

# **Nanotargeting und Organ-on-a-Chip Systeme für die Präzisionsmedizin**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

Von

**M. Sc. Juliana Pfeifer**

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referentin: : PD Dr. Beate Köberle

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2024



## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere wahrheitsgemäß, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten Anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde sowie die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweiligen gültigen Fassung beachtet zu haben. Darüber hinaus versichere ich, dass die in der Arbeit verwendeten Ergebnisse in dem vom Prüfungsausschuss festgelegten Zeitraum der Arbeit entstanden sind.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift (Juliana Pfeifer)

Diese Arbeit wurde von Juni 2020 bis März 2024 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ute Schepers am Institut für Funktionelle Grenzflächen des Karlsruher Institut für Technologie angefertigt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Drug Delivery-System: Nanopartikel .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Nanomaterialien .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Organische Nanopartikel .....	6
1.2.2 Anorganische Nanopartikel .....	7
1.2.3 Kohlenstoffbasierte Nanopartikel .....	8
<b>1.3 Transportmechanismen von Nanopartikeln .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Passives Targeting .....	9
1.3.2 Aktives Targeting .....	11
1.3.3 Liganden vermitteltes Targeting .....	11
1.3.4 Physikalische Stimulation .....	13
1.3.4.1 Aktives Targeting durch pH-Änderung .....	13
1.3.4.2 Photodynamische Therapie .....	14
<b>1.4 Biologische Barrieren .....</b>	<b>15</b>
1.4.1 Blut-Hirn-Schranke .....	16
1.4.2 Darmbarriere .....	19
<b>1.5 Biologische Charakterisierung.....</b>	<b>21</b>
1.5.1 In vitro Zellkulturmodelle .....	21
1.5.2 Organ-on-a-Chip-System .....	22
1.5.3 In vivo Zebrafisch Modell .....	25
<b>1.6 Medikamentenzulassung.....</b>	<b>27</b>
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>

<b>3.1 Anorganisch-Organische-Hybridnanopartikel .....</b>	<b>30</b>
3.1.1 Untersuchung der Zyto- und Phototoxizität der Gadolinium-basierten Nanopartikel.....	35
3.1.2 Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums durch Gadolinium-basierte Nanopartikel.....	41
<b>3.2 Gelatine-basierte Nanogelee (GNG) .....</b>	<b>52</b>
3.2.1 Synthese von GelNB- und GelS-Hydrogelen.....	53
3.2.2 Synthese Gelatine-basierter Nanogelee (GNG).....	59
3.2.3 GNG-Synthesenachweis über FTIR-Spektroskopie.....	63
3.2.4 Charakterisierung und Beeinflussung der Nanogel Größe .....	67
3.2.5 Auswirkung variabler Hydrogel-Konzentration auf die Nanogel Größe .....	68
3.2.6 Variierung der Nanogelgröße über den Funktionalisierungsgrad der Hydrogele.....	69
3.2.7 Untersuchung der Auswirkung einer Variierung der Hydrogel Konzentration und des Funktionalisierungsgrades in Hydrogelwürfel.....	70
3.2.8 Strukturanalyse des Hydrogels GelNB + GelS.....	73
3.2.9 Variation der Nanogelgröße durch unterschiedliche Verhältnisse von GelNB zu GelS.....	76
3.2.10 Synthese von Nanogelen optimaler Größe .....	77
3.2.11 Untersuchung der Auswirkung kürzerer Belichtungszeiten auf GNG .....	79
3.2.12 GNG Oberflächen Modifikation mit Peptoiden zu P@GNG .....	84
3.2.12.1 Peptoidsynthese .....	84
3.2.12.2 Kupplung der Peptoide an die GNG-Oberfläche.....	86
3.2.13 Bestimmung der Ladungskapazität von GNG.....	92
3.2.14 Analyse der Wirkstofffreisetzung von GNG.....	94
3.2.15 <i>In vitro</i> Charakterisierung von P@GNG in 2D-Zellkulturen .....	96
3.2.15.1 Aufnahme und Akkumulation von GNG in 2D-Zellkulturen .....	97
3.2.15.2 Biokompatibilität von GNG in 2D-Zellkulturen .....	110

3.2.16	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Nanogelee an 3D-Zellkulturmodellen .....	117
3.2.16.1	Penetration und Akkumulation von GNG in Tumorsphäroide .....	117
3.2.16.2	Zytotoxizitätsstudien von P@GNG an Tumorsphäroiden .....	119
3.2.17	<i>In vivo</i> Charakterisierung der Nanogelee an Zebrafischlarven .....	122
3.2.17.1	Untersuchung der <i>in vivo</i> Toxizität von GNG.....	123
3.2.17.2	Untersuchung der <i>in vivo</i> Biodistribution von P@GNG im Zebrafisch über eine transdermale Applikation .....	131
3.2.17.3	Untersuchung der <i>in vivo</i> Biodistribution von P@GNG im Zebrafisch über eine intravenöse Applikation .....	137
3.2.17.4	Untersuchung der <i>in vivo</i> Biodistribution von Peptoiden im Zebrafischembryo über eine orale Applikation .....	139
3.2.18	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Penetration von GNG durch biologische Barrieren .....	140
3.2.18.1	Transport von GNG durch die Blut-Hirn-Schranke .....	140
3.2.18.2	Einfluss von P8@GNG[DOP] auf die Neuronenaktivität.....	147
3.2.18.3	Transportes von GNG durch die Darm-Blut-Barriere .....	152
<b>3.3</b>	<b><i>Intestine-on-a-Chip</i> Modell: VitaPrint .....</b>	<b>158</b>
3.3.1	Entwicklung des VitaPrint Chip-Rohlings .....	161
3.3.2	3D-Druck von Biomaterial im Chip .....	164
3.3.3	Aktivierung und Silanisierung des VitaPrint-Chips .....	166
3.3.4	Anschluss der Kanäle des VitaPrint an ein mikrofluidisches System .....	168
3.3.4.1	Fluiddynamikanalyse durch numerische Strömungsmechanik (CFD) .....	169
3.3.4.2	Matrixstabilität und Diffusion im VitaPrint .....	173
3.3.5	Untersuchung der Biokompatibilität verschiedener Hydrogele .....	177
3.3.5.1	Besiedlung der gedruckten Matrix mit organotypischen Zellen .....	178
3.3.5.2	Photocrosslinking .....	184

3.3.5.3	Untersuchung des Wachstums von Bindegewebszellen in verschiedenen Hydrogelen .....	188
3.3.5.4	Viabilität von Zellen des intestinalen Mesenchyms in verschiedenen Hydrogelen .....	189
3.3.5.5	Besiedlung der VitaPrint Gewebematrix .....	192
3.3.5.6	Besiedlung der VitaPrint Endo- und Epithelialen-Gefäße.....	197
<b>3.4</b>	<b>Stammzelldifferenzierung .....</b>	<b>205</b>
3.4.1	Nachweis der Pluripotenz der verwendeten Stammzellen .....	205
3.4.2	Differenzierung von hiPSC zu intestinalen Epithelzellen.....	207
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>216</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>223</b>
<b>5.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>223</b>
5.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	223
5.1.2	Verwendete Geräte .....	224
5.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	226
5.1.4	Antikörper.....	230
5.1.4.1	Primärantikörper.....	230
5.1.4.2	Sekundärantikörper .....	230
5.1.5	Primer: Forward Reverse .....	230
5.1.6	Zelllinien und Medien .....	231
5.1.7	Software und Online-Plattformen .....	233
<b>5.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>234</b>
5.2.1	Synthesevorschriften .....	234
5.2.1.1	GelMA Synthese.....	234
5.2.1.2	GelNB Synthese.....	234
5.2.1.3	GelS-Synthese .....	235

5.2.1.4	GelNB-S Synthese.....	235
5.2.1.5	GelNB-DOX Synthese .....	236
5.2.1.6	Kollagen Extraktion .....	237
5.2.1.7	Photocol Synthese .....	237
5.2.1.8	ColS Synthese.....	238
5.2.1.9	Peptoid Synthese .....	238
5.2.1.10	Nanogel-Synthese .....	239
5.2.1.11	Peptoid Kupplung an Nanogele .....	239
5.2.1.12	Wirkstoffbeladung der GNG Nanogele .....	240
5.2.2	Material Charakterisierung .....	240
5.2.2.1	Quellverhältnis von GelNB/GelS-Hydrogelen .....	240
5.2.2.2	NMR-Spektroskopie .....	241
5.2.2.3	TNBSA-Assay zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrad der Hydrogelvorläufer .....	241
5.2.2.4	Ellman's Assay zur Bestimmung freier Thiol-Gruppen von Nanogelen.....	241
5.2.2.5	Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur Bestimmung der Nanogelgröße.....	242
5.2.2.6	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	242
5.2.2.7	FT-IR Spektroskopie .....	243
5.2.2.8	Wirkstoff Beladungseffizienz der GNG .....	243
5.2.2.9	Wirkstofffreisetzung von GNG.....	243
5.2.3	Zellkultivierung der adhärenen Zellkulturen .....	244
5.2.4	Zellkultivierung von iPSC (HD11 und WTC11NGN2) .....	244
5.2.5	Differenzierung und Passagieren intestinaler Organoide .....	245
5.2.6	Differenzierung von Neuronen aus ReNcell VM-Zellen .....	246
5.2.7	Zelleinbettung in Gelatine-basierten Hydrogelen.....	247
5.2.8	Zelleinbettung in Kollagen-basierten Hydrogelen .....	247

5.2.9	Zelleinbettung in Fibrinhydrogelen .....	247
5.2.10	Zelleinbettung in Mixhydrogelen .....	247
5.2.11	Visualisierung von Zellen .....	248
5.2.11.1	Zellkern Markierung mit Hoechst33342 .....	248
5.2.11.2	Mitochondrien Markierung mit MitoTracker™ Green .....	248
5.2.11.3	Zytosol Markierung mit CellTracker™ .....	249
5.2.11.4	Zytoskelett Markierung mit Phalloidin-FITC .....	249
5.2.11.5	Immunhistologische Markierung .....	249
5.2.11.5.1	Fixierung und Permeabilisierung der Zellproben .....	249
5.2.11.5.2	Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen .....	249
5.2.12	Mikroskopie der Nanopartikel in 2D-Zellkulturen .....	250
5.2.13	Mikroskopie von Gadolinium-basierten Nanopartikeln in 2D-Zellkulturen .....	250
5.2.14	Zellviabilitätsassay mit MTT .....	250
5.2.15	Sphäroid-Kultivierung .....	251
5.2.16	Sphäroid-Wachstumsstudie .....	251
5.2.17	Lebend-Tot-Färbung in 3D-Zellkulturen .....	252
5.2.18	CellTiter-Glo® 3D-Viabilitäts-Assay .....	253
5.2.19	Biologische Barriere im Transwell® .....	253
5.2.20	TEER-Messung im Transwell® .....	253
5.2.21	Calcium Imaging von Neuronen .....	254
5.2.22	Rekonstruktion der Blut-Hirn-Schranke im vasQchip .....	254
5.2.23	Q-PCR .....	254
5.2.23.1	RNA-Isolation .....	254
5.2.23.2	DNA-Verdau .....	255
5.2.23.3	cDNA-Synthese über Reverse Transkription .....	255
5.2.23.4	qPCR-Durchführung .....	256

5.2.24	Statistische Auswertung .....	257
5.2.25	VitaPrint.....	257
5.2.25.1	Aktivierung und Silanisierung der VitaPrint Objektträger .....	257
5.2.25.2	VitaPrint Aufbau .....	258
5.2.25.3	3D-Bioprinting im VitaPrint.....	258
5.2.25.4	Besiedlung der VitaPrint Kanäle .....	259
5.2.25.5	Flussdynamikanalyse der VitaPrint Kanäle .....	259
<b>5.3</b>	<b>Modellorganismus Zebrafisch .....</b>	<b>260</b>
5.3.1	Fischembryo-Toxizitätstest (FET-Test) .....	260
5.3.2	<i>In vivo</i> -Fluoreszenzmikroskopie im Zebrafischembryo .....	261
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>262</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>266</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>295</b>
8.1	Ermittlung geeigneter Kultivierungsmedien für Co-Kulturen .....	295
8.2	Ermittlung der Toxizität des Photoinitiators und der UV-Belichtung .....	296
8.3	Untersuchung des Wachstums von Zellen des intestinalen Mesenchyms in unterschiedliche Hydrogelen .....	297
8.3.1	Proliferationsverhalten von HISMC.....	297
8.3.2	Proliferationsverhalten von HIF .....	300
8.4	Nachweis der Antikörperspezifität von CDX2 und FoxA2 .....	304



# Zusammenfassung

Nanopartikel, die als *Drug-Delivery*-Systeme dienen, bieten eine vielversprechende Möglichkeit, Medikamente gezielt an spezifische Zellen oder Gewebe zu transportieren, wodurch ihre Wirksamkeit gesteigert und Nebenwirkungen minimiert werden können. Diese winzigen Partikel im Nanometerbereich können Wirkstoffe einschließen und sie vor vorzeitigem Abbau oder Ausscheidung schützen, während sie gleichzeitig eine kontrollierte Freisetzung ermöglichen. Dadurch wird nicht nur die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen erhöht, sondern auch ihre Verweildauer im Körper verlängert und ihre therapeutische Wirksamkeit optimiert. In dieser Arbeit wurden zwei innovative Ansätze zur Entwicklung fortschrittlicher *Drug-Delivery*-Systeme untersucht, um aktuellen Herausforderungen wie unzureichender Biodistribution, *Multidrug*-Resistenz und systemischer Toxizität entgegenzuwirken.

Die Forschung an anorganisch-organischen multimodalen Gadolinium-basierten Hybridnanopartikeln zielte darauf ab, die Wirkung des Zytostatikums Pemetrexed (PMX) durch Kombination mit einem zweiten Zytostatikum wie Estramustinphosphat (EMP) oder einem zusätzlichen Photosensibilisator wie ALPCS<sub>4</sub> oder TPPS<sub>4</sub> zu verbessern. Der Fokus lag dabei auf der Überwindung von Wirkstoffresistenzen durch synergistische Effekte, die durch die Kombination verschiedener Wirkstoff erzeugt werden. Neben der Kombination von PMX mit EMP erwies sich die ortsspezifische Modulation der Wirkung durch die Kombination mit Photosensibilisatoren und der anschließenden photodynamische Therapie als äußerst vielversprechend.

Der zweite Teil der Studie konzentrierte sich auf die Entwicklung einer gewebespezifischen Wirkstoff-*Applikation* durch Oberflächenmodifikation von Gelatine-basierten Nanogelee mit *Targeting-Liganden* auf Peptoidbasis. Diese Nanogelee zeigten eine hohe Biokompatibilität und eine effektive Wirkstofffreisetzung, insbesondere in saurer Umgebung, was für eine Krebsbehandlung von Vorteil ist. *In vitro* Studien zeigten eine verstärkte zytotoxische Wirkung beladener Nanogelee auf Krebszellen im Vergleich zu freiem Wirkstoff. Zudem konnte ein organellenspezifischer Transport der Nanogelee in Mitochondrien nachgewiesen werden. *In vivo* Untersuchungen an Zebrafischembryonen belegten den gezielten Transport der Nanogelee in spezifische Organe. Die Modifizierung verbesserte auch die Penetrationsfähigkeit durch Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke und der Darmbarriere.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit wurde zudem das VitaPrint-System, ein *Intestine-on-a-Chip*-Modell, entwickelt, das die 3D-Struktur des Darms realitätsgetreu nachbilden soll. Der VitaPrint-Chip integriert mikrofluidisch betriebene Kanäle wie das Darmlumen mit dessen angrenzenden Blutgefäße in einer Hydrogelmatrix. Erstmals wurde dabei auch ein arterieller und venöser Blutfluss implementiert, was in bisherigen Modellen nicht erreicht wurde. Die größte Herausforderung dabei bestand darin, eine konfluente epitheliale Zellschicht im künstlichen Darmlumen aufzubauen, wobei unterschiedliche Kombinationen Gelatine-basierter Hydrogele untersucht wurden. Zudem wurden humane pluripotente Stammzellen zu intestinalen Organoiden differenziert, um eine physiologisch relevante Zellvielfalt im Chip zu generieren. Trotz manch bleibender Herausforderungen zeigt das VitaPrint-System ein erhebliches Potenzial für innovative Anwendungen in der Medikamentenforschung, das zukünftig Tierversuche reduzieren könnten.

# 1 Einleitung

Die Möglichkeit zu einer personalisierten Herangehensweise an Diagnose und Behandlung führte zur Entwicklung der Präzisionsmedizin, die das Feld der medizinischen Versorgung revolutioniert hat.<sup>[1,2]</sup> Das zentrale Prinzip der Präzisionsmedizin besteht darin, individuelle genetische und ökologische Aspekte von Patienten zu nutzen, um eine optimale Behandlungsstrategie zu entwickeln.<sup>[3]</sup> So können durch die Analyse von genetischen Varianten, Biomarkern und anderen biologischen Merkmalen, Ärzte und Forscher präzisere Diagnosen stellen und Therapien auswählen, die am besten auf die spezifischen Bedürfnisse und Merkmale eines Patienten zugeschnitten sind. Ein wichtiges Anwendungsgebiet der Präzisionsmedizin ist die Onkologie, bei der gezielte Therapien entwickelt werden, die auf spezifische genetische Veränderungen in Tumorzellen abzielen. Obwohl dieser Ansatz bereits in der klinischen Tumorbehandlung sehr vielversprechend ist<sup>[4,5]</sup>, wurde die Umsetzung durch Probleme wie Medikamententoxizität und -resistenzbildung behindert.<sup>[6-8]</sup> Das Ziel der Präzisionsmedizin ist es die Effizienz von Wirkstoffen zu erhöhen, indem sie ausschließlich am Zielgewebe ihre Wirkung entfalten. Dafür ist ein maßgeschneidertes System zur kontrollierten Freisetzung des Wirkstoffs erforderlich (*Drug Delivery-System*). Diese innovative Herangehensweise bietet ein enormes Potenzial, zur Verbesserung der Wirksamkeit von Behandlungen bei gleichzeitiger Reduzierung der Toxizität, indem sie selektiv Krankheitsprozesse beeinflusst, während gesunde Zellen geschont werden.<sup>[9,10]</sup> Trotz der Erfolge durch die Präzisionsmedizin gibt es weiterhin viel Hürden in der Entwicklung von selektiven *Drug Delivery*-Systemen. So ist die spezifische Verabreichung von Wirkstoffen an ein Organ, ein Gewebe oder einen Zelltyp für die Behandlung menschlicher Krankheiten insbesondere von Infektions-, Krebs- und Erbkrankheiten weiterhin eine große Herausforderung.<sup>[11]</sup> Aus diesem Grund ist die Forschung an neuen verbesserten *Drug Delivery*-Systemen notwendig, um die Probleme des spezifischen Wirkstofftransports anzugehen.

## 1.1 *Drug Delivery*-System: Nanopartikel

So haben die Fortschritte in der Medizin und Biotechnologie zu einer Fülle von neuen spezifischen Wirkstoffkandidaten wie Small Molecules, Nucleinsäuren oder Antikörper geführt, von denen viele jedoch während der präklinischen Beurteilung aufgrund von

Problemen wie eingeschränkter Bioverfügbarkeit, unzureichender Stabilität und geringer Löslichkeit scheitern (Abbildung 1).<sup>[12]</sup> Nanopartikel (NP) haben sich hingegen als *Drug Delivery*-System für solche Moleküle im Hinblick auf die Verbesserung ihrer Löslichkeit, Bioverteilung und Pharmakokinetik von Wirkstoffen sowie die bevorzugte Akkumulation am Zielort als sehr geeignet erwiesen.<sup>[11-13]</sup>

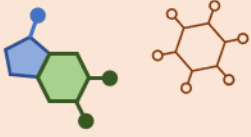
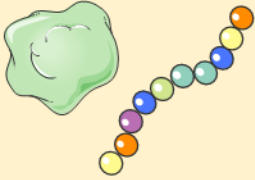

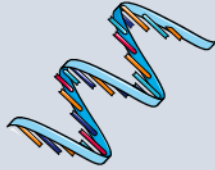
Potentielle Wirkstoffe	Herausforderung
<b>Small Molecules</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schlechte Löslichkeit</li> <li>• Off Target Toxizität</li> </ul>
<b>Protein und Peptide</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instabilität</li> <li>• Immunogenität</li> <li>• Penetration biologischen Barrieren</li> </ul>
<b>Antikörper</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instabilität</li> <li>• Immunogenität</li> <li>• Penetration biologischen Barrieren</li> <li>• Hohe Dosis erreichen</li> </ul>
<b>Nucleinsäuren</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Instabilität</li> <li>• Penetration der Zellmembran</li> <li>• Immunogenität</li> <li>• Off Target Gen Editing</li> </ul>

Abbildung 1: Schematische Darstellungen und Herausforderungen bekannter Wirkstoffe die für die Präzisionsmedizin eingesetzt werden.

So haben neueste Entwicklungen in den Bereichen Physik, Chemie und Materialwissenschaft Nanomaterialien mit einzigartigen Eigenschaften hervorgebracht, die die Behandlung von Tumoren, die gegenüber den derzeitigen Therapien resistent sind, verbessern können.<sup>[4,5]</sup> Solche Nanopartikel haben eine Größe im Nanometerbereich mit Durchmesser von weniger als 100 Nanometer.<sup>[13]</sup> Diese winzige Größe verleiht ihnen einzigartige physikalische, chemische und optische Eigenschaften, die sich stark von den Eigenschaften ihrer

makroskopischen Gegenstücke unterscheiden. Die Anwendung von Nanopartikeln als Träger für Wirkstoffe hat vor allem dazu beigetragen, die Wirkstoffkinetik zu verbessern, indem sie die Zirkulationszeit verlängern und Interaktionen zwischen den Geweben und dem Wirkstoff modulieren. Viele dieser innovativen biomedizinischen Anwendungen befinden sich derzeit in klinischen Studien und könnten in naher Zukunft bedeutende Fortschritte vor allem in der Krebstherapie ermöglichen.<sup>[5]</sup>

Bisher haben es allerdings von etwa 486 klinischen Studien nur etwas mehr als 50 Nanopharmazeutika auf den Markt geschafft (Stand 2023).<sup>[14-16]</sup> Diese bestehen aus vielfältigen Nanoformulierungen, wobei polymere (29%), liposomale (22%) und lipidbasierte (21%) Nanopartikel an vorderster Front stehen.<sup>[14,15,17]</sup> Tatsächlich wurde bereits 1995 mit Doxil, die erste Nanopartikel-Formulierung, als liposomaler Transporter des Zytostatikums Doxorubicin klinisch für die systemische Anwendung zugelassen.<sup>[18,19]</sup> Die neusten und momentan auch bekanntesten nanopartikulären Formulierungen sind Spikevax (Moderna) und Comirnaty (Pfizer-BioNTech), die 2020 von der FDA (Food and Drug Administration) als COVID-Impfstoffe zugelassen wurden. Hierbei bieten lipidbasierte Nanopartikel ein stabiles Gerüst, das den instabilen mRNA-Impfstoff sicher transportieren kann.<sup>[14,17]</sup> Weitere bekannte Vertreter nanomedizinischer Medikamente, die von der FDA zugelassen wurden, sind Mosquirix (2015) gegen Malaria, Panzenir (2019) gegen metastasierenden Brustkrebs oder Onivyde (2015) gegen Bauchspeicheldrüsenkrebs.<sup>[14,16,17]</sup> Trotz dieser Erfolge scheitern die meisten Nanopartikelformulierungen in den klinischen Studien. Bis heute stehen Nanopharmazeutika deshalb noch vor Herausforderungen, wie der Notwendigkeit einer besseren biologischen Charakterisierung, möglichen Toxizitätsproblemen, schlechter Biodistribution und *Clearance*.<sup>[15,20]</sup>

## 1.2 Nanomaterialien

Bei der Herstellung von Nanopartikeln müssen daher viele Aspekte berücksichtigt werden, die die Wirksamkeit der Formulierung beeinflussen, wie Material, Oberflächenladung, Größe und sogar die Art und Weise, wie der Wirkstoff in den Nanopartikel eingebracht wird.<sup>[17]</sup> Basierend auf ihrer Zusammensetzung werden Nanopartikel im Allgemeinen in drei Klassen eingeteilt: anorganische, organische und kohlenstoffbasierte Nanopartikel (Abbildung 2).<sup>[21]</sup>

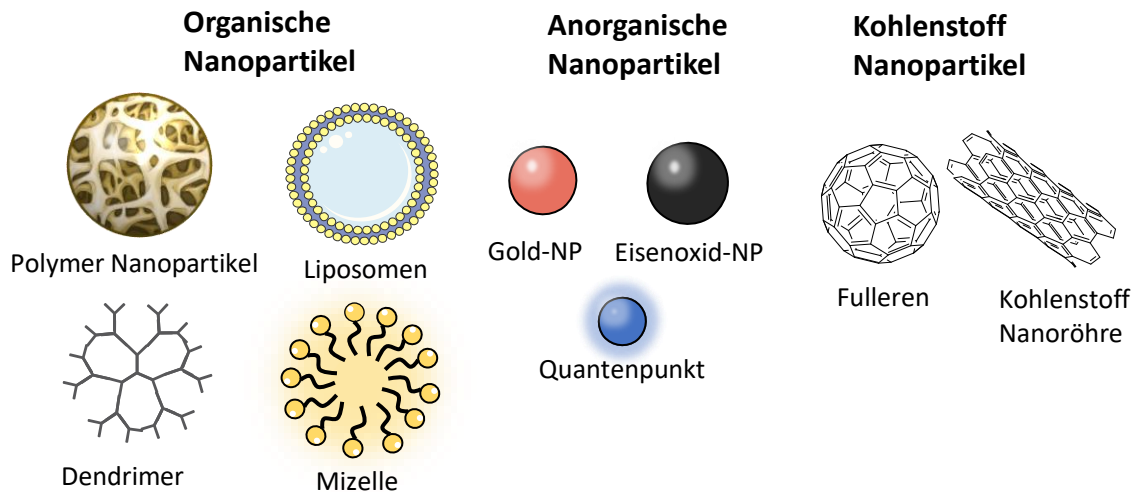


Abbildung 2: Hauptklassen von Nanopartikeln mit bekannten Vertretern.

### 1.2.1 Organische Nanopartikel

Die Klasse der organischen Nanopartikel umfasst hierbei Systeme, die aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Polymeren oder anderen organischen Verbindungen bestehen.<sup>[21,22]</sup>

Die prominentesten Vertreter dieser Klasse sind Dendrimere, Liposomen, Mizellen und Proteine wie Gelatine. Organische Nanopartikel sind in der Regel nicht toxisch, bioabbaubar und unempfindlich gegenüber thermischer und elektromagnetischer Strahlung.<sup>[23]</sup> Darüber hinaus werden sie oft durch nicht-kovalente zwischenmolekulare Wechselwirkungen gebildet, was sie naturgemäß labiler macht und einen Weg für die Ausscheidung aus dem Körper bietet.<sup>[24]</sup> Heutzutage werden organische Nanopartikel hauptsächlich im biomedizinischen Bereich bei der gezielten Wirkstoffabgabe<sup>[23]</sup> und der Krebstherapie verwendet.<sup>[21]</sup>

Neben den klassischen organischen Nanopartikeln gibt es auch die sogenannten Nanogele. Sie bestehen aus Hydrogelen, also dreidimensionalen Netzwerken von meist hydrophilen Polymerketten, die in einem wässrigen Medium dispergiert große Mengen an Wasser aufnehmen können, während sie ihre strukturierte Form beibehalten.<sup>[25]</sup> Diese Eigenschaft macht sie äußerst vielseitig und nützlich in einer Vielzahl von Anwendungen. So werden sie häufig in der Medizin für Wundauflagen, Wirkstofffreisetzung und Gewebeengineering verwendet, da sie biokompatibel sind und die Freisetzung von Wirkstoffen kontrolliert erfolgen kann.<sup>[26]</sup> Ihre einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften machen sie zu einem wichtigen Werkzeug für die Entwicklung innovativer Lösungen in verschiedenen Bereichen wie der Medizin, Kosmetik oder Umwelttechnik.<sup>[25,27,28]</sup> Werden aus solchen Hydrogelen nanopartikuläre Drug Delivery-Systeme erstellt, können sie den Vorteil von

Hydrogelen mit den Eigenschaften der Nanopartikel verbinden. Hierzu zählt eine Größe im Nanometerbereich, eine hohe Wasseraufnahmekapazität, einfache Modifikation und daraus folgende kontrollierbare Freisetzung von Wirkstoffen sowie eine hohe Biokompatibilität.<sup>[25]</sup> Diese Eigenschaften machen sie zu hervorragenden Kandidaten für *Drug Delivery*-Systeme. Ein Beispiel solcher Hydrogele ist Gelatine. Gelatine (Abbildung 3), als Derivat von Kollagen, ist von Natur aus biokompatibel und biologisch abbaubar und eignet sich deshalb hervorragend als organischer Nanopartikel. In Form von Gelatin-Nanopartikeln (GNPs) ermöglicht die hohe Oberfläche und amphotere (Fähigkeit, sowohl als Säure als auch als Base zu reagieren) Natur von Gelatine eine effiziente Beladung verschiedener Biomoleküle.<sup>[29]</sup> Die attraktiven Vorteile von Gelatine, wie ihre zelladhäsive Struktur, niedrige Kosten, hohe Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und geringe Immunogenität, haben sie zu einem begehrten Kandidaten für die Entwicklung von Biomaterialien wie Hydrogelen für die Gewebezüchtung und Wirkstofffreisetzung gemacht.<sup>[26,30]</sup>

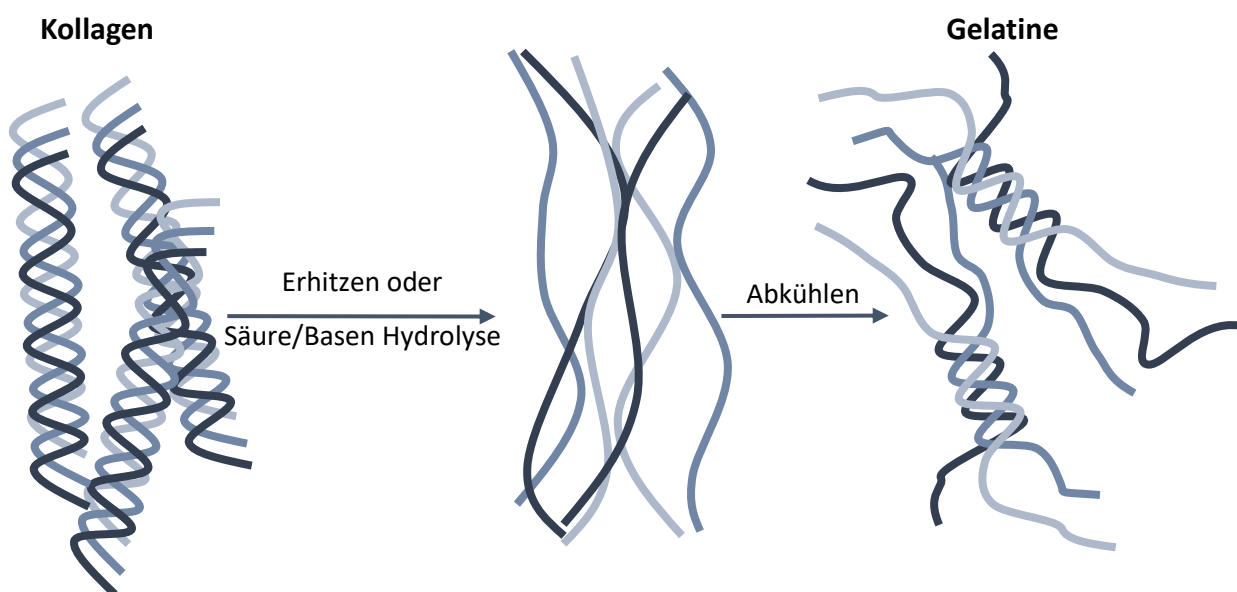


Abbildung 3: Gelatine Hydrolyse aus Kollagen Tripel-Helix Moleküle über Säure/Basen Denaturierung oder über Hitze und Anschließend thermische Aushärtung der Gelatine durch Kühlung.

### 1.2.2 Anorganische Nanopartikel

Die Klasse der anorganischen Nanopartikel setzt sich hingegen aus Partikel zusammen, die nicht aus Kohlenstoff oder organischen Materialien bestehen. Typische Vertreter dieser Klasse sind Metall- (Gold, Silber, Eisen), Keramik- (Titanoxide, Siliziumoxide) und Halbleiter-Nanopartikel (Silizium, Germanium). Aufgrund der charakteristischen lokalisierten

Oberflächenplasmonenresonanz besitzen diese Nanopartikel optische und elektrische Eigenschaften. Darüber hinaus verfügen einige metallbasierte Nanopartikel auch über einzigartige thermische, magnetische und biologische Eigenschaften.<sup>[21]</sup>

Unter der metallbasierten Nanomedizin zeigte sich Gadolinium (Gd) sowie seine Hybrid-Nanopartikel als besonders herausragend.<sup>[31,32]</sup> Gadolinium gehört zur Gruppe der seltenen Erden (auch als Lanthanoide bekannt) und kommt in der Natur in oxidiertem Zustand vor<sup>[31,33]</sup>. Die meisten klinisch verfügbaren Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie basieren auf paramagnetischen Gadolinium-Komplexen<sup>[33,34]</sup>, dabei sind freie Gadolinium-Ionen ( $\text{Gd}^{3+}$ ) von Natur aus toxisch und stellen in dieser Form eine erhebliche Gefahr für den menschlichen Körper dar. Um die Toxizität freier Gadolinium-Ionen zu reduzieren, werden sie von einem Liganden umhüllt oder innerhalb eines Materials eingeschlossen.<sup>[33,35,36]</sup> In den letzten Jahrzehnten wurden seine einzigartigen katalytischen, elektrischen, paramagnetischen und optischen Eigenschaften intensiv erforscht und für die Entwicklung funktionaler Gadolinium-basierter Nanomedikamente genutzt.<sup>[31-33]</sup> Eine Vielzahl dieser Gadolinium-basierten Nanomaterialien, darunter Gd-Chelate<sup>[37]</sup>, Natriumgadoliniumfluorid-Nanopartikel ( $\text{NaGdF}_4$ )<sup>[38]</sup>, Gadoliniumoxid-Nanopartikel ( $\text{Gd}_2\text{O}_3$ )<sup>[39]</sup>,  $\text{Gd}^{3+}$ -Metall-organische Gerüste (Gd-MOF)<sup>[40]</sup> und andere Gadolinium-basierte Nanokomposite<sup>[41]</sup> wurden entwickelt, synthetisiert und als Wirkstoffe für die Krebsbildgebung und bildgestützte Therapie evaluiert.<sup>[31]</sup> Da diese Nanopartikel thermodynamisch und kinetisch stabil sind, eine hohe Relaxivität aufweisen, gute Wasserlöslichkeit besitzen und eine geringe Toxizität zeigen sowie eine bessere Kontrolle über die molekulare Größe bieten vereinen Gadolinium-basierte Nanomaterialien sowohl bildgebende als auch therapeutische Funktionen und weisen großes Potenzial in der Krebsdiagnose und -visualisierung auf.<sup>[31,33]</sup>

### 1.2.3 Kohlenstoffbasierte Nanopartikel

Im Gegensatz zu organisch oder anorganischen Nanopartikelformulierungen, besteht die Klasse der kohlenstoffbasierten Nanopartikel ausschließlich aus Kohlenstoffatomen.<sup>[21,23]</sup> Bekannte Beispiele sind Fullerene und Kohlenstoffnanoröhren.<sup>[42,43]</sup> Diese Nanopartikel vereinen die Eigenschaften der  $\text{sp}^2$ -hybridisierten Kohlenstoffbindungen wie ihre Reaktivität mit den ungewöhnlichen physikochemischen Eigenschaften wie ihrer guten elektrischen Leitfähigkeit im Nanomaßstab.<sup>[44,45]</sup> Aufgrund ihrer elektrischen Leitfähigkeit und Festigkeit finden kohlenstoffbasierte Nanopartikel Anwendung in verschiedenen Bereichen wie

Wirkstofffreisetzung, Energiespeicherung, Bioimaging und Umweltsensorik.<sup>[21,44]</sup> So zeigen auch kohlenstoffbasierte Nanopartikel eine gut Biokompatibilität und können somit als *Nanocarrier* zum Einsatz kommen.

## 1.3 Transportmechanismen von Nanopartikeln

Werden solche Nanopartikel als *Drug Delivery*-System eingesetzt, können sie Wirkstoffe durch unterschiedliche Transportmechanismen an ein Zielgewebe transportieren, dies bezeichnet man als *Targeting*. Bei den meisten bereits von der FDA zugelassenen Nanopartikel-Systemen liegt das passive *Targeting* im Fokus, obwohl das aktive *Targeting* eine spezifischere Behandlung zulassen würde.

### 1.3.1 Passives *Targeting*

Beim passiven *Targeting* wird die längere Verweildauer von *Drug Delivery*-Systemen im Blutkreislauf sowie deren bevorzugte Ansammlung an Zielorten ausgenutzt, um Medikamente gezielt an bestimmte Organe, Gewebe oder Tumore zu liefern.<sup>[46]</sup> Insbesondere bei Tumorgeweben mit fenestrierten Blutgefäßen kommt es zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, was den Transport von größeren Makromolekülen (> 40 kDa) erleichtert. Auch ist die Lymphdrainage in Tumoren eingeschränkt, wodurch die Nanopartikel längere Zeit im Tumor verbleiben.<sup>[47]</sup> Dieser Effekt, bekannt als "erhöhte Permeabilität und Retention" (EPR), ermöglicht es den Medikamenten, sich im Tumorgewebe anzureichern und so eine gezielte Behandlung zu erreichen (Abbildung 4).<sup>[48]</sup>

Eine wichtige Erkenntnis ist, dass der EPR-Effekt nicht nur bei Tumoren, sondern auch bei infizierten oder entzündeten Geweben auftritt, wo eine ähnliche erhöhte Durchlässigkeit für Makromoleküle festgestellt wird. Der Unterschied liegt jedoch in der Dauer der Anreicherung, die bei entzündetem Gewebe aufgrund von Schwellungen kurzfristiger ist als bei Tumorgeweben, wo das lymphatische Drainagesystem inaktiv ist und die Anreicherung über einen längeren Zeitraum erfolgt.<sup>[47,48]</sup>

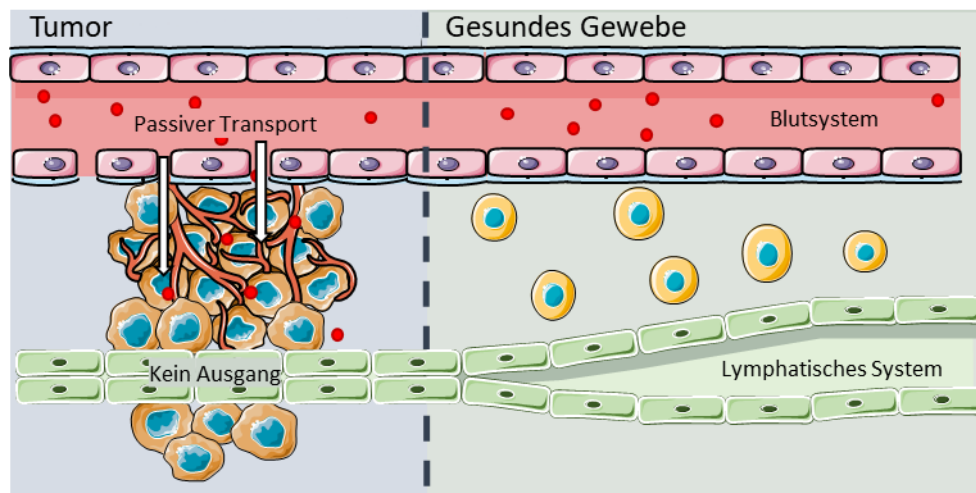


Abbildung 4: Schematische Darstellung des EPR-Effektes. Der Mechanismus der verstärkten Permeabilität und Retention (EPR) besagt, dass Nanopartikel (rot) durch Fenestrierungen in der Blutgefäßwand von Tumoren verstärkt in den Tumor aufgenommen werden. Sobald sich die Nanopartikel im Tumor befinden, werden sie aufgrund der verengten Tumorlymphgefäße nicht mehr abtransportiert. Die Kombination aus dem Eindringen von Nanopartikeln und dem Fehlen eines Austritts führt dazu, dass die Nanopartikel im Tumor verbleiben.<sup>[49]</sup>

Neueste Erkenntnisse widerlegen jedoch die Theorie des EPR-Effektes für viele Tumorarten. Denn wäre der Mechanismus korrekt, müssten viel mehr Nanopartikel in klinische Studien überzeugen. Stattdessen akkumulieren viele Nanopartikel nicht wie erwartet durch den EPR-Effekt im Tumorgewebe, sondern durch den kürzlich entdeckten aktiven Transport und Retentions-Effekt kurz ATR (Abbildung 5). Hierbei wird der Transport der Nanopartikel in den Tumor ähnlich einem Kreislauf beschrieben. Nanopartikel gelangen durch aktive Transportprozesse wie den transendothelialen Transport, vesikulären Organellen und *Bystander*-Effekte in den Tumor und werden im Tumorumfeld über zelluläre oder fluidodynamische Mechanismen transportiert.<sup>[50]</sup> Danach verlassen sie, abhängig von ihrer Größe, den Tumor durch intratumorale oder peritumorale lymphatische Gefäße und werden durch das lymphatische System transportiert, das den Tumor entwässert. Dadurch gelangen sie schließlich wieder in den Blutkreislauf, der sie erneut zum Tumor transportieren kann. Bei dieser Betrachtung unterliegt die Nanopartikelretention der Verzögerung des Transports vom Eintritt bis zum Austritt der Nanopartikel im Tumor. Diese Verzögerung ist abhängig von ihrem Transportmechanismus und der Wechselwirkungen der Nanopartikel mit den zellulären und nichtzellulären Bestandteilen des Tumors. Solche Wechselwirkungen sind tumorabhängig und können Nanopartikel auch dauerhaft im Tumor einschließen, wodurch sie bei der Erforschung neuer *Drug Delivery*-Systeme im Fokus stehen sollten.<sup>[49-51]</sup>

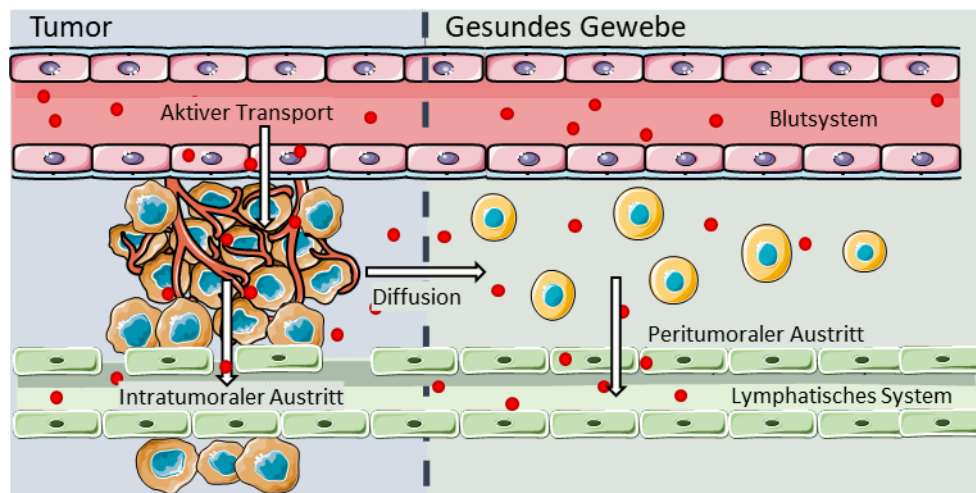


Abbildung 5: Schematische Darstellung des ATR-Effektes. Der Mechanismus des aktiven Transports und der Retention (ATR) von Nanopartikeln (rot) besagt, dass Nanopartikel sowohl durch aktive als auch passive Transportmechanismen in den Tumor gelangen. Zu den aktiven Transportmechanismen gehören unter anderem die Transzytose, die durch Endothelzellen den Transport von Nanopartikeln vermittelt. Diese aktiven Transportmechanismen überwiegen gegenüber dem passiven Transport, der Lücken und Fenestrations einschließt. Nach dem Eindringen in den Tumor werden die Nanopartikel aufgrund von Wechselwirkungen mit zellulären und azellulären Tumorkomponenten zurückgehalten. Diese Tumorkomponenten binden die Nanopartikel und verlangsamen so ihren Transport von der Eintrittsstelle zur Austrittsstelle. Nanopartikel verlassen den Tumor über intratumorale oder peritumorale Lymphbahnen. Nanopartikel erreichen die peritumoralen Lymphgefäße, indem sie am Tumorrand aus dem Tumor heraus transportiert werden und sich in den Tumor umgebenden Geweben anreichern.<sup>[49]</sup>

### 1.3.2 Aktives Targeting

Mit diesen neuen Erkenntnissen wird das aktive *Targeting* von Medikamenten umso wichtiger. Im Gegensatz zum passiven Transport, bei dem die *Drug Delivery*-Systeme aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften oder ihrer Größe selektiv zu bestimmten Geweben gelangen, erfolgt beim aktiven Transport die Bindung der Wirkstoffträger an spezifische Moleküle oder Rezeptoren, die auf der Oberfläche der Zielzellen oder im Tumor vorhanden sind. Ebenfalls kann die spezifische Mikroumgebung wie pH Unterschiede des Zielgewebes dazu genutzt werden, um die Wirkstofffreisetzung zielgerichtet zu modellieren. Diese Methode bietet eine höhere Spezifität und geringere Toxizität für gesundes Gewebe.

### 1.3.3 Liganden vermitteltes Targeting

Wird als aktives *Targeting*-System ein Liganden vermittelter Wirkstofftransport eingesetzt, können Moleküle wie Aptamere, Peptide oder Antikörper verwendet werden, um Rezeptor-Ligand oder Antikörper-Antigen vermittelte Interaktion mit dem Zielgewebe zu erreichen. Hierbei kann eine spezifische Rezeptorüberexpression von erkranktem Gewebe

dazu genutzt werden, um die Aufnahme von *Drug Delivery*-Systemen zu erhöhen.<sup>[52-55]</sup> So wurde bereits gezeigt, dass die Verwendung von mit Folsäure modifizierte Mizellen (FA-PEG), die Aufnahme des Chemotherapeutikums Docetaxel gezielt auf Folsäurerezeptor-positive Krebszellen (MCF-7-Zelle) verstärkt.<sup>[48,56]</sup> Ein häufiges Problem bei der Verwendung solcher Liganden ist jedoch ihre Instabilität im Organismus, da sie vom Immunsystem erkannt und abgebaut werden. Um eine vorschnelle Proteolyse der Liganden zu verhindern, werden immer häufiger Molekülklassen eingesetzt, die zwar ähnlich aufgebaut sind wie bereits bekannte spezifische Transporter, jedoch aufgrund von kleinen strukturellen Unterschieden nicht vom körpereigenen Immunsystem erkannt werden können. Dazu zählen Peptidomimetika<sup>[57]</sup> (Abbildung 6), also chemische Verbindungen, die strukturell Peptiden ähneln, aber modifiziert wurden, um deren biologische Eigenschaften zu verbessern oder zu verändern. Diese Modifikationen können dazu dienen, die Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau zu erhöhen, die Bioverfügbarkeit zu verbessern oder die Bindungsaffinität zu biologischen Zielmolekülen zu steigern.<sup>[58]</sup>

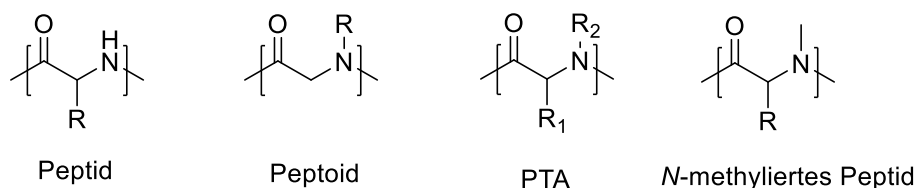


Abbildung 6: Strukturformelausschnitte eines Peptids und verschiedener Peptidomimetika Beispiele wie Peptoide, PTA (Peptid tertiäre Amide) und N-methylierte Peptide.<sup>[57]</sup>

Ein Beispiel für Peptidomimetika sind Peptoide.<sup>[58,59]</sup> Im Gegensatz zu Peptiden, die aus Aminosäuren aufgebaut sind, bestehen Peptoide aus *N*-substituierten Glycin-Resten (Abbildung 6).<sup>[59,60]</sup> Dies bedeutet, dass die Aminogruppe der Glycin-Einheiten durch verschiedene Substituenten ersetzt werden kann, was zu einer Vielzahl von strukturellen Varianten führt.<sup>[61]</sup> Peptoide konnten analog zur etablierten Peptidchemie bereits vielseitig eingesetzt werden und zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteasen.<sup>[59,60,62,63]</sup> Zudem konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass sich die Peptoide sehr gut als Targeting - Liganden für den Organ- und Organell-spezifischen Transport eignen. So konnten unter anderem bereits Transport-Peptoide für das olfaktorische System, Hirn, Herz und Leber und weitere Organe synthetisiert und charakterisiert werden.<sup>[59,60,62-65]</sup> Aufgrund dieser Eigenschaften und ihrer strukturellen Vielfalt sind Peptoide ein interessantes Forschungsgebiet mit großem Potenzial für medizinische und biotechnologische

Anwendungen<sup>[66]</sup> und eignen sich hervorragend für das Liganden vermittelten aktive *Targeting*.

### 1.3.4 Physikalische Stimulation

Das aktive *Targeting* kann zudem auch über physikalische Stimulation wie Temperatur- und pH-Veränderungen, photosensitive Aktivierung oder Magnetismus erfolgen.<sup>[67]</sup> Solche Systeme werden auch als intelligente Nanopartikel bezeichnet.<sup>[8]</sup>

#### 1.3.4.1 Aktives *Targeting* durch pH-Änderung

Bei dem aktiven *Targeting* durch pH-Änderung sind die *Drug Delivery*-Systeme so konzipiert, dass sie aufgrund von pH-Unterschieden im Körpergewebe gezielt aktiviert werden können. So kann eine gezielte Abgabe von Medikamenten an Tumorgewebe erreicht werden, das oft im Vergleich zu gesundem Gewebe (pH 7,4) einen saureren pH-Wert von bis zu pH 5,5 aufweisen kann (Abbildung 7). Diese pH-abhängige Freisetzung kann dazu beitragen, die Wirksamkeit von Krebstherapien zu verbessern, indem sie eine gezieltere Wirkstofffreisetzung ermöglicht und gleichzeitig gesundes Gewebe schont.<sup>[48]</sup>

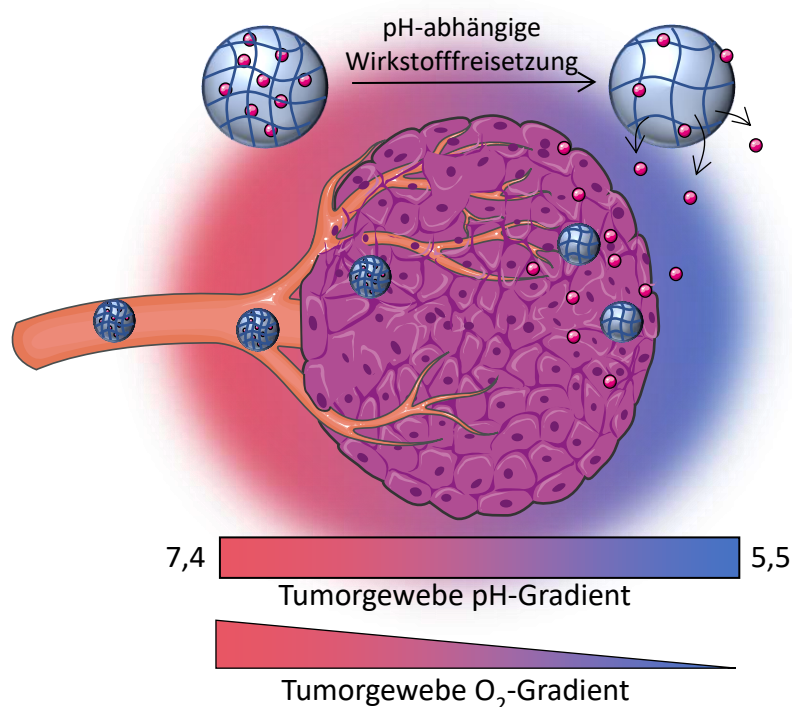


Abbildung 7: pH-Abhängige Freisetzung des Wirkstoffs von pH-sensitiven *Drug Delivery*-Systemen durch die saure Mikroumgebung des Tumors. Diese entsteht durch das schnelle Tumorwachstum, das zu einer unzureichenden Blutversorgung des Gewebes führt und somit zu einer geringen Sauerstoffversorgung im Tumorrinneren. Dies führt zu Hypoxie, wodurch Krebszellen vermehrt anaerobe Glykolyse betreiben und Milchsäure produzieren, die den sauren pH-Wert der Tumormikroumgebung verursachen.<sup>[68,69]</sup>

#### 1.3.4.2 Photodynamische Therapie

Nanopartikel können aber auch in Kombination mit photodynamischer Therapie (PDT) zum Einsatz kommen, um Tumorgewebe gezielt zu behandeln, ohne das umliegende gesunde Gewebe zu schädigen. Diese Therapie verwendet photoaktivierbare Substanzen, sogenannte Photosensibilisatoren, die in ihrem nicht angeregten Grundzustand keine Zytotoxizität aufweisen, aber nach einer Aktivierung mit Licht bestimmter Wellenlängen ihre zytotoxische Wirkung freisetzen. Dabei absorbieren Photosensibilisatoren Photonen, die sie in einen kurzlebigen, elektronisch angeregten Singulett-Zustand transformieren (Abbildung 8). Der Singulett-Zustand kann jedoch das *Intersystem Crossing* durchlaufen und sich zu einem stabileren, langlebigen, elektronisch angeregten Triplett-Zustand weiterentwickeln, indem das Elektron durch Spinumwandlung in das höherenergetische Orbital angehoben wird. Dieser angeregte Zustand kann durch Lichtemission (Phosphoreszenz) in den Grundzustand übergehen oder zwei Typen von Reaktionen durchlaufen. Der Triplett-Zustand hat eine längere Lebensdauer (bis zu mehreren Mikrosekunden), welche zu einem direkten Transfer von Energie auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) führen kann.<sup>[70,71]</sup> Dieser Energieübertragungsschritt führt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) und dem Grundzustand des Photosensibilisators, genannt Typ 2-Reaktion. Der Singulett-Sauerstoff ist extrem reaktiv und kann mit einer Vielzahl biologischer Substrate interagieren, oxidative Schäden verursachen und letztendlich zum Zelltod führen.<sup>[72]</sup> Ebenfalls kann eine sogenannte Typ 1-Reaktion auftreten, wenn der angeregte Zustand des Photosensibilisators direkt mit einem Substrat, wie den Lipiden der Zellmembran oder einem Molekül wie z. B. der DNA, reagiert und Wasserstoffatomabstraktionen oder Elektronentransferreaktionen durchläuft, um freie Radikale und Radikationen zu bilden. Diese Radikale reagieren mit molekularem Sauerstoff und produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  und  $H_2O_2$ , die oxidative Schäden verursachen können und so zu biologischen Läsionen führen.<sup>[72,73]</sup>

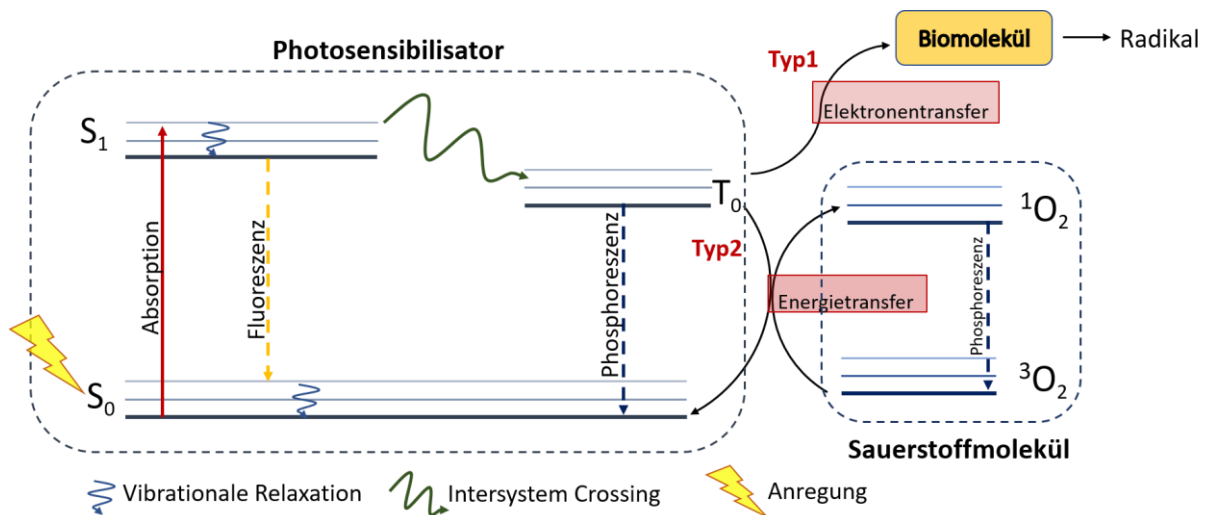


Abbildung 8: Jablonski-Diagramm und eine schematische Darstellung der Entstehung von reaktiven Molekülen bei der photodynamischen Therapie.

Die ROS, die aus den Reaktionen vom Typ I und Typ II resultieren, sind verantwortlich für die Einleitung des Zelltods und die therapeutische Wirkung der PDT.<sup>[74]</sup> Diese ROS können z. B. DNA- oder Lipid- Doppelbindungen angreifen, was letztlich zu DNA-Doppelstrangbrüchen und Membranläsionen und somit zu einer schweren Zellschädigung und zur Apoptose führt.<sup>[72]</sup> So ermöglicht dieser Prozess eine gezielte Behandlung von Tumoren, während das gesunde Gewebe nicht angegriffen wird.<sup>[73]</sup>

## 1.4 Biologische Barrieren

Auch wenn das *Targeting* genutzt werden kann um Nanopartikelwirkung spezifisch zu modellieren ist es unter normalen physiologischen Bedingungen schwierig, eine effektive Biodistribution und Wirkstofffreisetzung zu erreichen. Dies liegt oft an den vielen biologischen Barrieren die Nanopartikel in einem Organismus überwinden müssen, wodurch der Anteil der verabreichten Nanopartikel, die den therapeutischen Zielort erreichen, begrenzt wird.<sup>[75]</sup> Solche biologischen Barrieren wie z. B. Blutgefäße, Blut-Hirn-Schranke, Epidermis und Darmschleimhaut dienen der Abgrenzung einzelner Organe voneinander und unterscheiden sich somit auch von Organ zu Organ. Sie kontrollieren den Stofftransport von Blutgefäß zu Organ und sind durch Zell-Zell-Kontakte unterschiedlich stark ausgeprägt. So besitzen z. B. Hirn Lunge und Herz sogenannte kontinuierliche Endothele, die eine besonders undurchlässige Form des Blutgefäßes darstellt und nur durch kleine lipophile Stoffe durchdrungen werden kann. Andere Organ wie der Gastrointestinaltrakt, die Nieren und das Pankreas weisen Fenestrierungen in ihrem Endothel auf, die für den Austausch von Wasser

und größerer vorrangig lipophile Moleküle dienen. Diskontinuierliche Endothelien weisen hingegen durch größere Lücken zwischen den Zellen die größte Permeabilität für große und auch polare Substanzen auf und befinden sich meist in Organen wie Leber, Knochen und der Milz, die für die Filtration von größeren Molekülen oder Zellbestandteilen aus dem Blut zuständig sind.<sup>[76]</sup> Die Größe und Ladung der Nanopartikel ist somit entscheidend für ihrer Barriere-Permeabilität und somit auch für ihre Verteilung im Körper.

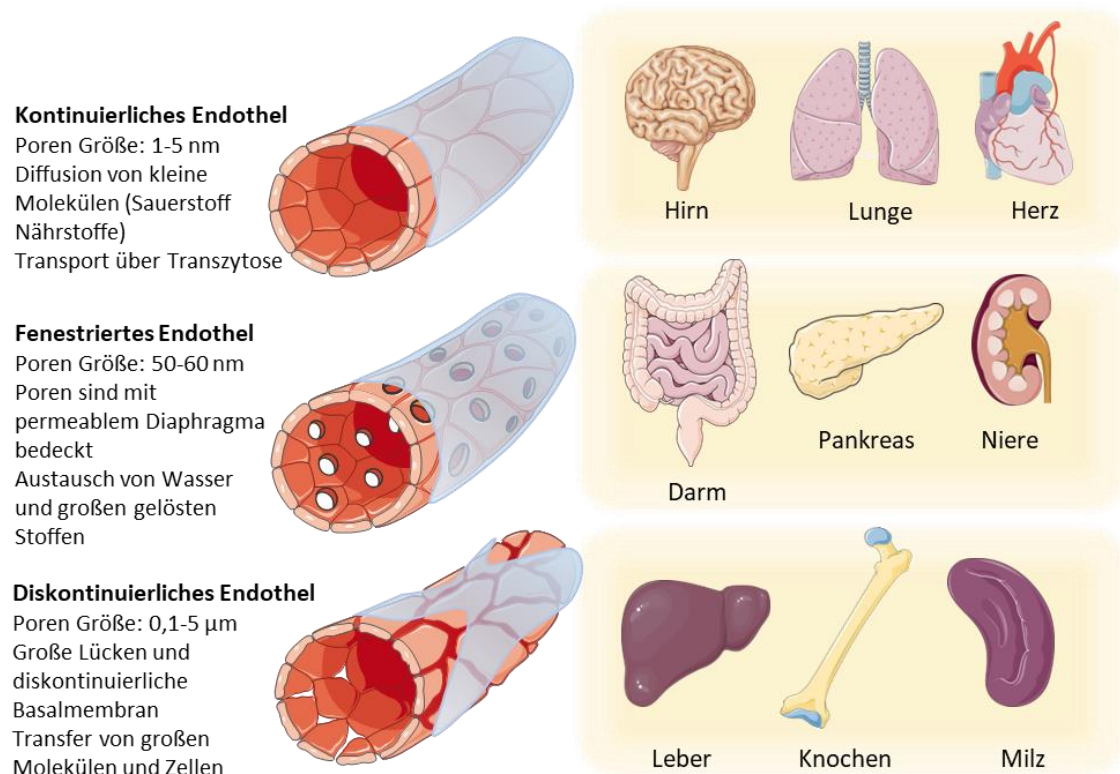
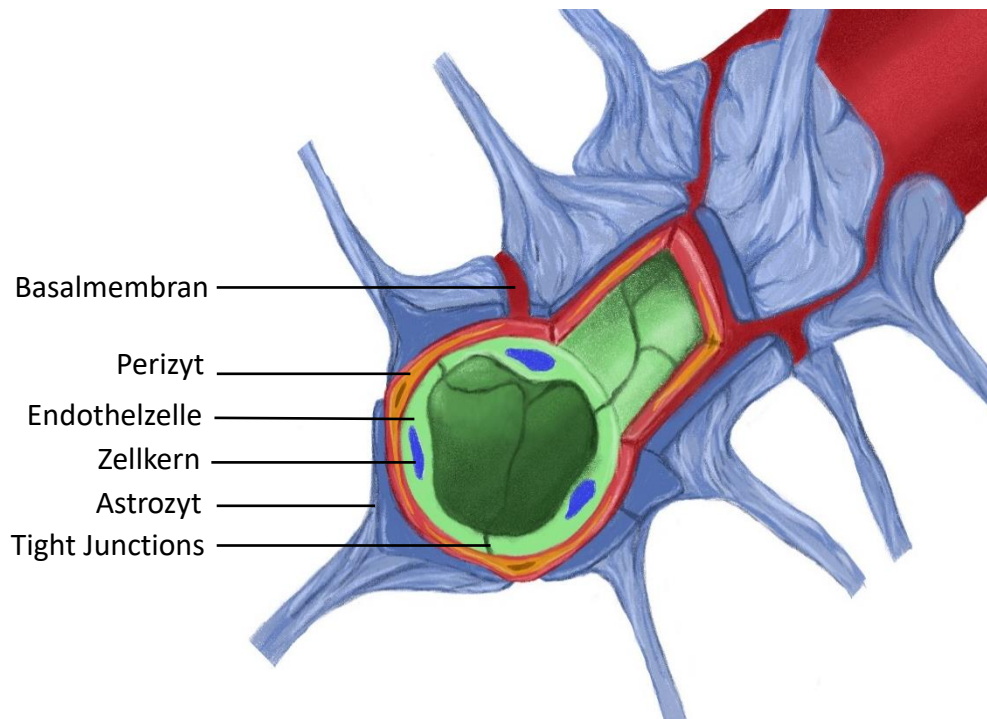


Abbildung 9: Schematische Darstellung unterschiedlicher permeabler Endothelien verschiedener Organe, je nach ihrer Lokalisation im Körper.

### 1.4.1 Blut-Hirn-Schranke

Die Abschirmung des Zentralnervensystems (ZNS) durch die Blut-Hirn-Schranke stellt eine bedeutende Herausforderung für die Wirkstofffreisetzung bei ZNS-Erkrankungen dar. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine einzigartige Schnittstelle, die dazu entworfen ist, selektiv Flüssigkeit, Ionen, Nährstoffe, bestimmte Peptide, Proteine und Immunzellen zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf zu transportieren, während sie eine undurchlässige Barriere für potenziell schädliche Chemikalien und Krankheitserreger darstellt.<sup>[76-79]</sup> Es wird angenommen, dass die Blut-Hirn-Schranke den Transport von fast 98 %

der Moleküle blockiert, wodurch die meisten pharmazeutischen Verbindungen nur schwer in das ZNS gelangen können.<sup>[79]</sup>



*Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke. Die Blut-Hirn-Schranke wird aus einem Endothel gebildet, das die Innenseite der Basalmembran mit Endothelzellen auskleidet. In dieser Basalmembran wachsen zudem Perizyten wohingegen die Endfüßchen der Astrozyten auf der Außenseite der Basalmembran anwachsen. Neuronen können wiederum an den Astrozyten binden und so Botenstoffe übertragen.*

Die Blutgefäße des ZNS bestehen aus kontinuierlichen Endothelen. Ihre Durchlässigkeit gegenüber vielen Verbindungen wie z.B. Schad- und Wirkstoffen wird durch Faktoren wie die engen Verbindungen der Endothelzellen durch eine hohe Expression an *Tight Junctions* beeinflusst. Zudem können, durch die Expression von Effluxpumpen viele Substanzen nach der Aufnahme wieder ins Lumen des Blutgefäßes herausschleusen werden.<sup>[76]</sup> Die Anzahl der Expression der *Tight Junctions* und der Effluxpumpen wird von einer neurovaskulären Einheit, bestehend aus Perizyten, Astrozyten und Neuronen gesteuert. Diese neurovaskuläre Einheit umgibt das Endothel, zusammen bilden sie die Blut-Hirn-Schranke im ZNS (Abbildung 10)<sup>[78]</sup>, und ist lediglich für kleine lipophile Substanzen durchlässig, die in der Lage sind passive durch die Barriere zu diffundieren. Um weitere, für das Gehirn wichtige Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren, kommen verschiedene Transportproteine zum Einsatz, die unter anderem den aktiven Transport von Makromolekülen ermöglichen. Besonders wichtig ist hier der Transport von Glucose durch den Hexose-Transporter Glut-1<sup>[80]</sup> oder der Transport

von Aminosäuren, die für die Proteinbiosynthese benötigt werden. Für die Aufnahme von Aminosäuren dienen hierbei fünf verschiedene Transportsysteme, wobei das L-(Leucin)-System am bedeutendsten ist und für den Transport von großen neutralen und aromatischen, essentiellen Aminosäuren wie Phenylalanin verantwortlich ist.<sup>[81]</sup> Zu diesem Transportsystem gehört auch der Lat1-Transporter, der unter anderem auch L-Dopa, die Vorstufen des Neurotransmitters Dopamin, in das ZNS schleust. Bestimmte Peptide wie Insulin und Transferrin können zudem über rezeptorvermittelten Transport in das Gehirn aufgenommen werden. Solche Transportprozesse können für die aktive Aufnahme von Wirkstoffen genutzt werden, indem *Drug Delivery*-Systeme biochemisch so modifiziert werden, sodass sie mit den Rezeptoren der Blut-Hirn-Schranke interagieren können um ihre Aufnahme zu initiieren<sup>[82,83]</sup>. Zwar können auch invasive Verfahren, die eine direkte intrazerebrale Injektion, Infusion oder Implantation erfordern<sup>[84]</sup> oder eine vorübergehende Störung der Blut-Hirn-Schranke mit sich bringen, ebenfalls die Aufnahme von Nanopartikel stimulieren,<sup>[85]</sup> diese Ansätze können jedoch das Risiko für zerebrale Infektionen, Verletzungen und Toxizität erhöhen und führen oft zu einer ungleichmäßigen Verteilung des Wirkstoffes.<sup>[76]</sup> Somit sind nichtinvasive Verfahren, wie die Verwendung von aktiven und passiven Transportprozessen, zu bevorzugen, was in den letzten Jahrzehnten zu einem Anstieg der Forschung für Blut-Hirn-Schranke permeable *Drug Delivery*-Systeme führte. So haben Studien der letzten zehn Jahre gezeigt, dass vor allem lipophile Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke passieren können, was den Vorteil bietet, bisher nicht permeable Verbindungen in das ZNS transportieren zu können. Die optimale Nanopartikelgröße wird hierfür auf 20-70 nm geschätzt.<sup>[86]</sup> Es wird vermutet, dass Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke, durch die rezeptorvermittelte Endozytose passieren können, was die Anheftung von zielgerichteten Liganden, Peptiden oder Rezeptoren an die Nanopartikel erfordert.<sup>[75,76,87]</sup> Hierfür könne Nanopartikel zum Beispiele mit Insulin oder Transferrin modifiziert werden um an deren Rezeptor zu binden um anschließend durch Endozytose aufgenommen zu werden.<sup>[88]</sup> Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Peptidmodifizierung von Goldnanopartikel mit einem Oligopeptid (Angiopep-2) und der daraus resultierende Affinität zu einem Membranrezeptor der Blut-Hirn-Schranke (LRP1-Rezeptor) die Aufnahme der Nanopartikel in das ZNS steigert.<sup>[83,89]</sup> Die Modifizierung von Nanogelen mit Blut-Hirn-Schranke spezifischen Liganden hat nicht nur den Vorteil der Barrierepenetration sondern verbessert zudem die Zirkulationszeit und Löslichkeit von Wirkstoffen. Die Blut-Hirn-Schranke ist jedoch nicht die einzige Barriere im menschlichen

Körper, die die Aufnahme von Wirkstoffen erschwert. So müssen Wirkstoffe z.B. bei einer oralen Applikation auch die Darmbarriere durchdringen um an ihr Zielgewebe transportiert werden zu können.

### 1.4.2 Darmbarriere

Obwohl die orale Applikation, die am weitesten verbreitete und am leichtesten akzeptierte Form der Medikamentenverabreichung ist, stellt der Gastrointestinaltrakt durch seine komplexen Aufbau zahlreiche Hürden für Nanopartikel dar.<sup>[75]</sup> Die intestinale Barriere besteht hierbei aus mehreren Zellschichten und zellulären Komponenten, die zusammenarbeiten, um den menschlichen Organismus vor der Aufnahme schädlicher Substanzen zu schützen und die Immunfunktion aufrechtzuerhalten. Die äußere Schicht der Darmbarriere besteht aus der Schleimschicht (Mukosa), dem Darmmikrobiom und Abwehrproteinen wie antimikrobiellen Proteinen (AMPs) sowie dem sekretorischen Immunglobulin A (sIgA). Die intestinalen Epithelzellen (IECs) bilden die mittlere Schicht, während die innere Schicht der Barriere aus Immunzellen der angeborenen und adaptiven Immunität besteht.<sup>[90,91]</sup>

Das Darmepithel besteht hierbei aus fünf verschiedenen Zelltypen (Abbildung 11), den Enterocyten, Schleimhaut produzierenden Becherzellen<sup>[92]</sup>, enteroendokrinen Zellen, Paneth-Zellen und M-Zellen.<sup>[91,93]</sup> Diese Zellen werden durch Stammzellen, die sich in den Darmkrypten befinden, kontinuierlich erneuert. Die Darmbarriere ist undurchlässig für hydrophile Lösungen, daher können sie Moleküle und Nährstoffe nur über spezifische Transporter durchdringen<sup>[93]</sup>. Hierfür gibt es zwei Hauptwege: den transzellulären Weg, der aktive Aufnahme und Endozytose umfasst, und den parazellulären Weg für hydrophile Moleküle, der durch Zell-Zell-Kontakte, insbesondere *Tight Junctions* (TJs), reguliert wird.<sup>[94]</sup> TJs spielen auch hier eine entscheidende Rolle für die Integrität der Darmbarriere, indem sie den parazellulären Transport von Substanzen selektiv kontrollieren.<sup>[90]</sup>

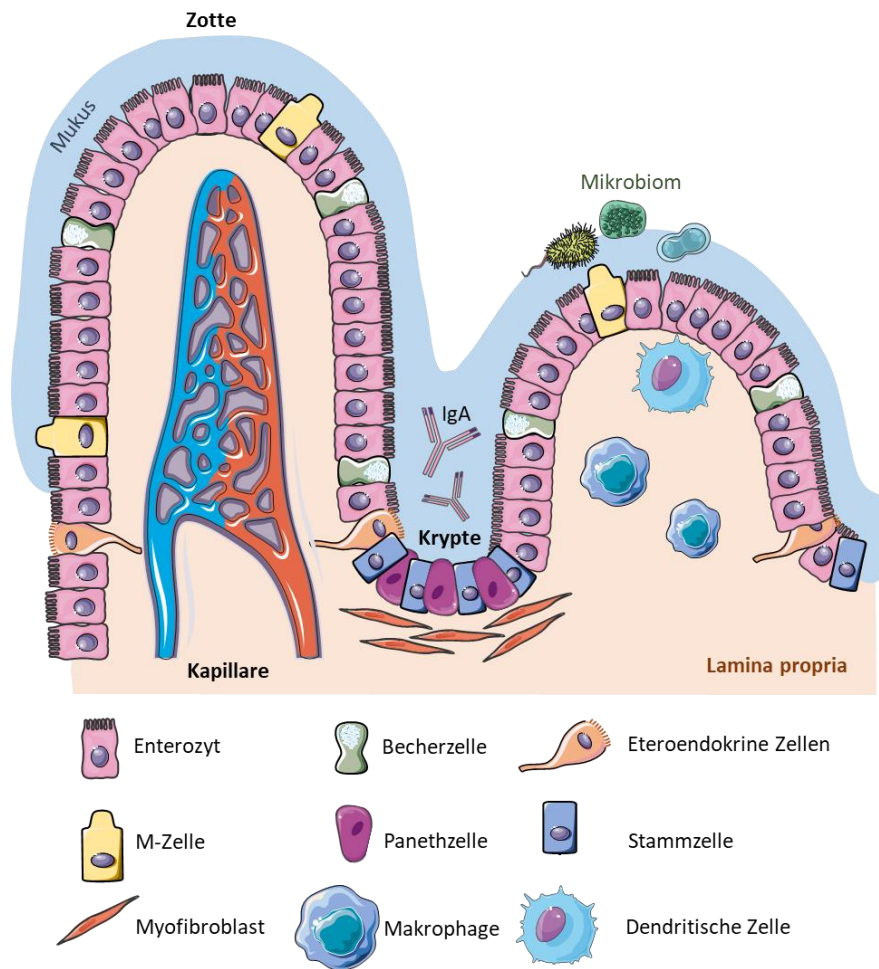


Abbildung 11: Schematische Aufbau der Dünndarmbarriere. Die Darmbarriere setzt sich aus Krypten und Zotten zusammen. Stammzellen befinden sich in den Krypten die sich zu Enterozyten, Becherzellen, enterokrinen Zellen, M-Zellen oder Panethzellen ausdifferenzieren können und Richtung Zotte wandern. Becherzellen produzieren die Mukosa, die sich über die ganze Epithelschicht ausbreitet. Hier finden sich Bakterien wieder die das Darmmikrobiom abbilden. M-Zellen nehmen an der mukosalen immunologischen Überwachung teil und induzieren die Bildung von IgA-sezernierenden Plasmazellen. Sekretorisches IgA besiedelt die Schleimschicht und moduliert die Wechselwirkungen zwischen Mikrobiom und Wirt. Paneth-Zellen befinden sich in den Krypten des Darms und produzieren antimikrobielle Peptide (AMPs) die zur Immunität des Wirts beitragen. Dendritische Zellen und Makrophagen tragen zudem zur Immunantwort von der basalen Seite des Epithels bei.<sup>[90]</sup>

Zusätzlich zu den zellulären Barrieren müssen Substanzen auch die Mukosa und das gastrointestinale Mikrobiom überwinden und eine Stabilität gegenüber extremen pH-Schwankungen aufweisen.<sup>[95]</sup> Diese Bedingungen und die Anwesenheit von Enzymen, die ihren Abbau fördern, machen den Gastrointestinaltrakt zu einer instabilen Umgebung für viele Nanopartikel und erschweren somit das Erreichen einer therapeutisch erwünschten Biodistribution über die orale Verabreichung erheblich.<sup>[75]</sup>

Häufig liegt der komplexe Aufbau dieser biologischen Barrieren auch dem Ausscheiden viele Nanopartikel in klinischen Studien zu Grunde. Eine intelligente Gestaltung von Nanopartikeln kann allerdings ihre Wirksamkeit verbessern, während gleichzeitig durch maßgeschneiderte Designs, präzisionsmedizinische Anwendungen ermöglicht werden.<sup>[96]</sup>

## 1.5 Biologische Charakterisierung

Bevor allerdings solche Nanopartikel für die pharmakologische Anwendung bereit sind, müssen sie eine Reihe von biologischen Tests bestehen, die Rückschlüsse auf ihre toxikologische Wirkung, Aufnahme und Biodistribution zulassen. Hierfür kommen verschiedene *in vitro* und *in vivo* Modelle in Frage.<sup>[96]</sup>

### 1.5.1 *In vitro* Zellkulturmodelle

Um unnötige Tierversuche zu vermeiden, werden zu Beginn häufig *in vitro* Zellkulturmodelle eingesetzt, um unwirksame Nanopartikel auszusortieren. Die herkömmliche Zellkultur, die auf der Kultivierung von Zellen als *Monolayer* auf einer planen und starren Oberfläche basiert, ist aufgrund ihrer Einfachheit und relativ niedrigen Kosten immer noch die am weitesten verbreitete Methode, um erste Erkenntnisse über das zelluläre Verhalten von Nanopartikeln zu gewinnen.<sup>[96]</sup> 2D-Zellkulturen mangelt es allerdings an physiologischer Relevanz, wodurch ihre Vorhersagekraft auf Grund des Fehlens einer natürlichen Mikroumgebung limitiert wird.<sup>[97]</sup> Komplexere 3D-Zellkulturen wie Sphäroide und Organoide können physiologischere Gewebeeigenschaften wie Zell-Zell Kontakte oder Zell-Matrix Interaktionen besser nachahmen, um so die Aussagekraft wissenschaftlicher Studien zu verstärken.<sup>[98]</sup> Diese Modelle bestehen aus aggregierten Zellen, die eine kugelförmige Struktur bilden (Sphäroide)<sup>[99]</sup> oder sind aus komplexeren selbstorganisierten hohlen 3D-Strukturen aus mehreren Zelltypen (Organoide)<sup>[100-105]</sup> aufgebaut. Oft werden solche Modelle verwendet, um die Mikroumgebung von Tumoren zu simulieren oder Aufnahmemechanismen zu studieren.<sup>[97,100]</sup> Hierbei kommen Stoffwechsel und Zellpolarität, sowie ihre Viabilität und Proliferation dem *in vivo* Verhalten sehr nahe. Ebenso können Membransysteme, wie das Transwell-System, verwendet werden, um Grenzflächen nachzubilden und Studien an Zellpolarität und Barrieren zu ermöglichen.<sup>[106-108]</sup> In solchen Transwell-Systemen könne auch *Air-Liquid-Interfaces* gebildet werden, die es ermöglichen Penetrationseigenschaften wie Untersuchungen von inhalativen Aufnahmeprozessen an artifiziellen Lungen<sup>[109]</sup> oder

transdermale Studien an artifiziellen Hautabschnitten<sup>[110]</sup> durchzuführen. Die Fortschritte der letzten Jahrzehnte haben zudem die Kultivierung von Zellen in einem 3D-Gewebe-*Scaffold* ermöglicht. Dabei wird die extrazelluläre Matrix von Hydrogelen aus natürlichen (Kollagen, Fibrinogen), synthetischen (PEG, PEGDA) oder semisynthetischen (GelMA, GelNB, GeIS) Polymeren nachgebildet.<sup>[111]</sup> Diese Matrix dient als Gerüst, welches das Wachstum von Zellen in drei Dimensionen zulässt. Solche Polymere können ebenfalls für das Bioprinting eingesetzt werden, um komplexe 3D-Strukturen zu erzeugen, die Organe im Ganzen oder Teilausschnitte davon abbilden können.<sup>[112]</sup> Da jedoch auch Faktoren wie mechanische Stimulation oder Gradienten eine wichtige Rolle im Zellverhalten spielen, werden mikrofluidische Modelle verwendet, um physiologisch durchblutete Gewebe nachzubilden, die *Organ-on-a-Chip*-Systeme genannt werden (Abbildung 12).<sup>[98,113,114]</sup>

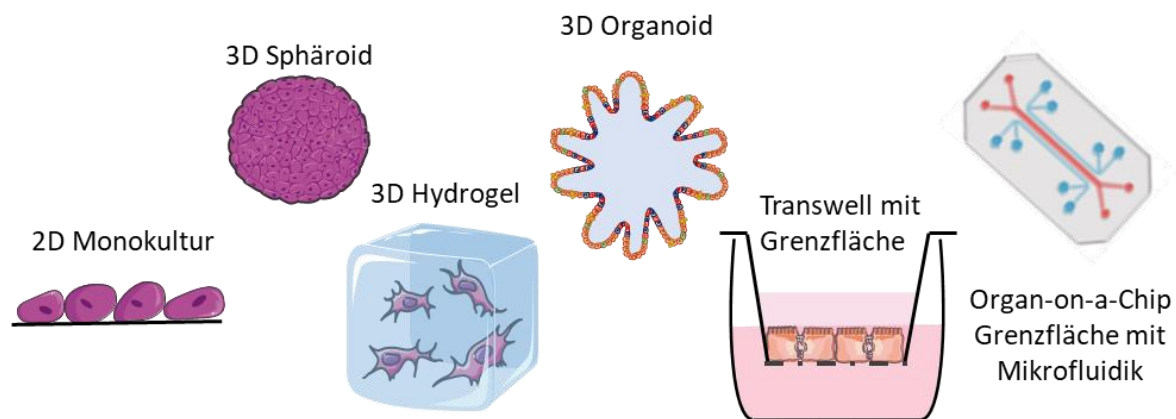


Abbildung 12: Darstellung unterschiedlicher Zellkulturmodelle. Von einfacher 2D-Monolayerschicht über 3D-Zellkulturen bis zu komplexen Organ-on-a-Chip-Modellen.

### 1.5.2 Organ-on-a-Chip-System

Mit dem Fortschritt neuer Technologien sind *Organ-on-a-Chip*-Systeme zu einem wesentlichen Ziel aktueller Entwicklungen geworden, deren Hauptziel es ist Tierversuche zu ersetzen.<sup>[115]</sup> Diese Modelle können die Merkmale von Organen genau nachahmen, indem sie verschiedene Zelllinien integrieren und eine kontinuierliche Perfusion von Nährstoffen ermöglichen. Als Ergebnis können nun Zell-Zell-Interaktionen, physiologische Mikroumgebungen, Gewebe-Kommunikation und vaskuläre Infusionen auf Arten zugänglich gemacht werden, die keine frühere Technologie ermöglichte.<sup>[115-118]</sup> Diese Systeme können verwendet werden, um das Verhalten von Organen und sogar die Pharmakokinetik auf ethischere und effizientere Weise vorherzusagen.<sup>[98]</sup>

Die Perfusion in *Organ-on-a-Chip*-Systemen erfolgt heute meist noch über die Kultivierung der 3D-Gewebe auf poröse Kunststoffmembranen, die noch in den meisten Fällen planar aufgebaut sind (Abbildung 13, A, B).<sup>[116]</sup> Mittlerweile gibt es auch Kanäle auf Basis einer physiologischeren gekrümmten halbrunden Form, die mit gewebespezifischem Endothel ausgekleidet werden können (Abbildung 13, C).<sup>[119]</sup> Dabei werden Endothelarten nachgebildet, die wie *in vivo* in verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Permeabilität aufweisen (Abbildung 9).<sup>[116,117]</sup> Diese abgebildete Grenzfläche ermöglicht den Austausch von Zellen der unterschiedlichen Kompartimente, wobei *in vivo* ähnliche Bedingungen geschaffen werden. Da so das Zellwachstum von den Scherkräften der Mikrofluidik beeinflusst wird, kommt es zur physiologisch korrekten Ausrichtung der Zellen, die maßgeblich ihre Barriere-Integrität beeinflusst.<sup>[113,119]</sup>

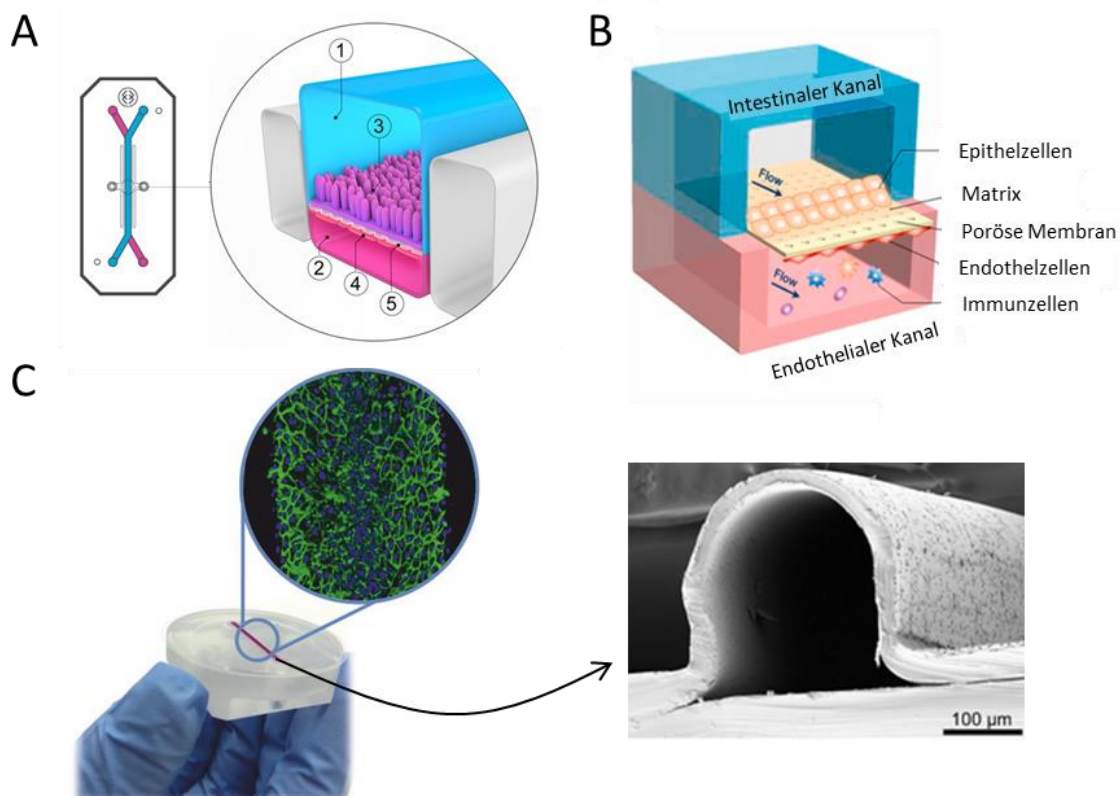


Abbildung 13: Organ-on-a-Chip Systeme aus 2 Kompartimenten, die durch eine poröse Plastikmembran getrennt sind. A) Duodenum Intestine-Chip der Firma Emulate. Draufsicht (links) und vertikaler Schnitt (rechts) mit planaren epithelialen (1; blau) und vaskulären (2; rosa) Zellkultur-Mikrokanäle, die von Darmepithelzellen (3) bzw. Endothelzellen (4) besiedelt und durch eine flexible, poröse, ECM-beschichtete PDMS-Membran (5) getrennt sind. Abgebildet mit Genehmigung von © 2020, Kasendra et al.<sup>[120]</sup> B) Gut-on-a-Chip Modell aus einem oberen planaren Darmepithelkanal und einem unteren mikrovaskulären Endothelkanal, getrennt durch eine ECM-beschichtete poröse Membran. Abgebildet mit Genehmigung von Guo et al. (2021).<sup>[121]</sup> C) Artifizielles Blutgefäß des VasQchips mit Abbildung eines fluidisch kultivierten Endothels (links) sowie Rastermikroskopische Aufnahme des porösen Halbrunden Mikrokanals (rechts). Abgebildet mit Genehmigung von Kappings et al.<sup>[119]</sup>

An solchen *Organ-on-a-Chip*-Modellen können unterschiedliche Applikationsarten evaluiert werden. Am häufigsten wird hierbei eine intravenöse oder orale Wirkstoffgabe simuliert und untersucht. Für die Untersuchung einer oralen Verabreichung kommen *Intestine-on-a-Chip*-Systeme zum Einsatz.<sup>[98,114]</sup>

Humane zellbasierte *Intestine-on-a-Chip*-Modelle haben sich als alternative Methode zur Nachbildung von Darmepithelien *in vitro* etabliert. Im Gegensatz zu Organoiden enthalten diese Plattformen Mikrofluidikkanäle, die dynamische Systeme mit realistischem Medienfluss schaffen und so eine größere experimentelle Kontrolle über die sich entwickelnden Gewebe ermöglichen. Die meisten Modelle verwenden typischerweise hohle rechteckige Kanäle, die von Darmepithelzellen besiedelt werden, um flache planare Kulturen zu erzeugen, die nur eine begrenzte Ähnlichkeit mit der anatomischen Zytomorphologie des nativen Darms aufweisen.<sup>[122-125]</sup> Ansätze die 3D-*Scaffolds* verwenden, um Krypta-Villus-Merkmale zu erhalten (Abbildung 14, A), setzen auf unterstützende Membrane wie Transwell-Zellkulturaufsätze, die das Co-Kultivieren mit anderen nicht-epithelialen Zelltypen verhindern und experimentelle Handhabbarkeit sowie bildbasierte Auswertungen verkomplizieren.<sup>[126-128]</sup> Die neuste Systeme jedoch versuchen Kunststoffmembrane zu vermeiden und stattdessen Hydrogele zu verwenden, die eine direkte Interaktion von Zellen zulassen (Abbildung 14, B).<sup>[126,128]</sup> Hierfür muss eine Kombination aus verschiedenen Verfahren dem 3D-Biodruck, Hydrogel-*Tissue-Engineering*, intrinsische Selbstorganisation und Mikrofluidik angewandt werden, um komplexe *in vivo* ähnliche Organ-Modelle zu erhalten.<sup>[124]</sup>

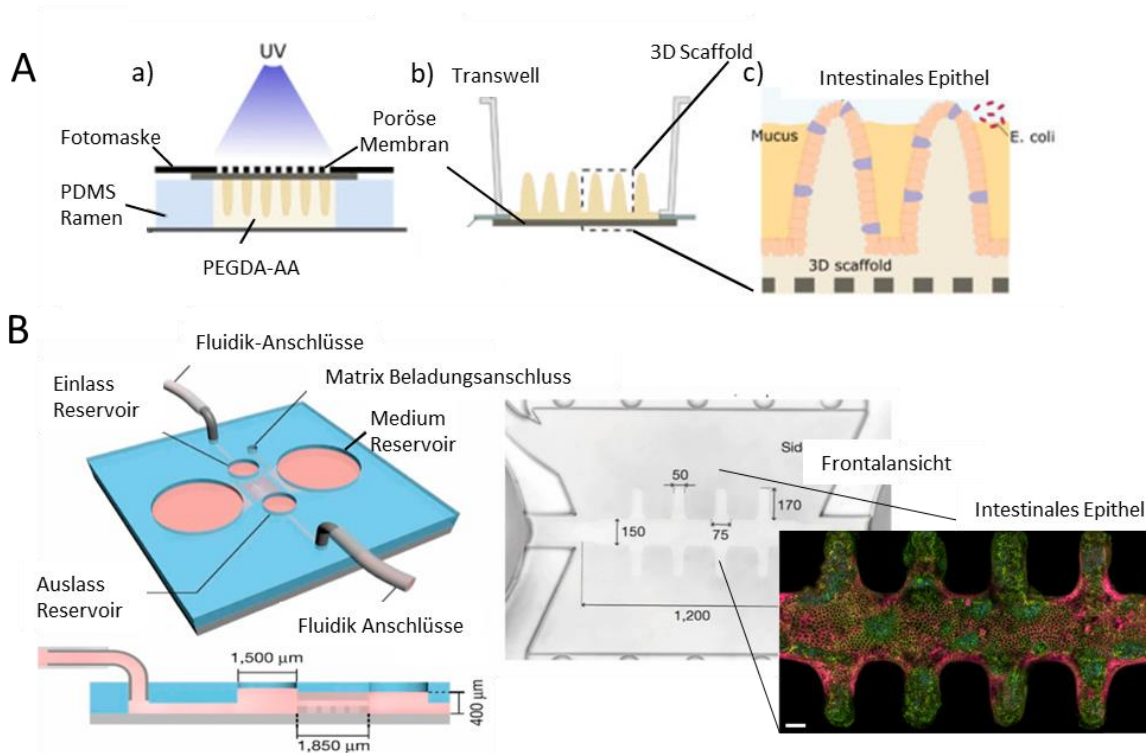


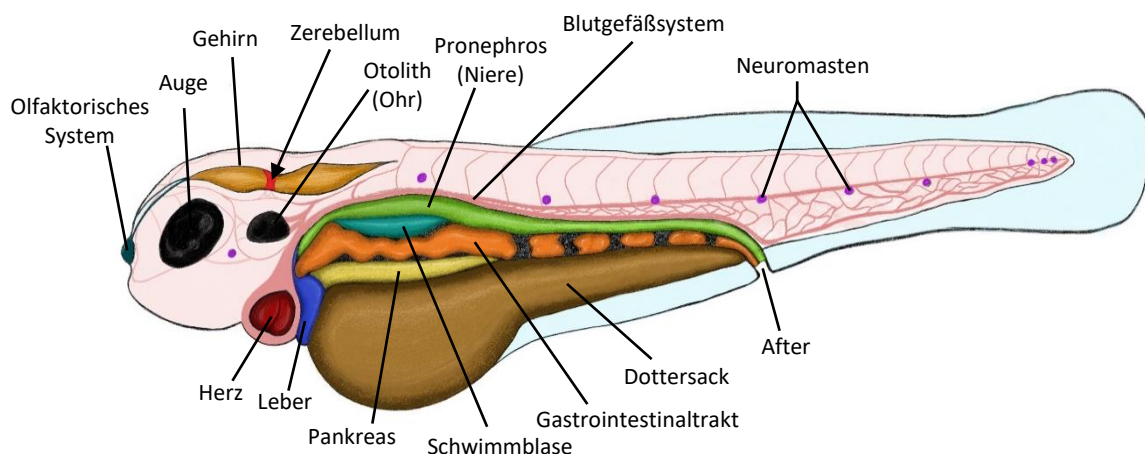
Abbildung 14: 3D-Scaffold basierte Darm-Modelle. A) 3D-Villus-Krypta Darm-Modell. (a) Darstellung des Herstellungsverfahrens (b) und des zottenartigen Hydrogels, das in einen herkömmlichen Transwell-Einsatz eingebaut ist. (c) Auf dem biomimetischen 3D-Modell wird die Darmbarriere aufgebaut. Abgebildet mit Genehmigung von Garcia-Diaz et al.<sup>[129]</sup> B) 3D-Gerüststruktur, die aus einer zentralen Hydrogelkammer besteht, die von zwei externen Medienreservoirs und zwei Einlass- und Auslassreservoirs für die Perfusion durch den Hohlraum flankiert wird. Abgebildet mit Genehmigung von Nikolaev und Mitofanova et al.<sup>[101]</sup>

### 1.5.3 In vivo Zebrafisch Modell

Auch wenn es ethisch wichtig ist an Ersatzmethoden für Tiermodelle zu forschen, können sie den komplexen Aufbau eines ganzen Organismus bisher noch nicht nachbilden. So können Aussagen über die Wirkung von Medikamenten an einzelnen Organen festgestellt werden, ihre Nebenwirkungen auf andere Organe wie *off-target* Effekte bleiben aber verborgen.<sup>[130]</sup> Als potentielle Tierversuchsmodele für die Wirkstoffuntersuchung kommen derzeit z.B. Fische, Mäuse, Hunde oder Affen infrage.

Zebrafische bieten hierbei viele Vorteile und haben sich in den letzten Jahren zu einem beliebten Modellorganismus in der biomedizinischen Forschung insbesondere der Toxikologie entwickelt.<sup>[131]</sup> So ermöglicht es ihre Transparenz in den frühen Entwicklungsstadien Entwicklungsprozesse und Krankheitsmodelle direkt zu beobachten ohne invasive Techniken anwenden zu müssen. Die schnelle Entwicklung der Zebrafische, gepaart mit ihrer kurzen Generationszeit, gestattet es zudem, schnell Ergebnisse zu erzielen und experimentelle

Manipulationen durchzuführen.<sup>[132]</sup> Darüber hinaus teilen Zebrafische viele genetische Ähnlichkeiten mit höheren Wirbeltieren, einschließlich des Menschen, was sie zu einem nützlichen Modell für die Untersuchung der Genfunktion und Krankheitsmechanismen macht.<sup>[133,134]</sup> Ihre kostengünstige Zucht und Haltung<sup>[135]</sup> erlaubt es, große Populationen für Hochdurchsatzscreenings und genetische Studien zu verwenden.<sup>[131]</sup> Auch haben Zebrafische ähnliche Organsysteme wie Säugetiere, einschließlich des Herz-Kreislauf-Systems, des Nervensystems und des Immunsystems, was sie zu einem relevanten Modell für die Untersuchung von Krankheiten und die Entwicklung von Therapien macht. So können zudem Rückschlüsse auf die Teratogenität von Substanzen, also über die Wirkstoffauswirkung auf Fehlbildungen bei der Embryonalentwicklung, gewonnen werden. Insgesamt machen diese Eigenschaften Zebrafische zu einem wertvollen Modellorganismus für die biomedizinische Forschung und haben dazu beigetragen, wichtige Erkenntnisse über die Entwicklung, Krankheitsmechanismen und Therapien zu gewinnen.<sup>[131,132,134]</sup>



*Abbildung 15: Schematische laterale Ansicht eines Zebrafischembryos, mit Abbildung einiger wichtiger Organe.*

Durch Studien an solchen Test-Modellen kann das erhaltene Wissen über die korrekte Wirkstofffreisetzung dazu beitragen, das Forschungsziel der Krebsnanomedizin zu erreichen, nämlich die klinische Umsetzung.

## 1.6 Medikamentenzulassung

Bis neue Medikamente wie Nanopartikel jedoch zugelassen werden können, vergehen meist 10-15 Jahre (Abbildung 16).<sup>[136]</sup> Von etwa 10 000 potenziellen Medikamenten schafft es allerdings durchschnittlich nur eines auf den Markt.

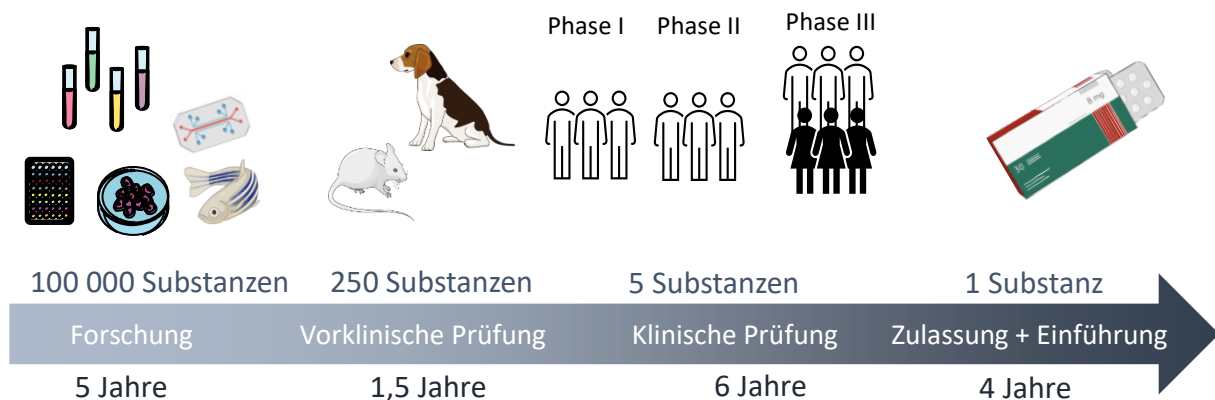


Abbildung 16: Stufen die ein Medikament bis zu seiner Einführung durchläuft.

Medikamentenstudien sind langwierig und teuer, denn um die Wirksamkeit, Sicherheit und Unbedenklichkeit eines Medikaments nachweisen zu können, müssen neue Wirkstoffe im Rahmen klinischer Studien mit größter Sorgfalt untersucht werden. Bei der Zulassung potentieller Medikamente durchlaufen diese verschiedene Stufen, bei denen Tierversuche bisher unausweichlich waren.<sup>[136]</sup> Um etwa ein Medikament in den Vereinigten Staaten zuzulassen, verlangte die FDA in der Regel Toxizitätstests an einer Nagetierart wie etwa Maus oder Ratte und an einer weiteren Spezies wie einem Affen oder Hund. Auch in Europa werden präklinische Tierversuche immer noch vorgeschrieben. Unternehmen verwenden daher jedes Jahr Zehntausende von Tieren für solche Tests. Allein in Deutschland werden jährlich ca. 3 Millionen Tierversuche durchgeführt, wobei nur 46 neue Medikamente inklusive der Generika pro Jahr zugelassen werden. Doch mehr als neun von zehn Medikamenten, die in klinische Studien eintreten, scheitern, weil sie unsicher oder unwirksam sind, was denjenigen Auftrieb verleitet, die argumentieren, dass Tierversuche Zeit, Geld und Leben verschwenden, da die Ergebnisse der Tierforschung nicht auf den Menschen übertragbar sind.<sup>[137]</sup> Dies führte nun dazu, dass nach über 80 Jahren Tierversuchspflicht bei der Zulassung von Medikamenten, die FDA 2023 die Regularien änderte, die es jetzt ermöglichen neue Wirkstoffe, ohne vorherige

Testung an Tieren, zuzulassen.<sup>[130]</sup> Um die Verwendung von Tiermodellen zu verfeinern, zu reduzieren oder letztendlich zu ersetzen (das 3R-Prinzip), ist die Entwicklung neuartiger *in vitro* Testmodelle nun eine dringende Notwendigkeit.<sup>[131]</sup> *Organ-On-a-Chip*-Modelle zeigen großes Potential als Alternative zum Tierversuchsmodell in der Wirkstoffforschung, da durch die Verwendung von humanen Zellen eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gegeben ist.<sup>[114]</sup> So gelang es BASF und Givaudan 2021 die erste weltweite Zulassung einer toxikologischen Teststrategie ohne Tierversuche von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) zu erhalten.<sup>[138]</sup> Denn durch die Verwendung humaner Zellen in der Strategie von BASF und Givaudan konnten bisher bessere toxikologische Vorhersagen über Wirkstoffe getroffen werden als mit den bisherigen Tierversuche möglich war. Allerdings basiert diese Methode auf drei unterschiedlichen Tests, da die Eigenschaften bisheriger künstlicher Organe nicht gänzlich mit denen des Menschen übereinstimmen, denn im Vergleich zum multizellulären Aufbau eines natürlichen Organs, wird im Modell meist nur eine Zellart verwendet und somit kann nur ein mikroskopischer Ausschnitt des Organs untersucht werden. Die meisten Methoden können somit Labortiere noch nicht ersetzen. Durch die Gesamtheit der Studien an 2D-Modellen bis hin zu komplexen artifiziellen Organen, kann allerdings die Anzahl der potentiellen Wirkstoffe schon vor dem Eintritt in die Tierversuchsphase deutlich reduziert werden, da hier nicht nur die personalisierte Wirkstoffforschung Kandidaten herausfiltert kann, die in der Mehrheit der Patienten keine Wirkung zeigen, sondern auch die Unterschiede zwischen Maus und Mensch schneller sichtbar werden. So können diese Modelle zum Erfolg von potentiellen Wirkstoffen in klinische Studien entscheidend sein und somit zur Zulassung von neuen Medikamenten bedeutend beitragen.

## 2 Zielsetzung

Mit über 40 % ist das Risiko im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken sehr hoch. Die Angst vor einer Krebsdiagnose deutet zudem auf die unzureichende Wirksamkeit und Risiken aktueller Therapien hin, was durch ernstzunehmende Nebenwirkungen und einer Sterberate von über 22 % untermauert wird. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es deshalb, innovative *Drug Delivery*-Systeme zu entwickeln, um den aktuellen Herausforderungen der Krebstherapie wie unzureichender Biodistribution, *Multidrug*-Resistenz und systemischer Toxizität bisheriger Medikamente entgegenzuwirken. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze untersucht, die eine präzise Kontrolle der Medikamentenfreisetzung zulassen. Ebenfalls soll ein neues innovatives Modell für die Untersuchung der Darmresorption von Wirkstoffen geschaffen werden, das die Translation zu klinischen Studien verbessern könnte und darüber hinaus Tierversuche minimiert.

### 3 Ergebnisse

Um nun solche innovative *Drug Delivery*-Systeme auf der Basis von Nanopartikeln zu entwickeln, und den aktuellen Herausforderungen der Krebstherapie wie unzureichender Biodistribution, *Multidrug*-Resistenz und systemischer Toxizität bisheriger Medikamente entgegenzuwirken, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Diese beruhen auf der Entwicklung multimodaler Nanopartikel, die verschiedene Eigenschaften vereinen können, wodurch additive therapeutische Effekte erzielt werden. Obwohl fast täglich über neue nanomedizinische Formulierungen und Anwendungen von Nanomedikamenten berichtet wird,<sup>[139]</sup> gibt es derzeit in Europa nur wenig zugelassene Produkte in diesem Bereich.<sup>[140]</sup> Dabei könnte die Multimodalität der Nanopartikel die Lösung vieler *Drug Delivery*-Probleme sein. Denn bei der Verabreichung von Wirkstoffen über nanomedizinische *Drug Delivery*-Systeme ändert sich ihre biologische Verteilung oft dramatisch, und die daraus resultierende Aufnahme in bestimmte Organe, wie Milz und Leber, kann zu einer lokalen Überexposition führen.<sup>[141]</sup> Auch ist die Neigung von Nanopartikeln, sich in lymphatischen Organen anzureichern, durchaus bekannt.<sup>[142]</sup> Dadurch kommt es nicht nur zu einer Freisetzung des Wirkstoffes im Tumorgewebe, sondern es wird auch gesundes Gewebe angegriffen. Multimodale Nanopartikel, die z.B. verschiedene therapeutische Entitäten enthalten oder zusätzliche Targeting-Liganden besitzen, könnten hier eine Abhilfe schaffen. Diese Problematik wird in dieser Arbeit mithilfe zweier unterschiedlich designten *Nanocarrier* angegangen. Zum einen wird eine multimodale Therapieform aus einer Kombination von Chemotherapeutikum und photodynamischer Therapie untersucht, die dazu dienen soll, eine gesteuerte, lokal verstärkte Toxizität zu erzielen. Zum anderen wird ein gezielter Transport durch Oberflächenmodifizierung von *Nanocarrier* evaluiert, um eine ungewollte Anlagerung in unspezifischem Gewebe zu umgehen.<sup>[20]</sup>

#### 3.1 Anorganisch-Organische-Hybridnanopartikel

Organische lipid- oder polymerbasierte Nanopartikel wie Liposomen und Mizellen kommen oft als *Drug Delivery*-System zum Einsatz.<sup>[143]</sup> In den letzten Jahren haben allerdings auch anorganische Nanopartikel die Aufmerksamkeit der Forscher auf sich gezogen, was auf ihre einzigartigen material- und größenabhängigen Merkmale zurückzuführen ist. Ihre physikalischen Eigenschaften, wie etwa ihre optischen und magnetischen Eigenschaften,

zusätzlich zu ihren chemischen Qualitäten, wie Inertheit, Stabilität und einfache Funktionalisierung, machen sie für Forscher besonders attraktiv.<sup>[144]</sup> Die in diesem Kapitel untersuchten Nanopartikel bestehen aus einem anorganischen Teil, dem Gadolinium, das paramagnetische Eigenschaften aufweist und bereits als anorganisches Kation  $Gd_4^{3+}$  für den Einsatz in der Magnetresonanztomographie (MRT) bekannt ist.<sup>[145]</sup> Den organischen Part bildet ein Cocktail aus dem Zytostatikum Pemetrexet (PMX) in Kombination mit einem Photosensibilisator (Aluminium(III)-chlorophthalocyanintetrasulfonsäure ( $H_4[AlPCS_4]$ ) oder Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin ( $H_4[TPPS_4]$ )) oder in Kombination mit Estramustinphosphat (EMP) einem zweiten Zytostatikum.<sup>[146]</sup>

Die beiden verwendeten Zytostatika PMX und EMP sind bereits für die Chemotherapie gegen Lungenkrebs (PMX) und Prostatakrebs (EMP) zugelassen. Hierbei dient PMX (Abbildung 17) als Antifolat-Medikament (Folsäure-Antagonist), dass durch die Blockierung der Folsäureaktivität die Zellteilung im Krebstumor hemmt. In der klinischen Anwendung zeigt PMX trotz seiner zytostatischen Wirksamkeit jedoch einige Schwachstellen, wie die zügige Ausscheidung, geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, begrenzte Bioverfügbarkeit, unzureichende Selektivität der Penetration von Tumorgewebe sowie potenziell schädliche Auswirkungen auf Milz und Nieren. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die Wirksamkeit von PMX in der Tumorthherapie weiter zu optimieren.<sup>[147,148]</sup> Das zweite, bereits zugelassene Chemotherapeutikum, das für die Nanopartikel verwendet wird, EMP (Abbildung 17), zeigt eine antimitotische Wirkung. In Kapselform wird es bereits seit 1977 unter dem Namen Estracyt® vermarktet.<sup>[149]</sup> EMP wird meist oral verabreicht, da die intravenöse Verabreichung einer hohen Dosis von EMP aufgrund seiner starken Toxizität vermieden wird, da sie zu kardiovaskulären, gastrointestinalen Schäden und zu Leberinsuffizienz führen kann. Der Unterschied in der zytotoxischen Auswirkung zwischen oraler und intravenöser Verabreichung liegt vor allem an den unterschiedlichen Wirkstoff-Stoffwechselwegen und der daraus resultierenden Bioverfügbarkeit. Die relative Bioverfügbarkeit des EMP bei einer oralen Verabreichung beträgt nur 75 % der Bioverfügbarkeit einer intravenösen Gabe, da es hier häufig zu einer Wechselwirkung vom EMP mit Nahrungsmitteln kommt.<sup>[150]</sup> Die Zellzyklus hemmende Wirkung von EMP ist allerdings dosisabhängig. Zudem ist EMP ein *Prodrug*, das heißt es ist pharmakologisch inaktiv, bis es im Körper metabolisiert und in die aktive toxische Form Estramustin überführt wird.<sup>[149]</sup> Um nun eine ausreichend hohe Menge an aktiven

Metaboliten im Blutkreislauf zu erreichen, muss daher eine hohe Dosis an EMP verabreicht werden. Durch eine *intra venöse* Applikation des Wirkstoffes könnte die benötigte Konzentration an EMP deutlich schneller erreicht werden, jedoch kommt es hierbei auch häufig zu starke Nebenwirkungen wie perianale Beschwerden, Erbrechen und einer Hepatotoxizität.<sup>[151]</sup> Studien zeigten allerdings bereits, dass die venöse Verabreichung des Medikamentes mithilfe eines *Nanocarriers* eine für die Wirkung ausreichend hoher Dosis und schonend für den gesunden Organismus erreicht werden kann,<sup>[150,152,153]</sup> was es zu einem geeigneten Wirkstoff macht, um in Kombination mit PMX über synergistische Effekte dessen Wirkung zu verstärken und so *Mutidrug*-Resistenzen vorzubeugen.

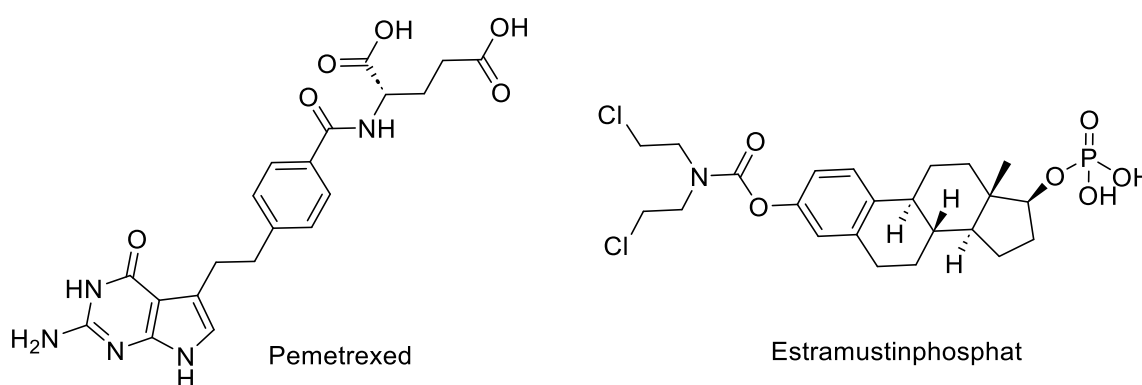


Abbildung 17: Struktur der zugelassenen Chemotherapeutika Pemetrexed (MW: 427,41 g/mol) und Estramustinphosphat (MW: 520,4 g/mol).

Um die Wirkung des Zytostatikums PMX weiter zu unterstützen, Resistenzen zu umgehen und additive Effekte zu erzeugen, sollte eine zweite zytotoxische Komponente in den Nanopartikeln eingeführt werden. Die Nanopartikel wurden so konzipiert, dass sie Photosensibilisatoren enthalten, die die nun zusätzlich eine photodynamische Therapie erlauben. Als Photosensibilisator der zweiten Generation zeichnet sich hierbei  $H_4[AlPCS_4]$  (Abbildung 18) als vielversprechendes Agent für die photodynamische Therapie (PDT) aus<sup>[154]</sup> und wurde auch bereits in einigen Ländern als Medikament hierfür zugelassen.<sup>[155-158]</sup> Neben seinen positiven Eigenschaften, wie der Möglichkeit einer Anregung in tieferem Gewebe durch die Verwendung von langwelligem Licht (650 – 775 nm), einer hohen Quantenausbeute mit 33 % (Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ))<sup>[159,160]</sup> und einer guten Photostabilität mit geringem *Photobleaching*, besitzt  $H_4[AlPCS_4]$  jedoch nur eine geringe Bioverfügbarkeit und eine hohe Bindungsaffinität zu Serumalbumin, wodurch letztendlich nur eine geringe Konzentration des Moleküls von Tumorzellen aufgenommen werden kann.<sup>[155,161-163]</sup>

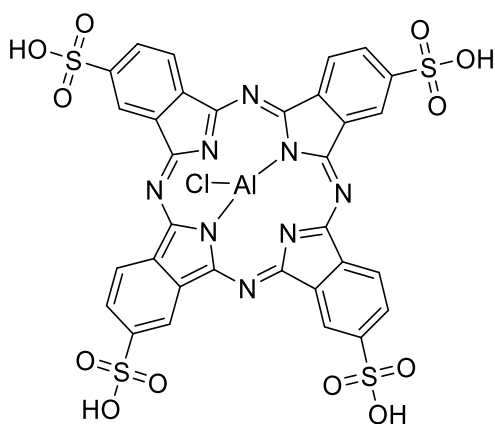


Abbildung 18: Strukturformel von  $H_4[AlPCS_4]$  (895,2 g/mol).

Aus diesem Grund wurde ein zweite Photosensibilisator  $H_4[TPPS_4]$  (Abbildung 19) untersucht.  $H_4[TPPS_4]$  leitet sich von der Klasse der Porphyrine ab und besitzt eine hohe Quantenausbeute von 51 %. Durch die Anregung mit Licht im sichtbaren Bereich (450 – 550 nm) kommt auch  $H_4[TPPS_4]$  für die photodynamische Therapie in tiefer liegende Gewebe infrage.<sup>[164]</sup>

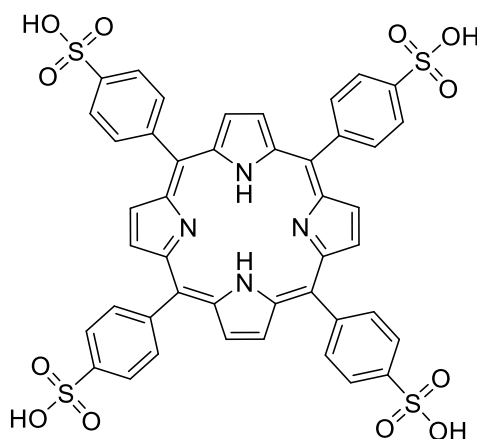


Abbildung 19: Strukturformel von  $H_4[TPPS_4]$  (934,959 g/mol).

Zur Erzeugung einer multimodalen Wirkung der beschriebenen Wirkstoffe, wurden nun Transportsysteme aus unterschiedlichen Kombinationen im Wirkstoffträgern synthetisiert und untersucht. Hierfür wurden die Wirkstoffe mit  $Gd^{3+}$  komplexiert, das zudem ebenfalls noch magnetische und fluoreszente Eigenschaften aufweist, wodurch die Wirkstoffaufnahme in den Organismus zusätzlich gut durch MRT oder Fluoreszenz basierte Bildgebung verfolgt werden kann. Die Synthese und Charakterisierung dieser Nanopartikel wurde von Dr. Mikhail Khorenko im Arbeitskreis von Prof. Dr. Claus Feldmann (Institut für Anorganische Chemie, KIT) durchgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wirkstoffgehalt pro 1 mg/mL Nanopartikel [mg/mL].

Nanopartikel	PMX	EMP	H <sub>4</sub> [AIPCS <sub>4</sub> ]	H <sub>4</sub> [TPPS <sub>4</sub> ]
[Gd(OH)] <sup>2+</sup> [(PMX) <sub>0.74</sub> (AIPCS <sub>4</sub> ) <sub>0.13</sub> ] <sup>2-</sup>	0,521		0,192	
[Gd(OH)] <sup>2+</sup> [(PMX) <sub>0.70</sub> (TPPS <sub>4</sub> ) <sub>0.15</sub> ] <sup>2-</sup>	0,488			0,229
Gd <sup>3+</sup> <sub>2</sub> [(PMX) <sub>0.5</sub> (EMP) <sub>0.5</sub> ] <sup>2-</sup> <sub>3</sub>	0,397	0,409		
Gd <sup>3+</sup> <sub>2</sub> [PMX] <sup>2-</sup> <sub>3</sub>	0,803			
[Gd(OH)] <sup>2+</sup> [EMP] <sup>2-</sup>		0,928		

Die Nanopartikelsynthese erfolgte über Keimbildung nach dem *LaMer*-Modell von Nukleationsphase über Keim-Wachstumsphase bis zur Stabilisierungsphase. Die Größe der synthetisierten Nanopartikel wurde anschließend über die dynamische Lichtstreuung (DLS) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) kontrolliert (Tabelle 2),<sup>[146]</sup> wobei Nanopartikel in der Größenordnung von 60 – 100 nm erhalten wurden.

Tabelle 2: Größencharakterisierung der Gadolinium-basierten Nanopartikel

Nanopartikel	Partikeldurchmesser [nm] (DLS in H <sub>2</sub> O)	Partikeldurchmesser [nm] (REM)
[Gd(OH)] <sup>2+</sup> [(PMX) <sub>0.74</sub> (AIPCS <sub>4</sub> ) <sub>0.13</sub> ] <sup>2-</sup>	98 ± 21	55 ± 3
[Gd(OH)] <sup>2+</sup> [(PMX) <sub>0.70</sub> (TPPS <sub>4</sub> ) <sub>0.15</sub> ] <sup>2-</sup>	59 ± 27	42 ± 3
Gd <sup>3+</sup> <sub>2</sub> [(PMX) <sub>0.5</sub> (EMP) <sub>0.5</sub> ] <sup>2-</sup> <sub>3</sub>	82 ± 17	35 ± 2
Gd <sup>3+</sup> <sub>2</sub> [PMX] <sup>2-</sup> <sub>3</sub>	97 ± 18	59 ± 5
[Gd(OH)] <sup>2+</sup> [EMP] <sup>2-</sup>	60 ± 16	26 ± 2

In Kollaboration mit Dr. Anna Meschkov im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG), KIT) konnten bereits erste Ergebnisse einer zellbiologischen Charakterisierung der Nanopartikel erhalten werden.<sup>[146,165]</sup> Hierbei wurde die Toxizität der Nanopartikel auf den Krebszelllinien SK-Mel-28 (humane Melanom-Zelllinie), HCT119 (humane Darmkrebs-Zelllinie), HeLa-GFP (transformierte humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und den primären Zelllinie NHDF (humane dermale Fibroblasten) und HUVEC (humane embryonale Nabelschnurendothelzellen) in 2D- und 3D-Zellkulturen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Nanopartikel ([Gd(OH)]<sup>2+</sup>[(PMX)<sub>0.74</sub>(AIPCS<sub>4</sub>)<sub>0.13</sub>]<sup>2-</sup>, [Gd(OH)]<sup>2+</sup>[(PMX)<sub>0.70</sub>(TPPS<sub>4</sub>)<sub>0.15</sub>]<sup>2-</sup>), die einen Photosensibilisator enthielten, nach Bestrahlung mit Licht der entsprechenden Wellenlängen

keine eindeutig stärkere Zytotoxizität im Vergleich zu dem freien Zytotoxin (PMX) und der Referenz ( $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3$ ) auf den Krebszelllinien besitzen. Es konnte somit bisher keine lichtinduzierte Verstärkung der Toxizität verursacht werden. Lediglich an den primäre Zelllinien NHDF und HUVEC zeigte sich eine phototoxische Reaktion, die ebenfalls die Angiogenese von Endothelzellen (HUVEC) hemmen konnte. Diese Eigenschaft kann allerdings bei einer Krebstherapie von Vorteil sein um die Angiogenese die verstärkt durch Tumore induziert wird, gezielt zu hemmen und so die Tumervaskularisierung zu stoppen.<sup>[146,161,165]</sup> Da jedoch die phototoxische Wirkung der Nanopartikel auf Krebszellen in vorherigen Arbeiten noch nicht nachgewiesen werden konnte, schließt diese Arbeit hier an, um an weiteren Zelllinie und Zellkulturmodellen die multimodale Wirkung der Nanopartikel zu charakterisieren. Hierfür sollte zum einen die Wirkung der bisherigen Nanopartikelformulierungen mikroskopisch auf HUVEC-GFP Zellen untersucht werden, um ihre phototoxische Wirkung zu verifizieren. Zudem sollte die Toxizität auf eine weitere Krebszelllinie, den HepG2 (humane Leberkrebs-Zelllinie) getestet werden. Da HepG2 Zellen dazu in der Lage sind einheitlich große Tumorsphäroide auszubilden, sollte so auch eine Evaluierung der zyto- und phototoxischen Wirkung der Gadolinium-basierten Nanopartikel in 3D-Zellkulturen durchgeführt werden.

### 3.1.1 Untersuchung der Zyto- und Phototoxizität der Gadolinium-basierten Nanopartikel

Die toxischen Eigenschaften der Nanopartikel wurden zunächst auf einer 2D-Zellkultur aus HepG2 untersucht. Hierfür wurde der von Mosmann, T. *et al.*<sup>[166]</sup> erstmals beschriebene MTT-Assay verwendet, um die zelluläre Stoffwechselaktivität zu messen, welche als Indikator für die Viabilität und Proliferation von Zellen dient. Dieser kolorimetrische Assay basiert auf der Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid oder MTT) zu violetten Formazan-Kristallen durch metabolisch aktive Zellen (Abbildung 20).<sup>[167-169]</sup> Lebensfähige Zellen enthalten in ihren Mitochondrien NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen, die das MTT zu Formazan reduzieren.<sup>[170]</sup> Die unlöslichen Formazan-Kristalle werden durch Zugabe einer Solubilisierungslösung aufgelöst, und die entstehende farbige Lösung wird durch Messung der Absorption bei 500-600 nm mit einem *Multiwell*-Spektralphotometer quantifiziert. Je violetter die Lösung ist, desto mehr lebensfähige, metabolisch aktive Zellen sind vorhanden.<sup>[171]</sup>

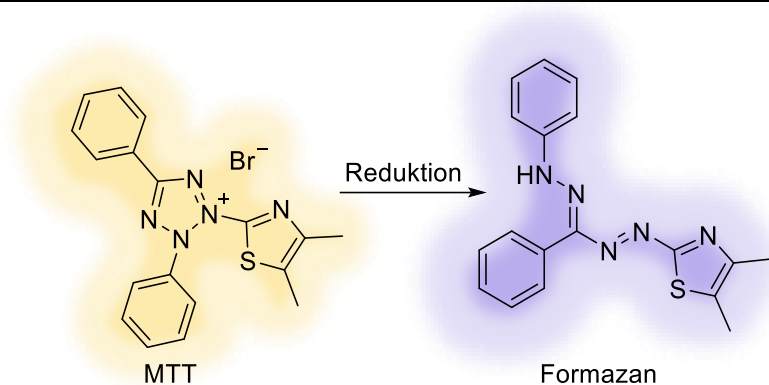


Abbildung 20: Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes MTT zum violetten Formazan durch mitochondriale Enzyme.

Standardmäßig wurden hierfür  $10^4$  HepG2 Zellen pro Well in einer adhäsiven 96-Well-Platte 24 h kultiviert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen (5  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  und 50  $\mu\text{g/mL}$ ) der Nanopartikel und den freien Wirkstoffen behandelt. Hierbei wurden die Zellplatten, die mit Photosensibilisatoren behandelt wurden, in Duplikaten erstellt, um die Auswirkung der Phototoxizität zu validieren. Hierfür wurden die Duplikate nach 24 h Inkubation für 15 min belichtet ( $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  mit 700 nm und  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  mit Weißlicht 400 – 700 nm). Nach insgesamt 72 h Wirkstoff Inkubation wurde die Toxizität über den MTT-Assay, wie in Kapitel 5.2.14 beschrieben, evaluiert. Die Auswertung wurde mit einem Microplatten-Photometer (SpectraMax® iD3) bei 540 nm durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Verstärkung der Zytotoxizität durch die Nanopartikel im Vergleich zu den freien Wirkstoffen (Abbildung 21). Die freien Photosensibilisatoren wiesen einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von etwa 15  $\mu\text{g/mL}$  für freies  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  und 9  $\mu\text{g/mL}$  für freies  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  nach der Belichtung auf (Abbildung 21, b) und d)). Auffällig ist auch eine zunehmende Viabilität durch die Behandlung mit freiem  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  ohne Belichtung (Abbildung 21, b)). Vor allem in niedrigeren Konzentrationen scheint  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  eine wachstumsfördernde Wirkung zu besitzen. Diese Wirkung wurde in der aktuellen Literatur bisher noch nicht beschrieben und führt vermutlich zur etwas schwächeren zytotoxischen Wirkung der  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^2\text{-NP}$  (Abbildung 21, a)) mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $\approx 15 \mu\text{g/mL}$  (mit 3,91  $\mu\text{g/mL}$  PMX und 1,44  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ) relativ zu den  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^2\text{-NP}$  (Abbildung 21, c)) mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $< 5 \mu\text{g/mL}$  (mit 1,22  $\mu\text{g/mL}$  PMX und 0,57  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ). Die durch PMX verursachte toxische Wirkung der Nanopartikel, die ohne Belichtung der Zellen untersucht wurde, zeigte keine zunehmende Zytotoxizität mit steigender Konzentration (Abbildung 21, a) und c)) was auch beim freien PMX in anderen Arbeiten beobachtet wurde<sup>[165,172]</sup>. Da, wie aus den Ergebnissen hervorgeht (Abbildung 21, f)), eine Erhöhung der PMX-Konzentration allein

nicht zu einer Verstärkung seiner zytotoxischen Wirkung führt, ist die Kombination mit einem weiteren Wirkstoff sinnvoll. Die Ergebnisse der kombinierten Nanopartikel zeigten einen 1,5-fach stärkeren additiven Effekt der Toxizität auf dem 2D-Zellkulturmodell. So weisen die Kombi-Nanopartikel mit Photosensibilisatoren ( $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^2$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^2$ ) eine verstärkte Toxizität um etwa das 0,15-fache durch den phototoxischen Effekt nach der Belichtung der Zellen auf. Auch die Kombination von PMX mit dem Zytostatikum EMP im Nanopartikel ( $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$ ) (Abbildung 21, e)) verursacht eine verstärkte Toxizität auf HepG2 Zellen mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $< 5 \mu\text{g/mL}$  (mit  $0,99 \mu\text{g/mL}$  PMX und  $1,02 \mu\text{g/mL}$  EMP) im Vergleich zum freien PMX ( $\text{IC}_{50} \approx 5,62 \mu\text{g/mL}$ ) und freiem EMP ( $\text{IC}_{50} \approx 4 \mu\text{g/mL}$ ) (Abbildung 21, f)).<sup>[146]</sup> Diese Nanopartikel zeigten eine, um fast das 5-fache, höhere Toxizität im Vergleich zu den freien Zytostatika (Abbildung 21, e)). Die erhaltenen  $\text{IC}_{50}$ -Werte der freien Zytostatika entsprechen denen, die auch in der Literatur für ähnliche Zelllinien beobachtet wurden, mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten für PMX auf hepatischen Krebszelllinien von  $1,45 \mu\text{g/mL} - 49,15 \mu\text{g/mL}$ <sup>[173,174]</sup> und  $\text{IC}_{50}$ -Werten für EMP auf Prostata-Krebszelllinien von  $0,94 \mu\text{g/mL} - 5,7 \mu\text{g/mL}$ <sup>[175-177]</sup>.

