
118. Figge L, Appler F, Chen HH, Sosnovik DE, Schnorr J, Seitz O, Taupitz M, Hamm B, Schellenberger E. Direct coupling of annexin A5 to VSOP yields small, protein-covered nanoprobe for MR imaging of apoptosis. *Contrast Media Mol Imaging*. 2014;9(4):291–9.
119. Scharlach C. *Synthese verschiedener elektrostatisch stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel und Vergleich der Eignung für die zielgerichtete MR-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques*. Charité Berlin; 2014.
120. Scharlach C, Warmuth C, Schellenberger E. Determination of blood circulation times of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by T2* relaxometry using ultrashort echo time (UTE) MRI. *Magn Reson Imaging*. 2015;33(9):1173–7.
121. Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Kravec I, Pilgrimm H, Bergmann-Fritsch H, Hamm B. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2004;39(7):394–405.
122. Corot C, Petry K, Trivedi R, Saleh A, Jonkmanns C, Le Bas J, Blezer E, Rausch M, Brochet B, Foster-Gareau P, Balériaux D, Gaillard S, Dousset V. Macrophage Imaging in Central Nervous System and in Carotid Atherosclerotic Plaque Using Ultrasmall

- Superparamagnetic Iron Oxide in Magnetic Resonance Imaging. *Invest Radiol.* 2004;39(10):619–25.
123. Cho H, Alcantara D, Yuan H, Sheth RA, Chen HH, Huang P, Anderson SB, Sosnovik DE, Mahmood U, Josephson L. Fluorochrome-Functionalized Nanoparticles for Imaging DNA in Biological Systems. *ACS Nano.* 2013;7(3):2032–2041.
 124. Chen B, Li Y, Zhang X, Liu F, Liu Y, Ji M, Xiong F, Gu N. An efficient synthesis of ferumoxytol induced by alternating-current magnetic field. *Mater Lett.* 2016;170:93–6.
 125. Lu M, Cohen MH, Rieves D, Pazdur R. FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease. *Am J Hematol.* 2010;85:315–9.
 126. Chen, S. Polymer-coated iron oxide nanoparticles for medical imaging [dissertation]. MIT; 2010.
 127. Balakrishnan VS, Rao M, Kausz a. T, Brenner L, Pereira BJB, Frigo TB, Lewis JM. Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:489–96.
 128. Bullivant JP, Zhao S, Willenberg BJ, Kozissnik B, Batich CD, Dobson J. Materials characterization of feraheme/ferumoxytol and preliminary evaluation of its potential for magnetic fluid hyperthermia. *Int J Mol Sci.* 2013;14:17501–10.
 129. Gharagouzloo CA, McMahon PN, Sridhar S. Quantitative contrast-enhanced MRI with superparamagnetic nanoparticles using ultrashort time-to-echo pulse sequences. *Magn Reson Med.* 2015;74(2):431–41.
 130. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Rienso : EPAR - Public assessment report. EMA/CHMP/221776/2012 First published: 06/07/2012. Last updated: 13/07/2015.
 131. Doyle KP, Quach LN, Arceuil HE, Buckwalter MS. Ferumoxytol administration does not alter infarct volume or the inflammatory response to stroke in mice. *Neurosci Lett.* 2015;584:236-40.
 132. Anzai Y, Piccoli CW, Outwater EK, Stanford W, Bluemke DA, Nurenberg P, Saini S, Maravilla KR, Feldman DE, Schmiedl UP, Brunberg JA, Francis IR, Harms SE, Som PM, Tempany CM. Evaluation of Neck and Body Metastases to Nodes with Ferumoxtran 10-enhanced MR Imaging: Phase III Safety and Efficacy Study. *Radiology.*

