

Aus der  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts)

**WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN  
CHITOSAN-NANOKAPSELN UND DEM ENDOTHEL  
UNTER STATISCHEN UND DYNAMISCHEN BEDINGUNGEN**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von Julia Hummel  
aus Neuss  
2021

# INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abbildungsverzeichnis</i>	3
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	5
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Nanotechnologie und Nanopartikel	6
1.2 Verbesserte Bioverfügbarkeit und geringere Nebenwirkungen: Medizinische Nanopartikel und zielgerichtete medikamentöse Therapie	7
1.3 Intravenöse Anwendung von Medikamenten: Vorteile und Besonderheiten	9
1.4 Chitosan und Chitosan-Nanokapseln	11
1.5 Intention der Arbeit	15
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Materialien	17
2.2 Chitosan-Nanokapseln	17
2.3 Zellkultur	17
2.4 Bestimmung von Größe und Konzentration der Chi-NK	18
2.5 Epifluoreszenzmikroskopie	18
2.6 Toxizitätsmessung mit Propidium-Iodid	19
2.7 Quantifizierung der Chi-NK-Aufnahme in die Zelle	20
2.8 Endozytose-Kinetik	22
2.9 Endozytose-Inhibition	23
2.10 Mikrofluidische Flusskammern	24
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1 Quantifizierung und Größenbestimmung	26
3.2 Toxizität	26
3.3 Interaktion zwischen Chi-NK und HUVECs unter statischen Bedingungen	31
3.4 Wechselwirkung zwischen Chi-NK und HUVECs unter Flussbedingungen	39
<b>4 Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1 Chi-NK und ihre Interaktion mit Proteinen und Zellen	43
4.2 Endozytosemechanismus in HUVECs	44
4.3 Toxizität	48
4.4 Veränderung der Interaktion unter Strömungsbedingungen	51
4.5 Anreicherung im vWF-exprimierenden Endothel	52
4.6 Ausblick und Möglichkeiten	54
4.7 Schlussfolgerung	55
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>57</i>

<b>6</b>	<b>Publikationen</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>71</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1</b> Chemische Struktur von Chitosan bzw. Chitin _____	<b>10</b>
<b>Abbildung 2</b> Skizze einer Chi-NK _____	<b>13</b>
<b>Abbildung 3</b> Histogramm von Negativ-(keine Chi-NK, nur Medium) und Positivkontrolle (Medium und Staurosporin) _____	<b>19</b>
<b>Abbildung 4</b> Skizze eines TRITC-markierten Chi-NK _____	<b>20</b>
<b>Abbildung 5</b> Streudiagramm (a) und Histogramm (b) (beispielhaft) der Zellen nach Inkubation mit TRITC-markierten Chi-NK _____	<b>21</b>
<b>Abbildung 6</b> Schematische Darstellung der verwendeten Endozytose-Inhibitoren _____	<b>22</b>
<b>Abbildung 7</b> Skizze einer Flusskammer _____	<b>23</b>
<b>Tabelle 1</b> Größenbestimmung der Chi-NK mittels NTA _____	<b>24</b>
<b>Abbildung 8</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach Stimulation mit Chi-NK in niedrigeren Konzentrationen, Inkubationszeit 24h, unterschiedliche Konzentrationen _____	<b>26</b>
<b>Abbildung 9</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach Stimulation mit Chi-NK in höheren Konzentrationen, Inkubationszeit 24h, unterschiedliche Konzentrationen _____	<b>27</b>
<b>Abbildung 10</b> Durchflusszytometrie nach PI-Färbung von mit Chi-NK stimulierten HUVECs _____	<b>29</b>
<b>Abbildung 11</b> Perinukleäre Akkumulation der Chi-NK in HUVECs, Konzentration $0,33 \cdot 10^{12}$ Partikel/ml, Inkubationszeit 24h _____	<b>30</b>
<b>Abbildung 12</b> Aufnahme mit strukturiert beleuchtete Fluoreszenz-Mikroskopie einer Endothelzelle nach Inkubation mit Chi-NK _____	<b>31</b>
<b>Abbildung 13.</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach der Inkubation mit Chi-NK in einer Konzentration von $0,33 \cdot 10^{12}$ Partikel/ml für unterschiedlich lange Inkubationszeiten. _____	<b>32</b>
<b>Abbildung 14</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach der Inkubation mit Chi-NK in einer Konzentration von $2,61 \cdot 10^{12}$ Partikel/ml für unterschiedlich lange Inkubationszeiten _____	<b>33</b>
<b>Abbildung 15</b> Übereinandergelegte Histogramme der unterschiedlichen Inkubationszeiten (0–6h) mit einer Chi-NK-Konzentration von $0,33 \cdot 10^{12}$ /ml. _____	<b>34</b>
<b>Abbildung 16</b> a) Durchflusszytometrischen Untersuchungen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten: Differenz der normalisierten Gesamtfluoreszenz in Bezug auf die Negativkontrolle und b) die dazugehörige Standardabweichungen _____	<b>35</b>
<b>Abbildung 17</b> a) Übereinandergelegte Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen nach Inkubation mit unterschiedlichen Chi-NK-Konzentrationen (Angabe in $x \cdot 10^{12}$ Partikel/ml) und b) Differenz der normalisierten Fluoreszenz bei steigender Konzentration in Bezug auf die Negativkontrolle _____	<b>36</b>
<b>Abbildung 18.</b> WST1-Test der Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen _____	<b>37</b>
<b>Abbildung 19.</b> Durchflusszytometrischen Untersuchungen nach Zugabe verschiedener Endozytoseinhibitoren: Differenz der normalisierten Fluoreszenz nach Stimulation mit Chi-NK _____	<b>38</b>
<b>Abbildung 20</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach Inkubation mit Chi-NK unter Flussbedingungen _____	<b>39</b>
<b>Abbildung 21</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie der Flusskammer unter laufendem Fluss nach Stimulation der HUVECs mit Histamin, Chi-NK-Konzentration $0,33 \cdot 10^{12}$ Partikel/ml, unterschiedliche Zeitpunkte _____	<b>40</b>
<b>Abbildung 22</b> Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder nach 6 Stunden unter Flussbedingungen und Histamin-Stimulation sowie nachträglicher Immunfluoreszenzfärbung _____	<b>41</b>
<b>Abbildung 23</b> Chi-NK-Applikation bei Melanom-tragenden Mäusen. a) Schematische Darstellung des	

Versuchsablaufes. b + c) *in vivo*-Bildgebung (IVIS) nach intravenöser Applikation von Chi-NK bei Melanom-tragenden Mäusen, oben Wildtyp, unten vWF-Knockout-Mäuse \_\_\_\_\_ **52**

**Abbildung 24** Anteil der Gesamt-Fluoreszenz in IVIS-Aufnahmen von Mäusen nach intravenöser Applikation von Chi-NK \_\_\_\_\_ **54**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSA = bovines Serumalbumin

CAP = *Chitosan-affinity-protein*; Chitosan affines Protein

Chi-NK = Chitosan-Nanokapsel

DAPI = Diamidinphenylindol

EPR = *Enhanced Permeation And Retention*

FACS = Flu

FDA = *Food and Drug Administration*; Zulassungsbehörde der USA

GFP = *green fluorescent protein*; grün fluoreszierendes Protein

HEPES = Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure-Puffer

HUVEC = *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen)

MDCK = *Madin-Darby Canine Kidney*; Nierenzellen des Kaninchens

NP = Nanopartikel

PBS = *phosphate buffered saline*; phosphatgepufferte Salzlösung

PI = Propidium-Iodid

rcf = *relative centrifugal force*; relative Zentrifugalbeschleunigung

TRITC = Tetramethylrhodaminisothiocyanat

vWF = von Willebrand-Faktor

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 NANOTECHNOLOGIE UND NANOPARTIKEL

Die Nanotechnologie ist ein in den letzten Jahren viel und zunehmend kontrovers diskutiertes Thema. Sie beschäftigt sich mit der Erforschung von Funktion und Anwendung von Nanomaterialien. Auf der einen Seite wird die Nanotechnologie häufig als eine der Schlüsseltechnologien der Zukunft gehandelt, die mit innovativen Werkstoffen zur Energie- und Ressourcenschonung beitragen kann und in der Medizin zu neuartigen Therapieansätzen führt. Auf der anderen Seite steht die Skepsis gegenüber dieser Technologie, vor allem in Anbetracht der steigenden Zahl an Produkten und verhältnismäßig geringen Kenntnisse über die Auswirkungen auf den Menschen und Umwelt. Eine steigende Zahl wissenschaftlicher Publikationen, aber auch in der Laienpresse veröffentlichte Artikel spiegeln das große Misstrauen gegenüber diesen Materialien wider.

Was diese Materialien so besonders macht und warum ihnen in den letzten Jahren so viel Aufmerksamkeit zuteilwird, ist ihre Größe und die daraus resultierenden Eigenschaften. „Nanos“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet Zwerg und spielt auf die geringe Größe dieser Partikel im Nanometer-Bereich an. Laut der Definition nach ISO TS 80004-1 sind Materialien dann Nanomaterialien, wenn sie in mindestens einer äußerlichen Dimension oder aber inneren Struktur oder Oberfläche im nanoskalierten Bereich liegen<sup>1</sup>. Nach dem ISO-Standard ist dieser Bereich definiert von ungefähr 1 bis 100nm (CEN ISO/TS 27687: 2008). Es existieren jedoch einige weitere Definitionen, was noch einmal verdeutlicht, wie komplex die Beurteilung von Nanomaterialien ist, da bisher nicht allgemein festgelegt ist, was zu diesen Materialien zählt<sup>2</sup>.

Manche Autoren und Forschungsgruppen versuchen daher, Nanomaterialien nicht allein über die Größe zu definieren, sondern über die Eigenschaften, die Nanomaterialien kennzeichnet. Die Größe allein reicht aus, dass Nanopartikel (NP) im Vergleich zu Partikeln in wesentlich größeren Dimensionen ihre, z.B. thermodynamischen, chemischen oder optischen Eigenschaften in relevantem Maße verändern, auch wenn sie aus demselben Material und atomaren Strukturen bestehen<sup>2-4</sup>. Ein weiterer für die biologische Auswirkung entscheidende Aspekt ist auch die Größe an sich: Durch die geringe Größe gelangen NP zum Beispiel bis in die kleinsten Gefäße der Lunge oder dringen tiefer in die Haut ein<sup>5</sup>.

Tatsächlich gibt es einige Hinweise, dass Partikel dieser Größenskala negative Auswirkungen auf Lebewesen haben<sup>6, 7, 8</sup>. Ein gewisses Misstrauen gegenüber Nanomaterialien ist also durchaus angebracht, zumal die Exposition bei zunehmender Verwendung ansteigt.

Gleichzeitig sorgen ebendiese besonderen Eigenschaften von Nanomaterialien für eine Vielzahl von Verbesserungen. Sei es in der Chemie, Elektronik, Optik, Energie- und Umwelttechnik, in der Werkstoffkunde, im Maschinenwesen oder in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Textilbranche und im medizinisch-pharmazeutischen Bereich: Für Nanomaterialien gibt es scheinbar unzählige Anwendungsgebiete<sup>9-11</sup>.

## 1.2 VERBESSERTE BIOVERFÜGBARKEIT UND GERINGERE NEBENWIRKUNGEN: MEDIZINISCHE NANOPARTIKEL UND ZIELGERICHTETE MEDIKAMENTÖSE THERAPIE

Die Medizintechnik und Pharmazie sind in der Nanotechnologie zurzeit einer der wichtigsten Anwendungsfelder<sup>10</sup>. Auch hier gibt es ein sehr breites Spektrum, Nanomaterialien zu nutzen: Diagnostik und Therapie sowie Medizintechnik und medizinische Materialien. Nanobeschichtungen von medizinischen Produkten, wie Implantaten oder medizintechnischen Geräten, führen zu einer verbesserten Hygiene durch eine erniedrigte Adhäsion von Bakterien oder bakterizid wirkende Oberflächen<sup>10, 12, 13</sup>. Auch diagnostisch können Nanomaterialien eingesetzt werden, beispielsweise als implantierbare Sensoren, die verschiedene Biomoleküle detektieren sollen, sowie als bildgebende NP<sup>10, 14-16</sup>.

Eines der größten Möglichkeiten, die derzeit angewandt wird, ist die medikamentöse Therapie, insbesondere die Krebstherapie, aber auch die Bekämpfung von Infektionen<sup>14</sup>. Es können Wirkstoffe in nanoskaliger Form vorliegen oder aber NP werden als Modifikation eines Wirkstoffes verwendet, um dessen Eigenschaften zu beeinflussen. Es sind bereits diverse Medikamente mit nanometrischer Komponente von der *Food- and Drug- Administration* (FDA) in den USA zugelassen<sup>17</sup>. Als Beispiele seien Doxorubicin-geladenen Liposomen genannt, welche bereits seit 1995 beim Kaposi-Sarkom verwendet werden, oder Albumin-gebundene Paclitaxel-NP, die bei der Brustkrebstherapie zum Einsatz kommen<sup>18, 19</sup>. Erforscht, manche davon bereits in klinischen Studien, werden aber noch weit mehr NP und ihre potentiellen Anwendungen. Die Verwendung von NP bietet viele Vorteile, einige ergeben sich aus den bereits schon erwähnten Eigenschaften von nanoskaligen Materialien und können an unterschiedlichen Punkten angreifen.

Sie können unter anderem die Bioverfügbarkeit von Medikamenten erhöhen. Ein Wirkstoff ist vielen Barrieren ausgesetzt, bevor es seine eigentliche Wirkung am Zielorgan entfalten kann. Zunächst muss dieser in den Körper gelangen. Das geschieht beispielsweise über das Darmepithel bei oralen oder das Endothel bei intravenösen Anwendungen. Nanosuspensionen von Aprepitant, ein Antiemetikum, wird in nanometrischer Form schneller im Darmepithel absorbiert. Ebenso können nanoskalige Formen eines Thiodiazol-Derivates eine Epithelschicht schneller passieren als größere Partikel<sup>20, 21</sup>.

Im Laufe der Aufnahme gelangen viele Medikamente in die Blutbahn, wo sie beispielsweise durch das Immunsystem deaktiviert werden und somit eine niedrigere Dosis resultiert. Im Falle von Doxorubicin-Liposomen konnte eine signifikant verlängerte Blutzirkulation erzielt werden, indem man die Partikel mit Polyethylenglukol beschichtete. Eine Opsonisierung und damit eine frühzeitige Eliminierung durch das retikuloendotheliale System (RES) kann damit verhindert werden<sup>22</sup>. Ein sehr aktuelles Beispiel sind die Impfstoffe gegen SARS-CoV-2, in denen die mRNA in Lipid-Nanokapseln verpackt ist und damit deren Stabilität erhöht wird<sup>23</sup>.

Aber auch die Medikamente selbst können unvorteilhafte Eigenschaften besitzen, die die Verfügbarkeit am Zielorgan herabsetzen, wie schlechte Löslichkeit oder mangelnde Stabilität. Die Herstellung von NP durch Bindung des Wirkstoffes an ein hydrophiles Material oder der Transport in einer Mizelle mit hydrophobem Kern bei gleichzeitig hydrophiler Oberfläche erhöht die Löslichkeit und somit die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes. Ein Beispiel dafür sind die bereits erwähnten Paclitaxel-NP, die erst durch die Bindung an Albumin eine bessere Löslichkeit im Blut erhalten. Zudem zeigen diese NP eine bessere Anti-Tumor-Aktivität und weniger Nebenwirkungen als die bis dahin verwendete Kombination mit dem Lösungsmittel Cremophor<sup>24, 25</sup>.

Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt der medikamentösen Therapie sind die Nebenwirkungen. Nicht selten sind die Nebenwirkungen dafür verantwortlich, dass Patienten in schlechtem Allgemeinzustand keine systemische Therapie mehr erhalten oder eine bereits begonnene Therapie wieder abgebrochen werden muss.

Ziel ist es darum, eine möglichst hohe Konzentration am Zielorgan zu erreichen und trotzdem eine toxische Wirkung an anderen Organen, die zu den unerwünschten Wirkungen führen, zu vermeiden. Für NP gibt es bereits verschiedene Ansätze, wie dieses Ziel erreicht werden könnte. Zum einen spielt die eben erwähnte erhöhte Verfügbarkeit am Zielorgan eine Rolle. Zum anderen gibt es Mechanismen, wie NP aus Gefäßen in bestimmte Gewebe übertreten können, die bei größeren Partikeln nicht greifen<sup>26</sup>. Intravenös verabreicht können NP passiv in Organe mit erhöhter Permeabilität des Endothels akkumulieren, wie in Leber oder Milz. Dieser Effekt ist Teil des als „*enhanced permeation and retention effect*“ (EPR) bezeichneten Phänomens, eines der bisher am häufigsten untersuchten, aber auch kontrovers diskutiertesten Effekte im Medikamententransport<sup>27</sup>. Auch in Tumorgefäßen findet sich häufig eine erhöhte Permeabilität, sodass beispielsweise das bereits erwähnte liposomale Doxorubicin im Falle von Brustkrebs tumoral akkumuliert und gleichzeitig eine insgesamt verminderte Nebenwirkungsrate aufweist<sup>28</sup>. Allerdings gibt es Hinweise, dass der EPR-Effekt in Thrombosen durch den herabgesetzten Blutfluss weniger stark ausgeprägt ist<sup>29</sup>. Da Tumorgefäße häufig eine erhöhte Thrombogenizität aufweisen, sind hier andere Mechanismen notwendig, um einen Wirkstoff an sein Ziel zu bringen<sup>30</sup>.

Das geht beispielsweise mit dem noch genaueren, aktiven, zielgerichteten Transport von Medikamenten an ihren Bestimmungsort. Pathologisch verändertes Gewebe unterscheidet sich beispielsweise in der Expression von Oberflächenmarker. Diese können als Zielstruktur dienen, um Medikamente zielgenau zu transportieren. Beim Glioblastom beispielsweise ist die Expression des LDL-Rezeptors (*low density lipoprotein*-Rezeptor) um ein Vielfaches erhöht. Paclitaxel, gebunden an Nano-LDL kann somit gezielt Tumorzellen ansteuern und zeigt *in vitro* bessere antitumorale Effekte<sup>31</sup>.

Mit spezifischen Systemen aus der Kombination von NP und aktivem Medikamententransport könnten auch Substanzen mit hoher Toxizität oder schlechter Löslichkeit zielgenau zum Wirkungsort transportiert werden und dort ihre, möglicherweise zellschädigende Wirkung entfalten und dabei nicht betroffenes Gewebe zu schonen. Es existieren dabei bereits mehrere Denkansätze, wie man eine schaltbare Freilassung der Medikamente erzielt, um sicherzustellen, dass Wirkstoffe nicht nur zum Ziel transportiert werden, sondern auch erst dort aktiviert werden. Untersucht werden bereits Aktivierungen durch einen erniedrigten pH-Wert im Extrazellulärraum oder enzymatisch durch krankheitsspezifische Enzyme<sup>32, 33</sup>.

Die Anwendungsmöglichkeiten von NP in der Medizin sind vielfältig. Entsprechend vielgestaltig sind die NP in Material, Form, Größe und weiteren Parametern. Eine der einfachsten Form sind Polymere, an denen Wirkstoffe gebunden sind. Komplexere Systeme bestehen beispielsweise aus Kapseln mit mehreren Komponenten, in denen Medikamente transportiert werden können. Dazwischen existieren viel Abstufungen. Wie bei Nanomaterialien im Allgemeinen macht es die Vielfältigkeit der NP schwierig, deren Wirkung im menschlichen Körper vorherzusagen. Zu zahlreich sind die Parameter, die Einfluss auf Toxizität, Interaktion und Wirkung haben. Hinzukommen in diesem Kontext verschieden reagierende Zellarten und komplexe biologische Systeme. Als einer der relevantesten Beispiele sei hier das Blut mit seinen verschiedenen zellulären und plasmatischen Komponenten genannt.

## 1.3 INTRAVENÖSE ANWENDUNG VON MEDIKAMENTEN: VORTEILE UND BESONDERHEITEN

Betrachtet man NP im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung, muss zunächst überlegt werden, auf welchem Weg sie in den Körper gelangen sollen und mit welchen Zellen sie dabei potentiell in Kontakt kommen könnten. In der Medizin sind verschiedene Applikationsformen bekannt, darunter vor allem die orale und intravenöse, aber auch subkutan, transdermal, nasal oder inhalativ. Vor allem der intravenöse Zugang ist eine häufig verwendete Methode. Vorteile dieses Weges sind die relativ gut vorhersehbare Bioverfügbarkeit und die gute Erreichbarkeit nahezu jeden Organs im Körper über das Gefäßsystem.

Zum Gefäßlumen hin ist dieses mit einschichtig angelegten Endothelzellen ausgekleidet. Somit stellen diese, neben den im Blut enthaltenen Zellen, die ersten Zellen dar, mit denen intravenös verabreichte Substanzen interagieren. Das kann zum einen therapeutisch genutzt werden, aber auch zu unerwünschten Nebenwirkungen führen.

Denn das Endothel ist nicht nur eine passive Barriere zwischen Gefäßlumen und umliegendem Gewebe. Vielmehr existieren zahlreiche Wechselwirkungen zwischen diesen Zellen und ihrer Umgebung. Als Reaktion auf Stimuli wie Zytokine, Gefäßverletzung oder veränderten Blutfluss kann das Endothel Genexpression, Oberflächenbeschaffenheit oder Zellproliferation verändern. Damit greift es aktiv in die Regulation von Gefäßtonus, Blutgerinnung und Angiogenese ein<sup>34-36</sup>. Unter normalen Bedingungen bildet es eine durchgehende, anti-thrombotische Oberfläche, welche Vasospasmus, eine überschießende Zellproliferation und Leukozyten-Adhäsion verhindert<sup>37</sup>. Diese Eigenschaften des Endothels können sich jedoch unter pathologischen Bedingungen verändern. Somit trägt es maßgeblich zur Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen bei, darunter Bluthochdruck, chronischer Niereninsuffizienz, Sepsis und Malignomen<sup>38</sup>. Hierbei kommt es u.a. zur sogenannten Endothelzellaktivierung durch beispielsweise proinflammatorische Zytokine (wie Tumor Nekrose Faktor, Interleukine), reaktiver Sauerstoffspezies oder Autoantikörper<sup>39</sup>. Daraus resultiert eine Veränderung der Zellintegrität und -oberfläche, Sekretion proinflammatorischer, prokoagulatorischer und vasoaktiver Substanzen sowie einer erhöhten Bindung von Leuko- und Thrombozyten<sup>38, 39</sup>.

Auch bei Tumorerkrankung lassen sich solche Veränderungen im Endothel nachweisen und unterscheiden sich dadurch maßgeblich von Gefäßen im gesunden Gewebe<sup>40</sup>. Dabei spielen die Endothelzellen v.a. bei Angiogenese eine maßgebliche Rolle. Ebenso werden Mechanismen diskutiert, die eine Metastasierung erleichtern oder die Umgehung der immunologischen Kontrolle in Tumoren ermöglichen<sup>41</sup>. Durch die von Tumorzellen sezernierten proangiogenetischen Substanzen wird ebenfalls von einer Endothelzellaktivierung mit all den daraus resultierenden Veränderungen gesprochen<sup>41</sup>. Endotheliale Marker wie Thrombomodulin oder von Willebrand-Faktor (vWF) können hier auch im peripheren Blut in erhöhten Konzentrationen gemessen werden<sup>42</sup>. Zudem wird ein Zusammenhang zwischen dem aktivierten, prokoagulatorischen Endothel und dem schon lange bekanntem erhöhtem Thromboserisiko bei Tumorpatienten vermutet<sup>42</sup>.

Daneben stellt das Endothel eine Barriere dar, die Moleküle aktiv aufnehmen bzw. ins Gewebe eintreten lassen können. Eine intrazelluläre Aufnahme von NP ergibt für enthaltene Wirkstoffe andere Zielorte als der parazelluläre Transport nach subendothelial. Ein intrazellulärer Transport könnte in Kombination mit NP zu einer Art Reservoir des aufgenommenen Wirkstoffes führen und somit bei gezieltem Transport in bestimmte Gewebe in höheren Konzentrationen resultieren. Zwei der wichtigsten

und bisher am besten untersuchten Aufnahmemechanismen für NP sind die Clathrin- sowie die Caveolin-abhängigen Endozytose<sup>43-45</sup>. Die Art wie NP in eine Zelle aufgenommen werden, bestimmt auch den weiteren intrazellulären Weg und den letztlichen Verbleib der NP und ihrer Wirkstoffe und damit zu einem gewissen Teil ihre Wirkung.

Nach der Aufnahme über den Clathrin-abhängigen Weg werden die Vesikel durch Fusion mit anderen Vesikeln zu frühen Endosomen, weiter zu späten Endosomen und schließlich unter anderem zu Lysosomen<sup>46</sup>. Eine Aufgabe der Lysosomen ist es den Inhalt der Vesikel abzubauen, beispielsweise über Enzyme oder einen niedrigen pH-Wert<sup>46</sup>. Das ist wesentlich für die Weiterverarbeitung von NP und derer gegebenenfalls im Rahmen von therapeutischer Anwendung enthaltenen Medikamente. Werden NP hier abgebaut und Wirkstoffe freigesetzt, kann von einer intrazellulären Wirkung ausgegangen werden. Vorausgesetzt, das enthaltene Medikament wird weder von den Enzymen noch vom niedrigen pH-Wert beeinträchtigt.

Im Gegensatz dazu hat der Inhalt von Caveosomen, die über den Caveolin-abhängigen Aufnahmeweg entstehen, einen neutralen pH-Wert. So könnte der hydrolytische Abbau in den Lysosomen umgangen werden<sup>47</sup>. Außerdem ist von Caveosomen bekannt, dass sie auch als transendotheliale Transporter fungieren und somit NP subendotheliale Kompartimente erreichen könnten<sup>48</sup>.

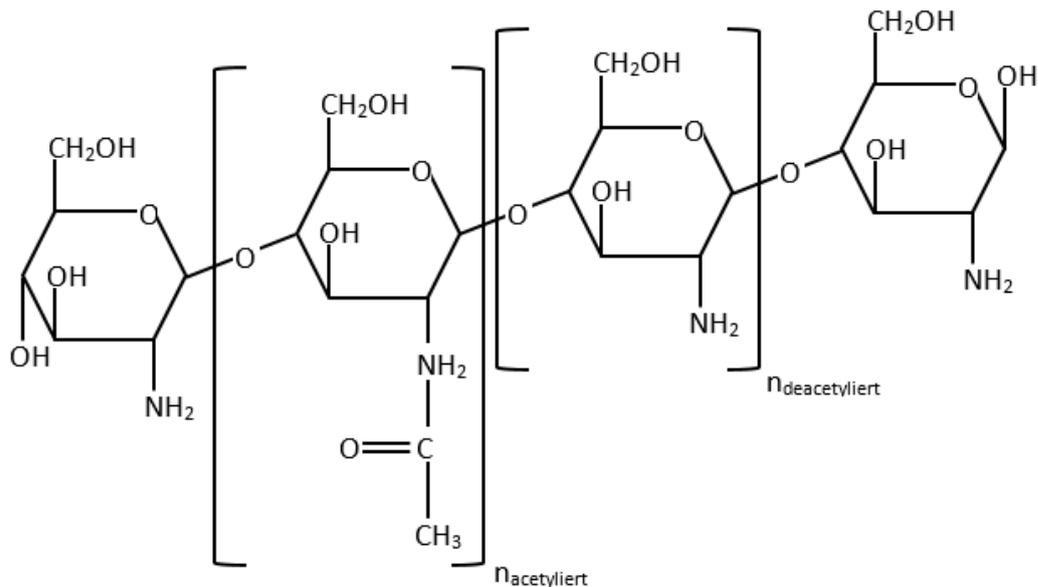
So ergeben sich schon durch den Aufnahmemechanismus unterschiedliche Wirkorte. Der Caveolin-Weg wird beispielsweise vor allem von negativ geladenen Oberflächen getriggert<sup>49</sup>. Somit könnte sich über die Modifizierung der Oberfläche eine gute Möglichkeit bieten, das Ziel der NP je nach Anwendung zu verändern.

Für die Testung von Toxizität und Endozytose von NP bei Endothelzellen existieren verschiedene *in vitro* Modelle. In der Forschung häufig verwendet werden Zellen aus Venen menschlicher Nabelschnüre (engl. „*human umbilical vein endothelial cells*“, HUVECs). Yi Cao et al. fassen in einem Review zusammen, warum HUVECs sich gut für die Testung von NP eignen<sup>45</sup>. Sie exprimieren endotheliale Marker wie I-CAM 1 oder V-CAM und reagieren auf physiologische und pathologische Stimuli<sup>34, 50</sup>. Dazu zählt etwa die Ausschüttung von vWF bei der Inkubation mit Histamin, wodurch die pathologische Situation in Tumorgefäßen des Melanoms simuliert werden kann<sup>51</sup>. Bei der zunehmenden Zahl an Arbeiten zur intravenösen Anwendung von NP spielt auch die gute Verfügbarkeit und relativ leichte Kultivierung der Zellen eine Rolle. Außerdem sind HUVECs durch die häufige Anwendung eine bereits gut untersuchte Zelllinie.

Bei der intravenösen Anwendung gibt es darüber hinaus einige Aspekte, die bei der *in vitro* Testung beachtet werden sollten. Der Kontakt zwischen NP und dem Endothel findet unter besonderen Bedingungen statt, die möglicherweise auf die NP und die Interaktion mit Endothelzellen Einfluss nehmen. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass Plasma-Proteine, wie Albumin und verschiedene Globuline, eine Art Hülle um NP bilden und deren Toxizität oder Aufnahme in Zellen verändern<sup>52-54</sup>. Dazu kommt der Einfluss von großen zellulären Bestandteilen wie Erythrozyten. Es gibt Hinweise, dass Erythrozyten die Verteilung der NP über den Gefäßdurchmesser verändern. Dabei kommt es zu einer erhöhten Konzentration nahe der Gefäßwände und zu einer gesteigerten Bindungsrate von NP an die Endothelzellen<sup>55</sup>. Eine weitere Besonderheit ist der Blutfluss. Hierbei verändern sich zum einen die Eigenschaften der Endothelzellen und die Endozytose der NP, zum anderen müssen NP, die das Endothel erreichen sollen, Scherkräfte überwinden, um an dieses anzudocken<sup>56, 57</sup>.