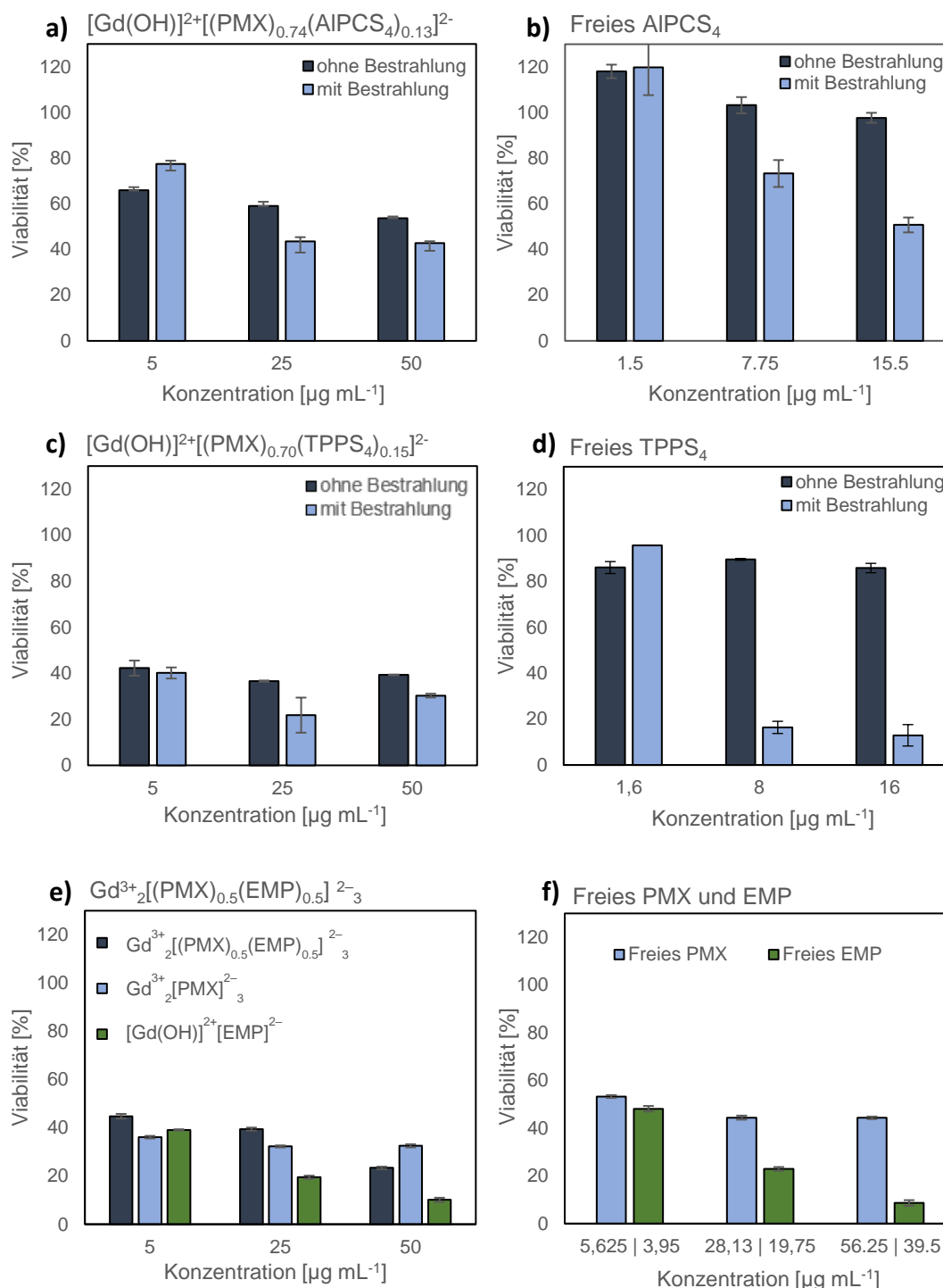


Abbildung 21: Zellviabilitäts-Assay an humanen Leberkarzinomzellen (HepG2).  $10^4$  HepG2 Zelle pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Wachstum mit  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ,  $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[\text{EMP}]^{2-}$  und  $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$ -IOH-NPs (5, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) sowie den frei gelösten aktiven Wirkstoffen  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  /  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  und PMX/EMP (1,55, 7,75, 15,5  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ; 1,6, 8,0, 16,0  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ; 5,625, 28,13, 56,25  $\mu\text{g/mL}$  PMX; 3,95, 19,75, 39,5  $\mu\text{g/mL}$  EMP) für 72 h inkubiert. Zum Teil wurden die Zellen nach 24h Inkubation für 30 min bei 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ) bestrahlt und weitere 48 h inkubiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt,  $n = 3$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. <sup>[146]</sup>

Da Versuche an 2D-Zellkulturmodellen nur erste Erkenntnisse über die Wirkung der Nanopartikel zulassen, müssen komplexere Zellkulturmodelle verwendet werden, um Ergebnisse zu erhalten, die besser auf den Menschen übertragen werden können. Hierfür wurden die Wirkung der Gadolinium-basierten Nanopartikel auf 3D-Tumorsphäroide aus HepG2 Zellen untersucht. Für diesen Versuch wurden Tumorsphäroide aus  $10^3$  HepG2 Zellen pro Well in einer mit 1,5 % Agarose beschichteten 96-Well-Platte für 3 Tage kultiviert (siehe Kapitel 5.2.15). Daraufhin erfolgte die Inkubation der Tumorsphäroide mit verschiedenen Konzentrationen an Nanopartikeln (25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  und 300  $\mu\text{g/mL}$ ) sowie deren freie Wirkstoffe in äquivalenter Konzentration. Ebenfalls wurde das Experiment zur Messung der Belichtungseffekte dupliziert, um nach 24 h jeweils die Hälfte der behandelten Tumorsphäroide zu belichten (15 min,  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  mit 700 nm und  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  mit Weißlicht 400 – 700 nm). Auch hier erfolgte nach insgesamt 72 h Inkubation die Auswertung über den MTT-Assay (siehe Kapitel 5.2.14), um die metabolische Aktivität der Tumorsphäroide zu evaluieren. Die Untersuchung zeigte, dass im Vergleich zur 2D-Zellkultur eine deutlich höhere Konzentration, etwa das 10-fache, benötigt wird, um eine ähnlich starke toxische Wirkung auf die Zellen zu erzielen (Abbildung 22). Werden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Substanzen betrachtet mit PMX ( $\text{IC}_{50} \approx 5,6 \mu\text{g/mL}$ ) (Abbildung 22, f)), belichtetes  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  ( $\text{IC}_{50} \approx 31 \mu\text{g/mL}$ ) (Abbildung 22, b)) und belichtetes  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  ( $\text{IC}_{50} \approx 96 \mu\text{g/mL}$ ) (Abbildung 22, d)), sowie die belichteten Nanopartikel,  $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3\text{-NP}$  ( $\text{IC}_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$  (mit 10,04  $\mu\text{g/mL}$  PMX)) (Abbildung 22, e)),  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}\text{-NP}$  ( $\text{IC}_{50} \approx 210 \mu\text{g/mL}$  (mit 54,74  $\mu\text{g/mL}$  PMX + 20,16  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ )) (Abbildung 22, a)) und  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}\text{-NP}$  ( $\text{IC}_{50} \approx 25 \mu\text{g/mL}$  (mit 6,1  $\mu\text{g/mL}$  PMX + 2,85  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ )) (Abbildung 22, c)), ist im Vergleich eine stärkere zytotoxische Wirkung der nanopartikulären Wirkstoffe durch einen synergistischen Effekt zu erkennen. Besonders deutlich ist der Wirkungsunterschied von freiem und nanopartikulärem Wirkstoff bei niedrigerer Konzentration. Die Wirkung von PMX erhöhte sich auch hier nicht bei sehr hohen Konzentrationen (Abbildung 22, f)), wodurch ebenfalls eine Verstärkung der Zytotoxizität nur durch die Zugabe eines zweiten Wirkstoffes erreicht werden kann. Allerdings ließ sich in der 3D-Zellkultur im Vergleich zu den Kombi-Nanopartikeln mit Photosensibilisatoren ( $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^2$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ) eine deutlich stärkere Wirkung durch die Kombination der zwei Zytotoxine, PMX und EMP ( $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$ ), erzielen (Abbildung 22, e)). Diese Nanopartikel weisen einen

IC<sub>50</sub>-Wert von unter 25 µg/mL (mit 4,95 µg/mL PMX und 5,1 µg/mL EMP) auf, mit deutlicher Zunahme der toxischen Wirkung bei steigender Konzentration.<sup>[146]</sup>

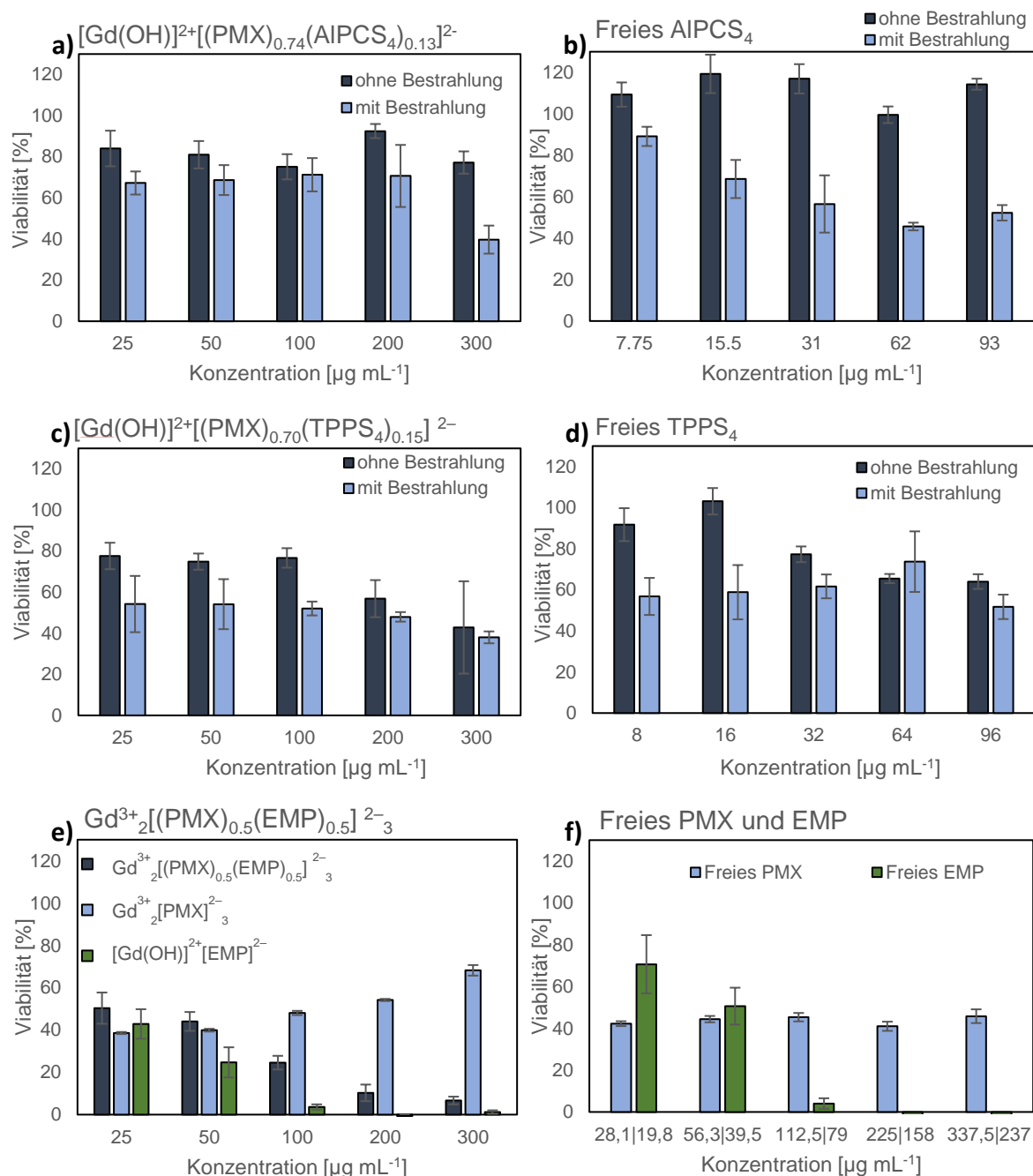


Abbildung 22: Zellviabilitäts-Assay an HepG2-Tumorsphäroiden. 3 Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50, 100, 200, 300 µg/mL) von  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ,  $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[\text{EMP}]^{2-}$  und  $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$  -IOH-NPs sowie den frei gelösten aktiven Wirkstoffen  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  /  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  und PMX/EMP (7,75, 15,5, 31,0, 62,0, 93,0 µg/mL  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ; 8,0, 16,0, 32,0, 64,0, 96,0 µg/mL  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ; 28,13, 56,25, 112,5, 225,0, 337,5 µg/mL PMX; 19,75, 39,5, 79,0, 158,0, 237,0 µg/mL EMP) für 72 h inkubiert. Zum Teil wurden die Zellen nach 24 h Inkubation für 30 min bei 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ) bestrahlt und weitere 48 h inkubiert. Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt, n = 3. Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.<sup>[146]</sup>

### 3.1.2 Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums durch Gadolinium-basierte Nanopartikel

Da die Wirkstoffe PMX und EMP vor allem die Zellteilung hemmen und der MTT-Assay lediglich eine Aussage über die metabolische Aktivität der Zellen zulässt, wurde zudem der Wachstumsverlauf der Tumorsphäroide analysiert. Hierfür wurden die Sphäroide wie zuvor beschrieben (Kapitel 5.2.15) in 1,5 % Agarose beschichtete Platten kultiviert und am dritten Tag mit Nanopartikeln und den freien Wirkstoffen behandelt. Auch hier wurde das Experiment zur Messung der Belichtungseffekte dupliziert und die Hälfte davon nach 24 h Inkubation für 15 min belichtet ( $\text{H}_4[\text{AlPCS}_4]$  mit 700 nm und  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  mit Weißlicht 400 – 700 nm). Die Auswertung erfolgte über ein LED-Mikroskop vor der Behandlung (Tag 0) sowie an den Tagen 1, 3 und 7 nach der Behandlung. Mithilfe der LAS X Software (Leica) konnten anschließend die Durchmesser der Tumorsphäroide bestimmt werden, um den Wachstumsverlauf betrachten zu können (Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25). Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur das Wachstum der Sphäroide beeinflusst wurde, sondern auch deren Morphologie (Abbildung 23, Abbildung 24, zoom). So lösten sich die Tumorsphäroide durch eine Behandlung mit Kombi-Nanopartikel ( $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AlPCS}_4)_{0.13}]^2$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ) an den normalerweise glatten Rändern auf und begannen zu zerfallen, es kam zur sogenannten Tumorsphäroid Regression.<sup>[178]</sup> Auch wenn das freie PMX und der  $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3$ -NP das Wachstum der Tumorsphäroiden verhindern konnten, behielten die Sphäroide ihre glatte Oberfläche und blieben somit weitestgehend intakt (Abbildung 24, i)). Ebenfalls konnten die Nanopartikel-Kombinationen von PMX und Photosensibilisator ( $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AlPCS}_4)_{0.13}]^2$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ) bereits vor ihrer Aktivierung mit Licht das Wachstum der Sphäroide durch die Wirkung des PMX reduzieren (Abbildung 23, b) und d) unbelichtet). Die belichteten Proben zeigten somit einen additiven Effekt und die Kombination von Wirkstoff und Photosensibilisator führte zudem zur Zerstörung der Tumormorphologie (Abbildung 23, b) und d) belichtet). Die stärkste Wirkung hatte, wie auch in vorherigen Zellmodellen, EMP, da es seine Wirkung schon bei niedrigeren Konzentrationen zeigte und diese mit höheren Konzentrationen noch zunahm (Abbildung 25). Die Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkung von PMX durch einen zweiten Wirkstoff im Nanopartikel konnte somit erreicht und nachgewiesen werden, wobei EMP, gefolgt von

$H_4[TPPS_4]$ , den stärksten additiven Effekt verursachte. Die Verwendung von  $H_4[AIPCS_4]$  zeigte in allen Tests den geringsten additiven Effekt.<sup>[146]</sup>

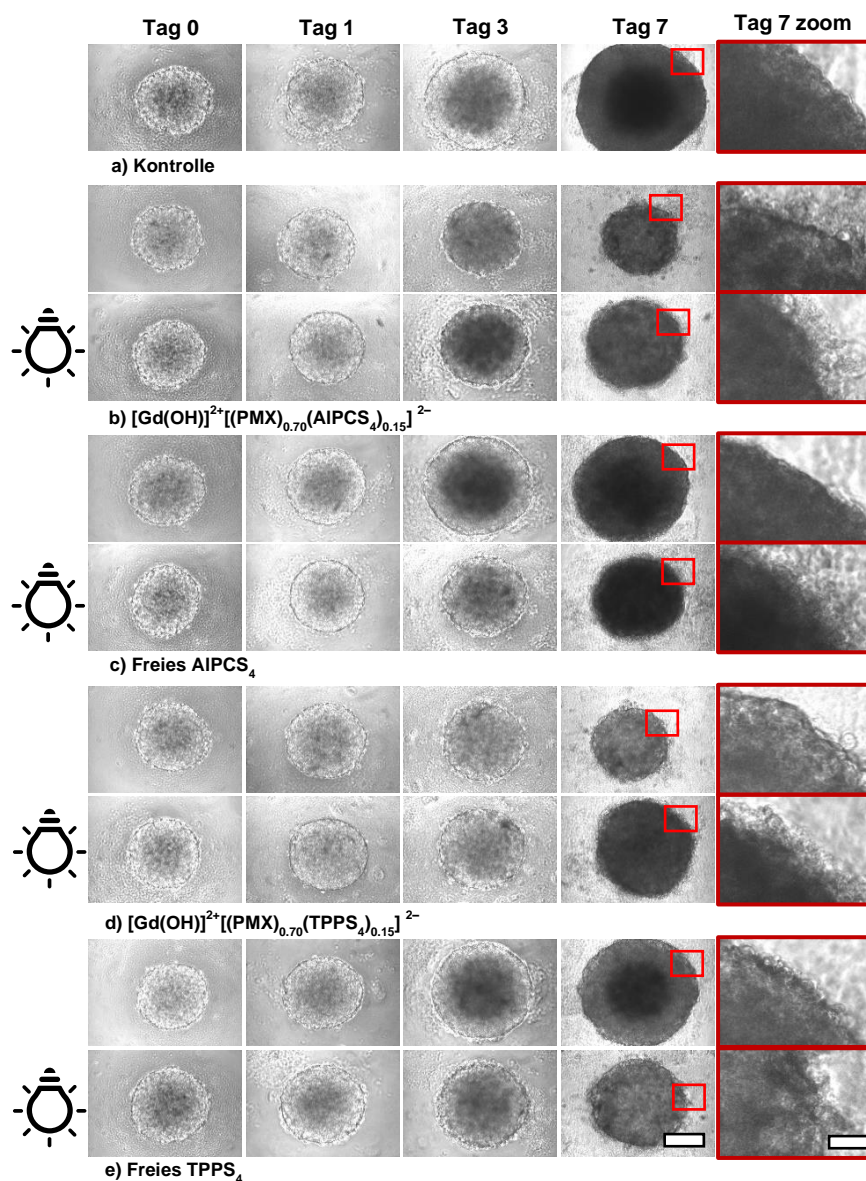


Abbildung 23: Mikroskopische Beobachtung des Wachstums von HepG2-Tumorsphäroiden vor der Behandlung (Tag 0) sowie an Tag 1, 3 und 7 nach der Behandlung. Drei Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit 100 µg/mL von  $[Gd(OH)]^{2+}[(PMX)_{0.74}(AIPCS_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[Gd(OH)]^{2+}[(PMX)_{0.70}(TPPS_4)_{0.15}]^{2-}$ ,  $Gd^{3+}_2[PMX]^{2-}_3$ ,  $[Gd(OH)]^{2+}[EMP]^2$  und  $Gd^{3+}_2[(PMX)_{0.5}(EMP)_{0.5}]^{2-}_3$ -IOH-NPs sowie den frei gelösten aktiven Wirkstoffen  $H_4[AIPCS_4]$  /  $H_4[TPPS_4]$ , PMX und EMP (31 µg/mL  $H_4[AIPCS_4]$ ; 32 µg/mL  $H_4[TPPS_4]$ ; 112,5 µg/mL PMX und 79,0 µg/mL EMP) behandelt. Zum Teil wurden die Zellen nach 24 h Inkubation für 30 min bei 700 nm (für  $H_4[AIPCS_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $H_4[TPPS_4]$ ) bestrahlt und insgesamt weitere 48 h inkubiert. Zu sehen ist die morphologische Veränderung der Sphäroide während der 7-tägigen Behandlung. Maßstab: 200 µm, ZOOM: 40 µm. Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.<sup>[146]</sup>

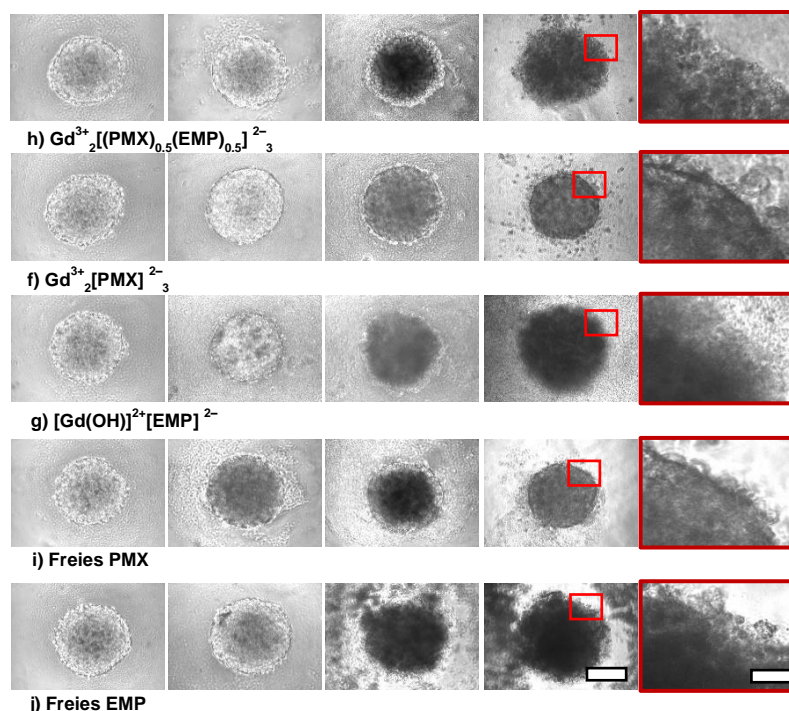


Abbildung 24: Mikroskopische Beobachtung des Wachstums von HepG2-Tumorsphäroiden vor der Behandlung (Tag 0) sowie an Tag 1, 3 und 7 nach der Behandlung. Drei Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit 100 µg/mL von  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ,  $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[\text{EMP}]^{2-}$  und  $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$ -IOH-NPs sowie den frei gelösten aktiven Wirkstoffen  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  /  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ , PMX und EMP (31 µg/mL  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ; 32 µg/mL  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ; 112,5 µg/mL PMX und 79,0 µg/mL EMP) behandelt. Zum Teil wurden die Zellen nach 24 h Inkubation für 30 min bei 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ) bestrahlt und insgesamt weitere 48 h inkubiert. Zu sehen ist die morphologische Veränderung der Sphäroide während der 7-tägigen Behandlung. Maßstab: 200 µm, ZOOM: 40 µm. Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. <sup>[146]</sup>

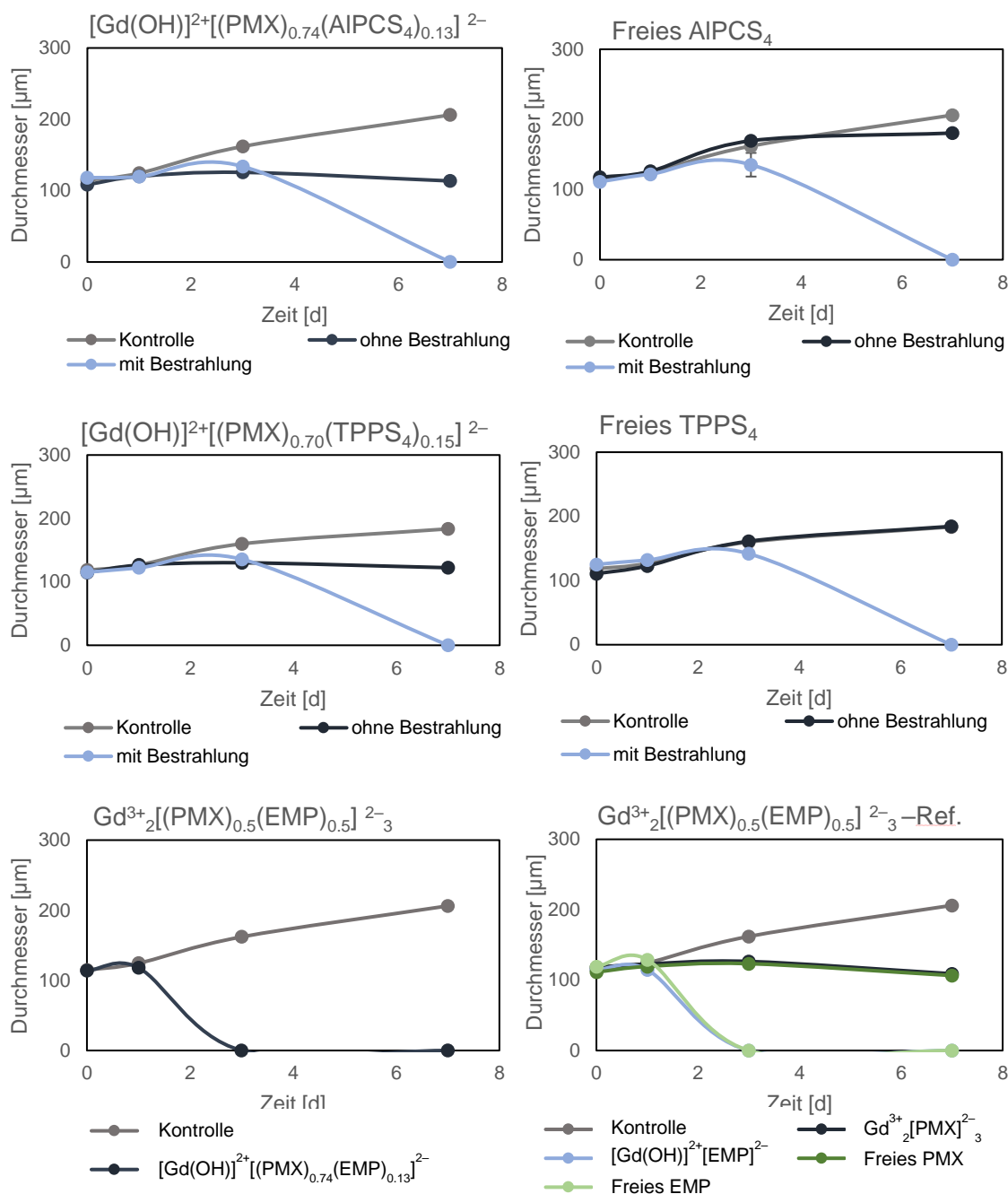


Abbildung 25: Mikroskopische Beobachtung des Wachstums von HepG2-Tumorsphäroiden vor der Behandlung (Tag 0) sowie an Tag 1, 3 und 7 nach der Behandlung. Drei Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit 100 µg/mL von  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ,  $\text{Gd}^{3+}_2[\text{PMX}]^{2-}_3$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[\text{EMP}]^{2-}$  und  $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$ -IOH-NPs sowie den frei gelösten aktiven Wirkstoffen  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  /  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ , PMX und EMP (31 µg/mL  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ; 32 µg/mL  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ; 112,5 µg/mL PMX und 79,0 µg/mL EMP) behandelt. Zum Teil wurden die Zellen nach 24 h Inkubation für 30 min bei 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ) bestrahlt und insgesamt weitere 48 h inkubiert. Abgebildet ist die Größenveränderung der HepG2-Tumorsphäroide im Vergleich zur Kontrollgruppe während der 7-tägigen Behandlung. Durchmesserwerte von 0 µm deuten auf Sphäroid-Regression hin. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt,  $n = 6$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. <sup>[146]</sup>

Im Anschluss an die Untersuchung des Sphäroidwachstums, wurden die fluoreszenten Eigenschaften der Photosensibilisatoren genutzt, um die Aufnahme der nanopartikulären und freien Wirkstoffe  $H_4[TPPS_4]$  und  $H_4[AlPCS_4]$  in die Tumorsphäroide mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren. Da die meisten Sphäroide nach 7 Tagen Inkubation durch die Toxizität der Nanopartikel und Wirkstoffe zerfielen, wurden für die Untersuchung der Nanopartikel-Aufnahme eine Inkubationszeit von 48 h gewählt mit einer Nanopartikel-Konzentration von 100  $\mu\text{g/mL}$  und freier Photosensibilisatoren in äquivalenter Konzentration. Um die Dimension der Sphäroide zu veranschaulichen, wurden die Zellkerne der HepG2-Sphäroide mittels Hoechst33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol-trihydrochlorid) angefärbt. Hoechst33342 bindet an den kleinen Furchen, bevorzugt an Adenin-Thymin-Regionen, der DNA, wodurch seine Fluoreszenzintensität um das 30-fache zunimmt und somit optimal zur Detektion der Zell DNA geeignet ist.<sup>[179]</sup> Auffallend war hierbei die deutlich ausgeprägtere Aufnahme des  $H_4[AlPCS_4]$  und dessen Nanopartikel, obwohl die Wirkungsweise beider Photosensibilisatoren in den vorherigen Ergebnissen vergleichbar war (Abbildung 26). Auch ist zu erkennen, dass die Nanopartikel gleichmäßiger in den gesamten Sphäroiden absorbiert wurden als die freien Photosensibilisatoren, die sich mehr im Inneren des Sphäroids anreicherten. Es ist bekannt, dass tetrasulfonierte Photosensibilisatoren wie  $H_4[TPPS_4]$  und  $H_4[AlPCS_4]$  eine hohe Hydrophilie aufweisen. Deshalb ist die Aufnahme in die Zellen aufgrund ihrer lipophilen Membran erschwert. Wie unter anderem Friberg *et al.* nachweisen konnten, kann durch eine Senkung des pH-Werts die Lipophilie der Moleküle zunehmen, wodurch sie besser in die Zellen aufgenommen werden können.<sup>[180]</sup> Da im Tumorsphäroide, wie auch in physiologischen Tumoren, im Inneren ein niedrigerer pH-Wert herrscht, wird die Absorption der Photosensibilisatoren verstärkt, wodurch, wie auch in Abbildung 26 zu erkennen ist, ein Großteil der freien Wirkstoffe im Inneren der Sphäroide absorbiert wird.<sup>[180-182]</sup> Somit wird durch einen Transport der Photosensibilisatoren im Nanopartikel eine bessere Aufnahme der Wirkstoffe gewährleistet.

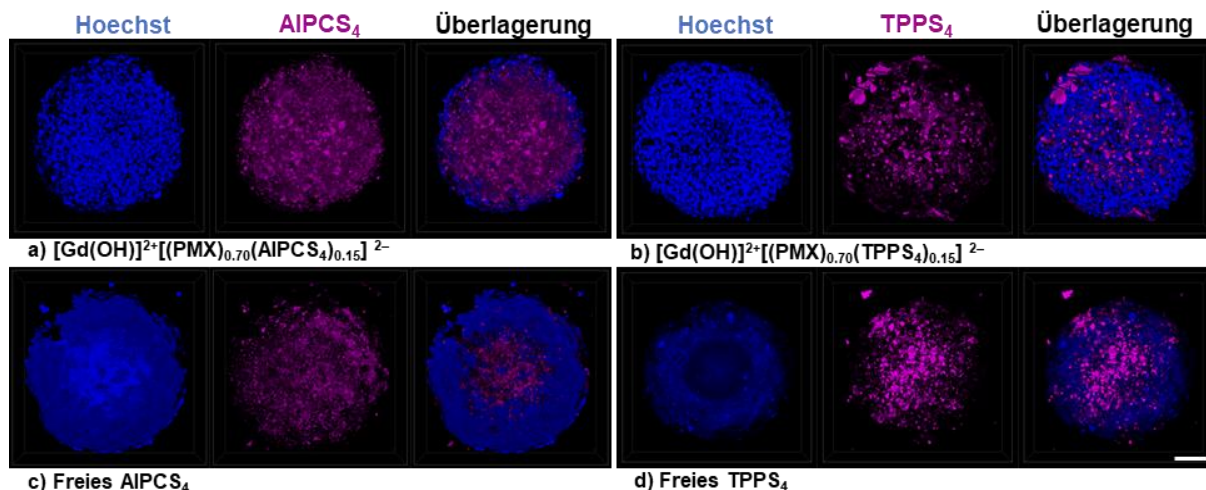


Abbildung 26: 3D-Konfokalmikroskopie von HepG2-Tumorsphäroiden nach 24-stündiger Behandlung mit  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$  (a) und  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$  (b) in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/mL}$  im Vergleich zu den freien Wirkstoffen  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  (c), 31  $\mu\text{g/mL}$  und  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  (d), 32  $\mu\text{g/mL}$ . Hoechst33342 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Zu sehen ist die Fluoreszenz-Aufnahme von Hoechst33342 (blau;  $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}450 \text{ nm}$ ) und IOH-NPs (lila;  $\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 650\text{-}750 \text{ nm}$  für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$  für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ). Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. <sup>[146]</sup>

Über eine Lebend-Tot-Färbung mittels Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) sollte nun noch die Toxizität der Gadolinium-basierten Nanopartikel veranschaulicht werden, um toxische und wachstumshemmende Effekte unterscheiden zu können. Das Calcein-AM kann über die intakte Zellmembran von lebensfähigen Zellen eindringen, wo es dann über Esterasen zum grün fluoreszierenden Calcein verstoffwechselt wird (Abbildung 27).<sup>[183,184]</sup> Propidiumiodid hingegen fluoresziert rot und kann lediglich durch die beschädigte Zellmembran von abgestorbenen oder geschädigten Zellen eindringen und in dessen DNA interkalieren (Abbildung 27).<sup>[183]</sup>

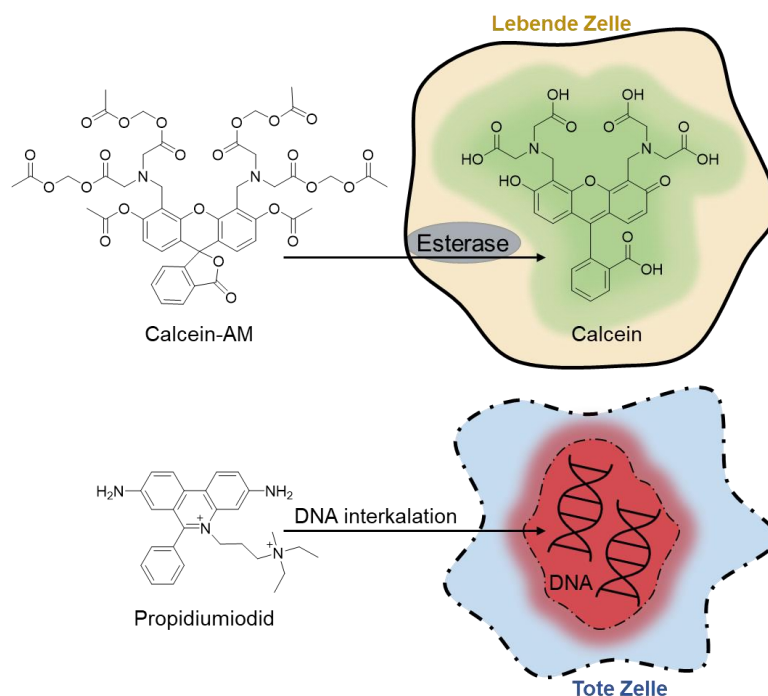


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Lebend-Tot-Färbung mittels Calcein-AM und Propidiumiodid.

In diesem Experiment wurden die freien und nanopartikulären Wirkstoffe (Tabelle 1), analog zu vorherigen Experimenten, belichtet und unbelichtet verglichen (Abbildung 28, Abbildung 29). Die Behandlung der Tumorsphäroide und die anschließende Lebend-Tot-Färbung wurden, wie in Kapitel 3.1.2 bzw. Kapitel 5.2.17 beschrieben, 48 h nach Inkubation durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, wobei die Phototoxizität durch die Zunahme der roten Fluoreszenzmarkierung der toten Zellen durch das PI deutlich zu erkennen ist. Während bei den freien Photosensibilisatoren im unbelichteten Zustand kaum abgestorbene Zellen auszumachen sind (Abbildung 29, a) und b)), war aufgrund des in den Nanopartikeln  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^2$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$  zusätzlich enthaltenen PMX bereits vor der Belichtung eine Zytotoxizität vorhanden, wodurch die Nanopartikel eine deutlich ausgeprägtere Wirkung auf die Tumorsphäroide zeigen (Abbildung 28, a) und b)). Auffälligerweise zeigte das freie PMX kaum Toxizität gegenüber den Sphäroiden, es schien lediglich das Wachstum des Tumors zu verringern (Abbildung 29, d)). In Kombination mit dem deutlich zytotoxischeren EMP im Nanopartikelcocktail  $[\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3]$ , war die Wirkung jedoch deutlich verstärkt (Abbildung 28, c)). EMP allein, im Nanopartikel oder frei, zeigte die stärkste Toxizität gegenüber den Tumorsphäroiden jedoch keine Verringerung des Tumorwachstums (Abbildung 29, f)). Eine Kombination der beiden Wirkstoffe PMX und EMP zeigte somit gute Grundvoraussetzungen als Kombitherapie,

wohingegen in Verbindung mit einem Photosensibilisator eine gezieltere Therapie möglich ist ohne gesundes Gewebe zu zerstören.<sup>[146]</sup> Auch ist erneut deutlich zu erkennen, dass die freien Photosensibilisatoren  $H_4[TPPS_4]$  und  $H_4[AlPCS_4]$  vermehrt im Inneren der Sphäroide akkumulieren, wodurch die meisten Zellen im Inneren abgetötet werden, wohingegen die Nanopartikel in den gesamten Sphäroiden angereichert werden und ihre Wirkung so auch die äußeren Zellschichten trifft.

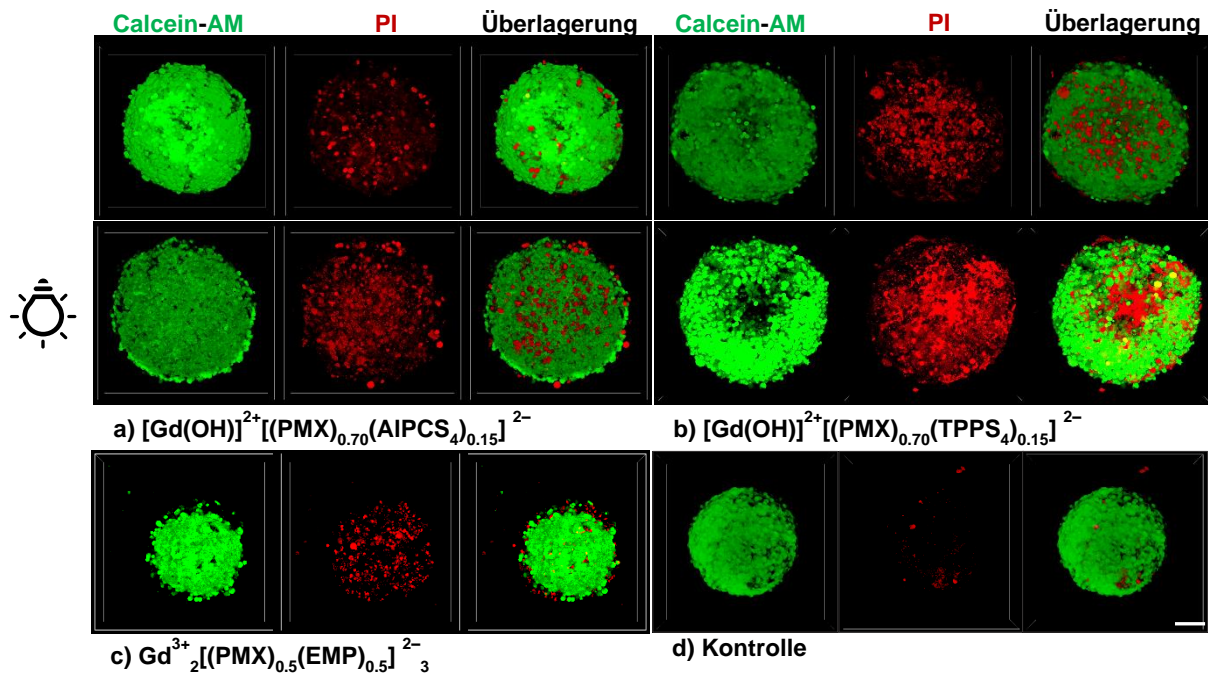


Abbildung 28: Lebend-Tot-Assay an HepG2-Tumorsphäroiden. 3D-Konfokalmikroskopie von Sphäroiden, die für 48 h mit 100  $\mu g/mL$   $[Gd(OH)]^{2+}[(PMX)_{0.70}(AlPCS_4)_{0.15}]^{2-}$ ,  $[Gd(OH)]^{2+}[(PMX)_{0.70}(TPPS_4)_{0.15}]^{2-}$  und  $Gd^{3+}_2[(PMX)_{0.5}(EMP)_{0.5}]^{2-}_3$  -IOH-NPs behandelt wurden. Zum Teil wurden die Sphäroide nach 24 h für 30 min bei 700 nm (für  $H_4[AlPCS_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $H_4[TPPS_4]$ ) bestrahlt. Die Sphäroide wurden mit Calcein-AM (grün:  $\lambda_{exc} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 510-600$  nm) für lebende Zellen und PI (rot:  $\lambda_{exc} = 535$  nm,  $\lambda_{em} = 580-700$  nm) für tote Zellen gefärbt. Maßstab: 100  $\mu m$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.<sup>[146]</sup>

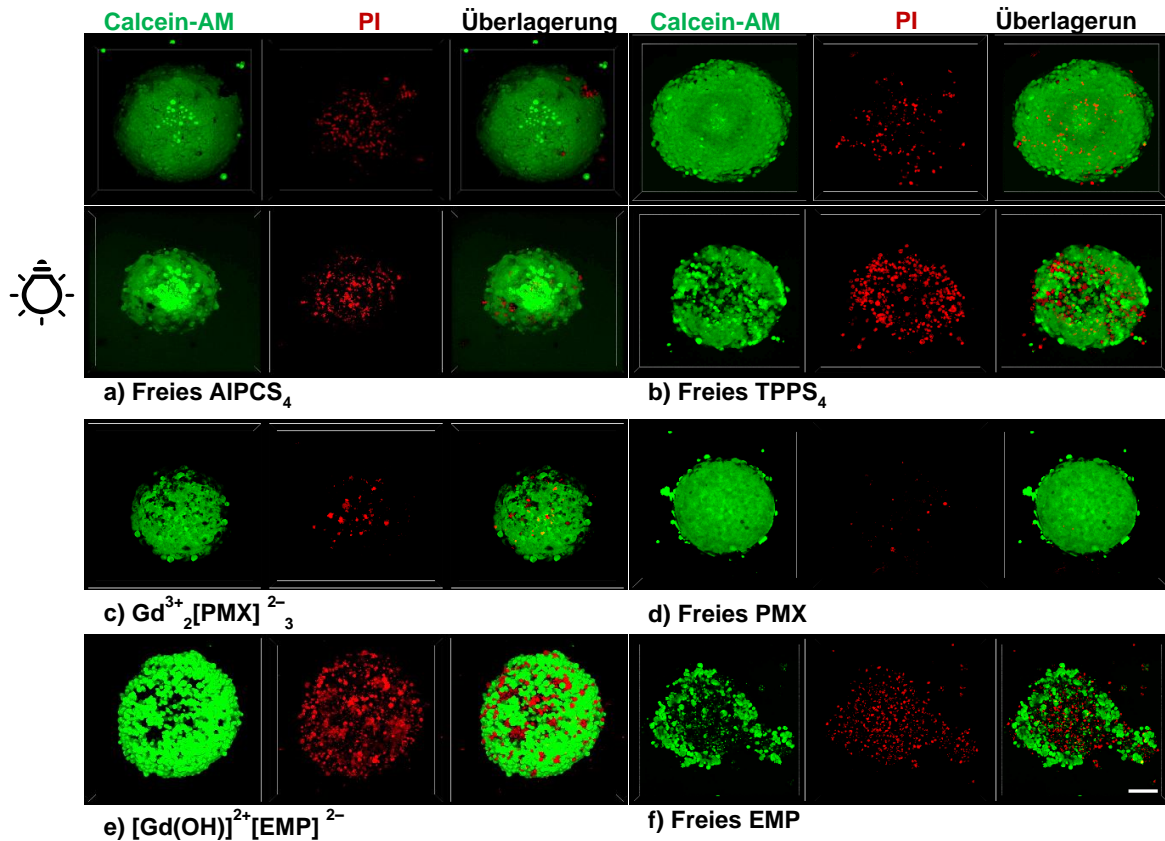


Abbildung 29: Lebend-Tot-Assay an HepG2-Tumorsphäroiden. 3D-Konfokalmikroskopie von Sphäroiden, die für 48 h mit 100  $\mu\text{g/mL}$   $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$  und  $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3$ -IOH-NPs behandelt wurden. Zum Teil wurden die Sphäroide nach 24 h für 30 min bei 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$ ) oder Weißlicht 400 – 700 nm (für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ) bestrahlt. Die Sphäroide wurden mit Calcein-AM (grün:  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}600 \text{ nm}$ ) für lebende Zellen und PI (rot:  $\lambda_{\text{exc}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 580\text{-}700 \text{ nm}$ ) für tote Zellen gefärbt. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. <sup>[146]</sup>

Die gezielte Phototoxizität, die durch eine Kombitherapie aus PMX und Photosensibilisator im Nanopartikel  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$  erreicht werden sollte, wurde in einer 2D-Zellkultur von GFP modifizierten primären HUVEC Zellen unter einem Konfokalmikroskop untersucht, da dabei eine sehr gezielte und spezifische Belichtung von einzelnen Zellen erfolgen kann. Durch die transformierten HUVEC Zellen kann ihre daraus resultierende GFP-Expression dazu genutzt werden, um die Morphologie der Zelle darzustellen. Hierfür wurden in einer 8-Well-Platte  $10^4$  HUVEC-GFP Zellen pro Well ausgesät und nach 24 h mit den freien Photosensibilisatoren  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  (15,5  $\mu\text{g/mL}$ ) und  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$  (16,0  $\mu\text{g/mL}$ ) und den Nanopartikeln  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$  und  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ) über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 markiert und die Proben mikroskopiert. Dabei wurde im Zoom eine Zelle jeweils für 20 min belichtet (635 nm für  $\text{H}_4[\text{AIPCS}_4]$  und 532 nm für  $\text{H}_4[\text{TPPS}_4]$ ) und

die mikroskopischen Aufnahmen vor und nach Belichtung verglichen (Abbildung 32, Abbildung 32). Die spezifische phototoxische Auswirkung auf die einzelne HUVEC-GFP Zelle ist nach 20 min Belichtung deutlich zu erkennen. Zwar verlor auch die mit Licht der Wellenlänge 532 nm belichtete Kontrollzelle (Abbildung 32, Abbildung 32, f)), nach 20 min an GFP Signal, jedoch ist dies auf die Instabilität des Fluorophors GFP gegenüber Licht der energiereichen Wellenlänge zurückzuführen, welche im Bereich des Anregungsspektrums von GFP liegt und bei Bestrahlung mit hoher Intensität zu *Photobleaching* führt.<sup>[185]</sup> Die Intaktheit der Kontrollzelle kann über ihre Hellfeldaufnahme nachgewiesen werden (Abbildung 32, Abbildung 32, f)). Eine Phototoxizität wurde zudem durch die Abschnürung von Vesikeln, sogenannter apoptotischer Körperchen (Abbildung 30), um die belichteten Zellen erkennbar. Diese weisen auf die Apoptose der Zellen im belichteten Bereich hin<sup>[186]</sup>, während die Zellen, die weiter entfernt wuchsen und unbelichtet blieben, keinerlei oder mäßig ausgeprägte Schäden aufweisen (Abbildung 32, a), b) und Abbildung 32 d) und f)).

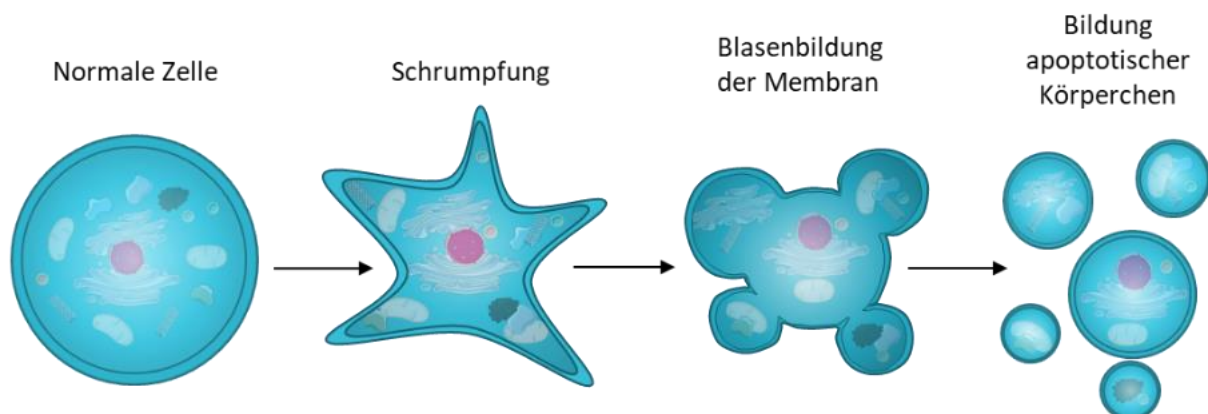


Abbildung 30: Schematische Ablauf der Apoptose. Nach ihrer Initiation zieht sich die Zelle zusammen woraufhin es zu Blasenbildung der Membran kommt, wobei die Zellbestandteile durch Caspasen gespalten, und Vesikel abgeschnürt werden. Am Ende bilden sich apoptotische Körperchen, die dann von Makrophagen aufgenommen und verdaut werden.

Eine Phototoxizität durch die Verwendung der multimodalen Nanopartikel aus einer Kombination aus PMX und Photosensibilisator ( $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^2$ ,  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ ) konnte somit bestätigt werden. Auch schienen die nanopartikulären Wirkstoffe eine stärkere Auswirkung auf die Zellen zu besitzen. Wie auch Jerjes *et al.* beschrieb, ist die Zellpenetration von tetrasulfonylierten Photosensibilisatoren aufgrund der daraus resultierenden Hydrophilie sehr eingeschränkt. Zudem verläuft ihr Aufnahmeweg über die Pinozytose.<sup>[187]</sup> Auch die Nanopartikel schienen in perinukleären Vesikeln der Zellen vorzuliegen, was ebenfalls für einen endozytotischen Aufnahmeweg spricht.

Dieses Ergebnis stimmt mit mehreren Studien überein, die ähnliche Nanopartikel untersuchten.<sup>[188,189]</sup> So zeigten Shi *et al.* einen unspezifischen endozytotischen Aufnahmeweg von  $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{-NP}$ <sup>[190]</sup> während Santelli *et al.* eine Mikropinozytose von  $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}\text{-NP}$  für wahrscheinlich halten<sup>[191]</sup>. Der genaue Aufnahmeweg der Gadolinium-basierten Nanopartikel wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, die Partikel scheinen die Aufnahme der Photosensibilisatoren jedoch zu verbessern.<sup>[146]</sup>

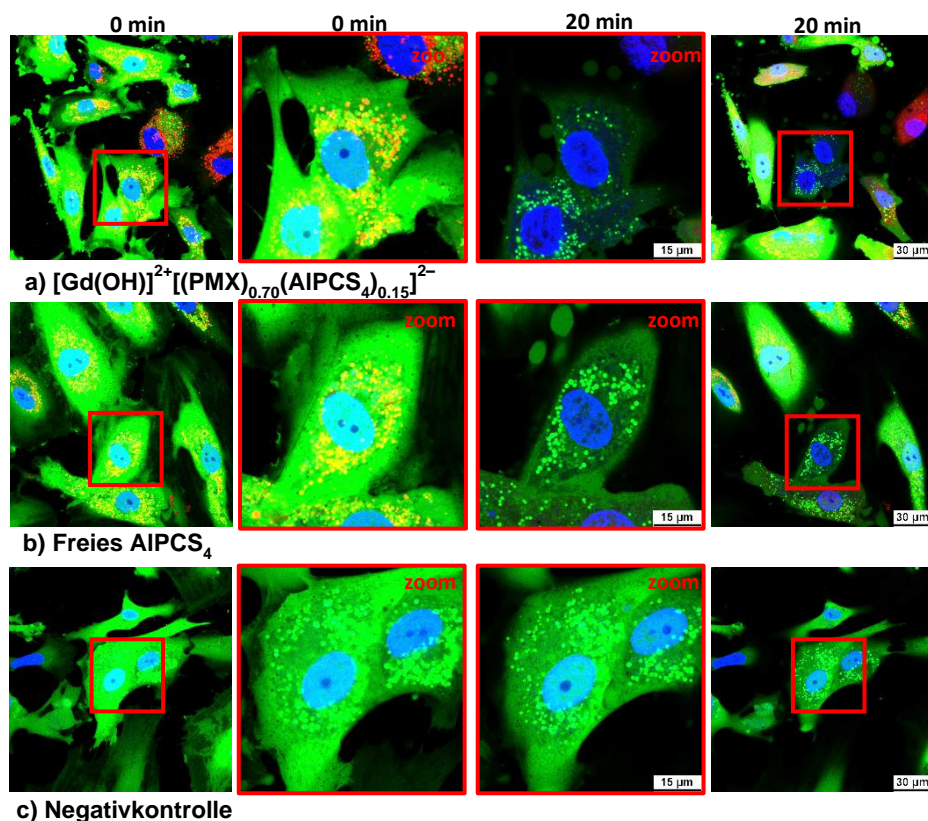


Abbildung 31: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von HUVEC-GFP-Zellen nach Inkubation mit (a)  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}$ -ION-NPs (50  $\mu\text{g/mL}$ ), und (b) freies  $\text{AIPCS}_4$  (15,5  $\mu\text{g/mL}$  für 24 h. Die Zellen wurden im Zoom 20 min lang bei 635 nm (für  $\text{AIPCS}_4$ ) bestrahlt. Nicht behandelte HUVEC-GFP-Zellen ( $\pm$  Bestrahlung) dienen als Negativkontrolle (c, f). Hoechst33342 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet ( $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}450 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind die überlagerten Bilder der Fluoreszenz-Aufnahmen von GFP ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}540 \text{ nm}$ ), Hoechst33342 und die ION-NPs ( $\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 650\text{-}750 \text{ nm}$  für  $\text{AIPCS}_4$ ). Maßstab: 15  $\mu\text{m}$  (Zoom) und 30  $\mu\text{m}$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.<sup>[146]</sup>

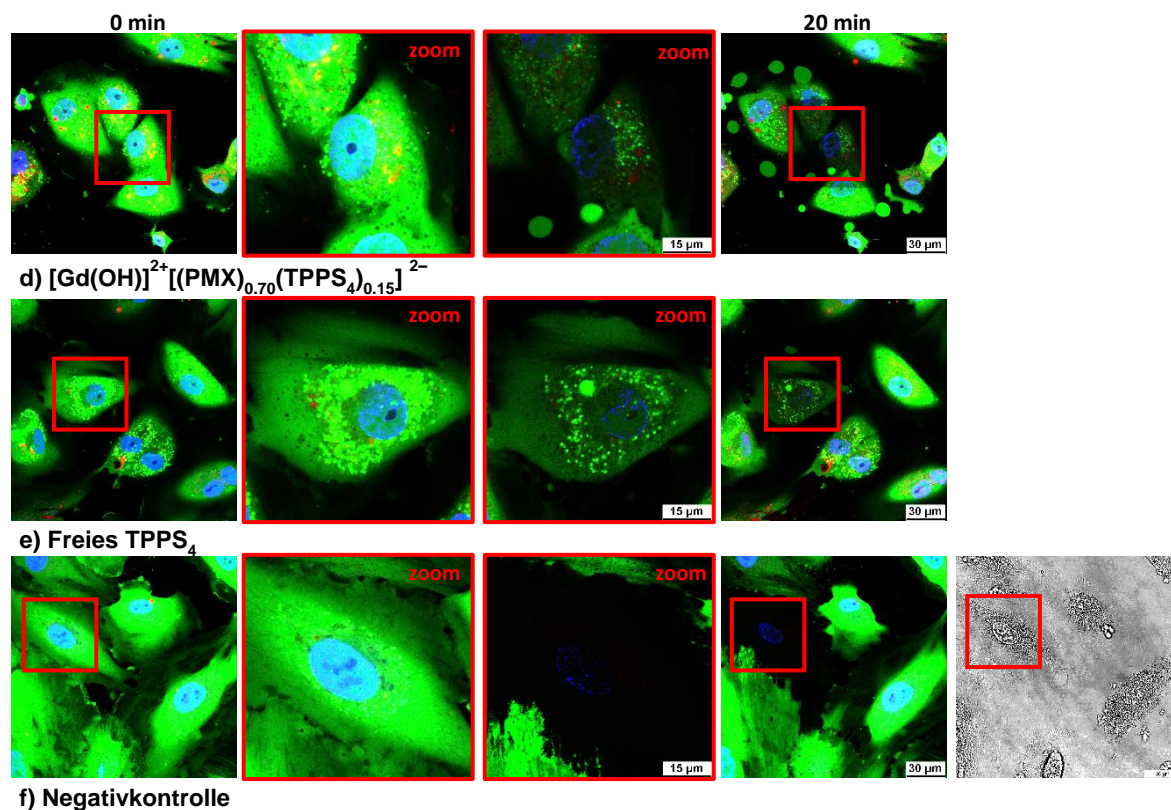


Abbildung 32: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von HUVEC-GFP-Zellen nach Inkubation mit (d)  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}$ -ION-NPs (50  $\mu\text{g/mL}$ ), und (e) freies  $\text{TPPS}_4$  (16,0  $\mu\text{g/mL}$ ) für 24 h. Die Zellen wurden im Zoom 20 min lang bei 532 nm (für  $\text{TPPS}_4$ ) bestrahlt. Nicht behandelte HUVEC-GFP-Zellen ( $\pm$  Bestrahlung) dienen als Negativkontrolle (c, f). Hoechst33342 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet ( $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}450 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind die überlagerten Bilder der Fluoreszenz-Aufnahmen von GFP ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}540 \text{ nm}$ ), Hoechst33342 und die ION-NPs ( $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$  für  $\text{TPPS}_4$ ). Maßstab: 15  $\mu\text{m}$  (Zoom) und 30  $\mu\text{m}$ . Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. <sup>[146]</sup>

### 3.2 Gelatine-basierte Nanogele (GNG)

Die Ergebnisse der bisher vorgestellten Gadolinium-basierten anorganisch-organischen Hybrid-Nanopartikel zeigen bereits großes Potential für den Einsatz als *Drug Delivery-System*. So können die Nanopartikel nachweislich die Aufnahme von organischen Wirkstoffen in Zellkulturen erhöhen und ermöglichen eine verstärkte Zytotoxizität durch die Möglichkeit einer Kombi-Therapie. Trotz ihrer Multimodalität besitzen sie jedoch noch keine Organ- oder Gewebe-Spezifität. Diese sollte durch die Anheftung eines gewebespezifischen Liganden bewirkt werden. Die Implementierung der Liganden ist hier jedoch nicht ganz einfach, so dass zur Testung von infrage kommenden gewebespezifischen Liganden, Nanocarrier auf Polymer Basis, sogenannten Nanogele, eingesetzt wurden, da diese leicht zu modifizieren sind.

Solche Nanogele (NG) bestehen aus dreidimensional vernetzten Polymernetzwerken im Nanomaßstab von 20 bis 250  $\mu\text{m}$ .<sup>[192]</sup> Sie können gleichzeitig die Eigenschaften von Hydrogelen und Nanopartikeln aufweisen.<sup>[193]</sup> So erlaubt ihre poröse Struktur die Einkapselung von hydrophoben oder hydrophilen Wirkstoffen, schützt diese vor dem Abbau und ermöglicht eine kontrollierte Freisetzung.<sup>[194]</sup> Zudem besitzen sie gute Quelleigenschaften was eine hohe Beladungskapazität im Vergleich zu festen Nanopartikeln wie z. B. Goldnanopartikel<sup>[195]</sup> oder Siliziumdioxid-Nanopartikel<sup>[196]</sup> ermöglicht. Im Vergleich zu physikalisch synthetisierten Nanogelen wie Liposomen<sup>[197]</sup> oder Mizellen<sup>[198]</sup> weisen chemisch vernetzte Nanogele eine verbesserte mechanische Stabilität unter physiologische Bedingungen auf. Ihre Oberfläche kann leicht durch Ligandenmodifikation variabel gestaltet werden, um die Wirkstoffe gezielt zu spezifischen Organen oder Geweben zu lenken. So werden nicht nur passive *Targeting*-Strategien durch den erweiterten Permeabilitäts- und Retentionseffekt (EPR-Effekt) unterstützt, sondern auch aktives *Targeting*, dass mittels Ligandenmodifikation ermöglicht wird. So ist auch die gezielte Abgabe durch Reaktionen auf externe Stimuli wie pH-Wert, Temperatur und Redoxbedingungen möglich. Dies macht Nanogel-basierte *Drug Delivery-Systems* (DDS) zu einer vielversprechenden Technologie in der Biomedizin.<sup>[26,192,199]</sup>

In diese Arbeit wurden Nanogele aus Hydrogelen synthetisiert, die auf thiol- und norbornenfunktionalisierter Gelatine basieren und über die Thiol-En-Click-Chemie polymerisiert werden können. Gelatine eignet sich hierbei besonders aufgrund ihrer guten Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und einer geringen Antigenität.<sup>[200]</sup> Sie wird aus der Hydrolyse von Kollagen gewonnen und kommt bereits in vielen biomedizinischen Bereichen wie Pharmazie und Kosmetik zum Einsatz.<sup>[26,199,201]</sup> Über einfache Modifikation können ihre mechanischen Eigenschaften verbessert und dadurch ihre Löslichkeit und Stabilität erhöht werden.<sup>[200,202]</sup>

### 3.2.1 Synthese von GelNB- und GelS-Hydrogelen

Die für die Nanogel verwendeten semi-synthetischen Hydrogele aus Norbornen- (GelNB) und Thiol-funktionalisierter (GelS) Gelatine werden durch die chemische Modifikation der primären Amine Lysin und Hydroxylysin (Lys und Hyl) von Gelatine Typ A synthetisiert, um photovernetzbare Einheiten entlang des Gelatine-Rückgrats zu ermöglichen. Die Synthese des Hydrogel-Vorläufers GelNB wurde wie in T. Göckler *et al.*<sup>[203]</sup> beschrieben durchgeführt

(Kapitel 5.2.1.2). Hierfür wurde NBCA (5-Norbornen-2-carboxylsäure) durch die Aktivierung mit EDC-HCl (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Chlorwasserstoff) und NHS (*N*-Hydroxysuccinimid), in einen Succinimidyl-Ester umgewandelt um anschließend die Reaktion zwischen den primären Aminen der Gelatine und dem Succinimidyl-Ester zu starten (Abbildung 34, A). Der Grad der Norbornensubstitution wurde durch die Menge an NBCA (0,3, 2, 10 Äquivalenten) gesteuert. In diesem Zusammenhang bezieht sich 1 Äquivalent (Äq.) auf die Anzahl der primären Aminogruppen in Gelatine, die hier 0,266 mmol Aminogruppen pro Gramm Gelatine entspricht. Der Prozentsatz umgewandelter Aminogruppen wurde über den Grad der Funktionalisierung (engl. *Degree of Functionalization*: DoF) angegeben. Dieser wurde über den TNBSA-Assay quantifiziert (Abbildung 34, C). Hierbei kann 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure, kurz TNBSA, mit primären Aminogruppen von Biomolekülen reagieren. Die dabei entstehenden Addukte weisen eine orangene Farbe auf, die kolorimetrisch bestimmt werden kann (Abbildung 33).

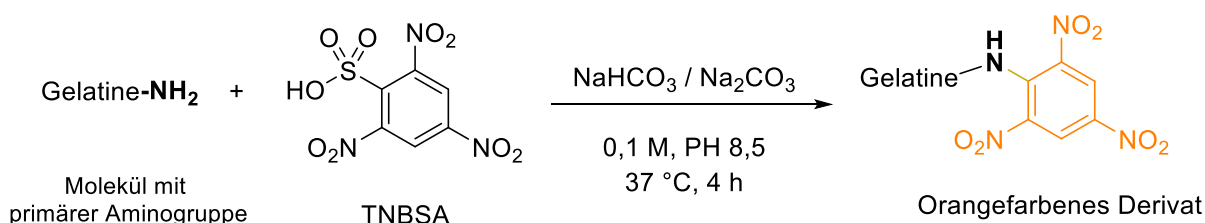


Abbildung 33: Reaktionsschema von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA) mit freien primären Aminen der Hydrogel-Vorstufen zum orangefarbenen Derivat.

Mit dieser bereits etablierten Methode kann eine schnelle qualitative und quantitative Bestimmung von primären Aminen durchgeführt werden.<sup>[204]</sup> Wie T. Göckler in seiner Dissertation bereits nachweisen konnte, führte der Einsatz von 0,3 Äq. NBCA hier zu einem GelNB *Low* mit geringer Norbornenfunktionalisierung (DoF:  $19 \pm 2\%$ ), 2 Äq. zu einem GelNB *Med* mit mittlerem Norbornenmodifikationsgrad (DoF:  $47 \pm 9\%$ ) und die Verwendung von 10 Äq. zu GelNB *High* mit hoher Norbornensubstitution (DoF:  $77 \pm 3\%$ ). Im Folgenden werden die Hydrogel-Vorstufen entsprechend diesen Äquivalenten als GelNB *Low*, *Med* und *High* definiert.<sup>[203,205]</sup> Der Syntheserfolg wurde zudem durch Nukleare-Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie) (Abbildung 34, B) nachgewiesen. Hierbei wird über die Wechselwirkung von Atomkernen mit einem Magnetfeld die chemische Struktur und die Umgebung von Molekülen bestimmt<sup>[206,207]</sup>. Die erfolgreiche GelNB-Synthese wurde so durch die Vinylprotonen von GelNB bei 6,27 ppm, 6,18 ppm und 5,9 ppm nachgewiesen (Abbildung 34, A Vinylprotonen a und b, B)), zudem kann beim Vergleich zum

$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Gelatine eine Abnahme des Protonensignals der Aminogruppen bei 3,20 ppm beobachtet werden (Abbildung 34, B), was ebenfalls für eine erfolgreiche Modifizierung der Gelatine-Aminogruppen spricht.

Die Synthese des zweiten Hydrogel-Vorläufers GelS wurde von Van Vlierberghe *et al.* beschrieben und erfolgte unter Verwendung des zyklischen Aminosäurederivats DL-N-Acetylhomocystein-Thiolacton (AHCT).<sup>[208]</sup> Hierfür reagierten die primären Aminogruppen der Gelatine mit AHCT unter der Zugabe von EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) (Abbildung 34, A). Letzteres wurde zugegeben, um zweiwertige Metalle in der Lösung zu chelatisieren, was die Oxidation von Sulfhydrylgruppen zu Disulfidbindungen verhindert<sup>[209]</sup>. Der Funktionalisierungsgrad von GelS wurde ebenfalls über den TNBSA-Assay ermittelt (Abbildung 34, C). Auch hier konnte durch eine Variierung des Thiolierungsreagenzes AHCT für GelS unterschiedliche DoF erhalten werden. So führte eine Verwendung von 1 Äq. AHCT zu einem GelS *Low* (DoF:  $8 \pm 3\%$ ) und 5 Äq. zu GelS *Medium* (DoF:  $32 \pm 5\%$ ). Im Folgenden werden die Hydrogel-Vorstufen entsprechend diesen Äquivalenten als GelS *Low* und *Med* definiert. GelS *High* konnte, wie T. Göckler bereits zeigte, durch eine Erhöhung des Thiolierungsreagenzes nicht erhalten werden. Dem liegt zugrunde, dass bereits eingebaute Thiole, bei hohen pH-Werten (pH 10), die für die Synthese benötigt werden, ebenfalls als Nucleophile fungieren und mit den restlichen Aminen der Gelatine um die Ringöffnung des AHCT's konkurrieren.<sup>[203,205]</sup> Der Erfolg der Reaktion konnte anschließend durch eine Signalerhöhung bei 2,08 ppm der Acetylprotonen vom gebundenen AHCT über  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 34, A) und B) Acetylprotonen (c)). Ebenfalls zeigt eine Abnahme des  $\text{NH}_2$ -Signals der primären Amine bei 3,20 ppm ihre erfolgreiche Modifikation (Abbildung 34, B). Im Vergleich zur Literatur wurden ähnlich hohe DoF für GelNB, jedoch etwa 40 % niedrigere DoF für GelS erhalten.<sup>[203,205]</sup>

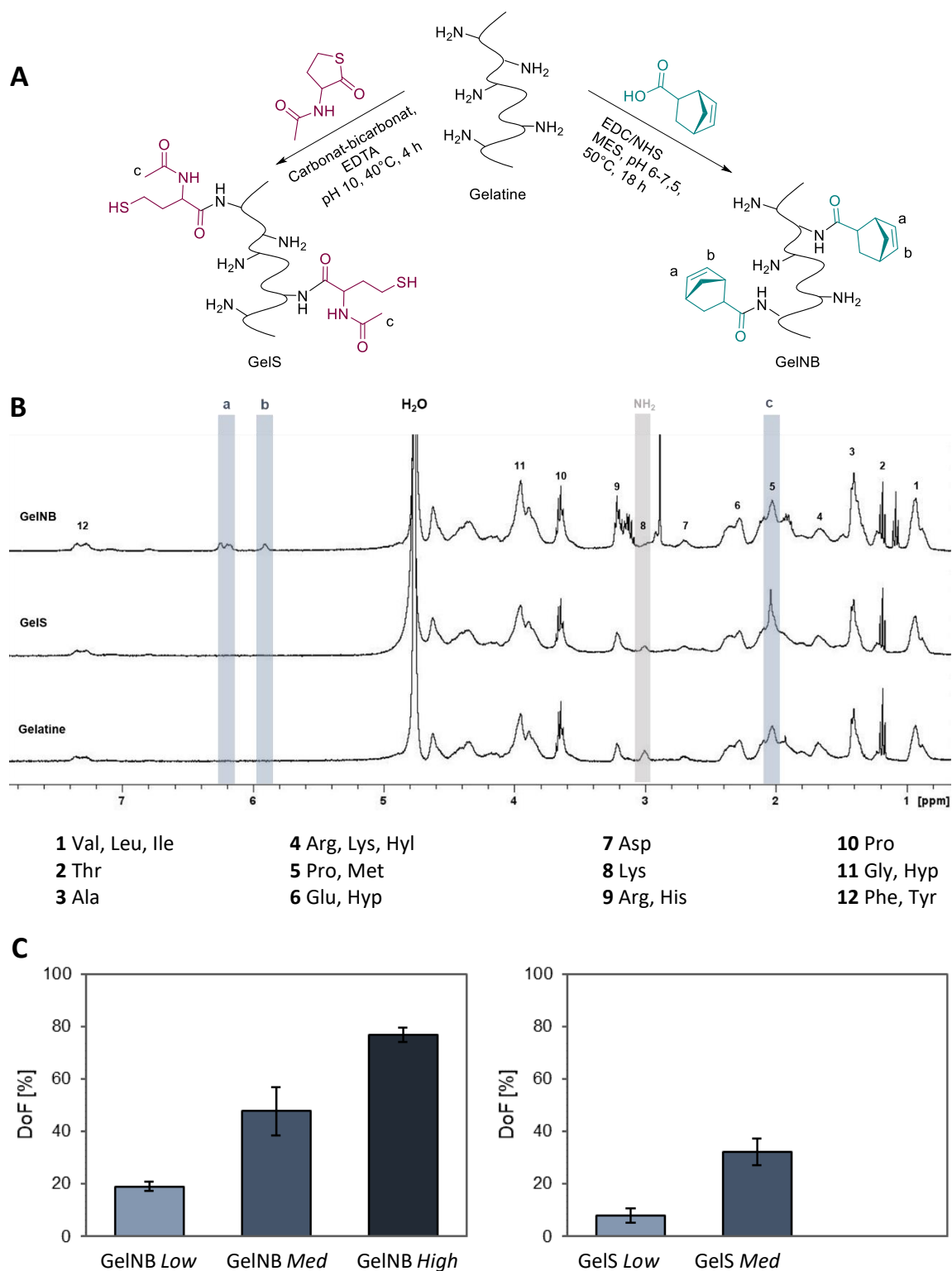


Abbildung 34: (A) Synthese von GelNB und GelS Hydrogel-Vorläufers aus Gelatine Typ A. (B)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (400 MHz, 315 K) von Gelatine, GelNB und GelS in  $\text{D}_2\text{O}$ . (C) Ermittelte Funktionalisierungsgrade (DoF) mittels TNBSA-Assay von GelNB und GelS. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

In der Hydrogel-Forschung spielt das Hydrogel GelMA eine große Rolle und wird meist als Goldstandard genutzt<sup>[210-213]</sup>, während das Hydrogel GelNB+GelS als neuartig gilt und noch kaum untersucht wurde.<sup>[214]</sup> Bei GelMA handelt es sich ebenfalls um Gelatine, deren primäre

Amine (Lys, Hyl) mittels Methacrylsäureanhydrid (MAA) modifiziert werden (Abbildung 35, A). Es existieren bereits erste Studien, die sich mit der Nanogelsynthese aus GelMA-Hydrogelen befassen.<sup>[26,199]</sup> Um die Ergebnisse mit den neuen Nanogelen dieser Arbeit vergleichen zu können, wurden ebenfalls Nanogele aus GelMA synthetisiert. Die Synthese des Hydrogel-Vorläufers GelMA verlief nach van den Bulcke *et al.*<sup>[215]</sup> (Kapitel 5.2.1.3). Der Funktionalisierungsgrad wurde während der Synthese über die Zugabe von MAA kontrolliert und anschließend mittels TNBSA-Assay untersucht.<sup>[205]</sup> Wie T. Göckler in seiner Arbeit bestätigen konnte, führte der Einsatz von 1 Äq. MAA zu einem GelMA *Low* mit niedrigem Funktionalisierungsgrad (DoF:  $20 \pm 8\%$ ), 8 Äq. zu einem GelMA *Med* mit mittlerem Funktionalisierungsgrad (DoF:  $44 \pm 4\%$ ) und die Verwendung von 20 Äq. zu GelMA *High* mit hohem Funktionalisierungsgrad (DoF:  $75 \pm 8\%$ ). Nahezu identische DoF-Werte, wie sie in der Literatur zu finden sind konnten auch in dieser Arbeit für GelMA erzielt werden.<sup>[205]</sup>

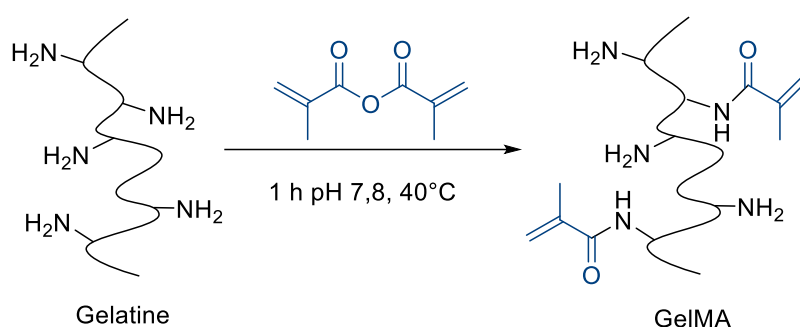


Abbildung 35: Synthese von GelMA aus Gelatine durch Modifikation mit Methacrylsäureanhydrid.

Das semi-synthetische Hydrogel GelMA kann über Photopolymerisation nicht nur intermolekulare Vernetzungen zu anderen Gelatinemolekülen sondern auch intermolekulare Vernetzungen innerhalb eines Gelatinemoleküls bilden, so dass eine heterogene Porengröße im Hydrogel entstehen kann, die aus Bausteinen einer einzigen Gelatineketten bestehen (Abbildung 40). Da dies die Größe der später hergestellten Nanogele beeinflussen könnte, wurde zur besseren Charakterisierung ein Hydrogel-Vorläufer erstellt, das sowohl mit Norbornen als auch mit Thiolen funktionalisiert wurde. Hierbei wurde bereits synthetisiertes GelNB mittels AHCT zu GelNB-S weiter modifiziert (Abbildung 36, A). Die Synthese und Charakterisierung des GelNB-S Hydrogelpolymers fand in Kollaboration mit M.Sc. Julia Rieger des Arbeitskreises von Prof. Dr. Ute Schepers (Institut für funktionelle Grenzflächen, KIT) statt. Der Syntheseerfolg wurde durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie über die Vinylprotonen des GelNB mit den Signalen bei 6,27 ppm, 6,18 ppm und 5,9 ppm und den Acetylprotonen vom Gels mit der Signalzunahme bei 2,08 ppm nachgewiesen. Zudem zeigte die Abnahme des  $\text{NH}_2$ -Signales

der freien Aminogruppen bei 3,20 ppm deutlich einen höheren Funktionalisierungsgrad des Hydrogel-Vorläufers GelNB-S (Abbildung 36, B).

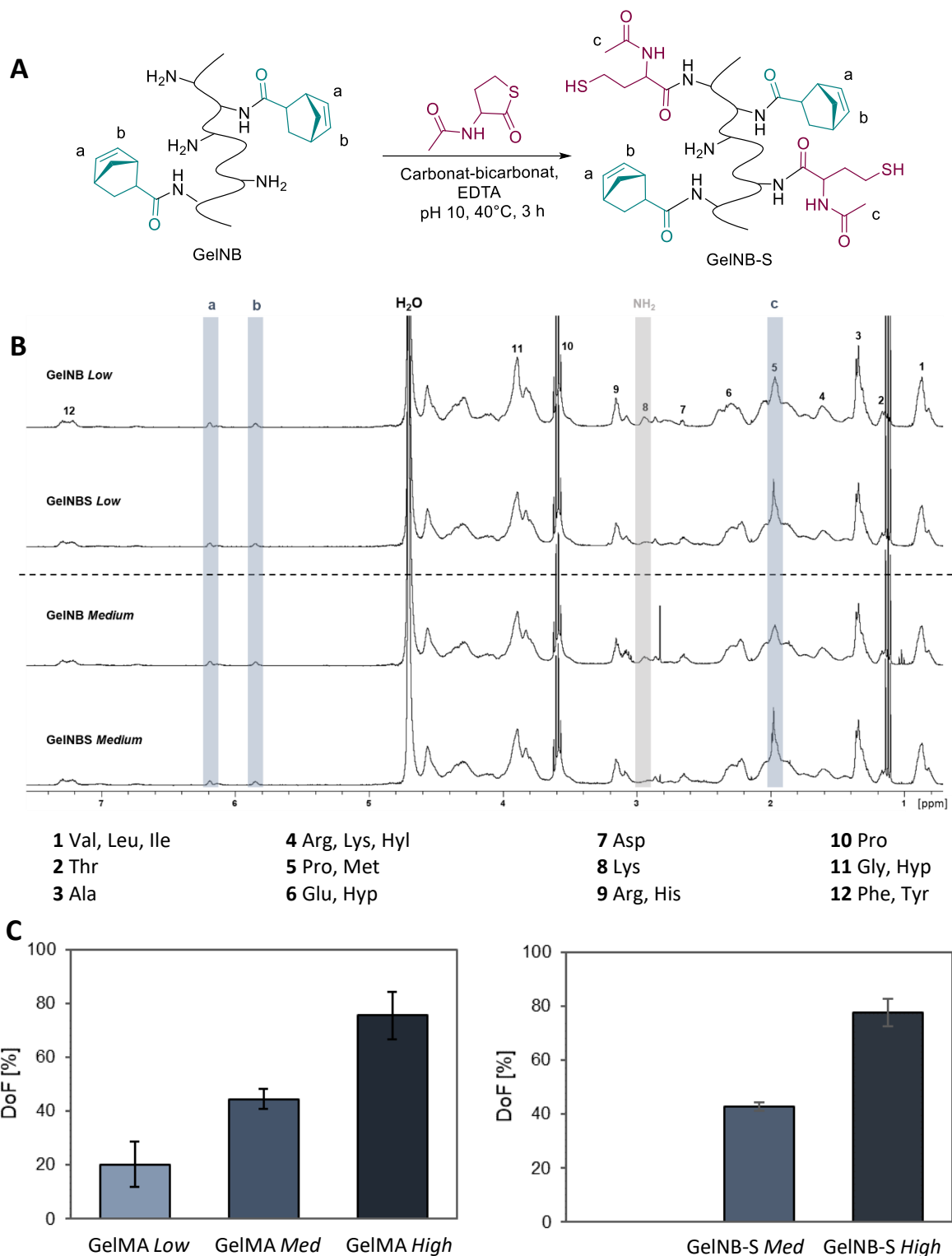


Abbildung 36: (A) Synthese von GelNB-S Hydrogel-Vorläufern aus Gelatine Typ A. (B)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (400 MHz, 315 K) von GelNB Low und Med, sowie GelNB-S Low und Med in  $\text{D}_2\text{O}$ . (C) Ermittelte Funktionalisierungsgrade (DoF) mittels TNBSA-Assay von GelMA und GelNB-S. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Des Weiteren wurde der Funktionalisierungsgrad über den TNBSA-Assay untersucht (Abbildung 36, C). Da das GelNB-S in zwei Schritten modifiziert wurde, konnte für die Synthese nur GelNB *Low* und *Med* verwendet werden, da bei GelNB *High* nicht mehr ausreichend freie Aminogruppen zur Verfügung stehen. Über die Synthese konnten somit die Hydrogel-Vorläufer GelNB-S *Med* mit mittlerem Funktionalisierungsgrad (DoF:  $42,7 \pm 1 \%$ ) und zu GelNB-S *High* mit einem hohen Funktionalisierungsgrad (DoF:  $78 \pm 5 \%$ ) erhalten werden.

### 3.2.2 Synthese Gelatine-basierter Nanogelee (GNG)

Nach erfolgreicher Hydrogel-Vorläufer Charakterisierung wurde die Nanogel Synthese nach Kim *et al.* <sup>[199]</sup> (Kapitel 5.2.1.10) durchgeführt (Abbildung 37). Hierfür wurde die Mikroemulsionsmethode eingesetzt, um Nanogelee mit geringer Größenverteilung zu erhalten. Dabei gilt es zunächst eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) aus n-Octan und gelöstem Hydrogel-Vorläufer zu erzeugen, die über ein Tensid, einem amphiphilen Tween 80 und Span 80 Gemisch, stabilisiert wird. Um daraus eine Mikroemulsion herzustellen, wird die Emulsion über Ultraschall emulgiert. Dadurch wird ein Mehrkomponentensystem erzeugt, das thermodynamisch stabil, isotrop und optisch transparent ist. Die Transparenz ist auf die Partikelgröße von etwa 100 nm zurückzuführen, da Partikel dieser Größe kaum das Licht streuen und somit nicht sichtbar sind.<sup>[26,199,216]</sup>

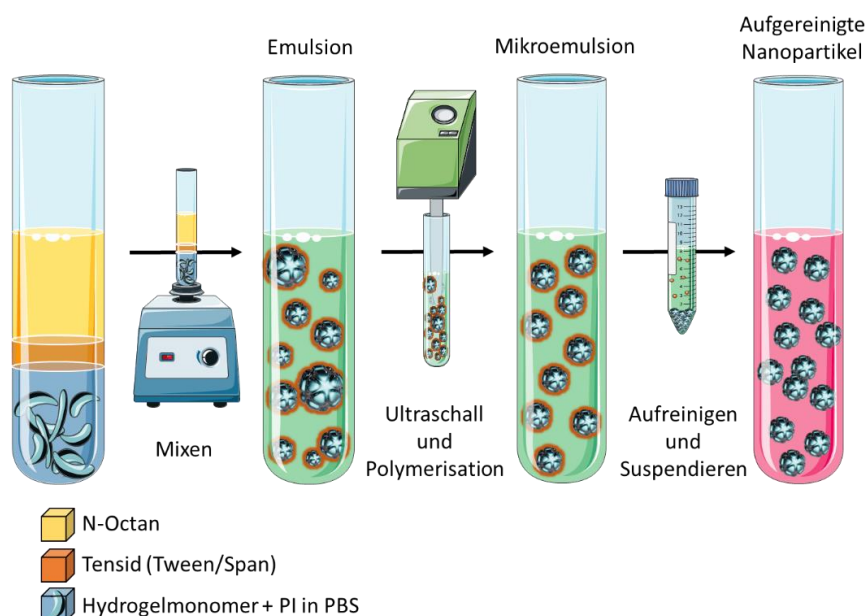


Abbildung 37: Schematische Darstellung des Synthesewegs von Gelatine-basierten Nanogelen (GNG). Wässrige und organische Phase werden zusammen mit einem Tensid gemixt, um eine Emulsion zu erzeugen die durch Ultraschall zu einer Mikroemulsion verfeinert wird. Danach können die Partikel mittel UV-Licht (320 – 500 nm) ausgehärtet werden. Die fertigen Nanogelee werden anschließend aufgereinigt und in wässriger Lösung suspendiert.

Die Photopolymerisation der Nanogele wurde anschließend über eine UV-Belichtung mit Licht des Wellenlängenbereichs von 320 bis 500 nm ausgelöst, um ihre Form und Größe zu konservieren (Abbildung 38, Abbildung 39). Hierbei diente der Photoinitiator, LAP (Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat) als Polymerisationsstarter, der die Polymerisation durch seinen radikalischen Zerfall initiiert (Abbildung 40).<sup>[217]</sup>

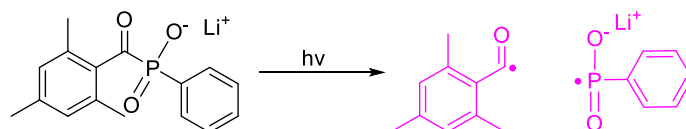


Abbildung 38: Radikalbildung aus Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) durch eine Belichtung mit 365-410 nm.

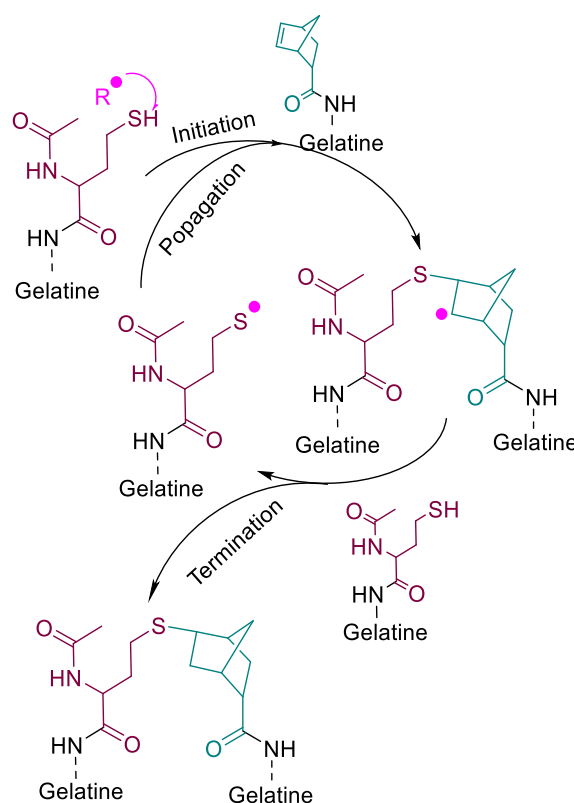


Abbildung 39: Photopolymerisation der Hydrogel-Vorläufer GelNB (blau) mit GelS (rot) zum polymerisierten Hydrogel. Zu sehen ist das über Thiol-En-Click-Chemie ausgelöste Stufenwachstum des Polymers.

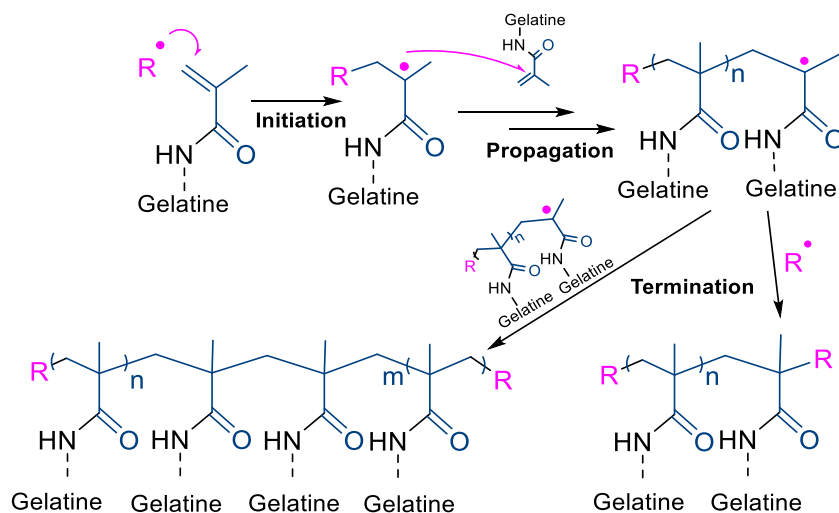


Abbildung 40: Photopolymerisation des Hydrogel-Vorläufers GelMA zum polymerisierten Hydrogel über Initiation, Propagation über Kettenwachstum zur Termination.

Nach anschließender Aufreinigung der polymerisierten Nanogele, wurden diese in  $1\times\text{DPBS}^-$  gelöst und charakterisiert. Um die Größe der Nanogele und ihren Polydispersitätsindex (PDI), also ihre einheitliche Größenverteilung zu untersuchen, wurden diese Parameter über die dynamische Lichtstreuung (DLS) analysiert (Abbildung 37). Die Messung basiert auf der Streuung von Laserstrahlen an sehr kleine Teilchen ( $< 1\ \mu\text{m}$ ). Da sich kleinere Partikel durch die Brownsche Molekularbewegung in Lösung schneller bewegen als große, kann durch die Korrelation der Streuintensität in Abhängigkeit der Zeit, der Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Über die Stokes-Einstein-Beziehung erhält man dann den hydrodynamischen Partikeldurchmesser.<sup>[218,219]</sup> Anhand des Polydispersitätsindex wird zudem die Größenverteilung der Lösung bestimmt. Kleine Werte unter 0,1 zeichnen sich besonders als monodisperse Lösungen aus. Werte unter 0,3 zählen als moderat polydispers und sind für die Eignung als *Nanocarrier* weitestgehend akzeptiert.<sup>[220]</sup>

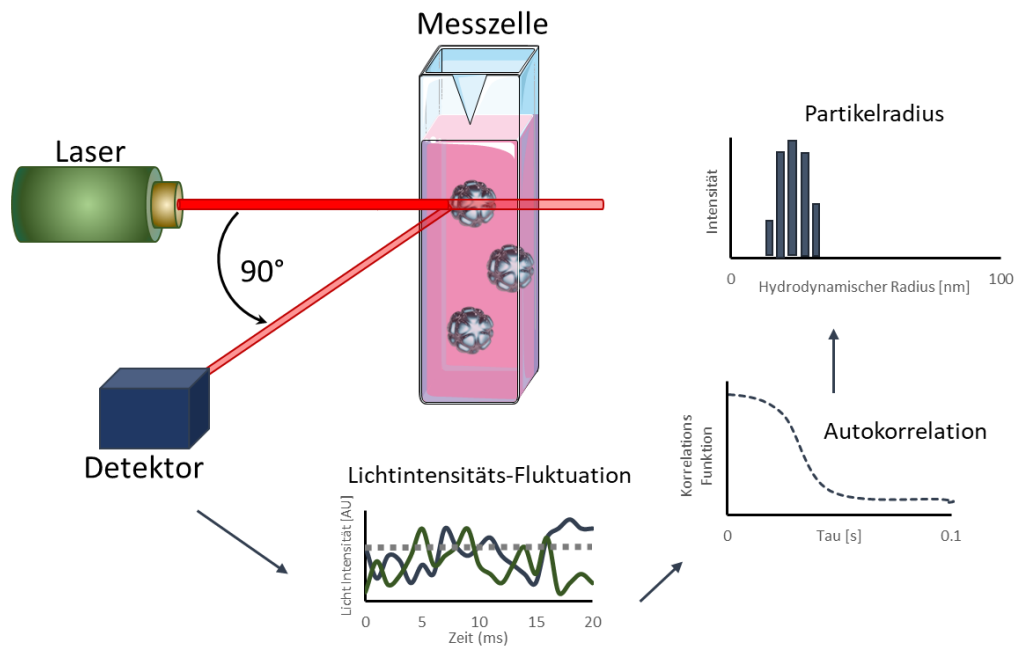


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Dynamischen Lichtstreuung. Dabei durchleuchtet ein Laserstrahl eine Messzelle mit Partikeln, die das Licht streuen. Die vom Detektor im 90° Winkel gemessene Intensität des gestreuten Lichts fluktuiert durch die Bewegung der Partikel. Diese Fluktuationen werden per Autokorrelationsfunktion analysiert, um die Diffusionsgeschwindigkeit und daraus den Partikelradius zu berechnen.

Da durch die Verwendung von Nanopartikeln der zuvor beschriebene EPR-Effekt (siehe Kapitel 1.3.1) ausgenutzt werden soll, gilt es Nanogele zu generieren, die in der Größenordnung von 50 - 200 nm liegen.<sup>[220]</sup> Somit können sie die Fenestrierungen der Epithelschicht, die sich in der Nähe von Tumoren bilden und in der Größenordnung von 20 – 200 nm liegen,<sup>[221]</sup> leicht durchdringen.<sup>[222]</sup> Um dies zu erreichen, wurden zunächst Nanogele aus den zuvor synthetisierten Hydrogel-Vorläufern hergestellt, um die daraus resultierende Größe zu vergleichen. Hierfür wurden ebenfalls die Hydrogel-Vorläufer GelNB und GelS nicht miteinander, sondern mit sich selbst über einen *Crosslinker* polymerisiert. Für GelNB wurde hierfür der *Crosslinker* DTT (Dithiothreitol) verwendet, während GelS über PEGDA (Polyethylene Glykol Diacrylat) vernetzt wurde. Alle Nanogele wurden aus 5 % Hydrogelen mit mittlerem DoF hergestellt und die resultierenden Nanogel-Durchmesser über DLS analysiert. Beim Vergleich der Größe der unterschiedlichen Nanogele fiel auf, dass sich der hydrodynamische Durchmesser der Nanogele aus GelMA, GelNB + GelS und GelNB-S kaum voneinander unterscheiden (Abbildung 42). Ihre Durchmesser liegen zwischen 150 und 200 nm und somit im optimalen Bereich für den Wirkstofftransport. Die einzelnen Hydrogel-Vorläufer GelNB und GelS hingegen, die mittels *Crosslinker* verknüpft wurden, zeigten nicht

nur einen hohen PDI von  $> 0,4$ , sondern wiesen auch einen zu großen Durchmesser von um die 290 nm für GelNB und 616 nm für GelS auf. Diese Art von Hydrogel eignet sich somit nicht als *Nanocarrier* und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Die Hydrogele GelMA, GelNB + Gels und GelNB-S zeigten hingegen PDI-Werte um die 0,2, was für eine einheitliche Größenverteilung der Lösungen spricht und somit auch für einen Syntheserfolg. Die Parameter des GelMA-basierten Nanogels entsprechen zudem den Literaturwerten,<sup>[26,192,223]</sup> wodurch der von Kim *et. al.*<sup>[199]</sup> beschriebene Syntheseweg auf die neuen Nanogele aus GelNB + GelS und GelNB-S übertragen werden konnte. Da sich das Hydrogel GelNB + GelS kaum von dem des GelNB-S unterschied, wurden ein Großteil der Untersuchungen nur mit GelNB + GelS durchgeführt. Das bereits etablierte GelMA Hydrogel wurde weiterhin als Referenz mitbetrachtet.

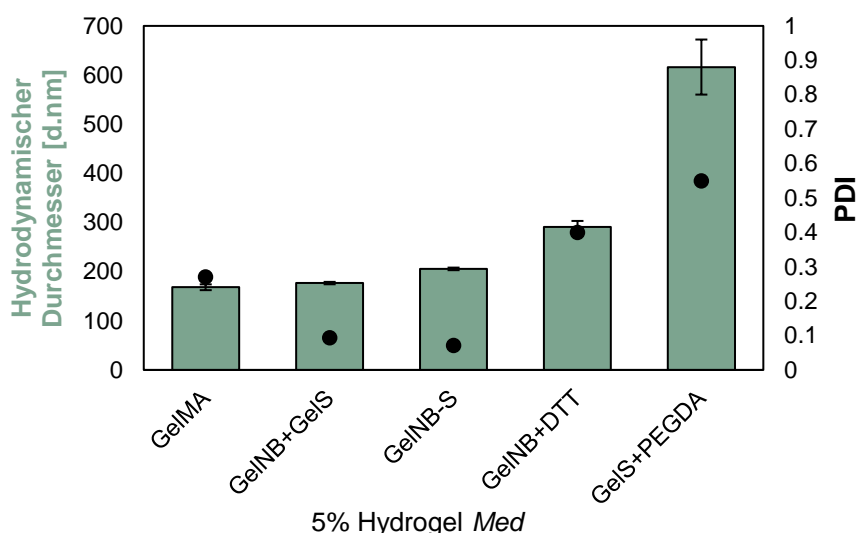


Abbildung 42: DLS-Messung des hydrodynamischen Durchmessers (Balken) und des PDIs (Punkte) von Nanogelen aus verschiedenen Hydrogel-Vorläufern. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

### 3.2.3 GNG-Synthesenachweis über FTIR-Spektroskopie

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Mikroemulsionsmethode, die über eine Ultraschall Behandlung der Lösung erzeugt wird, wirken sowohl hohe Temperaturen als auch mechanische Kräfte auf die modifizierte Gelatine. Das Protein Gelatine besitzt ein Rückgrat aus verknüpften Aminosäuren, die die langen Proteinketten bilden. Diese Proteinketten können durch thermische<sup>[224]</sup>, chemische<sup>[225]</sup> oder mechanische<sup>[226]</sup> Einwirkungen denaturiert werden. Mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) sollte nun untersucht werden, ob die modifizierte Gelatine in den fertig synthetisierten Nanogelen

weitestgehend intakt bleibt. Dabei werden durch Bestrahlung der Moleküle mit Infrarotstrahlung bestimmte chemische Bindungen angeregt und zum Schwingen gebracht. Die Streuung und Absorption der für diese Bindungen charakteristischen Schwingungen lässt dann auf die Zusammensetzung, Struktur und Funktionalität der Probe schließen.<sup>[227]</sup> Hierfür wurden FTIR-Spektren der reinen Gelatine mit denen der Hydrogel-Vorläufern (GelMA, GelNB und GelS) und den polymerisierten Nanogelen ( $\text{GNG}_{\text{GelMA}}$  und  $\text{GNG}_{\text{GelNB} + \text{GelS}}$ ) verglichen (Abbildung 46 und Abbildung 47). Das Ergebnis der FTIR-Spektren von GelMA und  $\text{GNG}_{\text{GelMA}}$  spiegeln die charakteristischen funktionellen Gruppen der Gelatine wider, sowie die an den Lysinrest der Gelatine gebundenen Methacrylatgruppen. So ist das Signal bei  $3424\text{ cm}^{-1}$  auf das Vorhandensein einer funktionellen Aminogruppe mit N-H-Streckung zurückzuführen (Abbildung 46, Amid A, Abbildung 44). Die Signale bei  $2924\text{ cm}^{-1}$  (C-H-Streckung von Alkenen) und  $2853\text{ cm}^{-1}$  (C-H-Streckung von Alkanen) weisen zudem auf das Vorhandensein von funktionellen Gelatine- und Methacrylatgruppen im Bereich von  $2500$  bis  $3500\text{ cm}^{-1}$  hin (Abbildung 46, Amid II, CH und  $\text{CH}_2$ , Abbildung 45). Die Bildung neuer Signale bei  $2360\text{ cm}^{-1}$  und  $2342\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von GelMA und vom  $\text{GNG}_{\text{GelMA}}$  sind auf die Bildung von  $-\text{C}=\text{O}_2$  im asymmetrischen Streckungsmodus von Methacrylsäure zurückgeführt (Abbildung 43) und das Signal bei  $1646\text{ cm}^{-1}$  weist auf das Vorhandensein der Amid-I-Bande hin, die eine  $\text{C}=\text{O}$ -Streckung darstellt (Abbildung 45).<sup>[227-232]</sup> In den Spektren von GelNB, GelS und  $\text{GNG}_{\text{GelNB} + \text{GelS}}$  finden sich ebenfalls die gleichen charakteristischen Signale der Gelatine wieder. Der Nachweis der funktionellen Amidbindungen des Gelatine-Rückgrates im Nanogel, weisen auf die erfolgreiche Synthese der Nanogelee über die funktionalisierte Gelatine hin.<sup>[233]</sup> Die Verwendung des Ultraschalls wirkt somit nicht beeinträchtigend auf die modifizierte Gelatine und kann ohne Bedenken auch für Nanogelee aus GelNB + GelS verwendet werden.

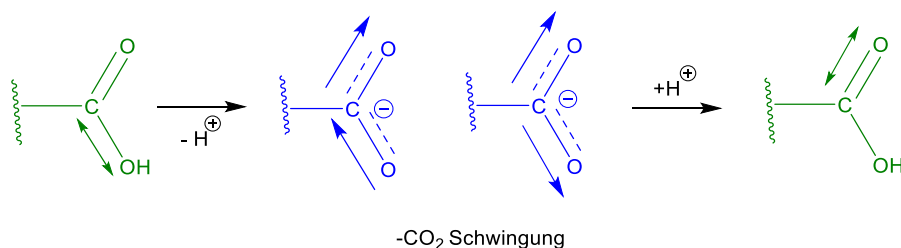


Abbildung 43: Schematische Darstellung der IR-aktiven Schwingungen. Asymmetrischer Streckmodus von -C-O<sub>2</sub> Bindungen mit Signal um die 2360 und 2342 cm<sup>-1</sup>.

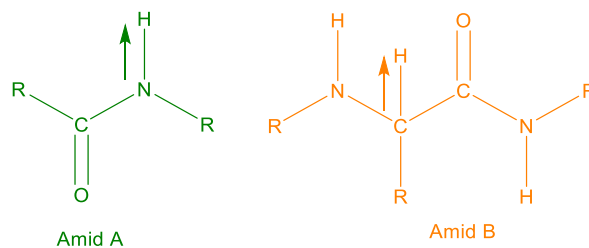


Abbildung 44: Schematische Darstellung der IR-aktiven Schwingungen von Peptiden. Typisches N-H-Streckungsschwingungs Signal um 3300 - 3500 cm<sup>-1</sup> der Peptidbindung (Amid A), sowie die Streckung der C-H-Bindung mit Signal um 2924 cm<sup>-1</sup> (Amid B).

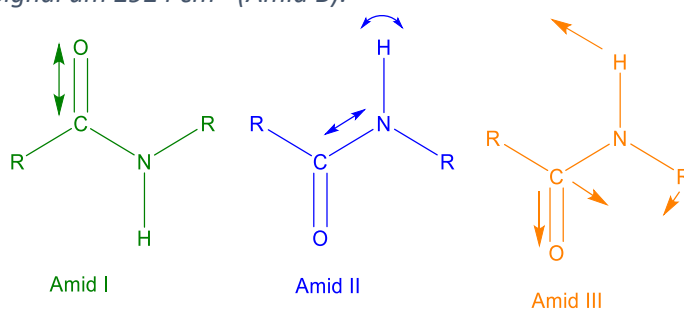


Abbildung 45: Schematische Darstellung der IR-aktiven Schwingungen von Peptiden. C=O-Streckung mit Signal um 1700 – 1600 cm<sup>-1</sup> (Amid I). N-H-Beugung mit Signal bei 1580 – 1480 cm<sup>-1</sup> (Amid II) und C-N-Asymmetrische-Streckung und N-H-Beugung mit Signal bei 1300 – 1230 cm<sup>-1</sup> (Amid III).

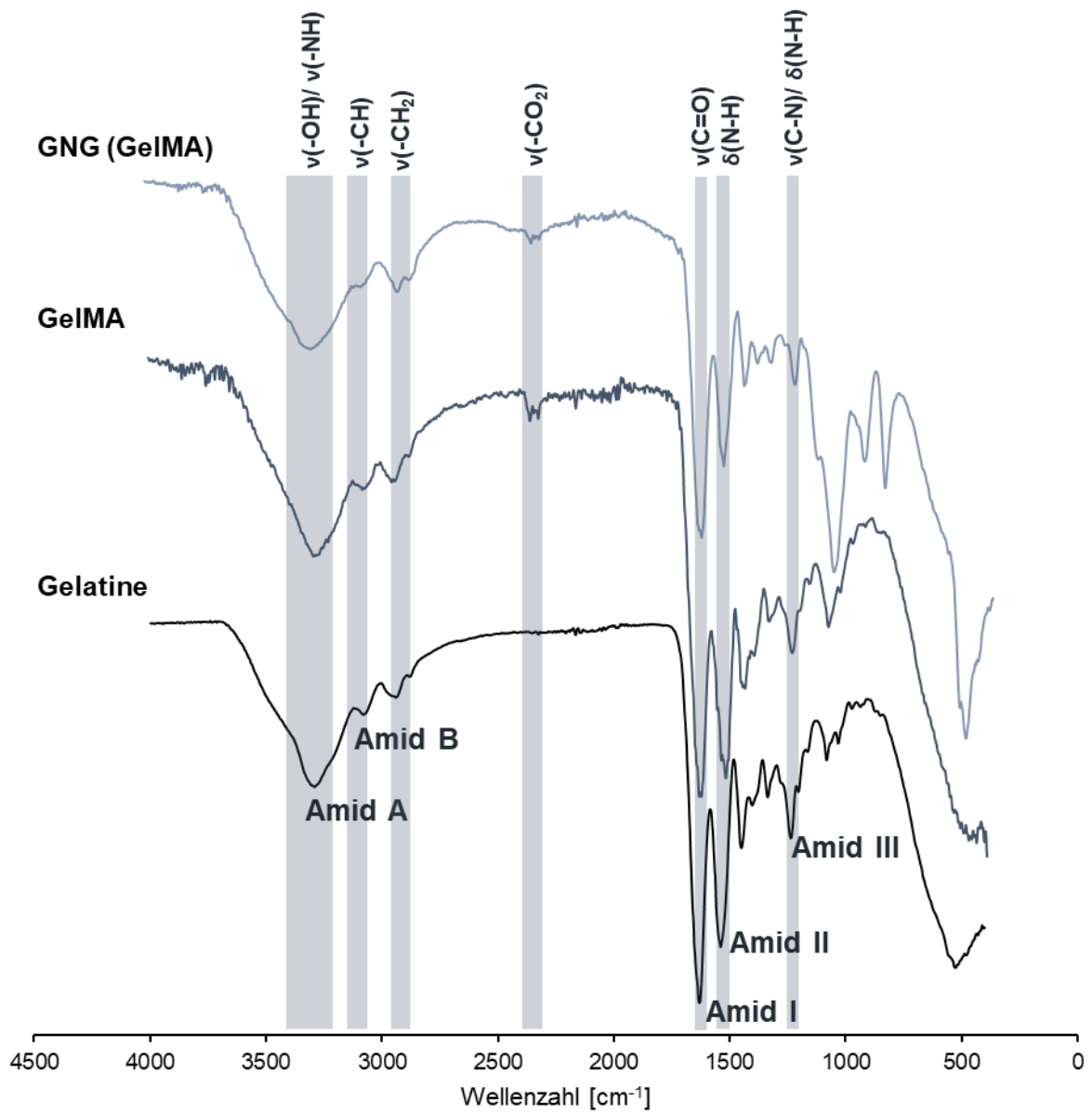


Abbildung 46: FTIR-Spektren von Gelatine, GelMA und dem GelMA-basierten Nanogel GNG<sub>GelMA</sub>.

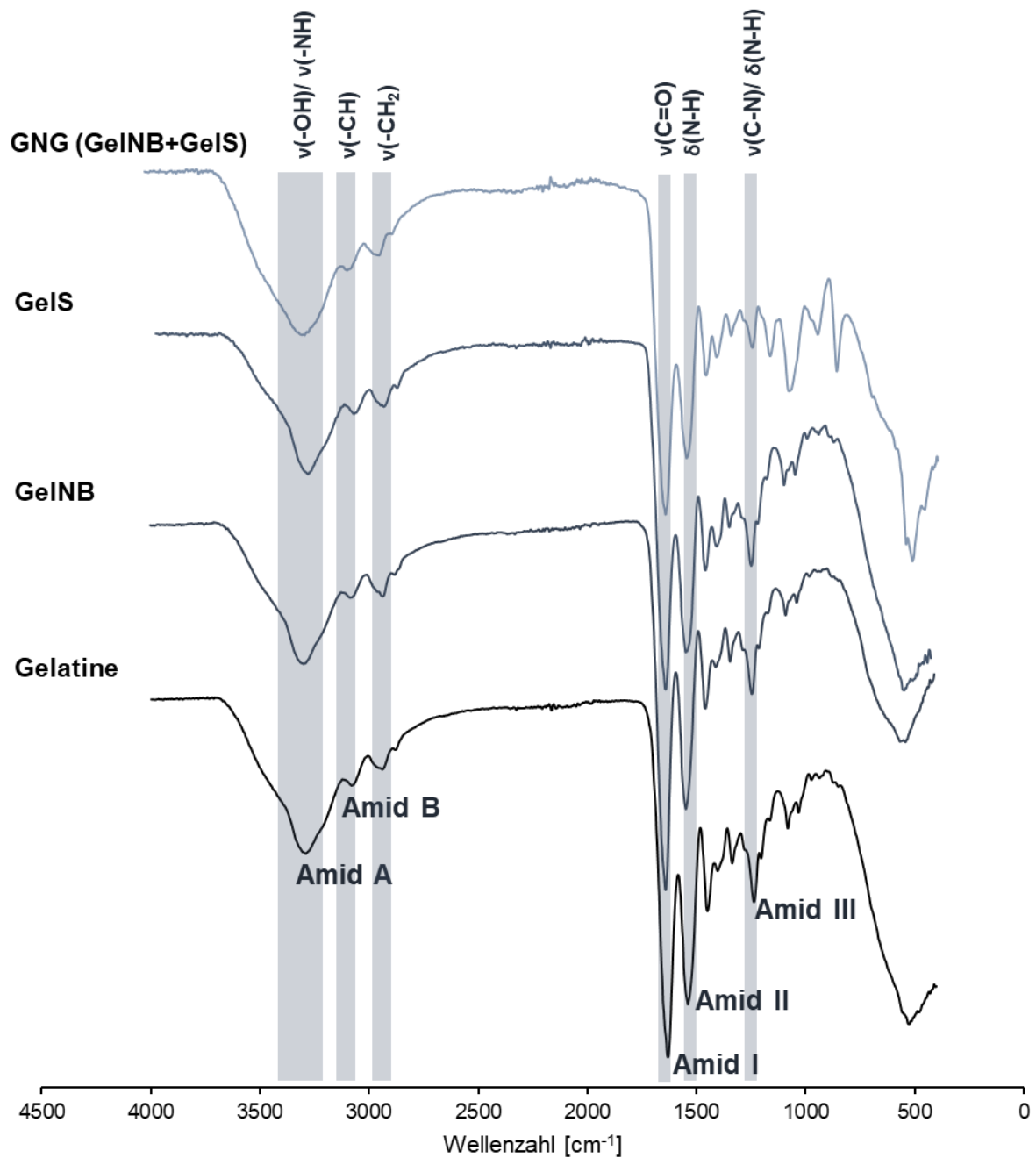


Abbildung 47: FTIR-Spektren von Gelatine, GelNB, GelS und dem Hydrogel GelNB + GelS-basierten Nanogel  $\text{GNG}_{\text{GelNB} + \text{GelS}}$ .

### 3.2.4 Charakterisierung und Beeinflussung der Nanogel Größe

Die Größe der Nanogele spielt bei ihrer Beladung und ihrem Transport eine große Rolle. Da sie aus Hydrogelen bestehen wird ihre Größe zudem maßgeblich von ihrer Quellungskapazität beeinflusst. Um zu untersuchen, wie sehr die Größe der Nanogele manipuliert werden kann

wurden einige Parameter bei der Nanogelsynthese verändert, um die Auswirkung auf ihre Größenverteilung zu beobachten.

### 3.2.5 Auswirkung variabler Hydrogel-Konzentration auf die Nanogel Größe

Zunächst wurde die Konzentration der Hydrogel-Vorläuferlösungen variiert. Hierfür wurden Nanogele aus unterschiedlichen Hydrogel-Konzentrationen (2,5 % und 5 % GelNB + Gels oder 4 %, 5 %, 8 % und 10 % GelMA) mit mittlerem Funktionalisierungsgrad synthetisiert. Die mittels DLS erhaltenen Ergebnisse der daraus synthetisierten Nanogele zeigten deutlich, dass Nanogele aus niedrigerer Hydrogel-Konzentration einen kleineren hydrodynamischen Durchmesser aufweisen, als diejenigen mit einer hohen Konzentration (Abbildung 48). Zudem kann festgestellt werden, dass bei der Synthese von Nanogelen aus GelNB + Gels Hydrogel-Vorläufern, deutlich niedrigere Konzentrationen verwendet werden kann, um trotzdem stabile Partikel mit akzeptablem PDI von unter 0,3 zu erhalten. Während die Nanogel aus GelMA bei kleineren Hydrogel-Konzentrationen instabiler wurden, was an dessen PDI von  $> 0,5$  deutlich zu erkennen ist. Im Gegensatz hierzu konnten keine Nanogele aus höher prozentigen ( $> 5\%$ ) GelNB + Gels Hydrogelen erhalten werden, da sich hierbei keine Mikroemulsion bildet bzw. der Hydrogel-Vorläufer Gels sehr schlecht in hohen Konzentrationen löslich ist.

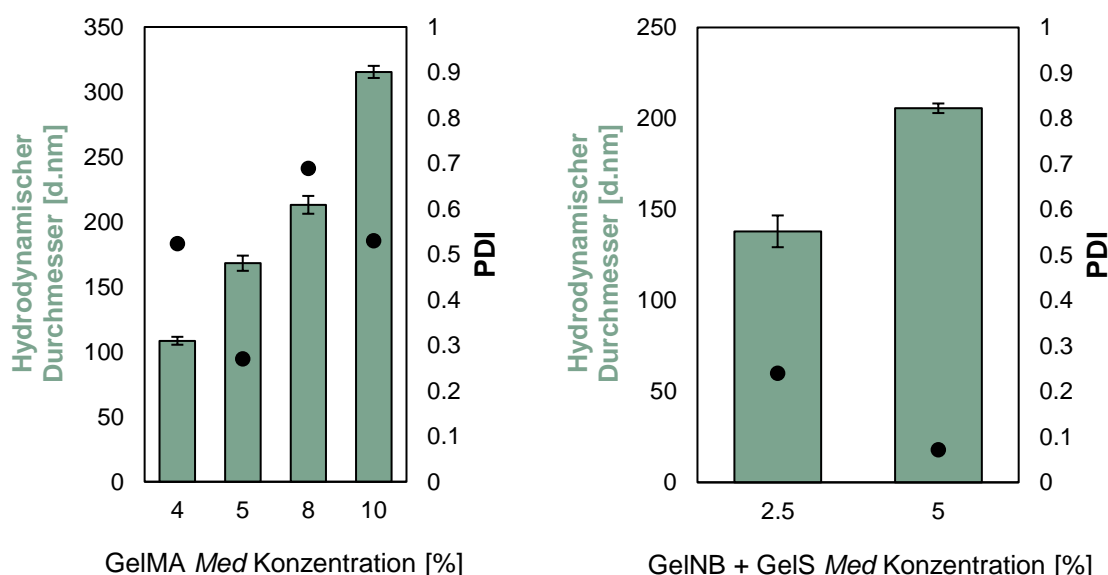


Abbildung 48: DLS-Messung des hydrodynamischen Durchmessers (Balken) und des PDIs (Punkte) von Nanogelen aus Hydrogel-Vorläufern mittleren Funktionalisierungsgrades unterschiedlicher Konzentration. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

### 3.2.6 Variierung der Nanogelgröße über den Funktionalisierungsgrad der Hydrogele

Da die Größe der Nanogele über die Konzentration der verwendeten Hydrogele beeinflusst werden kann, war es anschließend wichtig herauszufinden, ob auch der DoF der Hydrogel-Vorläufer die Größe der Partikel beeinflusst. Hierfür wurden Nanogele aus den 5 %igen Hydrogel-Vorläufern GelMA und GelNB + GelS mit unterschiedlichen DoF (*Low*, *Med* und *High*) synthetisiert und ihre Größen mittels DLS verglichen. Da wie zuvor beschrieben kein GelS *High* synthetisiert werden konnte, wird das Hydrogel GelNB + GelS *High* über das Mischungsverhältnis von GelNB *High* und GelS *Med* erzeugt. Die Zusammensetzung für die GelNB + GelS Hydrogele sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Hydrogel Mischungsverhältnis für GelNB + GelS

Hydrogel Bezeichnung	GelNB DoF	GelS DoF
<i>Low</i>	50 % <i>Low</i>	50 % <i>Low</i>
<i>Med</i>	50 % <i>Med</i>	50 % <i>Med</i>
<i>High</i>	40 % <i>High</i>	60 % <i>Med</i>

Die DLS-Ergebnisse der Nanogele mit unterschiedlichem Funktionalisierungsgrad zeigten eine abnehmende hydrodynamische Größe mit steigendem DoF (Abbildung 49). Auch hier zeigte das Hydrogel aus den Hydrogel-Vorläufer GelNB + GelS mit einem Durchmesser von 254 nm einen deutlichen Vorteil der Größe und Stabilität der Nanopartikel mit niedrigem Funktionalisierungsgrad (DoF: *Low*) gegenüber den GelMA-basierten Nanogelen mit einem Durchmesser von 420 nm. Bei einer Verwendung von niedrigeren Hydrogel-Konzentrationen oder niedrigem DoF kann die Stufenpolymerisation von GelNB + GelS der Kettenpolymerisation von GelMA überlegen sein, da diese in diesem Fall über die Click-Chemie besonders schnell abläuft und zudem an mehreren Stellen des Hydrogels gleichzeitig stattfinden kann und so für eine einheitlichere Verknüpfung sorgt.<sup>[234,235]</sup> So zeigten T. Göckler *et al.*<sup>[203]</sup> bereits, dass sich GelNB + GelS Hydrogele viel schneller aushärten lassen als das Standardhydrogel GelMA.<sup>[236]</sup>

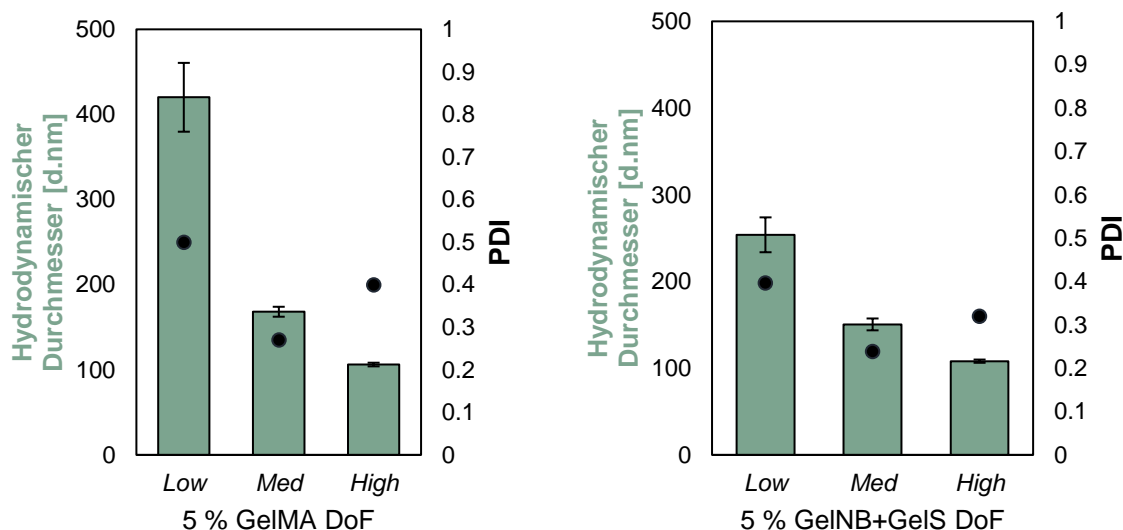


Abbildung 49: DLS-Messung des hydrodynamischen Durchmessers (Balken) und des PDIs (Punkte) von Nanogelen aus 5 % Hydrogel-Vorläufern mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgrade. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

### 3.2.7 Untersuchung der Auswirkung einer Variierung der Hydrogel Konzentration und des Funktionalisierungsgrades in Hydrogelwürfel

Das Ergebnis des Quellverhaltens sollte zusätzlich makroskopisch untersucht werden. Hierfür wurden  $12,5 \text{ cm}^3$  große Hydrogel-Würfel aus GelMA unterschiedlicher Konzentrationen und Funktionalisierungsgraden generiert. Anschließend wurden die Würfel für 24 h in DPBS<sup>-/-</sup> inkubiert (Abbildung 50). Zur Auswertung wurden die Hydrogelwürfel vor und nach der Inkubation in DPBS<sup>-/-</sup> abfotografiert (Abbildung 51, B). Die Volumenzunahme der Würfel wurde dann über ImageJ bestimmt. Bei dem Vergleich des Quellverhaltens der Hydrogelwürfel, mit dem der Nanogelee kann allerdings ein Unterschied festgestellt werden. Visuell ist die Zunahme des Quellverhaltens der Hydrogel-Würfel mit abnehmendem DoF zu erkennen (Abbildung 51, A), so wie es auch bei den Nanogelen zu beobachten war (Abbildung 49). Jedoch scheint hier die Volumenzunahme mit niedrigerer Konzentration zuzunehmen (Abbildung 51, A). Im Vergleich hierzu wurden die Nanogelee jedoch mit abnehmender Konzentration kleiner (Abbildung 48). Dies deutet darauf hin, dass die Quelleigenschaft von Hydrogelen niedrigerer Konzentration, aufgrund eines wenig dichten Hydrogel-Netzwerkes zwar ausgeprägter erscheinen als Hydrogele höherer Konzentration, dies jedoch bei dem für Nanopartikel verwendeten Syntheseweg der Mikroemulsion keine Rolle spielt. Werden niedrigere Konzentrationen an Hydrogel verwendet, können vermutlich kleinere Tröpfchen in der W/O-Emulsion ausgebildet werden, die zwar stärker aufquellen können, dies jedoch

aufgrund ihres großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses eine vergleichbar geringe Rolle spielt. Dies bedeutet jedoch auch, dass bei der Verwendung niedrigerer Konzentrationen eine höhere oder gleiche Ladungskapazität möglich wäre, wie in Nanogelen höherer Konzentration. Gonçalves *et al.* zeigten zudem, dass kleinere Nanogele aufgrund ihres großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses tendenziell eher dazu neigen ihren Wirkstoff schneller abzugeben, jedoch kann dem durch die Verwendung einer höheren molare Masse also in diesem Fall einer höheren Hydrogel-Konzentration im Nanogel entgegen gesteuert werden.<sup>[25]</sup>

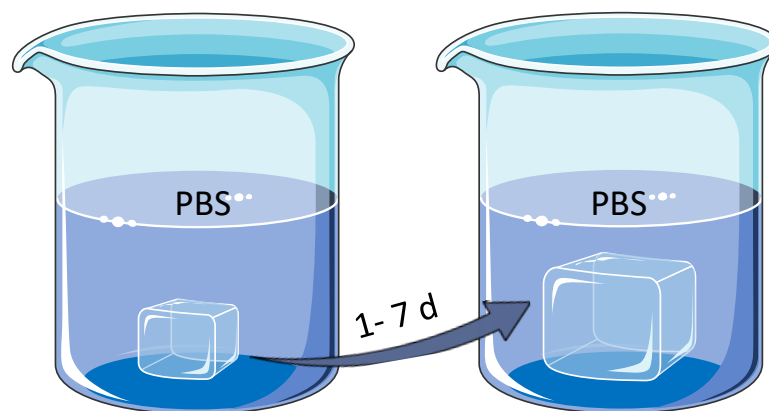


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Untersuchung des Quellverhaltens von Hydrogelwürfel in 1xDPBS<sup>-</sup> für 24 h bis 7 d.

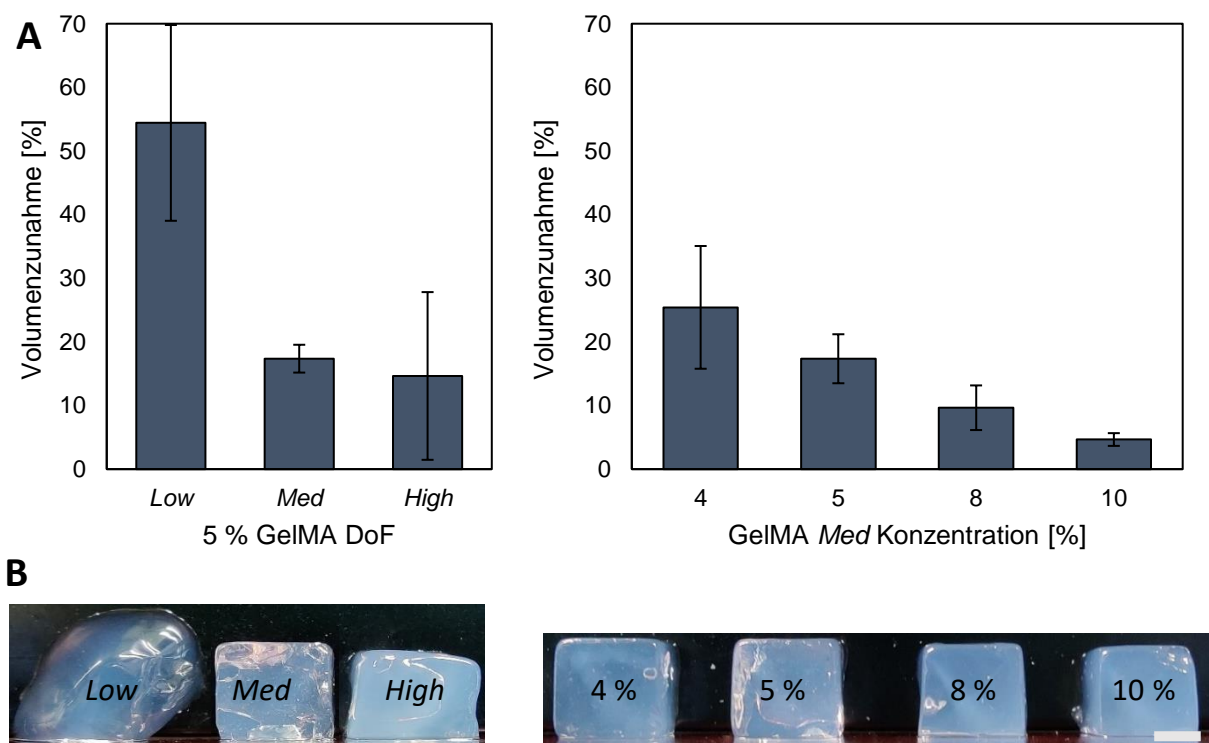


Abbildung 51: (A) Bestimmung der Volumenzunahme der 24 h in 1xDPBS<sup>-</sup> gequollenen GelMA Hydrogel-Würfel mittels ImageJ. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ . (B) Aufnahmen der GelMA Hydrogel-Würfel nach 24 h. Maßstab: 0,25 cm.

Der Einfluss der Dichte des Hydrogel-Netzwerkes wurde quantitativ über das Massenquellverhalten der Hydrogele untersucht. Umso höher die molare Masse des Nanogels, um so dichter sollte das Netzwerk ausgebildet sein. Hierfür wurden Hydrogel-Würfel wie zuvor beschrieben vorbereitet (Abbildung 50) und für 7 Tage in DPBS<sup>-/-</sup> gequollen (in Kollaboration mit M. Sc. Julia Rieger). Die Masse der Würfel wurde vor und nach den 7 Tagen ermittelt und die Zunahme berechnet. Das Hydrogel 5 % GelMA *Low* hatte sich allerdings bereits nach 2 Tagen aufgelöst und konnte somit nicht gemessen werden. Für GelMA *Med* und *High* ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie die bereits ermittelten im vorherigen Experiment (Abbildung 51). Eine höhere Hydrogel-Konzentration führt zu einem dichteren Netzwerk und somit zu einer höheren Steifigkeit des Hydrogels, wodurch die Aufnahmekapazität von Flüssigkeiten reduziert wird (Abbildung 52). Ebenfalls führt ein höherer Funktionalisierungsgrad zum gleichen Resultat. Auch bei den Hydrogelen mit Norbornen- und Thiolgruppen ist eine Abnahme des Quellverhaltens mit steigendem Funktionalisierungsgrad zu beobachten, jedoch scheinen die Netzwerke der GelNB + GelS Hydrogele dichter zu sein als die der GelMA und GelNB-S Hydrogele, wodurch ihre Aufnahmekapazität geringer ausgeprägt ist. Wie auch Miquelard-Garnier *et al.* bereits nachwiesen, kann es bei Hydrogelen wie GelMA und GelNB-S dazu kommen, dass funktionelle Nachbargruppen eines Hydrogelstrangs Bindungen untereinander ausbilden, wodurch *Loops* mit freihängenden Strukturen entstehen, die die Steifigkeit der Hydrogele reduzieren und eine ausgeprägteres Quellverhalten zulassen.<sup>[236,237]</sup> Allgemein scheint die Polymerisation über das Stufenwachstum von GelNB + GelS ein stabileres, gleichmäßigeres Netzwerk auszubilden, das zu höherer Steifigkeit der Hydrogele führt und somit zu einem geringeren Quellverhalten als bei Hydrogelen die über das Kettenwachstum polymerisieren.

