

Entwicklung von Markierungsreagenzien für die bildgebende Diagnostik

Bianca Grunert

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin "Kolloid- und Polymerchemie"

eingereicht an der

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

- | | |
|---------------|---------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Helmut Schlaad |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Andreas Taubert |
| 3. Gutachter: | PD Dr. Pia Welker |

Ort und Datum der Disputation: Potsdam, den 08.01.2019

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-422830>
<https://doi.org/10.25932/publishup-42283>

Für meine Eltern.

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
D	Diffusionskoeffizienz
d_h	Hydrodynamischer Durchmesser
ϵ	Dielektrizitätskonstante
E	Elektrische Feldstärke
k_B	Boltzmann-Konstante
λ	Wellenlänge
M	Magnetisierung
η	Dynamische Viskosität
T	Magnetische Flussdichte
T1	Longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit
T2	Transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit
r_1	Longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxivität
τ	Messzeit
T	Temperatur
ξ	Zetapotential
q	Streulichtvektor
v	Geschwindigkeit

Abkürzung	Bedeutung
A549	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549
AUC	Area Under the Curve
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
cps	counts per second
CT	Computer-Tomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPSS	Diode Pumped Solid State
DTPA	Diethyltriaminpentaessigsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EM	Elektrophoretische Mobilität
FCS	Fetal Calf Serum
FOV	Field of View
G5-PAMAM	Generation-5-Polyamidoamin

GPC	Gelpermeationschromatographie
GRE	Gradienten-Echo
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LA-ICP-MS	Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie, kurz MR
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie
PAA	Polyacrylsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDI	Polydispersitätsindex
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R-NCS	Isothiocyanate
ROI	Region of Interest
RSD	Relative Standard Deviation
SE	Spin-Echo
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxide
STAW	Standardabweichung
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween20
TE	Echozeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TR	Repetitionszeit

1	Theoretische Grundlagen	1
1.1	Einleitung	1
1.2	MRT-gestütztes Zell-Tracking	3
1.2.1	Makromolekulare Markierungsreagenzien.....	7
1.2.2	Nanopartikeläre Markierungsreagenzien	10
1.3	Aufnahme von Markierungsreagenzien in die Zelle	12
1.4	Bildgebung mit der Magnetresonanztomographie	13
1.5	Bildgebung mit der Laser-Ablation (LA)-ICP-MS	20
1.5.1	ICP-MS-basierte Immunoassays	23
1.6	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential.....	28
1.7	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	31
2	Ergebnisse und Diskussion	35
2.1	DOTA(Gd ³⁺)-G5-PAMAM Dendrimere.....	35
2.1.1	Acetylierung von G5-PAMAM.....	35
2.1.2	DOTA(Gd ³⁺)-Funktionalisierung von G5-PAMAM.....	39
2.2	Ln:GdVO ₄ -PAA Nanokristalle.....	42
2.2.1	Präparation der Reaktionsmischung und Einfluss der Polyacrylsäure	43
2.2.2	Variation der Ln ³⁺ -Menge	45
2.2.3	Untersuchung der Reproduzierbarkeit.....	47
2.2.4	Untersuchung der Partikelstabilität	49
2.2.5	Zeitabhängige Synthese.....	50
2.2.6	Formulierung und Sterilisation.....	51
2.3	Charakterisierung der Reagenzien.....	56
2.3.1	Infrarotspektroskopie.....	56
2.3.2	Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie und Röntgenfluoreszenzanalyse	58
2.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	60
2.3.4	Fluoreszenzspektroskopie.....	63
2.3.5	Bestimmung der r ₁ -Relaxivität	69
2.3.6	Biokompatibilitätsuntersuchungen	72
2.4	Metallmarkierung verschiedener Zellarten.....	74
2.4.1	Quantifizierung der Lanthanoide nach der Zellmarkierung	75
2.4.2	Mikroskopische Bewertung der Zellmarkierung mit Nanokristallen.....	77
2.4.3	Bildgebung von Zell-Phantomen am PET/MRT	80
2.4.4	Bildgebung der Zellmarkierung mit CLSM	82

2.4.5	Bildgebung der Zellmarkierung mit der LA-ICP-MS	86
2.5	Konjugation von Nanokristallen an Antikörper	94
3	Zusammenfassung und Ausblick	98
4	Anhang.....	102
4.1	Experimentelle Durchführung	102
4.1.1	Verwendete Chemikalien	102
4.1.2	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS)	105
4.1.3	Funktionalisierung von G5-PAMAM-Dendrimeren	108
4.1.4	Gelpermeationschromatographie.....	110
4.1.5	Synthese von Ln:GdVO ₄ -PAA Nanokristallen	110
4.1.6	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	111
4.1.7	Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie	111
4.1.8	Röntgenfluoreszenzanalyse	112
4.1.9	Transmissionselektronenmikroskopie	112
4.1.10	Fluoreszenzspektroskopie	112
4.1.11	Bestimmung der r ₁ -Relaxivität.....	113
4.1.12	Biokompatibilitätsuntersuchungen.....	113
4.1.13	Metallmarkierung von A549 Zellen und MSCs	114
4.1.14	Quantifizierung der Lanthanoide nach der Zellmarkierung	116
4.1.15	Präparation und Bildgebung von Zell-Phantomen am PET/MRT	117
4.1.16	Bildgebung der Zellmarkierung mit der LA-ICP-MS.....	118
4.1.17	Antikörperkonjugation und Dot Blot Assay.....	120
4.2	Experimentelle Daten	122
4.2.1	¹ H-NMR-Spektren von Ac-G5-PAMAM.....	122
4.2.2	Gelpermeationschromatographie von DOTA(Gd ³⁺)-Ac-G5-PAMAM... ..	124
4.2.3	Ln:GdVO ₄ -PAA Nanokristalle über solvothermale Route	125
4.2.4	Bestimmung der r ₁ -Relaxivität	131
4.2.5	Bioimaging mit LA-ICP-MS	132
	Literaturverzeichnis	137
	Danksagung.....	154

Zusammenfassung

Die intrazelluläre Markierung mit geeigneten Reagenzien ermöglicht ihre bildgebende Darstellung in lebenden Organismen. Dieses Verfahren (auch „Zell-Tracking“ genannt) wird in der Grundlagenforschung zur Entwicklung zellulärer Therapien, für die Erforschung pathologischer Prozesse, wie der Metastasierung, sowie für Therapiekontrollen eingesetzt. [1] Besondere Bedeutung haben in den letzten Jahren zelluläre Therapien mit Stammzellen erlangt, da sie großes Potential bei der Regeneration von Geweben bei Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Typ-1-Diabetes versprechen. [1] Für die Entwicklung einer zellulären Therapie sind Informationen über den Verbleib der applizierten Zellen *in vivo* (Homing-Potential), über ihre Zellphysiologie sowie über die Entstehung möglicher Entzündungen notwendig. [2] Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Synthese von Markierungsreagenzien, die nicht nur eine effiziente Zellmarkierung ermöglichen, sondern einen synergistischen Effekt hinsichtlich des modalitätsübergreifenden Einsatzes in den bildgebenden Verfahren MRT und Laser-Ablation(LA)-ICP-MS erlauben. Die MRT-Bildgebung ermöglicht die nicht invasive Nachverfolgung markierter Zellen *in vivo* und die LA-ICP-MS die anschließende *ex vivo* Analytik zur Darstellung der Elementverteilung (Bioimaging) in einer Biopsieprobe oder in einem Gewebeschnitt. Für diese Zwecke wurden zwei verschiedene Markierungsreagenzien mit dem kontrastgebenden Element Gadolinium synthetisiert. Gadolinium eignet sich aufgrund seines hohen magnetischen Moments hervorragend für die MRT-Bildgebung und da es in Biomolekülen nicht natürlich vorkommt, konnten die Reagenzien gleichermaßen für die Zellmarkierung und das Bioimaging mit der LA-ICP-MS untersucht werden. [3], [4] Für die Synthese eines makromolekularen Reagenzes wurde das kommerziell verfügbare Dendrimer G5-PAMAM über bifunktionelle Linker mit dem Chelator DOTA funktionalisiert, um anschließend Gadolinium zu komplexieren. Ein zweites, nanopartikuläres Reagenz wurde über eine Solvothermal-Synthese erhalten, bei der Ln:GdVO₄-Nanokristalle mit einer funktionellen Polyacrylsäure(PAA)-Hülle dargestellt wurden. Die Dotierung der Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle mit verschiedenen Lanthanoiden (Ln=Eu, Tb) zeigte ihre prinzipielle Multiplexfähigkeit in der LA-ICP-MS. Beide Markierungsreagenzien zeichneten sich durch gute Bioverträglichkeiten und r_1 -Relaxivitäten aus, was zudem ihr Potential für Anwendungen als präklinische „blood-pool“ MRT-Kontrastmittel belegte. Die Untersuchung der Zellmarkierung erfolgte anhand einer Tumorzelllinie und einer

Stammzelllinie, wobei beide Zellarten erfolgreich intrazellulär mit beiden Reagenzien markiert wurden. Nach der Zellmarkierung veranschaulichte die *in vitro* MRT-Bildgebung von Zell-Phantomen eine deutlichere Kontrastverstärkung der Zellen nach der Markierung mit den Nanokristallen im Vergleich zum kommerziellen Kontrastmittel Magnevist®. Die hohe Effizienz der Zellmarkierung mit den Nanokristallen und die damit verbundenen hohen Signalintensitäten in einer einzelnen Zelle erlaubten beim Bioimaging mit der LA-ICP-MS, Messungen bis zu einer Auflösung von 4 µm Laser Spot Size. Nach der Zellmarkierung mit den DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimern waren hingegen Aufnahmen mit der LA-ICP-MS nur bis zu einer Auflösung von 12 µm Laser Spot Size möglich. Insgesamt waren die Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle mit größerer Ausbeute und kostengünstiger herstellbar als die DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimere und zeigten zudem eine effizientere Zellmarkierung. Die Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle erscheinen somit für das Zell-Tracking als besonders vielversprechend. Darauf aufbauend wurden die Nanokristalle zur Etablierung der Antikörper-Konjugation ausgewählt, was sie für die molekulare *in vivo* Bildgebung sowie für die Immuno-Bildgebung von Gewebeschnitten oder Biopsie-Proben mit der LA-ICP-MS anwendbar macht.

Abstract

Labeling of intracellular structures using appropriate reagents allows diagnostic imaging of such structures in living organisms. This procedure, also known as ‘cell-tracking’, can be applied in various fields of basic research, e.g. for development of cellular therapies, understanding of pathological processes such as metastasis as well as monitoring of therapeutic strategies. [1] In recent years, cellular therapies involving stem cells have gained increasing importance for they promise great potential in the regeneration of damaged tissue associated with various diseases such as Parkinson’s disease or Type 1 diabetes. [1] However, to enable the development of a cell-based therapy, information regarding the *in vivo* ability of administered cells to migrate to the organ of their origin (homing potential), the cell physiology and the risk of potential inflammation is essential. [2] The objective of the present thesis was the synthesis of labeling reagents that not only enable efficient cell labeling, but also allow tracking of the labeled cells via magnetic resonance imaging (MRI) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectroscopy (LA-ICP-MS). MRI offers the ability to non-invasively track the labeled cells *in vivo*, whereas LA-ICP-MS allows subsequent *ex vivo* analysis of biopsy samples. To this end, two different types of labeling reagents were synthesized containing the contrast-enhancing element gadolinium (Gd). Gd is perfectly suited for MRI due to its high magnetic moment and, since it does not occur naturally in biomolecules, the Gd-containing labelling reagents could additionally be investigated with regard to their cell labeling and bioimaging efficacy using LA-ICP-MS. [3], [4] Synthesis of a macromolecular labeling reagent was performed by functionalization of the commercially available dendrimer G5-PAMAM with the chelator DOTA, which subsequently allows complexation of Gd³⁺-ions. A second nanoparticulate labeling reagent was synthesized via a solvothermal route which yielded Ln:GdVO₄ nanocrystals having a functional shell of polyacrylic acid. Doping of these nanocrystals with different lanthanides (Ln=Eu, Tb) demonstrated their fundamental capability for multiple implementation with LA-ICP-MS. All synthesized labeling reagents showed suitable biocompatibility and r₁-relativities, indicating their potential for application as *in vivo* preclinical MR imaging agents. The cell labeling efficacy of the synthesized reagents was investigated in both cancer and stem cell lines, whereby both cell types showed efficient intracellular uptake. After cell labelling, *in vitro* MRI of cell phantoms indicated

that the nanocrystalline-labelled cells portrayed a significantly higher contrast enhancement, in comparison to labelling with the commercially available MRI agent, Magnevist. Bioimaging of the nanocrystalline-labelled cells with LA-ICP-MS enabled resolutions of up to 4 μm laser spot size to be achieved since the high labelling efficacy allowed high signal intensities to be observed. On the other hand, measurements of dendrimer-labelled cells could be performed up to resolutions of 12 μm laser spot size. Evaluation of the different labelling reagents showed that the one based on nanocrystals could be synthesized more cost effectively, with greater yields and resulted in a higher cell labelling efficacy, demonstrating a superior aptitude for cell-tracking applications. Consequently, the nanocrystalline labeling reagent was selected for conjugation with antibodies, which in turn enables *in vitro* ICP-MS-based immunohistochemistry detection as well as *in vivo* molecular imaging.

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Einleitung

Das Ärzteblatt berichtete am 19. Januar 2017, dass in Deutschland die häufigste Todesursache auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen ist und gefolgt wird von Tumorerkrankungen, der in 2015 fast 25 % aller Sterbefälle erlagen. [5] Bei diesen und vielen anderen Erkrankungen werden bereits in der Frühphase krankheitsspezifische Biomoleküle exprimiert, welche nur durch besonders empfindliche Diagnosemethoden nachgewiesen werden können. Durch den Einsatz hochsensitiver Marker in *in vitro* Analysen, wie z.B. Immunoassays, können diese an krankheitsspezifische Biomoleküle binden und eine frühe diagnostische Aussage ermöglichen. [6] Für die *in vivo* Darstellung von biologischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene ist vor allem die Magnetresonanztomographie (MRT) von besonderer Bedeutung. Die MRT ermöglicht die Aufnahme hochaufgelöster anatomischer Bilder mit hohem Weichteilkontrast und liefert verschiedene funktionelle und physiologische Informationen. Die nicht-invasive Technik eignet sich hervorragend für serielle Untersuchungen im Rahmen von Verlaufskontrollen bei Krankheitsprozessen und Therapien. [7] (Prä)klinische Bildgebungsmethoden wie MRT, Computertomographie (CT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Ultraschall (US), Single Photonen-Emissions-Tomographie (SPECT) oder die optische Bildgebung (OI) bieten als Alternative zur Histologie neue Möglichkeiten bei der Untersuchung lebender Organismen. [8] Bei der MRT-Bildgebung werden häufig Kontrastmittel eingesetzt, um den Kontrast zwischen einem spezifischen Gewebe oder Organ und dem umgebenen Gewebe im Körper zu verstärken. Die, bei verschiedenen Krankheiten einhergehende, Tumor- oder Entzündungsbildung kann bei Verwendung eines Kontrastmittels besser sichtbar gemacht werden. Bei der MRT werden hauptsächlich Gadolinium-haltige Verbindungen oder superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIOs) als kontrastverstärkende Substanzen eingesetzt. Gadoliniumverbindungen werden klinisch nur als niedermolekulare Chelat-Komplexe angewendet und hauptsächlich für die Darstellung der Blutgefäße und zur Diagnostik von Gehirntumoren genutzt. [9], [10] Die von den Behörden zugelassenen

Eisenoxidnanopartikel werden in der MRT zur Diagnostik von Leber, Milz und Lymphknoten-Metastasen eingesetzt, jedoch wurden sie von den Gadolinium-haltigen Verbindungen zurückgedrängt. [11] Das Einsatzspektrum von makromolekularen Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln beschränkt sich auf den präklinischen Einsatz. Makromolekulare und vor allem nanopartikeluläre Kontrastmittel besitzen jedoch einige Vorteile gegenüber den niedermolekularen Verbindungen. Durch gezielte Steuerung der Oberflächeneigenschaften und der Partikelgröße können sie länger im Gefäßsystem verbleiben als niedermolekulare Verbindungen und sich in Tumorgewebe anreichern. [12] Besonders in präklinischen Studien zur Erforschung eines neuen Therapeutikums kann dies entscheidende Vorteile für Therapieverlaufskontrollen implizieren. Die Erhebung präklinischer Daten liefert wichtige Information zur Behandlung diverser Erkrankungen und wird dazu genutzt, um weiterführende klinische Studien zu indizieren. Mit der Entwicklung geeigneter Kontrastmittel für die Präklinik kann der Verlauf einer Krankheit oder die Wirkung eines neuen Medikamentes von Anfang bis Ende in einem einzelnen Tier nachverfolgt werden, wodurch auch die Anzahl an Labortiere reduziert wird. Zudem werden mit neuen Kontrastmitteln auch innovative Anwendungen möglich, die über die reine Bildgebung hinausgehen. Hierzu zählt die molekulare Bildgebung, die insbesondere auf dem Gebiet der Therapieverlaufskontrolle einen entscheidenden Beitrag liefert. [13] Nach Konjugation geeigneter Markierungsreagenzien an Antikörper ermöglicht die molekulare *in vivo* Bildgebung die Visualisierung subzellulärer Komponenten. Darüber hinaus werden innovative *in vitro* Verfahren, wie ICP-MS-basierte Immunoassays oder die Massenzytometrie (CyTOF), möglich. [14] Die Anwendung von Gadoliniumverbindungen als intrazelluläre Markierungsreagenzien ermöglicht das MR-gestützte Zell-Tracking und somit die nicht-invasive Nachverfolgung von markierten Zellen *in vivo*. Das Zell-Tracking spielt besonders bei der Erforschung von zellbasierten Therapien eine große Rolle, da sie Behandlungsmöglichkeiten für eine Vielzahl von Erkrankungen versprechen. [15], [16] Aktuelle Forschungsschwerpunkte sind beispielsweise die Tumorthherapie mit dendritischen Zellen oder die Stammzelltherapie. [17], [18] Therapien mit mesenchymalen Stammzellen wurden bereits in klinischen Studien untersucht. [15] Die Herausforderung bei der Erforschung von zellbasierten Therapien liegt darin zu bestimmen, welche Zellen eine therapeutische Wirksamkeit aufweisen. Die Wirksamkeit einer zellbasierten Therapie hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab, wie der Krankheitsursache, dem verwendeten Zelltyp und ihrer Applikationsform, der Zellproliferation und ihrer funktionalen Integration. Aus

diesen Gründen und zur Überführung in die klinische Praxis ist es wichtig, die Zellen und ihren therapeutischen Nutzen *in vivo* sichtbar zu machen. [2], [8], [19] Für die nicht-invasive Überwachung therapeutischer Zellen in lebenden Organismen ist aktuell die Zellmarkierung mit magnetischen Reagenzien für die MRT-Bildgebung die Methode der Wahl. [2], [20], [21], [22], [23]

1.2 MRT-gestütztes Zell-Tracking

MRT-basierte Technologien werden neben der Angiographie und der molekularen Bildgebung auch zur Nachverfolgung (,Tracking‘) von markierten (gelabelten) Zellen *in vivo* genutzt. [9], [19] Die Markierung therapeutischer Zellen hat nicht nur bei der Erforschung von Stammzelltherapien oder adoptiven Immuntherapien zunehmend an Bedeutung gewonnen, sie spielt auch bei der grundlegenden Krebsforschung eine Rolle, um neue zellbiologische Mechanismen zu verdeutlichen. [24] Die Effizienz der Zellmarkierung hängt sowohl von der verwendeten Zelllinie mit deren spezifischen Membraneigenschaften als auch von den physikochemischen Eigenschaften des Markierungsreagenzes ab. [25] Die größte Herausforderung ist die effiziente Aufnahme des Reagenzes in die Zelle, um sie mit hoher Sensitivität und über einen langen Zeitraum hinweg abbilden zu können, ohne die Funktionalität und Proliferation der Zellen zu beeinträchtigen. [22], [26] Die Zellmarkierung sollte zudem langlebig sein und eine wiederholte Bildgebung ermöglichen. [27] Bei der MRT-Bildgebung muss in Abhängigkeit des verwendeten Markierungsreagenzes die Puls-Sequenz so gewählt werden, dass die markierten Zellen von umgebenden Gewebe unterschieden werden können. [19] Es gibt zahlreiche Forschungsarbeiten, die SPIOs für die Zellmarkierung beschreiben. [28] SPIOs werden für die Zellmarkierung üblicherweise gemeinsam mit den Zellen kultiviert, wobei sie über Endozytose in die intrazellulären Kompartimente der Zelle aufgenommen werden, was die nicht-invasive MRT-Bildgebung der markierten Zellen ermöglicht. [29], [30] SPIOs sind derzeit das einzige MRT-Kontrastmittel in pharmazeutischer Qualität, die bereits präklinisch und klinisch für das Zell-Tracking eingesetzt wurden, um transplantierte Zellen in longitudinalen Studien nachzuverfolgen und die Effektivität einer zellbasierten Therapie zu bewerten. [26], [31], [22] Um die Aufnahme von SPIOs in die Zellen zu verbessern, ist die Verwendung von polykationischen Transfektionsreagenzien (TA) eine weiterverbreitete Methode. Durch

elektrostatische Wechselwirkungen bilden sich Komplexe mit den Makromolekülen und den SPIOs, wodurch sie über Endozytose einfacher in die Zellen transferiert werden können. [26] Das SPIO-basierte Zell-Tracking ist jedoch durch die mangelnde Spezifität limitiert. [22] In vielen Krankheitsmodellen, wie dem ischämischen Schlaganfall oder bei Tumorerkrankungen, kann es zu einer Gewebeeinblutung kommen, was die Differenzierung der eisenbeladenen Erythrozyten von den mit Eisen markierten Zellen nicht mehr ermöglicht. [32] Zur Überwindung dieser Limitierung wurden SPIOs bereits mehrfach an Nahinfrarot(NIR)-Fluoreszenz-Farbstoffe, wie den Cyanin-Farbstoff Cy5 oder Quantum Dots (QDs) konjugiert. [33], [34], [35], [36] Somit erhält man ein multimodales Kontrastmittel, das neben der MRT-Bildgebung, auch für die optische Bildgebung einsetzbar ist. Im Gegensatz zu den SPIOs, die einen negativen MRT-Kontrast erzeugen, bieten Gadolinium-basierte Kontrastmittel den Vorteil eines positiven MRT-Kontrasts. Ein positiver Kontrast wird allgemein bei der Auswertung der MRT-Aufnahmen bevorzugt, weil das Signal der jeweiligen anatomischen Struktur verstärkt wird. Negative Kontrastmittel schwächen das MRT-Signal ab, was die Auswertung erschweren kann. Deshalb wäre es naheliegend, ein klinisch zugelassenes Kontrastmittel auf Gadolinium-Basis für das MRT-gestützte Zell-Tracking zu verwenden. Es gibt jedoch einige Gründe, warum sie nur bedingt geeignet sind, darunter zählen die geringe Labeling-Effizienz und die mögliche Gd^{3+} -Freisetzung aus den Chelaten aufgrund des geringen pH-Wertes in den Lysosomen und Endosomen der Zelle. [31], [37] In den letzten Jahren wurden einige Gadolinium-basierte makromolekulare Substanzen für das Zell-Labeling entwickelt, wie z.B. liposomale [38], [39] und mizellare Formulierungen [40] oder polymerbeschichtete Gd_2O_3 Nanopartikel. [22], [41], [42], [43] Gadolinium-basierte Markierungsreagenzien bieten eine vielversprechende Option für die Zellmarkierung aufgrund des niedrigen Untergrundsignals in lebenden Organismen. Da es sich bei Gadolinium um kein körpereigenes Element handelt, können die Markierungsreagenzien neben der *in vivo* MRT-Bildgebung auch für die *ex vivo* Elementmikroskopie mit der Laser-Ablation (LA)-ICP-MS genutzt werden. Während die MRT zweifelsohne eine wertvolle Methode für die Bildgebung größerer Objekte darstellt, ist diese Technik nur bedingt geeignet, um die erforderliche Sensitivität und räumliche Auflösung auf zellulärer Ebene zu schaffen. [44] Die LA-ICP-MS ist hingegen eine sensitive analytische Methode, um die Verteilung von Elementen in komplexen biologischen Proben abzubilden. Mit der LA-ICP-MS wurden bereits Gadolinium-basierte Kontrastmittel in Tumor- und Gewebeproben nachgewiesen. [45] Der Einsatz

Gd³⁺-haltiger Markierungsreagenzien ermöglicht daher eine Gegenüberstellung der *in vivo* MRT-Aufnahmen mit den *ex vivo* Untersuchungen der LA-ICP-MS. Neben den Gd³⁺-basierten Kontrastmitteln und den SPIOs für die ¹H-MRT wurden Zellen auch mit Perfluorocarbon(PFC)-Nanoemulsionen für das ¹⁹F-basierte MRT-Tracking gelabelt. [2] Da ¹⁹F nur in sehr geringen Konzentrationen natürlich im Organismus vorkommt, entsteht hier kein Hintergrundsignal vom Gewebe und nur die gelabelten Zellen werden sichtbar. Die Methode erfordert daher eine Kombination mit ¹H MRT-Scans, was den Aufwand und die Kosten deutlich umfangreicher gestaltet. [2] Als Alternative zum MRT-gestützten Zell-Tracking wird der Verbleib und die Verteilung von transplantierten Zellen mit verschiedenen Farbstoffen, wie Vitalfarbstoffen (z.B. Fluorochrome), Thymidin-Analoga (z.B. Bromdesoxyuridin, BrdU) oder mit einem transfizierten Gen (z.B. grün-fluoreszierendes Protein, GFP) untersucht. Mit diesen Farbstoffen wird allerdings erst eine spätere Visualisierung nach der Gewebeentnahme mit (immuno)-histochemischen Techniken möglich. [19], [46] Fluoreszenz-Farbstoffe haben zudem den Nachteil, dass sie aufgrund der Mutabilität der Π -Elektronen oft ausbleichen. Diese irreversible Schädigung der Farbstoffe limitiert vor allem die Zeit für die Untersuchung der markierten Zellen. [47]

Der schematische Ablauf bei der *ex vivo* und *in situ* Zellmarkierung mit anschließender MRT-Bildgebung im Tiermodell ist in Abbildung 1 gezeigt. Nach Isolation ausgewählter Organe und deren pathologischer Begutachtung kann eine Validierung der *in vivo* MRT-Daten erfolgen. Diese Begutachtung kann beispielsweise mit konventioneller Mikroskopie oder mit der LA-ICP-MS erfolgen. Die LA-ICP-MS ist eine relativ neue, leistungsstarke Methode, um Metalle in biologischen Systemen nachzuweisen. Sie liefert hochaufgelöste Informationen über transplantierte Zellen an Gewebeschnitten und kann die diagnostischen Informationen der MRT-Bildgebung und der weitverbreiteten IHC Färbung sinnvoll ergänzen. [16], [48]

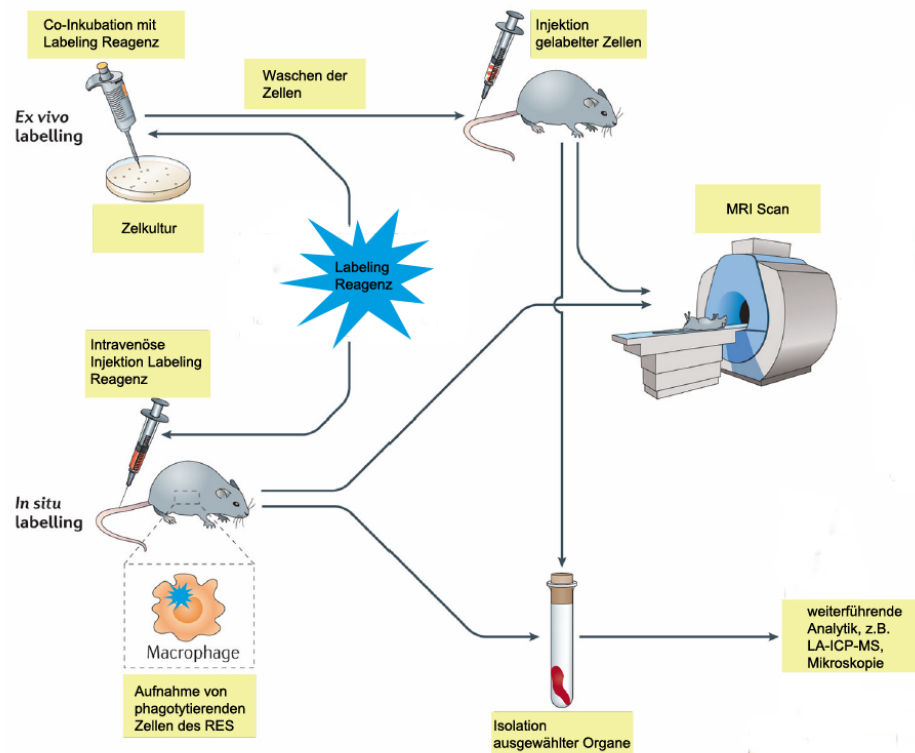


Abbildung 1: Schematische Darstellung der *ex vivo* und *in situ* Markierung von Zellen mit MRT-Kontrastmitteln. In Anlehnung an Ahrens und Bulte, 2013. [2]

In der vorliegenden Arbeit wurden DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierte G5-PAMAM Dendrimere und Ln: $GdVO_4$ -Nanokristalle als Reagenzien für die intrazelluläre Metallmarkierung sowie für die Anwendung als präklinische MRT-Kontrastmittel synthetisiert. Gemäß der Definition der Europäischen Kommission vom 18. Oktober 2011 werden Nanopartikel als natürliches oder synthetisch hergestelltes Material bezeichnet, bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1-100 nm aufweisen. [49] Diese Größenangabe kann gleichermaßen auf verschiedene Makromoleküle zutreffen, wie beispielsweise die G5-PAMAM Dendrimere, die mit einer Größe von ca. 5,4 nm vorliegen. [50] Zur besseren Unterscheidung beider Reagenzien werden in den folgenden Kapiteln das polymerbasierte G5-PAMAM als makromolekulares Reagenz und die $GdVO_4$ -Nanokristalle als nanopartikuläres Reagenz bezeichnet.

1.2.1 Makromolekulare Markierungsreagenzien

Für die Darstellung des makromolekularen Reagenzes wurde das Dendrimer Generation(G)-5-PAMAM (Polyamidoamin) als Grundgerüst eingesetzt. PAMAM-Dendrimere sind synthetische Makromoleküle mit definierter, verzweigter Struktur und monodisperser Verteilung, die kommerziell mit $1 \leq j \leq 10$ Verzweigungsgenerationen erhältlich sind. [51], [52] Im Gegensatz zu linearen Polymeren können sich bei Dendrimern kaum Verschlaufungen bilden, die maßgeblich die hohe Viskosität von herkömmlichen Polymer-Lösungen bedingen. [53] Die starke Verzweigung im Inneren der PAMAM-Dendrimere führt zu einer sehr dichten Molekülstruktur und zu einer hohen Anzahl von Funktionalitäten in der letzten Generation (G5-PAMAM: 128 primäre Aminogruppen). [12] Abbildung 2 zeigt die chemische Struktur eines PAMAM Dendrimers mit 2 Generationen sowie schematisch die Struktur mit 5 Generationen.

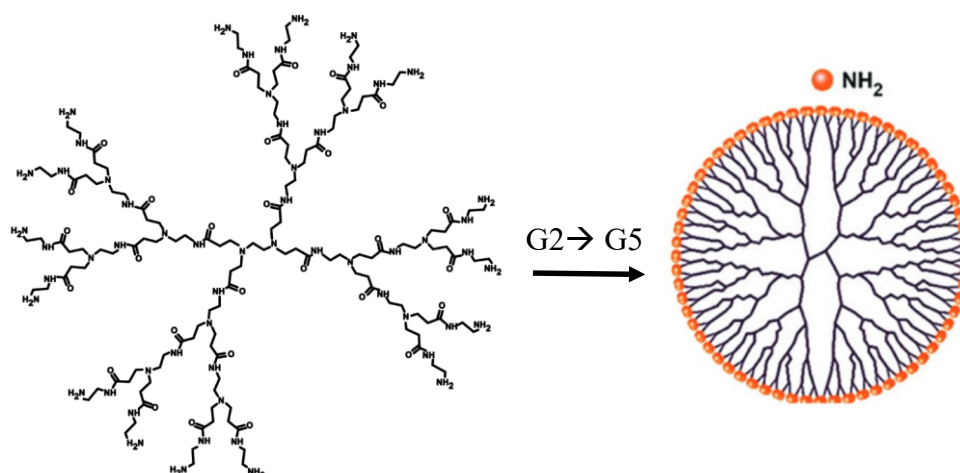


Abbildung 2: Darstellung der chemischen Struktur der Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimere. Links: Generation-2-PAMAM. [50] Rechts: Schematische Darstellung des Generation-5-PAMAM Dendrimers mit 128 primären Aminogruppen in der letzten Generation. [54]

Unabhängig von den Inneren Wiederholungseinheiten weisen kationische Dendrimere hämolytische und zytotoxische Eigenschaften auf, die von der Generation und der Anzahl der ionischen Oberflächengruppen abhängig sind. [55] Im Zuge der Funktionalisierung des G5-PAMAM Dendrimers erfolgte daher zunächst eine partielle Acetylierung (Abbildung 3), um nicht nur zytotoxische Eigenschaften und des Polykations verringern, sondern gleichermaßen die Löslichkeit in wässrigen Systemen verbessern. [56], [57]

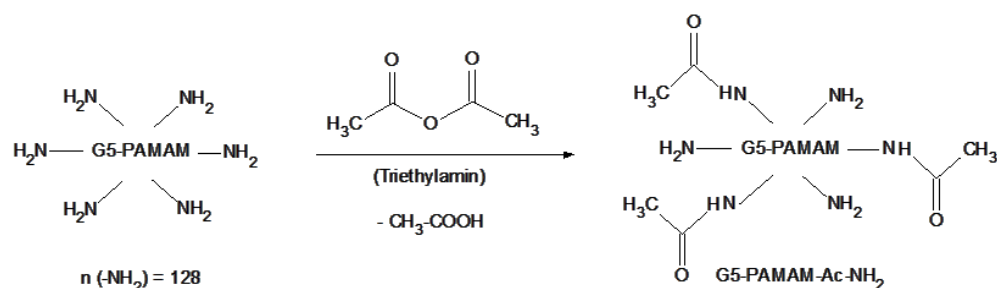


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Acetylierung von G5-PAMAM Dendrimern mit Essigsäureanhydrid und Triethylamin.

Nach partieller Acetylierung der Dendrimere erfolgte die Konjugation des Komplexbildners DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) an die freien, nicht acetylierten Aminogruppen, wodurch Gadoliniumionen oder andere Lanthanoide für die MRT- bzw. die LA-ICP-MS Bildgebung komplexiert werden können. Für die DOTA-Konjugation werden zwei bifunktionelle Chelatoren, DOTA-NHS und DOTA-NCS, untersucht. Beide Kopplungsstrategien bieten hierbei verschiedene Vorteile. Bei der DOTA-Konjugation über die Isothiocyanat-Gruppe (R-NCS) sind die hohe Reaktivität und ausgezeichnete Selektivität gegen primäre Aminogruppen vorteilhaft. Jedoch ist die Isothiocyanat-Gruppe relativ instabil in wässrigen Lösungen und neigt zur Hydrolyse. Abbildung 4 zeigt die betreffende Reaktionsgleichung für die Kopplung von DOTA-NCS an die primären Aminogruppen des Dendrimers unter Ausbildung einer Thioharnstoff-Bindung. [58] Für die Reaktion mit DOTA-NCS wird im Kopplungspuffer PBS/Bicarbonat pH 8,3 gearbeitet, da Isothiocyanate am besten bei alkalischen pH-Werten reagieren und die primären Aminogruppen des Dendrimers überwiegend deprotoniert vorliegen. Anhand des Reaktionsschemas wird ein wesentlicher Vorteil dieser Kopplungsstrategie deutlich, da sich nur ein stabiles Reaktionsprodukt ohne weitere Nebenprodukte bildet. [59], [60]

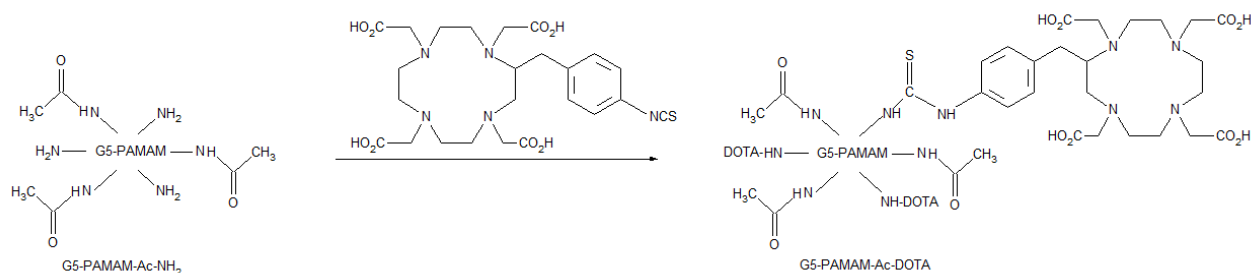


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kopplung von DOTA-NCS an acetylierte G5-PAMAM Dendrimere.

Bei der Verwendung von DOTA-NHS kommt es über die Reaktion des N-Hydroxysuccinimid(NHS)-Esters mit den primären Aminogruppen des Dendrimers unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid zur Ausbildung einer stabilen Amidbindung (Abbildung 5). Die Reaktanden werden hierfür im Kopplungspuffer 50 mM MES pH 5,5 gelöst und der pH-Wert der Reaktionsmischung unmittelbar nach der DOTA-NHS Zugabe mit 1 N NaOH auf pH 7,5 gestellt. Damit erhöhten sich die Nukleophilie der Aminogruppen und somit auch die Reaktivität gegen den NHS-Ester. Bei leicht saurem pH würde sich die Hydrolyse-Rate des NHS-Esters signifikant verkürzen.

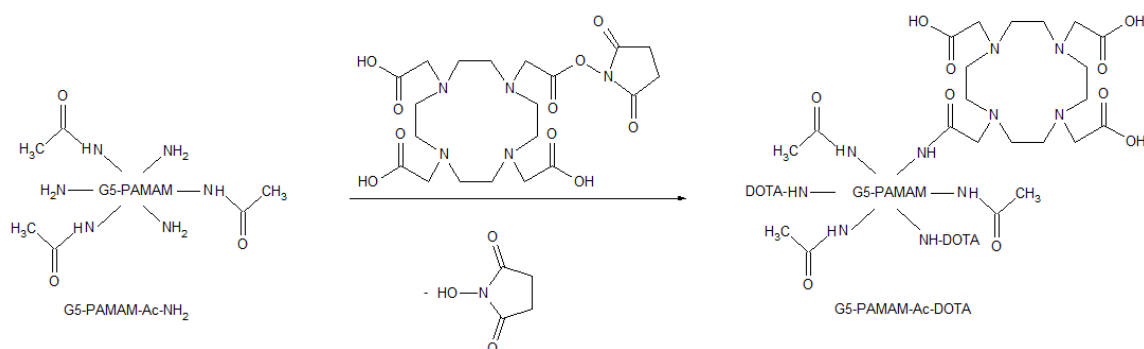


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kopplung von DOTA-NHS an acetylierte G5-PAMAM Dendrimere.

Im letzten Reaktionsschritt folgt schließlich die stark pH-Wert abhängige Gd^{3+} -Komplexierung in die konjugierten DOTA-Gruppen durch Ausbildung koordinativer Bindungen zwischen den Carboxygruppen und den Stickstoffatomen des Makrozyklus mit den dreiwertigen Lanthanoid-Ionen (Abbildung 6).

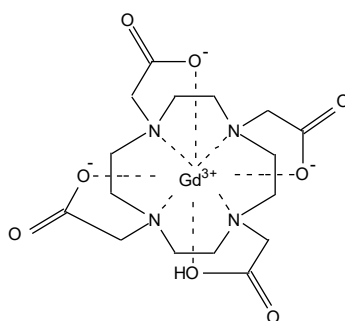


Abbildung 6: Monoprotonierte Form von DOTA mit komplexierten Gadolinium-Ion.

Zhu und Lever [61] untersuchten die Geschwindigkeit der Komplexierung einiger Lanthanoide mit dem Chelator DOTA für die pH-Werte 2,0-6,0. Hierbei zeigte sich, dass die Komplexierung bei pH 6,0 und 25°C am schnellsten verläuft. Dieser pH-Wert liegt über dem pK_2 -Wert des DOTA ($pK_2=4,50$), wodurch das Lanthanid-Ion schnell in die di-

bzw. monoprotonierte Form koordinieren kann. Die monoprotonierte Form des DOTA ist die am meisten aktive Spezies, die diprotonierte Form ist bereits um vier Größenordnungen weniger reaktiv. Die Komplexbildung der Lanthanoide in den Komplexbildnern ist ein zweistufiger Prozess. Zunächst bildet sich ein reversibles Zwischenprodukt gefolgt von einer relativ langsamen Komplexbildung, die in einem vollständig koordinierten Metallion resultiert. [61] Je mehr Lanthanoide pro Dendrimer eingeführt werden können, desto höher ist die Sensitivitätssteigerung in der Bildgebung. Eine Sensitivitätssteigerung sollte ebenfalls mit den nanopartikulären Reagenzien erreicht werden. Aus diesem Grund wurden Ln:GdVO₄-PAA-Nanokristalle synthetisiert, die, bedingt durch ihre chemischen Struktur, eine hohe Dichte an Metallionen aufweisen.

1.2.2 Nanopartikuläre Markierungsreagenzien

Im Vergleich zu den niedermolekularen Gd³⁺-Chelaten implizieren die Ln:GdVO₄-Nanokristalle entscheidende Vorteile aufgrund der drastischen Erhöhung der lokalen Gadolinium-Konzentration. Da sie nicht biologisch abbaubar sind, können sie über einen langen Zeitraum hinweg mit der MRT-Bildgebung verfolgt werden. Liu *et al.* [62] berichteten über die Dotierung der Nanokristalle mit verschiedenen Lanthanoiden, wodurch mehrere signalgebende Komponenten in einem Nanopartikel integriert werden können. Da die Lanthanoide alle die gleiche Wertigkeit aufweisen und ähnliche Ionenradien besitzen, können sie leicht gegeneinander ausgetauscht werden. Somit wird die Darstellung multifunktionaler Reagenzien für die multimodale Bildgebung möglich, was die Nanokristalle besonders für biomedizinische Anwendungen interessant macht. [63] Die MRT- und die optische Bildgebung sind beispielsweise äußerst komplementäre Methoden, deren Limitierungen durch eine Kombination umgangen werden können. [64] Die Verwendung von GdVO₄ als eine Matrix für Ln³⁺-Ionen geht auf die Arbeiten von Zaguniennyi *et al.* [65] im Jahr 1992 zurück. GdVO₄ zeigt eine starke Absorption von UV-Strahlung. Wird diese Matrix beispielsweise mit Europium dotiert, resultiert eine intensive rote Lumineszenz nach der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, die aus einem Energietransfer von den VO₄³⁻-Anionen auf die Eu³⁺-Ionen resultiert. [62] Die Nanokristalle erhalten damit neben den magnetischen Eigenschaften, auch interessante lumineszierende Eigenschaften. [66] Bereits 1982 erschien von Richardson *et al.* [67] ein Review Artikel über die Eigenschaften der Lanthanoide Europium und Terbium als lumineszierende Sonden für biologische Systeme. Die Darstellung lumineszierender

Nanopartikel erfolgte bereits mehrfach über die Dotierung von Yttriumvanadat, wobei starke und stabile Lumineszenzen erhalten wurden. [47], [66], [68], [69], [70] Abdesselem *et al.* [68] zeigten, dass beim Ersatz von Yttrium durch Gadolinium die lumineszierenden Eigenschaften der Nanopartikel erhalten blieben. Zu den multimodalen Nanopartikeln zählen auch die sog. „upconversion nanoparticles“ (UCNPs), die hauptsächlich für die optische Bildgebung genutzt werden. UCNPs können energiereiche Photonen nach Anregung mit Licht im nahen Infrarotbereich emittieren. [71] Das nahe Infrarotlicht wirkt sich hierbei weniger schädlich auf biologische Proben aus und hat eine größere Eindringtiefe ins Gewebe als die Anregung mit UV-Licht. [72] Die UCNPs, die meist aus einer NaYF₄-Matrix bestehen, können mit verschiedenen Lanthanoiden in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen dotiert werden, wodurch man verschiedene Emissionswellenlängen (Farben) erhält. [71] Sie zeichnen sich durch scharfe Emissionsbanden, lange Fluoreszenz-Lebensdauern, hohe Photostabilität und geringe Zytotoxizität aus. [72] UCNPs konnten bereits mit Gadolinium sowie mit SPIOs funktionalisiert werden, womit sie neben der optischen Bildgebung auch für die MRT-Bildgebung nutzbar wurden. [73] Da der Fokus in der vorliegenden Arbeit jedoch auf Anwendungen der Markierungsreagenzien für die MRT-Bildgebung und die LA-ICP-MS lag, wurde der Ansatz der UCNPs nicht weiterverfolgt. Vielmehr sollten die Ln:GdVO₄-Nanokristalle auch als Target-spezifisches Metallmarkierungsreagenz in ICP-MS-basierten Immunoassays einsetzbar werden. Die Partikeloberfläche musste hierfür entsprechende funktionelle Gruppen aufweisen müssen, um eine weiterführende, schonende Kopplung an Antikörper zu ermöglichen. Die Funktionalisierung der Nanokristalle erfolgte mit Polyacrylsäure (PAA), sodass die Konjugation an Antikörper über eine Carbodiimid-vermittelte Reaktion untersucht werden konnte. Nunez *et al.* [74] berichteten auch von einer Funktionalisierung der GdVO₄-Nanokristalle mit Aminodextran. Allerdings hat diese Funktionalisierung einen direkten Effekt auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanokristalle. Während bei der Funktionalisierung mit Polyacrylsäure Nanokristalle mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 60 nm erhalten wurden, resultierten bei Funktionalisierung mit Aminodextran hydrodynamische Durchmesser von ca. 135 nm. In Abhängigkeit der Partikel- bzw. Molekülgröße erfolgt die Aufnahme der Reagenzien von den Zellen.

1.3 Aufnahme von Markierungsreagenzien in die Zelle

Die Aufnahme kleiner Moleküle oder Ionen in die Zelle erfolgt durch einen aktiven oder passiven Transport durch spezifische Transmembranproteine, wohingegen der Transport vieler Makromoleküle und Nanopartikel vor allem über den Mechanismus der Endozytose erfolgt. [75] Die intrazelluläre Aufnahme der Makromoleküle und Nanopartikel ist vor allem abhängig von ihrer Größe, der Oberflächenbeschaffenheit sowie von der Inkubationszeit und der eingesetzten Konzentration. [76], [77], [78] Durch Einschnürungen und Ausstülpungen von Teilen der Zellmembran und der Ausbildung von Transportvesikeln gelangen die Substanzen über die Endozytose in das Zellinnere. Die Endozytose-Mechanismen lassen sich in zwei wesentliche Kategorien einteilen, den Phagozytose-Mechanismen und den Pinozytose-Mechanismen. [79] Abbildung 7 zeigt die schematische Darstellung der verschiedenen Endozytose-Mechanismen.

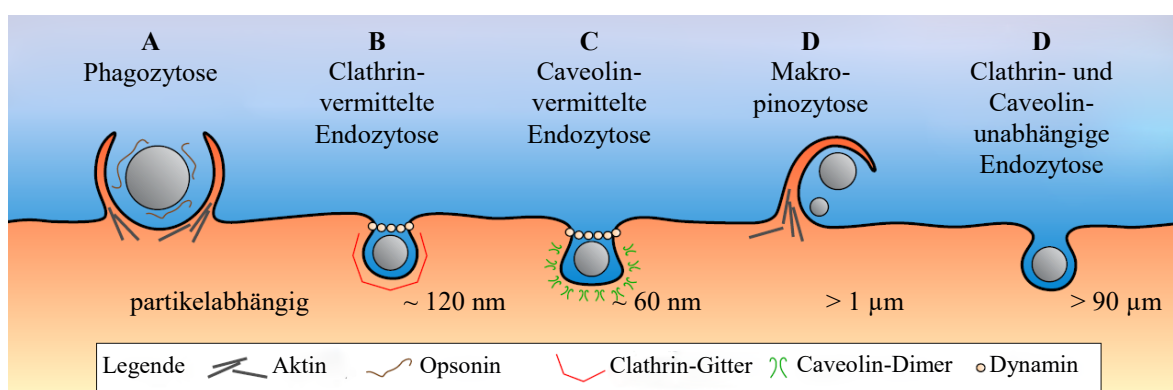


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aufnahme von Nanopartikeln in Säugetierzellen. In Anlehnung an Hillaireau und Couvreur, 2009. [79], [80]

Phagozytose beschränkt sich auf spezielle eukaryotische Zellen, wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen. [81] Diese Zellen sind dazu befähigt Pathogene, apoptotische Zellen und vieles mehr zu eliminieren. Fremdkörper und Partikel werden durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran (Vesikel) umschlossen und so in die Zelle geschleust. Hierfür werden die betreffenden Substanzen zunächst mit Opsoninen (Proteinen) besetzt, die im Blutstrom vorkommen. Die opsonierten Partikel binden an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche und lösen eine Signalkaskade aus, welche zur Aktinformierung und zur Aufnahme der Partikel in Vesikel, sog. Phagosomen führt. Die Phagosomen wiederum verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen und lysosomale Enzyme bauen aufgenommene Partikel schließlich intrazellulär ab. [79] Pinozytose hingegen tritt in allen Zellen nach vier grundlegenden Mechanismen auf:

Makropinozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose sowie Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose. [82] Diese Mechanismen sind streng geregelt und verlaufen grundlegend verschieden. Sie kontrollieren physiologische Prozesse, wie die Hormon-vermittelte Signaltransduktion, die Immunabwehr, die Antigen-Erkennung sowie die zelluläre und organismische Selbstregulierung. Im Gegensatz zur Phagozytose legen sich bei der Makropinozytose die Ausstülpungen (Vesikel) nicht wie ein „Reißverschluss“ um die Partikel, stattdessen kollabieren die Partikel mit der Plasmamembran und verschmelzen mit ihr, um große endozytotische Vesikeln auszubilden. Bei der Caveolin-vermittelten Endozytose bilden sich Vesikel an lipidreichen Membrandomänen, den sog. lipid-rafts. Die Caveoline sind membranständige dimere Proteine, die sackförmige Einbuchtungen in der Plasmamembran bilden. Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist für die kontinuierliche Aufnahme wichtiger Nährstoffe verantwortlich. Clathrin ist ein spezifisches Protein, das aus einer dreiarmligen Struktur aufgebaut ist und sich zu gitterartigen Schichten an den Membraninnenseiten formiert. In der Plasmamembran bilden sich kugelförmige Einstülpungen (endozytotische Vesikel), die für den gewünschten Transport in die Zelle verantwortlich sind. Bei der Caveolin- und Clathrin vermittelten Endozytose werden die gebildeten Vesikel von der Zellmembran durch das Protein Dynamin abgeschnürt und zum Endosom transportiert, wo sie schließlich mit diesem Zellorganell fusionieren. Des Weiteren gibt es noch Caveolin- und Clathrin- unabhängige Endozytose-Mechanismen, an denen ebenfalls das Protein Dynamin beteiligt ist. [80] Die effiziente Aufnahme der Gd^{3+} -basierten Markierungsreagenzien in die Zellen führt zu einer Kontrastverstärkung in der MRT-Bildgebung.

1.4 Bildgebung mit der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (griech: *tomos*=Schnitt), kurz MRT, ist ein bildgebendes Verfahren in der medizinischen Diagnostik, das auf dem Prinzip der Kernspinresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) beruht. [83] Die MRT-Bildgebung wird klinisch zur Darstellung verschiedener Weichteilgewebe genutzt und ermöglicht die Untersuchung von Tumoren und Entzündungsherden sowie die Erkennung und Charakterisierung von Anomalitäten des zentralen Nerven- und des kardiovaskulären Systems. [84], [85], [86], [87] Ein Vorteil der MRT ist, dass keine Röntgen- oder

ionisierende Strahlung zur Bilderzeugung nötig ist. Die MRT-Bildgebung beruht auf der Anregung von Protonen aus Wasser und Geweben. [88] Protonen besitzen einen Eigendrehimpuls, den man auch Kernspin nennt. Die Rotation der Kernspins um die eigene Achse erzeugt ein magnetisches Feld. Unter natürlichen Umständen ist die Ausrichtung der Kernspins ungeordnet. Wird jedoch ein starkes äußeres Magnetfeld angelegt, nehmen die Kernspins diskrete Orientierungen ein und vollführen eine Art Präzessionsbewegung (Kreiselbewegung) mit einer bestimmten Frequenz (Larmor-Frequenz). [89] Diese diskreten Orientierungen korrespondieren mit unterschiedlichen Energieniveaus, wobei die Ausrichtung in zwei verschiedenen Orientierungen erfolgen kann, parallel zum äußeren Magnetfeld (energiearme Orientierung) oder antiparallel (energetisch weniger günstige Orientierung) zum äußeren Magnetfeld. [90] Wird nun ein Hochfrequenz(HF)-Impuls eingestrahlt, der mit der Larmor-Frequenz der Protonen übereinstimmt, wird die Kernmagnetisierung von der Longitudinalachse des angelegten Magnetfeldes herausgelenkt. [89], [91] Der Betrag dieser Auslenkung wird durch den Anregungspuls charakterisiert. Nach Abschalten des HF-Impulses kehren die Kerne in ihren Gleichgewichtszustand zurück, d.h. sie relaxieren. Beim Übergang eines Kerns vom höheren in das tiefere Energieniveau kann Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben werden (Spin-Gitter-Relaxation oder T1-Relaxation). [91] Die Kernspins richten sich in Folge der T1-Relaxation wieder parallel zum äußeren Magnetfeld aus (Abbildung 8).

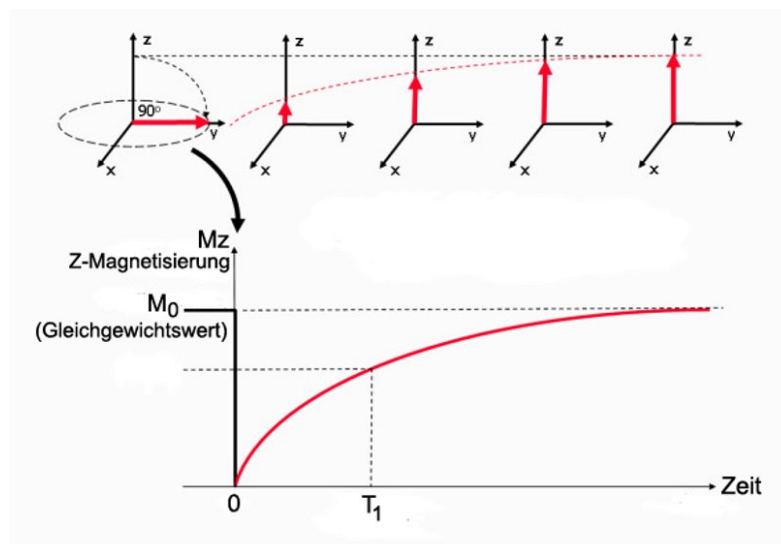


Abbildung 8: Prinzip der T1-Relaxation nach einem 90° HF-Impuls in Anlehnung an Ridgway, 2010. [92] Die Magnetisierung in z-Richtung richtet sich wieder in den Gleichgewichtszustand aus, wenn kein weiterer HF-Impuls angelegt wird. Die Wiederausrichtung ist ein exponentieller Prozess mit der Zeitkonstante T_1 , wobei T_1 die Zeit ist, bei der die Magnetisierung wieder 63 % ihres Gleichgewichtswertes erreicht hat.

Es können jedoch auch Wechselwirkungen mit Spins aus der Umgebung stattfinden, was zum Verlust der einheitlichen Rotation der zuvor synchronisierten Kerne führt. Diese Dauer zur Dephasierung der Spins wird als transversale Relaxation (Spin-Spin-Relaxation oder T2 Relaxation) bezeichnet. Die Zeit (Relaxation), bis der die Protonen wieder in ihren Ursprungszustand zurückkehren, ist abhängig von der Gewebeart und in welcher Art die Protonen im Gewebe (chemische Umgebung) gebunden sind. Aufgrund des unterschiedlichen Wassergehaltes (Protonendichte) in Fettgeweben, Muskelgeweben, Entzündungen oder Tumoren resultieren unterschiedliche Signalintensitäten, womit die Gewebearten und damit verbundene pathologische Veränderungen differenziert werden können. [83]. MRT-Geräte verfügen über Gradientenspulen für alle drei Raumdimensionen, sodass eine räumliche Zuordnung der Signale möglich wird und Schnittbilder eines Organismus in jeder beliebigen Ebene erzeugt werden können. [83], [89] Die betreffenden Messrichtungen zur Darstellung der Schnittbilder werden auch als anatomische Grundpositionen bezeichnet und sind in Abbildung 9 (A) gezeigt. Ein Foto des, in der vorliegenden verwendeten, präklinischen PET/MRT Gerätes (nanoScan 1 T der Fa. Mediso) und der verwendeten Bildgebungskammer für kleine Versuchstiere, mit der die MRT-Aufnahmen von Phantomen erfolgten, sind in Abbildung 9 (B) und Abbildung 9 (C) gezeigt.