## 1.4 CHITOSAN UND CHITOSAN-NANOKAPSELN

Für die Herstellung von NP steht eine enorme Vielfalt an Materialien zur Verfügung. Eine ganze Reihe von NP bestehen aus sogenannten Biopolymeren, eines davon ist Chitosan. Chitosan ist ein vom Chitin abgeleitetes Polysaccharid aus der Gruppe der Polyglucosamine. Beide Moleküle bestehen aus den Monomeren Glucosamin und zu einem variablen Anteil aus N-Acetylglucosamin (Abb. 1). Der Anteil an acetylierten Aminogruppen wird mit dem Acetylierungsgrad angegeben. Chitin besitzt einen höheren Acetylierungsgrad, eine genaue Abgrenzung wird noch diskutiert. Daher wird häufig die bessere Löslichkeit des Chitosans in wässrigen Lösungen zur Differenzierung herangezogen.



**Abbildung 8 Chemische Struktur von Chitosan bzw. Chitin.** Der Anteil an acetylierten Glucosaminen ( $n_{\text{acetyliert}}$ ) ist bei Chitosan niedriger als bei Chitin, wodurch Chitosan im Gegensatz zu Chitin ein besseres Lösungsverhalten zeigt.

Erstmals entdeckt wurde Chitosan 1859 von Charles Marie Benjamin Rouget, der Chitin mit Kalilauge kochte und dabei durch Deacetylierung Chitosan erhielt. Auch heute wird ein Großteil des technisch hergestellten Chitosans über diese alkalische Methode, allerdings mit Natronlauge, gewonnen<sup>58</sup>. Sehr viel seltener wird Chitosan auf enzymatischem Weg oder durch Extraktion von natürlich vorkommenden Chitosans aus Pilzen wie zum Beispiel *Gongronelle butleri* gewonnen<sup>59</sup>. Als Ausgangsstoff für die Produktion von Chitosan dienen aber vorwiegend Schalen von Krustentieren, in denen Chitin enthalten ist, beispielsweise Krabben oder Garnelen. Nach der Demineralisation und Deproteination des Ausgangsstoffes wird das daraus entstehende Chitin durch Deacetylierung weiter zu Chitosan verarbeitet. Ein Vorteil dieser Quelle ist, dass diese Stoffe ohnehin als Abfallprodukt bei der Verarbeitung dieser Schalentiere anfallen und somit keine zusätzlichen Ressourcen verbraucht werden. Zudem handelt es sich um einen nachwachsenden Rohstoff. Für die medizinische Anwendung von Chitosan ist es wichtig, dass bei der Reaktion mit Natronlauge eine vollständige Hydrolyse von Chitin-assoziierten Proteinen stattfindet, sodass das resultierende Produkt frei von potentiellen Allergenen ist.

Chitosan zählt wegen der vorhandenen Aminogruppen zu den polykationischen Molekülen. Der  $\text{pK}_s$ -Wert liegt zwischen 6,2 und 6,4, somit ist Chitosan gut in wässrigen Lösungen mit saurem pH-Wert löslich. Die Löslichkeit in neutralen oder alkalischen Lösungen hingegen ist gering, nimmt aber mit sinkendem Molekulargewicht des Chitosans zu. Chitosan ist allerdings, wie bereits angedeutet, kein einheitliches Molekül, sondern kann in verschiedenen Parametern variieren. Molekulares Gewicht,

Acetylierungsgrad, aber auch das Verteilungsmuster der Acetylgruppen und die Homogenität der Moleküle in einer Lösung beeinflussen maßgeblich Eigenschaften wie Löslichkeit und chemische Reaktivität<sup>60-62</sup>. Herstellungsmethode und Ausgangsmaterial wiederum haben großen Einfluss auf diese verschiedenen Parameter des Chitosans<sup>59, 63</sup>. Aus diesem Grund beschäftigen sich zahlreiche der aktuellen Publikationen mit dem Thema der exakten Charakterisierung und der möglichen Beeinflussbarkeit dieser Parameter sowie mit der Herstellung verschiedener Chitosan-Derivate und Chitosan-haltiger Partikel<sup>64-66</sup>.

Chitosan kann in unterschiedlichen physikalischen Formen vorliegen, beispielsweise als Lösung oder als Puder. Mithilfe von unterschiedlichen Zusätzen und Verarbeitungsverfahren kann Chitosan zu Nanopartikeln<sup>67</sup>, Mikrosphären<sup>68</sup>, Hydrogelen<sup>31</sup>, Filmen<sup>69</sup>, Schwämmen<sup>70</sup> oder Fasern<sup>71</sup> weiterverarbeitet werden. Darüber hinaus existiert eine große Anzahl an Chitosan-Derivaten, die unter anderem durch die drei reaktiven Gruppen (primäre Hydroxyl-, sekundäre Hydroxyl- und Amino-Gruppe; siehe Abb. 1) ermöglicht werden. Diese Derivate weisen zum Teil wesentliche Unterschiede zum Ursprungsmolekül auf, insbesondere hinsichtlich der chemischen und biologischen Eigenschaften und stellen somit eine Möglichkeit dar, Chitosanmolekülen eine bestimmte erwünschte Eigenschaft zu verleihen<sup>61, 72</sup>. Eines der bekanntesten Derivate ist derzeit das Carboxymethyl-Chitosan, welches unter anderem eine höhere Wasserlöslichkeit aufweist und bereits in der Kosmetik zahlreiche Anwendungen hat<sup>73-75</sup>.

Chitosan wird oft als biologisch abbaubar, nicht toxisch und biokompatibel bezeichnet, auch wenn nur selten konkrete Definitionen für diese Charakteristika benannt werden<sup>76,77</sup>. Trotzdem machen es diese Eigenschaften für diverse Anwendungen in Landwirtschaft, Wasseraufbereitung, Lebensmitteltechnologie, Kosmetikindustrie und vor allem für die Medizin interessant<sup>78</sup>. Durch seine chemische Struktur und die Anwesenheit von sowohl Hydroxy- als auch Aminogruppen kann es in der Wasseraufbereitung als Chelator von Metall-Ionen verwendet werden<sup>79</sup>. Als Pflanzenschutzmittel wird es sowohl wegen der antibakteriellen, als auch wegen der den pflanzeigenen Abwehrmechanismus-stimulierenden Wirkung erforscht<sup>80, 81</sup>. Aber auch in alltäglichen Produkten kommt Chitosan bereits zum Tragen. Laut der CosIng-Datenbank der europäischen Kommission existieren mindestens 45 Chitosan-Derivate, die bereits in Kosmetika eingesetzt werden<sup>82</sup>. Hierbei werden vor allem feuchtigkeitsspendende und -erhaltenden, sowie antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften des Chitosans genutzt<sup>83</sup>. Der Öffentlichkeit am bekanntesten dürfte der Einsatz als diätischer Zusatz sein, der zur Cholesterin-Senkung bis hin zur Körpergewichtsreduktion beitragen soll, auch wenn die Wirkung nicht abschließend geklärt ist<sup>84</sup>.

Mit der größte Fokus liegt auf der Anwendung von Chitosanen, insbesondere als Nanomaterial, in der Medizin. Zum einen sind die biologische Eigenschaften der Moleküle selbst, wie antimikrobielle, anti-tumorale<sup>85</sup>, antiinflammatorische und antioxidative<sup>86</sup> Aktivität sowie Mukoadhäsivität nützlich. In Wundauflagen wirken Chitosane unter anderem antimikrobiell und Makrophagen-stimulierend und dienen gleichzeitig als strukturgebendes Molekül, an denen weitere Komponenten gebunden werden können<sup>87</sup>. Als Hydrogel in einem Wundverband ist es bereits erhältlich (zum Beispiel Chitoderm® Plus). Auch gegen die Volkskrankheit Diabetes mellitus könnte Chitosan möglicherweise durch eine Erhöhung der Insulin-Sensitivität und Senkung der Triglyceride hilfreich sein<sup>88</sup>. Zudem zeigen erste Versuche mit Chitosanen auf dem Feld der Tumorthherapie vielversprechende Ergebnisse bei verschiedenen Tumoren. So inhibieren Chitosan-Oligosaccharide die Proliferation von Zellen des hepatozellulären Karzinoms<sup>89</sup> und des malignen Melanoms<sup>90</sup>.

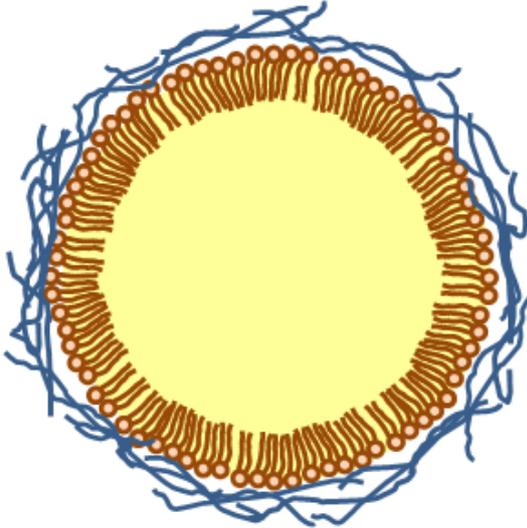
Neben der Möglichkeit Chitosan als Wirkstoff einzusetzen, existieren diverse Ansätze, in denen Chitosan als Träger- und Transportmolekül für andere Substanzen dient. Chitosan kann vor allem polyanionische Moleküle binden, beispielsweise Proteine, und deren Eigenschaften verändern. Eine

Eigenschaft, die oft in Zusammenhang mit Chitosan erwähnt wird, ist die Mukoadhesivität und den daraus resultierenden verbesserten Transport über Schleimhautbarriere. Ermöglicht wird das vor allem durch die positive Ladung von Chitosan, ohne die nur eine viel schwächere Adhäsion am negativ geladenen Epithel möglich wäre<sup>91</sup>.

Während es durch seinen polykationischen Charakter und die daraus resultierende Mukoadhesivität zu intestinalen oder nasalen Anwendungen bereits eine Vielzahl an Untersuchungen gibt, ist über die intravenöse Applikation weniger bekannt. Ein Grund dafür ist unter anderem die schlechte Löslichkeit und Stabilität des Chitosans in wässrigen Lösungen sowie bei alkalischen pH-Werten und damit auch in Blut (pH 7,4). Es existieren jedoch verschiedene Möglichkeiten die Löslichkeit zu verbessern. Eine davon ist die schon erwähnte Derivatisierung, z.B. mit Carboxy-Gruppen. Eine weitere ist der Einbau des Chitosans in größere Strukturen, wie Nanopartikel oder Nanosphären.

Calvo et al. entwickelten bereits 1997 eine Chitosan-Nanokapsel (Chi-NK), mit dem Ziel eines positiv geladenen kolloidalen Transportsystems. Eine Stabilität gegenüber Kationen, sowie eine fehlende Abstoßung gegenüber negativ geladenen biologischen Membranen, werden als Hauptgründe für die positiv statt bis dahin vor allem negativ geladenen Systemen genannt<sup>92</sup>. Goycoolea et al. untersuchten solche, nur leicht in der Herstellung veränderten, Chi-NK. Dabei lag der Fokus zunächst auf der Charakterisierung, dem Einfluss von molekularem Gewicht und Acetylierungsgrad des verwendeten Chitosans, aber auch auf dem genauen Aufbau der Chi-NK<sup>67</sup>.

In der Zusammenschau der Untersuchungen ergibt sich folgendes Bild (Abb. 2): Die Chitosan-Polymere sind um einen unpolaren Kern aus Miglykol (Gemisch aus mittelkettigen Triglyceriden) angeordnet. Eine Schicht aus Lecithin-Molekülen vermittelt den Kontakt. Während der unpolare Teil Richtung Ölkern orientiert ist, stellt der negativ geladene, polare Teil die Verbindung zu den positiven, nicht-acetylierten Aminogruppen des Chitosans her. Diese elektrostatischen Kräfte sind möglicherweise einer der Hauptkräfte der Zusammenlagerung. In den Untersuchungen zeigte sich aber eine bessere Chitosan-Inkorporation in die Chi-NK bei höherem Acetylierungsgrad. Es wird vermutet, dass nicht nur die elektrostatischen Kräfte für die Stabilität sorgen, sondern auch hydrophobe Kräfte wirken. Dabei schieben sich die hydrophoben Acetylgruppen in die ebenfalls hydrophobe Schicht des Lecithins, wodurch sie vom wässrigen Lösungsmittel abgeschirmt werden<sup>67</sup>. Die Chi-NK wurden darüber hinaus auf die Stabilität in verschiedenen Medien geprüft. Dabei zeigte sich eine gute Stabilität von bis zu 48 Stunden, trotz eines pH-Wertes von 7,45<sup>67</sup>, was eine wichtige Voraussetzung zur Anwendung bei physiologischen pH-Werten und somit auch im Gefäßsystem ist.



**Abbildung 9** Skizze einer Chi-NK (nicht maßstabsgetreu). Gelb = lipophiler Kern aus Miglykol, rot = Lecithin, blau = Hülle aus Chitosan-Molekülen. Neben elektrostatischen sorgen möglicherweise auch hydrophobe Kräfte (acetylierter Teil des Chitosan, apolarer Teil des Lecithins, lipophiler Kern) für den Zusammenhalt der Chi-NKs.

Auch die Beladung mit Medikamenten, wie Diazepam oder Capsaicin wurde bei diesen Chi-NK bereits erprobt. Beide Substanzen hatten kaum Einfluss auf Größe und Zeta-Potenzial der Kapseln<sup>67, 92</sup>. Für Capsaicin konnte sogar eine verminderte Toxizität von bei MDCK-Zellen (*Madin-Darby Canine Kidney Zellen*) nachgewiesen werden, wenn es in Chi-NK gebunden vorliegen<sup>93</sup>. Die im Vergleich zu anderen Chitosan-Formen bessere Löslichkeit von Chi-NK, birgt neue Möglichkeiten der intravenösen Anwendung, die bisher jedoch weniger untersucht ist.

## 1.5 INTENTION DER ARBEIT

Nanomedizinische Produkte und der aktive zielgerichtete Medikamententransport spielen eine zunehmende Rolle in der medikamentösen Therapie, um eine möglichst hohe Effizienz zu erzielen. Chi-NK besitzen vielversprechende Eigenschaften, die es als Transportmittel für Medikamenten interessant macht. Sie verbinden die positiven Eigenschaften des Chitosans mit der besseren Stabilität in wässrigen und alkalischen Lösungen sowie die Möglichkeit lipophile Medikamente im Kern zu transportieren. Bisher wurden vor allem Krebszelllinien oder Epithelzellen untersucht, für die intravenöse Anwendung sind jedoch vor allem die Endothelzellen von entscheidender Bedeutung. Zum einen kommen sie als einer der ersten Zellen mit den Partikeln in Kontakt, zum anderen könnten pathologische Veränderungen Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie sein.

Ein Molekül, das in diesem Zusammenhang einen besonderen Stellenwert hat, ist vWF. Dieses Glykoprotein wird hauptsächlich von den Endothelzellen selbst produziert und in den sogenannten Weibel-Pallade-Körperchen gespeichert<sup>94</sup>. Die Sekretion erfolgt unter anderem durch die Stimulation mit bestimmten Substanzen wie Thrombin, Vasopressin oder Histamin<sup>95-97</sup>. Es besteht aus unterschiedlichen Domänen, mit denen vWF eine Reihe von Molekülen binden kann und bietet damit eine große Angriffsfläche für eine zielgerichtete Therapie<sup>98, 99</sup>. Er spielt vor allem eine wesentliche Rolle in der Hämostase. In seiner physiologischen Funktion stabilisiert er den Gerinnungsfaktor VIII und schafft eine Verbindung zwischen Extrazellulärmatrix und Thrombozyten bzw. deren Oberflächenproteine im Falle einer Gefäßverletzung<sup>98, 100</sup>.

Eine besondere Eigenschaft von vWF ist dessen Scherkraft-abhängige Konformationsänderung<sup>101</sup>. So liegt es in Ruhe als globuläres Molekül vor, während es sich ab einer bestimmten Scherrate entfaltet und zusammen mit anderen vWF-Molekülen bis zu 1 mm lange Fäden bilden kann<sup>102</sup>. Die elongierte Form ist eine der Voraussetzungen für die Interaktion mit anderen Proteinen und Zellen<sup>103</sup>. Das bietet den Vorteil, dass eine Aktivierung und die dadurch begünstigte Thrombusbildung dann stattfindet, wenn sie auch gebraucht wird; z.B. bei erhöhten Scherkräften durch die Vasokonstriktion vor einer Gefäßverletzung. Doch ist vWF an einer Oberfläche, z.B. aktiviertem Endothel gebunden, findet diese Entfaltung schon bei wesentlich geringeren, physiologischen Scherkräften statt<sup>104</sup>. Das ist von pathophysiologischer Bedeutung, wenn zwar aktiviertes Endothel und eine erhöhte vWF-Konzentration vorliegen, jedoch keine Gerinnselbildung benötigt wird. Von klinischer Relevanz ist dies bei Tumorpatienten: Für bestimmte Tumorentitäten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen erhöhtem vWF-Level und einem gesteigerten Thromboserisiko gezeigt werden<sup>30</sup>. Bei Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen konnte man im Vergleich zu gesundem Gewebe auch lokal in den Tumorgefäßen eine erhöhte Menge, zum Teil sehr großer vWF-Fäden an aktiviertem Endothel nachweisen<sup>105</sup>. Therapeutisch könnte man diese aktiven vWF-Moleküle nutzen, um gezielt dieses veränderte Tumorendothel anzusteuern und somit Wirkstoff direkt an den Ort der gewünschten Wirkung zu transportieren und gleichzeitig gesundes Gewebe zu schonen.

Denn die Inzidenz dieser Tumorentität hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen<sup>106</sup>. Zwar wird ein großer Teil der Fälle in einem frühen Stadium mit relativ guter Prognose diagnostiziert<sup>106</sup>. Doch im fortgeschrittenen, metastasierten Stadium ist die Prognose deutlich schlechter. Hier kommen vor allem systemische Therapien zum Einsatz. Neben der klassischen, schon länger angewandten Chemotherapie existieren neue Wirkstoffe aus dem Kreis der Immuncheckpoint- und Signaltransduktionsinhibitoren. Sie haben eine signifikante Verbesserung der Therapie erbracht, doch auch die

Nebenwirkungsrate ist zum Teil wesentlich höher<sup>107, 108</sup>. Hier besteht noch Verbesserungspotenzial, dem man möglicherweise mit einem aktiven zielgerichteten Transport zum Zielorgan begegnen kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, in unterschiedlichen Experimenten zu untersuchen, ob sich Chi-NK für eine Anwendung als intravenöses Medikament eignen könnten, insbesondere im Hinblick auf eine potentielle Anwendung als zielgerichtete Therapie bei erhöhter vWF-Konzentration in tumoralen Gefäßen wie sie bei Melanomen vorkommen. Hierbei soll die Interaktion der Chi-NK mit HUVECs, die beispielhaft für Endothelzellen verwendet werden, unter statischen und unter physiologischen Flussbedingungen sowie eine möglicherweise induzierte Toxizität im Fokus stehen.

Zunächst soll die Toxizität deskriptiv mittels Immunfluoreszenz-Färbungen und quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Unter Verwendung gängiger Endozytoseinhibitoren soll die Aufnahme der Chi-NK in Endothelzellen näher beleuchtet werden. Anschließend wird die Interaktion zwischen Zellen und Chi-NK unter physiologischen Flussbedingungen mit Hilfe von Flusskammern betrachtet. Abschließend wird die pathologisch erhöhte Konzentration an vWF simuliert, wie sie auch in tumoralen Gefäßen des Melanoms vorkommt, um zum einen die Interaktion zwischen Chi-NK und prokoagulatorischem Endothel und zum anderen diese Endothelzellen als mögliche Zielstruktur im Rahmen von Diagnostik oder Therapie zu untersuchen<sup>34, 105</sup>.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

Nachfolgend eine Übersicht der verwendeten Materialien:

Accutase (PAA, Österreich), bovines Serumalbumin (BSA; GE Healthcare, UK), Gelatine (Sigma Aldrich, USA), 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure-Puffer (HEPES; Sigma Aldrich, USA), Medium (EBM2) und Zusätze (EBM2 Single Quots; beides Lonza, Schweiz), phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“, PBS; Sigma Aldrich, USA), 15ml/50ml-Röhrchen (Falcon, USA), Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, USA), 25cm<sup>2</sup> – Zellkultur-Flaschen (Falcon, USA), 6-/12-/24-/96-Zellkultur-Lochplatten (Falcon, USA).

### 2.2 CHITOSAN-NANOKAPSELN

Die Chi-NK wurden freundlicherweise von Francisco Goycoolea (Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Westfälische Wilhelms Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Chi-NK gliedern sich in drei Bereiche (Abb.2). Der Kern besteht aus Miglykol, einem neutralem Öl. Die äußerste, die Chi-NK umgebende Schicht wird von Chitosan-Molekülen gebildet. Dazwischen liegt eine Schicht aus Lecithin, das den Kontakt zwischen dem Öl und den Chitosanen vermittelt<sup>67,93</sup>. Die Chi-NK haben insgesamt ein Zeta-Potential von ungefähr +60 mV<sup>93</sup>. Das verwendete Chitosan liegt mit einem Acetylierungsgrad von 38,4% eher im hochgradig acetylierten Bereich der Chitosane. Das molekulare Gewicht dieser Substanz beträgt 17,56 kDa, was ungefähr 100 (N-Acetyl-) Glucosamin-Einheiten entspricht.

Hergestellt wurden die Chi-NK wie beschrieben mit leichten Modifikationen gegenüber der ursprünglichen Rezeptur<sup>67,92</sup>.

Nach der Fertigstellung wurden die Chi-NK bis zu Verwendung bei 4°C gelagert und bis zu drei Monate verwendet.

### 2.3 ZELLKULTUR

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um Endothelzellen der Umbilikalvene (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC). Die Zellen werden aus Nabelschnüren wie bereits beschrieben isoliert und konnten sofort verwendet oder bei -180°C in Stickstoff gelagert werden<sup>109, 110</sup>. Eingesetzt wurden die Zellen maximal bis zur dritten Passage.

Das Nährmedium für die Endothelzellen EBM2 wurde mit dem Zusatz EGM2 Single Quots versetzt und vor dem jeweiligen Gebrauch für 20min in einem Wasserbad erwärmt. Alle Arbeitsschritte fanden im Zellkulturraum unter einer Werkbank (Kojair, Finnland) unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellen wurden in mit Gelatine beschichteten 25cm<sup>2</sup>-Zellkultur-Flaschen mit jeweils 5ml Medium in einem Inkubator (Sanyo, Japan) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Das Medium wurde alle ein bis zwei Tage ausgetauscht und die Zellen bei Bedarf bei Konfluenz subkultiviert.

Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit bereits erwärmtem Trypsin-EDTA versetzt und anschließend bis zur Ablösung im Brutschrank inkubiert. Bei vollständiger Ablösung der Zellen wurde das Trypsin mit Medium abgestoppt, die Zellsuspension in ein 15ml-Röhrchen überführt und anschließend für 5min bei 260 rcf (*relative centrifugal force*) zentrifugiert (Hermle, Deutschland). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf zwei

neue, mit Gelatine beschichtete Zellkulturflaschen verteilt. Zur Beschichtung wurden die Zellkultur-Flaschen vor Verwendung für 30 Minuten mit Gelatine inkubiert und anschließend die überstehende Gelatine entfernt. Gezählt wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop vor Resuspendierung.

## 2.4 BESTIMMUNG VON GRÖÖE UND KONZENTRATION DER CHI-NK

Die Bestimmung der Konzentration und Größe der Chi-NK erfolgte mit Hilfe eines Instrumentes (NanoSight NS300, Malvern, USA), bei dem die „Nanoparticle Tracking Analysis“ (~Nanopartikel-Verfolgungsanalyse, NTA) angewendet wird. Dabei wird die Brown'sche Molekularbewegung von Partikeln genutzt, um Größe und Konzentration zu bestimmen. Dazu wird ein Laserstrahl durch die in Lösung (hier PBS) vorliegenden Partikel gesendet, der von diesen gestreut wird. Dieses Streulicht wird genutzt, um die Partikel zu visualisieren und damit die Bewegung der Partikel zu verfolgen. Aus dieser Bewegung und der Stokes-Einstein-Gleichung kann anschließend der hydrodynamische Durchmesser berechnet werden. Die Messung erfolgte im DKFZ Heidelberg. Die Aufnahmezeit betrug dabei 6\*45 Sekunden.

## 2.5 EPIFLUORESZENZMIKROSKOPIE

### 2.5.1 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden 12-Lochplatten mit Deckgläschen (Durchmesser 20mm; Hecht Assistent, Deutschland) bestückt und mit Gelatine beschichtet. Nach einer halben Stunde wurde die verbleibende Gelatine entfernt und circa 200.000 Zellen/ Kavität ausgesät.

Bei Konfluenz wurde das Medium entfernt und je nach Versuchsbedingungen mit in Medium verdünnten Chi-NK in verschiedenen Konzentrationen für unterschiedliche lange Zeit im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium mit den Chi-NK entfernt und die Zellen anschließend mit 4%igem PFA (Electron Microscopy Sciences, USA) in HEPES für 1 Stunde bei -20°C fixiert. Nach 3-maligem Waschen mit HEPES wurden die Zellen mit 2%igem BSA in Inkubationspuffer, bestehend aus 0,3% Triton-X (Sigma Aldrich, USA) und 0,1%BSA in HEPES, für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 300 µl/ Kavität des ersten Antikörpers hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im vorliegenden Fall war das ein 1:400 in Inkubationspuffer verdünnter Maus-anti-CD31-Antikörper (Dako, USA). Nach dem nächsten Waschschrift wurden jeweils 300 µl/Kavität des zweiten Antikörpers und des mit GFP (*green fluorescent protein*)-fusioniertem Chitosan-affinity-protein (CAP)<sup>35</sup> hinzugefügt. Beim zweiten Antikörper handelte es sich um den fluoreszierenden Alexa-555 Ziege-anti-Maus-Antikörper (Thermo Fisher Scientific, USA), der ebenfalls 1:400 in Inkubationspuffer verdünnt wurde. Nach dem letzten Waschschrift, diesmal nur einmal durchgeführt, wurden 300 µl/Kavität 1:1000 in Inkubationspuffer verdünntem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Sigma Aldrich, USA) hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dieser Schritt ermöglicht die Darstellung des Zellkerns. Jetzt folgte 5-maliges Waschen mit Inkubationspuffer und ein letzter Waschschrift mit destilliertem Wasser. Dann konnten die Deckgläschen entnommen, mit 10 µl DABCO-Mowiol (Sigma-Aldrich, USA) versetzt und auf Objektträger (Thermo Fisher Scientific, USA) gesetzt werden. Die Gläschen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.5.2 VISUALISIERUNG

Die Proben wurden spätestens drei Wochen nach erfolgter Färbung mithilfe eines Mikroskops mit Ölimmersionsobjektiv (Observer Z1, Zeiss, Deutschland) und dem dazugehörigen Programm ZEN (Version 2012) untersucht. Je Deckglas wurden mindestens fünf Bilder mit einer Mikroskopkamera (Axio-Cam, Zeiss, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die strukturiert beleuchtete Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Beleuchtungssystem Apotome (Zeiss, Deutschland) durchgeführt, ebenfalls mit dem Programm ZEN verarbeitet und zu einem 3D-Bild verrechnet.

Die Abbildungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit ImageJ (Version 1.50i; National Institute of Health, USA) erstellt.

### 2.5.3 QUANTIFIZIERUNG

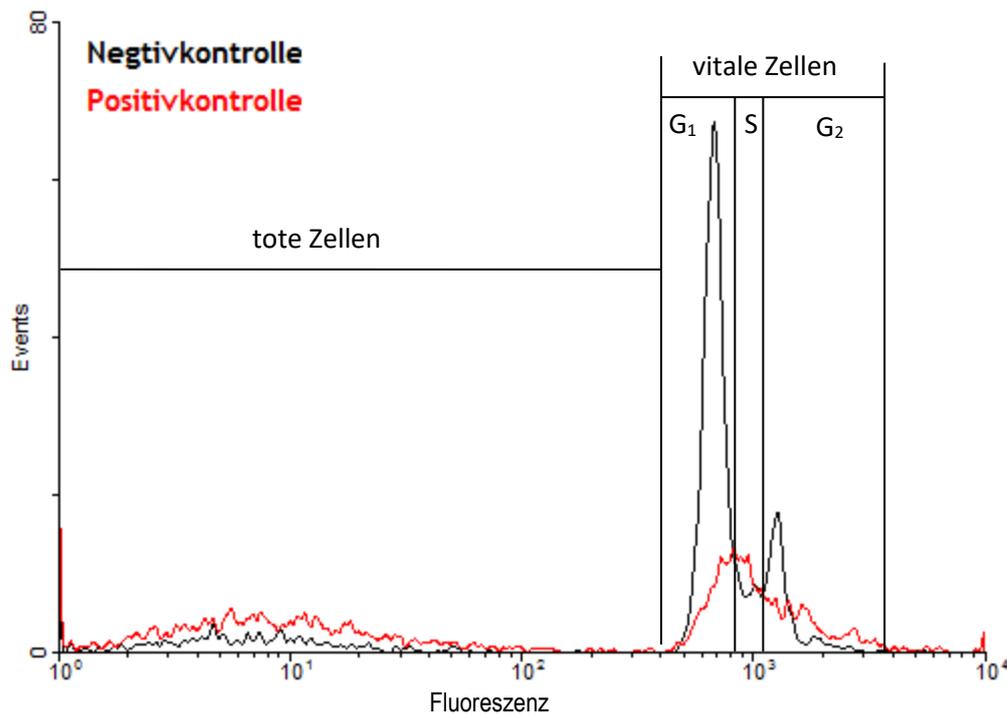
Eine Quantifizierung der Chi-NK war durch eine Auswertung der Bilder mit Hilfe der Programmes ImageJ möglich. Dazu wurden einzelne Zellen markiert und der Grauwert des Kanals, in dem die Chi-NK belichtete wurden bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

Die Belichtungszeiten betragen jeweils 1200 ms (Alexa555, rot), 350 ms (CAP-GFP, grün) und 25 ms (DAPI, blau).

## 2.6 TOXIZITÄTSMESSUNG MIT PROPIDIUM-IODID

Für die Toxizitätsmessung wurden die Zellen mit Propidium-Iodid (PI) behandelt, eine fluoreszierende Substanz, die in DNA interkaliert. Mit steigendem DNA-Gehalt wird eine erhöhte Fluoreszenz pro Zelle gemessen. So kann der Anteil an vitalen Zellen, also mit vollständigem DNA-Gehalt, anhand der Fluoreszenz bestimmt werden.

