



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Binding of positively and negatively charged micro- and nanoparticles to an epithelial and endothelial cell model“

Verfasserin

Bettina Luser

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth

**„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.“**

Sir Isaac Newton (1643-1727)

Herzlichen Dank!

An dieser Stelle möchte ich mich bei
Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth und
Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor
für die kompetente Betreuung und die Möglichkeit in der Zellkultur zu arbeiten bedanken.

Weiters möchte ich meinem Co-Betreuer Dr. Christian Fillafer danken, der mir immer mit
Rat und Tat zur Seite stand und mich sowohl beim praktischen Arbeiten, als auch beim
Verfassen dieser Diplomarbeit, ausgezeichnet unterstützt hat.

Ich danke auch meinen lieben Kolleginnen und Kollegen, die mich jeden Tag aufs Neue
aufgebaut haben und mir auch in schwierigeren Zeiten immer ein Lächeln ins Gesicht
gezaubert haben.

Zum guten Schluss möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken, die
immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mir eine große Stütze im gesamten
Studium waren.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	7
PROBLEMSTELLUNG	9
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	12
ANHANG A : Manuskript	20
<i>"Binding of positively and negatively charged micro- and nanoparticles to an epithelial and endothelial cell model"</i>	
INTRODUCTION	20
MATERIALS AND METHODS	21
RESULTS AND DISCUSSION	25
CONCLUSIONS	34
REFERENCES	35
ANHANG B : B.1. Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung von Mikropartikeln – Kalibrationsgeraden	41
B.2. Bindungsstudien mit positiv und negativ geladenen Mikropartikeln (1µm)	44
B.3. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu B.2.	45
B.4. Morphologie von HUVEC Zellmonolayern während der <i>in vitro</i> Kultivierung	46
B.5. Oberflächenfunktionalisierung von PS Partikeln mit PEI	47

LITERATURVERZEICHNIS

48

CURRICULUM VITAE

53

Problemstellung

Partikuläre Arzneistoffträger aus biokompatiblen und bioabbaubaren Polymeren stellen eine vielversprechende Technologie zur biopharmazeutischen Optimierung der Wirkstoffverabreichung dar. Mittels geeigneter physikalischer Verfahren können Mikro- und Nanopartikel mit hydrophoben oder auch hydrophilen Arzneistoffen beladen werden. Durch diesen Verkapselungsschritt können empfindliche Wirkstoffe, wie beispielsweise biotechnologisch hergestellte Makromoleküle, vor degradativen Einflüssen im Körper bzw. bei der Lagerung geschützt werden. So könnte nach peroraler Applikation eine Denaturierung im sauren Magenmilieu und ein etwaiger enzymatischer Abbau im Dünndarm weitgehend verhindert werden.[1] Da insbesondere Teilchen im Mikrometerbereich nur in geringem Ausmaß resorbiert werden, bedarf es zum Erreichen von therapeutisch effektiven Plasmaspiegeln in erster Linie einer verlängerten Verweildauer der Wirkstoffträger im Gastrointestinaltrakt. Die meisten bioabbaubaren und biokompatiblen Polymere, aus denen Partikel hergestellt werden, sind jedoch durch geringe intrinsische Bioadhäsion gekennzeichnet.[2, 3] Diese kann durch chemische [4] oder strukturelle Funktionalisierung [5] der Partikeloberfläche erhöht werden. Darüber hinaus kann über die Oberflächeneigenschaften und Größe der Teilchen die Biodistribution beeinflusst werden. Dadurch könnte nicht nur bei peroraler, sondern auch bei systemischer Applikation eine bevorzugte Akkumulation von Wirkstoffträgern im erkrankten Zielgewebe erreicht werden. Eine verringerte Exposition von gesundem Gewebe mit zumeist hochpotenten Arzneistoffen hätte sowohl eine verringerte Nebenwirkungsrate als auch eine Reduzierbarkeit der zu applizierenden Dosis zur Folge.

In erster Linie werden zur Funktionalisierung der Partikeloberfläche biorekognitive Liganden wie Lektine, Antikörper, Peptide, Aptamere oder auch kleine Moleküle wie Folsäure verwendet. Je spezifischer die komplementäre Rezeptorstruktur dieser Moleküle für einen bestimmten Zell- oder Gewebstyp ist, desto selektiver ist auch die daraus resultierende Anreicherung der Teilchen. Im Gegensatz zur Funktionalisierung mit spezifischen Liganden kann auch die Oberflächenladung von Mikro- und Nanopartikeln modifiziert werden, um die Interaktion der Teilchen mit Zellen zu erhöhen.[4,6] Dieser Ansatz basiert darauf, dass alle Zelltypen von multizellulären Organismen an ihrer extrazellulären Plasmamembran Oberflächenladungen aufweisen.[7] Ein Großteil dieser Ladungen ist vermutlich auf Carboxylgruppen von Sialinsäureresten und auf Phosphat-

Kopfgruppen von Phospholipiden zurückzuführen. Neben negativ geladenen Molekülen liegen auch positiv geladene Gruppen vor, die unter anderem ϵ -Aminogruppen von Lysin-Seitenketten der Membranproteine zuzuschreiben sind. Während die genaue Zusammensetzung und Verteilung der Ladungsträger in der Zellmembran noch nicht ausreichend geklärt werden konnte, ist aus Elektrophoreseexperimenten bekannt, dass die Nettoladung aller eukaryotischen Zellen überwiegend negativ ist. [7] Folglich ist eine bevorzugte elektrostatische Interaktion von positiv geladenen Wirkstoffträgern mit der Zellmembran zu erwarten.

Im Vergleich zur Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit biorekognitiven Liganden erfolgt die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln mit positivem Oberflächenpotential relativ einfach und kostengünstig. Einerseits kann dazu ein Matrixmaterial mit positiv geladenen funktionellen Gruppen eingesetzt werden. Dazu zählen beispielsweise Chitosan [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18] oder poly(β -Aminosäureester) [19, 20, 21]. Andererseits kann bei Partikeln mit negativem Zetapotential durch Grenzflächenadsorption von kationischen Polyelektrolyten eine Umkehr der Oberflächenladung durchgeführt werden. Zu diesem Zweck können eine Reihe von natürlichen, semisynthetischen und synthetischen Polykationen mit variablem Polymerisationsgrad wie Protamin, Chitosan, Poly(ethylenimin) (PEI) und Poly(L-lysin) (PLL) verwendet werden. [4]

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollte untersucht werden, ob positiv geladene Mikro- und Nanopartikel tatsächlich in höherem Ausmaß mit der Zellmembran von humanen Zellen interagieren als negativ geladene Teilchen. Dazu wurden Mikro- und Nanopartikel aus Poly(styrol) (PS) als Modell-Arzneistoffträger eingesetzt. Die verwendeten PS-Partikel sind durch oberflächenständige Carboxylgruppen und ein daraus resultierendes negatives Zetapotential charakterisiert. Folglich entsprechen diese Teilchen sowohl in Größe als auch Oberflächenladung weitgehend bioabbaubaren partikulären Arzneistoffträgern aus anionischen Polymeren. Dazu zählen unter anderem Teilchen, die aus Vertretern der häufig verwendeten Gruppe der Poly(D,L-Milchsäure-co-Glykolsäure) (PLGA)-Polyesterpolymere hergestellt sind, die von der Food and Drug Administration (FDA) für die Verwendung am Menschen zugelassen sind.[22, 23] Partikel aus PS sind zwar nicht biodegradierbar, können jedoch in definierten Größenklassen mit sehr enger Größenverteilung hergestellt werden. Diese Tatsache erleichtert die Interpretation der

Versuchsergebnisse vor allem dahingehend, dass bei Bindungsstudien potentielle Größenabhängigkeitsphänomene mituntersucht werden können.