- 2003;228(3):777–88.
133. Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, White DL, Jacobs P, et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol.* 1989;152:167–73.
 134. Bourrinet P, Bengele HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee J-M, Jacobs PM, et al. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol.* 2006;41(3):313–24.
 135. Ittrich H, Peldschus K, Raabe N, Kaul M, Adam G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: Applications and developments in diagnostics and therapy. *RoFo* 2013;185:1149–66.
 136. Feng Q, Liu Y, Huang J, Chen K, Huang J, Xiao K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–13.
 137. Laurent S, Bridot J-L, Elst L Vander, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Future Med Chem.* 2010;2(3):427–49.
 138. Wang Y-XJ, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 2001;11(11):2319–31.
 139. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015;44(23):8576–607.
 140. Smolensky ED, Park H-YE, Zhou Y, Rolla GA, Marjańska M, Botta M, Pierre VC. Scaling Laws at the Nano Size: The Effect of Particle Size and Shape on the Magnetism and Relaxivity of Iron Oxide Nanoparticle Contrast Agents. *J Mater Chem B.* 2013;1(22):2818–28.
 141. A.. Roch, Y. Gossuin, R.N. Muller PG. Superparamagnetic colloid suspensions: water magnetic relaxation and clustering. *J Magn Magn Mater.* 2005;293(8):532–539.
 142. Gillis P, Moyny F, Brooks RA. On T2-shortening by strongly magnetized spheres: A partial refocusing model. *Magn Reson Med.* 2002;47(2):257–63.

143. Bulte JWM, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004;17(7):484–99.
144. Haacke EM, Xu Y, Cheng Y-CN, Reichenbach JR. Susceptibility weighted imaging (SWI). *Magn Reson Med.* 2004;52(3):612–8.
145. Haacke EM, Mittal S, Wu Z, Neelavalli J, Cheng Y-CN. Susceptibility-Weighted Imaging: Technical Aspects and Clinical Applications, Part 1. *Am J Neuroradiol.* 2009 Jan 1;30(1):19–30.
146. Mittal S, Wu Z, Neelavalli J, Haacke EM. Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 2. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(2):232–52.
147. Ariza de Schellenberger A, Kratz H, Farr T, Loewa N, Hauptmann R, Wagner S, Taupitz M, Schnorr J, Schellenberger E. Labeling of mesenchymal stem cells for MRI with single-cell sensitivity. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:1517.
148. Lindquist RL, Papazoglou S, Scharlach C, Waiczies H, Schnorr J, Taupitz M, Hamm B, Schellenberger E. Imaging of Magnetic Microfield Distortions Allows Sensitive Single-Cell Detection. *Mol Imaging.* 12(2):83–9.
149. Scharlach C, Kratz H, Wiekhorst F, Warmuth C, Schnorr J, Genter G, Ebert M, Mueller S, Schellenberger E. Synthesis of acid-stabilized iron oxide nanoparticles and comparison for targeting atherosclerotic plaques: Evaluation by MRI, quantitative MPS, and TEM alternative to ambiguous Prussian blue iron staining. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2015;1–11.
150. Dahnke H, Liu W, Herzka D, Frank JA, Schaeffter T. Susceptibility gradient mapping (SGM): a new postprocessing method for positive contrast generation applied to superparamagnetic iron oxide particle (SPIO)-labeled cells. *Magn Reson Med.* 2008;60(3):595–603.
151. Zhao Q, Langley J, Lee S, Liu W. Positive contrast technique for the detection and quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in MRI. *NMR Biomed.* 2011;24(5):464–72.
152. Schenck JF. The role of magnetic susceptibility in magnetic resonance imaging: MRI magnetic compatibility of the first and second kinds. *Med Phys.* 1996;23(6):815–50.
153. Haacke EM, Ayaz M, Khan A, Manova ES, Krishnamurthy B, Gollapalli L, Ciulla C,