Dafür wurden etwa 400.000 Zellen in mit Gelatine vorinkubierten 6-Lochplatten bis zur Konfluenz angereichert. Anschließend wurde das Medium entfernt und verschiedene Konzentrationen an Chi-NK in Medium mit einem Gesamtvolumen von 2 ml hinzugefügt. Eine weitere Probe wurde mit in Medium verdünntem 1µM Staurosporin (Sigma Aldrich, USA) inkubiert. Diese Substanz, die bei Endothelzellen eine Apoptose auslöst wird als Positivkontrolle verwendet. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und nach dem Abstoppen mit Medium in ein 5ml-Rundboden-Röhrchen (Falcon, USA) überführt. Nach einer 2-maligen jeweils 5-minütigen Zentrifugation bei 269 rcf wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 1ml 96%-igem Ethanol (Carl Roth, Deutschland) versetzt. Abschließend wurden die Zellen bei -20°C für 15 Minuten fixiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation mit Entfernung des Überstandes und Resuspendieren der Zellen in 1ml PBS. Etwa 20 Minuten vor der eigentlichen Analyse in der Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit einer 3µMPI-Lösung versetzt. Dazu wurde eine 1,5mM PI Stammlösung (Sigma Aldrich, USA) 1:500 in HEPES und 0,1% Nonident P-40 (Sigma Aldrich, USA) verdünnt. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit einem Durchflusszytometer (Canto II, BD, USA) durchgeführt. Es wurden jeweils 10.000 Zellen bei einer Durchflussrate von 12µ/min untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem dazugehörigen Programm BD FACSDiva als Histogramm. Darin entsprechen die zwei Intensitätsmaxima dem einfachen (G1-Phase) und dem doppelten DNA-Gehalt (G2-Phase) und damit den entsprechenden Zellzyklen. Der Anteil mit mindestens einfachem DNA-Gehalt (G1, S, G2) wurde markiert und die Anzahl der Ereignisse bestimmt (Abb. 3)<sup>111</sup>. Mit Hilfe von GraphPadPrism (Version 6, GraphPadPrism Software Inc., USA) wurden die Werte analysiert und dargestellt.



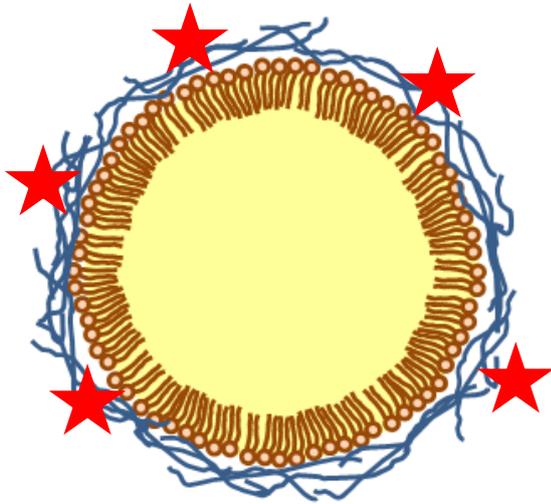
**Abbildung 10** Histogramm von Negativkontrolle (keine Chi-NK, nur Medium) und Positivkontrolle (Medium und Staursporin). Eingezeichnet sind G<sub>1</sub>-Phase (erster Gipfel, einfacher DNA-Gehalt), S-Phase und G<sub>2</sub>-Phase (zweiter Gipfel, doppelter DNA-Gehalt). Die Anzahl der toten Zellen links wurde dem der vitalen Zellen im rechten Feld gegenübergestellt.

## 2.7 QUANTIFIZIERUNG DER CHI-NK-AUFNAHME IN DIE ZELLE

Um den intrazellulären Gehalt von Chi-NK der Zellen für unterschiedliche Fragestellungen zu quantifizieren, wurden Zellen mit dem fluoreszierendem 5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC; Thermo Fisher Scientific, USA) markierten Chi-NK inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Dabei kam die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zum Einsatz, bei der zusätzlich zur Granularität und Größe auch die Fluoreszenz einer Zelle bestimmt werden kann.

### 2.7.1 MARKIERUNG

Die Markierung der Chi-NK erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC ( $\lambda=576\text{nm}$ ). Dafür wurde die kovalente Bindung der Aminogruppen des Chitosans mit der Carboxylgruppen/Isothiocyanat-Gruppe der TRITC-Moleküle genutzt. Diese Möglichkeit wurde bereits in ähnlicher Form für Fluoreszin beschrieben<sup>112</sup>. Dazu wurden 0,01  $\mu\text{l}$  TRITC mit 100  $\mu\text{l}$  Chi-NK und 900  $\mu\text{l}$  PBS für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal in einem Zentrifugen-Filter (Ultracel YM-10 und Microcon-10; Merck Milipore, Irland) zentrifugiert bis das Eluat klar war.



**Abbildung 11** Skizze eines TRITC-markierten Chi-NK (nicht maßstabsgetreu). Gelb = lipophiler Kern aus Miglykol, dunkelrot = Lecithin, blau = Hülle aus Chitosan-Molekülen, roter Stern = TRITC.

### 2.7.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

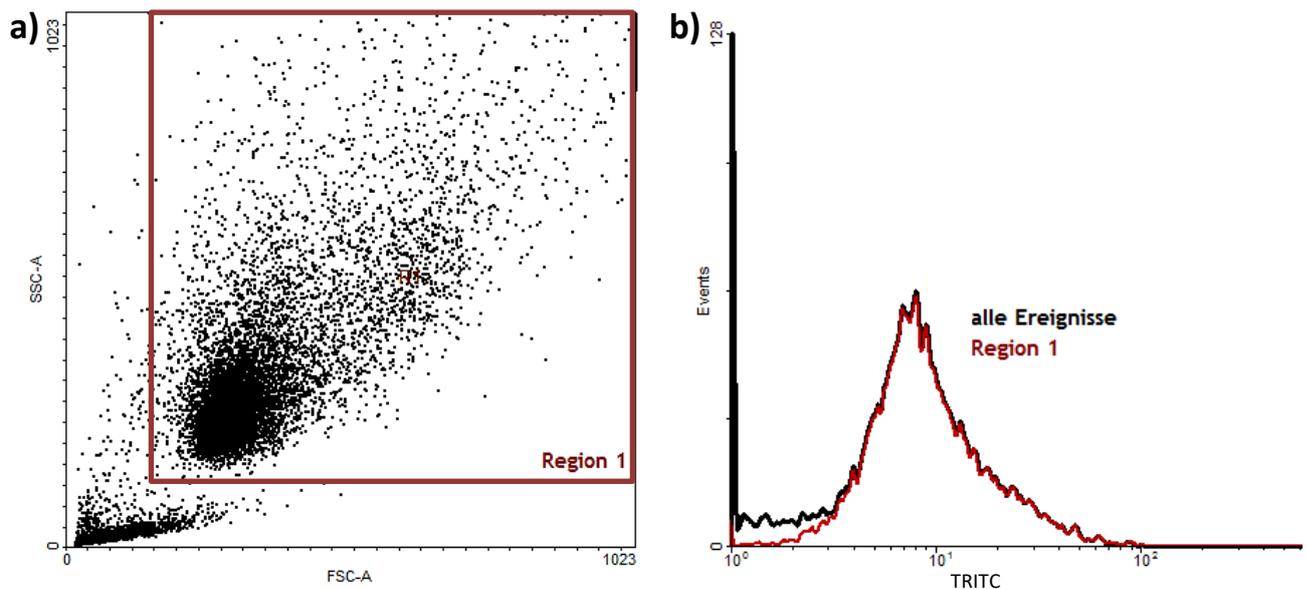
Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit einem (Canto II, BD, USA) durchgeführt.

Um eine erhöhte Fluoreszenz der Zellen verursacht durch die Zugabe von TRITC auszuschließen, wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen wie in den nachfolgenden Versuchen mit den Chi-NK mit TRITC inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Eine erhöhte Fluoreszenz konnte dabei nicht festgestellt werden, sodass bei einer steigenden Fluoreszenz von einer erhöhten Aufnahme von Chi-NK ausgegangen werden kann.

Im Folgenden wird das Vorgehen bei durchflusszytometrischer Untersuchung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit sowie der Inhibition der Endozytose der Chi-NK beschrieben. Von der, wie im jeweiligen Absatz erläutert, vorbereiteten Zell-Suspension wurden jeweils 10.000 Zellen bei einer Durchflussrate von 12  $\mu\text{l}/\text{min}$  analysiert.

### 2.7.3 BERECHNUNG

Die Auswertung erfolgte mit dem zum System gehörigem Programm BD FACSDica (Version 6.1.1). Zunächst wurde in einem DotBlot Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC) gegen Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC) aufgetragen (Abb. 5a). Dort wurden alle Ereignisse markiert, mit Ausnahme des Bereiches mit niedrigen FSC und SSC-Werten, um tote Zellen und Zellreste von der Analyse auszuschließen (in Abb. 5a mit „Region1“ bezeichnet). Von diesem markierten Bereich wurden die vom Programm erfasste Anzahl der Ereignisse und die mittlere TRITC-Fluoreszenz pro Ereignis für die Quantifizierung berücksichtigt (Abb.5b). Das Prinzip besteht darin, dass mit steigender Anzahl aufgenommener Chi-NK, die mittlere Fluoreszenz der Zellpopulation zunimmt. Anschließend wird das Produkt aus Anzahl und mittlerer Fluoreszenz gebildet. Das Produkt der unterschiedlichen Proben wird wiederum ins Verhältnis zum Produkt der Negativkontrolle gesetzt und so eine normalisierte Fluoreszenz ermittelt.



**Abbildung 12** Streudiagramm (a) und Histogramm (b) (beispielhaft) der Zellen nach Inkubation mit TRITC-markierten Chi-NK. Nach Markierung der relevanten Ereignisse im Streudiagramm, erhält man die zugehörige Kurve im Histogramm. Je mehr Chi-NK endozytiert worden sind, desto höher ist die gemessene Fluoreszenz. Um verschiedene Proben vergleichen zu können wurde die mittlere Fluoreszenz des gesamten Probe berechnet und anschließend ins Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt.

Die Darstellung in Form übereinander liegender Histogramme erfolgte unter Verwendung des Programmes WinMDI (Version 2.8; The Scripps Institute, USA). Die Auswertung und Darstellung wurde mit GraphPadPrism durchgeführt.

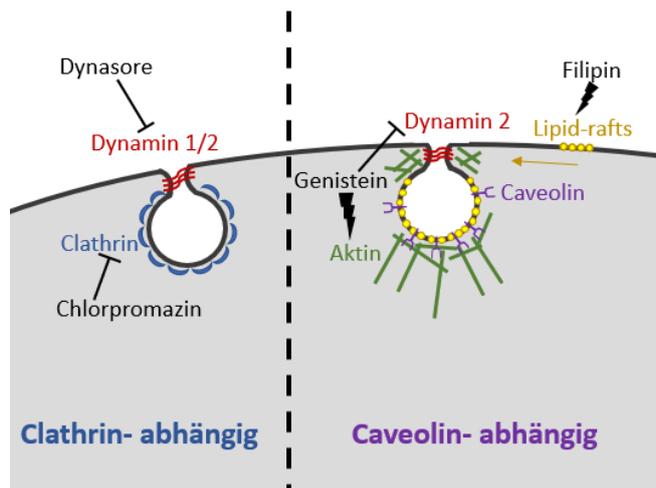
## 2.8 ENDOZYTOSE-KINETIK

Für die Untersuchung der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Endozytose wurden etwa 100.000 Zellen in mit Gelatine vorinkubierten 24-Lochplatten ausgesät. Bei Konfluenz wurden Chi-NK in Medium verdünnt in unterschiedlichen Konzentrationen für 6 Stunden oder  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml für unterschiedlich lange Zeiträume hinzugefügt und anschließend im Brutschrank inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase abgelöst. Bei vollständiger Ablösung der Zelle wurde die Reaktion mit Medium gestoppt und die Zellsuspension in 5ml-Rundboden-Röhrchen (Falcon, USA) umgefüllt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 260 rcf wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 2ml HEPES resuspendiert. Die Proben wurden bis zu durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gelagert.

## 2.9 ENDOZYTÖSE-INHIBITION

Für die Inhibition der Endozytose von Chi-NK wurden vier verschiedene Substanzen verwendet (Abb. 6; alles Sigma Aldrich, USA):

- Chlorpromazin ist eine häufig für die Blockierung der Endozytose verwendete Substanz. Es hemmt die Clathrin-Formierung, die notwendig ist, ein Clathrin-umhülltes Endosom zu bilden<sup>113</sup>.
- Ein zweiter, neuerer Inhibitor dieses Endozytoseweges ist Dynasore. Dynasore greift allerdings nicht direkt am Clathrin an, sondern verhindert die Aufnahme über die Blockierung von Dynamin, was essenziell für die Abschnürung des Endosoms von der Zellmembran ist<sup>114</sup>.
- Filipin ist wiederum bekannt für die Blockierung der Caveolin-abhängige Endozytose<sup>115</sup>. Es stört die Bildung von Cholesterol-Ansammlungen in der Zellmembran, die für die Caveolin-vermittelte Endozytose unabdingbar ist<sup>116</sup>.
- Genistein ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der zum einen die Depolymerisation des Aktin-Netzwerkes stört und zum anderen Dynamin II blockiert. Beide Faktoren sind wesentlich für die Aufnahme über den Caveolin-abhängigen Weg<sup>117,118,119,120</sup>. Er wird häufig zur Inhibition des Caveolin-abhängigen Aufnahmeweges verwendet<sup>120</sup>.



**Abbildung 13** Schematische Darstellung der verwendeten Endozytose-Inhibitoren. Dynasore hemmt Dynamin 1/2; Chlorpromazin stört die Clathrin-Formierung; Filipin verhindert die Zusammenlagerung des Cholesterol zu lipid rafts; Genistein hemmt die Aktin-Depolymerisation und zudem Dynamin 2

### 2.9.1 WST1-ASSAY DER INHIBITOREN

HUVECs wurden in einer mit Gelatine vorinkubierten 96-Lochplatte ausgesät und drei Tage bebrütet. Im Anschluss wurden die Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich dabei an anderen Arbeiten mit Endozytose-Inhibitoren. Nach vier Stunden wurde 20µl/ Kavität WST1-Reagenz (Roche, Deutschland) dazugegeben (1:10 Verdünnung) und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde der Gehalt an dunkelrotem Formazan, als Korrelat eines intakten Zellstoffwechsels, spektralphotometrisch (PowerWave XS2, BioTek, USA) bei einer Wellenlänge von 420nm, bestimmt.

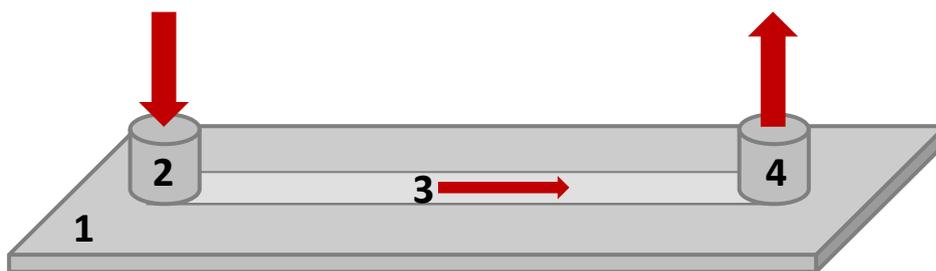
### 2.9.2 HEMMUNG DER AUFNAHME VON CHI-NK

Für die eigentliche Inhibition wurden etwa 100.000 Zellen/Kavität in eine mit Gelatine vorinkubierten 24-Lochplatte ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Zellen zunächst mit dem jeweiligen Inhibitor für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgte die Stimulation der Zellen mit  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml für 6 Stunden. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase abgelöst. Wenn sich die Zelle vollständig abgelöst hatte, wurde die Reaktion mit Medium gestoppt und

die Zellsuspension in 5ml-Rundboden-Röhrchen (Falcon, USA) überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 260 rcf wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 2ml HEPES resuspendiert. Die Proben wurden bis zu durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gelagert.

## 2.10 MIKROFLUIDISCHE FLUSSKAMMERN

Für die Versuche unter Flussbedingungen wurden spezielle Flusskammern verwendet ( $\mu$ -Slides I<sup>0,2</sup> Luer, ibidi, Deutschland; Abb. 7). Dabei handelt es sich um Kunststoff-Objektträger, in dem ein Flusskanal integriert ist (Wachstumsfläche: 50\*5mm, Volumen: 50 $\mu$ l). Jeweils am Ende des Kanals befindet sich eine nach oben führende Einfüll- bzw. Auslassöffnung. Dort kann die Kammer befüllt oder im Versuch an das Pumpsystem angeschlossen werden.



**Abbildung 14** Skizze einer Flusskammer. 1) Objektträger 2) Einfüllung: Hier wird die Mischung aus Medium, Chi-NK und Erythrozyten eingefüllt. 3) integrierter, geschlossener Flusskanal mit konfluenten HUVECs. Der rote Pfeil gibt die Flussrichtung an. 4) Auslass.

Die Flüssigkeiten wurden mit einer Pipette eingefüllt, wobei die Pipettenspitze den Boden des Kanals an dem Kanal zugewandten Seite der Einfüllöffnung berührte. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die Kammer blasenfrei befüllt wurde.

Zunächst wurde der Kanal mit Gelatine befüllt und für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde die überstehende Gelatine durch equilibriertes Medium ersetzt, um die Bildung von Luftblasen im Kanal zu vermeiden. Um das zu erreichen wurde zunächst die Gelatine durch die Auslassöffnung des Kanals abgesaugt, ohne den Kanal selbst zu leeren. Anschließend wurde auf der anderen Kanalseite Medium eingefüllt und der Objektträger so gekippt, dass die Flüssigkeit Richtung Auslass fließen kann, sodass auf dieser Seite die Flüssigkeit wieder abgenommen werden konnte. Danach wurde erneut Medium durch die Einfüllöffnung eingefüllt. Dieser Vorgang wurde drei bis vier Mal wiederholt bis der jetzt mit Gelatine beschichteter Kanal ganz mit Medium gefüllt war.

Im nächsten Schritt wurden circa 200.000 HUVECs in Suspension pro Flusskanal eingefüllt. Dies geschah nach dem gleichen Prinzip wie bereits beschrieben. Die Zellen wurden unter täglichem Mediumwechsel für drei Tage kultiviert.

Das Pumpsystem erfordert ein Flüssigkeitsvolumen von 4ml. Für das Experiment wurden zusätzlich Erythrozyten hinzugefügt, da bekannt ist, dass die roten Blutzellen Einfluss auf die Verteilung von NP im Blutgefäß haben<sup>55</sup>. Bei einem Sollvolumen von 4ml ergab sich folgende Mischung: 2ml Erythrozyten (entspricht einem Hämatokrit von 50%), 12,5 $\mu$ l Chi-NK ( $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml), BSA 320 $\mu$ g (entspricht einem Proteingehalt von 80g/l), 2ml HEPES. Für die Flussversuche mit stimulierten Endothelzellen und erhöhter vWF-Konzentration wurde zusätzlich 20  $\mu$ l Histamin zur Mischung hinzugefügt.

Die Erythrozyten wurden aus Vollblut gewonnen. Dafür wurde Vollblut in Citrat-Röhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Deutschland) abgenommen, anschließend in 50ml-Röhrchen umgefüllt und zentrifugiert (10 Minuten, 2000rcf, ohne Bremse). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Volumen mit

HEPES wieder auf 50ml ergänzt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang so oft wiederholt bis der Überstand klar wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Volumen nicht erneut aufgefüllt, sodass eine konzentrierte Erythrozytensuspension übrigblieb.

Die Schläuche des Pumpsystems (ibidi, Deutschland) wurden zunächst mit HEPES gespült und anschließend durch Chi-NK-Mischung ersetzt. Auch hier wurde auf die blasenfreie Einfüllung geachtet. Im Inkubationsschrank bei 37°C (Skadi Europe, Niederlande) wurde das System an die Flusskammer und die Pumpe (ibidi, Deutschland) angeschlossen und über das Programm PumpControl (ibidi, Deutschland) gesteuert. Dann wurde ein unidirektionaler Fluss mit der Scherkraft von 6 dyne/cm<sup>2</sup> angelegt. Nach 30 Minuten wurde der Fluss wieder abgeschaltet, der Objektträger wie oben beschrieben immunfluoreszierend gefärbt und anschließen visualisiert. Im Falle der Histamin-Stimulation wurden die Zellkerne wie beschrieben mit DAPI gefärbt, die vWF-Fäden mit Kaninchen-anti-humanes vWF-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) und FITC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (BDPharmingen, USA).

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 QUANTIFIZIERUNG UND GRÖßENBESTIMMUNG

Zunächst wurde mittels NTA die hydrodynamische Größe, die Konzentration und die Stabilität der Chi-NK bestimmt. Getestet wurden drei unterschiedliche Chi-NK-Lösungen, die sich entweder im Verdünnungsgrad und/ oder in der Lagerungsdauer (in Wasser bei 4°C) unterschieden. Demnach beträgt die mittlere Größe einer Chi-NK in Lösung etwa 111,13 nm. Anhand der ermittelten Konzentrationen wurde die ursprüngliche Konzentration der Ausgangslösung errechnet, sie liegt bei  $104,3 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml.

Lagerdauer	Verdünnung	Größe [nm]	SD [nm]
12 Wochen	1:400.000	108,5	36,6
1 Woche	1:100.000	112,6	46,1
1 Woche	1:100.000	112,1	50,7

**Tabelle 1 Größenbestimmung der Chi-NK mittels NTA.** Die Größe verändert sich über die Zeit nicht signifikant.

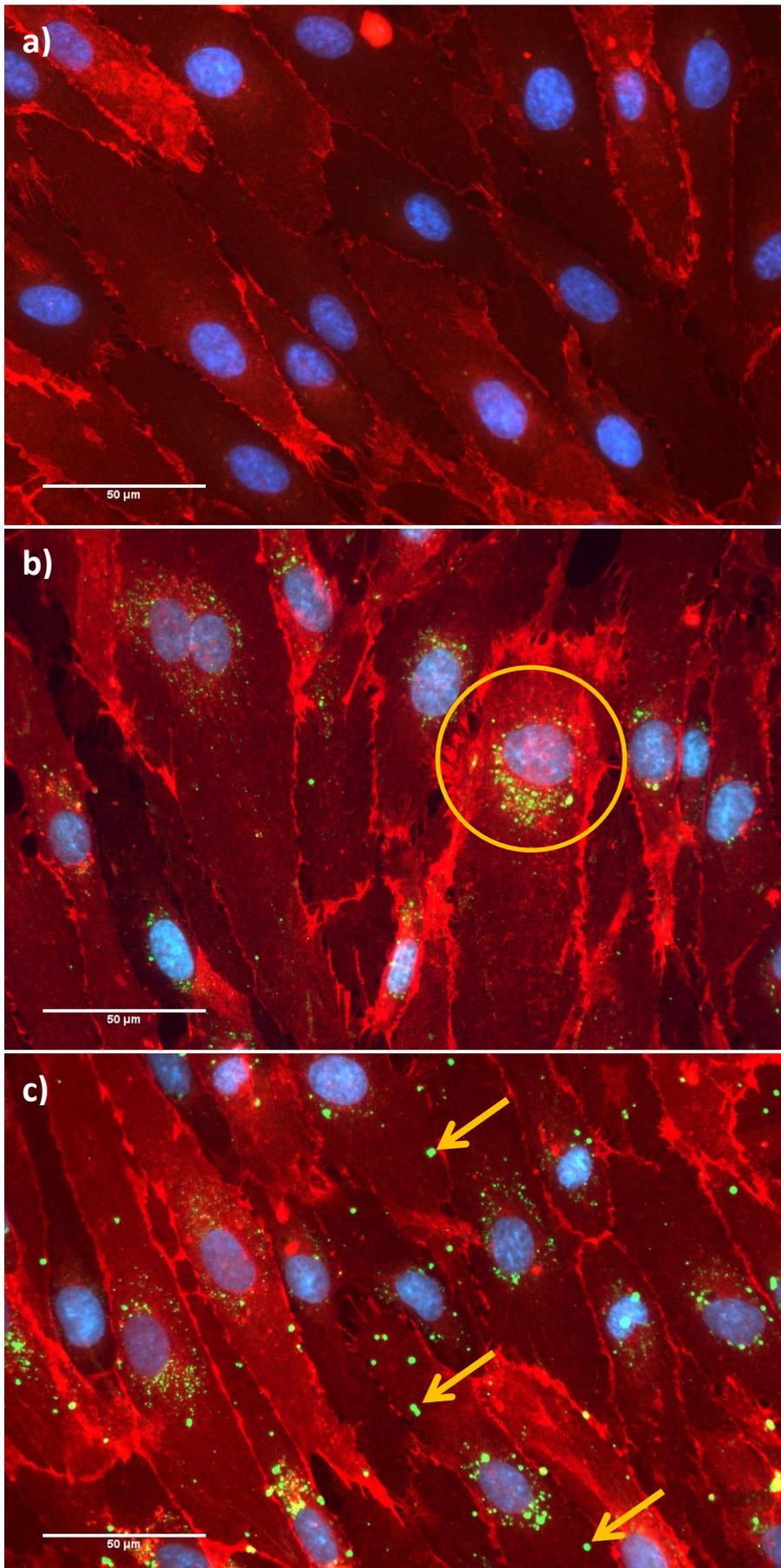
### 3.2 TOXIZITÄT

Um bei nachfolgenden Untersuchungen ein Verfälschen der Ergebnisse durch toxische Effekte der Chi-NK auf Endothelzellen zu vermeiden, wurde eine nicht-toxische Konzentration an Chi-NK ermittelt. Dazu erfolgte zunächst die Toxizitäts-Bestimmung nach morphologischen Aspekten mittels Immunfluoreszenz-Färbungen. HUVECs wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chi-NK inkubiert ( $0,16 \cdot 10^{12}$ - $2,61 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml). Anschließend wurden die CD-31-vermittelten Zell-Zell-Kontakte, die Zellkerne und die Chi-NK gefärbt.

Die Negativkontrolle (Abb. 8a), das heißt Proben ohne Behandlung mit Chi-NK, zeigt einen konfluenten Zellverband, in dem die Zellen klar voneinander abzugrenzen sind. Die mit roter Fluoreszenz markierten Zell-Zell Kontakte sind gleichmäßig ausgebildet und die mit DAPI markierte DNA grenzt den Zellkern klar vom Zytoplasma ab. Der Zellkern ist gleichmäßig gefärbt und weist die typische rundliche Form auf.

Bei den niedrigeren Chi-NK-Konzentrationen  $0,16 \cdot 10^{12}$  bis  $0,65 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml findet sich ein ähnliches Bild wie bei der Negativkontrolle (Abb. 8b, c; 9a). Die Zellen und Zellkerne weisen eine regelmäßige Form auf und sind gut von Umgebungsstrukturen abgrenzbar. Die Zell-Zell-Kontakte sind klar ausgebildet. Im Gegensatz zur Negativkontrolle, sind die grün markierten Chi-NK als kleine rundliche Strukturen dosisabhängig sichtbar. Bei  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml finden sich zudem vermehrt größere rundliche, grün fluoreszierende Strukturen, als Zeichen einer möglichen Zusammenlagerung von Chi-NK (Abb. 8c).

Anders dagegen verhält es sich bei den Konzentrationen ab  $1,3 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml und höher (Abb. 9b,c). Hier sind die Zellgrenzen nicht mehr klar zu erkennen, die Zellen liegen größtenteils vereinzelt vor. Das CD31 ist nicht mehr vermehrt an den Zellgrenzen lokalisiert, sondern unregelmäßig über den gesamten Zellkörper verteilt. Dies weist auf verminderte Zell-Zell-Kontakte hin. Der Kern und die Zellen sind im Vergleich zur Negativkontrolle kleiner. Die Chi-NK befinden sich überwiegend außerhalb der Zellgrenzen zwischen benachbarten Zellen.



**Abbildung 8** Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nah Stimulation mit Chi-NK in niedrigeren Konzentrationen, Inkubationszeit 24h, unterschiedliche Konzentrationen.

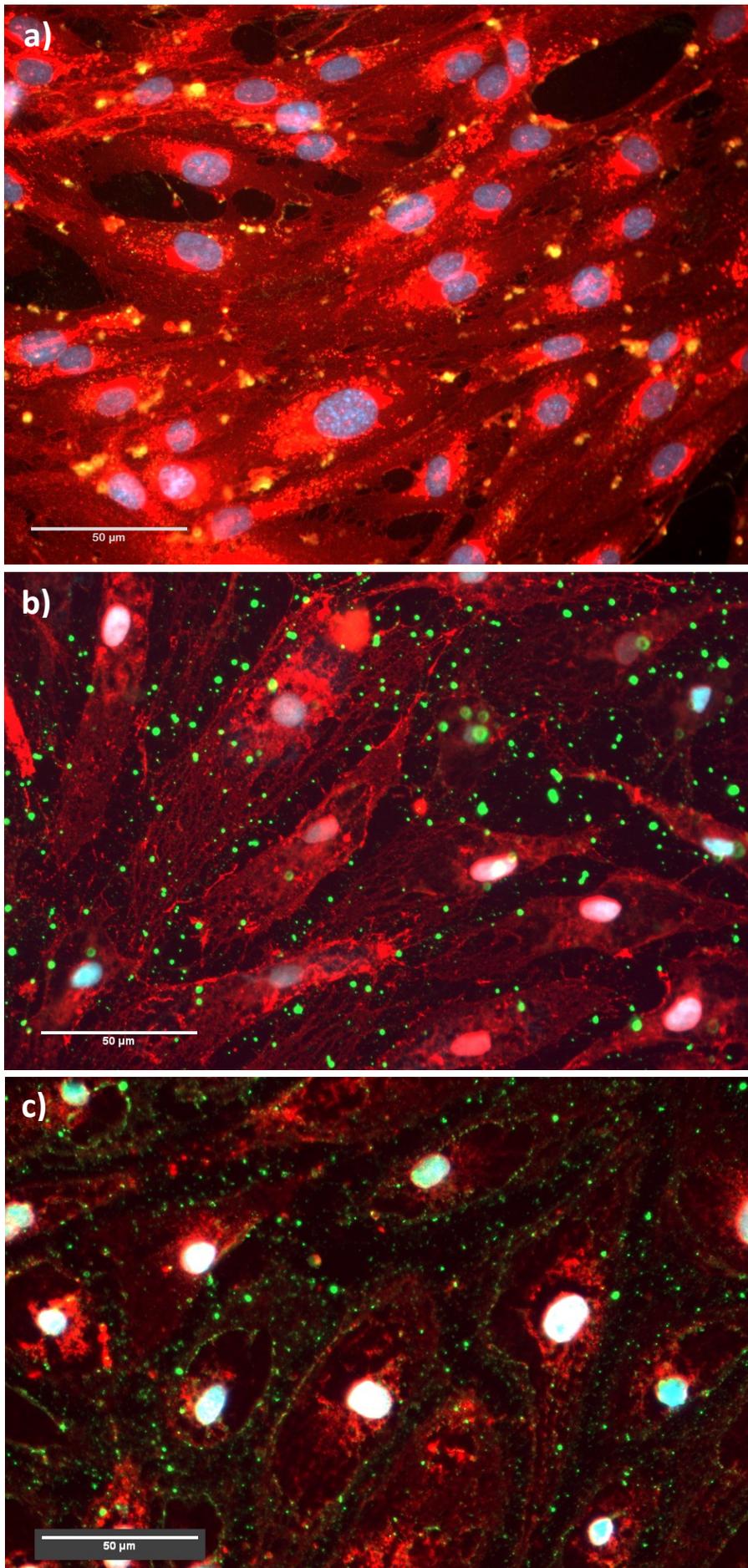
**a)** Negativkontrolle.