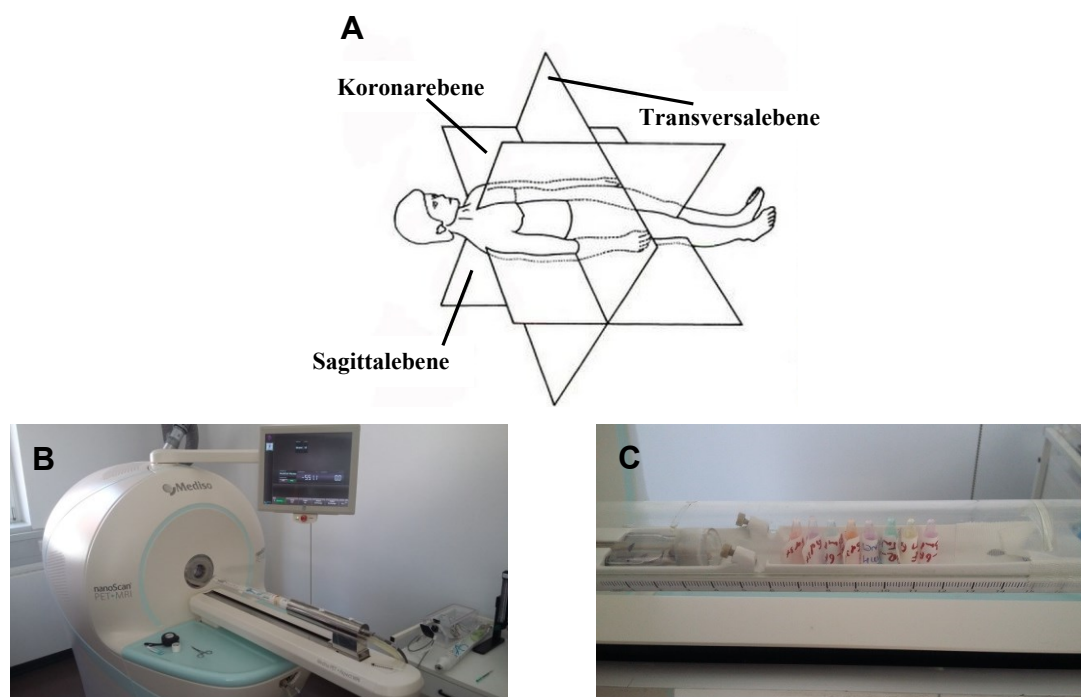


Abbildung 9: A: Darstellung der anatomischen Grundpositionen in Anlehnung an Whiting und Zernicke. [93] B: Foto des präklinischen nanoScan PET/MRT (1 T) der Fa. Mediso (Medical Imaging Systems) im BERIC (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center) auf dem Campus Virchow der Charité. C: Bildgebungskammer für kleine Versuchstiere mit bis zu 35 g (Maus).

Die Qualität von MRT-Aufnahmen wird u.a. von der gewählten Pulssequenz (z.B. SE [Spin-Echo] oder GRE [Gradienten-Echo]) und von der Feldstärke des verwendeten MRT-Gerätes beeinflusst. [89] Bei SE-Sequenzen wird mit einem 90° Anregungspuls gearbeitet, der die Längsmagnetisierung vollständig aufhebt und in die x-y-Ebene kippt. Im Gegensatz hierzu wird bei den GRE-Sequenzen ein initialer Anregungspuls mit Anregungswinkel (Flip-Winkel) $\alpha < 90^\circ$ verwendet, der die Längsmagnetisierung nicht vollständig zerstört. Dies führt zwar zu geringeren Signalausbeuten, hat aber schnellere Bildakquisition zur Folge. GRE-Sequenzen zeigen hohe Sensitivität für Metalle und sind daher besonders geeignet beim Einsatz paramagnetischer Kontrastmittel. [89], [94], [95] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die MRT hervorragend für die Bildgebung anatomischer Details eignet, jedoch aufgrund mangelnder Empfindlichkeit und Auflösung nicht geeignet ist für die Bildgebung auf zellulärer Ebene. [44] Als Alternative zur MRT-Bildgebung können die optische Bildgebung, die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Computertomographie (CT) zum Einsatz kommen. Die optische Bildgebung zeichnet sich durch gute Empfindlichkeit mit hoher Auflösung aus, mangelt jedoch an der Darstellung anatomischer und physiologischer Details. Die PET ist limitiert durch die geringe räumliche Auflösung und die CT aufgrund des geringen Weichteilkontrasts. [16] Um die Limitierungen einzelner Bildgebungsverfahren aufzuheben, werden oftmals mehrere Verfahren kombiniert bzw. Kontrastmittel eingesetzt. Kontrastmittel beeinflussen sowohl die T1- als auch die T2-Relaxation der sie umgebenden Protonen, wodurch aussagekräftigere diagnostische Ergebnisse erhalten werden. In der Klinik wird vor allem die T1-Komponente bei der MRT-Bildgebung genutzt. Die Wirkungsweise eines Kontrastmittels wird durch seine Relaxivität bestimmt, die ein Maß dafür ist, wie stark die Relaxationsraten der Protonen durch ein Kontrastmittel pro Konzentrationseinheit erhöht werden. [83] MRT-Kontrastmittel basieren meist auf paramagnetischen Substanzen wie Gd^{3+} - oder Mn^{2+} -Verbindungen oder auf kristallinem Eisenoxid (Fe_3O_4 oder Fe_2O_3). Eisenoxid wird in Form von SPIO (*Super Paramagnetic Iron Oxide*) Nanopartikeln eingesetzt, die meist mit einer hydrophilen Schicht aus Dextran, Citrat oder Lipiden umhüllt vorliegen. [96] Für eine *in vivo* Anwendung müssen alle Kontrastmittel geeignete pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen und bioverträglich sein. Gadolinium ist im Periodensystem in der Gruppe der Lanthanoide zu finden und in seiner freien ionischen Form stark toxisch (LD_{50} in Mäusen $0,2 \text{ mmolkg}^{-1}$). [84] Hierfür sind die nahezu identischen Ionenradien von Calcium und Gadolinium verantwortlich, wodurch ein ähnliches biologisches

Verhalten resultiert. [97] Freie Gadoliniumionen werden vorwiegend in den Knochen und in der Leber eingelagert, wo sie schnell zu Lebernekrosen führen können. [98] Gadolinium wird bis heute klinisch nur in Verbindung mit Komplexbildnern auf Aminocarboxylatbasis eingesetzt. [99], [100] Die magnetischen Eigenschaften der Gadoliniumionen beruhen auf den sieben ungepaarten Elektronen des 4f-Orbitals, welche die Relaxationszeit der umgebenden Protonen wirksam beeinflussen. [62], [101] Da es sich bei den Komplexbildnern um achtzahnige Liganden handelt, bleibt nur eine Koordinationsstelle für die Protonen offen, was die Effizienz als Kontrastmittel einschränkt. [102] Zwischen dem Relaxationszentrum Gadolinium und einem an die freie Koordinationsstelle vorübergehend gekoppelten Proton finden intensive magnetische Wechselwirkungen statt. Die an die Koordinationsstellen gebundenen Protonen aus den Geweben und Körperflüssigkeiten unterliegen einem raschen Austausch. [83] Der Austausch von Protonen an Gadolinium-komplexierten Zentren ist jedoch gegenüber dem freien Ion deutlich langsamer. Hohe Relaxivitäten sind nur schwer erreichbar. [102] In den MRT-Aufnahmen erscheint Gewebe bei Verwendung von Gd^{3+} -Kontrastmitteln hell (positiv Kontrast). SPIOs hingegen haben ein starkes magnetisches Moment, welches das lokale Magnetfeld stört und die T2-Relaxation der umgebenden Protonen stärker beeinflusst. Es resultiert ein lokaler Signalverlust in den MRT-Aufnahmen und Bereiche, in denen vermehrt SPIOs vorliegen, erscheinen dunkler (negativer Kontrast). [26] Der Gadolinium-Chelat Gadopenetate Dimeglumine (Magnevist[®]) ist seit 1988 klinisch zugelassen und ist weiterverbreitet als SPIOs und Mn(II)-Verbindungen. [84] Magnevist[®] war das erste von der U.S. FDA (Food and Drug Administration) zugelassene MRT-Kontrastmittel. [31] Nach Abschluss des europäischen Risikobewertungsverfahrens nach Artikel 31 der Richtlinie 2001/83/EG zu Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln ruht die Zulassung in der EU jedoch für die linearen Kontrastmittel Gadodiamid (Omniscan[®]), Gadopentetsäure (Magnevist[®]) und Gadoversetamid (OptiMARK[®]) seit 28.02.2018, da es Hinweise darauf gibt, dass sich kleine Gadoliniummengen im Gehirn ablagern. Die makrozyklischen Kontrastmittel Gadobutrol (Gadovist[®]), Gadotersäure (Dotarem[®]) und Gadoteridol (ProHance[®]) können jedoch weiterhin in ihren jetzigen Indikationen klinisch angewendet werden. [103] Die SPIO-Formulierung Feridex (Bayer HealthCare) wurde 1996 von der U.S. FDA als Leber-Kontrastmittel zugelassen. Diese Formulierung wird von Zellen des Retikulohistiozytären Systems (RHS) phagozytiert, welche im normalem Lebergewebe vor allem die Kupffer-Sternzellen sind. Die aufgenommenen SPIOs führen zu einer ausgeprägten Verkürzung der T2-Relaxation und damit zur Abnahme der

Signalintensität, während Leberläsionen, z.B. Metastasen, ohne Zellen des RHS hell bleiben. [94] In Europa wird die Formulierung unter dem Namen Endorem[®] (Guerbet) vertrieben. [31], [22] Ein Vorteil der SPIOs bei der *in vivo* Anwendung ist das natürliche Vorkommen von Eisen im menschlichen Organismus (durchschnittlich 4 g bei einem erwachsenen Menschen) und der biologische Abbau des Eisenoxids von den Kupfer Zellen innerhalb von 2-4 Wochen, das anschließend in den normalen Blutkreislauf übergeht, inklusive des Einbaus ins Hämoglobin. [31] Nachteilig beim Einsatz der niedermolekularen Gd³⁺-Chelate ist die schnelle Konzentrationsabnahme in den Gefäßen nach Injektion und die nicht-spezifische Aufnahme aus den Gefäßen in umgebendes Gewebe. [19] Mit den Gd³⁺-Chelaten ist ein hoher intravaskulärer Kontrast nur während der ersten arteriellen Passage („first-pass“) zu erreichen. Nach 2-5 min besteht ein Konzentrationsausgleich zwischen dem Gefäßsystem und interstitiellem Raum. Makromolekulare oder nanopartikuläre Verbindungen können die Limitierungen der niedermolekularen Chelate überwinden, da die Blutzirkulationszeit durch Größenkontrolle und Oberflächenmodifizierung signifikant erhöht werden kann. [33] Für die Bildgebung von Tumoren eignen sich vor allem nanopartikuläre Substanzen, die bisher jedoch nur in der präklinischen Forschung angewendet werden dürfen. Die Blutgefäße in gesunden Geweben haben eine intakte Endothelschicht, die von Nanopartikeln nicht passiert werden kann. In Tumorgeweben und Entzündungen zeichnen sich die Kapillargefäße aufgrund der fenestrierten Endothelzellen durch eine erhöhte Permeabilität aus. Die Nanopartikel können sich aufgrund des EPR-Effekts (engl. *enhanced permeability and retention*) in der extrazellulären Matrix anreichern und später durch Endozytose von diesen Geweben aufgenommen werden, wodurch eine deutliche Kontrastverstärkung resultiert. [99], [104] Abbildung 10 zeigt die schematische Darstellung der passiven Anreicherung von Nanopartikeln in Tumorgeweben.

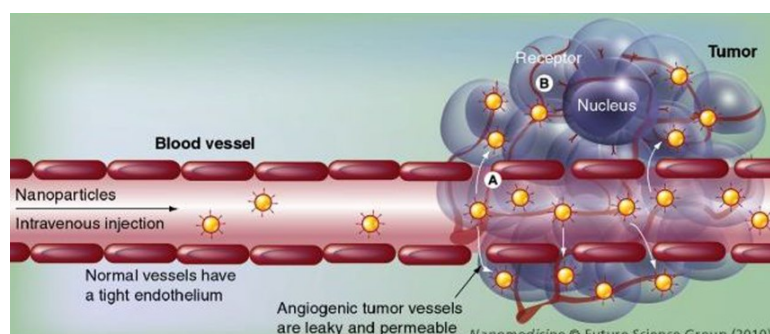


Abbildung 10: Passive Anreicherung von Nanopartikeln in Tumorgeweben aufgrund des EPR-Effektes (engl.: *enhanced permeability and retention* = „erhöhte Permeabilität und Retention“) nach Dong und Mumper, 2010. [105]

Synthetische makromolekulare und nanopartikuläre Kontrastmittel wurden erstmals 1990 publiziert und sind immer noch ein Gebiet auf dem intensiv geforscht wird. [99], [106], [107] Im Vergleich zu den niedermolekularen Kontrastmitteln konnten sie den MRT-Kontrast erhöhen und gleichzeitig die Gadoliniummenge reduzieren. [106] Um Blutbahnen nicht zu blockieren und biologische Membranen passieren zu können, dürfen die kolloidalen Partikel nicht größer als 400 nm sein. [106], [108] Die Ausscheidung niedermolekularer Kontrastmittel erfolgt zum großen Teil über die renale Filtration. [94] Bei Makromolekülen hängt die renale Filtration von verschiedenen physikochemischen Eigenschaften wie molekularer Struktur, Morphologie, Lipophilie und Polarität ab. [109] Makromoleküle mit einem Molekulargewicht > 68 kDa müssen vor ihrer Eliminierung metabolisiert werden. [110] Die Aufnahme durch Zellen des MPS (mononukleäres Phagozytosesystem) wird im Vergleich zu den niedermolekularen Verbindungen gesteigert. MPS ist eine zusammenfassende Bezeichnung für Monozytenvorläufer, Monozyten und Makrophagen. Die im Blut zirkulierenden Makromoleküle werden von Zellen des MPS aufgenommen und abgebaut. Diese Zellen treten vermehrt in Leber, Milz, Lunge und Knochenmark auf. [111] Die Gefahr der Gadolinium Anreicherung in Folge der Metabolisierung ist ein Hauptgrund für die limitierte Anwendung der makromolekularen Kontrastmittel im klinischen Bereich. [99] Durch die Einführung spezifischer funktioneller Gruppen an Makromoleküle und Nanopartikel eröffnet sich die Möglichkeit der Kopplung von Biomolekülen, wie Antikörpern oder Peptidsequenzen, womit die Reagenzien auch für die molekulare Bildgebung einsetzbar werden. Mit der MRT werden somit nicht mehr nur reine Aufschlüsse über die Morphologie möglich, sondern Änderungen, z.B. in Tumorzellen, können bereits auf molekularer Ebene erkannt werden. Das Prinzip der molekularen Bildgebung ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

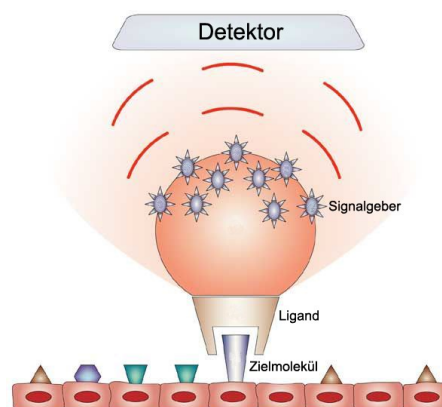


Abbildung 11: Prinzip der molekularen Bildgebung in Anlehnung an Choudhury *et al.*, 2004. [107] Als Signalgeber für die molekulare MRT-Bildgebung können paramagnetische oder superparamagnetische MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden.

Während mit der MRT-Bildgebung *in vivo* Aufnahmen von einem Organismus erzeugt werden, ermöglicht die laserinduzierte, induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) hochaufgelöste *in vitro* Analysen von Zellen oder Gewebeschnitten.

1.5 Bildgebung mit der Laser-Ablation (LA)-ICP-MS

Die Massenspektrometrie mit sanften Ionisierungsverfahren wie ESI (Elektrosprayionisation) und MALDI (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung) sind etablierte Methoden für die Identifizierung von Biomolekülen. Die Anwendung der LA-ICP-MS ist jedoch für die Analyse biologischer Proben weniger weit verbreitet. Die LA-ICP-MS wurde 1985 von Gray eingeführt und ermöglicht die Analyse von festem Probenmaterial mit hoher räumlicher Auflösung. [113] Die Methode liefert zahlreiche nützliche Informationen zur Verteilung von Metallen, Halbmetallen und Nichtmetallen im Spuren- und Ultraspurenbereich. [114], [115] Da bei der LA-ICP-MS die direkte Analyse von festem Probenmaterial erfolgt, benötigt man keine komplizierte und zeitaufwendige Probenvorbereitung, bei denen Kontaminationen der Probe oder Verluste der Analyten auftreten können. Neben der LA-ICP-MS ermöglicht die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) ebenfalls die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung von festen Oberflächen im Spuren- und Ultraspurenbereich. Bei SIMS wird die Probenoberfläche mit energetischen primären Ionen (0,2-30 keV) beschossen und die entstehenden geladenen Teilchen im Massenanalysator getrennt und anschließend

detektiert. Die LA-ICP-MS arbeitet hingegen mit einem kurz gepulsten, Hochleistungs-Laserstrahl, der auf die Probenoberfläche fokussiert wird und das Probenmaterial zeitlich und räumlich getrennt von der anschließenden Analyse mit der ICP-MS abträgt. Im Gegensatz zu SIMS können bei der LA-ICP-MS der Probeneintrag und die Ionisierung separat optimiert werden, wodurch die Methode allgemein Matrix-unempfindlicher ist. [113] Abbildung 12 zeigt die wichtigsten Komponenten eines LA-ICP-MS Gerätes bestehend aus Laserablationssystem, Ionenquelle (ICP) und Massenspektrometer. Das Massenspektrometer besteht aus einem Massenanalysator, in dem die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt (z.B. in einem Quadrupol, nach ihrer Flugzeit [Time of Flight] oder in einem doppelfokussierenden Sektorfeld) und schließlich im Ionendetektor (z.B. Faraday Cup, Sekundärelektronenvervielfacher) als einzelne Pulse (engl. *counts per second*, cps) gezählt werden. Die Hauptunterschiede der Massenanalysatoren liegen in ihrer Massen-Auflösung, den Element-Sensitivitäten und dem linearen Arbeitsbereich. Zurzeit liefern Sektorfeld-Geräte die höchste Sensitivität, den größten Dynamikbereich und können mit hoher Massenauflösung betrieben werden. Isobare Inferenzen von atomaren Ionen der Analyten und mehratomige Ionen werden umgangen. [116]

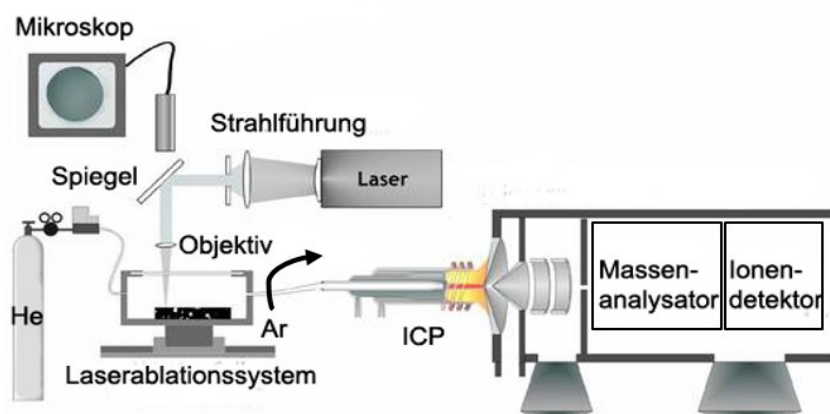


Abbildung 12: Prinzipieller Aufbau einer LA-ICP-MS Anlage, in Anlehnung an Günther und Hattendorf, 2005. [117]

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Laserablationssystem NWR213 gearbeitet, dass an ein Sektorfeld ICP-MS (Element XRTM) gekoppelt wurde. Die Abbildung 13 zeigt das Prinzip der Bildentstehung bei einer LA-ICP-MS Analyse.

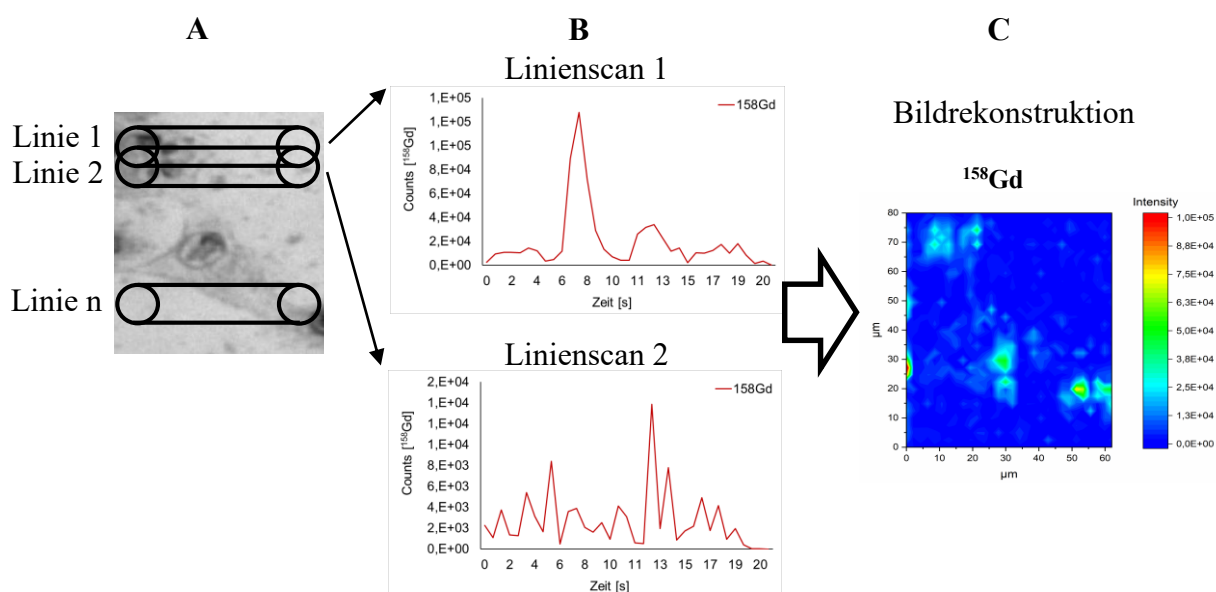


Abbildung 13: Prinzip der Bildentstehung beim Bioimaging mit der Laser-Ablation (LA)-ICP-MS. An der Lasereinheit werden in der Mikroskop-Aufnahme der zu untersuchenden Probe die Linien gesetzt, die vom Laser nacheinander abgetragen werden sollen, um sie mit dem ICP-MS zu analysieren (A). Das ICP-MS generiert für jede analysierte Linie und jedes Isotop einen Datensatz (B), aus dem eine Matrix erzeugt wird, um in Origin® ein Konturdiagramm zu erstellen (C).

Für die Analyse wird die zu untersuchende Probe (ein Gewebeschnitt, fixierte Zellen oder Dot Blot Membranen) zunächst im Laserablationssystem platziert. Die Ablationszelle wird luftdicht verschlossen und mit Helium gespült, um einen besseren Probentransport und eine höhere Sensitivität zu erreichen. [113] Das Lasersystem ist mit einem Lichtmikroskop ausgestattet, so dass in der Mikroskopie-Aufnahme zunächst der Bild-Bereich ausgewählt wird, der analysiert werden soll. Hierzu werden in der Software des Lasersystems die entsprechenden Linien in die Mikroskop-Aufnahme der Probe gezeichnet. Mit einem fokussierten Laserstrahl wird das Probenmaterial Linie für Linie abgetragen (ablatiert) und mit einem Trägergas (Argon) als Aerosol in das induktiv gekoppelte Plasma (ICP) geführt, wo es bei 6.000-8.000 K verdampft, atomisiert und ionisiert wird. [116], [118] Strukturelle und molekulare Informationen gehen im Zuge der Ionisierung komplett verloren. [116] Eine genaue Beschreibung der Ionisation im induktiv gekoppeltem Plasma erfolgt in Kapitel 1.7. Die gebildeten Ionen werden über ein Plasma-Interface, das aus Lochblenden (Cones) und einem differentiellen Pumpsystem besteht, vom Normaldruck ins Vakuum überführt (10^{-8} bis 10^{-10} bar) und im Massenspektrometer analysiert. [119], [120] Im Element XR™ erfolgt die Trennung der Ionen in einem doppelfokussierenden Sektorfeld, in dem sie erst durch ein Magnetfeld (magnetischer Analysator) und anschließend durch ein elektrostatisches Feld (elektrostatischer Analysator) geleitet werden. Die Ionen werden in Abhängigkeit vom

Scan-Modus (B-Scan oder E-Scan) entweder im magnetischen Feld richtungsfokussiert oder im nachgeschalteten elektrischen Feld energiefokussiert. [120] Im Modus B-Scan arbeitet man daher bei Variation des Magnetfeldes B und dem Ausgleich der unterschiedlichen kinetischen Energien der Ionen im nachgeschalteten elektrischem Feld. Im Modus E-Scan wird hingegen bei konstantem Magnetfeld B und Variation der Beschleunigungsspannung im elektrischen Feld gearbeitet. Im Anschluss werden die Ionen in den Detektor geleitet, der beim Element XRTM aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) für kleine Ionenströme und einem zusätzlichem Faraday-Detektor für hohe Ionenströme aufgebaut ist. [120] Nach der Analyse mit der ICP-MS wird für jede abgetragene Linie und jedes Isotop (sog. Linienscan) ein Datensatz (ASCII File) erzeugt und aus allen Linienscans eines Isotops eine Matrix erstellt, aus der mit Origin[®] ein Konturdiagramm erstellt wird, das die Verteilung der analysierten Elemente im gewählten Bildausschnitt zeigt. Die Elementverteilungen der Proben können mit einer lateralen Auflösung im μm -Bereich dargestellt werden, welche durch die Laserspotgröße und das zu analysierende Element begrenzt werden, da naturgemäß durch Reduktion der Spotgröße, auch das Volumen der abgetragenen Probe und damit die Menge der zu analysierenden Elemente reduziert wird. Weitere Verbesserungen der Laser-Ablation-Hardware gehen in Richtung reduzierter Spotgröße sowie schnellere Auswaschzeiten und Datenanalyse. [121] Die LA-ICP-MS kann neben der Darstellung der Elementverteilungen von festem Probenmaterial, auch für ICP-MS-basierte Immunoassays genutzt werden, bei denen metallmarkierte Antikörper zum Einsatz kommen.

1.5.1 ICP-MS-basierte Immunoassays

Die Anwendung metallmarkierter Antikörper in Immunoassays und deren hochsensitive Detektion mit der LA-ICP-MS ist ein aktueller Forschungsbereich der Bioanalytik. [122], [123] Über die Detektion der konjugierten Metalle werden Rückschlüsse auf spezifische Target-Moleküle möglich und somit beispielsweise der Nachweis krankhafter Zellen in Geweben (z.B. Biopsieproben). [124] Kommerziell erhältlich sind derzeit die Metallmarkierungsreagenzien MeCAT[®] (Metal coded affinity tags; Proteome Factory, Berlin) und MaxPar[®] (Fluidigm, USA), wobei beide einige Nachteile aufweisen. Die molekulare Struktur der Reagenzien und das Prinzip ihrer Konjugation an Antikörper ist in Abbildung 14 dargestellt.

Das Reagenz MeCAT[®] besitzt eine begrenzte Empfindlichkeit, da das Molekül nur einen Chelat aufweist, in dem nur ein Metallatom komplexiert werden kann.

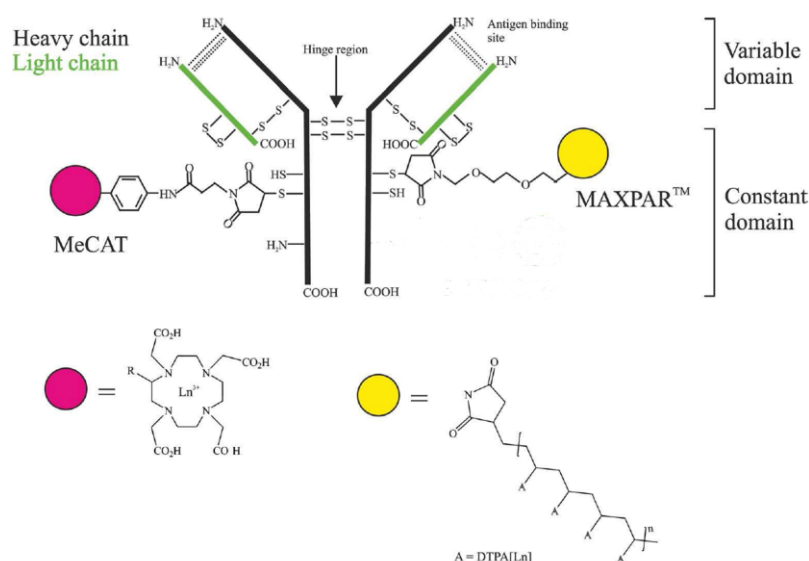


Abbildung 14: Kopplung von MeCAT[®] und MaxPar[®] zur Metallmarkierung von Antikörper, in Anlehnung an Waentig *et al.*, 2012. [123]

Die Konjugation der MeCAT[®]-Reagenzien an Antikörper erfordert zudem sehr harsche Bedingungen, bei der die Disulfidbrücken des Antikörpers geöffnet werden. Durch Öffnen der Disulfidbrücken wird eine Trennung der Antikörperketten beobachtet, was zu einer Beeinträchtigung des Bindungsvermögens führen kann. Bei der Reduzierung der Disulfidbrücken geht man jedoch davon aus, dass bevorzugt die Gelenkregion der Antikörper angegriffen wird und daher zwei identische Teile mit intakten Antigenbindungsstellen vorliegen, die weiterhin bei der Immunreaktion eine Antigen-Selektivität zeigen. [122] Die Konjugation der Antikörper erfolgt schließlich über die gebildeten Thiol-Gruppen, die mit dem Maleimid-Linker an den MeCAT[®]-Reagenzien zu einer stabilen Thioether-Bindung reagieren. Das polymerbasierte Markierungsreagenz MaxPar[®] ist kommerziell für die Massenzytometrie (CyTOF[®]-MS Technologie) erhältlich. An dem Polymermaterial können bis zu 35 Metallatome über Chelatbildner komplexiert werden (<https://www.fluidigm.com/reagents/mass-cytometry>), woraus eine Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zu den MeCAT[®]-Reagenzien resultiert. Bei der Massenzytometrie werden wie bei der konventionellen Durchflusszytometrie einzelne Zellen in einer heterogenen Probenflüssigkeit analysiert. Die Detektion verschiedener Proteine erfolgt bei der Durchflusszytometrie über Fluorochrom-markierte Antikörper. Die Anzahl an spektral auflösbaren Fluorochromen ist beschränkt, da die gängigen Fluoreszenz-Farbstoffe breite Emissionsbanden aufweisen, weshalb sie für Multiplex-

Anwendungen weniger geeignet sind. [72], [125] Bei der Massenzytometrie werden hingegen metallmarkierte Antikörper eingesetzt, die nach ihrer Flugzeit (*time-of-flight*, TOF) getrennt und analysiert werden. Dies ermöglicht mit den kommerziell erhältlichen MaxPAR[®] Reagenzien derzeit die Analyse von mehr als 40 Parametern pro Zelle (<https://www.fluidigm.com/products/helios>). [126] Da die MaxPar[®] Reagenzien die gleiche Linkerchemie wie die MeCAT[®] Reagenzien erfordern, gelten hierfür die dieselben Nachteile (siehe Abbildung 14). Zudem tragen die Polymere Restladungen, die in Immunoassays zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den markierten Antikörpern und dem Gewebe führen und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in der Bildgebung verschlechtern können. [123]

Bei der Entwicklung neuer Metallmarkierungsreagenzien gilt grundsätzlich, dass eine steigende Anzahl an Metallatomen mit einer Empfindlichkeitssteigerung einhergeht. Um für die LA-ICP-MS Metallmarkierungsreagenzien mit hoher Sensitivität zu erhalten, ist die Kopplung von Antikörpern an die weitverbreiteten SPIO-Nanopartikel nur bedingt geeignet. Bei der Detektionsmasse ⁵⁶Fe mit einer Isotopen-Häufigkeit von 91,66 % tritt bei der ICP-MS die Hauptinterferenz ArO^+ ($m/z=56$) auf, die aus den Argon-Ionen des Plasmas und den Sauerstoff-Ionen der Probenmatrix gebildet wird. [116], [127] Bestimmt man eine alternatives Eisen-Isotop, z.B. das Isotop ⁵⁴Fe, erreicht man nicht mehr die bestmögliche Empfindlichkeit. Führt man die Messung bei der Masse ⁵⁶Fe durch, ohne die ArO^+ Interferenz zu entfernen, erreicht man niedrigere Nachweisgrenzen, weil ein ausgesprochen großer Hintergrund das Signal überlagert. Die Anwendung von Kollisionszellen kann die Hintergrundsignale reduzieren, indem man ausnutzt, dass das Interferenz-Ion ArO^+ größer als das Analyt-Ion Fe^+ ist. [116] Werden in der Kollisionszelle beide Ionen durch das Inertgas Helium geleitet, wird das Interferenz-Ion aufgrund seiner Größe häufiger mit Helium kollidieren als das Analyt-Ion. Jedes dieser Zusammenstöße reduziert dabei eine gewisse kinetische Energie der Interferenz-Ionen. Daraus folgt, dass am Ende des Inertgas-Stroms die Analyt-Ionen eine größere Energie besitzen als die Interferenz-Ionen. Am Ausgang der Zelle wird eine Energiebarriere platziert, die nur von Analyt-Ionen mit höherer Energie passiert werden kann. Dieser Prozess wird als Bewegungsenergie-Diskriminierung (engl. *Kinetic Energy Discription*, KED) bezeichnet. Der Einsatz von Kollisionszellen kann die Hintergrundsignale reduzieren, jedoch wird gleichermaßen das Analyt-Signal und damit die Sensitivität reduziert. [116], [128], [129], [130]

Für die Darstellung metallmarkierter Antikörper, die eine Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zu den kommerziellen Reagenzien aufweisen, werden die in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Nanokristalle untersucht. Durch Dotierung der GdVO_4 -PAA Nanokristalle mit verschiedenen Lanthanoiden können sie der Multielementfähigkeit der ICP-MS zugänglich gemacht werden. Mit einem Multiplexansatz können zahlreiche Markierungselemente simultan bestimmt werden, wodurch die immunohistologische Diagnostik wesentlich verbessert und erweitert werden kann. Die Nanokristalle können über ihre funktionelle Polyacrylsäure-Hülle via einer Carbodiimid-vermittelten Reaktion an Antikörper konjugiert werden. Dabei kommt es zwischen den Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche und den freien Aminogruppen am Antikörper zur Ausbildung einer stabilen Amidbindung. Für die Reaktion müssen die Carboxygruppen zunächst mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und anschließender Zugabe von NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert werden. Die Aktivierung und die Konjugation erfolgen in wässrigen Medien und ermöglichen eine schonende Behandlung der Antikörper. Im Gegensatz zu den MeCAT[®] und MaxPar[®]-Reagenzien sind keine reduzierenden Bedingungen erforderlich. Abbildung 15 zeigt das Reaktionsschema der Antikörper-Konjugation über EDC/NHS Chemie.

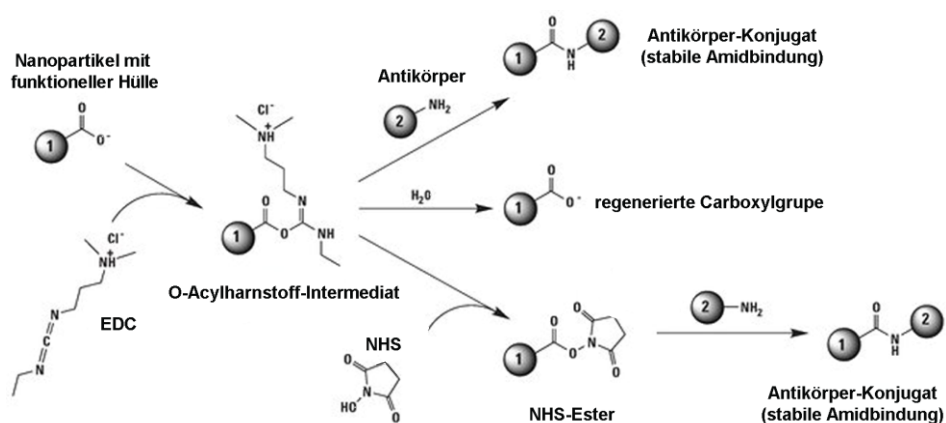


Abbildung 15: Reaktionsschema zur Verknüpfung einer Carbodiimid-aktivierten Carboxygruppe mit einer Aminogruppe eines Antikörpers. In Anlehnung an Hermanson, 2013. [58]

In Abbildung 15 ist ersichtlich, dass nach Aktivierung der Carboxygruppen mit EDC die direkte Umsetzung des O-Acylharnstoff-Intermediates mit den Aminogruppen des Antikörpers erfolgen kann. Das O-Acylharnstoff-Intermediat kann jedoch auch leicht von anderen Nucleophilen angegriffen werden, wie z.B. Sauerstoffatomen aus Wassermolekülen. Bei der Reaktion mit Wasser hydrolysiert das aktivierte Intermediat

zum Ausgangsstoff und als Nebenprodukt entsteht ein disubstituierter Isoharnstoff. Zur Erzeugung eines stabileren Intermediates erfolgt die Zugabe von NHS oder sulfo-NHS. Die Hydroxylgruppe des NHS bewirkt einen nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff des O-Acylharnstoffs und führt zur Bildung eines semi-stabilen NHS-Esters, der mit den Aminogruppen eines Antikörpers zu einem stabilen Konjugat reagiert. Der NHS-Ester kann ebenfalls einer Hydrolyse unterliegen, die bei saurem pH-Wert dramatisch kürzer abläuft. [58] Nachteilig bei der Antikörper-Konjugation über EDC/NHS Chemie ist die unspezifische Bindung der Antikörper an die Nanokristalle, da freie Aminogruppen auf der gesamten Antikörperoberfläche exponiert sein können. [131] Ein Teil der Antikörper kann beispielsweise so konjugiert werden, dass nicht beide Antigenerkennungssequenzen funktionsfähig auf der Nanopartikeloberfläche präsentiert werden (Abbildung 16). Hierdurch würde sich die Antigenbindekapazität eines einzelnen Nanokristalls verringern. Zudem kann ein „Cross-Linking“ zwischen den Nanokristallen und den Antikörpern stattfinden, was zum Ausfallen der Konjugate führen würde. Um dies zu vermeiden, muss in optimalen stöchiometrischen Verhältnissen an Aktivierungsreagenzien, Nanokristallen und Antikörpern gearbeitet werden.

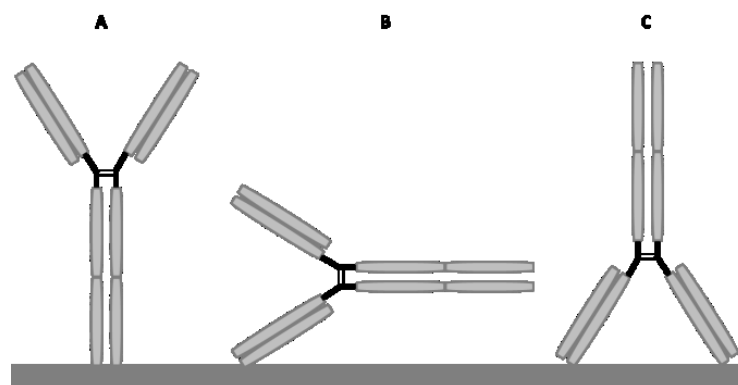


Abbildung 16: Bindungsmöglichkeiten von Antikörpern an feste Oberflächen (beispielsweise Glas, Agarose oder verschiedene Polymere) bei unspezifischer Kopplung über Amino- oder Carboxygruppen. A: optimale Kopplung, beide Antigenstellen sind frei zugänglich. B: nur eine funktionsfähige Antigenbindestelle. C: schlechte Kopplung, beide Antigenbindestellen sind funktionsunfähig. In Anlehnung an Luttmann *et al.*, 2014. [131]

Die Qualität der Bildgebung mit der LA-ICP-MS sowie mit der MRT hängt folglich entscheidend von den eingesetzten Reagenzien bzw. Kontrastmitteln ab. Daher ist es wichtig, die synthetisierten Reagenzien mit verschiedenen analytischen Methoden zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit zählten die dynamische Lichtstreuung, die Bestimmung des Zetapotentials und die ICP-MS zu den am häufigsten eingesetzten analytischen Methoden. Mit der ICP-MS Analytik erfolgte die quantitative Bestimmung der Lanthanoide in den Reagenzien, deren Messprinzip in Kapitel 1.7 beschrieben wird. Zunächst werden die dynamische Lichtstreuung und die Bestimmung des Zetapotentials vorgestellt. Diese beiden Methoden sind zur Bewertung der nanopartikulären Reagenzien von besonderer Bedeutung, da die hydrodynamische Größe der Nanopartikel ein wichtiges Kriterium für ihre Anwendung als Markierungsreagenz und Kontrastmittel darstellt, während das Zetapotential Aussagen zur Stabilität der Nanopartikel in einer Dispersion ermöglicht.

1.6 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine unverzichtbare Methode zur Messung der hydrodynamischen Größe und der Größenverteilung von Molekülen und Partikeln im Bereich von 1 nm-1 μm . Das Messprinzip beruht auf dem Faraday-Tyndall-Effekt, der die Streuung von eingestrahlttem Licht durch kolloidale Lösungen beschreibt. [132] Bei einer DLS Messung trifft monochromatisches Laserlicht durch eine Linse auf eine Küvette mit der Partikeldispersion und wird an den Partikeln gestreut. Die Intensität des gestreuten Lichtes durch ein einzelnes Partikel ist abhängig von seinem Molekulargewicht und seiner Gestalt, dem Unterschied zwischen dem Brechungsindex der Partikel und dem umgebenden Dispergiermedium sowie der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes. Die Streuintensität ist der Differenz der Brechungsindizes direkt proportional. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung bewegen sich Moleküle oder Partikel in alle Raumrichtungen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und streuen das eingestrahlte Licht mit unterschiedlichen Intensitäten. Die gemessene Streulichtintensität unterliegt somit zeitlichen Schwankungen und wird in Abhängigkeit von der Zeit an einem festen Ort detektiert. Aus diesen Schwankungen berechnet ein Korrelator eine Summe von Autokorrelationsfunktionen (Formel 1). [133]

$$g(\tau) = e^{-2Dq^2\tau} \quad \text{Formel 1}$$

In Formel 1 bezeichnet q den Streulichtvektor, der sich aus der Wellenlänge des Laserlichtes und dem Streulicht-(Detektions)winkel berechnet und τ die Messzeit. Die einzige Unbekannte in Formel 1 ist der Diffusionskoeffizient D , der nun aus der Gleichung berechnet werden kann. Der Diffusionskoeffizient D ist von der Temperatur T , der Viskosität η des Dispergiermittels und der Teilchen selbst abhängig. Aus der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 2) kann aus diesen Werten mit der Boltzmann Konstante k_B der hydrodynamische Radius r_h der Partikel berechnet werden.

$$r_h = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad \text{Formel 2}$$

Der hydrodynamische Radius der untersuchten Partikel entspricht dem Radius einer Kugel, welche die gleichen Diffusionseigenschaften in dem gegebenen Dispergiermittel ausweist wie die Probe. [132] Praktisch erfolgt die Berechnung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers, das sog. z-Mittel des Diffusionskoeffizienten, über die Auswertung der Autokorrelationsfunktionen mit einer Kumulantenanalyse, bei der die gemessene Autokorrelationsfunktion an eine exponentielle Korrelationsfunktion angepasst wird (Formel 3). Aus zweckmäßigen Gründen wurde die Formel 3 nach dem quadratischen Term abgebrochen.

$$\ln(g(\tau)) = -K_1 \cdot \tau + \frac{1}{2} K_2 \cdot \tau^2 \quad \text{Formel 3}$$

Aus dem ersten Kumulanten K_1 lässt sich das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z berechnen (Formel 4) und aus dem Quotienten des zweitem und des ersten quadrierten Kumulanten berechnet sich der Polydispersitätsindex (PDI) (Formel 5).

$$D_z = \frac{K_1}{q^2} \quad \text{Formel 4}$$

$$PDI = \frac{K_2}{K_1^2} \quad \text{Formel 5}$$

Die Anpassung von mehrfachen Exponentialfunktionen an die Autokorrelationsfunktion ergibt die Verteilung der Partikelgrößen (z.B. nach CONTIN). [134]

Das Zetapotenzial ist ein Maß für die elektrostatische Abstoßung bzw. Anziehung von geladenen Partikeln und ist damit ein wichtiger Parameter, um die physikalische Stabilität von Nanopartikeln einer Dispersion zu bewerten. [135] Geladene Partikel ziehen in wässrigen Lösungen entgegengesetzt geladene Ionen an, sodass sich eine elektrochemische Doppelschicht bildet, bei der sich die entgegengesetzten Ladungen flächenartig gegenüberstehen. Abbildung 17 zeigt die grafische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht (Stern-Doppelschicht) anhand eines negativ geladenen Partikels und den Verlauf des elektrischen Potentials mit zunehmenden Abstand von der Partikeloberfläche. Die hier gezeigte Doppelschicht besteht aus einer starren Sternschicht, bei der die Gegen-Ionen stark an der Partikeloberfläche haften und einer diffusen Schicht aus beweglichen Gegen-Ionen. Das zustande kommende Potential an der effektiven Scherebene zwischen starrem und beweglichen Teil der Doppelschicht wird als ξ -Zetapotential bezeichnet.

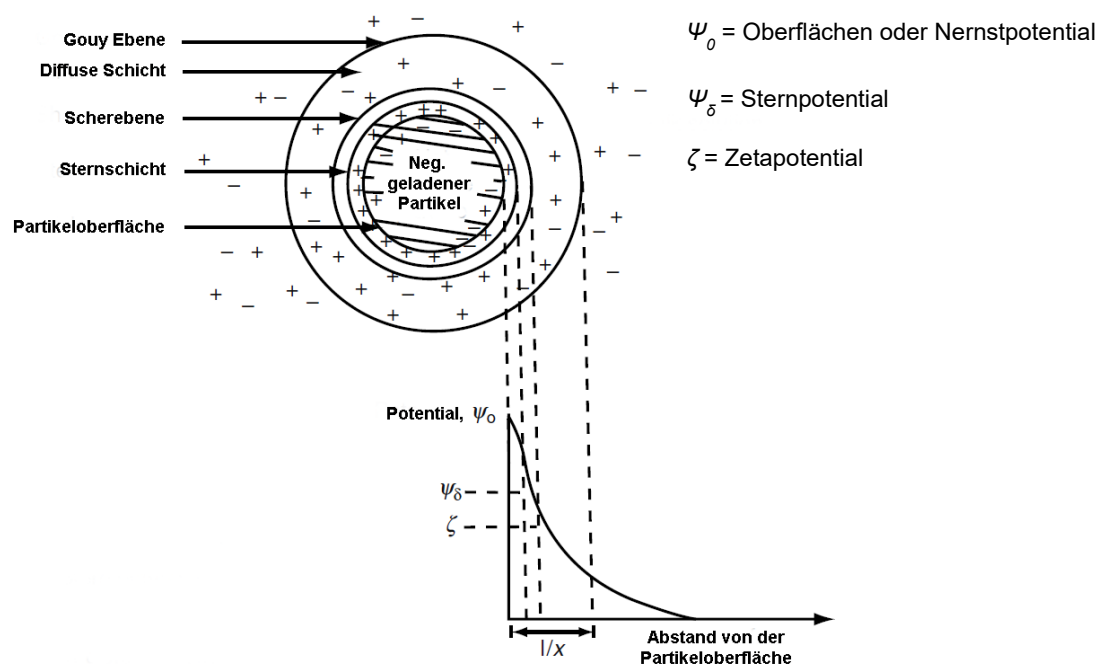


Abbildung 17: Potentialverlauf in Abhängigkeit zur Entfernung einer negativ geladenen Partikeloberfläche. In Anlehnung an Somasundaran *et al.*, 2009. [136]

Die Messung des Zetapotentials erfolgt über die Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit der geladenen Partikel im elektrischen Feld mithilfe des Laser-Doppler-Effektes. Das Messprinzip beruht auf der Streuung von Laserlicht durch die Partikel, wobei aufgrund des Doppler-Effektes eine Frequenzverschiebung des gestreuten Lichtes resultiert, das von der Geschwindigkeit der Partikel im elektrischen Feld und damit von ihrer Ladung abhängt. Bei bekannter Feldstärke kann aus der

gemessenen Frequenzverschiebung, die Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel berechnet werden, aus der sich gemäß Formel 6 die elektrophoretische Mobilität (EM) ergibt.

$$EM = \frac{v [\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]}{E [\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}]} \quad \text{Formel 6}$$

EM... elektrophoretische Mobilität

v... Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel

E... elektrische Feldstärke

Mit der elektrophoretischen Mobilität kann nun das Zetapotential berechnet werden. In dieser Arbeit wurde hierfür die Smoluchowski-Näherung herangezogen (siehe Formel 7).

$$EM = \frac{2}{3} \cdot \frac{\varepsilon \cdot \xi \cdot f(ka)}{\eta} \quad \text{Formel 7}$$

ε ... Dielektrizitätskonstante

$f(ka)$... Smoluchowski-Näherung mit $f(ka) = 1,5$

η ... dynamische Viskosität

Im Allgemeinen gilt, desto größer der Betrag des Zetapotentials, desto größer sind die elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Teilchen und umso stabiler ist die Dispersion. Gemäß *Riddick* agglomerieren Partikel nicht mehr ab einem Zetapotential von -31 mV und ab -41 mV kann man von einer guten Stabilität der Dispersion sprechen. [137]

1.7 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ist eine Methode für die schnelle Multielement-Analytik, die seit 1983 kommerziell erhältlich ist und Nachweisgrenzen vom unteren ppt bis oberen ppm Bereich erlaubt. Der hohe lineare Messbereich und die hohe Empfindlichkeit zeichnen diese Methode besonders für die anorganische Spurenanalytik aus. [138] Die häufigsten Anwendungsbereiche umfassen Fragestellungen der Medizin, der Umweltanalytik, der Biologie sowie die Untersuchung von Halbleitermaterialien. Für die quantitative Bestimmung der Lanthanoide in den synthetisierten Reagenzien wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem ICP-MS iCAP Q (Thermo Scientific™) gearbeitet, das mit einem Quadrupol-Massenanalysator

ausgestattet ist. Abbildung 18 zeigt die schematische Darstellung der wichtigsten Bauteile eines ICP-MS Gerätes.

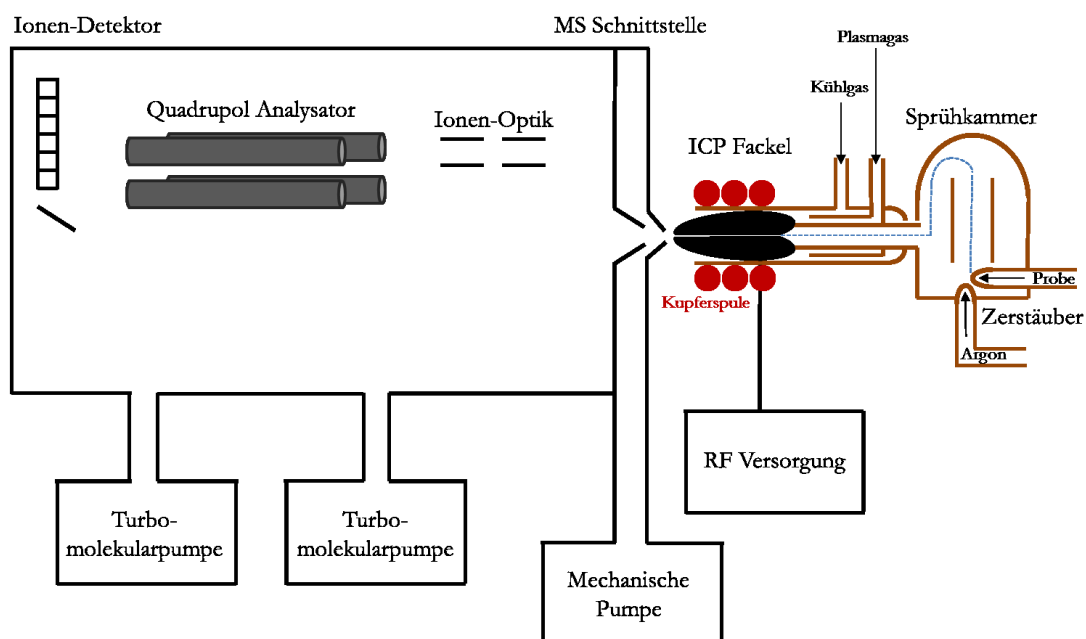


Abbildung 18: Schematischer Aufbau eines ICP-MS mit Quadrupol-Massenanalysator. In Anlehnung an Brennan *et al.*, 2015. [139]

Alle ICP-MS Systeme bestehen grundsätzlich aus einem Zerstäuber, der Sprühkammer, dem ICP als Ionenquelle und dem Detektor. Die MS Schnittstelle, der Massenanalysator, der Ionendetektor und die Vakuum-Kammer können je nach Hersteller und Bauart Unterschiede aufweisen. Der Analytik mit dieser Methode liegt folgendes Funktionsprinzip zugrunde: Zunächst wird die zu analysierende, flüssige Probe mit einer Flussrate von 1 mL/min über eine peristaltische Pumpe in den Zerstäuber gepumpt. Mit einem Argon-Gasstrom von 1 L/min wird die Flüssigkeit in ein feines Aerosol überführt. [129] In der Sprühkammer werden die feinen Flüssigkeitströpfchen des Aerosols von größeren Tropfen getrennt, da das in das Plasma einzubringende Aerosol möglichst fein und bezüglich der Tröpfchengröße gleich verteilt sein muss. Das feine Aerosol wird über den Proben-Injektor aus der Sprühkammer in die ICP Fackel transportiert, wo die Probenmoleküle zu einfach positiv geladenen Ionen umgesetzt werden. Das Plasma wird am Ende der ICP Fackel gebildet. Die Fackel besteht aus drei konzentrischen Quarzrohren. Durch die beiden äußeren Rohre fließt Argon in unterschiedlichen Flussraten, das dritte, innere Rohr, ist das Probeninjektions-Rohr. Zwischen äußeren und mittlerem Rohr wird eine hohe Flussrate von ca. 15 L Argon/min zur Kühlung der Quarzrohre benötigt, zwischen dem mittlerem Rohr und dem Injektionsrohr fließt ein

Hilfsgasstrom mit einer Flussrate 1 L Argon/min, was zur Positionierung des Plasmas genutzt wird. Im Injektionsrohr wird die Probe mit dem Trägergas in Form eines Aerosols durch das Zentrum des Rohrs in das Plasma geblasen. Die ICP-Fackel ist von einer wassergekühlten Induktionsspule aus Kupfer umgeben, die an einen Hochfrequenz-Generator (27 MHz) angeschlossen ist und ein oszillierendes elektromagnetisches Wechselfeld erzeugt. Dies erzeugt im Argon-Gas einen Induktionsstrom. Das Plasma wird durch einen Funken gezündet, wodurch ein kleiner Teil dieses Gases ionisiert. Es werden Argon-Ionen und Elektronen gebildet, die mit weiteren Argon-Atomen kollidieren und weitere Ionen bilden. Liegen Ionen und Elektronen im Gas in einem ausgeglichenen Ladungszustand vor, bezeichnet man es als Plasma. [140] Am offenen Ende des Rohrs bildet sich eine Plasmawolke in der die Probe unter Normaldruck atomisiert und anschließend ionisiert wird. Im Argon-Plasma können die meisten Elemente des Periodensystems ionisiert werden. Die Massenspektrometer-Schnittstelle dient zur Überführung der unter Atmosphärendruck erzeugten Ionen in das Quadrupol-Massenspektrometer. In der Schnittstelle (Interface) herrscht ein Druck von ca. 3 mbar, der die Ionen durch eine konusförmige Lochblende (Sample Cone) saugt. Über eine zweite Lochblende (Skimmer Cone) gelangen die Ionen zum Massenanalysator, in dem Hochvakuum herrscht (10^{-6} mbar). Die Ionen gelangen im Hochvakuum zunächst in die Ionenoptik, wo verschiedene Ionenlinsen, den Ionenstrahl auf den Massenanalysator fokussieren und neutrale Teilchen, Photonen und Elektronen entfernt werden. Das Quadrupol-Massenspektrometer besteht aus vier parallel angeordneten Metallstäben. An den gegenüberliegenden Stäben liegt eine Gleichspannung an. Die Gleichspannung wird überlagert von einer, um 180 phasenverschobenen, hochfrequenten Wechselspannung. Durch die anliegenden Spannungen werden die Ionen auf eine spiralförmige Bahn gezwungen. Bei einem bestimmten Verhältnis von Frequenz und Amplitude der Wechselspannung sowie der Gleichspannung können nur Ionen in einem schmalen Bereich von Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z Verhältnissen) in einer stabilen Bahn das Quadrupol passieren und im Ionendetektor (Sekundärelektronenvervielfacher) nachgewiesen werden. Alle anderen Ionen werden abgelenkt, kollidieren mit den Stäben und werden somit nicht detektiert. [119], [129], [140], [141] Durch elektrische Ansteuerung des Quadrupols kann der Bereich der m/z Werte variiert und der gewünschte Massenbereich abgetastet werden. [119] Dies erfolgt ohne Zeitverlust, so dass Quadrupol-Massenspektrometer sehr schnell messen können. Die Rohdaten der Signale haben die Einheit „counts per second“ (cps).