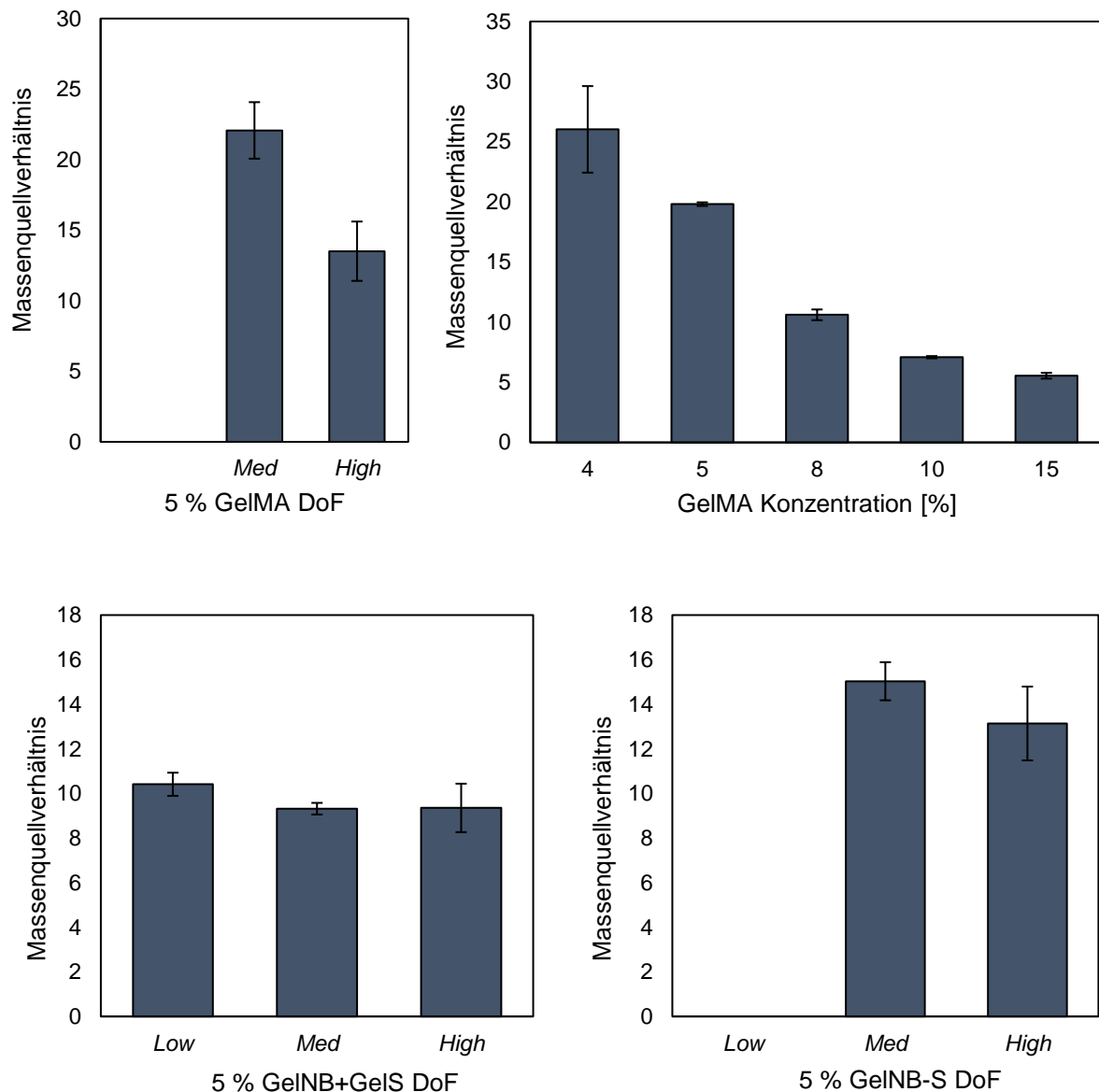


Abbildung 52: Massenquellverhältnis der Hydrogele aus 4 – 15 % GelMA, 5 % GelNB + GelS und 5 % GelNB-S mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden. Die Werte wurden vor und nach 7 Tagen Inkubation in 1xDPBS<sup>-</sup> über die Masse bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ . (In Kollaboration mit M.Sc. Julia Rieger).

### 3.2.8 Strukturanalyse des Hydrogels GelNB + GelS

Um das Quellverhalten der Hydrogele besser verstehen zu können, wurde zusätzlich ihre Struktur analysiert. Das Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen von Biomaterialien ist eine wesentliche Voraussetzung, um die Auswirkungen von Funktionalisierungen und Konzentrationen auf die mechanischen und biologischen Eigenschaften des Materials einschätzen zu können.<sup>[238]</sup> Zur Visualisierung der Mikroarchitektur der Hydrogele wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet. Für diesen Versuch wurden GelNB + GelS Hydrogelwürfel wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.2.7) aus unterschiedlichen Hydrogel-

Konzentrationen von GelNB + GelS *Med* (2,5 %, 5 % und 10 %) und unterschiedlichen DoF von 5 % GelNB + GelS (*Low*, *Med* und *High*) hergestellt und anschließend gefriergetrocknet. Querschnitte der getrockneten Hydrogelwürfel wurden anschließend auf einen REM-Träger aufgebracht und mit 3 nm Platin beschichtet, um die Leitfähigkeit der Hydrogeloberfläche zu erhöhen. Durch das Abrastern der Hydrogeloberfläche mit Elektronenstrahlen konnte dann das Hydrogel-Netzwerk visuell dargestellt werden.<sup>[238]</sup> Die Auswertung der REM-Bilder zeigt, dass sich die Porengröße der Hydrogele mit Veränderung der Konzentration umgekehrt proportional zueinander verhält. So bildeten sich bei Gelen mit höheren Konzentrationen kleinere Poren aus und umgekehrt (Abbildung 53).<sup>[239]</sup> Auch der Funktionalisierungsgrad zeigt eine Auswirkung auf die Porenbildung der Hydrogele (Abbildung 54). Die Poren des hoch funktionalisierten Hydrogels (*High*) zeigen deutlich stabilere Wände, während die des niedrigfunktionalisierten Hydrogels (*Low*) deutlich verschachtelter und lockerer wirken. Auch dies bestätigt die letzten Ergebnisse, die vermuten lassen, dass niedrig funktionalisierte Gele aufgrund des locker ausgebildeten Netzwerkes ein stärkeres Quellverhalten zeigen, was auch durch andere Arbeiten mit ähnlichen Hydrogelen wie zum Beispiel von Pamplona *et al.* bestätigt wird.<sup>[236]</sup> So wird auch verifiziert, dass die Bildung kleinerer Maschen im Gel, die durch eine höhere Gelkonzentration entstehen, die Ausdehnung der Gels verhindert, wodurch auch eine geringerer Aufnahmekapazität erwartet wird.<sup>[236]</sup> Ein Variieren der Porengröße kann zudem die molekulare Diffusion von Medikamenten aus den Nanopartikeln beeinflussen, was bei der Wahl der geeigneten Hydrogelparameter zu berücksichtigen ist.<sup>[239]</sup>

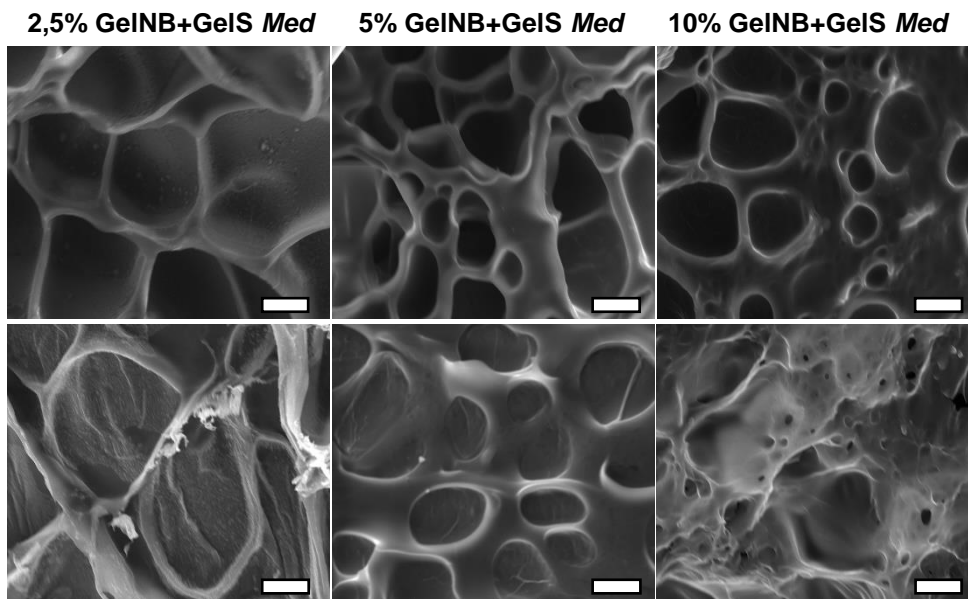


Abbildung 53: Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Bilder von vernetzten GelNB+GelS Med Hydrogelen in den Konzentrationen 2,5 %, 5 % und 10 %. Ausgehärtete Hydrogel-Würfel wurden gefriergetrocknet, in etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten und auf Kohlenstoff beschichtete Probenträger fixiert. Nach einer 3 nm Beschichtung mit Platin wurden die Proben mit 20 kV mikroskopiert. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

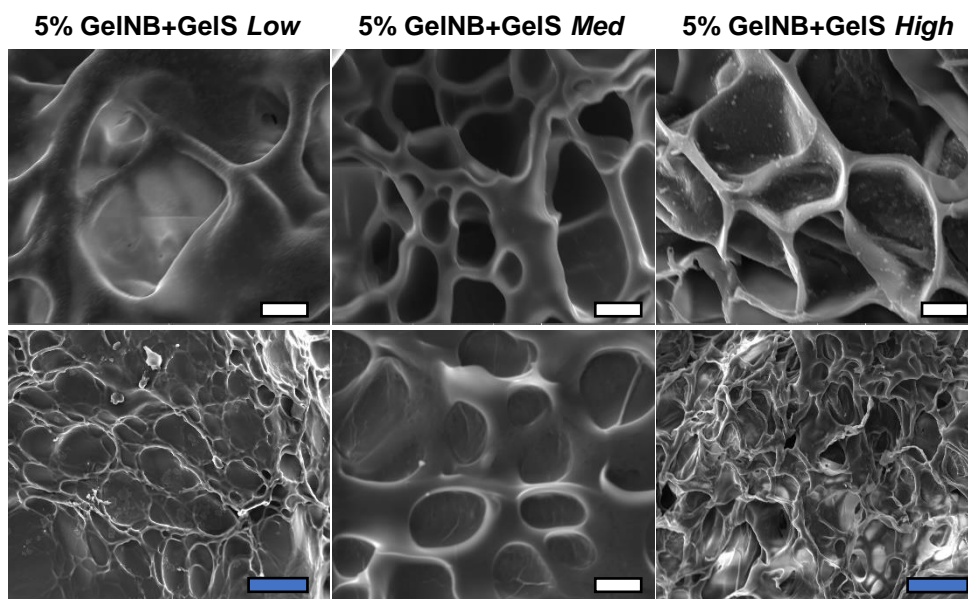


Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Bilder von vernetzten 5 % GelNB+GelS Hydrogelen mit den Funktionalisierungsgraden Low, Med und High. Ausgehärtete Hydrogel-Würfel wurden gefriergetrocknet, in etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten und auf Carbon beschichtete Probenträger fixiert. Nach einer 3 nm Beschichtung mit Platin wurden die Proben mit 20 kV mikroskopiert. Maßstab: weiß 20  $\mu\text{m}$  und blau 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.9 Variation der Nanogelgröße durch unterschiedliche Verhältnisse von GelNB zu Gels

Farzan *et al.* publizierten kürzlich eine Arbeit, bei der die Wichtigkeit der Porengröße in *Carrier*-Systemen hervorgehoben wurde.<sup>[240]</sup> Die Beladung von *Nanocarriern* fungiert meist über die Bindung von Wirkstoffen an ihrer Oberfläche. Da poröse *Carrier*-Systeme eine durch die Poren stark vergrößerte Oberfläche aufweisen, spielt die Größe der Poren eine maßgeblich Rolle bei der Kontrolle der Beladungs- und Freisetzungsrates der Wirkstoffe.<sup>[240]</sup> Die Porengröße kann im GelNB + Gels Hydrogel nicht nur über den DoF und ihrer Konzentration gesteuert werden, sondern auch über das Verhältnis von GelNB zu Gels. Die Auswirkung der Variation des Verhältnisses wurde aus diesem Grund als nächstes untersucht. Da, wie bereits nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.6, 3.2.7 und 3.2.8), die Porengröße die Steifigkeit der Hydrogele und somit die Größe der Nanopartikel beeinflusst, wurde die Auswirkung einer Variierung des GelNB zu Gels Verhältnisses im Nanopartikel über DLS untersucht. Die Nanopartikel wurden wie in Kapitel 5.2.1.10 beschrieben hergestellt und das GelNB zu Gels Verhältnis der Tabelle 4 entsprechend angepasst.

Tabelle 4: GelNB zu Gels Verhältnis mit resultierenden Nanogelgrößen

GelNB Med [%]	GelNB High [%]	Gels Med [%]	Nanogel Durchmesser [nm]
30		70	380
50		50	184
60		40	140
80		20	119
	40	60	137
	50	50	117
	60	40	108

Die entsprechenden DLS-Messungen machen deutlich, dass eine Erhöhung der Thiolgruppenanzahl, vorallem aber ein Überschuss, im Nanopartikel dazu führt, dass die hydrodynamische Größe der Nanopartikel zunimmt (Abbildung 55). Dies liegt vermutlich an den hydrophilen Thiolgruppen, die verstärkt mit Wasser interagieren und die Quellfähigkeit der Nanogele erhöhen können.<sup>[234-236]</sup> Wie zudem Miquelard-Garnier *et al.* nachweisen konnten, sind die Thiolgruppen des Hydrogels in der Lage miteinander Disulfidbrücken auszubilden, die wiederum zu den besagten überhängenden Strukturen im Gel führen und

damit zu einer geringeren Steifigkeit.<sup>[237]</sup> Somit ist das Verhältnis von Doppelbindungen und Sulfhydryl-Nukleophilen im Gel nicht trivial. Ein Überschuss an Thiolen oder sogar ein äquimolares Verhältnis fördert das Vorhandensein von herabhängenden Strukturen anstelle sie zu vernetzen und führt so zur Vergrößerung der Nanogelee.<sup>[236]</sup>

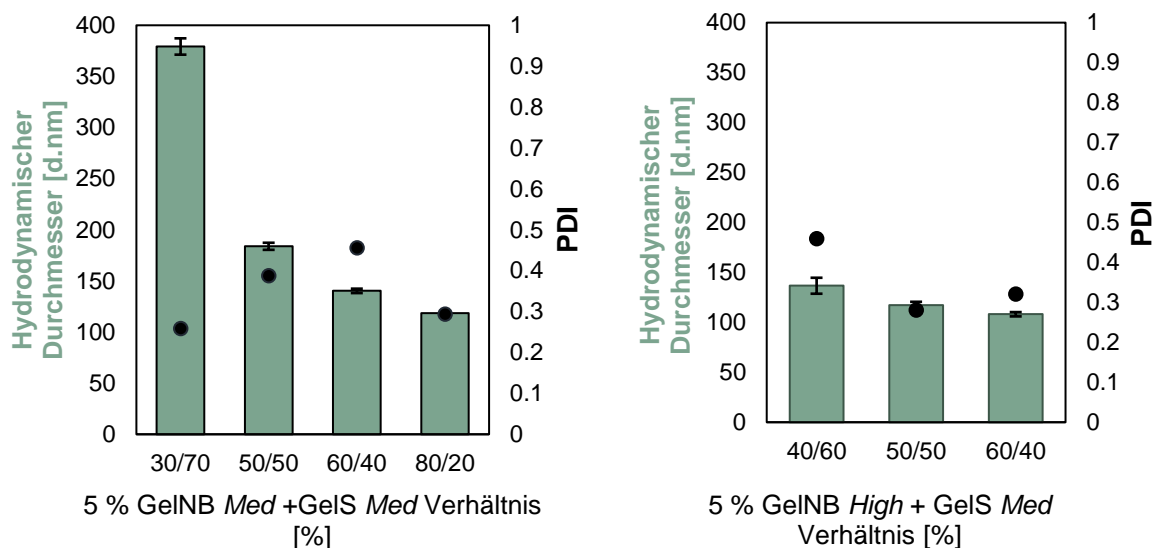


Abbildung 55: DLS-Messungen des hydrodynamischen Durchmessers (Balken) und des PDIs (Punkte) von 5 % GelNB + GelS Nanogelen mit unterschiedlichem Mischverhältnis und unterschiedlichen DoF. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

### 3.2.10 Synthese von Nanogelen optimaler Größe

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnten die besten Parameter für die Nanogelsynthese evaluiert werden. So wurde eine Nanogel aus 3 % GelNB + GelS Med in einem Mischungsverhältnis von 50/50 (v/v) GelNB/GelS synthetisiert, dass die optimalen Eigenschaften für den in dieser Arbeit benötigten *Nanocarrier* aufweist. Dieses Nanogel lieferte laut DLS-Messung eine Partikelgröße von  $103 \text{ nm} \pm 15$  mit einem hervorragenden PDI von 0,2 (Abbildung 56). Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden die Nanogelee unter einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Hierfür wurden die Nanopartikel mit einem Zerstäuber auf einen REM-Träger aufgetragen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die Probe im REM mit einer Elektronenstrahlstärke von 1 kV mikroskopiert. Mit dieser Methode konnten die bisher erhaltenen Ergebnisse verifiziert werden. So zeigen die kugelförmigen Nanogelee in der REM-Aufnahme einen Durchmesser von 109 nm und eine einheitliche Verteilung der Partikel auf dem Träger (Abbildung 56). Da der hydrodynamische Durchmesser meist größer ist als der reale Durchmesser, dies jedoch hier nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Nanopartikel eine sehr geringe Hydrathülle ausbilden.

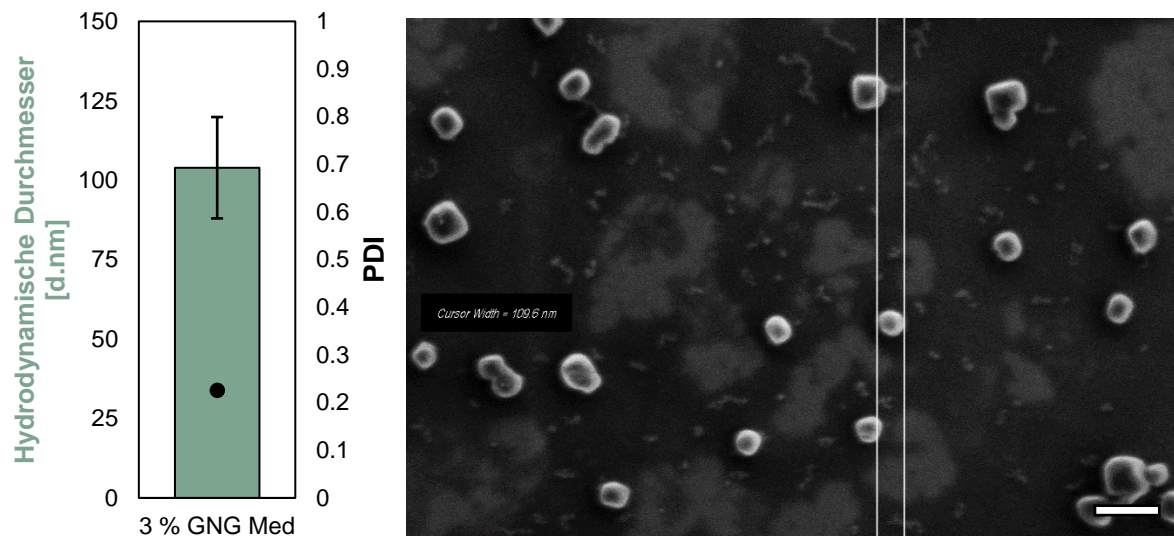


Abbildung 56: Größenbestimmung der Nanogele GNG aus 3 % GelNB + GelS Med Hydrogel im Mischverhältnis 50/50 (GelNB/GelS). Links: DLS-Messung zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers (Balken) und des PDIs (Punkte). Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ . Rechts: REM-Aufnahme der Nanogele, Aufnahme mit 1 kV, Maßstab 200 nm.

Nanopartikel, die eine gute Monodispersität aufweisen neigen oft dazu eine Oberflächenladung zu besitzen. Bestätigt werden kann dies über die Messung des Zeta-Potentials. Mit dieser Technik kann das elektrostatische Potential der elektrochemischen Doppelschicht, die die Nanogele umgibt, gemessen werden (Abbildung 57).<sup>[241]</sup> Nanopartikel die ein Zeta-Potential zwischen -10 und +10 mV aufweisen, werden als neutral angesehen. Während Nanopartikel mit einem Zeta-Potential über  $\pm 30$  mV, stark kationisch oder anionisch geladen sind. Da die meisten biologischen Zellmembranen eine negative Ladung aufweisen, kann das Zeta-Potential der Nanopartikel ihre Affinität zur Membranpenetration beeinflussen. Kationische Partikel zeigen dabei im Allgemeinen eine erhöhte Toxizität, die mit der Beeinträchtigung der Zellwand in Verbindung steht.<sup>[242,243]</sup> Die Messung des Zeta-Potentials der 3 % GNG Med Nanogelen über DLS in 1xDPBS<sup>-/-</sup> (pH 7,4) ergab ein Zeta-Potential von  $-3,8 \text{ mV} \pm 0,5$ , und deutet so auf Partikel mit neutraler Landung hin. Da ungeladene polare Moleküle die Zellmembran schlecht durchdringen können, könnte dies die Aufnahme der Nanogele in die Zellen beeinträchtigen.<sup>[29,244]</sup> Die Neutralität der Nanopartikel bedeutet zudem auch eine Neigung zur Agglomeration. Eine Beobachtung der Nanogel-Stabilität über 3 Monate in Lösung konnte eine Tendenz zur Agglomeration allerdings nicht bestätigen.

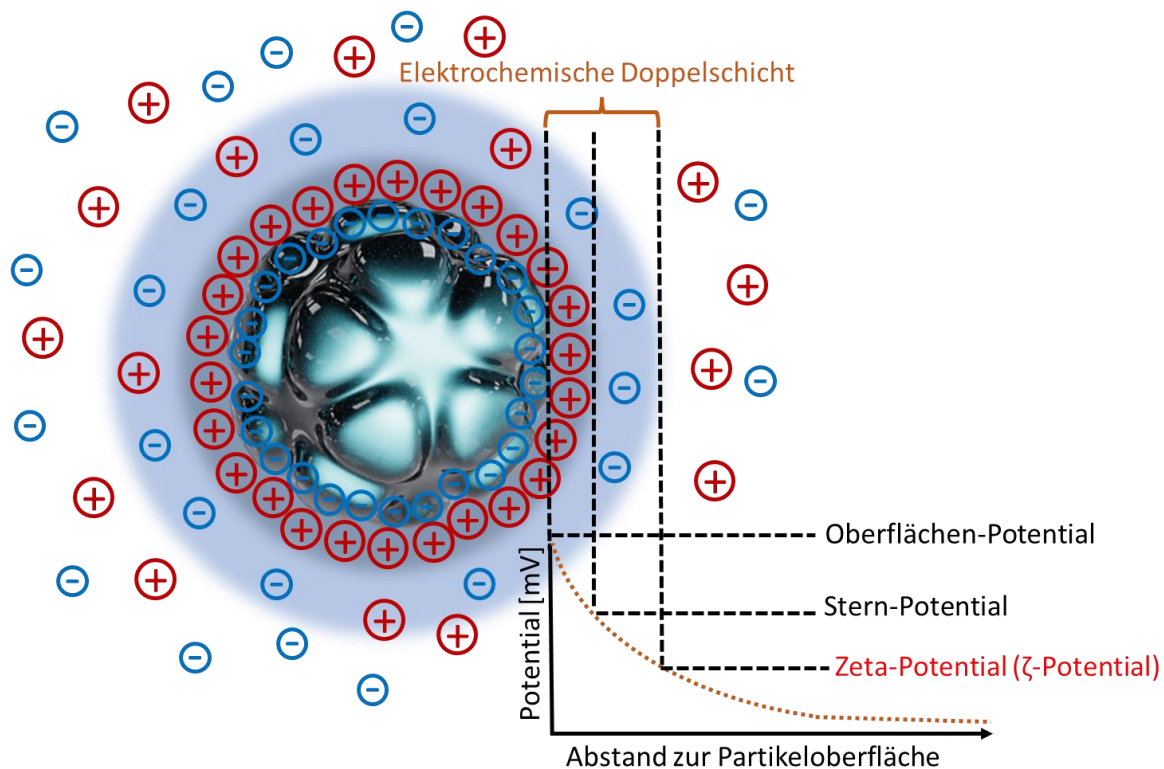


Abbildung 57: Schematische Darstellung des Zeta-Potentials von Nanopartikeln negativer Ladung in Lösung. <sup>[241]</sup>

### 3.2.11 Untersuchung der Auswirkung kürzerer Belichtungszeiten auf GNG

Viele Medikamente neigen zu einer Photodegradation. Vor allem energiereiche Strahlung des UV-Bereiches, wie die, die für die Polymerisation der Hydrogele benötigt wird, ist für viele Wirkstoffe besonders schädlich. <sup>[245]</sup> Die ebenfalls bei der Polymerisation entstehenden Radikale, führen zudem zu einer Autoxidation, weshalb ein Überschuss an freien Radikalen vermieden werden sollte. <sup>[246]</sup> Da Gökler *et al.* bereits nachweisen konnten, dass für die Polymerisation des Hydrogels GelNB + GelS weitaus weniger Photoinitiator im Vergleich zur GelMA Polymerisation eingesetzt werden muss, sowie eine kürzere Belichtungszeit verwendet werden kann, zeigt das Hydrogel GelNB + GelS einen großen Vorteil gegenüber GelMA für die Verwendung als *Drug Delivery*-System (DDS). <sup>[203]</sup> Um nun die geeignete Belichtungszeit und Photoinitiator-Konzentration (LAP) für die Nanogele feststellen zu können, wurde ein Gel-Aushärtungstest durchgeführt. Hierfür wurden 100  $\mu\text{L}$  der Hydrogel-Vorläufer-Lösung mit unterschiedlichen Photoinitiator-Konzentrationen (0,01; 0,03; 0,05; 0,1 und 0,3 % LAP) angesetzt und in 1 - 10 sec-Schritten mit UV-Licht (320 – 500 nm, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, Abstand zur Diode: 3 cm) belichtet, bis die Polymerisation eintrat. Die Ergebnisse wurden in Kollaboration

mit M. Sc. Julia Rieger im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (KIT, IFG) generiert. Für die Untersuchung der Aushärtungszeit wurden 3 % GelNB + GelS, 5 % GelMA und 3 % GelNB-S Hydrogele mit verschiedenen Funktionalisierungsgraden verglichen (Abbildung 58). Die erhaltenen Messwerte zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den GelNB + GelS und GelNB-S Hydrogelen im Vergleich zu GelMA. Eine Aushärtung von GelNB + GelS und GelNB-S Gelen konnte bereits mit 0,01 % LAP und unter 25 sec Belichtungszeit erreicht werden, während hierfür bei GelMA Gelen bis zu 830 sec benötigt wurden. Für eine Polymerisation mit einer Belichtungszeit von 25 sec benötigte GelMA mindestens eine 10-fache LAP-Konzentration (0,1 %). Beim Vergleich der unterschiedlichen DoF der Hydrogele zeigte der höchste Funktionalisierungsgrad (*High*) meist eine schnellere Polymerisation mit gleicher LAP-Konzentration. Lediglich bei dem Hydrogel GelNB + GelS fiel auf, dass hier das Gel mit dem höchsten DoF (*High*) im Vergleich langsamer polymerisierte. Vermutlich lag dies jedoch an dem für dieses Gel benötigte Mischungsverhältnis der Hydrogel-Vorläufer GelNB/GelS (40/60), wodurch das Ergebnis geringfügig abweicht. Das Aushärtungsoptimum für ein 3 % GelNB + GelS *Med* liegt somit bei 0,05 % LAP und 5 sec Belichtungsdauer, während für 5 % GelMA *Med*, 0,3 % LAP und 20 sec Belichtungszeit verwendet werden muss. Das neue GelNB-S Gel zeigt vergleichbare Werte zu den GelNB + GelS Gelen mit einem Optimum für 3 % GelNB-S *Med* bei 0,05 % LAP und 10 sec Belichtungszeit. Diese Hydrogele zeigen somit einen deutlichen Vorteil gegenüber dem Goldstandard GelMA und eignen sich somit weitaus mehr für die Verwendung als *Nanocarrier*.

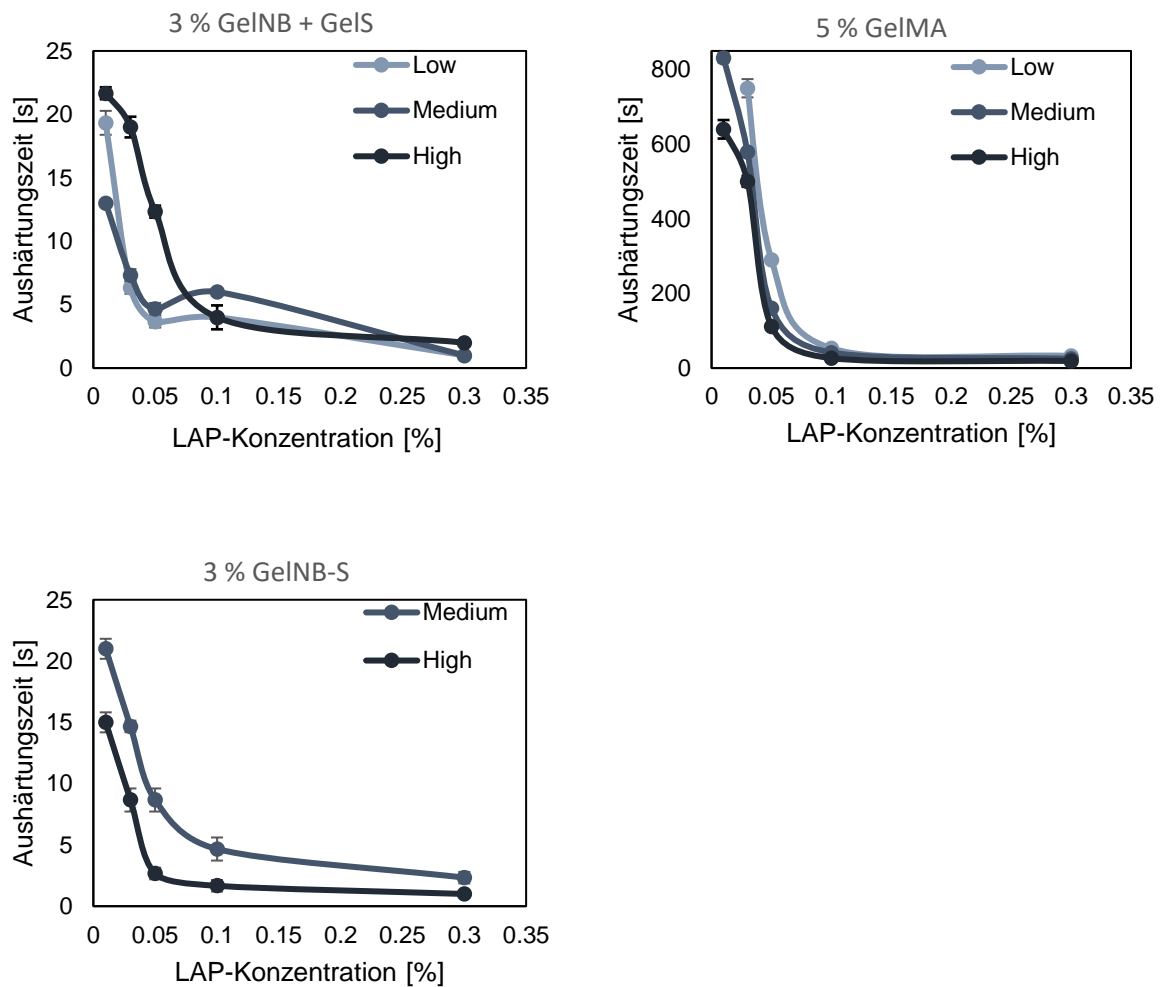


Abbildung 58: Aushärtungszeiten von Hydrogelen aus 3 % GelNB + GelS, 5 % GelMA und 3 % GelNB-S und unterschiedlicher DoF. 100  $\mu$ L Hydrogel wurden mit UV-Licht (320 – 500 nm, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, Abstand zur Diode 3 cm) in 1 – 10 sec abständen belichtet. Aufgetragen wurden die Belichtungsdauer gegen die Konzentrationen des Photoinitiators LAP. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Die Synthesemethode der Nanogele nach Kim *et al.* verwendet 0,5 % LAP und 30 min Belichtung mit 10 W/cm<sup>2</sup> für ein Nanogele aus 5 % GelMA *Med.*<sup>[199]</sup> Dies lässt erahnen, dass die ermittelten optimalen Aushärtungsverhältnisse nicht direkt auf die Polymerisation während der Nanogel-Synthese übertragen werden können. Da die Hydrogel-Lösung von Tensiden und einer organischen Phase umhüllt ist, wird das Licht bereits vorher gestreut oder absorbiert, weshalb die Belichtungsparameter beeinträchtigt werden. Deshalb wurde ebenfalls ein Aushärtungstest während der Nanogel-Synthese durchgeführt. Hierfür wurden 3 % GelNB + GelS *Med* Nanogele mit dem zuvor ermittelten Optimum an 0,05 % LAP angesetzt. Nach Generierung der Mikroemulsion, wurde die Lösung mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und Intensitäten im Abstand von 3 cm bestrahlt (320 – 500 nm). Die Größe

und Dispersität der synthetisierten Nanogele wurden anschließend über DLS überprüft. Das Resultat macht deutlich (Abbildung 59), dass die Belichtungszeit auf 5 min verkürzt werden kann, wenn eine Intensität von  $1 \text{ W/cm}^2$  verwendet wird (PDI 0,3). Bei niedrigerer Belichtungszeit oder Intensität, zeigten die Nanogele keine ausreichende Stabilität ( $\text{PDI} > 0,5$ ), wodurch sie stark agglomerierten. Eine sechs Mal kürzere Belichtungszeit bei einem Zehntel der Intensität und LAP-Konzentration ist allerdings eine deutliche Verbesserung gegenüber der von Kim *et. al.* verwendeten Zeit für GelMA basierte Nanogele.<sup>[199]</sup>

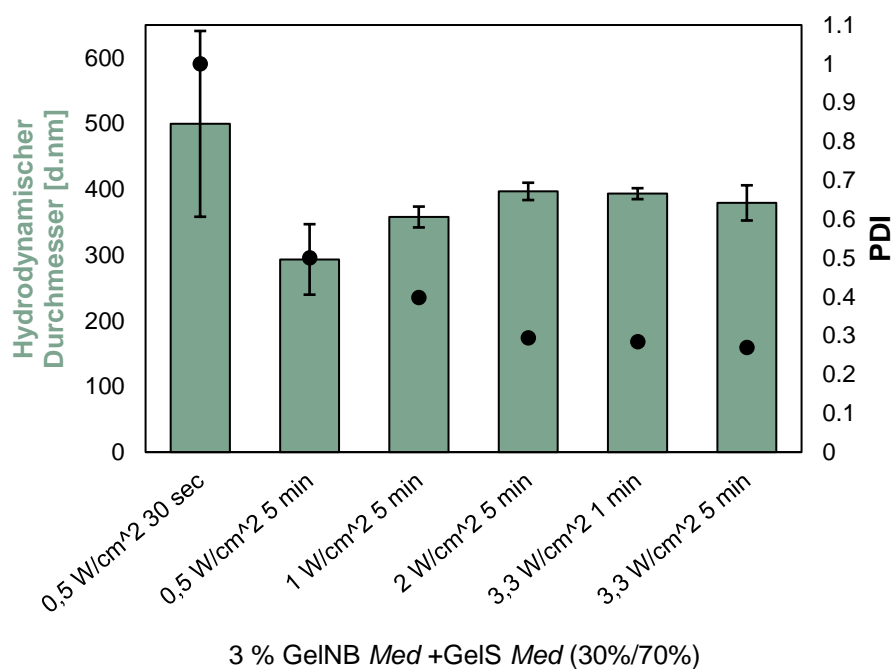


Abbildung 59: DLS-Messungen der hydrodynamischen Durchmesser (Balken) und des PDIs (Punkte) von 3 % GelNB + GelS Nanogelen Med (+ 0,05 % LAP) mit unterschiedlichen Belichtungseigenschaften während der Nanogelsynthese. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Mit den hier bestimmten Parametern sollte nun getestet werden, wie stark aktive Substanzen bei der Nanogelsynthese angegriffen werden. Zu diesem Zweck wurden Nanogele mit einem Dextran gekuppelten Fluorophor befüllt. Als Fluorophor wurde Alexa Fluor 647 gewählt, da sein Absorptionsspektrum zwischen 500 und 700 nm liegt, und es somit nicht über Photodegradation zerstört werden sollte. Trotzdem kann es zur Autoxidation und somit zu Fluoreszenzquenching kommen, was visuell über den Verlust der Farbe oder der Fluoreszenz beobachtet werden kann.<sup>[247]</sup> Zur Beladung der Nanogele wurde das Fluorophor der wässrigen Phase aus Hydrogel-Vorläuferlösung während der Erstellung der Emulsion beigemischt. Verglichen wurden die Nanogele aus 3 % GelNB + GelS Med (0,05 % LAP) mit 5 % GelMA Med (0,5 % LAP), zu Vergleichszwecken wurden beide Nanogele mit  $1 \text{ W/cm}^2$  für 5min belichtet

und anschließend über Fotoaufnahmen verglichen. In den Bildern vor und nach der Belichtung (Abbildung 60, links) ist ein deutliches Quenching des Fluorophors nach der Belichtung zu sehen, da es im GelMA basierten Nanogel ( $\text{GNG}_{\text{GelMA}}[\text{Dextran-AlexaFluor647}]$ ) eingeschlossen wurde (Abbildung 60, Links). Hingegen zeigt das Fluorophor in den GelNB + GelS basierten Nanogelen ( $\text{GNG}_{\text{GelNB+GelS}}[\text{Dextran-AlexaFluor647}]$ ) nur ein leichtes Quenching. Um den Verlust der Fluoreszenz quantitativ zu überprüfen, wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Microplatten-Photometer (SpectraMax® iD3) gemessen, wobei die Nanogele mit der freien unbelichteten Dextran-AlexaFluor647-Lösung gleicher Fluorophor-Konzentration verglichen wurden. Hierbei wurde deutlich, dass auch das Fluorophor im  $\text{GNG}_{\text{GelNB+GelS}}[\text{Dextran-AlexaFluor647}]$  rund 35 % an Intensität verloren hatte, vergleichsweise dazu hatte die Fluoreszenzintensität von  $\text{GNG}_{\text{GelMA}}[\text{Dextran-AlexaFluor647}]$  allerdings um ganze 96 % abgenommen. Hier ist kaum noch intaktes Fluorophor detektierbar. Dieses Experiment macht deutlich wie groß der Vorteil der Verwendung des Hydrogel GelNB + GelS bei der Nanogelsynthese als *Drug Delivery*-System ist.

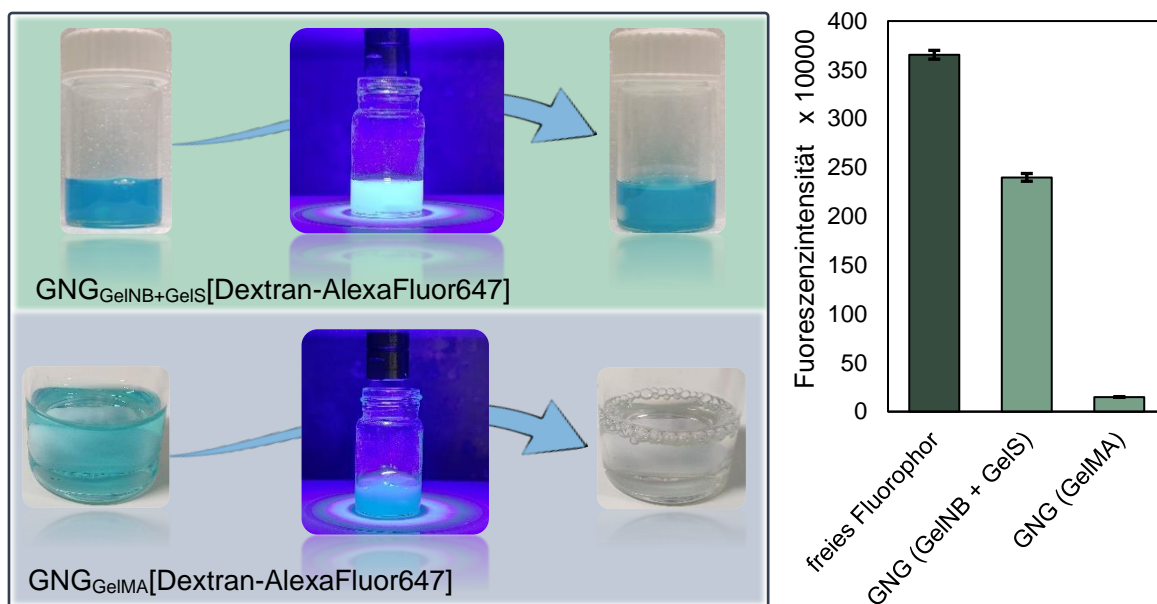


Abbildung 60: Links sind die Aufnahmen der Nanogele  $\text{GNG}_{\text{GelNB+GelS}}[\text{Dextran-AlexaFluor647}]$  und  $\text{GNG}_{\text{GelMA}}[\text{Dextran-AlexaFluor647}]$  während der Synthese vor und nach der Belichtung mit  $1 \text{ Watt/cm}^2$  für 5 min (für GelNB + GelS) und 15 min (für GelMA) dargestellt. Rechts ist die Fluoreszenzintensität der aufgereinigten Nanogele, sowie des freien Fluorophors Dextran-AlexaFluor647 aufgetragen. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

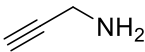
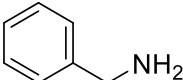
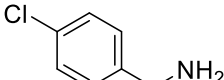
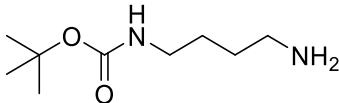
### 3.2.12 GNG Oberflächen Modifikation mit Peptoiden zu P@GNG

Nanopartikel, die Wirkstoffe transportieren sind bereits im klinischen Einsatz angekommen. Als passive Träger werden sie jedoch nicht als „*smarte*“ Transportmittel bezeichnet, hierfür fehlt ihnen die Fähigkeit der spezifischen Wirkung am Zielgewebe, wodurch ihre Effizienz gesteigert wird.<sup>[248]</sup> Um den zielgerichteten Transport der in dieser Arbeit beschriebenen Nanogelee „*smart*“ zu gestalten, soll ihre Oberfläche mit gewebespezifischen Peptoiden modifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Peptoide verwendet, welche bereits in früheren Arbeiten von Dr. Ilona Wehl<sup>[59]</sup> und Dr. Franziska Röncke<sup>[62]</sup> im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (KIT, IFG) charakterisiert wurden.

#### 3.2.12.1 Peptoidsynthese

Die ausgewählten Peptoide der bereits charakterisierten Peptoid-Bibliothek, bestehen aus Tetrameren und wurden aus den Aminen Propargylamin (*Nprg*), Benzylamin (*Nphe*), 4-Chlorbenzylamin (*Npcb*) und *N*-Boc-1,4-Butandiamin (*Nlys*) synthetisiert (Tabelle 5).<sup>[59]</sup> Die Peptoidsynthese verlief nach der Submonomermethode an einer festen Phase die bereits 1992 von Zuckermann *et al.*<sup>[63]</sup> an Peptiden beschrieben wurde.<sup>[60,63]</sup> Als feste Phase dient hier ein Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschütztes Rink-Amid-Harz, das in Synthespritzen gefüllt wurde. Nach Entschützung des Harzes begann der Syntheszyklus über eine Acylierung mit Bromessigsäure und der darauffolgenden Kupplung des Amins über eine nucleophile Substitution. Nach der Kupplung der vier Submonomere *Nprg*, *Nphe*, *Npcb* und *Nlys* (Tabelle 5) wurde das Peptoid über Rhodamin B fluorescent markiert und vom Harz abgespalten (Abbildung 61).

Tabelle 5: Strukturformel, Bezeichnung und Farbcode der Amine, die für die Peptoidsynthese verwendet wurden.

			
Propargylamin	Benzylamin	4-Chlorbenzylamin	<i>N</i> -Boc-1,4-Butandiamin
<i>Nprg</i>	<i>Nphe</i>	<i>Npcb</i>	<i>Nlys</i>

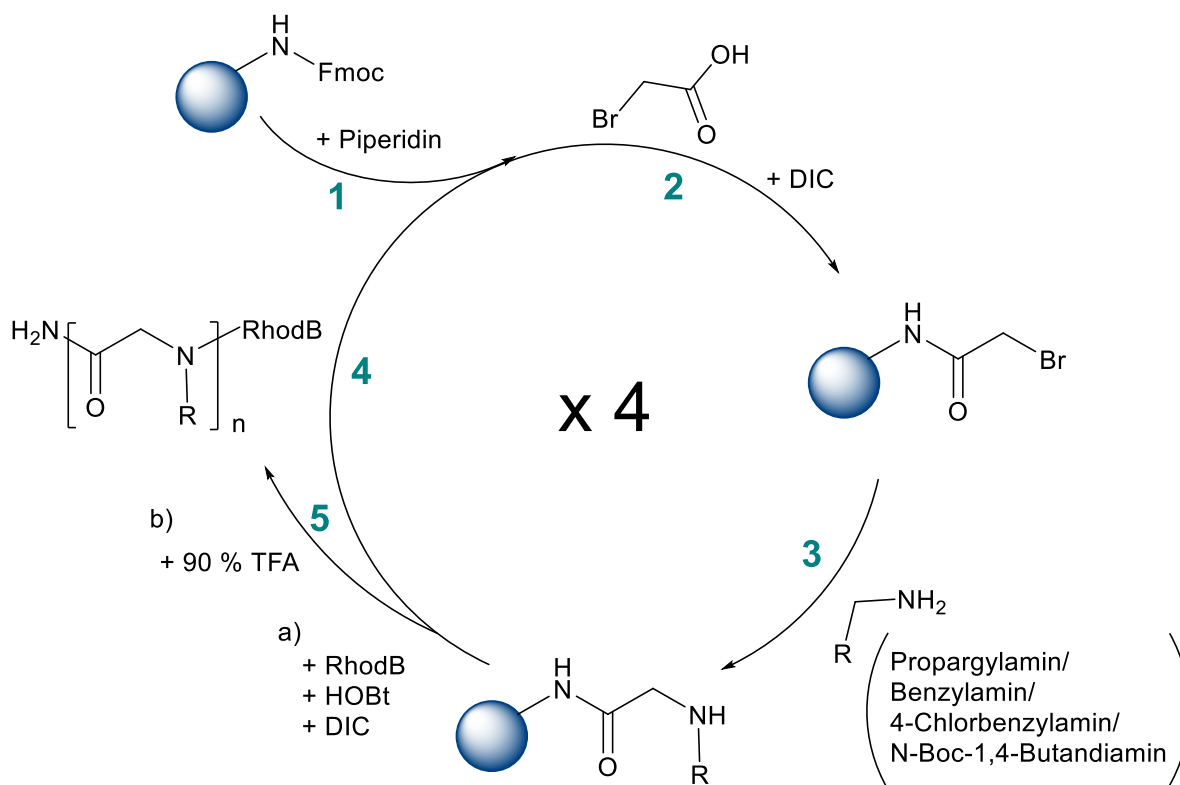


Abbildung 61: Peptoid-Synthese über die Festphasen Submonomermethode nach Zuckerman et. al. <sup>[60]</sup>  
 1) Der Syntheseprozess beginnt mit der Entschützung (Deprotektion) einer Rink-Amid-Harzmatrix unter Verwendung von Piperidin. 2) Anschließend erfolgt die Acylierung mit Bromessigsäure und  $N,N'$ -Diisopropylcarbodiimid (DIC). 3) Durch nukleophile Substitution wird das Halogenid durch das Amin ersetzt. 4) Danach erfolgt eine weitere Acylierung mit Bromessigsäure und somit eine Zykluswiederholungen, bis eine tetrameres Peptoid entsteht. 5) Zum Schluss wird das Fluorophor Rhodamin B über 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und DIC gekuppelt (5a) und das fertige Peptoid sauer über TFA vom Harz abgespalten (5b).

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptoide P1, P6, P8, P22, P28, P44, P56, P58 und P95 wurden nach ihrer gewebespezifischen Akkumulation in Zebrafischen ausgewählt (Tabelle 6). Zudem sollte das erste Monomer der Peptoid-Tetramere aus einem Propargylamin-Rest ( $N_{\text{prg}}$ ) bestehen, da die terminale Dreifachbindung des Moleküls dazu verwendet werden sollte, um das fertige Peptoid im Anschluss über eine Thiol-In-Click-Chemie<sup>[249]</sup> an das Nanogel zu koppeln (Abbildung 62). Das Peptoid P95 besitzt kein  $N_{\text{prg}}$  Monomer, und wurde als Negativkontrolle zum Kuppelnachweis an das Nanogel eingesetzt.

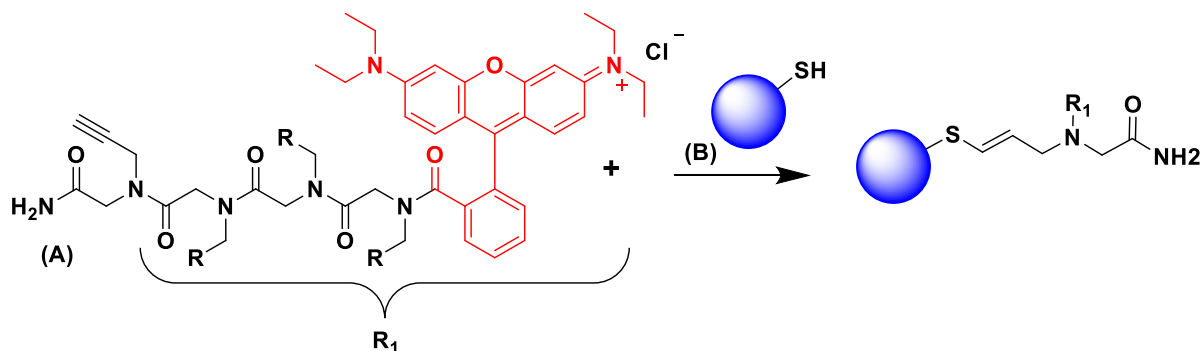


Abbildung 62: Thiol-In-Click Chemie der Oberflächenmodifikation des Nanogels. Strukturformel des Peptoid-Tetramers (A) mit erstem gekuppeltem Monomer Nprg und Fluoreszenzmarkierung über Rhodamin B (rot) am Ende der Tetramer-Kette. Die Alkynylgruppe des Peptoid reagiert nach Aktivierung mit einem Photoinitiator mit einer freien Thiolgruppe der Nanogeloberfläche (B).

Tabelle 6: Verwendete Peptide, deren Sequenz und Organspezifität im Zebrafischembryo <sup>[59]</sup>

Peptoid	Sequenz				Zebrafisch Organspezifität
P1					Verdauungssystem
P6					Caudal-Vene
P8					Olfaktorisches System
P22					ubiquitär
P26					Apoptotische Zellen
P28					Laterale Linie
P44					Verdauungssystem
P56					Olfaktorisches System
P58					-
P95					Augen, Dottersack
Nprg	Nphe		Npcb	Nlys	

### 3.2.12.2 Kupplung der Peptide an die GNG-Oberfläche

Nach erfolgreicher Peptoidsynthese wurde die Kupplung an die Nanogele über eine Thio-In-Click-Reaktion durchgeführt. Da das Nanogel aus den 3 %igen Hydrogel-Vorläufern GelS und GelNB Med besteht, können hier restliche Thiolgruppen dazu verwendet werden sich mit den Propargylamingruppen der Peptide zu verbinden (Abbildung 63). Hierfür wurde das Nanogel in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und mit Peptoid und Photoinitiator (0,03 % LAP) versetzt. Nach 30 sec

Belichtung mit UV-Licht (320 – 500 nm, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 3 cm Abstand) wurde die Reaktion für 1 h inkubiert, um so viel Peptoid wie möglich zu binden (Abbildung 64). Anschließend wurden die Peptoid-modifizierten Nanogele aufgereinigt (Kapitel 5.2.1.11) und quantifiziert.

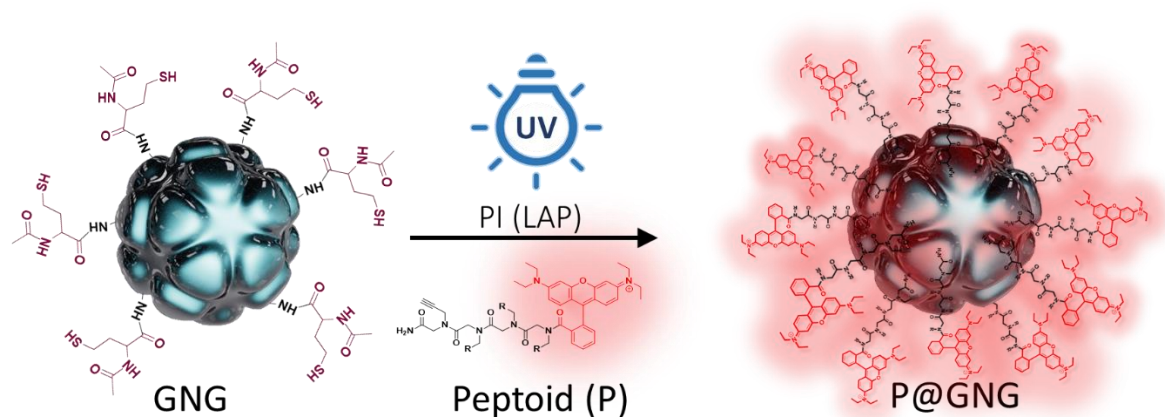


Abbildung 63: Oberflächenmodifikation der Nanogele mit organspezifischen Peptoiden.

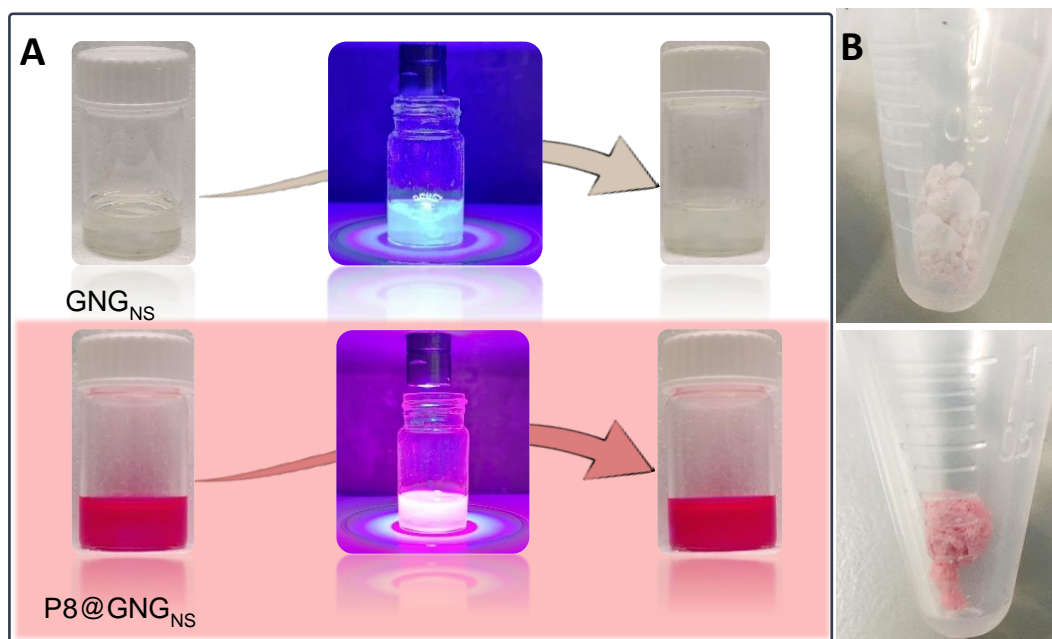


Abbildung 64: A) Lichtbildaufnahmen der Nanogelsynthese. GNG wurden mit UV-Licht der Intensität 1 W/cm<sup>2</sup> 5 min lang, 0,05 % LAP und 3 cm Abstand zur Lichtquelle für 60 sec belichtet. P8@GNG wurden mit UV-Licht (320 – 500 nm) der Stärke 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 0,03 % LAP und 3 cm Abstand zur Lichtquelle für 30 sec belichtet. Im Anschluss konnten die Nanogele für 1 h im Dunkeln abreagieren. B) Pellet der aufgereinigten Nanogele GNG und P8@GNG nach dem Trocknen.

Die Kupplung von Peptoiden an das Nanogel kann dann über die Quantifizierung der freien Thiolgruppen des Nanogels über den Ellmans-Assay bestimmt werden. Der kolorimetrische

Nachweis läuft über die Reaktion des Ellman Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB), das mit den Thiolgruppen von Gels reagieren kann und 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB<sup>-</sup>) freisetzt. TNB<sup>-</sup> kann anschließend photometrisch bei 412 nm quantifiziert werden (Abbildung 65).<sup>[250]</sup>

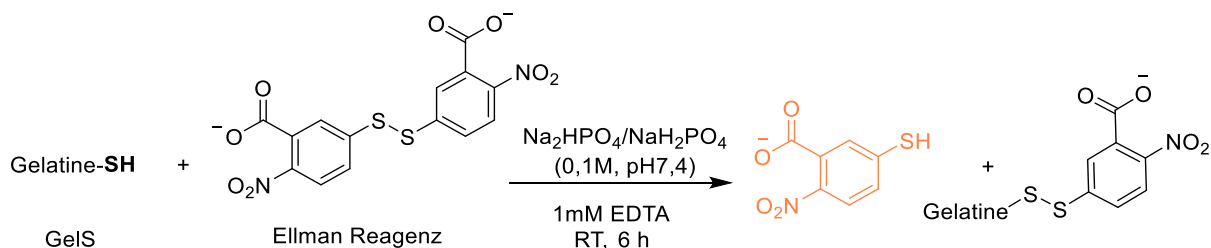


Abbildung 65: Reaktion des kolorimetrischen Nachweises von Thiol-Gruppen im Gels mittels Ellman Reagenz.

Um die Abnahme an freien Thiolgruppen während der Nanogel-Synthese zu beobachten, wurde Nanogel-Lösungen vor der Polymerisation, nach der Polymerisation und nach der Kupplung mit dem freien Peptoid P8 im Ellman-Assay verglichen (Abbildung 66, links). Hierbei konnte vor allem eine Abnahme von über 50 % an Thiolgruppen nach der Polymerisation der Nanogele beobachtet werden. Bei der Oberflächenmodifikation hingegen reagierten lediglich weitere 10 % der Thiolgruppen mit dem Peptoid P8. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich ein Großteil der Thiolgruppen auch im Inneren der Nanogele befinden, wo hydrophobe und sterisch gehinderte Peptoide nicht eindringen können. Die Intaktheit des Fluorophors Rhodamin B am Nanogel konnte anschließend über dessen Absorption im Microplatten-Photometer (Spectramax® iD3) bei 400 – 750 nm nachgewiesen werden (Abbildung 66, rechts).

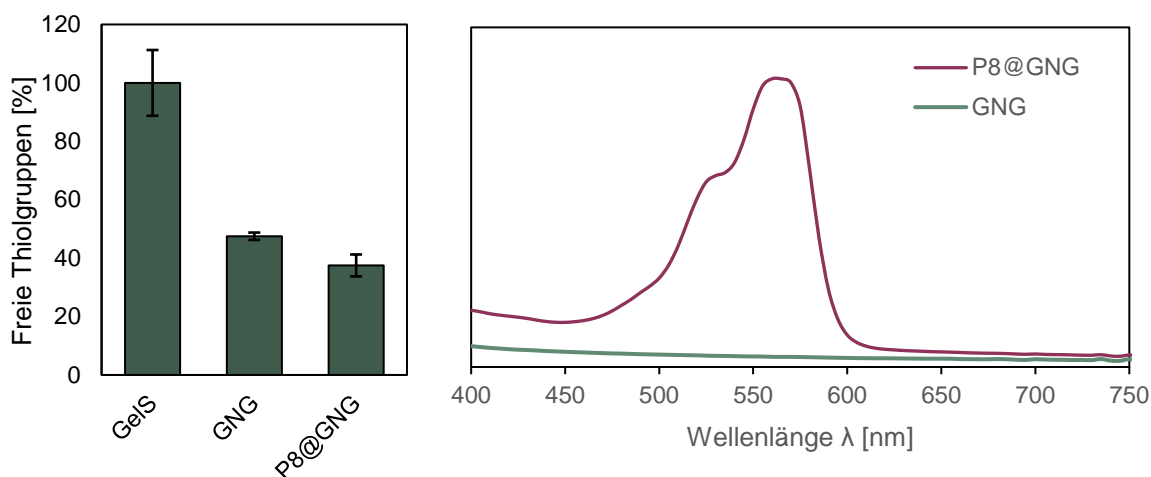


Abbildung 66: Links: kolorimetrischer Nachweis von freien Thiolgruppen im Verlauf der Nanogel Synthese. Verglichen wird das Nanogel vor der Belichtung (GelS); polymerisiertes Nanogel (GNG) und mit Peptoid-gekoppeltes Nanogel (P8@GNG). Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ . Rechts: Absorptionsspektrum des Nanogels vor und nach der Kupplung mit P8.

Um die Kupplungseffizienz zu erhöhen, sollte nach der Polymerisation und Aufreinigung der Nanogele deren Oberfläche über eine Thiolierung mit weiteren freien Thiolgruppen funktionalisiert werden. Hierfür wurde das sogenannte Trauts-Reagenz (2-Iminoethiolan) verwendet. Dabei handelt es sich um eine zyklische Thioimidat-Verbindung, die mit Primäraminen zur Sulfhydryl (SH)-Gruppe reagieren kann.<sup>[251]</sup> Das Nanogel wurde für die Thiolierung in DPBS<sup>-/-</sup> mit 50 mg/mL Trauts-Reagenz versetzt und für 1 h gerührt. Im Anschluss wurden die Nanogele aufgereinigt und mit Peptoid (1 mM P8) gekuppelt. Nanogele die mit Peptoid modifiziert wurden, werden im Folgenden als P@GNG bezeichnet.

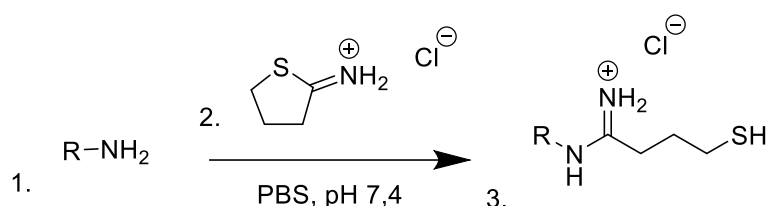


Abbildung 67: Oberflächenmodifikation mit Thiolgruppen (3.) von freien Aminogruppen (1.) der Nanogele über 2-Iminoethiolan (Trauts-Reagenz) (2.).

Der Einfluss der Thiolierung auf die Nanogel-Größe und ihrer Dispersität wurden anschließend über DLS überprüft (Abbildung 68, links). Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Thiolierung kaum eine Auswirkung auf die Nanogel-Größe hatte. Mit etwa 120 nm im Durchmesser blieben die Nanogele zudem im optimalen Bereich für den Wirkstofftransport. Auch an ihrer Monodispersität ( $PDI < 0,2$ ) änderte sich nichts. Lediglich nach der Peptoid-Kupplung nahmen

die Nanogelee etwa 30 % an Größe zu, was für eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften durch die Modifikation der Nanogelee mit Peptoiden spricht. Die Quantifizierung der verbesserten Kupplungskapazität wurde anschließend über die Absorptionsmessung des Rhodamin B über den Microplatten-Photometer (Spectramax® iD3) bei 550 nm durchgeführt (Abbildung 68, rechts). Hierbei ergab sich eine um fast das 3,5-fache höhere Konzentration des Peptoids an dem Nanogel nach einer Thiolierung. Somit konnten nach einer Erhöhung der Thiolgruppen durch das Trauts-Reagenz rund 70 % mehr Peptide an die Oberfläche der Nanogelee gekuppelt werden.

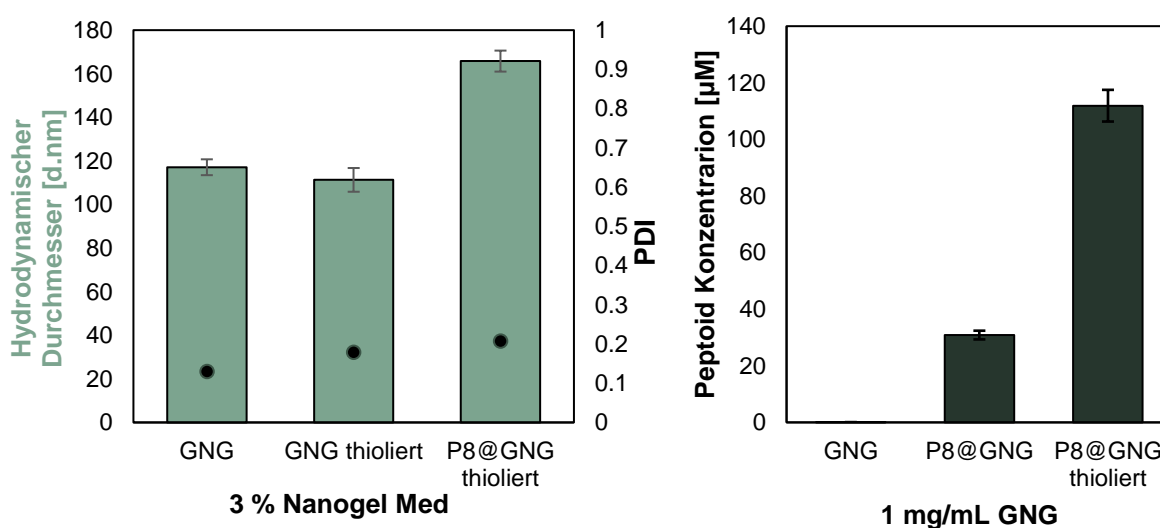


Abbildung 68: Links: DLS-Messungen der hydrodynamischen Durchmesser (Balken) und des PDIs (Punkte) von 3 % GelNB + GelS Nanogelen Med. Verglichen wurde Nanogelee vor und nach der Thiolierung und nach der Kupplung mit P8. Rechts: Kupplungskapazität von P@GNG für das Peptoid P8. Die Kupplung fand mit 1 mM P8 und 0,03 % LAP bei 0,5 W/cm<sup>2</sup> UV- Belichtung (320 – 500 nm) im Abstand von 3 cm für 30 sec statt. Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt, n = 3.

Da sich die Thiolierung der Nanogelee als wirksam erwies, wurden daraufhin alle ausgewählten Peptide an zuvor thiolierten Nanogelee gekuppelt. Zudem wurde die verwendete Peptoid-Konzentration während der Kupplung von 1 mM auf 9 mM bei P8 und auf 15 mM bei allen anderen Peptoiden erhöht, um die Reaktionseffizienz möglichst auszureizen. Die Quantifizierung der Kupplungskapazität der Peptide P6-P95 fand ebenfalls über die Absorptionsmessung des gekuppelten Fluorophors Rhodamin B bei 550 nm statt (Abbildung 69). Das Peptoid P44 zeigt hierbei mit 277 µM die höchste Kupplungskapazität. Es ist das einzige Peptoid mit zwei Mlys Monomeren, was die Hydrophilie des Peptoids erhöht. Demnach liegt es im Vergleich zu den anderen Peptoiden am besten in wässriger Lösung vor und kann so besser mit den Thiolgruppen der Nanogelee interagieren. Die Peptide P26, P28 und P58

weisen jeweils ein Nlys Monomer auf und besitzen mit um die 140  $\mu\text{M}$  gekuppelter Peptoid Konzentration die zweistärkste Kupplungseffizienz, während das P6, P8 und P56 mit um die 100  $\mu\text{M}$  durch ihren hydrophoben Charakter etwas schlechter kuppelten. P22 und P95 zeigen mit Konzentrationswerten um die 60  $\mu\text{M}$  die schlechteste Kupplungseffizienz. Dabei besitzt P22 als einziges Peptoid drei Npcb Gruppen. Diese scheinen die Löslichkeit des Peptoids stark herunterzusetzen, wodurch die Reaktion mit dem hydrophilen Nanogel erschwert wird. Da P95 keine Propargylgruppe besitzt, ist hier eine Kupplung des Peptoids nicht möglich, wodurch die gemessene Absorption durch das Interkalieren des Peptoids in das Nanogel zu erklären ist. Die Ergebnisse der Absorptionsmessung konnten ebenfalls visuell über die Pinkfärbung der Nanogele beobachtet werden (Abbildung 70).

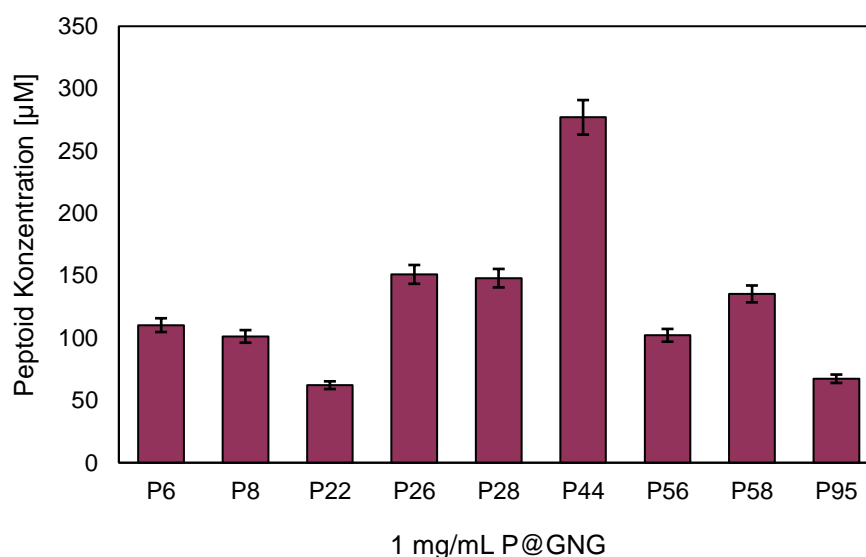


Abbildung 69: Kupplungskapazität von P@GNG für verschiedene Peptoide. Die Kupplung fand mit 15 mM Peptoid (Ausnahme P8 mit 9 mM) und 0,03 % LAP bei 0,5 W/cm<sup>2</sup> UV- Belichtung (320 – 500 nm) im Abstand von 3 cm für 1 min statt. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt, n = 3.

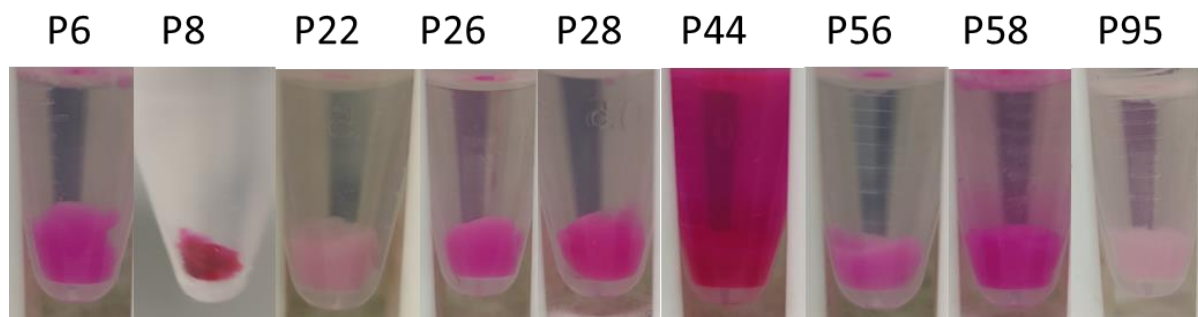


Abbildung 70: Lichtbildaufnahmen der Nanogele nach Kupplung der verschiedenen Peptoide. Abgebildet ist das Pellet der P@GNG nach der Aufreinigung und Suspendierung in 1 mL 1xDPBS<sup>-</sup>.

### 3.2.13 Bestimmung der Ladungskapazität von GNG

Nach erfolgreicher Peptoidkupplung sollte die Effizienz der Wirkstoffbeladung (engl. *drug loading efficiency*: DLE) von P@GNG mit den Wirkstoffen Doxorubicin und Dopamin untersucht werden (Abbildung 71). Hierbei wurde der *Nanocarrier* zum einen als Wirkstofftransporter für die Chemotherapie von Doxorubicin getestet und zum anderen für den Einsatz als Transportsystem für Dopamin zur Behandlung der Parkinson-Krankheit.

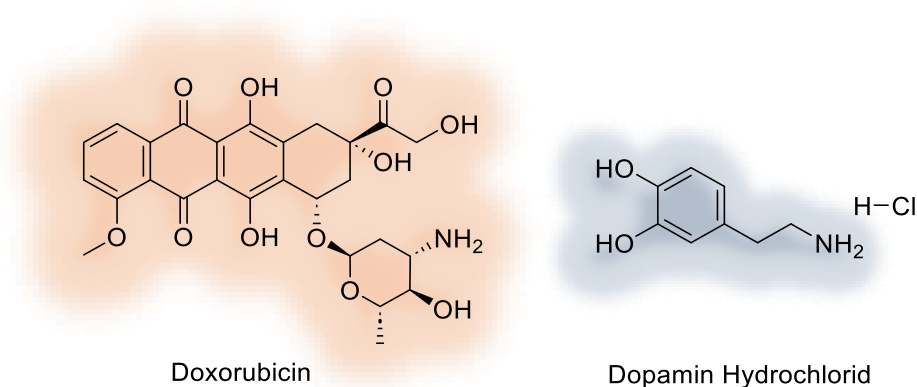


Abbildung 71: Strukturformeln von Doxorubicin und Dopamin Hydrochlorid.

Das Zytotoxin Doxorubicin wurde bisher für die Behandlung von Krebserkrankungen wie Leukämie, Lymphom sowie Brustkrebs, Lungenkrebs und Schilddrüsenkrebs eingesetzt. Es wird intravenös verabreicht, da es bei einer oralen Gabe zur sauren Hydrolyse im Magen oder zur Ausscheidung durch das P-Glykoprotein im Darm kommt und somit bei dieser Applikationsart nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit besteht. Ebenfalls verursacht Doxorubicin bei der intravenösen Gabe oft kardiotoxische Nebenwirkungen, wodurch es nur in geringen Mengen verabreicht werden kann.<sup>[252]</sup> Durch den Transport über das Nanogel P@GNG soll nun die Biokompatibilität und der Einsatzbereich von Doxorubicin erweitert werden. So wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit einer Ansteuerung des intestinalen Traktes durch die Kupplung der Darmspezifischen Peptide P44 oder P1 anvisiert.

*Nanocarrier* kommen nicht nur für eine Krebstherapie in Frage, auch können Therapien für andere Krankheiten durch *Nanocarrier* verbessert werden. Hierzu zählt zum Beispiel die Parkinson-Krankheit. Bei der Parkinson-Krankheit fehlt es an dem Botenstoff Dopamin im Gehirn, wodurch Nervenreize schlechter übertragen werden können und dadurch unter anderem Bewegungsstörungen auftreten. Da Dopamin jedoch nicht die Blut-Hirn-Schranke durchdringen kann, werden Dopaminvorstufen wie Levodopa verabreicht, um den Mangel an

Dopamin auszugleichen. Levodopa kann im Gegensatz zu Dopamin die Blut-Hirn-Schranke durchdringen und wird anschließend zu Dopamin metabolisiert. Jedoch zeigen viele Patienten nach mehreren Jahren Levodopa-Einnahme viele Nebenwirkungen wie Verhaltensänderungen, Motorische Verlangsamung oder neurotoxische Effekte, die mit der Zeit, den Symptomen der Krankheit, überwiegen.<sup>[253]</sup> Wäre ein Transport von Dopamin jedoch spezifisch durch die Blut-Hirn-Schranke möglich, könnte Dopamin direkt zu den Neuronen transportiert werden, um bei einer Therapie Nebenwirkungen zu minimieren. Für den Transport durch die Blut-Hirn-Schranke soll die Kupplung des Peptoid P8 an das Nanogel untersucht werden, da dieses in vorherigen Arbeiten eine Akkumulation in Nervenzellen des olfaktorischen Systems sowie im Hirn von Zebrafischen zeigte<sup>[59]</sup> und somit hervorragende Grundvoraussetzungen für den Transport für Dopamin in das zentrale Nervensystem bietet.

Die Beladung der Nanogelee fand nach der GNG-Synthese und Peptoidmodifikation durch die Bindung der Wirkstoffe über Van-der-Waals-Kräfte (VdWK) im Nanogel statt.<sup>[26,253]</sup> Beladene Nanogelee werden im Folgenden mit GNG[Wirkstoff] deklariert. Für die Beladung wurden, wie in Kapitel 5.2.1.12 beschrieben, 20 mg/mL Nanogelee für 24 h in 5 mg/mL Wirkstoff gelöst und unter Rühren quellen gelassen (Abbildung 72, rechts). Anschließend wurden die Nanogelee aufgereinigt und ihre Ladungskapazität photometrisch bestimmt (Abbildung 72, links). Bei der Beladung der Nanogelee mit Dopamin fiel auf, dass diese sich während der Synthese schwarz verfärbten (Abbildung 72, P@GNG[DOP]). Dies liegt an der Polymerisation des Dopamins, wodurch eine dünne Polydopamin-Schicht um die Nanogelee gebildet wird.<sup>[254-256]</sup> Trotzdem können die Polydopamin-modifizierten Nanogelee weiterhin für die Behandlung der Parkinson-Krankheit eingesetzt werden, da auch, wie andere Studien zeigen, Polydopamin den für die Behandlung nötigen Dopaminrezeptor der Neuronen aktivieren kann.<sup>[257,258]</sup> Die Nanogelee GNG zeigten mit einer Beladung von etwa 50 % des eingesetzten Wirkstoffes die höchste Beladungseffizienz (Abbildung 72, links), während die mit Peptoid-modifizierten Nanogelee P@GNG eine etwas niedrigere Beladungseffizienz von Doxorubicin mit nur 37 % und Dopamin mit 47 % aufwiesen. Hierbei zeigten die Peptoidmodifizierten Nanogelee eine um 10 % effizientere Beladung von Dopamin. Da die Wirkstoffe auch über Schwefel-Wasserstoff-Bindungen an die Nanogelee binden können<sup>[259]</sup>, sind bei den mit Peptoid funktionalisierten Nanogelen mehr Bindungsstellen durch die Peptoide blockiert und weniger Wirkstoff kann somit am Nanogel binden. Da zudem, wie zuvor analysiert, mehr P44 an das Nanogel kuppeln

kann als P8, sind für das P44@GNG[DOX] weitaus weniger Bindungsstellen vorhanden, wodurch hier ebenfalls die Beladungseffizienz im Vergleich zum P8@GNG[DOP] niedriger ausfällt. Im Vergleich zur Ladungseffizienz anderer Nanogelen der Literatur wie etwa mit 52,5 % von DOX-GelMA NG<sup>[26]</sup> oder 16,88 % von DOX-PCL-Nanokapseln<sup>[260]</sup>, zeigen die in dieser Arbeit entwickelten Nanogele eine vergleichbar gute Effizienz.

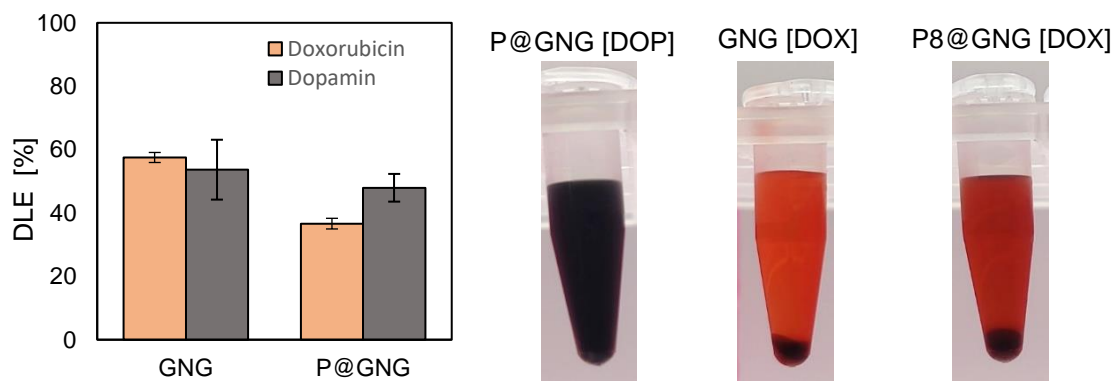


Abbildung 72: Links: Wirkstoffbeladungseffizienz von je 20 mg/mL GNG und P8/44@GNG Nanogelen mit je 5 mg/mL Dopamin (P8@GNG[DOP]) und Doxorubicin (P44@GNG[DOX]). Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ . Rechts: Lichtbildaufnahmen der Nanogel-Beladung während der Inkubation mit den Wirkstoffen Dopamin (schwarz) und Doxorubicin (orange).

### 3.2.14 Analyse der Wirkstofffreisetzung von GNG

Eine hohe Landungskapazität führt jedoch nicht automatisch zu einer guten Wirksamkeit der Nanogele, hierfür ist die Wirkstofffreisetzung von großer Bedeutung. Ein häufiges Problem von *Nanocarriern* ist ihre frühzeitige und unkontrollierte Abgabe des Wirkstoffes.<sup>[223]</sup> Da die Nanopartikel einige Zeit brauchen, um an ihrem Zielort anzukommen, ist es wichtig, dass der Großteil des Wirkstoffes nicht gleich zu Beginn vom Nanogel freigesetzt wird. Wie sich die Wirkstofffreisetzung der P@GNG Nanogele verhält, wurde an den mit Doxorubicin beladenen P44@GNG[DOX] Nanogelen photometrisch untersucht (Abbildung 73).

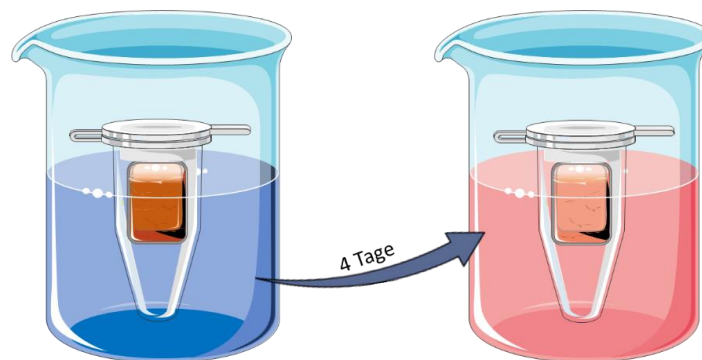


Abbildung 73: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung von P44@GNG[DOX]. 2 mg/mL P44@GNG[DOX] wurden in 1 mL Dialyse-Tubes, gelöst in DPBS<sup>-/-</sup> oder Acetatpuffer (pH 4,5) oder mit 1 mg/mL Kollagenase in DPBS<sup>-/-</sup>, für 4 Tage gegen 30 mL DPBS<sup>-/-</sup> bei 37 °C dialysiert.

2 mg/mL Nanogel wurde auf die Wirkstofffreisetzung durch Diffusion, pH-Wert Senkung und enzymatische Degradation durch Kollagenase über einen Zeitraum von 4 Tagen untersucht (Abbildung 74). Für die Auswertung wurde zu bestimmten Zeiten 1 mL Dialysat entnommen und dessen Doxorubicin-Konzentration über ein Photometer bei 480 nm bestimmt. In den ersten Stunden des Versuches fand die initiale Freisetzung des Wirkstoffes statt.<sup>[26]</sup> Hier wurden rund 10 % des Wirkstoffes bei allen untersuchten Freisetzungsmethoden einheitlich abgegeben. Ab einem Zeitraum von 24 h ist allerdings ein Unterschied zwischen den Methoden wahrnehmbar. Die Freisetzung durch eine Senkung des pH-Wertes nimmt ab hier langsam zu, noch stärker ist diese bei der enzymatischen Degradation durch Kollagenase zu beobachten, während bei einem Puffer mit neutralem pH-Wert kaum noch Wirkstoff freigesetzt wurde. Durch die Senkung des pH-Wertes liegen die Amino- und Carboxylgruppen des Nanogels und die primären Aminogruppen von Doxorubicin protoniert vor, wodurch die Interaktion der beiden Moleküle verringert wurde und der Wirkstoff freigesetzt werden kann.<sup>[26]</sup> Nach 94 h wurden bei einem pH-Wert von 7,4, rund 60 % des Wirkstoffes aus dem Nanogel freigesetzt. Die Senkung des pH-Wertes führte sogar zu einer Wirkstofffreisetzung von bis zu 83 %, wobei die enzymatische Degradation über Kollagenase lediglich 72 % des Wirkstoffes aus dem Nanogel freisetzte. Da die Kollagenase jedoch bereits nach 24 h an Reaktivität verliert,<sup>[261]</sup> könnte hier noch eine Steigerung der Freisetzung durch wiederholte Zugabe an Enzym erreicht werden. Die Freisetzung des Wirkstoffes über eine pH-Senkung ist jedoch von besonderer Bedeutung, da hier die spezifische Freisetzung in Tumorgeweben erreicht werden kann.<sup>[52]</sup> Die Mikroumgebung von Tumoren ist nämlich aufgrund schlechter Perfusion und metabolisch hoher Aktivität oft hypoxisch und sauer.<sup>[262]</sup> Diese Eigenschaften

können somit vom P@GNG[DOX] ausgenutzt werden, um eine hohe Wirkstofffreisetzung im Tumorgewebe zu erreichen und, um Nebenwirkungen durch eine Wirkstofffreisetzung in gesundem Gewebe, zu verringern.

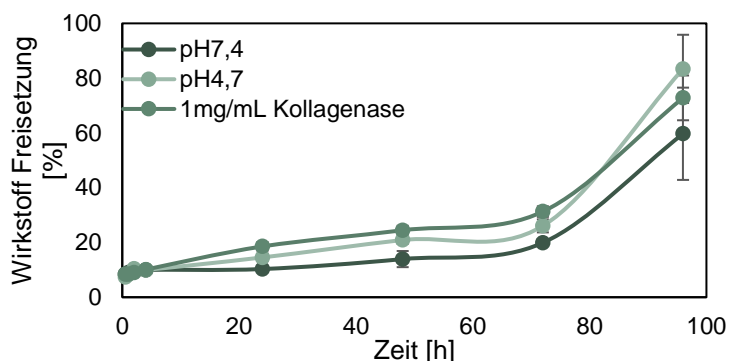


Abbildung 74: Wirkstofffreisetzung von P44@GNG[DOX] Nanogelen über den Zeitraum von 4 d. 2 mg/mL P44@GNG[DOX] wurden in 1 mL Dialyse-Tubes mit DPBS<sup>-/-</sup> pH 7,4 oder Acetatpuffer (pH 4,5) oder mit 1 mg/mL Kollagenase in DPBS<sup>-/-</sup> gegeben und für 4 d gegen DPBS<sup>-/-</sup> bei 37 °C dialysiert. Proben wurden nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h entnommen und ihre Absorption bei 480 nm gemessen.

### 3.2.15 *In vitro* Charakterisierung von P@GNG in 2D-Zellkulturen

Nach erfolgreicher chemischer und physikalischer Charakterisierung der Nanogelee, sollte nun ihre Wirkung an biologischen Organismen evaluiert werden. Durch die Untersuchung des Verhaltens von *Nanocarriern* in Zellkulturmodellen, können erste Anhaltspunkte über ihre Aufnahme, Toxizität und Akkumulation *in vitro* gewonnen werden.<sup>[263,264]</sup> Auf diese Eigenschaften sollten nun die P@GNG Nanogelee charakterisiert werden. Um einen guten Einblick zu gewinnen, wurden für die Experimente verschiedene Zelllinien mit charakteristischen Eigenschaften ausgewählt. So wurde für 2D-Zellkulturmodelle die humane Gebärmutterhalskrebs Zelllinie HeLa verwendet, da es sich hierbei um die erste und bekannteste permanente humane Zelllinie handelt und somit bereits viele Vergleichsstudien existieren.<sup>[265]</sup> Dadurch eignen sich HeLa Zellen besonders um erste Einblicke in die biologische Charakterisierung der Nanogelee zu gewinnen. Zum Vergleich wurde die humane Leberkrebs Zelllinie HepG2 verwendet. Sie eignet sich durch ihr ausgeprägtes Clustern besonders für die Kultivierung von 3D-Zellkulturen.<sup>[266]</sup> Da die P44@GNG[DOX] Nanogelee zudem für den Wirkstofftransport in den Darm vorgesehen sind, wurden auch Untersuchungen an der Darmkrebszelllinie Caco-2 durchgeführt. Caco-2 Zellen neigen dazu polarisierte 3D-Strukturen zu bilden die ein Lumen aufweisen und somit einer epithelialen Barriere ähneln.<sup>[267,268]</sup> So können erste Anhaltspunkte über die Penetration der Nanogelee im Darm gewonnen werden.

### 3.2.15.1 Aufnahme und Akkumulation von GNG in 2D-Zellkulturen

Die Aufnahme und Akkumulation der P@GNG Nanogeles und der dazugehörigen freien Peptide (P6-P95) wurden zunächst in 2D-Zellkulturmolellen untersucht. Hierfür wurden  $10^4$  Zellen pro Well eines 8-Well ibidi *Slides* ausgesät und nach 24 h Kultivierung, für weitere 24 h mit 100 µg/mL Nanogel oder 10 µM Peptoid inkubiert. Für eine bessere Einschätzung der organellspezifischen Akkumulation der Peptide wurden die Mitochondrien der Zellen vor dem Mikroskopieren mittels MitoTracker™ Green fluoreszent markiert. Ebenfalls wurde die DNA der Zellen mit dem Fluorophor Hoechst33342 markiert. Die mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 75, Abbildung 76) wurden über ein konfokales Fluoreszenzmikroskop (Leica Stellaris 5) erzeugt, wobei die Zellkerne blau, die Mitochondrien grün und die Peptide rot abgebildet wurden. Eine Akkumulation der Peptide in den Mitochondrien resultierte in einer Überlagerung der Floreszenzen, die in Orange zu sehen ist. Die mikroskopischen Aufnahmen der Anregung von 543 nm für die Visualisierung des Rhodamin Bs der Peptide zeigen, dass alle untersuchten Peptide in die Zelle aufgenommen werden. Zudem kann durch die Überlagerung der Bilder festgestellt werden, dass die hydrophoben Peptide P6, P8, P56 und P95 in den Mitochondrien akkumulieren. Die hydrophileren Peptide P26, P28, P44 und P58 hingegen wurden in den Endosomen detektiert, was daran zu erkennen ist, dass bei der Überlagerung der Fluoreszenzbilder von Rhodamin B und MitoTracker™ Green keine orange Färbung zu erkennen ist. Ebenfalls weist die Ansammlung der hydrophilen Peptide in Vesikeln um den Zellkern auf eine endosomale bzw. lysosomale Akkumulation hin. Allein das Peptoid P22 zeigte eine ubiquitäre Verteilung in der Zelle, ebenfalls kann hier eine Veränderung der Mitochondrien beobachtet werden, da auch der MitoTracker™ ubiquitär in der Zelle verteilt ist. Dies spricht für eine starke Toxizität des Peptoids P22. Dass kleine hydrophobe Moleküle die Membran der Mitochondrien penetrieren, ist bereits bekannt, da hydrophobe Moleküle mit der Doppelschicht der mitochondriellen Membran assoziieren können und sie so schädigen.<sup>[269]</sup> Ein Transport von Wirkstoffen in die für die Zelle lebensnotwendigen Mitochondrien kann die toxische Wirkung von Molekülen somit stark erhöhen.<sup>[270]</sup>

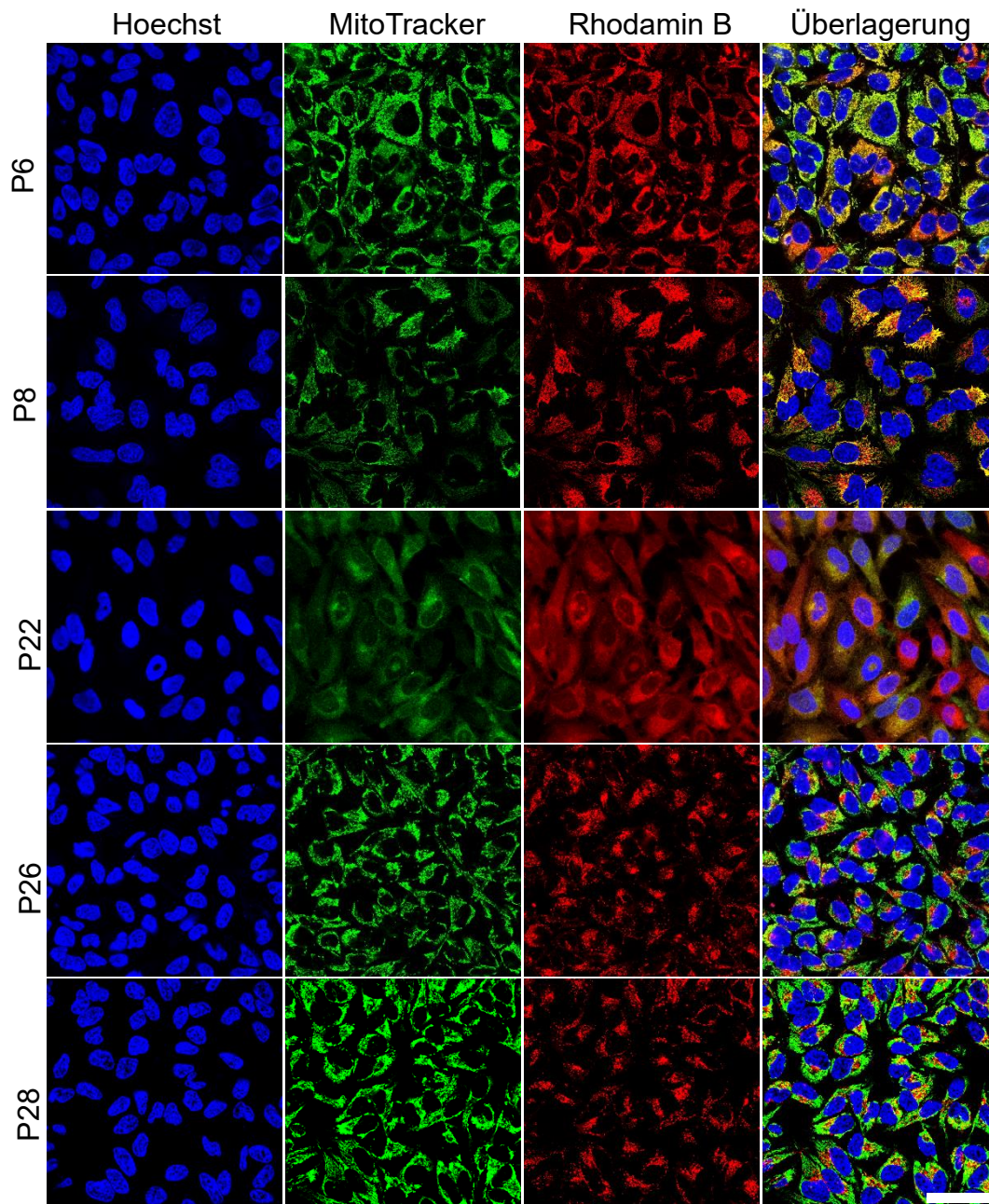


Abbildung 75: Konfokalmikroskopie der Lokalisation von Peptoiden in HeLa Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit  $10\ \mu\text{M}$  Peptoid erstellt. Nicht behandelte HeLa Zellen dienen als Negativkontrolle (Abbildung 76). Hoechst33342 ( $2\ \mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. MitoTracker™ Green ( $125\ \text{nM}$ ) dient zur Markierung der Mitochondrien. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33343 in Blau ( $\lambda_{\text{exc}} = 405\ \text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 450\ \text{nm}$ ), MitoTracker™ Green in Grün ( $\lambda_{\text{exc}} = 490\ \text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550\ \text{nm}$ ) und Peptoid in Rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543\ \text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 750\ \text{nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab:  $30\ \mu\text{m}$ .

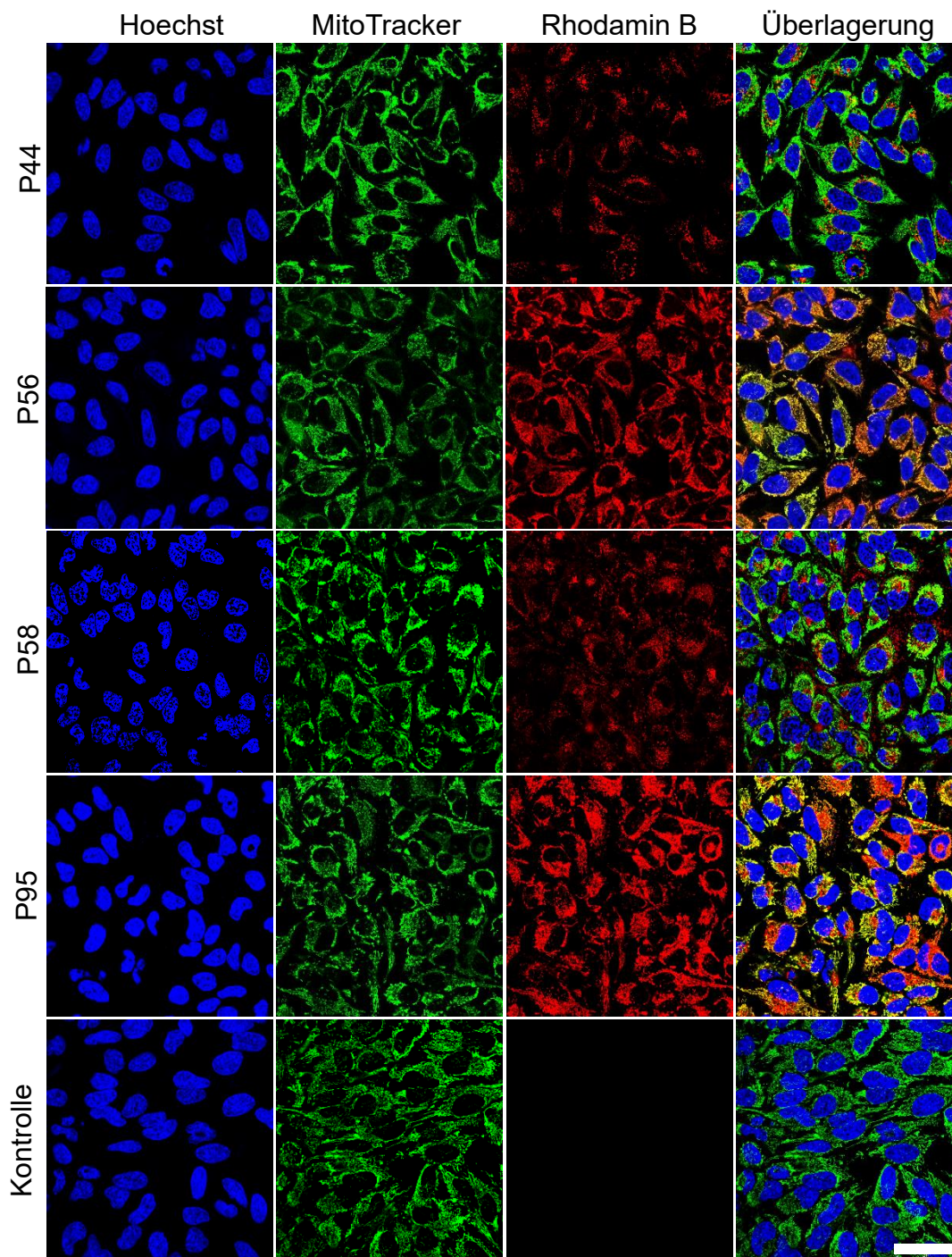


Abbildung 76: Konfokalmikroskopie der Lokalisation von Peptoiden in HeLa Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Peptoid erstellt. Nicht behandelte HeLa Zellen dienen als Negativkontrolle. Hoechst33342 (2  $\mu$ g/mL) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. MitoTracker™ Green (125 nM) dient zur Markierung der Mitochondrien. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33342 in Blau ( $\lambda_{exc} = 405$  nm,  $\lambda_{em} = 410 - 450$  nm), MitoTracker™ Green in Grün ( $\lambda_{exc} = 490$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 550$  nm) und Peptoid in Rot ( $\lambda_{exc} = 543$  nm,  $\lambda_{em} = 585 - 750$  nm), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 30  $\mu$ m.

Nanopartikel werden aufgrund ihrer Größe meist über Endozytose aufgenommen, und lokalisieren dadurch endosomal.<sup>[271]</sup> Über die Oberflächenmodifikation der Nanogelee mittels

Peptoid, sollte ihre Lokalisation in andere Zellorganelle ermöglicht werden. Bei der Auswertung der Nanogelakkumulation in der 2D-Zellkultur wurde besonderes Augenmerk daraufgelegt, ob die Funktionalisierung mit Peptoiden die Akkumulation der Nanogele veränderte. Somit wäre zu erwarten, dass Nanogele deren Oberflächen mit den mitochondrial akkumulierenden Peptoide P6, P8 und P56 modifiziert wurden ebenfalls eine mitochondriale Lokalisation aufweisen. Bei der Mikroskopie von P@GNG auf HeLa Zellen konnte bei den meisten Nanogelen keine Co-Markierung mit MitoTracker™ Green durchgeführt werden, da die Fluoreszenzintensität der gekuppelten Peptoide zu schwach ausgeprägt war (Abbildung 77, Abbildung 78). Dies führte aufgrund der Teilüberlappung der Extinktions- und Emissionsspektren von MitoTracker™ Green und Rhodamin B dazu, dass die Fluoreszenzsignale nicht mehr eindeutig getrennt werden konnten. Somit wurde die Mikroskopie der Nanogele ohne Co-Markierung mit MitoTracker™ Green durchgeführt und die Lokalisation der Nanogele über die typische Morphologie der Mitochondrien<sup>[272]</sup> und Endosomen<sup>[273]</sup> bestimmt. Die Nanogele P8@GNG und P44@GNG zeigten ausreichend starke Fluoreszenz, wodurch hier eine Co-Markierung mit MitoTracker™ Green durchgeführt werden konnte (Abbildung 79).

Die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen der HeLa Zellen zeigt eine mögliche mitochondriale Akkumulation von P8@GNG und P56@GNG (Abbildung 77, Abbildung 78, Abbildung 79). Die detektierte Fluoreszenz in den Mitochondrien könnte jedoch auch durch abgespaltene Peptoid-Fragmente verursacht worden sein, was durch die Ergebnisse dieses Versuchs noch nicht eindeutig beurteilt werden kann. Das Nanogel P6@GNG konnte jedoch nicht wie erhofft spezifisch in die Mitochondrien transportiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch eine teilweise mitochondriale Anlagerung von P22@GNG. Da das Peptoid kaum an die Nanogele gebunden hatte, war hier eine Fluoreszenz nicht zu erwarten. Die Ergebnisse des freien P22 (Abbildung 75) zeigten jedoch eine starke Penetration der Zelle, was eventuell auch auf das Nanogel P22@GNG übertragen wurde, wodurch hier die Aufnahme der Nanogele erhöht und eine Fluoreszenz detektiert werden kann. Alle anderen modifizierten Nanogele akkumulierten wie auch ihr gekuppeltes Peptoid in den Endosomen. Nur bei P95@GNG ist keine Fluoreszenz zu detektieren, was ebenfalls dafürspricht, dass Peptoide ohne Propargylamin-Seitenkette nicht an die Nanogele binden.

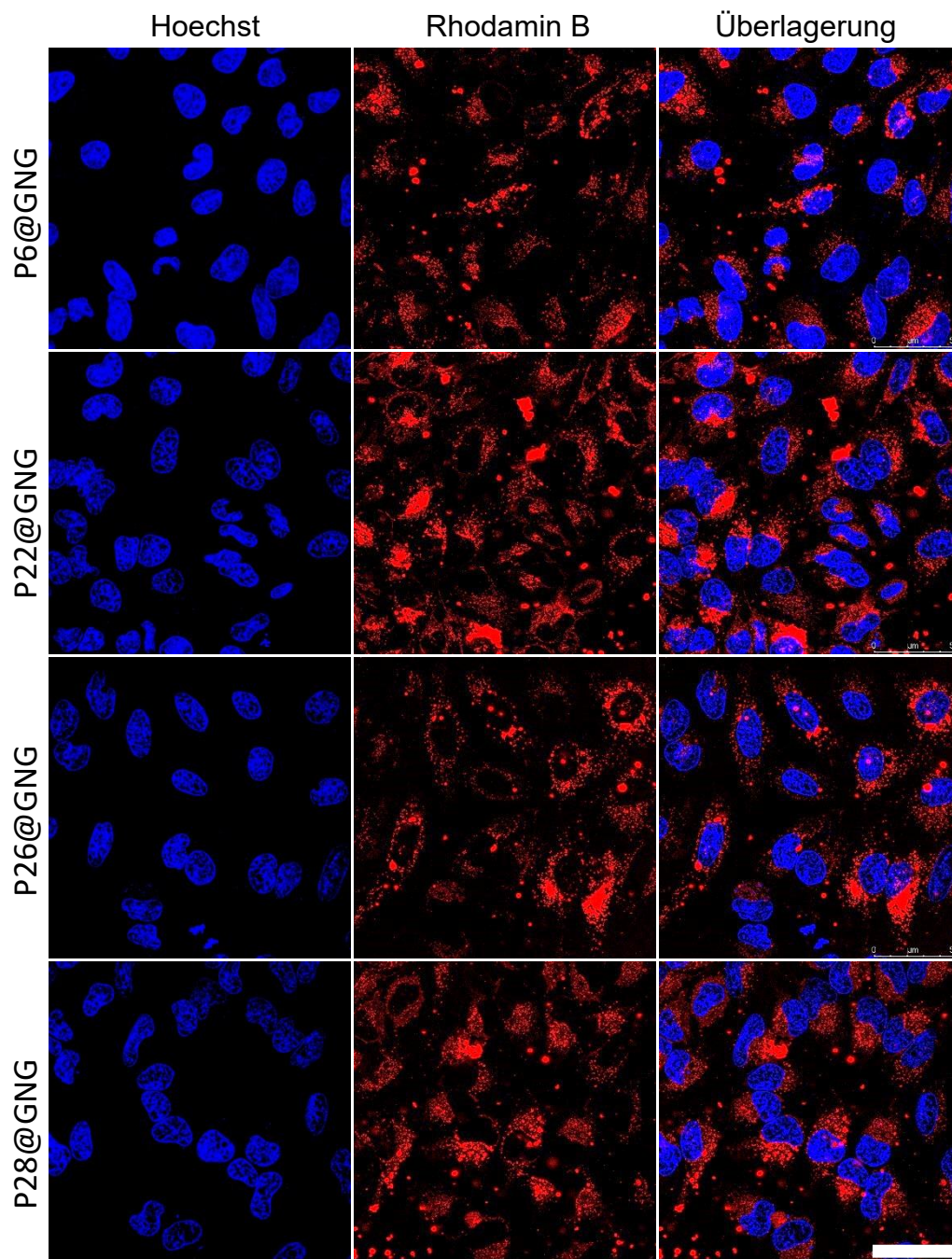


Abbildung 77: Konfokalmikroskopie der Lokalisation von P@GNG in HeLa Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 100  $\mu\text{g/mL}$  P@GNG erstellt. Nicht behandelte HeLa Zellen dienen als Negativkontrolle (Abbildung 78). Hoechst33342 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33343 in Blau ( $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 450 \text{ nm}$ ) und P@GNG in Rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .

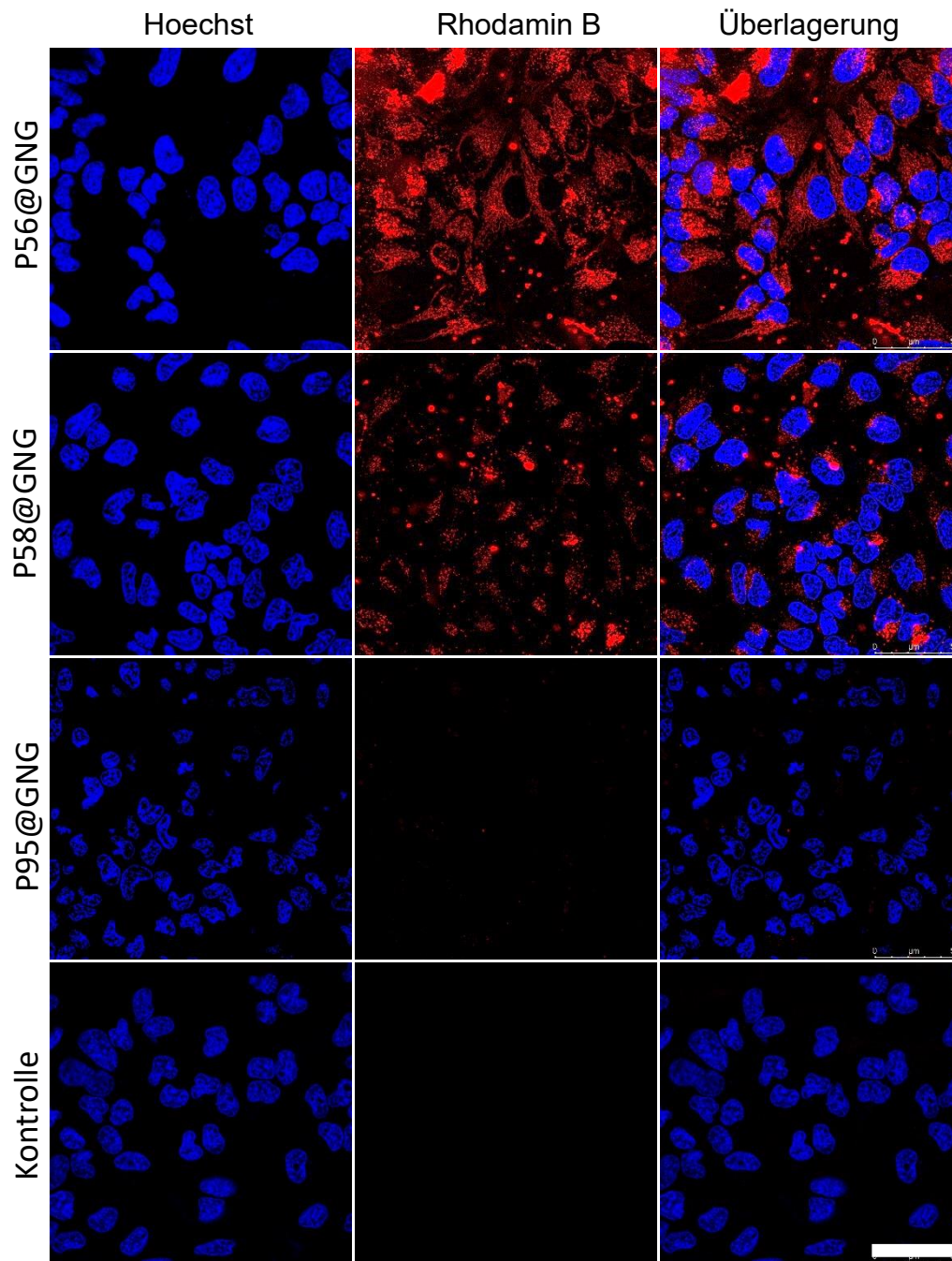


Abbildung 78: Konfokalmikroskopie der Lokalisation von P@GNG in HeLa Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 100  $\mu\text{g/mL}$  P@GNG erstellt. Nicht behandelte HeLa Zellen dienen als Negativkontrolle. Hoechst33342 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33342 in Blau ( $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 450 \text{ nm}$ ) und P@GNG in Rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .

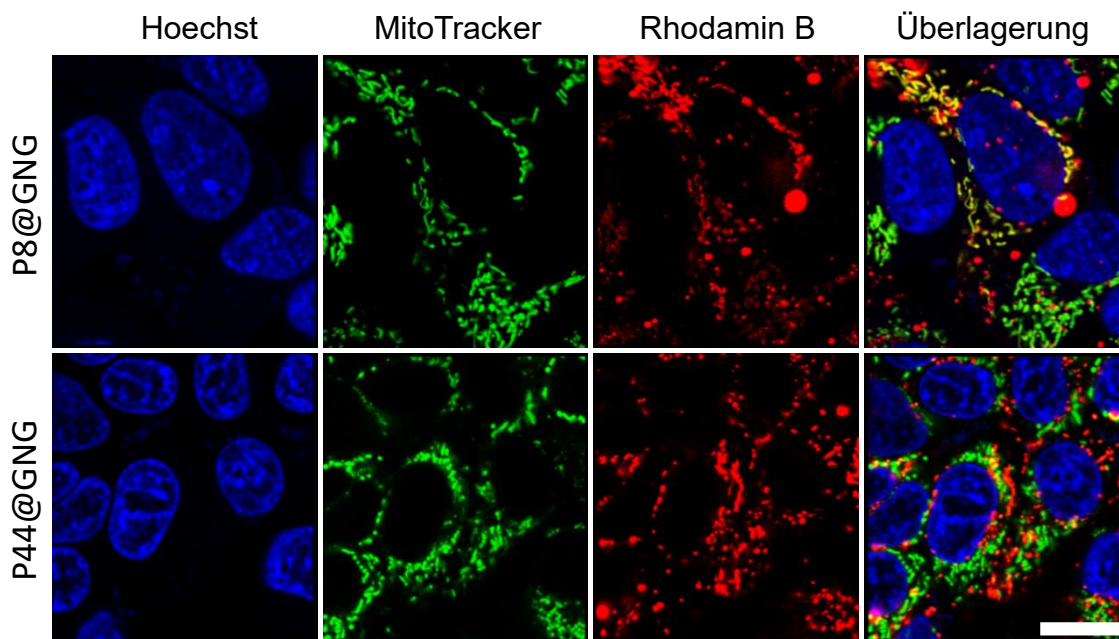


Abbildung 79: Konfokalmikroskopie der Lokalisation von P@GNG in HeLa Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 100  $\mu\text{g/mL}$  P@GNG erstellt. Hoechst33342 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. MitoTracker™ Green (125 nM) dient zur Markierung der Mitochondrien. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33343 in Blau ( $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 450 \text{ nm}$ ), MitoTracker™ Green in Grün ( $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$ ) und P@GNG in Rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Um zu sehen, ob die erhöhte Kupplungseffizienz der Nanogeles durch die Thiolierung auch über die Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann, wurden HepG2 Zellen für 24 h mit 100  $\mu\text{g/mL}$  P8@GNG mit und ohne Thiolierung, sowie freies P8 (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und wie zuvor beschrieben über konfokale Mikroskopie untersucht (Abbildung 80). Alle Aufnahmen wurden mit denselben Einstellungen erstellt. Die Ergebnisse zeigen eine deutlich ausgeprägtere Fluoreszenz der thiolierten Nanogeles und vergleichbar intensiv, wie die des freien Peptoids. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzintensität von nicht thioliertem P8@GNG deutlich schwächer. Somit konnte auch visuell die Erhöhung der Kupplungseffizienz der Nanogeles durch eine Thiolierung nachgewiesen werden.

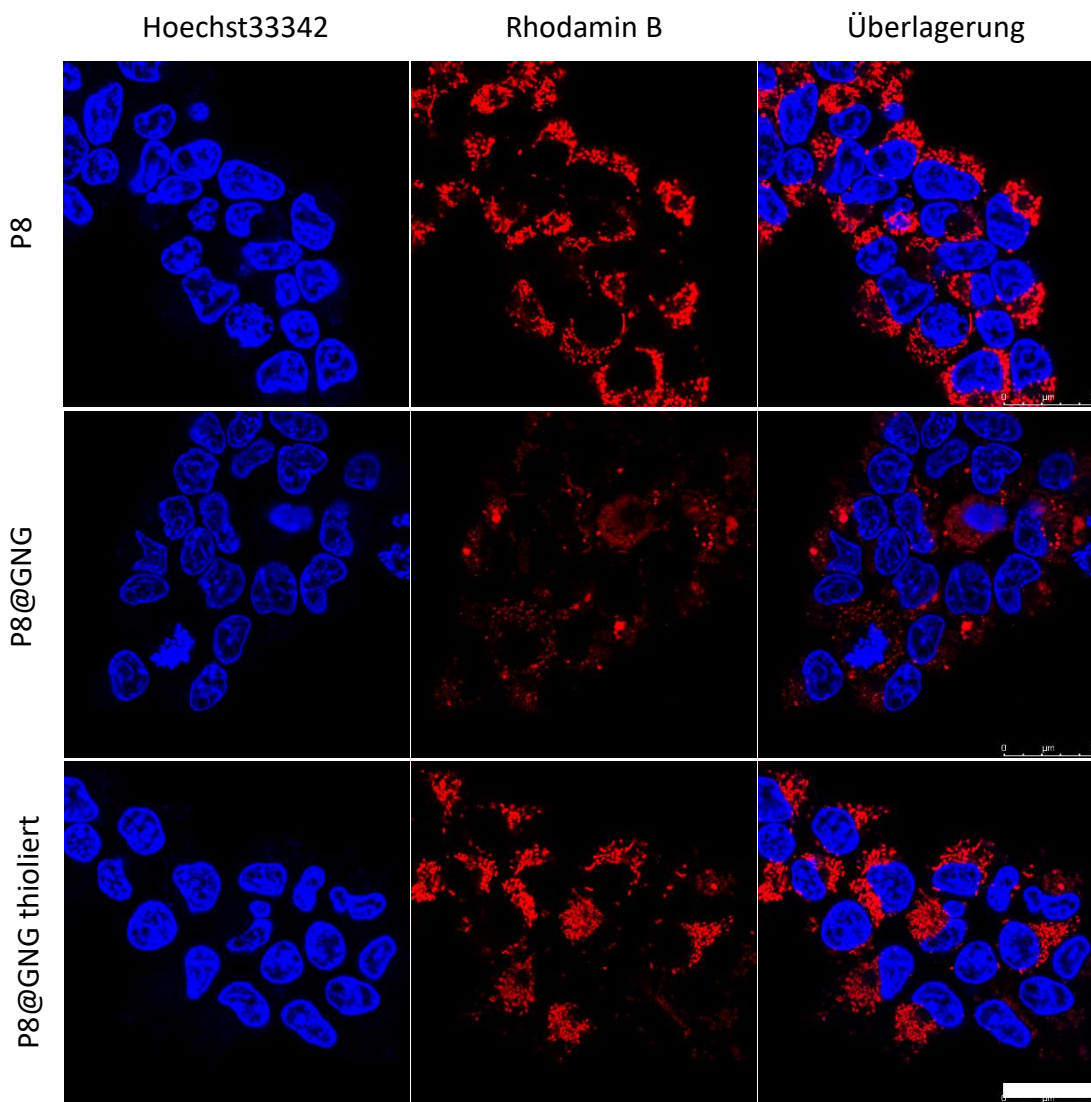


Abbildung 80: Konfokalmikroskopie zur Lokalisation von P8@GNG in HepG2 Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 100 µg/mL P8@GNG ± Thiolierung und 10 µM P8 erstellt. Hoechst33342 (2 µg/mL) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33342 in Blau ( $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410 - 450 \text{ nm}$ ) und P8@GNG bzw. P8 in Rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 25 µm.

Um nun auch das Targeting der P8@GNG visuell beurteilen zu können, wurden die Nanogelee mit fluoreszierenden Molekülen unterschiedlicher Massen beladen, um nachzuweisen, dass es sich hier immer noch um ganze Nanopartikel handelt und nicht um freigesetzte Peptide. Da durch den vorherigen Versuch (Abbildung 80) anzunehmen ist, dass das Peptoid P8 das Nanogel in die Mitochondrien der Zellen transportieren kann, sollte durch Co-Fluoreszenz des Rhodamin Bs an den Peptoid modifizierten Nanogeloberflächen und des zweiten Fluorophors des beladenen Moleküls ein erfolgreicher Transport des gesamten Nanopartikels in die Mitochondrien nachgewiesen werden. Da Mitochondrien für eine Vielzahl an

Zellüberlebenswichtigen Aufgaben wie Energieerzeugung, Bildung der Bausteine wie Lipide Proteine und Nukleinsäuren verantwortlich ist, kann eine Dysfunktion viele Krankheiten verursachen, die von Herz-Kreislauferkrankungen bis hin zu Krebs reichen. Ein gezielter Transport von Wirkstoffen in die Mitochondrien würde deshalb eine Fülle an neuer Therapeutischer Ansätze bieten.<sup>[274]</sup> Als zu transportierende Moleküle wurden das Fluorophor CellTracker™ Deep Red (650 g/mol), das Peptoid P171 aus den hydrophilen Submonomeren Nlys-Nlys-Nlys-Nlys-RhdB (954,69 g/mol) und das größte Molekül Dextran-Alexa Fluor™ 647 (10 kg/mol) untersucht. Alle Moleküle sind stark hydrophil und wurden während der Nanogelsynthese in die wässrige Phase der Mikroemulsion hinzugefügt.<sup>[199]</sup>

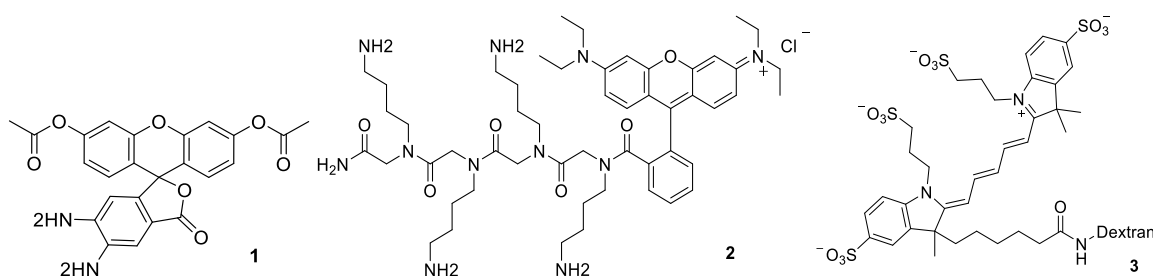


Abbildung 81: Strukturformeln der für den Transportnachweis von P8@GNG verwendeten Fluorophore. 1) CellTracker™ Deep Red (650 g/mol). 2) P171 (954,69 g/mol). 3) Dextran-Alexa Fluor™ 647 (10 kg/mol).



Abbildung 82: GNG[Fluorophor] Mikroemulsion nach der Synthese. GNG[CellTracker™ Deep Red] (Links), GNG[P171] (Mitte) und GNG[Dextran-Alexa Fluor™ 647] (Rechts).

Für die Untersuchung der Transportfähigkeit von Gelatine-basierten Nanogelen wurden HepG2 Zellen 14 h mit 100 µg/mL P8@GNG[Fluorophor] inkubiert und anschließend wie zuvor beschrieben mikroskopiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit freien Molekülen inkubiert, um den Unterschied der Zellakkumulation mit und ohne *Nanocarrier* beurteilen zu können. Freier, gelöster CellTracker™ Deep Red kann durch die Zellmembran diffundieren, wo es durch Esterasen zum fluoreszierenden Produkt hydrolysiert wird das durch Bindung an

intrazelluläre thiolhaltigen Biomolekülen in ein zellundurchlässiges Reaktionsprodukt umgewandelt wird.<sup>[275]</sup> Wie auch in den Aufnahmen der HepG2 Zellen zu erkennen, verteilt sich der freie CellTracker™ in der ganzen Zelle (Abbildung 83). Wird er aber über den Nanopartikel in die Zelle transportiert, ist die Lokalisation der CellTracker™ Fluoreszenz nur noch in den Endosomen zu erkennen und überlagert sich hier zum Teil mit dem Rhodamin B Signal des Nanogels (Abbildung 83, P8@GNG[CT] Überlagerung). Das Signal des Nanogels ist jedoch auch in den Mitochondrien zu detektieren, wohingegen der CellTracker™ hier keine Fluoreszenz zeigt. Da der CellTracker™ in der Zelle zunächst metabolisiert werden muss, um ein starkes Fluoreszenzsignal auszubilden und dies in den Mitochondrien vermutlich nicht passieren kann, besteht die Möglichkeit, dass dadurch das Signal des CellTrackers™ hier nicht detektiert werden kann.

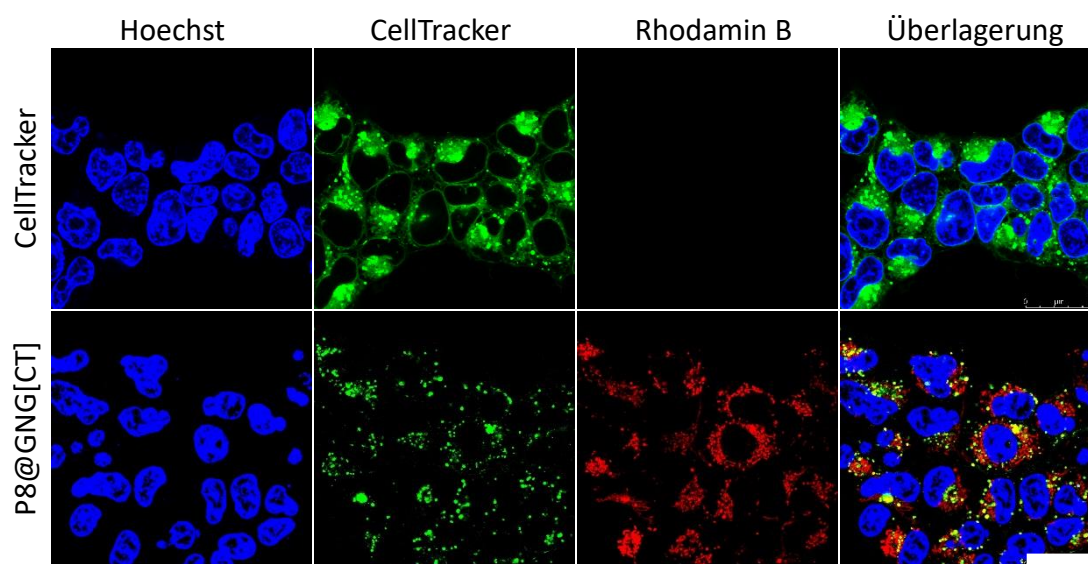


Abbildung 83: Konfokalmikroskopie zur Lokalisation von P8@GNG[CellTracker™Deep Red] und freiem CellTracker™Deep Red in HepG2 Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 200 µg/mL P@GNG und CellTracker™Deep Red (125 nM) erstellt. Hoechst33342 (2 µg/mL) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33342 in Blau ( $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410 - 450 \text{ nm}$ ), CellTracker™ Deep Red in Grün ( $\lambda_{exc} = 653 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660 - 840 \text{ nm}$ ) und P8@GNG in Rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 25 µm.

Bei der Betrachtung der Mikroskopieaufnahmen von P171, wird der Transport von unmodifiziertem Nanogel (GNG[P171]) mit dem von P8 modifiziertem Nanogel (P8@GNG[P171]) verglichen (Abbildung 84). Deutlich zu erkennen ist auch hier der Transport des unmodifizierten Nanogels (GNG[P171]) in die Endosomen der Zelle, während die Nanogelee die mit P8 gekuppelt wurden (P8@GNG[P171]) in die länglichen Mitochondrien<sup>[272]</sup>

der Zelle akkumulieren. Da die Peptoide P171 und P8 beide mit dem Fluorophor Rhodamin B markiert wurden, kann keine eindeutige Aussage über einen spezifischen Transport von P171 getroffen werden.

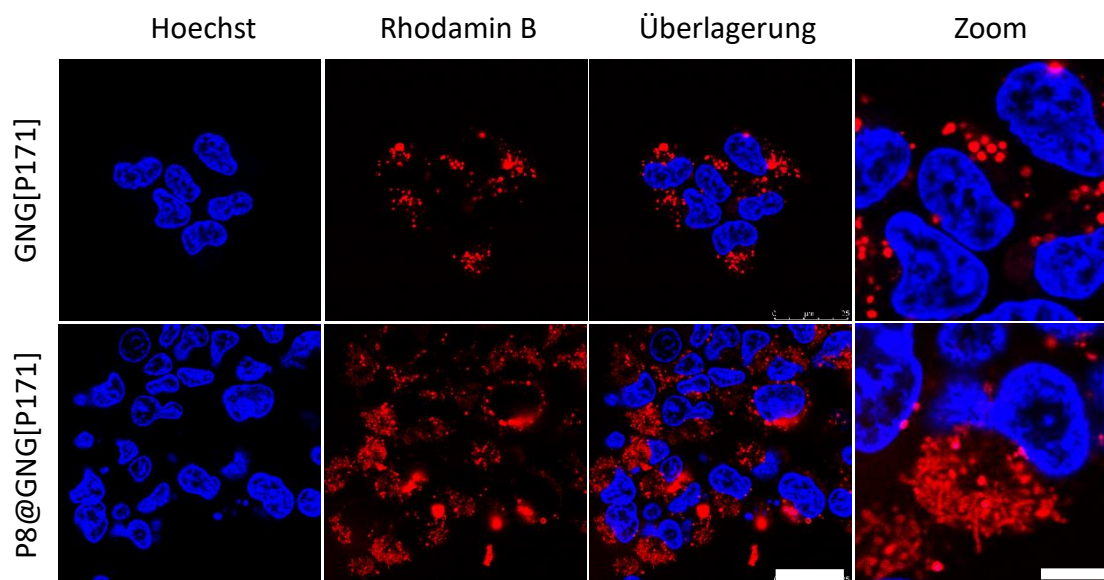


Abbildung 84: Konfokalmikroskopie zur Lokalisation von P8@GNG[P171] und GNG[P171] in HepG2 Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 200 µg/mL Nanogelen erstellt. Hoechst33342 (2 µg/mL) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33343 in Blau ( $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410 - 450 \text{ nm}$ ), GNG[P171] oder P8@GNG in Rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 25 µm und im Zoom 10 µm.

Zuletzt wurde der Transport des größten Moleküls Dextra Alexa Fluor™ 647 betrachtet (Abbildung 85). Aufgrund der Größe von Dextran (10 kg/mol), wird dieses frei gelöst ebenfalls durch die Endozytose in die Zellen aufgenommen, wodurch, wie auch hier zu sehen, die Lokalisation in den Endosomen zu beobachten war (Abbildung 85).<sup>[276]</sup> Durch den Transport über das P8@GNG war eine Verschiebung der Akkumulation in die Mitochondrien zu erhoffen. Wie die Ergebnisse der mikroskopischen Aufnahmen zeigen (Abbildung 85), konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, da kaum noch Fluoreszenz von Alexa Fluor™ 647 des beladenen Dextrans detektiert werden kann. Da wie Kim *et al.* bereits zeigten, auch größere Moleküle wie das BSA mit 66 kg/mol in die Nanogele geladen werden können<sup>[199]</sup>, wird hier vermutet, dass das Dextran-Alexa Fluor™ 647, zu instabil für die Synthese der Nanopartikel ist.