Durch Adsorption von PEI an negativ geladene PS-Partikel mit Durchmessern von 500 nm, 1000 nm und 2000 nm sollte deren Oberflächenpotential umgekehrt werden. Zu diesem Zweck sollte ein in der Literatur für negativ geladene Poly(Milchsäure)-Partikel beschriebenes Beschichtungsprotokoll verwendet und gegebenenfalls optimiert werden.[24] Um die Teilchen für Zellbindungsstudien einsetzen zu können, musste ein Puffersystem gefunden werden, welches einerseits die Stabilität der Suspensionen gewährleistet, andererseits aber auch mit Zellversuchen kompatibel ist. Anschließend sollte die Bindung der entgegengesetzt geladenen Mikro- und Nanopartikel an humane Gewebsmodelle untersucht werden. Hierzu wurden epitheliale Caco-2 Monolayer als Modell für das intestinale Epithel verwendet, während Monolayer aus humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) als Endothelmodell dienten. Das Ausmaß der Zellbindung von positiv und negativ geladenen Partikeln sollte schließlich mittels Fluoreszenzmikroskopie und Fluorimetrie ermittelt und interpretiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zum Manuskript

„Binding of positively and negatively charged micro- and nanoparticles to an epithelial and endothelial cell model“

C.Fillafer, B. Luser, M. Prantl, W. Neuhaus, R. Hofer-Warbinek, M. Wirth, F. Gabor

(siehe Anhang A) maßgeblich beigetragen werden.

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde untersucht, ob positiv geladene Partikel tatsächlich in höherem Ausmaß an humane Endothel- und Epithelzellen binden als negativ geladene Teilchen. Als Mikro- und Nanopartikel wurden nicht-biodegradierbare, carboxylierte Kolloide aus PS eingesetzt. Diese Teilchen sind in definierten Größenklassen kommerziell erhältlich und eignen sich daher ausgesprochen gut für systematische Bindungsstudien. Hinsichtlich ihrer Größe und Oberflächenladung sollten die eingesetzten PS-Partikel mit bioabbaubaren Wirkstoffträgern vergleichbar sein. Aufgrund der Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche sind diese Teilchen bei einem pH-Wert von 7,4 durch ein Zetapotential von -80 mV charakterisiert (Table 1, Anhang A). Durch Adsorption eines kationischen Polyelektrolyts wurde die Oberflächenladung invertiert. Hierbei diente ein Protokoll von Trimaille et al. als Grundlage.[24] Als Polykation wurde verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 10 kDa eingesetzt. Dessen Aminogruppen liegen in saurem Puffer weitgehend protoniert vor.[25] Beim Adsorptionsprozess interagieren die kationischen Gruppen von PEI mit den negativ geladenen Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche. Sowohl die Ionenstärke als auch der pH-Wert des Adsorptionspuffers spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Über diese beiden Parameter kann nämlich die Ladungsdichte und folglich auch die Konfiguration des Polyelektrolytmoleküls beeinflusst werden. In Wasser beziehungsweise Pufferlösungen mit

geringer Ionenstärke liegt PEI weitgehend in gestreckter Form vor. Dies beruht auf Repulsion zwischen den geladenen Aminogruppen der Polymersegmente. Im Gegensatz dazu kommt es bei höherer Ionenstärke zur Abschirmung der Ladungsinteraktionen und folglich zur Ausbildung einer knäulartigen Struktur. Während die Adsorption von gestrecktem PEI meist nur zu Ladungsausgleich führt, resultiert aus der Anlagerung von „coiled“ PEI eine Umkehr der Oberflächenladung.[24]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 100mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,8 als Adsorptionsmedium eingesetzt. Hierin gelöstes PEI sollte hauptsächlich als Polymerknäuel vorliegen.[24] In Übereinstimmung mit den bereits diskutierten Überlegungen wurde durch Adsorption von PEI an PS-Partikel tatsächlich eine Umkehr der Teilchenladung von etwa -80mV auf +55mV erzielt (Table 1, Anhang A). Dafür war es jedoch nötig, die für Poly(D,L-lactic acid) (PLA) etablierte Arbeitsvorschrift von Trimaille et al. zu modifizieren (B.5., Anhang B). Im Originalprotokoll wurde für eine erfolgreiche Oberflächenmodifikation PEI-Lösung mit einer Konzentration von 30µg/ml verwendet. Bei PS-Partikeln musste PEI jedoch in einer Konzentration von 5mg/ml eingesetzt werden, um eine Aggregation der Teilchen zu vermeiden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in unterschiedlichen Carboxylgruppendichten an den Oberflächen von PLA- und PS-Partikeln liegen. Sollten PS-Partikel nämlich durch deutlich mehr Carboxylgruppen charakterisiert sein als PLA-Partikel, könnte es bei niedrigeren PEI-Konzentrationen zu unzureichender Absättigung der Oberfläche kommen. In diesem Fall wären auf ein und demselben Teilchen sowohl positiv als auch negativ geladene Areale vorhanden. Dies würde in nächster Konsequenz zu einer Reduktion der elektrostatischen Stabilisierung der Suspension führen. Werden jedoch höhere Konzentrationen an PEI eingesetzt, kommt es zu einer spontanen Inversion der Oberflächenladung. Dadurch wird die Tendenz zur Aggregatbildung verringert. Bei den anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass in Suspensionen von negativ geladenen PS-Partikeln kaum Aggregation auftrat. Die mit PEI modifizierten Partikel bildeten hingegen, insbesondere bei Verdünnung und längerer Lagerung in isotonem Puffer, deutlich mehr Aggregate. Durch Anwendung von Ultraschall unmittelbar vor den Untersuchungen mit Zellen konnte jedoch der Großteil der Kolloide redispergiert werden.

Die Partikelbindungsstudien an Caco-2 Monolayern wurden in isotonem HEPES/NaOH Puffer pH 7,4 (isoHEPES) durchgeführt, da in diesem Standardpuffer keine Veränderungen in der Zellmorphologie auftraten. Für die Experimente mit HUVEC-

Monolayern musste jedoch auf PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) zurückgegriffen werden, da es in Ca²⁺-freiem Puffer zu einer Desintegration des Zellverbandes kam. Dies beruht vermutlich auf der Ca²⁺-Abhängigkeit interzellulärer Adhäsionsproteine. Um das Ausmaß der Partikelbindung an endotheliale und epitheliale Zellen direkt vergleichen zu können, wurden die Experimente mit Caco-2 Monolayern sowohl in isoHEPES als auch in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) durchgeführt.

Nach 30-minütiger Inkubation von positiv bzw negativ geladenen PS-Partikeln mit Caco-2-Monolayern bei Raumtemperatur in isoHEPES konnten deutliche Unterschiede in der Zellbindung festgestellt werden. Wie in Figure 1 (Anhang A) zu erkennen ist, wurde für negativ geladene 500nm PS-Partikeln erst ab einer zugesetzten Menge von 6 µg/well zellgebundene Fluoreszenz detektiert. Diese entspricht einer Partikelmasse von 0,05 ± 0,1 µg. Im Gegensatz dazu konnten für positiv geladene 500nm PS-Partikeln schon ab ~1µg/well geringe Mengen zellgebundener Partikel festgestellt werden (0,017 ± 0,004 µg). Ab einer zugesetzten Menge von 6µg/well war die Masse der zellgebundenen positiven Kolloide konstant 4- bis 5-fach höher als die der negativ geladenen Teilchen. Dieses Ergebnis konnte auch durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (Figure 2, Anhang A). Figure 2 (1A) zeigt, dass bei einer zugesetzten Menge von 1µg/well keine negativ geladenen 500nm PS-Partikel an den Caco-2-Monolayer gebunden hatten. Positiv geladene Partikel waren hingegen bei derselben Konzentration bereits deutlich als regelmäßig verteilte grüne Punkte erkennbar (Figure 2, 2A). Im Fall der 1000nm (Figure 12, Anhang B) und 2000nm PS-Partikel (Figure 1, Anhang A) wurden ähnliche Unterschiede detektiert. Die positiv geladenen 1000nm bzw. 2000nm PS-Partikel waren durchwegs durch eine 4,5-fach bzw. 2,5-fach höhere Zellbindung charakterisiert.