Zusammenfassendes Ziel der vorliegenden Arbeit war Synthese von Gadoliniumhaltigen makromolekularen und nanopartikulären Reagenzien, die sich für die präklinische MRT-Bildgebung und für die intrazelluläre Metallmarkierung eignen. Die Funktionalisierung kommerziell verfügbarer PAMAM-Dendrimere [12], [51], [142] und die Darstellung von Nanokristallen auf Basis von Gadoliniumorthovanadat (GdVO_4) [62], [65], [74] wurde bereits mehrfach publiziert. In der vorliegenden Arbeit sollten ausschließlich $\text{Ln}:\text{GdVO}_4$ -Nanokristalle ($\text{Ln} = \text{Eu}, \text{Tb}$) mit funktioneller Polyacrylsäure(PAA)-Hülle dargestellt werden, sodass über die Carboxygruppen eine schonende Konjugation von Antikörpern über EDC/NHS-Chemie möglich wird, ohne Reduktion der Disulfidgruppen am Antikörper. Über die Dotierung der Nanokristalle mit den verschiedenen Lanthanoiden sollten sie der Multielementfähigkeit der ICP-MS zugänglich gemacht werden. Die Synthese der PAA-funktionalisierten Nanokristalle wurde insbesondere dahingehend optimiert, um Nanokristalle mit hoher Ausbeute und schmaler Partikelgrößenverteilung zu erhalten. Die Partikelgröße- sowie die Partikelgrößenverteilung sind von besonderer Bedeutung bei einer potentiellen *in vivo* Anwendung, da die Partikelgröße die Biodistribution beeinflusst und bei einer *in vitro* Anwendung als intrazelluläres Metallmarkierungsreagenz die Aufnahme in die Zelle. *In vitro* Studien zeigten, dass die Zellaufnahme von Nanopartikeln in der Größenordnung zwischen 10-60 nm am effizientesten erfolgt. [143] Ziel war daher die Synthese von Nanokristallen mit einer Partikelgröße <60 nm, die ihre kolloidale Stabilität in biologischen Medien beibehalten. Bei den makromolekularen Reagenzien galt es das die zahlreichen primären Aminogruppen der G5-PAMAM Dendrimere in geeigneter Weise mit dem Chelator DOTA zu funktionalisieren, um möglichst vielen Gadoliniumionen je Dendrimer zu komplexieren und eine Sensitivitätssteigerung im Vergleich zu den zugelassenen Markierungsreagenzien und Kontrastmitteln zu erreichen. Nach Optimierung der Synthesen wurden beide Reagenzien eingehend charakterisiert und hinsichtlich ihrer potentiellen Anwendung als präklinische MRT-Kontrastmittel bewertet sowie für die Anwendung zur *in vitro* Markierung von Zellen untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

2 Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse zur Optimierung der Synthesen für die Darstellung makromolekularer und nanopartikulärer Reagenzien für die Anwendung als präklinische MRT-Kontrastmittel bzw. für die intrazelluläre Metallmarkierung von Zellen vorgestellt. Im Anschluss folgen die Ergebnisse zur Charakterisierung der Reagenzien mit verschiedenen analytischen Methoden wie der Infrarotspektroskopie, der Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie, der Transmissionselektronenmikroskopie und der Fluoreszenzspektroskopie sowie die Bestimmung der r_1 -Relaxivitäten und die Untersuchungen der Biokompatibilität mit dem MTT-Assay. Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse der Zellmarkierung mit den synthetisierten Reagenzien anhand zwei verschiedener Zellarten (Mesenchymale Stammzellen aus dem humanen Fettgewebe und Zellen der Linie A549 von einem Adenokarzinom der Lunge) vorgestellt. Zuletzt folgen die Ergebnisse der Antikörper-Konjugation an die nanopartikulären Reagenzien mit der Reaktionskontrolle über einen Dot Blot Assay.

2.1 DOTA(Gd^{3+})-G5-PAMAM Dendrimere

Für die Darstellung der makromolekularen Reagenzien beschreiben die folgenden beiden Kapitel die Untersuchungen zur Funktionalisierung der G5-PAMAM Dendrimere, wobei Kapitel 2.1.1 die Untersuchung der Acetylierung der Dendrimere beschreibt und Kapitel 2.1.2 die DOTA-Funktionalisierung mit anschließender Gd^{3+} -Komplexierung.

2.1.1 Acetylierung von G5-PAMAM

Die Acetylierung der G5-PAMAM Dendrimere erfolgte stets im ersten Reaktionsschritt, da alle weiteren Reaktionsschritte in wässrigen Systemen durchgeführt wurden. Um einen Acetylierungsgrad von ca. 50 % zu erreichen, wurden verschiedene molare Verhältnisse von Essigsäureanhydrid und der korrespondierenden Base Triethylamin untersucht (siehe Tabelle 1). Die entsprechende Synthesevorschrift zur Acetylierung der G5-PAMAM Dendrimere mit anschließender NMR-Analytik sowie die

DOTA(Gd^{3+})-Funktionalisierung sind im Anhang, Kapitel 4.1.3, beschrieben. Um die erzielten Acetylierungsgrade zu bestimmen, wurden ^1H -NMR-Spektren der Dendrimere aufgenommen. Tabelle 1 zeigt neben den molaren Verhältnissen der Ausgangsstoffe eine Übersicht der eingeführten Acetylgruppen je Dendrimer sowie die entsprechenden Acetylierungsgrade, die anhand der Integrale in den ^1H -NMR-Spektren berechnet wurden.

Tabelle 1: Übersicht der molaren Verhältnisse zur Acetylierung von G5-PAMAM mit Darstellung der erzielten Acetylierungsgrade nach Auswertung der ^1H -NMR-Spektren.

Nr.	mol. Überschuss $(\text{Ac})_2\text{O} : \text{PAMAM}$	mol. Überschuss $\text{Et}_3\text{N} : (\text{Ac})_2\text{O}$	$(-\text{CH}_3/-\text{CH}_2-)$	n (Acetylgruppen)	Acetylierung [%]
1	64	2,65	0,053	36	28
2	85	2,00	0,092	62	48
3	450	1,25	0,128	85	67
4	450	2,00	0,134	90	70

Abbildung 19 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum nach Acetylierung des Dendrimers (Ac-G5-PAMAM) mit 85-fachen molaren Überschuss Essig-anhydrid und 2-fachen molaren Überschuss der korrespondierenden Base Triethylamin (siehe Tabelle 1, Acetylierung Nr. 2). Die ^1H -NMR-Spektren der weiteren Acetylierungen befinden sich im Anhang, Kapitel 4.2.1.

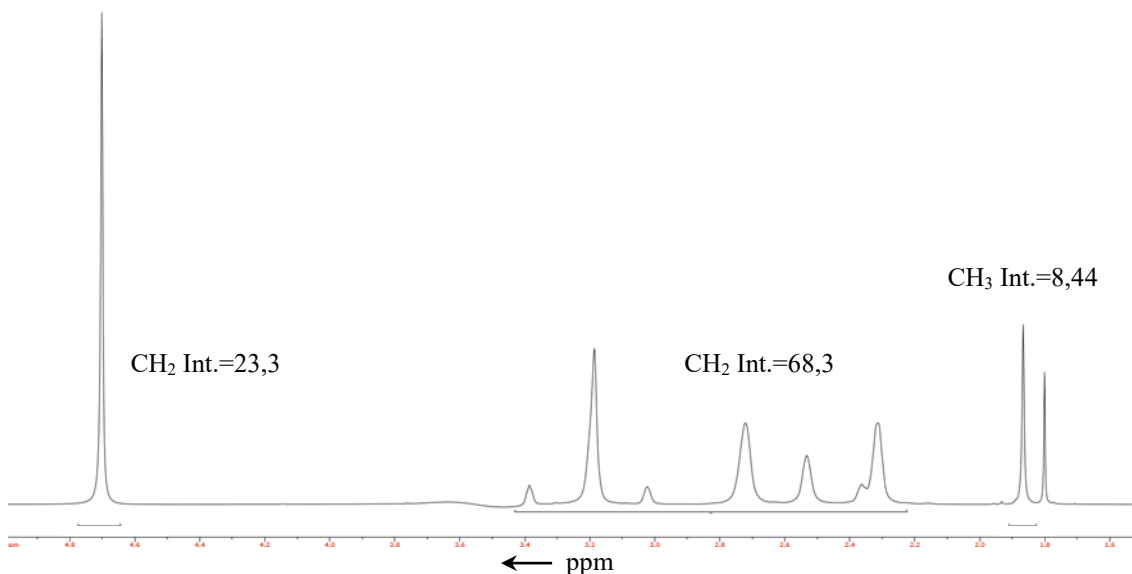


Abbildung 19: ^1H -NMR-Spektrum von acetyliertem G5-PAMAM nach Umsetzung mit 85-fachen molaren Überschuss an Essigsäureanhydrid und 2-fachen molaren Überschuss der korrespondierenden Base Triethylamin (siehe Tabelle 1, Acetylierung Nr. 2).

Die Berechnung der eingeführten Acetylgruppen erfolgte über das Verhältnis der Integrale der CH_3 Protonen im Hochfeld (ca. 1,87 ppm) zur Summe der integrierten Signale aller CH_2 Protonen zwischen 2,2-4,8 ppm unter Einbeziehung der molaren Massen der Acetylgruppen und des Dendrimers (siehe Formel 8). [56], [144]

$$n(\text{Acetyl-Gruppen}) = \frac{M(\text{G5-PAMAM})}{M(\text{CH}_3\text{CO-})} \cdot (-\text{CH}_3 / -\text{CH}_2 - \text{ratio}) \quad \text{Formel 8}$$

Der erste Peak bei ca. 1,8 ppm stammt aus einer Nebenreaktion, die während der Acetylierung abläuft. Die Zugabe von Triethylamin (Et_3N) erfolgt zur Umsetzung der freiwerdenden Essigsäure unter Bildung eines Alkylammonium-Salzes, sog. quartären Ammoniumverbindungen (Abbildung 20). Das Signal bei 1,8 ppm stammt folglich von den CH_3 -Protonen der entsprechenden Salze. Wird die freiwerdende Essigsäure nicht mit Triethylamin umgesetzt, kann sie ebenfalls unter Salzbildung mit den primären Aminogruppen des Dendrimers reagieren (Abbildung 21).

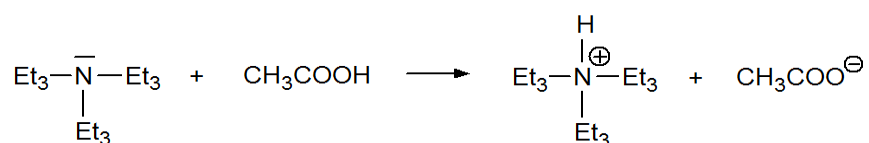


Abbildung 20: Nebenreaktion des Triethylamin mit Essigsäure unter Bildung des entsprechenden Alkylammonium-Salzes.

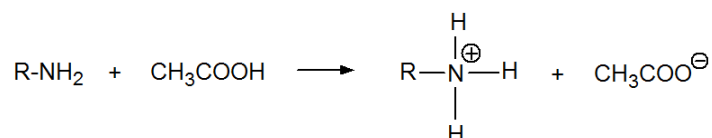


Abbildung 21: Nebenreaktion der primären Aminogruppen des Dendrimers mit Essigsäure unter Bildung des entsprechenden Ammonium-Salzes.

Die Reaktion der freiwerdenden Essigsäure mit den primären Aminogruppen konkurriert mit der Umsetzung der Essigsäure mit Triethylamin unter Bildung der entsprechenden Triethylamin-Acetat-Salze. Triethylamin wird daher im Überschuss zugegeben, um die freiwerdende Essigsäure umzusetzen und die Reaktion mit den primären Aminogruppen zu unterbinden. Neben der Auswertung der NMR-Spektren war die Löslichkeit der Dendrimere in D₂O unmittelbar vor der NMR-Analytik ein Indiz für den Acetylierungsgrad. Von der Acetylierung Nr. 1 bis nach Acetylierung Nr. 4 (siehe Tabelle 1) nahm die Löslichkeit der Proben zu, was für eine Zunahme des Acetylierungsgrades spricht. Dendrimere, die nach der Acetylierung Nr. 1 acetyliert wurden, ließen sich schlecht in D₂O lösen, während die Proben nach Acetylierung Nr. 2 nach kurzer Durchmischung und Behandlung im Ultraschallbad in D₂O gelöst werden konnten. Bei den untersuchten Acetylierungen wurde nur bei Acetylierung Nr. 1 unter Schutzgasatmosphäre (N₂) gearbeitet. Hier wurde nach der Publikation von Waite *et al.* [144] das Dendrimer und Triethylamin zunächst in wasserfreiem Methanol vorgelegt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktionsmischung 2 min mit Stickstoff gespült wurde und die Zugabe von Essigsäureanhydrid unter Stickstoff Überspülung erfolgte. Bei der Acetylierung Nr. 2-4 wurde die Publikation von Majoros *et al.* [56] herangezogen und, wie dort beschrieben, alle Edukte im Rundkolben ohne Schutzgas vorgelegt. Der Vergleich der Ergebnisse nach Acetylierung Nr. 2-4 mit dem Ergebnis nach Acetylierung Nr. 1 zeigt, dass die Arbeit unter Schutzgasatmosphäre keine entscheidenden Vorteile, bzw. in Relation zur Menge an Essigsäureanhydrid, keine höheren Acetylierungsgrade liefert. Der höchste Acetylierungsgrad wurde bei der Acetylierung Nr. 4 erreicht. Bei diesem Ansatz wurden 90 Aminogruppen acetyliert, was einem Acetylierungsgrad von 70 % entspricht. Da jedoch noch möglichst viele Aminogruppen für die DOTA-Konjugation zur Verfügung stehen sollten, wurde die Acetylierung nach der Reaktion Nr. 2 bevorzugt, bei der ein Acetylierungsgrad von 48 % erreicht wurde. Bei einer partiellen Acetylierung von ca. 50 % wurde ein guter Kompromiss zwischen Löslichkeit der Dendrimere und zur Verfügung stehenden Aminogruppen für die DOTA-Konjugation erhalten.

2.1.2 DOTA(Gd³⁺)-Funktionalisierung von G5-PAMAM

Im nächsten Schritt wurde der bifunktionelle Chelator DOTA-NHS bzw. DOTA-NCS sowie verschiedene Puffer und Temperaturen für die darauffolgende Gd³⁺-Komplexierung untersucht. Zur Untersuchung der optimalen Bedingungen für die Gd³⁺-Komplexierung wurde in Anlehnung an Waentig *et al.* [145] bei 37 °C sowie bei Raumtemperatur gearbeitet. Für beide Temperaturen wurden die Komplexierungspuffer 20 mM TBAA (Tetrabutylammoniumacetat) und 10 mM Citrat-Puffer mit pH 6,0 untersucht. Das Balkendiagramm in Abbildung 22 zeigt hierzu die grafische Darstellung der Anzahl der komplexierten Gd³⁺-Ionen je Dendrimer nach den unterschiedlichen Reaktionsführungen, die mit der ICP-MS Analytik ermittelt wurden. Nach der Gd³⁺-Zugabe trat vor allem bei den Blindwerten (keine DOTA-Zugabe) eine starke Trübung auf, die vermutlich aus der Bildung von Gd(OH)₃ resultierte. Die DOTA-funktionalisierten Proben zeigten nach der Gd³⁺-Zugabe, in Abhängigkeit von der Reaktionsführung, eine leichte bis keine Trübung. Da der Blindwert und alle Proben gleichbehandelt wurden, erfolgte vor der Dialyse zur Aufreinigung der Reaktionsprodukte zunächst die Filtration über einen 0,45 µm Spritzenfilter, wodurch die Trübung aus den Lösungen entfernt werden konnte.

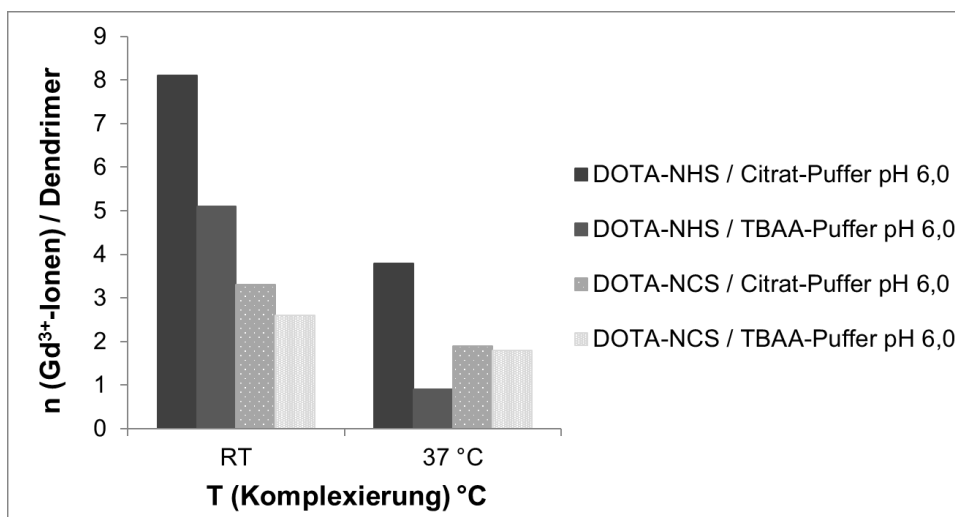


Abbildung 22: Untersuchung der bifunktionellen Linker DOTA-NHS und DOTS-NCS zur Funktionalisierung von acetylierten G5-PAMAM Dendrimeren für die anschließende Gd³⁺-Komplexierung. Die Gd³⁺-Komplexierung erfolgte jeweils in Citrat- bzw. TBAA-Puffer mit pH 6,0 sowie bei Raumtemperatur bzw. 37°C.

Das Balkendiagramm in Abbildung 22 zeigt deutlich, dass über die Reaktion mit dem Hydroxysuccinimid-Ester mehr DOTA-Gruppen konjugiert werden konnten und folglich mehr Gd^{3+} -Ionen je Dendrimer komplexiert wurden als bei der Verwendung von DOTA-NCS. Beim Chelator DOTA-NHS ist zu beachten, dass der funktionelle NHS-Ester an eine Carboxygruppe des Komplexes gebunden vorliegt, während beim DOTA-NCS die Funktionalität am Makrozyklus gebunden ist. Eine schlechtere Gd^{3+} -Komplexierung von DOTA-NHS im Vergleich zu DOTA-NCS wurde jedoch bei den verschiedenen Reaktionsführungen beobachtet. Mit DOTA-NHS und Citrat-Puffer für die Gd^{3+} -Komplexierung wurden bei Raumtemperatur 8 Gd^{3+} -Ionen je Dendrimer komplexiert. Die Gd^{3+} -Komplexierung bei 37°C unter Verwendung des 20 mM TBAA-Puffers erzielte bei allen Ansätzen geringere Gd^{3+} -Ausbeuten als bei Raumtemperatur. Bei weiteren Synthesen erfolgte die Komplexierung daher nur noch bei Raumtemperatur in 10 mM Citrat-Puffer bei pH 6,0. Aufgrund der höheren Gd^{3+} -Ausbeuten bei Verwendung von DOTA-NHS wurde ausschließlich mit diesem Chelator weitergearbeitet, der zudem rund 70 % preiswerter ist als DOTA-NCS.

Für die qualitative Bewertung der funktionalisierten Dendrimere wurde eine Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Trennung von Probenmolekülen nach ihrem Molekulargewicht, wobei große Moleküle die Säule schneller passieren als kleine, da die kleinen Moleküle zu einem größeren Anteil in die Poren der stationären Phase diffundieren können. Abbildung 23 zeigt die Chromatogramme der Blindwerte (Reaktion ohne DOTA-Zugabe) und der DOTA(Gd)-funktionalisierten Ac-G5-PAMAM Dendrimere. Die Peaks nach Detektion der Leitfähigkeit sind rot und die nach Detektion der UV-Absorption sind blau dargestellt. Für die Einteilung der Y-Achse wurde die Einheit mAU (UV-Absorption) gewählt, die über dem Elutionsvolumens aufgetragen wurde.

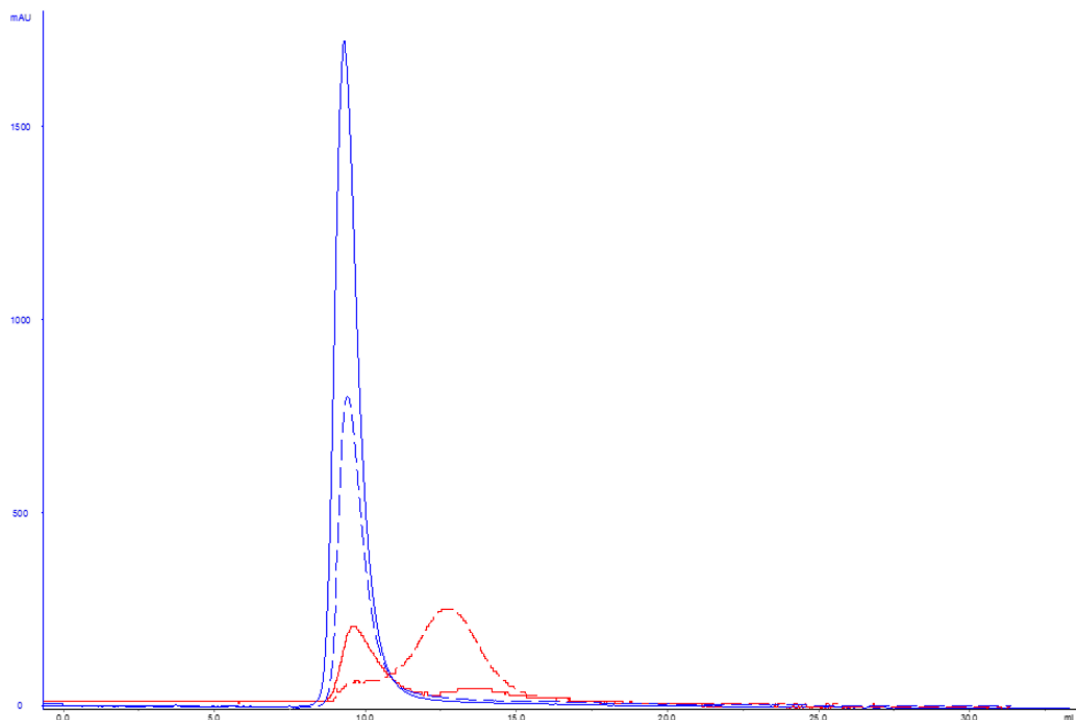


Abbildung 23: Gelpermeationschromatographie von acetyliertem G5-PAMAM ohne DOTA-Funktionalisierung mit Gd^{3+} -Zugabe (Blindwert) und von DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten, acetylierten G5-PAMAM Dendrimern bei Verwendung von DOTA-NHS mit Gd^{3+} -Komplexierung bei Raumtemperatur und 10 mM Citrat Puffer bei pH 6,0. Die gestrichelte Linie zeigt die Signale vom Blindwert, die durchgezogene Linie zeigt die Signale des funktionalisierten Dendrimers. Die roten Linien zeigen die Detektion der Leitfähigkeit und die blauen Signale zeigen die Detektion der UV-Absorption über dem Elutionsvolumen.

Im Chromatogramm ist das Dendrimer G5-PAMAM ($M=28.826$ g/mol) im ersten Peak bei ca. 10 mL Elutionsvolumen erkennbar. Der zweite Peak bei ca. 13 mL zeigt bei Detektion der Leitfähigkeit die freien, nicht komplexierten Gd^{3+} -Ionen. Im Vergleich zum Blindwert, bei dem die gleiche Menge des Dendrimers eingesetzt wurde wie für die DOTA-Funktionalisierung, zeigt das funktionalisierte Dendrimer ein ca. doppelt so hohes UV-Signal. Dies lässt auf eine erfolgreiche DOTA-Funktionalisierung schließen. Die Einführung zahlreicher Carbonyl-Funktionen resultierte in einer zunehmenden Absorption von UV-Licht. Während im Chromatogramm beim DOTA-funktionalisierten Dendrimer nur eine Erhöhung der Leitfähigkeit auf der Peakhöhe des Dendrimers zu erkennen ist, zeigt der Blindwert einen breiten zweiten Peak bei ca. 13 mL, welcher auf einen deutlich höheren Anteil an freien Gd^{3+} -Ionen hinweist. Das Chromatogramm verdeutlicht ergänzend zur ICP-MS Analytik die erfolgreiche DOTA-Funktionalisierung mit anschließender Gd^{3+} -Komplexierung. Das entsprechende Chromatogramm nach Gd^{3+} -Komplexierung in TBAA-Puffer ist im Anhang, Kapitel 4.2.2, zu finden.

Um die Gd^{3+} -Ausbeute in folgenden Synthesen zu steigern, wurde DOTA-NHS vor der Zugabe zum Dendrimer in DMSO (500 mg/mL) gelöst, um die Hydrolyse des reaktiven Hydroxysuccinimid-Esters vor der Reaktion mit den primären Aminogruppen zu vermeiden. Die anschließende Gd^{3+} -Komplexierung fand in 10 mM Citrat-Puffer pH 6,0 statt. Mit der optimierten Reaktionsführung konnten abzüglich des Blindwertes bis zu 22 Gd^{3+} -Ionen/Dendrimer komplexiert werden. Bei allen Synthesen zeigten die Blindwerte selbst nach mehrfacher Dialyse, Gd^{3+} -Gehalte von bis zu 0,2 mg/mL. Die Proben der Blindwerte und die funktionalisierten Dendrimere wurden im Anschluss an die Dialyse mit 1 N NaOH auf pH 12 gestellt, um zu überprüfen, ob freie Gd^{3+} -Ionen als $Gd(OH)_3$ ausfallen. Weder beim Blindwert noch bei den Proben war ein Niederschlag oder eine Trübung zu beobachten, was dafürspricht, dass die Gd^{3+} -Ionen zum Teil (ca. 15 %) in der Polymer-Matrix immobilisiert vorlagen. Für die Markierung der A549 Zellen und MSCs (siehe Kapitel 2.4) wurden ausschließlich funktionalisierte Dendrimere verwendet, bei denen DOTA-NHS als Lösung in DMSO zu den acetylierten G5-PAMAM Dendrimern gegeben wurde und die Gd^{3+} -Komplexierung in 10 mM Citrat-Puffer bei pH 6,0 stattfand. Neben den eben vorgestellten Funktionalisierungen der G5-PAMAM-Dendrimere beschreibt das nächste Kapitel die Synthese von Ln: $GdVO_4$ -PAA-Nanokristallen zur Darstellung der nanopartikulären Markierungsreagenzien.

2.2 Ln: $GdVO_4$ -PAA Nanokristalle

Für die Darstellung dotierter $GdVO_4$ -Nanokristalle mit funktioneller Polyacrylsäurehülle ($M_w=1.800\text{g/mol}$) wurde eine Solvothermal-Synthese in Anlehnung an Nunez *et al.* [74] optimiert, um Nanomaterialien mit Partikelgrößen $<60\text{ nm}$ zu erhalten. Für den Einsatz als präklinische Kontrastmittel bzw. als Markierungsreagenz für Zellen müssen die Nanokristalle reproduzierbar herstellbar sein, sie müssen eine schmale Größenverteilung aufweisen und ihre kolloidale Stabilität in biologischen Medien beibehalten. Die allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung von Ln: $GdVO_4$ -PAA Nanokristallen über die Solvothermal-Synthese befindet sich im Anhang, Kapitel 4.1.5.

2.2.1 Präparation der Reaktionsmischung und Einfluss der Polyacrylsäure

Bei der Solvothermal-Synthese zeigte sich zunächst, dass die Präparation der Reaktionsmischung aus beiden Ausgangslösungen, der Na_3VO_4 -Lösung mit zugesetzter Polyacrylsäure und der Lanthanoid(Ln^{3+})-Lösung, vor der Alterung bei 120°C einen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Nanokristalle hatte. Der geringste hydrodynamische Durchmesser wurde erhalten, wenn beide Ausgangslösungen gleichzeitig unter Rühren 1 : 1 miteinander gemischt wurden. Wurde dagegen die Na_3VO_4 -Lösung vorgelegt und die Ln^{3+} -Lösung langsam zugegeben, war bereits vor der Alterung eine Trübung zu beobachten. Legte man umgekehrt die Ln^{3+} -Lösung vor und gab die Na_3VO_4 -Lösung langsam zu, erhielt man eine Trübung, die im Laufe der Zugabe wieder verschwand. Wurde eine Ausgangslösung vorgelegt und die jeweils andere unter Rühren schnell zugegeben, trat keine Trübung auf und die Gemische blieben klar. Die Ursache für die auftretende Trübung vor der Alterung war die Bildung von Lanthanoid-Hydroxiden ($\text{Ln}(\text{OH})_3$), die bei besonders basischen pH-Werten auftritt. [146] Die Lanthanoid-Hydroxide reagieren nur langsam mit den Vanadat-Ionen. [69], [70] Bei niedrigen pH-Werten bilden sich hingegen neben protoniertem Orthovanadat, auch verstärkt Divanadat $[\text{V}_2\text{O}_7]^{4-}$ und Metavanadat $[\text{VO}_3]^-$ sowie deren protonierte Formen. [147], [148] Für die pH-Werte der klaren Mischungen wurde pH 12 ermittelt. Bei allen Ansätzen bildete sich ein weißer Niederschlag, der aus der Bildung der Nanokristalle resultierte und durch Zentrifugation aufgereinigt werden konnte. Während nach den verschiedenen Präparationen der Reaktionsmischungen durchweg Ausbeuten von 80-90 % erhalten wurden, betrug der hydrodynamische Durchmesser nur nach gleichzeitiger Mischung beider Ausgangslösungen 59,5 nm. Bei den weiteren Synthesen wurden hydrodynamische Durchmesser zwischen 72,4-82,5 nm erhalten. Bei allen Ansätzen lagen die Zetapotentiale im Bereich von -58 mV bis -45 mV und die PDI's zwischen 0,09-0,10. Beim Vorliegen einer streng monodispersen Partikelgrößenverteilung würde der PDI den Wert 0 annehmen. [132] In der Praxis wird eine Dispersion mit einem PDI bis 0,06 als monodispers bezeichnet. Bei Werten zwischen 0,1-0,2 spricht man von einer engen Verteilung, eine breite Verteilung liegt bei Werten zwischen 0,25 und 0,5 vor und ab einem PDI über 0,5 spricht man von einer polydispersen Verteilung. [132], [135] Beim Zetapotential deutet ein Wert größer ± 30 mV darauf hin, dass eine Dispersion ausreichend elektrostatisch stabilisiert ist, da die Oberflächenladungen die Aggregation der Nanopartikel verhindern. [149] Die

bestimmten Zetapotentialen und PDI's weisen daher auf ausreichend stabile Dispersionen mit engen Partikelgrößenverteilungen hin. Der hydrodynamische Durchmesser, das Zetapotential und der PDI sind zudem wichtige Parameter, um eine potentielle Anwendung der Nanokristalle als präklinische MRT-Kontrastmittel und/oder als Metallmarkierungsreagenz für Zellen zu bewerten. Die Größe der Nanokristalle hat einen entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik bei der *in vivo* Anwendung und die Oberflächenladung bzw. das Zetapotential hat einen Einfluss auf deren Stabilität. Die Langzeitstabilität von ausgewählten Ansätzen wurde durch wiederkehrende Messung des hydrodynamischen Durchmessers über einen Zeitraum von 6 Monaten bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind im folgenden Abschnitt unter Punkt 2.2.4 zu finden.

Für weitere Optimierungen der Synthese wurden die Reaktionsmischungen ausschließlich durch gleichzeitige Mischung beider Ausgangslösungen präpariert und der Einfluss der Polyacrylsäure-Menge auf den hydrodynamischen Durchmesser und die Ausbeute untersucht. Abbildung 24 zeigt ein Foto der Ansätze nach dreistündigem Altern bei 120°C, bei denen die Polyacrylsäure im Bereich von 1,0-20,0 mg/mL zur Vanadat-Phase zugesetzt wurde.

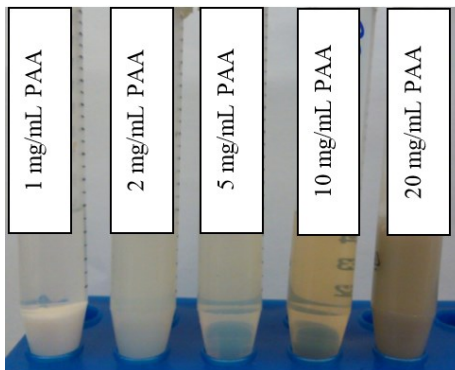


Abbildung 24: Foto der Reaktionsmischungen nach drei stündigem Altern im Trockenschrank bei 120°C zur Darstellung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristalle über eine Solvothermal-Synthese. Das Foto zeigt die erhaltenen Reaktionsprodukte bei Verwendung unterschiedlicher Polyacrylsäure-Mengen vor der Aufreinigung der Nanokristalle.

Mit 1 mg/mL Polyacrylsäure in der Vanadat-Phase wurde bereits bei der Untersuchung einer geeigneten Methode zur Präparation der Reaktionsmischung gearbeitet. Hier ist ein deutlich weißer Niederschlag erkennbar, der mit steigender PAA-Menge von links nach rechts bis 10 mg/mL PAA abnimmt und bei 20 mg/mL PAA durch Bildung eines kräftigen gelb-braunen Niederschlages schließlich wieder stark zunimmt. Dieser gelbliche Niederschlag resultierte aus der Anwesenheit von Polyvanadat. [69]

Beim Einsatz von 2, 5 und 10 mg/mL PAA konnte das Reaktionsprodukt nach der Synthese nicht über Zentrifugation aufgereinigt werden. Eine Aufreinigung konnte nur bei den Reaktionsprodukten mit 1 mg/mL PAA und 20 mg/mL PAA in der Reaktionsmischung erfolgen. Beim Einsatz von 20 mg/mL PAA wurde nach der Aufreinigung ein hydrodynamischer Durchmesser von 591,0 nm bestimmt, die Partikel fielen jedoch am Tag nach der Synthese aus. Für den Ansatz mit 1,0 mg/mL wurde ein hydrodynamischer Durchmesser von 64,6 nm mit einem PDI von 0,100 bestimmt. Weitere Synthesen wurden mit PAA-Mengen im Bereich von 0,8-1,2 mg/mL je Ansatz durchgeführt (siehe Anhang, Kapitel 4.2.3, Tabelle 13). Der hydrodynamische Partikeldurchmesser war bei Anwesenheit von 1,0 mg/mL PAA am geringsten. Für alle weiteren Synthesen wurde daher mit 1 mg/mL PAA je Reaktionsansatz weitergearbeitet und der Einfluss der Ln^{3+} -Menge und das Verhältnis von Ethylenglykol zu Wasser in der Reaktionsmischung auf die hydrodynamische Größe der Nanokristalle und auf die Ausbeute untersucht.

2.2.2 Variation der Ln^{3+} -Menge

Zur Evaluierung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden unterschiedliche Mengen der Lanthanoide in der Reaktionsmischung bei verschiedenen Ethylenglykol(EG)-Wasser-Verhältnissen untersucht. Die Synthese in einer Ethylenglykol-Wasser-Mischung zeichnet sich im Vergleich zu reinen Wasser durch einen leicht erhöhten Siedepunkt aus (Siedepunkt EG-Wasser=1,5 : 3,5 bzw. 30 Vol-% EG ca. 105°C). Ethylenglykol besitzt folglich nicht nur positive thermische Eigenschaften, wie einen hohen Siedepunkt und eine Stabilität über einen großen Temperaturbereich hinweg, es dient gleichzeitig als hervorragendes Lösungsmittel für die Edukte aufgrund seiner hohen Dielektrizitätskonstante und wirkt als Stabilisator zur Kontrolle des Partikelwachstums. Ethylenglykol, aber auch andere Polyole, wie Diethylenglykol oder Glycerol, wurden bereits mehrfach erfolgreich für die Synthesen nanostrukturierter Metalle und Metalloxide eingesetzt. [150] Gemäß der Publikation von Nunez *et al.* [74] wurde mit einer Ln^{3+} -Konzentration von 0,020 mol/L in einem EG-Wasser-Gemisch von 3,5 : 1,5 gearbeitet. Mit diesen Reaktionsparametern wurden Nanokristalle mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 63 nm synthetisiert, jedoch sollte die Ausbeute der Nanokristalle gesteigert werden. Die eingesetzten Mengen der seltenen Erden wurden daher im Bereich zwischen 0,02-0,08 mol/L je Reaktionsansatz

erhöht, um maximale Ausbeuten bei möglichst kleiner Partikelgröße zu erhalten. Die Grafik in Abbildung 25 zeigt die Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers und der Ausbeute von der Ln^{3+} -Konzentration in den verschiedenen EG-Wasser-Gemischen. Eine tabellarische Übersicht aller analysierten Parameter befindet sich im Anhang, Kapitel 4.2.3 (Tabelle 14).

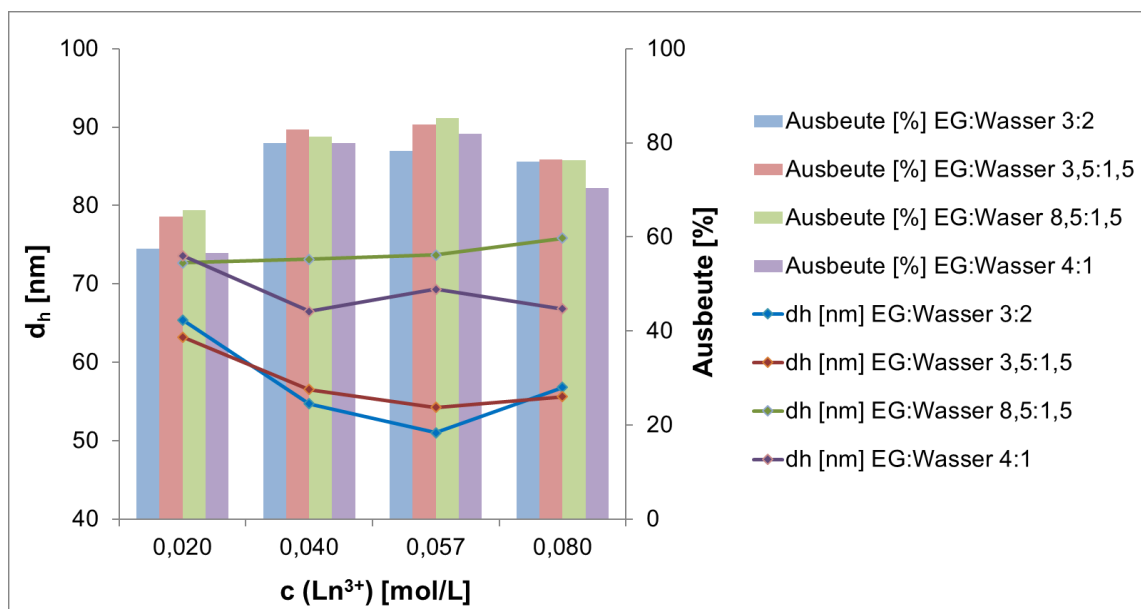


Abbildung 25: Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers und der Ausbeute von der Ln^{3+} -Konzentration in verschiedenen EG-Wasser-Mischungen zur Darstellung $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ -Nanokristallen über eine Solvothermal-Synthese.

Die Grafik in Abbildung 25 verdeutlicht die Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers und der Ausbeute der Nanokristalle gegenüber der eingesetzten Ln^{3+} -Konzentration und dem gewählten EG-Wasser-Verhältnis in der Reaktionsmischung. In den EG-Wasser-Verhältnissen 8,5:1,5 und 4:1 wurden über den gesamten Konzentrationsbereich der seltenen Erden hydrodynamische Durchmesser der Nanokristalle im Bereich von 66-76 nm erhalten. In den EG-Wasser-Verhältnissen von 3,5:1,5 und 3:2 konnten in Abhängigkeit von der Ln^{3+} -Menge um ca. 15 nm geringere Partikelgrößen im Bereich von 51-65 nm erzielt werden. Für die Zetapotentiale wurden durchweg Werte kleiner -40 mV bestimmt, was für stabile Dispersion bei allen Ansätzen spricht. Allgemein resultierte mit steigendem Anteil Ethylenglykol im Dispergiermedium ein Anstieg der Partikelgröße. Die kleinsten Nanokristalle wurden mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 55 nm in einem EG-Wasser-Verhältnis von 3,5 : 1,5 bzw. 3 : 2 erhalten. Die relative Ausbeute der Nanokristalle stieg bis zu einer Ln^{3+} -Menge von 0,057 mol/L im Reaktionsansatz auf 85 % an, bis sie bei 0,08 mol/L

Ln^{3+} schließlich wieder leicht abnahm. Unter Berücksichtigung von hydrodynamischem Durchmesser und Ausbeute wurden die besten Ergebnisse bei einer Ln^{3+} -Konzentration von 0,040 mol/L bzw. 0,057 mol/L in einem EG-Wasser-Verhältnis von 3:2 bzw. 3,5:1,5 erzielt. Bei diesen Reaktionsbedingungen wurden Nanokristalle mit hydrodynamischen Durchmessern zwischen mit 51-57 nm bei Ausbeuten von 78-84 % erhalten.

2.2.3 Untersuchung der Reproduzierbarkeit

Mit einer Ln^{3+} -Konzentration von 0,040 mol/L in der Reaktionsmischung erfolgten im EG-Wasser-Gemisch von 3,5:1,5 für die Dotierungselemente Europium und Terbium Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Solvothermal-Synthese. Hierfür wurden jeweils drei Solvothermal-Synthesen für jede Dotierung im Bereich von 5 %-60 % durchgeführt. Abbildung 26 zeigt die grafische Auswertung der Ergebnisse für das Dotierungselement Europium und Abbildung 27 für das Dotierungselement Terbium. Beide Grafiken verdeutlichen die hohe Reproduzierbarkeit der Synthese hinsichtlich hydrodynamischem Durchmesser und experimentell ermitteltem Dotierungsgrad. Während bei der Eu^{3+} -Dotierung eine leichte Abnahme der hydrodynamischen Größe (STAW 2,33) über den Dotierungsbereich zu beobachten war, zeigte die Tb^{3+} -Dotierung einen leichten Aufwärtstrend des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (STAW 2,08). Bei der Eu^{3+} -Dotierung lagen die experimentell ermittelten Dotierungsgrade bis 15 % maximal 1,3 % über dem theoretischen Dotierungsgrad. Von 20 % bis 60 % Europium wurden im Vergleich zur Theorie zunehmend geringere Dotierungsgrade bestimmt. Bei 60 % Europium war die Abweichung vom theoretischen Dotierungsgrad mit 2,8 % am größten. Im Falle der Tb^{3+} -Dotierung wurden durchweg geringere Dotierungsgrade bestimmt als theoretisch berechnet. Bei der 15 % Tb^{3+} -Dotierung war die Abweichung mit 2,0 % am größten. Beide Grafiken verdeutlichen jedoch, dass sich alle Dotierungen reproduzierbar und klar voneinander unterscheidbar herstellen ließen. Nach erfolgreicher Konjugation der Nanokristalle an Antikörper eignen sie sich folglich prinzipiell als Markierungsreagenz für Multiplex-Anwendungen mit der ICP-MS, da die verschiedenen Dotierungsgrade in der ICP-MS klar voneinander unterscheidbar sind. Eine tabellarische Übersicht der Analysenwerte für alle Synthesen befindet sich im Anhang, Kapitel 4.2.3.

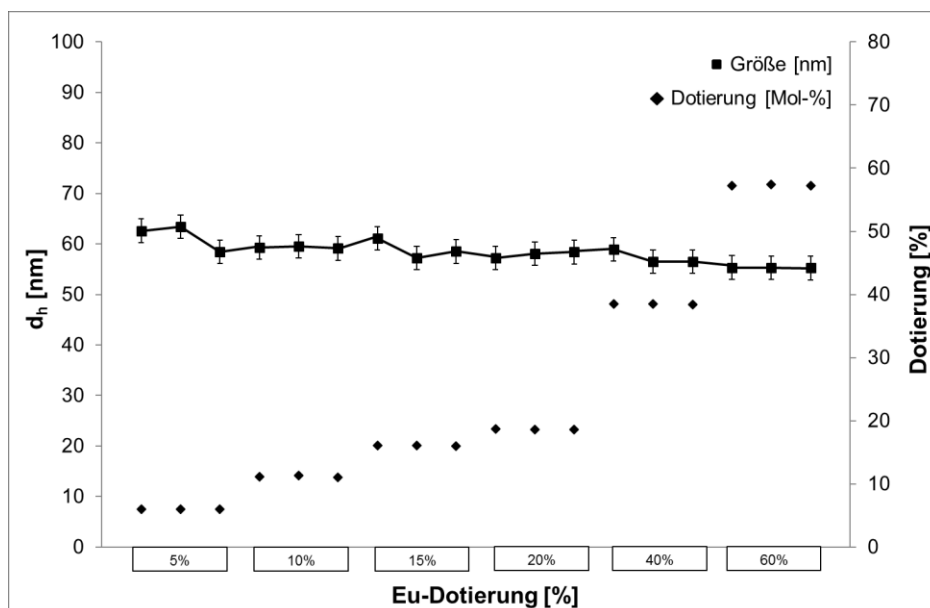


Abbildung 26: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Solvothermal-Synthese zur Darstellung von Eu:GdVO₄-PAA Nanokristallen über Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser bei verschiedenen Eu³⁺-Dotierungen im Bereich von 5 %-60 %. Alle Synthesen fanden in EG : Wasser-Mischungen von 3,5 : 1,5 mit Ln³⁺=0,040 mol/L und PAA=1 mg/mL statt.

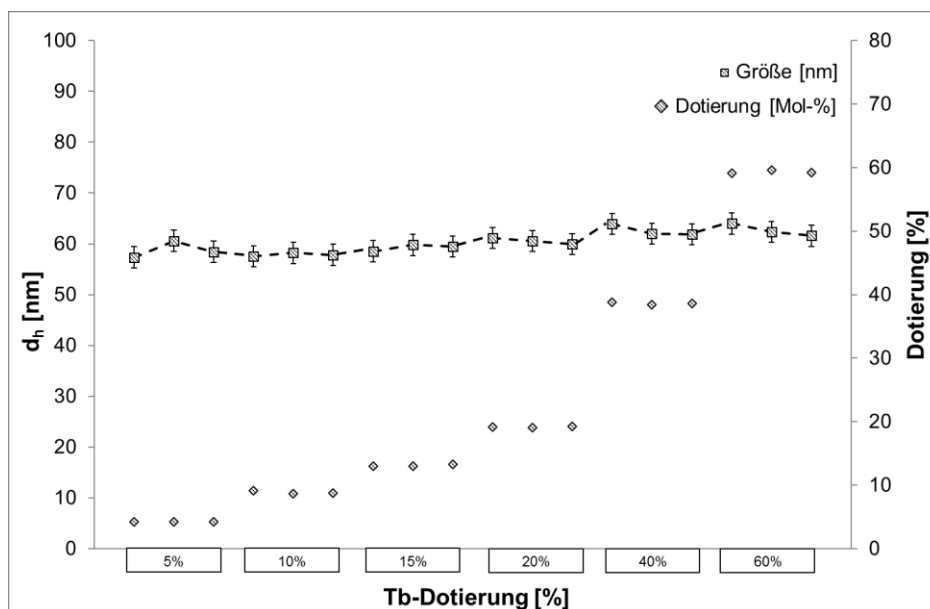


Abbildung 27: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Solvothermal-Synthese zur Darstellung von Tb:GdVO₄-PAA Nanokristallen über Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser bei verschiedenen Tb³⁺-Dotierungen im Bereich von 5 %-60 %. Alle Synthesen fanden in EG : Wasser-Mischungen von 3,5 : 1,5 mit Ln³⁺=0,040 mol/L und PAA=1 mg/mL statt.

Neben der Dotierung der GdVO₄-Nanokristalle mit einem Dotierungselement verlief die simultane Dotierung mit Eu³⁺ und Tb³⁺ ebenfalls erfolgreich. Für Nanokristalle vom Typ Eu_{0,05}Tb_{0,05}Gd_{0,90}VO₄-PAA wurde mit der ICP-MS ein experimenteller Dotierungsgrad für Eu³⁺ von 4,8 % und für Tb³⁺ von 4,3 % bestimmt. Der praktisch ermittelte Dotierungsgrad für Nanokristalle vom Typ Eu_{0,05}Tb_{0,10}Gd_{0,85}VO₄-PAA betrug für Eu³⁺=4,5 % und für Tb³⁺=9,3 %, und für Eu_{0,10}Tb_{0,10}Gd_{0,80}VO₄-PAA-Nanokristalle wurden für Eu³⁺=9,3 % und für Tb³⁺=9,5 % bestimmt. Die Dotierung der Nanokristalle mit zwei oder mehr Lanthanoiden würde ihr Spektrum für Multiplexanwendungen in ICP-MS basierten Immunoassays um ein Vielfaches erweitern.

Neben den Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Solvothermal-Synthese im 5 mL Batch wurde ebenfalls überprüft, ob ein Up-Scaling auf einen 50 mL Batch durchgeführt werden kann. Um in einem 50 mL Batch Nanokristalle mit gleichbleibender hydrodynamischer Größe zu erhalten, musste insbesondere die Rührgeschwindigkeit während der Mischung beider Ausgangslösungen angepasst werden, um eine ähnliche Durchmischung der Reaktanden wie im 5 mL Batch zu gewährleisten. Beide Ausgangslösungen wurden zunächst anstatt über einen 0,2 µm Spritzenfilter über einen 0,2 µm Bottle-Top Filter filtriert. Je 25 mL dieser Ausgangslösungen wurden gleichzeitig in einem 400 mL Becherglas bei 1.200 rpm anstatt bei 800 rpm gemischt. Für die Alterung bei 120°C wurde die Reaktionsmischung zu je 25 mL in 50 mL Falcon-Tubes aufgeteilt. Unter diesen Bedingungen wurde ein erfolgreiches Up-Scaling der Synthese erreicht, bei der Nanokristalle mit hydrodynamischen Durchmesser von 59 nm (PDI=0,086) und einem Zetapotential von -46,2 mV erhalten wurden.

2.2.4 Untersuchung der Partikelstabilität

Zur Beurteilung der Partikelstabilität wurde der hydrodynamische Durchmesser der Nanokristalle vom Typ Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA über einen Zeitraum von sechs Monaten bei Lagerung im Kühlschrank (+8°C) zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Abbildung 28 verdeutlicht den nahezu konstanten hydrodynamischen Durchmesser über den untersuchten Zeitraum. Es wurden folglich kolloidal stabile Nanokristall-Dispersionen erhalten, die mindestens über einen Zeitraum von sechs Monaten stabil in Milli-Q-Wasser gelagert werden konnten.

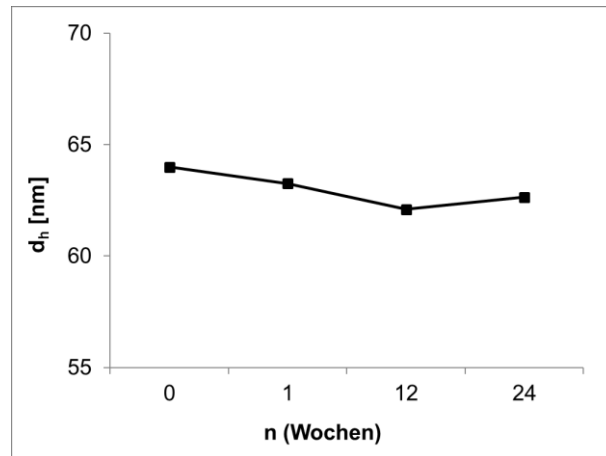


Abbildung 28: Untersuchung der Stabilität von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA Nanokristallen über einen Zeitraum von sechs Monaten nach Synthese in einer EG : Wasser-Mischung von 3,5 : 1,5 mit $\text{Ln}^{3+}=0,057$ mol/L und 1 mg/mL PAA.

2.2.5 Zeitabhängige Synthese

Bei den zeitabhängigen Synthesen wurde der Einfluss der Zeit für die Alterung bei 120°C auf die Ausbeute und den hydrodynamischen Durchmesser untersucht. Die Grafik in Abbildung 29 verdeutlicht, dass nach dreistündiger Alterung die maximale Ausbeute der Nanokristalle erhalten wurde, wobei sich die Ausbeute und der hydrodynamische Durchmesser bereits nach einer Stunde nicht mehr signifikant veränderte. Mit der gewählten dreistündigen Alterung kann man dementsprechend davon ausgehen, dass die Bildung des Präzipitates vollständig abgeschlossen war.

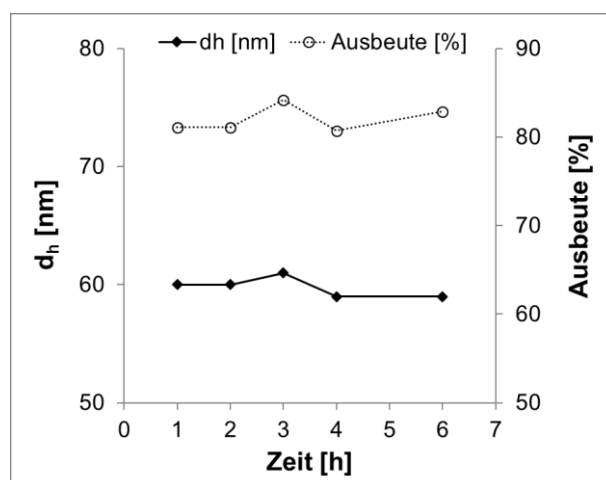


Abbildung 29: Abhängigkeit der Ausbeute und des hydrodynamischen Durchmessers von der Zeit der Alterung (1-6 Stunden) der Reaktionsmischung bei 120°C zur Darstellung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristallen über eine Solvothermal-Synthese. Die gezeigten Synthesen fanden in einer EG : Wasser-Mischung von 3,5 : 1,5 mit $\text{Ln}^{3+}=0,040$ mol/L und PAA=1 mg/mL statt.

2.2.6 Formulierung und Sterilisation

Für eine potentielle *in vivo* Anwendung sowie für die Untersuchung des biologischen Verhaltens der Nanokristalle ist es von großer Bedeutung, dass sie unter den gegebenen Versuchsbedingungen stabil sind. Besonders in biologischer Umgebung muss verifiziert werden, dass die Nanokristalle ihre kolloidale Eigenschaft als diskrete Teilchen beibehalten. Kolloide neigen aufgrund ihrer großen Oberflächenenergie zur Agglomeration, die mit einer Verminderung der Oberflächenenergie einhergeht. [132], [151], [152] Das Zetapotential der Nanokristalle ließ für wässrige Systeme auf kolloidal stabile Dispersionen schließen. Die kolloidale Stabilität hängt jedoch ebenso von der Elektrolytkonzentration im Dispergiermedium ab. Je höher die Elektrolytkonzentration und die Ladung der Gegenionen, desto schmaler ist die Grenzschicht um die Nanokristalle und umso leichter können sie sich annähern und agglomerieren. [132], [153] Die Agglomeration der Nanokristalle wird folglich nicht nur durch ihre physikochemischen Eigenschaften beeinflusst, sondern auch durch extrinsische Faktoren, wie der Temperatur, dem pH-Wert, dem osmotischen Druck und die Anwesenheit von Proteinen (Serum) im Dispersionsmedium. [149] Zellkulturmedien weisen stets eine hohe Elektrolytkonzentration auf, da sie erhebliche Mengen an Salzen, Zuckern, Aminosäuren und Proteinen enthalten, die zu einer Agglomeration der Nanopartikel führen können. [154], [155] Zellkulturmedien wird außerdem fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) zugesetzt, das zahlreiche Bestandteile für Wachstum und Proliferation der Zellen enthält. FCS besteht aus über 5.000 Komponenten, unter anderem Serumproteinen, Hormonen, extrazellulären Enzymen und Fettsäuren. [156] Beim direkten Mischen der wässrigen Nanokristall-Dispersionen mit DMEM-Zellkulturmedium zeigte sich, dass die Nanokristalle sofort agglomerierten und als Niederschlag ausfielen. Bei einer *in vivo* Anwendung werden aggregierte Nanopartikel rasch vom retikulohistiozytären System erkannt und über Leber und Milz vom Organismus beseitigt. Die Nanopartikel reichern sich unter Umständen nicht am gewünschten Zielort an. Darüber hinaus können Agglomerate im Blutkreislauf schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen wie den Verschluss von Blut- oder Lymphgefäßen. [149] Um die Stabilität der Nanokristalle in physiologischer Umgebung zu gewährleisten, wurden verschiedene Formulierungsmedien aus nicht-ionischen Tensiden und D-Mannitol untersucht. Die Formulierung umfasste neben der Anpassung der Osmolalität (250-350 mosmol/kg), auch die Adjustierung des pH-Wertes in den physiologischen Bereich (pH 7,35-7,45). Für

die Untersuchung einer geeigneten Formulierung wurden $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle in der Formulierung auf eine Gd^{3+} -Konzentration von 25 mM eingestellt. Diese Gd^{3+} -Konzentration wurde gewählt, da sie auch bei den präklinischen niedermolekularen Kontrastmitteln angewendet wird. Für die Herstellung der Formulierungen wurde zu den dialysierten, wässrigen Nanokristall-Dispersionen ($d_h=61$ nm) D-Mannitol bzw. eine Mischung aus D-Mannitol mit den nicht-ionischen Tensiden Pluronic® F 68 oder Kollidon® 17 PF gegeben und der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf physiologische Bedingungen eingestellt. Unter dem Handelsname Pluronic® werden sog. Poloxamere vertrieben, bei denen es sich um Blockcopolymere aus Ethylenoxid und Propylenoxid handelt, die als Dispergiermedium für chemisch-technische oder biologische Anwendungen genutzt werden. Kollidon® 17 PF, chemisch Polyvinylpyrrolidon, ist ein Formulierungsmedium, was speziell bei Injektionspräparaten Anwendung findet. Die Konzentration an D-Mannitol wurde in allen Formulierungen auf 300 mM eingestellt, um isoosmolare Bedingungen zu erreichen. Für die Tenside wurden im Formulierungsmedium Massenanteile im Bereich von 0,5-2 % w/w untersucht. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der hydrodynamischen Durchmesser, der Osmolaritäten und der pH-Werte in allen Formulierungen. Bei der Verwendung von Pluronic® F 68 wurde eine geringfügige Zunahme der hydrodynamischen Größe von 61 nm auf bis zu 65 nm mit steigendem Massenanteil Pluronic® F 68 beobachtet. Bei der Verwendung von Kollidon® 17 PF resultierte bereits ab 0,5 % w/w in der Formulierung eine Zunahme der Größe auf 74 nm, die bei 1,5 % Kollidon® 17 PF bis 107 nm weiter anstieg. Bei der Formulierung, bei der ausschließlich D-Mannitol verwendet wurde, blieb der hydrodynamische Durchmesser in der Formulierung mit 61,0 nm konstant.

Tabelle 2: Hydrodynamischer Durchmesser, Osmolalität und pH-Wert nach Formulierung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen mit $c(\text{Gd}^{3+})=25$ mM in verschiedenen Formulierungsmedien.

Formulierungsmedium	d_h [nm]	mosm/kg	pH
D-Mannitol	61	288	7,4
D-Mannitol + 1 % Pluronic® F 68	62	280	7,5
D-Mannitol + 2 % Pluronic® F 68	65	298	7,4
D-Mannitol + 0,5 % Kollidon® 17 PF	74	275	7,4
D-Mannitol + 1,5 % Kollidon® 17 PF	107	295	7,4

Um die Stabilität der Formulierungen im DMEM Zellkulturmedium zu untersuchen, wurden alle Formulierungen im Verhältnis 1:10 bzw. 1:5 mit 37°C temperierten Kulturmedium gemischt. Die Mischungsverhältnisse wurden gewählt, weil die Nanokristalle in höchster Konzentration in den Zellversuchen in einer 1:10 Verdünnung im Kulturmedium vorlagen. Zusätzlich wurde die 1:5 Verdünnung untersucht, um zu überprüfen, ob die Nanokristalle auch in höherer Konzentration im Kulturmedium stabil sind. Zur Überprüfung der Partikelstabilität wurden alle Mischungen bei 37°C gelagert und der hydrodynamische Durchmesser erneut zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 24 h, 72 h, 216 h) bestimmt. Bei allen Formulierungen und beiden Mischungsverhältnissen war eine Zunahme der hydrodynamischen Durchmesser im Zellkulturmedium zu beobachten, der jedoch im weiteren Verlauf bis zu 9 Tage (216 h) weitestgehend konstant blieb (Abbildung 30).