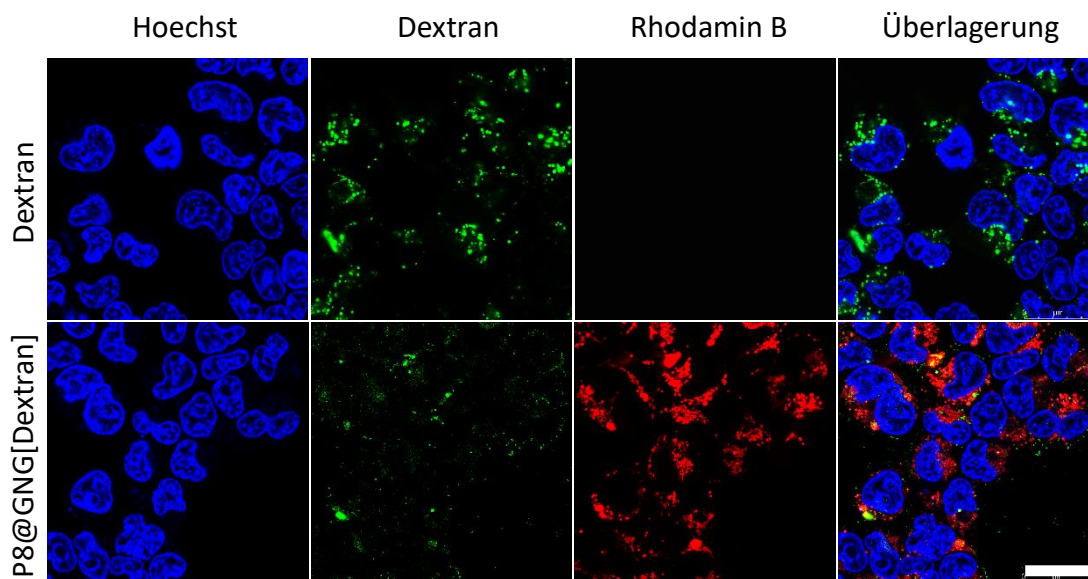


Abbildung 85: Konfokalmikroskopie zur Lokalisation von P8@GNG[DextranAlexaFluor647] und freiem Dextran-Alexa Fluor™ 647 in HepG2 Zellen. Aufnahmen wurden 24 h nach Inkubation mit 200 µg/mL P@GNG und Dextran-Alexa Fluor™ 647 (125 nM) erstellt. Hoechst33342 (2 µg/mL) wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Hoechst33342 in Blau ( $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410 - 450 \text{ nm}$ ), Dextran-Alexa Fluor™ 647 in Grün ( $\lambda_{exc} = 653 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660 - 840 \text{ nm}$ ) und P8@GNG in Rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 750 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 25 µm.

Da mit den verwendeten Fluorophoren bisher kein eindeutiges Ergebnis in Bezug auf den organellspezifischen Transport von Wirkstoffen durch die Nanogeles getroffen werden konnte, sollte die Fluoreszenz des Zytostatikum Doxorubicin dazu verwendet werden, um den Wirkstofftransport verfolgen zu können. Die bisher synthetisierten P8@GNG[DOX] Nanogeles ließen jedoch auch keine eindeutige Aussage zu, weshalb vermutet wurde, dass die Fluoreszenz des in den Nanogelen befindlichen Doxorubicins zu gering ist oder es über den Inkubationszeitraum bereits vom Nanogel durch eine Initiale Freisetzung, wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben, abgegeben wird. Ebenfalls ist eine Erhöhung der P8@GNG[DOX] Konzentration oder eine Verlängerung der Inkubationszeit, um die Fluoreszenzintensität durch eine höhere Akkumulation zu verstärken, aufgrund der starken Toxizität von Doxorubicin nicht möglich. [89,158,223,245,252,260,277] Deshalb wurde ein weiterer Ansatz der Beladung des Wirkstoffes untersucht. Somit soll die Beladung der Nanogeles nicht wie zuvor über elektrostatische Wechselwirkungen oder Van-der-Waals-Kräfte stattfinden, sondern über eine Kovalente Bindung an das Nanogel durchgeführt werden. Hierfür soll der Wirkstoff Doxorubicin zunächst an den GelNB Hydrogel-Vorläufer gebunden werden (Abbildung 86).

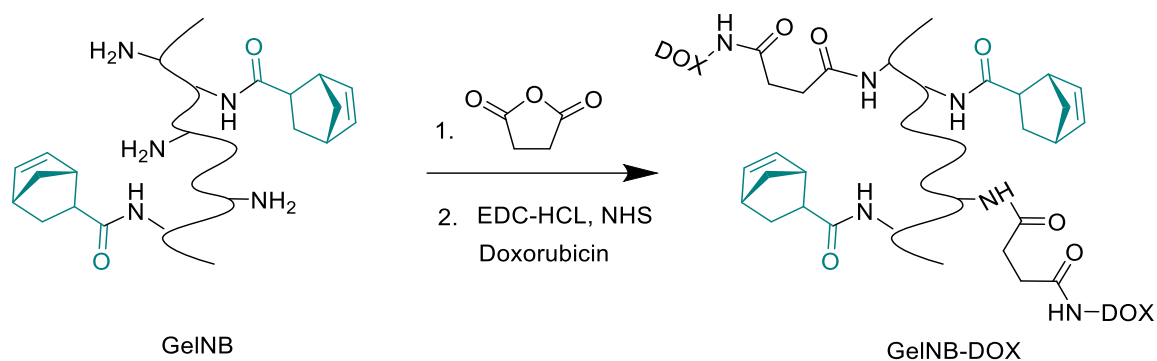


Abbildung 86: Synthese von GelNB-DOX ausgehend von GelNB, dessen freie  $\text{NH}_2$ -Gruppen mit Bernsteinsäureanhydrid (1) zunächst zu Succinyl-GelNB und dann über eine Carbodiimid-Crosslinker (EDC-HCL) und NHS mit Doxorubicin funktionalisiert wird.

Nach erfolgreicher Synthese wurde ein Nanogel aus der Hydrogel-Vorläufer GelNB-DOX und GelS wie in Kapitel 0 und 5.2.1.3 beschrieben synthetisiert und mit Peptoid wie in Kapitel 5.2.1.11 beschrieben modifiziert. Die Zellakkumulation der Nanogele sollte dann ebenfalls über die konfokale Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Hierfür wurden 24 h kultivierte  $10^4$  HeLa Zellen mit 500  $\mu\text{g/mL}$  P8@GNG[DOX] für 4 h inkubiert und anschließend mikroskopiert. Freies Doxorubicin akkumuliert gewöhnlich zum größten Teil im Nucleolus der Zellen wodurch der Transport im Nanogel zu den Mitochondrien deutlich zu erkennen sein sollte.<sup>[278]</sup> Bei der Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde deshalb der Transport von unmodifiziertem GNG[DOX] mit dem von mit Peptoid modifiziertem P8@GNG[DOX] verglichen (Abbildung 87). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen einen Unterschied der Akkumulation durch die Peptoid Modifizierung. Es ist nun zu erkennen, dass das Doxorubicin durch die GNG[DOX] Nanogele in den Endosomen lokalisiert, wohingegen das Doxorubicin durch die P8@GNG[DOX] Nanogele in den Mitochondrien der Zelle detektiert werden kann. Zudem weist die orangene Färbung in den überlagerten Bilder eine Co-Lokalisation der Fluorophore Doxorubicin und Rhodamin B nach und somit einen erfolgreiche Transport des Wirkstoffs Doxorubicin durch das Nanogel P8@GNG[DOX] in die Mitochondrien der Zelle.

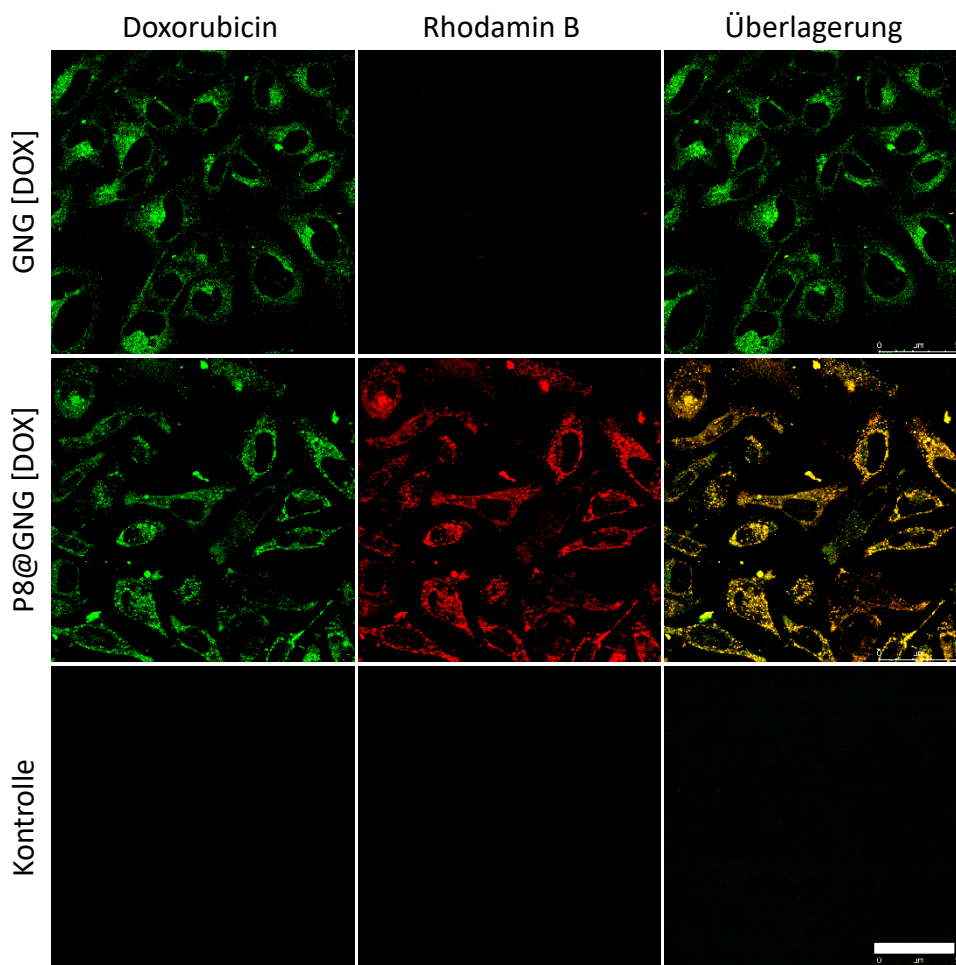


Abbildung 87: Konfokalmikroskopie zur Lokalisation von P8@GNG[DOX] und GNG[DOX] in HeLa Zellen. Aufnahmen wurden 4 h nach Inkubation mit 500  $\mu\text{g/mL}$  Nanogelen erstellt. Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen von Doxorubicin in Grün ( $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 660 - 840 \text{ nm}$ ) und P8@GNG in Rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 650 \text{ nm}$ ), sowie die überlagerten Bilder der Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.15.2 Biokompatibilität von GNG in 2D-Zellkulturen

Im Allgemeinen sollten *Nanocarrier* vorzugsweise keine Zytotoxizität aufweisen, damit sie sicher und effektiv für medizinische Anwendungen eingesetzt werden können. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Gelatine-basierte Hydrogele biokompatibel, biologisch abbaubar, nicht zytotoxisch und auch nicht immunogen sind.<sup>[199,210]</sup> Allerdings kann die Modifizierung der Nanogele mit Peptoiden ihre Toxizität beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Zytotoxizität der Peptoid modifizierten Gelatine-basierten Nanogele, auf das Proliferationsverhalten von HeLa und HepG2 Zellen mittels des zuvor beschriebenen MTT-Assays (Kapitel 5.2.14) untersucht. Hierfür wurden  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well Platte nach 24 h Kultivierung mit freien Peptoiden und unmodifiziertem Nanogel (GNG), sowie mit Peptoid gekuppeltem Nanogel (P@GNG) für 72 h behandelt. Ebenfalls wurde untersucht, ob

sich eine Thiolierung der Nanogelee toxisch auf die Zellen auswirken kann. Die Auswertung der Assays fand auch hier über den kalorimetrischen Umschlag von MTT durch metabolisch aktive Zellen statt. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse der Zellviabilitäten deuten darauf hin, dass sich die Thiolierung der Nanogelee sogar positiv auf die Viabilität der Zellen auswirken kann (Abbildung 88). Dieses Ergebnis kann ebenfalls durch bisherige Untersuchungen mit thiolierten Hydrogele anderer Studien belegt werden, die ebenfalls zeigten, dass die Interaktion von Zellen mit Thiolgruppen sich positiv auf das Zellwachstum und Proliferationsverhalten auswirken kann.<sup>[279-281]</sup> Da zudem thiolierte Nanogelee über Disulfidbrücken an Proteine der Zelloberfläche binden können, kann dies zu einer verstärkten Aufnahme der Nanogelee in die Zelle führen und somit zu einer verbesserten Aufnahme des Wirkstoffes beitragen.<sup>[279,282]</sup> Des Weiteren zeigen die Ergebnisse aller getesteten Nanogelee mit  $IC_{50}$ -Werten deutlich über 200  $\mu\text{g/mL}$ , eine moderate Zytotoxizität und somit eine gute Biokompatibilität. Die Kupplung des Peptoids P8, bewirkte allerdings eine leichte Zunahme der Toxizität, die wie zu erwarten mit einer Thiolierung noch um etwa 3 - 9 % gesteigert werden konnte, da folglich durch die Thiolierung auch mehr Peptoid gekuppelt werden konnte. Da die meisten mit Medikamenten beladene *Nanocarrier* bei Konzentrationen von 10 - 100  $\mu\text{g/mL}$  bereits eine starke Wirkung aufweisen, zeigen die Gelatine-basierten Nanogelee mit und ohne Peptoidmodifikation mit einem  $IC_{50}$ -Wert von über 200  $\mu\text{g/mL}$  somit eine gute Eignung für den Einsatz als *Nanocarrier*.

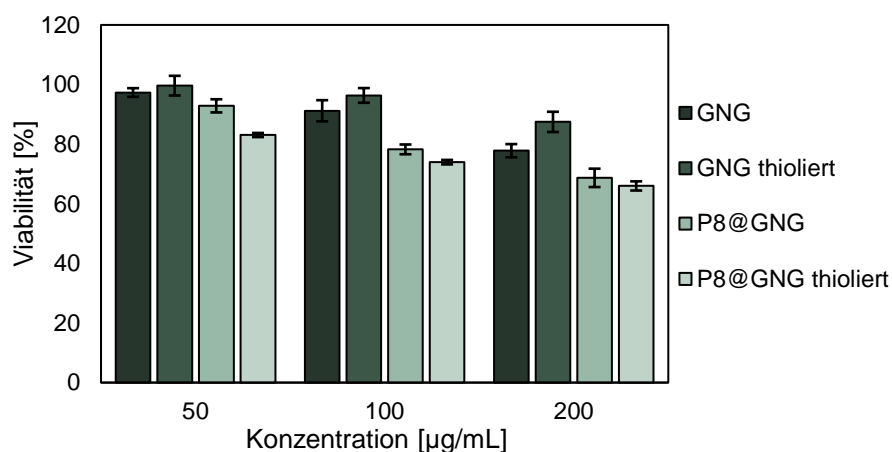


Abbildung 88: Zellviabilitäts-Assay mit Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Wachstum mit 50, 100 und 200  $\mu\text{g/mL}$  GNG, P8@GNG unthioliert und thioliert für 72 h inkubiert. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Die Untersuchung der Biokompatibilität von freien Peptoiden zeigt, dass die Peptide P6, P8, P22 und P56 die stärkste Zytotoxizität auf den Zelllinien HeLa und HepG2 besitzen (Abbildung

89, Abbildung 90). So zeichnet sich das Peptoid P8 als toxischstes Peptoid mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $< 25 \mu M$  aus. Peptoid P22 folgt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $25 \mu M$ , während die Peptide P26, P28, P44, P58 und P95 einen  $IC_{50}$ -Wert von deutlich über  $100 \mu M$  besitzen und somit die beste Biokompatibilität aufweisen. Erneut ist hier der hydrophobe Charakter der Peptide entscheidend. Da hydrophobe Peptide, wie auch in Kapitel 3.2.15.1 nachgewiesen verstärkt in die Mitochondrien akkumulieren können, und so der Energiestoffwechsel der Zelle gestört wird.<sup>[283]</sup> Beim Vergleich der Peptoidtoxizität auf den beiden Zellarten HepG2 und HeLa, kann zudem festgestellt werden, dass die Toxizität auf den HeLa Zellen durchschnittlich etwa 5 % stärker ausgeprägt ist als auf HepG2 Zellen. Die verwendeten HeLa Zellen zeigen allgemein ein etwas stärkeres Proliferationsverhalten als die HepG2 Zellen. Das sich schneller teilende Zellen oft empfindlicher auf Zytotoxine reagieren, liegt daran, dass diese oft Zellorganelle schädigen, die für die Zellteilung benötigt werden. Somit haben solche Wirkstoffe auch einen stärkeren Einfluss auf sich teilende Zellen und daher fällt die Toxizität der Peptide auf HeLa Zellen vermutlich etwas stärker aus.<sup>[284]</sup>

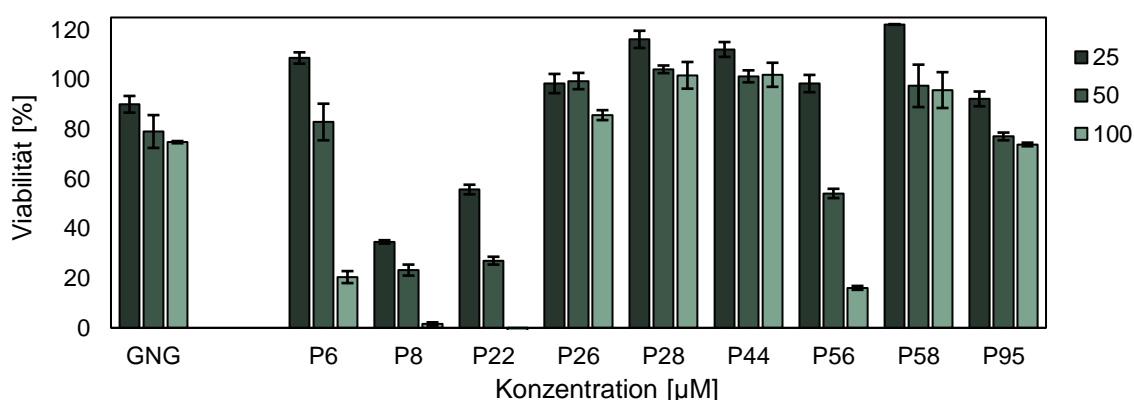


Abbildung 89: Zellviabilitäts-Assay mit Leberkrebszellen (HepG2).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Kultivierung mit 25, 50 und  $100 \mu M$  P6-P95 für 72 h inkubiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

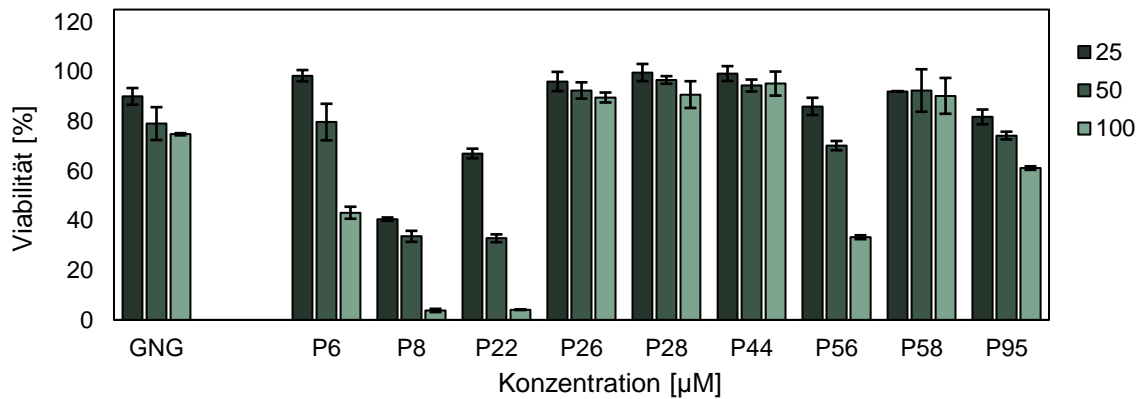


Abbildung 90: Zellviabilitäts-Assay mit Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Kultivierung mit 25, 50 und 100 µM P6-P95 für 72 h inkubiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Ein anderes Bild zeigt sich bei den toxikologischen Untersuchungen der unterschiedlichen P@GNG Nanogelee. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert aller modifizierten Nanogelee auf den HepG2 Zellen blieb über 400 µg/mL. Auch hier zeigen die Nanogelee eine toxischere Wirkung auf HeLa Zellen, was zu einem  $IC_{50}$ -Wert aller Nanogelee auf HeLa Zellen von um die 400 µg/mL führte. Auf den HeLa Zellen zeigten P44@GNG und P8@GNG die geringste Toxizität und somit überraschend die beste Biokompatibilität. Die unterschiedliche Toxizität der gekuppelten Nanogelee ist vermutlich auch auf deren Kupplungseffizienz zurückzuführen. Da P8 keine gute Kupplungseffizienz aufweist, ist es möglich dass dessen Toxizität nicht so signifikant ausfällt, wie die des freien Peptoids. Im Allgemeinen spricht jedoch der hohe  $IC_{50}$ -Wert von  $\geq$  oder etwa 400 µg/mL aller untersuchten Nanogelee für eine gute Biokompatibilität.

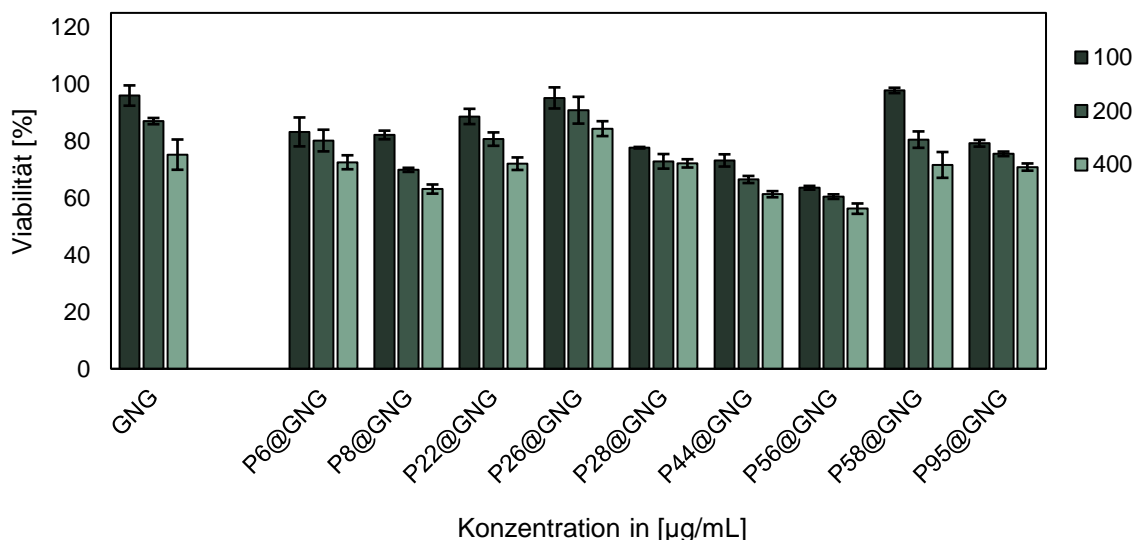


Abbildung 91: Zellviabilitäts-Assay mit Leberkrebszellen (HepG2).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Kultivierung mit 100, 200 und 400 µg/mL GNG und P@GNGs für 72 h inkubiert. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

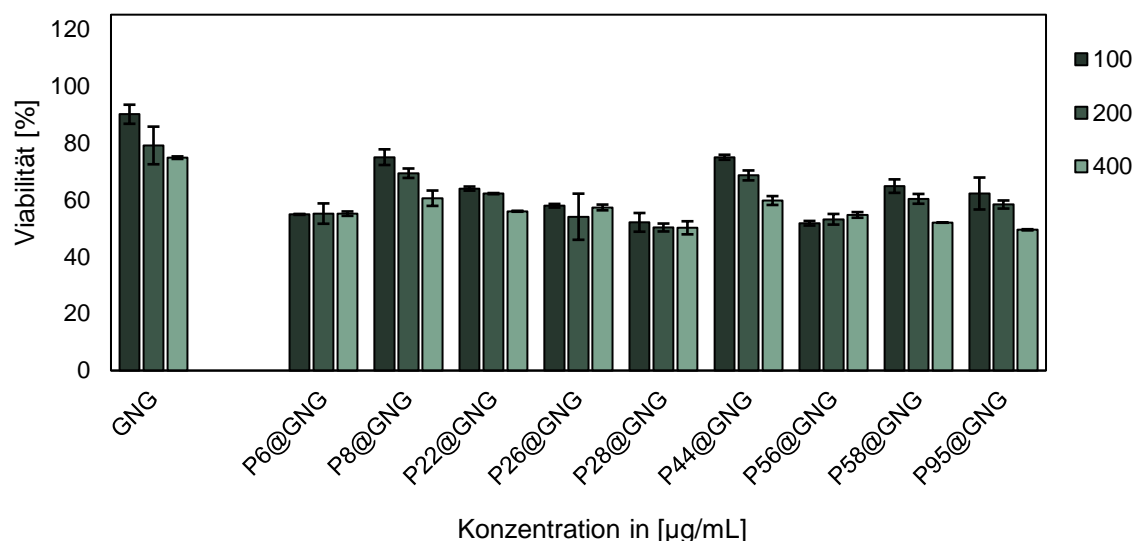


Abbildung 92: Zellviabilitäts-Assay mit Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Kultivierung mit 100, 200 und 400 µg/mL GNG und P@GNGs für 72 h inkubiert. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Im Anschluss an die Untersuchung zu den nicht beladenen Peptoid-modifizierten Nanogelen, wurde die Zytotoxizität der wirkstoffhaltigen Nanogelee P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOP] untersucht. Auch hier wurde die Zytotoxizität über die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Assay ermittelt. Wie zuvor beschrieben wurden  $10^4$  Zellen pro Well für 24 h kultiviert und anschließend mit 100, 200 und 400 µg/mL P8@GNG, GNG[DOP], P8@GNG[DOP] und dem freien Wirkstoff Dopamin (12, 24, 48 µg/mL) oder 100, 200 und 400 µg/mL P44@GNG, GNG[DOX], P44@GNG[DOX] und dem freien Wirkstoff Doxorubicin (9, 18,

36  $\mu\text{g/mL}$ ) für 72 h inkubiert. Die anschließende kolorimetrische Auswertung des MTT-Assays zeigte, dass Dopamin-beladenen Nanogelee  $\text{IC}_{50}$ -Werte von knapp über 400  $\mu\text{g/mL}$  aufwiesen, wobei sich die Toxizität der Nanogelee erneut auf den HeLa Zellen etwas ausgeprägter zeigte (Abbildung 93). Freies Dopamin hatte mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 48  $\mu\text{g/mL}$  eine Zellviabilität von 85 % auf HeLa Zellen und zeigt somit in den getesteten Konzentrationen kaum Toxizität. Wohingegen die höchste eingesetzte Konzentration (400  $\mu\text{g/mL}$ ) der P8@GNG[DOP] Nanogelee die HeLa Zellviabilität auf 57 % verringerte. Da allerdings auch P8@GNG mit 61 % Viabilität und GNG[DOP] mit 59 % Viabilität eine ähnlich starke Auswirkung auf die Zelle besaßen, ist die Toxizität vermutlich auf die Nanogelee zurückzuführen. Auf den HepG2 Zellen zeigte sich zudem eine Verbesserung der Viabilität durch GNG[DOP]. Forschungen haben bereits ergeben, dass HepG2 Zellen Dopaminrezeptoren aufweisen.<sup>[285]</sup> Ebenfalls ist bekannt, dass Dopaminrezeptor-Agonisten das Wachstum von Tumorzellen verstärken können.<sup>[286,287]</sup> Dies kann dazu führen, dass die Dopaminrezeptoren der HepG2 Zellen von den Dopamin haltigen Nanogelen aktiviert werden, wodurch ihr Wachstum angeregt wird.

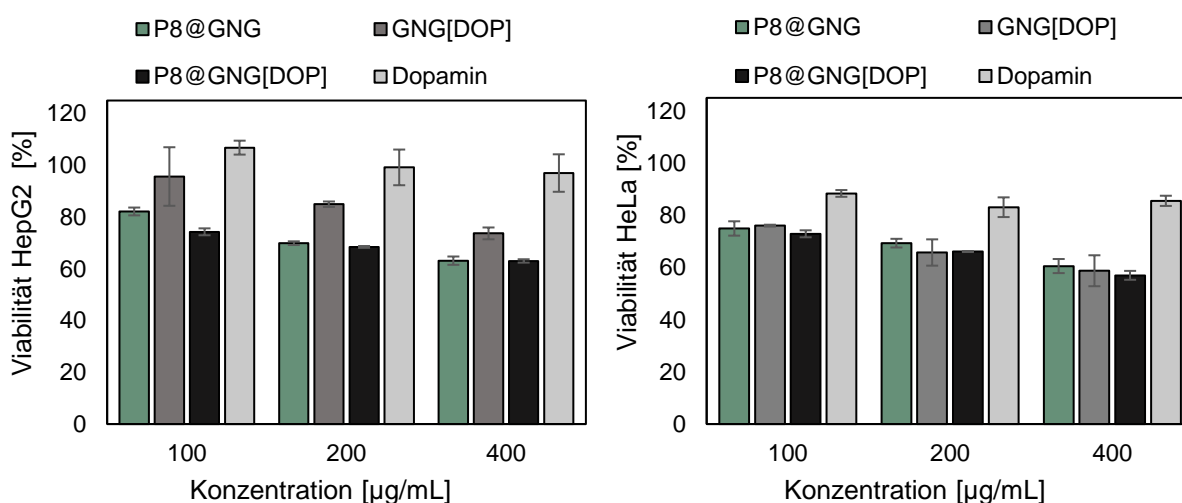


Abbildung 93: Zellviabilitäts-Assay mit Leberkrebszellen (HepG2, links) und Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa, rechts).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Kultivierung mit 100, 200 und 400  $\mu\text{g/mL}$  P8@GNG, GNG[DOP], P8@GNG[DOP] und freiem Dopamin (äquivalent zur im Nanopartikel enthaltenen Dopamin Konzentration von 12, 24, und 48  $\mu\text{g/mL}$ ) für 72 h inkubiert. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

Die Untersuchung der Toxizität von Doxorubicin haltigen Nanogelen zeigte eine deutlich stärkere toxische Wirkung auf die Zellen als die Dopamin haltigen Nanogelee (Abbildung 94). Während das unbeladene P44@GNG weiterhin einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $> 400 \mu\text{g/mL}$  aufwies,

zeigen die Doxorubicin haltigen Nanogelee nun einen signifikanten Anstieg der Toxizität. Hier lag der  $IC_{50}$ -Wert von GNG[DOX] auf den HepG2 Zellen nun bei etwa 90  $\mu\text{g/mL}$  und auf den HeLa Zellen bei etwa 120  $\mu\text{g/mL}$ , einem Viertel des  $IC_{50}$ -Wertes von unbeladenen Nanogelen. Die Modifikation der Nanogelee mit P44 bewirkte zudem noch eine Zunahme der Toxizität. Hier lag der  $IC_{50}$ -Wert auf den HepG2 Zellen von P44@GNG[DOX] nun deutlich unter 100  $\mu\text{g/mL}$  und auf den HeLa Zellen etwa bei 90  $\mu\text{g/mL}$ . Ebenfalls zeigte das P44@GNG[DOX] eine stärkere Toxizität auf den HepG2 Zellen als der freie Wirkstoff Doxorubicin. Hier wies das P44@GNG[DOX] mit 400  $\mu\text{g/mL}$  eine Zellviabilität von 10 % auf, während das freie Doxorubicin in äquivalenter Konzentration zum beladenen Doxorubicin (36  $\mu\text{g/mL}$ ) eine Zellviabilität von 20 % zeigte. Freies Doxorubicin zeigte zudem mit einem  $IC_{50}$ -Wert auf HepG2 Zellen von deutlich unter 9  $\mu\text{g/mL}$  und auf HeLa Zellen von etwas unter 9  $\mu\text{g/mL}$  im Gegensatz zu den Peptoiden eine stärkere Wirkung auf HepG2 Zellen. Leberzellen, wie HepG2 Zellen, sind bekannt für ihren hohen Stoffwechsel, wodurch sie eine große Anzahl an Mitochondrien aufweisen.<sup>[288]</sup> Da Doxorubicin ebenfalls die Mitochondrien schädigen kann, was zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren führt und somit zur Induktion des Zelltodes beiträgt,<sup>[277]</sup> ist eine stärkere Wirkung von Doxorubicin und Doxorubicin haltigen *Nanocarriern* auf HepG2 Zellen nicht überraschend.

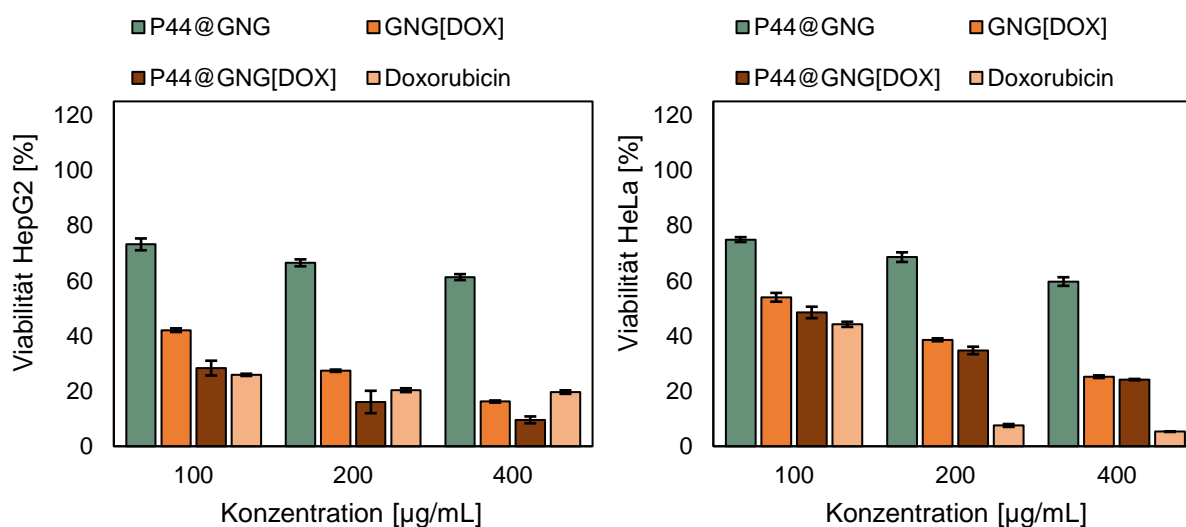


Abbildung 94: Zellviabilitäts-Assay mit Leberkrebszellen (HepG2, links) und Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa, rechts).  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Kultivierung mit 100, 200 und 400  $\mu\text{g/mL}$  P44@GNG, GNG[DOX], P44@GNG[DOX] und freiem Doxorubicin (äquivalenter zur im Nanopartikel enthaltenen Doxorubicin-Konzentration von 9, 18 und 36  $\mu\text{g/mL}$ ) für 72 h inkubiert. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

### 3.2.16 *In vitro* Charakterisierung der Nanogelee an 3D-Zellkulturmodellen

Obwohl *in vitro* 2D-Krebszelllinien, wie die bisher verwendeten *in vitro* Untersuchungen zeigten, wertvolle Einblicke in die Tumorbilogie liefern, replizieren sie die phänotypische und genetische Tumorerheterogenität nicht. Im Gegensatz dazu können 3D-Modelle die physiologische Krebskomplexität und Zellheterogenität reproduzieren.<sup>[289]</sup> 3D-Zellkulturmodelle wie Tumor-Sphäroide, können durch die Bildung ihrer eigenen extrazellulären Matrix (EZM) einen festen Tumor mit ähnlicher physiologischer Mikroumgebung nachahmen.<sup>[290]</sup> Die ausgebildete EZM und die veränderte Mikroumgebung der Zellen, können die Aufnahme von Wirkstoffen entscheidend beeinflussen. Durch eine Untersuchung an Tumorsphäroiden aus den Krebszelllinien HepG2 und Caco-2 sollten nun Erkenntnisse über die Penetrationseigenschaften von P@GNG Nanogelen gewonnen werden.<sup>[291]</sup> Auch bietet die Verwendung von Darmepithelzellen (HSIEC) eine Möglichkeit die Darmbarriere nachzuahmen, wodurch hier anhand der im Folgenden beschriebenen 3D-Modelle erste Untersuchungen der Aufnahme von Nanogelen über das Darmlumen durchgeführt werden konnten.<sup>[291]</sup>

#### 3.2.16.1 Penetration und Akkumulation von GNG in Tumorsphäroide

Für diese Untersuchung wurde P44@GNG verwendet, da P44 in vorherigen Studien bereits eine Affinität zum Darm aufwies<sup>[59]</sup> und somit für die orale Applikation von Doxorubicin eingesetzt werden könnte um dessen Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Für die Penetrations- und Akkumulations-Studien wurden Sphäroide aus  $3 \times 10^3$  HepG2 Zellen oder Caco-2 und primären HSIEC Zellen wie in Kapitel 5.2.15 beschrieben in nicht Adhäsiven 96-Well Platten für 3 Tage kultiviert. Die Aufnahme und Verteilung von P44@GNG in die Sphäroide wurde mit einer Nanogelkonzentration von 200 µg/mL über einen Inkubationszeitraum für 24 h untersucht. Ihre Auswertung erfolgte anschließend visuell über die konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 95). Die mikroskopische Untersuchung der Nanogelakkumulation nach 24 h zeigte hierbei eine gleichmäßige Verteilung der Nanogelee im ganzen HepG2 Sphäroid. Die Ergebnisse der Caco-2 Sphäroid-Abbildungen machen zudem deutlich, das P44@GNG Nanogelee in das Lumen des Sphäroids eindringen konnten und sich dort ansammelten. Ebenfalls kann erkannt werden, dass Nanogelee von den polarisierten Caco-2 Zellen sowie von den primären HSIEC Zellen trotz der ausgebildeten EZM aufgenommen werden. Eine mögliche orale Applikation der Nanogelee liegt somit im Bereich des Möglichen. Es muss jedoch beachtet werden, dass,

da die Caco-2 und HSIEC Sphäroide in Medium kultiviert wurden, es wahrscheinlich ist, dass die apikale Seite der Zellen im Inneren der Sphäroide ausgebildet wurde, wodurch hier eher eine Untersuchung des Transportes von der basolateralen Seite betrachtet wurde.<sup>[292-294]</sup> Diese spielt jedoch auch eine wichtige Rolle beim Transport von Substanzen zwischen Darmzellen und Gewebe,<sup>[293]</sup> wodurch auch diese Ergebnisse einen möglichen Transport der Nanogelee durch das Darmlumen nachweisen.

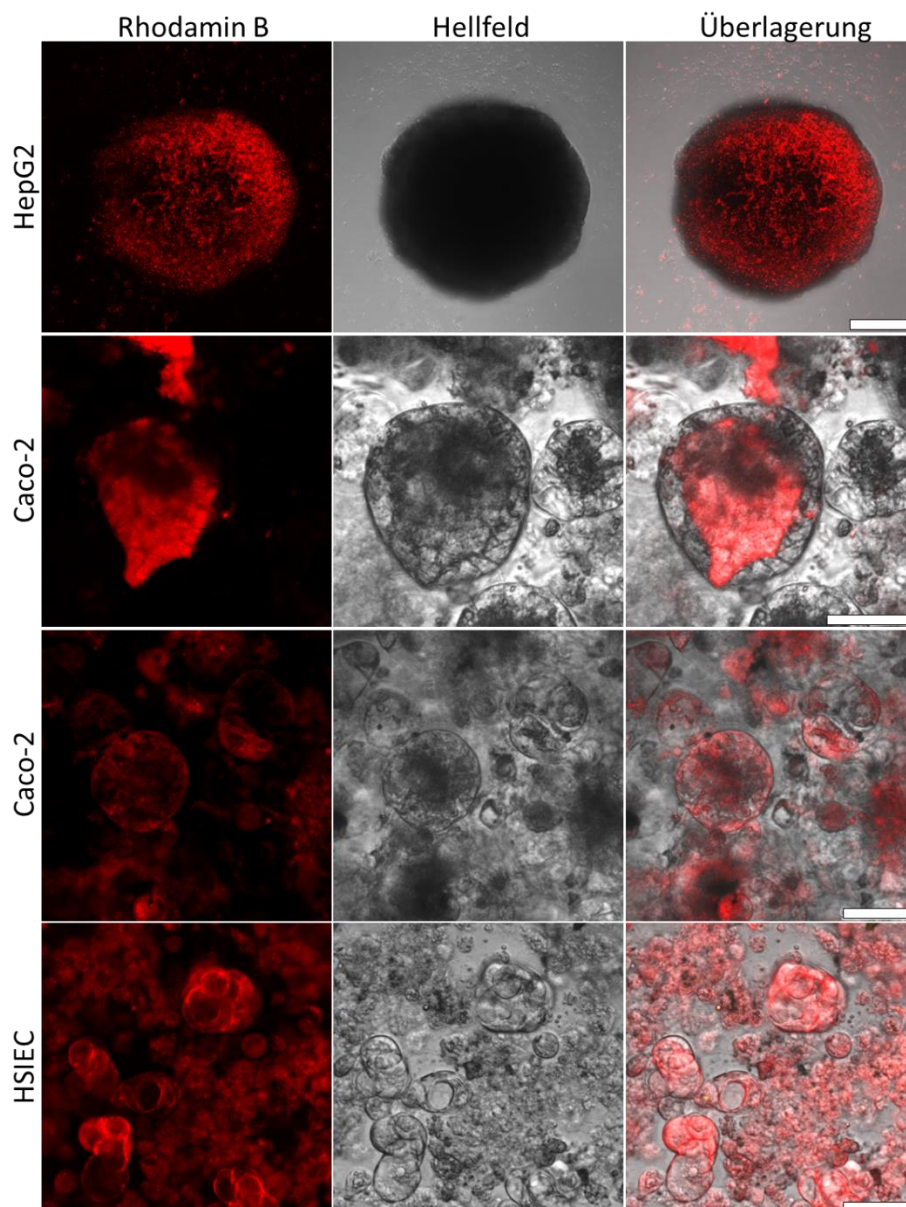


Abbildung 95: Konfokalmikroskopie zur Untersuchung der P44@GNG Penetration von Sphäroiden aus HepG2, Caco-2 und HSIEC Zellen. 200 µg/mL P44@GNG wurde für 24 h auf 3 Tage alten Sphäroiden inkubiert. Zu sehen ist die Fluoreszenzaufnahme von P44@GNG in Rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 650 \text{ nm}$ ), die Hellfeldaufnahme und ihre Überlagerung. Maßstab: 250 µm für HepG2 und 50 µm für Caco-2 und HSIEC Aufnahmen.

### 3.2.16.2 Zytotoxizitätsstudien von P@GNG an Tumorsphäroiden

Da die Penetration und Akkumulation von P@GNG Nanogelen in 3D-Zellkulturen nachgewiesen werden konnte, galt es die Wirkung der Nanogelee in Tumorsphäroiden zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 3 Tage gereifte Sphäroide, wie in Kapitel 5.2.15 beschrieben, kultiviert und mit GNG und wirkstoffhaltigen Nanogelen GNG[DOX], P44@GNG[DOX] und P8@GNG[DOP] der Konzentrationen 50, 100, 200, 400 und 800 µg/mL für 72 h inkubiert. Zum Vergleich wurden die Tumorsphäroide mit den freien Wirkstoffen Dopamin (0,5; 1; 2; 4 und 8 µg/mL) und Doxorubicin (0,75; 1,5; 3; 6 und 12 µg/mL) in äquivalenter Konzentration zum Wirkstoffgehalt der Nanogelee behandelt. Beobachtet wurde die metabolische Beeinflussung von HepG2 und Caco-2 Sphäroiden über den MTT-Assay, wie in Kapitel 5.2.14 beschrieben (Abbildung 96, Abbildung 97). Während bei dieser Untersuchung GNG keine nennenswerte Auswirkung weder auf HepG2 noch auf Caco-2 Sphäroide hatte, zeigten die mit Doxorubicin befüllten Nanogelee einen deutlich toxischeren Einfluss auf die Viabilität der Sphäroide. Zudem zeigte sich eine erhöhte Wirkung von Doxorubicin auf die HepG2 Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $> 4,6$  µg/mL, während er sich bei den Caco-2 Sphäroiden bei etwa 14 µg/mL befand. Auch wenn die Wirkung der mit Doxorubicin befüllten Nanogelee schwächer als die des freien Wirkstoffes ausfällt, ist dennoch ein deutlicher Einfluss auf die Viabilität der Sphäroide zu erkennen. Darüber hinaus zeigte das Peptoid-modifizierte Nanogel P44@GNG[DOX] ( $IC_{50} \approx 50$  µg/mL auf HepG2 und Caco-2) eine stärkere Wirkung auf die Sphäroide als das unmodifizierte GNG[DOX] ( $IC_{50} \approx 100$  µg/mL auf HepG2 und  $\approx 200$  µg/mL auf Caco-2). Freies Dopamin und das Nanogel P8@GNG[DOP] zeigten wie erwartet keinen toxischen Einfluss auf die Viabilität der Sphäroide. Da wie bereits erwähnt HepG2 Zellen auch Dopaminrezeptoren aufweisen, können diese wie bereits erwähnt stimuliert werden, was zu einer verstärkten metabolischen Aktivität der Zellen führt.<sup>[295]</sup> Die Wirkung des Dopamins durch den Transport der P8@GNG[DOP] Nanogelee kann somit ebenfalls nachgewiesen werden. Zudem zeigen die reinen Nanogelee eine sehr gute Biokompatibilität auf 3D-Zellkulturen und mit Beladung einen erfolgreichem Wirkstofftransport mit Wirkstofffreisetzung.

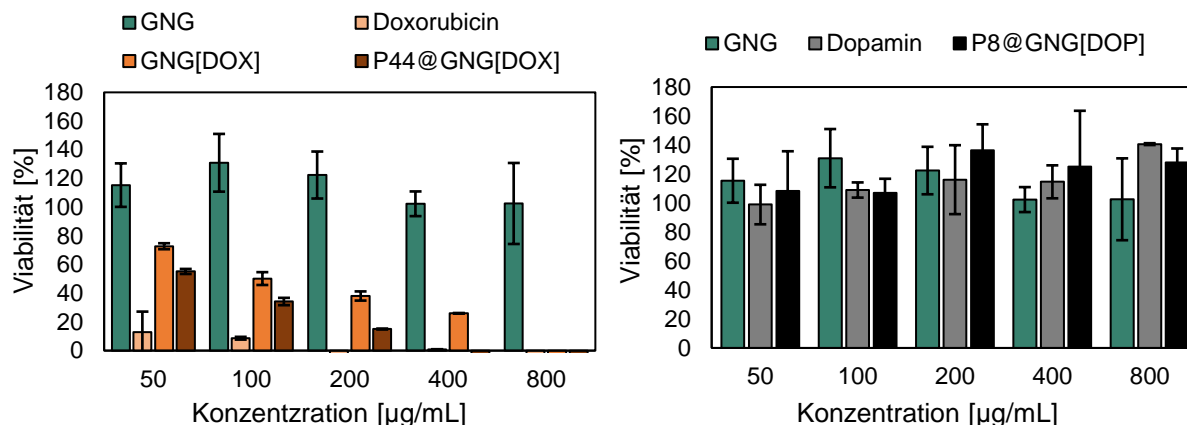


Abbildung 96: Zellviabilitäts-Assay an HepG2 Tumorsphäroiden. 3 Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (50, 100, 200, 400 und 800 µg/mL) von GNG, GNG[DOX] und P44@GNG[DOX], P8@GNG[DOP] sowie mit den frei gelösten aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (4,6; 9,15; 18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (6; 12; 24; 48; 96 µg/mL) für 72 h inkubiert. Die Konzentrationen der freien Wirkstoffe entspricht ihrem Gehalt in den Nanogelen. Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

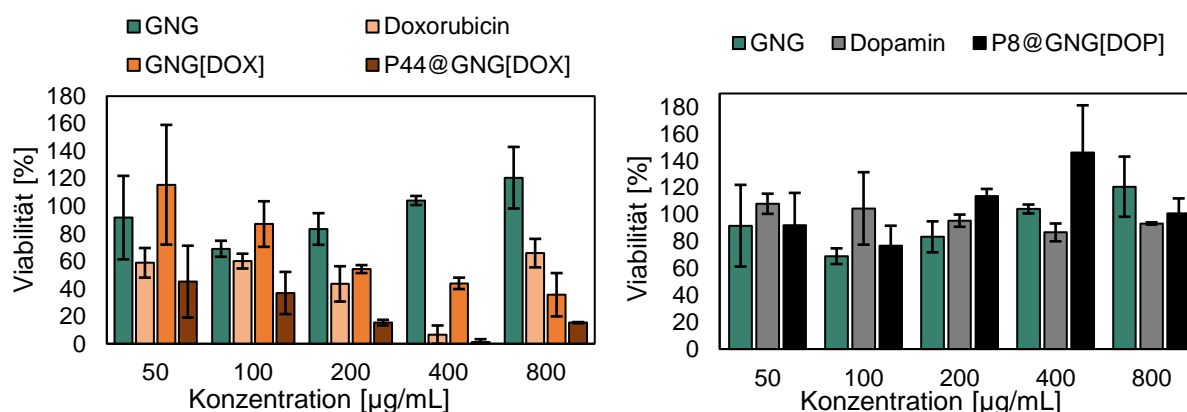


Abbildung 97: Zellviabilitäts-Assay an Caco-2 Tumorsphäroiden. 3 Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (50, 100, 200, 400 und 800 µg/mL) von GNG, GNG[DOX] und P44@GNG[DOX], P8@GNG[DOP] sowie mit den frei gelösten aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (4,6; 9,15; 18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (6; 12; 24; 48; 96 µg/mL) für 72 h inkubiert. Die Konzentrationen der freien Wirkstoffe entspricht ihrem Gehalt in den Nanogelen. Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

Bei einer Tumorthherapie steht nicht nur die Toxizität, sondern auch die Hemmung des Tumorwachstums im Vordergrund. HepG2 Zellen eignen sich aufgrund ihres gleichmäßigen Wachstums und einheitlicher Sphäroid Ausbildung besonders für solche Studien. Um die wachstumshemmenden Eigenschaften der Nanogeles zu untersuchen, wurde das Wachstum von HepG2 Tumorsphäroiden über 7 Tage Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nanogelen (50, 100, 200, 400 und 800 µg/mL) und freien Wirkstoffen in äquivalenter Konzentration des Wirkstoffgehalts der Nanogeles beobachtet (Abbildung 98). Die Ergebnisse

der Wachstumsstudie spiegeln die Ergebnisse des Viabilitätstests wider. Dopamin hatte wie zuvor mit und ohne Transport über die Nanogele keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum der Sphäroide. Das leere Nanogel zeigte lediglich mit der höchsten getesteten Konzentration von 800 µg/mL eine Wachstumsverlangsamung der Sphäroide, die aber im Vergleich zu den mit Doxorubicin beladenen Nanogelen nicht besonders ausgeprägt war, da die toxische Wirkung von Doxorubicin haltigen Nanopartikeln sogar zu einem Auflösen der Tumorsphäroide führte. Im Gegensatz zu der vorherigen Viabilitätsstudie, hatte in diesem Versuch das Nanogel P44@GNG[DOX] den stärksten Einfluss auf das Wachstum der Sphäroide. Hier kommt es bereits zu einer Auflösung der Sphäroide mit 100 µg/mL nach 7 Tagen inkubation. Zudem schaffen es die mit Doxorubicin beladenen Nanogele GNG[DOX] und P44@GNG[DOX] mit Konzentrationen von über 400 µg/mL bereits nach 5 Tagen die 3D-Morphologie der Sphäroide zu zerstören, während freies Doxorubicin mit äquivalenter Konzentration dafür eine Wirkungszeit von 7 Tagen benötigte. Auch wenn die Toxizität von freiem Doxorubicin, im Vergleich zum nanopartikulären System, im MTT-Assay höher ausfiel, ermöglichte der Transport im Nanogel eine schnellere Wirkung im Tumorsphäroid und somit eine beschleunigte Zerstörung der Tumormorphologie.

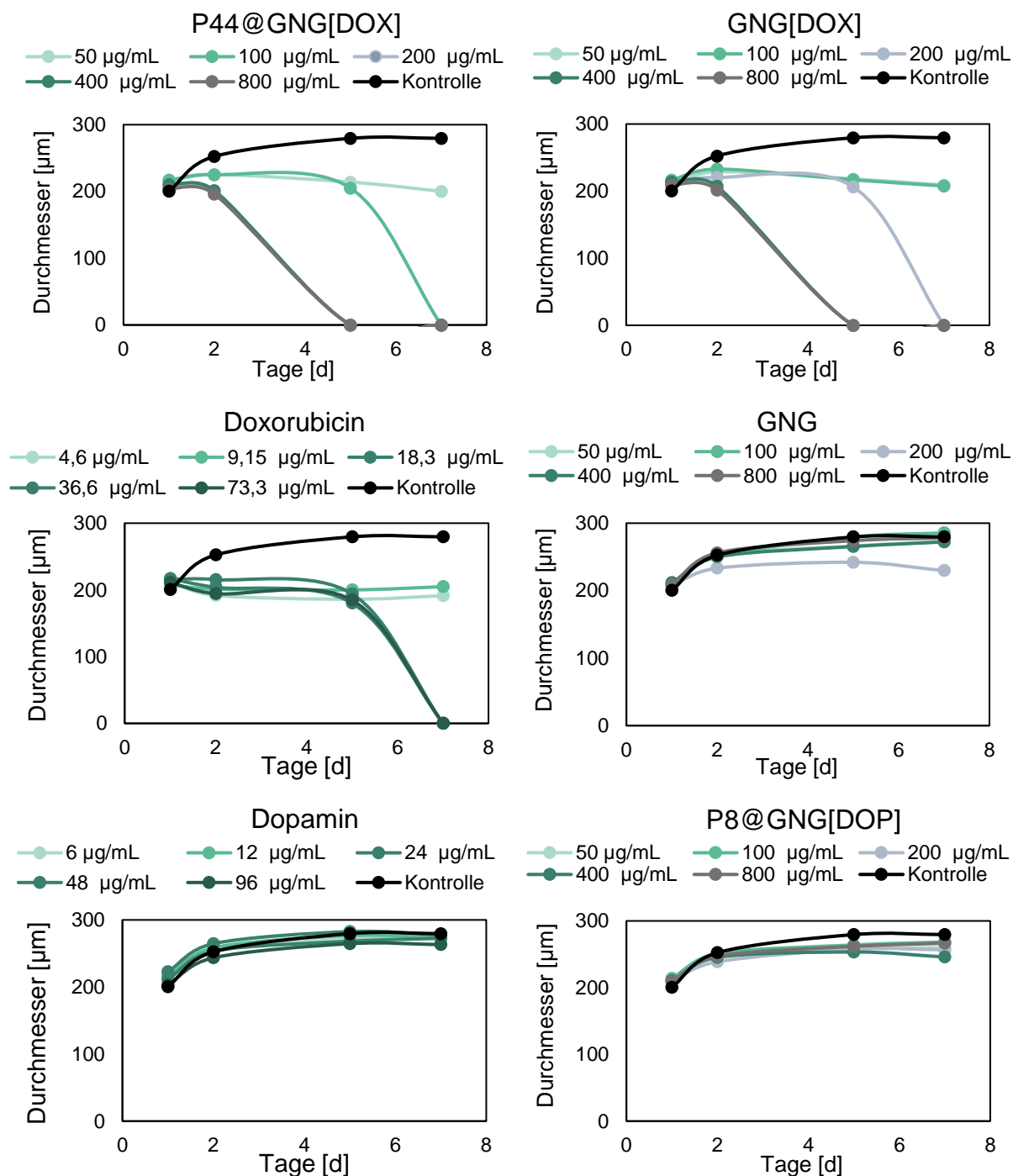


Abbildung 98: Wachstumsverlauf von HepG2 Sphäroiden. 3 Tage gereifte Tumorsphäroide wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (50, 100, 200, 400 und 800 µg/mL) von GNG, GNG[DOX] und P44@GNG[DOX], P8@GNG[DOP] sowie mit den frei gelösten aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (4,6; 9,15; 18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (6; 12; 24; 48; 96 µg/mL) für 7 d inkubiert. Die Konzentrationen des freien Wirkstoffes entspricht ihrem Gehalt in den Nanogelen. Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert,  $n = 4$ .

### 3.2.17 *In vivo* Charakterisierung der Nanogelee an Zebrafischlarven

Anhand der bisherigen durchgeführten *in vitro* Studien konnten bereits wichtige Erkenntnisse über die Zytotoxizität und akkumulativen Eigenschaften der P@GNG Nanogelee gewonnen

werden. Die Biodistribution der Nanogelee und der Einfluss von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen und Organen auf die Wirkung der Nanogelee können allerdings mit den bisherigen vorgestellten Zellkulturmodellen noch nicht untersucht werden. *In vivo* Toxizitäts- und Teratogenitätstests von kolloidalen nanopartikulären *Drug Delivery*-Systemen am Zebrafischmodell (*Danio rerio*) werden hingegen zunehmend akzeptiert und validiert.<sup>[296]</sup> Die vielen Vorteile wie die genetische Homologie zum Menschen, die molekulare und physiologische Ähnlichkeit zum Säugetier, seine schnelle Entwicklung und das *ex-utero*-Wachstum der transparenten Embryos bieten die Möglichkeit die Bildung der wichtigsten Organsysteme während der ersten Wochen zu studieren.<sup>[297]</sup> Mithilfe von Untersuchungen an Zebrafischembryos, sollen nun die Parameter wie akute Toxizität, Teratogenität und kardiologische und neurologische Schädigung durch Gelatine-basierte Nanogelee betrachtet werden. Darüber hinaus sollte der transparente Körper des Zebrafisches die Untersuchung der Biodistribution der Nanogelee durch die Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen.<sup>[296-300]</sup>

### 3.2.17.1 Untersuchung der *in vivo* Toxizität von GNG

Für die Beurteilung der Wirkung von P@GNG auf einen ganzen Organismus wurde ein Fisch-Embryo-Akut-Toxizitäts (FET)-Test wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben durchgeführt. Hierfür wurden frisch befruchtete Zebrafischeier (4 hpf (Stunden post Fertilisation)) mit verschiedenen Konzentrationen (200, 400 und 800 µg/mL) der Nanogelen GNG, P8@GNG, GNG[DOP], P8@GNG[DOP], P44@GNG[DOX] und den freien Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (24; 48; 96 µg/mL) behandelt und für 4 Tage überwacht. Die Mortalität der Zebrafischlarven nach der Inkubation mit den Wirkstoffen wurde nach 24, 48 und 72 hpf ermittelt. Die Ergebnisse, relativ zur Kontrolle betrachtet, zeigten, dass freies Doxorubicin im Vergleich zu den anderen Behandlungen die höchste Mortalitätsrate aufwies. Nach 48 hpf starben bei einer Konzentration von 36,6 µg/mL Doxorubicin bereits 100 % aller Embryos, während das P44@GNG[DOX] die akute Toxizität des Doxorubicins auf eine Mortalität von 20 % verringern konnte. Interessanterweise zeigte Dopamin ebenfalls eine embryonale Toxizität gegenüber der Zebrafischlarven. Hier starben zu Beginn der Entwicklung nach 24 hpf bereits bis zu 50 % aller Larven bei einer Konzentration von 48 µg/mL. Ebenfalls führte eine Konzentration von 800 µg/mL P8@GNG[DOP] nach 48 hpf zu einer Sterberate von 100 % der Embryos wobei das unmodifizierte Nanogel GNG[DOP] im Vergleich zu 40 % Mortalität führte. Ebenfalls hatte das wirkstofffreie Nanogel P8@GNG eine Auswirkung auf

die Mortalität, hier starben bis zu 40 % der Embryos nach 24 hpf Inkubation mit 800  $\mu\text{g/mL}$  Nanogel. Nur das reine Nanogel GNG hatte keinen akut toxischen Effekt auf die Zebrafische.

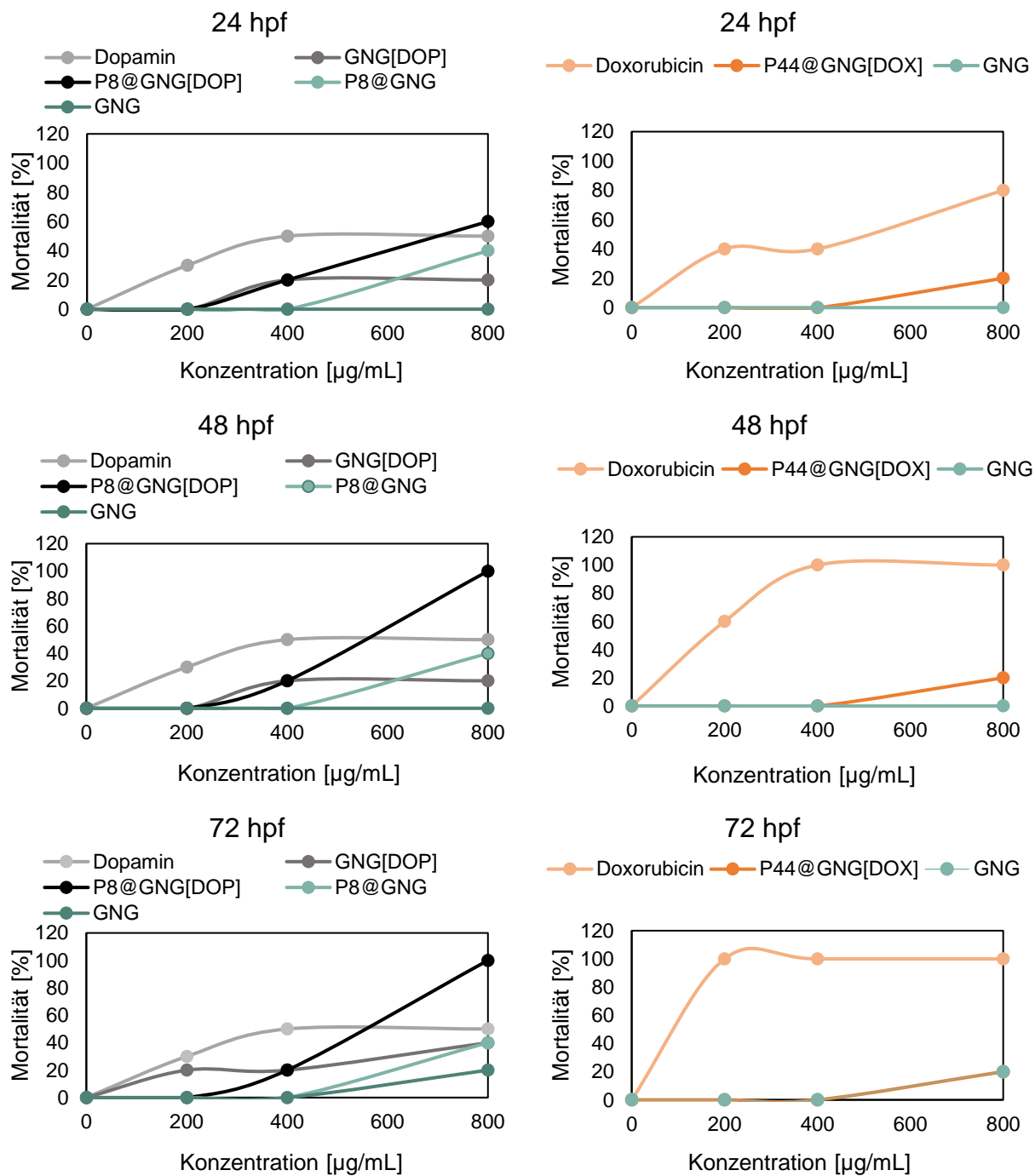


Abbildung 99: Mortalitätsrate von Zebrafischlarven nach 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi bei einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von GNG, P8@GNG, P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOX] (200, 400 und 800  $\mu\text{g/mL}$ ) und den freien aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3  $\mu\text{g/mL}$ ) und Dopamin (24; 48; 96  $\mu\text{g/mL}$ ). Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert,  $n = 6$ .

Wird die Schlupfrate der Embryos betrachtet (Abbildung 100), fällt auf, dass es durch Dopamin bei 20 % der Laven bereits nach 48 hpf zum Schlüpfen kommt, während die meisten Embryos erst nach 72 hpf schlüpften. Zebrafischembryos schlüpfen normalerweise bei einer

Wassertemperatur von 28 °C nach 72 hpf. Stress kann allerdings dazu führen, dass Embryos auch früher schlüpfen.<sup>[301]</sup> Da bekannt ist, dass sich Neuronen, die den Neurotransmitter Dopamin synthetisieren (dopaminerge Neuronen), 24 hpf im Zebrafisch entwickeln<sup>[302]</sup> und Dopamin bei Zebrafischlarven zu Stressreaktionen<sup>[303]</sup> führen kann, ist es möglich dass eine Exposition mit Dopamin Auswirkungen auf die Entwicklung der Fische haben kann. Hierfür spricht auch die höhere Mortalitätsrate der mit Dopamin und Dopamin beladenen Nanogel behandelten Embryonen, die eventuell auch durch die Auslösung von Dopamin induziertem Stress verursacht wurde (Abbildung 99).

Ein weiterer interessanter Faktor, der durch die Untersuchung der Fischembryonen evaluiert werden kann, ist die Kardiotoxizität von Wirkstoffen. Da Kardiotoxizität eins der häufigsten Nebenwirkungen von Doxorubicin ist,<sup>[300]</sup> wurde der Effekt der Nanopartikel auf die Herzfrequenz von Zebrafischembryos, wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, untersucht (Abbildung 101). Bei der Beobachtung der Embryonen führte freies Doxorubicin zu einer erhöhten Herzfrequenz der Larven nach 24 hpf. Nach 48 hpf waren diese Embryos bereits verstorben. Im Gegensatz dazu zeigten die P44@GNG[DOX] Nanogele nach 48 hpf eine Senkung der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls führten alle anderen Nanogele, mit und ohne Wirkstoff, zu einer Reduktion der Herzfrequenz. Dies war meist nach 48 hpf am deutlichsten ausgeprägt. Somit führt auch eine Exposition mit Nanogelen zu einer Dysfunktion des Herzes. Freies Dopamin zeigte als einzige Testsubstanz keine kardiotoxische Wirkung während der Entwicklung des Zebrafisches.

Die Messung der Veränderung einer spontanen Schwimmaktivität ermöglicht zusätzlich die Vorhersage neurotoxischer Effekte bei Zebrafischlarven. Eine hohe oder niedrige Aktivität im Vergleich zur Kontrolle kann somit auf unerwünschte Effekte der Nanogele hinweisen.<sup>[300]</sup> Die Aktivität der Zebrafischembryos wurde aus diesem Grund ebenfalls über die drei Tage Inkubationszeit beobachtet (Abbildung 102). Doxorubicin zeigte hier bei mittlerer Konzentration nach 24 hpf eine leichte Erhöhung der Schwimmaktivität die sich über die Zeit wieder regulierte, während P44@GNG[DOX] teilweise zu einer Verringerung der Aktivität führte. Deutlicher fiel dies jedoch bei Dopamin und dessen Nanogel (P8@GNG[DOP]) auf. Dopamin schien in freier Form, vor allem jedoch durch den Transport im Nanogel eine deutlich verstärkte Aktivität der Fischembryos zu verursachen, die mit hoher Konzentration und über einen zeitlichen Verlauf wieder abnahm. Dies war vor allem nach 24 hpf zu beobachten,

während P8@GNG auch in niedriger Konzentration von 200 µg/mL für eine verminderte Bewegungsaktivität der Fischembryos sorgte. Eine erhöhte Schwimmaktivität der Zebrafischembryos deutete auf eine neurotoxische Wirkung des Dopamins hin, das bereits im frühen Stadium die Entwicklung der Zebrafische beeinflusste. Bisherige Studien deuten zwar auf die suppressive Wirkung von Dopamin auf das Schwimmverhalten von Zebrafischembryos hin, diese wurden jedoch erst nach 72 hpf mit Dopamin behandelt, zu dieser Zeit sind dopaminerge Neuronen bereits zum Großteil entwickelt und können mit Dopamin interagieren.<sup>[297,302,303]</sup> Da auch das leere Nanogel P8@GNG eine vor allem aktivitätsverringende Wirkung zeigte während das reine GNG keinerlei Auswirkungen auf die Mobilität der Fische aufwies, lässt drauf schließen, dass das Peptoid P8 eine verstärkte neurotoxische Wirkung auf die Entwicklung der Zebrafische besitzt, was ebenfalls mit seiner bereits nachgewiesenen Affinität zur Akkumulation im olfaktorischen System<sup>[59]</sup> des Fisches zusammenhängen könnte.

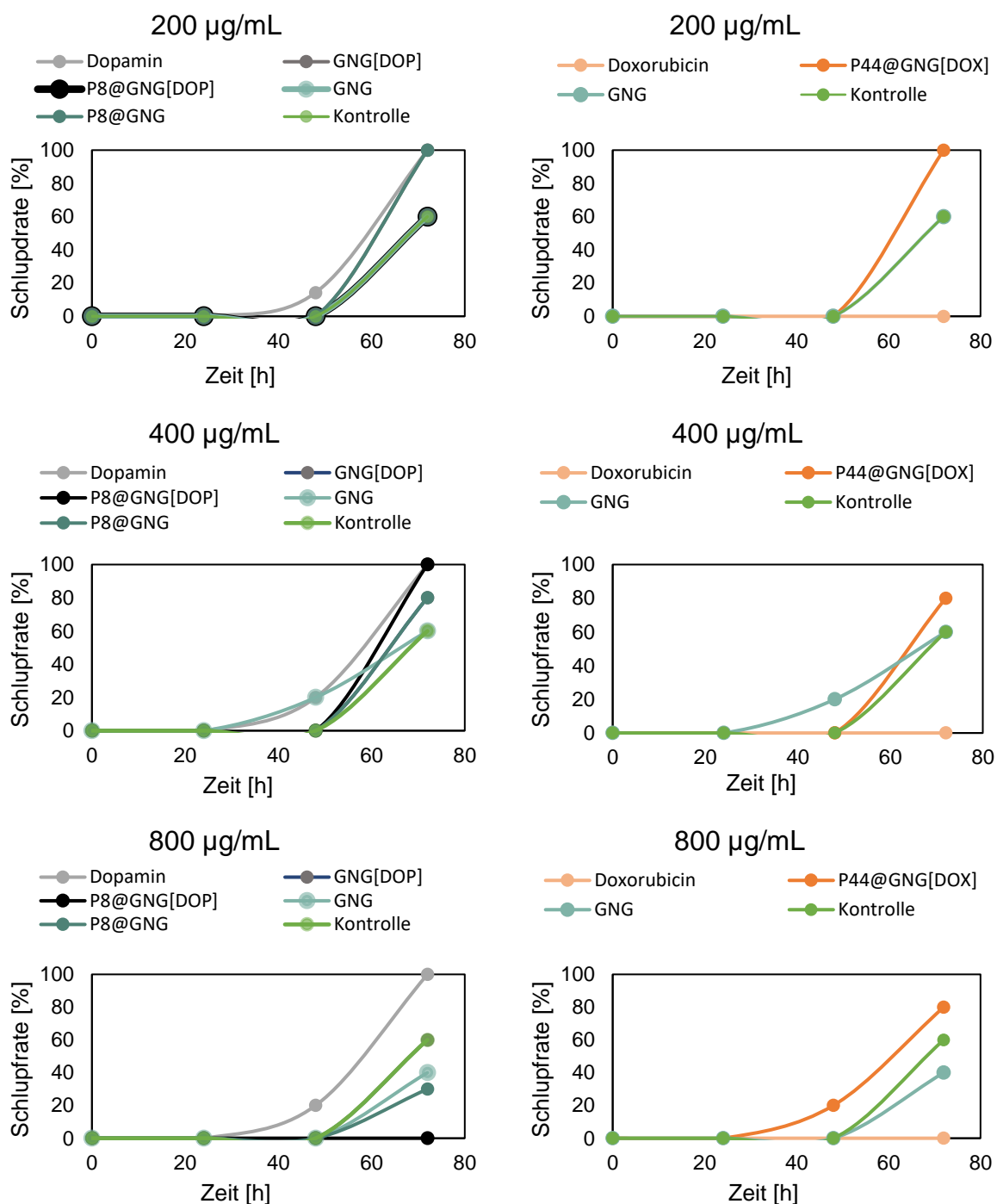


Abbildung 100: Schlupfrate von Zebrafischlarven nach 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi, nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von GNG, P8@GNG, P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOX] (200, 400 und 800 µg/mL) und den freien aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (24; 48; 96 µg/mL). Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert,  $n = 6$ .

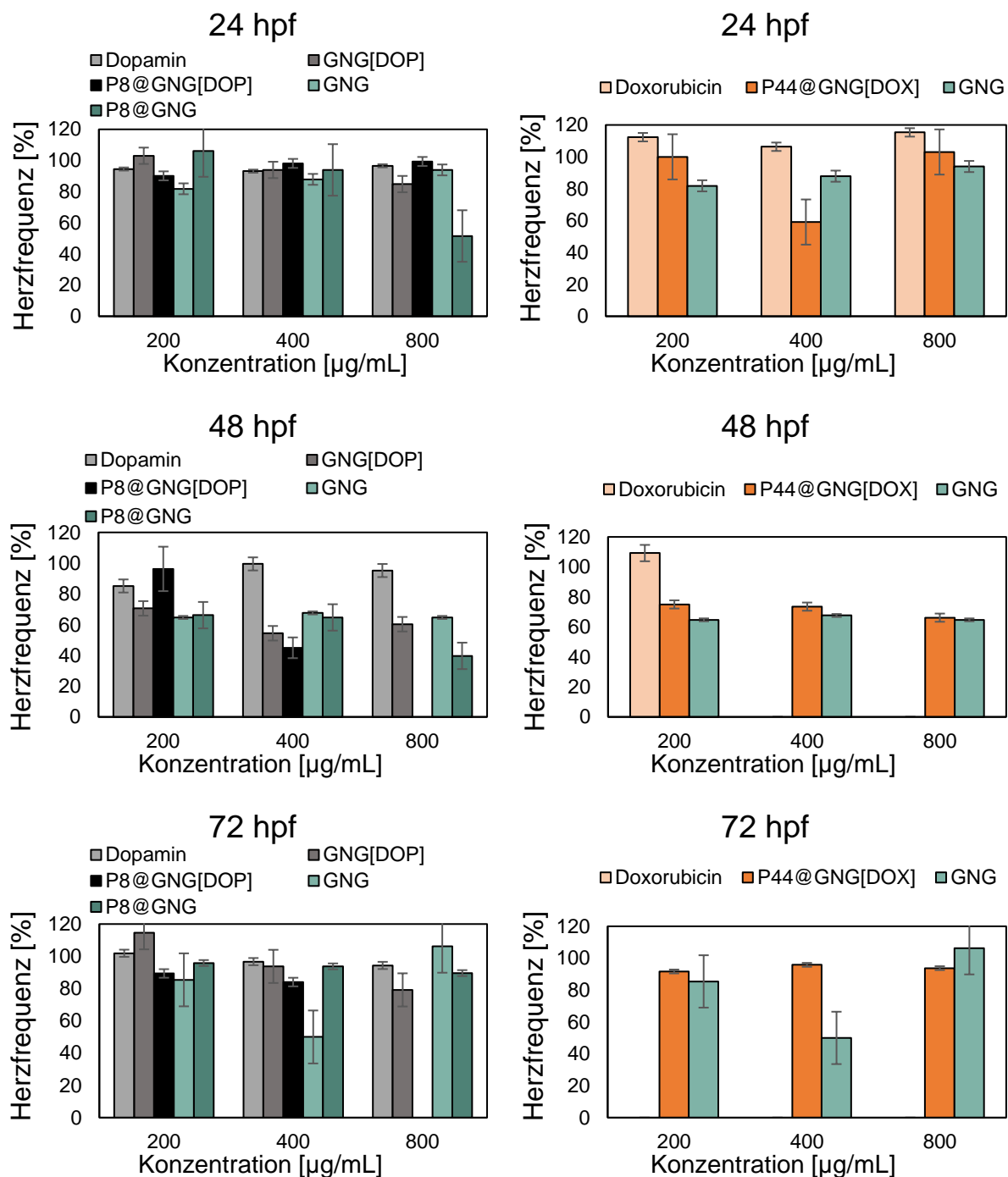


Abbildung 101: Herzfrequenz normiert zur Kontrolle von Zebrafischlarven nach 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von GNG, P8@GNG, P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOX] (200, 400 und 800 µg/mL) und den freien aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (24; 48; 96 µg/mL). Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

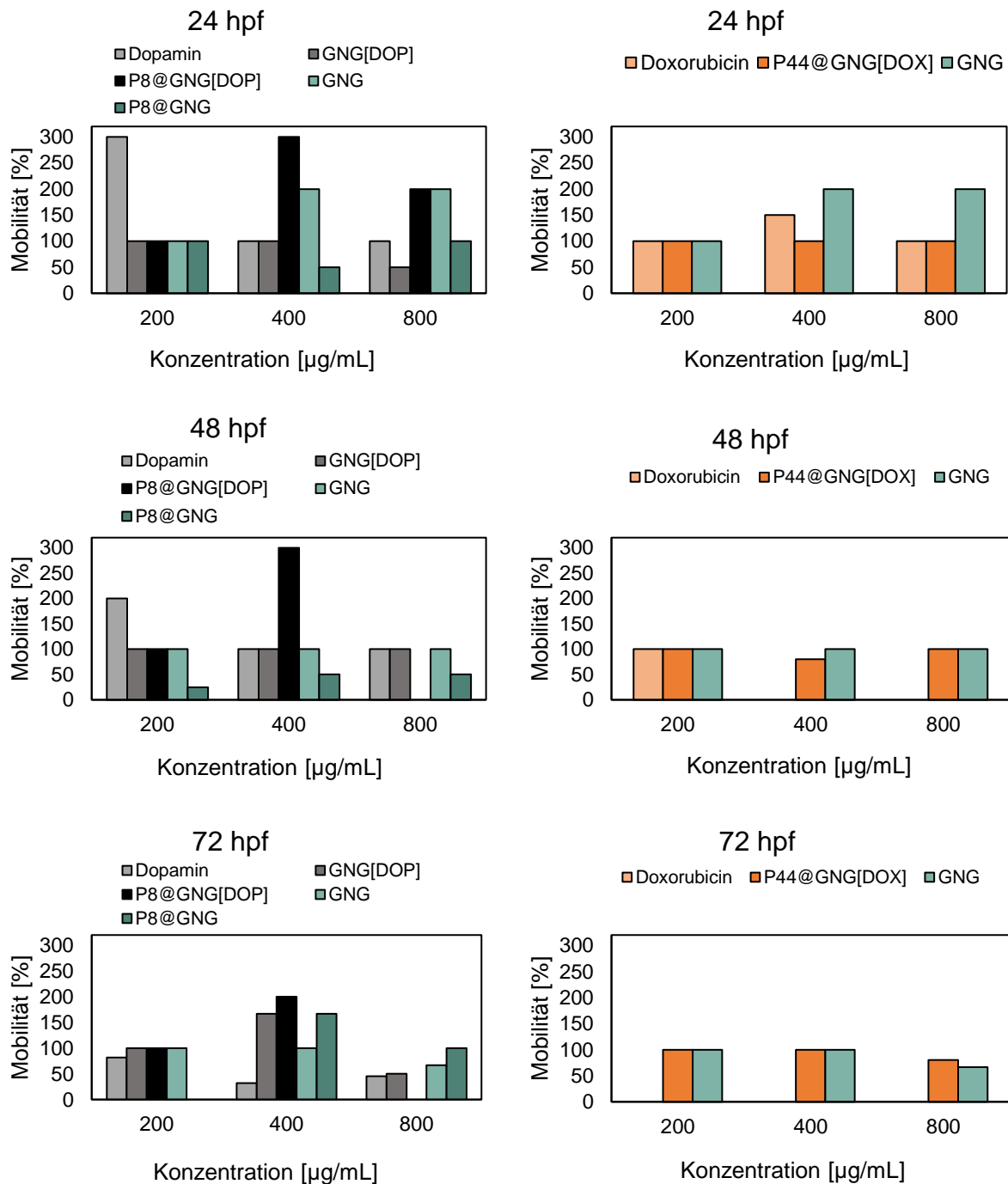


Abbildung 102: Mobilitätsrate von Zebrafischlarven nach 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von GNG, P8@GNG, P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOX] (200, 400 und 800 µg/mL) und den freien aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (24; 48; 96 µg/mL).

Als weiterer Parameter des FET-Testes wurde die morphologische Beeinflussung der Zebrafischentwicklung nach 72 hpi (Stunden post Inkubation) mikroskopisch untersucht (Tabelle 7). Hierbei zeigten sich vor allem bei Doxorubicin eine starke Veränderung bei der Ausbildung des Dottersacks. Zu einer Unterentwicklung des Embryos kam es bei der höchsten Konzentration von Doxorubicin zwar auch, jedoch musste hier beachtet werden, dass die

Fische im frühen Stadium von 24 hpf – 48 hpf bereits starben. Leider führte auch das reine GNG zur Unterentwicklung und Deformation des Rückgrates bei höherer Inkubationskonzentration, was jedoch nur bei einem kleinen Anteil der Embryos beobachtet wurde. P44@GNG[DOX] führte bei etwa 50 % der Embryos zu einer Veränderung der Rückgrat-Entwicklung, während P8@GNG auch eine deutlich stärkere Beeinflussung der morphologischen Entwicklung zeigte, die teilweise auch bei P8@GNG[DOP] ausgeprägt war. Dopamin hatte nur in geringer Konzentration eine starke Auswirkung auf die Entwicklung des Dottersacks, wohingegen eine Exposition mit GNG[DOP] eine Deformation des Rückgrates zufolge hatte. Zusammenfassend verursachte der Transporter GNG vermutlich in den meisten Fällen die Deformation des Rückgrates, während die freien Wirkstoffe eher die Entwicklung des Dottersacks beeinflussten.

*Tabelle 7: Morphologische Veränderungen der Zebrafische nach 72 hpi einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von GNG, P8@GNG, P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOX] (100, 400 und 800 µg/mL) und den freien aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (24; 48; 96 µg/mL). Die Werte entsprechen ihrem Mittelwert (n = 6).*

200 µg/mL	Doxorubicin	P44@GNG[DOX]	Dopamin	GNG[DOP]	P8@GNG[DOP]	P8@GNG	GNG
Deformation des Dottersacks	+	+	+++				
Deformation des Rückrades		++	+	++			+
Unterentwicklung						+++	
400 µg/mL	Doxorubicin	P44@GNG[DOX]	Dopamin	GNG[DOP]	P8@GNG[DOP]	P8@GNG	GNG
Deformation des Dottersacks	+++				+	+	
Deformation des Rückrades	+	++		++	+	++	+
Unterentwicklung							+
800 µg/mL	Doxorubicin	P44@GNG[DOX]	Dopamin	GNG[DOP]	P8@GNG[DOP]	P8@GNG	GNG
Deformation des Dottersacks	++++	++			+	+	
Deformation des Rückrades	+			+	+	+++	+
Unterentwicklung	+						+

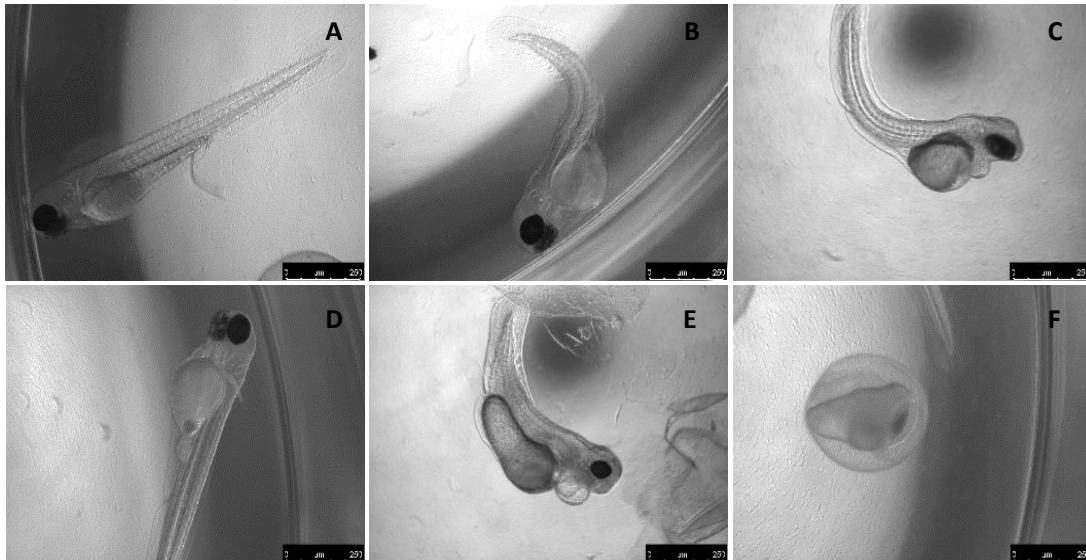


Abbildung 103: Beispiele morphologischer Veränderungen der Zebrafische nach 72 hpi einer Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von GNG, P8@GNG, P8@GNG[DOP] und P44@GNG[DOX] (100, 400 und 800 µg/mL) und den freien aktiven Wirkstoffen Doxorubicin (18,3; 36,6; 73,3 µg/mL) und Dopamin (24; 48; 96 µg/mL). A: Gesunde Zebrafischlarve, B und C: Deformation des Rückgrates, D und E: Deformation des Dottersacks, F: Unterentwicklung. Maßstab: 250 µm.

### 3.2.17.2 Untersuchung der *in vivo* Biodistribution von P@GNG im Zebrafisch über eine transdermale Applikation

Die Übertragung der organspezifischen Akkumulation der Peptide auf die modifizierten Nanogele, sollte nun im Zebrafischmodell nachgewiesen werden. Hierfür wurden 3 dpf (Tage post Fertilisation) alte Embryos mit 200 µg/mL Nanogelen und 60 µM freien Peptoiden für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Rhodamin B Fluoreszenz der P@GNG und Peptide über Konfokalmikroskopie detektiert (Abbildung 104, Abbildung 105). Die Inkubation der Fische in den Testlösungen kann mit einer Absorption über die Epidermis verglichen werden. Da Zebrafische erst ab 5 dpf den Mund öffnen und somit erst ab diesem Zeitpunkt oral Lösungen aufnehmen können, kann davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme in die Zebrafische tatsächlich nur über ihre Haut erfolgt.<sup>[304]</sup> Zudem ist die Entwicklung des Gastro-Intestinal-Traktes noch nicht abgeschlossen, eine Akkumulation im Darmbereich des Fisches über eine orale Applikation kann somit erst nach 5 dpf beobachtet werden.<sup>[131,305]</sup> Die Ergebnisse der Inkubation mit den freien Peptoidlösungen für 24 h zeigten unterschiedliche organspezifische Affinitäten der Peptide (Abbildung 104, Abbildung 105), wodurch ihr Nutzen für den Transport unterschiedlicher Medikamente evaluiert werden kann. So ergab

sich eine spezifische Akkumulation in die Pronephronen des Zebrafisch Embryos<sup>[306]</sup> von P6 und P22 (Abbildung 104) während sich P28, P44 und P58 in der Kaudalvene<sup>[307]</sup> anlagerten (Abbildung 105). Sobald ein Wirkstoff über die Haut aufgenommen wird, gelangt es in den Blutkreislauf und wird aufgrund seiner Eigenschaften in verschiedene Organe verteilt. Besonders hydrophile Peptide zeigen hier eine gute Bioverfügbarkeit. So weisen die drei Peptide P28, P44 und P58 die sich im ganzen Blutsystem der Zebrafischembryos verteilen jeweils die hydrophile Amino-Gruppen Nlys als Monomerbaustein auf. Die Peptide P6 und P22 hingegen weisen als einzige der getesteten Peptide mindestens zwei Npcb Monomere in ihrer Seitenkette auf. Dies könnte der Grund für ihren Transport in die Pronephrone der Fische sein, da die Nephronen den Chlorhaushalt des Körpers regulieren und somit Chlorid Ionen aus dem Blut filtern können. Somit kann diese spezifische Akkumulation genutzt werden, um über diese Peptide Medikamente für Nierenerkrankungen zu transportieren. Bei diesem Versuch viel auch eine häufige Akkumulation in den Neuromasten des Zebrafisches auf. Vor allem die Peptide P8, P56 und P58 zeigten hier eine starke Affinität, die Peptide P1 P29, P28 und P44 konnte ebenfalls, wenn auch geringer, in den Neuromasten detektiert werden (Abbildung 104, Abbildung 105). Die Neuromasten der Zebrafische sind sensorische Organe. Sie besitzen Haarzellen die Wasserbewegungen detektieren können und sind daher vergleichbar mit den Haarzellen des menschlichen Gehörganges. Sie befinden sich an der Lateralen Linie des Zebrafisches und werden häufig für die Untersuchungen des Hörverlustes eingesetzt, der durch eine Schädigung der Haarzellen verursacht wird. Über die Untersuchung der Neuromasten können Ototoxine identifiziert werden die für den Hörverlust verantwortlich sind<sup>[308]</sup> oder Wirkstofftransporter die dagegen ankämpfen<sup>[309]</sup> können. Die Affinität der Peptide zu den Neuromasten zeigt ihr Potential für eine aurale Applikation, also einer Medikamentenverabreichung über den Gehörgang, und wodurch auch ihr Targeting von *Drug Delivery*-System für die Behandlung im Gehörgang eingesetzt werden könnte. Ein weiteres Sinnesorgan des Zebrafisches, das ebenfalls direkt erreicht werden kann, ohne dass die Wirkstoffe die Haut der Zebrafische penetrieren müssen, ist das olfaktorische System. Dieses sitzt beim Zebrafisch, sowie auch beim Menschen in der Nähe der Nasenöffnung, wodurch Wirkstoffe direkt durch die Nase in das olfaktorische System transportiert werden können. In das olfaktorische System des Zebrafisches akkumulierten vor allem die Peptide P1, P8, P56 und P58. Da diese durch das Einatmen des Zebrafisches aufgenommen werden können, was einer intranasalen Medikamentenapplikation Nahe

kommt, ist die Akkumulation von Substanzen im olfaktorischen System des Zebrafisches nicht unwahrscheinlich. Viren wie das SARS-CoV-2 nutzen diesen Weg häufig, um in den Körper zu gelangen. Dabei können sie olfaktorische Schäden, Entzündungen und Funktionsstörungen wie den Verlust des Geruchssinns verursachen.<sup>[310,311]</sup> Olfaktorische *Drug Delivery*-Systeme könnten hier für die Behandlung von Viruserkrankungen eingesetzt werden, um eine direkte und lokale Behandlung zu ermöglichen. Da das olfaktorische System direkt mit dem Gehirn verbunden ist, kommt es bei einer Infektion auch häufig zu Hirnschäden. Im Bereich des Cerebellums des Hinterhirns im Zebrafisch konnten hierbei die Peptide P6 und P44 detektiert werden<sup>[312]</sup> (Abbildung 105, g) grüner Pfeil). Dieses ist für die Steuerung und Koordination von Bewegungsabläufen verantwortlich und kann aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nur schlecht bei einer Behandlung von Erkrankungen erreicht werden. Somit zeigen diese Peptide auch eine Möglichkeit für die Behandlungen von Hirninfektionen. Diese Ergebnisse zeigen das große Potential der Peptide, die somit bereits erste Nachweise ihrer Blut-Hirn-Schranke-Penetrationsfähigkeit liefern. Bei der Betrachtung der viszerale Organe der Zebrafische konnte zudem eine Akkumulation von P44 im Rektum des Zebrafisches beobachtet werden (Abbildung 105, g) grüner Kasten). Interessant könnte diese Akkumulation zum Beispiel für die Behandlung von Rektumkarzinomen sein, dass aktuell die zweithäufigste Darmkrebsart ist und durch eine zielgerichtete Behandlung bessere Heilungschancen aufweisen könnte. Da sich P44 nicht wie erwartet im oberen gastrointestinalen Bereich des Fisches ansammelte wurde zudem das Peptid P1 untersucht, das ebenfalls eine Spezifität zum Gastrointestinaltrakt des Fisches besitzen sollte.<sup>[59]</sup> Nach 24 h Inkubation konnte für das Peptid P1 die Akkumulation im intestinalen Trakt des Fisches nachgewiesen werden (Abbildung 104). Seine Affinität zum Dünndarm macht es attraktiv für die orale Applikation von Wirkstoffen, die so besser von Darmepithel aufgenommen werden können. Das Peptid P95 schien die Epidermis des Fisches nicht durchdringen zu können. Es akkumulierte lediglich in den Epithelzellen der Fischhaut und kommt somit für einen organspezifischen Wirkstofftransport nur für eine äußere Behandlung der Haut infrage (Abbildung 105).

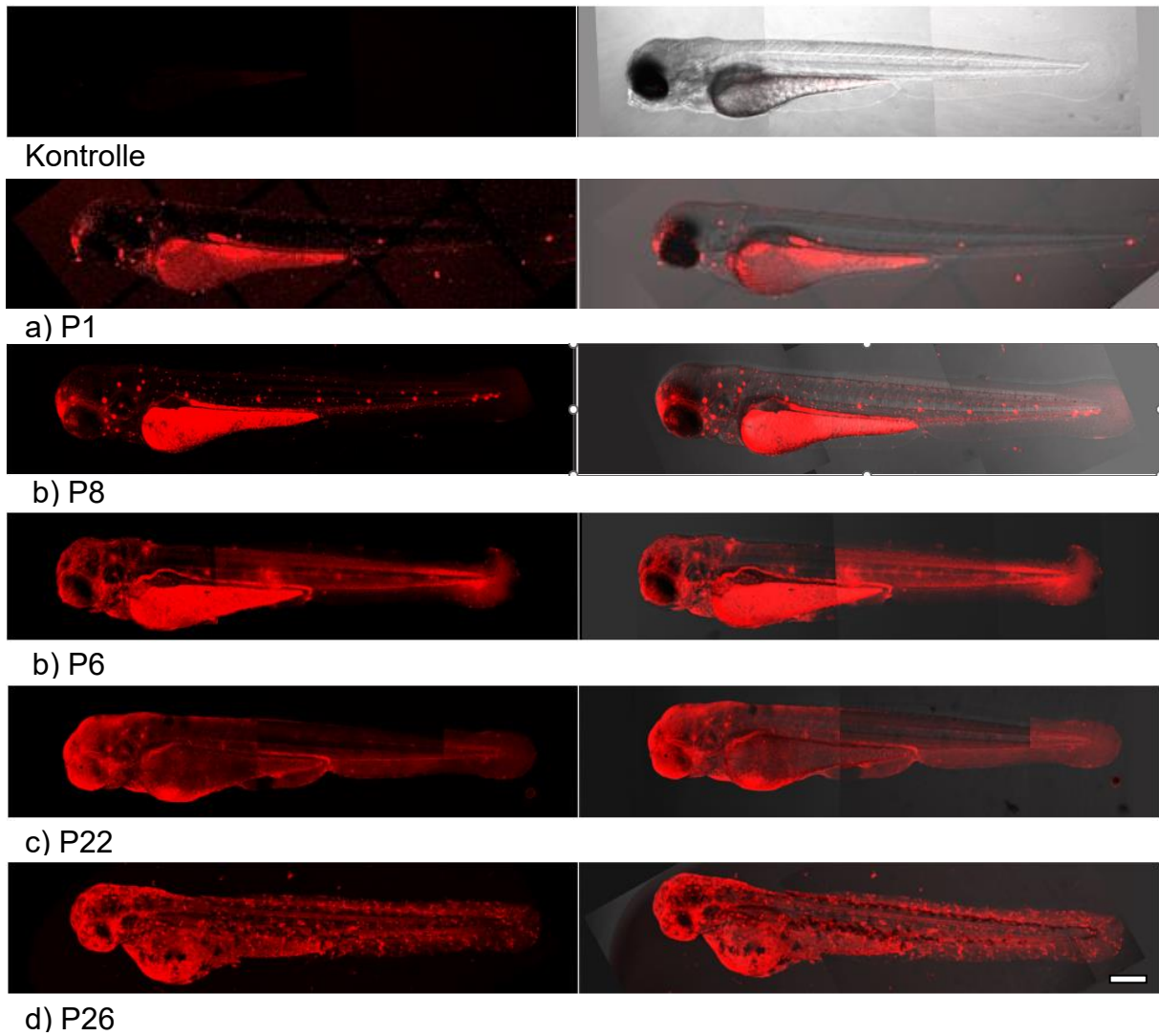


Abbildung 104: Akkumulation verschiedener Peptoide ( $60 \mu\text{M}$ ) nach 24 h Inkubation im Zebrafisch Embryo (72 hpf). Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Peptoide in rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 650 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Maßstab:  $230 \mu\text{m}$ .

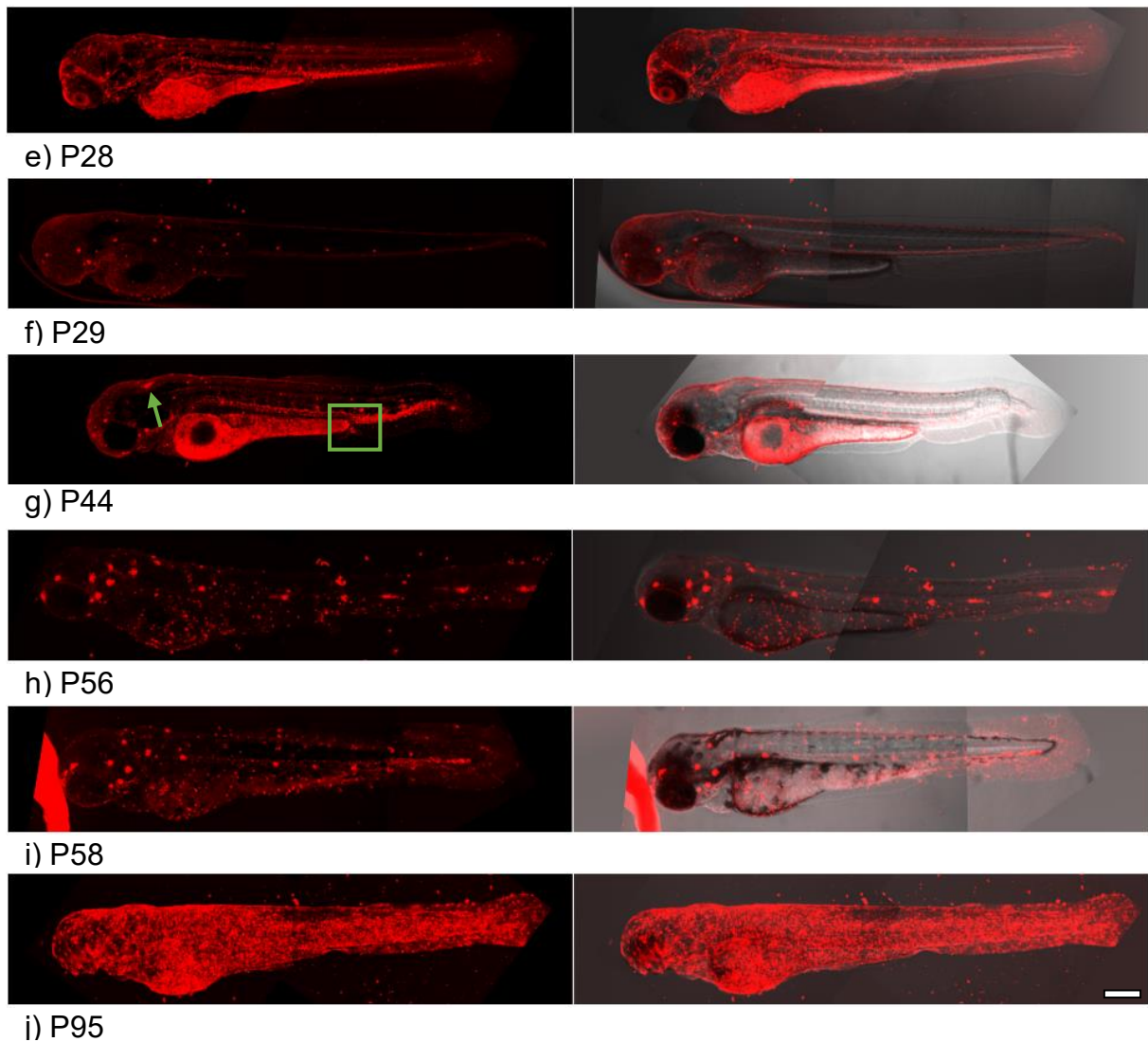


Abbildung 105: Akkumulation verschiedener Peptoide ( $60 \mu\text{M}$ ) nach 24 h Inkubation im Zebrafischembryo (72 hpf). Grüner Pfeil markiert das Cerebellum, grüner Kasten markiert den After. Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Peptoide in rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 650 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Maßstab:  $230 \mu\text{m}$ .

Bei der Betrachtung der Akkumulation von P@GNG Nanogelen im Zebrafischembryo, konnten lediglich die Nanogelee P8@GNG, P44@GNG und P1@GNG detektiert werden (Abbildung 106, Abbildung 107). Nach 24 h Inkubation zeigten unmodifizierte Nanogelee (GNG[BSA-RB]) die zur Detektion mit fluoreszenzmarkiertem BSA beladen wurden, keine spezifische Anlagerung in den Organen der Zebrafische, wohingegen die modifizierten Nanogelee die Fischhaut penetrieren und organspezifisch transportiert werden konnten. Peptoid P8 transportierte das Nanogel (P8@GNG) wie erwartet zum olfaktorischen System und den Neuromasten der Fische (Abbildung 106, b) und e)). P44 transportierte das Nanogel (P44@GNG) zu den Neuromasten und zum embryonalen After (Abbildung 106, d)), während P1@GNG in den Bereich des sich

bildenden Darmes akkumulierte (Abbildung 106, c) und f)). Ein organspezifischer Transport über die Applikation der Dermis konnte somit für die Peptoid-modifizierten Nanogelee nachgewiesen werden.

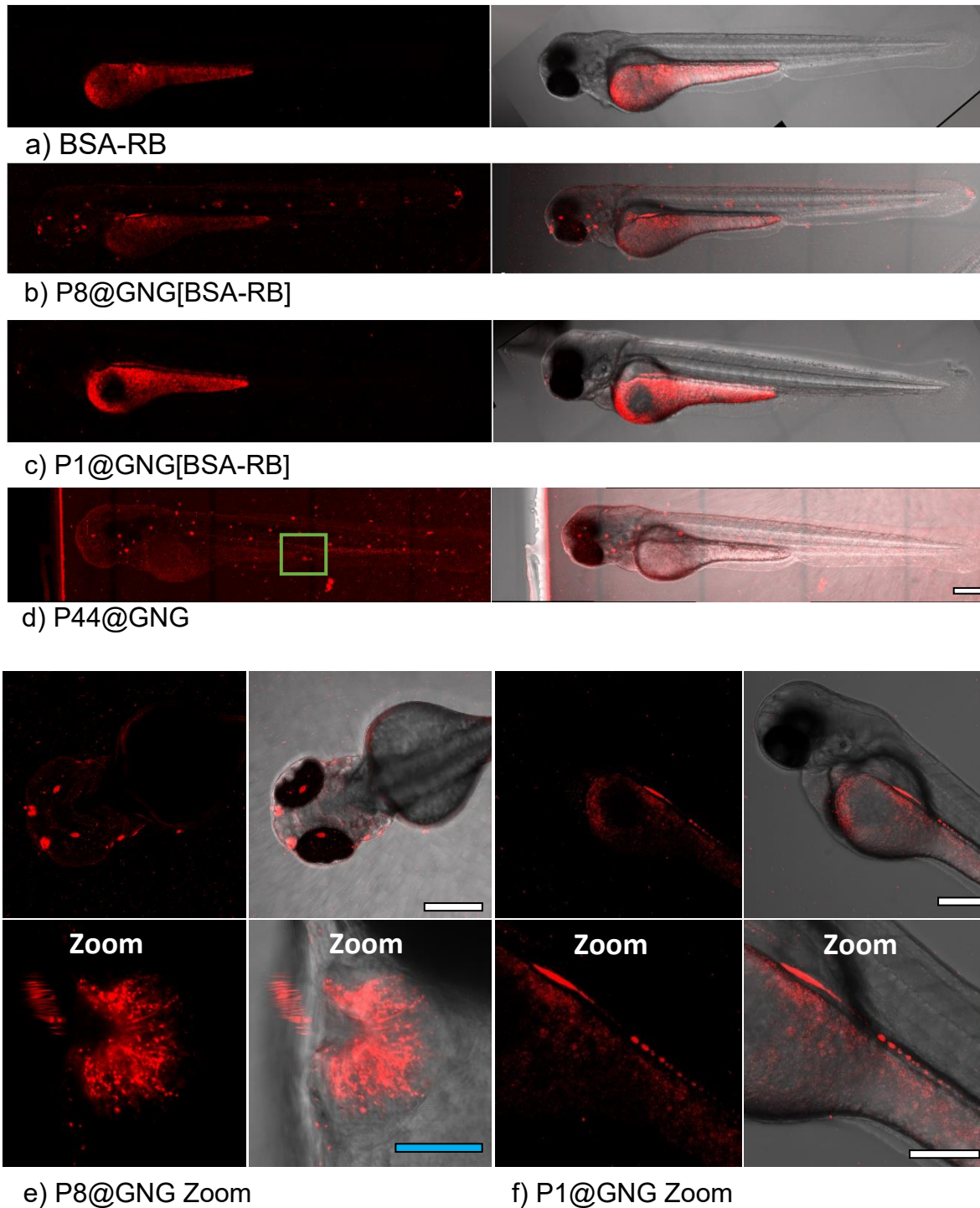


Abbildung 106: Akkumulation verschiedener Nanogelee (200 µg/mL) nach 24 h Inkubation im Zebrafischembryo (72 hpf). Grüner Kasten markiert den After. Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Nanogelee in rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 650 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Maßstab: 230 µm, Maßstab blau (e): 50 µm.

### 3.2.17.3 Untersuchung der *in vivo* Biodistribution von P@GNG im Zebrafisch über eine intravenöse Applikation

Der Weg, mit dem ein Wirkstoff verabreicht wird, hat häufig Auswirkung auf seine Lokalisation und seinen Metabolismus.<sup>[75,313]</sup> Deshalb ist es wichtig zusätzlich zur transdermalen Aufnahme andere Applikationsarten zu betrachten. Im Folgenden wurde nun die intravenöse Gabe des Nanogels und seiner freien Peptide untersucht. Die Mikroskopie der 4 dpf alten Zebrafischen fand 24 h nach Injektion mit 75  $\mu$ M Peptoid bzw. 200  $\mu$ g/mL P@GNG in die Kardinalvene statt. Die anschließende mikroskopische Auswertung zeigte auch eine Akkumulation der Peptide in den Hirnarealen des Fischembryos. In diese Areale akkumulierten die Peptide P6, P56, 58, P8 und P95. P44 hingegen akkumulierte in den intestinalen Vorstufen des Embryos. Eine Akkumulation im Pronephron war bei den Peptoiden P6, P56 und P95 zu detektieren. Die Peptide P22, P28 und P26 zeigten zudem eine starke Toxizität auf die Embryonen, was zu starken morphologischen Änderungen bis hin zum Tod führte.

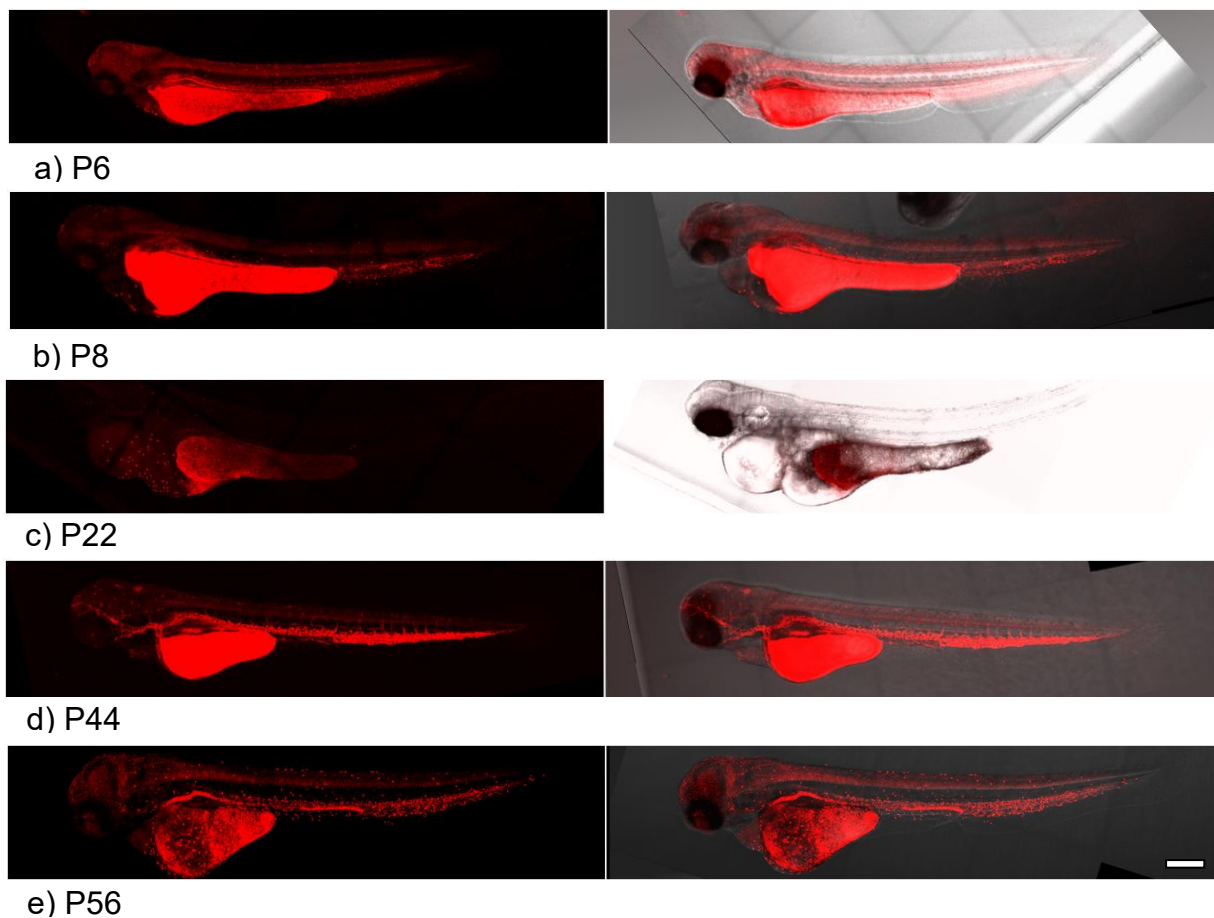
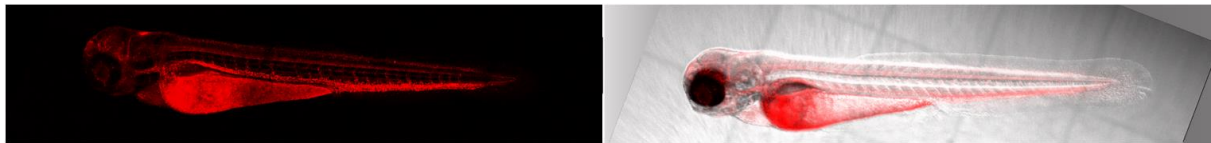
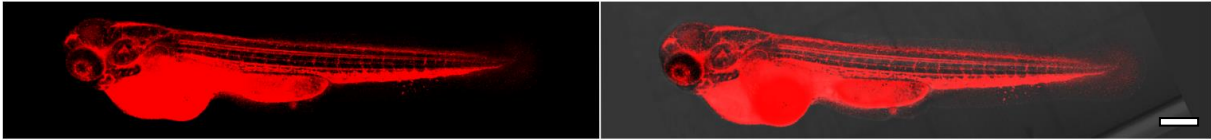


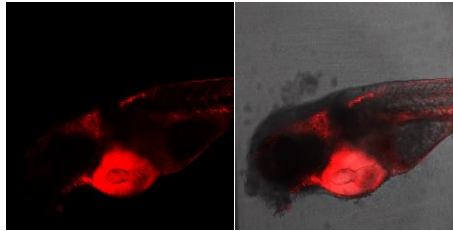
Abbildung 107: Akkumulation verschiedener Peptide (60  $\mu$ M) 24 h nach Injektion im Zebrafischembryo (72 hpf). Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Peptide in rot ( $\lambda_{exc} = 543$  nm,  $\lambda_{em} = 585 - 650$  nm) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Maßstab: 230  $\mu$ m.



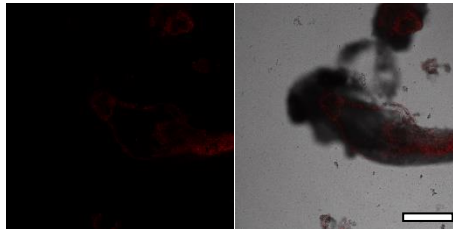
f) P95



g) P58



h) P26



i) P28

Abbildung 108: Akkumulation verschiedener Peptoide ( $60 \mu\text{M}$ ) 24 h nach Injektion im Zebrafischembryo (72 hpf). Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Peptoide in rot ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 585 - 650 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Maßstab  $230 \mu\text{m}$ .

Die Injektion der Fische wurde ebenfalls mit den Nanogelen P1@GNG, P8@GNG und P4@GNG durchgeführt. Die Untersuchung des P1@GNG fand in Kollaboration mit B. Sc. Christian Quaschnig im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (IFG, KIT) statt. Hierbei zeigte sich eine Verteilung des P1@GNG (Abbildung 109, a)) und P8@GNG (Abbildung 109, b)) im ganzen Blutkreislauf des Fischembryos, zudem ist eine Ansammlung, vor allem von P1@GNG (Abbildung 109, a) grüner Pfeil), in den Hirnarealen des Embryos zu erkennen, während das P44@GNG in den Teilabschnitt der intestinalen Vorstufe transportiert wurde (Abbildung 109, c)). Durch die intravenöse Gabe konnte hier ebenfalls eine organspezifische Akkumulation erreicht werden, wobei die Nanogelee auch durch die endotheliale Barriere der Organe transportiert werden mussten. Eine Akkumulation im olfaktorischen System konnte aufgrund der Applikationsart wie erwartet auf diesem Weg nicht erreicht werden, jedoch ist der Transport in das embryonale Hirn gelungen.

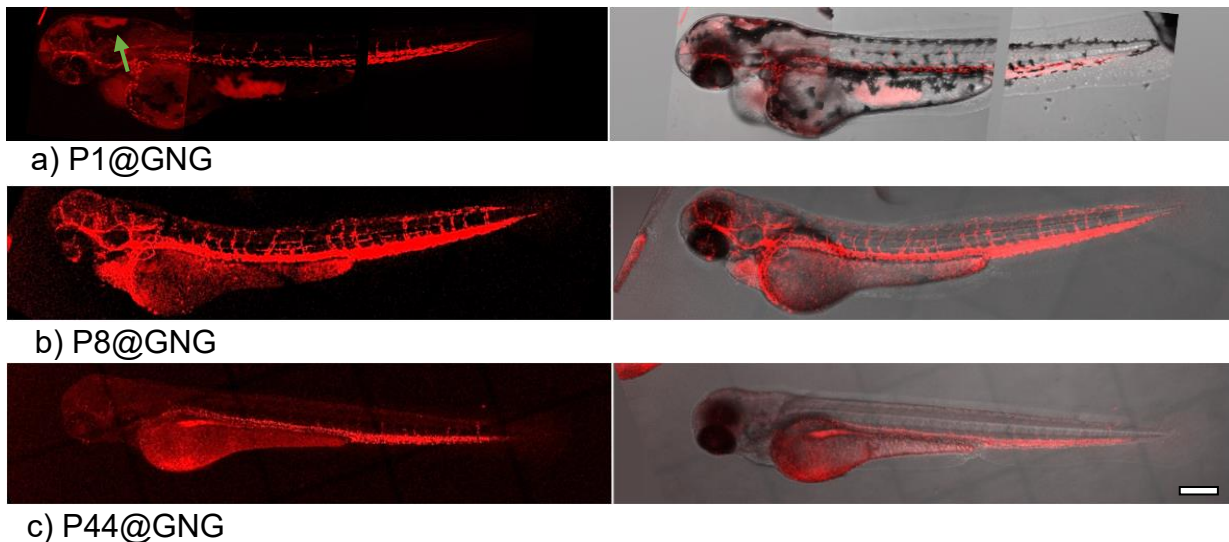


Abbildung 109: Akkumulation verschiedener Nanogeles (200 µg/mL von P8@GNG und P44@GNG, 1mg/mL von P1@GNG) 24 h nach Injektion im Zebrafischembryo (72 hpf). Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Nanogeles in rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 650 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Grüner Pfeil markiert das Hirnareal des Embryos. Maßstab: 230 µm.

#### 3.2.17.4 Untersuchung der *in vivo* Biodistribution von Peptoiden im Zebrafischembryo über eine orale Applikation

Eine orale Applikation konnte lediglich über den Verlauf von 4 h untersucht werden, da eine längere Haltung der Tiere ethisch nicht vertretbar ist. Für diesen Versuch konnten nur Ergebnisse von den Peptoiden P8 und P1 gewonnen werden (Abbildung 110). Für einen ersten Eindruck einer möglichen spezifischer Akkumulation sollte dies jedoch ausreichen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl das Peptoid P8 als auch das Peptoid P1 im Magen-Darm-Trakt aufgenommen wurden, wobei P1 stärker im Magen akkumulierte, während P8 auch verstärkt im Darmtrakt<sup>[305]</sup> zu finden war. Peptoid P8 akkumulierte zudem erneut im olfaktorischen System. Da eine orale Applikation bei Fischen auch immer mit einer transdermalen Applikation einhergeht, kann die olfaktorische Akkumulation von P8 auch von einer nasale Aufnahme herrühren. Eine Übertragung dieses Ergebnisses auf die Nanogeles ist im Hinblick auf die vorherigen Erkenntnisse wahrscheinlich, vor allem da durch die Mundöffnung auch größere Partikel in den Magen-Darm-Trakt gelangen können. Ob die Nanogeles jedoch auch durch die Darmbarriere transportiert werden können, kann aufgrund des kurzen Inkubationszeitraumes mit diesem Experiment nicht analysiert werden.

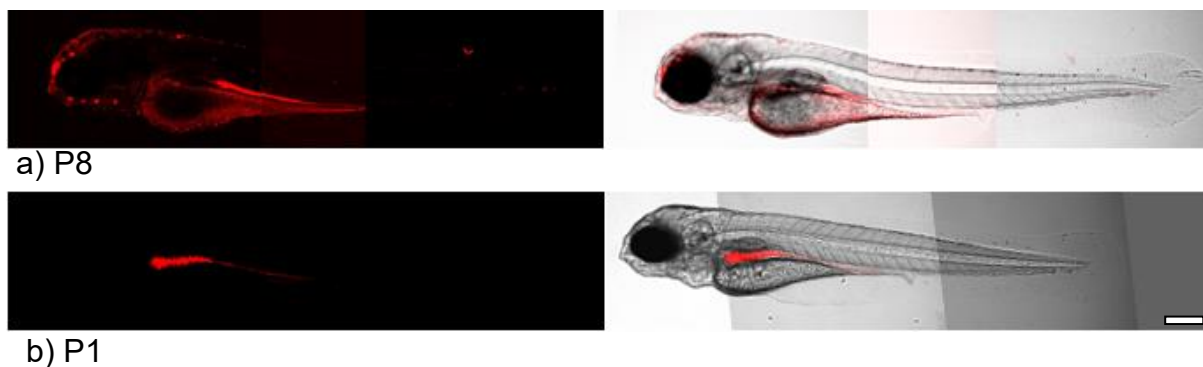


Abbildung 110: Akkumulation verschiedener Nanogelee (200 µg/mL) 4 h nach oraler Aufnahme im Zebrafischembryo (72 hpf). Abgebildet ist die Fluoreszenzaufnahme der Peptide in rot ( $\lambda_{exc} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 585 - 650 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit der Hellfeldaufnahme. Maßstab: 230 µm.

### 3.2.18 *In vitro* Charakterisierung der Penetration von GNG durch biologische Barrieren

Die unterschiedlichen Akkumulationen der Testsubstanzen bei unterschiedlichen Applikationsarten, machen deutlich, dass biologischen Barrieren bei der Ansteuerung des Zielortes von großer Bedeutung sind. Es ist obligatorisch, dass jedes neue Medikament darauf getestet wird, ob es das Potential zur Überwindung solcher Barrieren besitzt und wird meist durch Studien an Tiermodellen durchgeführt.<sup>[314]</sup> Die Untersuchung des Transports durch die Barrieren kann jedoch nicht immer vom Tier auf den Menschen übertragen werden- Aus diesem Grund werden immer neue Systeme etabliert, welche die biologischen Barrieren des Menschen nachahmen können.<sup>[75]</sup> So kommen unter anderem *Organ-on-a-Chip*-Systeme zum Einsatz, um die Penetrationseigenschaften von Substanzen zu überprüfen.<sup>[116,117]</sup> In diesem Kapitel geht es um die Charakterisierung der Nanogelee hinsichtlich ihres Transports durch die Blut-Hirn-Schranke und Darmbarriere.

#### 3.2.18.1 Transport von GNG durch die Blut-Hirn-Schranke

Das Zentralnervensystem (ZNS) ist durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt, die das Eindringen schädlicher Moleküle und auch therapeutischer Wirkstoffe in das Gehirn begrenzt. Bisher können nur wenige Moleküle die Blut-Hirn-Schranke durchdringen, was die Entwicklung von Therapien für Erkrankungen des ZNS einschränkt. Die Nanotechnologie bietet vielversprechende Möglichkeiten, um therapeutische Wirkstoffe durch die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. So zeigen Modifizierungen von Nanoträgern mit spezifischen Zielliganden oder Molekülen vielversprechende Ergebnisse für die rezeptorvermittelte Transzytose, die notwendig ist für die gezielte Wirkstofffreisetzung im ZNS.<sup>[315]</sup>

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Potential der Nanogelee für eine effektive Verabreichung von Medikamenten durch die Blut-Hirn-Schranke, um eine Behandlungsmöglichkeit von Hirnerkrankungen zu bieten. Die Untersuchung an der Blut-Hirn-Schranke wurde in Kollaboration mit Dr. Nicole Pleschka im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (am IFG, KIT) durchgeführt.<sup>[316]</sup> Hierfür wurde die Blut-Hirn-Schranke im *Organ-on-a-Chip*-Modell vasQchip (Abbildung 111) nachgestellt.<sup>[119]</sup> Dieses System hat seinen Vorteil in der Verwendung einer halbrunden Kanalstruktur, die ein Blutgefäß naturnahe nachahmen kann. Da der vasQchip mikrofluidisch betrieben werden kann, wirken so die Scherkräfte gleichmäßig auf die gesamte Endothelschicht des Blutgefäßes, wodurch eine homogene Auskleidung des kontinuierlichen Blutgefäßes erreicht werden kann.<sup>[119]</sup> Ob nun die hier vorgestellten Nanogelee die Blut-Hirn-Schranke durchdringen können, wurde mit dem Nanogel P8@GNG[DOP] untersucht. Dopamin wird für die Therapie der Parkinson Erkrankung (Morbus Parkinson) im Gehirn benötigt. Da es aber selbst nicht in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wäre der Transport über das Nanogel von großer Bedeutung.<sup>[253]</sup> Das Peptoid P8 zeigte in den vorherigen Ergebnissen eine Akkumulation im olfaktorischen System und Hirnarealen,<sup>[59]</sup> aus diesem Grund wurde es ausgewählt um ein spezifisches *Targeting* der Nanogelee ins Gehirn und somit den Transport des Dopamins durch die Blut-Hirn-Schranke zu verbessern.

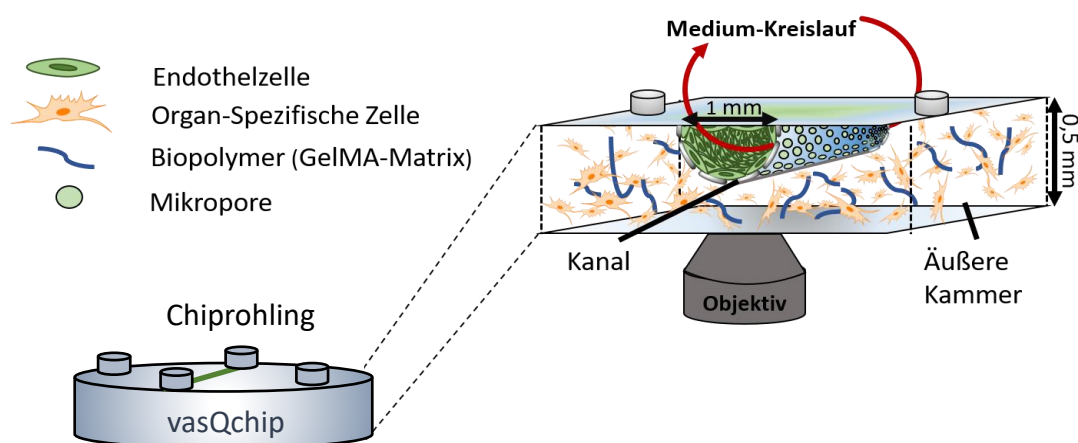


Abbildung 111: Schematische Darstellung des vasQchip-Systems mit einem Rohling aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Der Kanal besteht aus einer Polycarbonat Membran, die durch einen Beschuss mit Schwerionen eine laterale Ionenspur aufweist. Die halbrunde Kanalform wird durch das Thermoformen erzeugt. Anschließend werden die Membranporen durch das Ätzen der Ionenspur mit NaOH geöffnet und mit dem Chiprohling verbunden. Der gesamte Chip wird mit einem Deckglas abgedichtet und kann dann an eine mikrofluidisches System angeschlossen werden.

Für die Untersuchung der möglichen Penetration der Nanogele durch die Blut-Hirn-Schranke wurden im vasQchip Blut-Hirn barrieretypische Zellen kultiviert, um eine funktionelle Blut-Hirn-Schranke aufzubauen. Hierzu zählen humane Astrozyten (HA), humane immortalisierte Mikroglia, humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (hCMEC/D3) und humane vaskuläre Hirnperizyten (HBVP). Für die Besiedlung des mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichteten umgebenden Kompartiments wurden  $5 \cdot 10^5$  HBVP ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht  $5 \cdot 10^5$  HA-Zellen ausgesät und für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurden  $7,5 \cdot 10^4$  hCMEC/D3 im mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal kultiviert. Nachdem die Blut-Hirn-Schranke im vasQchip rekonstruiert war, wurde der Chip für 7 Tage bei einer Flussrate von 100  $\mu$ l/h fluidisch kultiviert. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung wurde anschließend überprüft, ob sich das Barriere-Model konfluent ausbildete (Abbildung 112). Hierfür wurden Zellen des vasQchips wie in Kapitel 5.2.11.5 beschrieben über PFA fixiert und anschließend permeabilisiert um die Zellmembranpermeabilität gegenüber der Immunofluoreszenzmarker zu erhöhen. Die unterschiedlichen Zellen wurden dann mit zellspezifischen Markern immunhistochemisch markiert. Hierfür wurde für HBVP ein  $\alpha$ -SMA-Antikörper (AK) verwendet, für die HA ein GFAP- AK und für die hCMEC/D3 ein CD31-AK. Die Zellkerne wurden zum Schluss mit Hoechst33342 markiert und der Chip über Konfokalmikroskopie ausgewertet. Über diese Färbung konnte das homogene, konfluente Wachstum der barrieretypischen Zellen entlang der Kanalstruktur des vasQchips (Abbildung 112) bestätigt werden.

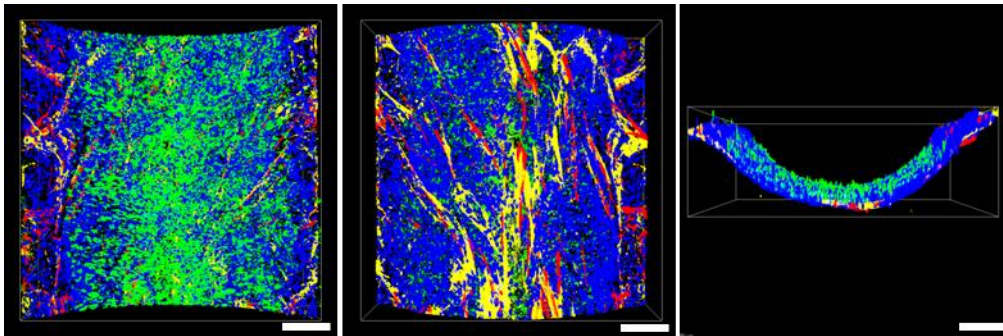


Abbildung 112: Immunfluoreszenzfärbung des Blut-Hirn-Schranke-Modells im vasQchip (in Kollaboration mit Dr. Nicole Pleschka). Für die Besiedlung des mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichteten umgebenden Kompartiments wurden  $5 \cdot 10^5$  HBVP ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden  $5 \cdot 10^5$  HA auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht ausgesät und für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurden  $7,5 \cdot 10^4$  hCMEC/D3 in mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal kultiviert und für 7 Tage fluidisch bei einer Flussrate von  $100 \mu\text{l/h}$  mit Medium versorgt. Zu sehen ist eine Immunfluoreszenzmarkierung der Zellen in Gelb:  $\alpha$ -SMA in HBVP, Rot: GFAP in HA und Grün: CD31 in hCMEC/D3. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) markiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden z-stack Messungen durchgeführt ( $n = 119$ , Abstand =  $3 \mu\text{m}$ ,  $h = 350 \mu\text{m}$ , Leica Stellaris 5). Abgebildet ist von links nach rechts die innere, die äußere und die horizontale Ansicht des Kanals. Maßstab:  $200 \mu\text{m}$ .