- Kim I, Petersen F, Kirsch W. Establishing a baseline phase behavior in magnetic resonance imaging to determine normal vs. abnormal iron content in the brain. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26(2):256–64.
154. Kiessling F, Mertens ME, Grimm J, Lammers T. Nanoparticles for imaging: top or flop? *Radiology*. 2014;273(1):10–28.
155. Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggård T, Donnelly SC, Cagney G, et al. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chemie Int Ed Engl*. 2007;46(30):5754–6.
156. Röcker C, Pötzl M, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(9):577–80.
157. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov A V. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*. 2010;145(3):182–95.
158. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(6):428–37.
159. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93–102.
160. Lemarchand C, Gref R, Passirani C, Garcion E, Petri B, Müller R, Costantini D, Couvreur P. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. *Biomaterials*. 2006;27(1):108–18.
161. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, Schlenk F, Fischer D, Kiouptsi K, Reinhardt C, Landfester K, Schild H, Maskos M, Knauer SK, Stauber RH. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):772–81.
162. Klein J. Probing the interactions of proteins and nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2029–30.
163. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2007;104(7):2050–5.
164. Babaei M, Eshghi H, Abnous K, Rahimizadeh M, Ramezani M. Promising gene delivery system based on polyethylenimine-modified silica nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 2017;24(4):156-164.
 165. Bonnemain B. Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A Review. *J Drug Target.* 1998;6(3):167–74.
 166. Funk F, Ryle P, Canclini C, Neiser S, Geisser P. The new generation of intravenous iron: chemistry, pharmacology, and toxicology of ferric carboxymaltose. *Arzneimittelforschung.* 2010;60:345–53.
 167. Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:3445–71.
 168. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):813–27.
 169. Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, Nothelfer K, Walther P, Frank H, Landfester K, Schrezenmeier H, Mailänder V. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials.* 2006;27(14):2820–8.
 170. Dawson KA, Salvati A, Lynch I. Nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnol.* 2009;4(2):84–5.
 171. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004;377(Pt 1):159–69.
 172. Wang B, Zhang L, Bae SC, Granick S. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18171–5.
 173. C. CP, Yi T, Katsuyuki T, A. TD, H. AF. Global incorporation of norleucine in place of methionine in cytochrome P450 BM-3 heme domain increases peroxygenase activity. *Biotechnol Bioeng.* 2003;83(6):729–34.
 174. Radchenko DS, Kattge S, Kara S, Ulrich AS, Afonin S. Does a methionine-to-norleucine substitution in PGLa influence peptide-membrane interactions? *Biochim Biophys Acta*

- *Biomembr.* 2016;1858(9):2019–27.
175. Pilgrimm H. Superparamagnetische Teilchen mit vergrößerter R1-Relaxivität, Verfahren zur Herstellung und deren Verwendung. Patent WO1997035200A1. 1997.
 176. Berne BJ, Pecora R. *Dynamic light scattering. With applications to chemistry, biology, and physics.* Mineola (NY): Dover Publications; 2013.
 177. Pustovit VN, Shahbazyan TV. Fluorescence quenching near small metal nanoparticles. *J Chem Phys.* 2012; 136(20):1–7.
 178. Balog S, Rodriguez-Lorenzo L, Monnier CA, Obiols-Rabasa M, Rothen-Rutishauser B, Schurtenberger P, Petri-Fink A. Characterizing nanoparticles in complex biological media and physiological fluids with depolarized dynamic light scattering. *Nanoscale.* 2015;7(14):5991–7.
 179. Joos A, Löwa N, Wiekhorst F, Gleich B, Haase A. Size-dependent MR relaxivities of magnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2017;427:122–6.
 180. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. *Wie funktioniert MRI? eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung.* Berlin: Springer-Verlag; 2009.
 181. Morneburg M. *Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik : Röntgendiagnostik und Angiographie, Computertomographie, Nuklearmedizin, Magnetresonanztomographie, Sonographie, integrierte Informationssysteme.* Erlangen: Publicis MCD Verlag; 1995.
 182. Ghugre NR, Doyle EK, Storey P, Wood JC. Relaxivity-iron calibration in hepatic iron overload: Predictions of a Monte Carlo model. *Magn Reson Med.* 2015;74(3):879–83.
 183. Doane TL, Cheng Y, Babar A, Hill RJ, Burda C. Electrophoretic Mobilities of PEGylated Gold NPs. *J Am Chem Soc.* 2010;132(44):15624–31.
 184. Malcher J, Heidt L, Goyenvalle A, Escobar H, Marg A, Beley C, Benchaouir R, Bader M, Spuler S, García L, Schöwel V. Exon Skipping in a Dysf-Missense Mutant Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;13:198–207.
 185. Ragelle H, Danhier F, Pr eat V, Langer R, Anderson DG. Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(7):851–64.
 186. Hamill RJ. *Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and*