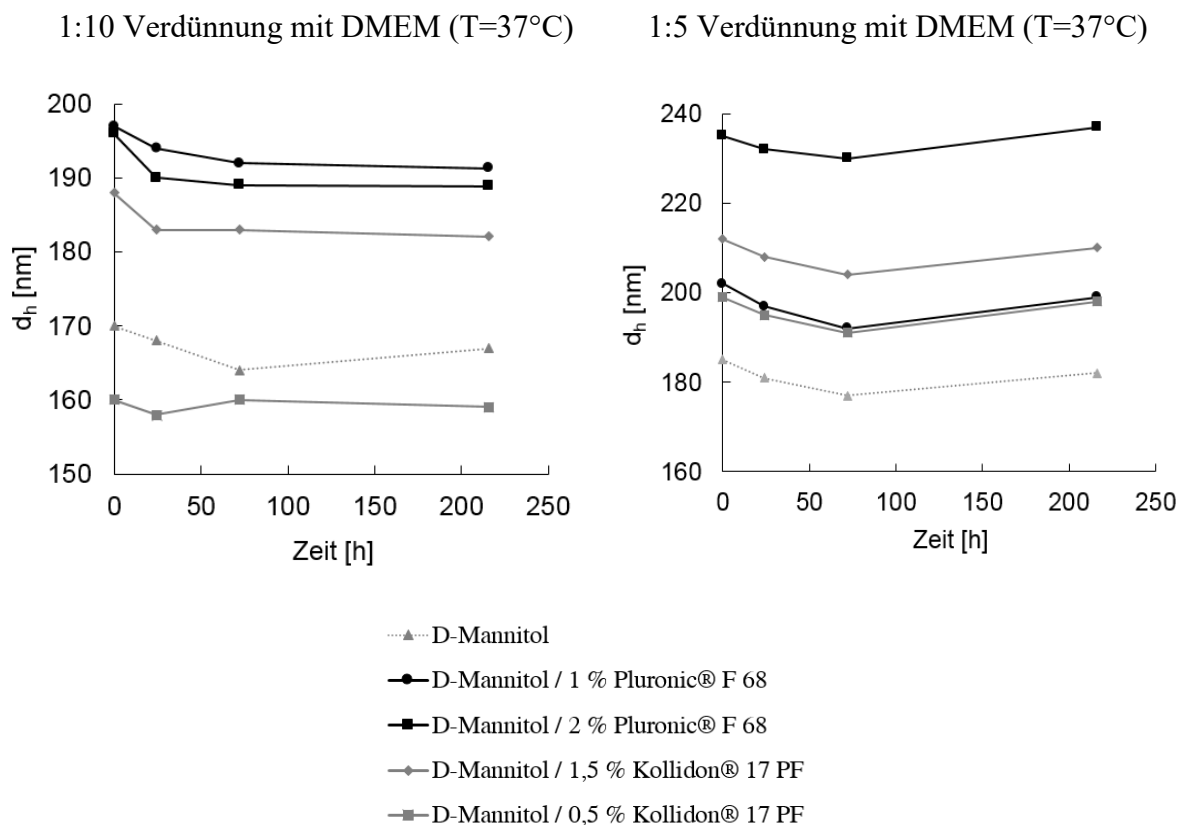


Abbildung 30: Untersuchung der Stabilität von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen in unterschiedlichen Formulierungsmedien nach 1:10 und 1:5 Mischung mit DMEM Zellkulturmedium bei 37°C.

Nach 1:10 Mischung der Formulierungen mit DMEM resultierte ein maximaler Anstieg der hydrodynamischen Durchmesser auf bis zu 197 nm nach Formulierung der Nanokristalle mit D-Mannitol und Pluronic®. Nach der Formulierung mit D-Mannitol stieg die Partikelgröße mit 160 nm am geringsten an. Bei der 1:5 Verdünnung mit DMEM

wurde eine stärkere Zunahme der hydrodynamischen Größe als bei der 1:10 Verdünnung beobachtet. Für die Formulierung mit D-Mannitol und 2 % Pluronic[®] stieg die Größe in der 1:5 Verdünnung auf bis zu 235 nm an. Die geringste Zunahme wurde bei der 1:5 Verdünnung ebenfalls nach Formulierung mit D-Mannitol beobachtet, bei der die hydrodynamische Größe auf 185 nm anstieg. Eine Zunahme der Partikelgrößen konnte aufgrund der hohen Elektrolyt- und Proteinkonzentration im Kulturmedium nicht verhindert werden. Die Nanokristalle lagen im Kulturmedium jedoch mit akzeptabler Größe vor, um vorrangig über die Clathrin-vermittelte Endozytose von den Zellen aufgenommen zu werden. Die Formulierungsversuche zeigten, dass sich D-Mannitol sowie ein Gemisch aus D-Mannitol mit geringen Mengen der nicht-ionischen Tenside für die Formulierung der Nanokristalle eigneten. Da die Zugabe der Tenside jedoch keine entscheidenden Vorteile lieferte, erfolgte aus Gründen der Praktikabilität die Formulierung der Nanokristalle für die zellbiologischen Experimente ausschließlich mit D-Mannitol. Für eine potentielle *in vivo* Anwendung müssen die Nanokristalle jedoch nicht nur in einer geeigneten Formulierung vorliegen, sie müssen bei unveränderter Partikelgröße gleichermaßen steril sein, das heißt frei von vermehrungsfähigen Mikroorganismen (DIN 58900, Teil 1 Sterilisation, allgemeine Grundlagen und Begriffe, vom April 1986. [157] Für die Herstellung eines sterilen Produktes kann die Sterilisation entweder im Endbehältnis erfolgen oder über eine Herstellung unter aseptischen Bedingungen. Bei der Herstellung steriler Arzneimittel fordert das Europäische Arzneibuch klare Priorität für ein Verfahren, bei dem die Sterilisation im Endbehältnis erfolgt (Ph.Eur.6 Grundwerk 2008 Teil 5.1.1). Weitere Sterilisationsverfahren, die vor allem bei Medizinprodukten angewendet werden, die in Kontakt mit Blut kommen, sind u.a. die Gassterilisation (mit Ethylenoxid oder Formaldehyd), die Plasmasterilisation (mit H₂O₂) oder die thermische Sterilisation mit feuchter (Autoklavieren) bzw. trockener Luft. [157] Für thermolabile Substanzen und für Gase wird häufig die Sterilfiltration eingesetzt. Hierfür werden üblicherweise 0,22 µm-Filter angewendet, um Mikroorganismen aus einem Produkt abzutrennen. Zur Abscheidung von Viren sind Filter mit geringerer Porengröße von 0,02-0,05 µm nötig. Zur Sicherheit wird die Sterilfiltration meist mit anderen Methoden kombiniert. [158] Die Sterilfiltration mit einem 0,22 µm Filter wurde in dieser Arbeit für alle Proben angewendet, mit denen in der Zellkultur gearbeitet wurde. Für eine potentielle *in vivo* Anwendung der Nanokristalle wurde die Sterilisation im Endbehältnis (Glasvials) durch Autoklavieren untersucht und der Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser bei allen Formulierungen analysiert. Für ein

präklinisches Kontrastmittel gelten zwar nicht die gleichen regulatorischen Anforderungen wie für ein Medizinprodukt oder für ein Arzneimittel, dennoch wurde das Autoklavieren im Endbehältnis favorisiert, da es nicht nur ein kostengünstiges, sondern auch ein effizientes Sterilisationsverfahren ist. Beim Autoklavieren wird gesättigter Wasserdampf in einem Druckkessel (Autoklaven) auf eine Temperatur von mehr als 100°C gebracht. Die Einwirkzeit der Proben im Autoklaven betrug bei 2 bar, bei der sich der Wasserdampf auf 121°C erhitzte, 10-20 min. Durch die Hitze im Autoklaven kommt es zur irreversiblen Denaturierung von Proteinen und damit zur Abtötung der Mikroorganismen. [159] Bei allen Formulierungen wurde nach dem Autoklavieren eine geringe bis mäßige Abnahme des Partikeldurchmessers beobachtet (Abbildung 31). Bei den Formulierungen mit Kollidon® 17 PF war die Abnahme der Partikelgröße um 24 nm (1,5 % Kollidon® 17 PF) bzw. 7 nm (0,5 % Kollidon® 17 PF) am größten. Bei allen weiteren Formulierungen reduzierte sich der Partikeldurchmesser um maximal 5 nm. Im weiteren Verlauf blieben die hydrodynamischen Partikeldurchmesser bei allen Formulierungen, außer der mit 2 % Pluronic®, über einen Zeitraum von mindestens 12 Wochen nahezu konstant.

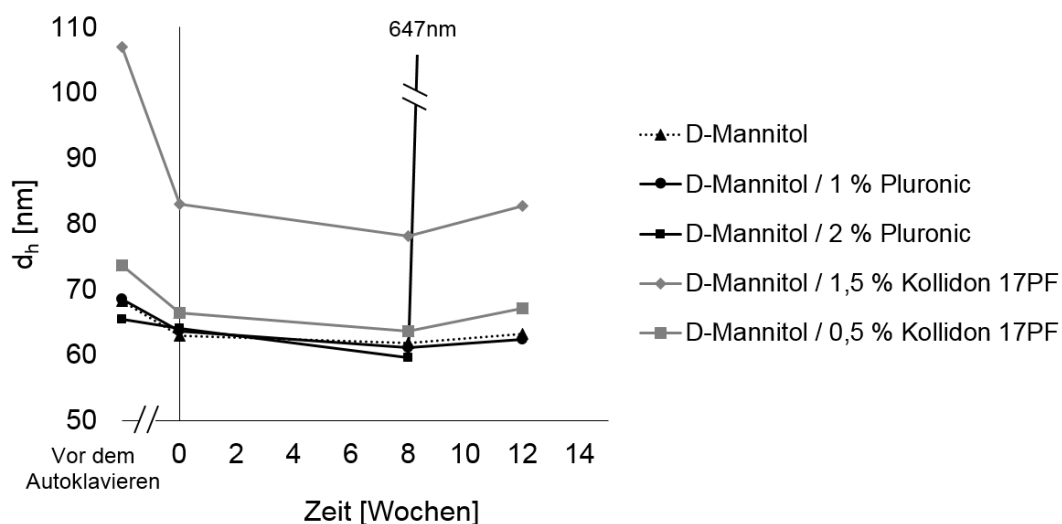


Abbildung 31: Untersuchung der Partikelstabilität von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen in unterschiedlichen Formulierungsmedien nach dem Autoklavieren durch Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers über einen Zeitraum von 12 Wochen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur.

Nach Formulierung der Nanokristalle mit D-Mannitol und 2 % Pluronic® F 68 war nach zwölf Wochen Lagerung ein starker Anstieg der Partikelgröße auf 650 nm zu beobachten. Die Nanokristalle waren folglich nicht mehr stabil und fielen aus. Die Untersuchungen der Partikelstabilität nach Formulierung mit anschließender

Autoklavierung bestätigte, dass die Verwendung von D-Mannitol ausreichend ist, um stabile Nanokristall-Dispersionen für einen Zeitraum der Lagerung von mindestens 3 Monaten zu gewährleisten. Nach Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen für die Synthese der Markierungsreagenzien in den vorangegangenen Kapiteln, sowie der Formulierung und Sterilisierung der Nanokristalle im vorliegenden Kapitel, stellt das nachfolgende Kapitel die umfassende Charakterisierung der Reagenzien mit verschiedenen analytischen Methoden vor.

2.3 Charakterisierung der Reagenzien

2.3.1 Infrarotspektroskopie

Mit Hilfe der Infrarot(IR)spektroskopie werden insbesondere von organischen Molekülen charakteristische Absorptionsbanden erhalten, die Aufschluss darüber geben, bei welchen Wellenlängen ein Molekül Strahlungsenergie aufnimmt. Aus IR-Spektren lassen sich somit funktionelle Gruppen identifizieren, wobei Banden $<1.500\text{ cm}^{-1}$ spezifisch für das jeweilige Molekül sind und den sog. „fingerprint“-Bereich kennzeichnen. Banden $>1.500\text{ cm}^{-1}$ können hingegen funktionellen Gruppen zugeordnet werden. [91] Um das Vorhandensein der funktionellen Polyacrylsäure-Hülle auf den Nanokristallen nachzuweisen, wurden daher Synthesen mit und ohne Zugabe von Polyacrylsäure durchgeführt. Von den gefriergetrockneten Nanokristallen sowie von reiner Polyacrylsäure wurden IR-Spektren aufgenommen, um über einen Vergleich des Absorptionsverhaltens Aussagen über deren Oberflächenfunktionalisierung treffen zu können. Abbildung 32 zeigt eine Übersicht der betreffenden IR-Spektren.

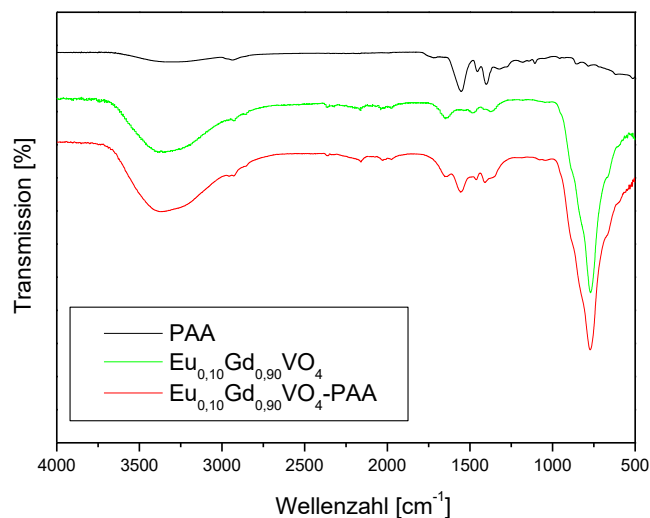


Abbildung 32: FTIR-Spektren von Polyacrylsäure (PAA), $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ Nanokristallen und $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA Nanokristallen. Die Bande bei 1.550 cm^{-1} im Spektrum $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA Nanokristalle zeigt das Vorhandensein der funktionellen Polyacrylsäure-Hülle.

Die IR-Spektren der Nanokristalle zeigen bei ca. 800 cm^{-1} jeweils starke Absorptionsbanden der Gitterschwingungen, die der V–O bzw. der Gd(Eu)–O Valenzschwingung zuzuordnen sind. [160] Die breite Bande bei ca. 3.400 cm^{-1} resultiert aus der O–H Valenzschwingung von adsorbiertem Wasser. [74], [160], [161] Im IR-Spektrum der PAA-funktionalisierten Nanokristalle und der reinen Polyacrylsäure sind bei ca. 1.550 cm^{-1} die charakteristischen Absorptionsbanden der (C=O)-Valenzschwingung erkennbar. Diese Valenzschwingungen werden auch Streckschwingungen genannt, wobei sich die Bindungslängen durch die aufgenommene Infrarotstrahlung ändern. [91], [162] Da die Carbonylbanden in beiden Spektren deckungsgleich sind, konnte das Vorhandensein der polymeren Hülle auf den Nanokristallen und damit die Polyacrylsäure eindeutig nachgewiesen werden. Die Lage der Carbonylbande lässt zudem Rückschlüsse auf den Doppelbindungscharakter der Carbonyl-Gruppen zu. Je höher der Doppelbindungscharakter der Carbonyl-Bindung, d.h. je stärker elektronenziehend eine Gruppe X im System R–CO–X ist, umso höher liegt die Wellenzahl der Bande. Elektronenziehende Substituenten verschieben die Bande daher in Richtung höherer Wellenzahlen und elektronenliefernde Substituenten in Richtung niedrigerer Wellenzahlen. [91] Die Lage der Bande zwischen $1.550\text{ -}1610\text{ cm}^{-1}$ lässt folglich auf das Vorhandensein von Carboxylat-Ionen schließen,

bei denen die negative Ladung gleichmäßig über beide Sauerstoffatome der Carboxygruppe delokalisiert vorliegt.

2.3.2 Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie und Röntgenfluoreszenzanalyse

Die Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie (auch WAXD, engl. *wide-angle X-ray diffraction*) ist eine Standardmethode zur Strukturaufklärung von Kristallen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit den Elektronen eines Kristalls, das als Beugungsgitter wirkt. Die Auswertung der Beugungserscheinungen ermöglicht Rückschlüsse auf die Anordnung der Atome im Kristall. [163], [164] Röntgenbeugungs-Untersuchungen werden routinemäßig an Pulvern durchgeführt. Es war daher besonders wichtig, dass die Proben komplett homogenisiert und pulverisiert vorlagen. Geeignete Pulver wurden nach Dialyse der Nanokristall-Dispersionen gegen Milli-Q-Wasser und anschließender Gefriertrocknung erhalten. Die Messparameter für die Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie sind im Anhang, Kapitel 4.1.7, zu finden. Abbildung 33 zeigt die entsprechenden Röntgenpulverdiffraktogramme von Ln:GdVO₄-PAA-Nanokristallen mit Europium und Terbium mit den Dotierungsgraden 5%, 10% und 15%.

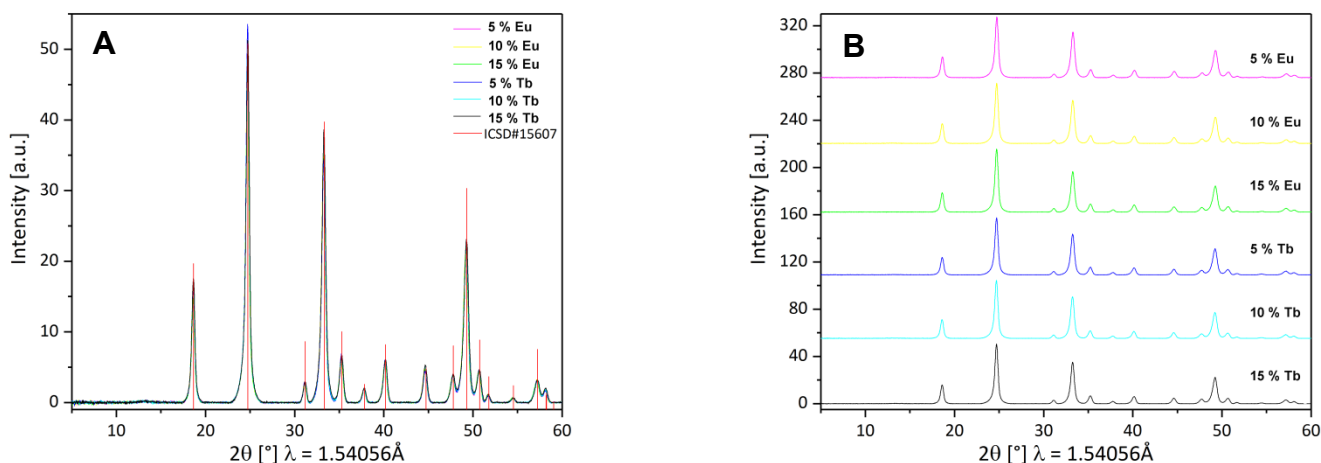


Abbildung 33: Röntgenpulverdiffraktogramme von Ln:GdVO₄-PAA-Nanokristallen mit 5%, 10% und 15% Europium- bzw. 5%, 10% und 15% Terbium-Dotierung sowie der Referenzdaten für tetragonales GdVO₄ vom ICSD File #15607. A: Überlagerte Röntgendiffraktogramme. B: Einzelaufnahmen der Röntgendiffraktogramme. Die untersuchten Nanokristalle wurden im EG-Wasser-Verhältnis von 3,5:1,5 mit $c(\text{Ln}^{3+})=0,057$ mol/L und 1 mg/mL PAA synthetisiert.

Zur Phasenidentifizierung wurden die gemessenen Diffraktogramme mit der Datenbank ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) abgeglichen. Die Reflexe in Abbildung 33 zeigen eindeutig, dass sich die synthetisierten Ln:GdVO₄-PAA-Nanokristalle der Phase Gadoliniumvanadiumoxid (ICSD#15607) zuordnen lassen. GdVO₄ kann in zwei verschiedenen Strukturen kristallisieren, im tetragonalen Kristallsystem (Zirkons-Type, ZrSiO₄) oder im monoklinen Kristallsystem (Monazits-Type, CePO₄). [74] Bei der Analyse zeigte sich, dass die Nanokristalle im tetragonalen Kristallsystem mit den Gitterparametern $a=7,218\text{\AA}$ und $c=6,348\text{\AA}$ kristallisieren und die Raumgruppe $I4_1/amd$ (141) aufweisen, welche kristallographische Informationen über die räumliche Anordnung des Kristalls liefern. Generell sei darauf hingewiesen, dass je kleiner die Kristalle werden, umso breiter werden die beobachteten Reflexe. Neben der Bestimmung der Kristallstruktur bietet die Röntgendiffraktometrie zudem die Möglichkeit, die Kristallitgrößen nach der Scherrer-Methode über die Bestimmung der Reflexverbreiterung abzuschätzen (siehe Kapitel 4.1.7, Formel 9). Dabei wurden nahezu identische Kristallitgrößen mit $20,25\pm 0,084\text{ nm}$ für beide Dotierungselemente mit unterschiedlichen Dotierungsgraden bestimmt, was die gute Reproduzierbarkeit der Synthese verdeutlicht. Die Scherrer-Methode lieferte jedoch nur eine grobe Näherung für die Kristallitgröße, die eindeutige Bestimmung erfolgte mit der Transmissionselektronenmikroskopie (siehe folgendes Kapitel 2.3.3). Zusätzlich wurde untersucht, ob mit der Röntgenbeugung auch der Dotierungsgrad bestimmt werden kann. Beim Intensitätsvergleich der intensivsten Reflexe im Diffraktogramm verschwand der Intensitätsunterschied der nahestehenden Elemente jedoch nahezu im Rauschen der Methode. Von den Nanokristallen mit 5 %, 10 % und 15 % Terbium-Dotierung wurde daher eine Röntgenfluoreszenzanalyse (siehe Anhang, Kapitel 4.1.8) durchgeführt, um zu zeigen, dass die verschiedenen Dotierungsgrade nach Anregung mit Röntgenstrahlung unterscheidbar sind. Die erhaltenen Intensitäten (kcps) nach der Röntgenfluoreszenzanalyse sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Röntgenfluoreszenzanalyse von Tb:GdVO₄-PAA Nanokristallen mit 5 %, 10 % und 15 % Terbium-Dotierung.

Dotierung	5 % Tb	10 % Tb	15 % Tb
Intensität [kcps]	14.35	29.51	51.64

Zunächst bestätigte die Röntgenfluoreszenzanalyse das eindeutige Vorhandensein von Terbium in den Nanokristallen. Durch die starke Röntgenstrahlung der Fluoreszenz-Methode (60 kV/66 mA) haben sich allerdings alle Proben schon nach 15 s Bestrahlungszeit bräunlich verfärbt, was auf Veränderungen der Polyacrylsäure zurückzuführen war. Da kein geeigneter Terbium- und Gadolinium-Standard bei der Röntgenfluoreszenzanalyse zum Einsatz kam, war mit den ermittelten Intensitäten keine Quantifizierung der Terbium-Gehalte möglich. Das Verhältnis der gemessenen Intensitäten von ca. 1:2:3 stimmte jedoch nahezu mit dem Verhältnis der theoretischen Tb³⁺-Dotierungsgrade von 5 %, 10 % und 15 % überein. Würde man die Röntgenfluoreszenzanalyse standardmäßig zur quantitativen Elementbestimmung durchführen, wäre ein Aufschluss der Proben vor der Analyse nicht zwingend erforderlich, was die Probenvorbereitung und die Auswertung deutlich verkürzen würde. [165] Da jedoch während der Anfertigung dieser Arbeit die Elementanalytik mit der ICP-MS dauerhaft zur Verfügung stand, erfolgten die Gehaltsbestimmungen standardmäßig mit dieser Methode.

2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Für eine direkte Abbildung der Nanokristalle und zur Bestimmung der Partikelgröße erfolgten Aufnahmen mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die Probenvorbereitung und die Betriebsparameter für die Transmissionselektronenmikroskopie sind im Anhang, Kapitel 4.1.9, beschrieben. Abbildung 34 zeigt die TEM-Aufnahmen von Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristallen in steigender Vergrößerung von A nach C. Die rechte Aufnahme lässt in der höchsten Vergrößerung die Gitternetzlinien der Nanokristalle erkennen, was für eine gute Kristallinität spricht.

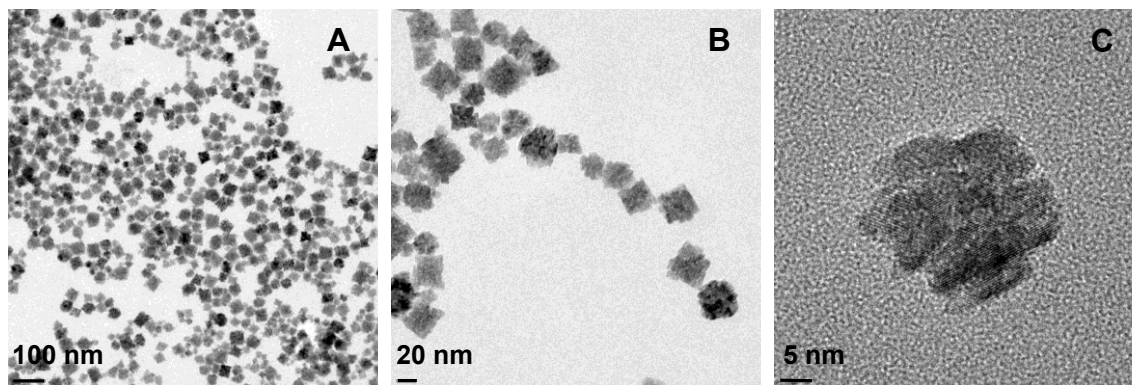


Abbildung 34: TEM-Aufnahmen von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristallen mit steigender Vergrößerung von A nach C.

Bei den TEM-Aufnahmen ist zu beachten, dass nur die Nanokristalle und nicht die Polyacrylsäure-Hülle abgebildet wurde. Atome mit geringer Ordnungszahl (z.B. H, O, C) streuen die Elektronen nur gering und erzeugen einen schwachen Kontrast. Bei höherer Ordnungszahl, wie z.B. bei Eu, Tb oder Gd, können mehr Elektronen gestreut werden und der Kontrast wird verstärkt. Organische Moleküle und biologische Proben müssen daher über eine spezielle Probenpräparation mit Schwermetallen vorbehandelt werden, um den Kontrast zu verstärken. [166], [167]

Um mit der Transmissionselektronenmikroskopie eine Aussage über die Größenverteilung der Nanokristalle treffen zu können, wurden mit dem Programm „Olympus Stream Essential 2.2“ in einer Übersichtsaufnahme die Durchmesser von insgesamt 270 Nanokristallen ausgemessen (Abbildung 35, A). Der mittlere Durchmesser ergibt sich hierbei als arithmetisches Mittel aus kleinstmöglichem Kreis, der an die Kanten angelegt werden kann und dem größtmöglichen Kreis, der die Eckpunkte berührt. Nach Auswertung dieser Daten resultierte ein mittlerer Durchmesser von $36,7 \pm 7,2$ nm. Abbildung 35 zeigt rechts neben dem Übersichtsbild ein Histogramm, das die Häufigkeit einzelner Größenklassen der Nanokristalle zeigt. Die Partikelklasse mit 40 nm tritt mit 66,3 % (126 von 270 Nanokristallen) am häufigsten auf. Nach der Scherrerauswertung (siehe Kapitel 2.3.2) wurde für die Kristallitgröße ein durchschnittlicher Wert von 20,3 nm bestimmt. Dieser Wert konnte nach Auswertung der Partikelgrößen in den TEM-Aufnahmen nicht reproduziert werden. Bei den Nanokristallen handelt es sich folglich, wie bei den meisten anorganischen Feststoffen, um polykristalline Proben, die aus mehreren kleinen Kristalliten mit unterschiedlicher Orientierung aufgebaut sind.

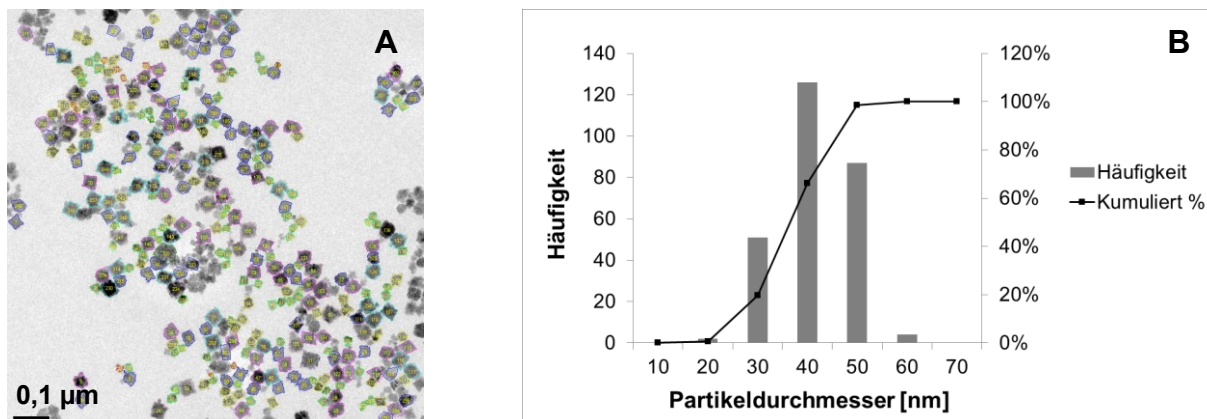


Abbildung 35: A: Auswertung der mittleren Partikeldurchmesser in der TEM-Aufnahme von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen. B: Histogramm der bestimmten Partikeldurchmesser nach Ausmessung von 270 Nanokristallen.

Weitere TEM-Aufnahmen von Nanokristallen mit Tb^{3+} -Dotierung bzw. einer Mischung aus Eu^{3+} - und Tb^{3+} -Dotierung ließen keine Unterschiede in Partikelmorphologie und -größe erkennen und verdeutlichen nochmals die gute Reproduzierbarkeit der Solvothermal-Synthese für verschiedene Dotierungselemente und -gehalte (Abbildung 36).

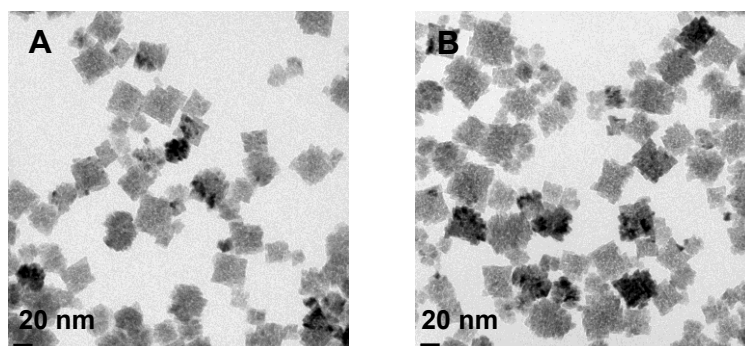


Abbildung 36: A: TEM-Aufnahme von $\text{Eu}_{0,10}\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,80}\text{VO}_4\text{-PAA}$ -Nanokristallen. B: TEM-Aufnahme von $\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ -Nanokristallen.

Zusätzlich zur Abbildung der Nanokristalle wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop Beugungsmuster und energiedispersive Röntgenspektren erzeugt. Für die Erzeugung der Beugungsmuster (Bragg-Beugung) wurden alle Elektronen, welche die Probe unter gleichem Winkel verlassen haben, in einem Punkt fokussiert. [168] Man spricht daher von Feinbereichsbeugung oder engl. *selected area electron diffraction* (SAED). Da es sich um eine polykristalline Probe handelt, zeigten die Beugungsmuster konzentrische Ringe (Abbildung 37, A), einkristalline Proben würden hingegen ein Beugungsmuster erzeugen, das aus einzelnen

Punkten aufgebaut ist. Das zugehörige energiedispersive Röntgenspektrum für Nanokristalle vom Typ $\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ (Abbildung 37, B) zeigt die Signale der enthaltenen Elemente sowie des Kupfers vom TEM-Grid.

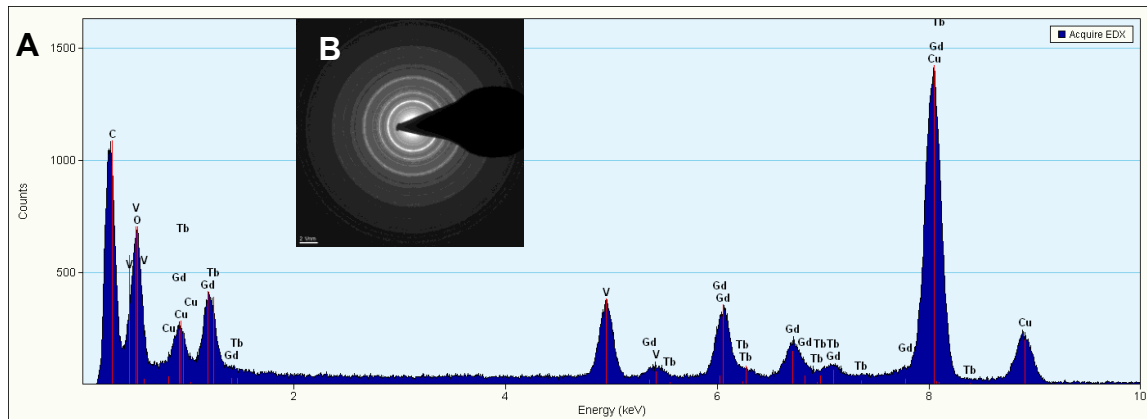


Abbildung 37: Energiedispersives Spektrum (A) und SAED (selected area electron diffraction) Aufnahme (B) für Nanokristalle vom Typ $\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$.

2.3.4 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Untersuchung der Lumineszenz-Eigenschaften der Nanokristalle wurden vor der Fluoreszenzspektroskopie zunächst UV-VIS-Spektren der mit Eu^{3+} - und Tb^{3+} -dotierten $\text{GdVO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle aufgenommen (Abbildung 38).

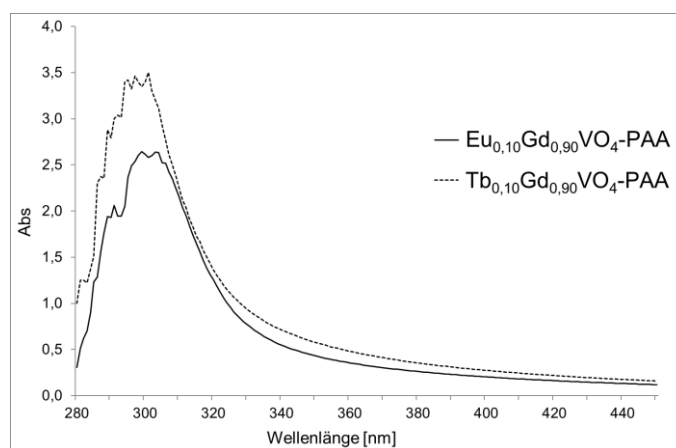


Abbildung 38: UV-VIS-Spektren von $\text{Ln}:\text{GdVO}_4\text{-PAA}$ -Nanokristallen im Bereich von 280-450 nm (UV/VIS Photometer der Fa. Analytik Jena, Specord 50plus).

Beide UV-VIS-Spektren zeigen breiten Absorptionsbanden im UV-Bereich zwischen 280-350 nm mit einem Maximum bei 300 nm. Die Absorptionsbanden können dem Ladungstransfer von den Sauerstoff-Liganden (O^{2-}) zum zentralen Vanadium (V^{5+}) im VO_4^{3-} -Anion zugeordnet werden. [66] Die lumineszierenden Eigenschaften der

Nanokristalle mit Eu^{3+} -Dotierung wurden bereits bei Betrachtung der Dispersion unter der UV-Lampe (Anregungswellenlänge von 254 nm) sichtbar, bei der die typische Emission im roten Spektralbereich zu erkennen war (Abbildung 39). Für die Tb^{3+} -Dotierung war hingegen keine sichtbare Lumineszenz erkennbar und die Probe ließ sich optisch nicht von den Nanokristallen ohne Dotierung unterscheiden. Charakteristisch für Terbium wäre eine gelblichgrüne Lumineszenz nach Anregung mit UV-Strahlung. [169]

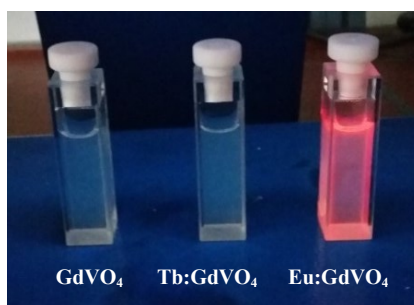


Abbildung 39: Foto der Messlösungen für die Fluoreszenzspektroskopie unter der UV-Lampe bei 254 nm Anregungswellenlänge für Nanokristalle vom Typ $\text{GdVO}_4\text{-PAA}$, $\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ und $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ (Konzentration 1 mg/mL).

Details zum verwendeten Fluoreszenzspektrometer und der Aufnahme der Spektren sind im Anhang, Kapitel 4.1.10, zu finden. Um die optimalen Messbedingungen für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren zu evaluieren, wurde zunächst für beide Dotierungselemente eine Excitation-Emission Map aufgenommen. Hierfür wurden die Nanokristalle im Bereich von 300-410 nm alle 5 nm angeregt und für jede Anregungswellenlänge das resultierende Emissionsspektrum alle 1 nm aufgezeichnet. Trägt man im Anschluss alle Emissionsspektren gegen ihre Anregungswellenlängen auf, erhält man ein zweidimensionales Bild, aus dem sich die Bereiche mit maximaler Emission visualisieren lassen. Für die Eu^{3+} -Dotierung (Abbildung 40) lässt sich aus der Excitation-Emission-Map bei einer Anregungswellenlänge von 325 nm ein Emissionsmaximum bei 618 nm erkennen, die der typisch roten Lumineszenz des Europiums zuzuordnen ist.

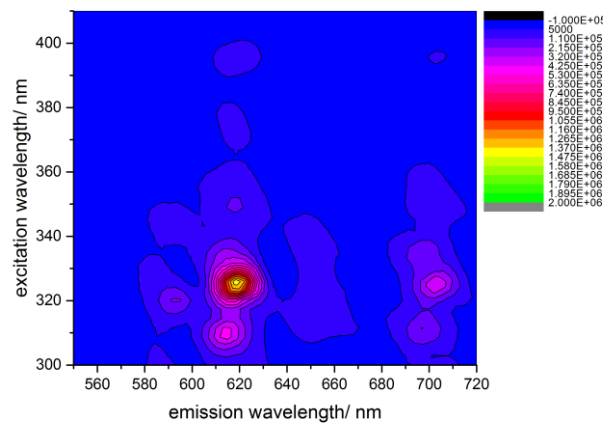


Abbildung 40: Excitation-Emission-Map von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen (1 mg/mL). Messparameter: $\Delta\lambda_{\text{exc}}=5$ nm, $\Delta\lambda_{\text{em}}=1$ nm, Dwell time=1 s, CutOff Filter=495 nm.

Für die lumineszierenden Eigenschaften des Europiums können zwei verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Die Eu^{3+} -Ionen können entweder direkt vom UV-Licht angeregt werden, woraus eine geringe Lumineszenz im sichtbaren Bereich resultiert oder durch einen effizienten Energietransfer von der Vanadat-Matrix zu den Eu^{3+} -Ionen. Der Transfer der absorbierten Energie von der VO_4^{3+} -Gruppe zu den Eu^{3+} -Ionen führt zu einer Anregung des ${}^5\text{D}_J$ -Zustandes mit $J>0$. Lumineszenz wird allerdings erst bei der Rückkehr vom ${}^5\text{D}_0$ -Zustand auf den ${}^7\text{F}$ -Zustand beobachtet (Abbildung 41). [170]

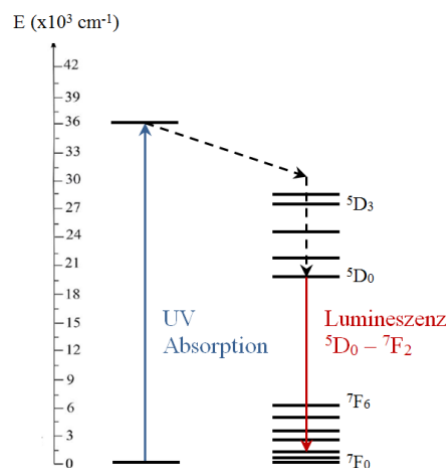


Abbildung 41: Energieübergänge bei der Eu^{3+} -Lumineszenz in einer Ln^{3+} -Vanadat-Matrix. [66]

Terbium hingegen zeigt nach Anregung mit UV-Strahlung charakteristische Übergänge zwischen dem angeregten ${}^5\text{D}_4$ -Zustand und den ${}^7\text{F}_J$ -Grundzuständen ($J=0-6$) [169] Für die Tb^{3+} -dotierten Nanokristalle lässt sich aus der Excitation-Emission-Map (Abbildung 42) bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm ein Emissionsmaximum bei 546 nm erkennen, die dem charakteristischen ${}^5\text{D}_4\text{-}{}^7\text{F}_5$ Übergang ($\Delta J=5$) zuzuordnen ist.

Die breite Bande ab ca. 600 nm mit dem intensivsten Signal nach Anregung mit einer Wellenlänge von ca. 370 nm konnte keinem Tb^{3+} -Übergang eindeutig zugeordnet werden. Da das Tb^{3+} -Signal wesentlich geringer als das Eu^{3+} -Signal ist, könnte es sich um Untergrundsignale handeln, die in den Eu^{3+} -Emissionsspektren im Untergrund verschwanden.

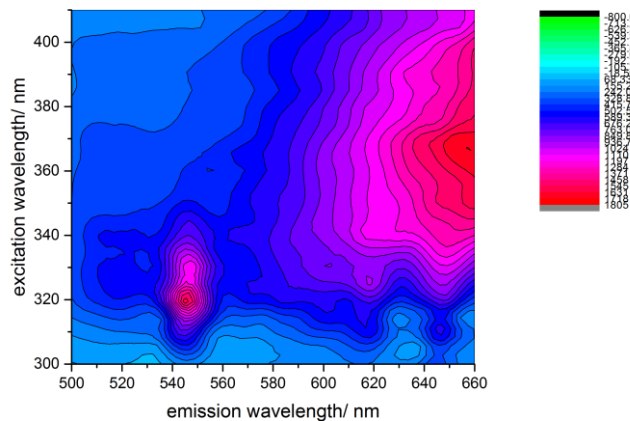


Abbildung 42: Excitation-Emission-Map von $Tb_{0,10}Gd_{0,90}VO_4$ -PAA Nanokristallen (10 mg/mL). Messparameter: $\Delta\lambda_{exc}=5$ nm, $\Delta\lambda_{em}=1$ nm, Dwell time 1 s, CutOff Filter=495 nm.

Für eine eindeutige Zuordnung der unbekanntenen Bande ab ca. 600 nm wurde eine weitere Excitation-Emission-Map von undotierten $GdVO_4$ -PAA Nanokristallen aufgenommen (Abbildung 43). In dieser Excitation-Emission-Map ist ebenfalls eine Bande ab ca. 600 nm erkennbar.

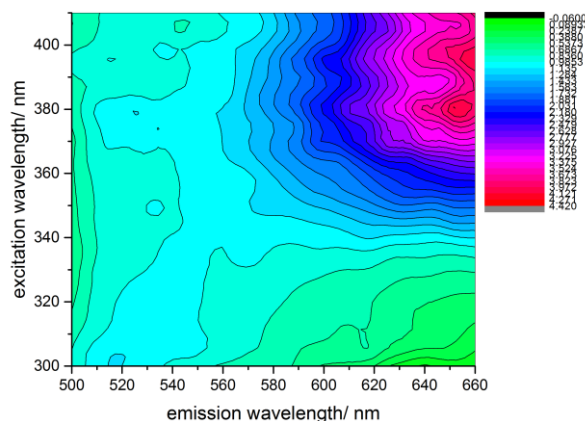


Abbildung 43: Excitation-Emission-Map von $GdVO_4$ -PAA Nanokristallen (10 mg/mL). Messparameter: $\Delta\lambda_{exc}=5$ nm, $\Delta\lambda_{em}=1$ nm, Dwell time 1 s, CutOff Filter=495 nm.

Trotz Verwendung eines 495 nm CutOff Filters sind folglich Streueffekte detektiert worden, die im Falle der Excitation-Emission-Map für die Eu^{3+} -Dotierung aufgrund der

höheren Intensität im Rauschen verschwunden sind. Streupeaks entstehen durch Streuung des Anregungswellenlichts an den Nanokristallen. Im Spektrum werden somit Banden sichtbar, bei denen es sich um keine echte Emission handelt. Die Streulichtbanden wurden durch Messung des Emissionsspektrums bei verschiedenen Anregungswellenlängen identifiziert. Die Position (nicht aber die Intensität) der charakteristischen Fluoreszenzsignale blieb dabei unverändert, während die Streupeaks in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge variierten.

Nach Aufnahme der Excitation-Emission-Maps wurden Fluoreszenzspektren bei fester Anregungswellenlänge aufgenommen. Hierfür wurde ebenfalls ein 495 nm Cut-Off Filter im Emissionsstrahlengang des Spektrometers eingebaut. Aufgrund apparativ bedingter Einflüsse ist es zudem sinnvoll, Fluoreszenzspektren zu korrigieren. Die automatische Korrektur der Spektren konnte bei dem verwendeten Gerät nur für eine Spaltbreite von 1,5 nm erfolgen, da hierfür die spektralen Eigenschaften des Emissionsstrahlenganges ermittelt worden sind und die gemessenen Spektren damit korrigiert werden konnten. Das Fluoreszenzspektrum der $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle (1 mg/mL) wurde nach Anregung mit 330 nm zwischen 500-700 nm aufgenommen und ist in Abbildung 44 gezeigt. Die charakteristischen Energieübergänge des Europiums sind im Spektrum bei 593 nm ($^5\text{D}_0\text{-}^7\text{F}_1$, $\Delta J=1$), bei 618 nm ($^5\text{D}_0\text{-}^7\text{F}_2$, $\Delta J=2$) und bei 699 nm ($^5\text{D}_0\text{-}^7\text{F}_4$, $\Delta J=4$) zu erkennen. [66], [68], [171], [172], [173] Aufgrund des Kristallfeldes ist die intensive rote Lumineszenz bei 614 nm und 618 nm in zwei Banden aufgespalten. [74]

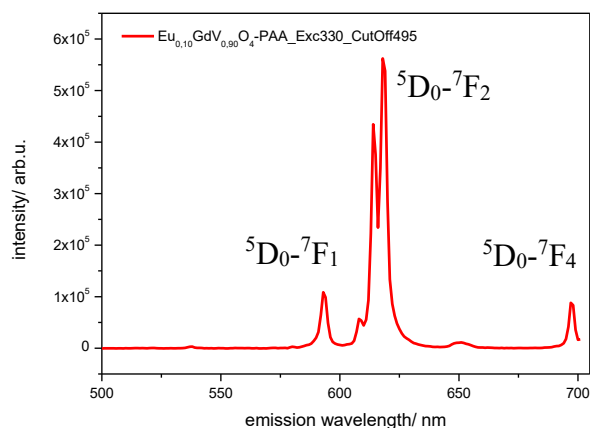


Abbildung 44: Emissionsspektrum von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen (1 mg/mL). Messparameter: $\lambda_{\text{exc}}=330$ nm; Spaltbreite 1,5 nm; CutOff Filter=495 nm.

Abbildung 45 zeigt das Fluoreszenzspektrum der $\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle (10 mg/mL) mit deutlich geringerem Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Eu^{3+} -Dotierung. Damit bei den Tb^{3+} -dotierten Nanokristallen ein Signal detektiert werden konnte, musste die Spaltbreite auf 5 nm erweitert werden. Die Messung eines korrigierten Spektrums war nicht möglich. Im Fluoreszenzspektrum konnte nach Änderung der Messparameter jedoch bei 546 nm die Bande für den ${}^5\text{D}_4\text{-}{}^7\text{F}_5$ Übergang ($\Delta J=5$) nachgewiesen werden (Abbildung 45). [174], [175], [176] Aufgrund der geringen Intensität dieses Überganges war die grüne Lumineszenz des Terbiums nicht unter der UV-Lampe sichtbar. [174]

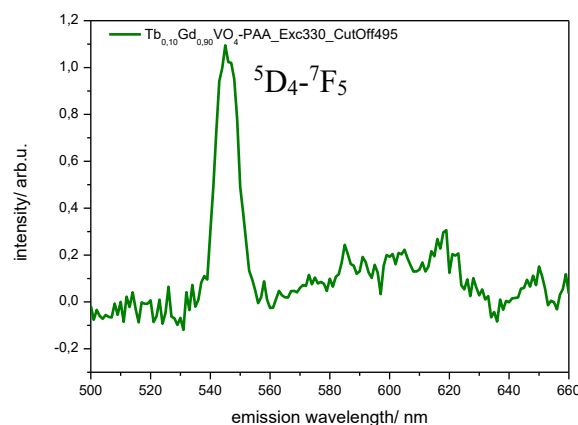


Abbildung 45: Emissionsspektrum von $\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen (10 mg/mL). Messparameter: $\lambda_{\text{exc}}=330$ nm; Spaltbreite 5 nm; CutOff Filter=495 nm.

Bei der Bewertung der optischen Eigenschaften der Nanokristalle ist zu beachten, dass bei der Eu^{3+} - und Tb^{3+} -Dotierung eine Anregung mit UV-Strahlung erforderlich war, um eine entsprechende Lumineszenz zu beobachten. Die synthetisierten Nanokristalle können folglich nicht für die optische *in vivo* Bildgebung genutzt werden. Aufgrund des schädlichen Effektes von UV-Strahlung auf lebende Organismen erfordern *in vivo* Experimente Anregungswellenlängen > 466 nm. [68] Yin *et al.* [161] umgingen dieses Problem, in dem sie GdVO_4 gleichzeitig mit mehreren Lanthanoiden dotierten und somit *Upconversion* Nanopartikel erhielten, die sich sowohl für die optische als auch für die MRT-Bildgebung eigneten. Bei der Dotierung von GdVO_4 mit Yb und Er (40 mol %, 2 mol %) erhielten sie beispielsweise Nanokristalle, die nach Anregung mit 980 nm eine rote Emission zwischen 650-670 nm zeigten. [63] Allgemein können durch Auswahl geeigneter Lanthanid-Dotierungen eine Vielzahl verschiedener Emissionsfarben erhalten werden. [177] Die Variabilität der Dotierungen konnte auch für die vorliegenden

Nanokristalle gezeigt werden. In dieser Arbeit umfassen die angestrebten Anwendungen der Nanokristalle, neben der MRT-Bildgebung, jedoch nur *in vitro* Untersuchungen. Eine Weiterentwicklung der Nanokristalle für die optische *in vivo* Bildgebung wurde daher zunächst nicht durchgeführt.

2.3.5 Bestimmung der r_1 -Relaxivität

Die Bestimmung der r_1 -Relaxivität erfolgte durch Messung der NMR-Relaxation der Wasserstoffkerne in wässrigen Lösungen in Gegenwart der DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimere, der Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle sowie der Referenzsubstanz Magnevist[®] mit einem NMR-Spektrometer (Minispec). Für die Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristalle erfolgte zusätzlich die Bestimmung der r_1 -Relaxivität am präklinischen PET/MRT. Die Geräteparameter und die experimentelle Durchführung sind im Anhang, Kapitel 4.1.11, beschrieben. Zunächst wurden jedoch Flüssig-Phantome der dotierten Nanokristalle und der Referenzsubstanz Magnevist[®] am präklinischen PET/MRT gemessen, um die Kontrasteigenschaften der Nanokristalle im Vergleich zum klinischen Kontrastmittel Magnevist[®] visuell zu bewerten. Abbildung 46 zeigt die erstellte HeatMap der Flüssig-Phantome, wobei erwartungsgemäß mit steigender Gd^{3+} -Konzentration eine zunehmende Kontrastverstärkung erkennbar ist. Je heller die Spots in der HeatMap erscheinen, umso stärker war die Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit und umso größer ist die r_1 -Relaxivität. Der direkte Vergleich der Spots der Referenzsubstanz Magnevist[®] und der Spots der Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle mit gleicher Gd^{3+} -Konzentration zeigt eine ähnliche Kontrastverstärkung.

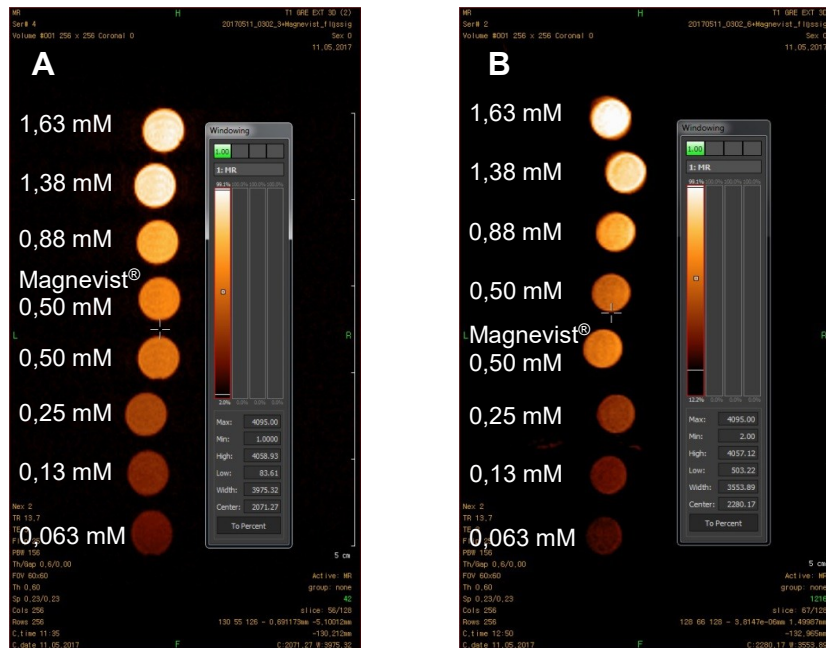


Abbildung 46: Messung von Flüssig-Phantomen der Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle mit unterschiedlichen Gd³⁺-Konzentrationen am präklinischen PET/MRT (nanoScan, Fa. Mediso) bei 1 T mit der Sequenz T1 GRE EXT 3D, der Repetitionszeit TR=13,7 ms, der Echozeit TE=3,0 ms und einem Flip-Angle (Anregungswinkel) von 25°. A: Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA und B: Tb_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA.

Für die Bestimmung der r_1 -Relaxivität mit dem präklinischen PET/MRT wurde von den Phantomen der Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristalle eine sog. T₁ Map erzeugt (Abbildung 47, A). Die Kurven in der T₁ Map zeigen die Auftragung der gemessenen Signalintensitäten gegen die Inversionszeiten T_I, die den Zeitraum zwischen dem 180°-Inversionsimpuls und dem Auslesen des MRT-Signals beschreibt. [178] Jeder Kurve in der T₁ Map wurde eine T₁-Relaxationszeit für jedes Phantom zugeordnet. [179] Eine Übersicht der ermittelten T₁-Relaxationszeiten befindet sich im Anhang, Kapitel 4.2.4. Über die Erstellung der T₁ Map ergibt sich für die Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristalle nach Auftragung der reziproken T₁-Relaxationszeiten über der Gd³⁺-Konzentrationen eine r_1 -Relaxivität von 2,0 mM⁻¹ s⁻¹ (Abbildung 47, B).

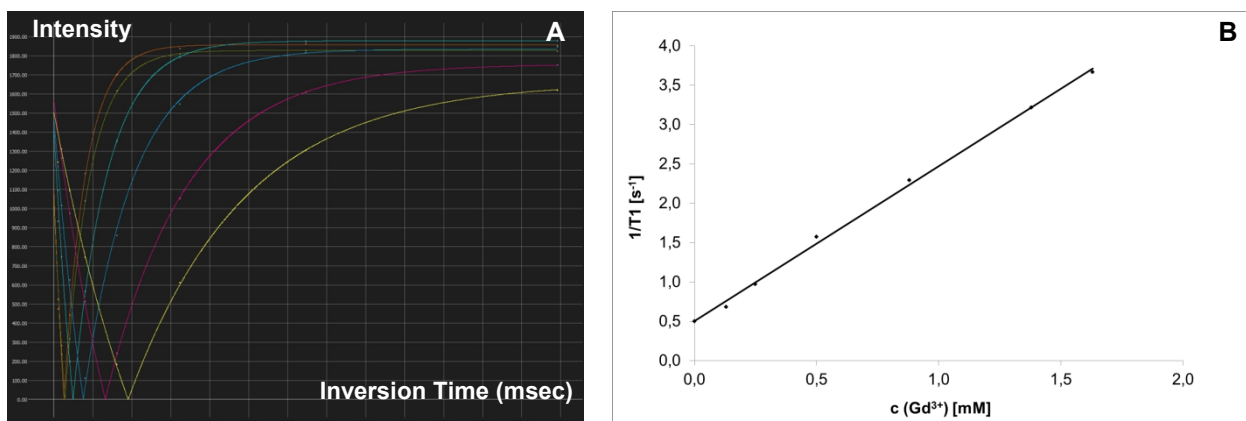


Abbildung 47: Bestimmung der r_1 -Relaxivität von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ -Nanokristallen nach Messung einer T_1 Map mit der Sequenz „IR GRE SNAP T_1 maps“ von Flüssig-Phantomen mit unterschiedlichen Gd^{3+} -Konzentrationen am präklinischen PET/MRT. Für die lineare Regressionsgerade wurde die Gleichung $2,0x+0,5$ ($R^2=0,9974$) ermittelt, was einer r_1 -Relaxivität von $2,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ entspricht.