Interessanterweise wurden auch Unterschiede in der Zellbindung in Abhängigkeit des verwendeten Puffers beobachtet. Verglichen mit isoHEPES (Figure 1, Anhang A und Figure 12, Anhang B) wurden in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) (Figure 3, Anhang A und Figure 13, Anhang B) geringere Mengen an zellassozierten Teilchen detektiert. Im Fall von positiv geladenen 500nm PS-Partikeln war die zellassozierte Menge um etwa 30% reduziert. Bei PS-Partikeln mit Durchmessern von 1000nm bzw. 2000nm wurde eine noch deutlichere Abnahme der Zellbindung um etwa 45% bzw. 60% beobachtet. Die Ursache für diese Reduktion ist nicht geklärt. Ein ionenspezifischer Effekt auf die Fluoreszenzintensität der Teilchen oder die ionische Interaktion mit der Zelloberfläche wäre prinzipiell möglich. Laut Osmolaritätsmessungen unterscheiden sich isoHEPES und PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) jedoch kaum in ihrer Ionenstärke. Darüber hinaus ist der Mol-Anteil von Na⁺ bzw. Cl⁻ in beiden

Pufferlösungen eindeutig am höchsten. Folglich erscheint es fraglich, ob die geringen Anteile an Ca^{2+} , Mg^{2+} bzw. Phosphationen für die beschriebenen Effekte verantwortlich sein können.

Die ermittelten Ergebnisse zeigen deutlich, dass positiv geladene PS-Partikel in höherem Ausmaß an Caco-2-Monolayer binden als negativ geladene Teilchen. Dies unterstützt die Hypothese, dass über ionische Interaktionen eine erhöhte Bindung an negativ geladene Gruppen der Zellmembran stattfinden kann. Bezüglich des Zellmodells sollte erwähnt werden, dass die Caco-2 Zelllinie aus einem Colonkarzinom isoliert wurde. Tumorzellen und regenerierende Zellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen oft eine erhöhte negative Oberflächenladung auf.[26, 27] Das Ausmaß der Partikelbindung an Caco-2 Zellen spiegelt also eventuell die Bindungsverhältnisse an intestinalen Zellen nur bedingt wider. Um also konkrete Vergleiche zwischen entartetem und normalem Gewebe anstellen zu können, sollten die Untersuchungen auch mit primären intestinalen Epithelzellen durchgeführt werden.

In den Versuchen mit HUVECs konnte gezeigt werden, dass nicht generell von einer bevorzugten Bindung von positiv geladenen Teilchen an Zellmonolayer ausgegangen werden darf. Aus den Ergebnissen in Figure 4 (Anhang A) ist deutlich ersichtlich, dass sich die Bindung von positiv und negativ geladenen 500nm PS-Partikeln an primäre Endothelzellen kaum unterscheidet. Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass ein Fit der kollektiven Datenpunkte mit einer linearen Funktion einen Determinationskoeffizient (R^2) von 0,99 ergibt. Bei 1000nm (Figure 14, Anhang B) und 2000nm PS-Partikeln (Figure 4, Anhang A) wurde zwischen den gegengleich geladenen Partikeln ebenfalls kein nennenswerter Unterschied in der Zellbindung beobachtet. Dies konnte auch durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (1000nm: Figure 16, Anhang B; 500nm und 2000nm: Figure 5, Anhang A). Bei einem Vergleich zwischen epithelalem und endothelalem Zellmodell fällt außerdem auf, dass das Ausmaß der Bindung an HUVECs generell höher ist. Im Fall von positiv geladenen 500nm und 1000nm PS-Partikeln war die Cytoadhäsion auf das Doppelte, bei den 2000nm PS-Partikeln sogar auf das 4-5-fache erhöht. Dieser Effekt war bei negativ geladenen Teilchen noch ausgeprägter. 500nm und 1000nm PS-Partikel lagerten sich 6-8-fach effektiver an HUVECs als an Caco-2-Zellen an. 2000nm PS-Partikel waren sogar durch eine 10-fach höhere Bindung charakterisiert. Im Gegensatz zu Caco-2 Monolayern liegen auf HUVECs offensichtlich andere Verhältnisse und Absolutmengen von Ladungsträgern vor. Eine

ähnliche Beobachtung wurde bereits von Osaka et al. für die Internalisation von positiv und negativ geladenen magnetischen Nanopartikeln in MCF-7 Brustkrebszellen und HUVECs beschrieben.[28] Demnach werden positiv geladene Teilchen von MCF-7 Zellen jedoch nicht von HUVECs bevorzugt aufgenommen.

Um die Bindungseffizienz von Nanopartikeln mit der von Mikropartikeln vergleichen zu können, wurden in den Experimenten gleiche Partikelmassen eingesetzt. Für eine realistische Gegenüberstellung müssen jedoch auch die unterschiedlichen Depositionsraten der Teilchen berücksichtigt werden.[29] Die theoretischen Sedimentationsgeschwindigkeiten (v_{sed}) der verschiedenen PS-Partikel können über Gleichung 9 (Anhang A) berechnet werden. Bei Raumtemperatur ergibt sich in wässrigem Puffer für 500nm PS-Partikel eine v_{sed} von $\sim 0,5 \mu\text{m min}^{-1}$, für 1000nm PS-Partikel $\sim 2 \mu\text{m min}^{-1}$ und für 2000nm PS-Partikel $\sim 7,7 \mu\text{m min}^{-1}$. Folglich werden nach 30 minütiger Inkubation alle Partikel unterhalb einer Füllhöhe von 15 μm , 60 μm bzw. 230 μm auf den Zellmonolayer sedimentieren. Unter Berücksichtigung der Basisfläche des Wells (33mm²) entspricht dies einer Deposition von 0,5%, 2% beziehungsweise 7,6% der insgesamt zugesetzten Partikelmenge. Wird eine hohe Affinität der Teilchen zur Zelloberfläche vorausgesetzt, so sind bei der höchsten eingesetzten Konzentration von $\sim 16 \mu\text{g/well}$ gebundene Partikelmassen im Bereich von 0,08 μg , 0,32 μg bzw. 1,2 μg zu erwarten. Diese theoretischen Depositionsmengen erscheinen insbesondere für größere Teilchen durchaus realistisch. Im Fall von 2000nm PS-Partikel auf HUVECs wurde beispielsweise experimentell eine zellgebundene Partikelmasse von $1,46 \pm 0,3 \mu\text{g}$ für positive und $1,07 \pm 0,15 \mu\text{g}$ für negativ geladene Partikel detektiert. Je kleiner die Teilchen sind, desto weniger stimmt die gebundene Partikelmenge mit der berechneten überein. Der Grund hierfür liegt vermutlich im zusehends diffusionskontrollierten Depositionsmechanismus von Teilchen mit kleinerem Radius.

Ein weiterer interessanter Aspekt der vorliegenden Ergebnisse ist, dass in gleicher Konzentration eingesetzte Nanopartikel (500nm: Figure 2, Anhang A) eine regelmäßigeren Verteilung am Zellmonolayer aufweisen als Mikropartikel (1000nm: Figure 16, Anhang B und 2000nm: Figure 5, Anhang A). Dieses Verteilungsmuster von Nanopartikeln könnte sich bei deren Verwendung als Arzneistoffträger als vorteilhaft erweisen, da der Wirkstoff im Gewebe homogener freigesetzt wird.