**b)**  $0,16 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml

**c)**  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml

Färbung der Zelloberfläche mit Alexa-555 (rot), des Zellkerns mit DAPI (blau) und der Chi-NK mit CAP (grün).

Die Zellen weisen in b + c keine relevanten, morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Die Chi-NK akkumulieren perinukleär (beispielhaft: gelber Kreis in b). Bei der höheren Konzentration finden sich zunehmend größere, rundliche grün fluoreszierende Strukturen, als Zeichen einer möglichen Zusammenlagerung von Chi-NK (gelbe Pfeile in c)



**Abbildung 9** Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach Stimulation mit Chi-NK in höheren Konzentrationen, Inkubationszeit 24h, unterschiedliche Konzentrationen a)  $0,65 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml. b)  $1,30 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml. c)  $2,61 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml

Färbung der Zelloberfläche mit Alexa-555 (rot), des Zellkerns mit DAPI (blau) und der Chi-NK mit CAP (grün). In a) sind kaum morphologische Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar, lediglich die Chi-NK lagern sich in größeren Strukturen zusammen. In b + c sind nicht mehr abgrenzbare Zellgrenzen und Verlust der Zell-Zell-Kontakte als morphologische Veränderung bei hohen Konzentrationen an Chi-NK sichtbar. Die Chi-NK befinden sich zudem überwiegend außerhalb der Zellgrenzen zwischen benachbarten Zellen und bilden größere Konglomerate.

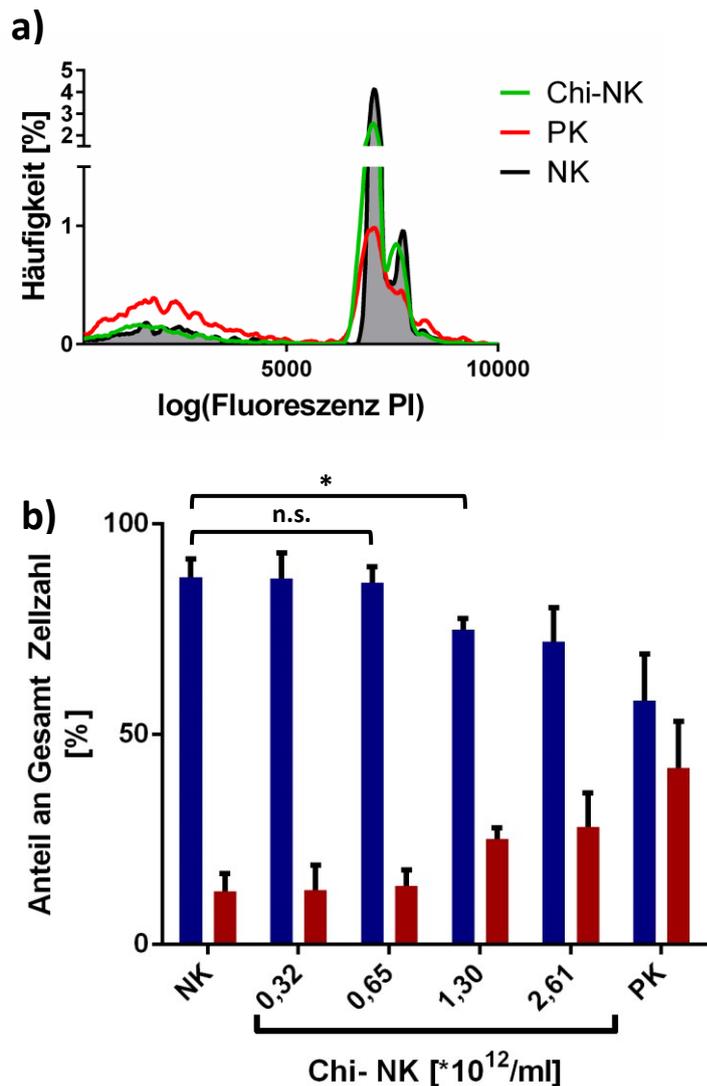
Um einen zytotoxischen Effekt zu quantifizieren wurden zeitgleich bei identischen Konzentrationen und Inkubationszeiten (24h) unterschiedliche Zytotoxizitätsmessungen vorgenommen.

Der zuerst durchgeführte WST1-Test brachte keine verwertbaren Ergebnisse. Dieser Test beruht auf der Umwandlung des Tetrazolium-Salz WST-1 zum Formazan bei intaktem Zellstoffwechsel. Die Menge des gebildeten Formazans wird photometrisch bei 450nm bestimmt. Im Falle einer Zellschädigung ist mit einer geringeren optischen Dichte zu rechnen. Bei der Positivkontrolle mit Triton-X war das auch der Fall, während bei zunehmender Chi-NK-Konzentration die optische Dichte zunahm. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die durch Chi-NK-bedingte Lichtstreuung sein, die mit der Messung der Lichtabsorption interferiert.

Um eine Verfälschung der Testergebnisse zu vermeiden, wurde deshalb ein Untersuchungsverfahren eingesetzt, das nicht auf der Messung der Lichtabsorption beruht. Bei diesem Verfahren wird die zelluläre DNA mittels dem fluoreszierenden PI markiert. Der Gehalt an DNA pro Zelle zur Beurteilung der Zellvitalität wird dann mittels Durchflusszytometrie gemessen. (Abb. 10) Die Inkubation der Zellen mit Staurosporin diente hier als Positivkontrolle.

Im Histogramm der Negativkontrolle erkennt man drei Zellpopulationen, die sich in ihrem DNA-Gehalt unterscheiden (Abb. 10a). Die häufigste Zellpopulation (höchster Peak) entspricht einer Population mit einfachem DNA-Gehalt (G1-Phase). Der zweite, kleinere, aber deutlich erkennbare Gipfel entspricht Zellen mit doppeltem Gehalt an DNA (G2-Phase). Zellen, die sich in der S-Phase befinden zeichnen sich durch eine intermediäre Fluoreszenz aus und liegen im Histogramm zwischen G1- und G2-Phase-Zellen. Die weniger stark fluoreszieren als die mit einfachem DNA-Gehalt werden hier als nicht vital gewertet.

In der Negativkontrolle liegt der Anteil toter Zellen bei  $12,6 \pm 3,5$  %. Bei den niedrigeren Chi-NK-Konzentrationen ( $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml und  $0,65 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) ist die Menge an vitalen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant unterschiedlich (p-Wert respektive 0,32 und 0,35). Bei einer Konzentration von  $1,3 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml nimmt der Anteil auf  $25,1 \pm 2,1$ % ( $1,3 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) bzw.  $27,9 \pm 6,6$  % ( $2,61 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) zu (p-Wert respektive 0,0063 und 0,0222). Außerdem zeigen auch die Histogramme der mit Chi-NK in niedrigen Konzentrationen ( $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml und  $0,16 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) behandelten Zellen zwei voneinander abgrenzbare Gipfel, sodass von einem Zellzyklus ausgegangen werden kann, der nicht wesentlich von den Chi-NK beeinflusst wird (Abb. 10b).



**Abbildung 10. Durchflusszytometrie nach PI-Färbung von mit Chi-NK stimulierten HUVECs. a) Histogramm der** Negativkontrolle (NK, schwarz),  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml (Chi-NK, grün) und Positivkontrolle (PK, rot). Erhaltene zwei Intensitätsmaxima als Zeichen für unbeeinträchtigten Zellzyklus sowie zunehmender Anteil an Zellen mit verringerter Fluoreszenz als Zeichen einer erhöhten Anzahl an toten Zellen. **b) Anteil der vitalen (blau) bzw. toter (rot) Zellen an der Gesamtpopulation bei unterschiedlichen Konzentrationen.** NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle. Zunehmende Toxizität bei steigenden Konzentrationen. Der Anteil vitaler Zellen bei den beiden niedrigeren Konzentrationen ist nicht signifikant geringer als bei der Negativkontrolle, ab einer Konzentration von  $1,3 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml ist der Unterschied signifikant.

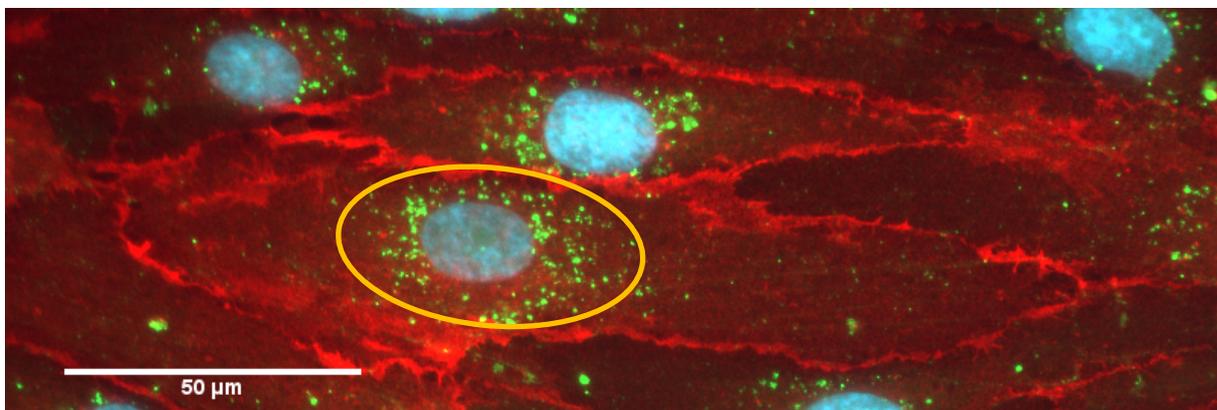
In der Zusammenschau der Immunfluoreszenz-Färbungen und der durchflusszytometrischen Untersuchung der PI-gefärbten Zellen kann also bei Konzentrationen von  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml und niedriger von einer nicht-toxischen Konzentration ausgegangen werden.

### 3.3 INTERAKTION ZWISCHEN CHI-NK UND HUVECS UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN

Alle folgenden Untersuchungen wurden unter statischen Bedingungen und mit einer, wie in der vorangehenden Toxizitätsmessung beschrieben, nicht-toxischer Konzentration von  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml durchgeführt.

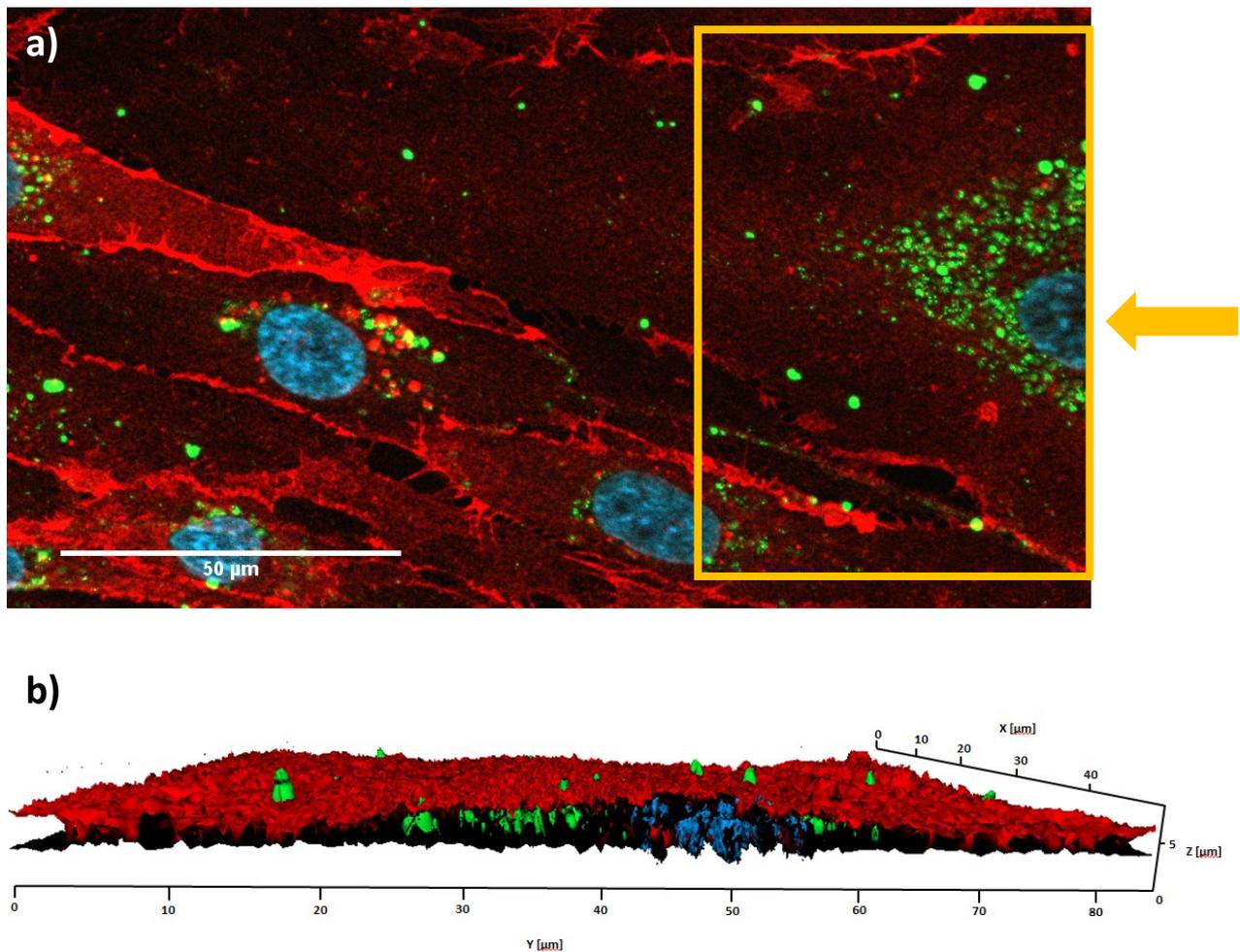
#### 3.3.1 LOKALISATION IN DER ZELLE

Die Interaktion zwischen Zelle und Chi-NK wurde durch Fluoreszenz-Mikroskopie weiter spezifiziert. In Analogie zum Abschnitt 3.2 wurden die Zellen für 24 Stunden mit Chi-NK inkubiert und anschließend immunfluoreszierend gefärbt. In der Epifluoreszenz-Mikroskopie ist zu erkennen, dass die Chi-NK überwiegend in der den Zellkern umgebenden (perinukleären) Region akkumulieren und sich nur wenige Chi-NK in der Peripherie finden (Abb. 11).



**Abbildung 11. Perinukleäre Akkumulation der Chi-NK in HUVECs, Konzentration  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml, Inkubationszeit 24h.** Die Zelloberfläche ist mit Alexa-555 konjugierten gegen CD31 gerichteten Antikörpern (rot), der Zellkern mit DAPI (blau) und die Chi-NK mit einem sfGFP markierten Chitosanbindeprotein CABP-sfGFP (grün) gefärbt. Die Chi-NK akkumulieren vor allem perinukleär (gelber Kreis).

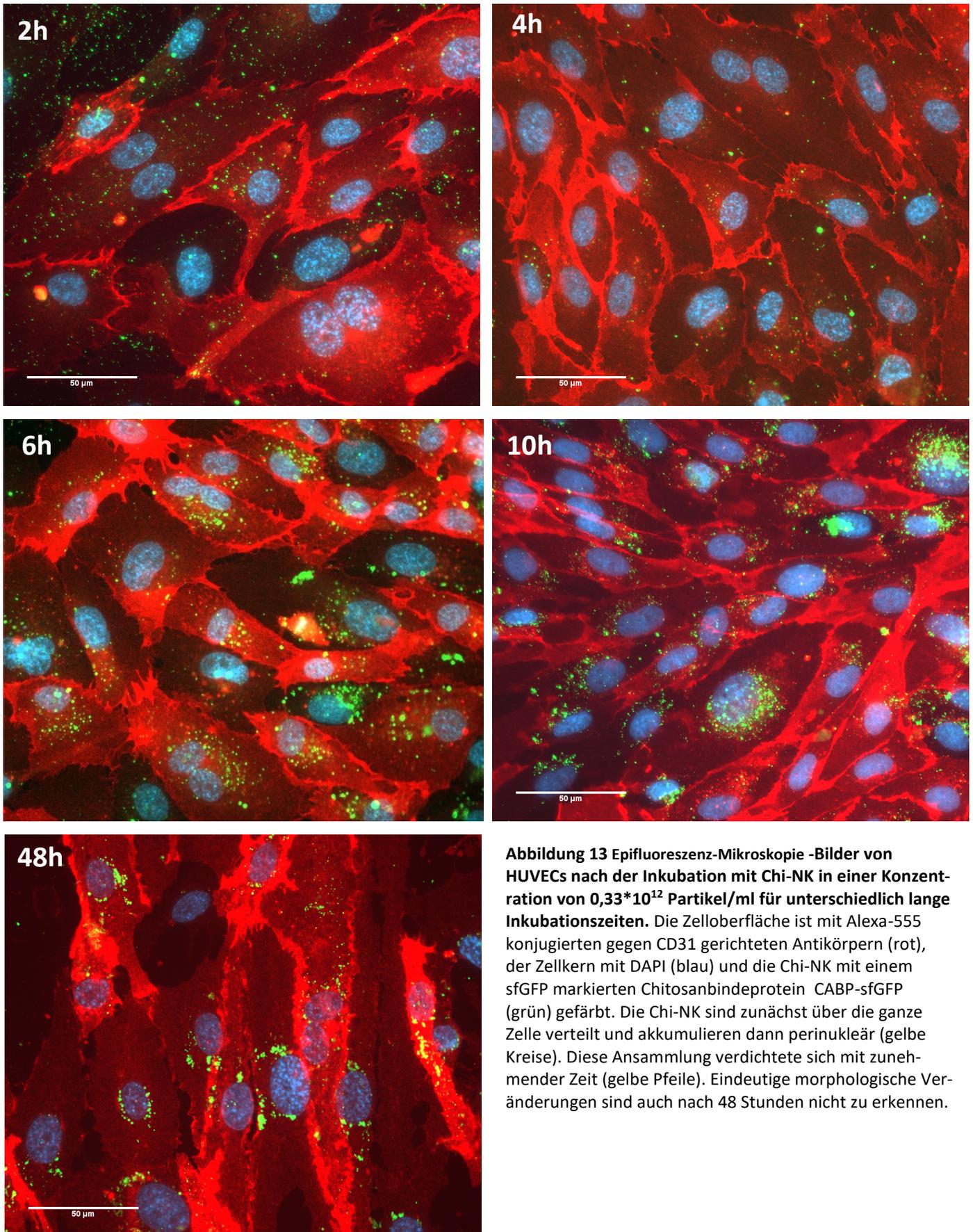
Da die Epifluoreszenz-Mikroskopie keine Analyse der dreidimensionalen Chi-NK-Verteilung erlaubt, wurde als nächstes die strukturiert-beleuchtete-Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt (Abb. 12). Der gelb umrahmte Ausschnitt in Abbildung 12a entspricht dem Teil der Zelle, der in Abbildung 12b dreidimensional rekonstruiert wurde. Um einen Einblick in die flachen Endothelzellen zu bekommen, wurde in der Z-Achse ein anderer Maßstab gewählt als in der X- bzw. Y-Achse. Die über eine CD-31 gefärbte Zellmembran (rot) stellen hierbei die Zellperipherie dar, alle dazwischen befindlichen Strukturen werden als intrazellulär gewertet. Sowohl der mit DAPI gefärbte Zellkern, als auch die grün erscheinenden Chi-NK befinden sich zwischen den begrenzenden Zellmembranen, was für eine intrazelluläre Lage spricht. Darüber hinaus ist auch in diesem Verfahren die perinukleäre Akkumulation der Chi-NK zu erkennen. Wenige Chi-NK finden sich auf der Zelloberfläche.



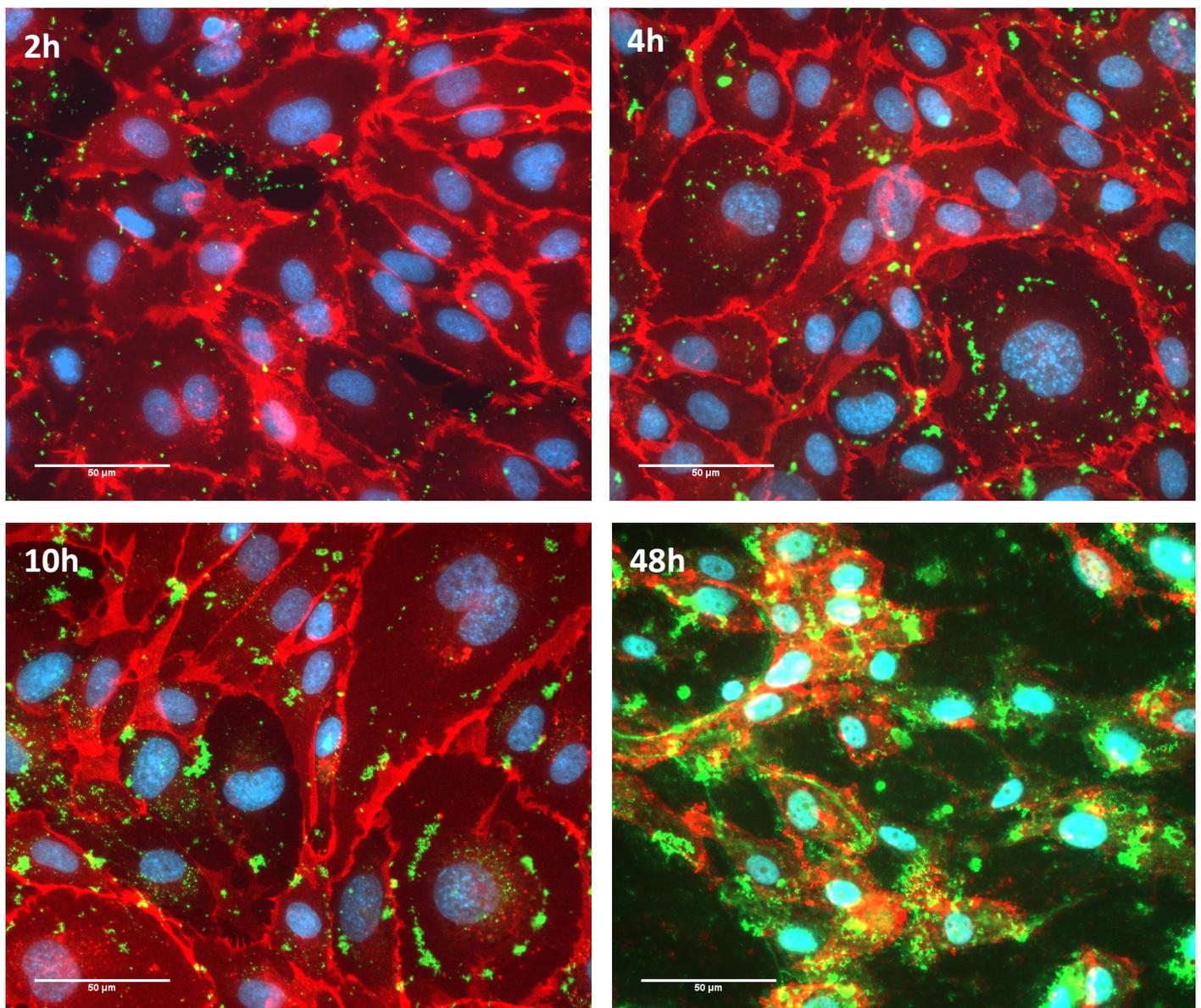
**Abbildung 12. Aufnahme mit strukturiert beleuchtete Fluoreszenz-Mikroskopie einer Endothelzelle nach Inkubation mit Chi-NK.** Die Zelloberfläche ist mit Alexa-555 konjugierten gegen CD31 gerichteten Antikörpern (rot), der Zellkern mit DAPI (blau) und die Chi-NK mit einem sfGFP markierten Chitosanbindeprotein CABP-sfGFP (grün) gefärbt. **a)** Aufsicht auf die Zelle: der gelbe Ausschnitt zeigt die Lokalisation der 3D-Rekonstruktion. **b)** Optischer Querschnitt durch die Zelle. Zwischen den beiden rot markierten Zellmembranen finden sich die grün markierten Chi-NK im Inneren der Zelle in der Nähe des blau dargestellten Zellkerns.

### 3.3.2 ZEIT- UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER AUFNAHME

Des Weiteren sollte der dosisabhängige Einfluss der Chi-NK im longitudinalen Verlauf untersucht werden. Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, wurden zunächst eine floureszenzmikroskopische Analyse der Zell-Zell-Kontakte und der Chi-NK Verteilung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit der gleichen Konzentration ( $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) unterschiedlich lange mit Chi-NK inkubiert (2, 4, 6, 10, 48h) (Abb. 13). Bereits nach zwei und vier Stunden sind vereinzelt Chi-NK zu sehen. Im Vergleich zur Aufnahme nach 24 Stunden sind die Chi-NK jedoch über die ganze Zelle verteilt und nicht eindeutig perinukleär lokalisiert. Erst nach sechs Stunden ist bei einzelnen Zellen das Verteilungsmuster der intrazellulären Chi-NK erstmals dem nach 24 Stunden ähnlich. Nach zehnstündiger Inkubation sammeln sich die Chi-NK fast ausschließlich in der Nähe des Zellkerns. Dies ändert sich auch zu späteren Messzeitpunkten nicht mehr wesentlich, jedoch fällt eine zunehmende Verdichtung der Chi-NK auf. Eindeutige morphologische Veränderungen sind auch nach 48 Stunden nicht zu erkennen.



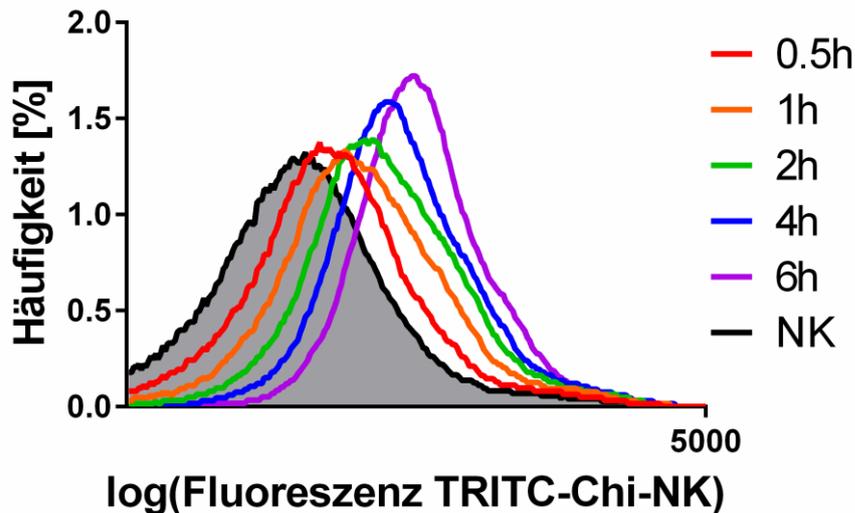
Um einen möglichen zeitabhängigen toxischen Effekt zu untersuchen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Zellen mit einer Konzentration von  $2,61 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml (eine aus den vorherigen Ergebnissen nach 24 Stunden toxische Konzentration) für jeweils 2,4,10,24 und 48 Stunden inkubiert (Abb. 14, für 24 Stunden siehe Abb. 9c). Auch hier findet sich nach zwei Stunden kein bestimmtes Verteilungsmuster. Nach vier Stunden akkumulieren die Chi-NK, wie auch bei der niedrigeren Konzentration, perinukleär (Vgl. Abb. 13). Zusätzlich zeigen sich nach zehn Stunden größere Ansammlungen von Chi-NK, die nicht eindeutig intrazellulär liegen. Auffällig ist, dass die Zellen bis zu einem Zeitpunkt von zehn Stunden noch vital erscheinen. Das lässt den Schluss zu, dass nicht die Konzentration alleine den zytotoxischen Effekt ausmacht, sondern auch die Expositionszeit entscheidend ist. Zur Quantifizierung der zeitabhängigen Chi-NK-Internalisierung wurden Endothelzellen mit fluoreszierenden Chi-NK unterschiedlich lange inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.



**Abbildung 14** Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von HUVECs nach der Inkubation mit Chi-NK in einer Konzentration von  $2,61 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml für unterschiedlich lange Inkubationszeiten. Die Zelloberfläche ist mit Alexa-555 konjugierten gegen CD31 gerichteten Antikörpern (rot), der Zellkern mit DAPI (blau) und die Chi-NK mit einem sfGFP markierten Chitosanbindeprotein CABP-sfGFP (grün) gefärbt. Bis zu einem Zeitpunkt von 10 Stunden sind keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar. Die Chi-NK sammeln sich perinukleär. Die bereits bei geringeren Konzentrationen beschriebene Verdichtung der Chi-NK zeigt sich hier bereits nach 4 Stunden. Nach 24 Stunden (Vgl. Abb. 9c) beginnen morphologische Verän-

Da der Nachweis der Chi-NK durch das CABP-sfGFP nicht sensitiv genug war, wurde hier eine TRITC-Markierung des Chitosans verwendet.

Im Histogramm sind die einzelnen Ereignisse anhand ihrer Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der gemessenen Ereignisse aufgetragen (Abb.15). Damit erhält man einen Überblick, wie häufig eine bestimmte Chi-NK Menge in einer Zelle vorliegt. Das Integral des Histogramms entspricht dabei der gesamten Chi-NK Menge in allen gemessenen Zellen. Hier zeigt sich bei zunehmender Inkubationszeit eine Verschiebung der Intensitätsmaxima hin zu höheren Fluoreszenzwerten. Das legt nahe, dass die Menge an Chi-NK in den Zellen mit der Inkubationszeit der Zellkulturen zunimmt.



**Abbildung 15** Übereinandergelagerte Histogramme der unterschiedlichen Inkubationszeiten (0–6h) mit einer Chi-NK-Konzentration von  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml. Die Intensitätsmaxima nehmen mit längeren Inkubationszeiten zu als Zeichen einer erhöhten Menge an endozytierten Chi-NK.