Diese bestimmte r_1 -Relaxivität der $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle am präklinischen PET/MRT konnte mit der Messung am Minispec bestätigt werden, bei der ein Wert für r_1 von $2,1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt wurde. Hierbei ist zu beachten, dass die Messung am Minispec bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und $0,94 \text{ T}$ erfolgte, wohingegen am PET/MRT bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ Raumtemperatur und 1 T gemessen wurde. Rohrer *et al.* [180] bestimmten die Relaxivitäten verschiedener klinischer Kontrastmittel bei physiologischer Temperatur und unterschiedlichen Feldstärken. Für Magnevist[®] ermittelten sie bei $1,5 \text{ T}$ eine Relaxivität von $r_1 = 3,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die mit der ermittelten Relaxivität für Magnevist[®] am Minispec mit $r_1 = 3,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nahezu übereinstimmt. Für die DOAT(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimere wurde sogar eine mehr als dreifach höhere Relaxivität von $r_1 = 11,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu Magnevist[®] erhalten.

Die unterschiedlichen r_1 -Relaxivitäten der verschiedenen Substanzklassen lassen sich mit ihrer chemischen Struktur begründen. Magnevist[®] (Gadopentetat-Dimeglumin) besteht aus Gd^{3+} -Komplexen mit linearen Polyaminopolycarbonsäure-Liganden. Da Gd^{3+} -Komplexe die Koordinationszahl neun des Zentralatoms bevorzugen, bleibt bei den achtzahnigen Liganden nur eine Koordinationsstelle für Wasserstoffkerne offen. [181] Zwischen dem Relaxationszentrum Gadolinium und einem an die freie Koordinationsstelle vorübergehend gekoppelten Wasserstoffkern finden intensive magnetische Wechselwirkungen statt, die eine Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit zur Folge haben. Im Falle der Nanokristalle können die stärksten magnetischen Wechselwirkungen mit den umliegenden Wasserstoffkernen nur zwischen den Gd^{3+} -

Ionen nahe der Partikeloberfläche stattfinden. Die Gd^{3+} -Ionen im Partikelinneren üben nur noch einen geringen oder ggf. keinen Einfluss mehr auf die umgebenden Protonen aus. Für die Nanokristalle resultierte daher im Vergleich zu Magnevist[®] eine geringere r_1 -Relaxivität. Die Aufnahmen der Flüssig-Phantome mit dem präklinischen PET/MRT (Abbildung 46) zeigten jedoch bei $c(Gd^{3+})=0,5$ mM keine eindeutig schwächere Kontrastverstärkung bei den Nanokristallen im Vergleich zu Magnevist[®]. Aus der molekularen Struktur der DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimere resultiert eine hohe lokale Konzentration an Gd^{3+} -Komplexen, die die umgebenden Protonen wirksam beeinflussen, wodurch sich die deutlich höhere r_1 -Relaxivität im Vergleich zu den Nanokristallen und zum Magnevist[®] ergibt. Bei beiden synthetisierten Reagenzien kann man davon ausgehen, dass sie insbesondere bei Anwendungen als präklinische „blood-pool“ Kontrastmittel länger im Blut zirkulieren als niedermolekulare Kontrastmittel und sich besser für Angiographien eignen als beispielsweise Magnevist[®]. Beim direkten Vergleich beider Reagenzien lässt sich schlussfolgern, dass die Ln: $GdVO_4$ -PAA Nanokristalle mit einer Partikelgröße von knapp 37 nm länger intravaskulär verbleiben als die ca. 5 nm großen DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten-G5-PAMAM Dendrimere. [143] Im Gegensatz zu den niedermolekularen Kontrastmitteln implizieren auch die Nanokristalle trotz geringerer r_1 -Relaxivität als Magnevist[®] entscheidende Vorteile bei der Kleintierbildgebung. Durch den EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention) von Tumorgewebe und Entzündungsorten neigen beide Reagenzien dazu sich im Endothelium anzureichern und führen somit zu einer Kontrastverstärkung in der MRT-Bildgebung, wobei einige Studien zeigten, dass die Anreicherung von Nanopartikeln mit Durchmessern <30 nm in Tumorgewebe begünstigt ist. [143]

2.3.6 Biokompatibilitätsuntersuchungen

Untersuchungen zur Biokompatibilität werden routinemäßig mit *in vitro* Toxizitätstests durchgeführt, die alle auf der Messung eines direkten Effektes von Proben auf grundlegende und zelltypspezifische Prozesse beruhen. Weitverbreitete Toxizitätstests sind u.a. der Trypanblau-Test, der Neutralrot-Test, der LDH-Test und der MTT-Test. [182] In dieser Arbeit wurde mit dem MTT-Test gearbeitet, bei dem der gelbe MTT-Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in metabolisch aktiven Zellen quantitativ zum blau gefärbten Formazan reduziert wird.

Reduktionsprozesse durch biologische Systeme wurden erstmals 1941 von Kuhn und Jerchel publiziert. [183] Seitdem Mosmann 1983 dieses Testprinzip für Zellkulturen beschrieb, wird es weitverbreitet für Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzt. [184] Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der Reduktion des MTT-Farbstoffs durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen, bei dem der Tetrazolium-Ring mit Hilfe des Cytochrom-Oxidase-Systems aufgebrochen wird und stark gefärbte, wasserunlösliche Formazane gebildet werden. Durch anschließende Lyse der Zellen mit 0,04 N HCl in *i*-Propanol können die Formazane in Lösung gebracht werden. Da nur metabolisch aktive, sprich gesunde, Zellen diese Enzymaktivität aufweisen, ist eine einfache Quantifizierung durch photometrische Messung des gebildeten Formazans bei 570 nm möglich. Der MTT-Test wurde an verschiedenen Passagen der Erhaltungskultur von humanen Leukämie-Zellen der Linie U937 durchgeführt. U397 Zellen bieten den Vorteil der einfachen Kultivierung, sie adhären nicht an Kunststoffoberflächen, sind beständig gegenüber mechanischen Einflüssen, teilen sich schnell (Verdoppelung der Zellzahl innerhalb von 20 h) und gehören zu den wenigen humanen Zelllinien, die noch monozytäre Eigenschaften aufweisen. [185] Abbildung 48 zeigt die bestimmten Zytotoxizitätsprofile der $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle (A) im Konzentrationsbereich von $c(\text{Gd}^{3+}) = 0,06\text{-}4,13\text{ mM}$ und der DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimern (B) im Konzentrationsbereich von $c(\text{Gd}^{3+}) = 0,03\text{-}1,55\text{ mM}$.

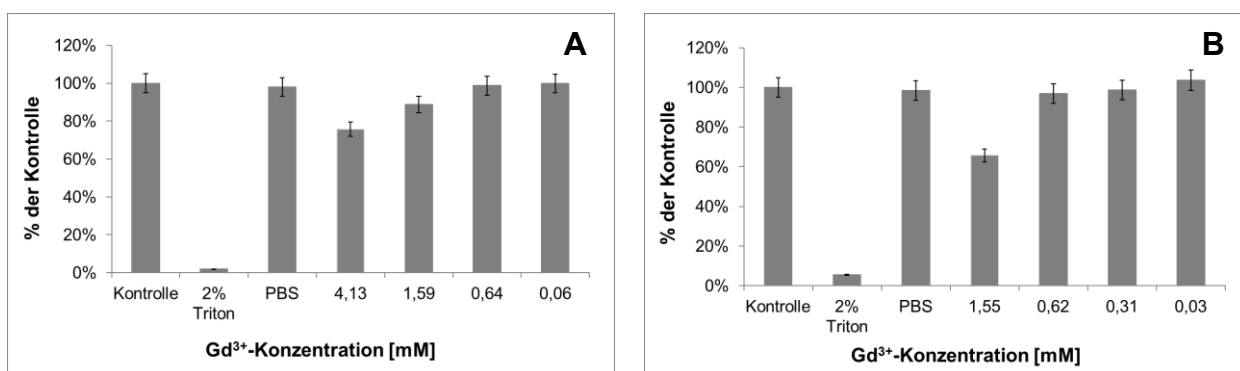


Abbildung 48: MTT-Test zur Zytotoxizitätsanalyse von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen (A) und DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimern (B) nach 24-stündiger Inkubation mit 4×10^4 U937 Zellen. Der prozentuale Anteil an gesunden Zellen wurde relativ zur Kontrolle mit Zellkulturmedium ($n=6$) bestimmt.

Für die Nanokristalle wurde die geringste Zellviabilität mit 75,6 % bei einer Gd^{3+} -Konzentration von 4,13 mM im Kulturmedium festgestellt. Bei Gd^{3+} -Konzentrationen $< 1,59\text{ mM}$ wurden Zellviabilitäten $> 80\%$ bestimmt, womit keine zytotoxischen Effekte

mehr durch die Nanokristalle zu erwarten waren. Bei der präklinischen MRT-Bildgebung werden Kontrastmittel auf Gadolinium-Basis von der Marke ViscoverTM üblicherweise in einer Dosis von 100 $\mu\text{mol Gd}^{3+}/\text{kg}$ (für eine 25 g Maus) eingesetzt. Bei einer Maus mit einem durchschnittlichen Blutvolumen von 1,75 mL beträgt die Gd^{3+} -Konzentration im Blut ca. 1,4 mM. Die Nanokristalle vom Typ $\text{Ln}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ können folglich in dieser Dosis für die *in vivo* MRT-Bildgebung eingesetzt werden. Bei den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimern wurde hingegen bereits ab 1,55 mM Gd^{3+} eine Beeinträchtigung der Zellviabilität beobachtet, die prozentual zur Kontrolle 65,7 % betrug. Bei Konzentrationen $<1,55\text{mM Gd}^{3+}$ waren keine zytotoxischen Effekte mehr zu erwarten. Aufgrund der hervorragenden r_1 -Relaxivität der funktionalisierten Dendrimere (siehe Kapitel 2.3.5) wäre jedoch bei der *in vivo* MRT-Bildgebung im Vergleich zu den Nanokristallen, die Applikation einer geringeren Gd^{3+} -Konzentration ausreichend, um einen gleichwertigen Kontrast zu erzeugen. Beide Reagenzien eignen sich somit potentiell als präklinische *in vivo* MRT-Kontrastmittel sowie für die Untersuchung ihrer Eignung zur Zellmarkierung. *In vivo* Versuche zur Beurteilung der Kontrasteigenschaften in einem Organismus konnten aufgrund der regulatorischen Hürden nicht durchgeführt werden. Die Ergebnisse zur Zellmarkierung werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

2.4 Metallmarkierung verschiedener Zellarten

Für die Untersuchungen der synthetisierten Reagenzien zur *in vitro* Zellmarkierung wurden die Testsubstanzen direkt zum Zellkulturmedium gegeben und gemeinsam mit adhärent wachsenden, humanen Lungentumorzellen der Linie A549 bzw. mesenchymalen Stammzellen (MSCs) aus dem humanen Fettgewebe auf Deckgläsern kultiviert. Beide Zellarten weisen eine erhöhte Proliferation auf, jedoch zeigen Tumorzellen ein pathologisches Wachstumsverhalten, wodurch sie gesundes Gewebe in einem Organismus zerstören. Stammzellen können hingegen zu verschiedenen Gewebearten differenziert werden und besitzen die Fähigkeit geschädigtes Gewebe zu regenerieren. [22], [186] Der Einsatz von Stammzellen für regenerative Therapien sowie der Nachweis der Sicherheit einer Stammzell-Therapie sind aktuelle Forschungsbereiche, die mit dem Zell-Tracking vorangetrieben werden können.

Bei der Untersuchung der *in vitro* Zellmarkierung zeigte sich, dass die nanopartikulären Reagenzien zu einem größeren Anteil von beiden Zellarten aufgenommen werden und besser für die Zellmarkierung geeignet sind als die DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimere. Der Nachweis der effizienteren Zellmarkierung erfolgte für beide Markierungsreagenzien sowie für die Referenz Magnevist[®] durch eine Quantifizierung der Lanthanoide in den Zellen mit der ICP-MS. Die ICP-MS Analytik bestätigte die höhere Aufnahme der Nanokristalle im Vergleich zu den DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimern sowie zum Magnevist[®]. Die anschließende qualitative Bewertung der Zellmarkierung erfolgte für die Nanokristalle nach der Präparation von Zell-Phantomen mit der MRT-Bildgebung, mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (*engl.* CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) sowie mit dem Bioimaging mit der LA-ICP-MS. Für die DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimern erfolgte die qualitative Bewertung der Zellmarkierung ausschließlich mit der LA-ICP-MS, da dies die empfindlichste der drei Methoden ist, um die Markierungsreagenzien nachzuweisen.

2.4.1 Quantifizierung der Lanthanoide nach der Zellmarkierung

Die Quantifizierung der Lanthanoide erfolgte nach Aufschluss einer vorgegebenen Anzahl von Zellen und Analyse der Lysate mit der ICP-MS. Die experimentelle Durchführung zur Markierung der Zellen und mit anschließendem Aufschluss zur Freisetzung der Lanthanoide ist in Kapitel 4.1.14 beschrieben. Abbildung 49 zeigt eine Übersicht der Quantifizierungen nach Markierung von A549-Zellen (A, C, E) und MSCs (B, D, F) mit Ln:GdVO₄-PAA Nanokristallen (A, B), DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimern (C, D) sowie Magnevist[®] (E, F). Die durchgezogenen Linien zeigen die absoluten Mengen der Lanthanoide nach der Inkubation mit den verschiedenen Reagenzien in μmol . Im Falle der Nanokristalle entspricht die Menge der Lanthanoide der Summe aus den Gd³⁺-Ionen und dem Dotierungselement. Für die funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimere und Magnevist[®] entspricht dies der Gd³⁺-Konzentration. Die gestrichelten Linien zeigen die relative Aufnahme der Markierungsreagenzien in Bezug auf ihre Ausgangskonzentration. Alle Diagramme in Abbildung 49 lassen nach Inkubation mit den Reagenzien für beide Zellarten eine Aufnahme erkennen, da die Mengen der Lanthanoide in den Zellaufschlüssen mit steigender Konzentration zunehmen. Die größte prozentuale Aufnahme erfolgte für beide Zellarten bei den

Nanokristallen (Abbildung 49 A, B), gefolgt von den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimeren (Abbildung 49 C, D) und Magnevist[®] (Abbildung 49 E, F). Bei den Nanokristallen blieb ab einer Konzentration von 15 pmol Ln^{3+} /Zelle die prozentuale Aufnahme der Reagenzien nahezu konstant, während bei den MSCs noch eine erneute Zunahme der relativen Aufnahme ab 15 pmol Ln^{3+} /Zelle zu beobachten war. Die DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimere zeigten für beide Zellarten ab 1 pmol Ln^{3+} /Zelle keinen signifikanten Anstieg der prozentualen Aufnahme der Reagenzien. Beim Magnevist[®] zeigten die A549-Zellen ab 1,5 pmol Ln^{3+} /Zelle eine Abnahme der prozentualen Aufnahme, während die MSCs ab 15 pmol Ln^{3+} /Zelle eine erneute Zunahme der prozentualen Aufnahme zeigten. Die prozentuale und die absolute Aufnahme war für beide Zellarten bei den Nanokristallen am größten und bei Magnevist[®] am geringsten. Magnevist[®] zählt zu den extrazellulären Kontrastmitteln, die sich nach intravenöser Applikation schnell vom Intravasalraum in den interstitiellen Raum verteilen und über die Nieren ausgeschieden werden. [187] Besonders in Zellkultur werden jedoch auch niedermolekulare Kontrastmittel zu einem gewissen Anteil über (Makro)Pinozytose in die Zellen aufgenommen werden, während die Aufnahme von partikulären Substanzen vornehmlich über Endozytose erfolgt (siehe hierzu auch Kapitel 1.3). [37], [188] Die Aufnahme von Substanzen in die Zelle ist abhängig von der verwendeten Zellart und dem Zellstoffwechsel, wobei die Aufnahme makromolekularer Substanzen in Abhängigkeit ihrer Größe und chemischen Struktur oft begünstigt ist. [189] Dies konnte auch in diesem Experiment gezeigt werden, da die Aufnahme der Nanokristalle um eine Größenordnung höher war als die des Magnevist[®]. Der Vergleich beider Zellarten macht deutlich, dass alle Markierungsreagenzien zu einem größeren Anteil von den MSCs aufgenommen wurden. Bei den Nanokristallen und den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimeren war die Aufnahme durch die MSCs um bis zu einer Größenordnung höher als bei den A549-Zellen.

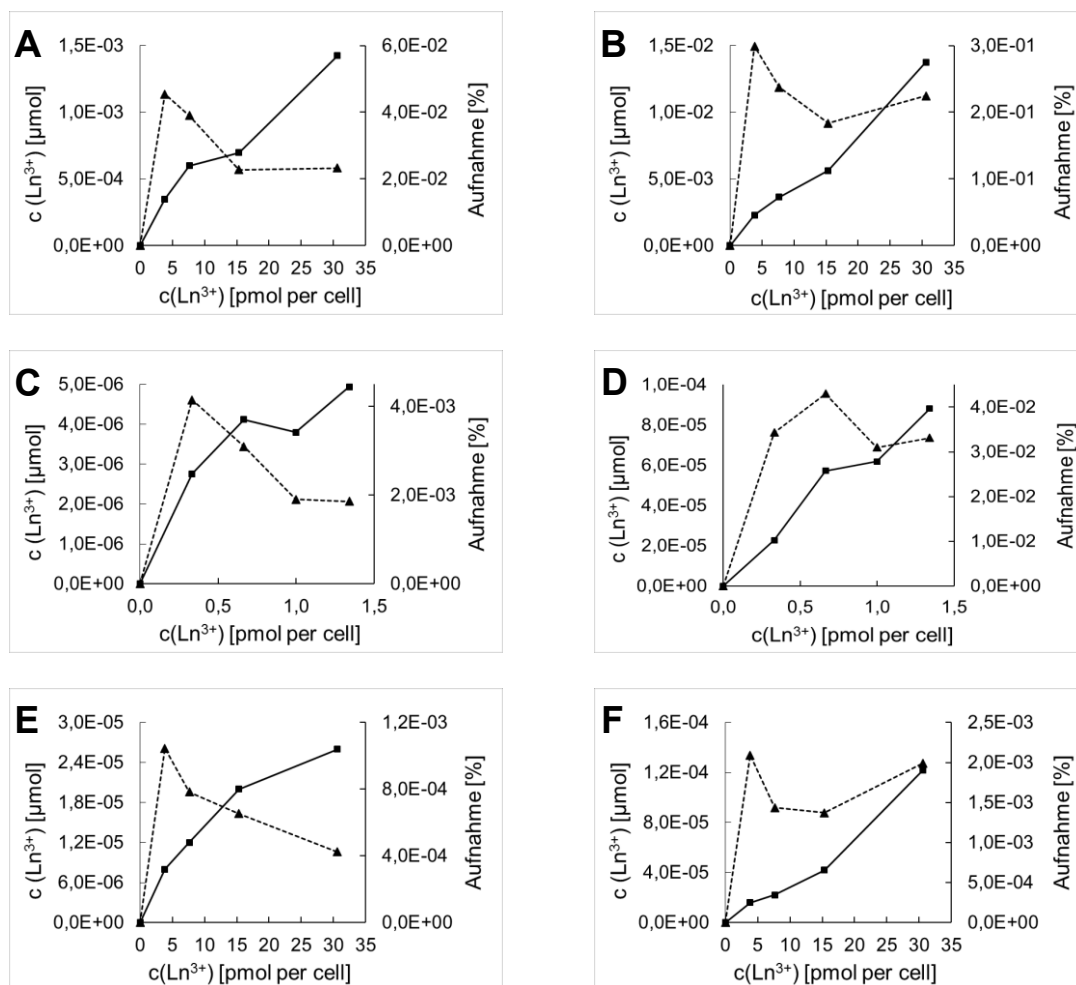


Abbildung 49: Quantifizierung der Lanthanoide nach 6 h Inkubation von 5×10^5 A549-Zellen bzw. 5×10^5 MSCs mit unterschiedlichen Mengen der Markierungsreagenzien Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle, DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM und Magnevist®. A: Inkubation von A549 Zellen mit Ln:GdVO₄-PAA. B: Inkubation von MSCs mit Ln:GdVO₄-PAA. C: Inkubation von A549 Zellen mit DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimern. D: Inkubation von MSCs mit DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimern. E: Inkubation von A549 Zellen mit Magnevist®. F: Inkubation von MSCs mit Magnevist®. Die durchgezogenen Linien zeigen die absolute Menge der bestimmten Lanthanoide nach der Inkubation in μmol . Die gestrichelte Linie zeigt die relative Aufnahme der Markierungsreagenzien in Bezug auf deren Ausgangskonzentration.

2.4.2 Mikroskopische Bewertung der Zellmarkierung mit Nanokristallen

Vor der Untersuchung der Zellmarkierung mit der MRT-Bildgebung, der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie und der LA-ICP-MS erfolgten zunächst Aufnahmen der A549-Zellen nach der Markierung mit den Nanokristallen mit der weiterverbreiteten Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe Kapitel 4.1.13). Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellkerne nach der Markierung mit dem Farbstoff DAPI

angefärbt. Der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet spezifisch an die DNA im Zellkern und zeigt nach Anregung mit ca. 360 nm ein Emissionsmaximum bei etwa 460 nm (Abbildung 50, A, B). [190] Neben der reinen Fluoreszenzmikroskopie, die im Falle der durchgeführten DAPI Färbung nur die Zellkerne erkennen lässt, erfolgten zusätzlich Aufnahmen mit zugeschaltetem Durchlicht (Abbildung 50, C, D).

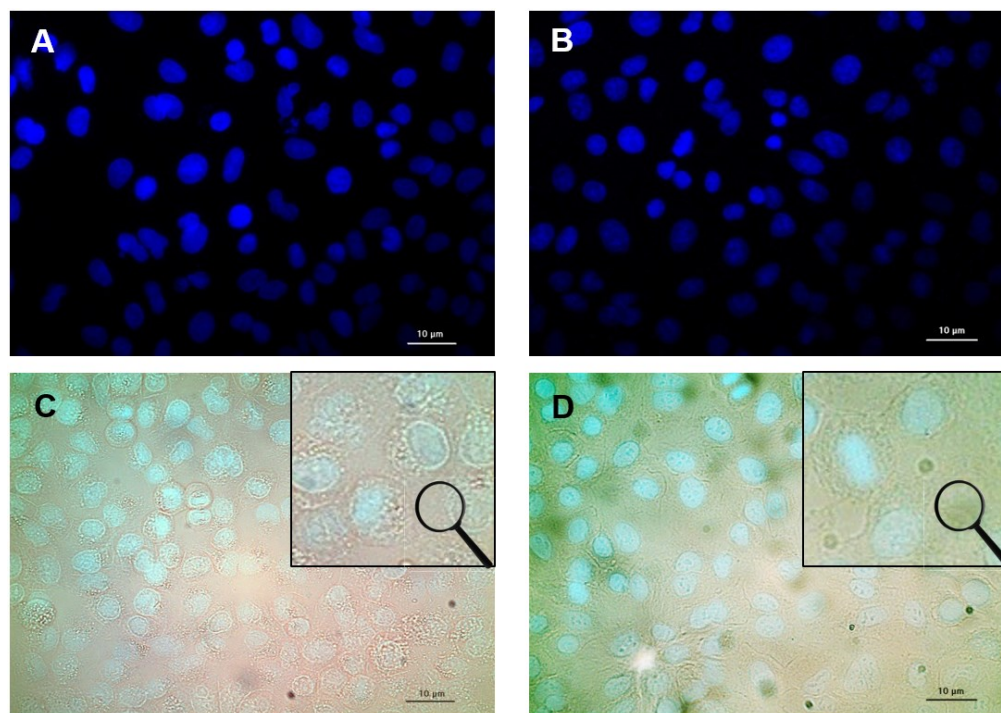


Abbildung 50: Mikroskopische Aufnahmen von Lungenkarzinomzellen nach 24 h Inkubation mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen in einer Konzentration von $5 \text{ pmol Ln}^{3+}/\text{Zelle}$ (A, C) und einer Kontrolle, bei der nur Kulturmedium eingesetzt wurde (B, D). Der Vergleich der Fluoreszenz-Aufnahmen der DAPI-gefärbten Zellkerne (A, B) zeigt keine Veränderung der Zellkernmorphologie zwischen beiden Aufnahmen. Auch bei den Durchlicht-Aufnahmen (C, D) konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

Beim direkten Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 50, A und B) nach Inkubation der A549-Zellen mit den Nanokristallen sowie der Kontrolle (keine Testsubstanz, nur Zugabe von Kulturmedium) sind keine morphologischen Unterschiede der Zellkerne erkennbar, welche typisch wären für nekrotische oder apoptotische Prozesse. Bei einer beginnenden Nekrose wäre eine Schwellung der Zellkerne im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Im weiteren Verlauf würden sich die Zellkerne und die Zellmembran auflösen und der Zellinhalt unkontrolliert freigesetzt werden. Die Nekrose ist ein pathologischer Prozess, der infolge schädlicher Einflüsse auf Zellen in Gang gesetzt wird. Die Apoptose wird hingegen auch als programmierter Zelltod bezeichnet, die zur Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl

in gesundem Gewebe dient. Bei einer beginnenden Apoptose werden die Zellkerne dichter gepackt, bis sie schließlich segmentiert werden. Im Gegensatz zur Nekrose wird der Zellinhalt nicht freigesetzt und entsteht keine Entzündungsreaktion. [186] Tumorzellen sind jedoch häufig gegen Apoptose resistent.

Da in der Beurteilung der Morphologie der Zellen keine negativen Einflüsse auf die Zellviabilität festgestellt werden konnte, können die Zellen in der vorliegenden Konzentration bis zu 24 Stunden bedenkenlos mit den Nanokristallen inkubiert werden, womit die Ergebnisse des MTT-Tests bestätigt wurden. Zur Visualisierung der gesamten Zelle wurden zusätzlich Durchlichtaufnahmen mit gleichzeitiger Anregung des Farbstoffs DAPI aufgenommen (Abbildung 50, C und D). Der Vergleich der A549-Zellen mit und ohne der Markierung mit den Nanokristallen zeigt in allen Aufnahmen Unterschiede im Zytoplasma der Zellen. Auffällig bei den Zellen mit den Testsubstanzen sind die stärker sichtbaren Granula aufgrund der, über Endozytose aufgenommenen, Nanokristalle. Der eindeutige Nachweis der Zellmarkierung erfolgt in den nächsten Kapiteln mit der MRT-Bildgebung, der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie und der LA-ICP-MS. Da die verwendeten Nanokristalle mit 10 % Eu-Dotierung vorlagen, wurden die Objektträger nach 6 h und 24 h Inkubation mit verschiedenen Mengen der Testsubstanzen zusätzlich auf einem UV-Tisch begutachtet (Abbildung 51).

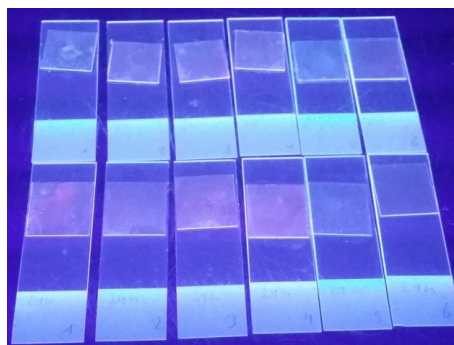


Abbildung 51: Foto der eingedeckten Lungenkarzinomzellen auf dem UV-Transilluminator nach Inkubation von mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen in verschiedenen Konzentrationen. Obere Reihe: 6 h Inkubation. Untere Reihe: 24 h Inkubation. Von links nach rechts: 0,8 pmol Ln^{3+} /Zelle; 2,5 pmol Ln^{3+} /Zelle; 3,2 pmol Ln^{3+} /Zelle; 5 pmol Ln^{3+} /Zelle; Blindwert (nur A549-Zellen mit Kulturmedium); Blindwert (1,5 mM Gd^{3+} ohne Zellen)

Die Objektträger zeigten auf dem UV-Tisch die typisch rote Eu^{3+} -Lumineszenz, die bereits bei den wässrigen Nanokristalldispersionen unter der UV-Lampe erkennbar war (siehe Kapitel 2.3.4, Abbildung 39). Die rote Fluoreszenz erscheint mit steigender Inkubationszeit intensiver. So zeigt die obere Reihe eine schwächere rötliche

Lumineszenz nach 6 h Inkubation als die untere Reihe nach 24 h Inkubation. Die Objektträger ohne Zellen, die nur mit den Testsubstanzen behandelt wurden sowie die Zellen ohne Testsubstanz, die in den letzten beiden Reihen erkennbar sind, zeigten im Vergleich zu den restlichen Objektträgern keine Lumineszenz. Eine unspezifische Adsorption der Nanokristalle an die Zellen oder die Deckgläser kann somit ausgeschlossen werden. Auf diese Weise ist eine qualitative Überprüfung der Zellmarkierung möglich.

2.4.3 Bildgebung von Zell-Phantomen am PET/MRT

Die Messung der Zell-Phantome erfolgte mit einem präklinischen PET/MRT System (nanoScan 1 T, Fa. Mediso), das eine räumliche Auflösung von bis zu 100 μm ermöglicht. Für die Präparation der Phantome wurden A549-Zellen und MSCs mit Ln:GdVO₄-PAA Nanokristallen und mit der Referenzsubstanz Magnevist[®] markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen fixiert, zentrifugiert und die erhaltenen Zell-Pellets mit Agarose überschichtet. Die genaue Beschreibung der experimentellen Durchführung zur Zellmarkierung und Bildgebung befindet sich im Anhang, Kapitel 4.1.15. Für die Messung der Zell-Phantome mit dem Kleintier PET/MRT musste die Geometrie der Probengefäße in geeigneter Weise ausgewählt werden, um die Phantome im Messfeld (*engl.* Field of View, FOV) der Bildgebungskammer platzieren zu können. Das FOV spielt besonders bei der Signalverarbeitung eine wichtige Rolle, da die Phasenkodierung nur im FOV eine Ortskodierung durchführt. Spins außerhalb des FOV erhalten eine Phasenkodierung, die von Spins innerhalb des Messbereiches nicht mehr unterscheidbar sind. In den MRT-Aufnahmen bilden sich solche falsch kodierten Anteile auf der gegenüberliegenden Seite im Bild ab. [178] Geeignete Zell-Phantome wurden nach Präparation in 200 μL Probengefäßen erhalten. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, keine Luftblasen in die Zell-Pellets einzubringen, da Luft im MRT ein negatives Signal erzeugt. Nachteilig bei der Verwendung der 200 μL Probengefäße war die Position der Zell-Pellets nahe dem oberen Rand des FOV, da die Gefäße kopfüber auf der Mausliege platziert werden mussten. Die mittige Platzierung im „Field of View“ wäre besser geeignet, jedoch ließen sich die Zell-Phantome trotzdem gut vermessen, was die entsprechenden MRT-Aufnahmen in Abbildung 52 bestätigen. Im Gegensatz zu den Zell-Phantomen trat dieses Problem bei Messung der Flüssig-Phantome (siehe Kapitel 2.3.5) nicht auf, da die 200 μL Probengefäße komplett befüllt wurden, so dass sich die Probe

über ein größeres Volumen im FOV verteilte. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten für die Flüssig-Phantome durch die Koronarebene und für die Zell-Phantome durch die Sagittalebene. Für die Messung der Zell-Phantome wurde zudem eine geeignete Sequenz evaluiert, um die Phantome mit einem möglichst guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. *signal to noise ratio*, SNR) darzustellen. Hierzu wurden die Pulssequenzen T1 SE 2D und T1 GRE EXT 3D getestet und in den wichtigsten Parametern variiert und optimiert. Die besten Aufnahmen hinsichtlich der Bildschärfe und -kontrast wurden mit der Sequenz T1 GRE EXT 3D erhalten. Da die Messung T₁-gewichtet erfolgte, wurden insbesondere die Repetitionszeit (TR) und die Echozeit (TE) optimiert, damit der Kontrast maßgeblich durch die T₁-Relaxationszeit bestimmt wurde. Bei der gewählten Gradienten-Echo-Sequenz (GRE) ist zudem der Anregungswinkel (Flip-Angle) ein wichtiger Parameter für die Bildqualität. Für die Messung der Zell-Phantome erfolgte mit TR=50, TE=2,9 und $\alpha=30^\circ$. Die entsprechenden MRT-Aufnahmen der *in vitro* Zell-Phantome von markierten A549-Zellen und MSCs zeigt die Abbildung 52.

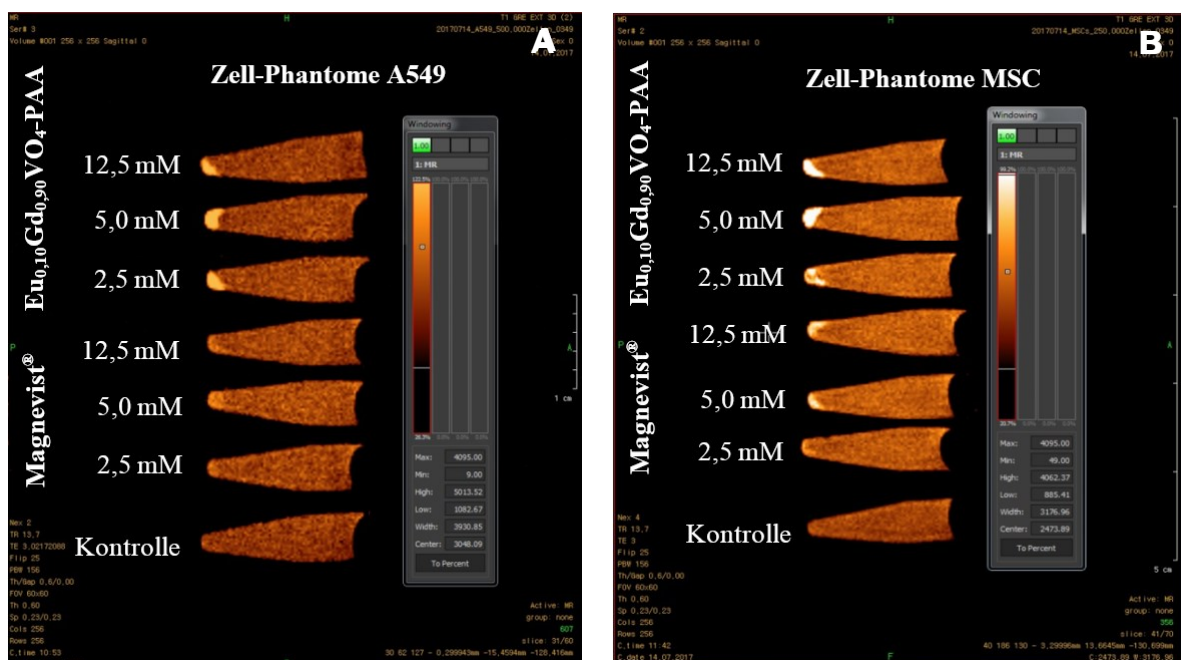


Abbildung 52: MRT-Aufnahmen der Zell-Phantome nach Markierung von A549-Zellen (A) und MSCs (B) mit steigender Gd³⁺-Konzentration von Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA-Nanokristallen bzw. Magnevist® bei gleichbleibender Zellzahl nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen. Für die Kontroll-Phantome wurde die gleiche Anzahl unmarkierter Zellen der jeweiligen Zelllinie verwendet. Die MRT-Aufnahmen erfolgten mit der Sequenz T1 GRE EXT 3D bei einer Repetitionszeit TR=50 ms, einer Echozeit TE=2,9 ms und einem Flip-Angle von 30°.

Die Aufnahmen der Zell-Phantome mit dem PET/MRT zeigten deutlich, dass sowohl Magnevist[®] als auch die Nanokristalle von beiden Zellarten aufgenommen werden, da die Zell-Pellets mit den Testsubstanzen am Boden der 200 µL Probengefäße ein stärkeres Signal erzeugen als die darüberliegende Agaroseschicht. Grund hierfür ist die Verkürzung der T₁-Relaxationszeit durch das paramagnetische Element Gadolinium. In den Kontroll-Phantomen, bei denen die Volumina der Testsubstanzen durch D-Mannitol ersetzt wurden, war erwartungsgemäß keine Kontrastverstärkung der Zell-Pellets erkennbar. Beide Zellarten zeigten bei gleicher Gd³⁺-Konzentration einen stärkeren Kontrast nach Inkubation mit den Nanokristallen als mit Magnevist[®]. Beide Zellarten haben dementsprechend mehr von den nanopartikulären Reagenzien als vom Magnevist[®] aufgenommen, was ebenfalls nach der Quantifizierung der Lanthanoide in den Zellen gezeigt wurde (siehe Kapitel 2.4.1). Auch die erhöhte Aufnahme-Fähigkeit der MSCs im Vergleich zu den A549-Zellen konnte mit den MRT-Aufnahmen bestätigt werden. Sowohl nach Markierung der MSCs mit den Nanokristallen, als auch mit der Referenzsubstanz Magnevist[®] war eine deutlich höhere Kontrastverstärkung der Zell-Pellets erkennbar.

2.4.4 Bildgebung der Zellmarkierung mit CLSM

In Kapitel 2.3.4 wurden bereits die lumineszierenden Eigenschaften der Eu:GdVO₄-PAA-Nanokristalle beschrieben. In diesem Kapitel wurden A549-Zellen und MSCs nach der Markierung mit den Nanokristallen mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) untersucht (siehe Kapitel 4.1.13). Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie wird bei CLSM nicht das gesamte Objekt beleuchtet, sondern von einem fokussierten Laserstrahl abgerastert, wodurch sich räumlich hochaufgelöste Bilder erzeugen lassen. [191] Bei den ersten CLSM-Aufnahmen der markierten Zellen zeigte sich, dass eine gleichzeitige Darstellung der mit DAPI-markierten Zellkerne und der Eu³⁺-dotierten Nanokristalle nicht ohne spezielle Optimierung der Messbedingungen möglich war. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt bei etwa 360 nm und zeigt im Gegensatz zum Europium eine breite Emissionsbande im Bereich von 370-600 nm mit einem Maximum bei ca. 460 nm. [190], [192] Da für die Anregung beider Substanzen nur ein DPSS Laser mit einer Wellenlänge von 355 nm zur Verfügung stand, wurde das Eu³⁺-Signal von der DAPI Fluoreszenz stark überstrahlt. Zudem unterscheiden sich die Messbedingungen beider Substanzen. Während für

Fluoreszenzmessungen mit DAPI kurze Messzeiten ausreichend sind, erfordern die seltenen Erden aufgrund der schmalen Emissionsbanden und der langen Fluoreszenzlebensdauern längere Messzeiten. [74], [172] Die CLSM-Aufnahmen erfolgten daher ohne Kernfärbung mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm zur Erzeugung des Fluoreszenzsignals vom Europium und teilweise bei gleichzeitiger Anregung mit 488 nm zur Erzeugung eines Transmissionsbildes der Zelle. Die Nanokristalle konnten somit in den Zellen dargestellt und lokalisiert werden. Abbildung 53 und Abbildung 54 zeigen die CLSM-Aufnahmen der mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ markierten A549-Zellen. Das Fluoreszenzsignal des Eu^{3+} wurde in diesen Aufnahmen grün eingefärbt. Die Aufnahmen in Abbildung 53 (B) und Abbildung 54 (A) und zeigen deutlich, dass in Bereichen, in denen sich keine Zellen auf den Deckgläsern befinden, nur sehr schwache Fluoreszenzsignale detektiert wurden. Intensivere Fluoreszenzsignale waren im Zytosol der Zellen erkennbar, vornehmlich lokalisiert um den Zellkern. Zur besseren Darstellung der Verteilung der Nanokristalle wurde zusätzlich ein räumlich aufgelöstes Emissionsspektrum aufgenommen (Abbildung 54, B).

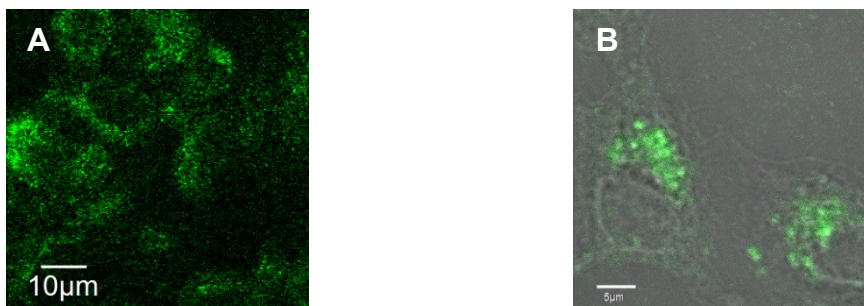


Abbildung 53: CLSM-Aufnahmen von markierten A549 Zellen mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen (10 pmol Ln^{3+} /Zelle, 24 h Inkubation) mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. A: Fluoreszenzaufnahme bei $\lambda_{\text{exc}}=355$ nm. B: Überlagerung von Transmissions- und Fluoreszenzaufnahme durch Messung bei $\lambda_{\text{exc}}=355$ nm und 488 nm.

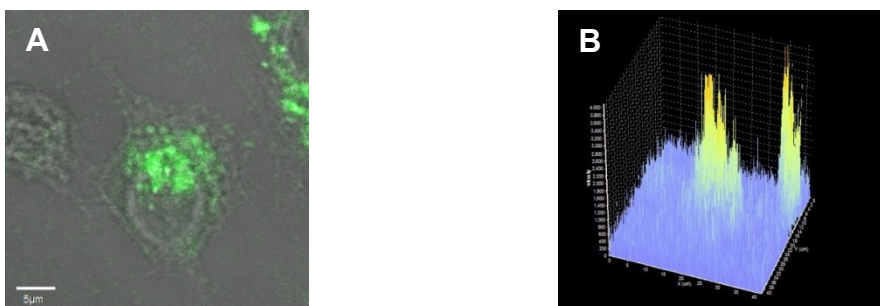


Abbildung 54: A: CLSM-Aufnahme von markierten A549 Zellen mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen (10 pmol Ln^{3+} /Zelle, 24 h Inkubation) bei $\lambda_{\text{exc}}=355$ nm und 488 nm mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. B: Räumlich aufgelöstes Emissionsspektrum der Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 54 (A).

Das räumlich aufgelöste Emissionsspektrum in Abbildung 54 (B) zeigt das entsprechende Intensitätsprofil der Fluoreszenz-Aufnahme in Abbildung 54 (A) und verdeutlicht die Verteilung der Nanokristalle in den Zellen. Im Intensitätsprofil ist ein relativ starkes Untergrundsignal erkennbar, das auf eine geringe Signalintensität der Fluoreszenz hinweist, aber dennoch die Visualisierung der Nanokristalle in den Zellen ermöglichte. Hierbei ist zu beachten, dass analog der Untersuchung der Zell-Phantome mit der PET/MRT Bildgebung (siehe Kapitel 2.4.3) ein Eu^{3+} -Dotierungsgrad von 10 % eingesetzt wurde, um die Eignung der Nanokristalle für die multimodale Bildgebung zu zeigen. Um sicherzustellen, dass das Fluoreszenzsignal auch vom Eu^{3+} stammt und nicht durch Streueffekte hervorgerufen wurde, erfolgte die Messung von Emissionsspektren am CSLM direkt in den A549 Zellen.

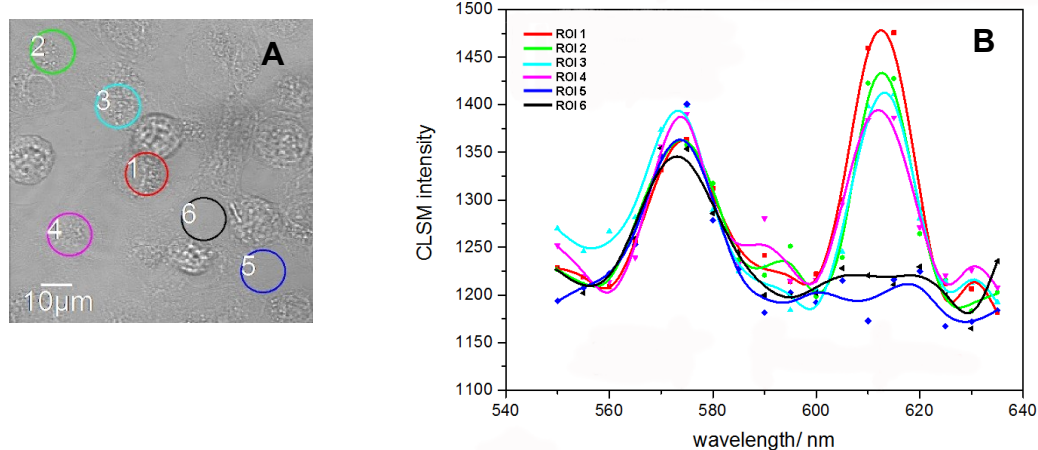


Abbildung 55: A: Mikroskop-Aufnahme im Durchlicht der $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten A549-Zellen (10 pmol Ln^{3+} /Zelle, 24 Inkubation) mit ROI's (engl. *region of interest*) innerhalb und außerhalb der Zellen für die Messung von Emissionsspektren. B: Emissionsspektren der ROI's von mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop nach Anregung mit $\lambda_{\text{exc}}=355$ nm.

Abbildung 55 (B) zeigt die Emissionsspektren von den Abbildung 55 (A) definierten ROI's (engl. *region of interest*). Die Emissionsspektren der ROI's innerhalb der Zellen (ROI 1-4) zeigten bei ca. 612 nm intensive Banden, während die Spektren für die ROI's außerhalb der Zellen (ROI 5-6) keine Emission bei 612 nm zeigten. Die Bande bei 612 nm kann daher der typisch roten Lumineszenz des Eu^{3+} für den $^5\text{D}_0$ - $^7\text{F}_2$ Übergang zugewiesen werden. [173] Für alle ROI's inner- und außerhalb der Zellen wurde in den Emissionsspektren jeweils eine zweite Bande bei ca. 575 nm detektiert. Diese Bande findet sich nicht im Emissionsspektrum des Eu^{3+} wieder (siehe Kapitel 2.3.4, Abbildung 44). Da die Banden bei 575 nm sowohl in den ROI's ohne Zellen als auch innerhalb der

Zellen detektiert wurden, handelt es sich hierbei um einen Artefakt. Bei der Anregung können jedoch auch Wechselwirkungen des eingestrahnten Lichts mit den Zellen selbst stattfinden. Diese Wechselwirkungen können zur Reflektion, zur Transmission oder zur Streuung der eingestrahnten Photonen an Zellen und Zellbestandteilen führen sowie zur Lichtabsorption, bei der die aufgenommene Energie in Form von Wärme oder als Fluoreszenz abgegeben wird. [193], [194] Weiterhin wird oft Autofluoreszenz beobachtet, wenn biologische Proben mit UV- oder sichtbaren Licht angeregt werden. [72] Die Wahrscheinlichkeiten, dass diese Effekte auftreten, hängen von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts und vom Zelltyp ab.

Neben den Zellen der Linie A549 wurden ebenfalls die markierten MSCs mit dem CLSM untersucht. Das Fluoreszenzsignal des Eu^{3+} wurde bei den MSCs rot eingefärbt. Abbildung 56 zeigt die Emissionsspektren, die nach Anregung mit $\lambda_{\text{exc}}=355$ nm an verschiedenen Bereichen der Deckgläser inner- und außerhalb der Zellen aufgenommen wurden.

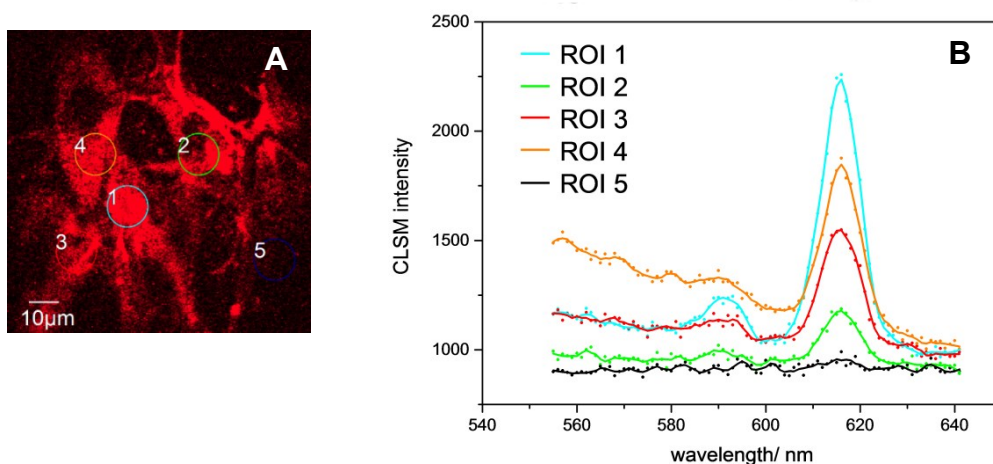


Abbildung 56: A: CLSM-Aufnahme von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ markierten MSCs (10 pmol Ln^{3+} /Zelle, 24 h Inkubation) mit ROI's (engl. *region of interest*) innerhalb und außerhalb der Zellen für die Messung von Emissionsspektren. B: Emissionsspektren der ROI's mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop nach Anregung mit $\lambda_{\text{exc}}=355$ nm.

Die CLSM-Aufnahme der markierten MSCs (Abbildung 56, A) zeigt analog zu den Messungen an den A549-Zellen Fluoreszenzsignale in den Zellen. Im Gegensatz zu den A549-Zellen, in denen die Nanokristalle vornehmlich um bzw. in der Nähe des Zellkerns detektiert wurden, zeigten die Nanokristalle in den MSCs eine Verteilung im gesamten Zytoplasma der Zelle. Für beide Zellarten wurde fluoreszenzmikroskopisch eine

intrazelluläre Akkumulation der Nanokristalle feststellt. Aus der Lokalisation Fluoreszenz-Signale lassen sich die Stadien der Endozytose ableiten. Direkt um den Zellkern sind die Lysosomen lokalisiert, weshalb Signale der Markierungsreagenzien nahe dem Zellkern auf den Endpunkt der Endozytose hinweisen und die Verteilung im Zytoplasma einen frühen Zeitpunkt der Endozytose zeigt. [195]

Die gemessenen Emissionsspektren in den MSCs (Abbildung 56, B) zeigten bei ca. 618 nm die charakteristische Bande für die rote Lumineszenz des Eu^{3+} , die im Vergleich zu den A549-Zellen zu leicht höheren Wellenlängen verschoben war. Vergleicht man die CLSM-Intensität auf der y-Achse der Emissionsspektren von den MSCs mit der in den Spektren von den A549-Zellen (Abbildung 55, B) wurde bei den MSCs eine bis zu 40 % höhere Intensität bei der Emission gemessen. Bei der Quantifizierung der Zellmarkierung (siehe Kapitel 2.4.1) sowie bei der Analyse der Zell-Phantome (siehe Kapitel 2.4.3) wurde ebenfalls eine erhöhte Aufnahme der Nanokristalle von den MSCs im Vergleich zu den A549-Zellen festgestellt. Zusammenfassend wurde mit den CLSM-Aufnahmen die Markierung der Zellen mit den Nanokristallen eindeutig nachgewiesen und ihre Eignung für die optische *in vitro* Bildgebung gezeigt. Die Durchlichtaufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Kapitel 2.4.1, Abbildung 50) deuteten bereits darauf hin, dass die mikroskopisch sichtbaren Granula der Zellen einer erfolgreichen Markierung mit den Nanokristallen zugeordnet werden können.

2.4.5 Bildgebung der Zellmarkierung mit der LA-ICP-MS

Die Bildgebung der Elementverteilungen (Bioimaging) nach der Markierung von A549-Zellen und MSCs mit $\text{Eu}:\text{GdVO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen, mit $\text{DOTA}(\text{Gd}^{3+})$ -funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimern und mit der Referenzsubstanz Magnevist[®] wurde mit der Laser-Ablation(LA)-ICP-MS untersucht. Die experimentelle Durchführung zur Zellmarkierung ist in Kapitel 4.1.13 und deren Messung mit der LA-ICP-MS ist in Kapitel 4.1.16 beschrieben. Für die analytische Bewertung der Zellmarkierung wurden die eingesetzten Konzentrationen, die Inkubationsdauer und die Geräteeinstellungen am Lasersystem optimiert, um Aufnahmen mit hoher Auflösung und guter Qualität zu erhalten. Die Auflösung wird bei der LA-ICP-MS von der gewählten Laser-Spotgröße und der Scan-Geschwindigkeit bestimmt und ist limitiert durch die Empfindlichkeit der zu analysierenden Elemente. [196] Am Lasersystem wurden verschiedene Parameter wie die Laserenergie, Frequenz, und Scan-Geschwindigkeit

variiert, um die Zellen komplett zu ablatieren ohne Probenmaterial von benachbarten Spots mitzuführen. Die durchschnittliche Analysendauer für die Bildgebung der Elementverteilung in einer Zelle betrug bei Messungen mit 4 μm Laser-Spotgröße, abzüglich der Herstellung der Messbereitschaft der Geräte, ca. eine halbe Stunde, womit die Leistungsfähigkeit der Methode unterstrichen wird. Zur Darstellung der Zellkerne in den LA-ICP-MS Aufnahmen wurden die Zellen nach der Markierung mit den Testsubstanzen mit einem Ir-Interkalator behandelt. Der Interkalator schiebt sich zwischen die Basenpaare in die Zellkern-DNA und ermöglicht über die Detektion des ^{193}Ir -Signals die Lokalisation der Zellkerne in den LA-ICP-MS Aufnahmen. In den Tabellen 4-9 ist eine Auswahl der elementmikroskopischen Aufnahmen nach der Zellmarkierung gezeigt. Die Aufnahmen nach der Markierung mit den $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA Nanokristallen sind für die A549-Zellen in Tabelle 4 und für die MSCs in Tabelle 5 gezeigt. Nach der Zellmarkierung mit den Nanokristallen konnte mit Auflösungen von 25 μm , 12 μm , 6 μm und 4 μm Laser-Spotgröße gemessen werden. Die elementmikroskopischen Aufnahmen mit Auflösungen von 6 μm und 4 μm Laser-Spotgröße sowie die der Kontroll-Zellen mit einer Auflösung von 12 μm Laser-Spotgröße sind in Tabelle 4-5 nach Messung der ^{193}Ir - und ^{158}Gd -Signale gezeigt. Die Aufnahmen mit Auflösungen von 25 μm und 12 μm Laser-Spotgröße sowie die Aufnahmen nach Messung der ^{153}Eu und ^{51}V -Signale sind im Anhang (Kapitel 4.2.5, Tabelle 23-26) zusammengestellt. Nach der Zellmarkierung waren nur bei den Nanokristallen Aufnahmen bis zu einer Auflösung von 4 μm Laser-Spotgröße möglich. Da die ^{158}Gd , ^{153}Eu und ^{51}V -Konzentrationen in den Zellen ausreichend hoch waren, konnten auch bei geringer Laser-Spotgröße, Intensitäten für ^{158}Gd von bis zu 10^5 cps erreicht werden. Bei Spotgrößen >12 μm waren die Intensitäten des Untergrundes relativ stark ausgeprägt. Die Konzentration des Ir-Interkalators war hingegen optimal, um den Zellkern bis zu einer Auflösung von 6 μm Laser-Spotgröße gut sichtbar darzustellen, während untergrundbedingte Störungen gering ausfielen. [4], [197] Bei einer Auflösung von 4 μm Laser-Spotgröße ließen sich die Zellkerne nicht mehr vom Rest der Zellen abgegrenzt darstellen und die ^{193}Ir -Signale verteilten sich über die gesamte Zelle. Die Aufnahmen >4 μm Laser-Spotgröße zeigten jedoch große Übereinstimmungen der ^{158}Gd -, ^{153}Eu - und ^{51}V -Signale mit den ^{193}Ir -Signalen der Zellkerne, was die effiziente Zellmarkierung mit den Nanokristallen belegte. In den Kontroll-Zellen wurden bei den A549-Zellen und den MSCs ausschließlich die Signale des ^{193}Ir -Interkalators detektiert, während die ^{158}Gd -, ^{153}Eu - und ^{51}V -Signalintensitäten vernachlässigbar gering ausfielen.

Tabelle 4: LA-ICP-MS Aufnahmen von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten A549 Zellen nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{193}Ir und ^{158}Gd . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s.