In der vorliegenden Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass positiv geladene PS-Partikel in höherem Ausmaß an intestinale Epithelzellmonolayer adhären als negativ geladene Teilchen. Im Fall von primären Endothelzellen wurde jedoch eine weitgehend äquivalente Bindung von positiv und negativ geladenen Mikro- und Nanopartikeln beobachtet. Diese Ergebnisse widersprechen der allgemeinen Annahme, dass positiv geladene Teilchen bevorzugt mit Zellmembranen interagieren. Die Untersuchungen zur Zellbindung wurden in der vorliegenden Diplomarbeit unter stationären Bedingungen durchgeführt. Da sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch im Blutgefäßsystem hydrodynamische Kräfte auf die partikulären Wirkstoffträger einwirken, sollten zukünftige Bindungsstudien unter dynamischen Bedingungen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck könnten Parallel Plate Flow Chambers (PPFC) [30, 31, 32] oder Mikrofluidiksysteme [33, 34, 35] eingesetzt werden. Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob Mikro- oder Nanopartikel stärker von Scherstress beeinflusst werden und welche Rolle die Oberflächenladung bei der Partikel-Zellinteraktion unter physiologisch relevanten Flussbedingungen spielt.

Anhang

Anhang A

Manuskript

"Binding of positively and negatively charged micro- and nanoparticles to an epithelial and endothelial cell model"

Anhang B

B.1. Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung von Mikropartikeln – Kalibrationsgeraden

B.2. Bindungsstudien mit positiv und negativ geladenen Mikropartikeln (1 μ m)

B.3. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu B.2.

B.4. Morphologie von HUVEC Zellmonolayern während der *in vitro* Kultivierung

B.5. Oberflächenfunktionalisierung von PS Partikeln mit PEI

Anhang A

„Binding of positively and negatively charged micro- and nanoparticles to an epithelial and endothelial cell model“

Christian Fillafer, Bettina Luser, Manuela Prantl, Winfried Neuhaus,
Renate Hofer-Warbinek, Michael Wirth, Franz Gabor.

to be submitted.

Introduction

The most prominent biological barriers encountered by particulate drug carriers upon administration to the human body are represented by epithelial and endothelial cells. Hence, a strong interaction with these tissues is essential to prolong the residence time of particles in the body or to achieve their absorption. Aside from surface modification with biorecognitive ligands, [1] coating of colloids with cationic polyelectrolytes has been discussed as a potential strategy to enhance the interaction with epithelial and endothelial cells. [1, 2] This rationale is based on the observation that all cell types of multicellular organisms are characterized by negatively charged cell surfaces. [3] The charges in the cell membrane largely derive from sialic acid carboxy groups and phosphates of phospholipid head groups. Aside from negative groups, cationic charges also exist which probably can be attributed to ϵ -amino groups of lysine side chains of membrane proteins. [3] It is not clear whether these charged moieties in the plasma membrane are evenly distributed or clustered, but generally negative groups seem to prevail. As indicated by several studies, ionic interactions between the particle surface and the cell might indeed mediate improved bioadhesion.

Thiele et al. showed that clearly higher quantities of PLL-coated PS microspheres were associated with and internalized by Antigen-Presenting Cells (APCs) *in vitro* as compared with negatively charged beads. [4] Moreover, positively charged particles were phagocytosed in endosomes which showed considerable interactions between the particle surface and the vesicle membrane. [5]

That positively charged carriers are also characterized by an altered biodistribution as compared to their negatively charged counterparts has been shown in *in vivo* studies. Polystyrene latices sized 1.3 μm , which had been surface modified with polylysyl gelatine,

were preferentially located in the lung 15 min after injection. [6] However, it was not clear if this altered biodistribution was essentially due to altered bioadhesion of positively charged colloids. Rather than that the authors argued that positively charged particles might be more prone to the formation of aggregates in whole blood. These aggregates might subsequently be trapped in the extensive capillary bed of the lung. More concrete evidence of enhanced bioadhesion of positively charged particles to the endothelium was provided by Labhassetwar et al. [2] PLGA nanoparticles sized ~100 nm that had been coated with the cationic excipient dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDAB) delivered 7-10 fold higher drug levels to isolated artery segments *ex vivo* than negatively charged colloids. Even more interesting in regards to potential targeting via charge, Thurston et al. reported that cationic liposomes preferentially bind to and are taken up by angiogenic endothelial cells in mouse tumor models and in a mouse model of chronic inflammation. [7] Thus, modifying the surface charge of particles might not only lead to increased bioadhesion, but might also represent an approach for targeting to specific cell populations.

From most studies in the literature it is difficult to deduce whether bioadhesion of charged particles is mediated by the charge itself, by proteins specifically adsorbed from serum or by other factors such as aggregate formation in whole blood. In this study, carboxylated PS nano- and microspheres and the same particles coated with the cationic polyelectrolyte poly(ethylenimine) (PEI) will serve as model colloids, since they resemble micro- and nanoparticulate drug carriers in size and charge.

Caco-2 and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) monolayers will be employed as epithelial and endothelial cell models respectively which are highly relevant for drug delivery. Using these particle and cell types in a controllable *in vitro* setting, it will be investigated if positively charged carriers are indeed characterized by higher bioadhesion than their negative counterparts.

Materials and methods

Materials

Yellow-green fluorescent carboxylated polystyrene particles with diameters of 500 nm and 2000 nm as well as PEI (branched, MW~ 10 kDa) were obtained from Polysciences Europe GmbH (Eppelheim, Germany). All other chemicals used were of analytical purity.

Cell culture

The Caco-2 cell line was purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and was used for the experiments between passage 41 and 57. Tissue culture reagents were obtained from Sigma (St. Louis, USA) and Gibco Life Technologies Ltd. (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Cells were cultivated in RPMI 1640 cell culture medium containing 10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine and 150 mg mL⁻¹ gentamycine in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and were subcultured by trypsination. Confluent Caco-2 cell monolayers in 96-well polystyrene microplates were obtained by seeding of 1.7 x 10⁴ cells/160 µL/well and cultivation for 5-6 days.

HUVECs were isolated from human umbilical cords by treatment with collagenase Type I and were used for the experiments between passage 2 and 4. The tissue culture flasks and microplates used for HUVEC cultivation were coated with a 1% (w/v) aqueous solution of gelatin (37°C) for 30 min at room temperature prior to seeding of the cells in endothelial growth medium-2 (EGM-2, Lonza, Basel, Switzerland). Confluent monolayers in 96-well polystyrene microplates were obtained by seeding of 1.7 x 10⁴ cells/160 µL/well and cultivation for 3 days.

Caco-2 and HUVEC cell monolayers for fluorescence microscopy were grown on glass cover slips in 24-well microplates. For cultivation of endothelial cells the glass slips were coated with a 100 µg mL⁻¹ solution of fibronectin (from BD Biosciences Europe) in PBS for 60 min at 37°C prior to seeding of the cells.

Coating of carboxylated nano- and microparticles with PEI

Coating of carboxylated polystyrene particles with diameters of 500 nm (PS₅₀₀) and 2000 nm (PS₂₀₀₀) was achieved by a technique modified from [8]. 100 µL of a 5 mg mL⁻¹ suspension of PS₅₀₀ or 100 µL of a 20 mg mL⁻¹ suspension of PS₂₀₀₀ were added dropwise to a 5 mg mL⁻¹ solution of PEI in 100 mM phosphate buffer pH 5.8 in a tube placed in an ultrasonic bath. In principle, the coating protocol can be adapted to various particle sizes as long as the ratio of total particle surface area (A_{total}): PEI concentration is held constant. The surface area A [m²] of a sphere with radius r [m] is calculated according to Eq.1

$$A = 4r^2\pi \quad (\text{Eq.1})$$

If the total particle mass M [kg] is known, the total number of particles N can be obtained from Eq.2

$$N = M/m \quad (\text{Eq.2})$$

where m [kg] is the mass of a single particle as given by Eq.3

$$m = \rho_p V \quad (\text{Eq.3})$$

with ρ_p [kg m^{-3}] as the density of the particle material and V [m^3] as the volume of a single particle Eq.4

$$V = (4r^3\pi)/3 \quad (\text{Eq.4})$$

Accordingly, A_{total} [m^2] can be calculated from Eq.5

$$A_{\text{total}} = NA \quad (\text{Eq.5})$$

and by substituting, the simplified expression Eq.6 is obtained.

$$A_{\text{total}} = 3C/r\rho_p \quad (\text{Eq.6})$$

Upon reaction of PEI with the particles under sonication for 10 min, 1300 μL of 100 mM phosphate buffer pH 5.8 were added, sonified, and the particles were spun down on a centrifuge (Eppendorf 5804R).