- Toxicity. *Drugs*. 2013;73(9):919–34.
187. Estelrich J, Escribano E, Queralt J, Busquets M, Estelrich J, Escribano E, Queralt J, Busquets MA. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):8070–101.
 188. Mathieu J-B, Martel S. Steering of aggregating magnetic microparticles using propulsion gradients coils in an MRI Scanner. *Magn Reson Med*. 2010;63(5):1336–45.
 189. Pouponneau P, Leroux J-C, Martel S. Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization. *Biomaterials*. 2009;30(31):6327–32.
 190. Grob D, Stein P. Magnetism in Medicine. *IEEE Trans Magn*. 1972;8(3):413.
 191. Lubbe AS, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrinann F, Gurtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke A, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D. Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Res*. 1996;56:4686–93.
 192. Wilson MW, Kerlan RK, Fidelman NA, Venook AP, LaBerge JM, Koda J, Gordon RL. Hepatocellular Carcinoma: Regional Therapy with a Magnetic Targeted Carrier Bound to Doxorubicin in a Dual MR Imaging/ Conventional Angiography Suite—Initial Experience with Four Patients. *Radiology*. 2004;230(1):287–93.
 193. Van den Oetelaar PJM, Mentink IM, Brinks GJ. Loss of Peptides and Proteins Upon Sterile Filtration Due to Adsorption to Membrane Filters. *Drug Dev Ind Pharm*. 1989;15(1):97–106.
 194. Pillai SA, Chobisa D, Urimi D, Ravindra N. Filters and Filtration: A Review of Mechanisms That Impact Cost, Product Quality and Patient Safety. *J Pharm Sci & Res*. 2016;8(5):271–8.
 195. Jackson KA, Snyder DS, Goodell MA. Skeletal Muscle Fiber-Specific Green Autofluorescence: Potential for Stem Cell Engraftment Artifacts. *Stem Cells*. 2004;22(2):180–7.
 196. Lauth GJ, Kowalczyk J. Stabilität von Suspensionen. In: Laut GJ, Kowalczyk J, eds. *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. Berlin,

- Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 285–330.
197. Laurent S, Saei AA, Behzadi S, Panahifar A, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11:1–22.
 198. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, Elia G, Dawson K. The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *ACS Nano.* 2011;5(9):7503–9.
 199. Gunnarsson SB, Bernfur K, Mikkelsen A, Cedervall T. Analysis of nanoparticle biomolecule complexes. *Nanoscale.* 2018;10(9):4246–57.
 200. Rü L, Hansell P, Wolgast M, Rügheimer L. Determination of the charge of the plasma proteins and consequent Donnan equilibrium across the capillary barriers in the rat microvasculature. *Authors J Compil Ó.* 2008;194:335–9.
 201. Miller S, Janin J, Lesk AM, Chothia C. Interior and surface of monomeric proteins. *J Mol Biol.* 1987;196(3):641–56.
 202. Sivertsen A, Isaksson J, Leiros H-KS, Svenson J, Svendsen J-S, Brandsdal B. Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin. *BMC Struct Biol.* 2014;14(1):4.
 203. Elsadek B, Kratz F. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon. *J Control Release.* 2012;157(1):4–28.
 204. Bert JL, Pearce RH, Renkin EM, Michel CC. The interstitium and microvascular exchange. In: Renkin EM, Michel CC, eds. *Handbook of Physiology, Section 2: the Cardiovascular System, Volume IV: Microcirculation Part 1.* American Physiological Society; 1984; p. 521.
 205. Gekle M. Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol.* 2005;67(1):573–94.
 206. Baler K, Martin OA, Carignano MA, Ameer GA, Vila JA, Szleifer I. Electrostatic unfolding and interactions of albumin driven by pH changes: a molecular dynamics study. *J Phys Chem B.* 2014;118(4):921–30.
 207. Kaittanis C, Shaffer TM, Ogirala A, Santra S, Perez JM, Chiosis G, Li Y, Josephson L, Grimm J. Environment-responsive nanophores for therapy and treatment monitoring via molecular MRI quenching. *Nat Commun.* 2014;5:3384.