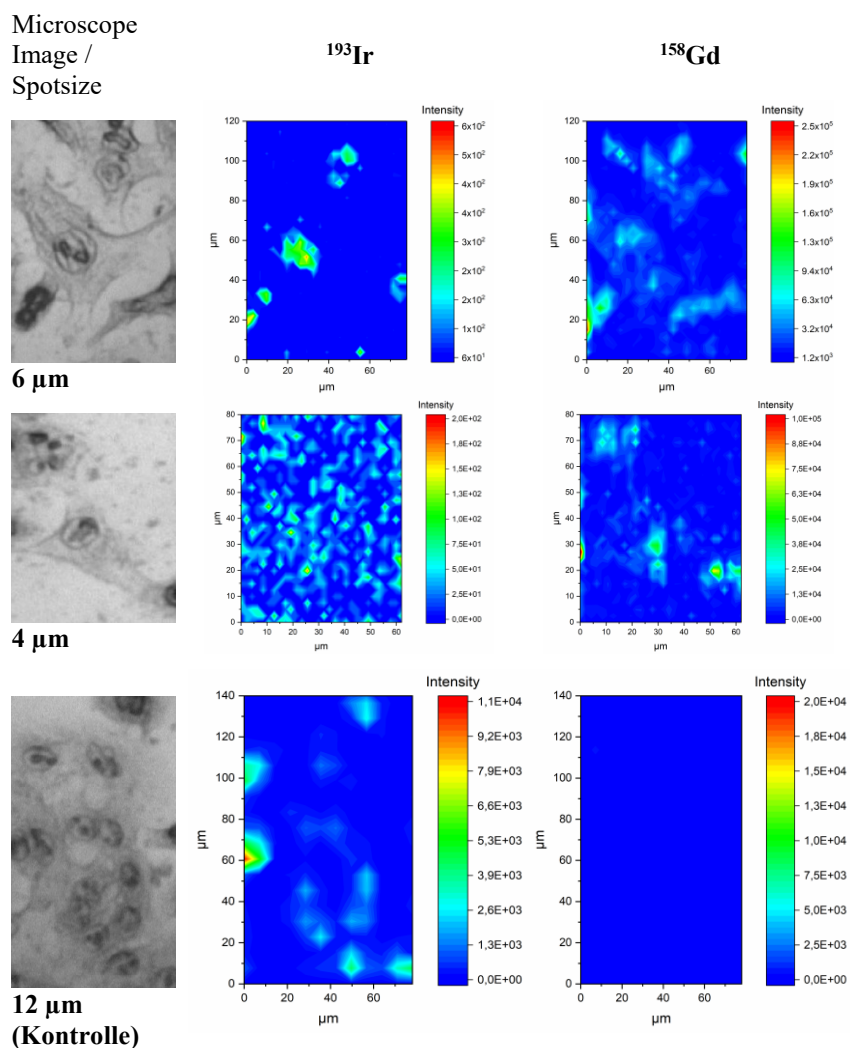
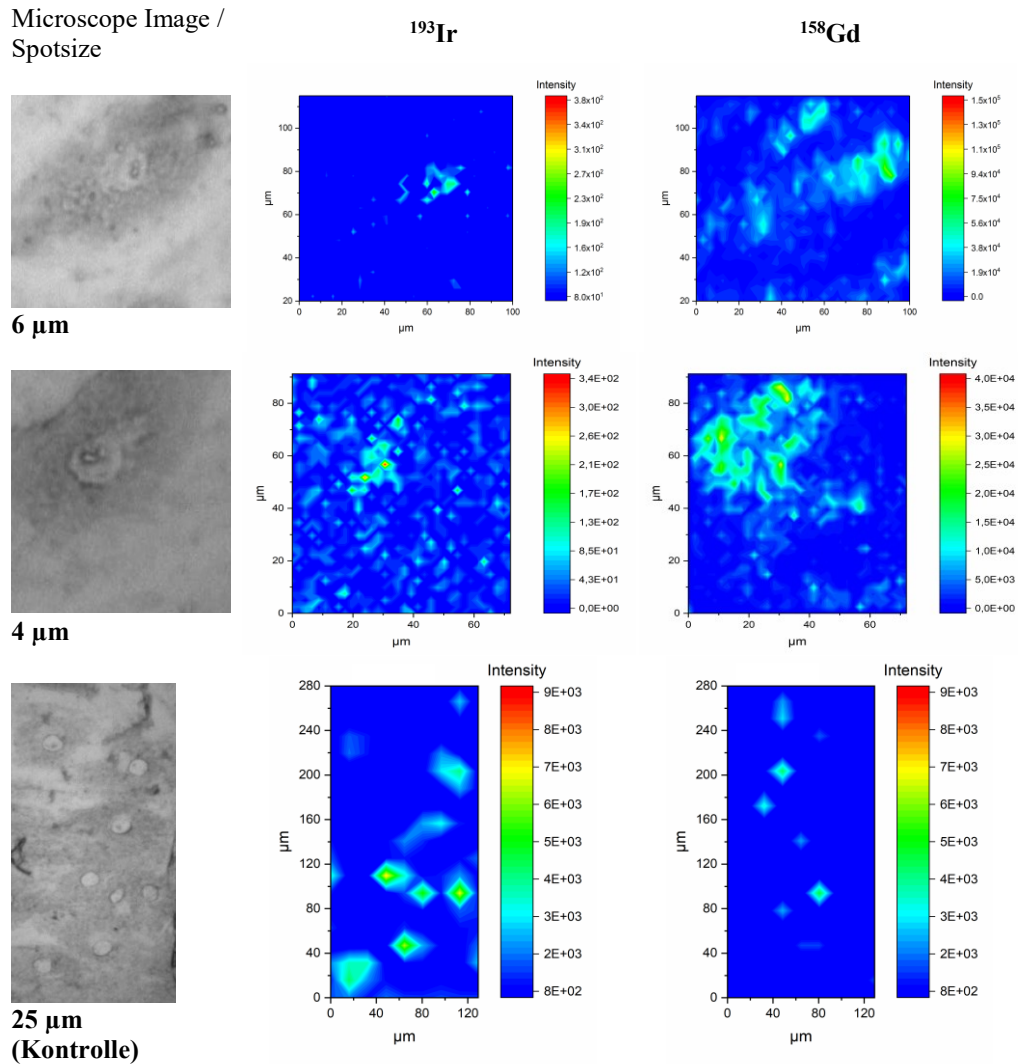


Tabelle 5: LA-ICP-MS Aufnahmen von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten MSCs nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{193}Ir und ^{158}Gd . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s.



Neben der bereits vorgestellten MRT-Bildgebung von Zell-Phantomen (siehe Kapitel 2.4.3) sowie der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (siehe Kapitel 2.4.4) konnte nun auch die Aufnahmen mit der LA-ICP-MS die effiziente Zellmarkierung mit den Nanokristallen zeigen. Der Vergleich der Morphologie der A549-Zellen und der MSCs nach der Markierung mit den Nanokristallen zeigte keine Unterschiede zu den Kontrollzellen. Somit wurde ergänzend zum MTT-Test bestätigt, dass die Zellmarkierung mit den Nanokristallen die Zellviabilität nicht beeinflusst (siehe Kapitel 2.3.6).

In den Tabellen 6-7 sind Übersichten der elementmikroskopischen Aufnahmen nach Markierung der A549-Zellen und der MSCs mit der Referenzsubstanz Magnevist[®] gezeigt. Neben der deutlichen Darstellung der Zellkerne zeigten die Aufnahmen wesentlich schwächere ¹⁵⁸Gd-Signalintensitäten als nach der Zellmarkierung mit den Nanokristallen und folglich eine weniger effiziente Zellmarkierung. Bei der Messung mit 12 µm Laser-Spotgröße waren die ¹⁵⁸Gd-Signalintensitäten nach der Markierung der MSCs mit Magnevist[®] um bis zu drei Größenordnungen geringer als nach der Markierung mit den Nanokristallen bei Messung mit gleicher Laser-Spotgröße. Bei Messungen <12 µm Laser-Spotgröße waren nach der Markierung mit Magnevist[®] keine ¹⁵⁸Gd-Signale mehr detektierbar. Die Aufnahmen nach Messung mit 25 µm Laser-Spotgröße sind im Anhang (Kapitel 4.2.5), in Tabelle 27 und Tabelle 28, für beide Zellarten zusammengestellt.

Tabelle 6: LA-ICP-MS Aufnahmen von Magnevist[®] markierten A549 Zellen nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln³⁺/Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ¹⁹³Ir und ¹⁵⁸Gd. Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s.

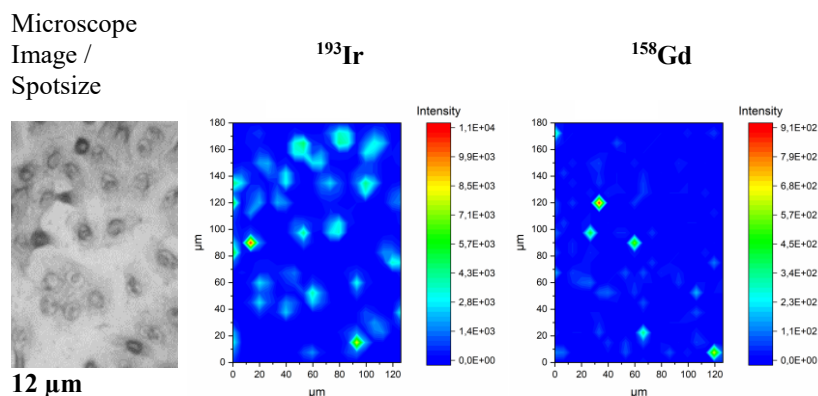
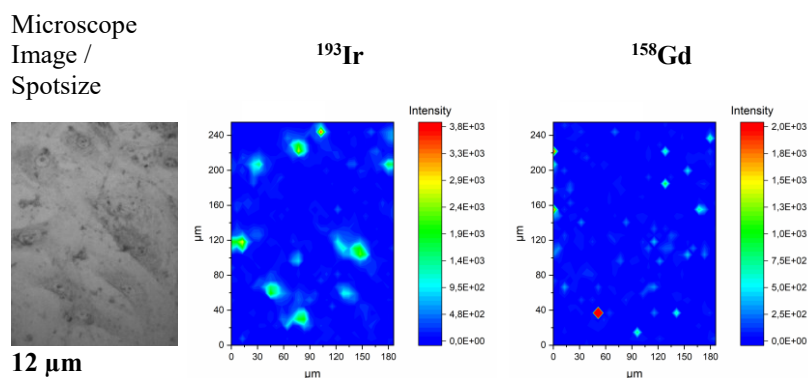


Tabelle 7: LA-ICP-MS Aufnahmen von Magnevist[®] markierten MSCs nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln³⁺/Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ¹⁹³Ir und ¹⁵⁸Gd. Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s.



Die Tabellen 8-9 zeigen schließlich die elementmikroskopischen Aufnahmen nach der Zellmarkierung von A549-Zellen und MSCs mit den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimern mit einer Auflösung von 12 μm Laser-Spotgröße. Analog der Zellmarkierung mit Magnevist[®] war $<12 \mu\text{m}$ Laser-Spotgröße keine Messung der ^{158}Gd -Signale mehr möglich. Auffällig bei den A549-Zellen war nach der Markierung mit den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimern (Tabelle 8) die stark veränderte Morphologie der Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Tabelle 4). Eine Veränderung der Zell-Morphologie wurde nach der Markierung mit den Nanokristallen für beide Zellarten (Tabelle 4-5) nicht beobachtet. Aus der veränderten Zell-Morphologie lässt sich auf zytotoxische Effekte durch die Dendrimere schließen. Zytotoxische Effekte werden vor allem bei kationischen Dendrimern beobachtet, wohingegen sich anionische Dendrimere als biokompatibel erwiesen haben. [198] Die veränderte Zell-Morphologie kann ein Hinweis darauf sein, dass die primären Aminogruppen des kationischen G5-PAMAM Dendrimers nicht vollständig funktionalisiert wurden. Nach der Markierung der MSCs mit den Dendrimern (Tabelle 9) war die Morphologie der Zellen jedoch weniger stark verändert. Andererseits war die Sichtbarkeit vesikulärer Strukturen in den Mikroskop-Aufnahmen der MSCs stärker ausgeprägt als nach der Markierung mit den Nanokristallen (Tabelle 5). Trotzdem wurden nach der Markierung mit den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimere Signalintensitäten für ^{158}Gd bei Messung mit 12 μm Laser-Spotgröße von bis zu 10^6 cps erreicht. Die Signalintensitäten verteilten sich jedoch bei beiden Zellarten wesentlich schlechter über die gesamten Zellen hinweg als nach der Markierung mit den Nanokristallen.

Tabelle 8: LA-ICP-MS Aufnahmen von DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM markierten A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{193}Ir und ^{158}Gd . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s.

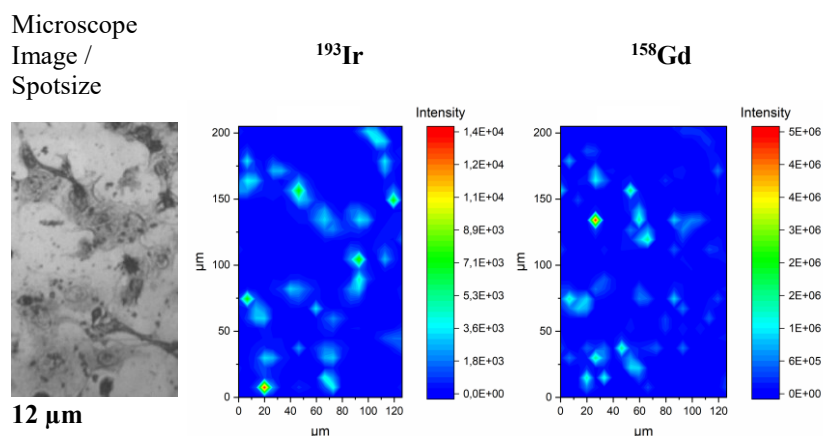
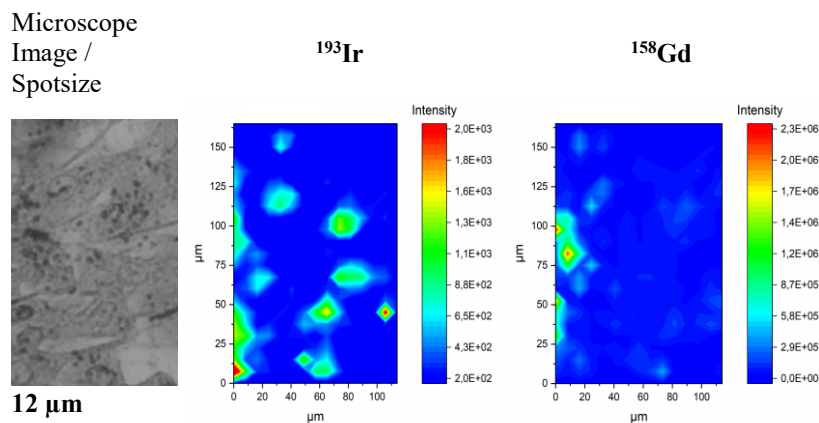


Tabelle 9: LA-ICP-MS Aufnahmen von DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten G5-PAMAM markierten MSCs nach 24 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{193}Ir und ^{158}Gd . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s.



Der direkte Vergleich aller elementmikroskopischen Aufnahmen verdeutlicht die bessere Eignung der Nanokristalle für die Zellmarkierung im Vergleich zu den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten Dendrimern und zum Magnevist[®]. Mit den Nanokristallen wurde nicht nur die höchste Auflösung bei der Bildgebung der Elementverteilung mit der LA-ICP-MS erreicht, sie eignen sich auch prinzipiell für einen multiparametrischen Ansatz mit der ICP-MS. Multiparametrische Ansätze verlangen eine Verschlüsselung der Markierungsreagenzien (Barcoding), was aufgrund der reproduzierbaren Dotierung der Nanokristalle mit verschiedenen Lanthanoiden sowie der simultanen Detektion der ^{158}Gd -, ^{153}Eu - und ^{51}V -Signale erreicht werden kann. Anhand der gemessenen ^{158}Gd -, ^{153}Eu -Signale aus den Datensätzen der LA-ICP-MS wurde überprüft, ob man ebenfalls Rückschlüsse auf den Dotierungsgrad der eingesetzten Nanokristalle schließen kann. Die Nanokristalle wären somit nicht mehr nur über ihr Dotierungselement in der LA-ICP-MS unterscheidbar, sondern zusätzlich über den vorliegenden Dotierungsgrad. Für die Berechnung des Dotierungsgrades wurde aus den Datensätzen der LA-ICP-MS Messungen mit einer Auflösung von 4 μm Laser Spot Size für jede ablatierte Linie die Fläche unter den Peaks nach Messung der ^{153}Eu - und ^{158}Gd -Signale integriert und über das Verhältnis beider Flächen der Eu^{3+} -Dotierungsgrad bestimmt. Abbildung 57 zeigt exemplarisch die ^{153}Eu - und ^{158}Gd -Intensitäten des Linienscans Nr. 14 aus dem Datensatz der mit Nanokristallen markierten A549-Zellen bei 4 μm Laser Spot Size.

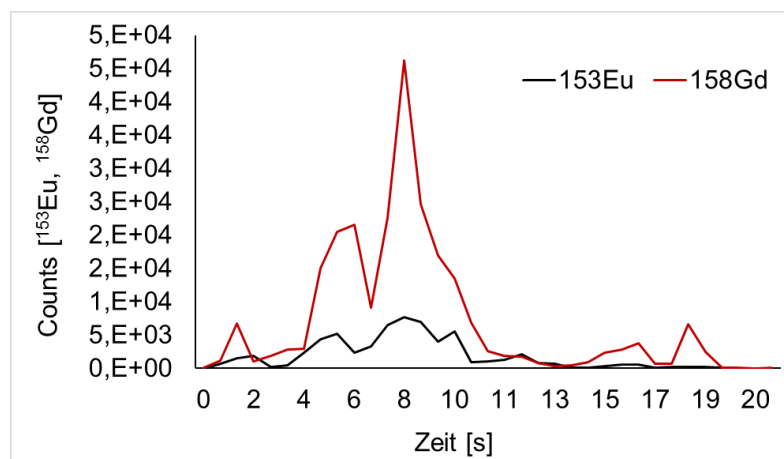


Abbildung 57: Auswertung der Signalintensitäten [cps] von Linienscan Nr. 14 aus dem Datensatz einer LA-ICP-MS Messung mit 4 μm Laser-Spotgröße von markierten A549-Zellen mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen. Die AUC (Area Under the Curve) beträgt für $^{153}\text{Eu}=3,78 \times 10^7$ und für $^{158}\text{Gd}=1,46 \times 10^8$, woraus sich nach Umrechnung der Integrale auf die natürliche Häufigkeit der Elemente ein Eu^{3+} -Dotierungsgrad für Linienscan Nr. 14 von 11,0 % ergibt.

Bei der Berechnung des Dotierungsgrades über die Signalintensitäten der beiden Isotope ^{153}Eu und ^{158}Gd muss allerdings berücksichtigt werden, dass man über das Isotopenverhältnis zunächst auf die natürliche Häufigkeit der Elemente umrechnen muss (Häufigkeit $^{153}\text{Eu}=52,2\%$, Häufigkeit $^{158}\text{Gd}=24,84\%$). Auf diese Weise erhält man nach Auswertung aller Linienscans (30 Linienscans) für die LA-ICP-MS Messung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ markierten A549-Zellen mit 4 μm Laser Spot Size einen mittleren Eu-Dotierungsgrad von 10,5 % mit einem RSD von 21,4 %. Für die, mit $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ markierten, MSCs ergibt sich nach Auswertung der Daten aus der LA-ICP-MS Messung mit 4 μm Laser Spot Size (33 Linienscans) ein mittlerer Eu-Dotierungsgrad von 11,2 % mit einem RSD von 22,9 %. Der Eu-Dotierungsgrad der eingesetzten Nanokristalle von 10 % wurde folglich nach den LA-ICP-MS Messungen der markierten Zellen wiedergefunden. Zum eindeutigen Nachweis des ermittelten Dotierungsgrades wurden die Nanokristalle aus dem gleichen Reaktionsansatz, wie sie für die Zellmarkierung verwendet wurden, mit der Flüssigmessung am ICP-MS (iCAP) erneut analysiert. Hierfür wurden sechs Proben der $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle genommen, die sechsmal aufgeschlossen und am iCAP analysiert wurden. Nach Auswertung der Signalintensitäten ergab sich für die Nanokristalle ein mittlerer Eu-Dotierungsgrad von 10,2 % mit einem RSD von 0,6 %. Die relativen Standardabweichungen zeigen, dass die Abweichungen der einzelnen Messungen untereinander in den biologischen Matrices bei den LA-ICP-MS Messungen wesentlich

größer ausfallen als bei der Flüssigmessung. Bei der LA-ICP-MS werden die Ergebnisse zusätzlich von der Laserenergie und dem effektiven Proben-transport von der Lasereinheit zum ICP-MS beeinflusst. Außerdem ist die Matrixlast bei den zellulären Proben wesentlich höher, wodurch mehr spektrale und nichtspektrale Interferenzen auftreten können. Bei Berechnung des mittleren Dotierungsgrades über die Auswertung >30 Linienscans nach den Messungen mit der LA-ICP-MS konnte der Dotierungsgrad jedoch eindeutig dem bestimmten Wert nach Aufschluss und Flüssigmessung der Nanokristalle zugeordnet werden. Dies ermöglicht prinzipiell die Zuordnung einer Metallmarkierung über das Verhältnis zweier (oder mehrerer) Dotierungen, was die Multiplexfähigkeit der Nanokristalle mit der LA-ICP-MS um ein Vielfaches erweitert würde.

2.5 Konjugation von Nanokristallen an Antikörper

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einer Konjugation der Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle an Antikörper zur Detektion von Biomarkern in Gewebeschnitten mittels anorganischer induktiv gekoppelter Plasma Massenspektroskopie (ICP-MS) dargestellt. Als Modellantikörper zur Etablierung eines geeigneten Kopplungsverfahrens wurde polyklonales anti-BSA (*anti-Bovine Serum Albumin*) eingesetzt. Polyklonale Antikörper können im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern mehrere Epitope des relevanten Antigens erkennen, binden jedoch auch oft unspezifisch. [131] Als Puffersysteme für die Konjugationen der Nanokristalle an anti-BSA wurden PBS pH 7,4 und 0,1 M MES pH 5,5 verwendet. Nach Aktivierung der Carboxygruppen im MES-Puffer wurde der pH-Wert nach Zugabe des Antikörpers auf pH 7,4 eingestellt. Somit fanden alle Konjugationen bei neutralem pH-Wert statt und die Nukleophilie der Aminogruppen der Antikörper wurde gegen die aktivierten Carboxygruppen erhöht. Nach der Konjugation wurden verbliebende reaktive Gruppen mit Glycin abgesättigt, um ein „Crosslinking“ der Nanokristalle zu vermeiden. Die Reaktionskontrolle der Antikörperkonjugation erfolgte mit einem Dot Blot Assay. Hierfür wurde das Antigen BSA in verschiedenen Konzentrationen, zusammen mit PBS und NeutrAvidin als negativ Kontrollen, auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Nach Inkubation der Membran mit den Antikörper-Konjugaten erfolgte die Analyse der getrockneten Membranen mit der LA-ICP-MS. Bei einer erfolgreichen Konjugation der Nanokristalle an anti-BSA zeigten die BSA-Spots

die entsprechenden Signale, der in den Nanokristallen enthaltenen Elemente. Abbildung 58 zeigt den Dot Blot einer Membran mit einem Antikörper-Konjugat, bei dem die Kopplungsreaktion mit Glycin abgestoppt wurde. Beim Abstoppen der Reaktion mit Glycin, der kleinsten α -Aminosäure, weist die polymere Hülle der Nanokristalle Restladungen auf. Diese Restladungen können zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem markierten Antikörper und einem Gewebe führen und wurden ebenfalls besonders intensiv im Dot Blot Assay beobachtet. Über alle Spots hinweg, auch bei PBS und bei der negativ Kontrolle NeutrAvidin, wurden Signale der Lanthanoide Gadolinium und Europium detektiert.

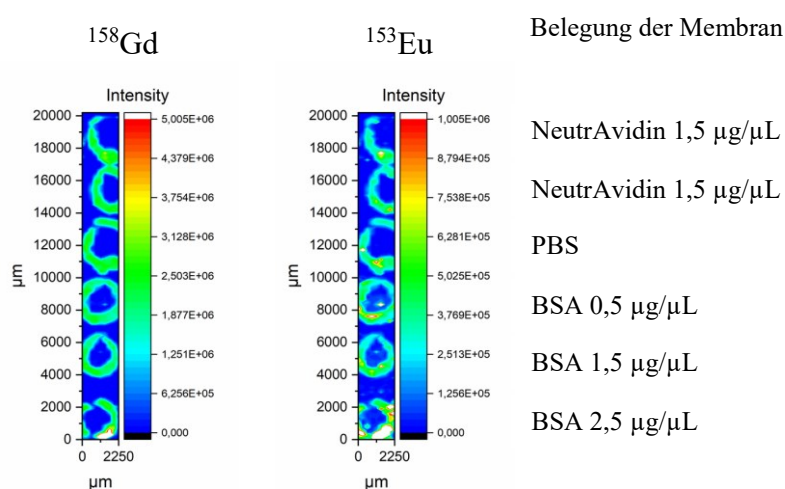


Abbildung 58: Überprüfung der Konjugation von $\text{Eu}_{0,05}\text{Gd}_{0,95}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen an anti-BSA über einen Dot Blot Assay. Die Aktivierung der Carboxygruppen und die Konjugation der Nanokristalle an die Antikörper erfolgte in 1x PBS pH 7,4 mit $\text{COOH}:\text{EDC}=1:1.000$, $\text{EDC}:\text{NHS}=1:1$ und $\text{COOH}:\text{Ab}=100:1$. Für den Dot Blot Assay wurden verschiedene Konzentrationen des Antigens BSA und der Blindwerte (NeutrAvidin und PBS) auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen, die anschließend mit dem Antikörper-Konjugat inkubiert wurde. Die Dot Blot Membran wurde mit der LA-ICP-MS analysiert und die Isotope ^{158}Gd und ^{153}Eu gemessen.

Auffällig ist zudem, dass sich alle Spots als Ringe und nicht als Punkte darstellen. Dieser Effekt wird auch „Kaffeering-Effekt“ genannt, der durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit und die Geometrie der suspendierten Teilchen begründet ist. Besonders sphärische Partikel fließen durch die Kapillarströmung vom Inneren des Tropfens zum Rand und lagern sich dort höher konzentriert ab. [199] Die Reaktionskontrolle der Antikörper-Konjugation mit dem Dot Blot Assay wird durch diesen Effekt aber nicht beeinflusst. Vielmehr mussten die unspezifischen Wechselwirkungen der Nanokristalle mit der Membran unterdrückt werden, um beurteilen zu können, ob es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den

Nanokristallen und dem Antikörper kam. Um dies zu erreichen, wurden die Oberflächenladungen der Nanokristalle in den Antikörper-Konjugaten nach Cruz-Alonso *et al.* [200] mit einem 20-fachem molaren Überschuss an Hydroxylamin abgeschirmt. Abbildung 59 und Abbildung 60 zeigen die Analysen der Dot Blot Membranen, bei denen die Konjugate vor der Inkubation mit dem Antigen mit Hydroxylamin behandelt wurden.

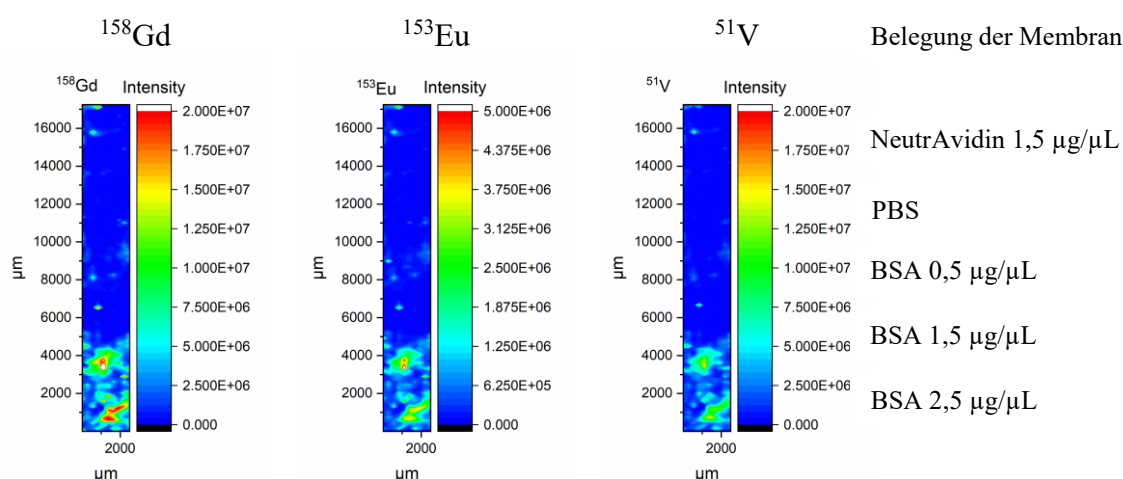


Abbildung 59: Überprüfung der Konjugation von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristallen an anti-BSA über einen Dot Blot Assay. Die Aktivierung der Carboxygruppen erfolgte in $0,1 \text{ M MES pH } 5,5$ und die Konjugation bei $\text{pH } 7,4$ mit $\text{COOH} : \text{EDC} = 1 : 500$, $\text{EDC} : \text{NHS} = 1 : 1$ und $\text{COOH} : \text{Ab} = 100 : 1$. Nach der Reaktion folgte die Abschirmung der negativen Oberflächenladungen der Antikörper-Konjugate mit 20-fachem molarem Überschuss Hydroxylamin. Für den Dot Blot Assay wurden verschiedene Konzentrationen des Antigens BSA und der Blindwerte (NeutrAvidin und PBS) auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen, die anschließend mit dem Antikörper-Konjugat inkubiert wurde. Die Dot Blot Membran wurde mit der LA-ICP-MS analysiert und die Isotope ^{158}Gd , ^{153}Eu und ^{51}V gemessen.

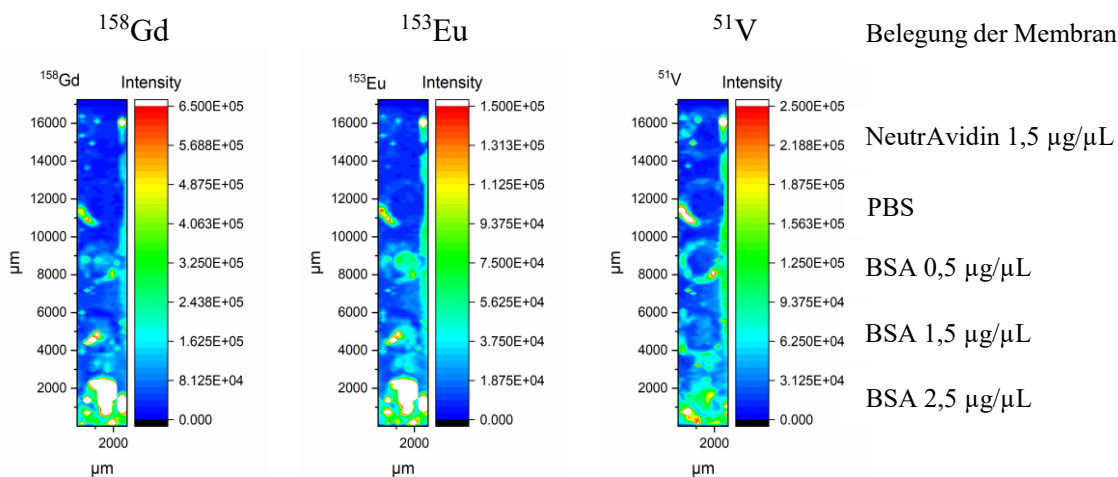


Abbildung 60: Überprüfung der Konjugation von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA Nanokristallen an anti-BSA über einen Dot Blot Assay. Die Aktivierung der Carboxygruppen und die Konjugation der Nanokristalle an die Antikörper erfolgte in 1x PBS pH 7,4 mit $\text{COOH} : \text{EDC} = 1 : 500$, $\text{EDC} : \text{NHS} = 1 : 1$ und $\text{COOH} : \text{Ab} = 100 : 1$. Nach der Reaktion folgte die Abschirmung der negativen Oberflächenladungen der Antikörper-Konjugate mit 20-fachem molarem Überschuss Hydroxylamin. Für den Dot Blot Assay wurden verschiedene Konzentrationen des Antigens BSA und der Blindwerte (NeutrAvidin und PBS) auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen, die anschließend mit dem Antikörper-Konjugat inkubiert wurde. Die Dot Blot Membran wurde mit der LA-ICP-MS analysiert und die Isotope ^{158}Gd , ^{153}Eu und ^{51}V gemessen.

Der Blot in Abbildung 59 wurde mit einem Antikörper-Konjugat inkubiert, bei dem die Carboxygruppen zunächst in 0,1 M MES pH 5,5 aktiviert wurden und die Kopplung an den BSA-Antikörper bei pH 7,4 erfolgte. Bei den Blots in Abbildung 60 erfolgte die Aktivierung und die Kopplung in PBS pH 7,4. Beide Blots zeigen nach der Behandlung der Konjugate mit Hydroxylamin eine deutlich geringe Signalintensität bei den Spots der Blindwerte. Nach der Antikörper-Konjugation in 0,1 M MES war der 20-fache molare Überschuss an Hydroxylamin ausreichend, um die negativen Oberflächenladungen abzuschirmen, da nahezu kein Signal bei den Blindwerten detektiert wurde. Die Konjugate nach Kopplung in PBS bei pH 7,4 zeigten hingegen noch unspezifische Wechselwirkungen. Jedoch wurden deutlich höhere Signalintensitäten bei den Antigen-Spots als bei den Blindwerten detektiert. Durch Optimierung des molaren Überschusses an Hydroxylamin könnten die unspezifischen Wechselwirkungen weiter reduziert werden. Insgesamt wurde über die gewählte EDC/NHS Chemie eine schonende Antikörper-Kopplung gewährleistet, deren Konjugate sich für weitere Untersuchungen mit der ICP-MS-basierten Immunohistochemie, aber auch für die CyTOF-Massenzytometrie eignen.

3 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten makromolekulare Markierungsreagenzien durch DOTA(Gd^{3+})-Funktionalisierung kommerziell verfügbarer G5-PAMAM Dendrimere und nanopartikuläre Markierungsreagenzien auf Basis von Gadoliniumorthovanadat (GdVO_4) erfolgreich synthetisiert werden. Für die Darstellung des makromolekularen Reagenzes wurde das Dendrimer G5-PAMAM über mehrere Reaktionsschritte funktionalisiert, um möglichst viele Gadolinium-Ionen je Dendrimer zu komplexieren. Zunächst wurde das kationische Polymer partiell acetyliert, um die Löslichkeit in wässrigen Systemen zu verbessern und zytotoxische Effekte zu verringern. [55], [57] Die Aufnahme von ^1H -NMR Spektren bestätigte die erfolgreiche Acetylierung von ca. 50 % der primären Aminogruppen in der letzten Generation der Dendrimere. Für die Konjugation des Chelators DOTA wurden die beiden bifunktionellen Linker DOTA-NHS und DOTA-NCS untersucht. Nach anschließender Gadolinium-Komplexierung erfolgte die Untersuchung der Reaktionsprodukte mit der Gelpermeationschromatographie und mit der ICP-MS Analytik. Nach Optimierung einzelner Syntheseschritte konnte mit dem bifunktionellen Linker DOTA-NHS eine Ausbeute von 22 Gadoliniumionen je Dendrimer erzielt werden. Ein zweites, nanopartikuläres Reagenz wurde über eine Solvothermal-Synthese in einem Gemisch aus Ethylenglykol und Wasser bei 120°C erhalten, bei der $\text{Ln}:\text{GdVO}_4$ -Nanokristalle ($\text{Ln}=\text{Eu}, \text{Tb}$) mit einer funktionellen Polyacrylsäure(PAA)-Hülle dargestellt wurden. Nach Untersuchung der optimalen Konzentrationen der Edukte in verschiedenen Ethylenglykol-Wasser-Gemischen wurden mit Polyacrylsäure funktionalisierte Nanokristalle mit hydrodynamischen Durchmessern von 60 ± 5 nm, Partikelgrößen von $36,7\text{ nm}\pm 7,2$ nm, Polydispersitätsindizes von 0,1 und Ausbeuten von über 80 % erhalten. Die Synthese der Nanokristalle zeichnete sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus und die Dotierung der Nanokristalle mit verschiedenen Dotierungselementen und -anteilen zeigte die prinzipielle Multiplexfähigkeit der Nanokristalle in der ICP-MS. Nach dem Up-Scaling der Synthese auf das 10-fache Reaktionsvolumen wurden Nanokristalle mit unveränderter hydrodynamischer Größe erhalten, wodurch sich der Herstellungsaufwand deutlich verringerte. Mit verschiedenen analytischen Methoden wie der Transmissionselektronenmikroskopie, der Fluoreszenz- und Infrarotspektroskopie sowie der Röntgenbeugung wurden die Nanokristalle eingehend charakterisiert. Die makromolekularen und nanopartikulären

Markierungsreagenzien zeichneten sich durch gute Bioverträglichkeiten und r_1 -Relaxivitäten aus, was ihr Potential für die Anwendung als präklinische MRT-Kontrastmittel belegte. Für die Nanokristalle wurde eine r_1 -Relaxivität von $2,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt und für die Gd^{3+} -funktionalisierten Dendrimere eine r_1 -Relaxivität von $11,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die funktionalisierten Dendrimere weisen somit eine mehr als dreifach höhere r_1 -Relaxivität als das kommerzielle Kontrastmittel Magnevist[®] auf. Für beide synthetisierten Reagenzien kann man davon ausgehen, dass sie insbesondere bei Anwendungen als präklinische „blood-pool“ Kontrastmittel zu einer Kontrastverstärkung in der MRT führen, da sie länger im Blut zirkulieren als die zugelassenen niedermolekularen Kontrastmittel (z.B. Dotarem[®]) und sich somit besser für Angiographien eignen. In Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung konnte das nanopartikuläre Reagenz, unter Beibehaltung seiner kolloidalen Stabilität, in geeigneter Weise formuliert und sterilisiert werden. Die Stabilität der autoklavierten Formulierungen wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten nachgewiesen. Nachdem der Nachweis der Stabilität der Formulierungen auch in Zellkulturmedien gezeigt werden konnte, wurden die synthetisierten Reagenzien und Magnevist[®] erfolgreich für die *in vitro* Zellmarkierung von adhärent wachsenden Lungentumorzellen der Linie A549 und humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe eingesetzt. Die Quantifizierung der Lanthanoide nach der Zellmarkierung zeigte für die Nanokristalle die effizienteste Zell-Aufnahme, gefolgt von den DOTA(Gd^{3+})-funktionalisierten Dendrimern und Magnevist[®]. Nach der Zellmarkierung veranschaulichte die *in vitro* MRT-Bildgebung der Zell-Phantome eine deutlichere Kontrastverstärkung der Zellen nach der Markierung mit den Nanokristallen im Vergleich zur Markierung mit Magnevist[®]. Die Eu^{3+} -dotierten GdVO_4 -PAA Nanokristalle zeigten überdies interessante lumineszierende Eigenschaften, die nach der Zellmarkierung mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht wurden und eine Visualisierung der Nanokristalle in den Zellen ermöglichte. Bei dem Bioimaging mit der LA-ICP-MS erlaubten die Messungen nach der Zellmarkierung mit den Nanokristallen eine Auflösung bis zu $4 \mu\text{m}$ Laser Spot Size, bei denen Intensitäten für ^{158}Gd im Bereich von 10^5 cps erreicht wurden. Die Nanokristalle konnten dementsprechend nach der Zellmarkierung modalitätsübergreifend für die *in vitro* MRT-Bildgebung und für das Bioimaging mit der LA-ICP-MS eingesetzt werden. Die LA-ICP-MS Messungen wurde ebenfalls dazu genutzt, den prinzipiellen Einsatz der Nanokristalle für Multiplexing-Anwendungen zu überprüfen. Hierfür wurden nach der LA-ICP-MS Messung der markierten Zellen, die

Dotierungsgrade der Nanokristalle über die Auswertung der Signalintensitäten der Isotope berechnet. Die ermittelten Dotierungsgrade der Nanokristalle konnten eindeutig dem Dotierungsgrad zugeordnet werden, welcher nach den flüssig ICP-MS Messungen vor der Zellmarkierung bestimmt wurde. Die Nanokristalle können somit nach erfolgreicher Konjugation an Antikörper die simultane Detektion zahlreicher Biomarker an Gewebeschnitten oder Biopsieproben ermöglichen, da über die Auswertung der gemessenen Isotope, die Zuordnung verschiedener Target-Moleküle möglich wird. Somit werden Multiplexanwendungen möglich, die weit über die Anzahl der verfügbaren Lanthanide hinausgehen und auch andere Metalle miteinschließen könnten. Im Gegensatz zu den Nanokristallen waren nach der Zellmarkierung mit den DOTA(Gd³⁺)-funktionalisierten Dendrimeren und Magnevist[®] beim Bioimaging mit der LA-ICP-MS nur Aufnahmen bis zu einer Auflösung von 12 µm Laser Spot Size möglich. Bei dieser Laser Spot Size wurden für die Dendrimere Signalintensitäten im Bereich von bis zu 10⁶ cps für ¹⁵⁸Gd erreicht, während beim Einsatz von Magnevist[®] die Signalintensitäten für ¹⁵⁸Gd nur im Bereich von bis zu 10³ cps lagen. Allgemein zeigten die Dendrimere und Magnevist[®] in den Aufnahmen mit der LA-ICP-MS eine schlechtere Verteilung im Zytoplasma der Zellen als die Nanokristalle. Mit den Nanokristallen wurden hingegen Aufnahmen erhalten, die, auch bei geringen Auflösungen, eine gute Verteilung der Signalintensitäten über die gesamte Zelle hinweg zeigten ohne die Zellviabilität zu beeinflussen. Die untersuchten Nanokristalle erscheinen somit für das Zell-Tracking besonders vielversprechend. Aus der prinzipiellen Eignung der Nanokristalle für Multiplex-Anwendungen resultierte die Motivation zur Etablierung einer geeigneten Synthesevorschrift zur Konjugation der Nanokristalle an Antikörper. Hierfür wurde als Modell-Antikörper polyklonales anti-BSA gewählt, deren Konjugation an die Nanokristalle über einen Dot Blot Assay überprüft wurde. Bei der Konjugation wurden insbesondere die Mengen der Aktivierungsreagenzien optimiert, um ein „Cross-Linking“ zwischen den Nanokristallen zu vermeiden. In den Dot Blot Experimenten zeigten die Konjugate zunächst starke unspezifische Wechselwirkungen mit der Nitrocellulose-Membran, die während der Reaktionskontrolle zum Einsatz kam und durch die negativen Oberflächenladungen der Nanokristalle aufgrund ihrer Polyacrylsäure-Hülle begründet war. Nach Abschirmung der Ladungen mit Hydroxylamin konnten die unspezifischen Wechselwirkungen wesentlich reduziert und die Spezifität der Konjugate gegen das Antigen BSA nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Konjugation der Nanokristalle an Antikörper steht nun dem Einsatz dieser Konjugate für die simultane Detektion

zahlreicher Biomarker für die Immuno-Bildgebung von Gewebeschnitten oder Biopsie-Proben nichts mehr im Wege. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Antikörper-Konjugate der Nanokristalle multiparametrische Ansätze ermöglichen und neben der Anwendung in ICP-MS-basierten Immunoassays, auch für die molekulare *in vivo* MRT-Bildgebung sowie für die CyTOF-Massenzytometrie untersucht werden können, was ihr Anwendungsspektrum maßgeblich erweitert würde. Für die Anwendung der makromolekularen und nanopartikulären Reagenzien als präklinische MRT-Kontrastmittel sind zeitnah entsprechende *in vivo* Versuche geplant.

4 Anhang

4.1 Experimentelle Durchführung

4.1.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure, 2-[(4-isothiocyanatophenyl)methyl]-	DOTA-NCS	B-205-100	Macrocyclics
2,2',2''-(10-(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triaessigsäure	DOTA-NHS	C084	CheMatech
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	DAPI	D1306	ThermoFisher Scientific
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	EDC	E6383	Sigma Aldrich
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure Monohydrat	MES	A1074,0100	AppliChem
1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	1 M HEPES	BW/L0180	Th.Geyer
1 N Natriumhydroxid Maßlösung	1 N NaOH	K021.1	Roth
1 N Salzsäure Maßlösung	1 N HCl	K025.1	Roth
anti-Bovine Serum Albumin Antikörper	anti-BSA Antikörper	SAL-10A	Hölzel Diagnostika
Bovine Serum Albumin (lyophilized powder, ≥ 96 %)	BSA	A2153-10G	Sigma Aldrich
Deuteriumoxid	D ₂ O	2361.1000	Th.Geyer
D-Mannitol	-	M4125	Sigma Aldrich
DMEM low Glucose	-	L0060-500	PAN Biochtech
DMEM with 4,5g/L Glucose	-	P04-04500	PAN Biochtech

Eindeckmedium	Roti [®] -Mount FluorCare	HP19.1	Carl Roth
Eindeckmedium mit DAPI	Roti [®] -Mount FluorCare DAPI	HP20.1	Carl Roth
Essigsäureanhydrid	C ₄ H ₆ O ₃	4483.1	Carl Roth
Ethylenglykol	EG	9516.1	Carl Roth
Europiumnitrat Pentahydrat	Eu(NO ₃) ₃ 5 H ₂ O	207918	Sigma Aldrich
Fetales Kälberserum	FCS	P30-3302	PAN Biochtech
Gadoliniumchlorid Hexahydrat	GdCl ₃ 6 H ₂ O	G7532	Sigma Aldrich
Gadoliniumnitrat Hexahydrat	Gd(NO ₃) ₃ 6 H ₂ O	451134	Sigma Aldrich
Generation 5 Poly(amidoamine) Dendrimers	G5-PAMAM	536709	Sigma Aldrich
Glycin	-	3790.2	Carl Roth
Hydroxylaminhydrochlorid	NH ₂ OH HCl	55459	Sigma Aldrich
Mercaptoethanol	-	4227.3	Carl Roth
Methanol (wasserfrei)	MeOH	322415	Sigma Aldrich
Milchpulver	-	T145.2	Carl Roth
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	A135.1	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	8551.1	Carl Roth
NeutrAvidin	-	31000	Fisher Scientific
N-Hydroxysuccinimid	NHS	130672	Sigma Aldrich
Nitrocellulose Membran Amersham Protran [®] 0,45 µm	NC Membran	WHA10402 506	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd	PFA	0335.2	Carl Roth
Penicillin-Streptomycin	Pen./Strep.	P06-07100	PAN Biotech
Phosphat-gepufferte Salzlösung	DPBS	L0615-500	Biowest
Phosphat-gepufferte Salzlösung	PBS	8435	Chemsolute
Polyacrylsäure	PAA	323667	Sigma Aldrich
Stickstoff	N ₂	-	Air Products
Tetrabutylammoniumacetat	TBAA	SA/335991	Th.Geyer
Thermo Tune B	-	THERMO TUNE B iCAP	Inorganic Ventures
Triethylamin	Et ₃ N	X875.1	Carl Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2 H ₂ O	S4641	Sigma Aldrich

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20	TBS-T	91414-10TAB	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA	-	P10-020100	Pan Biotech
Zitronensäure, wasserfrei	$C_6H_8O_7$	6490.3	Carl Roth

4.1.2 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS)

Die quantitative Bestimmung der Lanthanoid-Gehalte in den synthetisierten Reagenzien erfolgte mit der ICP-MS (iCAP Q, Thermo Scientific™) an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM). Um optimale Bedingungen für die hochempfindlichen Messungen der Elementanalytik zu gewährleisten, befindet sich das ICP-MS im sog. Graubereich der BAM, einem partikelreduzierten Bereich. Die Probenvorbereitung erfolgte daher mit großer Sorgfalt unter der Sterilwerkbank. Von allen Kalibrier- und Probelösungen wurden mindestens 10 mL einer Messlösung in je 15 mL Falcon-Tubes mit 1 %-iger HNO₃ als Lösemittel präpariert, um Querkontaminationen zu vermeiden. Sofern Glasgeräte während der Probenpräparation zum Einsatz kamen, wurden diese zunächst für 24 Stunden in 5 % HNO₃ gelagert und vor ihrer Verwendung gründlich mit Milli-Q gespült. Für die Präparation der Kalibrierlösungen wurden aus den entsprechenden Nitrat- bzw. Chlorid-Salzen der Lanthanoide Gadolinium, Europium und Terbium zunächst je eine Stammlösung hergestellt. Aus den Stammlösungen folgte die weitere Präparation der Kalibrierlösungen. Es wurden mindestens 6 Kalibrierlösungen mit je drei der zu bestimmenden Lanthanoide hergestellt. Die Konzentrationen in den Kalibrierlösungen lagen für Gadolinium im Bereich von 500-10.000 ng/L, für Europium im Bereich von 50-1.000 ng/L und für Terbium im Bereich von 60-1.300 ng/L. Alle Analysen erfolgten mit dem internen Standard Indium (1 g/L in 2-3% HNO₃, ICP Certipur von MERCK). Indium wurde gewählt, da es in den natürlichen Proben nicht enthalten ist, selbst keine Matrix-Effekte erzeugt und ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie die zu bestimmenden Lanthanoide aufweist. [201] Die Konzentration des internen Standards Indium betrug in allen Kalibrier- und Probelösungen 1.250 ng/L, womit die Signalintensitäten [cps] der ¹¹⁵In-Signale im mittleren Bereich der Signalintensitäten für die ¹⁵⁸Gd-Kalibrierlösungen lagen. Die kolloidal vorliegenden Nanokristalle wurden vor der Verdünnung mit 1 %-iger HNO₃ zunächst mit einem Überschuss konzentrierter Salpetersäure aufgeschlossen. Hierfür wurden 50 µL der Partikeldispersion mit 950 µL konzentrierter HNO₃ versetzt, wobei sämtliche Analyten in wässrige Lösung überführt werden konnten. Die weitere Verdünnung der Nanokristall-Proben erfolgte in 15 mL Falcon-Tubes mit 1 %-iger HNO₃. Es folgten üblicherweise zwei weitere Verdünnungen der Aufschlüsse, bei denen die Nanokristall-Proben in einem Volumen von 10 mL, erst 1:200 und anschließend 1:400, verdünnt wurden. Von den DOTA(Gd³⁺)-

funktionalisieren G5-PAMAM Dendrimere wurden im ersten Verdünnungsschritt 100 μL mit 900 μL konzentrierter HNO_3 versetzt. Die beiden weiteren Verdünnungsschritte erfolgten ebenfalls in einem Volumen von 10 mL und betragen üblicherweise erst 1:100 und anschließend 1:200. Die Zugabe des internen Standards erfolgte bei allen Proben während der ersten Verdünnung mit der 1 %-igen HNO_3 . Je nach Dotierungsgrad der Nanokristalle bzw. der Gd^{3+} -Konzentration der funktionalisierten Dendrimere wurden die Verdünnungsschritte gegebenenfalls angepasst. Die präparierten Messlösungen wurden an der BAM mit der ICP-MS analysiert. Vor der Inbetriebnahme des ICP-MS wurde zunächst das Kühlmobil eingeschaltet und Sample und Skimmer Konen auf exakten Sitz sowie auf Ablagerungen oder Deformationen der Konuseintrittsöffnungen kontrolliert. Nachdem die Temperatur am Kühlmobil 18°C erreicht hatte, wurde das Plasma gezündet. Die Einbrennzeit betrug mindestens 15 min währenddessen mit Milli-Q oder 1 %-iger HNO_3 gespült wurde. Die Überprüfung des Gerätes hinsichtlich Empfindlichkeit und massenspektraler Auflösung erfolgte mit einem „Performance-Report“ unter Verwendung der Multielementlösung „Tune B“. Sollte der Performance-Report nicht erfolgreich gewesen sein, wurden Empfindlichkeit und massenspektrale Auflösung mit der „Tune B“-Lösung und dem in der Software hinterlegten Wizard „Autotune“ optimiert. Beim „Autotune“ erfolgte die automatische Optimierung der Torch-Position, des Probengasflusses und der Spannungen an den Linsen des Quadrupol-Massenfilters. Nach erfolgreichem „Autotune“ wurden die Bedingungen für die nachfolgenden Messungen übernommen. Verliefe das „Autotune“ nicht erfolgreich, wurde eine Massekalibration durchgeführt. War auch diese nicht erfolgreich, musste ein Detektor-Setup gemeinsam mit dem Geräteverantwortlichen vorgenommen werden. Nach Massenkalkulation und/oder Detektor-Setup erfolgte jeweils erneut ein „Autotune“. War dieser erfolgreich, konnte mit den Messungen begonnen werden, für die mit dem Autosampler ASX 520 gearbeitet wurde. In der Software „Qtegra“ wurde ein LabBook mit allen zu ermessenden Proben erstellt und die gesamte Sequenz immer zweimal gemessen. Nach der ICP-MS Messung wurde die Linearität des kalibrieren Bereiches überprüft. Hierfür wurden die gemessenen ^{158}Gd -, ^{153}Eu - und ^{159}Tb -Signalintensitäten durch die Signalintensitäten des internen Standards ^{115}In dividiert. Aus den erhaltenen ‚relativen Signalen‘ wurde für jedes Element eine Kalibriergerade erstellt. Die Überprüfung der Linearität erfolgte über die Bestimmung der Quadrate der Korrelationskoeffizienten (R^2). Die Quantifizierung der Lanthanoid-Gehalte erfolgte nur, wenn für alle Kalibriergeraden, Korrelationskoeffizienten $>0,9990$ bestimmt wurden.

Tabelle 10 zeigt die Messparameter für die ICP-MS Analytik und Abbildung 61 zeigt exemplarisch die Kalibriergeraden, die für die Gadolinium-, Europium- und Terbium-Gehaltsbestimmung erhalten wurden.

Tabelle 10: Messparameter für die Messung flüssiger Proben mit der ICP-MS

ICP-MS Parameter	
Massenspektrometer	iCAP Q
Probeneintrag	PFA Zerstäuber
Inlet	High Matrix Inlet „HM“
Sample und Skimmer Conen	Nickel
Injektor-Rohr	2,5 mm

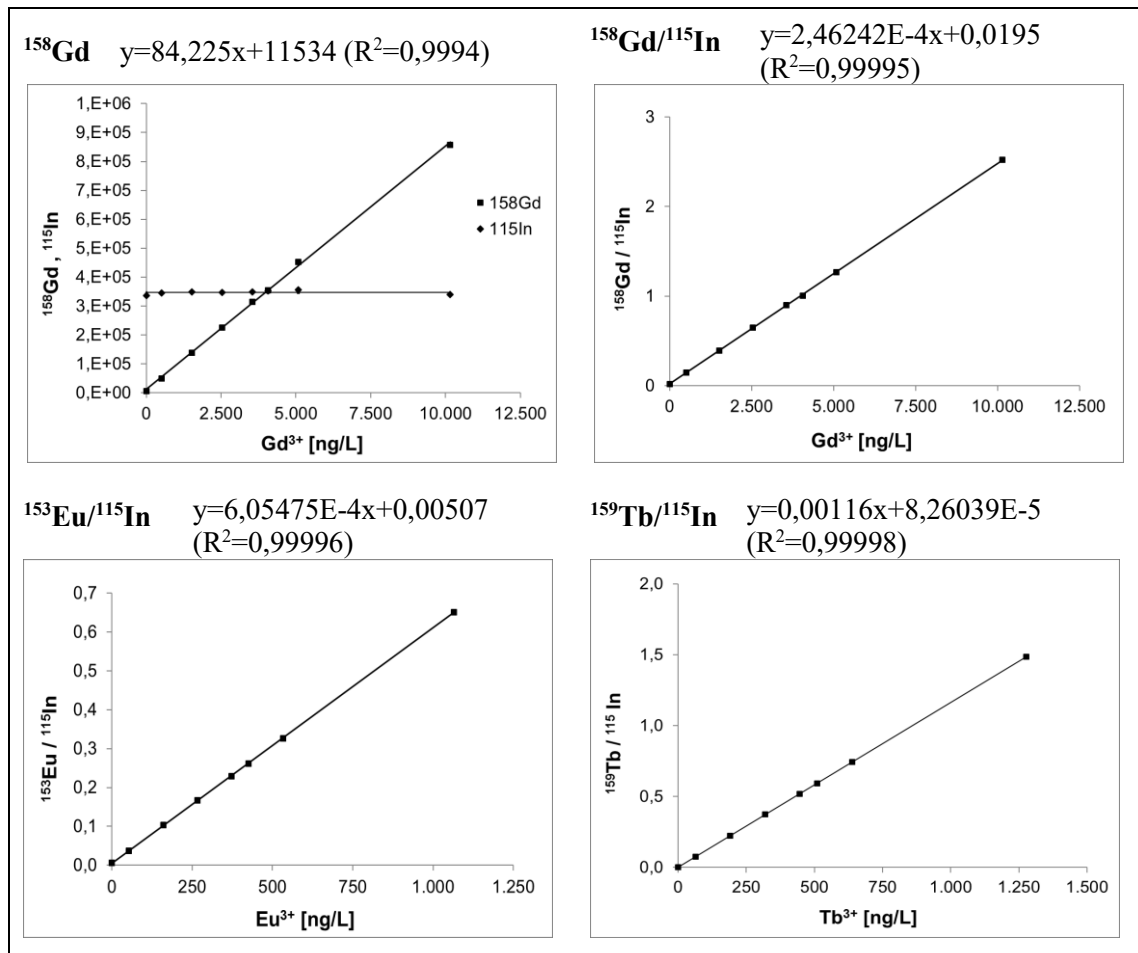


Abbildung 61: Darstellung der Kalibriergeraden für die quantitative ^{158}Gd -, ^{153}Eu - und ^{159}Tb -Bestimmung mit der ICP-MS-Analytik bei Verwendung des internen Standards ^{115}In .

4.1.3 Funktionalisierung von G5-PAMAM-Dendrimeren

Acetylierung von G5-PAMAM

Für die partielle Acetylierung des Dendrimers G5-PAMAM wurden verschiedene Mengen der Edukte untersucht, um einen Acetylierungsgrad von ca. 50 % zu erreichen (siehe Tabelle 11). Hierfür wurden in einem 25 mL Ein-Hals Rundkolben 0,104 g (3,59 μmol) G5-PAMAM und wasserfreies Methanol vorgelegt. Anschließend erfolgte bei 400 rpm die Zugabe der weiteren Edukte Essigsäureanhydrid und Triethylamin. Die Kolben wurden fest verschlossen und für 24 h bei Raumtemperatur und 400 rpm gerührt.

Tabelle 11: Übersicht der eingesetzten Stoffmengen der Edukte für die partielle Acetylierung von 3,59 μmol G5-PAMAM.

	Acetylierung 1	Acetylierung 2	Acetylierung 3	Acetylierung 4
Methanol (wasserfrei)	7,8 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Essigsäure- anhydrid	0,23 mmol	0,31 mmol	1,62 mmol	1,62 mmol
Triethylamin	0,25 mmol	0,61 mmol	2,02 mmol	3,24 mmol
N ₂ - Atmosphäre	Ja	-	-	-

Für die Bestimmung der Acetylierungsgrade mit der NMR Spektroskopie wurde am Ende der Reaktion das Methanol vollständig am Rotationsverdampfer (Wasserbad 40 °C, Druck: 200 mbar) entfernt und der Rückstand in 4 mL Milli-Q-Wasser aufgenommen. Die Aufreinigung der so erhaltenen Dispersionen erfolgte in AMICON Ultra-4 10K Filtereinheiten durch dreimaliges Waschen mit 4 mL Milli-Q-Wasser (20 min / 7.500 g). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Rückstand in 0,5 mL Milli-Q aufgenommen und in 1,1 mL Bördel-Vials überführt. Die Filtereinheiten wurden mit weiteren 0,5 mL Milli-Q gespült und diese Lösung ebenfalls in die Bördel-Vials überführt. Im Anschluss folgte die Gefrier Trocknung und die Verbördelung der Vials. Erst unmittelbar vor der NMR Analytik wurden die Proben in je 0,75 mL D₂O (1 Ampulle D₂O=0,75mL) aufgenommen. Nach Aufbrechen der Glasampulle wurde das D₂O vollständig über eine Spritze durch das Septum der verbördelten Vials zu den gefriergetrockneten Dendrimeren gegeben. Zum besseren Lösen der Dendrimere wurden die Vials gevortext und kurz ins Ultraschallbad gestellt. Erst direkt vor der NMR Messung

wurden die Vials geöffnet und der gesamte Inhalt in die NMR Röhren überführt. Die Aufnahme der NMR Spektren erfolgte mit einem 700 MHz NMR Spektrometer von Bruker (Avance III) an der TU Berlin.