As a rough guide, the centrifugation parameters for particle washing can be calculated according to Eq.7

$$t_{\text{max}} = 9/2 * [\eta/(\rho_p - \rho_s)r^2\omega^2] * \ln(R_e/R_a) \quad (\text{Eq.7})$$

where t_{max} [s] is the time needed to spin down all particles, η [$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$] is the viscosity of the suspension (water at 20°C: $0.001 \text{ kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$), ρ_p [kg m^{-3}] and ρ_s [kg m^{-3}] are the densities of the particles (polystyrene: 1050 kg m^{-3}) and suspension medium (1% aqueous solution of Poloxamer 188: 1000 kg m^{-3}) respectively, r [m] is the particle radius, ω [s^{-1}] is the angular frequency and R_a [m] is the distance from the rotor axis to the upper level of the suspension and R_e [m] to the bottom level of the suspension respectively (for Eppendorf 5804R with rotor F45-30-11: $r_a= 0.07 \text{ m}$, $r_e= 0.095 \text{ m}$). [9]

The angular frequency ω can be obtained from Eq.8

$$\omega = 2\pi V_{\text{rot}} \quad (\text{Eq.8})$$

with $v_{\text{rot}} [\text{s}^{-1}]$ as the rotation velocity. For PS₅₀₀ and PS₂₀₀₀ this results in centrifugation times of 3 min and 1 min respectively at 14000 rpm.

The pellet was washed with 1300 μL of 100 mM phosphate buffer pH 5.8, spun down on a centrifuge and was resuspended in 1 mL 20mM HEPES pH 7.4 (HEPES) for 5 min in an ultrasonic bath. Finally the suspension was sonified for 15 - 20 s (sonifier, Bandelin electronic UW70/HD 70; tip, MS 72/D, Berlin, Germany).

Control particles were treated as described above, but without PEI in the coating solution. The zeta potential of PEI-coated and control particles was determined upon dilution in HEPES (conductivity $\sim 0.69 \text{ mS cm}^{-1}$) by laser Doppler electrophoresis with a ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., U.K.). Prior to the binding studies on Caco-2 and HUVEC cell monolayers a small sample of all particle suspensions was drawn and checked for agglomerates under a fluorescence microscope.

Binding studies on cell monolayers

The stock suspensions of negatively and positively charged PS₅₀₀ and PS₂₀₀₀ in HEPES were diluted with 20mM isoHEPES/NaOH pH 7.4 (isoHEPES) + 0.1 % of Poloxamer 188 or PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) + 0.1 % of Poloxamer 188 to yield the working concentrations. All binding studies were performed with suspensions containing 16 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, 8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, 4 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, 2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, and 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ PS particles. Upon removal of the cell culture medium each well was filled with 100 μL of particle suspension or plain buffer as control. The homogeneity of loading between wells was checked via fluorimetry with a microplate reader (ex/em: 440/485 nm; Infinite 200i, Tecan Group Ltd., Grödig, Austria). Following incubation for 30 min at room temperature the particle suspension was removed and the cell monolayer was washed twice with 100 μL of buffer. Finally, the fluorescence of the cell monolayer which corresponds to the amount of cell-associated particles was determined by fluorimetry.

Fluorescence microscopy

HUVEC and Caco-2 cell monolayers grown on glass cover slips were used for fluorescence microscopy. Upon incubation with positively or negatively charged polystyrene particles for 30 min at room temperature the cell layers were washed twice with PBS.

Subsequently, the cells were fixed with ice cold methanol (-20°C) for 10 min at -20°C. After washing twice with PBS the cells were rehydrated with PBS containing 1% BSA for 20 min at room temperature. Then, 100 µL of a 1:200 dilution of the primary antibody were added followed by incubation for 1 h at 37°C. In case of Caco-2 cells, purified mouse-anti-human ZO-1 antibody (250 µg mL⁻¹, BD Transduction Laboratories) was used to label tight junction associated protein ZO-1 while in case of HUVECs a polyclonal goat-anti-human VE-cadherin (C-19) antibody (200 µg mL⁻¹, Santa Cruz Biotechnology) was used to label vascular endothelial cadherin. After washing twice with PBS + 1% BSA, 100 µL of a 1:200 dilution of R-phycoerythrin (RPE)-labelled goat-anti-mouse antibody (1 mg mL⁻¹, Dako) in case of ZO-1 staining and 100 µL of a 1:200 dilution of rhodamine-labelled rabbit-anti-goat antibody (1 mg mL⁻¹, Abcam) in case of VE-cadherin staining were added to the cells and left to react for 30 min at 37°C. Finally, the cell layers were washed twice with PBS + 1% BSA and embedded in a drop of FluorSave. All images were taken on a Nikon Eclipse 50i or a Zeiss Observer.Z1 microscope.

Results and Discussion

Adsorption of PEI leads to positively charged particles

The PS particles which were used in this study are not biodegradable and consequently not suitable for administration as drug carriers. However, they can be prepared in precise size classes and with custom surface chemistry which makes them an advantageous model for systematic particle studies.

Many polymers used as matrix materials for the preparation of biocompatible and biodegradable drug delivery systems are characterized by carboxyl end groups which impose a negative charge on the produced particle. Similarly, carboxylated PS particles carry negatively charged groups at the particle surface. As illustrated in Table 1, this results in clearly negative zeta potentials of > -80 mV at pH 7.4.

	Surface chemistry	Zeta potential [mV]
500 nm	carboxyl groups	-82.5±2.0
	PEI	54.0±2.8
2000 nm	carboxyl groups	-82.7±4.0
	PEI	60.5±4.9

Table 1: Zeta potential of 500 nm and 2000 nm polystyrene particles before and after surface modification with PEI.

The negative charges at the particle surface can be used to drive the adsorption of cationic polyelectrolytes. For this purpose, a series of natural, processed natural, and synthetic polyelectrolytes can be employed. These include protamine, [10] chitosan, [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21] gelatine, [22] diethylaminoethyl dextran, [23] Eudragit® RL/RS, [24] PEI, [25, 26, 27, 28, 29] and PLL. [30, 31, 26, 32, 33, 34] In this study, low molecular weight branched PEI was used due to its high density of amino groups. [35] In slightly acidic buffer the amino groups exist in their protonated and thus charged form. These cationic groups are expected to interact with negatively charged carboxyls at the particle surface by ionic interactions. At this, the composition of the adsorption buffer is expected to influence the polyelectrolyte configuration as well as adsorption efficiency. While PEI will exist as a rather stretched molecule in water or low ionic strength buffers, it will adapt a coiled configuration if the adsorption buffer's ionic strength is sufficiently high. Adsorption of coiled polyelectrolytes will not only result in direct charge compensation and neutralization of a particle's surface potential. Moreover, surplus positive charges will be introduced and the zeta potential will be inverted. [8] However, if the ionic strength of the adsorption buffer is increased further, the charges of the polyelectrolyte will be screened and electrostatic interactions with dissociated groups at the particle surface will be reduced. 100 mM phosphate buffer has proven to represent a suitable compromise in terms of ionic strength and was successfully used for coating of colloids with PEI. [8] In the present study, adsorption of PEI from 100 mM phosphate buffer onto PS nano- and microparticles was achieved. This was confirmed by a clear shift of the zeta potentials of PS particles to positive values as illustrated in Table 1. However, it has to be highlighted that the protocol by Trimaille et al. [8] had to be modified to generate satisfactory results with PS particles. While in the original study a PEI concentration of less than $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ was sufficient for introduction of a positive zeta potential, 5 mg mL^{-1} had to be employed in the present study. The increase in PEI concentration was necessary since irreversible agglomeration of the particles occurred at lower concentrations. A possible reason for this might lie in the different quantities of carboxyl groups at the surface of PS and PLA particles. PS particles might be characterized by a clearly higher surface carboxyl group density. This could explain why a PEI concentration in the range of $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ led to aggregation of the particles. Due to insufficient charge compensation at the particle surface colloids with partially negative and partially positive surface sites might be created. This would inherently reduce electrostatic stabilization of the dispersion and consequently favour the formation of aggregates. With higher PEI concentrations, the particle surface

charge is rapidly reversed and thus the potential for aggregation is low. Generally, as observed by fluorescence microscopy negatively charged particles used in this study were free from agglomerates. Positively charged particles tended to agglomerate upon dilution and prolonged storage in isotonic buffer. At this, the suspension was sonified until the majority of colloids were redispersed and ready to use for studies with cell monolayers.