Aus den Histogrammen kann man, wie in Absatz 2.7.3 dargestellt, die mittlere Fluoreszenz einer Zellpopulation bestimmen. Daraus kann man die Gesamtfluoreszenz errechnen und auf die Negativkontrolle normalisieren. Trägt man die Differenzen der normalisierten Fluoreszenz zwischen Negativkontrolle und Proben mit Chi-NK gegen die Konzentration auf (Abb. 16a), lässt sich eine zunehmende Aufnahme mit steigender Menge an Chi-NK feststellen. Vor allem in der ersten Stunde ist die Aufnahme von Chi-NK in die Zelle ausgeprägt. Bis zu sechs Stunden steigt sie zwar weiter an, jedoch ist die Aufnahme rate wesentlich geringer. Außerdem fällt eine anfänglich zunehmende Standardabweichung auf, die gegen Ende des untersuchten Zeitraumes wieder abnimmt (Abb. 16b).

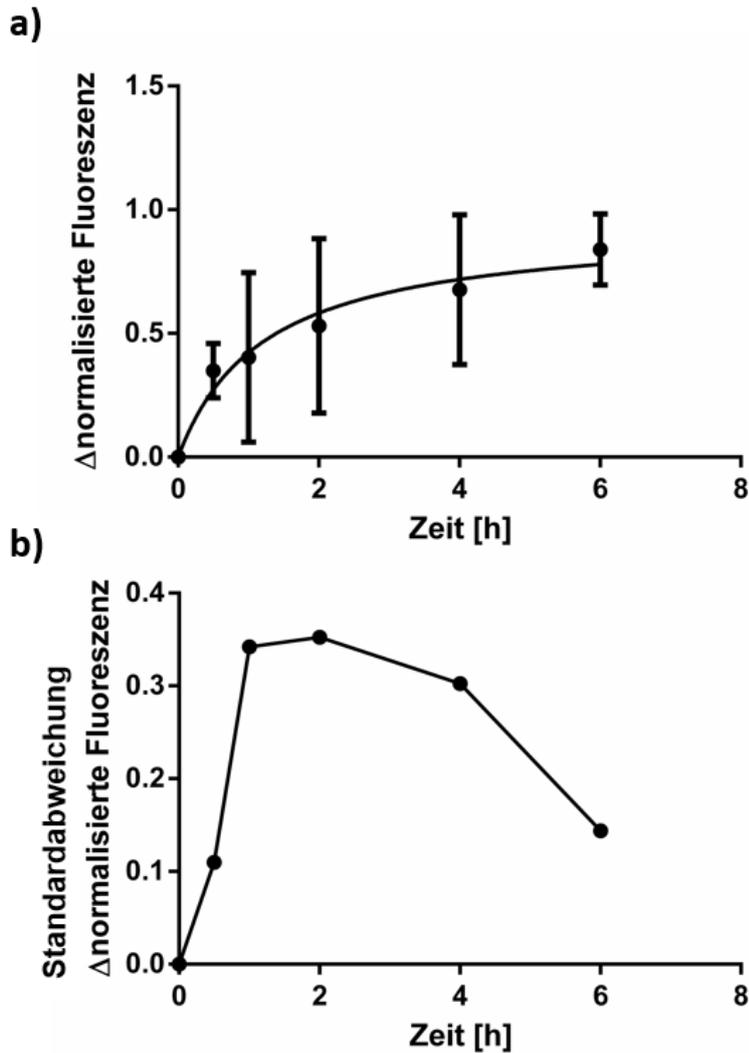


Abbildung 16 a) Durchflusszytometrischen Untersuchungen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten: Differenz der normalisierten Gesamtfluoreszenz in Bezug auf die Negativkontrolle. Die normalisierte Fluoreszenz nimmt im Laufe der Inkubationszeit zu. b) Auffallend ist die zunächst zunehmende und nach sechs Stunden wieder abnehmende Standardabweichung der normalisierten Fluoreszenz als Zeichen der aufgenommenen Partikelmenge.

Neben der Zeitabhängigkeit sollte auch die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von Chi-NK durchflusszytometrisch untersucht werden. Dazu wurden die Zellen für je sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $0,16/0,33/0,65/1,30 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) an TRITC-markierten Chi-NK inkubiert und anschließend analysiert. Die als Histogramm dargestellten Intensitätswerte in Abbildung 17a zeigen, analog zur zeitabhängigen Aufnahme, eine Verschiebung der Maxima in höhere Intensitätsbereiche. Aus Abbildung 17b ist die positive Korrelation zwischen der Chi-NK Konzentration und der aufgenommenen Menge an Chi-NK ersichtlich.

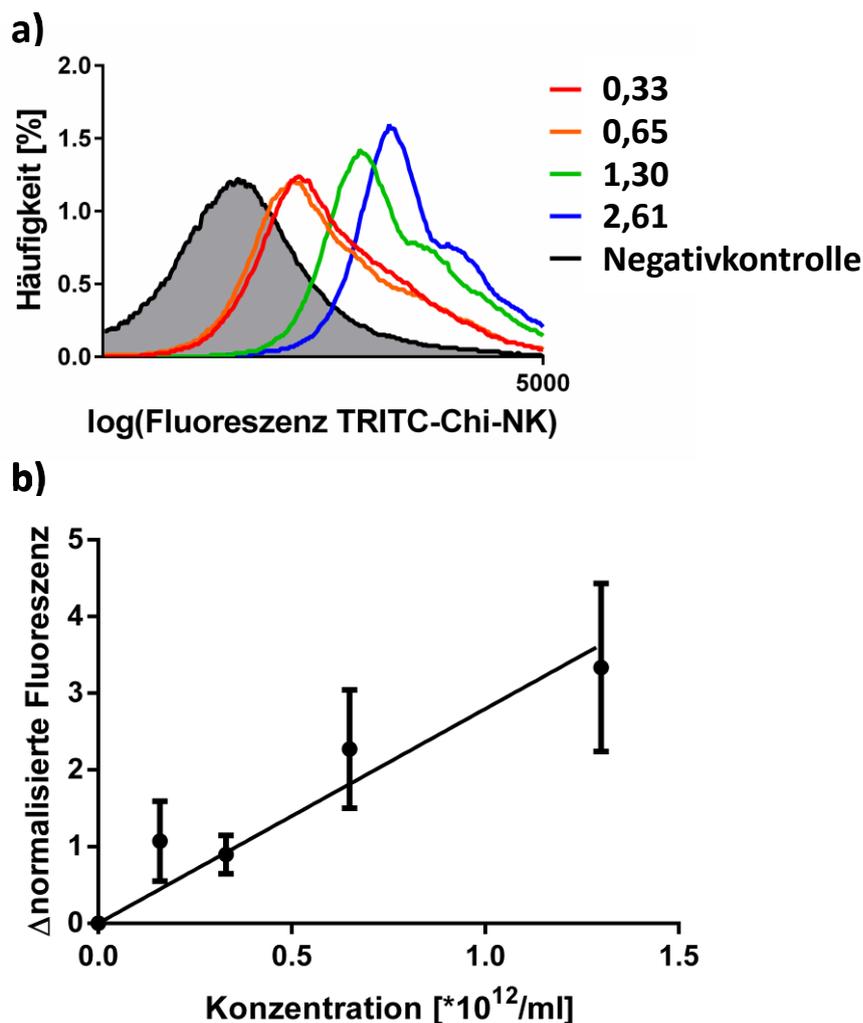
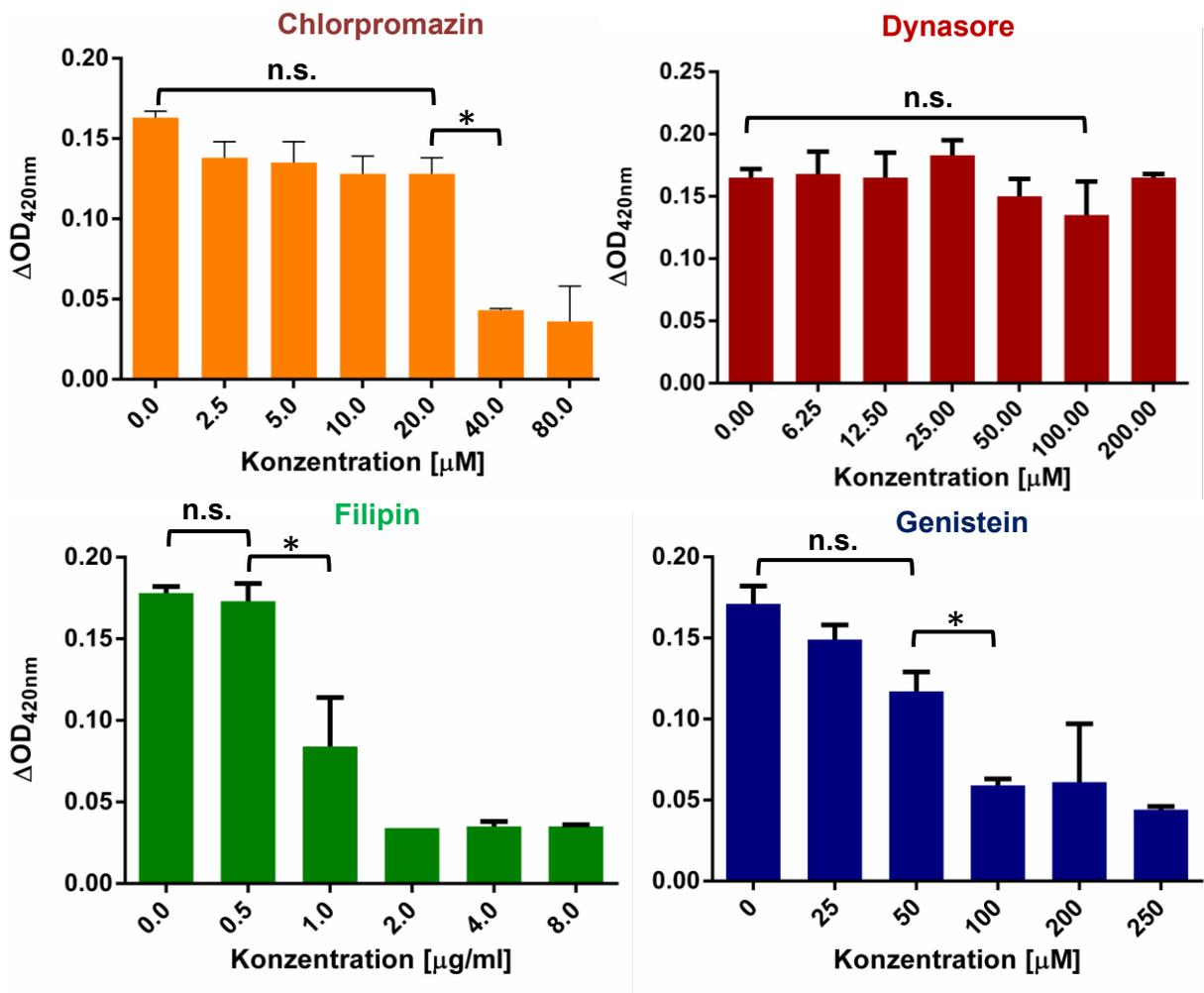


Abbildung 17 a) Übereinandergelegte Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen nach Inkubation mit unterschiedlichen Chi-NK-Konzentrationen (Angabe in  $\times 10^{12}$  Partikel/ml). Zunehmende Intensitätsmaxima mit steigender Konzentration b) Differenz der normalisierten Fluoreszenz bei steigender Konzentration in Bezug auf die Negativkontrolle. Mit steigender Konzentration nimmt die normalisierte Fluoreszenz als Zeichen einer stärkeren Endozytose von Chi-NK zu.

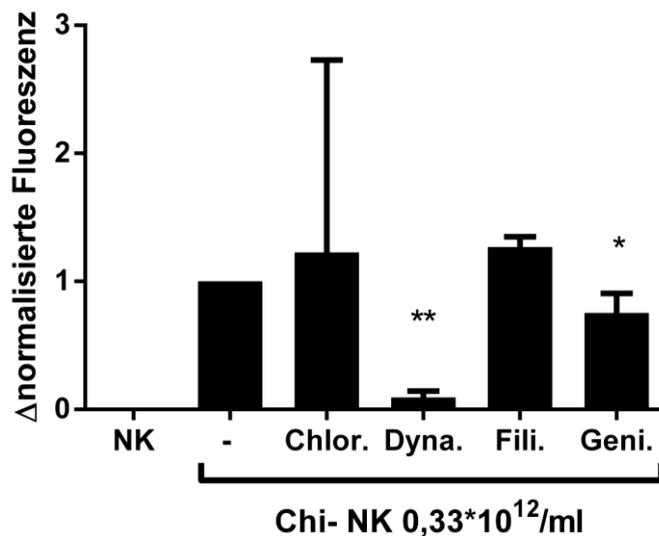
### 3.3.3 AUFNAHMEMECHANISMUS

Aus den bereits durchgeführten Untersuchungen geht hervor, dass die Chi-NK ins Zellinnere gelangen. Um den genauen Endozytosemechanismus zu klären, wurden die Zellen vor der Inkubation mit TRITC-markierten Chi-NK mit unterschiedlichen Inhibitoren des Clathrin-bzw. Caveolin-abhängigen Aufnahmeweges behandelt. Um mögliche toxische Effekte der Inhibitoren selbst, die das Ergebnis verfälschen könnten, auszuschließen, wurde die metabolische Aktivität der Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren (Chlorpromazin, Dynasore, Filipin, Genistein) mittels WST1-Test durchgeführt (Abb. 18). Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich dabei an Angaben aus ähnlichen Experimenten aus der Literatur (beispielhaft <sup>121, 122</sup>). Anschließend wurde die höchste nicht toxische Dosis gewählt, um die Blockierung der Aufnahme-Wege zu gewährleisten, ohne dabei die Zellen zu schädigen. Folgende Konzentrationen wurden dabei ermittelt: Chlorpromazin (20  $\mu$ M), Dynasore (100  $\mu$ M), Filipin (0,5  $\mu$ g/ml), Genistein (50  $\mu$ M).



**Abbildung 18. WST1-Test der Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen.** Gewählte Konzentrationen: Chlorpromazin (20 $\mu\text{M}$ ), Dynasore (100  $\mu\text{M}$ ), Filipin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), Genistein (50  $\mu\text{M}$ ).

Nach der Inkubation mit Inhibitoren für 30 Minuten wurden die Chi-NK hinzugefügt, die Zellen nach sechs Stunden durchflusszytometrisch untersucht und die Differenz der normalisierten Fluoreszenz berechnet (Abb. 19). Hierbei zeigte sich, dass Dynasore die Aufnahme von Chi-NK im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Chi-NK signifikant hemmt. Aber auch Genistein ließ eine signifikante, wenn auch nicht so stark ausgeprägte, Reduzierung der Aufnahme erkennen. Die Probe mit Chlorpromazin lieferte stark schwankende Ergebnisse, die keinen eindeutigen Schluss zulassen. Die Chi-NK nach Filipin-Zugabe änderte sich nicht signifikant.

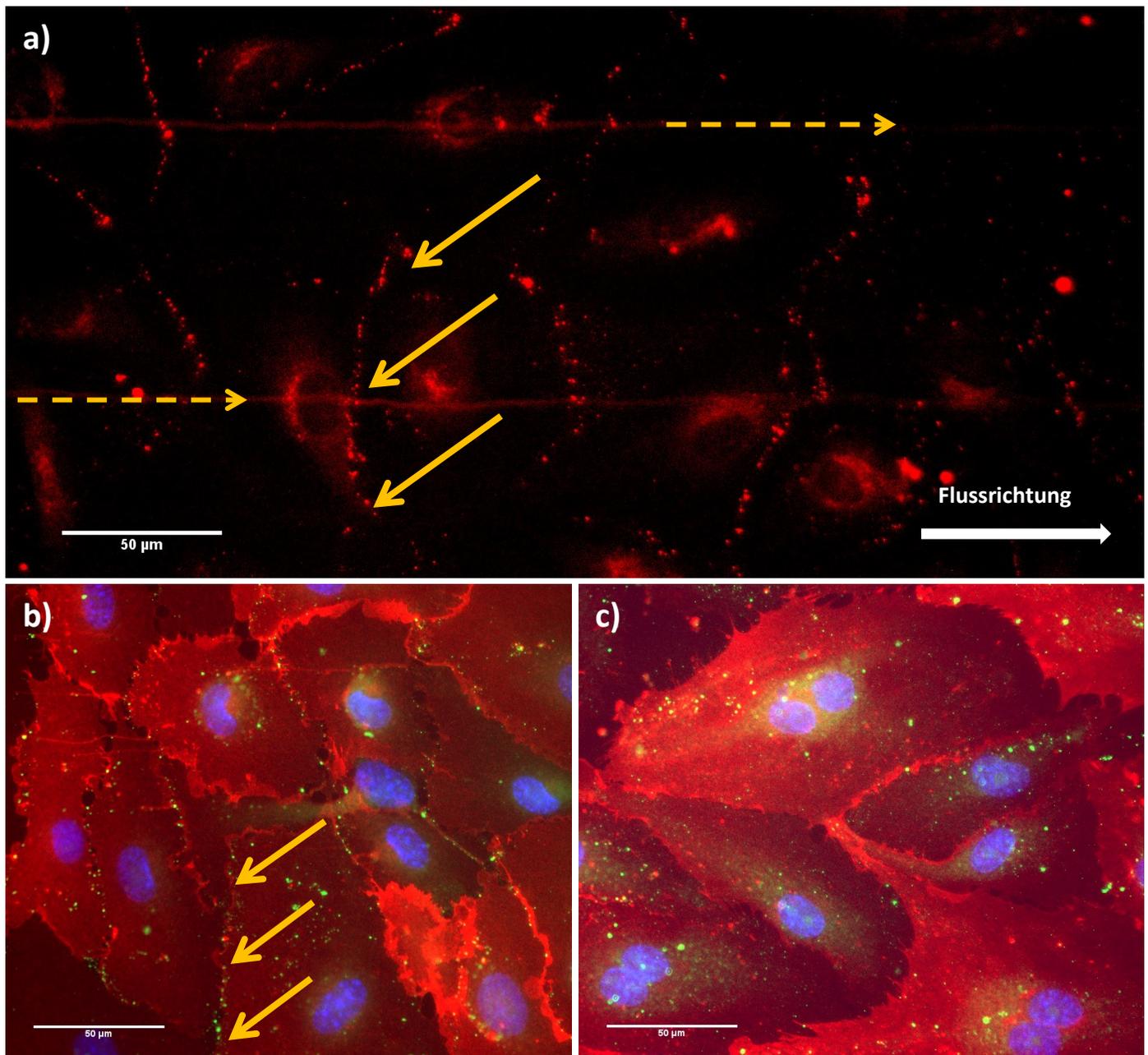


**Abbildung 19. Durchflusszytometrischen Untersuchungen nach Zugabe verschiedener Endozytoseinhibitoren: Differenz der normalisierten Fluoreszenz nach Stimulation mit Chi-NK.** Dynasore (Hemmung Clathrin-abh. Endozytose) und Genistein (Hemmung Caveolin-abh. Endozytose) zeigen eine signifikant verminderte Endozytose der Chi-NK durch die Endothelzellen. Bei Chlorpromazin ist eine Auswertung bei sehr hohen Standardabweichungen nicht möglich. Eine toxische Wirkung auf Endothelzellen ist hier eventuell die Ursache.

Die Chi-NK gelangen vorwiegend Clathrin-abhängig in den Intrazellulärraum der HUVECs. Dort akkumulieren sie perinukleär und verbleiben dort für min. 48 Stunden. Deskriptiv mittels Immunfluoreszenz-Färbungen und quantitativ mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen konnte für die Menge an endozytierten Chi-NK sowohl eine Zeit- als auch Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden.

### 3.4 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN CHI-NK UND HUVECS UNTER FLUSSBEDINGUNGEN

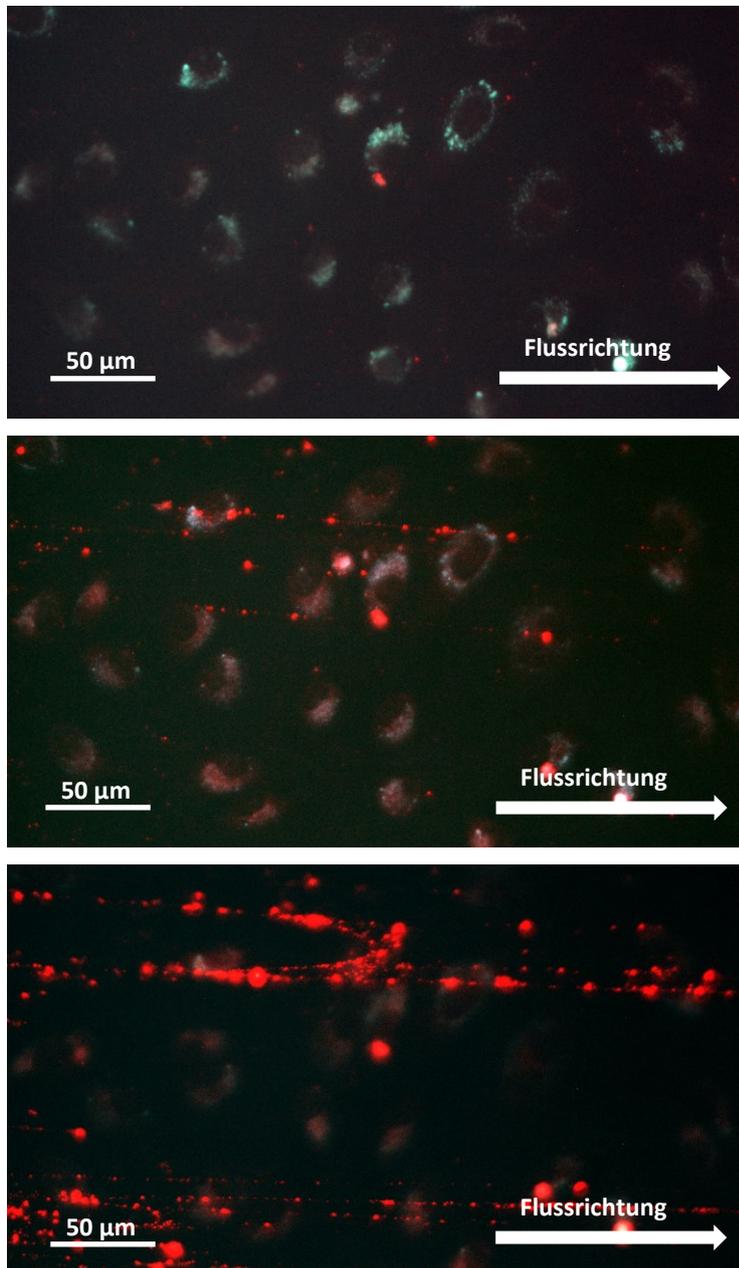
Weiterhin sollte ein erster Einblick über das Verhalten der Chi-NK unter Flussbedingungen gewonnen werden. Dazu wurden HUVECs in Flusskammern ausgesät und nach 3-4 Tagen Wachstum mit TRITC-markierten Chi-NK behandelt. Um die physiologischen Bedingungen des Blutflusses zu simulieren, wurde ein Gemisch aus Erythrozyten, BSA und Chi-NK hergestellt und in den Flusskammern verwendet<sup>55</sup>. Die Kammern wurden an Pumpen angeschlossen, die einen kontinuierlichen und unidirektionalen Fluss erzeugen. Während des Flussexperimentes wurde die Bindung der TRITC-markierten Chi-NK an das Endothel fluoreszenzmikroskopisch verfolgt (Abb. 20a). Nach 30 Minuten bzw. sechs Stunden wurde der Fluss beendet und die Flusskammern zusätzlich immunfluoreszierend gefärbt (Abb. 20 b+c). Zunächst war erkennbar, dass Chi-NK zumindest an den Zellen haften bleiben. In Abbildung 20a kann man außerdem einige horizontale Linien (gestrichelte Pfeile) erkennen, die durch vorbeifließende TRITC-Chi-NK entstehen. Schon in dieser Abbildung ohne immunfluoreszierende Färbung scheinen die Chi-NK entlang einer Linie zu akkumulieren. In der Immunfluoreszenz-Färbung ist zu erkennen, dass diese Linien die Zell-Grenzen darstellen. Zudem scheinen manche Chi-NK trotz des Flusses in die Zellen aufgenommen worden zu sein (perinukleäre Akkumulation), im Vergleich zu den Aufnahmen unter statischen Bedingungen sind hier jedoch weniger Partikel intrazellulär (Vgl. Abb. 13 mit Abb. 20 b+c). Allerdings müsste hier zusätzlich eine quantitative Bestimmung erfolgen, um eine eindeutige Aussage bezüglich der Endozytose zu treffen.



**Abbildung 20 HUVEC nach Inkubation mit Chi-NK unter Flussbedingungen.** a) TRITC-markierte Chi-NK unter Flussbedingungen (nach 30min) b) + c) zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen b) 30min und c) 6 Stunden. Die gestrichelten Pfeile zeigen vorbeifließende Chi-NK. Die durchgehenden Pfeile in a) heben die Kumulation der Chi-NK an einer bestimmten Linie hervor, in der zusätzlichen Markierung mit CD31-Antikörper wird deutlich, dass diese Linie die Zellgrenze darstellt (durchgehende Pfeile in b). Zudem sammeln sich auch hier einige Chi-NK in der perinukleären Region, wenn auch weniger deutlich als unter statischen Bedingungen (Vgl. Abb. 13), was möglicherweise an einer verminderten Endozytose liegt.

Da nicht nur der physiologische Blutfluss Einfluss auf die Interaktion der Chi-NK nimmt, sondern auch die Veränderung des Endothels, wurden weitere Flussversuche mit aktiviertem Endothel durchgeführt. Wie bereits erwähnt, kommt es hierbei zu einer Freisetzung von vWF ins Gefäßlumen, beispielsweise in Tumorgefäßen des Melanoms<sup>105, 109</sup>. Vor allem bei einer systemischen Therapie, könnte solch eine spezifische Endothelveränderung auch die Zielstruktur einer zielgerichteten Therapie sein. Um diese Situation nachzustellen, wurden bei gleichen Grundvoraussetzungen wie bereits bei den Flussversuchen ohne vWF, die HUVECs zusätzlich mit Histamin stimuliert. Anschließend erfolgte der Flussversuch

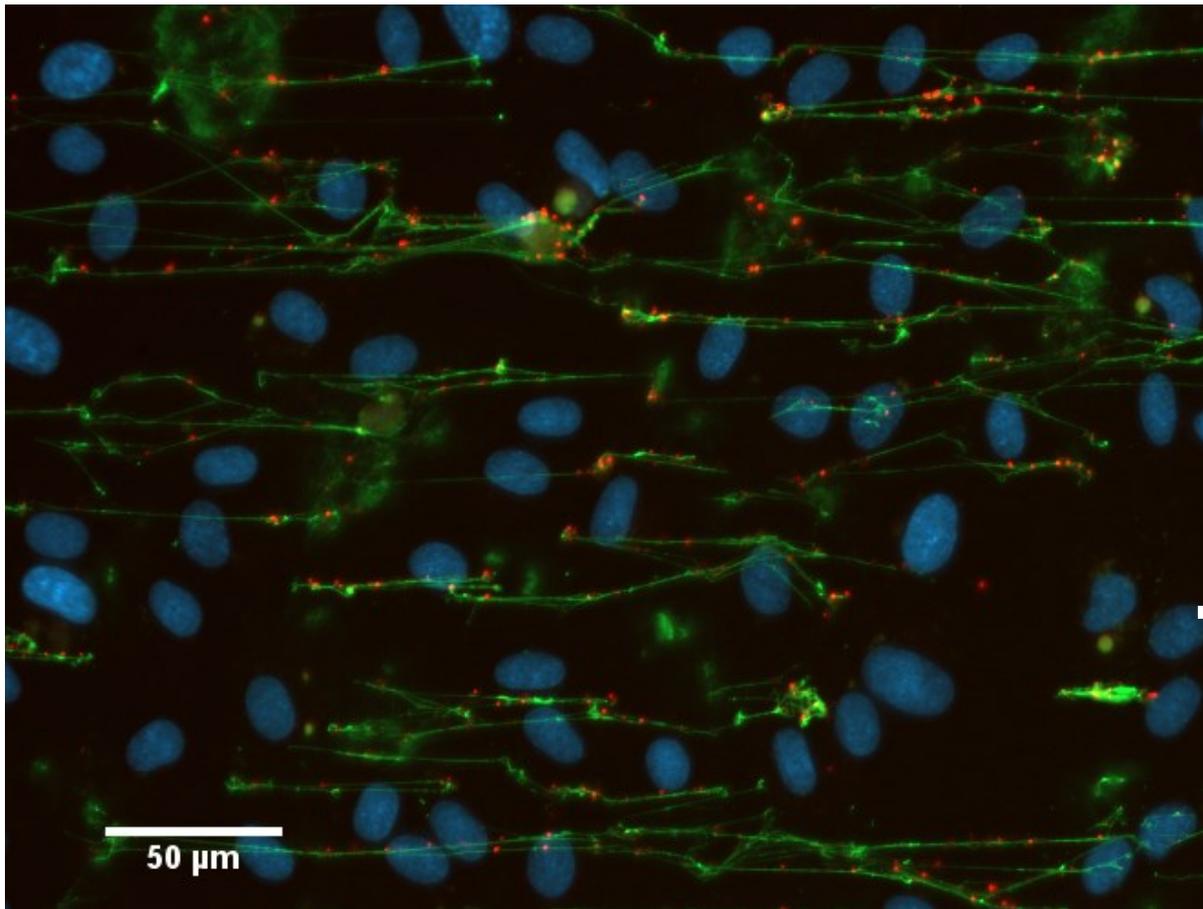
mit TRITC-markierten Chi-NK. Aufnahmen der Flusskammern nach null, 30 und 90 Minuten sind in Abbildung 21 a-c zu sehen. Dort ist gut erkennbar, dass mit fortschreitender Zeit zunehmend Chi-NK an vWF-Fäden binden. Auch nach einer Immunfluoreszenz-Färbung nach sechsstündiger Inkubation zeigt sich eine deutliche Ko-Lokalisation der Chi-NK und vWF-Fäden (Abb. 22). Auffallend ist außerdem, dass im Vergleich zur den Flussversuchen ohne vorherige Stimulation, kaum Chi-NK an den Zellen selbst binden (Vgl. Abb. 20b und Abb. 21b sowie Abb. 20c und Abb. 22).