DOTA(Gd)-Funktionalisierung von Ac-G5-PAMAM

Nach der Acetylierung der Dendrimere wurde das Lösemittel Methanol am Rotationsverdampfer (Wasserbad 40 °C, Druck: 200 mbar) entfernt und der erhaltene Rückstand in 1 mL Kopplungspuffer (50 mM MES pH 5,5 bzw. PBS/Bicarbonat pH 8,3) aufgenommen. Das acetylierte Dendrimer wurde in einen Float-A-Lyzer G2 (8-10 kDa) überführt und der Kolben noch zweimal mit je 1 mL Kopplungspuffer gründlich gespült und die Lösungen ebenfalls in das Dialysem modul überführt ($V_{\text{ges}}=3$ mL). Zur Entfernung überschüssiger Reaktanden wurde das Reaktionsprodukt gegen den Kopplungspuffer dialysiert. Nach der Aufreinigung wurden für die Kopplung je 0,69 μmol des aufgereinigten Dendrimers mit 69,12 μmol DOTA (DOTA-NHS bzw. DOTA-NCS) im jeweiligen Kopplungspuffer in einem Reaktionsvolumen von 4 mL umgesetzt. Im Falle der Zugabe von DOTA-NHS in DMSO wurden 110 μL DOTA-NHS-Lösung (500 mg/mL in DMSO) zu 3,89 mL acetyliertem Dendrimer (0,69 μmol) in PBS/Bicarbonat-Puffer pH 8,3 gegeben. Nach allen DOTA-Zugaben wurde der pH-Wert der Reaktionsmischungen mit 1 N NaOH auf den pH des Kopplungspuffers gestellt bzw. im Falle des 50 mM MES Puffers auf pH 7,5. Die Kopplungsreaktionen erfolgten in 10 mL Schnappdeckelgläser für 1 h bei 400 rpm und Raumtemperatur. Bei allen Synthesen wurde ein Blindwert mitgeführt, bei dem nur Kopplungspuffer bzw. DMSO ohne DOTA zugegeben wurde. Für die Aufreinigung wurden die DOTA-funktionalisierten Dendrimere in AMICON Ultra-4 10K Filtereinheiten überführt und 2x mit 4 mL Komplexierungspuffer (10 mM Citrat-Puffer pH 6,0 bzw. 20 mM TBAA Puffer pH 6,0) gewaschen (20 min / 7.500 g). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Rückstand in 2 mL Komplexierungspuffer redispergiert und in ein Schnappdeckelglas überführt. Die Filtereinheiten wurden mit je 1 mL Komplexierungspuffer gespült und die Lösung ebenfalls in das gleiche Schnappdeckelglas überführt. Die Zugabe von Gd^{3+} erfolgte über eine Lösung aus $\text{GdCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in Komplexierungspuffer mit einem molaren Überschuss von 30 % (57,51 μmol) bezogen auf 64 DOTA-Gruppen. Für 1 h wurden je 3 mL der DOTA funktionalisierten Dendrimers mit 1 mL der Gd^{3+} -Lösung bei 600 rpm und Raumtemperatur (bzw. 37 °C) gerührt. Im Anschluss wurden alle Proben über einen 0,45 μm Spritzenfilter filtriert und gegen 20 mM HEPES pH 7,0 im Float-A-Lyzer G2

(8-10 kDa) dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Dendrimere bei 2-8°C im Kühlschrank gelagert.

4.1.4 Gelpermeationschromatographie

Für die Untersuchung der funktionalisierten G5-PAMAM Dendrimere mit der Gelpermeationschromatographie wurde mit der stationären Phase Sephadex G-10 und einer ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) gearbeitet. Zum Packen der 16 mm Glassäule wurde in einem 50 mL Falcon-Tube zu 12,3 g Sephadex G-10 40,3 g heißes Wasser gegeben. Diese Mischung wurde für 24 h auf dem Schwenker bei Raumtemperatur quellen gelassen und im Anschluss die Säule gepackt. Die Höhe des Säulebetts betrug nach dieser Vorgehensweise ca. 13 cm. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 100 µL. Als Eluent (isokratisch) wurde 20 mM HEPES pH 7,0 gewählt und mit einer Flussrate von 1 mL/min gearbeitet. Es wurde die UV Absorption bei 210 nm und die Leitfähigkeit in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen detektiert.

4.1.5 Synthese von Ln:GdVO₄-PAA Nanokristallen

Die Darstellung von dotierten GdVO₄-PAA Nanokristallen über die solvothermale Route erfolgte aus zwei Ausgangslösungen bei 120°C. Lösung 1 bestand aus 0,2 M Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) mit Polyacrylsäure (Mw=1.800g/mol) in einem Gemisch aus Ethylenglykol und Wasser. Lösung 2 bestand aus den Lanthanoiden (Ln³⁺) in reinem Ethylenglykol. Um die Substanzen besser zu lösen, wurden beide Ausgangslösungen im Wasserbad für 10 min auf 80°C erwärmt. Nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie zunächst über einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert. Je 2,5 mL von jeder Ausgangslösung wurde unter Rühren bei 800 rpm in ein 50 mL Becherglas gegeben. Die Mischung wurde anschließend in ein 15 mL Falcon-Tube überführt und für die Alterung 3 h bei 120°C in den Trockenschrank gestellt. Nach der Alterung wurde die Dispersion auf Raumtemperatur abgekühlt und die Nanokristalle über Zentrifugation aufgereinigt. Mit jeweils 4 mL Lösemittel wurde zweimal mit Ethanol und einmal mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Nanokristalle in 4 mL Milli-Q-Wasser redispergiert und weiter über Dialyse (MWCO 8-10 kDa) gegen Milli-Q aufgereinigt.

4.1.6 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Für die DLS- und Zetapotential-Messungen wurde ein Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) mit einem He-Ne Laser (633 nm) an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung genutzt. Für die Messungen wurden die Partikeldispersionen 1:10 mit Milli-Q-Wasser verdünnt und bei 25°C in Rückstreuung (173° backscatter) gemessen. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung mit jeweils zehn Messzyklen durchgeführt. Die Berechnung der mittleren hydrodynamischen Durchmesser (Z-average) and der Polydispersitätsindices (PDI) erfolgten mit der Kumulantenanalyse. Die Zetapotentiale wurden aus der elektrophoretischen Mobilität über die Smoluchowski-Annäherung berechnet.

4.1.7 Röntgenweitwinkel-Pulverdiffraktometrie

Die Untersuchungen der Nanokristalle mit der Röntgendiffraktometrie erfolgten mit einem Bruker AXS D8 Advance Diffraktometer in Bragg-Brentano Geometrie mit Cu-K α_1 Strahlung ($\lambda=1.541874 \text{ \AA}$) an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Die Messung erfolgte mit einer Röntgenleistung von 40 kV (40 mA) zwischen $2\Theta=5-60^\circ$ mit $0,02^\circ$ Schrittweite und 10 s pro Schritt. Für eine Gesamtmessung resultierte eine Messzeit von ca. 8 h. Nach der Scherrer-Methode wurde über die Bestimmung der Reflexverbreiterung, die Kristallitgröße der Proben berechnet. Die Reflexverbreiterung wurde auf halber Höhe des intensivsten Reflexes (FWHM=full width at half maximum) im Bogenmaß bestimmt. Die Berechnung der Kristallitgröße B erfolgte gemäß Formel 9. In die Formel gehen die Scherrer-Konstante K (wurde in erster Näherung 1 gesetzt), die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung mit $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$ (Cu-k α), die Reflexposition des intensivsten Reflexes (L) und die Halbwertbreite FWHM im Bogenmaß ein.

$$B = \frac{K \cdot \lambda}{L \cdot \cos\theta} \quad \text{Formel 9}$$

Beispielsrechnung

$$B = \frac{K \cdot \lambda}{L \cdot \cos\theta} = \frac{1 \cdot 1,54056 \text{ \AA}}{0,0078 \cdot \cos(12,371)^\circ} = \frac{1,54056}{0,0076} = 202 \text{ \AA} = 20,2 \text{ nm}$$

4.1.8 Röntgenfluoreszenzanalyse

Die Untersuchungen der Nanokristalle mit der Röntgenfluoreszenzanalyse erfolgten mit einem PANalytical Zetium Ultimate RFA-Spektrometer mit einer Röhrenleistung von 60 kV (66 mA), einem Probenfleck von ca. 0,8 cm und 15 s Messzeit an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

4.1.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Aufnahmen von den Nanokristallen mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erfolgten am ZELMI (Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie) der TU Berlin. Das verwendete Transmissionselektronenmikroskop (FEI Tecnai G² Spirit 20 S-TWIN) arbeitete mit einer LaB₆-Kathode, 200 kV Beschleunigungsspannung und einer Punktauflösung von 0,24 nm. Für die Präparation der Proben wurden die Nanokristalldispersionen 1:1 mit Aceton gemischt und je 3 µL dieser Mischung auf einem TEM Grid aus Kupfer (mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfernetz) aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösemittels wurde das Grid auf dem Probenhalter platziert, über eine Schleuse ins Vakuum gebracht und dem Elektronenstrahl ausgesetzt.

4.1.10 Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte an einem Fluoreszenzspektrometer der Fa. Edinburgh Instruments Ltd. (Modell F900) an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Die Messung der Nanokristall-Dispersionen erfolgte unter Verwendung eines 495 nm Cut-Off Filters im Emissionsstrahlengang des Spektrometers.

4.1.11 Bestimmung der r_1 -Relaxivität

Für die Bestimmung der r_1 -Relaxivität wurden von den zu untersuchenden Proben mindestens fünf Verdünnungen mit Milli-Q-Wasser im Konzentrationsbereich von 0,05-2,0 mM Gd^{3+} hergestellt.

Für die Bestimmung der r_1 -Relaxivität am Minispec mq40 (Fa. Bruker) wurden je 200 μ L der Verdünnungen in NMR-Röhrchen überführt und bei 40°C und 0,94 T die longitudinalen Relaxationszeiten (T_1 -Relaxationszeiten) der Protonen in Gegenwart der zu analysierenden Proben bestimmt. Durch Auftragung der reziproken T_1 -Relaxationszeit (Relaxationsrate in s^{-1}) über der Konzentration in mM wurde aus dem Anstieg der linearen Regressionsgeraden die Relaxivität r_1 in $mM^{-1} \cdot s^{-1}$ erhalten.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{10}} + r_1 \cdot c_{KM} \quad \text{Formel 10}$$

Für die Bestimmung der r_1 -Relaxivität am präklinischen PET/MRT (nanoScan, Fa. Mediso) wurden je 250 μ L der Verdünnungen in 200 μ L Probengefäße (Flüssig-Phantome) überführt. Im Gegensatz zur Messung am Minispec erfolgten diese Messungen bei 1 T und 18°C. Mit der Sequenz „IR GRE SNAP T1 maps“ wurde von den $Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO_4$ -PAA Nanokristallen eine sog. T_1 Map erzeugt. Die T_1 Map enthielt für jede Verdünnung die aufgenommene T_1 -Relaxationskurve, die an die nachfolgende Formel 11 angepasst werden musste. Hierbei wurden die Parameter A, f und T_1 in der Software dahingehend optimiert, dass die Kurven mit einem „Adj. R-Square“ von $>0,99$ vorlagen. [181] Die Gleichung wird daher auch „Drei-Parameter-Fit“ genannt. Aus den so erhaltenen T_1 -Relaxationszeiten wurde analog Formel 10 die r_1 -Relaxivität bestimmt.

$$I = abs(A \cdot (1 - f \cdot e^{-\frac{T_1}{T_1}})) \quad \text{Formel 11}$$

4.1.12 Biokompatibilitätsuntersuchungen

Die Biokompatibilitätsuntersuchungen wurden mit dem MTT-Test an verschiedenen Passagen der Erhaltungskultur von humanen leukämischen Zellen der Linie U937 durchgeführt. Die Kultivierung der U937 Zellen (Suspensionszellen) erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2 (Standardbedingungen) unter Verwendung von RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Nach der Bestimmung der Zellzahl am CASY® Cell Counter wurde die Zellsuspension

mit Kulturmedium auf eine Zellzahl von 4×10^4 Zellen/100 μL eingestellt und je 100 μL dieser Verdünnung in die Kavitäten einer 96-Well Platte ausgesät. Im Falle der $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4\text{-PAA}$ Nanokristalle wurden die Partikeldispersionen zunächst mit D-Mannitol auf isoosmolare Bedingungen (290 ± 10 mOsm/kg) und pH 7,4 bei einer Gd^{3+} -Konzentration von 25 mM eingestellt. Die Gd^{3+} -funktionalisierten G5-PAMAM-Dendrimere wurden ebenfalls mit D-Mannitol auf isoosmolare Bedingungen eingestellt. Da sie nach der Synthese mit einer Gd^{3+} -Konzentration < 25 mM vorlagen, konnte hier keine vorige Einstellung der Konzentration auf 25 mM erfolgen. Alle Testsubstanzen wurden nach der Formulierung steril filtriert und je vier Verdünnungen (1:2, 1:5; 1:10; 1:100) mit Kulturmedium hergestellt. Zusätzlich zu den Testsubstanzen wurde bei allen MTT-Tests eine positiv und eine negativ Kontrolle mitgeführt. Für die negativ Kontrolle wurde PBS-Puffer und Kulturmedium verwendet, für die positiv Kontrolle 2 %-ige Triton X-100 Lösung, welche die Zellwand zerstört und somit toxisch wirkt. Von jeder Probe wurden 5 Mal je 50 μL zu den Zellsuspensionen pipettiert. Nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen folgte die Zugabe von 10 μL MTT Reagenz (5 mg/ml in PBS) und die Proben wurden für weitere 4 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Schließlich wurden die Platten zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und 100 μL Kulturlösung vorsichtig abpipettiert. In jede Kavität wurden 100 μL MTT-Stopp Reagenz (0,04 N HCl in i-Propanol) pipettiert und die Lösungen auf der Platte vorsichtig durchmischt. In den Kavitäten mit metabolisch aktiven Zellen war ein Farbwechsel von gelb zu blau zu beobachten. Im Mikrotiterplattenphotometer wurde die Absorption bei 570 nm und 620 nm gemessen. Die Messung bei 620 nm diente zum Abzug des Backgrounds, der von Zellbruchstücken oder anderen Störfaktoren herrührt. Die Berechnung der Zellviabilitäten erfolgte über die gemessenen Absorptionen der Proben in Relation zur Kontrolle mit Kulturmedium.

4.1.13 Metallmarkierung von A549 Zellen und MSCs

Die Zellmarkierung wurde anhand zweier adhärent wachsender Zellarten untersucht: Zellen des humanen Bronchialkarzinoms der Linie A549 und humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Fettgewebe. Die Kultivierung beider Zellarten erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2 (Standardbedingungen) unter Verwendung von DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Zellkulturmedium (für die MSCs mit 1 g/L Glukose und für die A549-Zellen mit 4,5 g/L Glukose) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin.

Vor der Zellmarkierung wurde die Erhaltungskultur zunächst unter dem Lichtmikroskop auf Wachstum begutachtet. Bei einer Konfluenz von mindestens 75 % wurden die Zellen geerntet. Durch 5-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA lösten sich die Zellen und konnten in PBS resuspendiert werden. Nach Bestimmung der Zellzahl mit einem Casy[®] Cell Counter wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Zur Untersuchung der Aufnahmefähigkeit der Markierungsreagenzien wurden die Zellen auf autoklavierte Deckgläser (22x22 mm) in einer 6-Well-Platten ausgesät. Nach Verteilung der Zellsuspensionen auf die Deckgläser wurde die Platte vorsichtig in den Brutschank transportiert. Nach 15 min wurden je 1,5 ml Medium pro Well hinzugeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das Medium am nächsten Tag komplett abgesaugt und die Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen mit frischem Kulturmedium zugegeben. Im Falle der Nanokristalle wurden die Partikeldispersionen zunächst mit D-Mannitol auf isoosmolare Bedingungen (290 ± 10 mOsm/kg) und pH 7,4 eingestellt. Alle Testsubstanzen wurden vor ihrer Zugabe über einen 22 μ m Spritzenfilter steril filtriert. Die Vorverdünnungen wurden auf das dreifache der Sollkonzentration eingestellt, so dass nach der Zugabe von 500 μ L der Testsubstanzen und weiteren 1.000 μ L Kulturmedium die gewünschte Konzentration vorlag. Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen für weitere 6 h bzw. 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut unter dem Mikroskop bezüglich Auffälligkeiten und Zellveränderungen begutachtet. Anschließend wurden die Zellen zweimal gründlich (3x kurz und 2x 5 min) mit je 2 mL DPBS pH 7,4 (ohne Ca und Mg) gewaschen (Standard-Waschschritte) und mit je 2 mL 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min fixiert. Danach wurden die Zellen nochmals zweimal mit DPBS pH 7,4 (Standard-Waschschritte) gewaschen und in Abhängigkeit der Methode zur Bewertung der Zellmarkierung weiter behandelt.

4.1.13.1 Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Zellmarkierung mit der Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit einem Fluoreszenz-Eindeckmedium und dem Kernfarbstoff DAPI auf Objektträger eindeckt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH). Die Lagerung der Proben erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur.

4.1.13.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

Für Untersuchungen der Zellmarkierung mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie wurden die Zellen ohne Kernfärbung auf Objektträger eindeckt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten bei Raumtemperatur an einem Fluoview 1000 (Olympus Deutschland GmbH) an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Für die Fluoreszenz-Aufnahmen wurde mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm (Cobolt Zouk™ 355 nm DPSS Laser, 10 mW) und für die Transmissions-Aufnahmen mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argon-Ionen-Laser, 30 mW) gearbeitet. Das Anregungswellenlicht wurde durch ein Olympus UPLSAPO 60xW (NA:1.20) Wasserimmersionsobjektiv auf einzelne Punkte des Objektes fokussiert. Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung eines 20/80 Strahlteilers und einer Erfassungsgeschwindigkeit von 200 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ gearbeitet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur.

4.1.13.3 Laser-Ablation (LA)-ICP-MS

Für das Bioimaging mit der LA-ICP-MS wurden die Zellen nach der Fixierung zusätzlich mit einem Ir-Interkalator behandelt, um die Zellkerne anzufärben. Für das Ir-Staining wurden die fixierten Zellen mit je 1,5 mL einer 0,25 μM Ir-Interkalator-Lösung für 45 min auf einem Horizontal-Schwenker inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss zweimal gründlich mit DPBS pH 7,4 gewaschen (Standard-Waschschritte) und über eine steigende Ethanolreihe dehydriert. Die Zellen wurden nicht eingedeckt und die Deckgläser bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß bis zur Messung aufbewahrt. Die ausführliche Beschreibung der Messung mit der LA-ICP-MS erfolgt in Kapitel 4.1.16.

4.1.14 Quantifizierung der Lanthanoide nach der Zellmarkierung

Für die Quantifizierung der Lanthanoide nach der Zellmarkierung wurden Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle, Gd³⁺-funktionalisierte G5-PAMAM Dendrimere und Magnevist® in jeweils vier verschiedenen Konzentration mit 2×10^5 A549-Zellen und 2×10^5 MSCs inkubiert. Zusätzlich wurde je ein Blindwert vorbereitet, bei dem 300 mM D-Mannitol anstatt der Testsubstanzen eingesetzt wurde. Die experimentelle Durchführung der

Zellmarkierung erfolgte analog Kapitel 4.1.13. Für die Nanokristalle und Magnevist[®] wurden Ln³⁺-Konzentrationen im Bereich von 3-31 pmol/Zelle untersucht und für die Gd³⁺-funktionalisierten Dendrimere Konzentrationen im Bereich von 0,3-1,4 pmol/Zelle. Nach 6-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurde das Medium von den Deckgläsern komplett abgesaugt und die Zellen zweimal gründlich mit DPBS pH 7,4 gewaschen (Standard-Waschschritte). Das Ablösen der Zellen von den Deckgläsern erfolgte durch 5-minütige Inkubation mit 0,2 mL Accutase. Anschließend wurden die Zellsuspensionen quantitativ mit 2 mL DPBS in 15 mL Falcon-Tubes überführt und für 7 min bei 1.250 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zell-Pellets in je 0,5 mL DPBS resuspendiert. Jede Zellsuspension wurde zu je 0,25 mL in zwei 1,5 mL Probengefäßen aufteilt und für 7 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zell-Pellets mit 200 µL konzentrierter Salpetersäure bei 60°C über Nacht auf dem Schüttler aufgeschlossen. Am nächsten Tag wurden die Lysate ad 1 mL mit Milli-Q-Wasser aufgefüllt und die Verdünnungen für die ICP-MS Analytik präpariert.

4.1.15 Präparation und Bildgebung von Zell-Phantomen am PET/MRT

Für die Präparation der Zellphantome wurden A549 Zellen und MSCs jeweils mit drei verschiedenen Gd³⁺-Konzentrationen (2,5 mM, 5,0 mM, 12,5 mM) der Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristalle bzw. mit Magnevist[®] inkubiert. Zusätzlich wurde je ein Blindwert vorbereitet, bei dem 300 mM D-Mannitol anstatt der Testsubstanzen eingesetzt wurde. Je Zelllinie wurden folglich 7 Phantome präpariert, wofür sieben 75 cm² Zellkulturflaschen vorbereitet wurden, in denen je 1x10⁶ Zellen ausgesät wurden. Alle Zellen wurden zunächst für 24 h unter Standardbedingungen adhären gelassen. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und jeweils 10 mL frisches Kulturmedium zugegeben. Zusätzlich wurden je 2 mL der Testsubstanzen bzw. 2 mL 300 mM D-Mannitol in die Kulturfalschen pipettiert. Die Nanokristalle wurden vor ihrer Zugabe zunächst mit D-Mannitol auf isoosmolare Bedingungen (290±10 mOsm/kg) und pH 7,4 eingestellt. Mit den Testsubstanzen wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit 7 mL DPBS gewaschen. Nach dem Waschen folgte das Ablösen der adhären Zellen durch 5-minütige Inkubation mit 2 mL Trypsin/EDTA. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden in je ein 15 mL Falcon-Tube überführt. Zusätzlich

wurden die Zellkulturflaschen mit je 5 mL 1xPBS gespült und die Lösung ebenfalls in die Falcon-Tubes gegeben. Die Zellsuspensionen wurden nun für 7 min bei 1.250 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zell-Pellets wurden in 2 mL 4 % PFA resuspendiert und für 10 min fixiert. Nach erneuter Zentrifugation für 7 min bei 1.250 rpm wurde der Überstand verworfen und die A549 Zellen in 10 mL DPBS und die MSCs in 1 mL DPBS resuspendiert. Von den Zellsuspensionen wurden am CASY Cell Counter die Zellzahlen bestimmt und die Volumina berechnet, in denen sich 500.000 A549 Zellen bzw. 250.000 MSC Zellen befinden. Die entsprechenden Mengen wurden je in ein 1,5 mL Probengefäß pipettiert. Für die A549-Zellen entsprach dies ca. 450-700 μ L und für die MSCs ca. 800-1.000 μ L. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 7 min bei 2.000 rpm nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde. Die Zell-Pellets wurden in ca. 50 μ L Restvolumen resuspendiert und in je ein 200 μ L Probengefäß überführt. Die 1,5 mL Probengefäße wurden mit 100 μ L PBS nachgespült. Für 7 min wurden die Zellsuspensionen bei 2.000 rpm in den Probengefäßen zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Pellets ohne erneutes resuspendieren nochmals für 7 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Pellets luftblasenfrei mit 200 μ L 1,5% Agarose überschichtet. Die Phantome wurden bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Messungen erfolgten mit einem nanoScan PET/MRT (1 T) der Fa. Mediso im ‚Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center‘ (BERIC) an der Charité unter Verwendung einer Bildgebungskammer für kleine Versuchstiere (Maus bis zu 35 g). Vor jeder Messung wurde ein ‚2D Sag Localizer GRE SNAP‘ durchgeführt, um je nach Größe des Messobjektes, die Anzahl der Schichten, die Schichtdicke und das FOV in der gewählten Sequenz anzupassen.

4.1.16 Bildgebung der Zellmarkierung mit der LA-ICP-MS

Für die Bildgebung der Zellmarkierung mit der LA-ICP-MS wurde das Laserablationssystem NWR213 (Nd:YAG 213 nm; New Wave Research, Inc.) an ein Sektorfeld ICP-MS (Element XRTM; Thermo Fisher Scientific) gekoppelt und beide über externe Triggerung miteinander synchronisiert. Das ICP-MS arbeitete mit einer 1350 W Hochfrequenz-Plasmaquelle, einem Argon-Plasmagasstrom von 16 L/min, einer Massenauflösung $m/\Delta m=300$, einer Proben-Integrationszeit (Dwell time) von 2 ms und dem elektronischen Scan Modus (E-Scan). Im Ablationssystem wurde Helium als

Transportgas mit einer Flussrate von 1 L/min eingesetzt. Vor dem Erreichen des ICP-MS wurde dem Probengasstrom Argon mit einer Flussrate von 0,6-0,8 L/min beigemischt, wobei die exakte Menge vom Tune des jeweiligen Tages abhängig war. Im Gegensatz zum iCAP verfügt das Element XRTM über keine „Autotune“ Funktion. Die Torch Position (x,y,z-Richtung), die Spannungen an den Linsen und der Probengasfluss wurden in der Gerätesoftware nacheinander optimiert. Das Tunen des Element XRTM erfolgte täglich mit einem Mikroskop-Glas, um maximale Ionen-Intensitäten und eine Oxid-Rate (Th/ThO) von unter 1 % während der Ablation zu erreichen. Für die Ablation der markierten Zellen von den Deckgläsern wurden am Laser 0,5 J/cm² Fluence und 20 Hz Repetitionsrate eingestellt. Laser-Spotgröße und Scan-Geschwindigkeit variierten zwischen 4-25 µm mit jeweils 4-25 µm/s. Alle Proben wurden Linie für Linie ablatiert, wobei sich jede Linie zu 50 % in Y-Richtung mit der vorherigen überlappte. Es wurden die Isotope ⁵¹V, ¹⁵³Eu, ¹⁵⁸Gd und ¹⁹³Ir gemessen. Die erhaltenen Daten wurden in Origin exportiert und farbkodierte Aufnahmen der Elementverteilungen erstellt.

Tabelle 12: Geräteparameter für die Messung fester Proben mit der ICP-MS

Lasersystem	
Laser	Nd:YAG
Wellenlänge	213 nm
Laserfluenz	0.5 J cm ⁻²
Wiederholfrequenz	20 Hz
Transportgas	1 L min ⁻¹ He
ICP-MS	
Massenspektrometer	Element XR
Hochfrequenz-Plasmaquelle	1350 W
Plasmagasstrom	16 L min ⁻¹ Ar
Hilfsgasstrom	1,1 L min ⁻¹ Ar
Probengasstrom	0,6-0,8 L min ⁻¹ Ar
Scan-Modus	E-Scan

4.1.17 Antikörperkonjugation und Dot Blot Assay

Für die Konjugation von Ln:GdVO₄-PAA Nanokristallen an anti-BSA Antikörper wurden zunächst 100 µg der Nanokristalle (ca. 10 mg/mL) dreimal mit 400 µL Kopplungspuffer (0,1 M MES Puffer pH 5,5 oder 1x PBS pH 7,4) in 50 kDa AMICON Filter Tubes (0,5 mL) gewaschen (5 min/3.000 g). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Retentat auf ca. 100 µL mit Kopplungspuffer aufgefüllt, gevortext und quantitativ in ein 1,5 mL Probengefäß überführt. In das Filter-Tube wurden nochmals 100 µL Kopplungspuffer gegeben, gevortext und die Lösung ebenfalls in das Probengefäß gefüllt, sodass ein Volumen von insgesamt 200 µL vorlag. Zur Nanokristall-Dispersion wurden anschließend 200 µL frisch hergestelltes Aktivierungsreagenz (EDC und NHS in Kopplungspuffer) pipettiert und die Mischung für 20 min bei Raumtemperatur und 350 rpm im Thermomixer inkubiert. Durch Zugabe von 10 µL β-Mercaptoethanol wurde die Reaktion gestoppt. Parallel zur Aktivierung der Carboxygruppen wurden 225 µg anti-BSA Antikörper dreimal mit 400 µL Kopplungspuffer in 50 kDa AMICON Filter Tubes (0,5 mL) aufgereinigt (5 min/7.500 g). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Retentat quantitativ zur aktivierten Nanokristall-Dispersion pipettiert. Im Falle der Aktivierung in 0,1 M MES Puffer pH 5,5 wurde der pH-Wert der Reaktionsmischung nach Antikörper-Zugabe mit 1 M NaOH auf pH 7,4 gestellt. Bei der Verwendung von PBS pH 7,4 erfolgte keine weitere pH-Wert Einstellung. Die Konjugation erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur und 350 rpm im Thermomixer. Am Ende wurden 30 µL Stoppreagenz (0,3 M Glycin) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 30 min (Raumtemperatur, 350 rpm) im Thermomixer inkubiert. Das erhaltene Konjugat wurde in 50 kDa Filter Tubes mit 400 µL PBS pH 7,4 aufgereinigt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden das Retentat in 200 µL Probengefäße überführt und bis zum Dot Blot Assay bei 4°C gelagert. Im Falle der Abschirmung der negativen Oberflächenladungen vor dem Dot Blot Assay wurden 30 µL des Antikörper-Konjugates in ein 0,5 mL Probengefäß überführt und mit einem 20-fachen molaren Überschuss an Hydroxylamin versetzt. Die Mischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur und 350 rpm im Thermomixer inkubiert und anschließend mit 400 µL PBS pH 7,4 in 50 kDa Filter Tubes aufgereinigt. Das Retentat wurde ebenfalls in 200 µL Probengefäße überführt und bei 4°C gelagert. Vor dem Dot Blot Assay erfolgte die Bestimmung der Antikörper-Konzentration mit einem NanoDrop Mikrovolumen-Spektrophotometer. Hierfür wurden je 2 µL der Konjugate auf eine optische

Messoberfläche pipettiert und der Proteingehalt über eine vorkonfigurierte Methode bei 280 nm gemessen. Für den Dot Blot Assays wurden zunächst Nitrocellulose-Membranen auf eine Größe von 25x8 mm zugeschnitten und mit PBS pH 7,4 verschiedene Verdünnungen des Antigens BSA (0,5; 1,5; und 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und der Negativ-Kontrolle NeutrAvidin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) hergestellt. Auf die Membranen wurden je 0,5 μL der Antigen-Verdünnungen und zusätzlich ein PBS Spot aufgetragen. Der gespottete Bereich wurde mit einem wasserfesten Edding markiert. Je eine Membran wurde in ein 25 mL Becherglas gelegt, mit 10 mL TBS-T bedeckt und für 5 min auf dem Horizontal-Schüttler bei 150 rpm gewaschen. Vor der Inkubation mit dem Antikörper-Konjugat wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt (geblockt). Hierfür wurde sie für 2 h mit 10 mL einer 5 % [w/v] Milchpulverlösung in TBS-T bei 150 rpm auf dem Horizontal-Schüttler inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Membranen dreimal für 5 min mit je 10 mL TBS-T bei 150 rpm auf dem Horizontal-Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in je ein 1,5 mL Probengefäß überführt, komplett mit TBS-T bedeckt und für 10 min auf dem Vertikalschüttler gewaschen. Währenddessen wurden 5 μg des Antikörpers (in Form des Konjugates) in 1,5 mL PBS vorbereitet. Das TBS-T wurde aus den Probengefäßen entfernt und 1,5 mL des Antikörperkonjugates zugegeben. Die Membranen wurden für 2 h auf dem Vertikalschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen vorsichtig aus den Probengefäßen in 25 mL Bechergläser überführt und dreimal mit 10 mL TBS-T für 5 min unter auf dem Horizontalschüttler bei 150 rpm gewaschen. Die Membranen wurden für mindestens 5 h an der Luft getrocknet und bis zur Messung bei Raumtemperatur in den Probengefäßen gelagert. Für die Messung der Dot Blot Membranen mit der LA-ICP-MS wurden am Laserablationssystem 7 % Energie, 20 Hz Repetitionsrate und 250 μm Spotgröße mit 250 $\mu\text{m}/\text{s}$ Scan-Geschwindigkeit eingestellt, wobei sich die einzelnen Linienscans nicht überlappten. Die Geräteparameter des ICP-MS sind Tabelle 12 aufgeführt.

4.2 Experimentelle Daten

4.2.1 ^1H -NMR-Spektren von Ac-G5-PAMAM

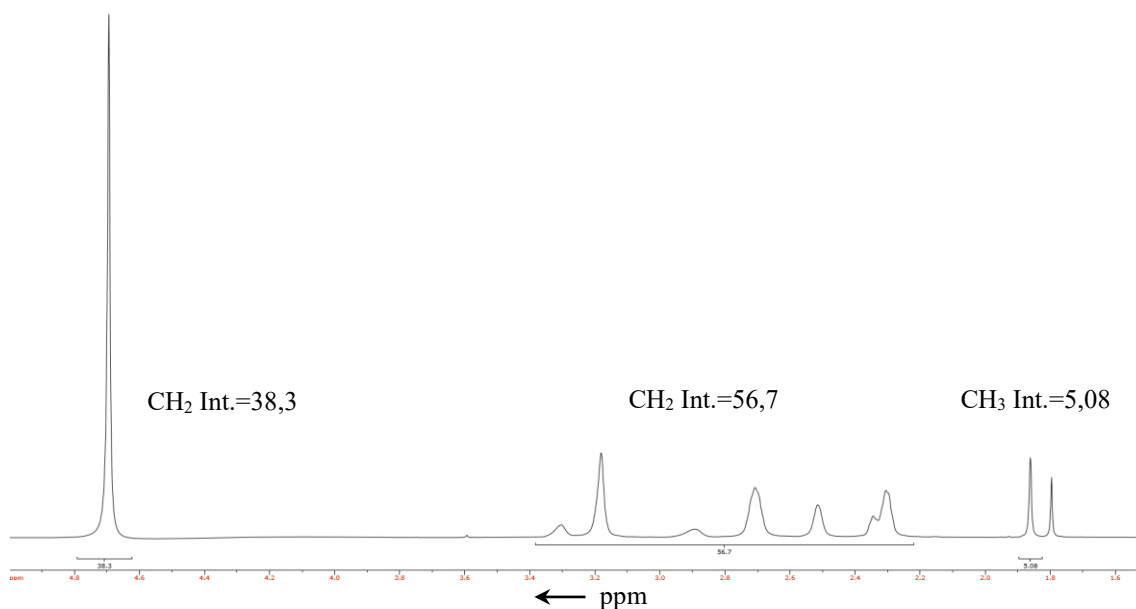


Abbildung 62: ^1H -NMR-Spektrum von acetyliertem G5-PAMAM nach Umsetzung mit 64-fachen molaren Überschuss an Essigsäureanhydrid und 2,65-fachen molaren Überschuss der korrespondierenden Base Triethylamin.

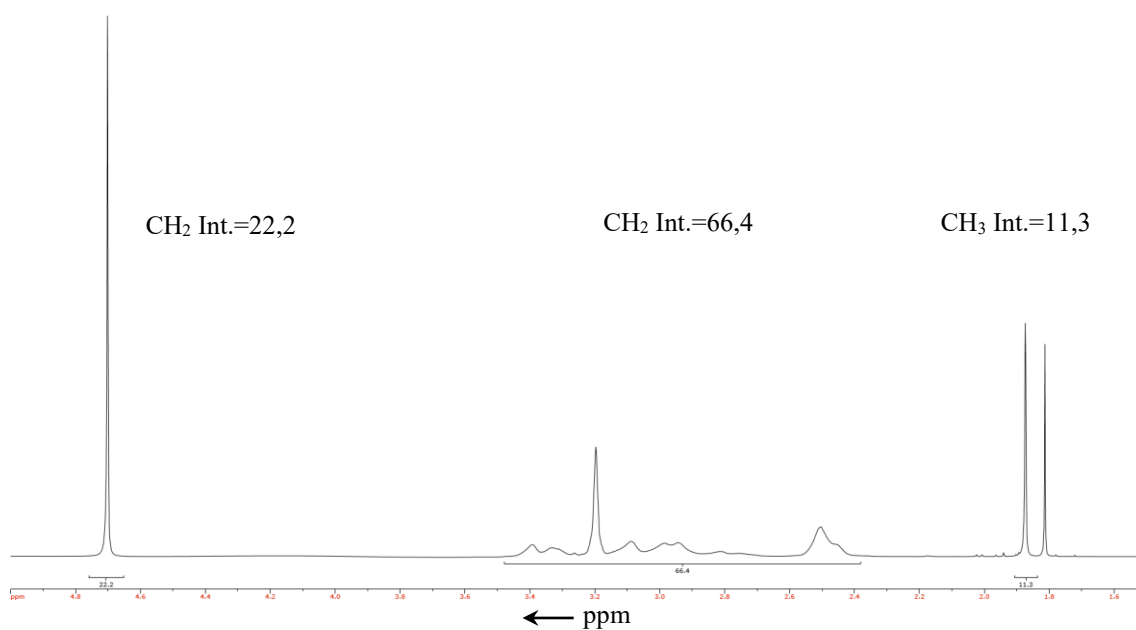


Abbildung 63: ^1H -NMR-Spektrum von acetyliertem G5-PAMAM nach Umsetzung mit 450-fachen molaren Überschuss an Essigsäureanhydrid und 1,25-fachen molaren Überschuss der korrespondierenden Base Triethylamin.

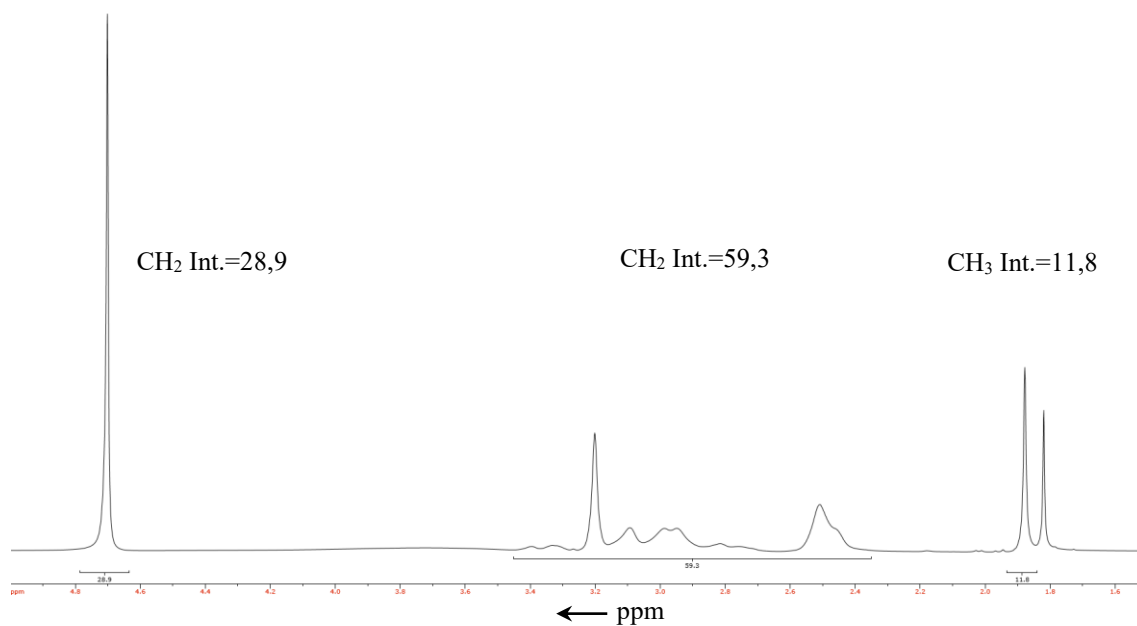


Abbildung 64: ¹H-NMR-Spektrum von acetyliertem G5-PAMAM nach Umsetzung mit 450-fachen molaren Überschuss an Essigsäureanhydrid und 2-fachen molaren Überschuss der korrespondierenden Base Triethylamin.

4.2.2 Gelpermeationschromatographie von DOTA(Gd³⁺)-Ac-G5-PAMAM

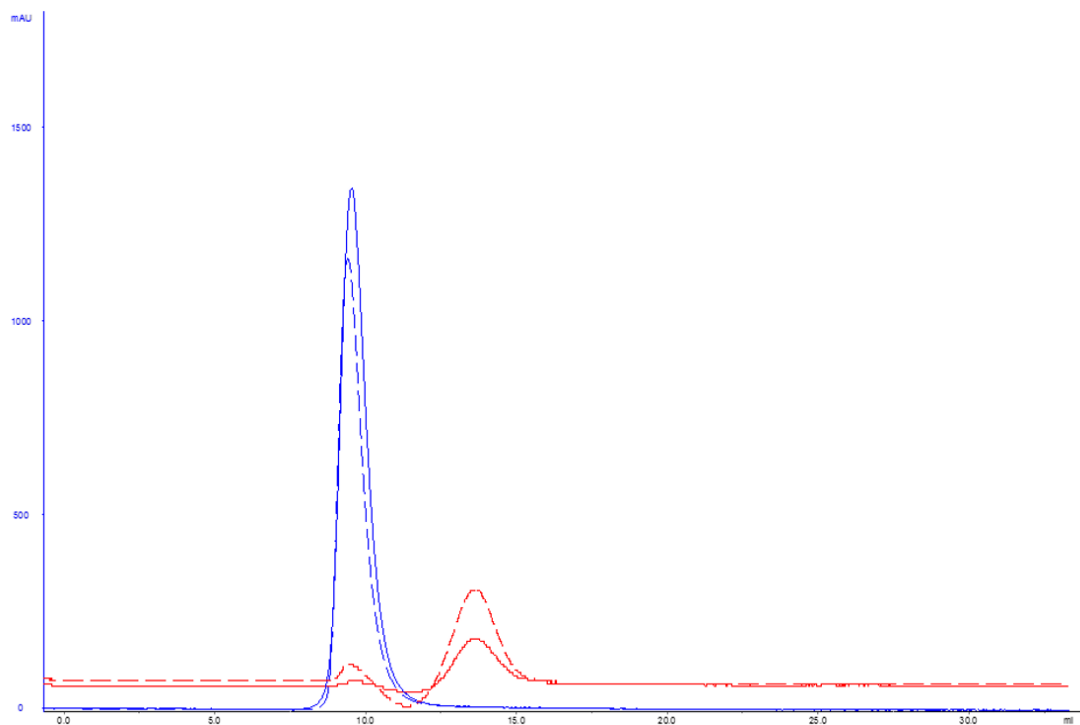


Abbildung 65: Gelpermeationschromatographie von acetyliertem G5-PAMAM ohne DOTA-Funktionalisierung mit Gd³⁺-Zugabe (Blindwert) und von DOTA(Gd)-funktionalisierten Ac-G5-PAMAM Dendrimern unter Verwendung von DOTA-NHS mit Gd³⁺-Komplexierung bei Raumtemperatur und TBAA Puffer bei pH 6,0. Die gestrichelte Linie zeigt die Signale vom Blindwert, die durchgezogene Linie zeigt die Signale des funktionalisierten Dendrimers. Die roten Linien zeigen die Detektion der Leitfähigkeit und die blauen Linien zeigen die Detektion der UV-Absorption über dem Elutionsvolumen.

4.2.3 Ln:GdVO₄-PAA Nanokristalle über solvothermale Route

Tabelle 13: Variation der Polyacrylsäuremenge zur Darstellung von Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristallen mit $c(\text{Ln}^{3+})=0,057$ mol/L und EG : H₂O=3,5 : 1,5.

PAA (Ansatz) [mg/mL]	Ausbeute [%]	d_h [nm]	Gd³⁺-Gehalt [mg/mL]	Eu³⁺-Dotierung [Mol-%]	ζ [mV]	PDI
0,8	89,1	66,8	6,30	9,2	-51,8	0,117
0,9	86,6	71,8	8,72	10,1	-53,2	0,062
1,0	82,3	64,6	6,71	9,7	-51,4	0,100
1,1	83,6	70,4	8,42	10,0	-48,4	0,076
1,2	51,5	71,6	3,64	11,5	-56,0	0,128

Tabelle 14: Untersuchung verschiedener EG-Wasser-Gemische und Ln³⁺-Konzentrationen zur Darstellung von Eu_{0,10}Gd_{0,90}VO₄-PAA Nanokristallen mit PAA=1 mg/mL.

EG-Wasser- Verhältnis	c(RE) [mol/L]	Ausbeute [%]	c(Gd³⁺) [mg/mL]	Eu³⁺-Dot. [Mol-%]	d_h [nm]	PDI	ζ [mV]
3 : 2	0,020	57,4	2,09	7,7	65,4	0,086	-52,3
3 : 2	0,040	80,0	5,67	5,4	54,7	0,066	-49,1
3 : 2	0,057	78,3	7,89	9,9	51,0	0,109	-49,6
3 : 2	0,080	76,0	10,77	5,3	56,8	0,097	-44,6
3,5 : 1,5	0,020	64,3	2,34	8,4	63,2	0,096	-40,8
3,5 : 1,5	0,040	82,8	5,87	5,5	56,5	0,089	-47,1
3,5 : 1,5	0,057	83,9	8,45	9,8	54,2	0,097	-47,1
3,5 : 1,5	0,080	76,4	10,83	5,2	55,6	0,080	-45,4
4 : 1	0,020	56,5	1,79	8,5	73,6	0,177	-53,1
4 : 1	0,040	80,0	5,04	10,3	66,5	0,117	-49,8
4 : 1	0,057	81,9	7,35	10,3	69,3	0,171	-48,2
4 : 1	0,080	70,4	8,86	10,6	66,8	0,093	-45,4
8,5 : 1,5	0,020	65,7	2,39	9,5	72,7	0,162	-43,0
8,5 : 1,5	0,040	81,3	8,42	10,0	73,1	0,136	-44,3
8,5 : 1,5	0,057	85,3	8,18	10,0	73,7	0,100	-47,3
8,5 : 1,5	0,080	76,3	10,81	9,1	75,8	0,114	-50,9

Tabelle 15: Darstellung von Eu:GdVO₄-PAA-Nanokristallen in verschiedenen Dotierungsgraden mit $c(\text{Ln}^{3+})=0,040$ mol/L, EG : H₂O=3,5 : 1,5 und PAA=1 mg/mL.

Dot. Theorie [%]	Ausbeute [%]	c(Gd³⁺) [mg/mL]	Eu³⁺-Dot. [Mol-%]	d_h [nm]	PDI	ζ [mV]
5	83,3	6,27	6,0	62,62	0,114	-45,7
5	85,2	6,43	6,0	63,44	0,137	-44,3
5	82,0	6,19	6,0	58,43	0,095	-45,8
10	79,4	5,62	11,1	59,28	0,113	-45,7
10	80,6	5,70	11,3	59,53	0,094	-45,3
10	84,9	6,01	11,0	59,11	0,101	-44,2
15	83,0	5,61	16,1	61,11	0,112	-43,6
15	87,1	5,89	16,1	57,25	0,091	-44,1
15	85,3	5,77	16,0	58,51	0,109	-44,6
20	81,6	5,13	18,7	57,22	0,079	-41,9
20	82,0	5,16	18,6	58,05	0,084	-42,6
20	77,1	4,85	18,6	58,40	0,087	-44,2
40	84,5	4,03	38,1	58,92	0,085	-44,0
40	84,4	3,98	38,5	56,5	0,086	-42,8
40	79,7	3,76	38,4	56,47	0,076	-41,3
60	85,2	2,68	57,2	55,33	0,098	-29,0
60	85,9	2,70	57,4	55,30	0,104	-42,9
60	77,9	2,45	57,2	55,24	0,072	-41,8

Tabelle 16: Darstellung von Tb:GdVO₄-PAA-Nanokristallen in verschiedenen Dotierungsgraden mit $c(\text{Ln}^{3+})=0,040$ mol/L, EG : H₂O=3,5 : 1,5 und PAA=1 mg/mL.

Dot. Theorie [%]	Ausbeute [%]	c(Gd³⁺) [mg/mL]	Tb³⁺-Dot. [Mol-%]	d_h [nm]	PDI	ζ [mV]
5	77,6	5,86	4,2	57,33	0,070	-43,4
5	85,2	6,43	4,2	60,60	0,110	-46,0
5	77,2	5,83	4,2	58,43	0,113	-50,0
10	82,8	5,86	9,1	57,53	0,091	-45,1
10	86,2	6,10	8,7	58,20	0,070	-46,8
10	75,6	5,35	8,8	57,83	0,074	-47,5
15	75,3	5,09	13,0	58,54	0,070	-44,2
15	76,2	5,15	13,0	59,79	0,071	-45,9
15	79,1	5,35	13,3	59,46	0,069	-48,9
20	79,8	5,07	19,2	61,14	0,100	-41,2
20	83,5	5,31	19,1	60,55	0,096	-43,0
20	83,5	5,31	19,3	59,93	0,082	-42,8
40				63,93	0,096	-61,7
40	84,2	3,97	38,8	61,99	0,085	-43,1
40	80,1	3,78	38,4	61,86	0,063	-42,6
60	80,4	2,53	59,1	63,99	0,071	-55,8
60	76,0	2,39	59,6	62,34	0,074	-41,4
60	79,8	2,51	59,2	61,58	0,078	-44,9

Tabelle 17: Untersuchung der Partikelstabilität in Abhängigkeit von der Polyacrylsäuremenge je Reaktionsansatz zur Darstellung $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristallen mit $c(\text{Ln}^{3+})=0,057 \text{ mol/L}$ und $\text{EG} : \text{H}_2\text{O}=3,5 : 1,5$.

PAA (Ansatz) [mg/mL]	0 Wochen	1 Woche	12 Wochen	24 Wochen
	d_h [nm]			
0,8	79,0	72,9	68,0	67,5
1,0	64,0	63,3	62,1	62,7
1,2	70,0	64,9	60,4	67,7

Tabelle 18: Untersuchung der hydrodynamischen Durchmesser verschieden formulierter $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristalle mit $c(\text{Gd}^{3+})=25 \text{ mM}$ nach 1:10 Verdünnung mit DMEM-Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 3 Tagen.

Formulierungsmedien	d_h [nm]			
	t=0 h	t=24 h	t=3 d	t=9 d
D-Mannitol	170	168	164	167
D-Mannitol + 1 % Pluronic [®]	197	194	192	191
D-Mannitol + 2 % Pluronic [®]	196	190	189	189
D-Mannitol + 0,5 % Kollidon [®] 17 PF	160	158	160	159
D-Mannitol + 1,5 % Kollidon [®] 17 PF	188	183	183	182

Tabelle 19: Untersuchung der hydrodynamischen Durchmesser verschieden formulierter $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristalle mit $c(\text{Gd}^{3+})=25$ mM nach 1:5 Verdünnung mit DMEM-Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 3 Tagen.

Formulierungsmedien	d_h [nm]			
	t=0 h	t=24 h	t=3 d	t=9 d
D-Mannitol	185	181	177	182
D-Mannitol + 1 % Pluronic [®]	202	197	192	199
D-Mannitol + 2 % Pluronic [®]	235	232	230	237
D-Mannitol + 0,5 % Kollidon [®] 17 PF	199	195	191	198
D-Mannitol + 1,5 % Kollidon [®] 17 PF	212	208	204	210

Tabelle 20: Untersuchung der hydrodynamischen Durchmesser verschieden formulierter $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristalle mit $c(\text{Gd}^{3+})=25$ mM nach Autoklavierung der Proben über einen Zeitraum von 3 Monaten.

Formulierungsmedien	d_h [nm]			
	Vor dem Autoklavieren	t=0 Wochen	t=8 Wochen	t=12 Wochen
D-Mannitol	68,3	62,9	61,9	63,2
D-Mannitol + 1 % Pluronic [®]	68,5	63,7	61,1	62,4
D-Mannitol + 2 % Pluronic [®]	65,4	64,0	59,6	646,9
D-Mannitol + 0,5 % Kollidon [®] 17 PF	73,7	66,5	63,6	67,2
D-Mannitol + 1,5 % Kollidon [®] 17 PF	107,0	83,0	78,2	82,8

4.2.4 Bestimmung der r_1 -Relaxivität

Tabelle 21: Bestimmung der longitudinalen r_1 -Relaxivität am präklinischen PET/MRT von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA-Nanokristallen bei 1,0 T und 18°C.

Region of Interest (ROI)	c (Gd^{3+}) [mM]	T_1 [ms]	$1/T_1$ [s^{-1}]
-	0,00	4.000,00	0,50
ROI 6	0,13	1.467,630	0,68
ROI 5	0,25	1.026,930	0,97
ROI 4	0,50	636,351	1,57
ROI 3	0,88	436,449	2,29
ROI 2	1,38	310,820	3,22
ROI 1	1,63	272,873	3,66

Tabelle 22: Bestimmung der r_1 -Relaxivität am Minispec von verschiedenen Metallmarkierungsreagenzien bei 0,94 T und 39°C.

	r_1 [$\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$]	R^2
DOTA(Gd)-Ac-G5-PAMAM	11,0	0,9998
Magnevist	3,2	0,9997
$\text{Tb}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA	2,1	0,9957
$\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA	2,1	0,9687

4.2.5 Bioimaging mit LA-ICP-MS

Tabelle 23: LA-ICP-MS Messung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten A549-Zellen nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{193}Ir , ^{158}Gd . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s, die Überlappung der Spots beträgt 50 %, die Fluence 0.5 J/cm² und die Wiederholanzfrequenz 20 Hz.

Microscope
Image /
Spotsize

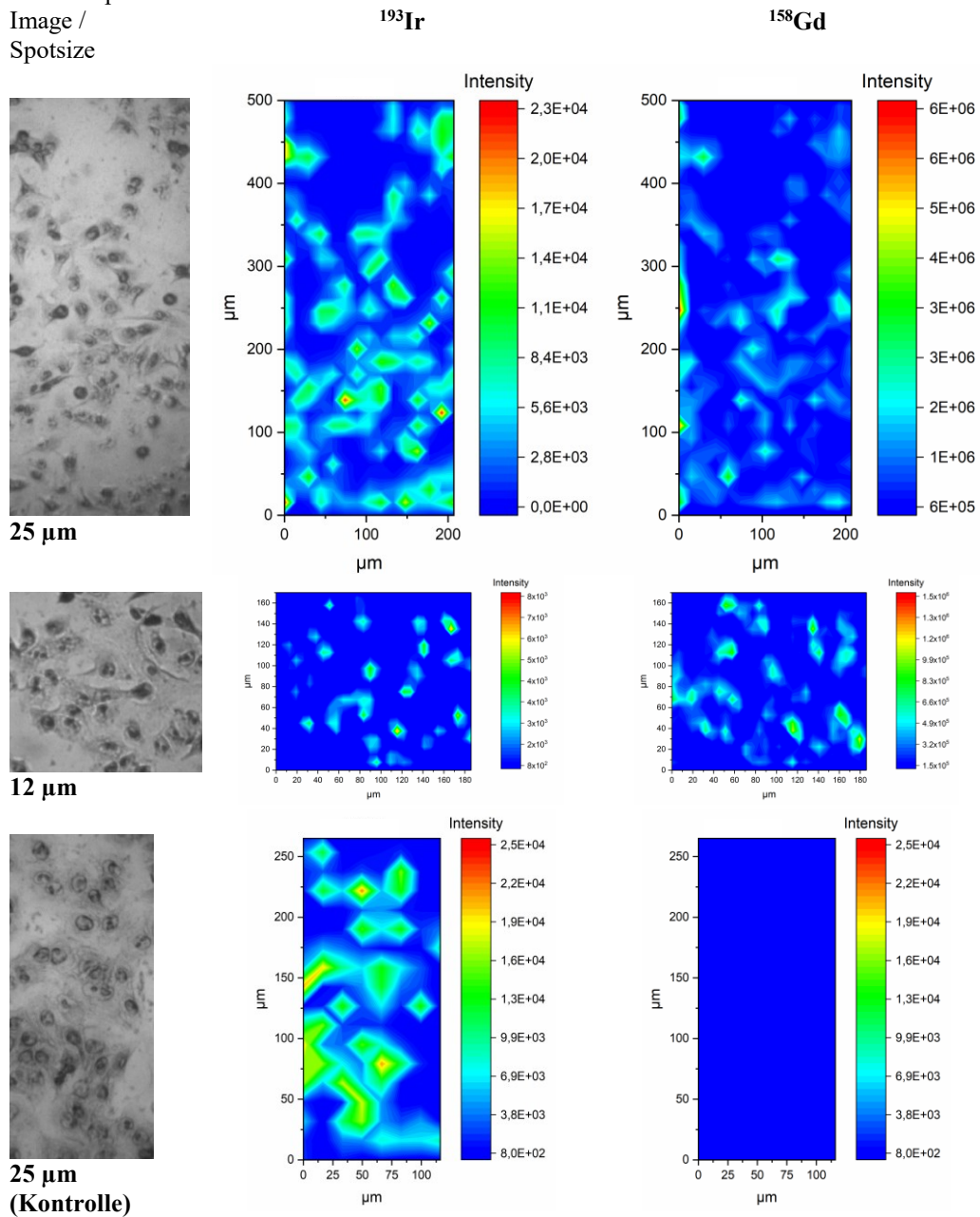


Tabelle 24: LA-ICP-MS Messung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten A549-Zellen nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{153}Eu und ^{51}V . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s, die Überlappung der Spots beträgt 50 %, die Fluence 0.5 J/cm² und die Wiederholfrequenz 20 Hz.