Vor der Durchführung des Experimentes mit dem entsprechenden Nanogelen sollte eine geeignete Behandlungskonzentration definiert werden. Für diesen Zweck wurde eine Viabilitätstest über die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Assay, wie in Kapitel 5.2.14 beschrieben, an Blut-Hirn-Schranke typischen Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von P8@GNG und P8@GNG[DOP] (Abbildung 113) für 72 h inkubiert. Die kolorimetrische Auswertung zeigt eine deutlich höhere Toxizität des mit Dopamin beladenen Nanogels P8@GNG[DOP] im Vergleich zum ungefüllten Nanogel P8@GNG (Abbildung 113). Dabei beträgt der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von P8@GNG[DOP] bei allen Zelllinien, außer den Neuronen, etwa  $2 \text{ mg/mL}$ . Die Neuronen reagierten deutlich empfindlicher auf das im Nanogel enthaltene Dopamin wodurch sich einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,08 \text{ mg/mL}$  für P8@GNG[DOP] ergibt, was auch hier, wie bereits bei den HepG2-Zellen in Vorversuchen auffiel (Kapitel 3.2.15.2), auf ihre hohen Dopamin-Rezeptorgehalt zurückzuführen ist. Das leere P8@GNG besitzt auch auf die Neuronen den stärksten Einfluss mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert knapp unter  $1 \text{ mg/mL}$  und zeigt mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,18 \text{ mg/mL}$  den zweit stärksten inhibitorischen Effekt auf die Endothelzellschicht aus HCMEC/D3. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von P8@GNG lag bei allen anderen Zellarten bei Konzentrationen von 5 bis  $10 \text{ mg/mL}$ . Anhand dieser Ergebnisse wurde eine Konzentration von  $1,12 \text{ mg/mL}$  P8@GNG[DOP] für die Untersuchung an der Blut-Hirn-Schranke im vasQchip ausgewählt, dies

entsprach einer Dopaminkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  und liegt somit nicht im zytotoxischen Bereich für die untersuchten Zellarten.

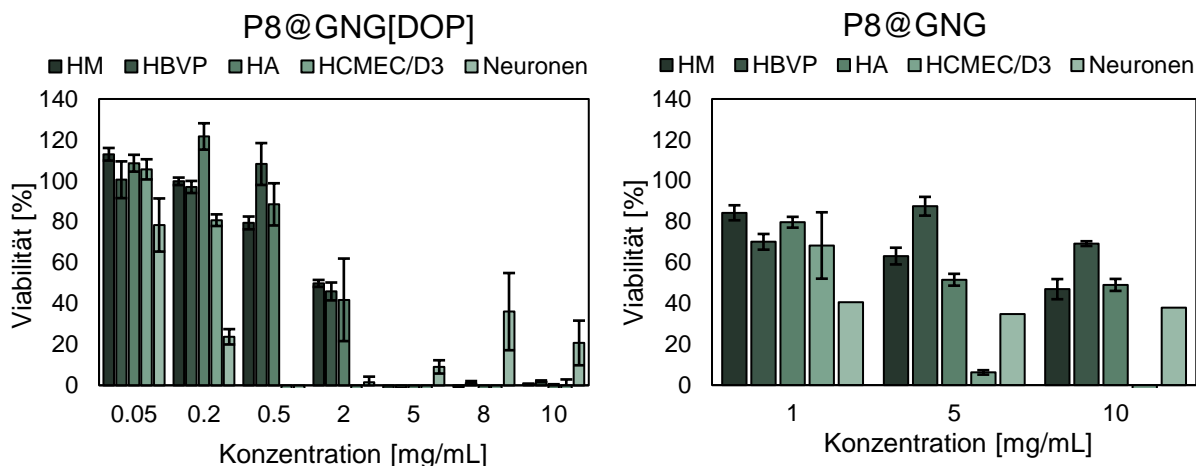


Abbildung 113: Zellviabilitäts-Assay von HM, HOVP, HA, HVMECid3 und Neuronen.  $10^4$  Zellen pro Well (2 x  $10^4$  HCMECid3) einer 96-Well-Platte wurden nach 24 h Wachstum mit 0,05, 0,2, 0,5, 2, 5, 8 und 10 mg/mL P8@GNG und 1, 5 und 10 mg/mL P8@GNG[DOP] für 72 h inkubiert. Die Experimente wurden in Dreifachausführung durchgeführt. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n=3$ . In Kollaboration mit Dr. Nicole Pleschka.

Nach der Ermittlung der Zytotoxizität auf die Blut-Hirn-Schranke typische Zellen wurde das Nanogele P8@GNG[DOP] in einer Konzentration von 1,12 mg/mL über ein mikrofluidisches System mit einer Flussraten von 100  $\mu\text{L}/\text{h}$  durch die Blutbahn der artifiziellen Barriere über 72 h perfundiert. Über Fluoreszenzmikroskopie konnte im Anschluss ein Transport durch die Blut-Hirn-Schranke beurteilt werden (Abbildung 114, Abbildung 115). Hierfür wurden Aufnahmen nach 24 h und 72 h Nanogel-Perfusion ausgewertet. Anhand der Fluoreszenz, der mit Rhodamin B markierten Peptide ist in den Aufnahmen der Transport durch die Blut-Hirn-Schranke im Chip deutlich zu erkennen. Zwar akkumulierten die Nanogele zum Großteil in den Endothelzellen (HCMEC/D3) des künstlichen Blutgefäßes, jedoch konnte bereits nach einer Verabreichungszeit von 24 h eine Anreicherung der Nanogele in den Perizyten (HBVP) des umliegenden Kompartiments beobachtet werden (Abbildung 115, A)). Die Aufnahme des Nanogels nahm nach weiteren 72 h Applikation sogar noch deutlich zu (Abbildung 115, B)). So wird die Fluoreszenz des Nanogeles auch in zunehmender Entfernung zum Kanal sichtbar. Durch eine abschließende immunhistochemische Markierung konnte nach der Nanogel-Applikation die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke im Chip-System durch das konfluente Wachstum der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 116). Diese Ergebnisse machen

deutlich, dass ein Transport von Dopamin durch die Blut-Hirn-Schranke im humanen Blutkreislauf somit durch die Gelatine-basierten Nanogelee umgesetzt werden kann.

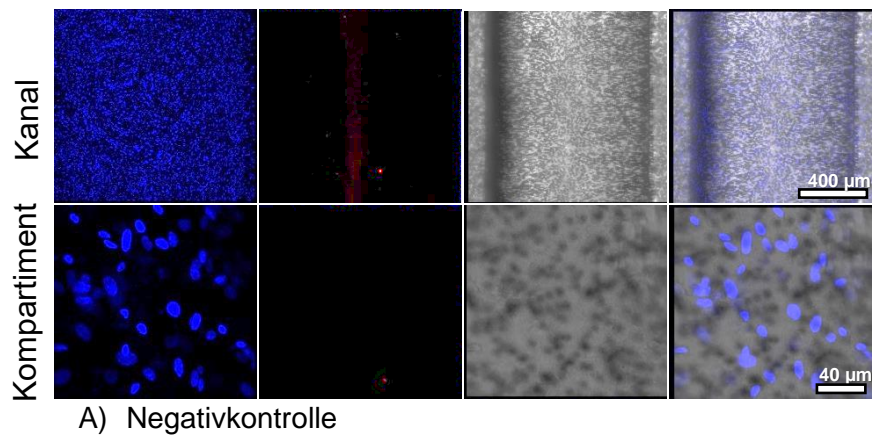


Abbildung 114: Fluoreszenzmikroskopie des Blut-Hirn-Schranke-Modells im vasQchip aus hCMEC/D3, HBVP und HA (in Kollaboration mit Dr. Nicole Plechka). Die Zellen wurden für 7 d fluidisch bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{l/h}$  im Mikrokanal kultiviert, ein unbehandelter Chip diente als Kontrolle (A). Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden z-stack Aufnahme des Kanals durchgeführt ( $n = 119$ , Abstand = 3  $\mu\text{m}$ ,  $h = 350 \mu\text{m}$ , Leica Stellaris). Zu sehen sind die mit Hoechst33342 markierten Zellkern (blau) und die Fluoreszenz der Rhodamin B von P8@GNG[DOP] (rot), einer Hellfeldaufnahme des Kanals sowie deren Überlagerung. Die Abbildungen des Kanals sind in Maximalansicht der 3D-Aufnahme dargestellt. Maßstab: 400  $\mu\text{m}$  und 40  $\mu\text{m}$ .

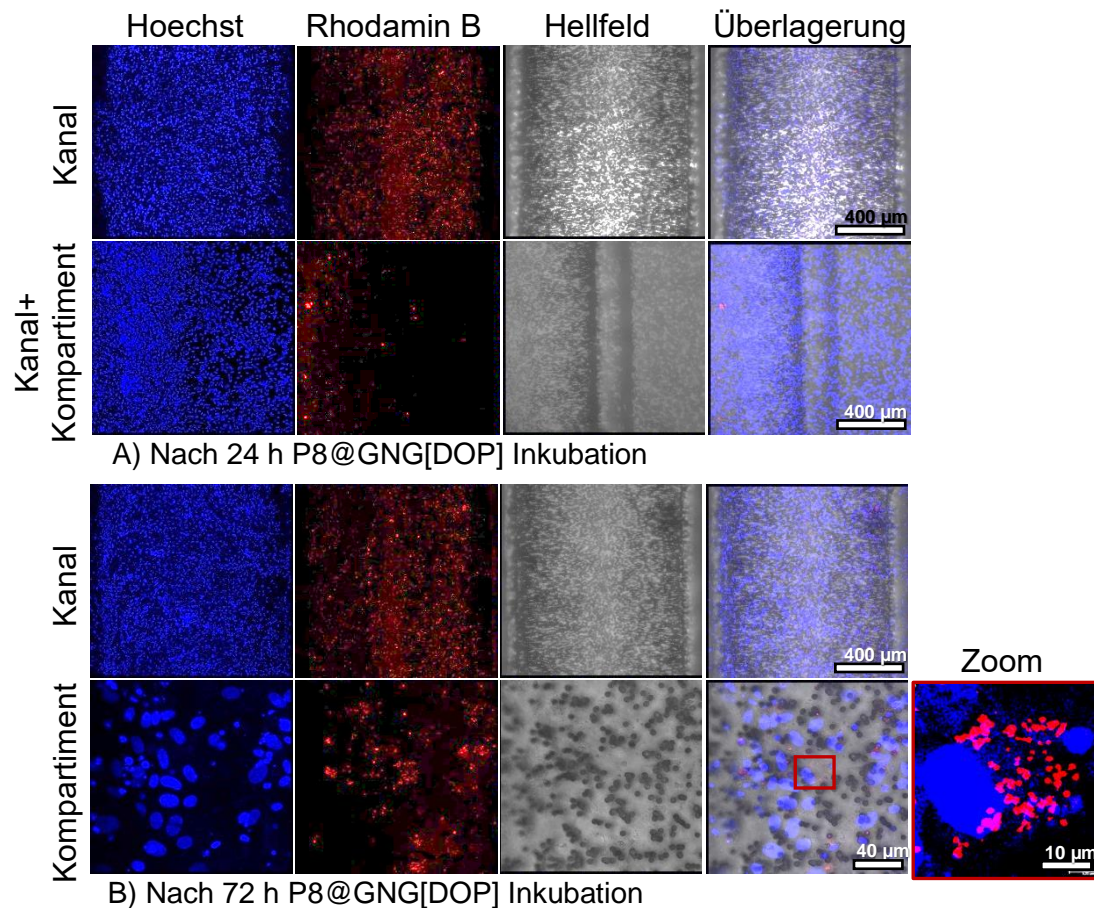


Abbildung 115: Fluoreszenzmikroskopie des Blut-Hirn-Schranke-Modells im vasQchip aus hCMEC/D3, HBVP und HA (in Kollaboration mit Dr. Nicole Plechka). Die Zellen wurden für 7 d fluidisch bei einer Flussrate von 100 µl/h im Mikrokanal kultiviert und anschließend für 24 h (A) und 72 h (B) mit 2 mg/mL P8@GNG[DOP] perfundiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden z-stack Aufnahme des Kanals durchgeführt ( $n = 119$ , Abstand = 3 µm,  $h = 350$  µm, Leica Stellaris). Zu sehen sind die mit Hoechst33342 markierten Zellkern (blau) und die Fluoreszenz von P8@GNG[DOP] (rot), einer Hellfeldaufnahme des Kanals sowie deren Überlagerung. Die Abbildungen des Kanals sind in Maximalansicht der 3D-Aufnahme dargestellt. Maßstab: 400 µm, 40 µm und 10 µm (Zoom).

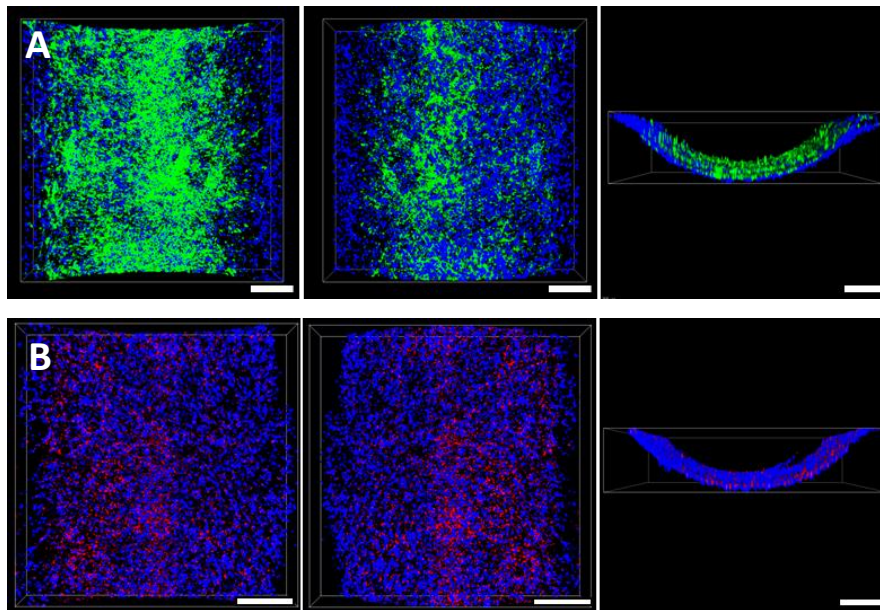


Abbildung 116: A) Immunfluoreszenzfärbung des Blut-Hirn-Schranke-Modells im vasQchip (in Kollaboration mit Dr. Nicole Pleschka) aus hCMEC/D3, HBVP und HA. Für die Besiedlung des mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichteten umgebenden Kompartiments wurden  $5 \cdot 10^5$  HBVP ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden  $5 \cdot 10^5$  HA auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht ausgesät und für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurden  $7,5 \cdot 10^4$  hCMEC/D3 im mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal kultiviert und für 7 Tage fluidisch bei einer Flussrate von  $100 \mu\text{l/h}$  mit Medium versorgt. Zu sehen ist eine Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in hCMEC/D3 (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) markiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden z-stack Messungen durchgeführt ( $n = 119$ , Abstand =  $3 \mu\text{m}$ ,  $h = 350 \mu\text{m}$ , Leica Stellaris 5). Abgebildet ist von links nach rechts die innere, die äußere und die horizontale Ansicht des Kanals. A) Repräsentiert den unbehandelten Chip. B) repräsentiert den mit 2 mg/mL P8@GNG[DOP] behandelten Chip nach 72 h. Zu sehen ist die Markierung der Zellkerne mit Hoechst33342 (blau) und Fluoreszenz von P8@GNG[DOP] (rot). Maßstab:  $200 \mu\text{m}$ .

### 3.2.18.2 Einfluss von P8@GNG[DOP] auf die Neuronenaktivität

Da über das vasQchip-Modell erfolgreich nachgewiesen werden konnte, dass die Nanogele eine artifizielle Blut-Hirn-Schranke durchdringen können, galt es als Nächstes herauszufinden, ob der beladene Wirkstoff Dopamin im Anschluss auch freigesetzt werden kann. Das beladene Dopamin ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren und kann somit direkt die Aktivität von Neuronen beeinflussen. Diese Neuronenaktivität kann dann über das *Calcium Imaging* nachgewiesen werden. Da das Dopamin an Dopaminrezeptoren bindet, die G-Protein gekoppelt zur Stimulation oder Hemmung der Produktion des *second Messengers* cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) führen,<sup>[317]</sup> kann es so auch indirekt den Kalziumgehalt in Zellen beeinflussen, insbesondere in Neuronen.<sup>[317,318]</sup> Denn die Dopaminrezeptoren sind mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen verbunden, die die

Kalziumhomöostase in den Zellen modulieren können. Zum Beispiel kann Dopamin die Kalziumaufnahme regulieren, indem es über die Aktivierung von Dopaminrezeptoren die Aktivität von Kalziumkanälen in der Zellmembran beeinflusst, was zu einer erhöhten oder verminderten Kalziumaufnahme in die Zelle führt.<sup>[317,319-322]</sup> Über die Untersuchung der Aktivität von Neuronen durch die Visualisierung ihres Kalziumsignalwegs, sollte festgestellt werden, ob die P8@GNG[DOP] Nanogelee auch in der Lage sind, die Aktivität der Neuronen zu beeinflussen. Hierfür wurden in Kollaboration mit Hannah Wunderlich aus dem Arbeitskreis von Dr. Kristen Kozielski (Professur für Neuroengineering Materials, Technische Universität München) Neuronen aus humanen neuralen Progenitorzellen (ReNcell VM) in einer 96-Well Platte, wie in Kapitel 5.2.6 beschrieben, differenziert<sup>[323,324]</sup> und anschließend ihre Aktivität über das *Calcium Imaging* visualisiert. Für das *Calcium Imaging* wurde das membrangängige lipophile Fluorophor Fluo-4 AM verwendet. Fluo-4 AM fluoresziert erst nach intrazellulären Metabolisierung und kann dann auch nicht mehr die Zellmembran passieren. Es bindet an Kalzium, wodurch seine Fluoreszenz um das 100-fache an Intensität gewinnt. Somit eignet es sich hervorragend zur intrazellulären Kalziumdetektion.<sup>[325]</sup> Über das *Calcium Imaging* wurde die Aktivität von Neuronen verglichen die 5 min mit 800 µg/mL P8@GNG[DOP] oder mit 96 µg/mL Dopamin behandelt wurden. Als Referenz diente eine unbehandelte Kontrolle. Die Untersuchung der Aktivität erfolgte über die Aufnahme mit einem Konfokalmikroskop für 5 min und 117 Frames, die im Anschluss über EZcalcium, einem MATLAB basierten *open source* Analyse Software Paket, ausgewertet wurden.<sup>[326]</sup> Mithilfe der Software konnten kalziumabhängige Signale in den Zellen detektiert werden, wobei die Intensitätsänderung des Signals über die Zeit berechnet wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die Neuronen zu Beginn des Experimentes auch ohne Behandlung eine hohe Aktivität aufwiesen (Abbildung 117, B). Grund hierfür ist eine intrazelluläre spontane Kalziumaktivität, die häufig die Differenzierung von Neuronen begleitet.<sup>[327]</sup> Spontane Kalziumsignale können auch durch externe Reize ausgelöst werden, was eventuell zu Beginn dieses Versuches durch einen Mediumwechsel, mit und ohne Wirkstoff, vor der Mikroskopie verursacht wurde. Auch die für 5 min mit P8@GNG[DOP] behandelten Neuronen zeigten eine hohe Aktivität nach 5 min Behandlung. Lediglich die Zellen, die mit freiem Dopamin behandelt wurden, wiesen eine deutliche Verringerung an kalziumabhängigen Signalen auf (Abbildung 117, B). Dies kann daran liegen, dass Dopamin bereits in die Zellen aufgenommen wurde bzw. Dopamin an die D2-Rezeptoren gebunden hatte, welche die Kalziumaufnahme in die Zellen verringern.<sup>[322]</sup> Nach einer

Inkubationszeit von 1 h änderte sich die Aktivität in den Neuronen stark (Abbildung 118). Die unbehandelte Kontrolle, zeigte hier keine Aktivität mehr, ebenso wie die, die mit Dopamin behandelt wurden. Im Gegensatz dazu, zeigten die mit dem Nanogel P8@GNG[DOP] behandelten Neuronen noch einige aktive Kalziumsignale. Die Nanogelee zeigen somit einen Einfluss auf die Zellaktivität und was auf eine erfolgreiche Freisetzung des Wirkstoffes aus den Nanogelen Hinweis. Dass die Wirkung anders ausfällt als die des Dopamins, liegt vermutlich an ihrem unterschiedlichen Aufnahmeweg. Während das Dopamin der Nanogelee erst verzögert in den Zellen freigesetzt wird, kann das freie Dopamin direkt von außen an den D-Rezeptoren binden und sofort die Kalziumaufnahme und Freisetzung interner Speicher steuern. Danach muss der Rezeptor und das Dopamin erst wieder reaktiviert werden. Dieser Prozess kann Minuten bis Stunden andauern.<sup>[328,329]</sup> Das Dopamin in der Zelle wird jedoch erst wieder in den synaptische Spalt abgegeben, wenn es durch die Einleitung der Exozytose, z.B. durch kalziumabhängige Aktivierungskaskaden wie der von Calmodulin, ausgestoßen wird (Abbildung 119).<sup>[330,331]</sup> Auch können extrazelluläre Enzyme wie Catechol-O-Methyltransferase (COMT) oder Monoaminooxidase (MAO) freies Dopamin inaktivieren und dessen Wirkung aufheben.<sup>[332]</sup> Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die Entwicklung und Anwendung von Nanopartikeln für die neuronale Modulation noch in einem frühen Stadium ist und noch viele Herausforderungen hinsichtlich ihrer Sicherheit, Wirksamkeit und spezifischen Anwendung zu bewältigen sind.<sup>[333]</sup> Die vorliegenden Ergebnisse zeigen allerdings bereits eine gute Voraussetzung des Nanocarriers P8@GNG[DOP] für den Transport des Neurotransmitters Dopamin in das zentrale Nervensystem.

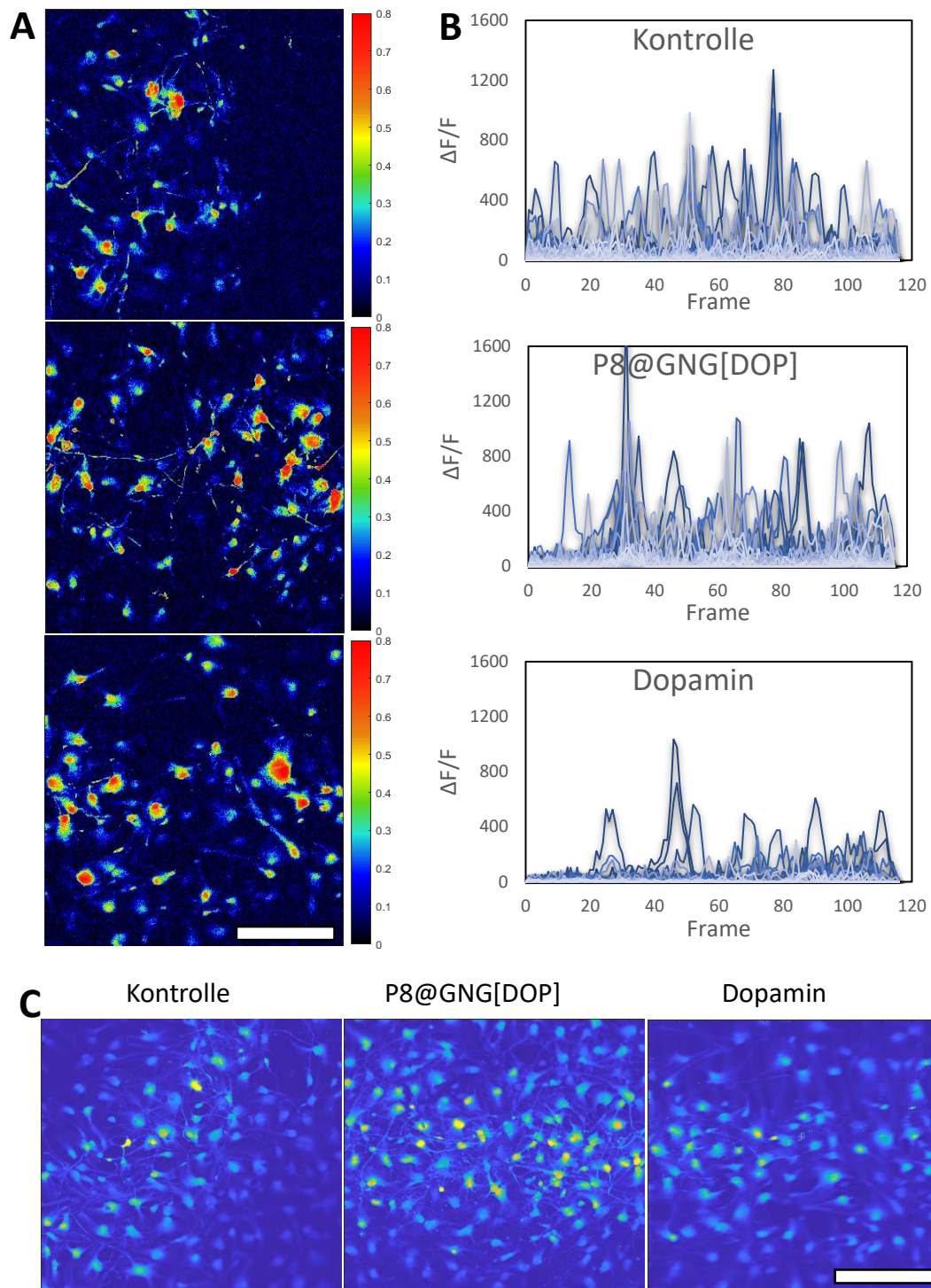


Abbildung 117: Calcium Imaging über Fluo-4 AM der Aktivität von Neuronen nach 5 min Inkubation mit 800  $\mu\text{g/mL}$  P8@GNG[Dop], 96  $\mu\text{g/mL}$  Dopamin oder frischem Medium. Bildsequenzen von 117 Frames innerhalb von 5 min wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Bildsequenzen wurden über die EZcalcium Software Toolbox in MATLAB ausgewertet. A) Heatmap der aktiven Bereiche. B) Signaländerung über die Zeit. C) Intensität des Fluo-4 Signals der Neuronen. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ .

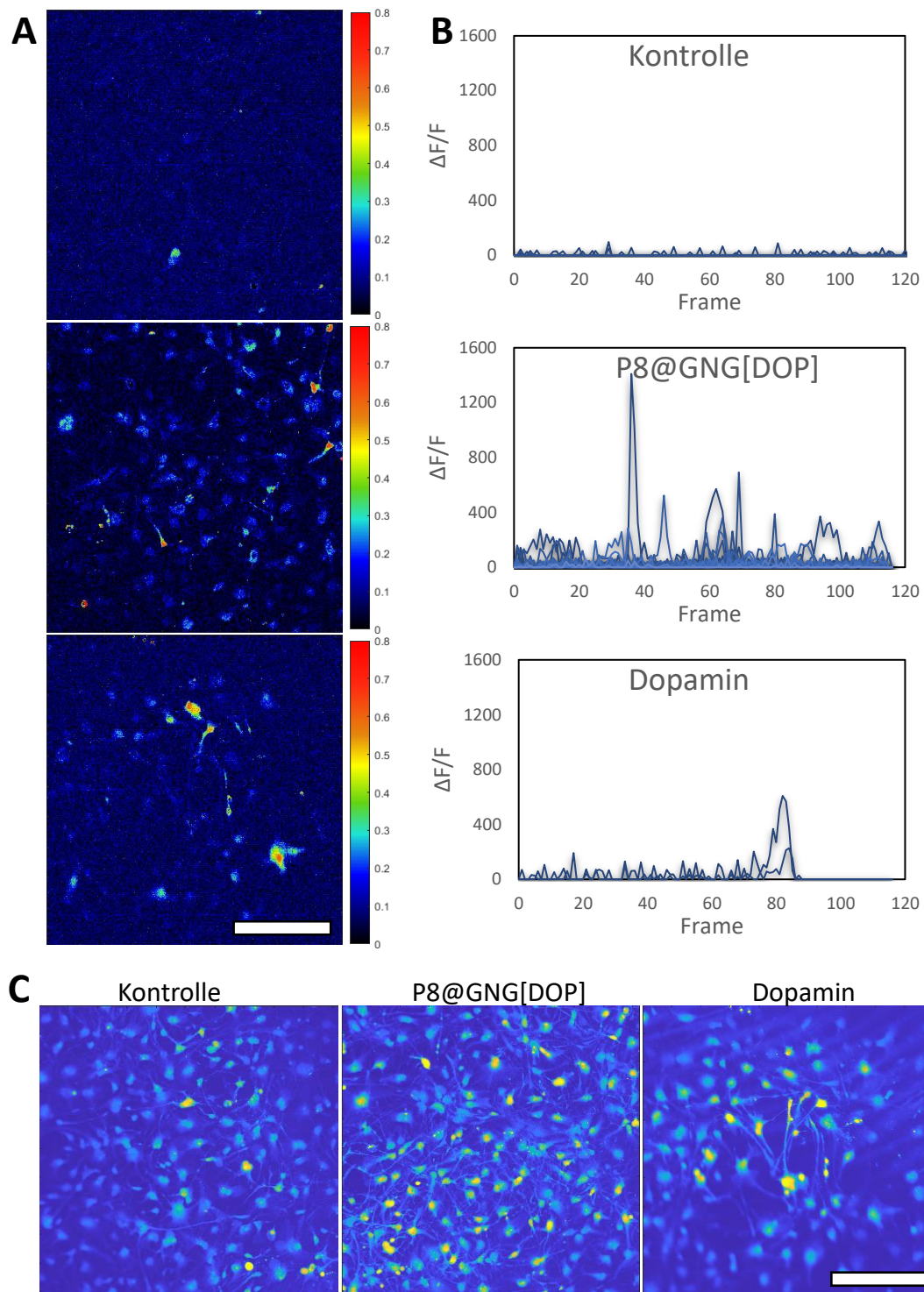


Abbildung 118: Calcium Imaging über Fluo-4 AM der Aktivität von Neuronen nach 5 min Inkubation mit 800  $\mu\text{g/mL}$  P8@GNG[Dop], 96  $\mu\text{g/mL}$  Dopamin oder frischem Medium. Bildsequenzen von 117 Frames innerhalb von 5 min wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Die Bildsequenzen wurden mithilfe der EZcalcium Softwar Toolbox in MATLAB ausgewertet. Abgebildet ist: A) Heatmap der aktiven Bereiche. B) Signaländerung über die Zeit. C) Intensität des Fluo-4 Signals der Neuronen. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ .

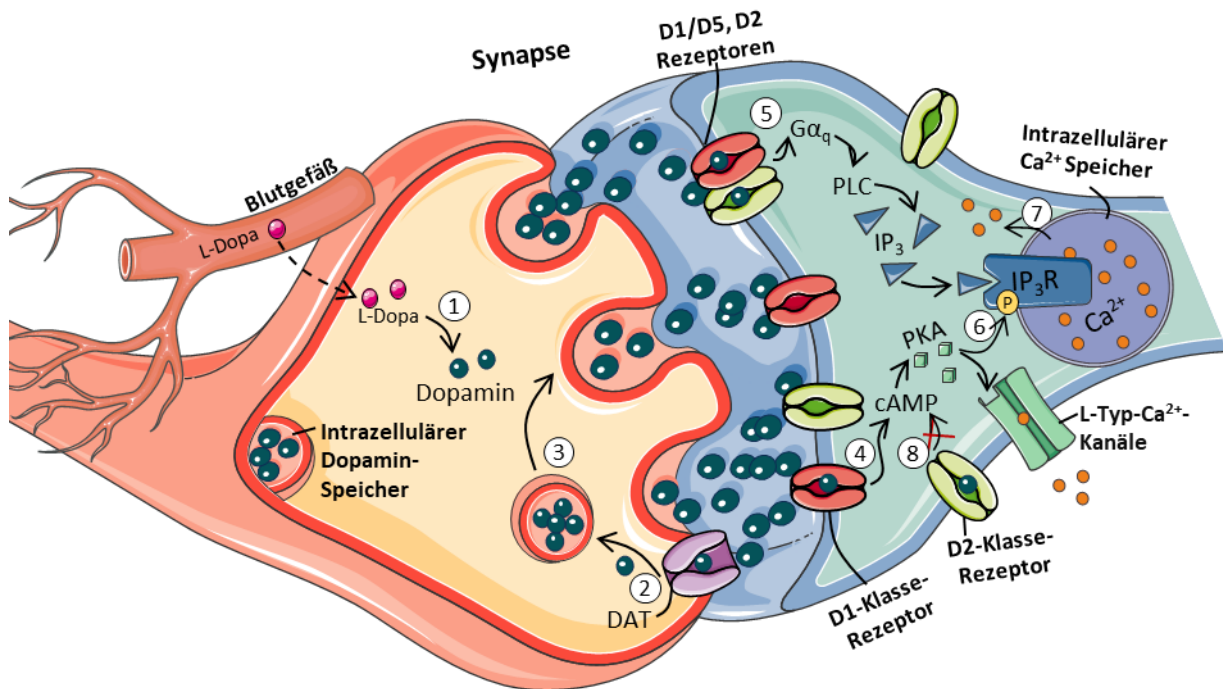


Abbildung 119: Modell der durch Dopaminrezeptor vermittelten cAMP-, InsP<sub>3</sub>- und Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung in der Synapse der Neuronen. Die Aufnahme von Dopamin in die Neurone erfolgt über L-Dopa durch das Blutgefäß und Umwandlung von Tyrosin zu L-Dopa über Tyrosinhydroxylase (TH). Anschließend wird L-Dopa durch die Verstoffwechselung über die Aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu Dopamin umgewandelt (1) oder durch die direkte Aufnahme von Dopamin durch DAT-Rezeptoren (2) der Zellmembran in die Neurone geschleust. Das Dopamin wird in Vesikel verpackt (3) und zur Signaltransduktion über Exozytose in den synaptischen Spalt abgegeben. Hierbei aktiviert Dopamin unter anderem D1-Klasse-Rezeptoren (4), was zur Aktivierung der Adenylatcyclase, zur Produktion von cAMP und zur Aktivierung von PKA führt. Die Aktivierung von PKA führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren und Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-Einflusskanälen (L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (6)). Phosphorylierte IP<sub>3</sub>-Rezeptoren sind wiederum empfindlicher gegenüber ihrem Agonisten (IP<sub>3</sub>) wodurch vermehrt intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> ausgeschüttet wird (7). Auch kann eine Aktivierung von D1/D5 oder D1/D2-Hybridrezeptoren (5) dazu führen, dass PLA aktiviert wird, welches wiederum zu verstärkter Produktion des Agonisten IP<sub>3</sub> führt, wodurch die Ca<sup>2+</sup> Ausschüttung durch Aktivierung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren eingeleitet wird. Die Aktivierung von D2-Klasse-Rezeptoren (8) hemmt wiederum die cAMP-Synthese, wodurch es nicht zur PKA-Aktivierung kommt. Dieses Modell zeigt, dass Dopamin induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signale auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen Ca<sup>2+</sup>- und cAMP-Signalwegen beruhen. [318,322,330,334]

### 3.2.18.3 Transportes von GNG durch die Darm-Blut-Barriere

Die orale Verabreichung von Wirkstoffen ist der bevorzugte Applikationsweg, birgt jedoch einige Herausforderungen, wie die ungleichmäßige Verteilung im Körper und eine geringere Wirksamkeit. Diese Probleme resultieren aus Faktoren wie dem umfangreichen präsystemischen Stoffwechsel, der sauren und basischen Umgebung des Magen-Darm-Trakts und dem enzymatischen Abbau. Dies führt zu einer unregelmäßigen Bioverfügbarkeit und geringen Aufnahme von Wirkstoffen.<sup>[315]</sup> Durch die Verwendung von *Nanocarriern* kann die Bioverfügbarkeit deutlich verbessert werden, jedoch müssen diese auch in der Lage sein über

den Darm aufgenommen zu werden. Erste Anhaltspunkte konnten bereits durch die Untersuchung der Nanogelee hinsichtlich ihrer penetrierenden Eigenschaften auf Caco-2 und HSIEC Sphäroiden im vorherigen Kapitel 3.2.16.1 gewonnen werden. Die geglückte Aufnahme in die Hohlräume der Sphäroide sollte nun an einem komplexeren Darmmodell nachgestellt werden. In einem *in-vitro* Transwell-Monolayer-Darmtransportversuch sollte anhand von humanen epithelialen Dickdarmkrebszellen (Caco-2 und HT-29), primären epithelialen Dünndarm-Zellen (HSIEC) sowie primären Darm-Fibroblasten (HIF) eine Darmbarriere nachgestellt werden, die der Darmphysiologie nahekommt. Caco-2 Zellen werden häufig bei Untersuchungen an der Darmbarriere eingesetzt. Dabei zeigen diese Zellen eine viel höhere Barriereintegrität als die physiologische Darmbarriere normalerweise darstellt. Darüber hinaus besteht der Darm aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen, die durch einen Monolayer aus nur einer Zellart nicht dargestellt wird<sup>[335,336]</sup>. Aus diesem Grund wurden Caco-2 Zellen mit HT-29 Zellen als Co-Kultur in Transwells kultiviert.<sup>[108]</sup> HT-29 Zellen können zu Becherzellen differenziert werden, dies sind Mukus produzierenden Zelltypen des Darmepithels, zudem gehen sie kaum *Tight Junctions* ein, wodurch die Barriereintegrität der Caco-2 Zellen herabgesetzt wird. Zum Vergleich wurden diese ebenfalls in Co-Kultur mit primären HSIEC Zellen kultiviert, um hier auch eine Zellvielfalt zu generieren. HIF-Zellen bilden normalerweise keine feste Monolayerschicht mit *Tight Junctions* und somit kaum eine Barriere aus. Da diese Zellen jedoch auch in der Darmwand zu finden sind, sollte das Verhalten der Nanogelee auch auf die HIF-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden in Kollaboration mit M. Sc. Sophia Kunz im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (KIT, IFG)  $2 \times 10^4$  Zellen pro Transwell einer 24 Well-Platte ausgesät und über 21 Tage kultiviert. Die Darmbarriere wurde anhand der Integrität der Monolayer durch Messungen des elektrischen transepithelialen-endothelialen-Widerstands (TEER) und der Molekülpermeabilität durch Ausnutzung der gut charakterisierten intestinalen Transportmechanismen bewertet<sup>[107]</sup> (Abbildung 120). Wie vermutet wiesen die Caco-2 Zellen mit bis zu  $460 \Omega \text{ cm}^2$  den stärksten Widerstand auf, während HT-29 mit  $12 \Omega \text{ cm}^2$  keine wirkliche Barriere bildeten. Die humanen primären Epithelzellen (HSIEC) zeigten einen Widerstand von bis zu  $37 \Omega \text{ cm}^2$ , der etwas unter den physiologischen Widerstand des Dünndarms von  $50 - 100 \Omega \text{ cm}^2$  lag<sup>[337]</sup>. Die Mischung der Caco-2 Zellen mit den HT-29 Zellen führte zu einer deutlichen Minderung des TEERs auf etwa  $140 \Omega \text{ cm}^2$ , der nun in einem ähnlicheren Bereich wie der TEER des physiologischen Darms lag. Außerdem führte die Co-Kultivierung von HSIEC Zellen mit HT-29 ebenfalls zu einer Minderung

des TEER-Wertes auf  $16 \Omega \text{ cm}^2$ , was jedoch keiner Verbesserung der Barriereintegrität für HSIEC Zellen entsprach. HIF-Zellen bilden wie angenommen keinen Widerstand aus, der durch das TEER detektiert werden könnte. Somit kam der Widerstand der Transwell-Barriere aus HSIEC Zellen dem physiologischen Darmwiderstand am nächsten.

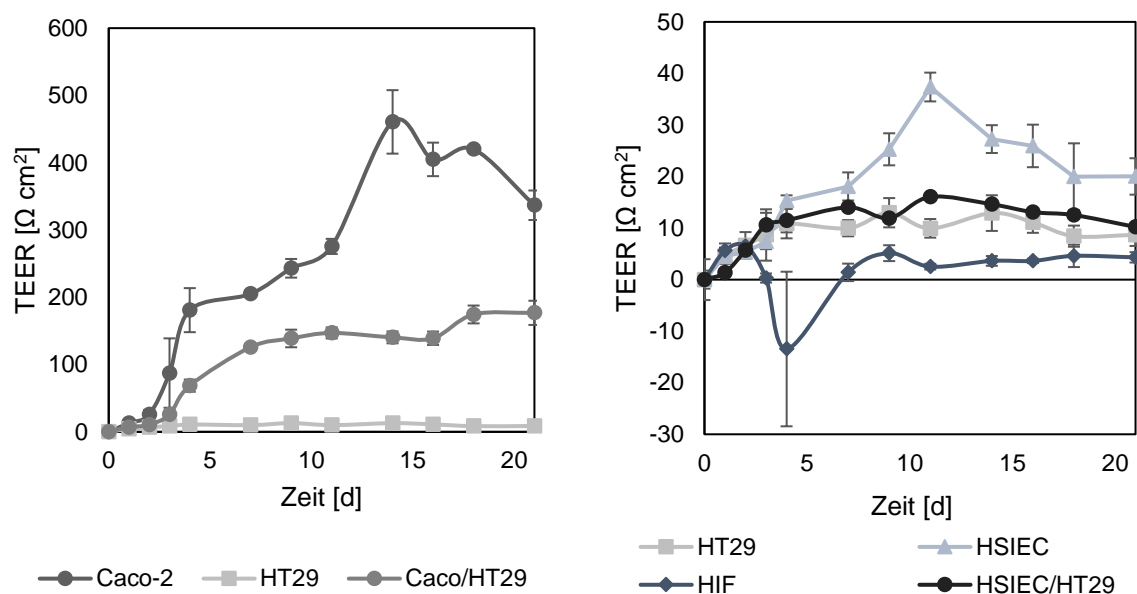


Abbildung 120: Transepithelialer Widerstand (TEER) von Monolayerkulturen im Transwell einer 24-Well-Platte.  $2 \times 10^4$  Zellen (Caco-2, HT-29, HSIEC, HIF und Co-Kulturen von HT-29 mit Caco-2 oder HSIEC Zellen in einem Mischungsverhältnis 50/50) wurden pro Transwell ausgesät und kultiviert. Der Widerstand wurde über 21 Tage verfolgt.

Die Quantifizierung der Permeabilität dieser Transwell-Darm-Barrieren, wurde zudem über den Dextran-Permeabilitäts-Assay analysiert<sup>[338]</sup>. Hydrophile mittelgroße Moleküle werden meist über den parazellulären Weg, also über die Zellzwischenräume und *Tight Junctions* der Zellen, durch die Darmbarriere transportiert. Bei einer intakten Barriere können mittelgroße Moleküle ( $\leq 600 \text{ Da in vivo}$ ;  $\leq 10 \text{ kDa in vitro}$ ) somit durch die Darmbarriere diffundieren, größere Moleküle jedoch müssen über andere Wege die Darmbarriere überwinden.<sup>[339]</sup> Für die Untersuchung der Barriereintegrität der im Transwell erzeugten Darmzellmonolayer, wurden  $20 \mu\text{g/mL}$  Dextran-FITC ( $10 \text{ kDa}$ ) für  $24 \text{ h}$  auf die künstlichen Darmbarrieren in den Transwells gegeben. Die Auswertung fand anschließend über die Messung der Fluoreszenz des an das Dextran gekuppelten Fluorophors FITC statt. Hierbei wurde die Fluoreszenz des oberen Transwells mit der des unteren Wells verglichen. Im Vergleich zu den Ergebnissen der TEER-Messung zeigten die Zellmonolayer, die einen hohen TEER-Wert aufwiesen auch eine niedrige Permeabilitätsrate (Abbildung 121). So ließ die Caco-2 Barriere kaum Dextran durch, während die anderen Monolayer keine dichte Barriere für Dextran ausbilden konnten. Im Vergleich zur

Kontrolle besaßen die HIF-Kultur und die HSIEC/HT-29 Co-Kultur die größten Permeabilitäten gegenüber dem Dextran, während die HSIEC-Monokultur eine bessere Barriereintegrität aufwies. Auch hier zeigte die Mischung von Caco-2 und HT-29 eine intakte Monolayerschicht, die kaum Dextran durchließ. Anhand der Dextranpermeabilitäts-Ergebnisse kam die Co-Kultur aus Caco-2 und HT-29 einer physiologischen Darmbarriere am nächsten.

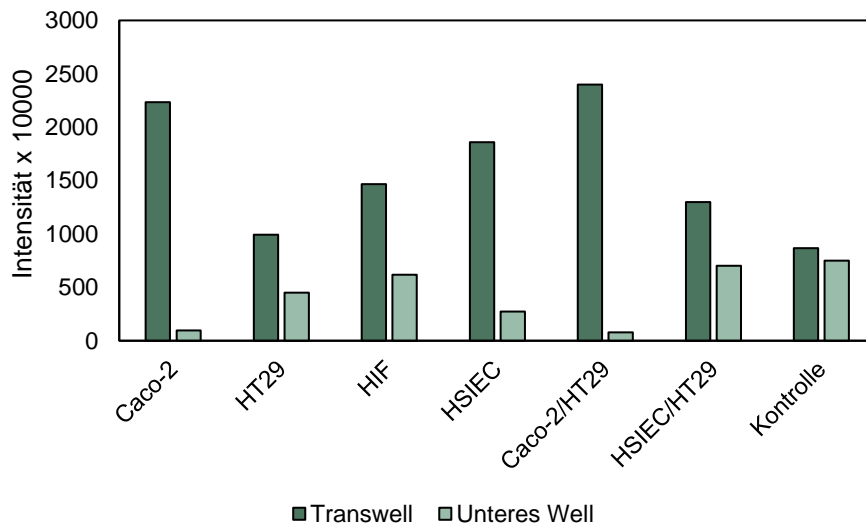


Abbildung 121: Dextran-Permeabilitäts-Assay von Monolayer Kulturen im Transwell einer 24-Well-Platte.  $2 \times 10^4$  Zellen (Caco-2, HT-29, HSIEC, HIF und Ko-Kulturen von HT-29 mit Caco-2 oder HSIEC Zellen in einem Mischungsverhältnis 50/50) wurden pro Transwell ausgesät und kultiviert. Die Permeabilität wurde nach 21 Tagen Kultivierung überprüft.

Nach der Überprüfung der Barriereintegrität wurden im Anschluss in Kollaboration mit B. Sc. Christian Quaschnig im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (KIT, IFG) die Barrierepenetration von P@GNG in Transwell-Experimenten untersucht. Da die Untersuchung über Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden sollten, wurden  $2 \times 10^4$  HepG2 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte unter den Transwells kultiviert. Somit können die Nanogelee, die die Barriere penetrieren konnten, in den HepG2 Zellen akkumulieren und über ihre Rhodamin B Fluoreszenz detektiert werden. Die Leberkrebszellen wurden ausgewählt, da die Leber das erste Organ ist, zu dem im Darm aufgenommenen Nährstoffe und auch Wirkstoffe transportiert werden und dies somit dem physiologischen Transportweg entsprechen würde<sup>[340]</sup>. Anschließend wurden 800 µg/mL P1@GNG auf die Transwells gegeben, für 24 h inkubiert. Danach konnten die HepG2 Zellen des unteren Kompartimentes mikroskopiert werden (Abbildung 122, Abbildung 123, Abbildung 124). Die Penetrationseigenschaften der Nanogelee war vergleichbar mit dem des Dextrans. Während die Barrieren von Caco-2 und Caco-2/HT-29 Co-Kultur kaum eine Permeabilität gegenüber dem Nanogel aufwies (Abbildung

123), zeigte die Barriere aus HSIEC und aus HSIEC/HT-29 Co-Kultur eine hohe Nanogel-Durchlässigkeit (Abbildung 122). HIF stellte wie erwartet keine Barriere für das Nanogel dar und die Monokultur aus HT-29 Zellen ließ auch eine große Konzentration an Nanogel penetrieren (Abbildung 123). Da die Integrität der physiologischste Darmbarriere in etwa zwischen der Integrität der HSIEC Zellen und der Co-Kultur aus Caco-2 und HT-29 Zellen liegt, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass ein Teil der Nanogel-Lösung die Darmbarriere durchdringen kann. Um die Ergebnisse zu verifizieren wären weiterführende Untersuchungen an komplexeren Darmmodellen wie einem Organ-on-a-Chip-System nötig.

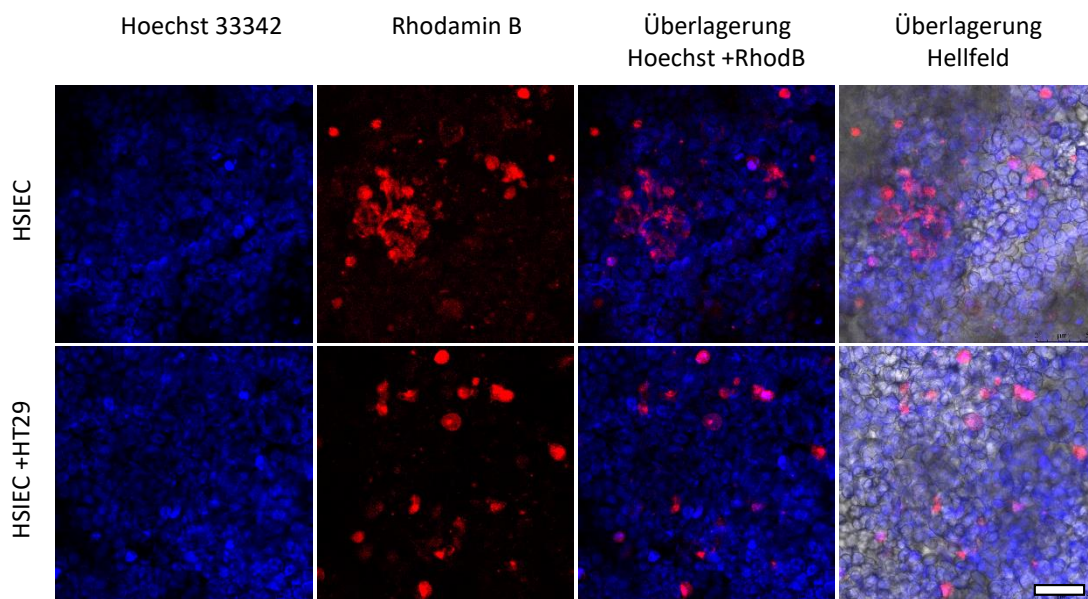


Abbildung 122: Penetrationstest von 800 µg/mL P1@GNG an Monolayerkulturen durch das Transwell einer 24-Well-Platte.  $2 \times 10^4$  Zellen (HSIEC und eine Co-Kultur von HT-29 mit HSIEC Zellen in einem Mischungsverhältnis 50/50) wurden pro Transwell ausgesät und kultiviert. An Tag 21 wurden  $2 \times 10^4$  HepG2 Zellen pro Well einer 24-Well-Platten unter dem Transwell kultiviert. Die Penetrationsfähigkeit des Nanogels wurde für 24 h nach 22 Tagen Kultivierung überprüft. Zu sehen ist die Fluoreszenzmikroskopie der mit Hoechst33342 markierten Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410-510 \text{ nm}$ ), das Rhodamin-B markierte P@GNG (rot:  $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 620-640 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit und ohne Hellfeld. Maßstab 50 µm.

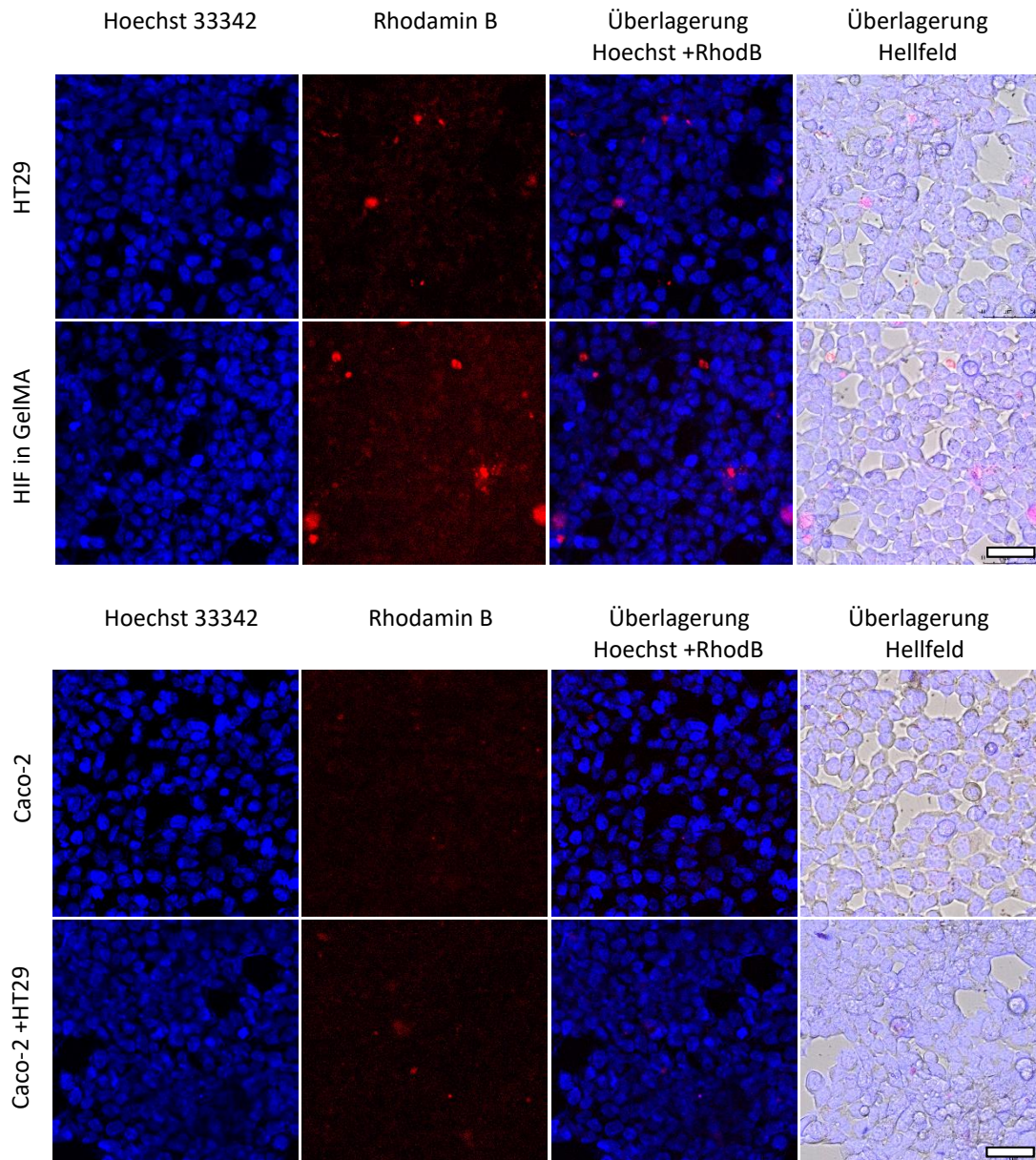


Abbildung 123: Penetrationstest von 800  $\mu\text{g/mL}$  P1@GNG an Monolayerkulturen durch das Transwell einer 24-Well-Platte.  $2 \times 10^4$  Zellen (HT-29, HIF in GelMA Hydrogel, Caco-2 und eine Co-Kultur von HT-29 mit Caco-2 Zellen in einem Mischungsverhältnis 50/50) wurden pro Transwell ausgesät und kultiviert. An Tag 21 wurden  $2 \times 10^4$  HepG2 Zellen pro Well einer 24-Well-Platten unter dem Transwell kultiviert. Die Penetrationsfähigkeit des Nanogels wurde für 24 h nach 22 Tagen Kultivierung überprüft. Zu sehen ist die Fluoreszenzmikroskopie der mit Hoechst33342 markierten Zellkerne (blau:  $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410-510 \text{ nm}$ ), das Rhodamin-B markierte P@GNG (rot:  $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 620-640 \text{ nm}$ ) und die Überlagerung mit und ohne Hellfeld. Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .

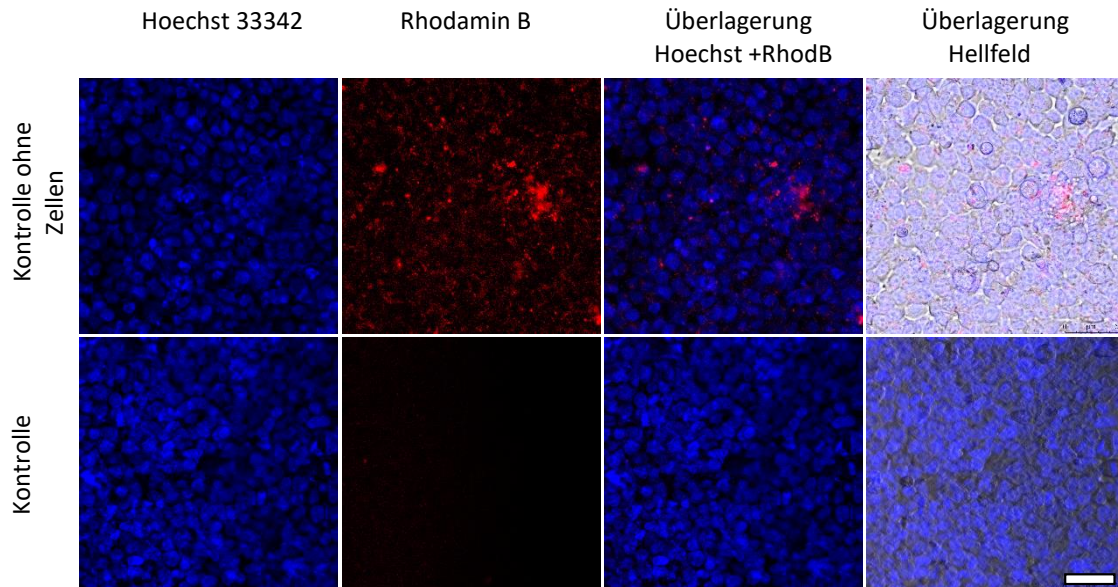
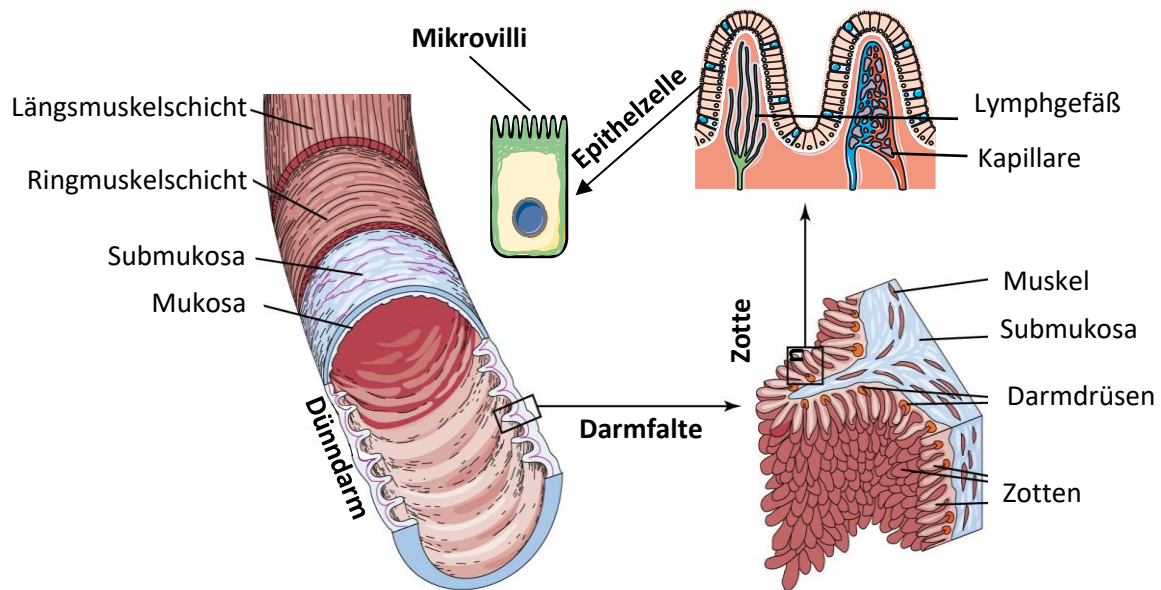


Abbildung 124: Penetrationstest von 800 µg/mL P1@GNG an Monolayerkulturen durch das Transwell einer 24-Well-Platte. Als Kontrolle wurde ein Transwell ohne Zellen verwendet. An Tag 21 wurden  $2 \times 10^4$  HepG2 Zellen pro Well einer 24-Well-Platten unter dem Transwell kultiviert. Die Penetrationsfähigkeit des Nanogels wurde für 24 h nach 22 Tagen Kultivierung überprüft. Eine HepG2 Kontrolle blieb unbehandelt. Zu sehen ist die Fluoreszenzmikroskopie der mit Hoechst33342 markierten Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405$  nm,  $\lambda_{em} = 410-510$  nm), das Rhodamin-B markierte P@GNG (rot:  $\lambda_{exc} = 532$  nm,  $\lambda_{em} = 620-640$  nm) und die Überlagerung mit und ohne Hellfeld. Maßstab 50 µm.

### 3.3 Intestine-on-a-Chip Modell: VitaPrint

Aktuelle präklinische toxikologische Sicherheitsstudien von Chemikalien und Pharmazeutika stützen sich meist auf die Verwendung von Tierversuchsmodellen, da konventionelle Zellkulturmodelle bei der Vorhersage der Medikamentenwirksamkeit aufgrund ihrer Einfachheit versagen.<sup>[341]</sup> Die Verwendung von Versuchstieren ist jedoch nicht nur teuer und zeitaufwendig, sondern gilt auch als äußerst unethisch und die erhaltenen Ergebnisse sind nicht zwingend auf den Menschen übertragbar.<sup>[342-344]</sup> Durch die Verwendung humaner Zellen können allerdings teilweise spezifische Funktionen des Ursprungorgans *in vitro* nachgebildet werden. Um Tierversuche zu minimieren können daher Zellkulturmodelle wie die bisher erläuterten Sphäroide, Organoid-Systeme oder Transwell-Filter für erste toxikologische Studien eingesetzt werden. Durch ihre einfache und schnelle Handhabung sind solche Modelle sehr populär, weisen allerdings im Vergleich zur Natur weder die komplexe physiologische Anordnung der verschiedenen Zelltypen auf, noch entwickeln sie eine Blutzirkulation.<sup>[103,345]</sup> Letzteres kann allerdings durch die Verwendung von *Organ-on-a-Chip* Systemen durch

Hinzufügen eines künstlichen Blutgefäßes unter Verwendung von mikrofluidischen Systemen, wie das des bereits erwähnten vasQchips, verbessert werden. Die meisten dieser Modelle bestehen bisher nur aus einem Zweikammer-System, das von einer porösen Membran getrennt wird.<sup>[115,119,346,347]</sup> Hierbei beeinflusst der in der mikrofluidischen Kammer entstehende Scherstress, das Zellverhalten in einer physiologischen Weise, die Einfluss auf die Aufnahme von Nährstoffen und Medikamenten nimmt.<sup>[119,348]</sup> Diese Chipmodelle dienen meist Resorptionsstudien an Blutbarrieren, so können mit solchen Modellen andere Aufnahmewege nicht untersucht werden. Da bei einer Medikamententherapie aber neben der intravenösen Gabe vor allem die orale Darreichungsform Anwendung findet, ist die Entwicklung eines *Intestine-on-a-Chip* Modells für Studien an der Darmbarriere von großem Interesse.<sup>[102]</sup> So wurden bereits *Intestine-on-a-Chip* Modelle eingeführt, die die Kultivierung von Epithelzellen unter kontinuierlicher Perfusion und physiologischem Scherstress ermöglichen und so die Umgebung eines menschlichen Darms im Vergleich zu statischen Kulturmethode besser rekonstruieren. Diese Modelle stützen sich bisher ebenfalls auf membranbasierte Systeme, in denen humane Zelllinien lediglich planar kultiviert werden können.<sup>[101,349-351]</sup> Trotz der Vielfalt an existierenden *Intestine-on-a-Chip* Modellen gibt es bis jetzt kaum Systeme, die die dreidimensionale Struktur des makroskopischen Darmes berücksichtigen. So sind die physiologischen Darmfalten, die zu einer erheblichen Oberflächenvergrößerung führen, von großer Bedeutung unter anderem für die Entwicklung und den Erhalt der Darmschleimhaut, die ebenfalls die Nährstoffaufnahme und auch die Medikamentenresorption stark beeinflussen kann.<sup>[101,102]</sup> *In vivo* hängt zudem die makroskopische Gewebekonstruktion stark von einem streng regulierten morphogenetischen Programm ab, durch das lokale Zellen miteinander interagieren und sich selbst organisieren können. Diese Zellinteraktionen steuern aufeinanderfolgende Zyklen der zellulären Differenzierung, die eine biologische Komplexität in großem Maßstab erreichen und von der Zelllokalisierung im Darmlumen beeinflusst werden.<sup>[101,104,105,347]</sup>



© Encyclopædia Britannica, Inc.

Abbildung 125: Schematischer Aufbau eines physiologischen Dünndarms. Die Oberfläche der Darmwand wird durch mehreren Darmfalten vergrößert, auf denen sich mehrere fingerförmige Darmzotten befinden. Diese wiederum sind mit Epithelzellen besiedelt, die wiederum Mikrovilli auf ihrer luminalen Seite ausbilden. Wodurch die Oberfläche des Menschlichen Darm etwa 30 m<sup>2</sup> beträgt.<sup>[352]</sup> Abbildung modifiziert nach Encyclopædia Britannica, Inc.<sup>[353]</sup>

Um nun dies dreidimensionale makroskopische Struktur des Darms nachzubilden, sollte nun ein neues den physiologischen Bedingungen ähnlicheres *Intestine-on-a-Chip* System, entworfen werden. Dieses System wird im Vollenden als VitaPrint bezeichnet. VitaPrint (Abbildung 126) hatte zum Ziel, die Lücken bisheriger *Organ-on-a-Chip* Modelle zur Nachahmung menschlicher Organe zu schließen und so ein ernsthafter Ersatz zu Tierversuchsmodellen zu bieten, da durch den Aufbau von VitaPrint alle relevanten Komponenten des Darms wie Barrieren, Immunabwehr und Scherstress physiologisch nachgestellt werden sollen. Dies soll durch die Etablierung eines mikrofluidischen 3D *Intestine-on-a-Chip*-Modells geschehen. Hierbei wird das Konzept der mikrofluidischen *Organ-on-a-Chip*-Modelle mit dem des 3D *Organ-Bioprinting* verbunden. So werden physiologisch korrekte Darmfalten in einem mikrofluidischen Chip von Blutgefäßen mit Nährstoffen versorgt, die gleichzeitig auch die Resorptionsbarriere bilden. Die makroskopische Struktur des künstlichen Darmepithels bietet zusätzlich die Möglichkeit den Einfluss des Darminterstitiums auf die Aufnahme von potenziellen Pharmazeutika zu untersuchen. So soll die Übertragbarkeit von Studien an bisherigen *Intestine-on-a-Chip*-Modellen auf den Menschen verbessert werden. Resorptionsstudien können mit solch einem Darmmodell sowohl im Bereich der Barrieren des Darmepithels als auch des Darmendothels zeitgleich

durchgeführt werden, um Veränderungen der Ergebnisse durch das Verwenden unterschiedlicher Modelle zu vermeiden. Die dreidimensionale Struktur der künstlichen Darmfalten wird über das *3D-Bioprinting* geformt, wobei das Material des gedruckten Gerüsts aus einem Hydrogel besteht, das die Zellen in der dritten Dimension stützt und gleichzeitig die Diffusion von Nährstoffen und Testsubstanzen gewährleistet.<sup>[203,354]</sup> Diese Gelmatrix stellt das Interstitium dar, in dem gewebespezifische Darmzellen eingebettet werden können, die für die Immunantwort des Darms entscheidend sind.

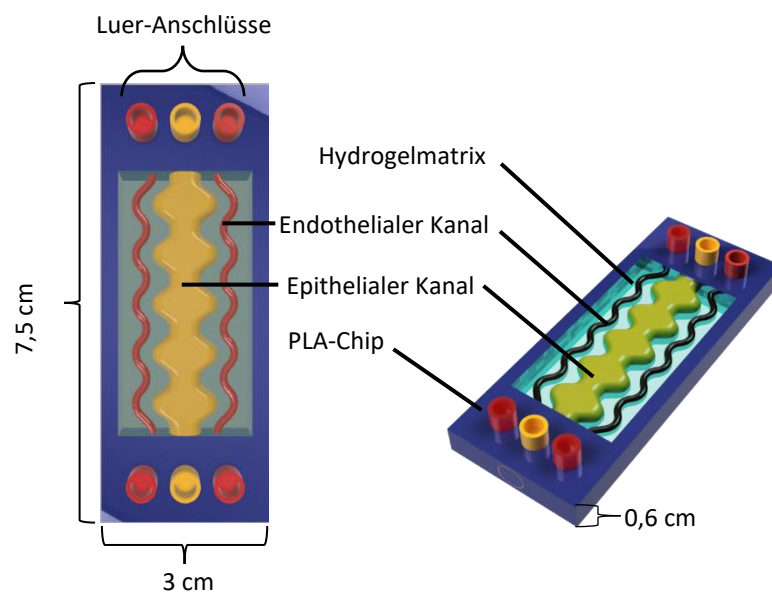


Abbildung 126: Schematischer Aufbau des VitaPrint Chips, bestehend aus zwei endothelialen Kanälen außen und einem intestinalen epithelialen Kanal in der Mitte des Chips. Alle Kanäle sind von einer Hydrogelmatrix umgeben und können über sechs Anschlüsse fluidisch perfundiert werden.

Große Vorteile eines solchen Chip-Modells wäre seine einfache und replizierbare Herstellung sowie die Verbindung mit weiteren VitaPrint *Organ-on-a-Chip*-Modulen, die den Einsatz für die Pharmaindustrie interessant machen und bei Erfolg Tierversuche nicht nur ergänzen, sondern gänzlich ersetzen könnten.

### 3.3.1 Entwicklung des VitaPrint Chip-Rohlings

Der Rohling des Organ-on-a-Chip Systems VitaPrint wurde über ein extrusionsbasiertes 3D-Druckverfahren hergestellt (Abbildung 127). Als Material für den Druck des Reaktors wurde Polylactid (PLA) gewählt, das neben den geeigneten Druckeigenschaften auch eine gute Biokompatibilität aufweist und zudem die Möglichkeit besteht, das Material biologisch abzubauen, um die Verschmutzung durch umweltschädliche Polymere zu minimieren.<sup>[355]</sup> Das Druckdesign des Chips wurde mit Hilfe der Software Autodesk Inventor als CAD-Zeichnung

angefertigt und anschließend mit einem Filament Drucker (UltiMaker 3 Dual Extrusion) erstellt. Um die Untersuchung des Chips mit herkömmlicher Laborausstattung zu ermöglichen, wurde der PLA-Chip mit den Dimensionen von 7,5 x 3,0 x 0,4 cm angefertigt, so dass er mit handelsüblichen Objektträgern verbunden werden kann (Abbildung 128). Das Design des Chips wurde kontinuierlich evaluiert und verbessert, bis es den Ansprüchen einer mikrofluidischen Perfusion unter biologischen Bedingungen genüge.

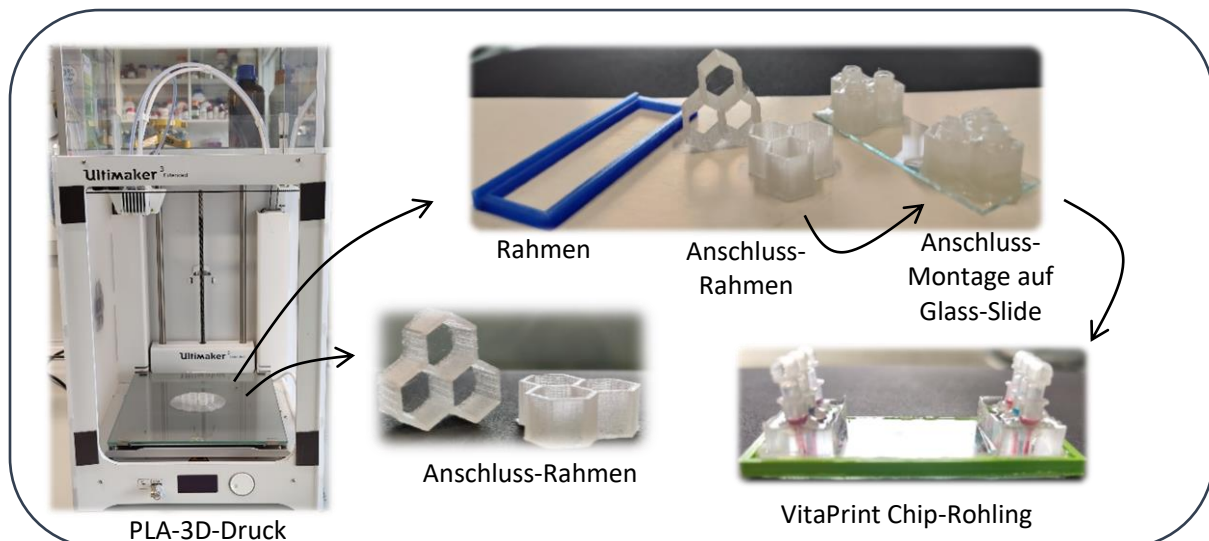


Abbildung 127: VitaPrint Chip und dessen Bestandteile. Abgebildet ist der Druck des VitaPrint Chips über einen 3D-Drucker der Marke UltiMaker, sowie die fertigen Anschlüsse und der Rahmen des Chips.

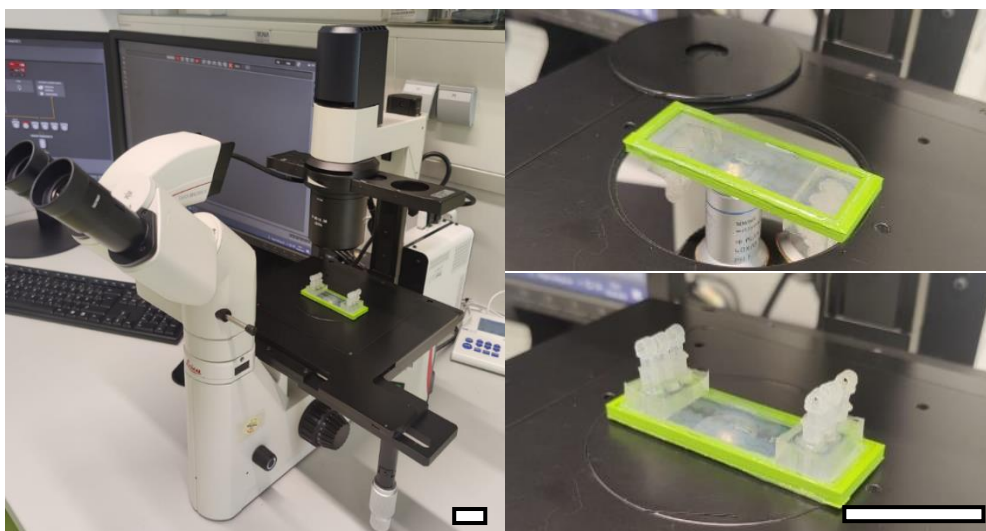


Abbildung 128: Ansicht des VitaPrint Chips bei der Untersuchung mit einem Standard LED-Mikroskop. Der Rahmen des Chips passt in die Standardhalterungen herkömmlicher Mikroskope und kann dadurch von beiden Seiten ohne Aufwand betrachtet werden. Maßstab: 4 cm.

Die Anschlüsse des Prototyps wurden so entworfen, dass sie mit gängigen Luer-Verbindungsadaptern kompatibel sind, die für Standard-Pumpsysteme angeboten werden. Da der Chip mit drei Kanälen betrieben werden soll, wurden je Seite drei Anschlüsse im Abstand von 6,5 mm verbaut. Die Entwicklung geeigneter Anschlüsse zeigte sich als besonders herausfordernd, da der Druck, der durch den mikrofluidischen Fluss auf den Chip wirkt, bei kleinen Unebenheiten im Material wie PLA oder PDMS zu undichten Stellen führte. Es wurden eine Reihe von Materialien (PLA, PDMS und DOWSIL SE 1700) und Materialkombinationen getestet. So stellte sich der 3D-Druck der Anschlüsse über PLA (Abbildung 129, Prototyp 1) oder der Guss aus PDMS (Polydimethylsiloxan, ELASTOSIL® RT 601) (Abbildung 129, Prototyp 2) nicht als kompatibel mit dem Modellaufbau heraus. Dies lag daran, dass der Druck aus PLA keine glatte Oberfläche hinterließ, durch die Flüssigkeiten an den Anschlüssen vorbeifließen konnte. Bei Anschlüssen aus PDMS hingegen, waren die Seitenwände zu glatt, wodurch die Fluidik-Anschlüsse schon bei niedrigen Flussraten aus dem PDMS glitten. Erst der Einbau von vorgefertigten Luer-Anschlüssen durch Befestigen und Abdichten über PDMS (Abbildung 130, Prototyp 3) oder DOWSIL™ SE 1700 (Abbildung 130, Prototyp 4) an die Glasoberfläche führten zu dichten Anschlüssen, die auch hohen Drücken von 95 mbar (Flussrate: 1,44 mL/min) standhielten. So wurde der Prototyp eines Bioreaktors erstellt, der aus einem PLA-Rahmen umgeben von zwei Deckgläser aufgebaut ist und auf dessen Glasoberfläche sechs Luer-Anschlüsse angebracht werden können. Dieser Bioreaktor stellt den VitaPrint Chip dar (Abbildung 127).

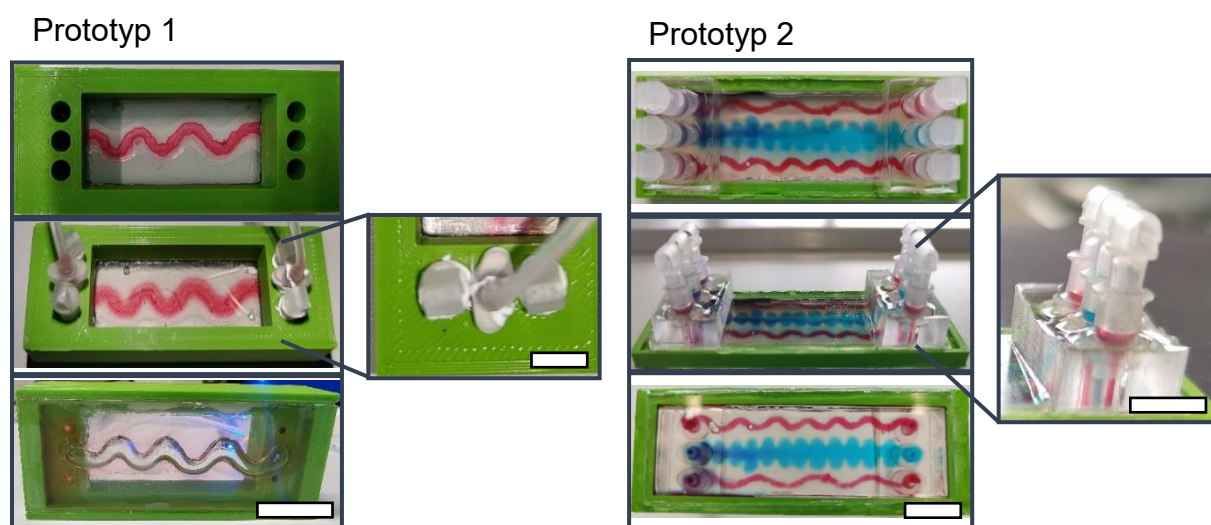


Abbildung 129: Entwicklung des VitaPrint Chips und dessen Anschlüsse. Prototyp 1: Anschlüsse aus PLA. Prototyp 2: Anschlüsse aus PDMS. Maßstab: 1 cm.

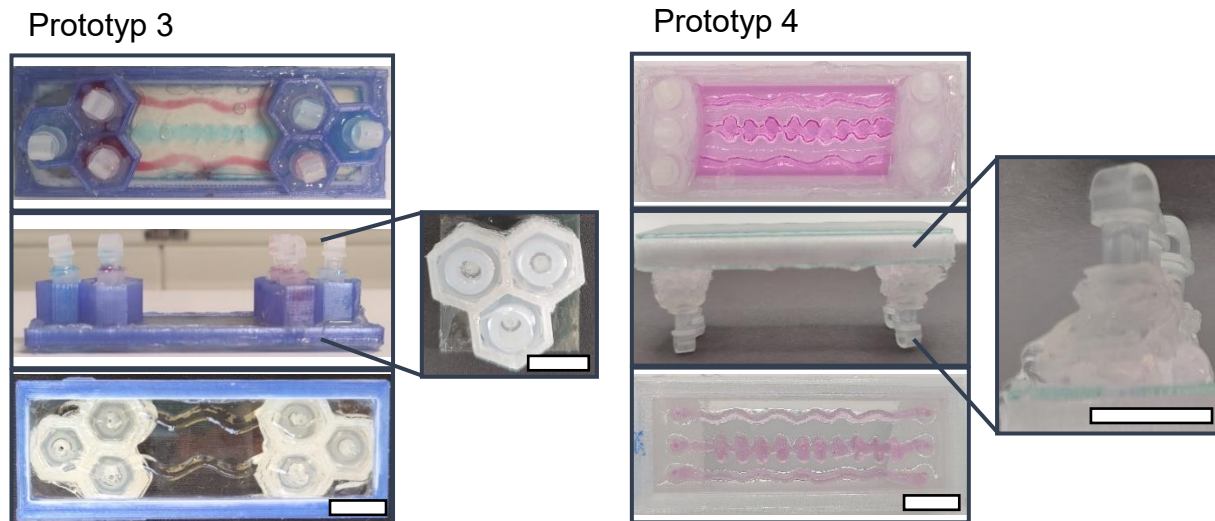


Abbildung 130: Entwicklung des VitaPrint Chips und dessen Anschlüsse. Prototyp 3: Luer-Anschlüsse durch PDMS abgedichtet. Prototyp 4: Luer-Anschlüsse durch DOWSIL™ SE 1700 abgedichtet. Maßstab: 1 cm.

### 3.3.2 3D-Druck von Biomaterial im Chip

Das Erstellen eines geeigneten Druckschemas ist ausschlaggebend für die Replizierbarkeit des Systems. Besonders herausfordernd ist hier der dreidimensionale Druck von gewundenen Kanälen, die mikrofluidisch betrieben werden sollen, um ein durchblutetes Zottenepithel zu simulieren. Eine Balance zwischen Stabilität des Gerüsts gegenüber fluidischem Druck und seiner Permeabilität gegenüber Nährstoffen muss hierbei gefunden werden. Ziel ist es eine Matrix mit physiologisch nahen Eigenschaften zu drucken, sodass Darmlamina spezifische Zellen in der Gelmatrix kultiviert werden können (Abbildung 132). Als Matrix dienen hierbei die bereits vorgestellten Hydrogele GelMA oder GelNB + GelS. Über die Verwendung von Gelatine als Opfermaterial, sollen hierbei die gewünschten Hohlstrukturen in die Hydrogel-Matrix eingebracht werden. Gelatine wurde aufgrund seiner bereits bekannten Biokompatibilität als geeignetes Opfermaterial gewählt. Durch Erwärmen auf 37 °C oder Abkühlen auf 28 °C, kann die Viskosität von 5 % Gelatine zudem leicht beeinflusst werden.<sup>[356]</sup> So wurde die Gelatine bei 28 °C in gewünschter Form gedruckt (Abbildung 131) und nach der Fertigung des Chips durch Erwärmen in einem Zellinkubator (37 °C) verflüssigt und ausgespült. Auch das Druckschema, das für das Opfermaterial und somit für die Konstruktion der Hohlstruktur und Kanäle des Darms und der Blutgefäße im Chip benötigt wird, wurde über CAD moduliert. Die Einbringung der Kanäle in den VitaPrint Chip erfolgte mit dem 3D-Bioprinter Biospot BP (Biofluidix) über das Extrusions-Druck Verfahren. Die Kanaldimensionen hatten einen Durchmesser von 1 mm mit einer Länge von 5,5-6 cm, wodurch die Gesetzte der

Mikrofluidik für die Strömungsdynamik im Chip gelten.<sup>[357]</sup> Nach dem 3D-Druck der Opferstruktur wurde die Kammer des Chips mit einer Matrix aus Hydrogel aufgefüllt, in der nach Ausspülen der verflüssigten Gelatine die Hohlstrukturen der künstlichen Blut- und Darmgefäße erhalten werden konnten.

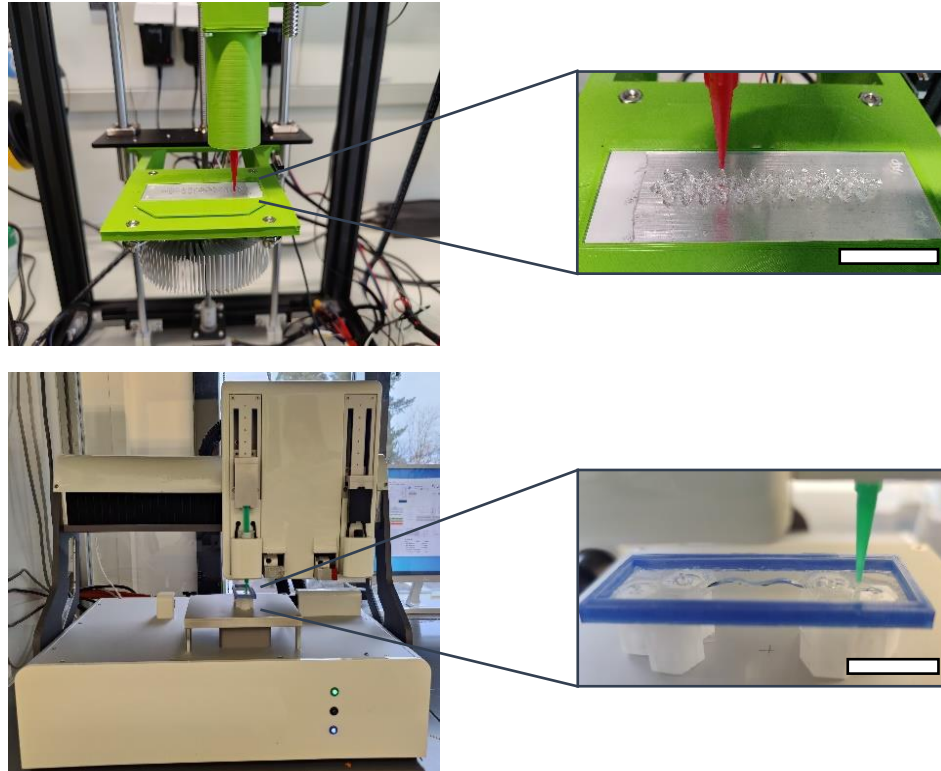


Abbildung 131: 3D-Druck des Gelatine-Opfermaterials in den VitaPrint Rohling durch das Extrusionsverfahren. Maßstab: 2 cm.

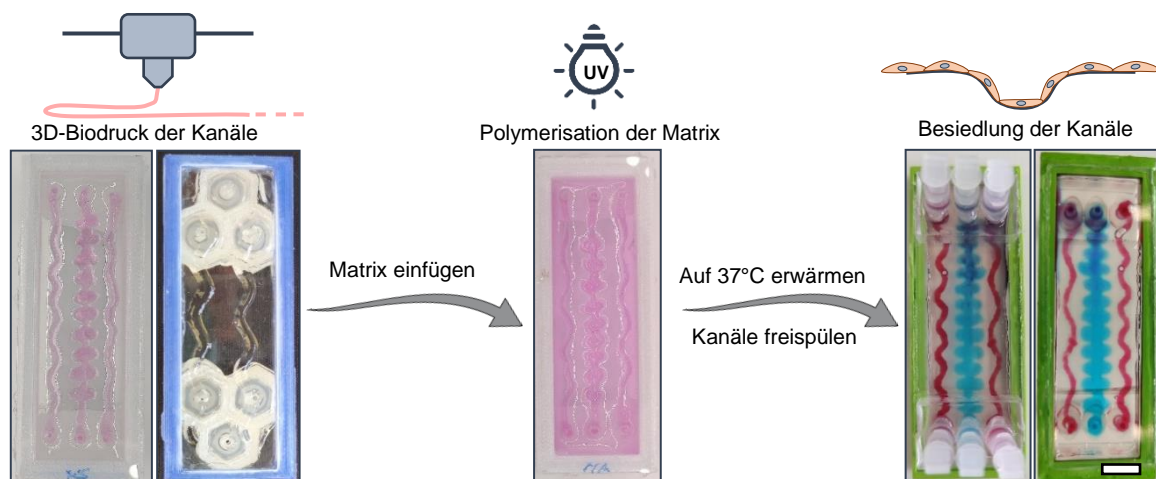


Abbildung 132: Verlauf der Herstellung von durchgängigen Kanälen in einer Hydrogelmatrix über den 3D Druck der Gefäße, über die Polymerisation der Hydrogel-Matrix bis zum Freispülen der Hohlstrukturen. Maßstab: 1 cm.

### 3.3.3 Aktivierung und Silanisierung des VitaPrint-Chips

Das Verdrucken der Opfermaterialien in Verbindung mit der Hydrogel Matrix zeichnete sich durch seine besonders leichte Handhabung aus. Auf Grund der makroskopischen Dimension kam es bei anschluss der Mikrofluidik jedoch teilweise zum Ablösen der Matrix von der Glasoberfläche. Dies führt dazu, dass die Struktur der Blut- und Darmgefäße aufgebrochen wurden und sie somit ihre Form nicht beibehielten (Abbildung 135, A). Eine Verbesserung sollte hier über eine kovalente Bindung der Hydrogelmatrix an die Glasoberfläche erreicht werden (Abbildung 135, B). Dafür wurde die Glasoberfläche über eine Silanisierung mit den entsprechenden funktionellen Gruppen, die eine Bindung an die Hydrogelmatrix ermöglichen, modifiziert (Abbildung 133, A). Die Oberfläche des Glass-Slide-Masters wurde hierfür gründlich für 1 h in einem chemischen Bad aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Piranha-Ätzlösung) gereinigt und aktiviert um die Adhäsionsfähigkeit der Oberflächen zu erhöhen. Danach folgte eine einstündige Silanisierung mit Bind-Silan (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan) für GelMA Hydrogele oder mit Trimethoxy(7-octen-1-yl)silan und 3-(Trimethoxysilyl)-1-propanethiol für GelNB + GelS Hydrogele (Abbildung 133, A).

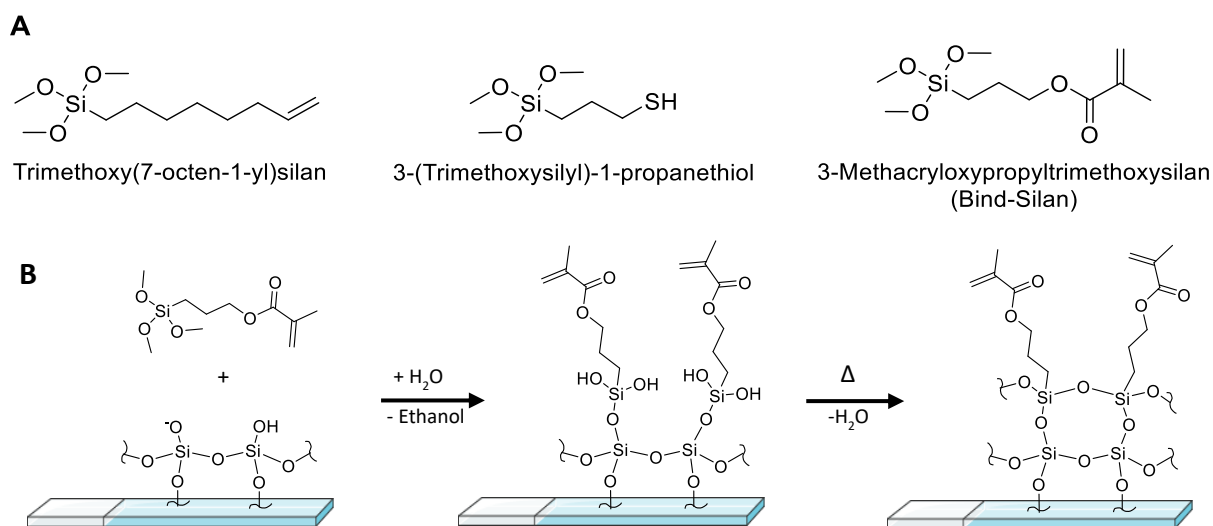


Abbildung 133: A) Strukturformeln der Silanisierungsreagenzien. B) Schematische Darstellung der Silanisierung einer Glasoberfläche mit Bind-Silan.

Die Funktionalisierung der Glasoberfläche, wurde über die Bindung von propargylhaltigen Peptiden, die mit Rhodamin B markiert waren, an die mit Thiol-Gruppen modifizierte Glasoberfläche fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Hierfür wurden nach erfolgter

Silanisierung, 50  $\mu\text{M}$  P8 mit 0,03 % LAP auf die silanisierte Fläche aufgetragen und diese kurz mit UV-Licht (320 – 500 nm) bestrahlt. Die Propargylgruppen der Peptoidlösung sollten sich nun über Thiol-In-Click-Chemie mit den Thiolgruppen der silanisierten Oberfläche verbinden. Die Fluoreszenz der gebundenen Peptide wurde nach der Reinigung der Glasoberfläche mit einem LED-Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica evaluiert. Die gelungene Silanisierung war durch eine starke Fluoreszenz der Peptide auf dem Objektträger deutlich zu erkennen (Abbildung 134).

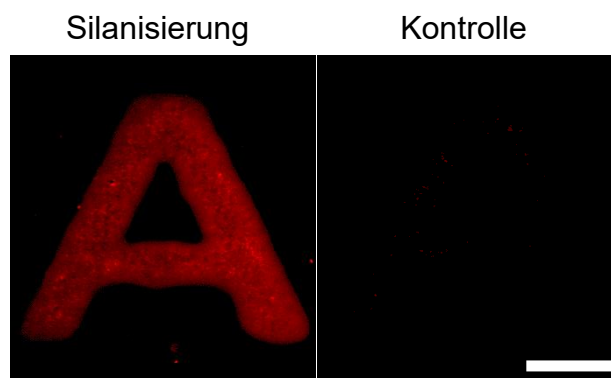


Abbildung 134: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Silanisierung des Objektträgers. Die Silanisierung wurde über die Kupplung von P8 an die Thiolgruppen der Silane überprüft. Zu sehen ist die Fluoreszenz von Rhodamin B eines Glass-Slides mit Silanisierung (links) und zur Kontrolle ein Slide ohne Silanisierung (rechts), nach der Kuppelung und Reinigung von 50  $\mu\text{M}$  Peptoid P8. Maßstab: 700  $\mu\text{m}$ .

Nach erfolgter Präparation des Objektträgers mit funktionellen Gruppen, wurde ein Chip mit Kanalstruktur erstellt, um die Auswirkung der Silanisierung zu überprüfen. Diesmal zeigte sich nach der Entfernung des Opfermaterials ein durchgehender stabiler Kanal, der auch größerem Druck von 95 mbar (Flussrate: 1,44 mL/min) standhielt, ohne dass sich die Hydrogel-Matrix von der Glasoberfläche löste (Abbildung 135, B). Somit konnte über die Aktivierung und anschließende Silanisierung eine geeignete Methode zur Präparation der Hohlkanäle für die Blut- und Darmgefäße etabliert werden.

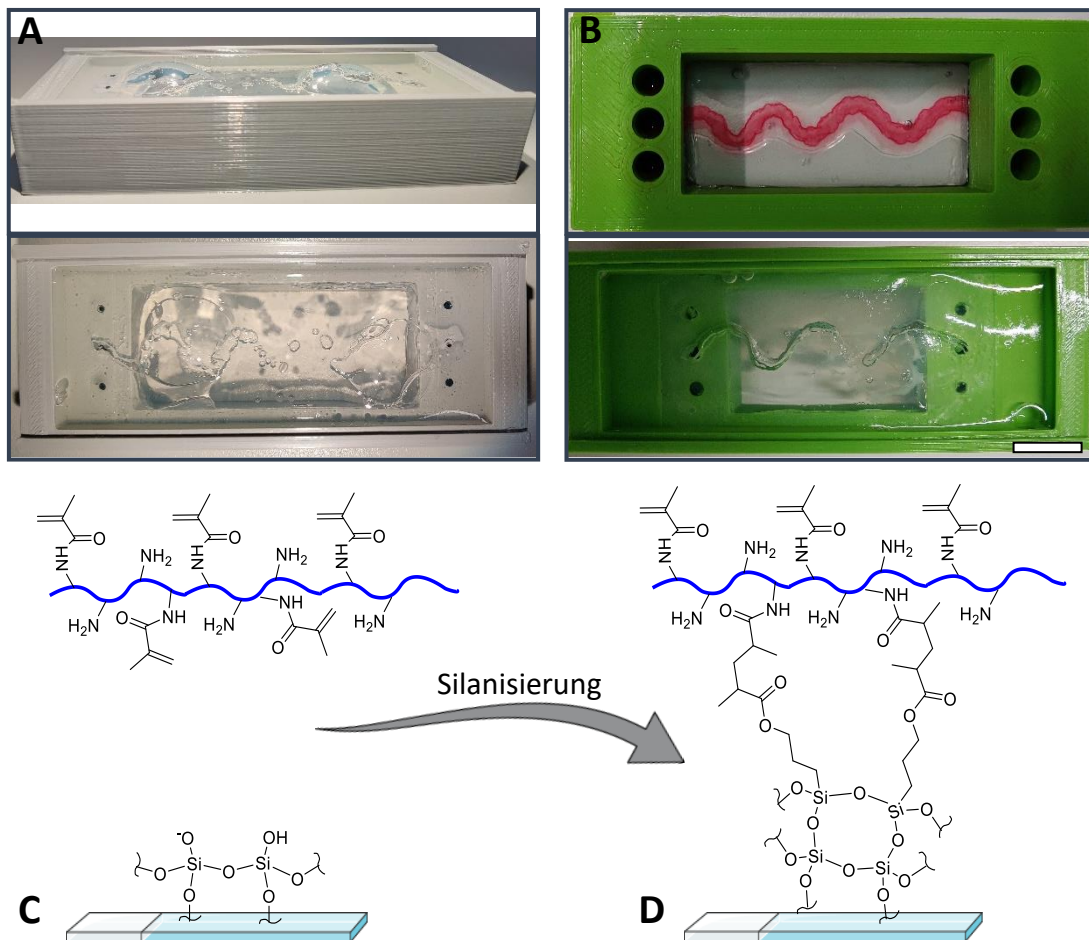


Abbildung 135: A) Abbildung eines VitaPrint Chips ohne Silanisierung und versuchter Freispülung der Kanäle. B) Abbildung eines VitaPrint-Chips nach Silanisierung und erfolgreicher Freispülung der Kanäle. Schematische Darstellung einer Glasoberfläche vor (C) und nach Silanisierung mit Bind-Silan (D) und anschließender Bindung an das Hydrogel. Maßstab: 1 cm.

### 3.3.4 Anschluss der Kanäle des VitaPrint an ein mikrofluidisches System

Die Zellen des Darmtraktes und vor allem der Blutgefäße, sind einem dynamischen intestinalen oder luminalen Fluss ausgesetzt. Die daraus resultierende Fluidspannung, die auf die Zellen wirkt, führt zu ihrer Morphogenese (Abbildung 136), die sie benötigen, um ihren physiologischen Funktionen nachzukommen.<sup>[358-360]</sup> Im VitaPrint System wird dieser Fluss durch den Anschluss an ein mikrofluidisches Pumpsystem erzeugt.

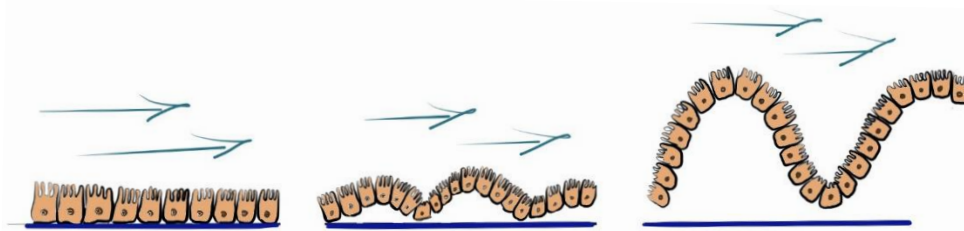


Abbildung 136: Schematischer Ablauf der Induktion der Darmmorphogenese. Durch das Anlegen eines mikrofluidischen Flusses, wird auf die Epithelzellen Scherstress ausgeübt, wodurch die Morphogenese eingeleitet wird und sich die darmtypische Morphologie ausbildet.<sup>[358]</sup>

Obwohl in den letzten Jahren viele mikrofluidische 3D-Gewebekultur- und *Organ-on-a-Chip*-Systeme etabliert wurden, zeigt die Mehrheit von ihnen immer noch eine flache oder rechteckige Geometrie. In den meisten Fällen repräsentieren die mikrofluidischen Kanäle das Blutgefäßsystem und sind somit auf der fluidischen Seite mit Endothelzellen bedeckt. In der Natur sind Blutgefäße oder der Darmtrakt jedoch in der Regel röhren- oder kreisförmige Strukturen wodurch sie anderen Scherkräften und Strömungsparametern ausgesetzt sind.<sup>[119]</sup> Im Folgenden wurden die Parameter für die Geometrie eines eckigen geraden, halbrunden geraden, rund geschwungenen und rund ausgestülpten Kanal analysiert.

#### 3.3.4.1 Fluidodynamikanalyse durch numerische Strömungsmechanik (CFD)

Bei der Mikrofluidik geht es um die Manipulation von Flüssigkeiten im mikroskopischen Maßstab innerhalb eines Systems. Ihr Flussverhalten beruht auf physikalischen Prinzipien. Eine wichtige Eigenschaft der auf Mikrofluidik-Plattformen gehandhabten Flüssigkeiten, ist ihre Viskosität. Sie beschreibt ihren Widerstand gegen Verformung durch Scher- oder Zugspannung. Bei laminaren Strömungen ist die Viskosität der dominierende Faktor, der die Strömungseigenschaften beeinflusst. In der Fluidmechanik wird die Strömung eines Systems über die Reynoldszahl ( $Re$ ) charakterisiert.<sup>[361]</sup> Sie gibt an, wie stark die Trägheitskräfte des Fluids im Vergleich zu den viskosen Kräften sind. Für niedrige Reynoldszahlen dominiert die viskose Strömung und es liegt eine laminare Strömung vor, während bei höheren Reynoldszahlen die Strömung eher turbulent ist.<sup>[362]</sup> Im Gegensatz zu großen Arterien ist der Blutfluss in der Mikrozirkulation hauptsächlich laminar.<sup>[361]</sup> Die Reynoldszahl (1) wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$Re = \frac{\rho * v * d}{\eta} \quad (1)$$

$\rho$  ist die Dichte der Flüssigkeit,  $v$  die Geschwindigkeit der Flüssigkeit,  $d$  der Durchmesser des Rohres und  $\eta$  die dynamische Viskosität der Flüssigkeit.

Im Folgenden werden verschiedene entworfene und simulierte Mikrofluidik-Kanalgeometrien auf ihren Einfluss auf die Fluidodynamikparametern innerhalb ihrer Mikroumgebung verglichen, um die Auswirkung der Kanalstruktur und somit seine Wichtigkeit zu belegen. Die Fluidodynamikanalyse wurde unter Verwendung von Autodesk CFD 2024 durchgeführt, wobei die Mikrofluidik-Kanalgeometrien mithilfe der Autodesk Fusion 360 Software entworfen wurden. In Mikrofluidiksystemen wird die Bewegung der Flüssigkeit durch die Kontinuitätsgleichung (2) und der inkompressiblen Form der Navier-Stokes-Gleichungen (3) beschrieben.<sup>[113]</sup>

$$\nabla \cdot \bar{U} = 0 \quad (2)$$

$$\rho \left( \frac{\delta \bar{U}}{\delta t} + \bar{U} \cdot \nabla \bar{U} \right) = -\nabla p + \rho \bar{g} + \nabla \cdot [\bar{\tau}] \quad (3)$$

$\rho$  ist die Dichte der Flüssigkeit ( $\text{kg/m}^3$ ),  $\bar{U} = (u, v, w)$  beschreibt den Strömungsgeschwindigkeitsvektor ( $\text{m/s}$ ),  $p$  ist der Druck ( $\text{Pa}$ ),  $\nabla$  die Divergenz und  $[\bar{\tau}]$  der Schubspannungstensor ( $\text{Pa}$ ). Die numerische Strömungssimulation (CFD) wurde zur Lösung der inkompressiblen Navier-Stokes-Gleichung (3) und der Kontinuitätsgleichung (2) eingesetzt, um die Geschwindigkeitsfelder, den Druck und die Schubspannungen in den verschiedenen Mikrokanal-Geometrien zu ermitteln.<sup>[113]</sup> Scherspannung, Flussrate und Druck spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle oder Vorhersage des zellulären Mikroumfelds und werden von der Geometrie eines Systems beeinflusst. Die Optimierung der Mikrokanal-Geometrien dient dazu die Parameter innerhalb physiologischer Werte zu halten, was die Nähr- und Sauerstoffversorgung des artifiziellen Gewebes verbessern und somit die Zellmorphologie, Proliferation, Funktion und das langfristige Überleben vieler Zelltypen erhöhen kann.<sup>[128]</sup> Insbesondere reguliert die Größe der Scherspannung die Zellmorphologie, die Phänotransformation und die Genexpression.<sup>[113]</sup> Ebenso spielt der Druck eine wichtige Rolle bei vielen Zellfunktionen und kann Schäden an Zellen verursachen, was in den meisten Fällen die Apoptose eingeleitet wird. Die physiologischen Werte der Scherspannung im menschlichen Gefäßsystem liegen im Bereich von 0,5 bis 120  $\text{dyne/cm}^2$ , sodass die Zellen bei Werten unterhalb dieses Bereichs apoptotisch und bei Werten darüber von der Flüssigkeitsströmung weggespült werden können.<sup>[113]</sup> Der übliche Bereich der Scherspannung

im menschlichen Darm liegt zwischen 1 und 5 dyne/cm<sup>2</sup> wodurch die Epithelzellen im Darm anderen Bedingungen ausgesetzt sind.<sup>[360,363]</sup>

Bei dem Vergleich der Kanalstrukturen war es möglich, die Verteilung der Flüssigkeit im Mikrokanal mithilfe des Stromlinienplots zu analysieren.<sup>[113]</sup> Das berechnete Geschwindigkeitsprofil innerhalb der Mikrokanäle zeigt eine parabolische Form, wobei die maximale Geschwindigkeit im Zentrum der Kammer und die minimale Geschwindigkeit aufgrund der Reibung an den Wänden auftritt (Abbildung 137). Die geschwungene Struktur des runden Kanals, führt hierbei zu keiner Veränderung des Geschwindigkeitsbetrags im Vergleich zu den rechteckigen und halbrunden Kanälen. Auffällig ist jedoch vor allem die niedrige Geschwindigkeit der Flüssigkeit in den Ausstülpungen des intestinalen Kanals, was dafür sorgen kann, dass Nähr- und Wirkstoffe eine längere Verweildauer im Gefäß aufweisen. Darüber hinaus nimmt das Geschwindigkeitsprofil in verschiedenen Teilen des intestinalen Kanals unterschiedliche Werte an, was die Gleichmäßigkeit der Anordnung und Morphogenese von Zellen im artifiziellen Darm beeinflussen kann.<sup>[113]</sup>

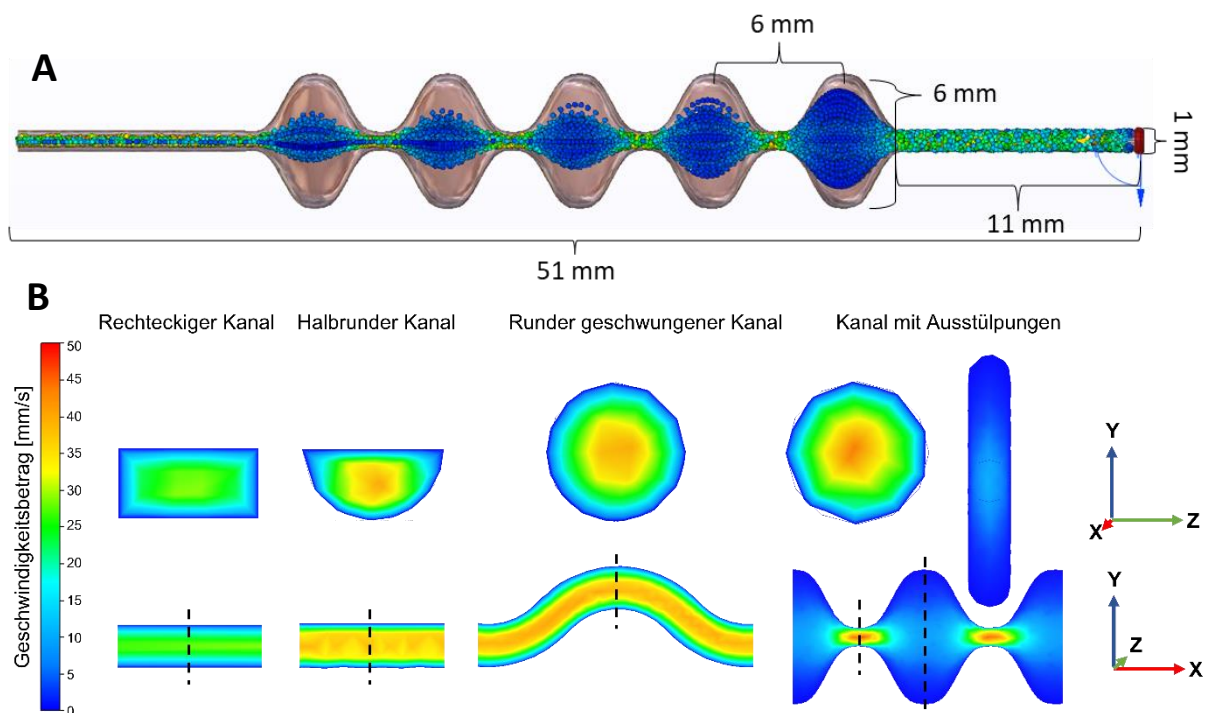


Abbildung 137: CFD-Analyse des Stromlinienplots (A) und des Geschwindigkeitsbetrags (B) unterschiedlicher Kanalgeometrien bei einer Flussgeschwindigkeit von 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$  für den runden Kanal (mit 1 mm Durchmesser) und 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  für den halbrunden (Durchmesser: 0,5 mm) und eckige Kanal (Flächenmaße von 1 mm x 0,5 mm). Die Länge aller Kanäle betrug 5,1 cm. Abgebildet sind die Querschnitte entlang der x-Achse und z-Achse.

Auch der Scherstress in den unterschiedlichen Kanalstrukturen wurde miteinander verglichen (Abbildung 138). Hierbei nimmt die Scherspannung ebenfalls einen parabolischen Verlauf an wobei sie an der Kanalwand zu und in der Mitte abnimmt. Insgesamt zeigen die kreisförmige Kanalgeometrien gleichmäßigere Werte für die Wandscherspannungen im Vergleich zur Eckigen, was sie für Zellkulturstudien besser geeignet macht. Axial betrachtet, zeigen die Ausstülpungen des intestinalen Kanals ebenfalls niedrigere Werte an. Niedrige Schubspannungswerte beeinträchtigen die Bildung von Fokaladhäsionen negativ, also die Bindung zwischen Zellmembran und EZM, sowie die Proliferation und Migration von Zellen. Die physiologische Scherspannung im Darm liegt mit  $> 5 \text{ dyne/cm}^2$  jedoch deutlich unter der eines Blutgefäßes mit  $> 120 \text{ dyne/cm}^2$ , wodurch die intestinale Kanalstruktur mit Ausstülpungen die optimale Geometrie zur Kultivierung von Darmzellen, aufweist.<sup>[360]</sup>

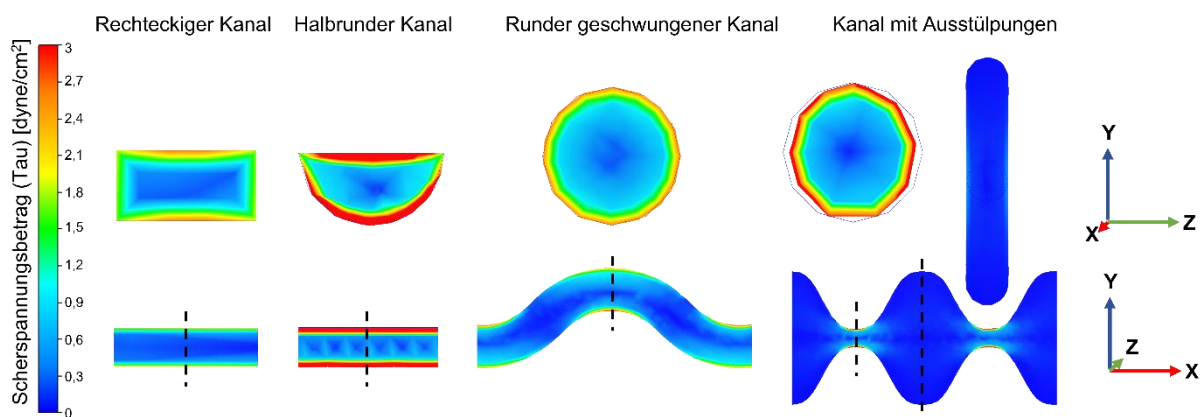


Abbildung 138: CFD-Analyse des Scherspannungsbetrags unterschiedlicher Kanalgeometrien bei einer Flussgeschwindigkeit von  $1000 \mu\text{L/min}$  für den runden Kanal (mit  $1 \text{ mm}$  Durchmesser) und  $500 \mu\text{L/min}$  für den halbrunden (Durchmesser:  $0,5 \text{ mm}$ ) und eckige Kanal (Flächenmaße von  $1 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm}$ ). Die Länge aller Kanäle betrug  $5,1 \text{ cm}$ . Abgebildet sind die Querschnitte entlang der x-Achse und z-Achse.

Über eine Analyse der VZ-Geschwindigkeit in den Kanälen können wichtige Informationen über das Fließverhalten und die Stömungsdynamik ihrer Mikrofluidik gewonnen werden.<sup>[364]</sup>

Die Analyse der VZ-Geschwindigkeit der Kanäle weist hierbei auf Turbulenzen im geschwungenen Kanal hin, die auch bei den Verengungen des intestinalen Kanals zu erkennen sind (Abbildung 139). Die Krümmung des Kanals führte zu Veränderungen der Wandscherspannung in Umfangsrichtung und erzeugte so einen Spannungsgradienten im 3D-Raum. Dieser zusätzliche Spannungsgradient, der sich vom Druckgradienten unterscheidet, der den axialen Fluss antreibt, induziert vermutlich im Darm eine Vermischung der Nährmedien bei hohem Fluss.<sup>[364]</sup> Durch die Krümmung des Kanals im geschwungenen Kanal,

übt die Flüssigkeit zudem eine verstärkte Kraft in Richtung der Gefäßwand aus. Die Interaktion von Nähr- und Wirkstoffen mit den Zellen wird somit erhöht, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme von Nähr- und Wirkstoffen erhöht werden kann.<sup>[362,365-367]</sup>

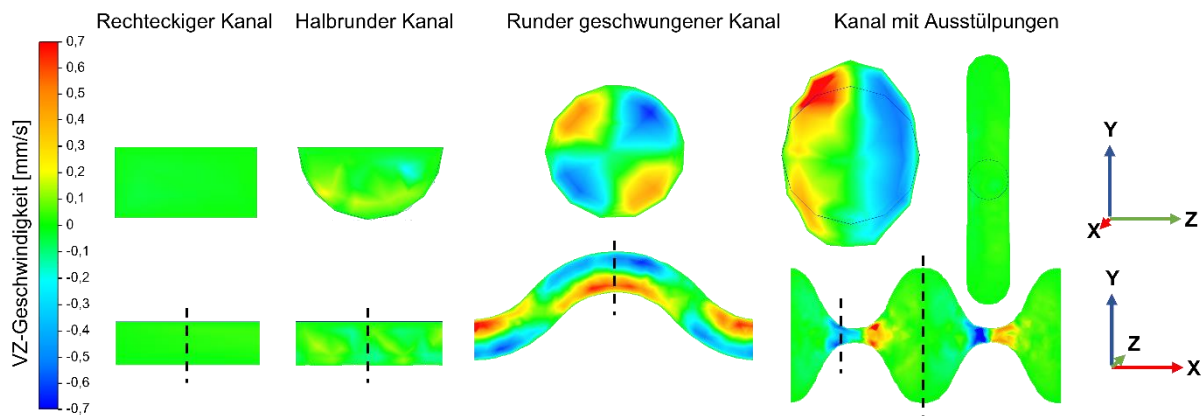


Abbildung 139: CFD-Analyse der VZ-Geschwindigkeit unterschiedlicher Kanalgeometrien bei einer Flussgeschwindigkeit von 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$  für den runden Kanal (mit 1 mm Durchmesser) und 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  für den halbrunden (Durchmesser: 0,5 mm) und eckige Kanal (Flächenmaße von 1 mm x 0,5 mm). Die Länge aller Kanäle betrug 5,1 cm. Abgebildet sind die Querschnitte entlang der x-Achse und z-Achse.

### 3.3.4.2 Matrixstabilität und Diffusion im VitaPrint

Für die flussbasierte Charakterisierung der Matrixstabilität gegenüber den Kräften, die durch den Flüssigkeitsstrom auf die Gefäßwände wirken, wurden die Kanäle des VitaPrint Chips aus 5 % GelNB + GelS an ein mikrofluidisches Spritzenpumpensystem (ibidi) angeschlossen und für 10 Tage mit 1xDPBS<sup>-/-</sup> perfundiert (Abbildung 140). Das Pumpensystem erzeugt über eine Luftdruckpumpe einen rezirkulierenden Fluss mit geschlossenem Kreislauf, wodurch eine unidirektionale laminare Strömung erzeugt wird, wie sie in kleinen physiologischen Gefäßen auftritt. Die Flussrate wurde innerhalb von 4 Tagen von 0,075 auf 1,21 mL/min gesteigert, was einem Druck von 3 - 80 mbar entspricht. Der berechnete Scherstress lag hier bei 8,09 - 129,49 dyne/cm<sup>2</sup> und entspricht den physiologischen Werten von kleinen bis großen humanen Blutgefäßen.<sup>[113]</sup> Für die Simulation des Darmtraktes werden deutlich niedrigere Flussraten von etwa 0,005 ml/min benötigt, um das Zellverhalten physiologisch beeinflussen zu können.<sup>[363]</sup> Diese Flussraten sollen allerdings für den VitaPrint Chip keine Probleme darstellen und wurden deshalb nicht getestet.

Die Kanalstrukturen des VitaPrint Chips zeigten über den gesamten Verlauf der Perfusion von 10 Tagen keine Veränderung der Geometrie (Abbildung 140). Auch die Matrix aus Gelatine-basiertem Hydrogel (5 % GelNB + GelS) erwies sich unter den fluidischen Bedingungen als

robustes Material, das für die Makroarchitektur im Chip geeignet ist und sich trotz seiner Elastizität unter den einwirkenden Kräften nicht verformt. Da das VitaPrint System zwei Kanäle zur Simulation des Blutflusses besitzt, kann zudem durch die Verbindung beider Kanäle in einen Kreislauf ein Nährstoffgradient erzeugt werden, um eine venöse und arterielle Versorgung zu imitieren (Abbildung 140). Die Möglichkeit der Verbindung mehrerer Chips miteinander, eröffnet zusätzlich die Möglichkeit *Organ-on-a-Chip*-Modelle unterschiedlicher Organe in Reihe zu schalten, um ein komplexeres Multiorgansystem zu imitieren.

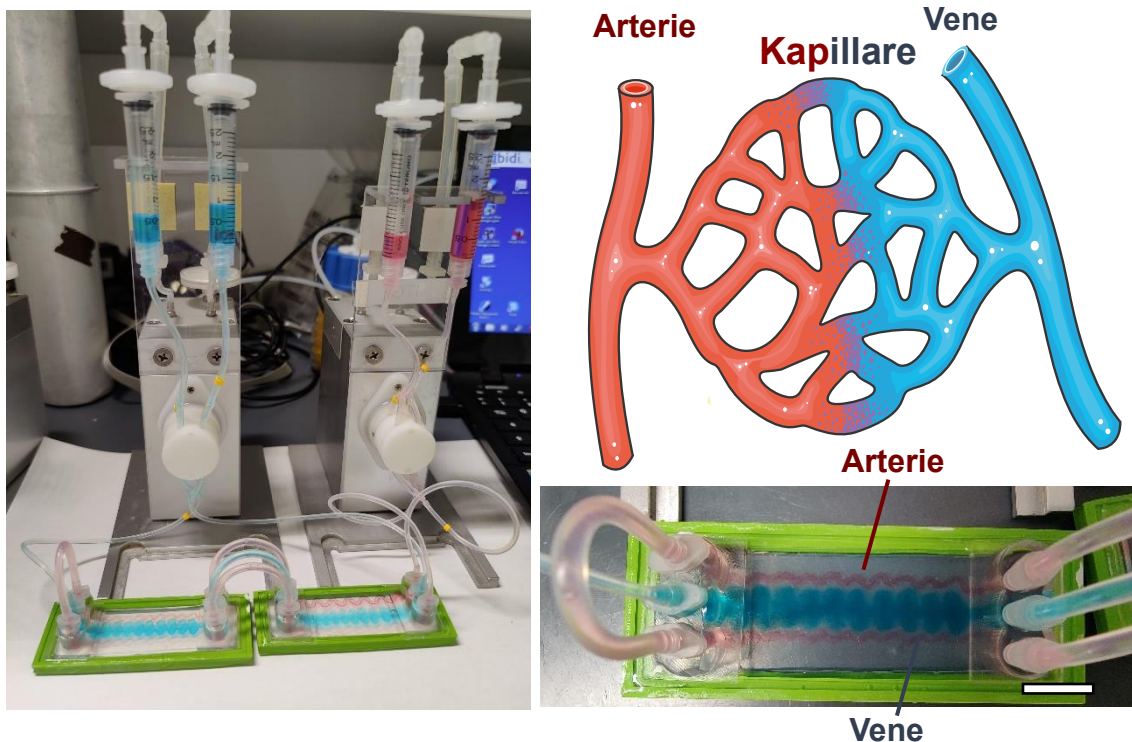


Abbildung 140: Aufbau des IBIDI Pumpsystems mit laminarem Fluss. Zu sehen ist die Perfusion von VitaPrint Chips mit 3 Kanälen aus 5 % GelNB + GelS mit 1xDPBS<sup>-/-</sup>. Die Versorgung der äußeren Blutgefäße (rot) verläuft im Kreislauf und getrennt vom inneren intestinalen Kanal (blau). Maßstab: 1 cm.

Im VitaPrint System soll die Versorgung der im Hydrogel wachsenden Zellen über die Diffusion der Nährstoffe durch die Blutgefäße gewährleistet werden. Physiologisch betrachtet werden Nährstoffe und Sauerstoff ebenfalls über die passive Diffusion in Gewebe aufgenommen. Die Diffusionsgrenze von Sauerstoff im Gewebe liegt aufgrund der geringen Löslichkeit bei etwa 100  $\mu$ m. Folglich stellt die strukturelle Architektur der physiologischen Mikrozirkulation sicher, dass Zellen immer innerhalb von 100  $\mu$ m von der nächsten Kapillare entfernt sind. Sauerstoff muss hierdurch in der Regel meist nur 30  $\mu$ m oder weniger diffundieren, um sein Ziel zu erreichen.<sup>[361]</sup>

Wie T. Göckler bereits in seiner Arbeit<sup>[205]</sup> zeigen konnte, ist die Diffusion von Molekülen innerhalb Gelatine-basierten Hydrogelen von ihrer Größe abhängig. Kleine Moleküle wie Glucose (180,156 Da) können nahezu ungehindert durch das Netzwerk der Matrix diffundieren, während größere Moleküle wie etwa Dextran (1 – 2000 kDa) einige Zeit für die Diffusion im Hydrogel benötigen. Im VitaPrint Chip werden die umliegenden Zellen der Matrix von zwei Gefäßen versorgt. Ihre geschwungene Architektur ermöglicht zudem die schnellere Versorgung eines größeren Bereichs.

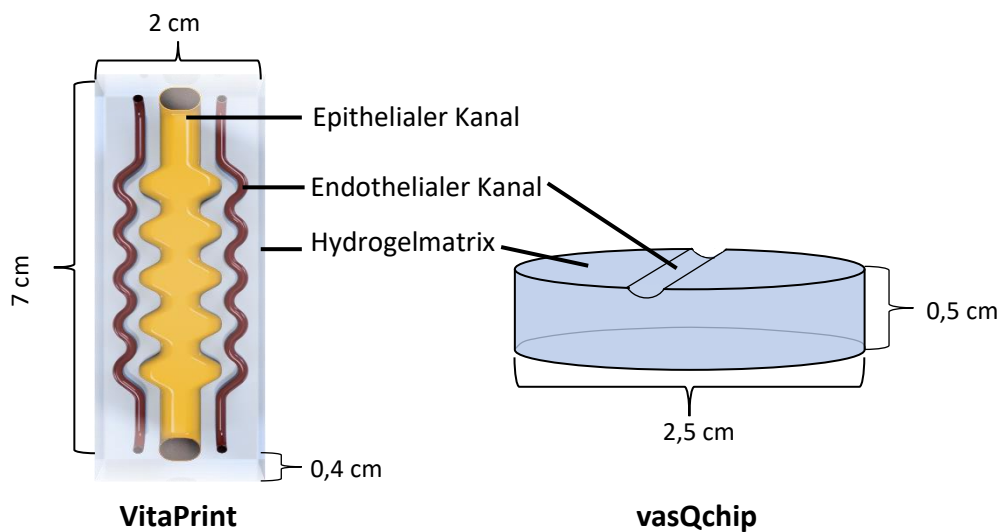


Abbildung 141: Dimension der Hydrogelmatrix in den Chip-Systemen VitaPrint und vasQchip.

Die Diffusion von Nährstoffen im VitaPrint-Chip wurde über die visuelle Betrachtung des zeitlichen Diffusionsverlaufs von 20 mg/mL Bluedextran (2000 kDa) sowohl unter statische Bedingungen als auch mit einer Flussgeschwindigkeit von mit 1 mL/min charakterisiert. Zudem wurde die Diffusion im VitaPrint Chip (Gelvolumen von 56 mm<sup>3</sup>) mit der des zuvor beschriebenen vasQchips<sup>[119]</sup> mit einer Membran-Porengröße von 3 µm und einem Gel-Volumen von etwa 24,5 mm<sup>3</sup> verglichen (Abbildung 142). Der Diffusionsverlauf von Dextran im VitaPrint Chip zeigte sich hierbei als deutlich effektiver im Vergleich zum vasQchip. So hatte nach 60 min Perfusion mit Bluedextranlösung bereits ein Volumen von 28 mm<sup>3</sup> das Dextran aufgenommen, während bei vasQchip nur ein geringer Teil der Bluedextranlösung überhaupt die Membran des Chips passieren konnte. Wird nun die Diffusion des statisch befüllten Kanals im VitaPrint Chip mit der des fluidisch betriebenen Kanals verglichen, zeigt sich auch, dass die Aufnahme des Dextrans im fluidischen Kanal deutlich verstärkt ist. Ein Hydrogel-Volumen von

28 mm<sup>3</sup> benötigt im statischen Versuchsaufbau fast dreimal so lange, um visuell in etwa die gleiche Menge an Dextran aufzunehmen.

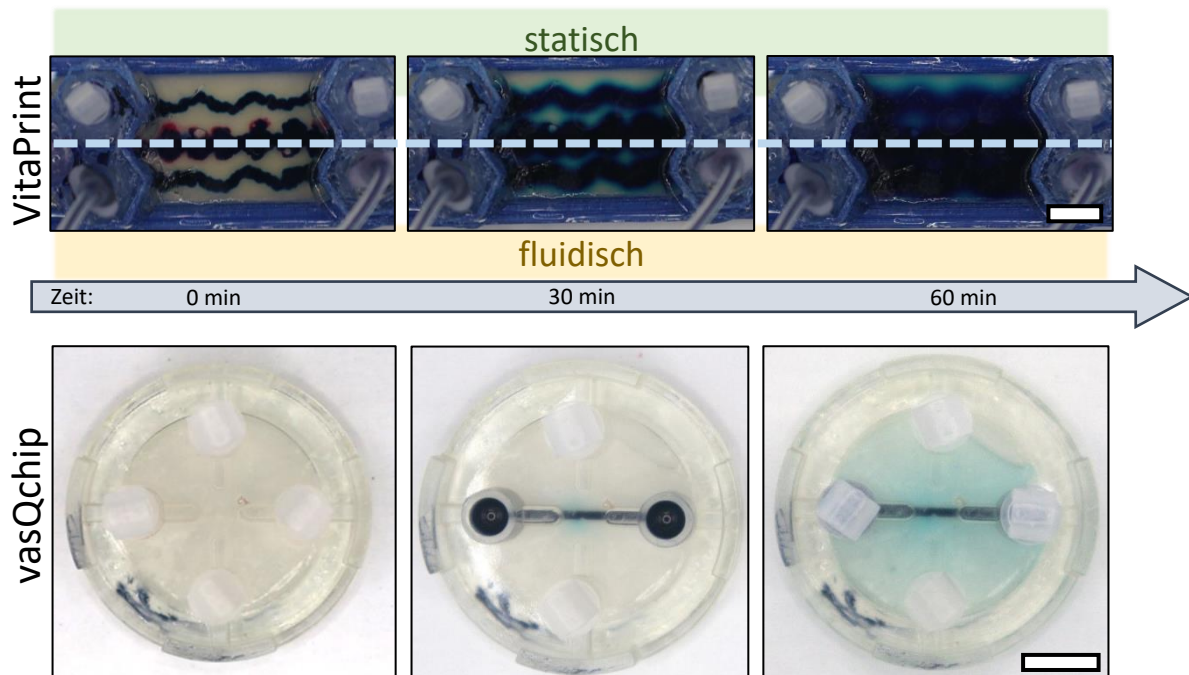


Abbildung 142: Diffusionsverlauf von BlueDextran in den Organ-on-a-Chip Modellen VitaPrint und vasQchip. Bilder wurden zum Zeitpunkt 0 min, 30 min und 60 min nach der Befüllung mit BlueDextran aufgenommen. Maßstab: 1 cm.