**Abbildung 21** Epifluoreszenz-Mikroskopie der Flusskammer unter laufendem Fluss nach Stimulation der HUVECs mit Histamin, Chi-NK- Konzentration  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml, unterschiedliche Zeitpunkte.

- a) 0 min
- b) 30min
- c) 90min

Mit fortlaufender Zeit binden mehr Chi-NK an längliche Strukturen, die sich in der nachträglichen Markierung mit vWF- Antikörpern als vWF- Fäden darstellen (Vgl. Abb. 22).



**Abbildung 22** Epifluoreszenz-Mikroskopie-Bilder nach 6 Stunden unter Flussbedingungen und Histamin-Stimulation sowie nachträglicher Immunfluoreszenz-Färbung. Die Chi-NK sind mit TRITC (rot), der Zellkern mit DAPI (blau) und die vWF-Fäden mit CABP-sfGFP (grün) markiert. Es zeigt sich eine deutliche Ko-Lokalisation von Chi-NK mit vWF-Fäden, während intrazellulär kaum Chi-NK zu sehen sind.

Unter Flussbedingungen ändert sich die Interaktion zwischen Chi-NK und Endothel dahingehend, dass die Chi-NK weniger an die Zelloberfläche binden, woraus eine verringerte Endozytose resultiert. Nach Stimulation der HUVECs mit Histamin und der daraus resultierenden vWF-Freisetzung reichern sich die Chi-NK vor allem im Bereich der vWF-Fäden an und finden sich noch weniger an der Zelloberfläche.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 CHI-NK UND IHRE INTERAKTION MIT PROTEINEN UND ZELLEN

Noch bevor intravenös-verabreichte NP mit Zellen in Kontakt kommen, interagieren sie mit Proteinen im Blut (oder anderen Eiweiß-halten Lösungen). Diese legen sich wie eine Hülle um die NP, was in der Literatur als „*protein corona*“ bezeichnet wird<sup>123,124</sup>. Es gibt mehrere Hinweise, dass die Protein-Schicht unter anderem die Toxizität von NP herabsetzt oder die Endozytose steigert<sup>125,126,127</sup>. Daher wurden alle vorliegenden Experimente in Medium unter Zugabe von BSA (bovines Serumalbumin) durchgeführt, sodass auch hier von einer Bindung von Proteinen an die Chi-NK ausgegangen werden kann.

Bei der Interaktion zwischen der Zelloberfläche von Endothelzellen und den NP, die einer möglichen Endozytose vorausgehen, spielen zwei Mechanismen eine Rolle: eine unspezifische (z.B. elektrostatische, van der Waals oder hydrophobe Kräfte) und eine spezifische Bindung (z.B. über Liganden und Rezeptoren)<sup>128,129</sup>. Beide Vorgänge können durch die oben erwähnte Protein-Hülle beeinflusst werden. Anionische NP werden beispielsweise schlechter endozytiert als kationische, da hier eine bessere elektrostatische Wechselwirkung zwischen positiv geladenen NP und negativ geladener Zellmembran vermutet wird<sup>121, 130</sup>. Angelagerte Proteine können hier durch eine Veränderung der Oberflächenladung relevant werden<sup>131</sup>.

Die spezifische Bindung wird zum Beispiel über Rezeptoren vermittelt. Als Liganden fungieren dabei entweder die Oberflächenstrukturen der NP selbst oder aber die oben beschriebene Protein-Schicht. Chitine bzw. deren Molekül-Enden, werden beispielsweise als Liganden des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) diskutiert<sup>132</sup>. Da Chitosan eine ähnliche Struktur aufweist, ist eine Bindung an diesen Rezeptor denkbar. Da bei den vorliegenden Chi-NK von einer Beschichtung mit BSA ausgegangen werden muss, spielen möglicherweise auch Rezeptoren die BSA als Liganden haben, eine Rolle. So konnten Fleischer et al. für anionisch geladene und mit BSA inkubierte NP eine erhöhte Bindung an einen Albumin-Rezeptor zeigen. Interessanterweise banden auf gleiche Weise behandelte kationische NP bevorzugt an Scavenger-Rezeptoren. Diese Gruppe von Rezeptoren gehört zu den sogenannten Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. *pattern recognition receptor*, PRR) und binden u.a. modifizierte Lipide oder Lipoproteine, aber auch NP<sup>133, 134</sup>. Die Adhäsion von NP kann also über verschiedene Mechanismen durch die Protein-Hülle beeinflusst werden.

#### 4.1.1 PARAMETER FÜR DIE INTRAZELLULÄRE AUFNAHME VON NP

Im Falle der Chi-NK konnte in den verschiedenen Bildern (Vgl. Abb. 12) gezeigt werden, dass sie in die HUVECs aufgenommen werden und nicht nur auf der Oberfläche der Zellen haften. Speziell für Chi-NK wurde das auch bei MDCK-Zellen beobachtet<sup>93</sup>. Aber auch für viele andere NP konnte die Aufnahme in Endothelzellen nachgewiesen werden<sup>135, 136</sup>. Dabei zeigte sich, dass sich verschiedene Parameter auf die Internalisation auswirkten. Hierbei muss noch einmal zwischen den unterschiedlichen Arten der Endozytose unterschieden werden, nämlich der der Phagozytose, die nur bestimmte Zellen ausführen, und der Pinozytose, die alle Zelltypen verwenden. Da HUVECs nicht zu diesen spezialisierten Zellen gehören, bezieht sich der folgende Abschnitt nur auf die zur Pinozytose gehörenden Mechanismen.

Zum einen konnte wiederholt ein Zusammenhang zwischen Größe und Aufnahme von NP festgestellt werden. Allerdings fallen die Ergebnisse für die größenabhängige Endozytose für unterschiedliche NP

nicht einheitlich aus. Während Polymere mit zunehmender Größe schlechter intestinal aufgenommen werden<sup>137</sup>, konnte für Chitosan-NP bei A549-Zellen (Adenokarzinomzellen der Lunge) keine größenabhängige Aufnahme festgestellt werden<sup>138</sup>. Insgesamt werden jedoch verschiedene NP in einer Größenordnung von 100nm in mehrere Zelltypen aufgenommen. Auch die sphärische Form der Chi-NK wurde in mehreren Experimenten als positiver Einflussfaktor auf die Endozytose gewertet<sup>139</sup>.

Zum anderen konnten Huang et al. für Chitosan-NP zwar keine Größen-, jedoch eine Ladungsabhängigkeit bzw. eine Abhängigkeit vom Acetylierungsgrad für die Aufnahme feststellen<sup>138</sup>. Bei Chitosanen ist der Acetylierungsgrad ein wichtiger Einflussfaktor für die Oberflächenladung: Mit zunehmender Acetylierung nimmt die Zahl an kationischen Amino-Gruppen und somit das Zeta-Potential ab<sup>138</sup>. Im oben genannten Experiment wurden NP mit einem positiveren Zeta-Potential besser endozytiert, als die mit einem niedrigeren<sup>138</sup>. Der Grund wird, wie bereits beschrieben, in einer besseren Interaktion zwischen den positiv geladenen Partikeln und der negativ geladenen Zellmembran vermutet.

Chi-NK alleine besitzen mit einem Zeta-Potenzial von + 60mV eine positive Oberflächenladung<sup>93</sup>. Tenzer et al. führten Versuche mit Endothelzellen und Polystyrol-NP durch, die in Größe und ursprünglichem Zeta-Potenzial vergleichbar zu Chi-NK sind. Dabei zeigte sich eine höhere Endozytose mit Protein-Hülle im Vergleich zu Partikeln ohne Protein-Hülle, trotz der durch die Protein-Hülle verminderten Ladung<sup>125</sup>. Die Protein-Schicht scheint die Nachteile einer geringen Oberflächen-Ladung möglicherweise mit anderen Mechanismen auszugleichen. Als Ursache scheinen sowohl die, bereits erwähnte, unspezifische Interaktion der Protein-Hülle mit der Zelloberfläche, als auch die spezifische Bindung bestimmter Proteine an Zell-Rezeptoren eine Rolle zu spielen<sup>52, 140</sup>.

Auch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien können für Abweichungen der Aufnahme ins Zellinnere in unterschiedlichen Untersuchungen verantwortlich sein, v.a. da häufig Tumorzelllinien zur Untersuchung der Endozytose von NP verwendet werden. Es sind diverse, an der Endozytose beteiligte Proteine beschrieben, die bei malignen Zellen verändert vorliegen und somit auch potenziell die Aufnahme von NP beeinflussen<sup>141</sup>. Bei HeLa-Zellen (humane Plattenepithelkarzinomzellen der Zervix uteri) und HUVECs konnten beispielsweise deutliche Unterschiede in der Endozytose-Kinetik von Siliziumdioxid-NP gezeigt werden: HeLa-Zellen hatte nach zwei Stunden Inkubationszeit deutlich weniger SiO<sub>2</sub>-NP aufgenommen als HUVECs, endozytierten nach 24 Stunden aber insgesamt deutlich mehr NP<sup>142</sup>. Das verdeutlicht noch einmal, wie wichtig eine separate Betrachtung einzelner Zelltypen ist.

## 4.2 ENDOZYTOSMECHANISMUS IN HUVECS

### 4.2.1 ANWENDUNG VON ENDOZYTOSSE-INHIBITOREN

Für Chi-NK, die unter statischen und Flussbedingungen das Zellinnere erreichen, stehen, wie bereits erwähnt, verschiedene Aufnahmemechanismen zur Verfügung. Für die Inhibition wurden für die Clathrin- bzw. Caveolin-vermittelte Endozytose jeweils zwei unterschiedliche Substanzen verwendet. Um das Verfälschen der Ergebnisse durch toxische Effekte der Inhibitoren zu vermeiden, wurden die Substanzen zunächst auf ihre Toxizität untersucht. Chlorpromazin war jedoch schon in geringen Mengen toxisch, sodass ein gewisser zellschädigender Einfluss in Kauf genommen wurde. Allerdings zeigten sich bei der Auswertung hohe Standardabweichungen, sodass auch diese Konzentration schon mit zu hoher Zelltoxizität verbunden war. Auch Vercauteren et al. kamen zu einem ähnlichen Ergebnis, dass Chlorpromazin schon nach kurzer Zeit und in Konzentrationen, die in einigen Veröffentlichungen verwendet wurden, zytotoxisch ist. Angesichts der Tatsache, dass Dynasore in ungiftigen Konzentrationen bereits

eine effektive Blockierung erbrachte, wäre dies eine sinnvolle Alternative zum häufig verwendeten Chlorpromazin.

Allerdings ist nicht nur die Toxizität, sondern auch die Effizienz von Inhibitoren Zelltyp-abhängig<sup>120,143</sup>. Zwar wurde das für HUVECs hier nicht überprüft, doch für Filipin ist eine Konzentration von 0,5 µg/ml bei Endothelzellen ausreichend<sup>115</sup>. Bei Dynasore konnte eine fast vollständige Blockierung der Chi-NK-Aufnahme gezeigt werden, sodass für jeden Aufnahmeweg mindestens ein effektiver Inhibitor zum Einsatz kam.

#### 4.2.2 ENDOZYTOSMECHANISMUS

Bei der Inhibition der unterschiedlichen Aufnahmemechanismen konnte eine signifikante Reduzierung der Endozytose bei Dynasore nachgewiesen werden. Dynasore ist ein potenter Inhibitor von Dynamin<sup>114</sup>, ein entscheidendes Protein bei der Endozytose über den Clathrin-abhängigen Weg. Der Clathrin-abhängige Weg ist also hier der Hauptmechanismus, über den Chi-NK in die Zelle gelangen. Dies ist auch für viele andere sphärische kationische NP, die bis zu 200nm groß sind, der Fall<sup>144,122, 145</sup>.

Bei den Chi-NK wurde die Aufnahme nicht nur durch Dynasore, sondern auch durch Genistein (Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose) signifikant gehemmt, wenn auch in geringerem Ausmaß. Dafür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Viele Beobachtungen legen nahe, dass die meisten NP nicht ausschließlich über einen Mechanismus aufgenommen, sondern vielmehr über mehrere Wege das Zellinnere erreichen<sup>144</sup>. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Genistein zu einem geringen Teil auch den Clathrin-abhängigen Weg inhibiert<sup>120</sup> und somit zu einer reduzierten Aufnahme der Chi-NK führt.

Neben den beiden hier untersuchten Mechanismen, existieren noch einige weitere, zum Teil wenig untersuchte Aufnahmewege<sup>146</sup>. Auch wenn alternative Routen wie Makropinozytose oder Clathrin- und Caveolin-unabhängige Mechanismen hier nicht untersucht wurden, kann aufgrund der eindeutigen Hemmung durch Dynasore davon ausgegangen werden, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose zumindest einen Großteil der Aufnahme bedingt.

Auslöser für die Clathrin-abhängige Aufnahme könnte die Bindung der Chi-NK an Oberflächen-Rezeptoren sein, was mit einer deutlichen Abnahme der Endozytose-Geschwindigkeit nach ca. 1 Stunde im Sinne einer Sättigung vereinbar ist. Hier könnte die bereits erwähnte Protein-Schicht eine Rolle spielen, indem Proteine als Ligand für eine Rezeptor-gesteuerte Endozytose fungieren. Im Falle der Chi-NK wurde BSA als Protein-Zusatz verwendet. Wie bereits oben beschrieben, fungieren hier möglicherweise BSA- bzw. Scavenger-Rezeptoren Für Albumin existieren Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die eine Endozytose initiieren könnten. Fleischer et al. untersuchten zwei unterschiedliche NP mit BSA-Beschichtung und konnten tatsächlich eine Bindung an bestimmte Rezeptoren feststellen. Wie bereits erwähnt, koppelten aber nur anionische NP mit BSA an den Albumin-Rezeptor an, während sich kationische NP mit BSA an den Scavenger-Rezeptor anlagerten<sup>131</sup>. Während bei anionischen NP BSA in seiner normalen Form erhalten blieb, veränderte es auf kationischen NP seine Sekundär-Struktur<sup>147</sup>. Dieser scheinbar kleine Unterschied reicht, um die Aufnahme über den Scavenger-Rezeptor, statt über den Albumin-Rezeptor, zu vermitteln. Die von Fleischer et al. untersuchten kationischen NP waren mit NH<sub>2</sub>-Gruppen modifiziert und in Größe und Zeta-Potential ähnlich den Chi-NK, sodass eine Aufnahme über den Scavenger-Rezeptor denkbar wäre. Auch die Clathrin-vermittelte Endozytose kann über diesen Rezeptor ausgelöst werden<sup>148</sup>.

Ehrenberg et al. gehen jedoch eher von einer unspezifischen Interaktion zwischen Protein-bedeckten NP und der Zelloberfläche aus. Das schließen sie aus Untersuchungen, bei denen zwei Medien mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung zum Einsatz kamen. Eine signifikante Veränderung der NP-Zell-Interaktion konnte dabei nicht nachgewiesen werden<sup>52</sup>. Versuche von Salvati et al. ergaben zudem, dass eine Beschichtung mit Transferrin als Liganden für spezifische Rezeptoren nicht mehr wirksam ist, sobald diese NP in Serum mit weiteren Proteinen in Kontakt kommen<sup>149</sup>. Auch ist bekannt, dass sich die Zusammensetzung der Protein-Hülle mit der Zeit verändert<sup>150</sup>. Diese dynamische Änderung der Oberflächeneigenschaften sollte bei der Entwicklung von NP für die intravenöse Applikation weitergehend untersucht werden, um den möglichen Einfluss von Plasmaproteinen auf die Wirkung der NP und des transportierenden Wirkstoffes zu verstehen. Darüber hinaus bietet die gezielte Beschichtung von NP mit bestimmten Proteinen eine Möglichkeit, den Ort der Medikamenten-Freisetzung zu steuern. Verhindert die Beschichtung der NP eine Aufnahme, könnte eine Freisetzung nur ins Gefäßlumen stattfinden.

#### 4.2.3 PERINUKLEÄRE AKKUMULATION NACH ENDOZYTÖSE

Die Aufnahme über den Clathrin-abhängigen Weg spielt auch für den weiteren Verbleib von NP im Allgemeinen eine Rolle. Nach der Aufnahme fusionieren die Vesikel immer weiter mit anderen Kompartimenten, sodass verschiedene Enzyme hinzukommen und ein saurer pH-Wert im Inneren des Vesikels herrscht<sup>46, 151</sup>. Für die Clathrin-abhängige Endozytose ist unter anderem ein Transport in ein bei vielen Zellen zellkernnahes Kompartiment, als Teil eines intrazellulären Vesikelsystems, bekannt<sup>46</sup>.

Auch für die Chi-NK konnte eine Akkumulation in einer Region nahe des Zellkerns gezeigt werden. Dieses Muster beschrieben schon andere Autoren für NP nach der Aufnahme in Endothelzellen, unter anderem bei Silika-NP<sup>135, 152</sup>. Doch auch hier spielen wieder Größe, Zusammensetzung und Zeta-Potenzial eine Rolle. Rejman et al. verglichen unterschiedlich große NP. Hier akkumulierten fluoreszierende Mikrosphären bis zu einer Größe von 200nm ebenfalls perinukleär, während 500nm große Partikel in der Peripherie der Zelle verblieben<sup>145</sup>. Gleichzeitig wurde eine Färbung des lysosomalen Kompartimentes durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Ko-Lokalisation mit den Partikeln bis zu 200nm in der perinukleären Region<sup>122</sup>.

Die Chi-NK benötigen zwischen vier und sechs Stunden, um sich perinukleär anzulagern. Auch für Silika-NP wurde eine vergleichbare Geschwindigkeit beschrieben, bis die NP in der Zellkern-nahen Region akkumulieren<sup>142</sup>.

Ab hier sind unterschiedliche Szenarien denkbar. Entweder die Chi-NK geben ihre Substanzen noch in den Vesikeln frei. Diese werden möglicherweise durch Enzyme und pH-Wert beeinträchtigt oder gar erst aktiviert, wofür bereits einige Ansätze existieren<sup>153</sup>. Auch eine zytoplasmatische Freisetzung der Wirkstoffe wäre möglich. Von hier aus können dann beispielsweise intrazelluläre Prozesse (z.B. Hemmung der Mitose bei Chemotherapeutika) oder auch die DNA beeinflusst werden (z.B. Gentherapie bei erblichen Erkrankungen). Chitosan-NP (Größe ca. 220nm, Zeta-Potential zwischen +35,3 und +13,1 mV) und einzelne Chitosan-Moleküle (Zeta-Potential zwischen +28,8 und -4,5mV) beispielsweise, die beide ebenfalls Clathrin-abhängig endozytiert werden, waren nach der Aufnahme im Nucleus zu finden<sup>154</sup>. Weiterhin ist auch ein Transport zu anderen Zellkompartimenten denkbar, wodurch es unter anderem zu einer Ausschleusung der Chi-NK oder deren Inhalte kommen kann<sup>46</sup>. Möchte man eine bestimmte Route in oder durch die Zelle ansteuern, wäre beispielsweise eine Kopplung an Moleküle denkbar, deren Verlauf bereits bekannt ist<sup>46</sup>.

Eine perinukleäre Akkumulation zusammen mit der Clathrin-vermittelten Endozytose, lässt eine Anreicherung in bereits beschriebenen zellkernnahen Kompartimenten vermuten<sup>46</sup>. Da von einem niedrigen pH-Wert ausgegangen werden muss, sollten, im Hinblick auf eine mögliche Beladung mit Medikamenten, Wirkstoffe sorgfältig auf dieses Milieu abgestimmt werden oder aber die Chi-NK so modifiziert werden, dass andere Aufnahmewege unter Umgehung der Lysosomen stattfinden.

#### 4.2.4 DYNAMIK DER ENDOZYTOSE

Des Weiteren wurde die Dynamik der Endozytose betrachtet. Für Chi-NK konnte eine steigende Aufnahme mit fortschreitender Zeit gezeigt werden. Diese verläuft jedoch nicht linear, vielmehr nimmt die Geschwindigkeit bereits nach einer Stunde deutlich ab. Ein möglicher Grund dafür könnte eine Rezeptor-abhängige Aufnahme sein, die nach Verbrauch erst wieder zur Verfügung stehen, wenn sie mit recycelten Vesikeln wieder zu Zellmembran zurückkehren<sup>155</sup>.

Ein weiterer auffälliger Aspekt ist, dass die Standardabweichung der Aufnahme über die Zeit zunächst zunimmt und nach 6 Stunden wieder abnimmt (Abb. 16b). In der durchflusszytometrischen Auswertung ist erkennbar, dass sich auch HUVECs in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus befinden. Dadurch verändert sich auch die Bereitschaft der Zelle zur Endozytose. Dies könnte eine Erklärung für die anfänglichen Unterschiede, insgesamt jedoch vergleichbaren Aufnahme sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass nicht alle Zellen sofort zu gleich vielen Chi-NK Kontakt haben und es erst im Verlauf der Zeit durch Diffusion zu einer gleichmäßigen Verteilung der Chi-NK auf den Zell-Oberflächen kommt.

Anders verhielt es sich dagegen bei der Konzentrationsabhängigkeit. Zwischen Chi-NK-Aufnahme und steigender Konzentration findet sich ein beinahe linearer Zusammenhang. Interessanterweise ist auch bei den Konzentrationen, die toxisch für HUVECs sind, noch eine zunehmende Aufnahme zu beobachten. Möglicherweise wirken die toxischen Effekte zeitversetzt zur Aufnahme, sodass selbst Zellen, die bereits eine hohe Menge Chi-NK internalisiert haben, noch für einige Zeit eine intakte Endozytose aufrechterhalten können.

Insgesamt wird ein Vergleich mit anderen NP im Hinblick auf die Endozytose dadurch erschwert, dass sehr viele Parameter Einfluss auf die Endozytose haben. Abweichende Ergebnisse können zum Beispiel durch das unterschiedliche Endozytose-Verhalten der verschiedenen Zelllinien oder durch das Vorhandensein einer Vielzahl von Proteinen im Medium zustande kommen.

Doch trotz aller Unterschiede in den Versuchsbedingungen, wird die Aufnahme von sphärischen NP in der Größenordnung von 100nm und einer positiven Oberflächenladung, mit und ohne Protein-Hülle in der Literatur häufig beschrieben. Auch der Clathrin-vermittelte Weg passt gut zu früheren Arbeiten mit in Größe und Ladung den Chi-NK ähnlichen NP.

## 4.3 TOXIZITÄT

Für Chi-NK konnte gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration sowohl die Aufnahme, als auch die Toxizität steigt. Es herrscht also ein, zumindest indirekter, Zusammenhang zwischen endozytierten Chi-NK und Toxizität. In Verbindung mit der Tatsache, dass auch hohe Konzentrationen erst nach einer bestimmten Zeit toxisch sind (Abb. 14) und die Aufnahme ebenfalls zeitabhängig ist, könnte das bedeuten, dass vor allem die aufgenommenen Chi-NK für die Zellschädigung verantwortlich sind und nicht etwa Partikel, die auf der Oberfläche haften.

Das spielt vor allem unter Flussbedingungen eine Rolle, da hier die Chi-NK langsamer oder weniger aufgenommen werden, als unter statischen Bedingungen und somit eine verringerte zytotoxische Wirkung haben (Vgl. Abb. 20 bis 22). Eine verminderte Zytotoxizität durch NP unter Flussbedingungen konnten auch andere Autoren zeigen<sup>156</sup>.

Nichtsdestotrotz muss die mögliche Toxizität bei einer eventuellen Anwendung am Menschen genauer beleuchtet werden. In den beschriebenen Experimenten konnte bis zu einer Konzentration von  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml sowohl in den Epifluoreszenz-Bildern als auch in der Durchflusszytometrie mit einer PI-Färbung keine toxischen Effekte auf HUVECs nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen zeigen ein abnehmendes Zellüberleben. Auch andere Autoren beschreiben für diverse NP einen nicht-toxischen Bereich. Ein konkreter Vergleich ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. Vielmehr nehmen, wie auch bei der Internalisation von NP, eine ganze Reihe von Parametern, wie zum Beispiel Größe und Material der NP, aber auch der Zelltyp, Einfluss auf die Zelltoxizität. Gerade bei Chitosanen gibt es eine Vielzahl möglicher Formen, in der sie vorliegen können, beispielsweise als einzelnes Molekül, als NP oder als Nanokapsel. Das macht eine detaillierte Betrachtung der NP notwendig, um Vergleiche mit Chi-NK ziehen zu können.

### 4.3.1 VERGLEICH DER CHI-NK MIT ANDEREN NP ÜBER EINFLUSSFAKTOREN AUF DEREN TOXIZITÄT

Ein entscheidender Faktor für die Zytotoxizität ist das Material der NP. Chi-NK gehören zur Gruppe der (Bio-) Polymeren. Cao et al. verglichen in ihrem Review mehrere Arten von NP miteinander und stellten fest, dass schon Polymer-basierte NP im Allgemeinen weniger toxisch für Endothelzellen sind als zum Beispiel Metall-basierte NP, wie Zink- oder Silber-NP<sup>45</sup>.

Chitosan selbst gilt gemeinhin als nicht-toxisch und biologisch abbaubar. Viele Eigenschaften werden bereits genutzt, sowohl in der Medizin, als auch in der Kosmetik<sup>82, 157</sup>. Eine Chitosan-basierte Wundauflage beispielsweise wurde bereits von der FDA zugelassen<sup>158</sup>. In mehreren Ländern wird Chitosan in diätischen Produkten verwendet. All das setzt voraus, dass Chitosan nicht toxisch in der jeweiligen Anwendung ist. Ein weiterer Aspekt, der für die Biokompatibilität von Chitosanen spricht, ist die verminderte Toxizität bei Modifikation von NP aus unterschiedlichen Materialien mit Chitosan. Alginat-Mikrosphären<sup>68</sup> und auch Zinksulfid-Quantumdots<sup>159</sup> sind weniger toxisch, wenn sie mit Chitosan beschichtet sind. Auch zytotoxische Substanzen, zum Beispiel Capsaicin, sind weniger zellschädigend, wenn sie in Chitosan-NP gebunden sind<sup>93</sup>.

Doch selbst wenn NP aus ein und demselben Material bestehen, können Parameter wie Form, Größe und Oberflächenladung erhebliche Unterschiede in der Wirkung auf die Zellen nach sich ziehen. Chi-

NK liegen in einer sphärischen Form vor. Für diese Form der Partikel konnte für Endothelzellen eine geringere Toxizität als zum Beispiel für Stab-förmige NP gezeigt werden<sup>122</sup>. Auch in anderen Zellen konnte eine geringere oder keine Toxizität für sphärische NP im Vergleich zu anderen Formen festgestellt werden<sup>160</sup>.

Die Toxizität von Titanoxid-NP scheint sogar abhängig von deren Kristallstruktur zu sein<sup>161</sup>. Für Chitosan gibt es unterschiedliche Ergebnisse: Huang et al. konnten zwischen Chitosan-Molekülen und Chitosan-NP keine Unterschiede in der konzentrationsabhängigen Toxizität nachweisen<sup>138</sup>, während Jesus et al. eine höhere Toxizität bei Chitosan-NP im Vergleich zu Chitosan-Polymeren feststellen konnten<sup>162</sup>.

Häufig wird auch die Größe eines NP als Einflussfaktor untersucht. Mehrere Untersuchungen zeigten bei einer Vielzahl an eukaryotischen Zellen, als auch im Speziellen bei Endothelzellen, einen Zusammenhang zwischen Größe und Toxizität<sup>45,139,135</sup>. Allgemein gültige Aussagen zur Größenabhängigkeit lassen sich jedoch trotzdem nicht ableiten. Bei Chitosan-NP konnten zwischen 256nm und 122nm keine Unterschiede in der Auswirkung auf A549-Zellen (Adenokarzinom-Zellen der Lunge) festgestellt werden (im Vergleich: Chi-NK 112nm). Ursächlich für die unterschiedlichen Größen waren unterschiedliche molekulare Gewichte der Chitosan-Moleküle<sup>138</sup>. Einen signifikanten Unterschied machten jedoch der Acetylierungsgrad der verwendeten Chitosan-Moleküle.

Die Oberflächenladung von NP hat ebenfalls Einfluss auf deren Toxizität. Huhn et al. konnten zeigen, dass positiv geladene Gold-Partikel schon in geringeren Konzentrationen toxisch auf Endothelzellen wirken als negativ geladene<sup>163</sup>. Als Grund hierfür wird eine stärkere Interaktion von positiv geladenen NP mit der negativ geladenen Zelloberfläche vermutet.

Bei Chitosanen hängt diese Oberflächenladung maßgeblich vom Acetylierungsgrad ab, welcher als Einflussfaktor auf die Toxizität bereits bekannt ist<sup>164,138</sup>. Mit zunehmender Acetylierung nimmt die Zahl an kationischen Amino-Gruppen und somit das Zeta-Potential ab und damit auch die Interaktion mit Zelloberfläche<sup>138</sup>. Bei A495-Zellen konnte mit zunehmendem Acetylierungsgrad des Chitosans tatsächlich eine abnehmende Toxizität nachgewiesen werden, unabhängig von molekularem Gewicht oder Konfiguration (Chitosan-Moleküle vs. Chitosan-NP)<sup>138,76</sup>. Huang et al. konnten für NP eine abnehmende Zellschädigung bei der Steigerung des Acetylierungsgrades von 12% ( $\zeta$ -Potenzial 25,4 – 34,6 mV) auf 39% ( $\zeta$ -Potenzial 14,3 -15,4 mV) feststellen (jedoch ohne Zugabe von Proteinen)<sup>138</sup>. Auch Kean et al. verglichen die Toxizität mehrerer Chitosane mit unterschiedlichen Acetylierungsgrad und fanden eine Grenze von ca. 40-60%, unter der die Moleküle kaum mehr toxische Effekte aufwiesen<sup>76</sup>.

Bei Chi-NK im Speziellen ist ein abnehmendes Zeta-Potential mit steigendem Acetylierungsgrad des verwendeten Chitosans bekannt<sup>165</sup>. In dieser Arbeit wurden Chitosane mit einem Acetylierungsgrad von 32% für die Herstellung verwendet, was in einem Zeta-Potenzial von +60 mV resultiert. Trotz dieser positiven Ladung, haben sie bis zu einer bestimmten Konzentration keinen toxischen Effekt oder können sogar den toxischen Effekt von Capsaicin auf MDCK-Zellen reduzieren<sup>93</sup>. Eine mögliche Erklärung könnte die Bindung von Proteinen an die Chi-NK sein. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass diese Protein-Schicht die Zellschädigung von, auch kationischer, NP herabsetzt<sup>126,127</sup>.