Positively charged particles exhibit higher binding to Caco-2 cell monolayers

The usability of micro- and nanoparticles for drug delivery purposes depends on their delivery efficiency. To be able to compare the cell binding efficiency of differently sized particles, the mass deposition data will be presented in this study.

Upon incubation of negatively and positively charged colloids with Caco-2 cell monolayers for 30 min at room temperature in isoHEPES, clear differences in the amount of cell-binding were observed. As illustrated in Figure 1, negatively charged PS₅₀₀ were only detected when at least 6 µg had been added to the cell layer which resulted in 0.05 ± 0.1 µg of cell-associated particles.

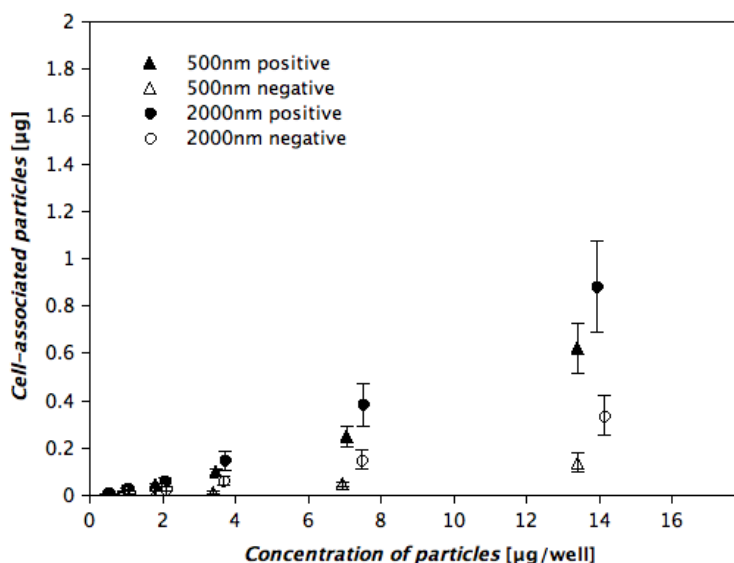


Figure 1: Positively (closed symbols) and negatively charged particles (open symbols) associated with Caco-2 cell monolayers upon incubation in isoHEPES for 30 min at room temperature. Particle diameter 500 nm (Δ) and 2000 nm (○). Each data point consists of n= 27 measurements.

In contrast, positively charged PS₅₀₀ were already unambiguously detected upon addition of ~1 µg which resulted in 0.017 ± 0.004 µg of cell-associated particles. At concentrations of ≥ 6 µg of particles added per well, the amount of cell-bound PS₅₀₀ particles was constantly 4-5 fold higher in the case of positively charged colloids as compared to their negative counterparts. This was also confirmed by fluorescence microscopy as illustrated in Figure 2.

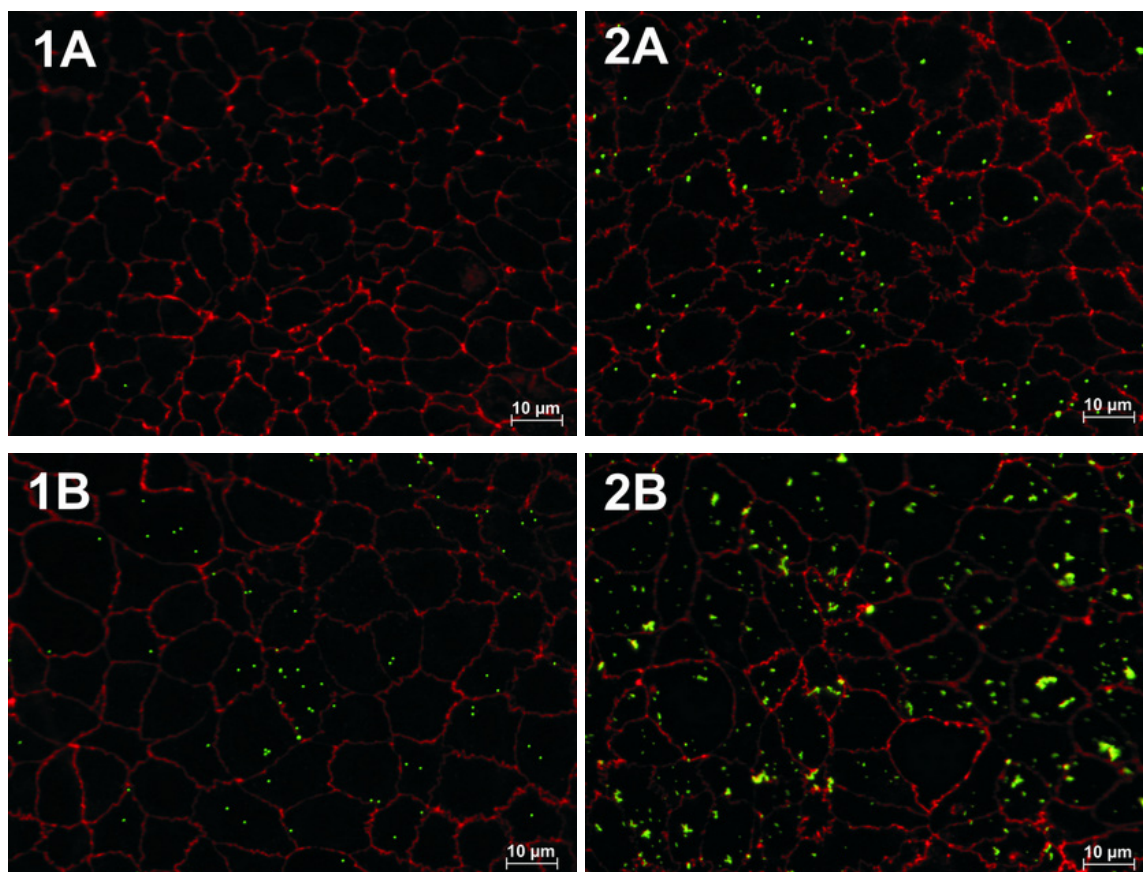


Figure 2: Negatively (1) and positively charged (2) 500 nm particles (green) associated with Caco-2 cells after 30 min incubation. Concentration of particle suspension $\sim 1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ (A) and $\sim 8 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ (B). Tight junction associated protein ZO-1 labelled in red.

Consistent with the quantitative results obtained by fluorimetry, almost no negatively charged PS_{500} were observed on the Caco-2 cell monolayer upon incubation with a suspension containing $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. (Figure 2 1A). At the same concentration, positively charged PS_{500} were already clearly visualized as regularly distributed green dots (Figure 2 2A). The quantitative data plotted in Figure 1 were still reflected in the visually observed densities of bound particles when the concentration had been increased 8-fold (Figure 2 B).

Similar observations as with PS_{500} were made in the case of PS_{2000} . Starting at a concentration of $\sim 1 \mu\text{g}$ per well, cell-associated particles were unambiguously detected. Over the whole concentration range tested, the positively charged colloids were characterized by a 2.5 fold higher cell binding than the negatively charged PS_{2000} .