Die Diffusion von Molekülen über eine Membran aufgrund eines Konzentrationsgefälles wird dabei näherungsweise über das 1. Ficksche Gesetz (4) beschrieben:<sup>[368]</sup>

$$V_D = -D \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (4)$$

$$D = k \frac{T}{6\pi r \eta} \quad (5)$$

Wobei  $V_D$  die Diffusionsgeschwindigkeit,  $D$  den Diffusionskoeffizient (5),  $\Delta c$  den Konzentrationsunterschied und  $\Delta x$  die zu überwindende Strecke beschreibt.  $D$  wird dabei von der Diffusionskonstanten  $k$ , der Temperatur ( $T$ ) in Abhängigkeit des Radius ( $r$ ) der Teilchen und der Viskosität des Mediums ( $\eta$ ) bestimmt. Mit anderen Worten, die Diffusionsgeschwindigkeit ist direkt proportional zum Konzentrationsgradienten des Moleküls. Da im fluidischen Betrieb immer neues Dextran nach transportiert wird, wird das Konzentrationsgefälle immer hochgehalten, wodurch die Diffusion hier deutlich stärker ausgeprägt ist als im statischen Versuchsaufbau. Somit zeigt der perfundierte Kanal des

VitaPrints, die höchste Diffusionsrate aller getesteten Systeme und Bedingungen und dementsprechend die beste Voraussetzung für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen.

### 3.3.5 Untersuchung der Biokompatibilität verschiedener Hydrogele

Die Extrazellulärmatrix (EZM) stellt eines der komplexesten strukturellen Gewebe im Organismus dar.<sup>[369]</sup> So muss sie nicht nur wie zu vor beschrieben eine geeignete Diffusionsvoraussetzungen für Nährstoffe aufweisen, sondern auch die nötige Stabilität zur Unterstützung des Zellwachstums sowohl in der EZM als auch auf ihr bereitstellen. Die am häufigsten verwendeten Hydrogele für *Organ-on-Chip*-Systeme, die die EZM imitieren sollen, werden aus Kollagen, Fibrinogen, Matrigel, Gelatine, Polyacrylamid (PA), Polyethylenglykol (PEG) oder Hyaluronsäure (HA) hergestellt.<sup>[370,371]</sup> In den letzten Jahren wurden zudem auch Hydrogele aus nativer Gewebe-EZM erstellt, um die EZM des jeweiligen Organs detailgetreuer nachzubilden.<sup>[372,373]</sup> All diese Materialine könnten sich auch für den Einsatz in dem hier beschriebenen VitaPrint System eignen. Da in diesem System allerdings im Gegensatz zu den meisten anderen Chipmodellen<sup>[374]</sup> keine feste Membran eingebaut ist, muss die gewählte Hydrogel-Matrix so konzipiert werden, dass die Zellen wie in der EZM sowohl in ihr als auch auf ihr wachsen können. Denn im Gegensatz zum Zellwachstum auf einer 2D-Oberfläche, die eine Membran bietet, sind die Zellen zwar weniger in der Ausbildung ihrer Morphologie eingeschränkt, haben allerdings innerhalb einer 3D-Matrix ähnlich zur EZM mehrere Bindungsstellen in verschiedenen Ebenen.<sup>[374]</sup> Diese Bindungsstellen bestehen aus sogenannten RGD-Domänen die aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Einbuchstaben-Code RGD) bestehen. Zellen können mit Hilfe von Oberflächenrezeptoren, den Integrinen, an diesen Sequenzen binden, wodurch das Zytoskelett mit der Matrix verbunden wird. Darüber hinaus werden so auch Kräfte übertragen und die intrazelluläre Signaltransduktion aktiviert, um die Genexpression zu regulieren. Die Anzahl der Bindungsstellen ist hierfür entscheidend und muss bei der Wahl der Hydrogel-Matrix berücksichtigt werden. Außerdem ist es Zellen möglich über Oberflächenrezeptoren mit Wachstumsfaktoren zu interagieren. Solche sind normalerweise an der EZM gebunden, um zelluläre Signaltransduktionswege zu aktivieren und sollten deshalb auch in der Hydrogel-Matrix zu finden sein.<sup>[375]</sup> Somit hat jedes Organ aufgrund seiner unterschiedlichen Bedürfnisse eine andere Zusammensetzung der EZM. Die EZM des Darms zum Beispiel ist aus

zwei unterschiedlichen Schichten aufgebaut (Abbildung 143). Der Basalmembran, die zwischen dem Epithel und der Lamina propria liegt und zum größten Teil aus Kollagen IV und Laminin besteht, die die Zellorganisation und Differenzierung kontrolliert und mit Zelloberflächenrezeptoren interagiert. Und der interstitiellen Matrix der Lamina propria, in der Kollagen I und Fibronectin dominieren, um Fibroblasten und Myofibroblasten Halt zu geben.<sup>[369,376,377]</sup> Dieser komplexe Aufbau der Darm EZM machen es zur großen Herausforderung eine geeignete künstliche Matrix als Ersatz zu generieren.<sup>[377]</sup> In diesem Abschnitt werden unterschiedliche Hydrogele auf ihre Eignung als intestinale EZM untersucht.

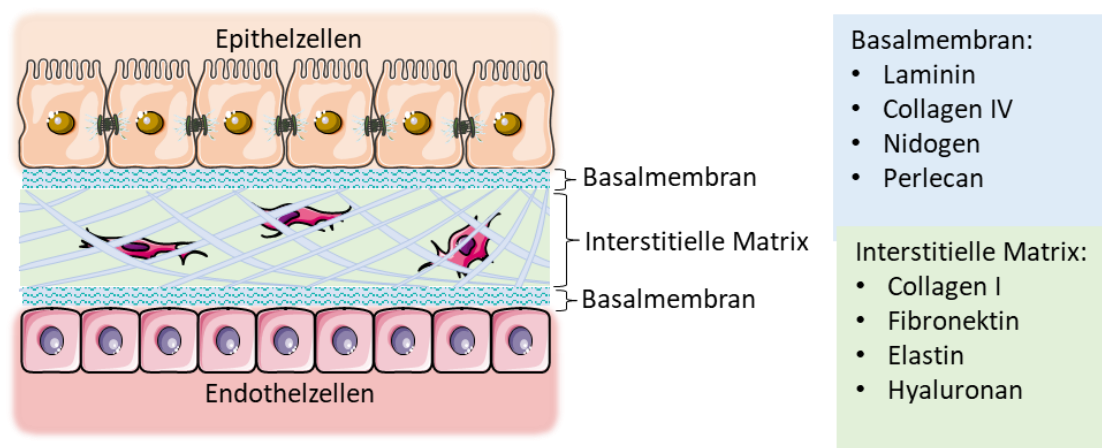


Abbildung 143: Schematischer Aufbau der Extrazellulären Matrix in der Lamina Propria des Darms.<sup>[377]</sup> Die Epithelzellen des Darms und die Endothelzellen der Blutgefäße wachsen auf der Basalmembran die die Lumina propria von beiden Seiten umgibt. Die interstitielle Matrix hingegen bildet das Gerüst für Zellen des Bindegewebes, die in der Lumina propria wachsen.

### 3.3.5.1 Besiedlung der gedruckten Matrix mit organotypischen Zellen

Bisher wurden für die Kultivierung von intestinalen Epithelzellen vor allem Matrigel oder Kollagen verwendet.<sup>[373]</sup> Matrigel wird aus dem Engelberth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom extrahiert und verursacht damit eine erhebliche chargenabhängige Variation in kultivierten Organoiden. Zudem sind Matrigel und Kollagen aufgrund ihrer schnellen wärmeabhängigen Gelierung schwer handzuhaben und somit für den 3D-Druck im Tissue-Engineering nicht geeignet<sup>[378]</sup>. Ebenso ist es nicht möglich natürliche Hydrogele an die Oberfläche des Objektträgers des VitaPrint zu binden, wodurch, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, die Kanäle nicht ohne weiteres perfundiert werden können. Semisynthetische Hydrogele wie etwa GelMA hingegen sind leicht zu manipulieren, weisen jedoch häufig zu wenige Bindungsstellen für die Zellen auf.<sup>[379]</sup> Eine Mischung aus semisynthetischen und natürlichen Hydrogelen könnte somit die Vorteile beider vereinen.

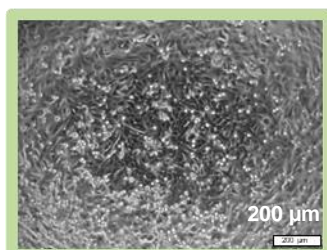
Zur Evaluierung eines geeigneten Hydrogels für den VitaPrint Chip wurden deshalb unter anderem die natürlichen Hydrogele Matrigel, Kollagen und Fibrinogen, sowie die semisynthetische Hydrogel GelMA, GelNB+GelS auf ihre Eignung als künstliche EZM untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene Mischungen (Mixgele) und Beschichtungen der Hydrogele getestet. Studien haben auch gezeigt, dass die Steifigkeit von Hydrogelen die Adhäsion der Zellen positiv beeinflussen kann. Dies kann durch eine Erhöhung der Hydrogel Konzentration erreicht werden, sowie durch eine Mischung der Hydrogele mit Poly(ethyleneglycol)-Diacrylat (PEGDA).<sup>[370,380,381]</sup> PEGDA ist ein synthetisches, nicht abbaubares Polymer, das mechanisch stabile Netzwerke bildet und in Co-Polymerisation mit dem Hydrogel GelMA dessen Steifigkeit gravierend erhöhen kann.<sup>[380]</sup> Die Evaluierung geeigneter Medien für Co-Kulturen, der Toxizität des Photoinitiator (LAP) und der UV-Belichtung sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 8.1 und 8.2).

Charakterisiert wurden die Hydrogele auf das Wachstum von primären intestinalen Epithelzellen (HSIEC), sowie den epithelialen Darmkrebszellen Caco-2 auf den Hydrogeloberflächen. Da der VitaPrint Chip auch Blutgefäße simulieren soll, wurde zudem auch das Wachstum von primären intestinalen Endothelzellen (HSIMEC) auf den Hydrogelen beobachtet. Für die Untersuchung wurden je 200 µL der verwendeten Hydrogelvorläufer (Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10) in die Wells einer 48-Well-Platte gegeben. Nach der Polymerisation wurden je  $2 \times 10^4$  Zellen pro Hydrogel ausgesät und 24 h kultiviert. Da in normalen 2D-Zellkultursystemen ein Großteil der Zellen bereits nach 4 h am Boden der Kulturgefäße anwuchs, sollte eine Aussage über die Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen durchaus nach 24 h Kultivierung möglich sein. Die Auswertung fand deshalb nach 24 h über Mikroskopie durch die Betrachtung des Hellfeldes statt (Tabelle 8-10). Nach der angegebenen Kultivierungszeit konnte lediglich auf den natürlichen Hydrogelen, Fibrinogen und Kollagen, ein Anwachsen der Epithel- und Endothelzellen beobachtet werden. Auf den Mixgelen aus GelMA mit Kollagen oder Fibrinogen wuchsen die Zellen nur teilweise an. Die Co-Polymerisation der Hydrogele GelMA und PEGDA führte zwar wie auch Vila *et al.*<sup>[380]</sup> beschrieb zu einer Adhäsion von Caco-2 Zellen (Tabelle 10), die primären Zellkulturen HSIEC (Tabelle 8) und HSIMEC (Tabelle 9) konnten hier jedoch ebenfalls nicht mit der Matrix interagieren.

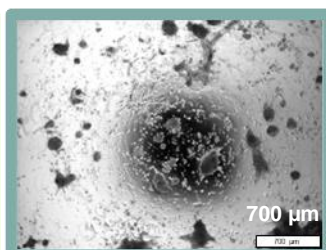
Tabelle 8: HSIEC Wachstum auf verschiedenen Hydrogelen. (grün: flächiges Wachstum, blau: mäßiges Wachstum, rot: kein Wachstum)

Hydrogel Mix	x	5 % GelMA Med	2 mg/mL Kollagen	2 mg/mL Photocol	2 mg/mL Fibrinogen	25 % Matrigel	2,5 % PEGDA	5 % PEGDA	10 % PEGDA
5 % GelMA Low									
10 % GelMA Low									
2,5 % GelMA Med									
4 % GelMA Med									
5 % GelMA Med									
7,5 % GelMA Med									
10 % GelMA Med									
4 % GelMA High									
5 % GelMA High									
10 % GelMA High									
5 % GelNB + GelS Low									
2,5 % GelNB + GelS Med									
5 % GelNB + GelS Med									
10 % GelNB + GelS Med									
5 % GelNB + GelS High									
10 % GelNB + GelS High									
2 mg/mL Kollagen									
2 mg/mL Photocol									
2 mg/mL Fibrinogen									
25 % Matrigel									
2 mg/mL Kollagen + 2 mg/mL Fibrinogen									
25 % Matrigel + 2 mg/mL Fibrinogen									

flächiges Wachstum



mäßiges Wachstum



kein Wachstum

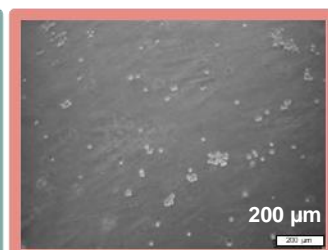
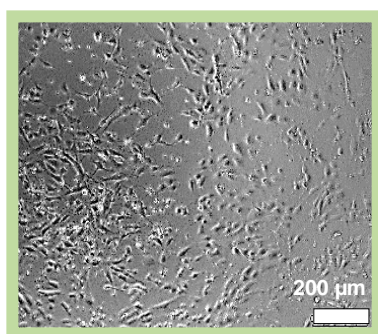


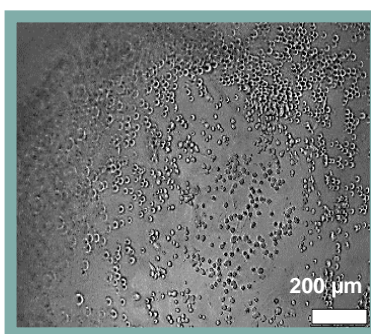
Tabelle 9: HSIMEC Wachstum auf verschiedenen Hydrogelen. (grün: flächiges Wachstum, blau: mäßiges Wachstum, rot: kein Wachstum)

Hydrogel Mix	x	2 mg/mL Kollagen	2 mg/mL Photocoll	1 mg/mL Photocoll	2 mg/mL Fibrinogen	50 % Matrigel
4 % GelMA Med						
5 % GelMA Med						
2,5 % GelMA High						
4 % GelMA High						
2,5 % GelNB + GelS Med						
5 % GelNB + GelS Med						
2,5 % GelNB + GelS High						
5 % GelNB + GelS High						
1 mg/mL Kollagen						
x						

flächiges Wachstum



mäßiges Wachstum



kein Wachstum

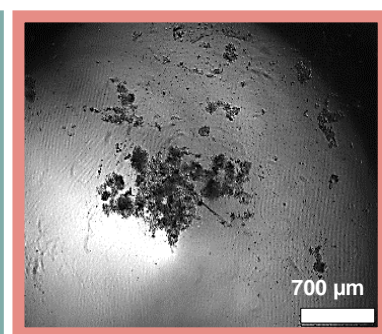
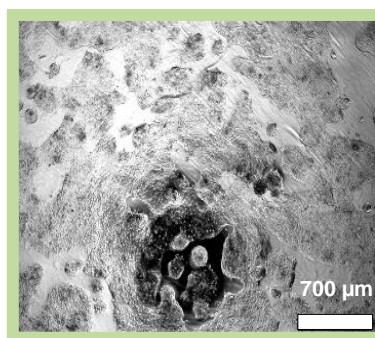


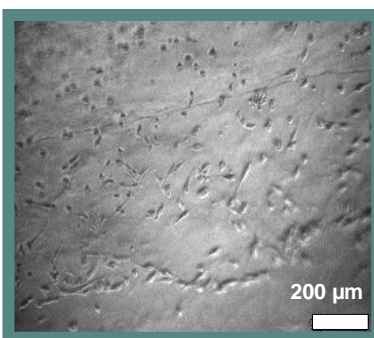
Tabelle 10: Caco-2 Wachstum auch verschiedenen Hydrogelen. (grün: flächiges Wachstum, blau: mäßiges Wachstum, rot: kein Wachstum)

Hydrogel Mix	x	2 mg/mL Kollagen	2 mg/mL Photocoll	2 mg/mL Fibrinogen	10% PEGDA	50 % Matrigel
10 % GelMA Low						
5 % GelMA Med						
10 % GelMA Med						
5 % GelMA High						
10 % GelMA High						
5 % GelNB + GelS Low						
5 % GelNB + GelS Med						
5 % GelNB + GelS High						
10 % GelNB + GelS High						
x						

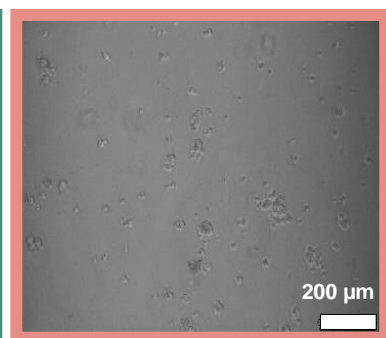
flächiges Wachstum



mäßiges Wachstum



kein Wachstum



Da feste Materialien für die Zellkultur meist beschichtet werden um eine Adhäsion der Zellen herbeizuführen<sup>[382]</sup>, wurde überprüft, ob dies auch bei Hydrogelen zu einem verbesserten Zellwachstum führt. Für diese Untersuchung wurden je 200 µL Hydrogelvorläuferlösung in die Wells einer 48-Well-Platte gegeben. Nach der Polymerisation wurden die Hydrogel dann für 1 h mit 100 µL der entsprechenden Beschichtungslösung (siehe Tabelle 11) inkubiert. Als

potentielles Beschichtungsreagenz wurde Kollagen I, Fibrinogen, Matrigel, Gelatine und Poly-L-Ornithin genauer betrachtet. Nach der Polymerisation und Beschichtung wurden je  $2 \times 10^4$  Zellen pro Hydrogel ausgesät und über einen Zeitraum von 24 h kultiviert. Die Auswertung erfolgte auch hier mikroskopisch über die Betrachtung der Hellfeldaufnahmen. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Beschichtung von GelMA mit Fibrinogen und Matrigel teilweise zu einer verbesserten Adhäsion von HSIEC Zellen führte. Diese Adhäsion bildet sich jedoch nicht flächig auf dem gesamten Hydrogel aus, wodurch dies für die Zellen nicht ausreichte, um eine konfluente Epithelschicht auszubilden.

Tabelle 11: HSIEC Wachstum auf verschiedene Hydrogelen mit unterschiedlicher Beschichtung

Hydrogel	Beschichtung	2 mg/mL Kollagen	0,1 mg/mL Kollagen	2 mg/mL Photocol	2 mg/mL Fibrinogen	0,1 mg/mL Fibrinogen	25 % Matrigel	50 % Matrigel	100 % Matrigel	1 % Gelatine	0,01 % Poly-L-Ornithin
5 % GelMA Med											
10 % GelMA Med											
5 % GelMA High											
5 % GelNB + GelS High											
2 mg/mL Kollagen											
2 mg/mL Photocol											

Die flächig angewachsenen Zellen auf den natürlichen Hydrogelen Kollagen und Fibrinogen wurden nach der Beobachtung für weitere 5 Tage kultiviert, um sie auf ihre Eignung als Matrix für den VitaPrint Chip zu untersuchen. Denn bei der Verwendung im Chip ist eine Zellkultivierung über mehrere Wochen angedacht. Im weiteren Verlauf zeigte sich hierbei das Fibrinogen Hydrogel als besonders instabil, da es sich bereits nach weiteren 2 Tagen Kultivierung auflöste. Das Kollagen-Hydrogel hingegen zeigte sich über eine Kultivierungszeit von 5 Tagen beständig. Hier durchliefen die Epithelzellen HSIEC zudem eine Morphogenese und bildeten intestinal typische Zotten-ähnliche Strukturen auf der Kollagenoberfläche aus (Abbildung 144).

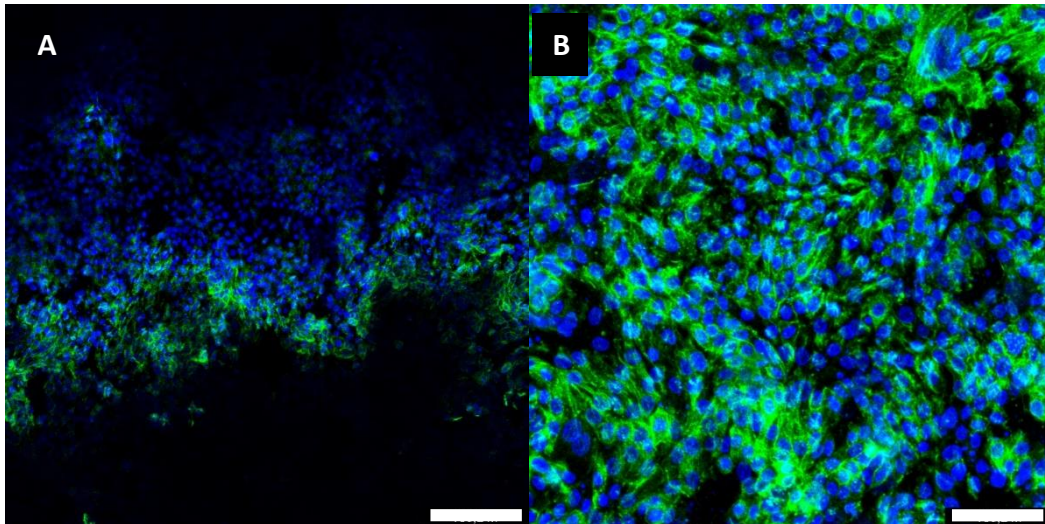


Abbildung 144: HSIEC Wachstum auf 2 mg/mL Kollagen Hydrogel nach weiteren 5 Tagen Kultivierung. Zu sehen sind die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen der mit Hoechst33342 markierten Zellkerne (blau), sowie die Aktinfilamente die mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) markiert wurden. Das Hydrogel ist im Querschnitt (A) dargestellt und in Frontansicht (B). Maßstab: 30 µm.

Da Kollagen jedoch nicht an der Glasoberfläche der silanisierten Objektträger, die für den VitaPrint-Chip benötigt werden (Kapitel 3.3.3), haften bleibt, kommt es nicht für die Verwendung im VitaPrint-System in Frage. Aus diesem Grund wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, um die Adhäsion der Epithel- und Endothelzellen zu verbessern. Hierfür wurde eine Modifikation des natürlichen Hydrogels Kollagen mit funktionellen Gruppen wie MAA oder Thiolen zu Photocol oder CoLS ähnlich zu GelMA oder Gels in Betracht gezogen, um eine kovalente Bindung an die Glasoberfläche des VitaPrint zu ermöglichen.

### 3.3.5.2 Photocol Synthese

Die Synthese und Charakterisierung des Photocols für die Adhäsion von HSIEC Zellen wurde in Kollaboration mit M. Sc. Sophia Kunz im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (KIT, IFG) durchgeführt. Das hierfür verwendete Kollagen I wurde aus Kollagenfasern (Abbildung 145) von Maus- oder Rattenschwänzen extrahiert (siehe Kapitel 5.2.1.6) und in 20 mM Essigsäure für 7 Tage gelöst, bevor es gefriergetrocknet wurde. Die anschließende Synthese erfolgte nach L. Jin *et al.*<sup>[383]</sup> Hierfür wurde das in 10 mM HCl gelöste Kollagen über Methacrylsäureanhydrid (MAA) bei 4 °C für 16 h zu Photocol umgesetzt (Abbildung 146). Nach anschließender Dialyse und Gefriertrocknung, konnte der Erfolg der Synthese über <sup>1</sup>H-NMR nachgewiesen werden (Abbildung 147).

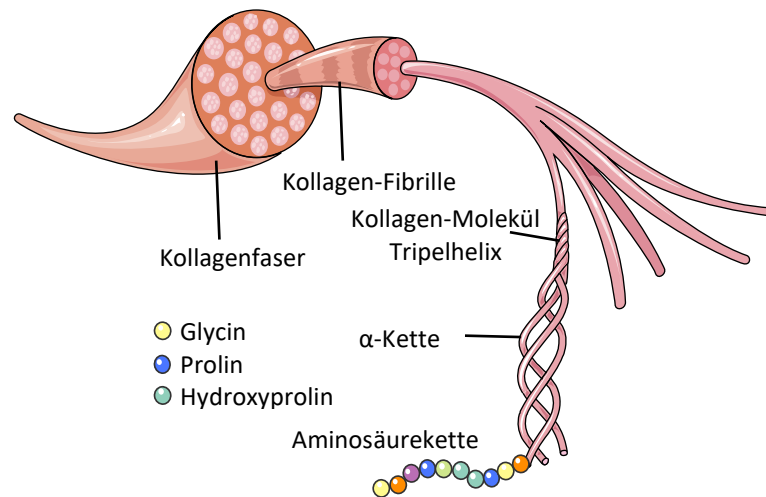


Abbildung 145: Physiologischer Aufbau einer Kollagenfaser. Diese bestehen aus mehreren Untereinheiten, die durch Helix-Konformationen miteinander verbunden sind. Die sogenannte Tripelhelix besteht aus drei lange Kollagenfasern, die aus Kollagenproteinen bestehen. Die häufigste Aminosäure dieser Proteinfasern sind Glycin, dicht gefolgt von Prolin und Hydroxyprolin, die in einer α-Kette miteinander verbunden sind.

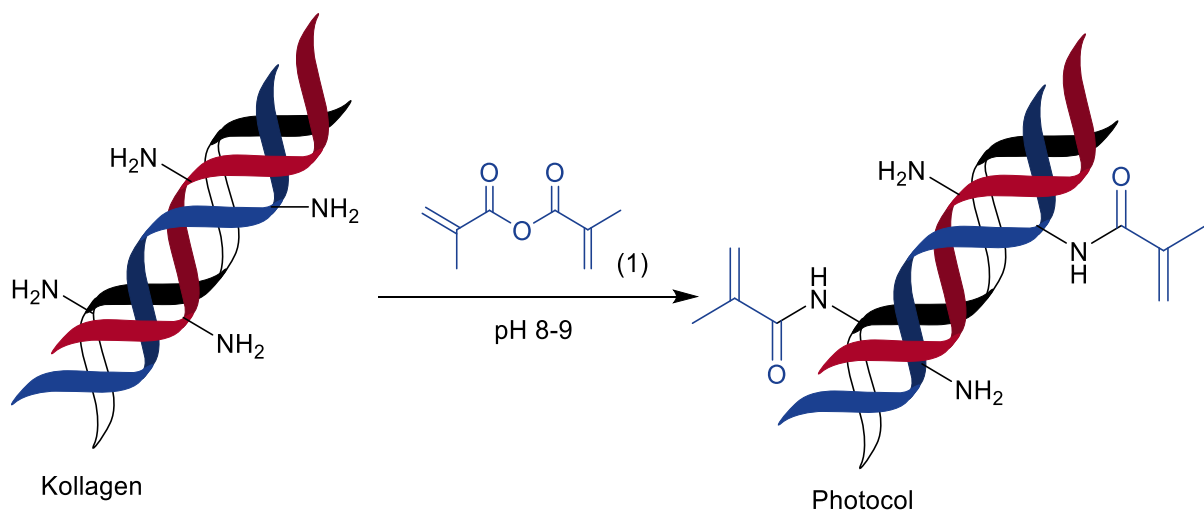


Abbildung 146: Schematische Darstellung der Synthese von Photocoll aus Kollagen I über Methacrylsäureanhydrid (1) bei einem pH von 8-9.

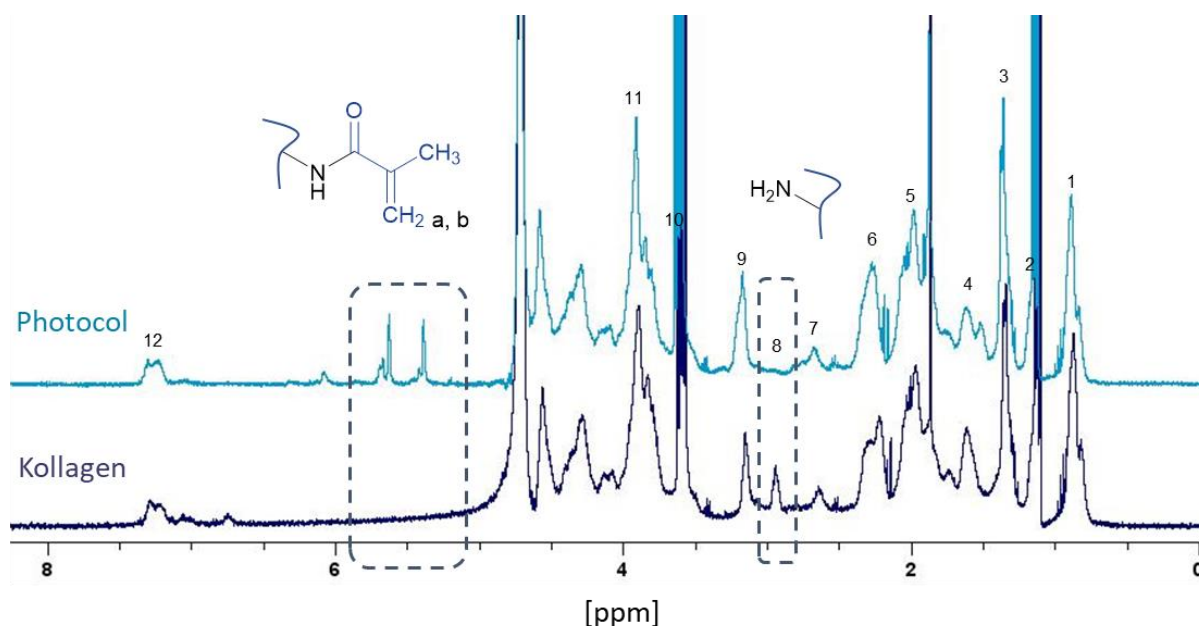


Abbildung 147:  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von Kollagen I und Photocol in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Ebenfalls sollte die Synthese von thioliertem Kollagen eine Co-Polymerisation mit dem semisynthetischen Hydrogel GelNB ermöglichen. Die Synthese von thioliertem Kollagen wurde nach R. Holmes *et al.*<sup>[384]</sup> durchgeführt. Hierfür wurden das zuvor aus Rattenschwänzen extrahierte Kollagen I in 17,4 mM Essigsäure gelöst und bei pH 7,4 für 24 h über Iminothiolan zu Photocol umgesetzt (Abbildung 148). Nach anschließender Dialyse und Gefriertrocknung war es jedoch nicht mehr möglich das Photocol zu lösen, wodurch weder der Erfolg der Synthese nachgewiesen noch Versuche mit dem Photocol durchgeführt werden konnten. Dies lag vermutlich an der hohen Anzahl an Thiolgruppe, die das Lösen von modifizierten Hydrogelen erschwert und in Zukunft durch Modifizierung des Syntheseprotokolls verbessert werden könnte.

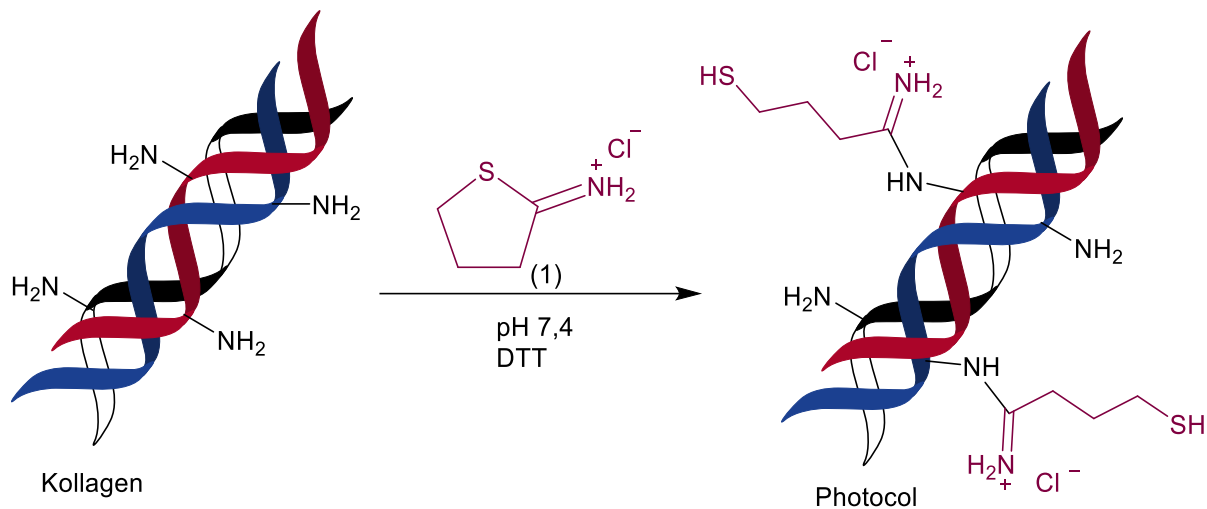


Abbildung 148: Schematische Darstellung der Synthese von Photocol aus Kollagen I über 2-Iminothiolan (1) in Anwesenheit von 1,4-Dithiothreitol (DTT) bei pH 7,4.

Zur Evaluierung des Wachstums von HSIEC Zellen auf dem Photocol Hydrogel, wurde 200  $\mu\text{L}$  von 2 mg/mL in 20 mM Essigsäure gelöstes Photocol mit 0,3 % LAP in ein 8-Well-IBIDI Slide gegeben. Die Aushärtung erfolgte nach der Neutralisation der Lösung über 1 mM NaOH auf einen pH-Wert von 7, zunächst thermisch bei 37 °C für 1 h und anschließend über die Polymerisation durch UV-Licht (320 – 500 nm, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 30 sec). Nach erfolgreicher Aushärtung wurden  $2 \times 10^4$  HSIEC Zellen auf das Gel gegeben und für 24 h kultiviert. Die anschließende Auswertung über Fluoreszenzmikroskopie zeigte nun ein vergleichbares Ergebnis wie bei unmodifiziertem Kollagen (Abbildung 149). Die Zellen wuchsen flächendeckend auf dem Hydrogel. Nach weiteren 5 Tagen Kultivierung auf dem Gel zeigte sich zudem ebenfalls eine Ausbildung von zotten-artigen Strukturen. Eine zusätzlich Untersuchtes Mixgel aus Photocol und den Gelatine-basierten Hydrogelen, GelMA oder GelNB + GelS, zeigte zudem ebenfalls eine Verbesserung der Adhäsion von HSIEC Zellen (Tabelle 8) im Vergleich zu den reine Hydrogelen GelMA und GelNB + GelS. Dieses Gel zeigt somit die besten Voraussetzungen als Basalmatrix Imitat im VitaPrint-System für die Kultivierung der intestinalen epithelialen und endothelialen Zellen. Bindegewebszellen wachsen allerdings in der EZM, wodurch die gewählte Hydrogel-Matrix auch Eigenschaften der Interstitiellen Matrix aufweisen muss, um die Co-Kultivierung verschiedener Zelltypen im VitaPrint-System zu ermöglichen.

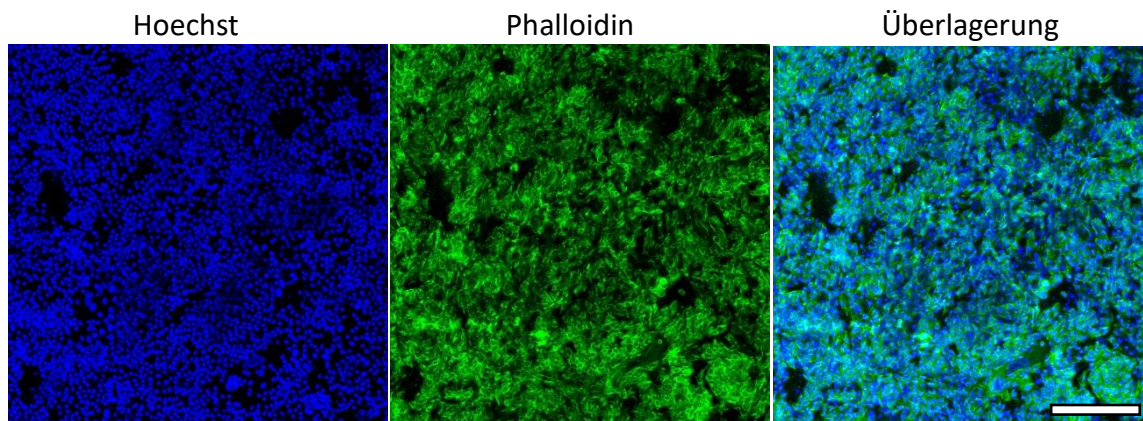


Abbildung 149: HSIEC Wachstum auf 2 mg/mL Photocoll Hydrogel nach 5 Tagen Kultivierung. Zu sehen sind die Fluoreszenzaufnahmen der mit Hoechst33342markierten Zellkerne (blau), sowie die Aktinfilamente die mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) markiert wurden und einer Überlagerung beider Aufnahmen. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.5.3 Untersuchung des Wachstums von Bindegewebszellen in verschiedenen Hydrogelen

Erst in den letzten Jahren wurde die Relevanz des Darm-Bindegewebes, das sogenannte intestinale Mesenchym, das zum großen Teil aus Fibroblasten und Muskelzellen besteht, in die Entwicklung der Gewebekomöostase und im Zusammenhang mit Darmerkrankungen deutlich.<sup>[385]</sup> Co-Kultur-Experimente von Darmepithel- und Zellen des intestinalen Mesenchyms wurden in der Literatur beschrieben und bieten Einblicke in den Mechanismus der Interaktion zwischen den beiden Zellschichten.<sup>[118,386,387]</sup> Im Jahr 2020 zeigte eine Studie, dass subepitheliale Myofibroblasten im Darm eine starke pro-angiogene Wirkung hatten und die Organisation von Endothelzellen in zottenartige Strukturen ermöglichten. Die Co-Kultur der perfundierten Kapillarstrukturen mit Darmepithelzellen in einem *Intestine-on-a-Chip*-System führte hierbei zur Rekonstruktion des systemischen Kreislaufs und eines luminalen Kompartiments, in dem ein polarisiertes Epithel gebildet werden konnte.<sup>[118,388]</sup> Jedoch gibt es momentan keine *Organ-on-a-Chip*-Modelle die sowohl Epithel, Endothel als auch die Zellen des intestinalen Mesenchyms in der intestinalen Lamina propria gleichzeitig nachahmen.<sup>[118]</sup> Da all diese Zellkompartimente im VitaPrint abgebildet werden sollen, galt es ebenfalls das Wachstum von primären humanen intestinalen Fibroblasten (HIF) und primäre humanen intestinalen Muskelzellen (HISMC) in verschiedenen Hydrogelen zu charakterisieren.

### 3.3.5.4 Viabilität von Zellen des intestinalen Mesenchyms in verschiedenen Hydrogelen

Die Evaluation des Wachstums von HIF und HISMC wurde anhand ihrer Viabilität im Hydrogel bestimmt, welche über eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI erfolgte. Die Auswertung fand zum einen über fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen statt, die mit einem auf Python basierenden Skript (Kapitel 5.2.17) ausgewertet (Abbildung 150) wurden, sowie quantitativ über die kolorimetrische Lumineszenzmessung der metabolischen Aktivität der Zellen im Hydrogel mithilfe des CellTiter-Glo® 3D Zell Viabilitäts-Assay (Abbildung 151). Der CellTiter-Glo® Assay basiert hierbei auf der Umsetzung von Luciferin zum lumineszierenden Oxyluciferin über die ATP abhängige Ultra-Glo® Luciferase. Die Lumineszenzintensität ist somit abhängig von der ATP-Konzentration der Zellen, die mit zunehmender viabler Zellzahl steigt.<sup>[389]</sup> Für diesen Versuch wurden zunächst 200 µL Hydrogel mit je 10<sup>5</sup> HIF oder HISMC Zellen gemischt und in ein Well einer 48-Well-Platte gegeben. Die Polymerisation erfolgte je nach Hydrogel thermisch (37 °C, 30 min) oder photochemisch (320 – 500 nm, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 30 sec). Im Anschluss der Polymerisation wurden die Hydrogele mit 100 µL Medium überschichtet und die Zellen für 21 Tage kultiviert. Die anschließende Analyse der Zellviabilität zeigte, dass intestinale Fibroblasten und Muskelzellen vor allem eine weichere Matrix bevorzugen. Hier wurde deutlich, dass Gelatine-basierte Hydrogele unter 5 % Konzentration am besten zur Bindung der Zellen geführt hatte. Auch in diesem Versuch konnte mit den natürlichen Hydrogelen eine deutlich bessere Viabilität der Zellen erhalten werden. Das Fibrinogen zeigte mit einer bis zu 8-fach stärkeren Lumineszenz im CellTiter-Glo® die die höchste Viabilität für die Zellen (Abbildung 151), was durch vorherige Studien bereits vorhersehbar war.<sup>[388]</sup> Jedoch zeigten auch hier die natürlichen Hydrogele eine instabilere Matrix, die sich bereits nach 2 Tag aufzulösen begann. Zudem führen Kollagen Hydrogele und auch Photocol Hydrogele durch die sogenannte Fibroblasten-Kontraktion<sup>[229,390,391]</sup> zu einer Verkleinerung und Verdichtung des Hydrogels, was sie für das *Organ-on-a-Chip*-System ungeeignet macht. Die Mixhydrogele hingegen zeigten eine Formstabilität, während jedoch auch hier die Viabilität der Zellen abnahm. Grund hierfür ist wohl die höhere Konzentration der Hydrogele, wodurch ihre Steifigkeit erhöht wird was, wie bereits von A. Rowlands *et al.* nachgewiesen, nicht für jeden Zelltyp von Vorteil ist.<sup>[370]</sup> Die semisynthetischen Hydrogele GelMA und GelNB + GelS zeigten hohe Viabilitätswerte. Auch hier konnte eine Abnahme der Viabilität der Zelle mit zunehmender Steifigkeit, über die Konzentration oder den DoF beobachtet werden. Da sich GelMA Hydrogel mit niedriger Konzentration oder niedrigem DoF

(Low) bereits nach einem Tag wieder auflösten, erwies sich das GelNB + GelS Hydrogel als deutlich bessere Option, da dieses auch über längere Zeit mit niedrigerer Konzentration oder DoF formstabil blieb. Die Zellen zeigten auch allgemein eine bessere Viabilität in GelNB + GelS Hydrogelen. Möglich wäre hier ein stärkerer Einfluss von zellschädigenden Radikalen, die vermehrt bei der Polymerisation von GelMA benötigt werden, denn hier wird für die Polymerisation des Hydrogels rund 10 % mehr Photoinitiator benötigt. Der schädliche Einfluss der Radikale wurde durch eine Viabilitätstest einer 2D-Zellkultur über den MTT-Assay festgestellt, die Ergebnisse sind dem Anhang (Kapitel 8.2, Abbildung 182) zu entnehmen. Somit zeigte sich das Hydrogel 3,5 % GelNB + GelS *Med* als stabile Matrix mit den höchsten Viabilitätswerten der beiden Zelllinien HIF und HISMC im Verlauf der 21 Tage Kultivierung (Abbildung 150, Abbildung 151) und besaß somit die besten Voraussetzungen als Matrix für das VitaPrint Systems zur Kultivierung von Zellen des intestinalen Mesenchyms. Die dazugehörigen mikroskopischen Aufnahmen sind im Anhang dargestellt (Kapitel 8.3).

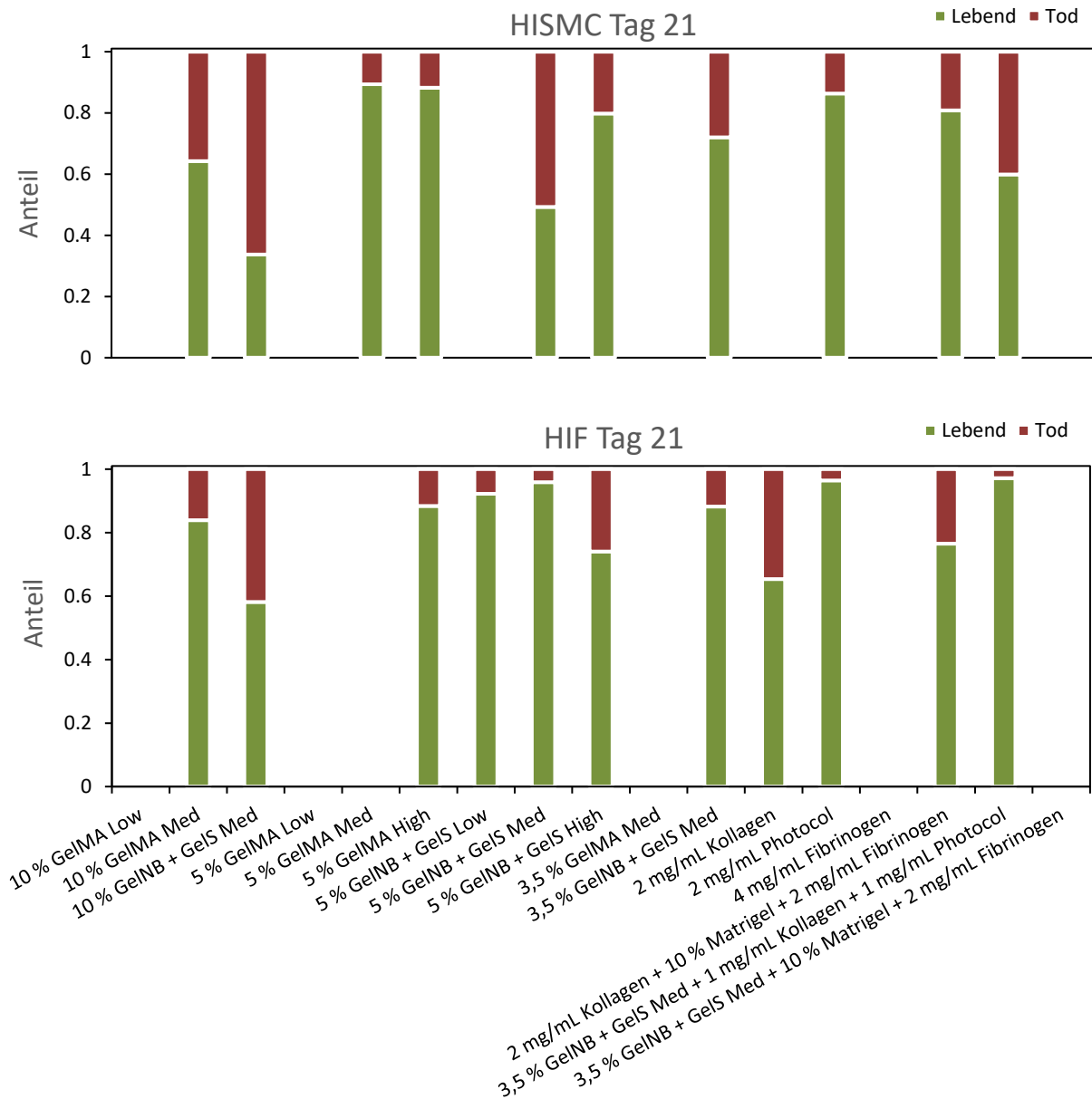


Abbildung 150: Viabilität von HISM oder HIF-Zellen in verschiedenen Hydrogel-Ansätzen.  $10^5$ -Zellen wurden in 200  $\mu$ L in einer 48-Well Platten für 21 Tage kultiviert. Anschließend wurde ihre Viabilität über die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid und anschließender Mikroskopie ermittelt. Die Auswertung fand mithilfe von Python über die prozentuale Ermittlung der grünen und roten Zellen statt. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an der Gesamtfläche fluoreszierender Zellen.

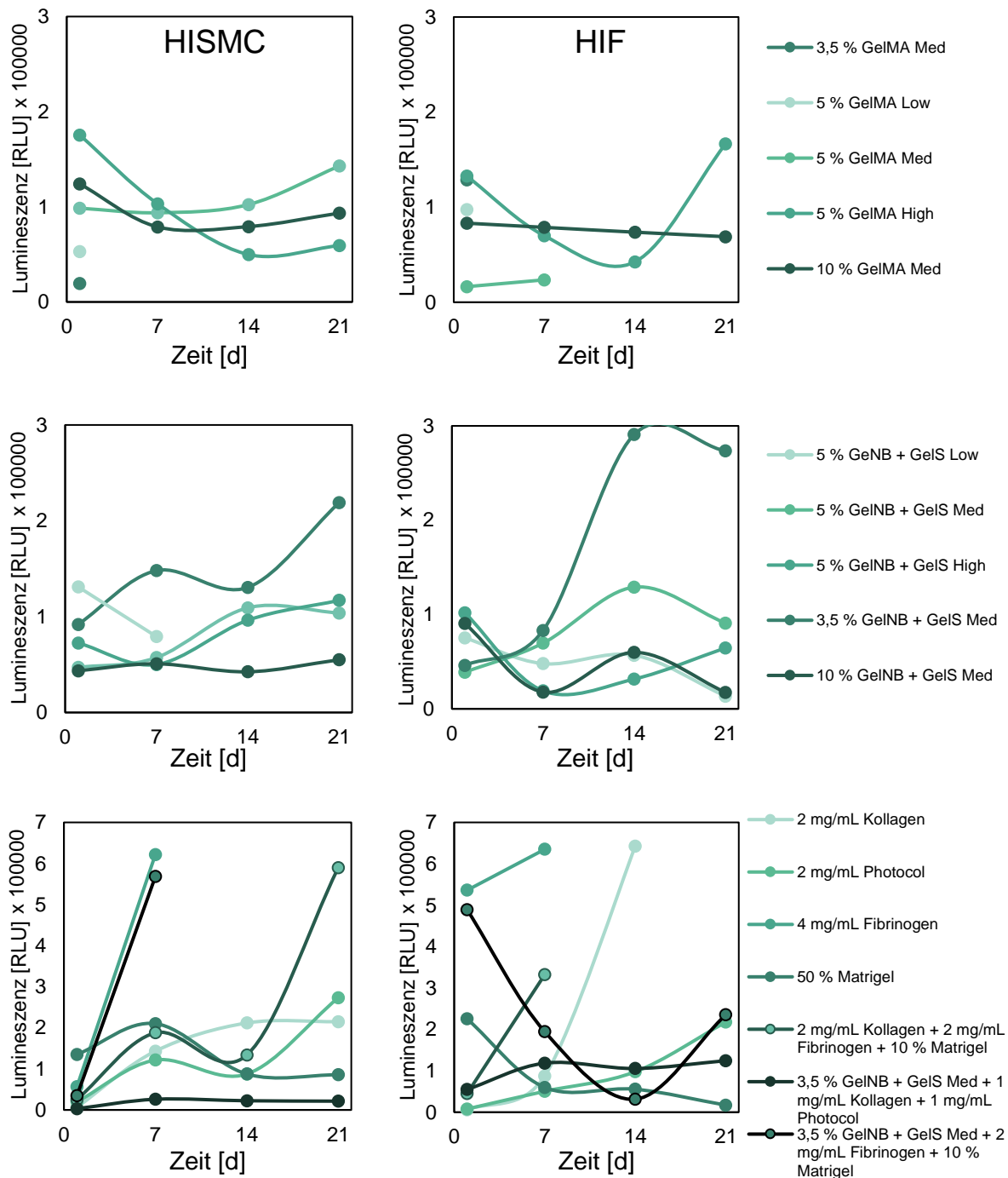


Abbildung 151: Viabilität von HISM oder HIF-Zellen in verschiedenen Hydrogel-Ansätzen.  $10^5$ -Zellen wurden in 200  $\mu$ L in einer 48-Well Platten für 21 Tage kultiviert. Anschließend wurde ihre Viabilität über die metabolische Umsetzung von CellTiter Glo<sup>®</sup> ermittelt. Für bereits aufgelöste Gele wurden im Verlauf keine Daten aufgetragen.

### 3.3.5.5 Besiedlung der VitaPrint Gewebematrix

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse sollten im Folgenden die Erfolgreiche Kultivierung von Zellen im VitaPrint-System ermöglichen. Hierfür wurden VitaPrint Chips mit einem Gemisch aus HIF und HISM ( $10^6$  Zellen/mL, Verhältnis 50/50) in drei verschiedenen Hydrogelen

erstellt. Die Anfertigung der Chips erfolgte wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.3.2) über den 3D-Biodruck des Opfermaterials Gelatine und anschließender thermischer (37°C, 30 min) und photochemischer (320 – 500 nm, 0,5 W/cm<sup>2</sup>, 3 x 30 sec) Aushärtung des Hydrogel-Zell-Mixes. Anschließend wurden die Chips für 30 min bei 37 °C inkubiert, um das flüssig gewordenen Opfermaterial Gelatine mit DPBS<sup>-/-</sup> aus den Kanälen zu spülen. Die Kanäle wurden mit Medium befüllt und 24 h statisch kultiviert. Es wurden Chips mit den Hydrogelen 5 % GelMA *Med*, 3,5 % GelNB + GelS *Med* und dem Mixgel aus 3,5 % GelNB + GelS, 2 mg/ml Kollagen I und 10 % Matrigel miteinander verglichen. Zwar waren die Mixgele mit Fibrinogen für die Kultivierung der Zellen des intestinalen Mesenchyms am vielversprechendsten, jedoch ist die Herstellung eines solchen Gels im größeren Maßstab aufgrund der unterschiedlichen Aushärtungsarten von Fibrinogen (enzymatisch über Thrombin), Kollagen (thermisch bei 37 °C und Neutralisierung) und GelNB + GelS (photochemisch) schwer zu handhaben. Zudem wurde natives Kollagen I statt Photocol verwendet, da Photocol für eine photochemische Polymerisation eine hohe Photoinitiator-Konzentration benötigt. Die Verwendung einer niedrigen Photoinitiator-Konzentration, die für die Polymerisation von GelNB + GelS Hydrogelen ausreicht, war jedoch im Vorherigen Experiment ein ausschlaggebender Faktor für die Viabilität der Bindegewebszellen, weshalb Photocol bei einer Verwendung im Mixgel ausschied. Nach 24 h Kultivierung wurden die äußeren Kanäle des Chips, die die Blutgefäße imitieren, an das Pumpensystem von IBIDI angeschlossen und für 24 h bei einer Flussrate von 100 µL/min kultiviert. Danach wurde eine Lebend-Tot-Färbung eines Chips mit Calcein-AM und PI durchgeführt, um die Verteilung und Viabilität der Zellen im Chip beurteilen zu können (Abbildung 152, Abbildung 153). Hierbei zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im ganzen Chip in allen Ebenen der Matrix (Abbildung 153). Ebenfalls kann durch die Markierung der toten Zellen mit PI (rot) in der Fluoreszenzaufnahme erkannt werden, dass die Zellen, die in der Nähe der perfundierten äußeren Kanäle wuchsen, eine höhere Viabilität aufwiesen als jene um den intestinalen, nicht perfundierten Kanal in der Mitte des Chips (Abbildung 152).

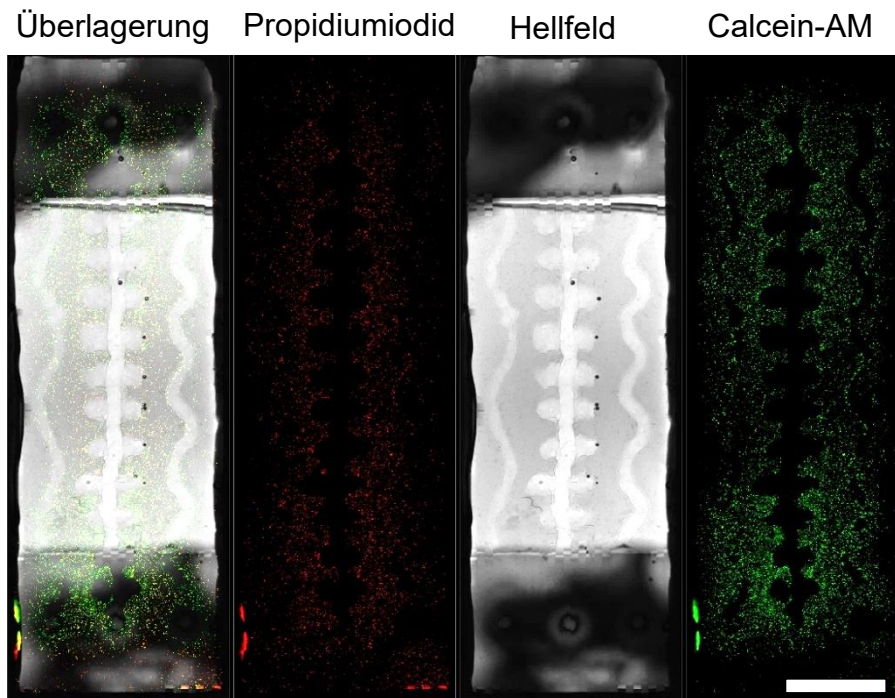


Abbildung 152: Lebend-Tot Färbung von HIF und HISMC in einer Gelmatrix aus 5 % GelMA Med im VitaPrint Chip. Abgebildet sind die Markierungen der lebenden Zellen mit Calcein-AM (grün), der toten Zellen mit Propidiumiodid (rot), das Hellfeldes und deren Überlagerung. Aufnahmen nach 48 h Kultivierung, davon 24 h fluidisch mit einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Maßstab: 10 mm.

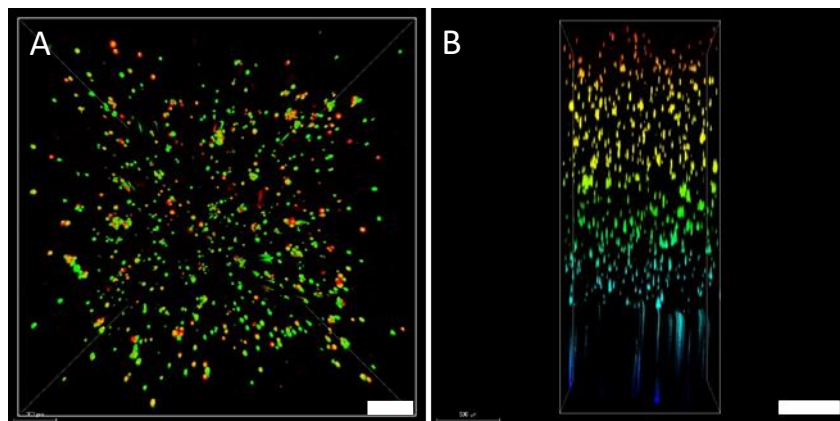
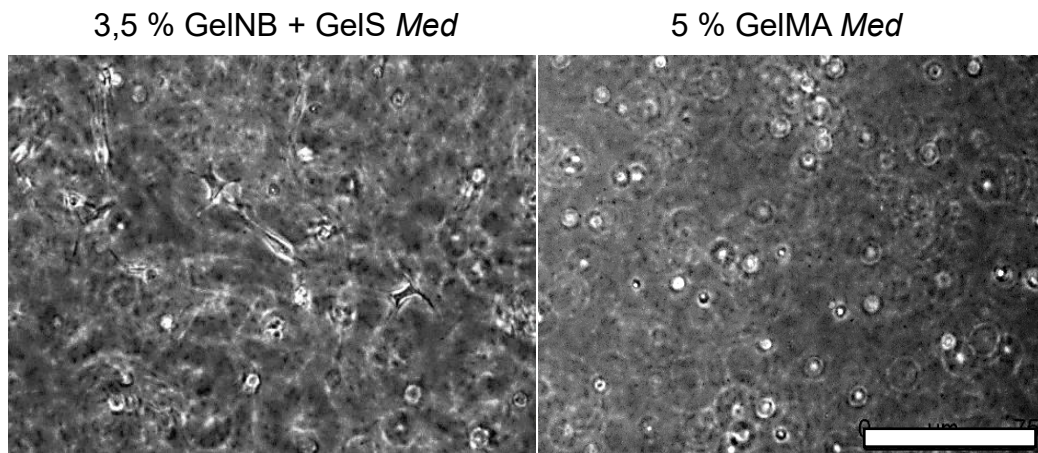


Abbildung 153: A) Lebend-Tot Färbung von HIF und HISMC in einer Gelmatrix aus 5 % GelMA Med im VitaPrint Chip. Abgebildet sind die Markierungen der lebenden Zellen mit Calcein-AM (grün), der toten Zellen mit Propidiumiodid (rot). Aufnahmen nach 48 h Kultivierung, davon 24 h fluidisch mit einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . B) Tiefenfärbung der 3D-Aufnahme des Gels. Z-stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu\text{m}$ , Höhe = 300  $\mu\text{m}$ . Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ .

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Zellen im GelNB + GelS Hydrogel bereits nach 24 h Kultivierung begannen ihre typische 3-dimensiolane spindelförmige Morphologie anzunehmen, während die Zellen im GelMA Hydrogel zu diesem Zeitpunkt noch keine

Zellfortsätze aufwiesen (Abbildung 154). Dies entspricht den Ergebnissen der zuvor dargestellten Hydrogel Biokompatibilitätsversuche (Kapitel 3.3.5.4) und zeigt die Übertragbarkeit der zuvor erlangten Erkenntnisse auf das VitaPrint-System.



*Abbildung 154: Vergleich der Kultivierung von HIF und HISMC in VitaPrint Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA Med, 3,5 % GelNB + GelS Med. Zu sehen sind die Hellfeldaufnahme des HISMC und HIF-Zellgemisches in der künstlichen Zellmatrix nach 24 h Kultivierung. Maßstab: 200 µm.*

Um die HIF-Zellen von den HISMC-Zellen unterscheiden zu können, wurden die HIF-Zellen mit CellTracker™ green und die HISMC mit CellTracker™ red vor der Mischung mit dem Hydrogel bei der Chipanfertigung für 30 min angefärbt. Die mikroskopische Betrachtung der CellTracker™ Färbung von HIF (grün) und HSIEC (rot) Zellen zeigt auch nach 48 h Kultivierung keine morphologische Veränderung der Zellen im GelMA Hydrogel, während die Zellen im GelNB + GelS Hydrogel bereits begonnen Zellnetzwerke auszubilden (Abbildung 156). Im Mixgel konnte nach 48 h Kultivierung die Bildung von Zellfortsätzen ausgemacht werden. Da das Mixhydrogel eine höhere Steifigkeit aufweist als das GelNB + GelS Hydrogel, dauert die Entwicklung von spindelförmigen Vorsätzen wohl etwas länger als im GelNB + GelS Hydrogel allein. Auch konnte beobachtet werden, dass eine Perfusion der Kanäle zu einer deutlich schnelleren Ausbildung der Zellfortsätze führt, da die Zellen so schneller und besser mit Nährstoffen und Medium versorgt werden konnten (Abbildung 155). Das GelNB + GelS Hydrogel ist somit für die Kultivierung von Zellen des intestinalen Mesenchyms im VitaPrint-System sehr gut geeignet.

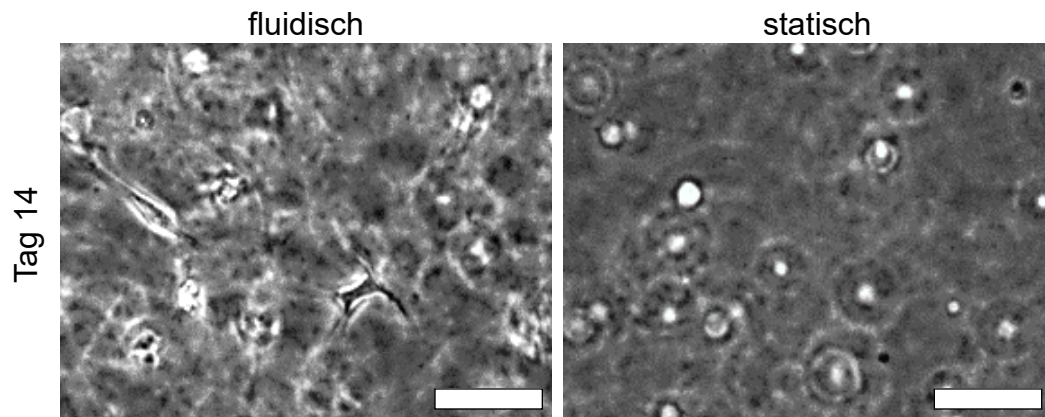


Abbildung 155: Vergleich der statischen und fluidischen Kultivierung von HIF und HISMC in VitaPrint Chips aus den Hydrogelen 3,5 % GelNB + Gels Med. Zu sehen sind die Hellfeldaufnahme des HISMC und HIF-Gemisches in der Zellmatrix nach 14 Tagen Kultivierung der Zellen. Maßstab: 100 µm.

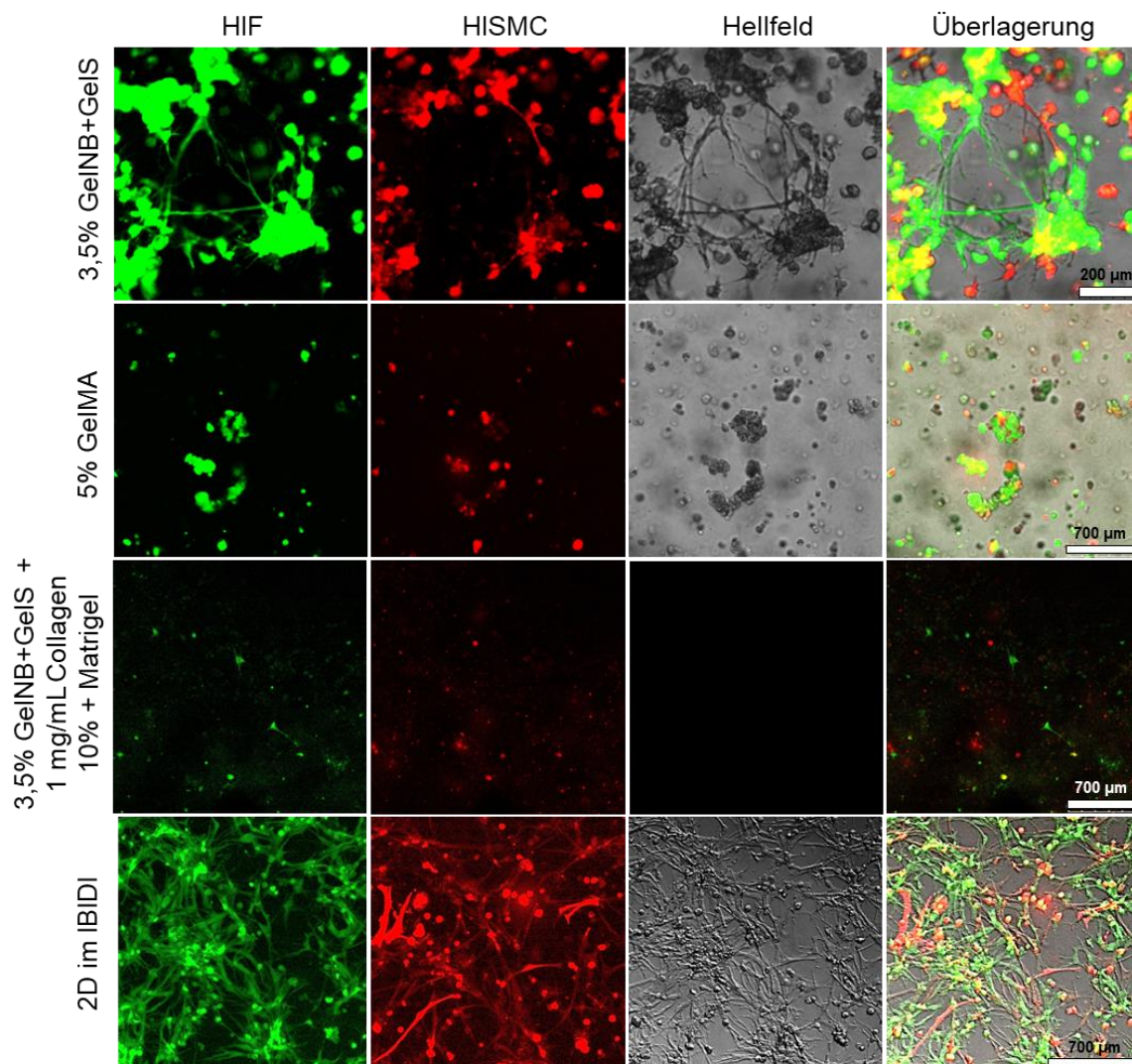


Abbildung 156: Vergleich der Kultivierung von HIF und HISMC in VitaPrint Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA Med, 3,5 % GelNB + Gels Med und dem Hydrogelmix 3,5 % GelNB+ Gels Med + 1 mg/mL Kollagen + 10 % Matrigel. Zu sehen sind die Fluoreszenzaufnahme der mit CellTracker™ red markierten HISMC (rot) und der mit CellTracker™ green markierten HIF- Zellen (grün), deren Hellfeldaufnahme und der Überlagerung nach 24 h Kultivierung der Zellen. Maßstab: 200 µm und 700 µm.

### 3.3.5.6 Besiedlung der VitaPrint Endo- und Epithelialen-Gefäße

Als nächstes galt es nun auch die Kultivierung von endothelialen und epithelialen Zellen auf dem Hydrogel im VitaPrint-System zu ermöglichen um eine anschließende Co-Kultivierung aller Zellarten zu erreichen. Hierfür sollten ebenfalls die in Kapitel 3.3.5.1 gesammelten Erkenntnisse auf das VitaPrint-System übertragen werden. Die Kultivierung von Endothel- und Epithelzellen war, wie die vorherigen Ergebnisse der intestinalen Biokompatibilität der Hydrogele zeigten (siehe Kapitel 3.3.5.1), besonders herausfordernd, so konnte bisher für die Kultivierung der endothelialen HSIMEC Zellen keine kompatible Lösung für das VitaPrint-System gefunden werden. Da auch die Kultivierung der HSIEC Zellen problematisch war, konzentriert sich diese Arbeit auf die Verbesserung der Adhäsion von HSIEC Zellen im VitaPrint-System. Für den endothelialen Kanal wurden im folgenden GFP markierte embryonale Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC-GFP) statt der HSIMEC verwendet, da ihre einfache Kultivierung auf Gelatine-basierten Hydrogelen bereits bekannt ist.<sup>[392]</sup> Für die Evaluation des Wachstums wurde in Kollaboration mit M. Sc. Sophia Kunz im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (KIT, IFG) zunächst ein Chip aus 5 % GelMA *Med* Hydrogel, wie zuvor beschrieben, hergestellt und die Kanäle mit 0,05 mg/mL Kollagenlösung für 1h beschichtet. Daraufhin wurden die Kanäle mit 200 µL (endothelialer Kanal)  $10^5$  HUVEC/mL oder 500 µL (epithelialer Kanal)  $10^5$  HSIEC/mL befüllt. Anschließend wurde der Chip während der Kultivierung für 1 h alle 15 min um 45° ihrer Längsachse gedreht um das Anwachsen der Zellen im ganzen Kanal zu ermöglichen, danach wurde der Chip für 24 h statisch kultiviert. Daraufhin wurde die Adhäsion der Zellen im intestinalen Kanal über eine Leben-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI und die Adhäsion der HUVEC-GFP Zellen über ihre GFP-Fluoreszenz mikroskopisch evaluiert (Abbildung 157, Abbildung 158, Abbildung 159). Eine gleichmäßige Adhäsion der HSIEC Zellen konnte hierbei allerdings nicht beobachtet werden (Abbildung 157). Stattdessen bildeten die Zellen Cluster-artige Ansammlungen in den Vertiefungen der Kanalstruktur und zeigten im Inneren der Cluster auch eine geringe Viabilität (Abbildung 157). Im Vergleich dazu konnten die HUVEC Zellen wie zu erwarten am ganzen Kanal gleichmäßig anwachsen und so ein endotheliales Layer ausbilden (Abbildung 158, Abbildung 159).

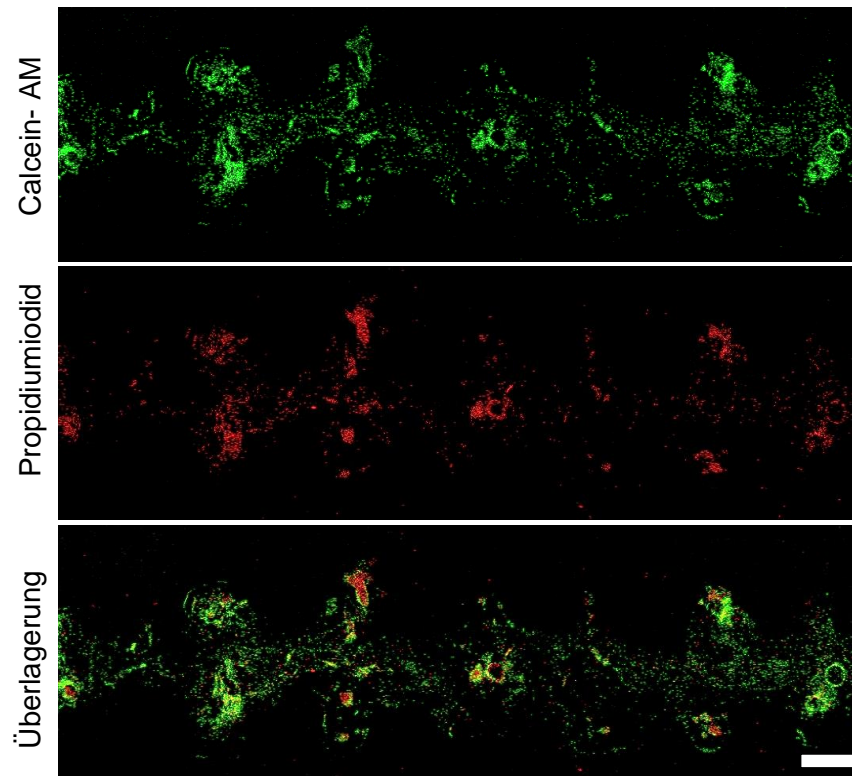


Abbildung 157: Lebend-Tot Färbung von HSIEC Zellen im epithelialen Kanal des VitaPrint Chips. Abgebildet sind die Markierungen der lebenden Zellen mit Calcein-AM (grün), der toten Zellen mit Propidiumiodid (rot) und deren Überlagerung. Maßstab: 2 mm.

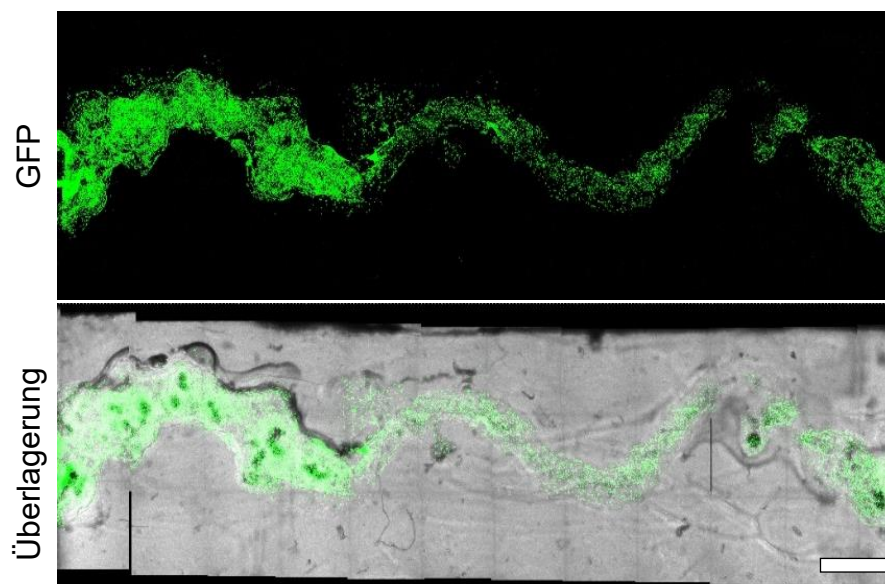


Abbildung 158: Kultivierung von HUVEC-GFP Zellen im endothelialen Kanal des VitaPrint Chips. Zu sehen ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GFP (grün) und der Überlagerung mit dem Hellfeld. Maßstab: 2 mm.

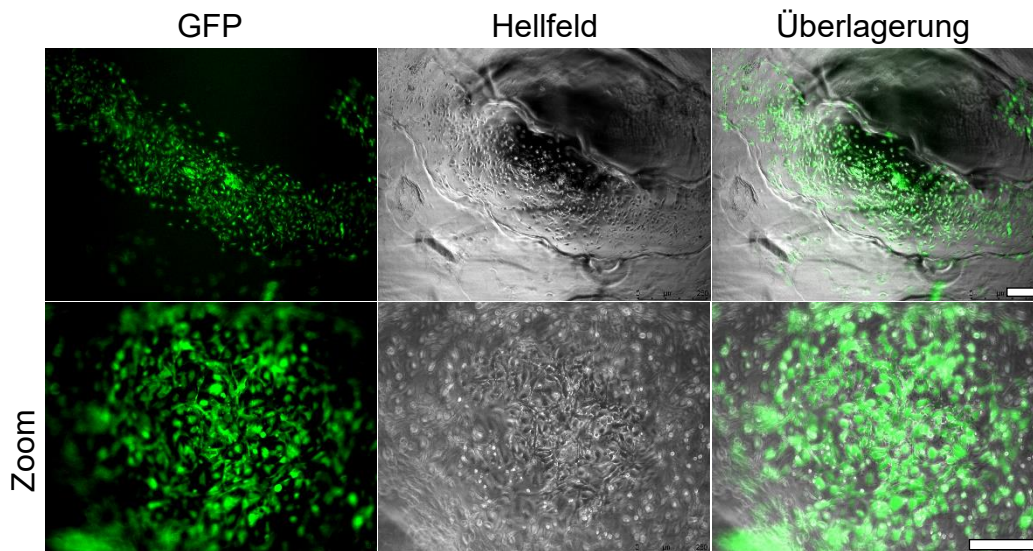


Abbildung 159: Kultivierung von HUVEC-GFP Zellen im endothelialen Kanal des VitaPrint Chips. Zu sehen ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GFP (grün), des Hellfeldes und der Überlagerung. Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ , Zoom: 700  $\mu\text{m}$ .

Da die Beschichtung mit Kollagen nicht zielführend war, wurde eine Beschichtung mit Photocol betrachtet. Ebenfalls soll das Wachstum von Zellen des intestinalen Mesenchyms in der Matrix die Adhäsion der epithelialen Zellen im Kanal fördern, aus diesem Grund wurden als nächstes Hydrogele mit HIF und HISMC wie in Kapitel 3.3.5.4 beschrieben angefertigt. Hierfür wurden ebenfalls Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA und 3,5 % GelNB + GelS zum Vergleich hergestellt und die Kanäle mit 0,05 mg/mL Photocollösung mit 0,3 % LAP für 1h inkubiert und dann für 30 sec mit 0,5 W/cm<sup>2</sup> belichtet. Danach wurden die intestinalen Kanäle wie zuvor beschrieben mit 500  $\mu\text{L}$   $10 \times 10^4$  HSIEC/mL besiedelt. Bei der mikroskopischen Auswertung der Chips nach 24 h Kultivierung konnte nun eine leichte Adhäsion der HSIEC Zellen auf der Hydrogeloberfläche beobachtet werden. Die Chips wurden danach weitere 14 Tage fluidisch bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  durch die endothelialen Kanäle kultiviert. In dieser Zeit wuchsen die Zellen in den beschichteten GelMA Hydrogelen deutlich besser, und deuten auf eine effiziente Beschichtung mit Photocol hin (Abbildung 160). Das Photocol konnte sich hier mit dem GelMA vernetzen, mit dem GelNB + GelS war dies auf Grund der funktionellen Gruppen nicht möglich. Bei den GelMA Hydrogelen war jedoch nach 14 Tagen Kultivierung kein konfluentes Zellwachstum zu erkennen, somit reichte das Wachsen der Zellen auf dem Hydrogel zu Beginn der Kultivierung nicht aus, um die Fläche konfluent auszukleiden. Zudem konnte festgestellt werden, dass die HIF und HISMC-Zellen im Hydrogel

GelMA keine Vorsätze ausbildeten, im Hydrogel GelNB + GelS jedoch bereits nach 24 h Ausläufer ausgebildet wurden (Abbildung 160).

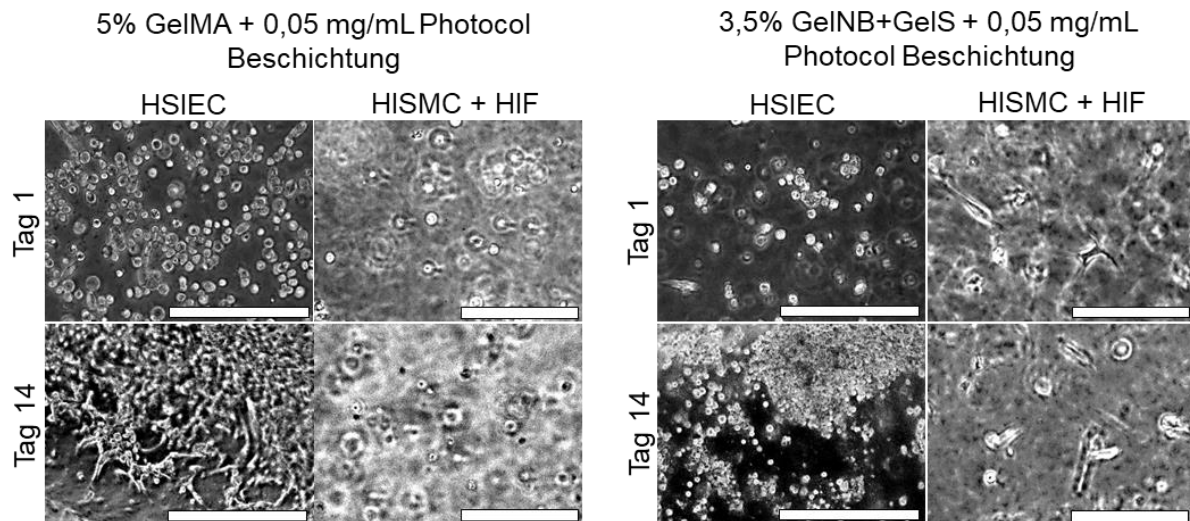


Abbildung 160: Vergleich der Kultivierung von HSIEC und HIF + HISMC in VitaPrint Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA und 3,5 % GelNB + GelS jeweils mit 0,05 mg/mL Photocoll Beschichtung für 1 h nach der Polymerisation. Zu sehen sind die Hellfeldaufnahmen der HSIEC Zellen im Kanal und des HISMC und HIF-Gemisches in der Zellmatrix nach 1 und 14 Tagen Kultivierung der Zellen. Maßstab: 200  $\mu$ m.

Da eine Beschichtung mit Kollagen und Photocoll weiterhin nicht ausreichte, um ein flächendeckendes Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden als nächstes Mixgele im VitaPrint-System betrachtet. Hierfür wurden ebenfalls Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA Med, 3,5 % GelNB + GelS Med und dem Hydrogelmix aus 3,5 % GelNB + GelS Med, 2 mg/ml Kollagen und 10 % Matrigel sowie dem Hydrogelmix aus 3,5 % GelNB + GelS Med, 1 mg/mL Kollagen und 1 mg/mL Photocoll hergestellt und miteinander verglichen. Nach der VitaPrint-Fertigung wurden die Kanäle mit den intestinalen Epithelzellen HSIEC wie zuvor beschrieben besiedelt. Anschließend wurde die Adhäsion mikroskopisch evaluiert (Abbildung 161, Abbildung 162). Im Vergleich zur kaum vorhandenen Adhäsion an Gelatine-basierten Hydrogelen zeigten die Mix-Hydrogele eine deutlich höhere und gleichmäßigere Adhäsion der Zellen im Kanal. Bereits nach 5 Tagen fluidischer Kultivierung konnte ein konfluentes Wachstum der HSIEC Zellen auf den Mixgelen beobachtet werden, was durch die längliche Morphologie der Zellen zu erkennen ist (Abbildung 161, Abbildung 162). Während sich die nach einem Tag angewachsen Zellen auf den GelMA und GelNB + GelS Hydrogelen nach 5 Tagen zum Teil wieder ablösten, was an der runden Morphologie der Zelle zu erkennen ist (Abbildung 161). Die HIF und HISMC in der Matrix, zeigten zudem spindelförmige

Ausbildungen in allen Gelen, die durch den fluidischen Betrieb bereits nach 1 Tag Kultivierung im Chip erreicht werden konnte.

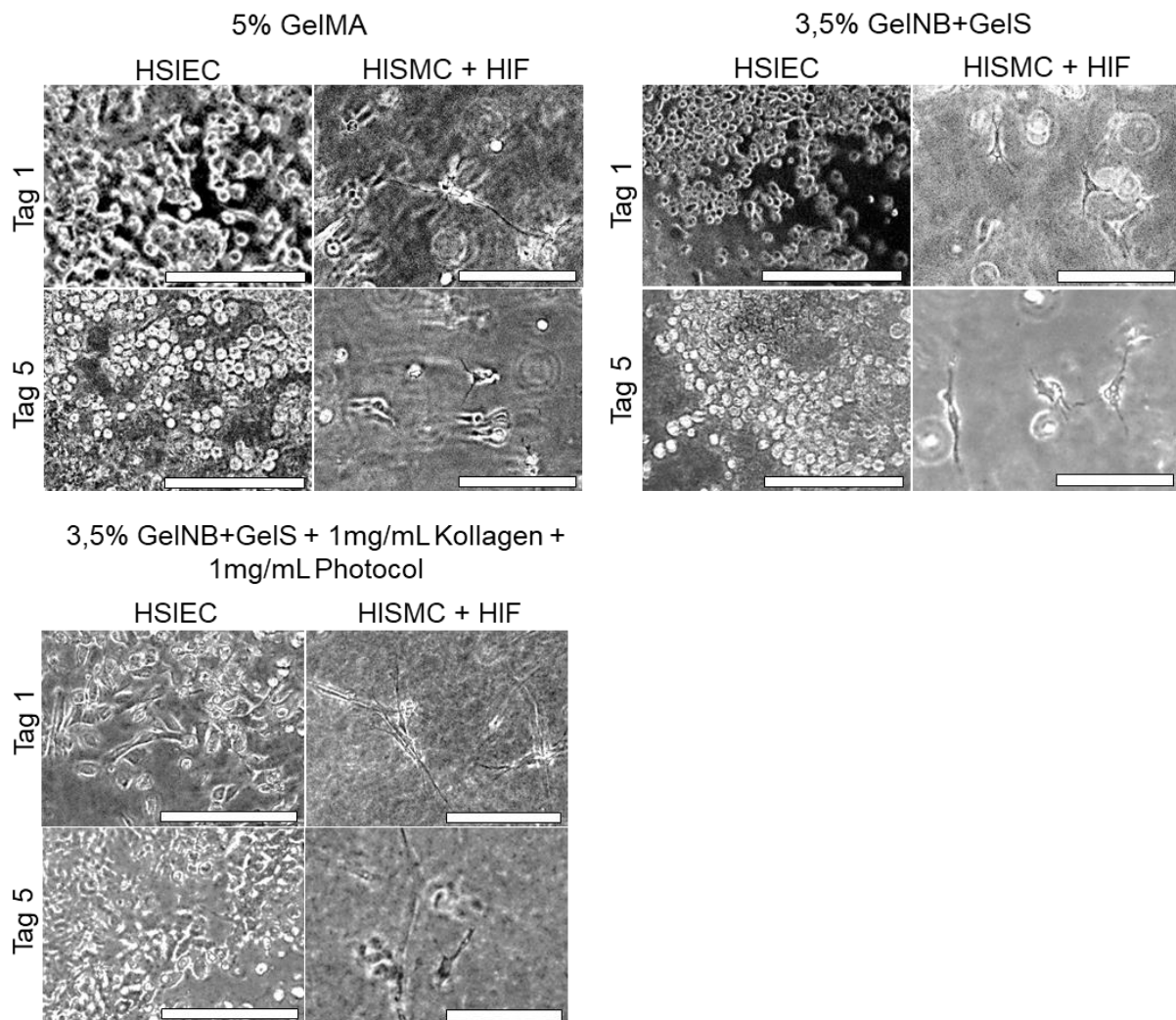


Abbildung 161: Vergleich der Kultivierung von HSIEC und HIF, HISMC in VitaPrint Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA, 3,5 % GelNB + GelS und dem Hydrogelmix 3,5 % GelNB+ GelS + 1 mg/mL Kollagen + 1 mg/mL Photocol. Zu sehen sind die Hellfeldaufnahme der HSIEC Zellen im Kanal und des HISMC, HIF-Gemisches in der Zellmatrix nach 1 und 5 Tagen Kultivierung der Zellen. Maßstab: 200 µm.

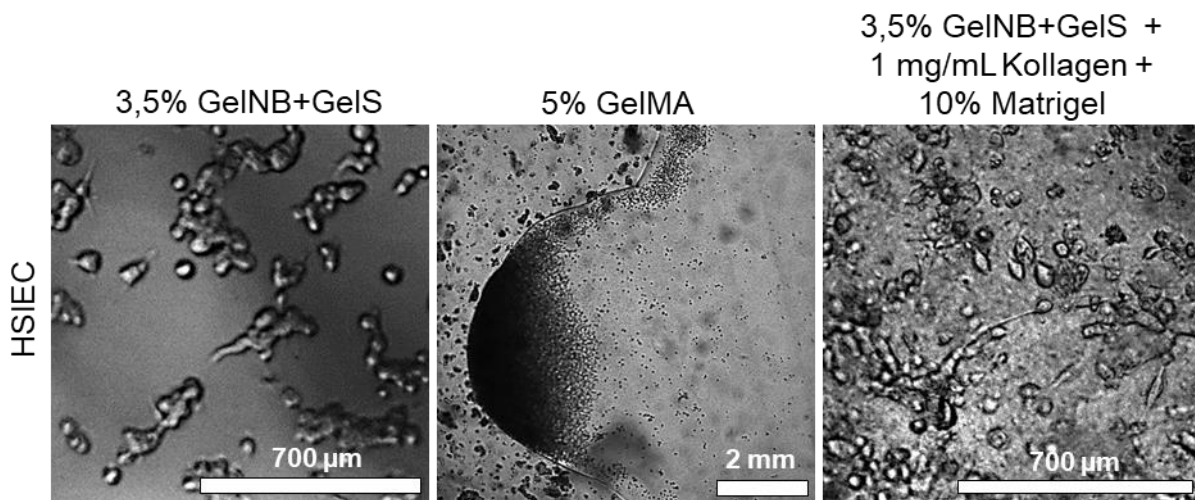
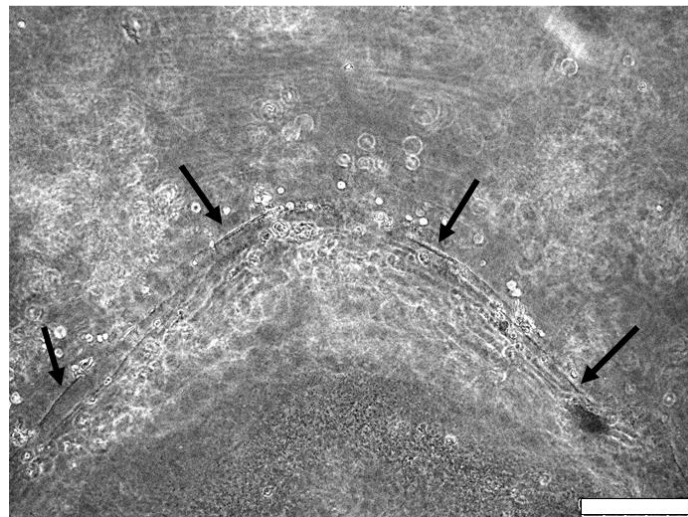


Abbildung 162: Vergleich der Kultivierung HSIEC in VitaPrint Chips aus den Hydrogelen 5 % GelMA, 3,5 % GelNB + GelS und dem Hydrogelmix 3,5 % GelNB+ GelS + 10 mg/mL Kollagen + 10 % Matrigel. Zu sehen sind die Hellfeldaufnahme der HSIEC Zellen im Kanal nach 5 Tagen Kultivierung der Zellen. Maßstab: 700 µm, und 2 mm.

Nach einer weiteren Kultivierung der Epithelzelle von 14 Tagen auf den Hydrogele 5 % GelMA, 3,5 % GelNB + GelS und des Mixhydrogels 3,5 % GelNB + GelS, 1 mg/mL Kollagen und 1 mg/mL Photocol konnten zudem morphologische Veränderungen der mesenchymalen Zellen im Chip beobachtet werden. Zum einen zeigten die glatten Muskelzellen HISMC im Chip eine Ausrichtung an den künstlichen Darmfalten des intestinalen Kanals aus Mixhydrogel (Abbildung 163). Die korrekte Ausrichtung der glatten Muskelzellen als sogenannte Muskularis Mukosa ist für ihre physiologische Funktion bedeutend. Verschiedene Studien zeigten bisher, dass mechanische Reize die Ausrichtung der Muskelzellen beeinflussen können.<sup>[392,393]</sup> Aufgrund des Kollagengehalts im Hydrogel könnte hier die Fibroblastenkontraktion die Hydrogelmatrix unter Spannung gesetzt haben, wodurch die Muskelzellen stimuliert wurden und sich ausrichteten und eine künstliche Muscularis Mukosa ausbildeten.

3,5% GelNB+GelS + 1mg/mL Kollagen + 1mg/mL Photocol



*Abbildung 163: Hellfeldaufnahme der spontanen Ausrichtung von HSMC am intestinalen Kanalrand des VitaPrint Chips nach 14 Tagen fluidischer Kultivierung bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . HSMC wurden mit HIF im Mixgel 3,5 % GelNB+ GelS + 1 mg/mL Kollagen + 1 mg/mL Photocol in Co-Kultur mit HSIEC Zellen im intestinalen Kanal kultiviert. Maßstab: 200 $\mu\text{m}$ .*

Solch eine Ausrichtung der Muskelzellen HSMC konnte in den kollagenfreien Hydrogelen nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich stattdessen eine Morphogenese der HSIEC Zellen in zottenartige Strukturen (Abbildung 164). Die Ausbildung von Darmstrukturen unterschied sich zwischen dem GelNB + GelS Hydrogel und dem GelMA Hydrogel. Die Zotten, die sich im GelNB + GelS bildeten, ähnelten denen eines Dünndarms. Diese zeichnen sich vor allem durch ihre Länge aus wohingegen im Dickdarm keine Zotten vorhanden sind, sondern lediglich intestinale Krypten, die kleine Darmfurchen verursachen.<sup>[394]</sup> Die sich ausbreitenden Zotten und Krypten wuchsen jedoch in die Matrix hinein. Aufgrund der Kultivierung der Epithelzellen im intestinalen Kanal, wurde hier während der Wachstumsphase noch regelmäßig Medium hinzugegeben. Dies führte vermutlich zu einer Polarisierung der Zellen in die entgegengesetzte Richtung, da dadurch weniger Nährstoffe und Sauerstoff durch die Matrixseite zu den Zellen transportiert wurde.<sup>[395]</sup> Auch wenn bisher noch keine funktionierende Darmbarriere im VitaPrint Chip etabliert werden konnte, zeigt die Morphogenese der Zellen bereits das große Potential des VitaPrint-Systems. Da das größte Problem allerdings weiterhin bei der konfluenten Kultivierung der primären Dünndarm Epithelzellen HSIEC lag, sollte nun überprüft werden, ob eine andere Zellquelle die Lösung für ein konfluente Kultivierung des künstlichen Epithels im VitaPrint-System bringt. Bisherige Ergebnisse dieser Arbeit zeigten schließlich, dass Zelltypen wie HUVEC-GFP oder Caco-2

durchaus auf den Bisher untersuchten Hydrogelen konfluent kultiviert werden konnten. Eine weitere relevante Quelle für intestinale Darmepithelzellen könnte unter anderem auch durch eine Differenzierung von Stammzellen erhalten werden. Dies galt es im Folgenden zu Untersuchen.

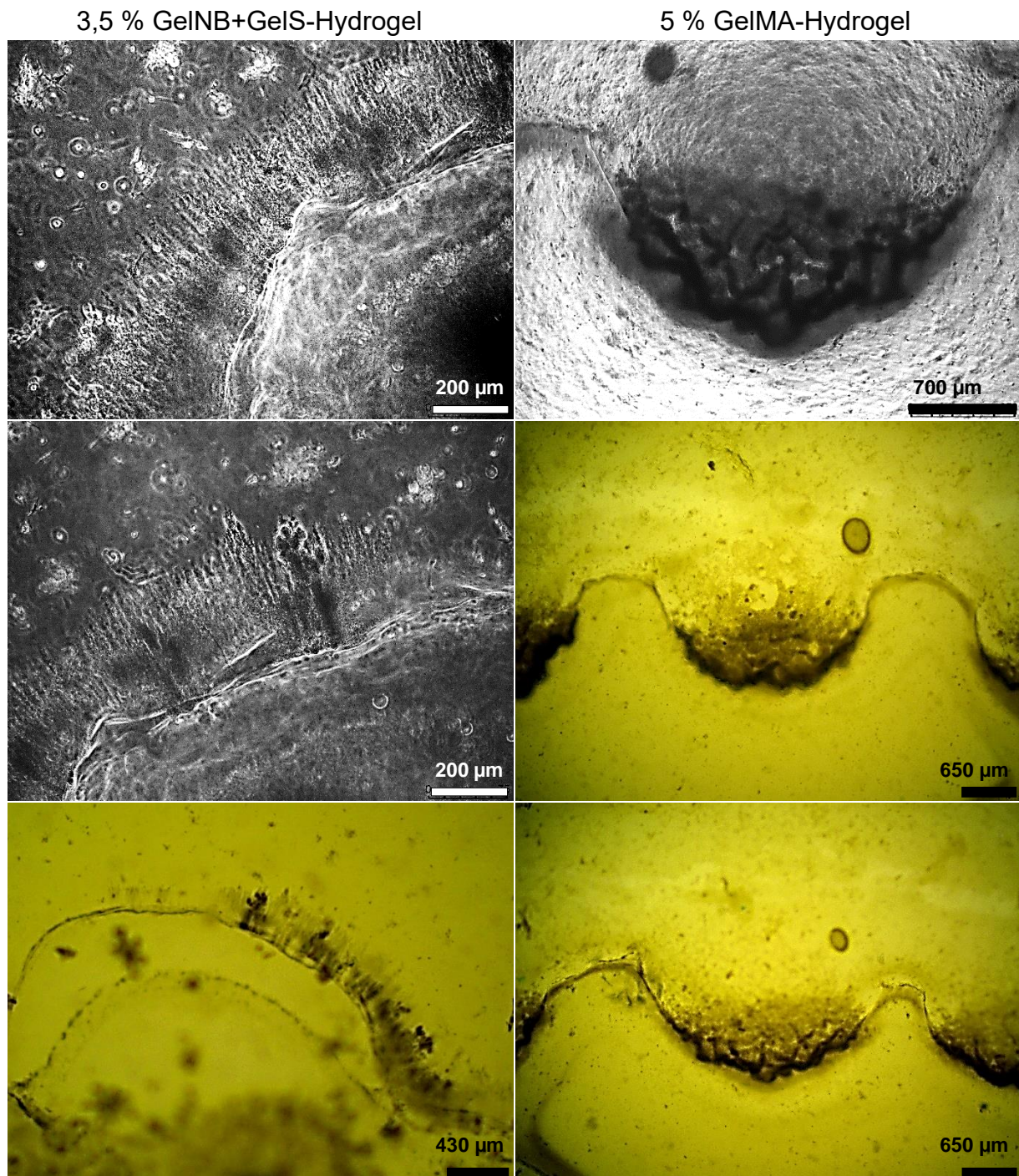


Abbildung 164: Ausbildung Zottenähnlicher Struktur der HSIEC Zellen in den intestinalen Kanälen im VitaPrint Chip nach 14 Tagen Kultivierung. Zu sehen sind die Hellfeldaufnahme der HSIEC Zellen in den epithelialen Kanälen aus den Hydrogelen 5 % GelMA, 3,5 % GelNB + GelS.

### 3.4 Stammzellendifferenzierung

Physiologisch relevante Quellen für resorbierbare Darmepithelzellen sind für Studien zum Wirkstofftransport beim Menschen von entscheidender Bedeutung. Aus menschlichen Adenokarzinomen abgeleitete Darmzelllinien wie Caco-2 bieten den Vorteil, dass sie leicht zu kultivieren sind, aber sie bilden den Phänotyp des Darms *in vivo* nicht vollständig ab. Kommerziell erwerbliche primäre humane intestinale Zellen (hInEpCs), besitzen hingegen weitere wichtige *in vivo* anatomische und biochemische Merkmale, sind jedoch deutlich schwerer zu kultivieren und haben nur eine begrenzte Lebensdauer.<sup>[396]</sup> Darüber hinaus ist ein großer Nachteil von kommerziell erworbenen primären Zellen, dass die Zellen von menschlichen Spendern entnommen werden müssen und ihre Eigenschaften deshalb auch nicht immer vergleichbar sind.<sup>[107]</sup> Zusätzliche Quellen für erneuerbare, physiologisch relevante menschliche Darmzellen sind dringend benötigtes Werkzeug für die Wirkstoffforschung und Untersuchungen der Darmphysiologie.<sup>[107]</sup> Um solche Darmmodelle einem physiologischen Darm näher zu bringen, zeigte sich der Einsatz von humanen Stammzellen als vielversprechend, da diese eine größere Zellkomplexität mit sich bringen und somit die Vielfältigkeit des Darmepithels durch Ausbildung sogenannter organoider Zotten reproduzieren können.<sup>[396-398]</sup> In dieser Arbeit wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) zu intestinalen Organoiden differenziert, die anschließend im VitaPrint System kultiviert werden können. Die differenzierten Darmzellen wurden anhand der Expression von darmspezifischen Markern durch immunzytochemische und mRNA-Expressionsanalysen bewertet.

#### 3.4.1 Nachweis der Pluripotenz der verwendeten Stammzellen

Die für diese Arbeit verwendete Stammzelllinie WTC11 NGN2 stammt von gesunden menschlichen Spendern<sup>[399]</sup> und wurden über die episomale Reprogrammierungsmethode generiert.<sup>[400]</sup> Ebenfalls kann bei diesen Zellen durch Ngn2-Genomeditierung der Transkriptionsfaktor Neurogenin-2 (NGN2) exprimiert werden. Eine Überexpression von NGN2 kann so durch die Zugabe von Doxycyclin ausgelöst werden, wodurch eine neuronale Differenzierung gefördert wird.<sup>[401-403]</sup> Da es für eine erfolgreiche Differenzierung wichtig ist, dass die Stammzellen noch ihre Pluripotenz aufweisen, galt es zunächst zu überprüfen, ob dies bei den verwendeten Zellen noch gegeben war. Hierfür eignen sich die Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog, die über Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden können. Beide

Transkriptionsfaktoren regulieren die Erneuerung der Zellen und somit ihre Pluripotenz.<sup>[404,405]</sup> Die Immunfluoreszenzfärbung wurde, wie in Kapitel 5.2.11.5 beschrieben durchgeführt und anschließend über konfokale Fluoreszenzmikroskopie oder über Durchflusszytometrie ausgewertet. Für die Durchflusszytometrie werden die Zellen mithilfe einer Flüssigkeitsströmung durch einen Laserstrahl geleitet und die dabei entstehenden Signale gemessen. So kann quantitativ die Anzahl von fluoreszenzmarkierten Zellen einer Population bestimmt werden.<sup>[406-408]</sup> Über die Fluoreszenzmikroskopie konnte dann deutlich die Fluoreszenzmarkierung von Oct4 und Nanog in den Zellkernen der Stammzellen nachgewiesen werden (Abbildung 165). Ebenso zeigte die Auswertung über Durchflusszytometrie einen Anteil von über 93 % pluripotenter Zellen in der kultivierten Kultur von WTC11 NGN2 (Abbildung 166) wodurch eine ausreichende Pluripotenz der Zellen für die folgende Differenzierung gegeben war.

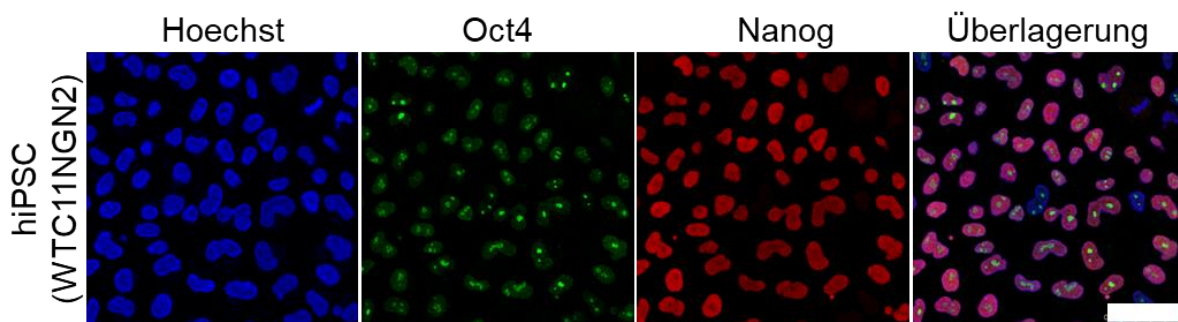


Abbildung 165: Nachweis der hiPSC Pluripotenz. Immunfluoreszenzfärbung der hiPSC. WTC11-NGN2 wurden in Matrigel beschichtete 6-Well Platen kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen über Immunfluoreszenzfärbung mit Nanog und Oct4 markiert und anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 markiert. Abgebildet sind die mit Hoechst33342 markierten Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410-510 \text{ nm}$ ): die Immunfluoreszenzfärbung mit Oct4 (grün:  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 494-562 \text{ nm}$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit Nanog (rot:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660-798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

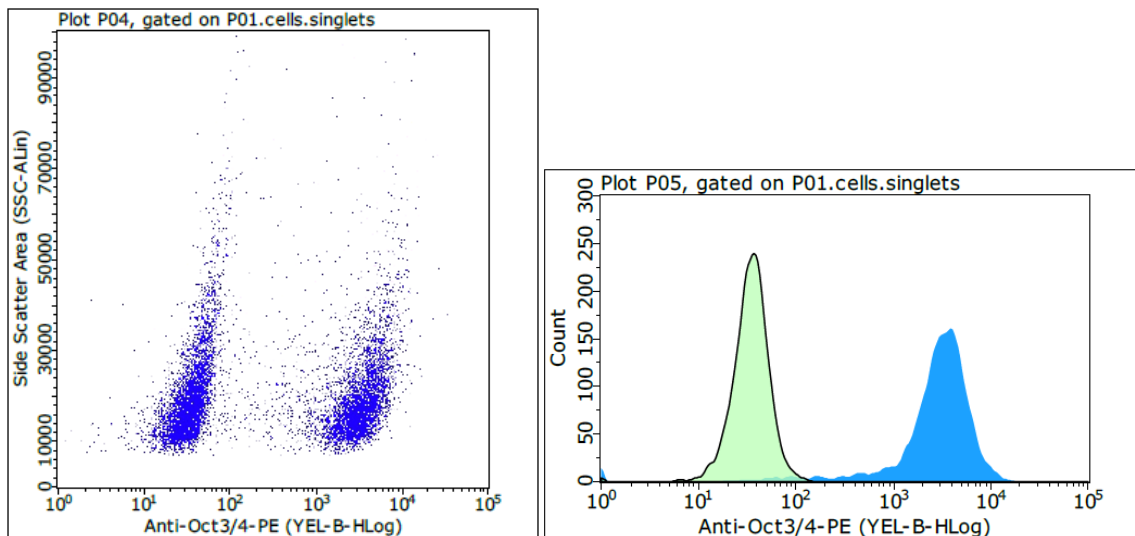


Abbildung 166: Nachweis der Pluripotenz von hiPSC über die Durchflusszytometrie. WTC11-NGN2 wurden in Matrigel beschichtete 6-Well Platen kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen abgelöst und über Immunfluoreszenzfärbung mit Oct3/4-PE markiert. Die Auswertung fand über das Guava EasyCyte Flow Cytometer statt. Abgebildet sind die detektierten Zellpopulationen der unmarkierten und mit Fluorophor markierten (höhere Anti-Oct3/4-PE Fluoreszenzintensität) Stammzellen.

### 3.4.2 Differenzierung von hiPSC zu intestinalen Epithelzellen

Nachdem die Pluripotenz der Stammzellen nachgewiesen werden konnte, wurde ein bereits etabliertes drei Stufen Differenzierungsprotokoll<sup>[409]</sup> verwendet, um die Differenzierung von hiPSC in Darmgewebe zu lenken. Hierfür wurden die Stammzellen in zeitlicher Abfolge mit Wachstumsfaktoren behandelt, um die embryonale Darmentwicklung nachzuahmen. Diese umfasst die induzierte Bildung des definierten Endoderms (DE) über den Wachstumsfaktor Aktivin A und die anschließende Induzierung des Hindgut-Endoderms (HD) und dessen Spezifikation durch Morphogenese über Wnt und den Fibroblastenwachstumsfaktoren FGF4 (Abbildung 167).

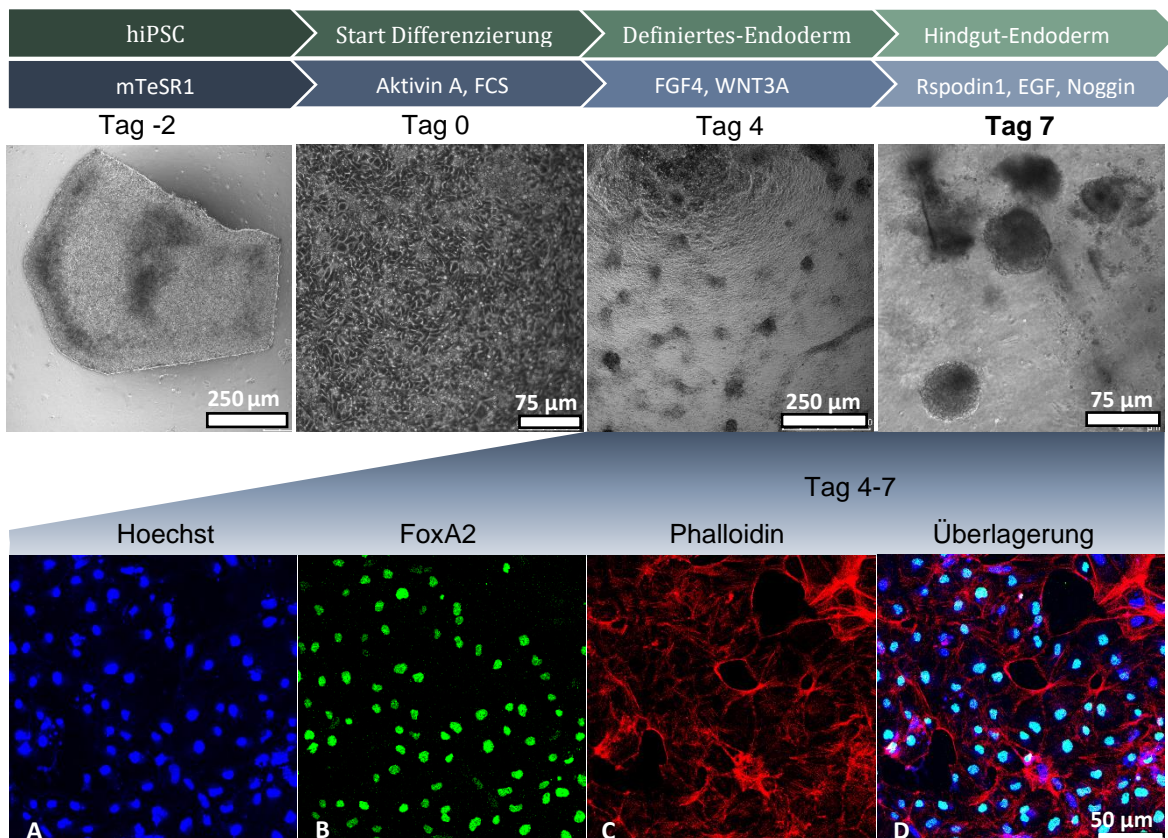


Abbildung 167: Differenzierungsverlauf von hiPSC zu Epithelialen Darmzellen. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Zu sehen ist der Differenzierungsverlauf im Hellfeld und der Nachweis der Differenzierung zum Endoderm mittels Immunfluoreszenzfärbung des Expressionsmarkers FoxA2. Ebenfalls wurden die Zellkerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (A:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410\text{-}510 \text{ nm}$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit FoxA2 (B:  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 494\text{-}562$ ), die Aktinfilamente (C:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660\text{-}798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung (D).

Im Anschluss kommt es zum intestinalen Wachstum, Morphogenese und Zytodifferenzierung in Matrigel, um das dreidimensionale Wachstum und die Ausbildung polarisierter Organoiden zu fördern.<sup>[409,410]</sup> Das differenzierte DE exprimiert hierbei FoxA2 und das differenzierte HD exprimiert Cdx2.<sup>[409]</sup> Diese Expressionsmarker können dann dazu verwendet werden, den Erfolg der Differenzierung zu untersuchen.<sup>[409]</sup> So wurde eine immunhistochemische Färbung mit FoxA2 wie in Kapitel 5.2.11.5 beschrieben an Tag 7 durchgeführt (Abbildung 167) und eine CDX2 immunhistochemische Färbung der fertig differenzierten Darmorganoide an Tag 12 der Differenzierung, bzw. Tag 5 der Kultivierung im Matrigel (Abbildung 168). Um die Morphologie der Zellen darzustellen, wurden die Aktinfilamente der Zellen über Phalloidin und die Zellkerne über Hoechst33342 fluoreszent markiert. Die Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Zellen über Konfokalmikroskopie zeigen deutlich die Lokalisation der

Expressionsmarker FoxA2 des Endoderms (Abbildung 169) und CDX2 der Darmorganoide (Abbildung 168) in den Zellkernen der differenzierten Darmepithelzellen. Auch die Ausbildung des Organoiden mit Kavität ist im Querschnitt der Z-Stack-Aufnahme deutlich zu erkennen (Abbildung 168). Ebenfalls konnte eine FoxA2 Expression in den Zellkernen der Darmorganoide festgestellt werden (Abbildung 169), während die Stammzellmarker Oct4 (Abbildung 170) und Nanog (Abbildung 171) keine Färbung in den differenzierten Zellen zeigten und somit den Verlust der Pluripotenz durch die Differenzierung bestätigen.

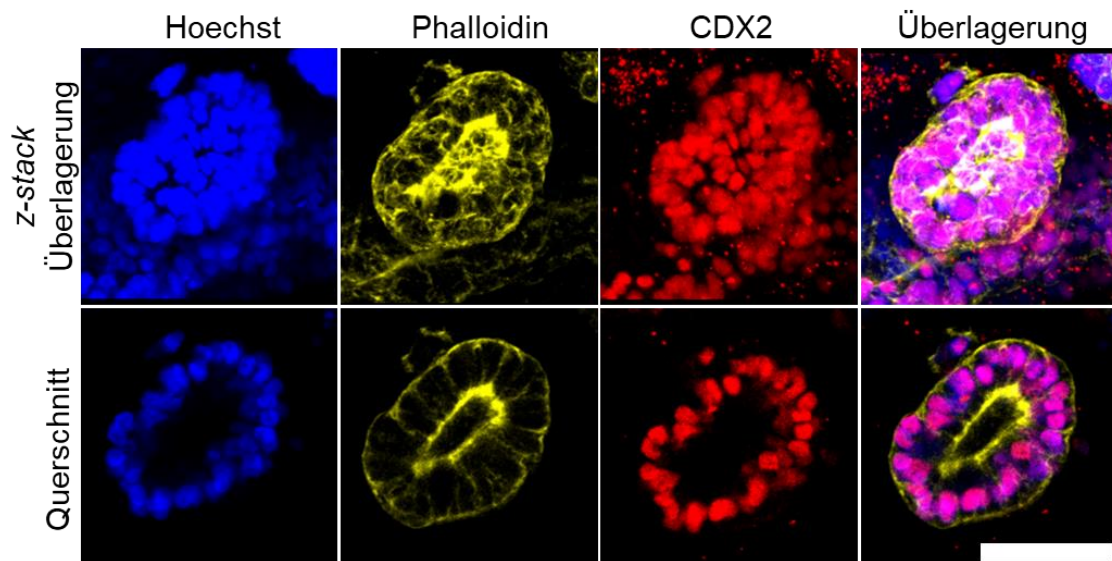


Abbildung 168: Differenzierungsnachweis von Epithelialen Darmzellen. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultivieren. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Abgebildet ist der Differenzierungsnachweis der Darmorganoid mittels Immunfluoreszenzfärbung des Expressionsmarkers Cdx2. Ebenfalls wurden die Zellekerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410\text{-}510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (gelb:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556\text{-}573$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit CDX2 (rot:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660\text{-}798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Z-stack Aufnahmen:  $n = 150$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe =  $330 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

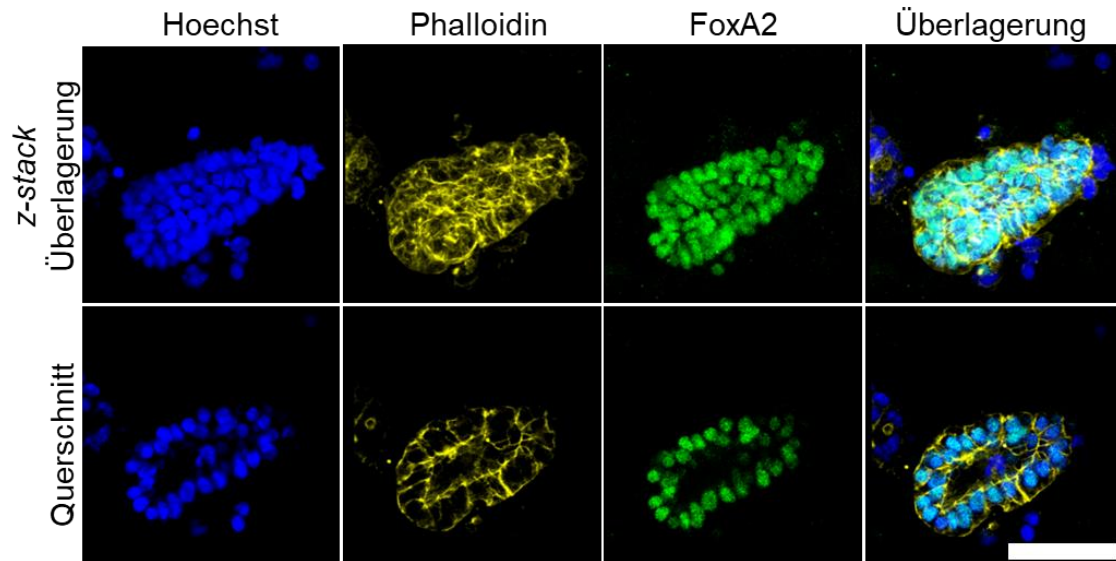


Abbildung 169: Expression von FoxA2 der epithelialen Darmorganoide. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Zu sehen ist die Immunfluoreszenzfärbung von FoxA2 im 5 Tage alten Darmorganoid. Ebenfalls wurden die Zellkerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410-510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (gelb:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556-732$ ), die immunfluoreszenzfärbung mit FoxA2 (grün:  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 494-562 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Z-stack Aufnahmen:  $n = 150$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe  $= 330 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

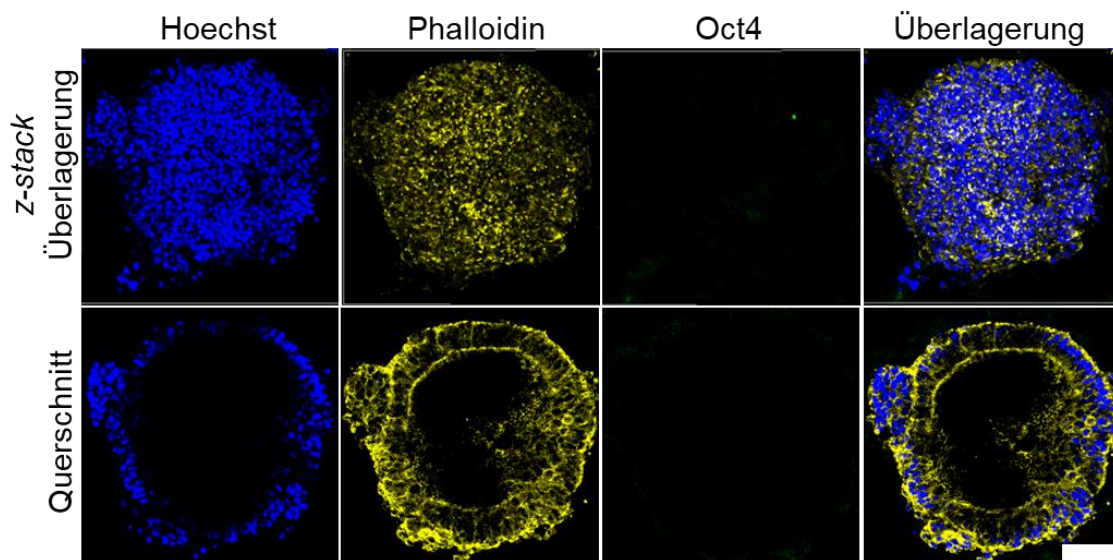


Abbildung 170: Expression von Oct4 der epithelialen Darmorganoide. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Zu sehen ist die Immunfluoreszenzfärbung von Oct4 im 5 Tage alten Darmorganoid. Ebenfalls wurden die Zellkerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410-510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (gelb:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556-732$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit Oct4 (grün:  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 494-562 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Z-stack Aufnahmen:  $n = 150$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe  $= 330 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

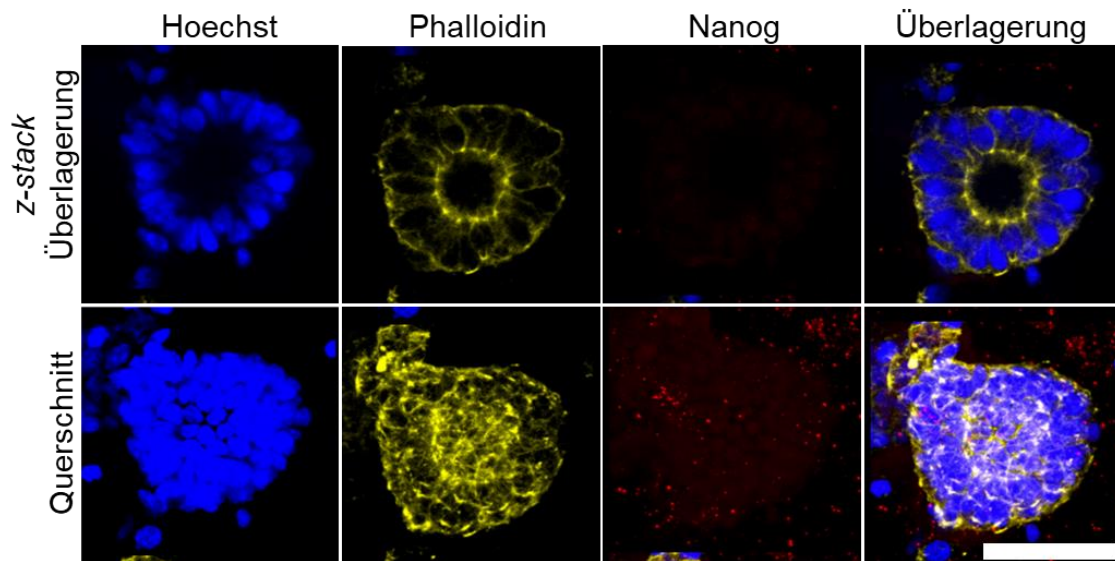


Abbildung 171: Expression von Nanog der epithelialen Darmorganoide. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Zu sehen ist die Immunfluoreszenzfärbung von Nanog im 5 Tage alten Darmorganoid. Ebenfalls wurden die Zellkerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410\text{-}510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (gelb:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556\text{-}573$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit Nanog (rot:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660\text{-}798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Z-stack Aufnahmen:  $n = 150$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe  $= 330 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

Eine Polarisierung der Darmorganoide kann zudem über die Entwicklung der *Tight Junctions* überprüft werden. Hierfür wurde das für die *Tight Junction* exprimierte Protein Occludin durch Immunfluoreszenzfärbung über Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Occludin befindet sich physiologischer Weise auf der apikalen Seite der Darmbarriere und ist vermutlich an der Aufnahme größerer Moleküle durch die Darmbarriere beteiligt.<sup>[411,412]</sup> Auch in den Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Occludin konnte die Ansammlung des Proteins in der inneren Seite der Organoide beobachtet werden. Da die Nährstoffe vom Medium außerhalb der Organoide geliefert werden, ist hier die natürliche Anordnung der apikalen Seite von Darmzellen im Inneren des Organoiden wahrscheinlich.

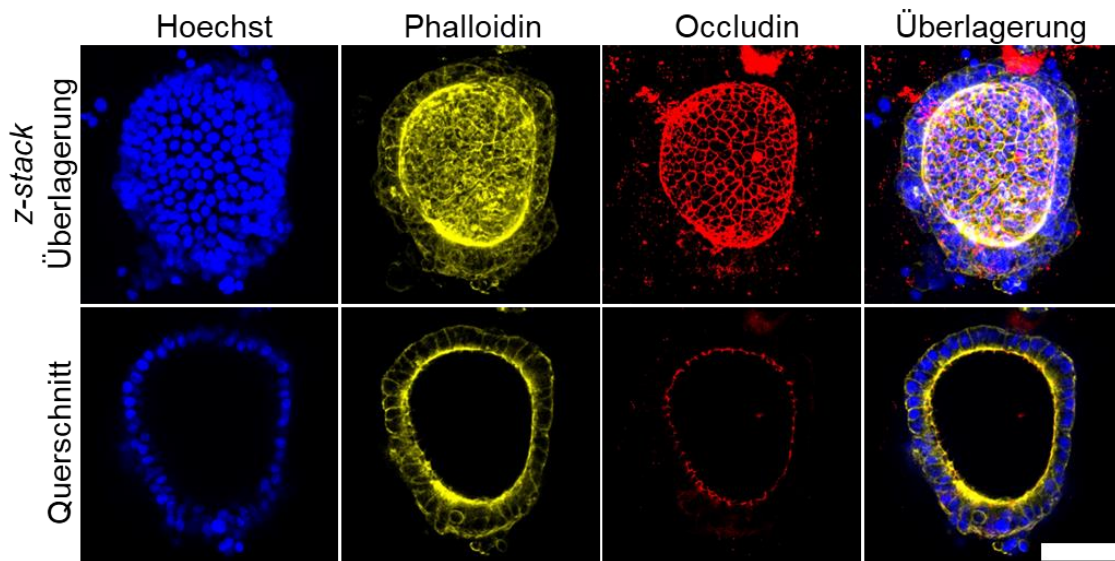


Abbildung 172: Expression von Occludin der epithelialen Darmorganoide. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Zu sehen ist die Immunfluoreszenzfärbung von Occludin im 5 Tage alten Darmorganoid. Ebenfalls wurden die Zellkerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410-510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (gelb:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556-573$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit Occludin (rot:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660-798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Z-stack Aufnahmen:  $n = 150$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe  $= 330 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

Eine weitere wichtige Eigenschaft des Darms ist die Produktion von Mucin, das die Schleimschicht des apikalen Darmbereichs ausbildet und diesen von äußeren Einflüssen schützt. Für dessen Produktion ist das MUC2-Gen verantwortlich, das vor allem in Becherzellen im Darm vorkommt.<sup>[413,414]</sup> Durch Immunfluoreszenzfärbung soll nun ebenfalls die Funktionalität der Darmorganoide nachgewiesen werden. Auch hier zeigt die Auswertung der Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie zeigen eine Expression von MUC2 (Abbildung 173) und weisen damit auf das Vorhandensein unterschiedlicher Zelltypen in den differenzierten Darmorganoiden hin.<sup>[414]</sup>

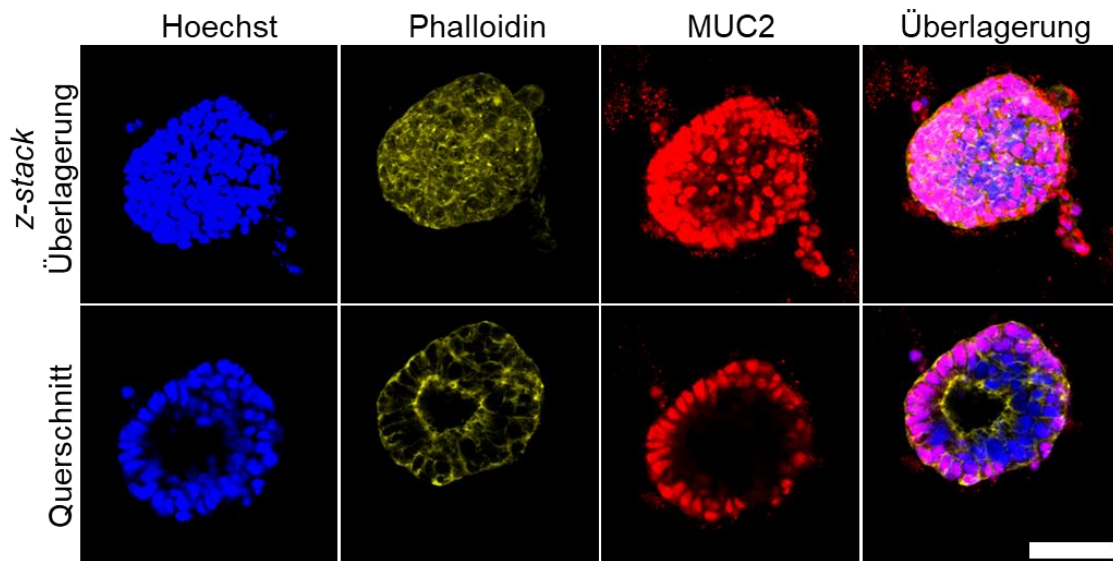


Abbildung 173: Expression von MUC2 der epithelialen Darmorganoide. hiPSC Zellen wurden 3 Tage auf mit Matrigel beschichteten 48-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, bis sich organoidähnliche Strukturen ausbildeten. Zu sehen ist die Immunfluoreszenzfärbung von MUC2 im 5 Tage alten Darmorganoid. Ebenfalls wurden die Zellkerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellkerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410\text{-}510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (gelb:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556\text{-}573$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit MUC2 (rot:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660\text{-}798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Z-stack Aufnahmen:  $n = 150$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe  $= 330 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ .

Ein Profil der relativen Genexpression von intestinalen epithelzell-typischen Genen wurde erstellt, um die Differenzierung der Zellen besser beurteilen zu können. Hierbei wurden ebenfalls intestinale Organoide aus der Stammzelllinie HD11 differenziert. Diese menschliche Zelllinie wurde über den Sendai-Virus transfiziert und stellt ebenfalls eine etablierte stabile Stammzelllinie da. Die intestinalen Zellen wurden wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben differenziert und am 12ten Tag über eine quantitative Echtzeit-PCR (q-PCR) auf die Genexpression von Sox17 (Crypt Zellen)<sup>[415]</sup>, FoxA2 (Definiertes Endoderm)<sup>[416]</sup>, CDX2 (Hindgut Endoderm)<sup>[417]</sup>, Villin (Enterozyten)<sup>[418]</sup>, Muc2 (Goblet Zellen)<sup>[419]</sup>, Lysozym (Paneth Zellen)<sup>[420]</sup>, LBR5 (intestinale Stammzellen)<sup>[421]</sup> und EPHB2 (intestinale Stammzellen)<sup>[422]</sup>, sowie den stammzelltypischen Expressionsmarkern Nanog (pluripotente Stammzellen)<sup>[423]</sup> und Oct4 (pluripotente Stammzellen)<sup>[424]</sup> hin untersucht.<sup>[107]</sup> Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf die konventionell erworbenen Darmzellen (HSIEC) normiert. Wie erwartet wurde Nanog und Oct4 lediglich von den Stammzellen exprimiert. Das Expressionsergebnis zeigte ebenfalls eine ähnliche oder teilweise stärkere Expression intestinaler Marker von hiPSC differenzierten Darmzellen im Vergleich zu den kommerziell erworbenen Zellen (HSIEC). So ist das Expressionslevel der endodermalen Marker FoxA2 und CDX2 in differenzierten Zellen

signifikant höher als deren Expression in HSIEC Zellen. Ebenso zeigt sich in den differenzierten Zellen, vor allem aber in denen aus WTC11 NGN2 abstammenden Epithelzellen, eine höhere Zellvielfalt durch vorhandene Villin-Expression, die auf Enterocyten hindeuten, Muc2 Expression, die für das Vorhandensein von Becherzellen spricht und auch Lysozym, das für das Vorhandensein von Panethzellen spricht. Die intestinalen Stammzellmarker LGR5 und EPHB2 wurden ebenfalls in den differenzierten Zellen exprimiert wodurch erwartet werden kann, dass diese intestinalen Organoiden sich selbst erneuern und somit alle Zellarten eines physiologischen Darms aufwiesen. So zeigten die differenzierten Zellen, vor allem die aus WTC11 NGN2 abstammenden Organoiden eine hervorragende Qualität und die besten Voraussetzungen für die physiologische Darstellung einer artifiziellen Darmbarriere im *Intestine-on-a-Chip* Modell VitaPrint.

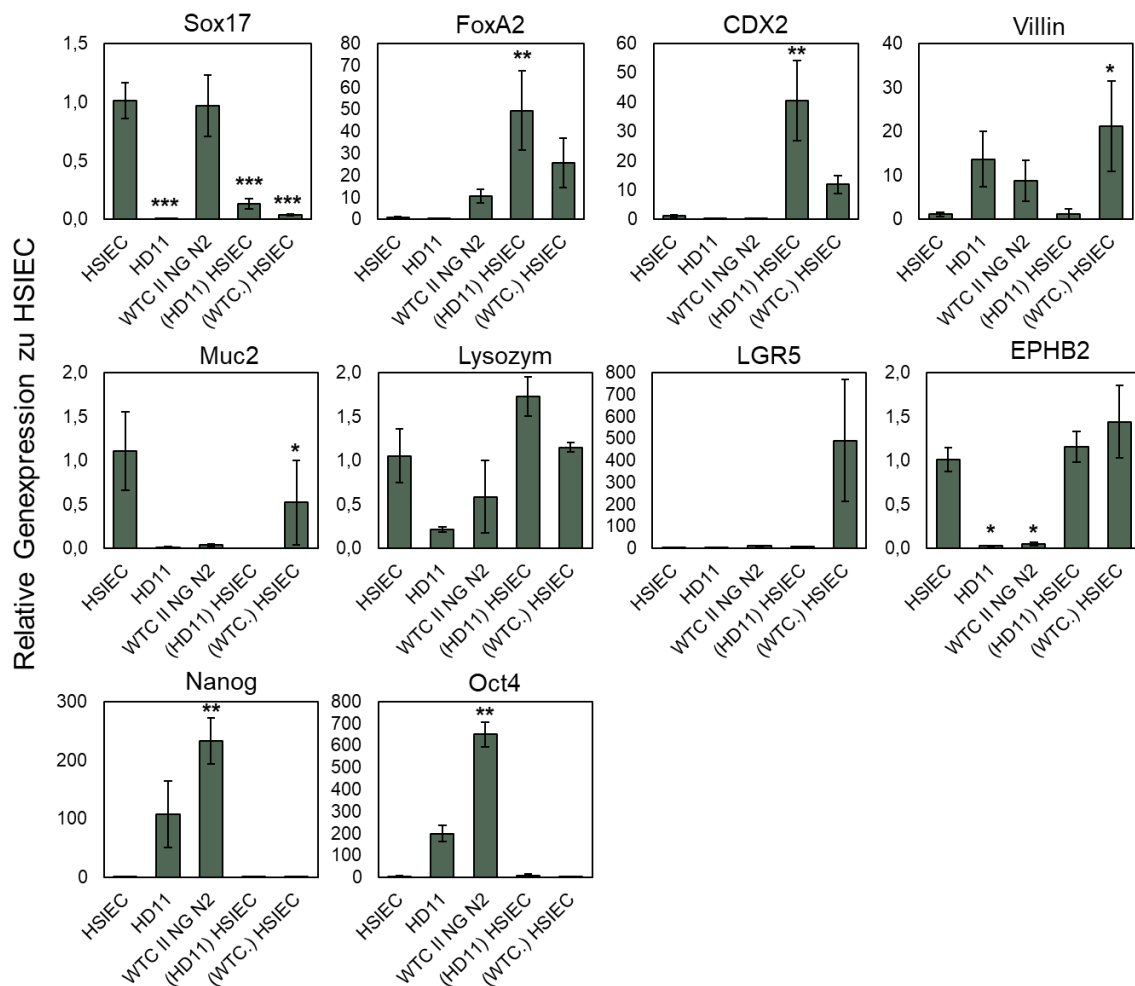


Abbildung 174: Relative Genexpression intestinaler Marker in Stammzellen (HD11, WTC11 NGN2) und differenzierter Darmorganoiden aus den zwei Stammzelllinien, normiert auf kommerziell erwerbliche primäre humane intestinale Zellen HSIEC. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt, ( $n=3$ ). Die Statistik wurde über einen Student-T-Test bestimmt, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Um die Kompatibilität der differenzierten Zellen mit den VitaPrint Chipmodell zu überprüfen, wurde getestet, ob die differenzierten intestinalen Organoide auf den für den Chip verwendeten Hydrogelen anwachsen können. Hierfür wurden die Organoide auf 200  $\mu$ L 5 % GelMA *Med* Hydrogele mit und ohne 25 % Matrigel 3 Tage kultiviert und zum Vergleich ebenfalls für 3 Tage konventionell in 100  $\mu$ L 50 % Matrigel (5.2.5). Im Anschluss wurden die Zellen über ein LED-Mikroskop untersucht (Abbildung 175). Die Hellfeldaufnahmen des Mikroskops zeigen stark ausgeprägte 3D-Organoiden in 50 % Matrigel. Auf den Hydrogelen sind einzelne Zellen angewachsen, jedoch zeigt sich keine 3D-Ausbildung der Organoide. Dies könnte jedoch mit einer längeren Kultivierungszeit erreicht werden. Vor allem im mit Matrigel gemischten Hydrogel zeigte sich eine gleichmäßigere Ausbreitung der intestinalen Zellen im Vergleich zu dem einfachen 5 % GelMA *Med* Gel. Durch einen Mix mit Kollagen könnte hier ebenfalls eine bessere Kultivierung der Zellen erreicht werden. Dies soll in zukünftigen Experimenten getestet werden, da die differenzierten Zellen deutlich mehr Merkmale eines physiologischen Darms aufweisen und so geeigneter für ein *Intestine-on-a-Chip* Modell wären.

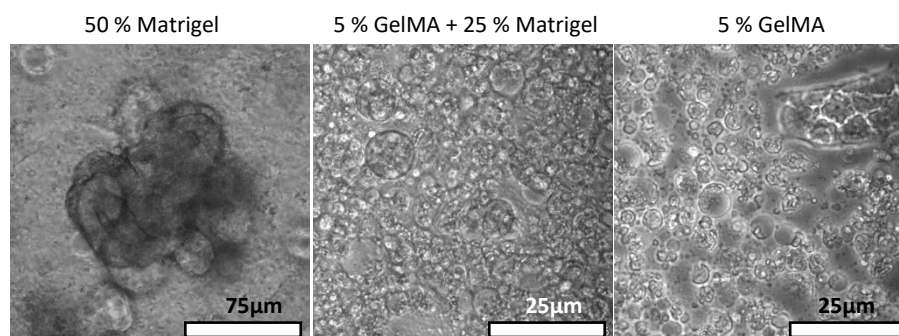


Abbildung 175: Wachstum von differenzierten Darm-Organoiden in 50 % Matrigel, auf 5 % GelMA + 25 % Matrigel und auf 5 % GelMA. 20 differenzierte Darm-Organoiden wurden auf 200  $\mu$ L Hydrogel aufgetragen und für 3 Tage kultiviert. Abgebildet sind die Hellfeldaufnahmen, die mittels LED-Mikroskop erhalten wurden.

## 4 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche *Nanocarrier*-Ansätze für die Nutzung als innovative *Drug Delivery*-Systeme untersucht, um die aktuellen Herausforderungen wie unzureichende Biodistribution und systemische Toxizität anzugehen. Einer davon umfasste Gadolinium-basierte anorganisch-organische Hybridnanopartikel, die eine gezielte multimodale Therapie ermöglichen. Der andere Ansatz beschäftigt sich mit Gelatine-basierten Nanogelen, die durch Oberflächenmodifikation eine Gewebespezifität erhalten, welche für einen gezielten Wirkstofftransport benötigt wird.

Die Forschung an Gadolinium-basierten Hybridnanopartikeln sollte neue Erkenntnisse über eine verbesserte Wirkung von Pemetrexed (PMX) durch eine Kombitherapie mit einem zweiten Zytostatikum wie Estramustinphosphat (EMP, als  $\text{Gd}^{3+}_2[(\text{PMX})_{0.5}(\text{EMP})_{0.5}]^{2-}_3\text{-NP}$ ) oder in Verbindung mit einem Photosensibilisator, wie AIPCS<sub>4</sub> oder TPPS<sub>4</sub> (als  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.74}(\text{AIPCS}_4)_{0.13}]^{2-}\text{-NP}$  oder  $[\text{Gd}(\text{OH})]^{2+}[(\text{PMX})_{0.70}(\text{TPPS}_4)_{0.15}]^{2-}\text{-NP}$ ) bringen. Die Wirkung von PMX ist zwar effektiv, durch seine schwache Toxizität, tritt bei vielen Patienten jedoch eine primäre oder erworbene Resistenz auf.<sup>[425]</sup> Ziel war es somit die Wirksamkeit von PMX durch additive oder synergistische Effekte zu erhöhen, um Resistenzen zu umgehen. Bisher entwickelten Patienten in klinischen Studien, bei denen eine verbesserte PMX Behandlung durch Kombitherapie mit einem zweiten Zytostatikum wie etwa Cisplatin angestrebt wurde, eine *Multidrug*-Resistenz.<sup>[426,427]</sup> Deshalb sollte nicht nur die Kombination mit einem weiteren Zytostatikum getestet werden, sondern auch die Kombination mit einem Photosensibilisator, wodurch zwei verschiedene Therapieformen verbunden werden können.<sup>[428]</sup> Hintergrund sind Studien wie die von Park *et al.* die bereits 2014 in klinischen Studien nachweisen konnten, dass die Kombination aus photodynamischer Therapie (PDT) und Chemotherapie die Ein-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Gallengangkarzinom signifikant verbesserte. Ihre Überlebensrate stieg auf 76,2 %, während sie bei der alleinigen Behandlung mit PDT nur bei 32 % lag.<sup>[429,430]</sup> Bei den meisten Studien werden die beiden Behandlungsmethoden allerdings nacheinander durchgeführt, da die gleichzeitige Verabreichung von Medikamenten in ausreichend hoher Wirkdosis eine Gefahr der systemischen Toxizität hervorrufen kann.<sup>[53,431]</sup> Ebenso zeigen bisher zugelassene Wirkstoffe für die PDT, wie etwa Photofrin® oder Levulan®, häufig den Nachteil in nicht ausreichend hoher Dosis für die PDT am Zielgewebe anzukommen, wodurch ihre Wirkung drastisch

verringert wird.<sup>[432]</sup> Ein nanopartikulärer Transport würde hingegen zu einer erhöhten Akkumulation von Wirkstoffen in Tumorgewebe führen, wodurch eine geringere Dosis der Wirkstoffe verabreicht werden muss und gesundes Gewebe unbeeinflusst bleibt.<sup>[433,434]</sup> An diesem Punkt setzten nun die anorganisch-organischen multimodalen Hybridnanopartikel an. Tatsächlich haben aktuelle Erkenntnisse gezeigt, dass die Verwendung von Nanopartikeln die therapeutische Wirksamkeit der PDT erheblich steigern können.<sup>[435,436]</sup> Da die Nanopartikel im Arbeitskreis von Prof. Dr. Claus Feldmann (Institut für Anorganische Chemie, KIT) synthetisiert wurden, fand dort auch die chemische und physikalische Charakterisierung der Nanopartikel statt. Hierbei zeichneten sich die Nanopartikel besonders durch Merkmale wie ihre einfache Synthese in Wasser, ihr Partikeldurchmesser von 40 bis 60 nm, ihre unübertroffen hohe Ladungskapazität von bis zu 82 % der Gesamtnanopartikelmasse aus.<sup>[146,437]</sup> Erste biologische Charakterisierungen der Nanopartikel konnten ebenfalls bereits von Dr. Anna Meschkov in ihrer Dissertation durchgeführt werden.<sup>[165]</sup> In dieser Arbeit wurde deshalb der Schwerpunkt auf die Charakterisierung der Nanopartikel auf 3D Tumorsphäroide gelegt. Dabei wurde ihre Zytotoxizität, Phototoxizität und wachstumshemmenden Eigenschaften untersucht. Die Resultate der Untersuchung konnten einen additiven Effekt der PMX-Behandlung in Kombination mit einem zweiten Wirkstoff belegen. So konnte das Wachstum der Tumore durch PMX nicht nur gehemmt, sondern seine 3D-Morphologie gleichzeitig durch EMP, AIPCS<sub>4</sub> oder TPPS<sub>4</sub> zerstört werden. Im Vergleich zeigte die Kombination aus den beiden Zytostatika PMX und EMP im Nanopartikel zwar die stärkste Wirkung auf die Tumorsphäroide, die Wirkung kann jedoch nicht ortsspezifisch moduliert werden. Für diesen Zweck zeigte die Kombination mit einem Photosensibilisator einen deutlichen Vorteil, da hier eine spezifischere Tumorbehandlung durchgeführt werden kann. So zeigte in dieser Arbeit eine Erhöhung der PMX-Konzentration keine Verstärkung der Toxizität, während durch die Aktivierung der Photosensibilisator (AIPCS<sub>4</sub>, TPPS<sub>4</sub>) die Gesamtzytotoxizität des Nanopartikels mit zunehmender Konzentration gesteigert werden konnte. Zusammenfassend bietet diese Studie bedeutsame Erkenntnisse über die synergistischen Effekte von multimodalen Hybridnanopartikeln in 3D-Tumorsphäroiden. So können Chemotherapie und PDT in einer gemeinsamen Plattform integrieren werden, um eine äußerst wirksame und verbesserte antikarzinogene Leistungsfähigkeit zu gewinnen umso Wirkstoffresistenzen zu überwinden. Untersuchungen an Zellkulturmodelle lassen allerdings noch keine eindeutige Aussage über ihr Verhalten *in vivo* zu, wodurch weitere Studien an komplexeren Modellen oder

Tierversuche benötigt werden, um die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen zu können.

Nanopartikel, die für eine PDT eingesetzt werden können, sind nur eine Möglichkeit eine Krebstherapie spezifischer zu gestalten und können nicht für Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, deren Wirkung sich nicht auf die Toxizität fokussiert. So galt es im zweiten Teil dieser Arbeit einen gewebespezifischen Transport von *Nanocarriern* zu erreichen. Dies sollte über eine Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln durch bereits charakterisierte organspezifische Peptoiden erreicht werden. Einige Forschungen beschäftigen sich bereits mit einem Wirkstofftransport durch Peptide,<sup>[54,64,65,438]</sup> jedoch wurden sie noch nicht auf einen gewebespezifischen Transport von Nanopartikel untersucht. Da sie sich ähnlich wie Peptide im Organismus verhalten, sie zudem deutliche Vorteile wie eine bessere biologische Stabilität und Immuntoleranz aufweisen, eignen sie sich weitaus besser als spezifische Transporter. Zudem wurden bereits zahlreiche Erkenntnisse über Peptide gewonnen, die aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten oft auf Peptide übertragen werden können.<sup>[439]</sup> Auf Basis solcher Studien, stellten sich besonders Polymernanopartikel von Vorteil für eine Immobilisation von Molekülen an Nanopartikeloberflächen heraus, da sie einfach durch funktionelle Gruppen modifiziert werden können.<sup>[440]</sup> So konnte in dieser Arbeit die Bindung der Peptide an Nanogele erfolgreich durchgeführt werden. Diese Nanogele (GNG) bestanden aus dem Biopolymer Gelatine, das durch funktionelle Gruppen zu einem semisynthetischen Hydrogel modifiziert wurde. GNG zeigten eine hohe Biokompatibilität mit modifizierbarer Größe im Bereich um die 120 nm und eine mäßige Beladungskapazität von 37-50 %. Aufgrund ihrer auf dem Hydrogel basierenden quellbaren Eigenschaften, sollte die Beladungskapazität allerdings durch eine Veränderung der Syntheseparameter noch gesteigert werden können.<sup>[441]</sup> Darüber hinaus konnte eine Wirkstofffreisetzung von bis zu 80 % über eine Senkung des pH-Wertes erreicht werden. Solche Eigenschaften stellen sich vor allem bei einer Krebsbehandlung von Vorteil heraus, da in Tumorumgebung meist ein niedrigerer pH-Level herrscht, der so zu einer verstärkten Freisetzung von Wirkstoffen führen kann.<sup>[222]</sup> Zudem wurde die Modifizierung der Nanogeloberfläche anhand von tetrameren Peptoiden mit unterschiedlichen Seitenketten untersucht. Dabei erfolgte die Peptoidkupplung über die Thiol-In-Click Chemie, wobei die Peptide effizient innerhalb weniger Sekunden an die Nanopartikeloberfläche gebunden werden konnten. Die unterschiedlichen Peptide zeigten dabei eine verstärkte

Kupplungskapazität mit zunehmender Hydrophilie. Da die Kupplung der Peptoide im wässrigen Puffern stattfand, könnte noch eine Verbesserung der Kupplungseffizienz von hydrophoben Peptoide durch eine Verwendung amphiphiler Lösungsmittel, wie DMSO erreicht werden.<sup>[442]</sup> Die Kupplungseffizienz der untersuchten Peptoide P8 und P44 war allerdings für weiteren Studien ausreichend, wodurch der Fokus bei der biologischen Charakterisierung mit P8 und P44 gekuppelten Nanogelege lag. In diesem Zusammenhang wurden die Nanopartikel P8@GNG und P44@GNG auf ihre Toxizität und Transportfähigkeit der Wirkstoffe Doxorubicin und Dopamin *in vitro* auf Zellkulturen und *in vivo* auf Zebrafisch-Embryos untersucht, sowie ihre barrierepenetrierenden Eigenschaften durch die Blut-Hirn-Schranke und Darmbarriere evaluiert. Dabei konnte eine gute Biokompatibilität der unbeladenen Nanogelege auf Zellkulturen festgestellt werden. Für den Wirkstofftransport des Zytostatikums Doxorubicin durch das modifizierte Nanogel P44@GNG[DOX] konnte zudem eine Verstärkung der Toxizität des Wirkstoffes auf HepG2 2D-Zellkulturen erreicht werden, die in 3D-Tumorsphäroide im Vergleich zum unmodifizierten Nanopartikel GNG[DOX] ebenfalls eine toxischere Wirkung zeigten. Zudem konnte die Morphologie der Tumorsphäroide durch eine Behandlung mit P44@GNG[DOX] im Vergleich zum freiem Doxorubicin deutlich früher zerstört werden. Die Größe der Nanopartikel könnte hier die Aufnahme in Tumorsphäroide beeinflussen, wodurch mehr Wirkstoff in die äußere Schicht des Tumors aufgenommen wird und eine verstärkte Wirkung auf die Tumorintegrität entsteht. Besonders bedeutend war zudem der Nachweis eines organellspezifischen Transportes durch P8@GNG in die Mitochondrien von 2D-Zellkulturen,<sup>[274]</sup> wenn man bedenkt, dass fast alle Nanopartikelsysteme über einen Endozytoseweg aufgenommen werden, wodurch diese meist in den Endosomen der Zelle vorliegen.<sup>[244]</sup> Ein organellspezifischer Transport wurde jedoch nur erreicht, wenn das Peptoid in ausreichender Konzentration an die Nanogelege gekuppelt werden konnte, was durch eine zusätzliche Modifizierung der Nanogelege erreicht werden konnte. Die Effizienz der Nanogelege für den zielgerichteten Transport wurde vor allem durch *in vivo* Studien an Zebrafischembryonen deutlich. Die Resultate zeigten einen gezielten organspezifischen Transport von P8@GNG in das olfaktorische System, von P44@GNG in die After-Region oder von P1@GNG in den Gastrointestinaltrakt der Embryos. Somit eröffnen sich neue Behandlungsmöglichkeiten nicht nur für den Gastrointestinaltrakt, sondern auch für Krankheiten wie COVID-19, bei denen unter anderem das olfaktorische System angegriffen wird, wodurch es zu Geruchsverlust oder sogar zu Hirnentzündungen kommen kann.<sup>[443,444]</sup>

Die organspezifische Akkumulation der Peptoide zeigte auch eine Abhängigkeit von der gewählten Applikationsart, die in komplexeren *in vivo* Studien noch untersucht werden sollte. Da aber ohne eine Peptoidkupplung keine Penetration der Nanopartikel durch die transdermale Barriere im Zebrafischembryo erreicht wurde, zeigte hier die Modifizierung der Nanogele mit Peptoiden bereits eine deutliche Verbesserung der Penetrationsfähigkeit von Nanogelen *in vivo*. Daraufhin wurden Untersuchungen der Penetrationsfähigkeit von Nanogelen durch weitere Barrieren in komplexeren *in vitro* Studien durchgeführt. Die Nachbildung der Blut-Hirn-Schranke in einem *Organ-on-a-Chip*-Modell (vasQchip) ließ erste Erkenntnisse der Penetrationsfähigkeit von Nanogelen zu, wodurch sie für den Transport von Blut-Hirn-Schranke-undurchlässigen Medikamenten wie Dopamin eingesetzt werden könnten. In diesem Kontext zeigten Dopamin beladene Nanogele (P8@GNG[DOP]) sogar eine positive Beeinflussung von Neuronen, deren spontane Aktivität durch eine Behandlung mit P8@GNG[DOP] im Vergleich zu freiem Dopamin deutlich verlängert werden konnte. Auch wurde in diesem Zuge ihre Penetrationsfähigkeit der Darmbarriere untersucht, die die Möglichkeit einer oralen Verabreichung von Doxorubicin ermöglichen sollte. Diese Barriere wurden aus Caco-2 Zellen oder primären humanen Epithelzellen (HSIEC) in einem Transwell-System aufgebaut, konnte somit allerdings eine physiologische Darmintegrität nicht angemessen nachahmen. Diese Studien ließen aber bereits eine mögliche Penetrationsfähigkeit der Nanopartikel erahnen. Die durch das Transwell-System erhaltenen Ergebnisse sollten aus diesem Grund in komplexeren Modellen verifiziert werden. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer Transport von Nanogelen oder Nanopartikeln, über Peptoide gezielt modelliert werden kann. Im Vergleich zu den wenigen anderen selektiven Methoden aktueller Studien wie SORT (selektives Organ *Targeting*)<sup>[445,446]</sup> oder ACNPs (Antikörper- Konjugierte Nanopartikel)<sup>[55]</sup> zeigen die hier vorgestellten P@GNG Nanogele zudem die Vorteile einer einfachen Synthese, Biokompatibilität und Stabilität. Darüber hinaus kann durch die Daten aus bereits charakterisierten Peptoidbibliotheken eine organspezifische Akkumulation vorausgesagt werden, was bei neuen Technologien wie dem SORT nicht der Fall ist.<sup>[445-447]</sup>

Um in zukünftigen Studien geeignete *in vitro* Modelle zur Untersuchung von Wirkstoffen an der Darmbarriere zu etablieren, wurde im abschließenden Teil dieser Arbeit ein *Intestine-on-a-Chip*-Modell auf Basis des 3D-Drucks entwickelt, das VitaPrint-System. Dieses Modell wurde

so konstruiert, dass es die 3D-Struktur des makroskopischen Darms von Mikrovilli über Zotten bis hin zu den Darmschlingen nachahmen sollte. So wird eine große Oberfläche auf kleinem Raum geboten, die die Penetration von Nährstoffen oder Wirkstoffen beeinflussen kann.<sup>[352]</sup> In dem hier konstruierten VitaPrint-Chip konnten bereits erfolgreich drei mikrofluidisch betriebene Kanäle in eine Hydrogelmatrix gedruckt werden, die einen artifiziellen Darm naturnahe abbilden sollen. Viele *Intestine-on-a-Chip*-Modelle, wie dem bekannten Emulate<sup>[125]</sup>, weisen keine unterstützenden Gewebezellen auf, die typischerweise im Darm vorkommen. In der Hydrogelmatrix des VitaPrint-Chips konnten hier bereits intestinale Fibroblasten und Muskelzellen kultiviert werden, um die intestinale Matrix nachzuahmen. Zudem wurde durch die Implementierung von zwei Blutgefäßen im Chip ein arterieller und ein venöser Blutfluss erzeugt, der bis jetzt noch in keinem *Intestine-on-a-Chip* Modell nachgebildet wurde und wichtig für Funktionsstudien von Organen und Geweben unter Nähr- und Sauerstoffgradienten ist.<sup>[448]</sup> Im Gegensatz zu manch anderen Modellen besitzt das VitaPrint-System allerdings keine Möglichkeit eine künstliche Peristaltik auf die Zellen wirken zu lassen. Da in diesem Chip jedoch bereits intestinale Muskelzellen kultiviert werden konnten, ist die Möglichkeit einer spontanen physiologischen Kontraktion über die Darmmuskelzellen in der weichen Matrix gegeben<sup>[449]</sup> und wird bereits in laufenden Studien untersucht. Die größte Herausforderung für den VitaPrint-Chip war allerdings die Besiedlung der Matrix mit intestinalen Epithelzellen. Untersuchungsergebnisse ließen darauf schließen, dass sich Gelatine-basierte Hydrogele als am besten für die Fertigung der Chips eigneten, die auf einer photometrischen Aushärtung basieren. In dieser Arbeit konnte allerdings noch kein effizienter Weg gefunden werden, der es ermöglicht eine konfluente epitheliale Zellschicht in der apikalen Seite des intestinalen Kanals aufzubauen. Wenige andere matrixbasierte Darmmodellstudien verwenden für das epitheliale Wachstum teure Matrixbestandteile wie Matrigel oder Kollagen, die mit dem VitaPrint-Chip, aufgrund der Wirtschaftlichkeit oder Chip-Stabilität keine Kompatibilität aufweisen. Durch eine Mischung verschiedener Hydrogele konnte allerdings bereits eine Verbesserung der Zellkultivierung im Chip erreicht werden, jedoch muss noch weiter nach einer besser geeigneten Matrix für die epitheliale und endotheliale Kultivierung von intestinalen Zellen geforscht werden. Ideen hierfür, wie thermische Aushärtung des Gels oder Modifizierung von Kollagen oder Fibrinogen, gibt es viele und werden in aktuell laufenden Studien evaluiert. Auch sollten sich zukünftige Untersuchungen nicht auf kommerziell erworbene Zellen limitieren, sondern die

Stammzellforschung integrieren. Erste Untersuchungen an differenzierten intestinalen Zellen wurde auch in dieser Arbeit bereits unternommen und zeigen vielversprechende Ergebnisse im Bereich ihrer Zellvielfalt, die durch ihre spezifische Genexpression nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der gleichen Probleme, die auch bei den kommerziell erwerblichen Zellen (HSIEC) auftraten, war auch hier eine Kultivierung der differenzierten intestinalen Organoide auf den Hydrogelen nicht vollends möglich. Trotz dieser Hürden scheint das VitaPrint-System bereits eine positive Wirkung auf die Morphogenese der zum Teil angewachsenen Zellen zu haben, wodurch bereits zottenähnliche Strukturen oder Muskelzellausrichtungen erhalten werden konnten. Der Aufbau des Chips zeigt sich somit durchaus geeignet für die Implementierung eines künstlichen Darms und zur Testung neuer Medikamente als Ersatz für Tierversuche. Da zudem Tierversuche oft die Wirkung von Medikamenten im Menschen nicht vorhersagen können, stützen sich neue Teststrategien immer häufiger auf solche *Organ-on-a-Chip*-Systeme. So hat eine kürzlich veröffentlichte Studie mit einem Leber-Chip der Marke Emulate gezeigt, dass der untersuchte Chip 87 % lebertoxischer Medikamente korrekt identifizieren konnte und zudem bei keinem nicht toxischen Medikament fälschlicherweise alarmierte.<sup>[450]</sup> Auch der erste und bisher einzige von der OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) 2021 zugelassen Organchip zu Testung der Toxikologie potentieller Medikamente<sup>[138]</sup> zeigt das Potential für die Entwicklung neuer tierversuchsfreier Teststrategien, wie dem hier vorgestellten VitaPrint-Modell. VitaPrint zeigte somit ein erhebliches Potenzial für die Nutzung in innovative biologische und translationale Anwendungen, um so relevante vorklinische Daten zu liefern die Tierversuche in der Medikamentenforschung ersetzen könnten.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen ø 32 mm, #1,5, Menzel

Dialyseschläuche 12-14 kDa Sigma Aldrich® Merck

D-Tube™ Dialyzers, maxi, 14 kDa, Merck

Female Luer Lock Coupler ibidi® GmbH

Hämacytometer-Deckgläser VWR® International

Hartschalen qPCR Platten und Microseal Folien, Bio-Rad Laboratories GmbH

Injektionsnadeln 0,25 mm rot, konisch, Vieweg GmbH

Klebeband VHB™ Scotch™

Kryoröhrchen, 2 ml, VWR® International

Luer Connector Male ibidi® GmbH

Luer Lock Connector Female ibidi® GmbH

Luer Plug Male ibidi® GmbH

Microscope Slides, 76 x 26 x 1 mm, 631-1550, VWR

Mr. Frosty™ Freezing Container Thermo Scientific™

Multiwell-Platte, 48-Well, VWR® International

Multiwell-Platte, 96 / 24 / 12 / 6-Well transparent, Greiner Bio-One™, CELLSTAR™

PCR Strips 8 Stück Brand GmbH

Perfusionsset, YELLOW, 15 cm Länge, ID 0.5 mm 2 mL reservoir, ibidi

Petrischale ø 94 mm, Höhe 16 mm, Greiner Bio-One™, CELLSTAR™

Polycarbonatfolie, 106 Ionen/cm<sup>2</sup>

PP-Reactor 10mL mit PE frit, Multisyntech GmbH, V100PE087

Pumpenschlauch Tygon 3350 ø innen 0,76 mm, Saint-Gobain Performance

Pumpenschlauch Tygon LMT-55, 2 Stopper, ø innen 0,76 mm, VWR® International

Spritzen Omnifix® 1 ml, B. Braun SE

Sterilfilter Rotilabo®, Porengröße 0,22 µm, Carl Roth GmbH

Transwell® 24-Well, 0,33 cm<sup>2</sup>, 0,4 µm Porengröße, PC-Membran, Transparent, VWR® International

Ultrafiltrationseinheit Vivaspin, 50 kDa; PES, VWR

Zählkammer, Neubauer Paul Marienfeld GmbH & Co.KG

Zell-/Gewebekultur Platte ø 100 mm, Höhe 20 mm Greiner Bio-One™, CELLSTAR™

Zellkultur Multiwellplatten PS, glasklar, mit Abdeckplatte, steril, 96-Well (655180), CELLSTAR®, Greiner, Bio-One

Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm<sup>2</sup>, Cellstar®, Greiner

Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>, Filterschraubverschluss, Greiner Bio-One™, CELLSTAR™

Zentrifugenröhrchen, Cellstar® Tubes

Zentrifugenröhrchen, konischer Boden, 15 / 50 ml, Greiner Bio-One™, CELLSTAR™

µ-Slide 8 Well high ibiTreat ibidi® GmbH

µ-Slide 8 Well ibiTreat ibidi® GmbH

BASF Ultrafuse PLA-0024B075, 2,85 mm, 750 g

### 5.1.2 Verwendete Geräte

3D Filament-Drucker, Ultimaker3 Extendet

Analysewaagen, VWR

Biospot BP, Biofluidix GmbH

CFX Connect Real Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories GmbH

CO2-Inkubator, C170 Binder

EVOM3 inklusive STX2-Plus, Elektrode WPI

Feinwaage AB265-S/FACT, Mettler Toledo

Fluidische Einheit 10903 , ibidi

Konfokalmikroskop, Leica STELLARIS 5 8119637

Guava® easyCyte™, Flow Cytometer, Luminex

Lyophilisator, Christ Alpha 1-4 Christ GmbH

Massenspektrometer, UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonics, Germany

microINJECTOR™ System, MINIJ1, Tritech™ Research

microINJECTOR™, MINIJ-2, Tritech™ Research

Mikroplatten-Reader, SpectraMax® iD3 Molecular Devices

Mikroskop, Leica DM IL LED

Multikanalpipette, Eppendorf

NanoDrop™ Lite, Thermo Scientific™

Omniculture® SERIES 2000, Lumen Dynamics, EXCELITAS Technologies Corp.

Peristaltikpumpe, perISYS Cetoni

Pipetten, Eppendorf Research Plus 0,5-10 / 2-20 / 1-100 / 20-200 / 100-1000 µl,  
Eppendorf

Plattenzentrifuge, Labofuge 400R Heraeus

Präzisionswaage, PR Series Ohaus®

Pump System, ibidi

Rasterelektionenmikroskop, TESCAN VEGA3 SBU

Rasterelektronenmikroskop, Zeiss SUPRA 40 VP Gemini

Rotationsmikrotom, Leica RM 2155

Sonifier, Branson Cell Disruptor B15

Thermocycler, peqSTAR VWR®, peqlab

Thermomixer 5436, Eppendorf

Transferpipette 2,5 µl, Brand

Ultraschallbad, Bioruptor Sonication System (Diagenode)

Zetasizer-Nano-ZSP (He-Ne-Laser (633 nm)), Malvern Instruments, (Malvern UK)

### 5.1.3 Chemikalien und Lösungen

1,4-Diaminobutan, Sigma Aldrich® Merck KGaA, D13208-500G

2',7'-Dichlorofluorescein diacetat ≥ 97 %, D6883, Sigma-Aldrich®

4 % PFA in DPBS<sup>-/-</sup>, 0335.0, Carl Roth®

4-Chlorbenzylamin, Sigma Aldrich® Merck KGaA, C27409-5G

5-Norbornen-2-Carbonsäure, TCI Chemicals

5x Green GoTaq Reaktionspuffer, Promega

Aceton, Carl Roth® GmbH

Benzylamin, Sigma Aldrich® Merck KGaA, 8018120100

Calcein-AM, Invitrogen™

CasBlock™, Invitrogen™

CellTracker™ Green CMFDA Dye, C2925, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific

Chloroform, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced, Corning Catalog #356231

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, Corning 354277

D-(+)-Glucose, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Di-tert-Butyldicarbonat, Sigma Aldrich® Merck KGaA, 34660-25G-F

DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Gibco® Life Technologies

DMEM/F12, Gibco® Life Technologies

DMSO, D2650-100mL, Sigma-Aldrich®

DNA Marker, 100 bp New England Biolabs®, GmbH

dNTP Solution Mix New England Biolabs®, GmbH

Dopamin-hydrochlorid, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Doxorubicin (hydrochloride) biomol, Cayman Chemical

Doxycyclin-hyclat, Sigma Aldrich® Merck KGaA

DPBS<sup>-/-</sup>, 14040-091 Gibco®, Life Technologies™

Ethanol, 99,8 %, VWR® Chemicals

FBS (Fetales Kälberserum) Gibco®, Life Technologies

Fibronektinlösung, human, 1 mg/ml, PromoCell®

Fluo-4 AM, membrangängig, Invitrogen™

Fmoc-geschützte Rink-Amidharz (AM-Harz LL 100-200 Maschen, 0,61 mmol/g

Gelatine Typ A, aus der Schweinehaut, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Gentle Cell Dissociation Reagent, 07174, StemCell™ Technologies

Glutaraldehyd, Sigma Aldrich® Merck KGaA

GoTaq® G2 DNA-Polymerase, Promega

GoTaq® qPCR MasterMix, Promega

HEPES Gibco®, Life Technologies

Hoechst33342, Trihydrochlorid, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Isopropanol, Carl Roth® GmbH

KnockOut™ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Gibco® Life Technologies

KnockOut™ Serumersatz, Gibco® Life Technologies

Kollagen Typ 1 aus Rattenschwanz, 5 mg/ml, Enzo Life Science

Konzentrierte Essigsäure, VWR® Chemicals

LAP (Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat), TCI Chemicals

L-Glutamine, 07100, StemCell™ Technologies

Methacrylsäureanhydrid, Sigma Aldrich® Merck KGaA

mTeSR™ Plus Basalmedium mit 5x Zusätzen, StemCell™ Technologies

MTT (Cell Proliferation Assay #G41000), Promega

NaCl (Natriumchlorid), Carl Roth® GmbH

NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat), Carl Roth® GmbH

NaOH (Natriumhydroxid), Carl Roth® GmbH

NHS (*N*-Hydroxysuccinimid), Sigma Aldrich® Merck KGaA

n-Octan, Sigma-Aldrich®

Normocin, InvivoGen

Nukleasefreies Wasser, Promega

Penicillin/Streptomycin Gibco®, Life Technologies

PFA (Paraformaldehyd), Carl Roth® GmbH

Phalloidin-TRITC, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Poly-L-Ornithin-Lösung, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Propargylamine TCI chemicals, P0911

Propidiumiodid (PI), Sigma Aldrich® Merck KGaA

Random Primer, Promega

Reverse Transkriptase, Promega

RNase AWAY®, VWR® International

Rhodamin B, Sigma Aldrich® Merck KGaA, R6626-100G

RQ1 RNase-freie DNase, Promega

SDS (Sodiumdodecylsulfat), Carl Roth® GmbH

Sorbitanmonooleat, Span® 80, Sigma-Aldrich®

STEMdiff™ Definitive Endoderm Supplement CJ, StemCell™ Technologies

STEMdiff™ Endoderm Basal Medium, StemCell™ Technologies

STEMdiff™ Gastrointestinal Supplement PK, StemCell™ Technologies

STEMdiff™ Gastrointestinal Supplement UB, StemCell™ Technologies

STEMdiff™ Intestinal Organoid Basal Medium, StemCell™ Technologies

STEMdiff™ Intestinal Organoid Supplement, StemCell™ Technologies

StemPro™ Accutase™ Zelldissoziationsreagenz Gibco®, Life Technologies

Tetrahydrofuran, >99,5 % , AnalaR NORMAPUR® ACS, VWR® International

Triton X-100, T9284-100 mL, Sigma-Aldrich®

Trypsin-EDTA 0,25% Gibco®, Life Technologies

Trypsin-EDTA, 0,25 %, Gibco

TWEEN® 80, Sigma-Aldrich®

Universal-Agarose, peqGOLD, VWR® International

Y-27632 Dihydrochlorid, (ROCK-Inhibitor), PeproTech®

### 5.1.4 Antikörper

#### 5.1.4.1 Primärantikörper

Anti-CD31 produced in sheep AF806, R&D Systems

Anti-GFAP produced in rabbit AB5804, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Anti-Nanog produced in mouse ab62734, abcam

Anti-Oct-4 produced in rabbit ab181557, abcam

Anti-Occludin produced in rabbit EPR20992, abcam

Anti-MUC2 produced in mouse MCA1743, Bio-Rad

Anti-  $\alpha$  -SMA produced in mouse ab54723, abcam

Anti-FoxA2 produced in rabbit ab256493, abcam

Anti-CDX2 produced in mouse, OT11A3, TrueMAB™

Anti-Oct-4-PE produced in mouse 560186, BD Biosciences

#### 5.1.4.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit A21206, Invitrogen™

Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse A11001, Invitrogen™

Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat A11006, Invitrogen™

Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Sheep A21099, Invitrogen™

Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse A11031, Invitrogen™

Alexa Fluor® 647 Chicken Anti-Rabbit A21443, Invitrogen™

Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Rat A21247, Invitrogen™

### 5.1.5 Primer: Forward Reverse

**CDX2** TTCACTACAGTCGCTACATCACCA CTGCGGTTCTGAAACCAGATT

**EPHB2** CTGCAGGGCCAGGAATTTG CACCCTGTGGTTGTCCAGTGTTA

**FOXA2** GGTGTACTCCCGGCCCATTA CAGAGTTAGCCGGGCCTGAA

**GAPDH** GCAAGAGCACAAGAGGAAGAG TCTACATGGCAACTGTGAGGA

**LGR5** ATGCTGGAATGTTTCAGGCTCA CAGCCATCAAGCAGGTGTTCA

**LYSOZYM** CCGTGATCCACAAGGCATTA GAGTTAACTCCACAACCTTGAACA

**MUC2** CAACCAGCACGTCATCCTGAA GATGCAAATGCTGGCATCAAAG

**Nanog** GCAACCAGACCCAGAACATCC CCAAGGCAGCCTCCAAGTCAC

**Oct-4** AGAAGGGCAAGCGATCAAGC AGGGACCGAGGAGTACAGTG

**SOX17** CTGCAGGCCAGAAGCAGTGTTA CCCAAACTGTTCAAGTGGCAGA

**VILLIN1** GCTTGGCAACTCTAGGGACTGG TGAGGTTGCTGTTAGCATTGAACAC

### 5.1.6 Zelllinien und Medien

Zelllinie		Medium
<b>HeLa</b>	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), ThermoFisher Scientific 2 % FBS 1 % P/S (Penicillin/ Streptomycin)
<b>Caco-2</b>	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), ThermoFisher Scientific 2 % FBS 1 % P/S
<b>HepG2</b>	Humane Hepatozelluläres Karzinom-Zelllinie	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), ThermoFisher Scientific 2 % FBS 1 % P/S
<b>HT29</b>	Humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), ThermoFisher Scientific 2 % FBS 1 % P/S
<b>HUVEC-GFP</b>	Humane Nabelschnurvenenendothelzellen mit Expression von GFP, (PB-CAP-001GFP, PeliBioTech), P8-12	Endothelial Cell Growth Medium Kit classic (GFP/RFP), PeliBioTech
<b>HSIEC</b>	Humane Dünndarmepithelzellen (P10756, Innoprot), P2-10	Epithelial Cell Pro-Conditioned Medium Kit (EpiPro), Innoprot

<b>HSIMEC</b>	Humane Dünndarmendothelzelle (P10753, Innoprot), P2-5	Endothelial cell medium Kit (ECM), Innoprot
<b>HSIF</b>	Humane Dünndarmfibroblasten (P10760, Innoprot), P2-9	Fibroblast Medium Kit (FM), Innoprot
<b>HISMC</b>	Humane intestinale Dünndarmmuskelzellen (P10751, Innoprot), P2-9	Smooth Muscle Cell Medium Kit (SMCM), Innoprot
<b>HA</b>	Humane Astrozyten (1800, Provitro GmbH), Passage 5-8	Astrozytenmedium Kit (AM) , Provitro GmbH 2 % FBS 1 % P/S
<b>HBVP</b>	Humane vaskuläre Hirnperizyten (1200, Provitro GmbH), Passage 5-8	Perizytenmedium Kit (PM), Provitro GmbH 2 % FBS 1 % P/S
<b>hCMEC/D3</b>	Humane Mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (SC066, Merck), Passage 5-8	Endothelial Cell Basal Medium 2 (EBM2), PromoCell 125 µl Ascorbinsäure 125 µl bFGF 125 µl EGF 125 µl IGF-1 125 µl VEGF 1 % P/S 2,5 % FBS 0,55 µM Hydrocortison
<b>HM</b>	Immortalisierte humane Mikroglia (P10354-IM, Innoprot), Passage 2-8	Mikroglia-medium Kit (MM), Innoprot 5 % FBS 1 % P/S
<b>HD11</b>	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC), Bereitgestellt von Prof. Dr. med. Jochen Utikal, DKFZ Heidelberg	mTeSR™ Plus Basalmedium, Stemcell Technologies 1 µg/ml Doxycyclin-hyclat 50 µg/ml Normocin
<b>WTC11NGN2</b>	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) mit einem Doxycyclin-induzierbaren Promoter zur Expression von NGN2, Bereitgestellt von Prof. Dr. Peter St George-Hyslop,	mTeSR™ Plus Basalmedium, Stemcell Technologies 1 % P/S
<b>ReNcell VM-Zellen</b>		ReNcell VM-Medium: DMEM/F12 mit GlutaMAX B27 Zusatz (ohne Vit.A)

---

Heparin  
P/S  
2-Mercaptoethanol  
cAMP  
GDNF

---

### 5.1.7 Software und Online-Plattformen

Anaconda, Inc. Python

Arduino IDE 2.3.2, GutHub

Autodesk CFD 2024

Autodesk Fusion 360

Autodesk Inventor Professional 2022

CETONI peRISYS Schlauchpumpensoftware

ChatGPT

ChemDraw Professional 20.0

GraphPad, Prism 10

Leica LasX3.5.7

MADLAB R2023b, EZcalcium

Mass-Up v1.0.14, sing-group <sup>[451]</sup>

Microsoft Office 365

PumpControl Software, ibidi

Smart SERVIER MEDICAL ART

TopSpin, NMR Data Analysis, Bruker

Zetasizer Software v3.30, Malvern Panalytical

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Synthesevorschriften

#### 5.2.1.1 GelMA Synthese

1 g Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom, 0,266 mmol NH<sub>2</sub>-Gruppen, 1 Äq.) wurde zunächst in 10 mL PBS bei 50 °C unter Rühren gelöst. Anschließend wurde Methacrylsäureanhydrid (siehe Tabelle 12) langsam zugegeben und die Reaktionslösung bei 50 °C für 2 h gerührt. Die Lösung wurde anschließend mit 10 mL DPBS<sup>-/-</sup> verdünnt, in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) überführt und 7 d bei 40 °C gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert, wobei zweimal täglich das Wasser gewechselt wurde. Die gereinigte Lösung wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der dann bei -20 °C gelagert wurde.

*Tabelle 12: Menge an Methacrylsäureanhydrid (MAA) pro Gramm Gelatine*

<b>Funktionalisierungsgrad</b>	<b>MAA n [mmol] / 1 g Gelatine</b>	<b>MAA V [μl] / 1 g Gelatine</b>
<i>Low (1 Äq.)</i>	0,266	39,5
<i>Medium (8 Äq.)</i>	2,128	316
<i>High (20 Äq.)</i>	7,98	1185

#### 5.2.1.2 GelNB Synthese

Norbornencarboxylsäure (NBCA, siehe Tabelle 13) wurde in 20 mL MES-Puffer bei pH 5-6 gelöst, dann wurde EDC-HCl unter Rühren hinzugegeben. Anschließend wurde *N*-Hydroxysuccinimid (siehe Tabelle 13) beigefügt und für weitere 5 min gerührt. Das gewählte molare Verhältnis von Carbonsäure, EDC-HCl und NHS war hier 1:2:1 (siehe Tabelle 13). Nach Zugabe von Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom, 0,266 mmol NH<sub>2</sub>-Gruppen, 1 Äq.) wurde der pH-Wert über 10 M NaOH auf 7,5 eingestellt und über Nacht bei 50 °C rühren gelassen. Die Lösung wurde anschließend in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) überführt und 7 d bei 40 °C gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert, wobei zweimal täglich das Wasser gewechselt wurde. Die gereinigte Lösung wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der dann bei -20 °C gelagert wurde.

Tabelle 13: Menge an Chemikalien pro Gramm Gelatine

Funktionalisierungsgrad	NCA n [mmol]/ 1 g Gelatine	NCA V [ $\mu$ l]/ 1 g Gelatine	EDC-HCl m [mg] / 1 g Gelatine	NHS m [mg] / 1 g Gelatine
Low (0,3 Äq.)	0,0798	9,768	30,594	9,186
Medium (2 Äq.)	0,532	65,10	203,97	61,23
High (10 Äq.)	2,66	325,51	1019,84	306,14

### 5.2.1.3 GelS-Synthese

10 g Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom, 0,266 mmol NH<sub>2</sub>-Gruppen, 1 Äq.) wurde bei 40 °C in 100 mL entgastem 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer (pH 10) zusammen mit einer Spatelspitze EDTA gelöst. Anschließend wurde *N*-Acetylhomocysteinethiolacton (AHCT, siehe Tabelle 14) hinzugegeben und die Reaktion 3 h unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Aufreinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei 40 °C gegen entgastem dH<sub>2</sub>O mit einer Spatelspitze EDTA, wobei zweimal täglich das Wasser gewechselt wurde. Die gereinigte Lösung wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der unter Stickstoffatmosphäre bei -80 °C gelagert wurde.

Tabelle 14: Menge an *N*-Acetylhomocystein-thiolacton (AHCT) pro Gramm Gelatine

Funktionalisierungsgrad	AHCT n [mmol] / 1 g Gelatine	AHCT m [mg] / 1 g Gelatine
Low (1 Äq.)	0,266	42,4
Medium (5 Äq.)	1,33	211,8

### 5.2.1.4 GelNB-S Synthese

1 g GelNB (*Low oder Med*) wurde in 20 ml entgastem 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 10) bei 40 °C mit einer Spatelspitze EDTA gelöst. Die Reaktion wurde unter Schutzgas (Stickstoff) durchgeführt, während schrittweise *N*-Acetylhomocysteinethiolacton (AHCT) (siehe Tabelle 15) mit einer Spritze tropfenweise zugegeben wurde. Die Lösung wurde für 3 Stunden bei 40 °C unter Schutzgas gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit 20 ml destilliertem Wasser verdünnt und in 14 kDa Dialyseschläuche umgefüllt. Die Aufreinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei 40 °C gegen entgastem dH<sub>2</sub>O mit einer Spatelspitze EDTA,

wobei zweimal täglich das Dialysewasser gewechselt wurde. Die gereinigte Lösung wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der unter Stickstoffatmosphäre bei -80 °C gelagert wurde.

Tabelle 15: Menge an *N*-Acetylhomocystein-thiolacton (AHCT) pro Gramm GelNB (*Low/Med*)

Funktionalisierungsgrad	AHCT n [mmol] / 1 g GelNB	AHCT m [mg] / 1 g GelNB
Med (3,5 Äq.) (aus GelNB Low)	0,9	148,4
High (10 Äq.) (aus GelNB Med)	2,7	423,6

### 5.2.1.5 GelNB-DOX Synthese

Für die GelNB-DOX Synthese wurde zunächst 500 mg GelNB bei 37 °C in 10 mL dH<sub>2</sub>O unter Rühren gelöst. Anschließend wurden 0,8 mL NaOH (0,1M) hinzugegeben und 5 min weiter gerührt. Danach wurden 0,05 g Bernsteinsäureanhydrid (Succinic Anhydrid) hinzugefügt und 24 h bei 40 °C unter Rühren zur Reaktion gebracht. Nach der Reaktion wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert mittels Natriumhydroxid auf 7,4 eingestellt. Die Reaktion wurde dann 1-2 Tage bei 40 °C gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde.

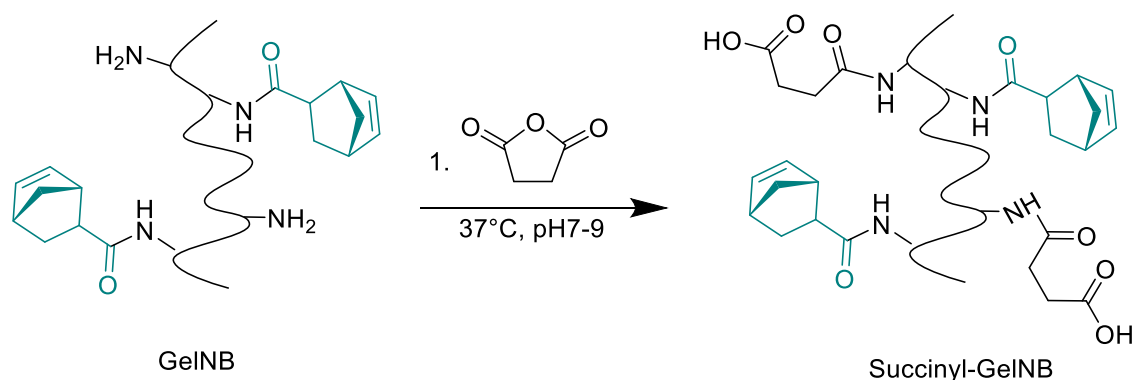


Abbildung 176: Synthese von Succinyl-GelNB über die Reaktion von Bernsteinsäureanhydrid (1) mit den freien NH<sub>2</sub>-Gruppen von GelNB.

Nach der Aufreinigung des Succinyl-GelNB Produktes, wurden 500 mg davon in 10 mL MES-Puffer (0,5 M) bei 50 °C und pH 6, gelöst. Anschließend wurden 102 mg EDC-HCL zur Lösung hinzugegeben und für weitere 5 min gerührt. Dann wurden 31 mg NHS (*N*-Hydroxysuccinimid)



16 h gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde für 2 d in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) gegen 10 mM HCl-Lösung dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde.<sup>[452]</sup>

#### 5.2.1.8 CoLS Synthese

0,5 g Kollagen wurde in 100 mL Essigsäure (17,4 mM ) unter Rühren gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt, dann wurde 2-Iminothiolan (2IT) (im Verhältnis 5–20:1, [2IT]:[Lys]) zusammen mit 1,4-Dithiothreitol (DTT) (im Verhältnis 50:50, [DTT]:[2IT]) zugegeben. Die Lösung wurde für 24 h gerührt und anschließend mittels Ethanol im 20-fachen Volumenüberschuss gefällt, zentrifugiert und der Rückstand luftgetrocknet. Es wurde ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde.<sup>[384]</sup>

#### 5.2.1.9 Peptoid Synthese

300 mg Fmoc-geschütztes Rink-Amidharz (AM-Harz LL 100-200 Maschen, 0,61 mmol/g) wurde über Nacht in 2 mL DMF in Filterspritzen auf einem Schüttler quellen gelassen. Anschließend wurde das Harz 3 x 5 min lang mit je 2 mL DMF gewaschen und 3 x 5 min mit je 2,1 mL 20 % Piperidin in DMF entschützt. Danach wurde das entschützte Harz erneut 3 x 5 min sorgfältig mit je 2 mL DMF gewaschen. Die Acylierung des Harzes wurde mit 801 µL Bromessigsäure (156 mmol, 20 Äq.) und 251 µL Diisopropylcarbodiimid (156 mmol, 20 Äq.) in insgesamt 2 mL DMF für 30 min durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die Spritzen 3 x 5 min lang mit je 2 mL DMF gewaschen. Für die Kupplung mit den verschiedenen Submonomeren wurden das Harz in den Spritzen 60 min mit 2 mL einer 1 M Submonomer-Lösung in DMF inkubiert. Vor der nächsten Acylierung wurden die Spritzen erneut gründlich 3 x 5 min lang mit 2 mL DMF gewaschen. Rhodamin B wurde durch Übernacht-Inkubation mit 86,22 mg Rhodamin B (60 M, 10 Äq.), 27,8 µL Diisopropylcarbodiimid (156 mmol, 20 Äq.) und 27,5 mg (156 mmol, 20 Äq.) 1-Hydroxybenzotriazol in insgesamt 2 mL DMF gekoppelt. Nach der Kopplung des Farbstoffs wurden das Peptoid-Harz mit DMF bis zur Farblosigkeit der Waschlösung gewaschen. Im Anschluss wurde mindestens achtmal gründlich mit 2 mL DCM gewaschen. Zum Schluss wurde die endgültige Abspaltung des Peptoids vom Harz für 2 h mit 2 mL 95 % Trifluoressigsäure in DCM durchgeführt. Die fertigen und abgespaltene Peptoide wurden unter Stickstoff getrocknet und anschließend für die weitere Verwendung in Wasser-Ethanol (2:1) gelöst. Alle Peptoide wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert.

#### 5.2.1.10 Nanogel-Synthese

Die Nanogele wurden über eine Wasser-in-Öl-Mikroemulsion (W/O) hergestellt. Das Volumenverhältnis zwischen wässriger Phase zu Tensid zu organischer Phase betrug 16,7:16,7:66,6. Für einen 5 mL Syntheseansatz wurden zunächst die wässrige und organische Phase getrennt angesetzt. Dabei bestand die wässrige Phase aus 835  $\mu$ L Hydrogel + 0,05 % (für GelNB + GelS bzw. GelNB-S) bzw. 0,5 % (für GelMA) (w/v) Lithiumphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat-Photoinitiator (LAP) in PBS und die ölige Phase aus einem Gemisch aus 3330  $\mu$ L n-Octan + 835  $\mu$ L Tensides (60:40, [Tween80]:[Span80]). Die wässrige Lösung und die organische Tensid-Emulsion wurden anschließend miteinander vermischt und für 15 min mit einem Ultraschall-Prozessor (Stufe 3, Sonifier, Cell Disruptor B15, Branson) homogenisiert, bis eine klare Lösung entstand, die für 30 min bei RT äquilibriert wurde. Um das Nanogel auszuhärten, wurde die Lösung 5 min mit einer Aushärtungslampe (OmniCure®) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 320 - 500$  nm, mit  $1 \text{ W/cm}^2$  und einem Abstand von 30 mm unter Rühren in einem Eisbad für mindesten 30 s bestrahlt. Nach der Polymerisierung wurden die fertigen Nanogele mit THF gefällt, 5 min bei 2000 g abzentrifugiert und der entstandenen Überstand abgenommen. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt. Die Nanogele wurden anschließend getrocknet und in 5 mL DPBS<sup>-/-</sup> mit dem Ultraschall-Prozessor für 15 min suspendiert. Die Lösung wurde gefriergetrocknet. Es wurde ein weißer styropor-/watteartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde.

#### 5.2.1.11 Peptoid Kupplung an Nanogele

Um Peptoide an die Oberfläche der Nanogele zu binden, wurden 25 mg/mL Nanogel in 2 mL DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und Peptoid (15 mM Peptoid-Lösung bzw. 9 mM P8-Lösung) zur Lösung gegeben. Ebenfalls wurden 0,03 % Photoinitiator (LAP) zur Lösung hinzugefügt und alles für 1 min bei  $0,5 \text{ W/cm}^2$  mit UV-Licht bestrahlt. Danach wurde die Lösung für 1 h weiter gerührt, über THF gefällt (ca. 10 mL) und mit 2000 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mehrfach mit THF gewaschen. Dieser Schritt wurde bis zur Farblosigkeit der Lösung wiederholt. Bei hydrophilen Peptoiden wurde nach der Aufreinigung zusätzlich eine Dialyse gegen DPBS<sup>-/-</sup> für 24 h durchgeführt oder die Lösung in 3 mL DPBS<sup>-/-</sup> durch Ultraschall gelöst und mit einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin, 50 kDa; PES) bei 4000 x g abzentrifugiert bis das Zentrifugat farblos erschien, um restliches ungebundene Peptoide vollständig zu entfernen. Das gekuppelte Nanogel wurden dann in 2 mL dH<sub>2</sub>O gelöst

und anschließend gefriergetrocknet. Es wurde ein pinker styropor-/watteartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde.

#### 5.2.1.12 Wirkstoffbeladung der GNG Nanogelee

Die Beladung der Nanogelee fand auf zwei verschiedenen Arten statt. Die Beladung von großen Molekülen wie Dextran, die im Netzwerk der Nanogelee eingeschlossen werden sollten, wurde während der Nanogelsynthese durchgeführt. Hierbei wurde die benötigte Konzentration des aktiven Moleküls in die wässrige Phase der W/O-Emulsion beigemischt und mit der Nanogelsynthese wie in Kapitel 5.2.1.10 beschrieben fortgeführt.

Für die Wirkstoffbeladung mit kleineren Molekülen, die über VdWK an die Nanogelee binden (DOX und DOP) wurden 20 mg/mL der fertig synthetisierten Nanogelee in 1 mL DPBS<sup>-/-</sup> gelöst, 5 mg/mL Wirkstoff hinzugegeben und die Lösung ÜN im Dunkeln bei RT rühren gelassen. Im Anschluss wurden die Nanogelee über THF (etwa 10 mL) gefällt und mit 2000 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut mit THF in Suspension gebracht. Dieser Schritt wurde bis zur Farblosigkeit der Lösung (oder mind. 3-mal) wiederholt. Bei hydrophilen Wirkstoffen wurde nach der Aufreinigung zusätzlich eine Dialyse gegen DPBS<sup>-/-</sup> für 24 h durchgeführt oder die Lösung in 3 mL DPBS<sup>-/-</sup> durch Ultraschall gelöst und mit einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin, 50 kDa; PES) bei 4000 x g abzentrifugiert bis das Zentrifugat farblos erschien, um restlichen ungebundenen Wirkstoff vollständig zu entfernen.

### 5.2.2 Material Charakterisierung

#### 5.2.2.1 Quellverhältnis von GelNB/GelS-Hydrogelen

Das Quellverhältnis der Hydrogelen wurde über ihre Massenzunahme analysiert. Hierfür wurden Hydrogelwürfel aus unterschiedliche Hydrogel Konzentrationen und Funktionalisierungsgraden in einer PDMS-Form (0,5 x 0,5 cm) hergestellt. Nach der Lyophilisation wurde das Trockengewicht bestimmt, und die Hydrogelproben in DPBS<sup>-/-</sup> bei Raumtemperatur für 48 h gequollen. Nach Entfernung von überschüssigem Wasser von der Oberfläche der Hydrogelee mit einem Tuch wurde das Gewicht der gequollenen Proben gewogen. Das Quellverhältnis der Hydrogelee wurde gemäß folgender Gleichung (siehe Formel 6) berechnet, wobei "Wtrocken" das Gewicht der lyophilisierten Hydrogelprobe und "Wgequollen" das Gewicht nach vollständigem Quellen darstellt.

$$\text{Massenquellverhältnis} = \frac{(W_{\text{gequollen}})}{(W_{\text{trocken}})} \quad (6)$$

#### 5.2.2.2 NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Hydrogelvorläufer wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  unter Verwendung eines 400 MHz NMR-Spektrometers (AVANCE 400, Bruker) aufgenommen. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Hydrogelvorläufer wurden bei einer Temperatur von 41,84 °C gemessen, um eine Gelierung der Probe während der Messung zu verhindern. Ihre chemischen Verschiebungen werden in Teilen pro Million ( $\delta/\text{ppm}$ ) angegeben und sind im Vergleich zur Tetramethylsilan (TMS)-Referenz verschoben. Die Beschreibung der Signale umfasst: s = Singulett, bs = breites Signal, dd = Dublett von Dublett, m = Multiplett.

#### 5.2.2.3 TNBSA-Assay zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrad der Hydrogelvorläufer

Der Anteil modifizierter freier Aminogruppen der synthetisierten Gelatinederivate wurde mittels des TNBSA-Assays bestimmt. Dazu wurden Lösungen von Gelatine, GelMA, GelNB, GelS und GelNB-S (jeweils 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in Natrium-Carbonat-Bicarbonat-Puffer (0,1 M, pH 8,5) vorbereitet. 500  $\mu\text{L}$  der Testlösungen wurden mit 250  $\mu\text{L}$  einer 0,02 %igen TNBSA-Lösung gemischt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Als Blank dienten 500  $\mu\text{L}$  der Testlösungen, zu der zuerst 125  $\mu\text{L}$  1 M HCl und danach 250  $\mu\text{L}$  der 0,02 %igen TNBSA-Lösung gegeben wurden. Nach der Inkubationszeit wurden auch die Testlösungen mit 125  $\mu\text{L}$  1 M HCl versetzt. Anschließend wurde zu allen Proben 250  $\mu\text{L}$  10 %ige SDS-Lösung hinzugegeben und die Absorption bei 335 nm über ein Photometer (SmartSpec 3000) gemessen. Der Funktionalisierungsgrad (DoF) wurde aus dem Verhältnis der gemessenen Absorptionswerte von funktionalisierter und unfunktionalisierter Gelatine gemäß folgender Gleichung berechnet.

$$\text{DoF [\%]} = 1 - \frac{(A(\text{Gelatinederivat}))}{((A(\text{Gelatine})))} * 100\% \quad (7)$$

#### 5.2.2.4 Ellman's Assay zur Bestimmung freier Thiol-Gruppen von Nanogelen

Der Anteil freier Thiol-Gruppen in photopolymerisierten Nanogelen wurde mittels des Ellman's Assays bestimmt. Als Kontrolle dienten entsprechende GelS-Hydrogele ohne GelNB-

Zusatz, die durch Abkühlen der Vorläuferlösung auf 4 °C für 20 min hergestellt wurden. Die Nanogele und die entsprechenden GelS-Kontrollen wurden in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4, 1 mM EDTA) zusammen mit dem Ellman's Reagenz (0,2 mM) bei Raumtemperatur für 6 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 200 µL der Lösung in eine 96-Well-Platte überführt, und die Absorption bei 412 nm gemessen (SpectraMax iD3, Molecular Devices). Der Anteil nicht-reagierter Thiol-Gruppen wurde gemäß folgender Gleichung berechnet.

$$\text{Freie Thiolgruppen \%} = \frac{(A_{\text{Nanogel}})}{(A_{\text{GelS}} - \text{Kontrolle})} * 100\% \quad (8)$$

#### 5.2.2.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur Bestimmung der Nanogelgröße

DLS-Messungen wurden durchgeführt, um die Größe und den PDI der synthetisierten Nanogel zu bestimmen. Die Messungen wurden spektrometrisch mit dem Nanoseries ZetaSizer (Malvern, United Kingdom) mit einem He-Ne-Laser (633 nm) ausgeführt. Jede Messung wurde in Triplikaten mit je 15 Messungen pro Durchgang in DPBS<sup>-/-</sup> bei RT durchgeführt. Im Anschluss wurde ein Mittelwert aus den Maxima der Messungen berechnet.

#### 5.2.2.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die GelNB + GelS Hydrogele wurden in Würfelformen (0,5 x 0,5 cm) aus PDMS hergestellt und anschließend gefriergetrocknet. Danach wurden 1-2 mm dicke Scheiben mit einem Skalpell abgetrennt, welche dann mit Kohlenstoffklebern auf einen REM-Träger aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Proben mit 3 nm Platin beschichtet und mit einem TESCAN VEGA3 SBU und den folgenden Einstellungen mikroskopiert.

SEM HV: 20.0 kV                      View field: 134 µm                      Detector: InLens

DoT: SE                                  SEM Mag: 500 x – 2.00 kx

Die Nanogele wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop Zeiss SUPRA 40 VP Gemini mikroskopiert. Hierfür wurden die Nanopartikel mittels Dispenser in feinen Tröpfchen auf die REM-Träger aufgesprüht, luftgetrocknet und mit folgenden Einstellungen mikroskopiert.

EHT: 1.00 kV                      View field: 30 µm                      Detector: InLens

DoT: SE2                                  SEM Mag: 120 00 kx

### 5.2.2.7 FT-IR Spektroskopie

Die FT-IR-Messungen wurden mit einem ALPHA II FT-IR-Spektrometer im mittleren Infrarotbereich ( $\lambda = 400$  bis  $4000 \text{ cm}^{-1}$ ) mit 1-2 mg der trockenen Hydrogele, Nanogele oder Gelatine durchgeführt.

### 5.2.2.8 Wirkstoff Beladungseffizienz der GNG

Die quantitative Bestimmung der Konzentration von DOX und DOP in GNG und P@GNG erfolgt mithilfe einer Kalibrierungskurve von freiem DOX und DOP. Zur Erstellung der Kalibrierungskurve wurde die DOX -Lösung in einer Serie von 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000  $\mu\text{g/mL}$  und die DOP-Lösung in einer Serie von 19,5; 39,1; 78,1; 156,3; 312,5; 625; 1250; 2500  $\mu\text{g/mL}$  in eine 96-Well-Platte aufgetragen und die Absorption bei 480 nm für DOX und 280 nm DOP unter Verwendung eines Mikroplattenspektrophotometers (Mikroplatten-Reader SpectraMax® iD3 Molecular Devices) gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass die Kalibrierungskurve im Konzentrationsbereich der Nanogel Beladungskonzentration linear verlief. Der Korrelationskoeffizient der Kalibrierungsgerade lag somit höher als 0,99. Die Absorption der Nanogele wurde mit 1 mg/mL Lösungen mit den für DOX und DOP verwendeten Wellenlängen gemessen. Die Beladungseffizienz der Nanogele wurde dann durch den Abgleich der Absorption vor dem Aufreinigen der beladenen Nanogele (A0) und der Absorption der Nanogelen nach der Aufreinigung (A1) berechnet. Die Beladungseffizienz (DLE (%)) von DOX und DOP wurde mit folgender Gleichung bestimmt.

$$DLE [\%] = \frac{(A0 - A1)}{(A0)} * 100 \quad (9)$$

### 5.2.2.9 Wirkstofffreisetzung von GNG

Das P44@GNG[DOX] wurden jeweils in den Dispersionspuffern PBS (0,01 M, pH 7,4), Acetatpuffer (0,01 M, pH 4,5) oder mit 1 mg/mL Collagenase in PBS (0,01 M, pH 7,4) gelöst und in Dialysegefäße überführt. Die Dialysegefäße wurde in 45 mL des jeweiligen Dispersionspuffers in Reaktionsgefäße platziert und unter Rühren bei 37 °C inkubiert. Nach den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden 1 ml der Probelösung entnommen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 480 nm quantifiziert (A1) und mit dem Zeitpunkt 0 h (A0) verglichen. Die entnommene Lösung wurde anschließend wieder zurückgeführt. Die Wirkstofffreisetzung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Wirkstofffreisetzung}[\%] = \frac{(A0 - A1)}{(A0)} * 100 \quad (10)$$

### 5.2.3 Zellkultivierung der adhärennten Zellkulturen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei -196 °C im Stickstofftank gelagert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die entsprechenden Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 15 mL vorgewärmtem Medium gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um das im Einfriermedium enthaltene und für die Zellen schädigende DMSO zu entfernen.

Passagiert wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Die Zellen wurden hierfür zunächst mit 1xDPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und über 1 mL Trypsin-EDTA (zur Spaltung der Adhäsionsproteine Arginin und Lysin) durch 3 - 5 min Inkubation bei 37 °C abgelöst. Durch anschließendes Verdünnen mit FCS-haltigem Medium wurde das Enzym gestoppt und ein Teil der Zellen in einer neuen Zellkulturflasche mit 15 mL Medium weiterkultiviert. Das Auszählen der Zellen für Versuche wurde durch eine Neubauer Zählkammer durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension auf die Zählkammer pipettiert, ausgezählt und so die Volumenkonzentration der Suspension ermittelt.

Um nicht mehr benötigte Zellen zu lagern, wurden sie bei einer Konfluenz von 80 - 90 % wie zuvor beschrieben abgelöst, und das Kultivierungsmedium abzentrifugiert (1200 U/min, 3 min). Das erhaltene Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen an Einfriermedium suspendiert, um eine Zellzahl von 10<sup>6</sup> Zellen pro ml zu erreichen. Je 1 mL der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in einen mit Isopropanol gefüllten, 4 °C kalten Einfrierbehälter gesetzt, der dann auf -80 °C heruntergekühlt wurde. Nach 24 h wurde das Kryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt und dort bei -196 °C bis zur erneuten Verwendung der Zellen gelagert.

### 5.2.4 Zellkultivierung von iPSC (HD11 und WTC11NGN2)

6-Well-Platten zur Kultivierung der iPSC-Linien HD11 und WTC11NGN2 wurden mit Matrigel hESC in einer Verdünnung von 1:100 in 1 ml DMEM/F12 (für HD11) oder in 1 ml KnockOut™

DMEM (für WTC11NGN2) für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur beschichtet. Danach wurden die Platten mit 1 ml DMEM/F12 (für HD11) oder in 1 ml KnockOut™ DMEM (für WTC11NGN2) gewaschen und mit 2 mL Medium (mTeSR™1) befüllt.

Für die iPSC-Linie HD11, die in Kolonien kultiviert wurden, wurde ein manuelles Passagieren durchgeführt, wenn die Mehrheit der Kolonien groß, kompakt und dichte Zentren im Vergleich zu ihren Rändern aufwiesen. Mit einer Pipettenspitze wurden die Kolonien steril unter einem Mikroskop in 50 – 200 µm große Aggregate zerteilt und ein Teil in die frisch beschichtete 6-Well-Platte überführt. Die Zellen wurden dann gleichmäßig durch Schwenken im Well verteilt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Alle 2 Tage wurden differenzierte Ausläufer der Kolonien mit einer Pipettenspitze unter einem Mikroskop entfernt. Danach wurden die Kolonien zweimal mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen und im spezifischen Nährmedium weiterkultiviert.

Die iPSC-Linie WTC11 NGN2 wurde als Monolayer kultiviert. Die Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von 80 %. Die Zellen wurden hierfür zunächst einmal mit 2 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 1 ml StemPro™ Accutase™ enzymatisch für 2 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre abgelöst. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (900 U/min, 5 min) und das Zellpellet in DPBS<sup>+/+</sup> suspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und zur Weiterkultivierung (Zellzahl 3×10<sup>5</sup>) in die zuvor beschichteten Wells einer 6-Well-Platte im entsprechenden Medium ausgesät. Bei der Passagierung wurde am ersten Tag ROCK-Inhibitor mit einer Konzentration von 10 µM hinzugefügt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

### 5.2.5 Differenzierung und Passagieren intestinaler Organoide

Für die Differenzierung der Stammzellen zu intestinalen Organoiden wurden 6000 hiPSC Zellaggregate zwischen 50 – 200 µm Größe in einer mit Matrigel beschichteten 24-Well-Platte 24-48 h kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 85-90 % erreicht hatten (Tag 0).

An Tag 0, 1 und 2 wurde dann 600 µL frisches 37 °C warmes DE Differenzierungsmedium (STEMdiff™ Endoderm Basal Medium + 1 % STEMdiff™ Definitive Endoderm Supplement CJ) beim Mediumwechsel hinzugegeben. An den Tagen 3-8 wurden dann je 500 µL 37 °C vorgewärmtes MH Medium (STEMdiff™ Endoderm Basal Medium + 1 % STEMdiff™ Gastrointestinal Supplement PK + 1 % STEMdiff™ Gastrointestinal Supplement UB) beim

Mediumwechsel hinzugegeben. Die Sphäroide, die sich ab Tag 4 bildeten, wurden täglich mit einer 1 mL Pipette vorsichtig geerntet und etwa 50 Sphäroide zusammen in 50  $\mu$ L Matrigel Dome (25  $\mu$ L Matrigel + 25  $\mu$ L STEMdiff™ Intestinal OGM) zu Organoiden kultiviert. Die Matrigel-Zell-Dome wurden zügig in 24-Well-Platten pipettiert und 10 min im Inkubator bei 37 °C oder 20 min bei RT ausgehärtet. Anschließend wurden die Wells vorsichtig mit 500  $\mu$ L STEMdiff™ Intestinal OGM aufgefüllt.

Alle 7-10 Tage wurden die differenzierten Organoide passagiert. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen und die Dome in 1 mL 3dGRO™ Organoid Dissociation Reagenz für 3 min inkubiert. Danach wurden die Matrigeldome vorsichtig mit einer 1 mL Pipette durch Auf- und Abpipettieren aufgebrochen und mit kaltem DMEM/F-12 in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Darin wurden die Organoide mit einer 1 mL Pipette durch Auf- und Abpipettieren (5–10-mal) vorsichtig zerkleinert (Größe 100 – 500  $\mu$ m). Die Organoidfragmente setzen sich dann für 10 min auf Eis bei leichtem Drehen des Röhrchens am Boden ab und der Überstand konnte entnommen werden. Anschließend wurden 2 mL kaltes DMEM/F-12 hinzugegeben und die Fragmente bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird erneut in Medium gelöst und mit Matrigel in neue Dome wie zuvor beschrieben weiter kultiviert.

### 5.2.6 Differenzierung von Neuronen aus ReNcell VM-Zellen

Die Differenzierung der ReNcell VM-Zellen verlief nach Protokoll des Verkäufers und wurde in Kollaboration mit M. Sc. Hannah Wunderlich aus dem Arbeitskreis von Dr. Kristen Kozielski (Professur für Neuroengineering Materials, Technische Universität München) durchgeführt. Hierfür wurden eine 96-Well Platte mit Laminin (20  $\mu$ g/mL in DMEN/F12) bei 37 °C für 4 h beschichtet. Anschließend wurden  $3 \times 10^3$  Zellen pro Well für 24 h in ReNcell™ Kultivierungsmedium mit 20 ng/mL FGF-2 und 20 ng/mL EGF kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt ohne die Wachstumsfaktoren FGF-2 und EGF hinzuzufügen. Durch das Entfernen der Wachstumsfaktoren bFGF und EGF aus dem Gewebekulturmedium wurde die Differenzierung eingeleitet. Dies führte zu einem Wachstumsstillstand der Zellen und innerhalb von 2-3 Tagen begannen sie, sich in eine neuronalere und gliale Zellmorphologie zu differenzieren, die unter Phasenkontrastmikroskopie sichtbar wurde. Für insgesamt zwei Wochen wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt, ohne die Wachstumsfaktoren hinzuzufügen. Danach wurden die Untersuchungen an den differenzierten Neuronen gestartet.<sup>[323,324]</sup>

### 5.2.7 Zelleinbettung in Gelatine-basierten Hydrogelen

HSIF und HISMC (Passage 2-10,  $10^6$  Zellen/mL im Hydrogel) wurden in Hydrogelvorläuferlösungen von GelMA und GelNB/GelS mit einem Anteil von 0,3 % (GelMA) bzw. 0,03 % (GelNB-S) (w/v) des Photoinitiators LAP und Medium suspendiert. Anschließend wurden jeweils 200  $\mu$ L der Hydrogelvorläuferlösung in einen 8-Well- $\mu$ -slide (ibiTreat, ibidi) überführt und durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>, 30 sec, Omnicure S2000, igb-tech) ausgehärtet. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogele mit 200  $\mu$ L Medium überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Regelmäßige Medienwechsel wurden alle 2 - 3 Tage durchgeführt.

### 5.2.8 Zelleinbettung in Kollagen-basierten Hydrogelen

HSIF und HISMC (Passage 2-10,  $10^6$  Zellen/mL) wurden in 2 mg/mL Kollagen und Medium auf Eis gemischt und anschließend mit 0,5 % 1 M NaOH neutralisiert. 200  $\mu$ L der Lösung wurden in 8-Well  $\mu$ -slide (ibiTreat, ibidi) überführt und 30 min im 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre thermisch ausgehärtet. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogele mit 200  $\mu$ L Medium überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Regelmäßige Medienwechsel wurden alle 2 - 3 Tage durchgeführt.

Die Einbettung von Photocol wurde analog durchgeführt, jedoch wurden die Gele nach der thermischen Aushärtung zusätzlich photochemisch mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>, 30 sec, Omnicure S2000, igb-tech) ausgehärtet.

### 5.2.9 Zelleinbettung in Fibrinhydrogelen

HSIF und HISMC (Passage 2-10,  $10^6$  Zellen/mL) wurden in 2 mg/mL Fibrinogen und Medium auf Eis gemischt und anschließend 0,15 U/ml Aprotinin versetzt. 200  $\mu$ L der Lösung wurden in 8-Well  $\mu$ -slide (ibiTreat, ibidi) überführt und 5 min bei RT ausgehärtet. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogele mit 200  $\mu$ L Medium überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Regelmäßige Medienwechsel wurden alle 2 - 3 Tage durchgeführt.

### 5.2.10 Zelleinbettung in Mixhydrogelen

HSIF und HISMC (Passage 2-10,  $10^6$  Zellen/mL in Medium) wurden mit den Bestandteilen der Mixhydrogele gemischt. Dabei wurden die Zellen je nach Gelzusammensetzung zunächst mit den gewärmten Gelatine-basierten Hydrogelen, 0,3 % bzw. 0,03 % (w/v) LAP, NaOH und

1 mg/mL Fibrinogen gemischt und die gekühlten Hydrogel-Bestandteile 1 mg/mL Kollagen oder 1 mg/mL Photocol mit 0,075 U/ml Aprotinin und 25 % (v/v) Matrigel getrennt angesetzt, zuletzt wurden die gekühlten und gewärmten Bestandteile zügig zusammengeführt und sofort in 200 µL in 8-Well µ-slide (ibiTreat, ibidi) überführt. Die Gele wurden zunächst enzymatisch und thermisch und anschließend photochemisch wie zuvor beschrieben ausgehärtet. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogele mit 200 µl Medium überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Regelmäßige Medienwechsel wurden alle 2 - 3 Tage durchgeführt.

### 5.2.11 Visualisierung von Zellen

Für die Aufnahme der Bilder wurde ein Leica STELLARIS 5 8119637 konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Leica Application Suite (LAS X) aufgenommen und bearbeitet. Für die Mikroskopie in 8-Well-µSlides wurden 2x10<sup>4</sup> Zellen pro Well ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert, bevor die Zellen behandelt wurden.

Mikroskop:	Leica STELLARIS 5 8119637
Objective:	ACS APO 63 x 1.15 OIL, ACS APO 20 x 1.15 und ACS APO 10 x 1.15
Format:	1024 x 1024 Pixel (400 Hz)
Lochblende:	Airy 1,00 AU
Line Average:	4-6
Laser:	405 nm 10%, WLL 80%
Hybriddetektor:	Trans PMT, HyD 1-3

#### 5.2.11.1 Zellkern Markierung mit Hoechst33342

Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen mit Hoechst33342 markiert. Hierfür wurde 5 min vor der Mikroskopie eine Hoechstlösung von 2 µg/mL in Medium hinzugegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Anschließend konnten die Proben visualisiert werden ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 405 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 410 - 450 nm).

#### 5.2.11.2 Mitochondrien Markierung mit MitoTracker™ Green

Zur Visualisierung der Zellmitochondrien wurden Zellen mit MitoTracker™ Green markiert. Hierfür wurden die Zellen mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 125 nM MitoTracker™ Green für

20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen der Färbelösung wurde erneut 2-mal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Anschließend konnten die Proben visualisiert werden ( $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$ ).

#### 5.2.11.3 Zytosol Markierung mit CellTracker™

Zur Visualisierung des Zytosols wurde die Zellen mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen, und mit 10  $\mu\text{M}$  CellTracker™Green CMFDA oder CellTracker™Red CMTPX für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen der Färbelösung wurde erneut 2-mal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Anschließend konnten die Proben visualisiert werden. (Green:  $\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 498 - 525 \text{ nm}$ ), (Red:  $\lambda_{\text{exc}} = 577 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 580 - 620 \text{ nm}$ ).

#### 5.2.11.4 Zytoskelett Markierung mit Phalloidin-FITC

Zur Markierung der Aktinfilamente des Zytoskelettes wurden die Zellen mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit einer 4 %igen (w/v) PFA-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach einem erneuten Waschen mit eisgekühltem DPBS<sup>-/-</sup> wurden das Aktinzytoskelett mit 100 mM Phalloidin-FITC für 40 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Nach Entfernen der Färbelösung wurde einmal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und dann frisches DPBS<sup>-/-</sup> hinzugefügt. Anschließend konnten die Proben visualisiert werden ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 570 - 573 \text{ nm}$ ).

#### 5.2.11.5 Immunhistologische Markierung

##### 5.2.11.5.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellproben

Die Zellen wurden zur Fixierung zweimal mit kaltem DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und anschließend mit 4 %iger PFA-Lösung für 10 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und zur Permeabilisierung mit 0,1 %igen Triton-X-Lösung für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit DPBS<sup>-/-</sup> wurden die Zellen weiter fluoreszent markiert oder bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

##### 5.2.11.5.2 Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen

Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Zellen mit CasBlock™ für 30 min bei Raumtemperatur blockiert und die Zellen mit primärem Antikörper in CasBlock™ (1:1000) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Zellen zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und der sekundäre Antikörper gelöst in CasBlock™ (1:500) hinzugefügt und ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die

immunmarkierten Zellen zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und visualisiert. Eine Liste der verwendeten Antikörper ist in Kapitel 5.1.4 dargestellt.

Um eine verstärkte Expression des intestinalen Proteins in intestinalen Zellen nachzuweisen und um die Spezifität der Antikörper zu bestimmen, wurden die verwendeten Antikörper Anti-CDX2 und Anti-FoxA2 auch an anderen Zelllinien getestet (Kapitel 8.4).

#### **5.2.12 Mikroskopie der Nanopartikel in 2D-Zellkulturen**

Für die Beobachtung einer Aufnahme der Nanopartikel in 2D-Zellkulturen wurden in 8-Well- $\mu$ Slides jeweils 200  $\mu$ l einer Zellsuspension aus  $10^5$  Zellen pro mL ausgesät und 24 h in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Als Kontrolle blieb ein Well unbehandelt. Im Anschluss wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 200  $\mu$ l pro Well der jeweiligen Nanopartikellösung behandelt und erneut 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> - Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden zum Teil Zellorganelle wie zuvor beschrieben markiert und daraufhin mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen beobachtet.

#### **5.2.13 Mikroskopie von Gadolinium-basierten Nanopartikeln in 2D-Zellkulturen**

Zur Visualisierung der Zellaufnahme und Wirkweise der Photosensibilisatorhaltigen Nanopartikeln wurden die Zellen in 8-Well- $\mu$ Slides ausgesät und nach einem Tag Kultivierung mit Nanopartikeln behandelt. Als Kontrolle blieb ein Well unbehandelt. Nach einem Tag Inkubation wurde die Zellen mit Hoechst33342 markiert und mikroskopiert. Beim Mikroskopieren wurde zunächst ein Bild aufgenommen und anschließend auf einzelne Zellen hineingezoomt. Von diesen wurden erneut ein Bild aufgenommen und diese dann für 20 min bei einer Wellenlänge von 635 nm für ALPCS<sub>4</sub> oder 550 nm für TPPS<sub>4</sub> und einer Laserintensität von 80 % belichtet. Daraufhin wurde wieder ein Bild aufgenommen. Im Anschluss wurde herausgezoomt und erneut ein Gesamtbild der Zellen in Ausgangsposition nach der Belichtung aufgenommen.

#### **5.2.14 Zellviabilitätsassay mit MTT**

Um die Toxizität von Wirkstoffen quantitativ zu bestimmen, wurden 100  $\mu$ l pro Well einer Zellsuspension aus  $10^5$  Zellen pro ml in einer 96-Well-Platte (Cellstar 96 Well *Cell Culture Plate*) ausplattiert. Die Platte wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 h kultiviert. Im

Anschluss wurde das Medium abgesaugt und mit 100 µl Testlösung in Medium behandelt. Für jede Testsubstanz wurden Triplikate angefertigt. Die Wells am Rand der Platte wurden nicht behandelt, um die Verfälschung der Ergebnisse durch Randeffekte zu vermeiden. Für eine Negativ- und Positivkontrolle blieben jeweils drei Wells unbehandelt. Die Platte wurden dann für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Platten mit den phototoxischen Nanopartikel wurden nach 36 h 15 min mit einer Wellenlänge von 700 nm (AIPCS<sub>4</sub>) oder Weißlicht 400 – 700 nm (TPPS<sub>4</sub>) belichtet und dann weitere 36 h inkubiert. Daraufhin wurde in drei unbehandelte Wells 5 µl Triton 100 pipettiert, um sie für die Negativkontrolle zu präparieren. Dann wurden 15 µl MTT in alle 60 Wells der Platte gegeben. Nach weiteren 4 h im Inkubator bei 37 °C wurden 100 µl Stopsolution zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Messung der Absorption fand nach einer weiteren Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mithilfe des SpectraMax® iD3 Mikroplatten-Readers bei einer Wellenlänge von 595 nm statt. Mit Tumorsphäroiden wurde analog dazu verfahren.

#### **5.2.15 Sphäroid-Kultivierung**

Die Kultivierung der Sphäroide fand auf Agarose-Platten statt. Hierfür wurde eine sterile 1,5 %ige Agaroselösung in DPBS<sup>-/-</sup> durch Erhitzen in einer Mikrowelle hergestellt und jeweils 50 µl pro Well in eine 96-Well-Platte (Cellstar 96 Well *Cell Culture Plate*) gegeben. Die äußeren Wells wurden mit 100 µl DPBS<sup>-/-</sup> befüllt, um später das Verdunsten des Mediums zu verhindern. Während die Agaroselösung bei Raumtemperatur aushärtete, wurden die Zellen vorbereitet. Für die Kultivierung von Sphäroiden wurden 50 µL pro Well einer Zellsuspension der Konzentration  $3 \times 10^4$  Zellen pro ml pipettiert. Anschließend wurde die fertige Platte für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Durch die antiaderenten Eigenschaften der Agarose sammeln sich die Zellen in der Mitte der Wells und bilden Verbindungen untereinander aus. Diese Zellverbände wuchsen innerhalb von drei Tagen zu einem Sphäroid heran und konnten dann geerntet oder behandelt werden.

#### **5.2.16 Sphäroid-Wachstumsstudie**

Die Beobachtung des Wachstums von Sphäroiden wurde mit einem Leica DM IL LED Mikroskop durchgeführt und mithilfe der Software *Leica Application Suit* (LAS-AF) ausgewertet. Hierfür wurde vier- bis sechsmal der Durchmesser des Sphäroids bestimmt und gemittelt (Abbildung 178). Hierfür wurden pro Lösung drei Sphäroide ausgewertet. Die erste Aufnahme der Sphäroide erfolgte vor der Behandlung und daraufhin nach der Behandlung an jedem

weiteren Tag für fünf Tage. Sphäroide, die mit den phototoxischen Substanzen behandelt wurden, wurden 24 h nach ihrer Behandlung 15 min bei 700 nm (AIPCS<sub>4</sub>) oder Weißlicht 400 – 700 nm (TPPS<sub>4</sub>) belichtet.

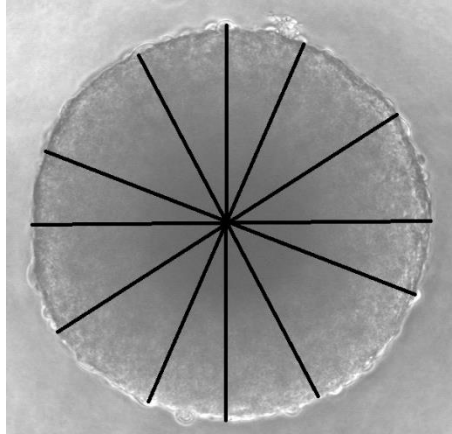


Abbildung 178: Veranschaulichung der Messung des Durchmessers zur Bestimmung der Wachstumszunahme von Sphäroiden.

### 5.2.17 Lebend-Tot-Färbung in 3D-Zellkulturen

Um die Zellviabilität der in den jeweiligen Hydrogelen eingebetteten Zellen oder Sphäroide zu bestimmen, wurde eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Dazu wurde das überstehende Zellkulturmedium entfernt und die Zellkultur mit 4 µg/ml Calcein-AM (für Hydrogele) oder 6,5 µg/ml Fluoresceindiacetat (FDA) (für Sphäroide) und 20 µg/ml Propidiumiodid für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre markiert. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Anschließend konnten die Proben fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. (Calcein-AM:  $\lambda_{\text{exc}}$  = 496 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 525 nm), (FDA:  $\lambda_{\text{exc}}$  = 490 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 530 nm), (PI:  $\lambda_{\text{exc}}$  = 533 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 590 - 630 nm). Für dreidimensionale Proben wurden z-Stack Aufnahmen in der Größe von 300 µm für Hydrogele und 200 µm für Sphäroide in 3-5 µm Schritten aufgenommen. Die Auswertung der Lebend-Tot-Färbung der Hydrogele fand über Python statt. Dabei wurde eventuelles Hintergrundrauschen über eine Gauß-Glättung und einem durch den Otsu-Algorithmus automatisch gesetzten Intensitätsgrenzwert entfernt. Anschließend wurde der Flächenanteil der rot gefärbten Zellen prozentual mit dem der grün gefärbten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

### 5.2.18 CellTiter-Glo® 3D-Viabilitäts-Assay

Für den CellTiter-Glo® 3D-Assay wurden Hydrogele wie zuvor beschrieben in 96-Well-Platten mit einem Volumen von 100 µL angesetzt und nach der Polymerisation mit 100 µL Medium beschichtet. Die Hydrogelplatten wurden in vierfacher Ausführung angesetzt und je eine Platte an einem der Tage 1, 7, 14, 21 untersucht. Dabei wurde das Medium mit 50 µL frischem Medium und 50 µL CellTiter-Glo® 3D-Reagenz für 1 h inkubiert und anschließend 5 min kräftig geschüttelt. Die Auswertung fand über die Messung der Lumineszenz mithilfe des SpectraMax® iD3 Multi-Mode-Mikroplatten-Readers statt.

### 5.2.19 Biologische Barriere im Transwell®

Transwells mit einer Porengröße von 0,3 µm (24 Well Platte; 6,5 mm Insert) wurden für 1 h mit 150 µL Collagen-1 Lösung (0,1 mg/mL in DPBS<sup>-/-</sup>) beschichtet und anschließend 150 µL darmspezifische Zellen der Konzentration  $3 \times 10^5$ /mL eingefügt. Das äußere Kompartiment des Transwells wurde dabei mit 500 µL Medium aufgefüllt. Die Transwells® wurden 7 d bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert, wobei, wenn benötigt ein Medienwechsel im äußeren Kompartiment durchgeführt wurde.

### 5.2.20 TEER-Messung im Transwell®

Die TEER-Messung der Barriere Modelle in den Transwell-Systemen wurde ab Tag 0 der Transwell Herstellung durchgeführt. Das Messgerät (EVOM3 mit STX2-Plus Elektrode) wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Danach wurde jeweils eine Elektrode des TEER-Messgeräts in das apikale und eine in das basale Kompartiment des Transwell-Systems platziert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Membran der Elektroden vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Die elektrischen Widerstände wurden anschließend ermittelt. Jede Probe wurde in unabhängigen Triplikaten gemessen, wobei jeweils ein Blank (beschichtetes Transwell-System ohne Zellen) verwendet wurde. Die erhaltenen Werte ( $R_{\text{Transwell}}$ ) wurden relativ zum Blank ( $R_{\text{Blank}}$ ) ermittelt und dann auf die Oberfläche des Transwell-Systems ( $A_{\text{Transwell}}$ ) normiert (Formel 11) und wie folgt berechnet (Formel 12).

$$R_{\text{Zellbarriere}}[\Omega] = R_{\text{Transwell}} - R_{\text{Blank}} \quad (11)$$

$$TEER [\Omega \text{ cm}^2] = R_{\text{Zellbarriere}} * A_{\text{Transwell}} \quad (12)$$

### 5.2.21 Calcium Imaging von Neuronen

Neuronen wurden in 96-Well-Platten aus Neuronenvorläufern (ReNcell-VM) differenziert (Kapitel 5.2.6) und anschließend mit 100 µl einer 10 µM Fluo-4 AM-Lösung (in ReNcell VM-Medium) für 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre behandelt. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 100 µl Testlösung (in ReNcell VM-Medium) inkubiert. Die veränderten Ca<sup>2+</sup>-Ströme konnten dann mithilfe inverser Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (λ<sub>ex</sub>: 495 nm, λ<sub>em</sub>: 528 nm). In dieser Studie wurden Videosequenzen mit einer Dauer von 5 min und 117 Bildfolgen generiert, die anschließend mit der Open-Source Toolbox EZcalcium über die Software MATLAB ausgewertet wurden.

### 5.2.22 Rekonstruktion der Blut-Hirn-Schranke im vasQchip

Der Versuchsaufbau wurde in Kollaboration mit Dr. Nicole Pleschka (im Arbeitskreis von Dr. Ute Schepers, IFG, KIT) durchgeführt. Zunächst wurden die vasQchips unter einer UV-Lampe für 1 h pro Seite sterilisiert. Es wurden die Zelllinien hCMEC/D3 (Passage 5), HBVP (Passage 5), HA (Passage 5) und HM (Passage 4-7) verwendet. Um ein Zellwachstum auf der Oberfläche der Chips zu ermöglichen, wurden die Kompartimente mit Strukturproteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen I für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre behandelt. Für die Besiedlung des mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichteten umgebenden Kompartiments wurden 5·10<sup>5</sup> HBVP in KM-Medium ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden 5·10<sup>5</sup> HA auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht ausgesät und für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurden 7,5·10<sup>4</sup> hCMEC/D3 im mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal kultiviert und für 7 Tage fluidisch bei einer Flussrate von 100 µL/h betrieben, bevor die Untersuchungen mit den Testlösungen durchgeführt wurden. Genauere Details sind der Arbeit von Dr. Nicole Pleschka zu entnehmen.<sup>[316]</sup>

### 5.2.23 Q-PCR

#### 5.2.23.1 RNA-Isolation

Zunächst wurde das Medium von den zu untersuchenden Zellen entfernt und die Zellen durch 400 µl TRIzol®-Reagenz lysiert. Die Zellsuspension wurde in Reaktionsröhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 80 µl Chloroform zur Probe gegeben, für 15 sec invertiert und für 3 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben

bei 12000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dies führte zur Bildung von drei Phasen: der unteren Phenol-Chloroform-Phase, einer Interphase (weißlich) und der oberen RNA-haltigen wässrigen Phase. Die RNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsröhrchen überführt, gefolgt von der Zugabe von 200 µL Isopropanol, und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut bei 12000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, wodurch ein gelartiger RNA-Pellet zurückblieb. Das RNA-Pellet wurde durch Suspendierung in 400 µL 75 %igem Ethanol gewaschen und bei 7500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das verbleibende Zellpellet in einem offenen Reaktionsröhrchen für etwa 10 min luftgetrocknet, wobei darauf geachtet wurde, dass das Pellet nicht vollständig austrocknete. Anschließend wurde das RNA-Pellet durch Suspension in 50 µL nukleasefreiem Wasser und Erwärmung auf 60 °C für 15 min gelöst. Eine Nanodrop-Messung wurde durchgeführt, um das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm zu bestimmen und somit die RNA-Konzentration zu quantifizieren.

#### 5.2.23.2 DNA-Verdau

Zur Verdauung der genomischen DNA wurde 1 µg RNA mit den zusätzlichen Reagenzien gemäß Tabelle 16 in einem PCR-Reaktionsröhrchen auf Eis gemischt und anschließend 30 min bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert. Die enzymatische Verdauung wurde durch Zugabe von 1 µL Stopplösung gestoppt und anschließend für 10 Minuten bei 65 °C im Thermocycler inkubiert, um die DNase zu inaktivieren.

*Tabelle 16: Mengen der einzusetzenden Reagenzien für den DNA-Verdau der RNA-Probe*

RNA in Wasser	1 µg in bis zu 8 µL
RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaktion Buffer	1 µL
RQ1 RNase-Free DNase	1 µL (1u/µg RNA)
Nuclease-freies Wasser	auf Endvolumen von 10 µL auffüllen

#### 5.2.23.3 cDNA-Synthese über Reverse Transkription

Für die Synthese der cDNA wurde 1 µL Random Primer (200 ng/µL) zur RNA gegeben und anschließend für 5 min bei 70 °C in einem Thermocycler erhitzt. Nach der Inkubation wurde das Volumen in zwei PCR-Reaktionsröhrchen aufgeteilt. Zwei Master-Mix wurden dann

vorbereitet (Tabelle 17), eine für die eigentliche Synthese (RT+) und eine als Kontrolle, bei der die reverse Transkriptase (RT) durch Wasser ersetzt wurde (RT-).

*Tabelle 17: Zusammensetzung des Master-Mix für die cDNA-Synthese mit (RT+) und ohne Reverse Transkriptase (RT-)*

RT +	RT -	
4 µL		5x buffer
2 µL		dNTP (10 mM)
0,5 µL	-	MLRVT (Reverse Transkriptase)
3,5 µL	4 µL	H <sub>2</sub> O
Gesamtvolumen pro Probe: 10 µL		

Je Reaktionsgefäß wurden 10 µL eines der Master-Mixe hinzugegeben und folgendes Programm im Thermocycler durchgeführt.

Thermocycle Programm:

- 10 min bei 25 °C
- 60 min bei 42 °C
- 10 min bei 70 °C
- ∞ bei 40 °C

Abschließend wurde jede Probe durch Zugabe von 100 µL H<sub>2</sub>O verdünnt und konnte danach weiterverwendet werden.

#### 5.2.23.4 qPCR-Durchführung

Zu Beginn wurde eine Stammlösung aus dem forward (F)- und reverse (R)- Primer jeweils in der Konzentration von 10 pmol/µL mit nukleasefreiem Wasser aus 1+1+8 Teilen in einem Eppendorf-Tube hergestellt. Daraufhin wurden die jeweiligen Substanzen nach Tabelle 18 in die Wells einer qPCR-Platte pipettiert.

*Tabelle 18: Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR*

10 µL	GoTaq® qPCR Master Mix
1 µL	Primer F+R Mix (10 pmol/µL)
5 µL	H <sub>2</sub> O

4 $\mu$ L	cDNA
Gesamtvolumen je 20 $\mu$ l	

Nach dem Auftragen der jeweiligen Proben wurde die qPCR-Platte mit einer Versiegelungsfolie verklebt und für 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde die qPCR mit dem StepOnePlus Real-Time PCR-System nach folgendem Programm durchgeführt:

- Holding Stage: Number of Cycles: 1
  - 95 °C, 2 min
- Cycling Stage: Number of Cycles: 40
  - Denaturation: 95 °C, 00:15 min
  - Annealing + Extension: 60 °C, 01:00 min
- Melt Curve Stage:
  - 95 °C, 00:15 min
  - 60 °C, 01:00 min

Alle Proben wurden in Triplikaten aufgetragen. Die erhaltenen  $C_T$ -Werte der Triplikate wurden gemittelt und im Anschluss über die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet. Zur Normierung wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet.

### 5.2.24 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, wobei n die Anzahl der unabhängigen Stichproben darstellte. Wenn angegeben, wurde der statistische Vergleich der Mittelwerte zweier Stichproben unter Verwendung des Student's t-Tests in GraphPad durchgeführt. Dabei wurden die statistischen Signifikanzwerte p (p-Werte) wie folgt gekennzeichnet: \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

### 5.2.25 VitaPrint

#### 5.2.25.1 Aktivierung und Silanisierung der VitaPrint Objektträger

Zur Aktivierung der Objektträger wurde eine Piranha-Lösung angesetzt. Dafür wurde tropfenweise vorsichtig unter Rühren in einem Eisbad 30 %ige  $H_2O_2$  in konzentrierte Schwefelsäure (Verhältnis v/v 1:3) pipettiert und dabei die Temperatur unter 50 °C gehalten. Anschließend wurden die Objektträger mindestens 1 h in Piranha-Lösung eingelegt. Danach wurden die Objektträger mit VE-Wasser und anschließend mit Aceton abgespült und getrocknet, ohne die Oberfläche zu manipulieren.

Zur Silanisierung der Objektträger wurde Silanisierungslösung wie in Tabelle 19 angegeben angesetzt und die Objektträger für 1 h mit der Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit VE-Wasser und Ethanol gereinigt und getrocknet, ohne die Oberfläche zu manipulieren.

*Tabelle 19: Zusammensetzung der Silanisierungslösung*

Bind-Silane oder Trimethoxy(7-octen-1-yl)silan + 3-(Trimethoxysilyl)-1-propanethiol (1:1)	16 µL
Ethanol	2 mL
dH <sub>2</sub> O	8 mL
Essigsäure	2,2 µL

### 5.2.25.2 VitaPrint Aufbau

Um den VitaPrint Chip aufzubauen, wurden zunächst die Luer Lock Anschlüsse (Female, ibidi) auf den Objektträger über PDMS (ELASTOSIL® A and B)) oder DOWSIL™ SE 1700 angebracht. Bei der Verwendung von PDMS wurde aufgrund der geringeren Viskosität eine bienenwabenartige Struktur, bestehend aus drei Sechsecken aus PLA als Grussform verwendet. Die Aushärtung fand bei 40 °C für mindestens 1 h, meist über Nacht statt. Die fertigen Objektträger wurden dann über PDMS mit dem Chiprohling bei 40 °C über Nacht im Wärmeschrank miteinander verbunden. Zur Sterilisierung wurde der Chip mit 80 % Ethanol besprüht, steril getrocknet und über Nacht mit UV-Licht bestrahlt.

### 5.2.25.3 3D-Bioprinting im VitaPrint

Das 3D-Bioprinting des Opfermaterials im VitaPrint wurde mit einem extrusionsbasierten 3D-Drucker (3D Discovery Gen 1, regenHU) durchgeführt, der mit einem Kartuschensystem (Nordson EFD), Dosiernadeln (konisch, Durchmesser: 0,25 mm, Gauge 25, Vieweg) und einem Kühlsystem (Pilote ONE, Peter Huber Kältemaschinenbau) ausgestattet war. Als Biotinte wurde 5 % Gelatine in 1 mL Spritzen aufgezogen und erwärmt. Die Spritze wurde in den Druckkopf eingesetzt und die konische Nadel angeschlossen. Die Biotinte wurde mittels Kühlsystem auf eine Temperatur von 28 °C für 30 min gekühlt, der Extrusionsdruck erfolgte bei einer Temperatur von 28 °C, einem Druck von 0,03 MPa und einer Druckgeschwindigkeit von 20 mm/min. Die fertigen, in den Chip gedruckte Struktur wurde abgedeckt 5 min bei 4 °C

gekühlt und dann mit 5-8 mL Matrix aus Hydrogele wie in den Kapiteln 5.2.7 - 5.2.10 beschrieben aufgefüllt. Anschließend wurden die Chips mit einem silanisierten Deckglas abgedichtet und je nach Hydrogel wie in den Kapiteln 5.2.7 - 5.2.10 beschrieben polymerisiert. Danach wurden die Chips im Inkubator für 30 min 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erwärmt um dann die Kanäle mit 37 °C warmem sterilen DPBS<sup>-/-</sup> frei zu spülen, bis die ganze Gelatine entfernen war. Danach wurden die Kanäle mit Zellen besiedelt und an ein Pumpsystem angeschlossen.

Geeignete Medien für Co-Kulturen wurden über den MTT-Assay oder über eine Wachstumskurve bestimmt. Ebenso wurde die toxische Einwirkung des Photoinitiators (LAP) und der UV-Belichtung über den MTT-Test ermittelt. Die Ergebnisse sind im Anhang zu finden (Kapitel 8.1 und 8.2). So wurden Mischkulturen von HSIF und HSMC in SMCM-Medium kultiviert, während der endotheliale Kanal mit EGM-2-Medium perfundiert wurde und der epitheliale Kanal mit EpiPro-Medium.

#### 5.2.25.4 Besiedlung der VitaPrint Kanäle

Zur Besiedlung der Chips wurden wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben Epithelzellen (HSIEC, Caco-2) und Endothelien (HSIMEC und HUVEC) abgelöst und 10<sup>6</sup> Zellen in 300 µL in die Kanäle mit einer 1 mL Spritze eingefügt. Die Chips wurden zur Besiedlung alle 15 min um 45° der Längsachse gedreht, um eine einheitliche Kultivierung der Kanäle zu gewährleisten. Anschließend wurden die Chips für 24 h statisch im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre Kultivierung und dann an ein Spritzenpumpensystem (ibidi) angeschlossen und für 3 Tage bei einer Flussrate von 100 µL/min der äußeren Kanäle und 20 µL/min des inneren Kanals fluidisch kultiviert.

#### 5.2.25.5 Flussdynamikanalyse der VitaPrint Kanäle

Die Flussanalyse wurde mit dem Programm Autodesk CFD 2024 durchgeführt. Hierfür wurden zuvor vier unterschiedliche Kanal-Geometrien mit der Autodesk Fusion 360 Software erstellt und in CFD geladen. Als Randbedingungen wurde ein Volumenstrom von 1000 mm<sup>3</sup>/min für runde Kanäle (mit 1 mm Durchmesser) und 500 µL/min für halbrunde und eckige Kanäle (Flächenmaße von 1 mm x 0,5 mm) mit einem Überdruck von 0 Pa gewählt. Als Fluid wurde Wasser und als Körper wurde Mensch eingestellt. Die Netzgröße wurde dann automatisch

vom Programm erstellt (Abbildung 179). Die Anzahl an auszuführenden Iterationen wurde auf 100 begrenzt und der Lösungsmodus auf stationär eingestellt.

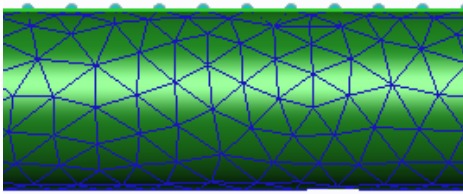


Abbildung 179: Beispiel für die Maschengröße der automatischen Netzerstellung.

## 5.3 Modellorganismus Zebrafisch

Für diese Arbeit wurden die Zebrafische (*Danio rerio*) der Casper-Linie und Wild-Typ verwendet. Die Haltung der Zebrafische fand bei 26 °C mit einem 14 h-Tag- und 10 h-Nacht-Zyklus statt. Dabei wurden die Zebrafische mit einem Futter aus Flocken, Pellets und Lebendfutter aus frisch geschlüpften Artemienlarven versorgt. Um die Paarung der Fische hervorzurufen, wurden sie in Laichtanks zunächst nach Geschlechtern getrennt und am folgenden Tag zu Beginn des Tageszyklus in ein Becken zusammengesetzt. Nach 1-4 h wurden die Eier gesammelt und in Petrischalen mit Fischwasser überführt. Die Eier wurden bei 28 °C kultiviert. Es fand ein täglicher Wechsel des Fischwassers statt, dabei wurden verendete und unbefruchtete Eier aussortiert. Alle Embryos wurden am fünften Tag nach der Befruchtung euthanasiert.

### 5.3.1 Fischembryo-Toxizitätstest (FET-Test)

Die Auswirkung von Wirkstoffen auf den Modellorganismus Zebrafisch wurde anhand eines FET-Tests untersucht. Hierfür wurden je sechs 4 hpf alte Zebrafischembryos (*Danio rerio*) in je ein Well einer 6-Well Platte überführt und mit 2 mL Testsubstanz in Fischwasser 5 Tage bei 28 °C inkubiert. Eine Kontrolle blieb unbehandelt. Die mit Photosensibilisator behandelten Fische wurde nach 24 h für 15 min mit einer Wellenlänge von 700 nm (AIPCS<sub>4</sub>) oder Weißlicht 400 – 700 nm (TPPS<sub>4</sub>) belichtet. Alle Embryos wurden vor der Behandlung und dann jeden weiteren Tag mikroskopisch auf Auffälligkeiten untersucht. Verwendet wurde hierfür ein Leica DM IL LED Mikroskop. Zur Ermittlung der Herzfrequenz wurden die Herzschläge für 1 min mit einem Handzähler bestimmt. Für die Ermittlung der Aktivität wurden die Bewegung der Fische über einen Zeitraum von 1 min beobachtet.

### **5.3.2 *In vivo*-Fluoreszenzmikroskopie im Zebrafischembryo**

Um die Akkumulation der Nanopartikel im Modellorganismus Zebrafisch zu beobachten, wurde die Testsubstanz über unterschiedliche Applikationsarten verabreicht.

Für eine intravenöse Gabe wurde die Embryos mit 0,02 % Tricaine-Lösung betäubt und etwa 50 µL Testsubstanz in DPBS<sup>-/-</sup> in die Kardinalvene der 3 d alter Zebrafischembryos mithilfe eines Mikroinjektors (microINJECTOR™ System MINIJ1 und MINIJ-2, Tritech™ Research) injiziert. Anschließend wurde die Tricaine-Lösung mit frischem Fischwasser ausgetauscht. Nach 24 h Inkubation bei 28 °C wurde die Zebrafische dann mit 0,02 % Tricaine-Lösung betäubt und mikroskopiert.

Für eine transdermale Applikation wurde 3 dpf Fische in 200 µL Testlösung in Fischwasser für 24 h bei 28 °C inkubiert und nach Wasserwechsel mit 0,02% Tricaine-Lösung betäubt und mikroskopiert.

Die Untersuchung der oralen Applikation fand an 4 dpf Fischembryos mit einer Inkubation von 200 µL Testlösung für 4 h bei 28 °C statt. Nach einem Wasserwechsel und Betäubung mit 0,02% Tricaine-Lösung wurden die Fische mikroskopiert.

Nach allen Untersuchungen wurden die Fische euthanasiert.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AHCT	<i>N</i> -Acetyl-DL-Homocysteinthiolacton
AMP	Antimikrobielles Protein
AOC	Institut für anorganische Chemie
Äq.	Äquivalente
ATR	aktiver Transport und Retentions-Effekt
B. Sc.	Bachelor of Science
Bzw.	beziehungsweise
CAD	Computer Aided Design
Calcein-AM	Calcein Acetomethyl
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tage
DDS	Drug Delivery-Systeme
DE	Definiertes Endoderm
DLE	Drug Loading Efficiency
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DoF	Degree of Functionalization (Funktionalisierungsgrad)
DOP	Dopamin
DOX	Doxorubicin

DPBS <sup>-/-</sup>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ohne Kalzium und Magnesium
dpf	days post fertilisation
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
DTX	Docetaxel
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Chlorwasserstoff
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Estamustinphosphat
engl.	englisch
EPR-Effekt	Enhanced Permeability and Retention Effekt
EZM	Extrazellulärmatrix
FET	Fisch-Embryo-Akut-Toxizität
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gram
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GNG	Gelatine-basiertes Nanogel
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>4</sub> [AlPCS <sub>4</sub> ]	Aluminium(III)-chlorophthalocyanintetrasulfonsäure
H <sub>4</sub> [TPPS <sub>4</sub> ]	Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin
HG	Hindgut Endoderm
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
hpf	hours post fertilisation
hpi	hours post incubation
HYL	Hydrolysin
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration für 50 %
iEC	intestinale Epithelzellen

IFG	Institut für funktionelle Grenzflächen
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LAP	Lithium Phenyl(2,4,6-trimethyl-benzoyl)phosphinat
Laser	Lichtverstärkung durch stimulierte Strahlungsemission
LED	Licht emittierende Diode
LYS	Lysin
M	Mol pro Liter
M. Sc.	Master of Science
MAA	Methacrylsäureanhydrid
min	Minute
mL	Milliliter
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBCA	5-norbornene-2-carboxylsäure
NG	Nanogel
NGN2	Neurogenin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
<i>N</i> lys	<i>N</i> -Boc-1,4-Butandiamin
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NP	Nanopartikel
<i>N</i> pcb	4-Chlorobenzylamin
<i>N</i> phe	Phenylamin
<i>N</i> prg	Propargylamin

OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PD	Polydopamin
PDI	Polydispersitätsindex
PDT	Photodynamische Therapie
PEGDA	Polyethylene Glycol Diacrylat
pH	pondus Hydrogenii
PI	Photoinitiator
PI	Photosensibilisator
PI	Propidiumiodid
PLA	Polymilchsäuren
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMX	Pemetrexet
q-PCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
TEER	transepithelische/transendothelische elektrische Widerstand
TJ's	Tight Junctions
UV	Ultraviolett
VdWK	Van-der-Waals-Kräfte
W	Watt
W/O	Wasser in Öl
z.B.	zum Beispiel
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Extinktionswellenlänge

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Mahara, G., Tian, C., Xu, X. & Zhu, J. Breakthrough of glycobiology in the 21st century. *Front Immunol* **13**, 1071360 (2022).
- 2 Mahara, G., Tian, C., Xu, X. & Wang, W. Revolutionising health care: Exploring the latest advances in medical sciences. *J Glob Health* **13**, 03042 (2023).
- 3 Manzari, M. T., Shamay, Y., Kiguchi, H., Rosen, N., Scaltriti, M. & Heller, D. A. Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nat Rev Mater* **6**, 351-370 (2021).
- 4 Altammar, K. A. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol* **14**, 1155622 (2023).
- 5 Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **25** (2019).
- 6 Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209-249 (2021).
- 7 Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424 (2018).
- 8 Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y. B. & Cai, L. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* **8**, 418 (2023).
- 9 Messinger, Y. H., Gaynon, P., Sposto, R., van der Giessen, J., Eckroth, E., Malvar, J. & Bostrom, B. C. Bortezomib Combined with VXL D Chemotherapy Is Highly Effective In Advanced B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Allowing Early Study Termination Due to Efficacy. A Therapeutic Advances in Childhood Leukemia (TACL) Consortium Phase II Study. *Blood* **118**, 251-251 (2011).
- 10 Hosomi, Y., Morita, S., Sugawara, S., Kato, T., Fukuhara, T., Gemma, A., Takahashi, K., Fujita, Y., Harada, T., Minato, K., Takamura, K., Hagiwara, K., Kobayashi, K., Nukiwa, T., Inoue, A. & North-East Japan Study, G. Gefitinib Alone Versus Gefitinib Plus Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer With Mutated Epidermal Growth Factor Receptor: NEJ009 Study. *J Clin Oncol* **38**, 115-123 (2020).
- 11 Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z. & Vandamme, T. F. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol* **71**, 1185-1198 (2019).
- 12 Vargason, A. M., Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nat Biomed Eng* **5**, 951-967 (2021).
- 13 Jia, Y., Jiang, Y., He, Y., Zhang, W., Zou, J., Magar, K. T., Boucetta, H., Teng, C. & He, W. Approved Nanomedicine against Diseases. *Pharmaceutics* **15** (2023).
- 14 Namiot, E. D., Sokolov, A. V., Chubarev, V. N., Tarasov, V. V. & Schioth, H. B. Nanoparticles in Clinical Trials: Analysis of Clinical Trials, FDA Approvals and Use for COVID-19 Vaccines. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
- 15 C. Lee Ventola, M. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *Pharmacy and Therapeutics* **42**, 742-755 (2017).
- 16 Rodriguez, F., Caruana, P., De la Fuente, N., Espanol, P., Gamez, M., Balart, J., Llurba, E., Rovira, R., Ruiz, R., Martin-Lorente, C., Corchero, J. L. & Cespedes, M. V. Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules* **12** (2022).

- 17 Thi, T. T. H., Suys, E. J. A., Lee, J. S., Nguyen, D. H., Park, K. D. & Truong, N. P. Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* **9** (2021).
- 18 Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. *Chem Rev* **117**, 11476-11521 (2017).
- 19 Barenholz, Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* **160**, 117-134 (2012).
- 20 Metselaar, J. M. & Lammers, T. Challenges in nanomedicine clinical translation. *Drug Delivery and Translational Research* **10**, 721-725 (2020).
- 21 Joudeh, N. & Linke, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnology* **20**, 262 (2022).
- 22 Pan, K. & Zhong, Q. Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**, 245-266 (2016).
- 23 Anu Mary Ealia, S. & Saravanakumar, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **263** (2017).
- 24 Ng, K. K. & Zheng, G. Molecular Interactions in Organic Nanoparticles for Phototheranostic Applications. *Chem Rev* **115**, 11012-11042 (2015).
- 25 Gonçalves, C., Pereira, P. & Gama, M. Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Materials* **3**, 1420-1460 (2010).
- 26 Kang, M. G., Lee, M. Y., Cha, J. M., Lee, J. K., Lee, S. C., Kim, J., Hwang, Y. S. & Bae, H. Nanogels Derived from Fish Gelatin: Application to Drug Delivery System. *Marine Drugs* **17**, 246 (2019).
- 27 Liao, X., Shen, M., Li, T., Feng, L., Lin, Z., Shi, G., Pei, G. & Cai, X. Combined Molybdenum Gelatine Methacrylate Injectable Nano-Hydrogel Effective Against Diabetic Bone Regeneration. *Int J Nanomedicine* **18**, 5925-5942 (2023).
- 28 Xu, F., Dawson, C., Lamb, M., Mueller, E., Stefanek, E., Akbari, M. & Hoare, T. Hydrogels for Tissue Engineering: Addressing Key Design Needs Toward Clinical Translation. *Front Bioeng Biotechnol* **10**, 849831 (2022).
- 29 Andree, L., Oude Egberink, R., Dodemont, J., Hassani Besheli, N., Yang, F., Brock, R. & Leeuwenburgh, S. C. G. Gelatin Nanoparticles for Complexation and Enhanced Cellular Delivery of mRNA. *Nanomaterials (Basel)* **12** (2022).
- 30 Su, K. & Wang, C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol Lett* **37**, 2139-2145 (2015).
- 31 Zeng, Y., Li, H., Li, Z., Luo, Q., Zhu, H., Gu, Z., Zhang, H., Gong, Q. & Luo, K. Engineered gadolinium-based nanomaterials as cancer imaging agents. *Applied Materials Today* **20** (2020).
- 32 Freund, R., Lachelt, U., Gruber, T., Ruhle, B. & Wuttke, S. Multifunctional Efficiency: Extending the Concept of Atom Economy to Functional Nanomaterials. *ACS Nano* **12**, 2094-2105 (2018).
- 33 Fatima, A., Ahmad, M. W., Al Saidi, A. K. A., Choudhury, A., Chang, Y. & Lee, G. H. Recent Advances in Gadolinium Based Contrast Agents for Bioimaging Applications. *Nanomaterials (Basel)* **11** (2021).

- 34 Villaraza, A. J., Bumb, A. & Brechbiel, M. W. Macromolecules, dendrimers, and nanomaterials in magnetic resonance imaging: the interplay between size, function, and pharmacokinetics. *Chem Rev* **110**, 2921-2959 (2010).
- 35 Ananta, J. S., Godin, B., Sethi, R., Moriggi, L., Liu, X., Serda, R. E., Krishnamurthy, R., Muthupillai, R., Bolskar, R. D., Helm, L., Ferrari, M., Wilson, L. J. & Decuzzi, P. Geometrical confinement of gadolinium-based contrast agents in nanoporous particles enhances T1 contrast. *Nat Nanotechnol* **5**, 815-821 (2010).
- 36 Rose, T. A., Jr. & Choi, J. W. Intravenous Imaging Contrast Media Complications: The Basics That Every Clinician Needs to Know. *Am J Med* **128**, 943-949 (2015).
- 37 Yokoyama, M. & Shiraishi, K. Stability evaluation of Gd chelates for macromolecular MRI contrast agents. *MAGMA* **33**, 527-536 (2020).
- 38 Xing, H., Zhang, S., Bu, W., Zheng, X., Wang, L., Xiao, Q., Ni, D., Zhang, J., Zhou, L., Peng, W., Zhao, K., Hua, Y. & Shi, J. Ultrasmall NaGdF<sub>4</sub> nanodots for efficient MR angiography and atherosclerotic plaque imaging. *Adv Mater* **26**, 3867-3872 (2014).
- 39 Zelenakova, A., Hrubovcak, P., Berkutova, A., Sofranko, O., Kucerka, N., Ivankov, O., Kuklin, A., Girman, V. & Zelenak, V. Gadolinium-oxide nanoparticles for cryogenic magnetocaloric applications. *Sci Rep* **12**, 2282 (2022).
- 40 Garg, A., Almasi, M., Bednarcik, J., Sharma, R., Rao, V. S., Panchal, P., Jain, A. & Sharma, A. Gd(III) metal-organic framework as an effective humidity sensor and its hydrogen adsorption properties. *Chemosphere* **305**, 135467 (2022).
- 41 Khatik, R., Wang, Z., Zhi, D., Kiran, S., Dwivedi, P., Liang, G., Qiu, B. & Yang, Q. Integrin alpha(v)beta(3) Receptor Overexpressing on Tumor-Targeted Positive MRI-Guided Chemotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 163-176 (2020).
- 42 Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G. & Eklund, P. C. Fullerenes. *Journal of Materials Research* **8**, 2054-2097 (2011).
- 43 Long, C. M., Nascarella, M. A. & Valberg, P. A. Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: physical and chemical distinctions. *Environ Pollut* **181**, 271-286 (2013).
- 44 Mauter, M. S. & Elimelech, M. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environ Sci Technol* **42**, 5843-5859 (2008).
- 45 Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **12**, 908-931 (2019).
- 46 Singh, R. & Lillard, J. W., Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* **86**, 215-223 (2009).
- 47 Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**, 271-284 (2000).
- 48 Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S. G., Krishnaswamy, S., Essa, M. M., Lin, F. H. & Qoronfle, M. W. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res* **23**, 20 (2019).
- 49 Nguyen, L. N. M., Ngo, W., Lin, Z. P., Sindhwani, S., MacMillan, P., Mladjenovic, S. M. & Chan, W. C. W. The mechanisms of nanoparticle delivery to solid tumours. *Nature Reviews Bioengineering* **2**, 201-213 (2024).
- 50 Sindhwani, S., Syed, A. M., Ngai, J., Kingston, B. R., Maiorino, L., Rothschild, J., MacMillan, P., Zhang, Y., Rajesh, N. U., Hoang, T., Wu, J. L. Y., Wilhelm, S., Zilman, A., Gadde, S., Sulaiman, A., Ouyang, B., Lin, Z., Wang, L., Egeblad, M. & Chan, W. C. W. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat Mater* **19**, 566-575 (2020).

- 51 Nguyen, L. N. M., Lin, Z. P., Sindhwani, S., MacMillan, P., Mladjenovic, S. M., Stordy, B., Ngo, W. & Chan, W. C. W. The exit of nanoparticles from solid tumours. *Nat Mater* **22**, 1261-1272 (2023).
- 52 Jung, H. S., Lee, M.-Y., Kong, W. H., Do, I. H. & Hahn, S. K. Nano graphene oxide–hyaluronic acid conjugate for target specific cancer drug delivery. *RSC Advances* **4** (2014).
- 53 Greco, F. & Vicent, M. J. Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 1203-1213 (2009).
- 54 Purdy, H. M. *A Peptoid-based targeted Drug delivery system for the treatment of Metastatic cancer of Metastatic cancer* Bachelor of Science in Chemical Engineering thesis, University of Arkansas, Fayetteville, (2014).
- 55 Kumari, M., Acharya, A. & Krishnamurthy, P. T. Antibody-conjugated nanoparticles for target-specific drug delivery of chemotherapeutics. *Beilstein J Nanotechnol* **14**, 912-926 (2023).
- 56 Shi, C., Zhang, Z., Wang, F. & Luan, Y. Active-targeting docetaxel-loaded mixed micelles for enhancing antitumor efficacy. *Journal of Molecular Liquids* **264**, 172-178 (2018).
- 57 Gao, Y. & Kodadek, T. Split-and-pool synthesis and characterization of peptide tertiary amide library. *J Vis Exp*, e51299 (2014).
- 58 Li Petri, G., Di Martino, S. & De Rosa, M. Peptidomimetics: An Overview of Recent Medicinal Chemistry Efforts toward the Discovery of Novel Small Molecule Inhibitors. *J Med Chem* **65**, 7438-7475 (2022).
- 59 Wehl, I. D. M. *High-throughput screening and evaluation of combinatorial cell penetrating peptoid libraries to identify organelle- and organ-specific drug delivery molecules 1* thesis, Cuvillier Verlag Göttingen, (2019).
- 60 Tran, H., Gael, S. L., Connolly, M. D. & Zuckermann, R. N. Solid-phase Submonomer Synthesis of Peptoid Polymers and their Self-Assembly into Highly-Ordered Nanosheets. *Journal of Visualized Experiments*, e3373 (2011).
- 61 Connolly, M. D., Xuan, S., Molchanova, N. & Zuckermann, R. N. Submonomer synthesis of sequence defined peptoids with diverse side-chains. *Methods Enzymol* **656**, 241-270 (2021).
- 62 Roenicke, F. *Synthese und in vivo Screening einer Bibliothek zellpenetrierender Peptide zur Isolation organspezifischer Transportmolekule 1* thesis, Cuvillier Verlag, (2016).
- 63 Zuckermann, R. N., Kerr, J. M., Kent, S. B. H. & Moos, W. H. Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(N-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10646-10647 (2002).
- 64 Schroder, T., Niemeier, N., Afonin, S., Ulrich, A. S., Krug, H. F. & Brase, S. Peptoidic amino- and guanidinium-carrier systems: targeted drug delivery into the cell cytosol or the nucleus. *J Med Chem* **51**, 376-379 (2008).
- 65 Tina Schröder, K. S., Nicole Niemeier, Teodor S. Balaban, Harald F. Krug, Ute Schepers and Stefan Bräse. Solid-Phase Synthesis, Bioconjugation, and Toxicology of Novel Cationic Oligopeptoids for Cellular Drug Delivery. *Bioconjugate Chem* **19**, 281-605 (2007).
- 66 Simon, R. J., Kania, R. S., Zuckermann, R. N., Huebner, V. D., Jewell, D. A., Banville, S., Ng, S., Wang, L., Rosenberg, S., Marlowe, C. K. & et al. Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9367-9371 (1992).

- 67 Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. & Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep* **64**, 1020-1037 (2012).
- 68 Justus, C. R., Dong, L. & Yang, L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* **4**, 354 (2013).
- 69 Boedtkjer, E. & Pedersen, S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu Rev Physiol* **82**, 103-126 (2020).
- 70 Lee, C. N., Hsu, R., Chen, H. & Wong, T. W. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules* **25** (2020).
- 71 Felsher, D. W. Cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **3**, 375-380 (2003).
- 72 Allison, R. R. & Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* **46**, 24-29 (2013).
- 73 Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **13** (2021).
- 74 Donnelly, R. F., McCarron, P. A. & Tunney, M. M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* **163**, 1-12 (2008).
- 75 Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A. & Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 101-124 (2021).
- 76 von Roemeling, C., Jiang, W., Chan, C. K., Weissman, I. L. & Kim, B. Y. S. Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine. *Trends Biotechnol* **35**, 159-171 (2017).
- 77 Daneman, R. & Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020412 (2015).
- 78 Xu, L., Nirwane, A. & Yao, Y. Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke Vasc Neurol* **4**, 78-82 (2019).
- 79 Pardridge, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1959-1972 (2012).
- 80 Bowman, P. D., Ennis, S. R., Rarey, K. E., Betz, A. L. & Goldstein, G. W. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol* **14**, 396-402 (1983).
- 81 Audus, K. L. & Borchardt, R. T. Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharm Res* **3**, 81-87 (1986).
- 82 Illum, L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* **87**, 187-198 (2003).
- 83 Yuan, H., Fales, A. M. & Vo-Dinh, T. TAT peptide-functionalized gold nanostars: enhanced intracellular delivery and efficient NIR photothermal therapy using ultralow irradiance. *J Am Chem Soc* **134**, 11358-11361 (2012).
- 84 Pardridge, W. M. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **13**, 963-975 (2016).
- 85 McDannold, N., Arvanitis, C. D., Vykhodtseva, N. & Livingstone, M. S. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res* **72**, 3652-3663 (2012).
- 86 Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. & Chan, W. C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* **6**, 662-668 (2006).