Neben den NP-Eigenschaften spielt auch der Zelltyp eine entscheidende Rolle für einen schädlichen Einfluss der Partikel. HUVECs werden von Siliziumoxid-NP stärker beeinflusst als zum Beispiel Zellen des Zervix-Karzinoms<sup>142</sup>. Danielsen et al. verglichen die Toxizität mehrerer Metall-basierter NP jeweils

bei HUVECs und THP-1-Zellen (leukämische Monozyten). Hierbei zeigte sich, dass die stärkste Toxizität bei den beiden Zelllinien von jeweils unterschiedlichen NP hervorgerufen wurde<sup>161</sup>.

Insgesamt bedeutet das für eine mögliche intravenöse Anwendung, dass neben anderen Endothelzellen, vor allem zelluläre Blutbestandteile untersucht werden müssen.

Makrophagen, als Weiterentwicklung der im Blut enthaltenen Monozyten, zeigten ab einer Konzentration von Chi-NK ähnlichen NP von  $550 \cdot 10^6$  Partikel/ml einen toxischen Effekt<sup>166</sup>, während bei HUVECs, wie erwähnt, erst ab  $1,3 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml eine eindeutige Schädigung nachweisbar war. Bender et al. untersuchten den Einfluss auf verschiedene wesentliche Faktoren im Zusammenhang mit Blutbestandteilen. Hierbei konnte nach Hinzufügen von 2%iger Lösung mit Chitosan beschichteten NP zu Vollblut keine erhöhte Hämolyse und nur ein geringer Effekt auf die Plättchen-Aggregation nachgewiesen werden<sup>167</sup>. Das sind zumindest erste Hinweise, dass Chitosan-NP in dieser Form gut biokompatibel sind.

#### 4.3.2 TOXIZITÄTSMESSUNGEN UND ANDERE MARKER FÜR ZELLVERÄNDERUNGEN

Um die Zelltoxizität und die Biokompatibilität eines Stoffes zu testen, stehen eine große Zahl an Methoden zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen die Zellmorphologie und zum anderen das Zellüberleben anhand von PI, ein indirekter Parameter für die Zellmembran-Integrität, beurteilt. Beide Untersuchungen brachten ähnliche Ergebnisse, was die kritische Konzentration betrifft. Dass sich Chi-NK in diesen Tests in bestimmten Konzentrationen als ungiftig erwiesen, ist ein maßgeblicher Hinweis, sollte jedoch noch weiter evaluiert werden. Zumal die Veränderung der Zellmorphologie und der Membranintegrität eher späte Veränderungen darstellen. Veränderungen im Zellmetabolismus, in der Genexpression oder aber der Einfluss auf Endothelaktivierung werden hier nicht mit einbezogen. Calarco et al. zum Beispiel beschrieben bei Polyethylenimine zwar keine signifikante Zytotoxizität, jedoch konnten DNA-Schäden festgestellt werden, sodass Zellveränderungen schon ohne sichtbare morphologische Zeichen vorliegen könnten<sup>168</sup>.

Trotz der vielen Versuchsreihen zu Chitosan-basierten NP, die in der Literatur beschrieben sind, ist es schwierig konkrete Vergleiche anzustellen. Nur selten sind die Chitosane, die Art der Verarbeitung, die letztendliche Erscheinungsform, die getesteten Zelllinien und nicht zuletzt die verwendeten Methoden nicht identisch und lassen daher nur vorsichtige Schlüsse zu. Dazu kommt, dass die Menge an NP zum Teil nicht genau bestimmt ist, sondern in unterschiedlichen Einheiten angegeben wird. Nichtsdestotrotz ist in der Zusammenschau der Literatur hinsichtlich Material, Größe, Ladung und Form vereinbar, dass sowohl das verwendete Chitosan als auch das daraus entwickelte Chi-NK im bisher untersuchten Rahmen in Konzentrationen bis  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml keinen schädlichen Einfluss auf HUVECs haben.

Weitere wichtige Aspekte, die in diesem Zusammenhang untersucht werden sollten, sind zum einen die nicht sichtbaren Veränderungen, wie Genexpression, sowie mögliche Abbaupfade der Chi-NK, um eine Akkumulation der Chi-NK mit eventuellen schädlichen Metaboliten auszuschließen.

## 4.4 VERÄNDERUNG DER INTERAKTION UNTER STRÖMUNGSBEDINGUNGEN

Neben Zell- und NP-abhängigen Einflussgrößen muss auch ein weiterer Aspekt bei der Zell-NP-Interaktion betrachtet werden. Unter physiologischen Bedingungen findet der Kontakt zwischen NP und dem Endothel nicht unter statischen Bedingungen statt. Ein Fluss übt zusätzlich Kräfte auf NP aus, sodass eine Bindung an das Endothel erschwert wird. Zudem kommt es zu verschiedenen zellulären Veränderungen, die möglicherweise Einfluss auf die NP-Zell-Interaktion haben<sup>56</sup>. Hinzu kommen die Erythrozyten, die eine veränderte Verteilung von kleineren im Blut enthaltenen Bestandteilen bewirken<sup>55</sup>. Tan et al. konnten zeigen, dass sich die NP-Verteilung von ca. 100 nm großen Biotin-bedeckten NP im Gefäß durch die Zugabe von Erythrozyten verändert. Die Konzentration ist nicht mehr homogen über den ganzen Durchmesser des Gefäßes, sondern in der Peripherie deutlich höher als im Zentrum, was in einer erhöhten effektiven NP-Konzentration und letztlich in einer erhöhten Bindung an Endothelzellen resultiert<sup>55</sup>.

Aus diesen Gründen wurden erste Flussversuche mit einem Chi-NK-Erythrozyten-Gemisch durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass sich die Interaktion zwischen Chi-NK und Zellen verändert sobald der Kontakt unter Flussbedingungen stattfindet. Auf den Bildern erkennt man, dass die Zellen nach sechs Stunden deutlich weniger Chi-NK gebunden haben, als unter statischen Bedingungen zu diesem Zeitpunkt (Vgl. Abb 13 und 20c).

Zwar werden die meisten Untersuchungen mit NP unter statischen Bedingungen durchgeführt, jedoch konnte bereits auch für andere NP eine Abnahme der Internalisierung unter Flussbedingungen beobachtet werden<sup>156</sup>. Fede et al. fanden zudem bei Gold-NP heraus, dass diese unter Flussbedingungen in Konzentrationen, die unter statischen Bedingungen bereits zelltoxisch waren, weniger Aggregate auf der Zelloberfläche bildeten und keine signifikante Zytotoxizität aufwiesen<sup>156</sup>. Da man davon ausgeht, dass vor allem die intrazellulären Chi-NK in hohen Dosen eine toxische Wirkung haben, ist unter Flussbedingungen auch hier mit einer zusätzlich reduzierten Toxizität zu rechnen.

Eine mögliche Erklärung für die verminderte zelluläre Interaktion der Chi-NK wäre eine viel höhere Energie, die nötig ist, um die unter Strömungseinfluss tangential an den Endothelzellen wirkende Kraft zu überwinden. Des Weiteren ist bereits bekannt, dass sich unter Fluss sowohl Zellmorphologie als auch die Expression bestimmter Marker bei Endothelzellen verändern, was ein möglicher Erklärungsansatz sein könnte und beim Design von NP berücksichtigt werden sollte<sup>56,169</sup>.

Es scheint aber auch Veränderungen unter Flussbedingungen zu geben, die zu einer verstärkten Bindung an die Endothelzellen führen. Für Siliziumdioxid-NP beispielsweise konnte unter Fluss eine erhöhte Aufnahme gezeigt werden, bei gleichzeitiger Veränderung der Zelloberfläche durch Aktin-Skelett-Anpassungen an die Flussbedingungen. Die Autoren vermuten eine erleichterte Aufnahme durch sogenanntes „*membrane ruffling*“, das unregelmäßig Werden der Zelloberfläche unter Flussbedingungen<sup>170</sup>. Rigau et al. zeigten eine verstärkte zelluläre Interaktion von kationischen NP unter Flussbedingungen, während anionische NP weniger stark davon beeinflusst wurden<sup>171</sup>. Dies legt nahe, dass auch die Ladung der NP eine Rolle beim Einfluss der Scherkräfte spielt.

Des Weiteren ist in der vorliegenden Arbeit auffallend, die Ansammlung von Chi-NK an den Zell-Zell-Kontakten. Möglicherweise können Proteine, die nur an Zell-Zell-Kontakten vorkommen, Chi-NK binden. CD31/PECAM-1 beispielsweise kommt bei Endothelzell-Schichten fast ausschließlich an den

Zellgrenzen vor und wird Scherkraft-induziert phosphoryliert, sodass eine Bindung unter Fluss-jedoch nicht unter statischen Bedingungen stattfindet<sup>172, 173</sup>.

## 4.5 ANREICHERUNG IM vWF-EXPRIMIERENDEN ENDOTHEL

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Medikamenten-Träger wäre eine Akkumulation an einer definierten Stelle, z.B. in einem Tumor, wünschenswert. Dies kann beispielsweise durch die passive Anreicherung durch den bereits erwähnten EPR-Effekt erfolgen, bei dem nanoskalige Wirkstoffe in Tumoren durch erhöhte Permeabilität und Aufnahme des Tumor-Endothels kumulieren. Dieser Effekt wird jedoch kontrovers diskutiert, da zum einen auch andere, gesunde Gewebe, wie Leber oder Milz einer erhöhte Endothelpermeabilität aufweisen. Zum anderen wird die Relevanz des EPR-Effektes *in vivo* von manchen Autoren in Frage gestellt<sup>174</sup>.

Eine andere vielversprechende Methode ist der aktive Medikamententransport. Es sind bereits Medikamente im Einsatz, die bestimmte Zielstrukturen, wie zum Beispiel Oberflächenmarker von Tumorzellen, ansteuern<sup>175, 176</sup>. Ziel ist hierbei, eine erhöhte Exposition der Tumorzellen gegenüber Wirkstoffen, beispielsweise Chemotherapeutika, während nicht betroffene Zellen einer geringeren Menge an Wirkstoffen ausgesetzt sind und somit die Nebenwirkungsrate sinkt<sup>177</sup>. Doch nicht nur die Tumorzelle und ihre speziellen Eigenschaften können als Angriffspunkt dienen. Auch das Endothel in Tumoren weist vielfältige Veränderungen, wie eine abnorme Endothelzellaktivierung oder erhöhte Proliferation, im Vergleich zu gesundem Gewebe auf und kann somit als Zielstruktur dienen.

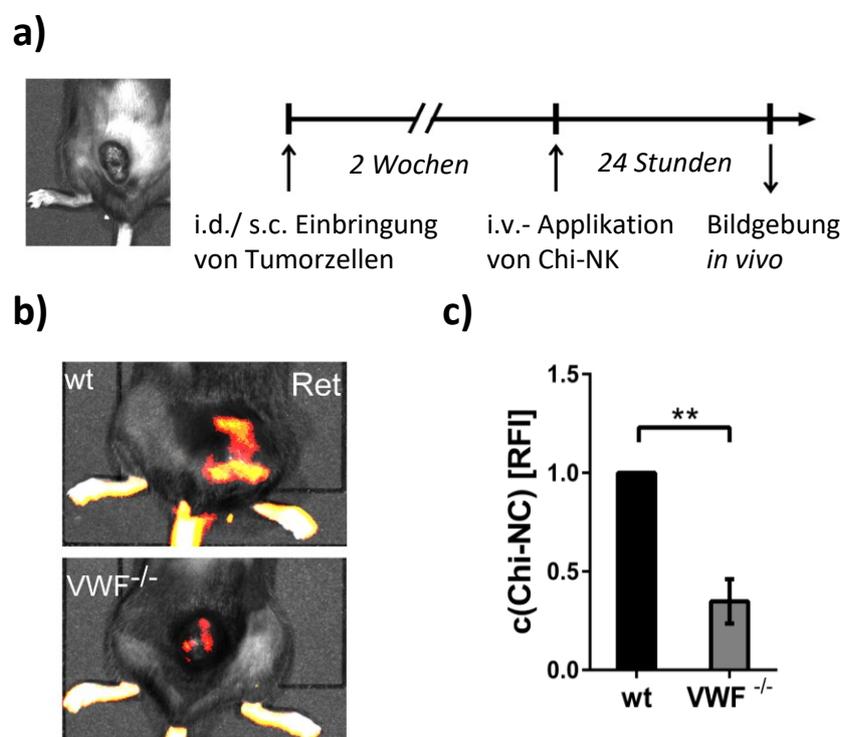
Schiffelers et al. entwickelten NP bei denen siRNA („*small interfering RNA*“, engl. für „kleine eingreifende RNA“) zusammen mit einem Liganden für Integrin komplexiert vorlagen. Integrin wurde als Ziel gewählt, da es vor allem bei der Gefäßneubildung, wie es vermehrt bei Tumoren vorkommt, exprimiert wird. Die verwendete siRNA inhibierte die weitere Gefäßneubildung. In Tumor-tragenden Mäusen konnte durch diese NP per Integrin-Liganden ein zielgerichteter Transport zum Tumor und ein durch siRNA ausgelöstes reduziertes Tumorwachstum gezeigt werden<sup>178</sup>.

Auch in den tumoralen Gefäßen des Melanoms kommt es über unterschiedliche Mechanismen zu einer Endothelzell-Aktivierung. Daraus resultiert unter anderem eine erhöhte Freisetzung von vWF nach intraluminal. Um dieses Molekül als mögliche Zielstruktur zu testen, wurde in den vorliegenden Untersuchungen dieses aktivierte Tumorendothel simuliert und Flussversuche mit vWF-exprimierendem Endothel durchgeführt. In Abbildung 21 und 22 ist erkennbar, dass Chi-NK im Vergleich zu Experimenten mit nicht-aktivierten HUVECs auch ohne vorherige Modifikation (z.B. mit Antikörpern) an stimuliertes Endothel bzw. an die vWF-Fäden binden. Zudem ist erkennbar, dass durch die Anreicherung an den extrazellulären vWF-Fäden eine verminderte Adhäsion an der Zelloberfläche und damit Endozytose der Chi-NK nach sich zieht (Abb. 21 und 22). Dieses Phänomen könnte dazu genutzt werden, Chemotherapeutika oder andere medikamentöse Tumortherapien gezielt im aktivierten Endothel des Melanoms anzureichern und gleichzeitig durch Schonung von nicht betroffenem Gewebe die Nebenwirkungen zu reduzieren.

Erste Versuche mit Melanom-tragenden Mäusen ergaben bereits Hinweise, dass die Bindung der Chi-NK an vWF auch *in vivo* eine Rolle spielt. In der *in vivo*-Bildgebung (engl.: *intravital imaging system*, IVIS) nach i.v.-Applikation von Chi-NK bei Melanom-tragenden Mäusen zeigte sich eine vermehrte Anreicherung der Chi-NK im Bereich des Tumors (Abb. 23). Fiel vWF als Bindungspartner weg, in diesem Fall bei vWF-Knockout Mäusen, war hingegen nur eine verminderte Akkumulation in dieser Region

darstellbar. Somit ist die vWF-Bindung der vermittelnde Faktor zwischen Chi-NK und dem aktivierten Tumorendothel.

Möglicherweise liegt die Erklärung in der Ähnlichkeit des vWF-Moleküls zu einem anderen Molekül, den Muzinen. VWF und Muzine, beides Glykoproteine, haben einige Gemeinsamkeiten in Sekundär- und Tertiärstruktur<sup>179-181</sup>. Gezeigt werden konnte bereits, dass die Beschichtung mit Chitosan die Adhäsion von Partikeln an Muzin-Schicht signifikant verbessert<sup>182</sup>. Es existieren verschiedene Theorien, wie genau die Bindung des Chitosans an solche Muzine zustande kommt, unter anderem über elektrostatische, ionische oder Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Verschränkung der Polymere ineinander<sup>183-185</sup>. Möglicherweise spielen ähnliche Mechanismen eine Rolle in der vermehrten Bindung von Chi-NK an vWF-Fäden.



**Abbildung 23 Chi-NK-Applikation bei Melanom-tragenden Mäusen. a) Schematische Darstellung des Versuchsablaufes:** 2 Wochen nach Injektion von Melanomzellen wurden die Chi-NK i.v. verabreicht. Nach 24 Stunden wurden die IVIS- Aufnahmen erstellt. **b + c) *in vivo*-Bildgebung (IVIS) nach intravenöser Applikation von Chi-NK bei Melanom-tragenden Mäusen, oben Wildtyp, unten vWF-Knockout-Mäuse.** Die Akkumulation von Chi-NK in tumoralen Gefäßen ist auch *in vivo* von Bedeutung. Fällt das vWF als Bindungspartner für Chi-NK weg, zeigt sich eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz als Zeichen einer verminderten tumoralen Chi-NK-Akkumulation.

## 4.6 AUSBLICK UND MÖGLICHKEITEN

Im weiteren Verlauf können mögliche Wirkstoffe getestet werden, die mit Hilfe von Chi-NK transportiert werden könnten und ob diese auch in gewünschten Konzentrationen ihren Wirkort erreichen, beispielsweise tumorale Gefäße des Melanoms. Kaiser et al. beluden Chi-NK erfolgreich mit Capsaicin und konnten für den in Chi-NK gebundene Substanz eine niedrigere Toxizität gegenüber MDCK-Zellen als in der freien Form zeigen<sup>93</sup>. Im konkreten Fall des Melanoms könnten Wirkstoffe zum einen aus dem Kreis der Chemotherapeutika und der Immuncheckpoint- und Signaltransduktionsinhibitoren sein, zum anderen die erhöhte Thrombogenizität in betroffenen Gefäßen beeinflussen.

Cauwels et al koppelten Interferon, einer der bei Melanomen eingesetzten Wirkstoffe, an CD20-Antikörper. Damit konnten bei Mäusen mit (durch gezielte genetische Veränderung) CD20-positiven Melanomen ähnliche antitumorale Effekte bei geringeren Nebenwirkungen erzielt werden<sup>186</sup>.

Eine weitere mögliche Wirkstoffgruppe sind Tyrosinkinase-Inhibitoren. Dabrafenib ist in Deutschland für die medikamentöse Therapie des Melanoms bereits zugelassen, Sorafenib wird noch als Mono- oder Kombinationstherapie auf seine Wirksamkeit hin untersucht<sup>187-189</sup>. Diese Medikamente sind derzeit aufgrund der schlechten Löslichkeit bei physiologischem pH-Wert nur als orale Therapie verfügbar. Die Bioverfügbarkeit dieser Applikationsform ist allerdings schwer vorherzusehen, da die Substanz nach der Applikation verschiedene Hindernisse überwinden muss (u.a. Resorption im Darmepithel, Elimination/Deaktivierung durch Metabolisierung in der Leber) und führt zu teils großen interindividuellen Unterschieden<sup>190</sup>. Das birgt das Risiko einer unbeabsichtigten Überschreitung der maximal tolerablen bzw. Unterschreitung der minimal notwendigen Dosis. Eine Inkorporation in den lipophilen Kern der Chi-NK könnte mit der verbesserten Löslichkeit eine intravenöse Anwendung möglich machen. Damit könnte die Bioverfügbarkeit verbessert und mit einer zielgerichteten Therapie die Nebenwirkungsrate verringert werden.

Neben der Frage, wie ein Stoff in den Körper gelangt, sollte auch der weitere Verbleib weiter untersucht werden. Die Biokompatibilität ist nicht allein vom Stoff selbst abhängig, sondern auch von seinen möglicherweise schädlichen Metaboliten, sowie der Interaktion mit anderen im Körper vorkommenden Molekülen. Zunächst sollte evaluiert werden, ob und wie Chi-NK abgebaut werden. Zwar wird Chitosan im Allgemeinen als „biokompatibel und biologisch abbaubar“ betrachtet und tatsächlich existieren einige humane Enzyme, die Chitosan theoretisch abbauen könnten. In Kaninchen fand man nach der intravenösen Injektion von Chitosan eine erhöhte Konzentration an Lysozym, eines der Chitosan-abbauenden Enzyme<sup>191</sup>. Auch die endgültige Elimination sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Verschiedene Studien mit intravenös verabreichten Chitosan-Derivaten konnten unterschiedliche Akkumulationsmuster feststellen, darunter waren Organe wie Leber, Niere, aber auch Milz. Doch ob auch Chi-NK mit seinen verschiedenen Komponenten im menschlichen Körper verstoffwechselt werden können, ist bislang weitestgehend unbekannt.

In präklinischen Tiermodellen wurden mit Hilfe einer *in vivo*-Bildgebung Aufnahmen von Wildtyp-Mäusen angefertigt, denen fluoreszierende Chi-NK in die Schwanzvene injiziert wurden. Hierbei zeigte sich in ersten Auswertungen eine deutliche Anreicherung in der Milz und Leber (Abb. 24). Eine mögliche Ursache ist der bereits erwähnte EPR-Effekt durch die erhöhte Permeabilität der Endothelien in diesen beiden Organen. Möglich ist also eine hepatische Elimination. Zum einen kann dieser Umstand bei einer Leberinsuffizienz zu einer Akkumulation im Körper führen. Zum anderen kann durch die gezielte Veränderung der Eigenschaften der NP, wie Größe und Oberflächenzusammensetzung, ein Abbau in der Leber verlangsamt werden<sup>192</sup>.

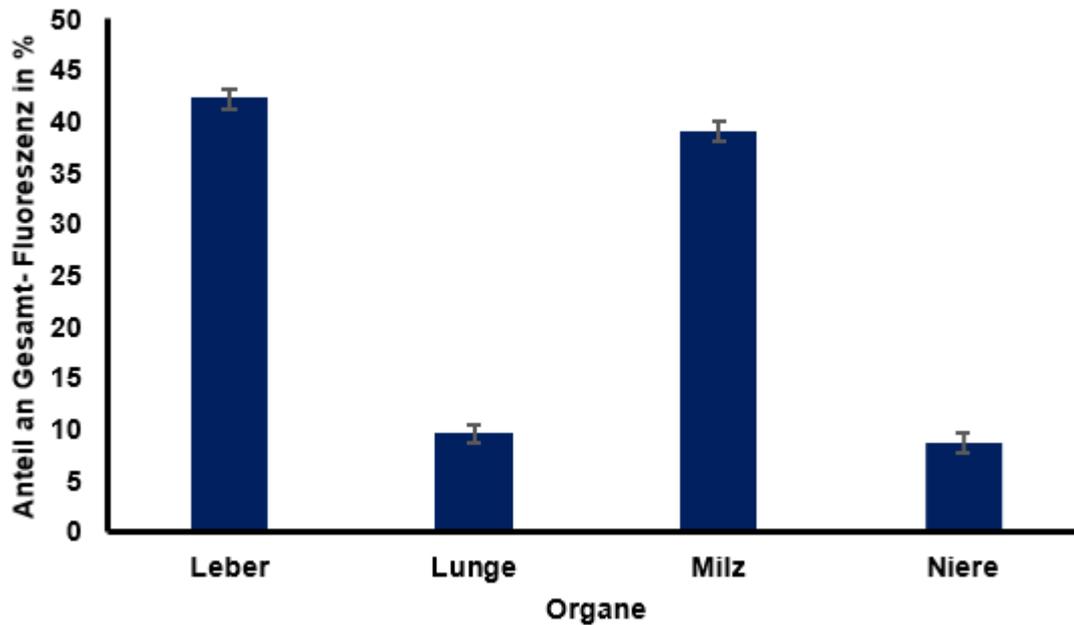


Abbildung 24 Anteil der Gesamt-Fluoreszenz in IVIS-Aufnahmen von Mäusen nach intravenöser Applikation von Chi-NK. Anteil einzelner Organe an der Gesamtfluoreszenz. Leber und Milz weisen besonders hohe Fluoreszenzanteile auf.

## 4.7 SCHLUSSFOLGERUNG

Chitosan-NK gelangen Clathrin-abhängig in den Intrazellulärraum der HUVECs. Dort akkumulieren sie perinukleär und verbleiben dort für min. 48 Stunden. Bis zu einer Konzentration von  $0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml bleiben Chi-NK ohne toxische Effekte auf HUVECs. In höheren Konzentrationen werden diese zeit- und konzentrationsabhängig wahrscheinlich hauptsächlich von den intrazellulären Partikeln ausgelöst.

Unter unidirektionalen Strömungsbedingungen ist eine abnehmende Anlagerung der Chi-NK an die Zelloberfläche zu beobachten. Das bedeutet, dass unter physiologischen Bedingungen eine höhere Konzentration angewendet werden kann, da weniger intrazelluläre Partikel auch eine geringere Toxizität nach sich ziehen. In der Simulation eines aktivierten Endothels durch zusätzliche Stimulation mit Histamin ist dagegen eine deutliche Anreicherung der Chi-NK an den gestreckten vWF-Fäden zu erkennen. Dabei ist keine Kopplung der Chi-NK an vWF-Antikörpern nötig. Gleichzeitig ist eine nochmals reduzierte Adhäsion der Chi-NK an die Zelloberfläche der HUVECs zu beobachten. Über diese vWF-vermittelte Kumulation von Chi-NK an den Zellen ergibt sich eine neue Möglichkeit zytotoxische Substanzen gezielt in gerinnungsaktiviertem Endothel anzureichern und gleichzeitig nicht betroffenes Gewebe zu schonen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Verpackung von Biomolekülen wie z.B. *messenger-RNA* oder Medikamenten wie z.B. Chemotherapeutika in Nanopartikel ist ein gängiges Verfahren in der Nanomedizin. Entsprechende Nanopartikel werden unter anderem bereits in der Krebstherapie oder zur Impfung gegen SARS-CoV-2 eingesetzt. Nanometrischen Wirkstoffvehikel werden genutzt, um die verpackten Biomoleküle vor dem vorzeitigen Abbau durch z.B. Ribonukleasen zu schützen oder um hydrophobe Medikamente in einer wässrigen Lösung zu stabilisieren. Die praktische Handhabung nanomedizinischer Formulierungen im klinischen Alltag und der therapeutische Effekt der transportierten Substanz hängen maßgeblich von der Stabilität des Nanopartikels und seiner Wechselwirkung mit dem biologischen System ab. Aufgrund ihrer geringen Größe können Nanopartikel biologische Barrieren wie die Blut-Gewebe-Schranke überwinden und von Zellen internalisiert werden. Dies kann sowohl therapeutisch genutzt werden, aber auch zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Doch bei der Testung von Nanomaterialien wird der Fokus selten auf die Wechselwirkung zwischen physiologischem und pathophysiologischem Endothel und den Partikeln gelegt. Auch der Einfluss des Blutflusses auf die Interaktion von im Blut zirkulierenden Nanopartikel und der Gefäßwand sind weitestgehend unbekannt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher die Wechselwirkung von Chitosan-Nanokapseln (Chi-NK) mit humanen Endothelzellen unter statischen Versuchsbedingungen und unter (patho-) physiologischen Blutflussbedingungen untersucht. Der Einfluss einer prokoagulatorischen Endothelzellaktivierung und insbesondere die dabei ablaufende Freisetzung des von-Willebrand-Faktors (vWF) auf die Interaktion zwischen Chi-NK und Endothel stand im Fokus der Flussexperimente. Der vWF ist ein hochmolekulares Glykoprotein, welches nach seiner Freisetzung Scherkraft-abhängig gestreckt wird und Thrombozyten aus dem Blutstrom rekrutiert.

Unter statischen Bedingungen kam es zu einer Dosis- und Zeit-abhängigen Aufnahme der Chi-NK in die Endothelzellen. In Immunfluoreszenzfärbungen war eine perinukleäre Akkumulation erkennbar. Durchflusszytometrische Messungen zeigten, dass geringe Chi-NK Konzentrationen ( $< 0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) nicht zytotoxisch waren. Höheren Chi-NK Konzentrationen ( $> 0,33 \cdot 10^{12}$  Partikel/ml) zeigten eine Zeit-, als auch Konzentrations-abhängige Toxizität. Behandlungen mit verschiedenen Endozytoseinhibitoren deuteten darauf hin, dass Chi-NK hauptsächlich Clathrin-abhängig in die Endothelzellen aufgenommen wurden.

In mikrofluidischen Flusskammern wurden in weiteren Versuchen der Einfluss des Blutflusses und die prokoagulatorischen Endothelzellaktivierung auf die Wechselwirkung zwischen Gefäßwand und Chi-NK untersucht. Im Gegensatz zu den statischen Versuchsbedingungen lagerten sich unter unidirektionalen Strömungsbedingungen von  $6 \text{ dyn/cm}^2$  weniger Chi-NK an der Endothelzelloberfläche an. Nach Freisetzung des vWF durch Stimulation der Endothelzelle mit  $50 \mu\text{M}$  Histamin ist allerdings eine deutliche endotheliale Anreicherung der Chi-NK über den durch den Blutfluss gestreckten, fadenförmigen vWF zu erkennen.