Particle binding studies with Caco-2 cells can be performed in isoHEPES without notable morphological alterations of the cells or disintegration of the monolayer. However, HUVEC monolayers proved to be highly sensitive to the composition and type of the incubation buffer. Thus, binding studies had to be performed in PBS ($+\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). In order to be able

to compare the quantities of cell-associated particles between the endothelial and epithelial cell model, particle binding studies with Caco-2 cell monolayers were also performed in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺). When comparing the binding rates in isoHEPES (Figure 1) with those in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) (Figure 3) it becomes obvious that in the latter case the amount of cell-associated particles was clearly reduced in all cases.

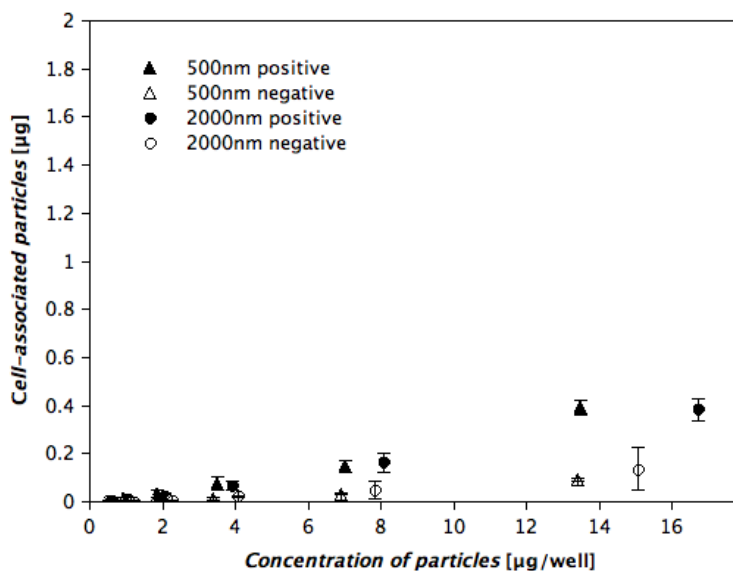


Figure 3: Positively (closed symbols) and negatively charged particles (open symbols) associated with Caco-2 cell monolayers upon incubation in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) for 30 min at room temperature. Particle diameter 500 nm (Δ) and 2000 nm (o). Each data point consists of n=6 measurements.

Interestingly, the effect of PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) on cell-binding was more pronounced in case of PS₂₀₀₀. This was exemplified by a consistent reduction of the the amount of cell-bound positively and negatively charged particles by about 60%. In case of PS₅₀₀ the reduction was not as distinct as in the case of PS₂₀₀₀ but nevertheless amounted to about 30 %. For both sizes, the effect was neither dependent on the concentration nor on the surface charge of the particles. This indicates involvement of a nonspecific mechanism that probably either affects the particles' detection via fluorimetry or their ionic interaction with the cell monolayer. However, neither of these reasons can be conclusively argued to be involved in this case.

Since the pH as well as osmolarity of PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) and isoHEPES were identical according to measurements, buffer-induced fluorescence intensity alterations are unlikely. The interaction between two oppositely charged species is known to depend on the concentration and type of ions in the medium. Consequently, the buffer composition determines the surface potential of dispersed colloids and charged groups in the cell membrane and might alter the interaction between oppositely charged species. Although

PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) contains multivalent ions, the main component contributing to its osmolarity and thus ionic strength is sodium chloride. Calculations confirm that a similar ionic strength as for isoHEPES can be expected. This probably precludes effects of multivalent ions on the interface and thus interaction potential of colloids as well as cells.

Regardless of the different quantities of cell-bound particles in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) and isoHEPES, the results clearly demonstrate a particle size independent preferential binding of cationic particles to Caco-2 cell monolayers.

Very likely, this can be attributed to ionic interactions between the polycation-coated colloids and negative charges of the Caco-2 cell membrane. Thus, with the epithelial cell model the hypotheses and reports in the literature according to which positively charged particles are more bioadhesive than their negative counterparts were confirmed.

It should be borne in mind, however, that Caco-2 cells were originally isolated from a colon carcinoma. Tumor or regenerating cells are characterized by higher electrophoretic mobilities and thus higher cell surface charge than their normal counterparts. [36, 37] As a consequence it might be possible that the clearly preferential binding of positively charged particles onto Caco-2 cells does not exactly reflect the binding to normal intestinal epithelium. Studies with primary intestinal epithelial cells might help to clarify this issue.

Negative and positive particles equally bind to endothelial cells

In contrast to the results obtained with Caco-2 cell monolayers, no preferential attachment of positively charged particles was observed on HUVEC monolayers. As illustrated in Figure 4, the adhesion data for positively and negatively charged PS₅₀₀ are clearly similar.

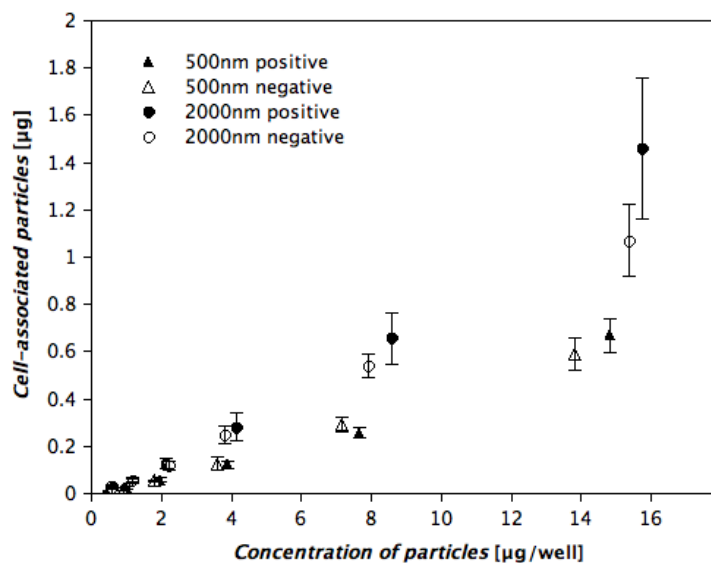


Figure 4: Positively (closed symbols) and negatively charged particles (open symbols) associated with HUVEC cell monolayers upon incubation in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) for 30 min at room temperature. Particle diameter 500 nm (Δ) and 2000 nm (o). Each data point consists of n=21 measurements.

When both data sets are collectively fitted with a linear function, a coefficient of determination (R^2) of 0.99 is obtained. Similarly, no pronounced differences between positively and negatively charged PS_{2000} were observed. This was confirmed by fluorescence microscopy as illustrated in Figure 5.