208. Lundqvist M, Augustsson C, Lilja M, Lundkvist K, Dahlbäck B, Linse S, Cedervall T. The nanoparticle protein corona formed in human blood or human blood fractions. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175871.
209. Safi M, Courtois J, Seigneuret M, Conjeaud H, Berret J-F. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(35):9353–63.
210. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188(2):112–8.
211. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri J-C, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 2003;24(6):1001–11.
212. Safi M, Sarrouj H, Sandre O, Mignet N, Berret J-F. Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology*. 2010;21(14):145103.
213. Florence AT. “Targeting” nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers. *J Control Release*. 2012;164(2):115–24.
214. Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J Control Release*. 2011;153(3):198–205.
215. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today*. 2015;10(4):487–510.
216. Laurent S, Saei AA, Behzadi S, Panahifar A, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11:1–22.
217. Michel CC, Curry FE. Microvascular Permeability. *Physiol Rev*. 1999 79(3):703-761.
218. Ho YT, Adriani G, Beyer S, Nhan P-T, Kamm RD, Kah JCY. A Facile Method to Probe the Vascular Permeability of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *Sci Rep*. 7(1):707.
219. Daan J.A. Crommelin ATF. Towards more effective advanced drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2013;454(1):496–511

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alejandro Xavier León Betancourt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Magnetische Nanopartikeln mit therapeutisch wirksamen zellpenetrierenden Peptiden für die zielgerichtete Pharmakotherapie der Dysferlinopathie“ („Magnetic nanoparticles with cell-penetrating peptides for therapeutical magnetic drug delivery in dysferlinopathy“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Alejandro Xavier León Betancourt

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eyk Schellenberger und Dr. med. Verena Schöwel für die konstruktive Betreuung und stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Simone Spuler für ihr Vertrauen in das Projekt, ihre hilfreiche Anregung und konstruktive Kritik.

Ich danke allen Kollegen der Arbeitsgruppe Spuler und der Arbeitsgruppe Schellenberger für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Dr. rer. nat. Akvile Häckel, Dr. rer. nat. Angela de Schellenberger und Dr. rer. nat. Harald Kratz bin ich sehr dankbar für ihre moralische Unterstützung in meinen Stunden im Labor im Campus Mitte und ihre Beratung zu laborspezifischen Fragen. Monika Ebert möchte ich für die Synthese der VSOP danken.

Ein besonderer Dank geht an Stephanie Meyer-Liesener sowie an Adrienne Rothe, die mich mit viel Geduld in die Zellkultur, Western Blots und Kryoschnitte eingeführt haben. Für die konstruktive Diskussionen und Anregungen möchte ich mich bei den Kollegen der Arbeitsgruppe Spuler, insbesondere Dr. rer. nat. Andreas Marg, Dr. rer. nat. Jakob Melcher und M. Sc. Eric Metzler.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. med. Verena Schöwel, Dr. Heidi Schooltink (Studi-Coach e.V.) und Eyk Schellenberger für ihre linguistische Unterstützung und Hilfe bei der Korrektur der verfassten Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt Susanne Müller und Dr. Philipp Böhm-Sturm für ihre tatkräftige Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich für die Einarbeitung im Kleintier-MRT und ihre Unterstützung mit der Nutzung und Auswertung der bildgebenden Ergebnisse bedanken, obwohl diese in der Dissertation nicht einbezogen wurden.