Aufbauend auf diesen Arbeiten soll in zukünftigen Versuchen evaluiert werden, ob sich Chi-NK für den Transport von Krebsmedikamenten im präklinischen Tiermodell eignen. Die hier beschriebene vWF-vermittelte Kumulation von Chi-NK am Endothel zeigt auf, dass sich blutzirkulierende Nanopartikel besonders in gerinnungsaktivierten Gefäßabschnitten anreichern. Dies ist insbesondere für zukünftige Therapieansätze interessant, da bekannt ist, dass in Tumoren und Metastasen des Melanoms vWF-Fäden gehäuft im Gefäßlumen vorkommen und somit eine Anreicherung antitumoral wirkender Substanzen im Tumorgefäß ermöglichen.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. ISO/TS 80004-2:2015,
2. Göran Lövestam HR, Gert Roebben, Birgit Sokull Klüttgen, Neil Gibson, Jean-Philippe Putaud and Hermann Stamm: Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes. 2010
3. G. Schmid MD, H. Ernst, H. Fuchs, W. Grünwald, A. Grunwald, H. Hofmann, M. Mayor, W. Rathgeber, U. Simon, D. Wyrwa: Small Dimensions and Material Properties A Definition of Nanotechnology. 2003
4. Bhushan B: Introduction to Nanotechnology. In: *Springer Handbook of Nanotechnology*. edited by Bhushan B, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp 1-12
5. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV: Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of nanobiotechnology*, 2: 12-12, 2004 10.1186/1477-3155-2-12
6. Ma H, Williams PL, Diamond SA: Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environmental Pollution*, 172: 76-85, 2013  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.011>
7. Ge Y, Schimel JP, Holden PA: Evidence for negative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental science & technology*, 45: 1659-1664, 2011 10.1021/es103040t
8. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier J-F, Delos M, et al.: Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and applied pharmacology*, 207: 221-231, 2005 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.008>
9. Michael Steinfeldt AvG, Ulrich Petschow, Rüdiger Haum, Thomas Chudoba, Stephan Haubold Nachhaltigkeitseffekte durch Herstellung und Anwendung nanotechnologischer Produkte *Schriftenreihe des IÖW* 2004
10. (Hrsg.) BfBuFB: nano.DE-Report 2013. *Ideen Innovation Wachstum*, 2013
11. (Hrsg.) U: Nanotechnik für Mensch und Umwelt. 2009
12. Elbourne A, Crawford RJ, Ivanova EP: Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues. *Journal of Colloid and Interface Science*, 508: 603-616, 2017 <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.021>
13. Yu Q, Ista LK, Lopez GP: Nanopatterned antimicrobial enzymatic surfaces combining biocidal and fouling release properties. *Nanoscale*, 6: 4750-4757, 2014 10.1039/C3NR06497B
14. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J: THE BIG PICTURE ON SMALL MEDICINE: THE STATE OF NANOMEDICINE PRODUCTS APPROVED FOR USE OR IN CLINICAL TRIALS. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 9: 1-14, 2013 10.1016/j.nano.2012.05.013
15. Liu Q, Liu Y, Wu F, Cao X, Li Z, Alharbi M, et al.: Highly Sensitive and Wearable In2O<sub>3</sub> Nanoribbon Transistor Biosensors with Integrated On-Chip Gate for Glucose Monitoring in Body Fluids. *ACS Nano*, 12: 1170-1178, 2018 10.1021/acsnano.7b06823
16. Frias JC, Williams KJ, Fisher EA, Fayad ZA: Recombinant HDL-like nanoparticles: a specific contrast agent for MRI of atherosclerotic plaques. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 16316-16317, 2004 10.1021/ja044911a
17. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR: Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical research*, 33: 2373-2387, 2016 10.1007/s11095-016-1958-5

18. Zong Y, Wu J, Shen K: Nanoparticle albumin-bound paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8: 17360-17372, 2017 10.18632/oncotarget.14477
19. Kreuter A, Rasokat H, Klouche M, Esser S, Bader A, Gambichler T, et al.: Liposomal pegylated doxorubicin versus low-dose recombinant interferon Alfa-2a in the treatment of advanced classic Kaposi's sarcoma; retrospective analysis of three German centers. *Cancer investigation*, 23: 653-659, 2005 10.1080/07357900500358259
20. Roos C, Dahlgren D, Berg S, Westergren J, Abrahamsson B, Tannergren C, et al.: In Vivo Mechanisms of Intestinal Drug Absorption from Aprepitant Nanoformulations. *Molecular pharmaceutics*, 14: 4233-4242, 2017 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00294
21. Jia L, Wong H, Cerna C, Weitman SD: Effect of nanonization on absorption of 301029: ex vivo and in vivo pharmacokinetic correlations determined by liquid chromatography/mass spectrometry. *Pharmaceutical research*, 19: 1091-1096, 2002
22. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y: Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 42: 419-436, 2003 10.2165/00003088-200342050-00002
23. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al.: An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med*, 383: 1920-1931, 2020 10.1056/NEJMoa2022483
24. Robinson DM, Keating GM: Albumin-bound Paclitaxel: in metastatic breast cancer. *Drugs*, 66: 941-948, 2006
25. Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A, et al.: Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 12: 1317-1324, 2006 10.1158/1078-0432.ccr-05-1634
26. Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY: Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced drug delivery reviews*, 65: 1866-1879, 2013 10.1016/j.addr.2013.09.019
27. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC: Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*, 66: 2-25, 2014
28. Xing M, Yan F, Yu S, Shen P: Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PloS one*, 10: e0133569-e0133569, 2015 10.1371/journal.pone.0133569
29. Maeda H, Tsukigawa K, Fang J: A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy--Problems, Solutions, and Prospects. *Microcirculation*, 23: 173-182, 2016 10.1111/micc.12228
30. Obermeier HL, Riedl J, Ay C, Koder S, Quehenberger P, Bartsch R, et al.: The role of ADAMTS-13 and von Willebrand factor in cancer patients: Results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *Res Pract Thromb Haemost*, 3: 503-514, 2019 10.1002/rth2.12197
31. Nikanjam M, Gibbs AR, Hunt CA, Budinger TF, Forte TM: Synthetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme.

- Journal of Controlled Release*, 124: 163-171, 2007  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.007>
32. Tannock IF, Rotin D: Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res*, 49: 4373-4384, 1989
  33. Shaffer SA, Baker-Lee C, Kennedy J, Lai MS, de Vries P, Buhler K, et al.: In vitro and in vivo metabolism of paclitaxel poliglumex: identification of metabolites and active proteases. *Cancer Chemother Pharmacol*, 59: 537-548, 2007 10.1007/s00280-006-0296-4
  34. Kerk N, Strozyk EA, Poppelmann B, Schneider SW: The mechanism of melanoma-associated thrombin activity and von Willebrand factor release from endothelial cells. *The Journal of investigative dermatology*, 130: 2259-2268, 2010 10.1038/jid.2010.136
  35. Nampally M, Moerschbacher BM, Kolkenbrock S: Fusion of a novel genetically engineered chitosan affinity protein and green fluorescent protein for specific detection of chitosan in vitro and in situ. *Applied and environmental microbiology*, 78: 3114-3119, 2012 10.1128/aem.07506-11
  36. Waitkus MS, Harris DP, DiCorleto PE: Mechanisms of Endothelial Activation. In: *Encyclopedia of Medical Immunology: Autoimmune Diseases*. edited by Mackay IR, Rose NR, Diamond B, Davidson A, New York, NY, Springer New York, 2014, pp 715-724
  37. Endothelial Functions and Dysfunctions. In: *Endothelial Dysfunctions in Vascular Disease*. 2007, pp 1-25
  38. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al.: The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, 9: 1057-1069, 2013 10.7150/ijbs.7502
  39. Hunt BJ, Jurd KM: Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *Bmj*, 316: 1328-1329, 1998 10.1136/bmj.316.7141.1328
  40. Dudley AC: Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006536, 2012 10.1101/cshperspect.a006536
  41. Klein D: The Tumor Vascular Endothelium as Decision Maker in Cancer Therapy. *Front Oncol*, 8: 367, 2018 10.3389/fonc.2018.00367
  42. Blann AD: Endothelial cell activation markers in cancer. *Thromb Res*, 129 Suppl 1: S122-126, 2012 10.1016/s0049-3848(12)70031-2
  43. Kumari S, Mg S, Mayor S: Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research*, 20: 256, 2010 10.1038/cr.2010.19
  44. Salatin S, Yari Khosroushahi A: Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21: 1668-1686, 2017 10.1111/jcmm.13110
  45. Cao Y, Gong Y, Liu L, Zhou Y, Fang X, Zhang C, et al.: The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of applied toxicology : JAT*, 2017 10.1002/jat.3470
  46. Watson P, Jones AT, Stephens DJ: Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Advanced drug delivery reviews*, 57: 43-61, 2005 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.05.003>
  47. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z: The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8: 1-10, 2013 <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>

48. Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom BJ, Chrastina A, et al.: Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nature biotechnology*, 25: 327-337, 2007 10.1038/nbt1292
49. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV: Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 145: 182-195, 2010 10.1016/j.jconrel.2010.01.036
50. Altannavch TS, Roubalova K, Kucera P, Andel M: Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation. *Physiological research*, 53: 77-82, 2004
51. Hamilton KK, Sims PJ: Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. *J Clin Invest*, 79: 600-608, 1987 10.1172/jci112853
52. Ehrenberg MS, Friedman AE, Finkelstein JN, Oberdörster G, McGrath JL: The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 30: 603-610, 2009 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.050>
53. Lynch I, Salvati A, Dawson KA: Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nature nanotechnology*, 4: 546-547, 2009 10.1038/nnano.2009.248
54. Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, Salvati A: Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano*, 6: 5845, 2012
55. Tan J, Thomas A, Liu Y: Influence of Red Blood Cells on Nanoparticle Targeted Delivery in Microcirculation. *Soft matter*, 8: 1934-1946, 2011 10.1039/C2SM06391C
56. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV: Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 219: 382-408, 2017 10.1111/apha.12725
57. Klingberg H, Loft S, Oddershede LB, Moller P: The influence of flow, shear stress and adhesion molecule targeting on gold nanoparticle uptake in human endothelial cells. *Nanoscale*, 7: 11409-11419, 2015 10.1039/c5nr01467k
58. Nwe N, Furuike T, Tamura H: Isolation and characterization of chitin and chitosan from marine origin. *Advances in food and nutrition research*, 72: 1-15, 2014 10.1016/b978-0-12-800269-8.00001-4
59. Nwe N, Furuike T, Tamura H: Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering: 11 Years of Our Progress, Present Situation and Future Prospects. In: *Biopolymers*. edited by Elnashar M, Intech, 2010,
60. Aiba S-i: Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *International journal of biological macromolecules*, 13: 40-44, 1991 [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90008-I](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90008-I)
61. Rinaudo M: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31: 603-632, 2006 <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
62. Rinaudo M, Milas M, Le Dung P: Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International journal of biological macromolecules*, 15: 281-285, 1993
63. Lertsutthiwong P, Chuen How N, Chandkrachang S, Stevens W: *Effect of Chemical Treatment on the Characteristics of Shrimp Chitosan*, 2002

64. Caro-Leon FJ, Arguelles-Monal W, Carvajal-Millan E, Lopez-Franco YL, Goycoolea-Valencia FM, San Roman Del Barrio J, et al.: Production and characterization of supercritical CO<sub>2</sub> dried chitosan nanoparticles as novel carrier device. *Carbohydr Polym*, 198: 556-562, 2018 10.1016/j.carbpol.2018.06.102
65. Panzarasa G, Osypova A, Sicher A, Bruinink A, Dufresne ER: Controlled formation of chitosan particles by a clock reaction. *Soft Matter*, 14: 6415-6418, 2018 10.1039/c8sm01060a
66. Song H, Wu H, Li S, Tian H, Li Y, Wang J: Homogeneous Synthesis of Cationic Chitosan via New Avenue. *Molecules*, 23, 2018 10.3390/molecules23081921
67. Goycoolea FM, Valle-Gallego A, Stefani R, Menchicchi B, David L, Rochas C, et al.: Chitosan-based nanocapsules: physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation. *Colloid and Polymer Science*, 290: 1423-1434, 2012 10.1007/s00396-012-2669-z
68. Silva CM, Veiga F, Ribeiro AJ, Zerrouk N, Arnaud P: Effect of chitosan-coated alginate microspheres on the permeability of Caco-2 cell monolayers. *Drug development and industrial pharmacy*, 32: 1079-1088, 2006 10.1080/03639040600735020
69. Moreira Mdel R, Pereda M, Marcovich NE, Roura SI: Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: assessment on carrot, cheese, and salami. *Journal of food science*, 76: M54-63, 2011 10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x
70. Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Ishizaki H, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, et al.: Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. *BioMed research international*, 2014: 786892, 2014 10.1155/2014/786892
71. Zhou Y, Yang H, Liu X, Mao J, Gu S, Xu W: Potential of quaternization-functionalized chitosan fiber for wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 52: 327-332, 2013 10.1016/j.ijbiomac.2012.10.012
72. Kumirska J, Weinhold MX, Thöming J, Stepnowski P: Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*, 3: 1875, 2011
73. Chen X-G, Park H-J: Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydrate Polymers*, 53: 355-359, 2003 [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00051-1)
74. Muzzarelli RAA, Ilari P, Petrarulo M: Solubility and structure of N-carboxymethylchitosan. *International journal of biological macromolecules*, 16: 177-180, 1994 [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90048-5](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90048-5)
75. Jimtaisong A, Saewan N: Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *International journal of cosmetic science*, 36: 12-21, 2014 10.1111/ics.12102
76. Kean T, Thanou M: Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62: 3-11, 2010 10.1016/j.addr.2009.09.004
77. Rodrigues S, Dionisio M, Lopez CR, Grenha A: Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *Journal of functional biomaterials*, 3: 615-641, 2012 10.3390/jfb3030615
78. Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J: Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25: 170-179, 2011 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>
79. Bassi R, Prasher SO, Simpson BK: Removal of Selected Metal Ions from Aqueous Solutions Using Chitosan Flakes. *Separation Science and Technology*, 35: 547-560, 2000 10.1081/SS-100100175

80. Badawy M, Rabea E: *A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection*, 2011 10.1155/2011/460381
81. Hadwiger LA, Beckman JM: Chitosan as a Component of Pea-*Fusarium solani* Interactions. *Plant Physiology*, 66: 205-211, 1980 10.1104/pp.66.2.205
82. Commission E: CosIng - Cosmetic Ingredients and Substances, Accessed 20.04.2018
83. Aranaz I, Acosta N, Civera C, Elorza B, Mingo J, Castro C, et al.: Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers*, 10: 213, 2018
84. Mhurchu CN, Poppitt SD, McGill AT, Leahy FE, Bennett DA, Lin RB, et al.: The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: a randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28: 1149-1156, 2004 10.1038/sj.ijo.0802693
85. Karagozlu MZ, Kim S-K: Chapter Twelve - Anticancer Effects of Chitin and Chitosan Derivatives. In: *Advances in food and nutrition research*. edited by Kim S-K, Academic Press, 2014, pp 215-225
86. Ngo D-H, Kim S-K: Chapter Two - Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. In: *Advances in food and nutrition research*. edited by Kim S-K, Academic Press, 2014, pp 15-31
87. Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O: Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97: 417-426, 2015 <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>
88. Hernández-González SO, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Robles-Cervantes JA: Chitosan improves insulin sensitivity as determined by the euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in obese subjects. *Nutrition Research*, 30: 392-395, 2010 <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.06.005>
89. Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ: Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47: 1864-1871, 2009 10.1016/j.fct.2009.04.044
90. Gibot L, Chabaud S, Bouhout S, Bolduc S, Auger FA, Moulin VJ: Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. *International journal of biological macromolecules*, 72: 370-379, 2015 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.033
91. Schipper NG, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, Varum KM, Artursson P: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical research*, 14: 923-929, 1997
92. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ: Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid and Polymer Science*, 275: 46-53, 1997 10.1007/s003960050050
93. Kaiser M, Pereira S, Pohl L, Ketelhut S, Kemper B, Gorzelanny C, et al.: Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Scientific reports*, 5: 10048, 2015 10.1038/srep10048
94. Wagner DD, Marder VJ: Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *The Journal of cell biology*, 99: 2123-2130, 1984 10.1083/jcb.99.6.2123
95. Erent M, Meli A, Moiso N, Babich V, Hannah MJ, Skehel P, et al.: Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked Weibel-Palade body exocytosis

- determined from individual fusion events in human endothelial cells. *J Physiol*, 583: 195-212, 2007 10.1113/jphysiol.2007.132993
96. Levine JD, Harlan JM, Harker LA, Joseph ML, Counts RB: Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Blood*, 60: 531-534, 1982
97. Niessner H, Korninger C: 1-Deamino-8-D-arginine-vasopressin--an alternative in the management of mild haemophilia A and von Willebrand's disease. *Wien Klin Wochenschr*, 95: 753-757, 1983
98. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L: Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus*, 9 Suppl 2: s3-s8, 2011 10.2450/2011.002S
99. Zhou Y-F, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA: Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, 120: 449-458, 2012 10.1182/blood-2012-01-405134
100. Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ: Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature*, 279: 636-638, 1979 10.1038/279636a0
101. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, et al.: Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 7899-7903, 2007 10.1073/pnas.0608422104
102. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al.: ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*, 100: 4033-4039, 2002 10.1182/blood-2002-05-1401
103. Fu H, Jiang Y, Yang D, Scheiflinger F, Wong WP, Springer TA: Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation. *Nature Communications*, 8: 324, 2017 10.1038/s41467-017-00230-2
104. Gogia S, Neelamegham S: Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology*, 52: 319-335, 2015 10.3233/bir-15061
105. Bauer AT, Suckau J, Frank K, Desch A, Goertz L, Wagner AH, et al.: von Willebrand factor fibers promote cancer-associated platelet aggregation in malignant melanoma of mice and humans. *Blood*, 125: 3153-3163, 2015 10.1182/blood-2014-08-595686
106. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Waldeyer-Sauerland M, et al.: Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019
107. Pasquali S, Hadjinicolaou AV, Chiarion Sileni V, Rossi CR, Mocellin S: Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD011123-CD011123, 2018 10.1002/14651858.CD011123.pub2
108. Terheyden P, Krackhardt A, Eigentler T: The Systemic Treatment of Melanoma. *Dtsch Arztebl Int*, 116: 497-504, 2019 10.3238/arztebl.2019.0497
109. Desch A, Strozyk EA, Bauer AT, Huck V, Niemeyer V, Wieland T, et al.: Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin alphavbeta5-induced secretion of VEGF-A. *Am J Pathol*, 181: 693-705, 2012 10.1016/j.ajpath.2012.04.012
110. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*, 52: 2745-2756, 1973 10.1172/JCI107470

111. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 139: 271-279, 1991
112. Teijeiro-Osorio D, Remunan-Lopez C, Alonso MJ: Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*, 71: 257-263, 2009  
10.1016/j.ejpb.2008.09.020
113. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG: Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *The Journal of cell biology*, 123: 1107-1117, 1993
114. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T: Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell*, 10: 839-850, 2006  
10.1016/j.devcel.2006.04.002
115. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J: Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology*, 127: 1217-1232, 1994
116. Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG: Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *The Journal of cell biology*, 111: 2931-2938, 1990
117. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, et al.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, 262: 5592-5595, 1987
118. Parton RG, Joggerst B, Simons K: Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology*, 127: 1199-1215, 1994
119. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A: Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 296: 535-539, 2002  
10.1126/science.1069784
120. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, et al.: The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18: 561-569, 2010  
10.1038/mt.2009.281
121. Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S: Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Molecular pharmaceutics*, 11: 4363-4373, 2014  
10.1021/mp500439c
122. Landgraf L, Muller I, Ernst P, Schafer M, Rosman C, Schick I, et al.: Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6: 300-312, 2015  
10.3762/bjnano.6.28
123. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA: Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*, 7: 779-786, 2012  
10.1038/nnano.2012.207
124. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al.: Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 2050-2055, 2007  
10.1073/pnas.0608582104

125. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al.: Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnology*, 8: 772-781, 2013
126. Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, et al.: Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 16968-16973, 2011 10.1073/pnas.1105270108
127. McConnell KI, Shamsudeen S, Meraz IM, Mahadevan TS, Ziemys A, Rees P, et al.: Reduced Cationic Nanoparticle Cytotoxicity Based on Serum Masking of Surface Potential. *Journal of biomedical nanotechnology*, 12: 154-164, 2016
128. Zhang S, Gao H, Bao G: Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS nano*, 9: 8655-8671, 2015 10.1021/acsnano.5b03184
129. Decuzzi P, Ferrari M: The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials*, 28: 2915-2922, 2007 10.1016/j.biomaterials.2007.02.013
130. Freese C, Gibson MI, Klok HA, Unger RE, Kirkpatrick CJ: Size- and coating-dependent uptake of polymer-coated gold nanoparticles in primary human dermal microvascular endothelial cells. *Biomacromolecules*, 13: 1533-1543, 2012 10.1021/bm300248u
131. Fleischer CC, Payne CK: Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Accounts of chemical research*, 47: 2651-2659, 2014 10.1021/ar500190q
132. Fuchs K, Cardona Gloria Y, Wolz OO, Herster F, Sharma L, Dillen CA, et al.: The fungal ligand chitin directly binds TLR2 and triggers inflammation dependent on oligomer size. *EMBO Rep*, 19, 2018 10.15252/embr.201846065
133. Choi CHJ, Hao L, Narayan SP, Auyeung E, Mirkin CA: Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 7625-7630, 2013 10.1073/pnas.1305804110
134. Lackner KJ, Peetz D: Scavenger-Rezeptor. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. edited by Gressner AM, Arndt T, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2019, pp 2116-2116
135. Bauer AT, Strozyk EA, Gorzelanny C, Westerhausen C, Desch A, Schneider MF, et al.: Cytotoxicity of silica nanoparticles through exocytosis of von Willebrand factor and necrotic cell death in primary human endothelial cells. *Biomaterials*, 32: 8385-8393, 2011
136. Sulheim E, Baghirov H, von Haartman E, Boe A, Aslund AK, Morch Y, et al.: Cellular uptake and intracellular degradation of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, 14: 1, 2016 10.1186/s12951-015-0156-7
137. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T: Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*, 50: 147-160, 2000
138. Huang M, Khor E, Lim LY: Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21: 344-353, 2004
139. Beddoes CM, Case CP, Briscoe WH: Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective,

140. Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, et al.: Uptake Mechanism of ApoE-Modified Nanoparticles on Brain Capillary Endothelial Cells as a Blood-Brain Barrier Model. *PLoS ONE*, 7: e32568, 2012 10.1371/journal.pone.0032568
141. Mellman I, Yarden Y: Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a016949-a016949, 2013 10.1101/cshperspect.a016949
142. Blechinger J, Bauer AT, Torrano AA, Gorzelanny C, Brauchle C, Schneider SW: Uptake kinetics and nanotoxicity of silica nanoparticles are cell type dependent. *Small*, 9: 3970-3980, 2013
143. Kuhn DA, Vanhecke D, Michen B, Blank F, Gehr P, Petri-Fink A, et al.: Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5: 1625-1636, 2014 10.3762/bjnano.5.174
144. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi J, Farokhzad OC: Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 190: 485-499, 2014 10.1016/j.jconrel.2014.06.038
145. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D: Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal*, 377: 159-169, 2004 10.1042/bj20031253
146. Canton I, Battaglia G: Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society reviews*, 41: 2718-2739, 2012 10.1039/c2cs15309b
147. Fleischer CC, Payne CK: Secondary structure of corona proteins determines the cell surface receptors used by nanoparticles. *The journal of physical chemistry B*, 118: 14017-14026, 2014 10.1021/jp502624n
148. Zani I, Stephen S, Mughal N, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft S, et al.: Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*, 4: 178, 2015
149. Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Bombelli FB, Hristov DR, et al.: Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nano*, 8: 137-143, 2013 <http://www.nature.com/nnano/journal/v8/n2/abs/nnano.2012.237.html#supplementary-information>
150. 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. *Advanced drug delivery reviews*, 61: 428-437, 2009 10.1016/j.addr.2009.03.009
151. Maxfield FR, McGraw TE: Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 121, 2004 10.1038/nrm1315
152. Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee S-Y, Kwon S-H, Jeon H, et al.: Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 135: 259-267, 2009 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.018>
153. Du H, Liu M, Yang X, Zhai G: The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery. *Drug discovery today*, 2015 10.1016/j.drudis.2015.03.002
154. Huang M, Ma Z, Khor E, Lim LY: Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharmaceutical research*, 19: 1488-1494, 2002
155. Grant BD, Donaldson JG: Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 597-608, 2009

156. Fede C, Fortunati I, Weber V, Rossetto N, Bertasi F, Petrelli L, et al.: Evaluation of gold nanoparticles toxicity towards human endothelial cells under static and flow conditions. *Microvascular Research*, 97: 147-155, 2015  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2014.10.010>
157. Cheung RC, Ng TB, Wong JH, Chan WY: Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine drugs*, 13: 5156-5186, 2015  
10.3390/md13085156
158. Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE, Holcomb JB: A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *The Journal of trauma*, 60: 655-658, 2006 10.1097/01.ta.0000199392.91772.44
159. Chang SQ, Kang B, Dai YD, Zhang HX, Chen D: One-step fabrication of biocompatible chitosan-coated ZnS and ZnS:Mn<sup>2+</sup> quantum dots via a gamma-radiation route. *Nanoscale research letters*, 6: 591, 2011 10.1186/1556-276x-6-591
160. Stoehr LC, Gonzalez E, Stampfl A, Casals E, Duschl A, Puentes V, et al.: Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 8: 36, 2011 10.1186/1743-8977-8-36
161. Danielsen PH, Cao Y, Roursgaard M, Moller P, Loft S: Endothelial cell activation, oxidative stress and inflammation induced by a panel of metal-based nanomaterials. *Nanotoxicology*, 9: 813-824, 2015
162. Jesus S, Marques AP, Duarte A, Soares E, Costa JP, Colaço M, et al.: Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 2020 10.3389/fbioe.2020.00100
163. Huhn D, Kantner K, Geidel C, Brandholt S, De Cock I, Soenen SJ, et al.: Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano*, 7: 3253-3263, 2013 10.1021/nn3059295
164. Schipper NG, Varum KM, Artursson P: Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharmaceutical research*, 13: 1686-1692, 1996
165. Santander-Ortega MJ, Peula-Garcia JM, Goycoolea FM, Ortega-Vinuesa JL: Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 82: 571-580, 2011 10.1016/j.colsurfb.2010.10.019
166. Oliveira LT, de Paula MA, Roatt BM, Garcia GM, Silva LSB, Reis AB, et al.: Impact of dose and surface features on plasmatic and liver concentrations of biodegradable polymeric nanocapsules. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 105: 19-32, 2017 10.1016/j.ejps.2017.04.017
167. Eduardo A. Bender MDA, Leticia M. Colome: Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. 2012
168. Calarco A, Bosetti M, Margarucci S, Fusaro L, Nicoli E, Petillo O, et al.: The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells. *Toxicol Lett*, 218: 10-17, 2013
169. Ando J, Yamamoto K: Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxidants & redox signaling*, 15: 1389-1403, 2011 10.1089/ars.2010.3361

170. Samuel SP, Jain N, O'Dowd F, Paul T, Kashanin D, Gerard VA, et al.: Multifactorial determinants that govern nanoparticle uptake by human endothelial cells under flow. *International journal of nanomedicine*, 7: 2943-2956, 2012 10.2147/ijn.s30624
171. Hosta-Rigau L, Städler B: Shear stress and its effect on the interaction of myoblast cells with nanosized drug delivery vehicles. *Molecular pharmaceuticals*, 10: 2707-2712, 2013 10.1021/mp4001298
172. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA: EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology*, 110: 1227-1237, 1990 10.1083/jcb.110.4.1227
173. Harada N, Masuda M, Fujiwara K: Fluid flow and osmotic stress induce tyrosine phosphorylation of an endothelial cell 128 kDa surface glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 214: 69-74, 1995 10.1006/bbrc.1995.2257
174. Nichols JW, Bae YH: Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action. *Nano Today*, 7: 606-618, 2012 10.1016/j.nantod.2012.10.010
175. Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC: Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5: 147, 2006 10.1038/nrd1957
176. Duong HK, Sekeres MA: Targeted treatment of acute myeloid leukemia in older adults: role of gemtuzumab ozogamicin. *Clinical interventions in aging*, 4: 197-205, 2009
177. Muhamad N, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K: Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International journal of nanomedicine*, 13: 3921-3935, 2018 10.2147/IJN.S165210
178. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, et al.: Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic acids research*, 32: e149, 2004 10.1093/nar/gnh140
179. Javitt G, Khmel'nitsky L, Albert L, Elad N, Ilani T, Diskin R, et al.: Assembly Mechanism of Mucin and von Willebrand Factor Polymers. *bioRxiv*: 2020.2003.2008.982447, 2020 10.1101/2020.03.08.982447
180. Perez-Vilar J, Hill RL: The structure and assembly of secreted mucins. *The Journal of biological chemistry*, 274: 31751-31754, 1999 10.1074/jbc.274.45.31751
181. Sadler JE: BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF VON WILLEBRAND FACTOR. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 395-424, 1998 10.1146/annurev.biochem.67.1.395
182. Bravo-Osuna I, Vauthier C, Farabollini A, Palmieri GF, Ponchel G: Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials*, 28: 2233-2243, 2007 10.1016/j.biomaterials.2007.01.005
183. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV: Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 9: 1837-1842, 2008 10.1021/bm800276d
184. Collado-González M, González Espinosa Y, Goycoolea FM: Interaction Between Chitosan and Mucin: Fundamentals and Applications. *Biomimetics (Basel)*, 4: 32, 2019 10.3390/biomimetics4020032
185. Menchicchi B, Fuenzalida JP, Bobbili KB, Hensel A, Swamy MJ, Goycoolea FM: Structure of chitosan determines its interactions with mucin. *Biomacromolecules*, 15: 3550-3558, 2014 10.1021/bm5007954
186. Cauwels A, Van Lint S, Garcin G, Bultinck J, Paul F, Gerlo S, et al.: A safe and highly efficient tumor-targeted type I interferon immunotherapy depends on the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 7: e1398876, 2018 10.1080/2162402x.2017.1398876

187. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al.: Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*, 377: 1813-1823, 2017 10.1056/NEJMoa1708539
188. Agency EM: Tafinlar, Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tafinlar#authorisation-details-section>. Accessed 12.12.2020
189. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. 2020
190. Herbrink M, Nuijen B, Schellens JH, Beijnen JH: Variability in bioavailability of small molecular tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*, 41: 412-422, 2015 10.1016/j.ctrv.2015.03.005
191. Hirano S, Iwata M, Yamanaka K, Tanaka H, Toda T, Inui H: Enhancement of Serum Lysozyme Activity by Injecting a Mixture of Chitosan Oligosaccharides Intravenously in Rabbits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 2623-2625, 1991 10.1080/00021369.1991.10871007
192. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC: Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 5: 505-515, 2008 10.1021/mp800051m

## 6 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

*Name und Vorname:* Hummel, Julia  
*Geburtsdatum:* 1. Mai 1993  
*Geburtsort:* Neuss  
*Familienstand:* ledig  
*Vater:* Mathias Hummel  
*Mutter:* Ulrike Hummel

### SCHULISCHER WERDEGANG

*2003 – 2011*                      *Otto-von-Taube-Gymnasium Gauting*  
*01.07.2011*                      *Abitur*

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

***WS 2011 -SS 2017***              *Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg*  
*09.09.2013*                      *Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)*  
*06.04.2017*                      *Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)*

***WS 2017 – WS 2018***              *Studium der Humanmedizin an der Charité Universitätsmedizin Berlin*  
*06.12.2018*                      *Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)*

## 7 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Stefan W. Schneider für die Überlassung des Themas meiner Arbeit bedanken. Durch seine lehrreichen und zugleich unterhaltsamen Vorlesungen hat er mein Interesse geweckt und mich auf die Abteilung für experimentelle Dermatologie aufmerksam gemacht. Auch während meiner Zeit im Labor trug er mit zahlreichen Anregungen und Ideen zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. rer. nat. Christian Gorzelanny für die ausgezeichnete Betreuung. Er brachte mir mit viel Geduld und Enthusiasmus Chitosan-Nanokapseln, Endothelzellen und verschiedenste experimentelle Methoden näher. Durch seine humorvolle Art schaffte er es mich auch in schwierigen Momenten zu motivieren und stand mir stets Rat und Tat zur Seite.

Auch bei Natalia Halter möchte ich mich für ihre Hilfe und Erklärungen beim Arbeiten im Labor und insbesondere mit Zellkulturen bedanken. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine unzähligen Fragen.

Und natürlich vereinfacht es vieles, wenn man Teil einer Arbeitsgruppe sein darf, die einen so herzlich ins Team aufnimmt. Für die einzigartige Zeit im Labor, die mich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich weitergebracht hat, habe ich mich ganz herzlich beim gesamten Team der experimentellen Dermatologie bedanken.