- 87 Grabrucker, A. M., Ruozi, B., Belletti, D., Pederzoli, F., Forni, F., Vandelli, M. A. & Tosi, G. Nanoparticle transport across the blood brain barrier. *Tissue Barriers* **4**, e1153568 (2016).
- 88 Fukuta, M., Okada, H., Iinuma, S., Yanai, S. & Toguchi, H. Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood-brain barrier. *Pharm Res* **11**, 1681-1688 (1994).
- 89 Ruan, S., Yuan, M., Zhang, L., Hu, G., Chen, J., Cun, X., Zhang, Q., Yang, Y., He, Q. & Gao, H. Tumor microenvironment sensitive doxorubicin delivery and release to glioma using angiopep-2 decorated gold nanoparticles. *Biomaterials* **37**, 425-435 (2015).
- 90 Di Tommaso, N., Gasbarrini, A. & Ponziani, F. R. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health* **18** (2021).
- 91 Vancamelbeke, M. & Vermeire, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 821-834 (2017).
- 92 Pelaseyed, T., Bergstrom, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schutte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodriguez-Pineiro, A. M., Nystrom, E. E., Wising, C., Johansson, M. E. & Hansson, G. C. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* **260**, 8-20 (2014).
- 93 Keita, A. V. & Soderholm, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 718-733 (2010).
- 94 Paradis, T., Begue, H., Basmaciyan, L., Dalle, F. & Bon, F. Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* **22** (2021).
- 95 Ensign, L. M., Cone, R. & Hanes, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 557-570 (2012).
- 96 Cardoso, B. D., Castanheira, E. M. S., Lanceros-Mendez, S. & Cardoso, V. F. Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventional to Microfluidic Strategies. *Adv Healthc Mater* **12**, e2202936 (2023).
- 97 Jaroch, K., Jaroch, A. & Bojko, B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *J Pharm Biomed Anal* **147**, 297-312 (2018).
- 98 Gimondi, S., Ferreira, H., Reis, R. L. & Neves, N. M. Microfluidic Devices: A Tool for Nanoparticle Synthesis and Performance Evaluation. *ACS Nano* **17**, 14205-14228 (2023).
- 99 Lee, K. H. & Kim, T. H. Recent Advances in Multicellular Tumor Spheroid Generation for Drug Screening. *Biosensors (Basel)* **11** (2021).
- 100 Calandrini, C. & Drost, J. Normal and tumor-derived organoids as a drug screening platform for tumor-specific drug vulnerabilities. *STAR Protoc* **3**, 101079 (2022).
- 101 Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., Elci, B., Brandenburg, N., Kolotuev, I., Gjorevski, N., Clevers, H. & Lutolf, M. P. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature* **585**, 574-578 (2020).
- 102 Brassard, J. A., Nikolaev, M., Hubscher, T., Hofer, M. & Lutolf, M. P. Recapitulating macro-scale tissue self-organization through organoid bioprinting. *Nat Mater* **20**, 22-29 (2021).
- 103 Shah, S. B. & Singh, A. Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. *Acta Biomater* **53**, 29-45 (2017).
- 104 Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* **165**, 1586-1597 (2016).

- 105 Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**, 1247125 (2014).
- 106 Ghaffarian, R. & Muro, S. Models and methods to evaluate transport of drug delivery systems across cellular barriers. *J Vis Exp*, e50638 (2013).
- 107 Kauffman, A. L., Gyurdieva, A. V., Mabus, J. R., Ferguson, C., Yan, Z. & Hornby, P. J. Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. *Front Pharmacol* **4**, 79 (2013).
- 108 Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L. & Hickman, J. J. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **20**, 107-126 (2015).
- 109 Bluhmki, T., Bitzer, S., Gindele, J. A., Schruf, E., Kiechle, T., Webster, M., Schymeinsky, J., Ries, R., Gantner, F., Bischoff, D., Garnett, J. & Heilker, R. Development of a miniaturized 96-Transwell air-liquid interface human small airway epithelial model. *Sci Rep* **10**, 13022 (2020).
- 110 Yee, C. H., Aoki, S., Uchihashi, K., Matsunobu, A., Yamasaki, F., Misago, N., Piao, M., Tetsuji, U., Yonemitsu, N., Sugihara, H. & Toda, S. The air liquid-interface, a skin microenvironment, promotes growth of melanoma cells, but not their apoptosis and invasion, through activation of mitogen-activated protein kinase. *Acta Histochem Cytochem* **43**, 1-7 (2010).
- 111 Gyles, D. A., Castro, L. D., Silva, J. O. C. & Ribeiro-Costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *European Polymer Journal* **88**, 373-392 (2017).
- 112 Unagolla, J. M. & Jayasuriya, A. C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl Mater Today* **18** (2020).
- 113 Pisapia, F., Balachandran, W. & Rasekh, M. Organ-on-a-Chip: Design and Simulation of Various Microfluidic Channel Geometries for the Influence of Fluid Dynamic Parameters. *Applied Sciences* **12** (2022).
- 114 Feitor, J. F., Brazaca, L. C., Lima, A. M., Ferreira, V. G., Kassab, G., Bagnato, V. S., Carrilho, E. & Cardoso, D. R. Organ-on-a-Chip for Drug Screening: A Bright Future for Sustainability? A Critical Review. *ACS Biomater Sci Eng* **9**, 2220-2234 (2023).
- 115 Bhise, N. S., Ribas, J., Manoharan, V., Zhang, Y. S., Polini, A., Massa, S., Dokmeci, M. R. & Khademhosseini, A. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *J Control Release* **190**, 82-93 (2014).
- 116 Leung, C. M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., Takayama, S., Shuler, M. L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E. & Toh, Y.-C. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers* **2** (2022).
- 117 Kang, S., Park, S. E. & Huh, D. D. Organ-on-a-chip technology for nanoparticle research. *Nano Converg* **8**, 20 (2021).
- 118 Pimenta, J., Ribeiro, R., Almeida, R., Costa, P. F., da Silva, M. A. & Pereira, B. Organ-on-Chip Approaches for Intestinal 3D In Vitro Modeling. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **13**, 351-367 (2022).
- 119 Kappings, V., Grün, C., Ivannikov, D., Hebeiss, I., Kattge, S., Wendland, I., Rapp, B. E., Hettel, M., Deutschmann, O. & Schepers, U. vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues. *Advanced Materials Technologies* **3** (2018).

- 120 Kasendra, M., Luc, R., Yin, J., Manatakis, D. V., Kulkarni, G., Lucchesi, C., Sliz, J., Apostolou, A., Sunuwar, L., Obrigewitch, J., Jang, K. J., Hamilton, G. A., Donowitz, M. & Karalis, K. Duodenum Intestine-Chip for preclinical drug assessment in a human relevant model. *Elife* **9** (2020).
- 121 Guo, Y., Luo, R., Wang, Y., Deng, P., Song, T., Zhang, M., Wang, P., Zhang, X., Cui, K., Tao, T., Li, Z., Chen, W., Zheng, Y. & Qin, J. SARS-CoV-2 induced intestinal responses with a biomimetic human gut-on-chip. *Sci Bull (Beijing)* **66**, 783-793 (2021).
- 122 Bein, A., Shin, W., Jalili-Firoozinezhad, S., Park, M. H., Sontheimer-Phelps, A., Tovaglieri, A., Chalkiadaki, A., Kim, H. J. & Ingber, D. E. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **5**, 659-668 (2018).
- 123 Valiei, A., Aminian-Dehkordi, J. & Mofrad, M. R. K. Gut-on-a-chip models for dissecting the gut microbiology and physiology. *APL Bioeng* **7**, 011502 (2023).
- 124 Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., Richmond, C. A., Li, H., Breault, D. T. & Ingber, D. E. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep* **8**, 2871 (2018).
- 125 Apostolou, A., Panchakshari, R. A., Banerjee, A., Manatakis, D. V., Paraskevopoulou, M. D., Luc, R., Abu-Ali, G., Dimitriou, A., Lucchesi, C., Kulkarni, G., Maulana, T. I., Kasendra, M., Kerns, J. S., Bleck, B., Ewart, L., Manolakos, E. S., Hamilton, G. A., Giallourakis, C. & Karalis, K. A Novel Microphysiological Colon Platform to Decipher Mechanisms Driving Human Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **12**, 1719-1741 (2021).
- 126 Wu, L., Ai, Y., Xie, R., Xiong, J., Wang, Y. & Liang, Q. Organoids/organs-on-a-chip: new frontiers of intestinal pathophysiological models. *Lab Chip* **23**, 1192-1212 (2023).
- 127 Serrano, S. G. L. a. L. *Organ on a chip 101*, <https://beonchip.com/organ-on-a-chip-101/> (2021).
- 128 Shin, Y. C., Shin, W., Koh, D., Wu, A., Ambrosini, Y. M., Min, S., Eckhardt, S. G., Fleming, R. Y. D., Kim, S., Park, S., Koh, H., Yoo, T. K. & Kim, H. J. Three-Dimensional Regeneration of Patient-Derived Intestinal Organoid Epithelium in a Physiodynamic Mucosal Interface-on-a-Chip. *Micromachines (Basel)* **11** (2020).
- 129 Garcia-Diaz, M., Cendra, M. D. M., Alonso-Roman, R., Urdaniz, M., Torrents, E. & Martinez, E. Mimicking the Intestinal Host-Pathogen Interactions in a 3D In Vitro Model: The Role of the Mucus Layer. *Pharmaceutics* **14** (2022).
- 130 Wadman, M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science* **379**, 127-128 (2023).
- 131 Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S. & Zon, L. I. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol* **33**, 95-118 (2020).
- 132 van Wijk, R. C., Krekels, E. H. J., Hankemeier, T., Spalink, H. P. & van der Graaf, P. H. Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discovery Today: Disease Models* **22**, 27-34 (2016).
- 133 Santoriello, C. & Zon, L. I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* **122**, 2337-2343 (2012).
- 134 MacRae, C. A. & Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 721-731 (2015).
- 135 Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* **269**, 1-20 (2007).

- 136 Van Norman, G. A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. *JACC Basic Transl Sci* **1**, 170-179 (2016).
- 137 Hackam, D. G. & Redelmeier, D. A. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA* **296**, 1731-1732 (2006).
- 138 Lau, B. & André, M. L., Gemeinsame Presse-Information: *Weltweit erste toxikologische Teststrategie ohne Tierversuche von der OECD zugelassen*, BASF und Givaudan, [https://www.basf.com/dam/jcr:f4ae3bb7-0dfa-37a1-9604-07aea21f2f6d/basf/www/global/documents/de/news-and-media/news-releases/2021/06/P241\\_BASF\\_Givaudan.pdf](https://www.basf.com/dam/jcr:f4ae3bb7-0dfa-37a1-9604-07aea21f2f6d/basf/www/global/documents/de/news-and-media/news-releases/2021/06/P241_BASF_Givaudan.pdf) (2021).
- 139 *Nanotechnology news*, <https://phys.org/nanotech-news/> (2003-20024).
- 140 Halwani, A. A. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. *Pharmaceutics* **14** (2022).
- 141 Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* **33**, 941-951 (2015).
- 142 Grabbe, S., Landfester, K., Schuppan, D., Barz, M. & Zentel, R. Nanoparticles and the immune system: challenges and opportunities. *Nanomedicine* **11**, 2621-2624 (2016).
- 143 Qiu, L. Y. & Bae, Y. H. Polymer Architecture and Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* **23**, 1-30 (2006).
- 144 Khalid, K., Tan, X., Mohd Zaid, H. F., Tao, Y., Lye Chew, C., Chu, D. T., Lam, M. K., Ho, Y. C., Lim, J. W. & Chin Wei, L. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. *Bioengineered* **11**, 328-355 (2020).
- 145 Woolen, S. A., Shankar, P. R., Gagnier, J. J., MacEachern, M. P., Singer, L. & Davenport, M. S. Risk of Nephrogenic Systemic Fibrosis in Patients With Stage 4 or 5 Chronic Kidney Disease Receiving a Group II Gadolinium-Based Contrast Agent: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* **180**, 223-230 (2020).
- 146 Khorenko, M., Pfeifer, J., Napp, J., Meschkov, A., Alves, F., Schepers, U. & Feldmann, C. Theranostic inorganic-organic hybrid nanoparticles with a cocktail of chemotherapeutic and cytostatic drugs. *J Mater Chem B* **11**, 3635-3649 (2023).
- 147 Liu, H., Guo, C., Shang, Y., Zeng, L., Jia, H. & Wang, Z. A Supramolecular Nanoparticle of Pemetrexed Improves the Anti-Tumor Effect by Inhibiting Mitochondrial Energy Metabolism. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9** (2021).
- 148 Glezerman, I. G., Pietanza, M. C., Miller, V. & Seshan, S. V. Kidney Tubular Toxicity of Maintenance Pemetrexed Therapy. *American Journal of Kidney Diseases* **58**, 817-820 (2011).
- 149 Pfizer Corporation Austria Ges.m.b.H., W. ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS (FACHINFORMATION) *Estracyt*, 2015).
- 150 Kopreski, M. S. A. S. P. B. F. B. G. P.-O. Method to potentiate intravenous estramustin phosphate. China patent CN1273530A (2000).
- 151 Hudes, G., Haas, N., Yeslow, G., Gillon, T., Gunnarsson, P. O., Ellman, M., Nordle, O., Eriksson, B., Miller, L., Cisar, L., Kopreski, M., Viaro, D. & Hartley-Asp, B. Phase I clinical and pharmacologic trial of intravenous estramustine phosphate. *J Clin Oncol* **20**, 1115-1127 (2002).
- 152 William Kevin Kelly, A. X. Z., Howard Scher, Tracey Curley, Mary Fallon, Susan Slovin, Lawrence Schwartz, Steve Larson, William Tong, Beryl Hartley-Asp, Cinzia Pellizzoni, and Maurizio Rocchetti. Dose Escalation Study of Intravenous Estramustine Phosphate in Combination with Paclitaxel and Carboplatin in Patients with Advanced Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* **9**, 2098-2107 (2003).

- 153 Gunnarsson, P. O., Andersson, S. B., Johansson, S. A., Nilsson, T. & Plym-Forsshell, G. Pharmacokinetics of estramustine phosphate (Estracyt) in prostatic cancer patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* **26**, 113-119 (1984).
- 154 Crous, A. & Abrahamse, H. Photodynamic Therapy with an AlPcS4Cl Gold Nanoparticle Conjugate Decreases Lung Cancer's Metastatic Potential. *Coatings* **12** (2022).
- 155 Trushina, O. I., Novikova, E. G., Sokolov, V. V., Filonenko, E. V., Chissov, V. I. & Vorozhtsov, G. N. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **5**, 256-259 (2008).
- 156 Oleg I. Apolikhin, I. V. C., Andrey V. Sivkov, Denis V. Altunin, Sergey G. Kuzmin, and Georgy N. Vorozhtsov. Adjuvant Photodynamic Therapy (PDT) with Photosensitizer Photosens for Superficial Bladder Cancer. Experimental investigations to treat prostate cancer by PDT with Photosens. *Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions III* **6632**, 64 (2007).
- 157 Likhvantseva VG , O. E., Petrenko MA , Merzliakova Olu , Kuz'min SG , Vorozhtsov GN. Analysis of changes in the accumulation of the photosensitizer Photosens, its elimination kinetics and distribution in the tissues of the eye and eyelids in health and in some tumorous processes. *Vestnik Oftalmologii* **124**, 38-44 (2008).
- 158 Ali, S., Muhammad, S., Khurshid, A., Ikram, M., Maqsood, M., Fisher, C., Cathcart, J. & Lilge, L. Effective phthalocyanines mediated photodynamic therapy with doxorubicin or methotrexate combination therapy at sub-micromolar concentrations in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **22**, 51-64 (2018).
- 159 Amin, R. M., Hauser, C., Kinzler, I., Rueck, A. & Scalfi-Happ, C. Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer: new approach. *Photochem Photobiol Sci* **11**, 1156-1163 (2012).
- 160 Sekkat, N., van den Bergh, H., Nyokong, T. & Lange, N. Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. *Molecules* **17**, 98-144 (2011).
- 161 Poß, M., Zittel, E., Seidl, C., Meschkov, A., Muñoz, L., Schepers, U. & Feldmann, C. Gd<sub>4</sub><sup>3+</sup>[AlPCS<sub>4</sub>]<sub>3</sub><sup>4-</sup> Nanoagent Generating <sup>1</sup>O<sub>2</sub> for Photodynamic Therapy. *Advanced Functional Materials* **28**, 1801074 (2018).
- 162 Santos, K. L. M., Barros, R. M., da Silva Lima, D. P., Nunes, A. M. A., Sato, M. R., Faccio, R., de Lima Damasceno, B. P. G. & Oshiro-Junior, J. A. Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **32**, 102032 (2020).
- 163 Xin, J., Wang, S., Wang, B., Wang, J., Wang, J., Zhang, L., Xin, B., Shen, L., Zhang, Z. & Yao, C. AlPcS<sub>4</sub>-PDT for gastric cancer therapy using gold nanorod, cationic liposome, and Pluronic F127 nanomicellar drug carriers. *International Journal of Nanomedicine Volume* **13**, 2017-2036 (2018).
- 164 Nistorescu, S., Udrea, A. M., Badea, M. A., Lungu, I., Boni, M., Tozar, T., Dumitrache, F., Maraloiu, V. A., Popescu, R. G., Fleaca, C., Andronescu, E., Dinischiotu, A., Staicu, A. & Balas, M. Low Blue Dose Photodynamic Therapy with Porphyrin-Iron Oxide Nanoparticles Complexes: In Vitro Study on Human Melanoma Cells. *Pharmaceutics* **13**, 2130 (2021).
- 165 Meschkov, A. *Fluoreszierende, metallbasierte Nanosysteme zum gezielten Wirkstofftransport* (Cuvillier Verlag Göttingen, 2020).
- 166 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63 (1983).

- 167 Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. & Boyd, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research* **51**, 2515-2520 (1991).
- 168 Slater, T. F., Sawyer, B. & Straeuli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta* **77**, 383-393 (1963).
- 169 Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R. & Sugimachi, K. The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **23**, 273-276 (1987).
- 170 Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**, 474-482 (1993).
- 171 Merck. *MTT-Assayprotokoll für Zellviabilität und Zellproliferation*, <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt> (2024).
- 172 Gesmundo, I., Pedrolli, F., Vitale, N., Bertoldo, A., Orlando, G., Banfi, D., Granato, G., Kasarla, R., Balzola, F., Deaglio, S., Cai, R., Sha, W., Papotti, M., Ghigo, E., Schally, A. V. & Granata, R. Antagonist of Growth Hormone-Releasing Hormone Potentiates the Antitumor Effect of Pemetrexed and Cisplatin in Pleural Mesothelioma. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 11248 (2022).
- 173 Yang, W., Soares, J., Greninger, P., Edelman, E. J., Lightfoot, H., Forbes, S., Bindal, N., Beare, D., Smith, J. A., Thompson, I. R., Ramaswamy, S., Futreal, P. A., Haber, D. A., Stratton, M. R., Benes, C., McDermott, U. & Garnett, M. J. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res* **41**, D955-961 (2013).
- 174 collaboration between the Cancer Genome Project at the Wellcome Sanger Institute (UK) and the Center for Molecular Therapeutics, M. G. H. C. C. U. *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer*, <https://www.cancerrxgene.org/compound/Pemetrexed/428/by-tissue?> (2010).
- 175 Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W. & Budman, D. R. Androgen antagonistic effect of estramustine phosphate (EMP) metabolites on wild-type and mutated androgen receptor. *Biochem Pharmacol* **55**, 1427-1433 (1998).
- 176 Wutzler, S. *Dosis-Wirkungs-Beziehung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib auf drei verschiedene Prostatakarzinom-Zelllinien* Technischen Universität München, (2005).
- 177 Wang, L. G., Liu, X. M., Budman, D. R. & Kreis, W. Synergistic effect of estramustine and [3'-keto-Bmtl]-[Val2]-cyclosporine (PSC 833) on the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP cells. *Biochem Pharmacol* **58**, 1115-1121 (1999).
- 178 Langlois, S., St-Pierre, M. E., Holland, S. H., Xiang, X., Freeman, E., Mohamed, H., Dural, A. C., Hammad, A., Karami, S., van de Panne, C. & Cowan, K. N. Inhibition of PANX1 Channels Reduces the Malignant Properties of Human High-Risk Neuroblastoma. *J Cancer* **14**, 689-706 (2023).
- 179 Bucevičius, J., Lukinavičius, G. & Gerasimaitė, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. *Chemosensors* **6** (2018).

- 180 Friberg, E. G., Cunderlikova, B., Pettersen, E. O. & Moan, J. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett* **195**, 73-80 (2003).
- 181 Moan, J., Peng, Q., Evensen, J. F., Berg, K., Western, A. & Rimington, C. Photosensitizing efficiencies, tumor- and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochem Photobiol* **46**, 713-721 (1987).
- 182 Berg, K., Bommer, J. C. & Moan, J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett* **44**, 7-15 (1989).
- 183 Kaneshiro, E. S., Wyder, M. A., Wu, Y.-P. & Cushion, M. T. Reliability of calcein acetoxymethyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *Journal of Microbiological Methods* **17**, 1-16 (1993).
- 184 De Clerck, L. S., Bridts, C. H., Mertens, A. M., Moens, M. M. & Stevens, W. J. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *Journal of Immunological Methods* **172**, 115-124 (1994).
- 185 White, J. & Stelzer, E. Photobleaching GFP reveals proteindynamics inside livecells. *CELL BIOLOGY* **9**, 61-65 (1999).
- 186 Battistelli, M. & Falcieri, E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)* **9**, 21 (2020).
- 187 Jerjes, W., Theodossiou, T. A., Hirschberg, H., Hogset, A., Weyergang, A., Selbo, P. K., Hamdoon, Z., Hopper, C. & Berg, K. Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research. *J Clin Med* **9** (2020).
- 188 Brune, N., Mues, B., Buhl, E. M., Hintzen, K. W., Jockenhoevel, S., Cornelissen, C. G., Slabu, I. & Thiebes, A. L. Dual Labeling of Primary Cells with Fluorescent Gadolinium Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* **13** (2023).
- 189 Rima, W., Sancey, L., Aloy, M. T., Armandy, E., Alcantara, G. B., Epicier, T., Malchere, A., Joly-Pottuz, L., Mowat, P., Lux, F., Tillement, O., Burdin, B., Rivoire, A., Boule, C., Anselme-Bertrand, I., Pourchez, J., Cottier, M., Roux, S., Rodriguez-Lafrasse, C. & Perriat, P. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 181-195 (2013).
- 190 Shi, Z., Neoh, K. G., Kang, E. T., Shuter, B. & Wang, S. C. Bifunctional Eu(3+)-doped Gd(2)O(3) nanoparticles as a luminescent and T(1) contrast agent for stem cell labeling. *Contrast Media Mol Imaging* **5**, 105-111 (2010).
- 191 Santelli, J., Lechevallier, S., Baaziz, H., Vincent, M., Martinez, C., Mauricot, R., Parini, A., Verelst, M. & Cussac, D. Multimodal gadolinium oxysulfide nanoparticles: a versatile contrast agent for mesenchymal stem cell labeling. *Nanoscale* **10**, 16775-16786 (2018).
- 192 Yin, Y., Hu, B., Yuan, X., Cai, L., Gao, H. & Yang, Q. Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* **12**, 290 (2020).
- 193 Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Nita, L. E. & Chiriac, A. P. Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. *Drug Delivery* **24**, 539-557 (2017).
- 194 Din, F. U., Aman, W., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S. & Zeb, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *International Journal of Nanomedicine* **Volume 12**, 7291-7309 (2017).
- 195 L. A. Dykman, N. G. K. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* **3**, 34-55 (2011).

- 196 Song, Y., Li, Y., Xu, Q. & Liu, Z. Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: advances, challenges, and outlook. *International Journal of Nanomedicine* **Volume 12**, 87-110 (2017).
- 197 Mohite, P., Singh, S., Pawar, A., Sangale, A. & Prajapati, B. G. Lipid-based oral formulation in capsules to improve the delivery of poorly water-soluble drugs. *Frontiers in Drug Delivery* **3** (2023).
- 198 Zhou, Q., Zhang, L., Yang, T. & Wu, H. Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine* **Volume 13**, 2921-2942 (2018).
- 199 Kim, J., Gauvin, R., Yoon, H. J., Kim, J.-H., Kwon, S.-M., Park, H. J., Baek, S. H., Cha, J. M. & Bae, H. Skin penetration-inducing gelatin methacryloyl nanogels for transdermal macromolecule delivery. *Macromolecular Research* **24**, 1115-1125 (2016).
- 200 Foox, M. & Zilberman, M. Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* **12**, 1547-1563 (2015).
- 201 Al-Nimry, S., Dayah, A. A., Hasan, I. & Daghmash, R. Cosmetic, Biomedical and Pharmaceutical Applications of Fish Gelatin/Hydrolysates. *Marine Drugs* **19**, 145 (2021).
- 202 Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K. & Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* **22**, 763-768 (2000).
- 203 Gockler, T., Haase, S., Kempter, X., Pfister, R., Maciel, B. R., Grimm, A., Molitor, T., Willenbacher, N. & Schepers, U. Tuning Superfast Curing Thiol-Norbornene-Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Advanced Healthcare Materials* **10**, 2100206 (2021).
- 204 By KAZUO SATAKE, T. O., MOCHIIHIKO OHASHI AND TOMOTAKA SHINODA. THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF AMINE, AMINO ACID AND PEPTIDE WITH 2,4,6-TRINITROBENZENE 1-SULFONIC ACID. *The Journal of Biochemistry* **47**, 654-660 (1960).
- 205 Göckler, M. S. T. *Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering* Karlsruher Institut für Technologie (KIT), (2022).
- 206 Bharti, S. K. & Roy, R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **35**, 5-26 (2012).
- 207 Jungnickel, J. L. & Forbes, J. W. Quantitative Measurement of Hydrogen Types by Integrated Nuclear Magnetic Resonance Intensities. *Analytical Chemistry* **35**, 938-942 (2002).
- 208 Vlierberghe, S. V., Schacht, E. & Dubruel, P. Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties. *European Polymer Journal* **47**, 1039-1047 (2011).
- 209 Trivedi, M. V., Laurence, J. S. & Siahaan, T. J. The role of thiols and disulfides on protein stability. *Curr Protein Pept Sci* **10**, 614-625 (2009).
- 210 Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N. & Khademhosseini, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **73**, 254-271 (2015).
- 211 Kaemmerer, E., Melchels, F. P., Holzapfel, B. M., Meckel, T., Hutmacher, D. W. & Loessner, D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: an alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater* **10**, 2551-2562 (2014).

- 212 Piao, Y., You, H., Xu, T., Bei, H.-P., Piwko, I. Z., Kwan, Y. Y. & Zhao, X. Biomedical applications of gelatin methacryloyl hydrogels. *Engineered Regeneration* **2**, 47-56 (2021).
- 213 Chen, S., Wang, Y., Lai, J., Tan, S. & Wang, M. Structure and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesized in Different Reaction Systems. *Biomacromolecules* **24**, 2928-2941 (2023).
- 214 Burchak, V. *Charakterisierung der Hydrogele GelNB/S und GelNB/DTT für das 3D Bioprinting von Knochen-, Knorpel- und Fettersatzgeweben*, Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau, (2021).
- 215 Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M. & Berghmans, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **1**, 31-38 (2000).
- 216 Gyger, F. *Mikroemulsionen mit flüssigem Ammoniak und ihre Verwendung zur Synthese von Nanomaterialien*, Karlsruhe, (2013).
- 217 Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N. & Anseth, K. S. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* **30**, 6702-6707 (2009).
- 218 Dorfmueller, T. Dynamic light scattering — applications of photon correlation spectroscopy. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **91**, 498-499 (1987).
- 219 Kaszuba, M. *Dynamic Light Scattering method development using the Zetasizer Advance Series*, <https://www.malvernpanalytical.com/de/learn/knowledge-center/application-notes/an230209-dls-method-development-zetasizer> (2023).
- 220 Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. & Mozafari, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **10** (2018).
- 221 Khushwant S. Yadav, D. K. M., Ashwini Deshpande, Anil M. Pethe *Chapter 7 - Levels of Drug Targeting*. ( Elsevier Inc. All, 2019).
- 222 Wu, J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med* **11** (2021).
- 223 Mohammadi, M., Arabi, L. & Alibolandi, M. Doxorubicin-loaded composite nanogels for cancer treatment. *J Control Release* **328**, 171-191 (2020).
- 224 Qi, J., Zhang, W.-w., Feng, X.-c., Yu, J.-h., Han, M.-y., Deng, S.-l., Zhou, G.-h., Wang, H.-h. & Xu, X.-l. Thermal degradation of gelatin enhances its ability to bind aroma compounds: Investigation of underlying mechanisms. *Food Hydrocolloids* **83**, 497-510 (2018).
- 225 Ahn, G., Kim, Y., Lee, S.-W., Jeong, Y. J., Son, H. & Lee, D. Effect of heterogeneous multi-layered gelatin scaffolds on the diffusion characteristics and cellular activities of preosteoblasts. *Macromolecular Research* **22**, 99-107 (2013).
- 226 Kanegae, M., Kou, S., Okawa, Y., Kobayashi, H., Ohmo, T., Ohki, T. & Kitayama, T. Ultrasonic Degradation of High Molecular Weight Components of Gelatin. *The Journal of Photographic Science* **40**, 187-189 (1992).
- 227 Banerjee, A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy -A Review. *Indian Association for the Cultivation of Science* (2021).

- 228 Das, M. P., R, S. P., Prasad, K., Jv, V. & M, R. Extraction and Characterization of Gelatin: A Functional Biopolymer. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **9** (2017).
- 229 Zhang, Q., Wang, P., Fang, X., Lin, F., Fang, J. & Xiong, C. Collagen gel contraction assays: From modelling wound healing to quantifying cellular interactions with three-dimensional extracellular matrices. *Eur J Cell Biol* **101**, 151253 (2022).
- 230 Fonseca, D. F. S., Costa, P. C., Almeida, I. F., Dias-Pereira, P., Correia-Sa, I., Bastos, V., Oliveira, H., Vilela, C., Silvestre, A. J. D. & Freire, C. S. R. Swellable Gelatin Methacryloyl Microneedles for Extraction of Interstitial Skin Fluid toward Minimally Invasive Monitoring of Urea. *Macromol Biosci* **20**, e2000195 (2020).
- 231 Michele Di Foggia<sup>1</sup>, P. T., Armida Torreggiani<sup>2</sup>, Monica Dettin<sup>3</sup> and Anna Tinti<sup>1</sup>. Self-assembling peptides for biomedical applications: IR and Raman spectroscopies for the study of secondary structure. *Proteomics Research Journa* **2** (2012).
- 232 Ramalingam, S. R. M. Aqueous-Mediated Synthesis and Characterization of Gelatin Methacryloyl for Biomedical Applications. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **12**, 6269-6279 (2021).
- 233 Li, D., Xu, W. & Liu, H. Fabrication of chitosan functionalized dual stimuli-responsive injectable nanogel to control delivery of doxorubicin. *Colloid and Polymer Science* **301**, 879-891 (2023).
- 234 Polizzotti, B. D., Fairbanks, B. D. & Anseth, K. S. Three-Dimensional Biochemical Patterning of Click-Based Composite Hydrogels via Thiolene Photopolymerization. *Biomacromolecules* **9**, 1084-1087 (2008).
- 235 Munoz, Z., Shih, H. & Lin, C. C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol–norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomater. Sci.* **2**, 1063-1072 (2014).
- 236 Pamplona, R., Gonzalez-Lana, S., Romero, P., Ochoa, I., Martin-Rapun, R. & Sanchez-Somolinos, C. Tuning of Mechanical Properties in Photopolymerizable Gelatin-Based Hydrogels for In Vitro Cell Culture Systems. *ACS Applied Polymer Materials* **5**, 1487-1498 (2023).
- 237 Miquelard-Garnier, G., Demoures, S., Creton, C. & Hourdet, D. Synthesis and Rheological Behavior of New Hydrophobically Modified Hydrogels with Tunable Properties. *Macromolecules* **39**, 8128-8139 (2006).
- 238 Boyd-Moss, M., Firipis, K., O’Connell, C. D., Rifai, A., Quigley, A., Boer, G., Long, B. M., Nisbet, D. R. & Williams, R. J. Shining a light on the hidden structure of gelatin methacryloyl bioinks using small-angle X-ray scattering (SAXS). *Materials Chemistry Frontiers* **5**, 8025-8036 (2021).
- 239 Lee, Y., Lee, J. M., Bae, P. K., Chung, I. Y., Chung, B. H. & Chung, B. G. Photo-crosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device. *Electrophoresis* **36**, 994-1001 (2015).
- 240 Farzan, M., Roth, R., Schoelkopf, J., Huwyler, J. & Puchkov, M. The processes behind drug loading and release in porous drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* **189**, 133-151 (2023).
- 241 Lunardi, C. N., Gomes, A. J., Rocha, F. S., De Tommaso, J. & Patience, G. S. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **99**, 627-639 (2021).
- 242 Patri, J. D. C. A. K. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery - Zeta Potential Measurement*. Vol. 697 63-70 (Humana Press, 210).

- 243 Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., Nobbmann, U., Sayre, P. & Rumble, J. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano* **3**, 953-965 (2016).
- 244 Augustine, R., Hasan, A., Primavera, R., Wilson, R. J., Thakor, A. S. & Kevadiya, B. D. Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications* **25** (2020).
- 245 Kaushik, D. & Bansal, G. Four new degradation products of doxorubicin: An application of forced degradation study and hyphenated chromatographic techniques. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **5**, 285-295 (2015).
- 246 Gabric, A., Hodnik, Z. & Pajk, S. Oxidation of Drugs during Drug Product Development: Problems and Solutions. *Pharmaceutics* **14**, 325 (2022).
- 247 Choudhury, F. A., Sabat, G., Sussman, M. R., Nishi, Y. & Shohet, J. L. Fluorophore-based sensor for oxygen radicals in processing plasmas *Journal of Vacuum Science and Technology A* **33**, 1305 (2015).
- 248 Ruoslahti, E. Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles. *Advanced Materials* **24**, 3747-3756 (2012).
- 249 Lowe, A. B., Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. *Journal of Materials Chemistry* **20** (2010).
- 250 Chadda, R. & Robertson, J. L. Measuring Membrane Protein Dimerization Equilibrium in Lipid Bilayers by Single-Molecule Fluorescence Microscopy. *Methods Enzymol* **581**, 53-82 (2016).
- 251 Duggan, S., O'Donovan, O., Owens, E., Cummins, W. & Hughes, H. Synthesis of mucoadhesive thiolated gelatin using a two-step reaction process. *Eur J Pharm Biopharm* **91**, 75-81 (2015).
- 252 Pan, D. C., Krishnan, V., Salinas, A. K., Kim, J., Sun, T., Ravid, S., Peng, K., Wu, D., Nurunnabi, M., Nelson, J. A., Niziolek, Z., Guo, J. & Mitragotri, S. Hyaluronic acid–doxorubicin nanoparticles for targeted treatment of colorectal cancer. *Bioengineering & Translational Medicine* **6**, e10166 (2021).
- 253 Monge-Fuentes, V., Biolchi Mayer, A., Lima, M. R., Geraldés, L. R., Zanotto, L. N., Moreira, K. G., Martins, O. P., Piva, H. L., Felipe, M. S. S., Amaral, A. C., Bocca, A. L., Tedesco, A. C. & Mortari, M. R. Dopamine-loaded nanoparticle systems circumvent the blood–brain barrier restoring motor function in mouse model for Parkinson's Disease. *Scientific Reports* **11**, 15185 (2021).
- 254 Fichman, G. & Schneider, J. P. Dopamine Self-Polymerization as a Simple and Powerful Tool to Modulate the Viscoelastic Mechanical Properties of Peptide-Based Gels. *Molecules* **26**, 1363 (2021).
- 255 Chen, T. P., Liu, T., Su, T. L. & Liang, J. Self-Polymerization of Dopamine in Acidic Environments without Oxygen. *Langmuir* **33**, 5863-5871 (2017).
- 256 Du, X., Li, L., Behboodi-Sadabad, F., Welle, A., Li, J., Heissler, S., Zhang, H., Plumeré, N. & Levkin, P. A. Bio-inspired strategy for controlled dopamine polymerization in basic solutions. *Polymer Chemistry* **8**, 2145-2151 (2017).
- 257 Battaglini, M., Marino, A., Carmignani, A., Tapeinos, C., Cauda, V., Ancona, A., Garino, N., Vighetto, V., La Rosa, G., Sinibaldi, E. & Ciofani, G. Polydopamine Nanoparticles as an Organic and Biodegradable Multitasking Tool for Neuroprotection and Remote Neuronal Stimulation. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 35782-35798 (2020).

- 258 Sun, X., Wu, C., Tian, X., Wang, P., Guo, J., Shao, Z. & Wei, Q. Activation of Dopamine Receptor D1 and Downstream Cellular Functions by Polydopamine. *ACS Biomater Sci Eng* **10**, 420-428 (2024).
- 259 van Bergen, L. A., Alonso, M., Pallo, A., Nilsson, L., De Proft, F. & Messens, J. Revisiting sulfur H-bonds in proteins: The example of peroxiredoxin AhpE. *Sci Rep* **6**, 30369 (2016).
- 260 Fahmi, A., Abdur-Rahman, M., Mahareek, O. & Shemis, M. A. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of doxorubicin-loaded polycaprolactone nanocapsules as controlled anti-hepatocellular carcinoma drug release system. *BMC Chem* **16**, 95 (2022).
- 261 Moreno, V. M., Merono, C., Baeza, A., Usategui, A., Ortiz-Romero, P. L., Pablos, J. L. & Vallet-Regi, M. UVA-Degradable Collagenase Nanocapsules as a Potential Treatment for Fibrotic Diseases. *Pharmaceutics* **13** (2021).
- 262 Zhang, X., Lin, Y. & Gillies, R. J. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* **51**, 1167-1170 (2010).
- 263 Amelian, A., Wasilewska, K., Megias, D. & Winnicka, K. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacol Rep* **69**, 861-870 (2017).
- 264 Thippabhotla, S., Zhong, C. & He, M. 3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles. *Sci Rep* **9**, 13012 (2019).
- 265 Callaway, E. Deal done over HeLa cell line. *Nature* **500**, 132-133 (2013).
- 266 Shah, U. K., Mallia, J. O., Singh, N., Chapman, K. E., Doak, S. H. & Jenkins, G. J. S. A three-dimensional in vitro HepG2 cells liver spheroid model for genotoxicity studies. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **825**, 51-58 (2018).
- 267 Engle, M. J., Goetz, G. S. & Alpers, D. H. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol* **174**, 362-369 (1998).
- 268 Haddad, M. J., Sztupecki, W., Delayre-Orthez, C., Rhazi, L., Barbezier, N., Depeint, F. & Anton, P. M. Complexification of In Vitro Models of Intestinal Barriers, A True Challenge for a More Accurate Alternative Approach. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
- 269 Horton, K. L., Pereira, M. P., Stewart, K. M., Fonseca, S. B. & Kelley, S. O. Tuning the activity of mitochondria-penetrating peptides for delivery or disruption. *Chembiochem* **13**, 476-485 (2012).
- 270 Leung, M. C. K. & Meyer, J. N. Mitochondria as a target of organophosphate and carbamate pesticides: Revisiting common mechanisms of action with new approach methodologies. *Reprod Toxicol* **89**, 83-92 (2019).
- 271 Iversen, T.-G., Skotland, T. & Sandvig, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **6**, 176-185 (2011).
- 272 Karbowski, M. & Youle, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 870-880 (2003).
- 273 van der Beek, J., de Heus, C., Liv, N. & Klumperman, J. Morpho-functional characterization of the endo-lysosomal system by high-throughput correlative light-electron microscopy. *Journal of Cell Biology* (2021).
- 274 Tabish, T. A. & Hamblin, M. R. Mitochondria-targeted nanoparticles (mitoNANO): An emerging therapeutic shortcut for cancer. *Biomater Biosyst* **3**, 100023 (2021).
- 275 Zhou, W., Kang, H. C., O'Grad, M., M. Chamber, K., Dubbel, B., Melquis, P. & R. Gee, K. CellTrace™ Far Red & CellTracker™ Deep Red. *Journal of Biological Methods* **3** (2016).

- 276 Li, L., Wan, T., Wan, M., Liu, B., Cheng, R. & Zhang, R. The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol Int* **39**, 531-539 (2015).
- 277 Wu, B. B., Leung, K. T. & Poon, E. N. Mitochondrial-Targeted Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Int J Mol Sci* **23** (2022).
- 278 Wasiak, I., Kulikowska, A., Janczewska, M., Michalak, M., Cymerman, I. A., Nagalski, A., Kallinger, P., Szymanski, W. W. & Ciach, T. Dextran Nanoparticle Synthesis and Properties. *PLoS One* **11**, e0146237 (2016).
- 279 Hegedus, O., Juriga, D., Sipos, E., Voniatis, C., Juhasz, A., Idrissi, A., Zrinyi, M., Varga, G., Jedlovsky-Hajdu, A. & Nagy, K. S. Free thiol groups on poly(aspartamide) based hydrogels facilitate tooth-derived progenitor cell proliferation and differentiation. *PLoS One* **14**, e0226363 (2019).
- 280 Su, J. Thiol-Mediated Chemoselective Strategies for In Situ Formation of Hydrogels. *Gels* **4** (2018).
- 281 Galli, C., Parisi, L., Elviri, L., Bianchera, A., Smerieri, A., Lagonegro, P., Lumetti, S., Manfredi, E., Bettini, R. & Macaluso, G. M. Chitosan scaffold modified with D-(+) raffinose and enriched with thiol-modified gelatin for improved osteoblast adhesion. *Biomed Mater* **11**, 015004 (2016).
- 282 Stenzel, M. H. Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature's Building Blocks. *ACS Macro Lett* **2**, 14-18 (2013).
- 283 Begrich, K., Massart, J., Robin, M. A., Borgne-Sanchez, A. & Fromenty, B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* **54**, 773-794 (2011).
- 284 Mitchison, T. J. The proliferation rate paradox in antimitotic chemotherapy. *Mol Biol Cell* **23**, 1-6 (2012).
- 285 Xu, J. J., Wang, S. Y., Chen, Y., Chen, G. P., Li, Z. Q., Shao, X. Y., Li, L., Lu, W. & Zhou, T. Y. Dopamine D1 receptor activation induces dehydroepiandrosterone sulfotransferase (SULT2A1) in HepG2 cells. *Acta Pharmacol Sin* **35**, 889-898 (2014).
- 286 Iishi, H., Baba, M., Tatsuta, M., Okuda, S. & Taniguchi, H. Enhancement of dopaminergic agonist bromocriptine of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Br J Cancer* **65**, 351-354 (1992).
- 287 Weissenrieder, J. S., Neighbors, J. D., Mailman, R. B. & Hohl, R. J. Cancer and the Dopamine D(2) Receptor: A Pharmacological Perspective. *J Pharmacol Exp Ther* **370**, 111-126 (2019).
- 288 David L. Nelson, M. C. *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*. 7 edn, 2656 (WH Freeman, 2017).
- 289 Giolito, M. V., Claret, L., Frau, C. & Plateroti, M. Three-dimensional Model of Spheroids to Study Colon Cancer Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments* **167** (2021).
- 290 Pratiwi, F. W., Peng, C. C., Wu, S. H., Kuo, C. W., Mou, C. Y., Tung, Y. C. & Chen, P. Evaluation of Nanoparticle Penetration in the Tumor Spheroid Using Two-Photon Microscopy. *Biomedicines* **9** (2020).
- 291 Takahashi, Y., Noguchi, M., Inoue, Y., Sato, S., Shimizu, M., Kojima, H., Okabe, T., Kiyono, H., Yamauchi, Y. & Sato, R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. *iScience* **25**, 104542 (2022).
- 292 Zhang, Y., Huang, S., Zhong, W., Chen, W., Yao, B. & Wang, X. 3D organoids derived from the small intestine: An emerging tool for drug transport research. *Acta Pharm Sin B* **11**, 1697-1707 (2021).

- 293 Mescher, A. L. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Sixteenth Edition*. 16 edn, 576 (McGraw-Hill Education, 2021).
- 294 Bigorgne, A. E., Farin, H. F., Lemoine, R., Mahlaoui, N., Lambert, N., Gil, M., Schulz, A., Philippet, P., Schlessner, P., Abrahamsen, T. G., Oymar, K., Davies, E. G., Ellingsen, C. L., Leteurtre, E., Moreau-Massart, B., Berrebi, D., Bole-Feysot, C., Nischke, P., Brousse, N., Fischer, A., Clevers, H. & de Saint Basile, G. TTC7A mutations disrupt intestinal epithelial apicobasal polarity. *J Clin Invest* **124**, 328-337 (2014).
- 295 Yan, Y., Pan, J., Chen, Y., Xing, W., Li, Q., Wang, D., Zhou, X., Xie, J., Miao, C., Yuan, Y., Zeng, W. & Chen, D. Increased dopamine and its receptor dopamine receptor D1 promote tumor growth in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Commun (Lond)* **40**, 694-710 (2020).
- 296 Li, Y., Miao, X., Chen, T., Yi, X., Wang, R., Zhao, H., Lee, S. M., Wang, X. & Zheng, Y. Zebrafish as a visual and dynamic model to study the transport of nanosized drug delivery systems across the biological barriers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **156**, 227-235 (2017).
- 297 Thirumalai, V. & Cline, H. T. Endogenous Dopamine Suppresses Initiation of Swimming in Prefeeding Zebrafish Larvae. *Journal of Neurophysiology* **100**, 1635-1648 (2008).
- 298 Calienno, M. N., Cagel, M., Montanari, J., Moreton, M. A., Prieto, M. J., Chiappetta, D. A. & Alonso, S. D. V. Zebrafish (*Danio rerio*) model as an early stage screening tool to study the biodistribution and toxicity profile of doxorubicin-loaded mixed micelles. *Toxicol Appl Pharmacol* **357**, 106-114 (2018).
- 299 Maciag, M., Wnorowski, A., Mierzejewska, M. & Plazinska, A. Pharmacological assessment of zebrafish-based cardiotoxicity models. *Biomed Pharmacother* **148**, 112695 (2022).
- 300 Lee, K. Y., Jang, G. H., Byun, C. H., Jeun, M., Searson, P. C. & Lee, K. H. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. *Biosci Rep* **37** (2017).
- 301 Ord, J. Ionic Stress Prompts Premature Hatching of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Fishes* **4** (2019).
- 302 Liu, L., Wu, F. Y., Zhu, C. Y., Zou, H. Y., Kong, R. Q., Ma, Y. K., Su, D., Song, G. Q., Zhang, Y. & Liu, K. C. Involvement of dopamine signaling pathway in neurodevelopmental toxicity induced by isoniazid in zebrafish. *Chemosphere* **265**, 129109 (2021).
- 303 Caldwell, L. J., Davies, N. O., Cavone, L., Mysiak, K. S., Semenova, S. A., Panula, P., Armstrong, J. D., Becker, C. G. & Becker, T. Regeneration of Dopaminergic Neurons in Adult Zebrafish Depends on Immune System Activation and Differs for Distinct Populations. *J Neurosci* **39**, 4694-4713 (2019).
- 304 Bauer, B., Mally, A. & Liedtke, D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *Int J Mol Sci* **22** (2021).
- 305 Wallace, K. N. & Pack, M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev Biol* **255**, 12-29 (2003).
- 306 Iain A. Drummond, A. M., Hartmut Hentschel, Marlies Elger, Lila Solnica-Krezel, Alexander F. Schier, Stephan C. F. Neuhauss, Derek L. Stemple, Fried Zwartkruis, Zehava Rangini, Wolfgang Driever and Mark C. Fishman. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development-the Company of Biologists Limited* **125**, 4655-4667 (1999).
- 307 Hans, C., McCollum, C., Bondesson, M., Shah, S. & Merchant, F. in *2015 IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)* 524-527 (2015).

- 308 Ou, H. C., Raible, D. W. & Rubel, E. W. Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hear Res* **233**, 46-53 (2007).
- 309 Ou, H. C., Santos, F., Raible, D. W., Simon, J. A. & Rubel, E. W. Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today* **15**, 265-271 (2010).
- 310 Kraus, A., Huertas, M., Ellis, L., Boudinot, P., Levraud, J. P. & Salinas, I. Intranasal delivery of SARS-CoV-2 spike protein is sufficient to cause olfactory damage, inflammation and olfactory dysfunction in zebrafish. *Brain Behav Immun* **102**, 341-359 (2022).
- 311 Choi, S. S. A., Chan, H. H., Chan, C. M., Wang, X., Webb, S. E., Leung, K. W., Tsim, K. W. K. & Miller, A. L. Neuromasts and Olfactory Organs of Zebrafish Larvae Represent Possible Sites of SARS-CoV-2 Pseudovirus Host Cell Entry. *J Virol* **96**, e0141822 (2022).
- 312 Mattern, K., von Trotha, J. W., Erfle, P., Koster, R. W. & Dietzel, A. NeuroExaminer: an all-glass microfluidic device for whole-brain in vivo imaging in zebrafish. *Commun Biol* **3**, 311 (2020).
- 313 Benet, L. Z. Effect of route of administration and distribution on drug action. *J Pharmacokinet Biopharm* **6**, 559-585 (1978).
- 314 Kou, L., Bhutia, Y. D., Yao, Q., He, Z., Sun, J. & Ganapathy, V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Front Pharmacol* **9**, 27 (2018).
- 315 Shah, M. R., Imran, M. & Ullah, S. *Nanocarriers for Organ-Specific and Localized Drug Delivery*. 270 (Elsevier, 2022).
- 316 Pleschka, N. *In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheiten des Gehirns und der Retina auf einem Organ-on-a-chip System zur Modellierung degenerativer Erkrankungen*, Karlsruher Institut für Technologie, (2022).
- 317 Fischer, T., Scheffler, P. & Lohr, C. Dopamine-induced calcium signaling in olfactory bulb astrocytes. *Sci Rep* **10**, 631 (2020).
- 318 Tang, T. S. & Bezprozvanny, I. Dopamine receptor-mediated Ca(2+) signaling in striatal medium spiny neurons. *J Biol Chem* **279**, 42082-42094 (2004).
- 319 Dragicevic, E., Poetschke, C., Duda, J., Schlaudraff, F., Lammel, S., Schiemann, J., Fauler, M., Hetzel, A., Watanabe, M., Lujan, R., Malenka, R. C., Striessnig, J. & Liss, B. Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons. *Brain* **137**, 2287-2302 (2014).
- 320 Perreault, M. L., Shen, M. Y., Fan, T. & George, S. R. Regulation of c-fos expression by the dopamine D1-D2 receptor heteromer. *Neuroscience* **285**, 194-203 (2015).
- 321 Tabata, Y., Imaizumi, Y., Sugawara, M., Andoh-Noda, T., Banno, S., Chai, M., Sone, T., Yamazaki, K., Ito, M., Tsukahara, K., Saya, H., Hattori, N., Kohyama, J. & Okano, H. T-type Calcium Channels Determine the Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Mitochondrial Stress in Familial Parkinson Disease. *Stem Cell Reports* **11**, 1171-1184 (2018).
- 322 Swapna, I., Bondy, B. & Morikawa, H. Differential Dopamine Regulation of Ca(2+) Signaling and Its Timing Dependence in the Nucleus Accumbens. *Cell Rep* **15**, 563-573 (2016).
- 323 Randolph L. Corteling, P. a. E. A. M., PhD, ReNeuron group plc. *ReNcell™ VM Cell Line - A Model of Human Neural Development and Differentiation*, <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/104/258/an1236en00> (2008).

- 324 ReNcell™ VM Human Neural Progenitor Cell Line, <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/264/393/scc008ds> (2007).
- 325 McKenzie, M., Lim, S. C. & Duchen, M. R. Simultaneous Measurement of Mitochondrial Calcium and Mitochondrial Membrane Potential in Live Cells by Fluorescent Microscopy. *J Vis Exp* (2017).
- 326 Cantu, D. A., Wang, B., Gongwer, M. W., He, C. X., Goel, A., Suresh, A., Kourdougli, N., Arroyo, E. D., Zeiger, W. & Portera-Cailliau, C. EZcalcium: Open-Source Toolbox for Analysis of Calcium Imaging Data. *Front Neural Circuits* **14**, 25 (2020).
- 327 Voelker, J., Voelker, C., Engert, J., Goemann, N., Hagen, R. & Rak, K. Spontaneous Calcium Oscillations through Differentiation: A Calcium Imaging Analysis of Rat Cochlear Nucleus Neural Stem Cells. *Cells* **10** (2021).
- 328 Namkung, Y., Dipace, C., Javitch, J. A. & Sibley, D. R. G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation regulates post-endocytic trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* **284**, 15038-15051 (2009).
- 329 Koenig, J. A. & Edwardson, J. M. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 276-287 (1997).
- 330 Liu, C. & Kaeser, P. S. Mechanisms and regulation of dopamine release. *Curr Opin Neurobiol* **57**, 46-53 (2019).
- 331 Keighron, J. D., Bonaventura, J., Li, Y., Yang, J. W., DeMarco, E. M., Hersey, M., Cao, J., Sandtner, W., Michaelides, M., Sitte, H. H., Newman, A. H. & Tanda, G. Interactions of calmodulin kinase II with the dopamine transporter facilitate cocaine-induced enhancement of evoked dopamine release. *Transl Psychiatry* **13**, 202 (2023).
- 332 Finberg, J. P. M. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **126**, 433-448 (2019).
- 333 Sisubalan, N., Shalini, R., Ramya, S., Sivamaruthi, B. S. & Chaiyasut, C. Recent advances in nanomaterials for neural applications: opportunities and challenges. *Nanomedicine (Lond)* **18**, 1979-1994 (2023).
- 334 Klimaschewski, L. P. in *Parkinson und Alzheimer heute* Ch. Chapter 2, 31-114 (2021).
- 335 Lopez-Escalera, S. & Wellejus, A. Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as in vitro models of colonic and small intestinal integrity. *Biochem Biophys Rep* **31**, 101314 (2022).
- 336 Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A. & Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **21**, 1-26 (2005).
- 337 Speer, J. E., Gunasekara, D. B., Wang, Y., Fallon, J. K., Attayek, P. J., Smith, P. C., Sims, C. E. & Allbritton, N. L. Molecular transport through primary human small intestinal monolayers by culture on a collagen scaffold with a gradient of chemical cross-linking. *J Biol Eng* **13**, 36 (2019).
- 338 Pauty, J., Usuba, R., Takahashi, H., Suehiro, J., Fujisawa, K., Yano, K., Nishizawa, T. & Matsunaga, Y. T. A Vascular Permeability Assay Using an In Vitro Human Microvessel Model Mimicking the Inflammatory Condition. *Nanotheranostics* **1**, 103-113 (2017).
- 339 Schoultz, I. & Keita, A. V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells* **9** (2020).
- 340 Le, J. Drug Administration. *Drugs-MSD MANUAL* (2022).
- 341 Daniel G. Hackam, M. D. A. R., MD, MSHSR. Translation of Research Evidence From Animals to Humans. *JAMA*. **296**, 1727-1732 (2006).

- 342 Komura, H. & Iwaki, M. In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species differences. *Drug Metab Rev* **43**, 476-498 (2011).
- 343 Martignoni, M., Groothuis, G. M. & de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**, 875-894 (2006).
- 344 Punt, A., Bouwmeester, H., Schiffelers, M. W. A. & Peijnenburg, A. Expert opinions on the acceptance of alternative methods in food safety evaluations: Formulating recommendations to increase acceptance of non-animal methods for kinetics. *Regul Toxicol Pharmacol* **92**, 145-151 (2018).
- 345 Hurko, O. & Ryan, J. L. Translational research in central nervous system drug discovery. *NeuroRx* **2**, 671-682 (2005).
- 346 Dutton, J. S., Hinman, S. S., Kim, R., Wang, Y. & Allbritton, N. L. Primary Cell-Derived Intestinal Models: Recapitulating Physiology. *Trends Biotechnol* **37**, 744-760 (2019).
- 347 Kulthong, K., Hooiveld, G., Duivenvoorde, L., Miro Estruch, I., Marin, V., van der Zande, M. & Bouwmeester, H. Transcriptome comparisons of in vitro intestinal epithelia grown under static and microfluidic gut-on-chip conditions with in vivo human epithelia. *Sci Rep* **11**, 3234 (2021).
- 348 Frame, M. D., Chapman, G. B., Makino, Y. & Sarelius, I. H. Shear stress gradient over endothelial cells in a curved microchannel system. *Biorheology* **35**, 245-261 (1998).
- 349 Kim, H. J., Huh, D., Hamilton, G. & Ingber, D. E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab on a Chip* **12**, 2165-2174 (2012).
- 350 Kim, H. J. & Ingber, D. E. Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr Biol (Camb)* **5**, 1130-1140 (2013).
- 351 Kulthong, K., Duivenvoorde, L., Mizera, B. Z., Rijkers, D., Dam, G. T., Oegema, G., Puzyn, T., Bouwmeester, H. & van der Zande, M. Implementation of a dynamic intestinal gut-on-a-chip barrier model for transport studies of lipophilic dioxin congeners. *RSC Adv* **8**, 32440-32453 (2018).
- 352 Walton, K. D., Fredo, A. M., Wang, S. & Gumucio, D. L. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development* **143**, 2261-2272 (2016).
- 353 Encyclopædia Britannica, I. *Small intestine: structure of digestive tube*, <https://kids.britannica.com/students/article/digestive-system/274004> (2024).
- 354 Pepelanova, I., Kruppa, K., Scheper, T. & Lavrentieva, A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering (Basel)* **5** (2018).
- 355 Zhang, B., Wang, L., Song, P., Pei, X., Sun, H., Wu, L., Zhou, C., Wang, K., Fan, Y. & Zhang, X. 3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations. *Materials & Design* **201** (2021).
- 356 Piras, C. C. & Smith, D. K. Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks. *J Mater Chem B* **8**, 8171-8188 (2020).
- 357 Beauchamp, M. J., Nordin, G. P. & Woolley, A. T. Moving from millifluidic to truly microfluidic sub-100-µm cross-section 3D printed devices. *Anal Bioanal Chem* **409**, 4311-4319 (2017).
- 358 Shin, W. & Kim, H. J. 3D in vitro morphogenesis of human intestinal epithelium in a gut-on-a-chip or a hybrid chip with a cell culture insert. *Nat Protoc* **17**, 910-939 (2022).

- 359 Gordon, E., Schimmel, L. & Frye, M. The Importance of Mechanical Forces for in vitro Endothelial Cell Biology. *Front Physiol* **11**, 684 (2020).
- 360 Thomas, D. P., Zhang, J., Nguyen, N. T. & Ta, H. T. Microfluidic Gut-on-a-Chip: Fundamentals and Challenges. *Biosensors (Basel)* **13** (2023).
- 361 Moses, S. R., Adorno, J. J., Palmer, A. F. & Song, J. W. Vessel-on-a-chip models for studying microvascular physiology, transport, and function in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* **320**, C92-C105 (2021).
- 362 Campinho, P., Vilfan, A. & Vermot, J. Blood Flow Forces in Shaping the Vascular System: A Focus on Endothelial Cell Behavior. *Front Physiol* **11**, 552 (2020).
- 363 Tan, H. Y., Trier, S., Rahbek, U. L., Dufva, M., Kutter, J. P. & Andresen, T. L. A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies. *PLoS One* **13**, e0197101 (2018).
- 364 Mandrycky, C., Hadland, B. & Zheng, Y. 3D curvature-instructed endothelial flow response and tissue vascularization. *Sci Adv* **6** (2020).
- 365 Cui, J., Liu, Y., Xiao, L., Chen, S. & Fu, B. M. Numerical study on the adhesion of a circulating tumor cell in a curved microvessel. *Biomech Model Mechanobiol* **20**, 243-254 (2021).
- 366 Al-Faqheri, W., Thio, T. H. G., Qasaimeh, M. A., Dietzel, A., Madou, M. & Al-Halhouli, A. a. Particle/cell separation on microfluidic platforms based on centrifugation effect: a review. *Microfluidics and Nanofluidics* **21** (2017).
- 367 Xiao, L. L., Yan, W. W., Liu, Y., Chen, S. & Fu, B. M. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* 219-234 (Springer International Publishing, 2018).
- 368 Axpe, E., Chan, D., Offeddu, G. S., Chang, Y., Merida, D., Hernandez, H. L. & Appel, E. A. A Multiscale Model for Solute Diffusion in Hydrogels. *Macromolecules* **52**, 6889-6897 (2019).
- 369 Pompili, S., Latella, G., Gaudio, E., Sferra, R. & Vetusch, A. The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall. *Front Med (Lausanne)* **8**, 610189 (2021).
- 370 Caliri, S. R. & Burdick, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* **13**, 405-414 (2016).
- 371 Allen, M. E., Hindley, J. W., Baxani, D. K., Ces, O. & Elani, Y. Hydrogels as functional components in artificial cell systems. *Nat Rev Chem* **6**, 562-578 (2022).
- 372 Marhuenda, E., Villarino, A., Narciso, M., Elowsson, L., Almendros, I., Westergren-Thorsson, G., Farre, R., Gavara, N. & Otero, J. Development of a physiometric model of acute respiratory distress syndrome by using ECM hydrogels and organ-on-a-chip devices. *Front Pharmacol* **13**, 945134 (2022).
- 373 Kim, S., Min, S., Choi, Y. S., Jo, S. H., Jung, J. H., Han, K., Kim, J., An, S., Ji, Y. W., Kim, Y. G. & Cho, S. W. Tissue extracellular matrix hydrogels as alternatives to Matrigel for culturing gastrointestinal organoids. *Nat Commun* **13**, 1692 (2022).
- 374 Van Os, L., Engelhardt, B. & Guenat, O. T. Integration of immune cells in organs-on-chips: a tutorial. *Front Bioeng Biotechnol* **11**, 1191104 (2023).
- 375 Lou, J. & Mooney, D. J. Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture. *Nat Rev Chem* **6**, 726-744 (2022).
- 376 Abebe Akalu, P. C. B. Matrix, Extracellular and Interstitial. *Cell Biology and Molecular Medicine* (2006).

- 377 Valdoz, J. C., Johnson, B. C., Jacobs, D. J., Franks, N. A., Dodson, E. L., Sanders, C., Cribbs, C. G. & Van Ry, P. M. The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question. *Int J Mol Sci* **22** (2021).
- 378 Ronca, A., D'Amora, U., Capuana, E., Zihlmann, C., Stiefel, N., Pattappa, G., Schewior, R., Docheva, D., Angele, P. & Ambrosio, L. Development of a highly concentrated collagen ink for the creation of a 3D printed meniscus. *Heliyon* **9**, e23107 (2023).
- 379 Utech, S. & Boccaccini, A. R. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. *Journal of Materials Science* **51**, 271-310 (2015).
- 380 Vila, A., Torras, N., Castano, A. G., Garcia-Diaz, M., Comelles, J., Perez-Berezo, T., Corregidor, C., Castano, O., Engel, E., Fernandez-Majada, V. & Martinez, E. Hydrogel co-networks of gelatine methacrylate and poly(ethylene glycol) diacrylate sustain 3D functional in vitro models of intestinal mucosa. *Biofabrication* **12**, 025008 (2020).
- 381 Li, X., Chen, S., Li, J., Wang, X., Zhang, J., Kawazoe, N. & Chen, G. 3D Culture of Chondrocytes in Gelatin Hydrogels with Different Stiffness. *Polymers (Basel)* **8** (2016).
- 382 Cai, S., Wu, C., Yang, W., Liang, W., Yu, H. & Liu, L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnology Reviews* **9**, 971-989 (2020).
- 383 Jin, L., Park, K., Yoon, Y., Kim, H. S., Kim, H. J., Choi, J. W., Lee, D. Y., Chun, H. J. & Yang, D. H. Visible Light-Cured Antibacterial Collagen Hydrogel Containing Water-Solubilized Triclosan for Improved Wound Healing. *Materials (Basel)* **14** (2021).
- 384 Holmes, R., Yang, X. B., Dunne, A., Florea, L., Wood, D. & Tronci, G. Thiol-Ene Photo-Click Collagen-PEG Hydrogels: Impact of Water-Soluble Photoinitiators on Cell Viability, Gelation Kinetics and Rheological Properties. *Polymers (Basel)* **9** (2017).
- 385 Brugger, M. D. & Basler, K. The diverse nature of intestinal fibroblasts in development, homeostasis, and disease. *Trends Cell Biol* **33**, 834-849 (2023).
- 386 Goke, M., Kanai, M. & Podolsky, D. K. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* **274**, G809-818 (1998).
- 387 Visco, V., Bava, F. A., d'Alessandro, F., Cavallini, M., Ziparo, V. & Torrisi, M. R. Human colon fibroblasts induce differentiation and proliferation of intestinal epithelial cells through the direct paracrine action of keratinocyte growth factor. *J Cell Physiol* **220**, 204-213 (2009).
- 388 Seiler, K. M., Bajinting, A., Alvarado, D. M., Traore, M. A., Binkley, M. M., Goo, W. H., Lanik, W. E., Ou, J., Ismail, U., Iticovici, M., King, C. R., VanDussen, K. L., Swietlicki, E. A., Gazit, V., Guo, J., Luke, C. J., Stappenbeck, T., Ciorba, M. A., George, S. C., Meacham, J. M., Rubin, D. C., Good, M. & Warner, B. W. Patient-derived small intestinal myofibroblasts direct perfused, physiologically responsive capillary development in a microfluidic Gut-on-a-Chip Model. *Sci Rep* **10**, 3842 (2020).
- 389 Corporation, C. M. a. P. Reproducible Drug Screening Assays Using Single Organoids. (2023).
- 390 Grinnell, F. Mini-Review on the Cellular Mechanisms of Disease, Fibroblasts, Myofibroblasts, and Wound Contraction *The Journal of Cell Biology* **124**, 401-404 (1994).
- 391 Trelford, C. B., Denstedt, J. T., Armstrong, J. J. & Hutnik, C. M. L. The Pro-Fibrotic Behavior of Human Tenon's Capsule Fibroblasts in Medically Treated Glaucoma Patients. *Clin Ophthalmol* **14**, 1391-1402 (2020).

- 392 Kruger-Genge, A., Hauser, S., Neffe, A. T., Liu, Y., Lendlein, A., Pietzsch, J. & Jung, F. Response of Endothelial Cells to Gelatin-Based Hydrogels. *ACS Biomater Sci Eng* **7**, 527-540 (2021).
- 393 Huycke, T. R., Miller, B. M., Gill, H. K., Nerurkar, N. L., Sprinzak, D., Mahadevan, L. & Tabin, C. J. Genetic and Mechanical Regulation of Intestinal Smooth Muscle Development. *Cell* **179**, 90-105 e121 (2019).
- 394 Lewis, C. *Doctoral Dissertation: A biocultural analysis of ethnic variation in colorectal cancer incidence and mortality in the United States from 1988 to 2006*, Indiana University Bloomington, (2014).
- 395 Lee, J. L. & Streuli, C. H. Integrins and epithelial cell polarity. *J Cell Sci* **127**, 3217-3225 (2014).
- 396 Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W. & Scarino, M. L. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* **29**, 649-668 (2001).
- 397 Takayama, K., Negoro, R., Yamashita, T., Kawai, K., Ichikawa, M., Mori, T., Nakatsu, N., Harada, K., Ito, S., Yamada, H., Yamaura, Y., Hirata, K., Ishida, S. & Mizuguchi, H. Generation of Human iPSC-Derived Intestinal Epithelial Cell Monolayers by CDX2 Transduction. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **8**, 513-526 (2019).
- 398 Moerkens, R., Mooiweer, J., Ramirez-Sanchez, A. D., Oelen, R., Franke, L., Wijmenga, C., Barrett, R. J., Jonkers, I. H. & Withoff, S. An iPSC-derived small intestine-on-chip with self-organizing epithelial, mesenchymal, and neural cells. *Cell Rep* **43**, 114247 (2024).
- 399 Faith R Kreitzer<sup>1</sup>, N. S., <sup>2</sup>, Alice Sheehan<sup>1</sup>, Miller Huang<sup>3</sup>, Jason S Park<sup>1,4</sup>, Matthew J Spindler<sup>1</sup>, Paweena Lizarraga<sup>1</sup>, William A Weiss<sup>3</sup>, Po-Lin So<sup>1</sup>, Bruce R Conklin<sup>1</sup>. A robust method to derive functional neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Am J Stem Cell* **2**, 119-131 (2013).
- 400 Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H. & Yamanaka, S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* **8**, 409-412 (2011).
- 401 Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., Xu, W., Yang, N., Danko, T., Chen, L., Wernig, M. & Sudhof, T. C. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* **78**, 785-798 (2013).
- 402 Pantazis, C. B., Yang, A., Lara, E., McDonough, J. A., Blauwendraat, C., Peng, L., Oguro, H., Kanaujiya, J., Zou, J., Sebesta, D., Pratt, G., Cross, E., Blockwick, J., Buxton, P., Kinner-Bibeau, L., Medura, C., Tompkins, C., Hughes, S., Santiana, M., Faghri, F., Nalls, M. A., Vitale, D., Ballard, S., Qi, Y. A., Ramos, D. M., Anderson, K. M., Stadler, J., Narayan, P., Papademetriou, J., Reilly, L., Nelson, M. P., Aggarwal, S., Rosen, L. U., Kirwan, P., Pisupati, V., Coon, S. L., Scholz, S. W., Priebe, T., Ottl, M., Dong, J., Meijer, M., Janssen, L. J. M., Lourenco, V. S., van der Kant, R., Crusius, D., Paquet, D., Raulin, A. C., Bu, G., Held, A., Wainger, B. J., Gabriele, R. M. C., Casey, J. M., Wray, S., Abu-Bonsrah, D., Parish, C. L., Beccari, M. S., Cleveland, D. W., Li, E., Rose, I. V. L., Kampmann, M., Calatayud Aristoy, C., Verstreken, P., Heinrich, L., Chen, M. Y., Schule, B., Dou, D., Holzbaur, E. L. F., Zanellati, M. C., Basundra, R., Deshmukh, M., Cohen, S., Khanna, R., Raman, M., Nevin, Z. S., Matia, M., Van Lent, J., Timmerman, V., Conklin, B. R., Johnson Chase, K., Zhang, K., Funes, S., Bosco, D. A., Erlebach, L., Welzer, M.,

- Kronenberg-Versteeg, D., Lyu, G., Arenas, E., Coccia, E., Sarrafha, L., Ahfeldt, T., Marioni, J. C., Skarnes, W. C., Cookson, M. R., Ward, M. E. & Merkle, F. T. A reference human induced pluripotent stem cell line for large-scale collaborative studies. *Cell Stem Cell* **29**, 1685-1702 e1622 (2022).
- 403 Fernandopulle, M. S., Prestil, R., Grunseich, C., Wang, C., Gan, L. & Ward, M. E. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr Protoc Cell Biol* **79**, e51 (2018).
- 404 van Schaijik, B., Davis, P. F., Wickremesekera, A. C., Tan, S. T. & Itinteang, T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol* **71**, 88-91 (2018).
- 405 Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J. & Mongan, N. P. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* **18**, 1093-1108 (2009).
- 406 McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **120**, 5 1 1-5 1 11 (2018).
- 407 Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F. & Scheper, T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 350-360 (2001).
- 408 Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* **37**, 163-176 (2017).
- 409 Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., Hoskins, E. E., Kalinichenko, V. V., Wells, S. I., Zorn, A. M., Shroyer, N. F. & Wells, J. M. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105-109 (2011).
- 410 Kwon, O., Jung, K. B., Lee, K. R., Son, Y. S., Lee, H., Kim, J. J., Kim, K., Lee, S., Song, Y. K., Jung, J., Park, K., Kim, D. S., Son, M. J., Lee, M. O., Han, T. S., Cho, H. S., Oh, S. J., Chung, H., Kim, S. H., Chung, K. S., Kim, J., Jung, C. R. & Son, M. Y. The development of a functional human small intestinal epithelium model for drug absorption. *Sci Adv* **7** (2021).
- 411 Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M. & Ma, T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G1054-1064 (2011).
- 412 Ciccocioppo, R., Finamore, A., Ara, C., Di Sabatino, A., Mengheri, E. & Corazza, G. R. Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol* **125**, 502-511 (2006).
- 413 Allen, A., Hutton, D. A. & Pearson, J. P. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 797-801 (1998).
- 414 Konno, T., Kotani, T., Setiawan, J., Nishigaito, Y., Sawada, N., Imada, S., Saito, Y., Murata, Y. & Matozaki, T. Role of lysophosphatidic acid in proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells. *PLoS One* **14**, e0215255 (2019).
- 415 Fu, L. & Shi, Y. B. The Sox transcriptional factors: Functions during intestinal development in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* **63**, 58-67 (2017).
- 416 Burtscher, I. & Lickert, H. Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo. *Development* **136**, 1029-1038 (2009).
- 417 Gao, N., White, P. & Kaestner, K. H. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* **16**, 588-599 (2009).

- 418 Friederich, E., Vancompernelle, K., Louvard, D. & Vandekerckhove, J. Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. *J Biol Chem* **274**, 26751-26760 (1999).
- 419 Gum, J. R., Jr., Hicks, J. W., Gillespie, A. M., Carlson, E. J., Komuves, L., Karnik, S., Hong, J. C., Epstein, C. J. & Kim, Y. S. Goblet cell-specific expression mediated by the MUC2 mucin gene promoter in the intestine of transgenic mice. *Am J Physiol* **276**, G666-676 (1999).
- 420 Peeters, T. & Vantrappen, G. The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut* **16**, 553-558 (1975).
- 421 Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. & Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007 (2007).
- 422 Hyesung Kim1\*, J. K. M., Seung Sam Paik2, Hyunsung Kim2, Hosub Park2, Yeon Ju Kim3, Seung Bum Lee4, Heung Up Kim5, Hyun Joo Song5, In Ho Jeong6, Suji Hong1, Chul Min Park7, Cheol Lee8, Younghoon Kim9, Bogun Jang. EPHB2 expression is associated with intestinal phenotype of gastric cancer and indicates better prognosis by suppressing gastric cancer migration. *Am J Cancer Res* **12**, 1295-1308 (2022).
- 423 Blinka, S. & Rao, S. Nanog Expression in Embryonic Stem Cells - An Ideal Model System to Dissect Enhancer Function. *Bioessays* **39** (2017).
- 424 Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391 (1998).
- 425 Liu, Y., Huber, R. M., Kiefl, R., Tufman, A. & Kauffmann-Guerrero, D. Hedgehog Pathway Activation Might Mediate Pemetrexed Resistance in NSCLC Cells. *Anticancer Res* **40**, 1451-1458 (2020).
- 426 Bi, G., Liang, J., Zhao, M., Zhang, H., Jin, X., Lu, T., Zheng, Y., Bian, Y., Chen, Z., Huang, Y., Besskaya, V., Zhan, C., Wang, Q. & Tan, L. miR-6077 promotes cisplatin/pemetrexed resistance in lung adenocarcinoma via CDKN1A/cell cycle arrest and KEAP1/ferroptosis pathways. *Mol Ther Nucleic Acids* **28**, 366-386 (2022).
- 427 Arbour, K. C. & Riely, G. J. Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA* **322**, 764-774 (2019).
- 428 Songca, S. P. Combinations of Photodynamic Therapy with Other Minimally Invasive Therapeutic Technologies against Cancer and Microbial Infections. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
- 429 Hao, Y., Chung, C. K., Yu, Z., Huis In 't Veld, R. V., Ossendorp, F. A., Ten Dijke, P. & Cruz, L. J. Combinatorial Therapeutic Approaches with Nanomaterial-Based Photodynamic Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **14** (2022).
- 430 Park, D. H., Lee, S. S., Park, S. E., Lee, J. L., Choi, J. H., Choi, H. J., Jang, J. W., Kim, H. J., Eum, J. B., Seo, D. W., Lee, S. K., Kim, M. H. & Lee, J. B. Randomised phase II trial of photodynamic therapy plus oral fluoropyrimidine, S-1, versus photodynamic therapy alone for unresectable hilar cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer* **50**, 1259-1268 (2014).
- 431 He, C., Tang, Z., Tian, H. & Chen, X. Co-delivery of chemotherapeutics and proteins for synergistic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **98**, 64-76 (2016).
- 432 Baskaran, R., Lee, J. & Yang, S. G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res* **22**, 25 (2018).

- 433 Zhang, G., Wang, N., Sun, H., Fu, X., Zhai, S. & Cui, J. Self-adjuvanting photosensitizer nanoparticles for combination photodynamic immunotherapy. *Biomater Sci* **9**, 6940-6949 (2021).
- 434 Ak, G., Aksu, D., Capkin, E., Sari, O., Kimiz Gebologlu, I. & Sanlier, S. H. Delivery of pemetrexed by magnetic nanoparticles: design, characterization, in vitro and in vivo assessment. *Prep Biochem Biotechnol* **50**, 215-225 (2020).
- 435 Majernik, M., Jendzelovsky, R., Vargova, J., Jendzelovska, Z. & Fedorocko, P. Multifunctional Nanoplatforms as a Novel Effective Approach in Photodynamic Therapy and Chemotherapy, to Overcome Multidrug Resistance in Cancer. *Pharmaceutics* **14** (2022).
- 436 Zhang, W., Shen, J., Su, H., Mu, G., Sun, J. H., Tan, C. P., Liang, X. J., Ji, L. N. & Mao, Z. W. Co-Delivery of Cisplatin Prodrug and Chlorin e6 by Mesoporous Silica Nanoparticles for Chemo-Photodynamic Combination Therapy to Combat Drug Resistance. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 13332-13340 (2016).
- 437 Khorenko, M. *Synthese und Charakterisierung anorganischer-organischer Hybridnanopartikel mit biologisch-medizinischem Anwendungspotential*, KIT, (2020).
- 438 Unciti-Broceta, A., Diezmann, F., Ou-Yang, C. Y., Fara, M. A. & Bradley, M. Synthesis, penetrability and intracellular targeting of fluorescein-tagged peptoids and peptide-peptoid hybrids. *Bioorg Med Chem* **17**, 959-966 (2009).
- 439 Liu, M., Fang, X., Yang, Y. & Wang, C. Peptide-Enabled Targeted Delivery Systems for Therapeutic Applications. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 701504 (2021).
- 440 Bhardwaj, H. & Jangde, R. K. Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. *Next Nanotechnology* **2** (2023).
- 441 Andreadza, R., Morales, A., Pieniz, S. & Labidi, J. Gelatin-Based Hydrogels: Potential Biomaterials for Remediation. *Polymers (Basel)* **15** (2023).
- 442 Ghazoyan, H. H., Grigoryan, Z. L., Markarian, S. A. & Chaban, V. V. Dimethyl sulfoxide heavily extends homogeneous regions of the Propionitrile/DMSO/Water mixtures. *Journal of Molecular Liquids* **380** (2023).
- 443 Butowt, R., Bilinska, K. & von Bartheld, C. S. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends Neurosci* **46**, 75-90 (2023).
- 444 Butowt, R. & von Bartheld, C. S. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. *Neuroscientist* **27**, 582-603 (2021).
- 445 Cheng, Q., Wei, T., Farbiak, L., Johnson, L. T., Dilliard, S. A. & Siegwart, D. J. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotechnol* **15**, 313-320 (2020).
- 446 Li, J. & Wang, H. Selective organ targeting nanoparticles: from design to clinical translation. *Nanoscale Horiz* **8**, 1155-1173 (2023).
- 447 Wang, X., Liu, S., Sun, Y., Yu, X., Lee, S. M., Cheng, Q., Wei, T., Gong, J., Robinson, J., Zhang, D., Lian, X., Basak, P. & Siegwart, D. J. Preparation of selective organ-targeting (SORT) lipid nanoparticles (LNPs) using multiple technical methods for tissue-specific mRNA delivery. *Nat Protoc* **18**, 265-291 (2023).
- 448 Allen, J. W. & Bhatia, S. N. Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnol Bioeng* **82**, 253-262 (2003).

- 449 Kobayashi, M., Khalil, H. A., Lei, N. Y., Wang, Q., Wang, K., Wu, B. M. & Dunn, J. C. Y. Bioengineering functional smooth muscle with spontaneous rhythmic contraction in vitro. *Sci Rep* **8**, 13544 (2018).
- 450 Ewart, L., Apostolou, A., Briggs, S. A., Carman, C. V., Chaff, J. T., Heng, A. R., Jadalannagari, S., Janardhanan, J., Jang, K. J., Joshipura, S. R., Kadam, M. M., Kanellias, M., Kujala, V. J., Kulkarni, G., Le, C. Y., Lucchesi, C., Manatakis, D. V., Maniar, K. K., Quinn, M. E., Ravan, J. S., Rizos, A. C., Sauld, J. F. K., Sliz, J. D., Tien-Street, W., Trinidad, D. R., Velez, J., Wendell, M., Irrechukwu, O., Mahalingaiah, P. K., Ingber, D. E., Scannell, J. W. & Levner, D. Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology. *Commun Med (Lond)* **2**, 154 (2022).
- 451 Lopez-Fernandez, H., Santos, H. M., Capelo, J. L., Fdez-Riverola, F., Glez-Pena, D. & Reboiro-Jato, M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics* **16**, 318 (2015).
- 452 Brinkman, W. T., Nagapudi, K., Thomas, B. S. & Chaikof, E. L. Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function. *Biomacromolecules* **4**, 890-895 (2003).

## 8 Anhang

### 8.1 Ermittlung geeigneter Kultivierungsmedien für Co-Kulturen

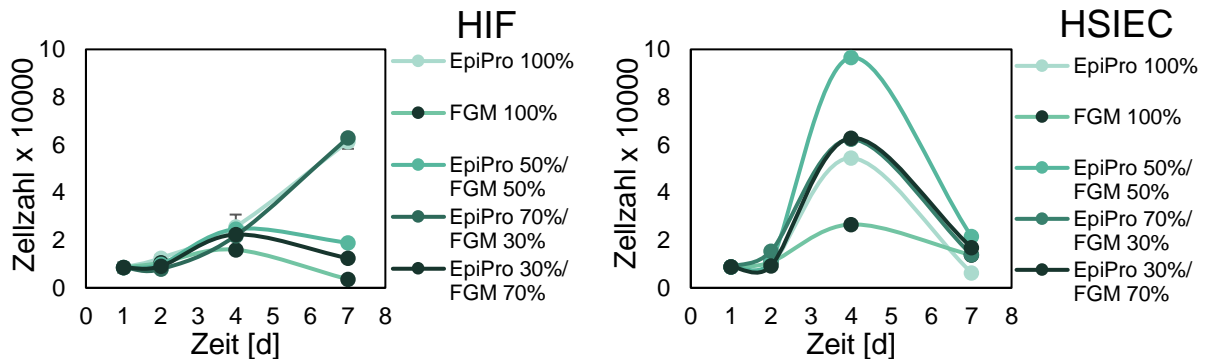


Abbildung 180: Proliverationsverhalten von HIF und HSIEC Zellen in unterschiedlichen Medien. Bei  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde nach 24 h (Tag1) Kultivierung ein Medienwechsel mit unterschiedlichen Medien durchgeführt und die Zellen für 72 h weiter kultiviert. An Tag 1, 2, 4 und 7 wurde die Zellzahl pro Well ermittelt. Die Werte werden als Mittelwert dargestellt,  $n = 3$ .

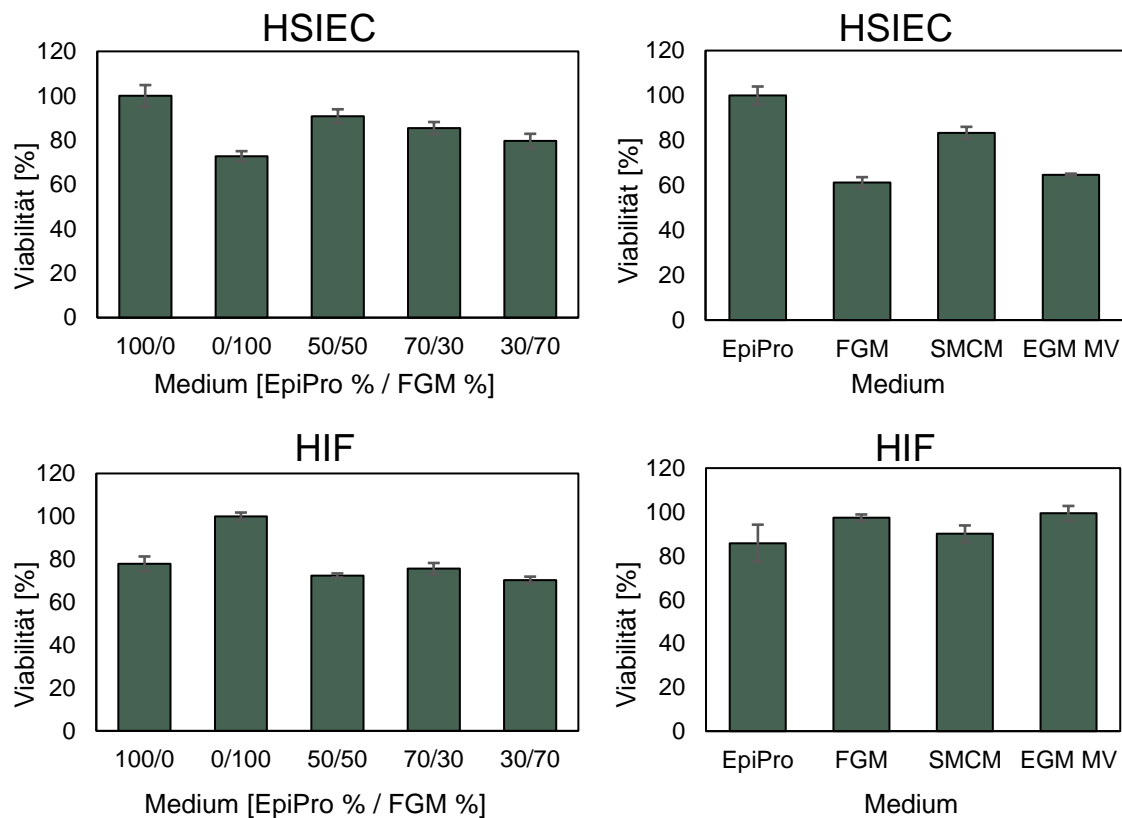


Abbildung 181: Zellviabilitäts-Assay mit HSIEC und HIF. Bei  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde nach 24 h Kultivierung ein Medienwechsel mit unterschiedlichen Medien durchgeführt und die Zellen für 72 h weiter kultiviert. Die Viabilität wurde über den MTT-Assay bestimmt. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

## 8.2 Ermittlung der Toxizität des Photoinitiators und der UV-Belichtung

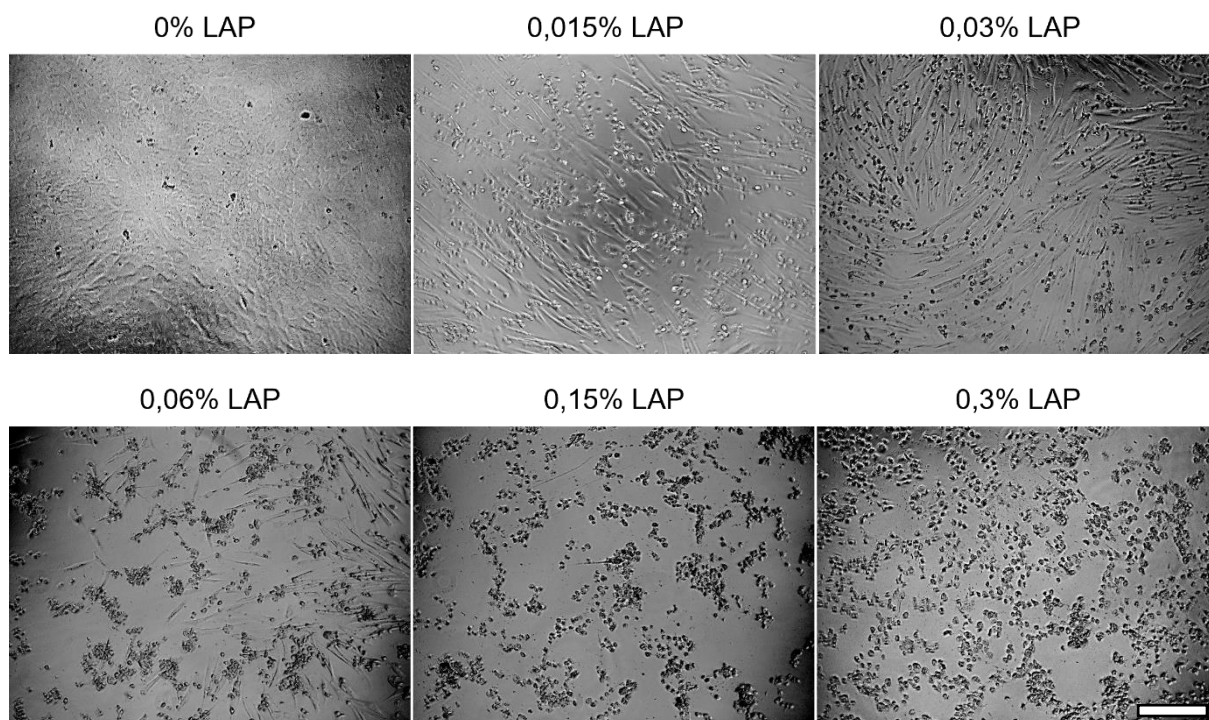


Abbildung 182: Toxizität von LAP auf HISMZ.  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde nach 24 h Kultivierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Photoinitiator (LAP) behandelt und für 30 s und  $0,5 \text{ W/cm}^2$  bei einem Abstand von 5 cm mit UV-Licht bestrahlt. Die Zellen wurden dann 72 h weiter kultiviert und anschließend mikroskopiert. Maßstab:  $400 \mu\text{m}$ .

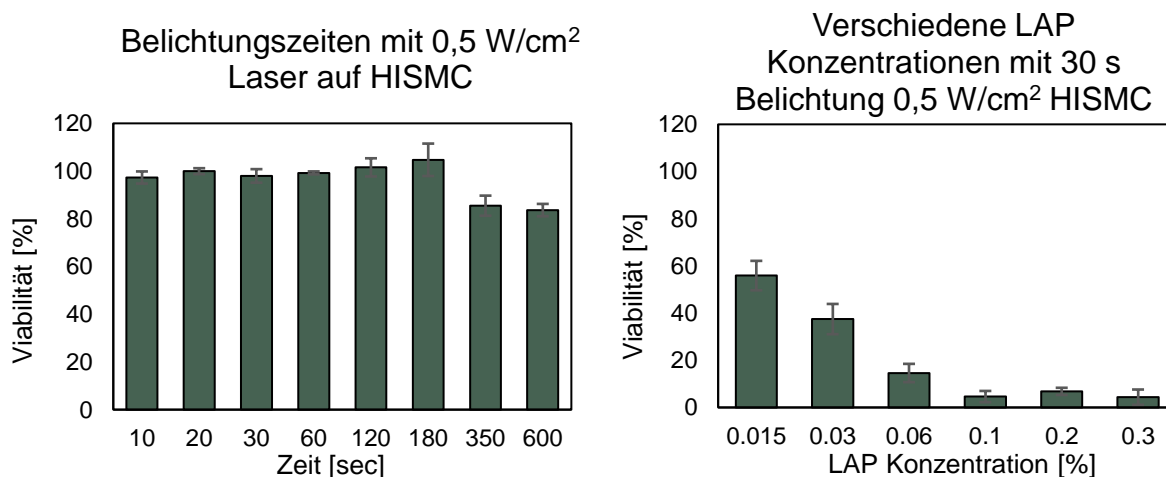


Abbildung 183: Zellviabilitäts-Assay mit HISMZ.  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde nach 24 h Kultivierung mit  $0,5 \text{ W/cm}^2$ , 5 cm Abstand und unterschiedliche Belichtungszeiten bestrahlt (links) oder mit unterschiedlichen LAP-Konzentrationen behandelt und für 30 s mit  $0,5 \text{ W/cm}^2$  und 5 cm Abstand bestrahlt (rechts). Die Zellen wurden danach für 72 h weiter kultiviert. Die Viabilität wurde über den MTT-Assay bestimmt. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

## 8.3 Untersuchung des Wachstums von Zellen des intestinalen Mesenchyms in unterschiedliche Hydrogelen

### 8.3.1 Proliferationsverhalten von HISMC

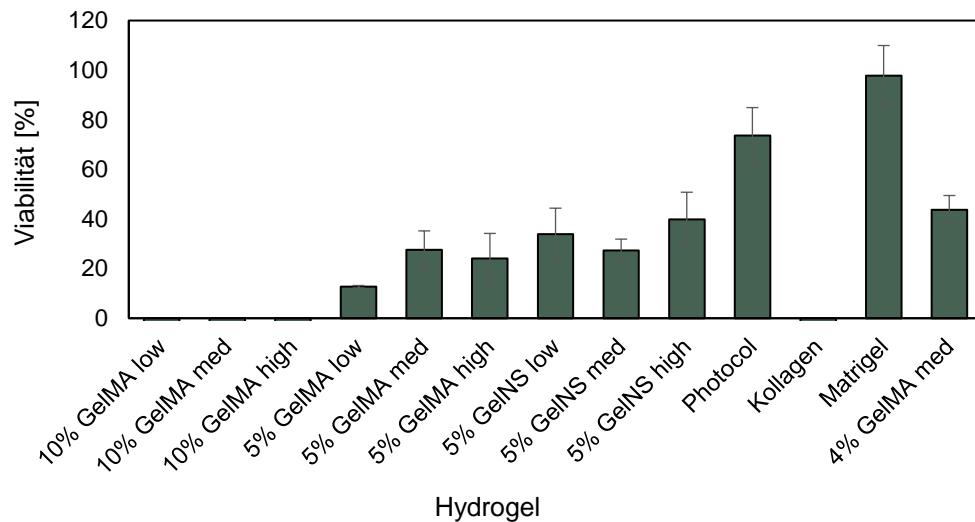


Abbildung 184: Zellviabilitäts-Assay mit HISMC.  $10^5$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde in unterschiedliche Hydrogelen für 96 h kultiviert. Die Viabilität wurde über den MTT-Assay bestimmt. Die Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt,  $n = 3$ .

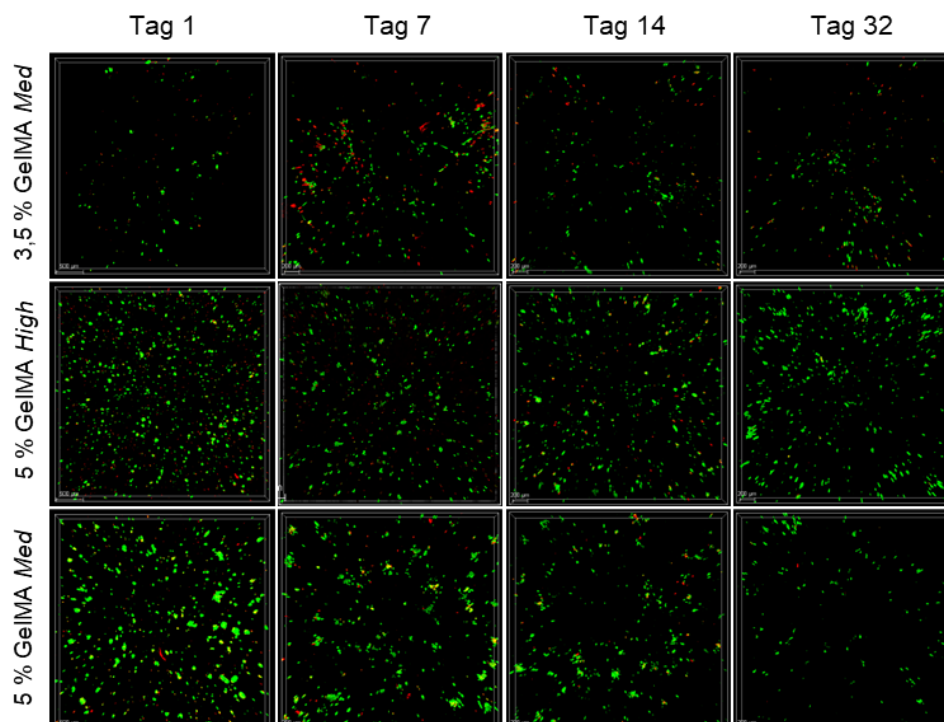


Abbildung 185: Lebend-Tot-Färbung von HISMC in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je 100  $\mu$ L Hydrogel angesetzt. An den Tagen 1, 7, 14 und 32 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{exc} = 496$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 525$  nm und PI:  $\lambda_{exc} = 533$  nm,  $\lambda_{em} = 590 - 630$  nm. Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu$ m, Höhe= 300  $\mu$ m. Maßstab: 500  $\mu$ m.

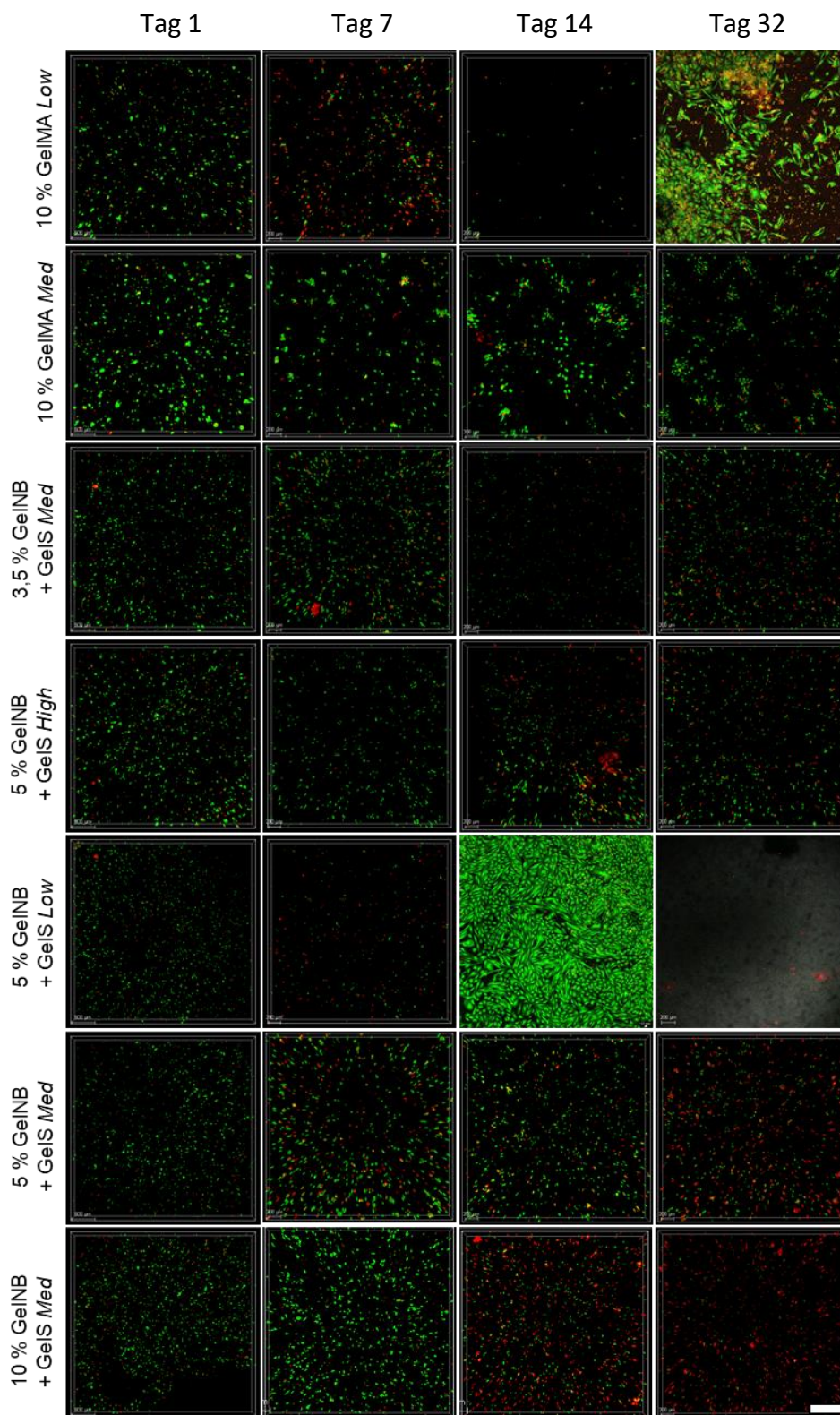


Abbildung 186: Lebend-Tot-Färbung von HSMC in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je 100  $\mu$ L Hydrogel angesetzt. An den Tagen 1, 7, 14 und 32 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{exc} = 496$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 525$  nm und PI:  $\lambda_{exc} = 533$  nm,  $\lambda_{em} = 590 - 630$  nm. Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu$ m, Höhe= 300  $\mu$ m. Maßstab: 500  $\mu$ m.

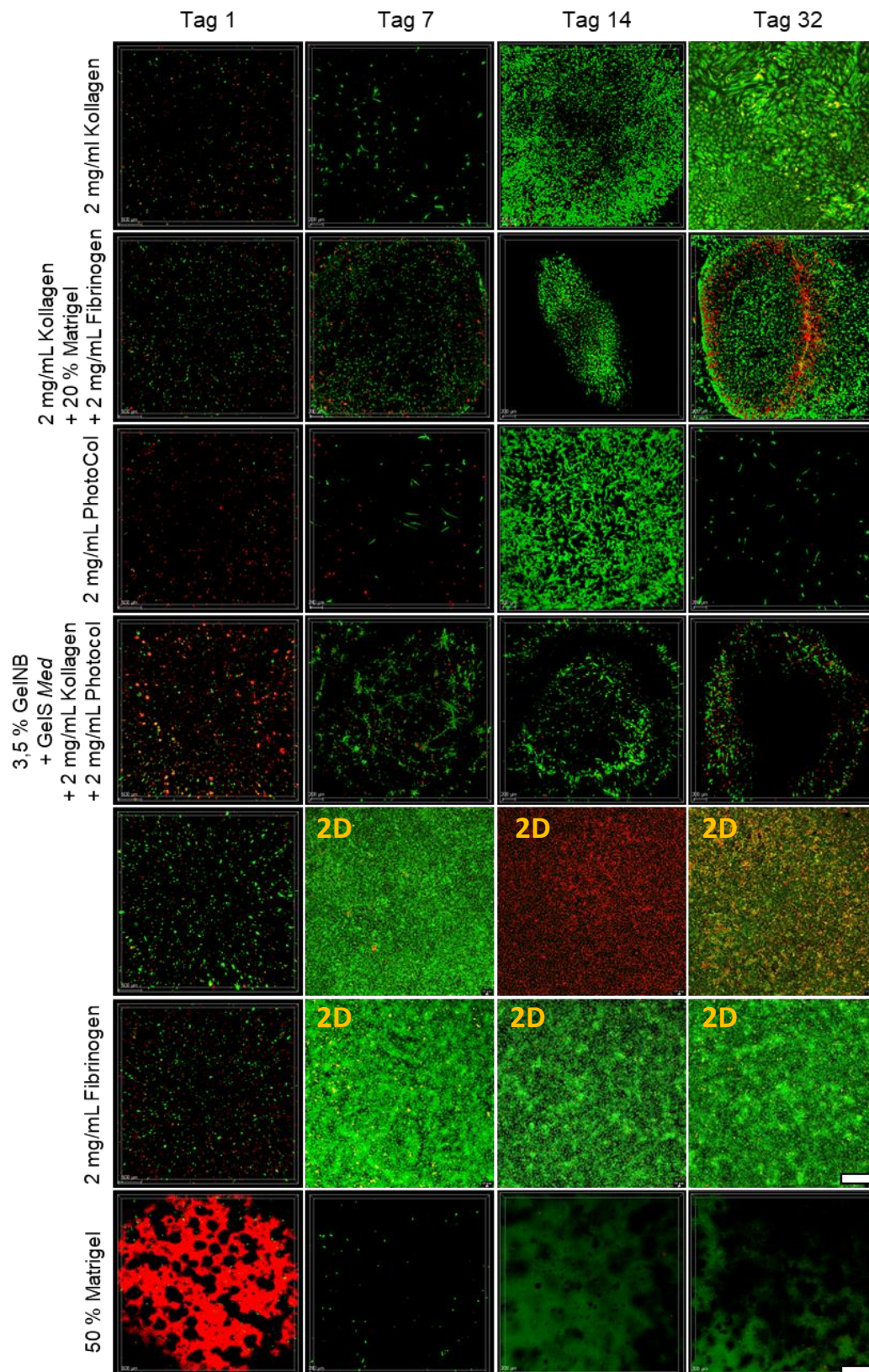


Abbildung 187: Lebend-Tot-Färbung von HISMC in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je 100  $\mu$ L Hydrogel angesetzt. An den Tagen 1, 7, 14 und 32 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{exc} = 496$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 525$  nm und PI:  $\lambda_{exc} = 533$  nm,  $\lambda_{em} = 590 - 630$  nm. Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu$ m, Höhe= 300  $\mu$ m. Maßstab: 2D: 100  $\mu$ m, 3D: 500  $\mu$ m.

### 8.3.2 Proliferationsverhalten von HIF

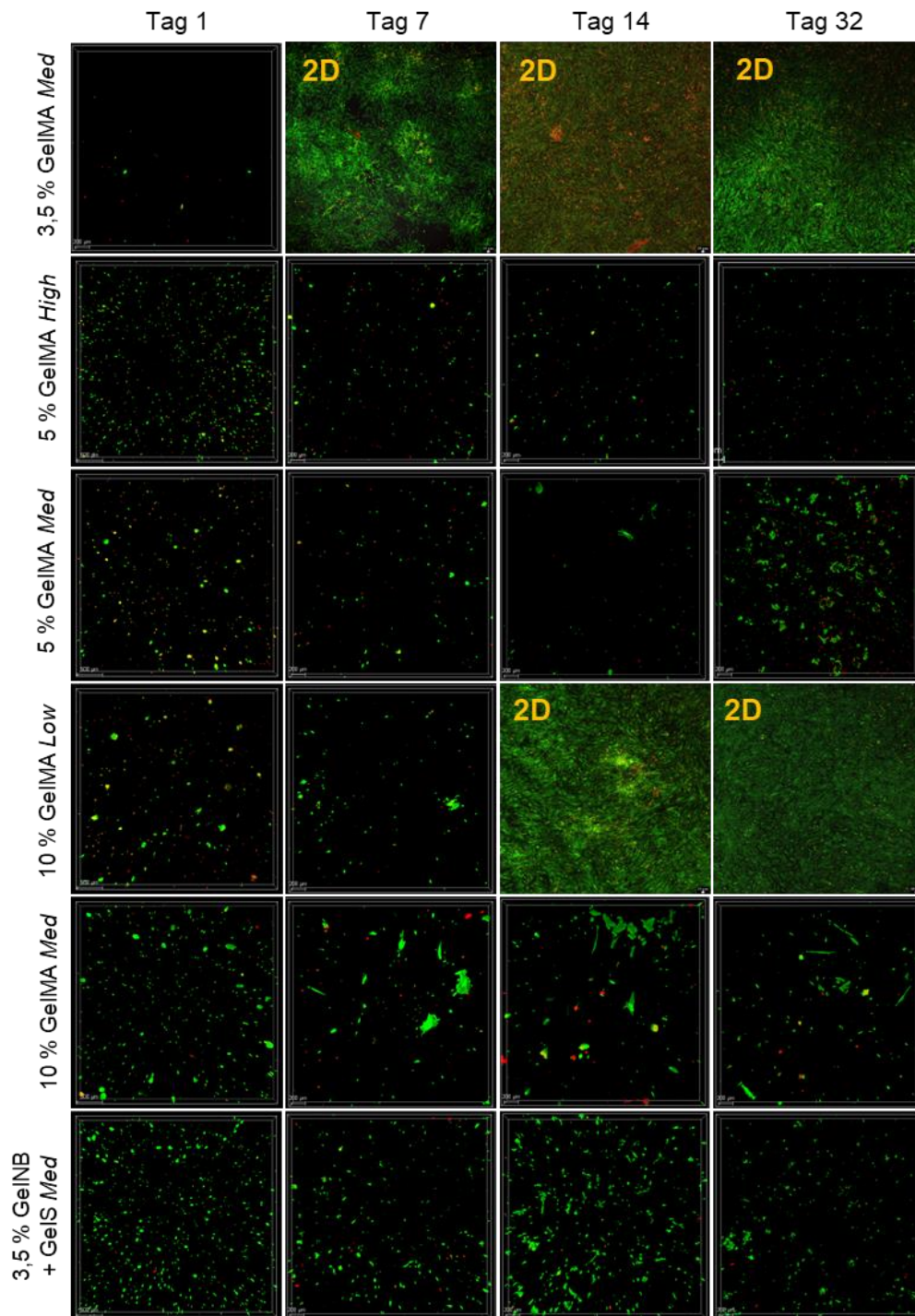


Abbildung 188: Lebend-Tot-Färbung von HIF in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je 100  $\mu$ L Hydrogel angesetzt. An den Tagen 1, 7, 14 und 32 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{exc} = 496$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 525$  nm und PI:  $\lambda_{exc} = 533$  nm,  $\lambda_{em} = 590 - 630$  nm. Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu$ m, Höhe= 300  $\mu$ m. Maßstab: 2D: 100  $\mu$ m, 3D: 500  $\mu$ m.

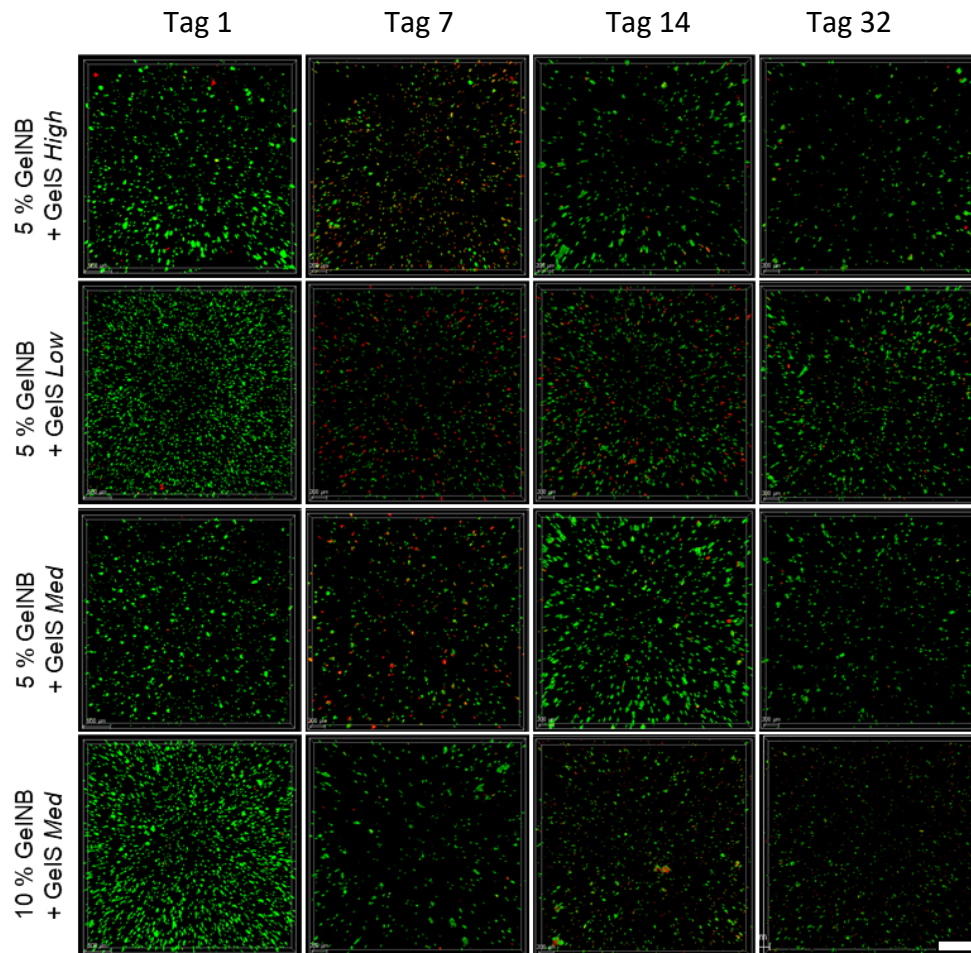


Abbildung 189: Lebend-Tot-Färbung von HIF in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je  $100 \mu\text{L}$  Hydrogel angesetzt. An den Tagen 1, 7, 14 und 32 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{\text{exc}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 525 \text{ nm}$  und PI:  $\lambda_{\text{exc}} = 533 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 - 630 \text{ nm}$ . Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand  $3 \mu\text{m}$ , Höhe  $= 300 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $500 \mu\text{m}$ .

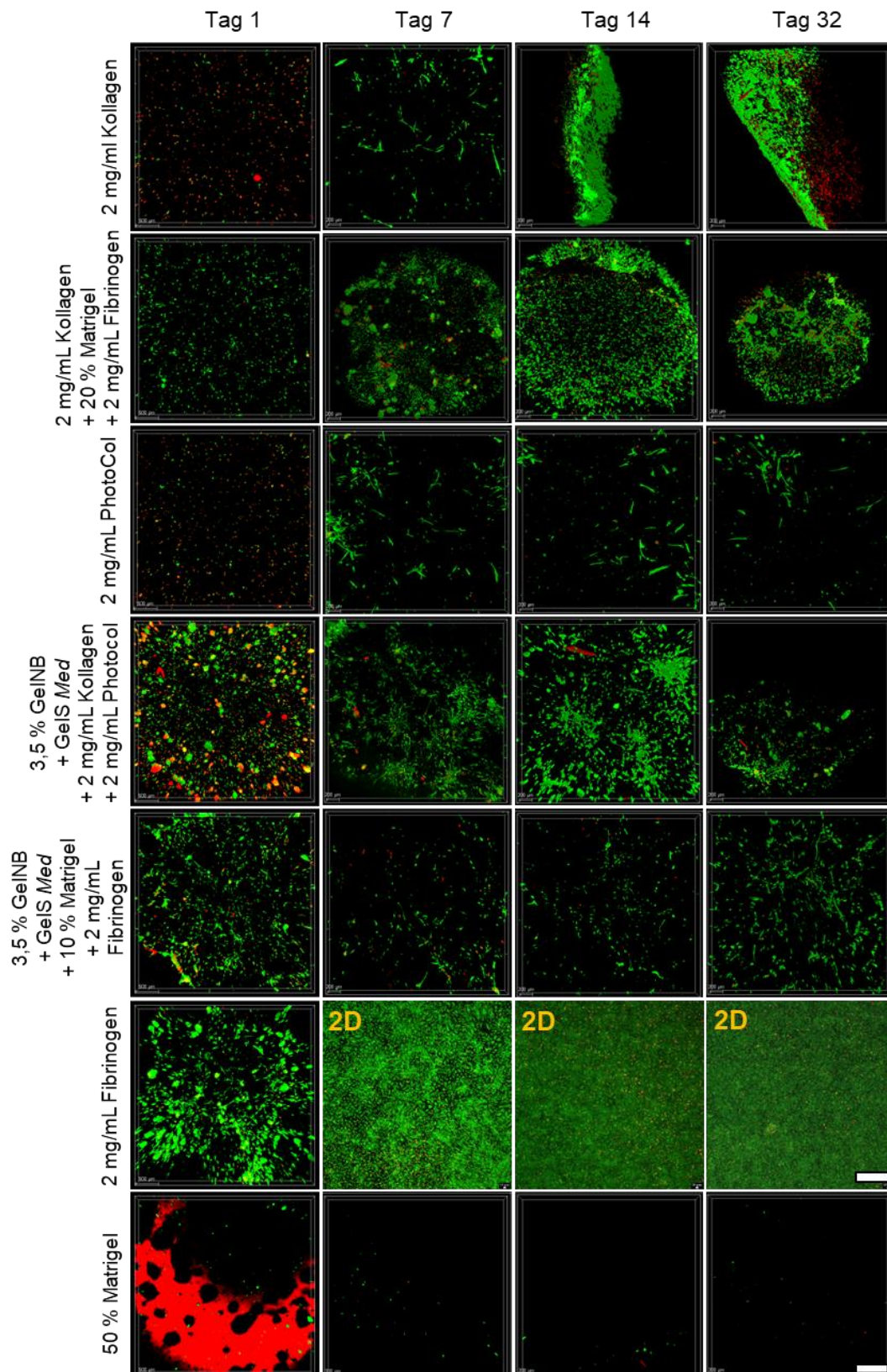


Abbildung 190: Lebend-Tot-Färbung von HIF in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je 100  $\mu$ L Hydrogel angesetzt. An den Tagen 1, 7, 14 und 32 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{exc} = 496$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 525$  nm und PI:  $\lambda_{exc} = 533$  nm,  $\lambda_{em} = 590 - 630$  nm. Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu$ m, Höhe= 300  $\mu$ m. Maßstab: 2D: 100  $\mu$ m, 3D: 500  $\mu$ m.

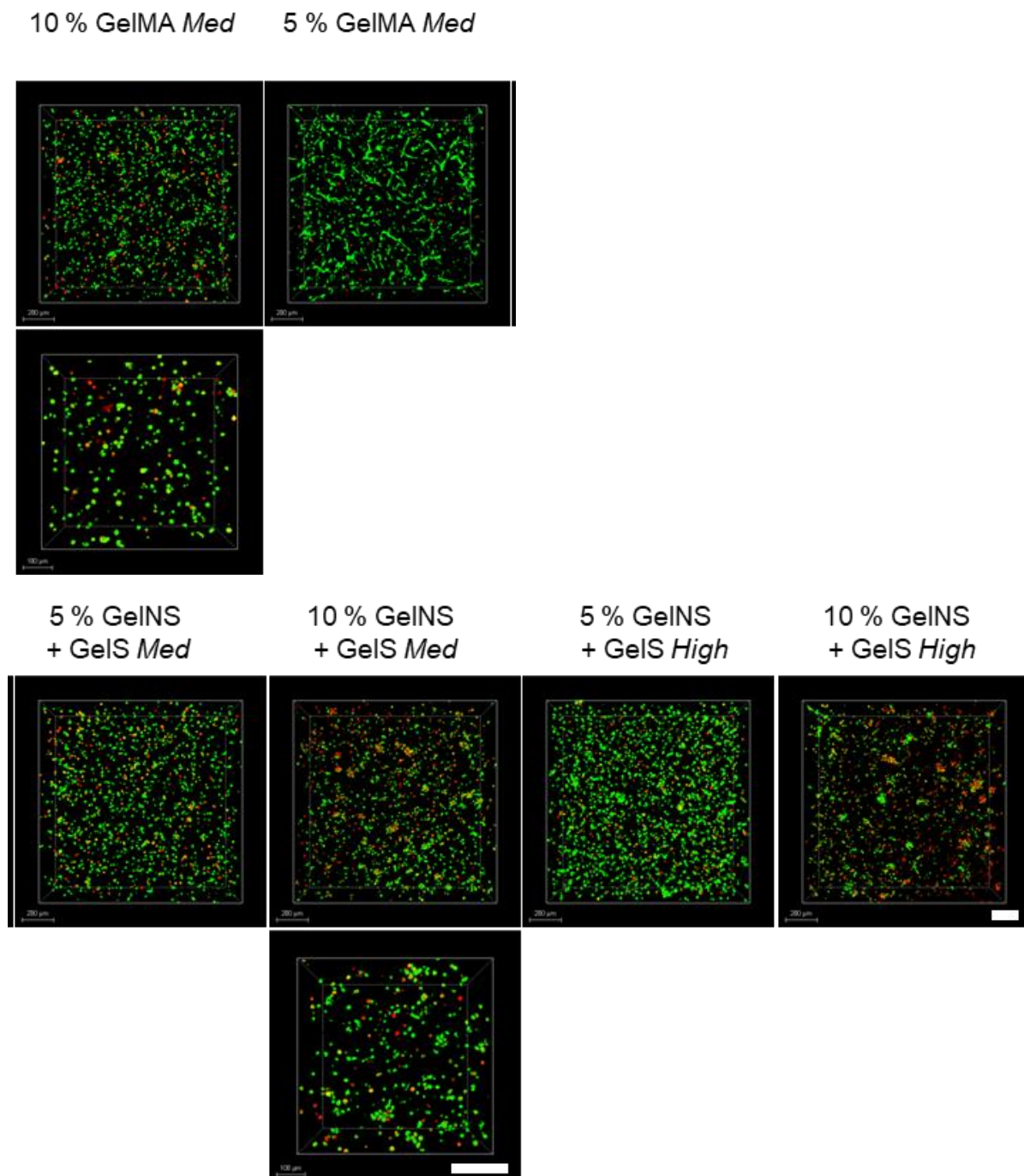


Abbildung 191: Lebend-Tot-Färbung von HIF in verschiedenen Hydrogelen.  $10^5$  Zellen Pro Well einer 96-Well-Platte wurden in je 100  $\mu$ L Hydrogel angesetzt. An Tag 5 wurden die Zellen mit Calcein-AM (grün, lebend) und PI (rot, tot) markiert. Abgebildet sind die Überlagerungen in 3D-Ansicht der z-Stack Aufnahmen von Calcein-AM:  $\lambda_{exc} = 496$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 525$  nm und PI:  $\lambda_{exc} = 533$  nm,  $\lambda_{em} = 590 - 630$  nm. Z-Stack Aufnahmen:  $n = 100$ , Abstand 3  $\mu$ m, Höhe= 300  $\mu$ m. Maßstab: 200  $\mu$ m.

## 8.4 Nachweis der Antikörperspezifität von CDX2 und FoxA2

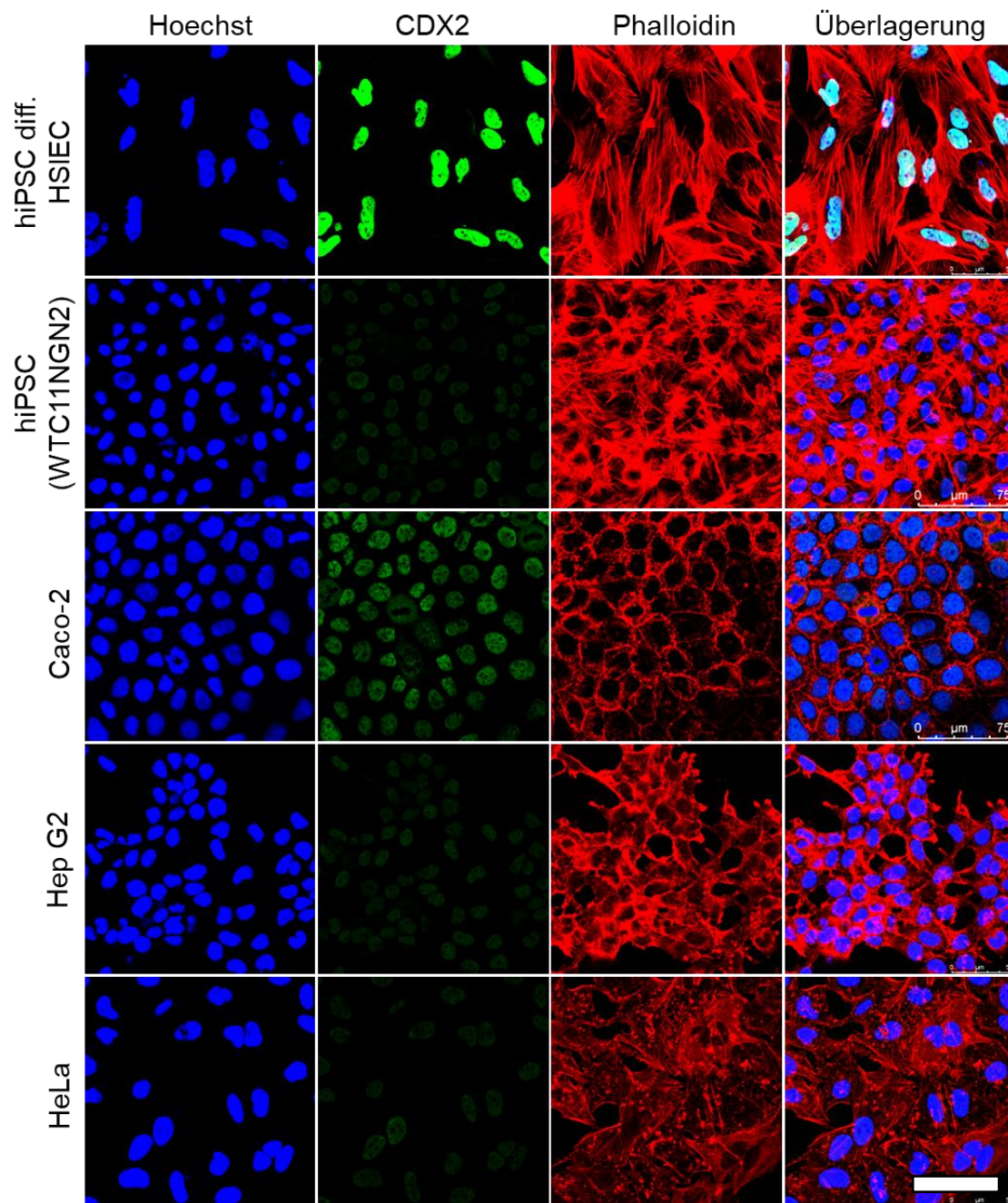


Abbildung 192:  $10^4$  Zellen pro Well eine 8-Well-Platte wurden für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung des Expressionsmarkers Cdx2 markiert. Ebenfalls wurden die Zellekerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellekerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410\text{-}510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (rot:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556\text{-}573 \text{ nm}$ ), die Immunfluoreszenzfärbung mit CDX2 (grün:  $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 660\text{-}798 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Maßstab:  $75 \mu\text{m}$ .

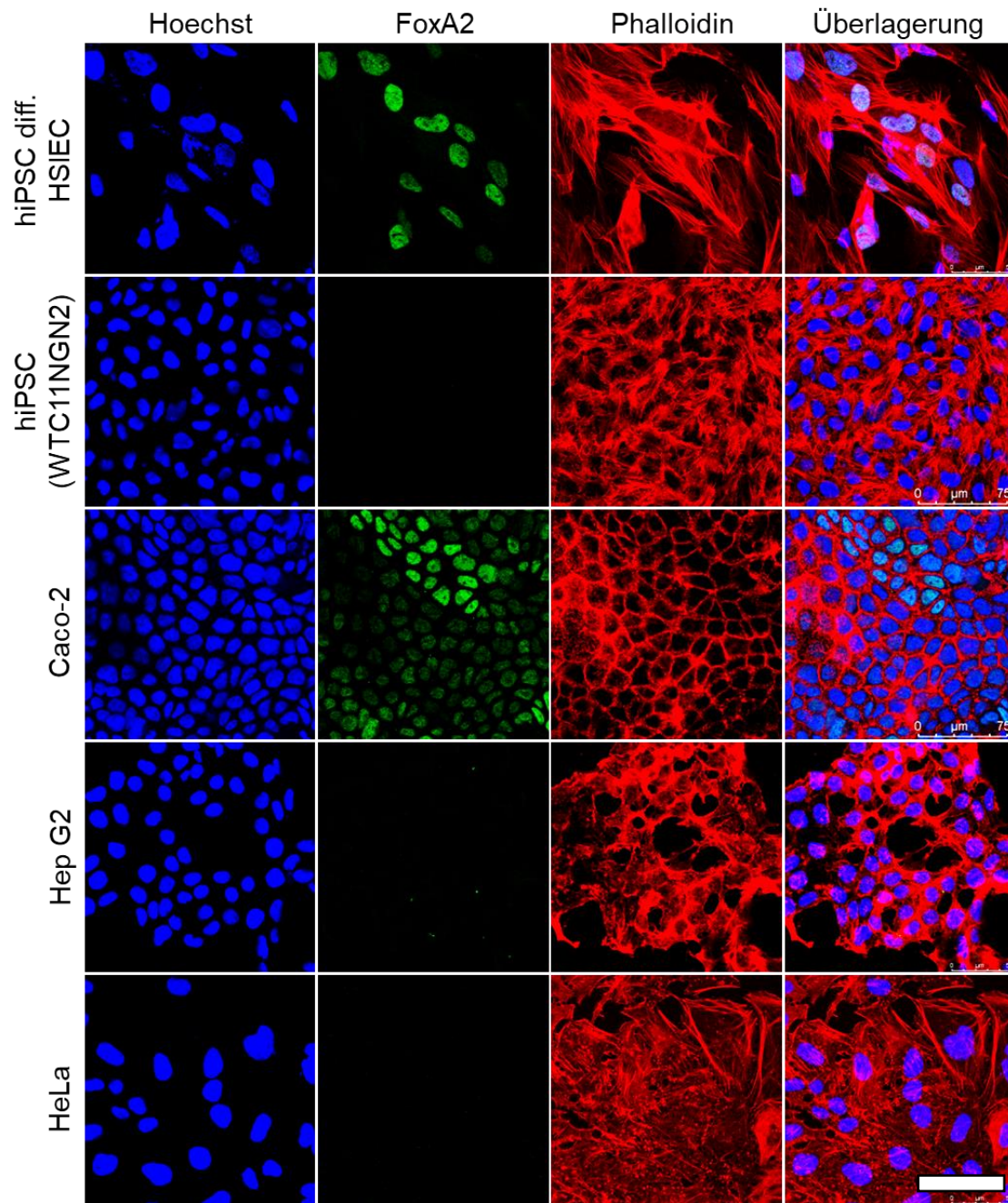


Abbildung 193:  $10^4$  Zellen pro Well eine 8-Well-Platte wurden für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung des Expressionsmarkers FoxA2 markiert. Ebenfalls wurden die Zellekerne über Hoechst33342 und die Aktinfilamente mit Phalloidin markiert. Abgebildet sind die Zellekerne (blau:  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 410\text{-}510 \text{ nm}$ ), die Aktinfilamente (rot:  $\lambda_{exc} = 551 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 556\text{-}732 \text{ nm}$ ), die immunfluoreszenzfärbung mit FoXA2 (grün:  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 494\text{-}562 \text{ nm}$ ) und deren Überlagerung. Maßstab:  $75 \mu\text{m}$ .