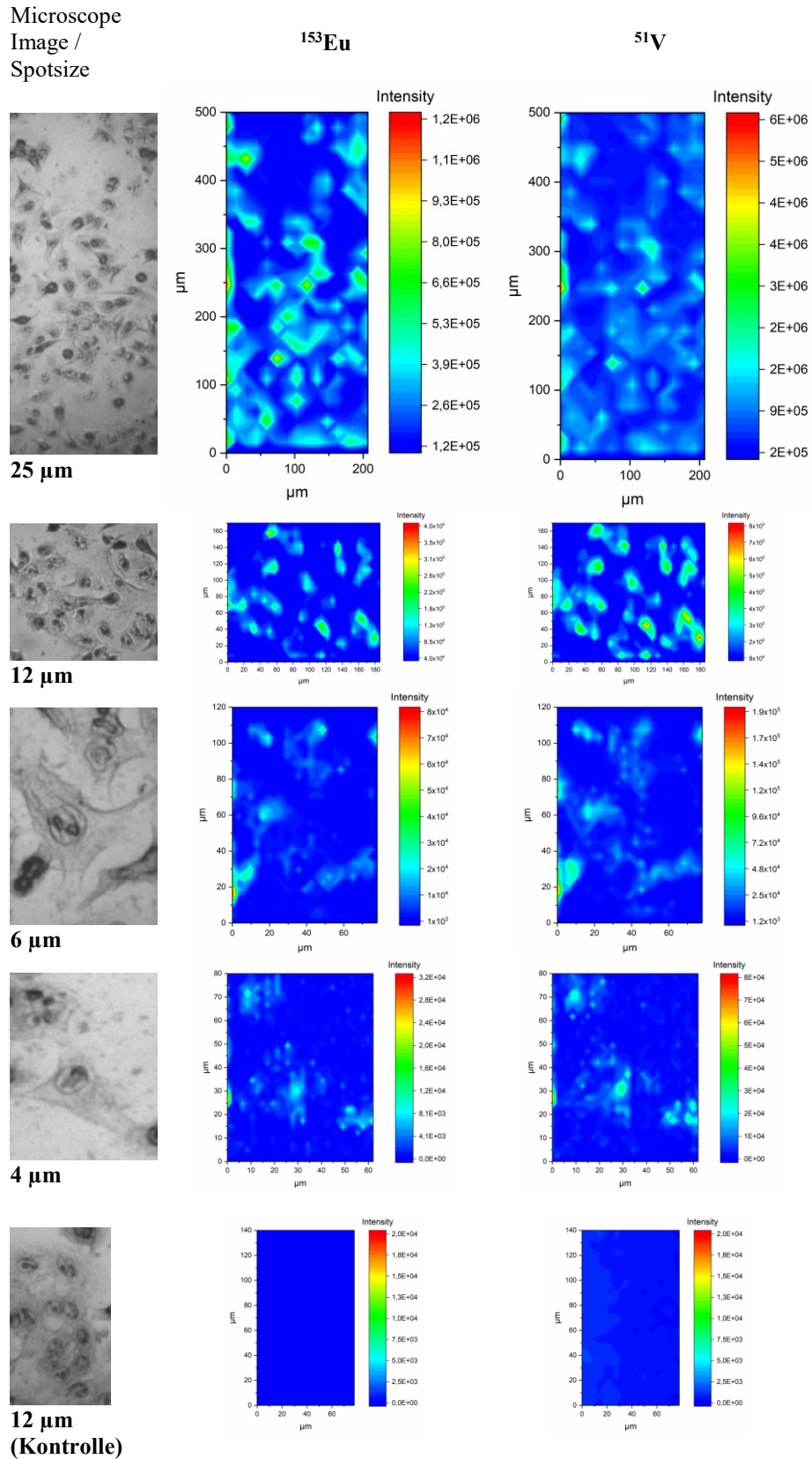


Tabelle 25: LA-ICP-MS Messung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten MSCs nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von $10 \text{ pmol Ln}^{3+}/\text{Zelle}$. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{193}Ir und ^{158}Gd . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s, die Überlappung der Spots beträgt 50 %, die Fluence 0.5 J/cm^2 und die Wiederholfrequenz 20 Hz.

Microscope
Image /
Spotsize

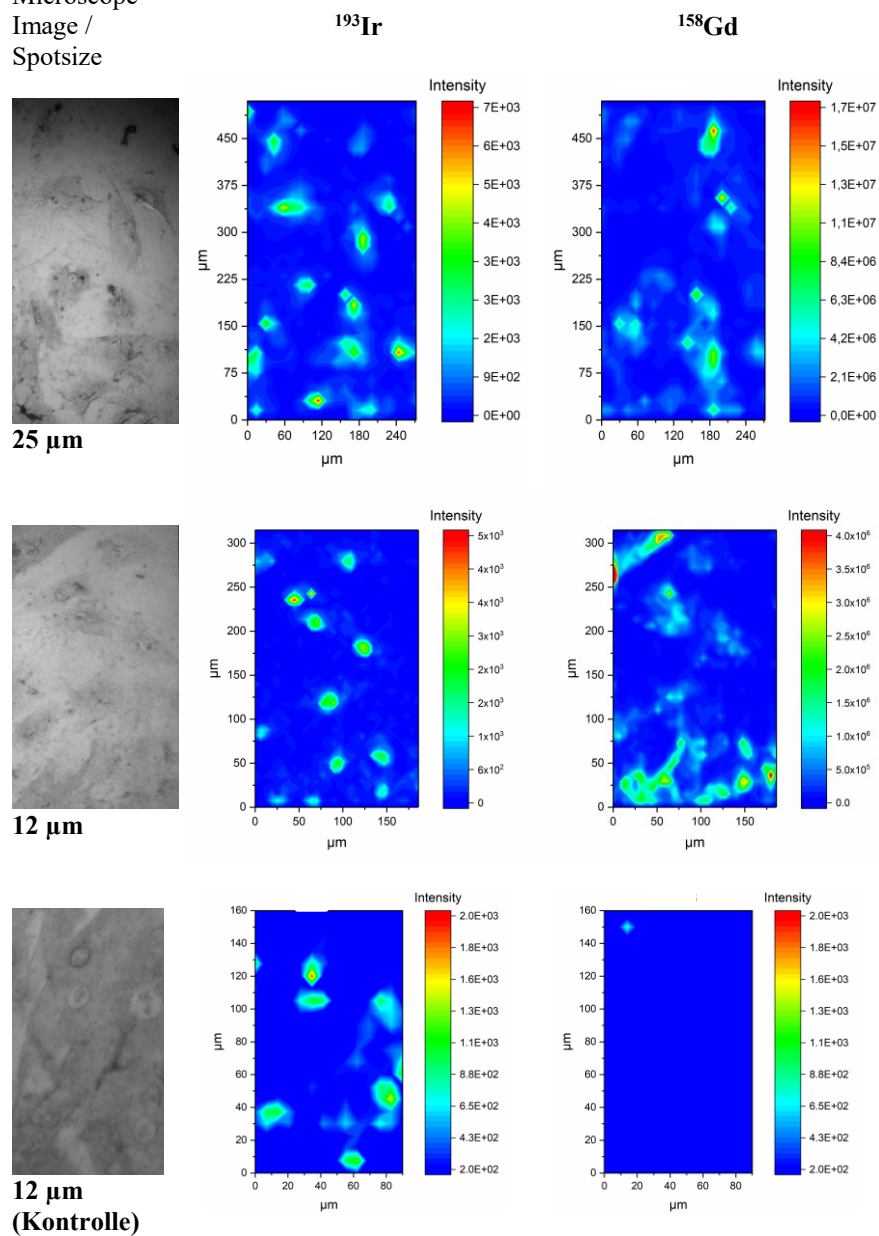
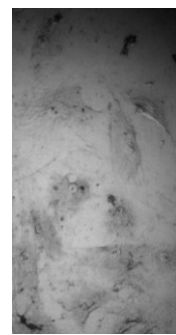
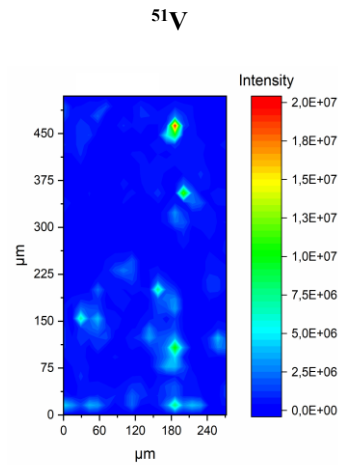
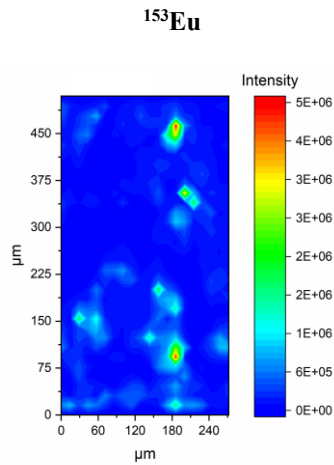


Tabelle 26: LA-ICP-MS Messung von $\text{Eu}_{0,10}\text{Gd}_{0,90}\text{VO}_4$ -PAA markierten MSCs nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln^{3+} /Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ^{153}Eu und ^{51}V . Die Auflösung entspricht der Spotgröße x Spotgröße/s, die Überlappung der Spots beträgt 50 %, die Fluence 0.5 J/cm² und die Wiederholfrequenz 20 Hz.

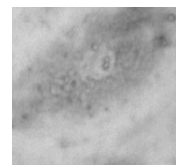
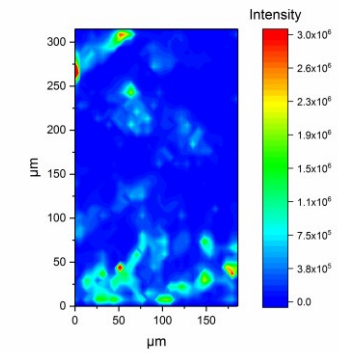
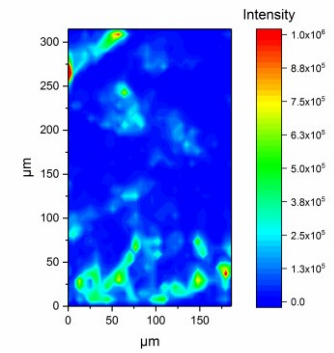
Microscope
Image /
Spotsize



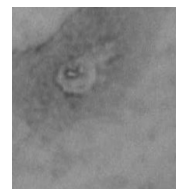
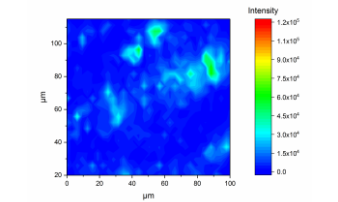
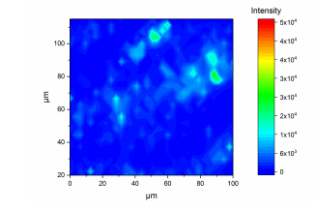
25 µm



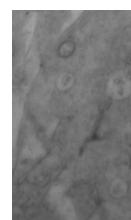
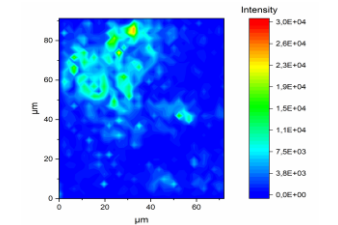
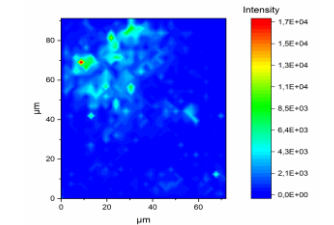
12 µm



6 µm



4 µm



12 µm
(Kontrolle)

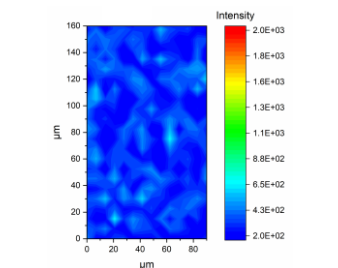
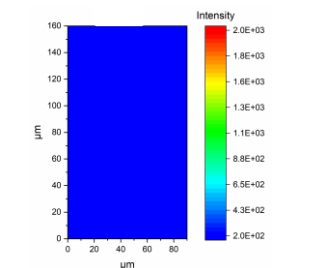


Tabelle 27: LA-ICP-MS Messung von Magnevist[®] markierten A549 Zellen nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln³⁺/Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ¹⁹³Ir und ¹⁵⁸Gd. Die Auflösung entspricht der Spotsize x Spotsize/s, die Überlappung der Spots beträgt 50 %, die Fluence 0.5 J/cm² und die Wiederholfrequenz 20 Hz.

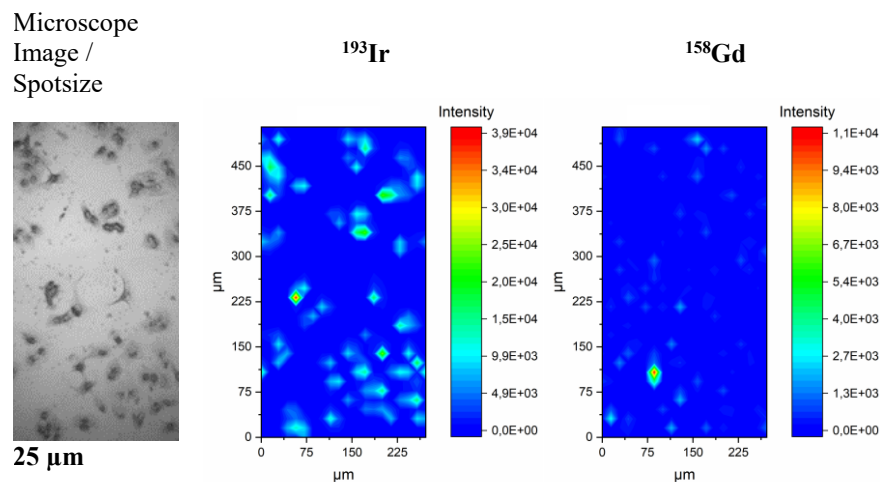
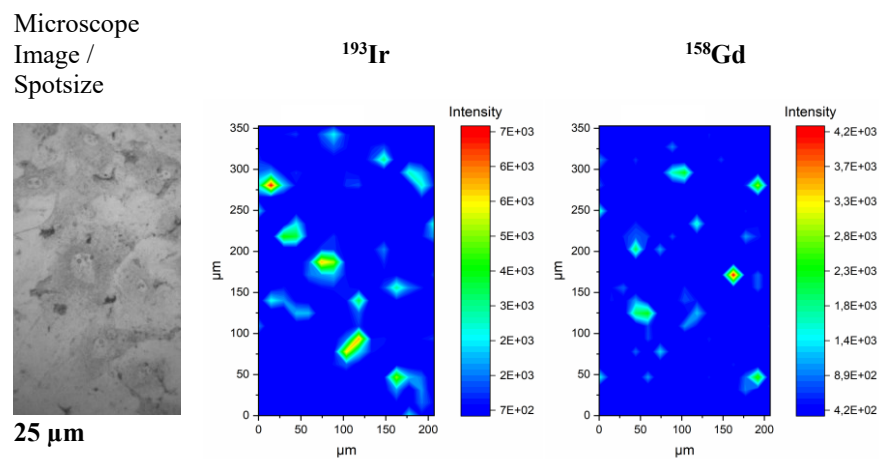


Tabelle 28: LA-ICP-MS Messung von Magnevist[®] markierten MSCs nach 6 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 pmol Ln³⁺/Zelle. Die Aufnahmen zeigen die Elementverteilungen nach Messung der Isotope ¹⁹³Ir und ¹⁵⁸Gd. Die Auflösung entspricht der Spotsize x Spotsize/s, die Überlappung der Spots beträgt 50 %, die Fluence 0.5 J/cm² und die Wiederholfrequenz 20 Hz.



Literaturverzeichnis

- [1] J. Grimm, M. F. Kircher und R. Weissleder, „Cell tracking. Principles and applications,“ *Der Radiologe*, Bd. 47, Nr. 1, pp. 25-33, 2007.
- [2] E. T. Ahrens und J. W. M. Bulte, „Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging,“ *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 13, Nr. 10, pp. 755-763, 2013.
- [3] M.-F. Bellin und A. J. Van Der Molen, „Extracellular gadolinium-based contrast media: An overview,“ *Eur J Radiol.*, Bd. 66, pp. 160-167, 2008.
- [4] A. J. Herrmann, S. Techritz und N. Jakubowski, „A simple metal staining procedure for identification and visualization of single cells by LA-ICP-MS,“ *Analyst*, Bd. 142, p. 1703–1710, 2017.
- [5] „www.aerzteblatt.de,“ 19 01 2017. [Online]. Available: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/72563/Herz-Kreislauf-Erkrankungen-und-Krebs-haeufigste-Todesursachen>. [Zugriff am 22 02 2018].
- [6] M. Jürgens und J. Popp, „Leuchtende Nanokristalle für die medizinische Diagnose,“ *Photonik*, Nr. 2, pp. 62-65, 2007.
- [7] R. Stollberger, F. Knoll, A. Petrovic, C. Diwocky und P. Opriessnig , „Hochmoderne MR-Anlage als Knotenpunkt interdisziplinärer Forschung,“ *Forschungsjournal der TU Graz - Human- und Biotechnology - Forschen auf den Spuren des Lebens*, Bd. 1, Nr. 7, pp. 10-14, 2012.
- [8] A. K. Srivastava und J. W. M. Bulte, „Seeing Stem Cells at Work In Vivo,“ *Stem Cell Rev.*, Bd. 10, Nr. 1, pp. 127-144, 2014.
- [9] H. J. Michaely, P. Reimer und S. O. Schönberg, *Atlas der MR-Angiographie*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.
- [10] H. Lüllmann, K. Mohr und L. Hein, *Pharmakologie und Toxikologie*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2010.
- [11] D. Fischer und I. Hilger, „Nanopartikel - Innovative Anwendungsgebiete in der Diagnostik und vor allem in der Therapie,“ *DAZ*, Bd. 13, p. 58, 2014.

- [12] C. Kojima, B. Turkbey, M. Ogawa, M. Bernardo, C. A. Regino, L. J. Bryant, P. L. Choyke, K. Kono und H. Kobayashi, „Dendrimer-Based MRI Contrast Agents: The Effects of PEGylation on Relaxivity and Pharmacokinetics,“ *Nanomedicine*, Bd. 7, Nr. 6, pp. 1001-1008, 2011.
- [13] J. Schilling, „idw-Informationsdienst Wissenschaft,“ 17 04 2007. [Online]. Available: <https://idw-online.de/de/news204720>. [Zugriff am 31 10 2016].
- [14] M. Modo, M. Hoehn und J. W. Bulte, „Cellular MR imaging,“ *Mol Imaging*, Bd. 4, Nr. 3, pp. 143-164, 2005.
- [15] E. Buzhor, L. Leshansky, J. Blumenthal, H. Barash, D. Warshawsky, Y. Mazor und R. Shtrichman, „Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases,“ *Regen Med*, Bd. 9, Nr. 5, pp. 649-672, 2014.
- [16] U. Himmelreich und T. Dresselaers, „Cell labeling and tracking for experimental models using Magnetic Resonance Imaging,“ *Methods*, Bd. 48, pp. 112-124, 2009.
- [17] C.-L. Zhang, T. Huang, B.-L. Wu, W.-X. H und D. Liu, „Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges,“ *Oncotarget*, Bd. 8, Nr. 43, pp. 75756-75766, 2017.
- [18] T. B. H. Geijtenbeek, „Dendritic Cell Immunotherapy, the Next Step in Cancer Treatment,“ *Multidiscip. Cancer Invest.*, Bd. 1, Nr. 2, pp. 1-2, 2017.
- [19] W. J. Rogers, C. H. Meyer und C. M. Kramer, „Technology Insight: in vivo cell tracking by use of MRI,“ *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, Bd. 3, Nr. 10, pp. 554-562, 2006.
- [20] S.-L. Hu, P.-G. Lu, L.-J. Zhang, F. Li, Z. Chen, N. Wu, H. Meng, J. K. Lin und H. Feng, „In Vivo Magnetic Resonance Imaging Tracking of SPIO-Labeled Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells,“ *J. Cell. Biochem.*, Bd. 113, Nr. 3, pp. 1005-1012, 2012.
- [21] D. J. Korchinski, M. Taha, R. Yang, N. Nathoo und J. F. Dunn, „Iron Oxide as an MRI Contrast Agent for Cell Tracking,“ *Magn. Reson Insights*, Bd. 8, pp. 15-29, 2015.
- [22] M. R. Bernsen, J. Guenoun, S. T. van Tiel und G. P. Krestin, „Nanoparticles and clinically applicable cell tracking,“ *Br J Radiol.*, Bd. 88, Nr. 1054, pp. 1-17, 2015.
- [23] S. Ju, G. Teng, Y. Zang, M. Ma, F. Chen und Y. Ni, „In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood,“ *Magn. Reson Imaging*, Bd. 24, Nr. 5, pp. 611-617, 2006.
- [24] M. F. Kircher, S. S. Gambhir und J. Grimm, „Noninvasive cell-tracking methods,“ *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, Bd. 8, pp. 677-688, 2011.

- [25] L. Li, W. Jiang, K. Luo, H. Song, F. Lan, Y. Wu und Z. Gu, „Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking,“ *Theranostics*, Bd. 3, Nr. 8, pp. 595-615, 2013.
- [26] M. Neri, C. Maderna, C. Cavazzin, V. Deidda-Vigoriti, L. S. Politi, G. Scotti, P. Marzola, A. Sbarbati, A. L. Vescovi und A. Gritti, „Efficient In Vitro Labeling of Human Neural Precursor Cells with Superparamagnetic Iron Oxide Particles: Relevance for In Vivo Cell Tracking,“ *Stem Cells*, Bd. 26, Nr. 2, pp. 505-516, 2008.
- [27] J. M. Hill, A. J. Dick, V. K. Raman, R. B. Thompson, Z.-X. Yu und K. A. Hinds, „Serial Cardiac Magnetic Resonance Imaging of Injected Mesenchymal Stem Cells,“ *Circulation*, Bd. 108, Nr. 8, pp. 1009-1014, 2003.
- [28] J. W. Bulte, A. S. Arbab, T. Douglas und J. A. Frank, „Preparation of Magnetically Labeled Cells for Cell Tracking by Magnetic Resonance Imaging,“ *Methods Enzymol.*, Bd. 386, pp. 275-299, 2004.
- [29] J. W. M. Bulte, L. D. Ma, R. L. Magin, R. L. Kamman, C. E. Hulstaert, K. G. Go, T. H. The und L. de Leij, „Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles,“ *Magn Reson Med.*, Bd. 29, Nr. 1, pp. 32-37, 1993.
- [30] J. W. Bulte, S. Zhang, P. van Gelderen, V. Herynek, E. K. Jordan, I. D. Duncan und J. A. Frank, „Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination,“ *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Bd. 96, Nr. 26, pp. 15256-15261, 1999.
- [31] J. W. M. Bulte, „In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies,“ *American Roentgen Ray Society*, Bd. 193, pp. 314-325, 2009.
- [32] F. L. Giesel, M. Stroick, M. Griebel, H. Tröster, C. W. von der Lieth, M. Requardt, M. Rius, M. Essig, H. U. Kauczor, M. G. Hennerici und M. Fatar, „Gadofluorine m uptake in stem cells as a new magnetic resonance imaging tracking method: an in vitro and in vivo study,“ *Invest Radiol.*, Bd. 41, Nr. 12, pp. 868-873, 2006.
- [33] J. Kim, Y. Piao und T. Hyeon, „Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy,“ *Chem. Soc. Rev.*, Bd. 38, pp. 372-390, 2009.

- [34] D. Koktysh, V. Bright und W. Pham, „Fluorescent magnetic hybrid nanoprobe for multimodal bioimaging,“ *Nanotechnology*, Bd. 22, p. 275606, 2011.
- [35] S. A. Corr, Y. P. Rakovich und Y. K. Gun'ko, „Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications,“ *Nanoscale Res Lett.*, Bd. 3, Nr. 3, pp. 87-104, 2008.
- [36] X. Yi, F. Wang, W. Qin, X. Yang und J. Yuan, „Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field,“ *Int J Nanomedicine*, Bd. 9, pp. 1347-1365, 2014.
- [37] C. Cabella, S. Geninatti Crich, D. Corpillo, A. Barge, C. Ghirelli, E. Bruno, V. Lorusso, F. Uggeri und S. Aime, „Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as ‘sponges’ of Gd ions,“ *Contrast Med. Mol. Imaging*, Bd. 1, Nr. 1, pp. 23-29, 2006.
- [38] J. Guenoun, G. A. Koning, G. Doeswijk, L. Bosman, P. A. Wielopolski, G. P. Grestin und M. R. Bernsen, „Cationic Gd-DTPA liposomes for highly efficient labeling of mesenchymal stem cells and cell tracking with MRI,“ *Cell Transpl.*, Bd. 21, pp. 191-205, 2012.
- [39] K. B. Ghaghada, M. Ravoori, D. Sabapathy, J. Bankson, V. Kundra und A. Annapragada, „New Dual Mode Gadolinium Nanoparticle Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging,“ *PLoS ONE*, Bd. 4, Nr. 10, p. e7628, 2009.
- [40] H. Nejadnik, T. D. Henning, T. Do, E. J. Sutton, F. Baehner, A. Horvai, B. Sennino, D. McDonald, R. Meier und B. Misselwitz, „MR Imaging Features of Gadofluorine-Labeled Matrix-Associated Stem Cell Implants in Cartilage Defects,“ *PLoS One*, Bd. 7, Nr. 12, p. e49971, 2012.
- [41] C. Aspod, D. Laurin, M. F. Janier, C. A. Mandon, C. Thivolet, C. Villiers, P. Mowat, A.-M. Madec, O. Tillement und P. Perriat, „Paramagnetic nanoparticles to track and quantify in vivo immune human therapeutic cells,“ *Nanoscale*, Bd. 5, pp. 11409-11415, 2013.
- [42] R. Di Corato, F. Gazeau, C. Le Visage, D. Fayol, P. Levitz, F. Lux, D. Letourneur, N. Luciani, O. Tillement und C. Wilhelm, „High-resolution cellular MRI: gadolinium and iron oxide nanoparticles for in-depth dual-cell imaging of engineered tissue constructs,“ *ACS Nano*, Bd. 7, pp. 7500-7512, 2013.
- [43] J. L. Vivero-Escoto, W. J. Rieter, H. Lau, R. C. Huxford-Phillips und W. Lin, „Biodegradable Polysilsesquioxane Nanoparticles as Efficient Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging,“ *Small*, Bd. 9, Nr. 20, pp. 3523-3531, 2013.

- [44] W. Ren, G. Tian, L. Zhou, W. Yin, L. Yan, S. Jin, Z. Gu und Y. Zhao, „Lanthanide ion-doped GdPO₄ nanorods with dual-modal bio-optical and magnetic resonance imaging properties,“ *Nanoscale*, Bd. 4, Nr. 12, pp. 3754-3760, 2012.
- [45] A. J. Managh, S. L. Edwards, A. Bushell, K. J. Wood, E. K. Geissler, J. A. Hutchinson, R. W. Hutchinson, H. J. Reid und B. L. Sharp, „Single cell tracking of gadolinium labelled CD4⁺ T cells by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS),“ *Anal. Chem.*, Bd. 85, Nr. 22, pp. 10627-10634, 2013.
- [46] J. W. Bulte, T. Douglas, B. Witwer, S. C. Zhang, E. Strable, B. K. Lewis, H. Zywicke, B. Miller, P. van Gelderen und B. M. Moskowitz, „Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells,“ *Nat. Biotechnol.*, Bd. 19, Nr. 12, pp. 1141-1147, 2001.
- [47] B. J. Shen, L.-D. Sun, J.-D. Zhu, L.-H. Wei, H.-F. Sun und C. H. Yan, „Biocompatible Bright YVO₄:Eu Nanoparticles as Versatile Optical Bioprobes,“ *Adv. Funct. Mater.*, Bd. 20, Nr. 21, pp. 3708-3714, 2010.
- [48] J. A. T. Pugh, A. G. Cox, C. W. McLeod, J. Bunch, M. J. Writer, S. L. Hart, A. Bienemann, E. White und J. Bell, „Elemental imaging of MRI contrast agents: benchmarking of LA-ICP-MS to MRI,“ *Anal. Bioanal. Chem.*, Bd. 403, Nr. 6, pp. 1641-1649, 2012.
- [49] „Nano-Sicherheit,“ [Online]. Available: <http://www.nano-sicherheit.de/Nanomaterialien>. [Zugriff am 16 07 2018].
- [50] „Dendritech,“ [Online]. Available: <http://www.dendritech.com/pamam.html>. [Zugriff am 31 05 2018].
- [51] S. D. Swanson, J. F. Kukowska-Latallo, A. K. Patri, C. Chen, S. Ge, Z. Cao, A. Kotlyar, A. T. East und J. R. Baker, „Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement,“ *Int. J. Nanomed.*, Bd. 3, Nr. 2, pp. 201-210, 2008.
- [52] C. Zech, Synthesestrategien zur gezielten Kontrolle makromolekularer Architekturen, München: Herbert Utz Verlag GmbH, 2000.
- [53] A. M. Grumezescu, Nanobiomaterials in Drug Delivery, Elsevier, 2016.
- [54] A. J. Ruiz-Sanchez, C. Parolo, B. S. Miller, E. R. Gray, K. Schlegel und R. A. McKendry, „Tuneable plasmonic gold dendrimer nanochains for sensitive disease detection,“ *J. Mater. Chem. B*, Bd. 5, pp. 7262-7266, 2017.

- [55] A. K. Patri, I. J. Majoros und J. R. Baker, „Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery,“ *Current Opinion in Chemical Biology*, Bd. 6, pp. 466-471, 2002.
- [56] I. J. Majoros, B. Keszler, S. Woehler, T. Bull und J. R. Baker, „Acetylation of Poly(amidoamine) Dendrimers,“ *Macromolecules*, Bd. 36, Nr. 15, pp. 5526-5529, 2003.
- [57] R. B. Kolhatkar, K. M. Kitchens, P. W. Swaan und H. Ghandehari, „Surface Acetylation of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Decreases Cytotoxicity while Maintaining Membrane Permeability,“ *Bioconjugate Chem.*, Bd. 18, Nr. 6, pp. 2054-2060, 2007.
- [58] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Inc., 2013.
- [59] N. Jakubowski, L. Waentig, H. Hayen, A. Venkatachalam, A. von Bohlen, P. H. Roos und A. Manz, „Labelling of proteins with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid and lanthanides and detection by ICP-MS,“ *J. Anal. At. Spectrom.*, Bd. 23, pp. 1497-1507, 2008.
- [60] L. Waentig, Dissertation: Strategien für das Multielement-Labeling von Proteinen und Antikörpern für LA-ICP-MS Anwendungen, Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund, 2010.
- [61] X. Zhu und S. Z. Lever, „Formation kinetics and stability studies on the lanthanide complexes of DOTA by capillary electrophoresis,“ *Electrophoresis*, Bd. 23, pp. 1348-1358, 2002.
- [62] Y. Liu, G. Liu, X. Dong, J. Wang und W. Yu, „Tunable photoluminescence and magnetic properties of Dy³⁺ and Eu³⁺ doped GdVO₄ multifunctional phosphors,“ *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Bd. 17, pp. 26638-26644, 2015.
- [63] G. Tian, Z. Gu, X. Liu, L. Zhou, W. Yin, L. Yan, S. Jin, W. Ren, G. Xing und S. Li, „Facile Fabrication of Rare-Earth-Doped Gd₂O₃ Hollow Spheres with Upconversion Luminescence, Magnetic Resonance, and Drug Delivery Properties,“ *J. Phys. Chem. C*, Bd. 115, Nr. 48, pp. 23790-23796, 2011.
- [64] W. J. Mulder, A. W. Griffioen, G. J. Strijkers, D. P. Cormode, K. Nicolay und Z. A. Fayad, „Magnetic and fluorescent nanoparticles for multimodality imaging,“ *Nanomedicine*, Bd. 2, Nr. 3, pp. 307-324, 2007.

- [65] A. Szczeszak, T. Grzyb, Z. Siniadecki, N. Andrzejewska, S. Lis, M. Matczak, G. Nowaczyk, S. Jurga und B. Idzikowski, „Structural, Spectroscopic, and Magnetic Properties of Eu³⁺-Doped GdVO₄ Nanocrystals Synthesized by a Hydrothermal Method,“ *Inorg. Chem.*, Bd. 53, Nr. 23, pp. 12243-12252, 2014.
- [66] T. V. Gavrilovic, D. J. Jovanovic, V. Lojpur und M. D. Dramicanin, „Multifunctional Eu³⁺- and Er³⁺/ Yb³⁺ -doped GdVO₄ nanoparticles synthesized by reverse micelle method,“ *Sci. Rep.*, Bd. 4, Nr. 4209, pp. 1-9, 2014.
- [67] F. S. Richardson, „Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems,“ *Chem. Rev.*, Bd. 82, pp. 541-552, 1982.
- [68] M. Abdesslem, M. Schoeffel, I. Maurin, R. Ramodiharilafy, G. Autret, O. Clément, P. L. Tharaux, J. P. Boilot, T. Gacoin und C. Bouzigues, „Multifunctional Rare Earth Vanadate Nanoparticles: Luminescent Labels, Oxidant Sensors and Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents,“ *ACS Nano*, Bd. 8, Nr. 11, pp. 11126-11137, 2014.
- [69] A. Huignard, T. Gacoin und J.-P. Boilot, „Synthesis and Luminescence Properties of Colloidal YVO₄:Eu Phosphors,“ *Chem. Mater.*, Bd. 12, Nr. 4, pp. 1090-1094, 2000.
- [70] A. Huignard, V. Buissette, G. Laurent, T. Gacoin und J. P. Boilot, „Synthesis and Characterizations of YVO₄:Eu Colloids,“ *Chem. Mater.*, Bd. 14, Nr. 5, pp. 2264-2269, 2002.
- [71] L. Cheng, K. Yang, S. Zhang, M. Shao, S. Lee und Z. Liu, „Highly-Sensitive Multiplexed in vivo Imaging Using PEGylated Upconversion Nanoparticles,“ *Nano Res.*, Bd. 3, Nr. 10, pp. 722-732, 2010.
- [72] F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen und X. Liu, „Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy,“ *Analyst*, Bd. 135, pp. 1839-1854, 2010.
- [73] L. Cheng, K. Yang, Y. Li, J. Chen, C. Wang, M. Shao, S. T. Lee und Z. Liu, „Facile Preparation of Multifunctional Upconversion Nanoprobes for Multimodal Imaging and Dual-Targeted Photothermal Therapy,“ *Angew. Chem.*, Bd. 50, Nr. 32, pp. 7523 -7528, 2011.
- [74] N. O. Nunez, S. Rivera, D. Alcantara, J. M. de la Fuente, J. Garcia-Sevillano und M. Ocana, „Surface modified Eu:GdVO₄ nanocrystals for optical and MRI imaging,“ *Dalton Trans.*, Bd. 42, pp. 10725-10734, 21 May 2013.
- [75] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer, Stryer Biochemie, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.

- [76] C.-W. Lu, Y. Hung, J.-K. Hsiao, M. Yao, T. H. Chung, Y. S. Lin, S. H. Wu, S. C. Hsu, H. M. Liu und C. Y. Mou, „Bifunctional Magnetic Silica Nanoparticles for Highly Efficient Human Stem Cell Labeling,“ *Nano Lett.*, Bd. 7, Nr. 1, pp. 149-154, 2007.
- [77] K. Y. Win und S. S. Feng, „Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs,“ *Biomaterials*, Bd. 26, Nr. 15, pp. 2713-2722, 2005.
- [78] A. Verma und F. Stellacci, „Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions,“ *small*, Bd. 6, Nr. 1, pp. 12-21, 2010.
- [79] S. Conner und S. Schmid, „Regulated portals of entry into the cell,“ *Nature*, Bd. 422, pp. 37-44, 2003.
- [80] H. Hillaireau und P. Couvreur, „Nanocarriers’ entry into the cell: relevance to drug delivery,“ *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 66, pp. 2873-2896, 2009.
- [81] M. Rabinovitch, „Professional and non-professional phagocytes: an introduction,“ *Trends Cell Biol*, Bd. 5, pp. 85-87, 1995.
- [82] S. J. Royle, „The cellular functions of clathrin,“ *Cell Mol Life Sci.*, Bd. 63, Nr. 16, pp. 1823-1832, 2006.
- [83] M. Reiser, *Magnetresonanztomographie*, S. W., Hrsg., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2002.
- [84] E. J. Werner, A. Datta, C. J. Jocher und K. N. Raymond, „MRI-Kontrastmittel mit hoher Relaxivität: Komplexchemie im Dienste medizinischer Bildgebung,“ *Angew. Chem.*, Bd. 120, Nr. 45, pp. 8696-8709, 2008.
- [85] R. M. Botnar, M. Stuber, K. V. Kissinger, W. Y. Kim, E. Spuentrup und W. J. Manning, „Noninvasive Coronary Vessel Wall and Plaque Imaging With Magnetic Resonance Imaging,“ *Circulation*, Bd. 102, Nr. 21, pp. 2582-2587, 2000.
- [86] G. P. Schmidt, R. Schmid, K. Hahn und M. F. Reiser, „Ganzkörper-MRT und PET-CT in der Tumordiagnostik,“ *Radiologe*, Bd. 44, pp. 1079-1087, 2004.
- [87] M. Forsting und O. Jansen, *MRT des Zentralnervensystems*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2014.
- [88] D. U. Silverthorn, *Physiologie*, München: Pearson, 2009.

- [89] U. Fischer und F. Baum, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2014.
- [90] K.-H. Hellwege, Einführung in die Festkörperphysik, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo: Springer-Verlag, 1988.
- [91] M. Hesse, H. Meier und B. Zech, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Stuttgart: Thieme, 2005.
- [92] J. Ridgway, „Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: Part I,“ *J Cardiovasc Magn Reson.*, Bd. 12, Nr. 71, pp. 1-28, 2010.
- [93] W. C. Whiting und R. F. Zernicke, Biomechanics of Musculoskeletal Injury, Human Kinetics Publishers, 2008.
- [94] D. Weishaupt, V. D. Köchli und B. Marincek, Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung, Springer, 2009.
- [95] M. Vahlensieck und M. Reiser, MRT des Bewegungsapparats, Georg Thieme Verlag, 2014.
- [96] M. Bottrill, L. Kwok und N. J. Long, „Lanthanides in magnetic resonance imaging,“ *Chem. Soc. Rev.*, Nr. 35, pp. 557-571, 2006.
- [97] G. W. Bourne und J. M. Trifaró, „The gadolinium ion: A potent blocker of calcium channels and catecholamine release from cultured chromaffin cells,“ *Neuroscience*, Bd. 7, Nr. 7, pp. 1615-1622, 1982.
- [98] S. Becker, O. Witzke und A. Kribben, „Nephrogene systemische Fibrose,“ *Medizinische Klinik*, Bd. 104, Nr. 3, pp. 204-209, 2009.
- [99] A. M. Mohs und Z. R. Lu, „Gadolinium(III)-based blood-pool contrast agents for magnetic resonance imaging: status and clinical potential,“ *Expert Opin. Drug Deliv.*, Bd. 4, Nr. 2, pp. 14-164, 2007.
- [100] E. A. Permyakov und R. H. Kretsinger, Calcium Binding Proteins, Wiley, 2011.
- [101] S. Cotton, Lanthanide and Actinide Chemistry, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006.
- [102] M. K. Thompson, M. Botta, G. Nicolle, L. Helm, S. Aime, A. E. Merbach und K. N. Raymond, „A Highly Stable Gadolinium Complex with a Fast, Associative Mechanism of Water Exchange,“ *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 125, Nr. 47, pp. 14274-14275, 2003.

- [103] „www.bfarm.de“, 15.12.2017. [Online]. Available: https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RV_STP/g-l/gadolinium-kernspin-neu.html. [Zugriff am 22.02.2018].
- [104] G. Pohl-Apel und H. Bengs, „Drug Delivery Systems: Mit Nanopartikeln Wirkstoffe ans Ziel bringen“, *BIOspektrum*, Nr. 07.10, pp. 816-817, 2010.
- [105] X. Dong und R. J. Mumper, „Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress“, *Nanomedicine*, Bd. 5, Nr. 4, pp. 597-615, 2010.
- [106] S. Schumacher, R. Wüstneck, B.-R. Paulke, R. Cartier und U. Pison, „Gd³⁺ binding of carboxylated polyglycidyl methacrylate latices and their colloidal stability“, *Colloid Polym. Sci.*, Bd. 287, Nr. 2, pp. 203-214, 2009.
- [107] C. H. Reynolds, N. Annan, K. Beshah, J. H. Huber, S. H. Shaber, R. E. Lenkinski und J. A. Wortman, „Gadolinium-loaded nanoparticles: New contrast agents for magnetic resonance imaging“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 122, Nr. 37, pp. 8940-8945, 2000.
- [108] J. Kreuter, *Colloidal Drug Delivery Systems*, MARCEL DEKKER, INC., 1994.
- [109] A. Gressner, *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.
- [110] K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann und K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, München: Elsevier, 2017.
- [111] L. C. Junqueira und J. Carneiro, *Histologie - Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1996.
- [112] R. P. Choudhury, V. Fuster und Z. A. Fayad, „Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Bd. 3, pp. 913-925, 2004.
- [113] J. Pisonero, B. Fernandez und D. Günther, „Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis“, *J. Anal. At. Spectrom.*, Bd. 24, pp. 1145-1160, 2009.
- [114] A. Sussulini und J. S. Becker, „Application of laser microdissection ICP-MS for high resolution elemental mapping in mouse brain tissue: A comparative study with laser ablation ICP-MS“, *Talanta*, Bd. 132, pp. 579-582, 2015.

- [115] A. Matusch, C. Depboylu, C. Palm, B. Wu, G. U. Höglinger, M. K. Schäfer und J. S. Becker, „Cerebral Bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP Mouse Model of Parkinson’s Disease Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS),“ *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, Bd. 21, Nr. 1, pp. 161-171, 2010.
- [116] J. S. Becker und N. Jakubowski, „The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences,“ *Chem. Soc. Rev.*, Bd. 38, pp. 1969-1983, 2009.
- [117] D. Günther und B. Hattendorf, „Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry,“ *Trends Anal. Chem.; TrAC*, Bd. 24, Nr. 3, pp. 255-265, 2005.
- [118] D. Stuewer und N. Jakubowski, „Elemental Analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Sector Field Instruments: a Progress Report,“ *J. Mass Spectrom.*, Bd. 33, pp. 579-590, 1998.
- [119] H. Greim, Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Bd. 2: Analysen in biologischem Material, Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
- [120] N. Jakubowski, L. Moens und F. Vanhaecke, „Sector field mass spectrometers in ICP-MS,“ *Spectrochim. Acta B*, Bd. 53, pp. 1739-1763, 1998.
- [121] L. Mueller, A. J. Herrmann, S. Techritz, U. Panne und N. Jakubowski, „Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS,“ *Anal. Bioanal. Chem.*, Bd. 409, Nr. 14, pp. 3667-3676, 2017.
- [122] L. Mueller, T. Mairinger, G. Hermann, G. Koellensperger und S. Hann, „Characterization of metal-tagged antibodies used in ICP-MS-based immunoassays,“ *Anal Bioanal Chem*, Bd. 406, pp. 163-169, 2014.
- [123] L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P. H. Roos und M. W. Linscheid, „Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS,“ *J. Anal. At. Spectrom.*, Bd. 27, pp. 1311-1320, 2012.
- [124] I. Konz, B. Fernández, M. L. Fernández, R. Pereiro und A. Sanz-Medel, „Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications,“ *Anal Bioanal Chem*, Bd. 403, pp. 2113-2125, 2012.

- [125] C. Giesen, H. A. O. Wang, D. Schapiro, N. Zivanovic , A. Jacobs, B. Hattendorf, P. J. Schöffler, D. Grolimund, J. M. Buhmann und S. Brandt, „highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry,“ *Nat. Methods*, Bd. 11, Nr. 4, pp. 417-421, 2014.
- [126] <http://www.b-crt.de>. [Online]. Available: <https://www.b-crt.de/forschung/core-units/flow-cytometry-mass-cytometry/massenzytometrie-cytof2/>. [Zugriff am 15 03 2018].
- [127] H. Dunkelberg, T. Gebel und A. Hartwig, *Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelüberwachung*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012.
- [128] PerkinElmer, *The 30-Minute Guide to ICP-MS - Technical Note*, Copyright 2004-2011.
- [129] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, Marcel Dekker, Inc., 2004.
- [130] R. Thomas, „A Beginner’s Guide to ICP-MS,“ *Spectroscopy*, Bd. 17, Nr. 2, pp. 42-48, 2002.
- [131] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper und D. Myrtek, *Der Experimentator: Immunologie*, Springer Spektrum, 2014.
- [132] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, 2002.
- [133] R. Winter und F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Stuttgart: B.G. Teubner, 1998.
- [134] R. Pecora, *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*, New York: Plenum Press, 1985.
- [135] R. H. Mueller, R. Schuhmann und K. Thode, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*, Berlin: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1996.
- [136] P. Somasundaran, S. C. Mehta, X. Yu und S. Krishnakumar, *Colloid Systems and Interfaces Stability of Dispersions through Polymer and Surfactant Adsorption*, Taylor & Francis Group, LLC, 2009.
- [137] T. M. Riddick, *Control of colloid stability through zeta potential; With a closing chapter on its relationship to cardiovascular disease*, Published for Zeta-Meter, 1968.
- [138] M. Thompson und J. N. Walsh, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. In: *Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Boston, MA: Springer, 1989.
- [139] R. Brennan, J. Dulude und R. Thomas, „Approaches to maximize performance and reduce the frequency of routine maintenance in ICP-MS,“ *Spectroscopy*, Bd. 30, Nr. 10, pp. 12-25, 2015.

- [140] F. Vanhaecke und P. Degryse, *Isotopic Analysis*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012.
- [141] N. Wiederneit, Dissertation: Einsatz der ICP Massenspektrometrie zur Multielementbestimmung in biologischen Proben, Hamburg, 2001.
- [142] H. Rahmania, A. Mutalib, M. Ramli und J. Levita, „Synthesis and stability test of radiogadolinium(III)-DOTA-PAMAM G3.0-trastuzumab as SPECT-MRI molecular imaging agent for diagnosis of HER-2 positive breast cancer,“ *J Radiat Res Appl Sci.*, Bd. 8, pp. 91-99, 2015.
- [143] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han und G. Bao, „The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction,“ *Nanomedicine*, Bd. 11, Nr. 6, pp. 673-692, 2016.
- [144] C. L. Waite, S. M. Sparks, K. E. Uhrich und C. M. Roth, „Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA,“ *BMC Biotechnology*, Bd. 9, Nr. 38, pp. 1-10, 2009.
- [145] L. Waentig, P. H. Roos und N. Jakubowski, „Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry,“ *J. Anal. At. Spectrom.*, Bd. 24, pp. 924-933, 12 May 2009.
- [146] C. Chang und D. Mao, „Thermal Dehydration Kinetics of a Rare Earth Hydroxide, Gd(OH)₃,“ *Int. J. Chem. Kinet.*, Bd. 39, Nr. 2, pp. 75-81, 2006.
- [147] A. Acker und H. Bremer, „<http://www.spektrum.de>,“ [Online]. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/chemie/vanadate/9683>. [Zugriff am 30.08.2017].
- [148] N. N. Greenwood und A. Earnshaw, *Chemistry of the elements*, United Kingdom: Pergamon Press, 1984.
- [149] J. Matuszak, J. Baumgartner, J. Zaloga, M. Juenet, A. E. da Silva, D. Franke, G. Almer, I. Texier, D. Faivre und J. M. Metselaar, „Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing,“ *Nanomedicine (Lond.)*, Bd. 11, Nr. 6, pp. 597-616, 2016.
- [150] X. Zhang, Z. Ai, F. Jia und L. Zhang, „Generalized One-Pot Synthesis, Characterization, and Photocatalytic Activity of Hierarchical BiOX (X = Cl, Br, I) Nanoplate Microspheres,“ *J. Phys. Chem. C*, Bd. 112, Nr. 3, pp. 747-753, 2008.
- [151] S. Sepeur, *Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*, Hannover: Vincentz Network, 2008.

- [152] B. Jirgensons und M. Straumanis, Kurzes Lehrbuch der Kolloidchemie, Berlin Göttingen Heidelberg: Springer-Verlag, 1949.
- [153] G. J. Lauth und J. Kowalczyk, Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2016.
- [154] D. Mahl, Dissertation: Synthese, Löslichkeit und Stabilität von Gold-Nanopartikeln in biologischen Medien, 2011.
- [155] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag und S. Franzen, „Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces,“ *Langmuir*, Bd. 21, Nr. 20, pp. 9303-9307, 2005.
- [156] G. Gstraunthaler und T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2013.
- [157] H. Ackermann, AllEx - Alles fürs Examen: Das Kompendium für die 2. ÄP, Thieme, 2012.
- [158] K. Munk, Taschenlehrbuch Biologie Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2008.
- [159] F. Kayser, E. Böttger, P. Deplazes, O. Haller und A. Roers, Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie, Thieme, 2014.
- [160] L. Yang, L. Li, M. Zhao und G. Li, „Size-induced variations in bulk/surface structures and their impact on photoluminescence properties of GdVO₄:Eu³⁺ nanoparticles,“ *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Bd. 14, p. 9956–9965, 2012.
- [161] W. Yin, L. Zhou und Z. Gu, „Lanthanide-doped GdVO₄ upconversion nanophosphors with tunable emissions and their applications for biomedical imaging,“ *J. Mater. Chem.*, Bd. 22, p. 6974–6981, 2012.
- [162] H. Günzler und H.-U. Gremlich, IR Spektroskopie, Weinheim: Wiley-VCH GmbH & Co.KGaA, 2003.
- [163] L. Spieß, G. Teichert, R. Schwarzer, H. Behnken und C. Genzel, Moderne Röntgenbeugung, Wiesbaden: Vieweg + Teubner, 2009.
- [164] H. Krischner, Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse, Vieweg-Verlag: Wiesbaden, 1980.
- [165] M. Haschke und J. Flock, Röntgenfluoreszenzanalyse in der Laborpraxis, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017.

- [166] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH, 2011.
- [167] A. Linnemann und S. Kühl, *Grundlagen der Licht- und Elektronenmikroskopie*, Stuttgart: Eugen Ulmer KG, 2018.
- [168] D. H. M. Buchold, „Ein Beitrag zur Darstellung komplexer nanoskaliger Cyanide und Oxide sowie nanoskaliger Hohlkugeln inw/o Mikroemulsionen,“ Cuvillier Verlag, Göttingen, 2007.
- [169] K. Riwozki, H. Meyssamy, H. Schnablegger, A. Kornowski und M. Haase, „Synthese von Kolloiden und redispergierbaren Pulvern stark lumineszierender LaPO₄:Ce,Tb-Nanokristalle,“ *Angew. Chem.*, Bd. 113, Nr. 3, pp. 574-578, 2001.
- [170] M. Schoeffel, „Multifunctional Rare Earth Vanadate Nanoparticles: Luminescent Labels, Oxidant Sensors and Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents,“ *Materials Science*, 2012.
- [171] T. Kim, N. Lee, Y. I. Park, J. Kim, E. Y. Lee, M. Yi, B.-G. Kim, T. Hyeon und T. Yu, „Mesoporous silica-coated luminescent Eu³⁺ doped GdVO₄ nanoparticles for multimodal imaging and drug delivery,“ *RSC Adv.*, Bd. 4, p. 45687–45695, 2014.
- [172] F. Zheng, W. Wang und P. Yang, „GdVO₄Ln (Ln = Eu, Dy, and Sm) Microstructures: Solvothermal and Luminescent Properties,“ *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, Bd. 5, p. 596–599, 2011.
- [173] K. Binnemans, „Interpretation of europium(III) spectra,“ *Coord. Chem. Rev.*, Bd. 295, pp. 1-45, 2015.
- [174] T. H. Tran, K. H. Tran, T. K. Hoang, T. H. Pham und Q. M. Le, „Fabrication and properties of terbium phosphate nanorods,“ *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, Bd. 3, p. 015010 (4pp), 2012.
- [175] D. Singh, K. Singh, S. Bhagwan, R. K. Saini, R. Srivastava und I. Singh, „Preparation and photoluminescence enhancement in terbium(III) ternary complexes with β -diketone and monodentate auxiliary ligands,“ *Cogent Chemistry*, Bd. 2, pp. 1-11, 2016.
- [176] Z. Zhou, Q. Wang, S. Huo und Y. Yang, „Luminescent terbium(III) complex-based titania sensing material for fluoride and its photocatalytic properties,“ *Photochem. Photobiol. Sci.*, Bd. 11, Nr. 4, p. 738–743, 2012.

- [177] Y. Song, B. Shao, Feng Y., W. Lü, J. Huo, S. Zhao, M. Liu, G. Liu und H. You, „Emission Enhancement and Color Tuning for GdVO₄:Ln³⁺ (Ln = Dy, Eu) by Surface Modification at Single Wavelength Excitation,“ *Inorg. Chem.*, Bd. 56, Nr. 1, pp. 282-291, 2017.
- [178] F. Schneider und G. R. Fink, Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.
- [179] M. Babos, „Application Note: Quantitative MR Parametric Mapping in nanoScan MRI,“ Mediso Medical Imaging Systems, 2014.
- [180] M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt und H.-J. Weinmann, „Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths,“ *Invest Radiol*, Bd. 40, Nr. 11, pp. 715-724, 2005.
- [181] L. Beyer und J. A. Cornejo, Koordinationschemie: Grundlagen - Synthesen- Anwendungen, Heidelberg: Springer Spektrum, 2012.
- [182] E. Wintermantel und S.-W. Ha, Medizintechnik-Life Science Engineering, Springer-Verlag, 2009.
- [183] R. Kuhn und D. Jerchel, „Reduktion von Tetrazolium-Salzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen,“ *Chem. Ber.*, Bd. 74, Nr. 6, pp. 949-952, 1941.
- [184] T. Mosmann, „Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,“ *J Immunol Methods*, Bd. 65, Nr. 1-2, pp. 55-63, 1983.
- [185] P. E. DiCorleto und C. A. de la Motte, „Characterization of the Adhesion of the Human Monocytic Cell Line U937 to Cultured Endothelial Cells,“ *J. Clin. Invest.*, Bd. 75, pp. 1153-1161, 1985.
- [186] C. Wagener und O. Müller, Molekulare Onkologie, Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe, 2010.
- [187] T. J. Vogl, M. G. Mack und J. O. Balzer, LeberMetastasen: Diagnose — Intervention — Therapie, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2002.
- [188] T. H. Schiebler und W. Schmidt, Anatomie, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1991.
- [189] S. Aime und P. Caravan, „Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition,“ *Magn Reson Imaging*, Bd. 30, Nr. 6, p. 1259–1267, 2009.
- [190] H. Jörg, Optische Mikroskopie, Weinheim: Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, 2014.

- [191] A. X. Trautwein, U. Kreibig und J. Hüttermann, Physik für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten, Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2008.
- [192] T. Scientific, „DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride),“ [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1306>. [Zugriff am 10. Oktober 2017].
- [193] O. Dössel und T. M. Buzug, Biomedizinische Technik - Medizinische Bildgebung, Berlin Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2014.
- [194] C. Raulin und B. Greve, Laser und IPL-Technologie in der Dermatologie und Ästhetischen Medizin, Stuttgart New York: Schattauer, 2003.
- [195] A. Cabezas, K. G. Bache, A. Brech und H. Stenmark, „Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes,“ *J Cell Sci*, Bd. 118, Nr. 12, pp. 2625-2635, 2005.
- [196] E. Moreno-Gordaliza, C. Giesen, A. Lázaro, D. Esteban-Fernández, B. Humanes, B. Cañas, U. Panne, A. Tejedor, N. Jakubowski und M. M. Gómez-Gómez, „Elemental Bioimaging in Kidney by LA-ICP-MS As a Tool to Study Nephrotoxicity and Renal Protective Strategies in Cisplatin Therapies,“ *Anal. Chem.*, Bd. 83, Nr. 20, pp. 7933-7940, 2011.
- [197] O. Ornatsky, X. Lou, S. Schäfer, W. Sheldrick, V. Baranov, D. Bandura und S. Tanner, „Study of cell antigens and intracellular DNA by identification of element-containing labels and metallointercalators using inductively coupled plasma mass spectrometry,“ *Anal Chem.*, Bd. 80, Nr. 7, pp. 2539-2547, 2008.
- [198] J. Khandare, A. Mohr, M. Calderón, P. Welker, K. Licha und R. Haag, „Structure-biocompatibility relationship of dendritic polyglycerol derivatives,“ *Biomaterials*, Bd. 31, Nr. 15, pp. 4268-4277, 2010.
- [199] P. J. Yunker, T. Still, M. A. Lohr und A. G. Yodh, „Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions,“ *Nature*, Bd. 476, pp. 308-311, 2011.
- [200] M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Alvarez, H. Gonzalez_Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski und R. Pereiro, „Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by laser ablation-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags,“ *Microchim Acta*, Bd. 185, Nr. 1, pp. 64-72, 2018.
- [201] W. Funk, V. Dammann und G. Donnevert, Qualitätssicherung in der analytischen Chemie, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Bei Dr. Andreas Briel und Dr. Michael Wallmeyer bedanke ich mich für die Möglichkeit diese Arbeit bei der nanoPET Pharma GmbH anfertigen zu können. Ich danke ihnen für ihr entgegengebrachtes Vertrauen und die mir gewährten Gestaltungsfreiräume.

Prof. Dr. Helmut Schlaad und Prof. Dr. Andreas Taubert von der Universität Potsdam danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und für ihre Unterstützung auf dem Weg zur Promotion.

Bei PD Dr. Pia Welker bedanke ich mich für die Übernahme der Funktion als externe Gutachterin.

Dr. Alexander Kraupner danke ich für seine stetige Diskussionsbereitschaft und für die motivierenden Worte während der Entwicklung dieser Arbeit. Sein moralischer Beistand hat wesentlich zum Erfolg meiner Promotion beigetragen.

Dr. Franziska Appler danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre großartige Hilfe bei den Messungen am PET/MRT im BERIC (Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center) der Charité.

Kristian Helmis und Frauke Serowka danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der nanoPET Pharma GmbH danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Besonderen Dank schulde ich weiterhin zahlreichen Mitarbeitern von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Aus dem Fachbereich 1.1 (Anorganische Spurenanalytik) danke ich speziell Dr. Norbert Jakubowski, der mich mit seinen vielen konstruktiven Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat. Dr. Jessica Saatz danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die wertvollen Diskussionen während der Durchführung der LA-ICP-MS Messungen. Antje Cossmer danke ich für die engagierte Einarbung in das iCAP. Bei Dr. Ute Resch-Genger und Dr. Katrin Hoffmann aus dem Fachbereich 1.2 (Biophotonik) bedanke ich mich für die

fluoreszenzspektroskopischen und -mikroskopischen Untersuchungen sowie für die fachlichen Diskussionen während der Durchführung der Messungen. Bei Dr. Franziska Emmerling und Dominik Lubjuhn aus dem Fachbereich 1.3 (Strukturanalytik) bedanke ich mich für die Messung der Pulver-Beugungsdiagramme.

Bei Dr. Ralf Hauptmann von der Charité bedanke ich mich für die Messzeiten an der Puls-NMR.

Dr. Sebastian Kitzig danke ich für die Aufnahme der NMR Spektren an der TU Berlin.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglichten, mich nie unter Druck gesetzt haben und mir immer motivierend zur Seite standen.