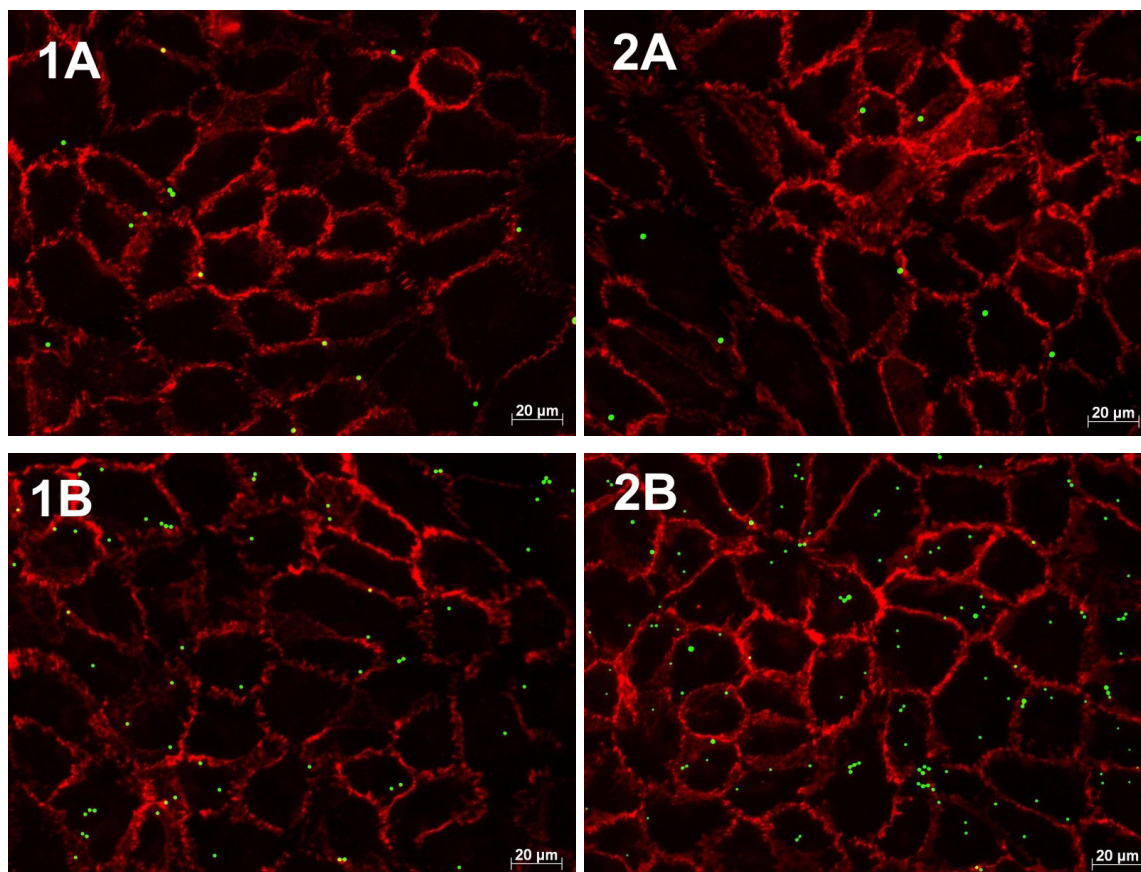


Figure 5: Negatively (1) and positively charged (2) 2000 nm particles (green) associated with HUVECs after 30 min incubation. Concentration of particle suspension $\sim 1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ (A) and $\sim 8 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ (B). Vascular endothelial cadherin (red).

These results indicate that HUVEC monolayers, unlike Caco-2 cell monolayers, bear equal binding capacity for negatively and positively charged particles. Related observations were reported by Osaka et al., who investigated the uptake of positively and negatively charged magnetite nanoparticles into MCF-7 breast cancer cells and HUVECs. [38] While a preferential uptake of positively charged nanoparticles into MCF-7 cells was detected, the data for HUVECs revealed no difference between positively and negatively charged colloids. In connection with the presented results, this indicates that higher bioadhesion of positively charged particles obviously can not be presumed for all cell types.

HUVEC monolayers bind more particles than Caco-2 monolayers

In terms of the quantities of cell-associated particles, HUVECs obviously represent a comparatively affine cell substrate for particle binding. Over the concentration range investigated, HUVEC monolayers exhibit a 2-fold and 4-5 fold higher binding capacity than Caco-2 cell monolayers for positively charged PS₅₀₀ and PS₂₀₀₀ respectively. In the case of negatively charged colloids, this was even more pronounced as illustrated by 6-8 fold and 10-fold higher binding of PS₅₀₀ and PS₂₀₀₀ respectively. This could be specific for endothelial cells. However, it is also possible that primary intestinal epithelial cells differ from Caco-2 cells in terms of their binding capacity for positively and negatively charged particles. This point and possible differences between primary cells and cell lines should be clarified in future studies.

Higher binding efficiency of nanoparticles

As illustrated by the fluorescence microscopic images in Figure 2 and Figure 5, PS₅₀₀ are more uniformly distributed on the cell monolayer. In regards to drug delivery this implies that the incorporated drug will be released more homogenously to the cells if delivered in smaller carriers.

To be able to estimate the binding efficiency the theoretical particle deposition rates during the experiment can be calculated. Deposition rates for particles in the sedimentation controlled regime depend on the sedimentation velocity v_{sed} of the particles according to Eq.9

$$v_{\text{sed}} = 2/9 * [(gr^2(\rho_p - \rho_s)/\eta)] \quad (\text{Eq.9})$$

with g [m s^{-2}] as the gravitational acceleration. For PS₅₀₀ and PS₂₀₀₀ in aqueous buffer at room temperature a v_{sed} of $\sim 0.5 \mu\text{m min}^{-1}$ and $\sim 7.7 \mu\text{m min}^{-1}$ respectively is expected. This leads to the assumption, that the PS₅₀₀ in the lower 15 μm and the PS₂₀₀₀ in the lower 230 μm of suspension in the cylindrical well will have sedimented onto the cell layer after incubation for 30 min. Considering the cylindrical form of the microplate well with a base of 33 mm^2 and a uniform distribution of the particles, this amounts to deposition of 0.5 % of the added PS₅₀₀ and 7.6 % of the added PS₂₀₀₀. Consequently, an about 15 times higher deposition of PS₂₀₀₀ can be expected. For the highest concentration of $\sim 16 \mu\text{g}/100\mu\text{L}/\text{well}$ this corresponds to deposition of 0.08 and 1.2 μg of PS₅₀₀ and PS₂₀₀₀ respectively.

These rough estimates indicate that only a small fraction of the colloids actually deposits on the cell monolayer within 30 min. As illustrated by the almost linear binding curves for

all particle types on Caco-2 and HUVEC monolayers, no saturation of the cell layer occurs during the experiment. In the case of PS₂₀₀₀ the theoretical deposition rates seem realistic if compared with the experimentally observed values for positively ($1.46 \pm 0.30 \mu\text{g}$) and negatively charged particles ($1.07 \pm 0.15 \mu\text{g}$) on HUVECs. In case of PS₅₀₀ however, the calculated deposition rates seem to be rather inaccurate. All positively charged PS₅₀₀ bind in higher quantities as expected on HUVEC and Caco-2 monolayers. A reason for this might be the formation of aggregates which sediment at a higher v_{sed} than single particles. However, aggregates were never observed with negatively charged PS₅₀₀ and nevertheless $0.67 \pm 0.07 \mu\text{g}$ of particles were detected as cell-bound at a concentration of $\sim 14.8 \mu\text{g}$ added to HUVEC monolayers (Figure 4). This is clearly higher than the calculated value of $<0.1 \mu\text{g}$. Thus, aggregation is not solely responsible for the discrepancies between theoretical and experimentally observed deposition rates in case of PS₅₀₀. Transport of particles to the cell layer by diffusion is likely to lead to additional deposition, however this is not accounted for in the calculation above.

Larger particles are expected to expose a higher surface area per particle to the cell monolayer. This should entail a higher probability of interaction between oppositely charged groups and thus a higher likelihood of cell-binding. A clear bias of the experimentally observed cell-bound particle mass according to these considerations however was not observed. Although PS₂₀₀₀ are generally characterized by higher binding, it is at maximum only twice as high as that of the corresponding PS₅₀₀. This is in clear contrast to the theoretically predicted 15 times higher deposition of PS₂₀₀₀. The reasons for this are not entirely clear. However, it is plausible that the increased surface area available for binding does not necessarily lead to improved anchoring of the particles. Possibly, this can be explained by the difference in radius between the particles which affects their susceptibility to hydrodynamic stress. In the experiments presented, the washing steps to remove non-bound particles might impose sufficient shear stress to dissociate the interaction between PS₂₀₀₀ and the cells. At the same time, PS₅₀₀ could remain cell-bound since smaller colloids are relatively unaffected by shear stress due to their smaller radius and thus exposed surface area. [39] Consequently, efficient cell-binding could be attained by working with particles at an optimal ratio of particle size to adhesion area. Studies with parallel plate flow chambers (PPFC) [39, 40, 41] or microfluidic devices [42, 43, 44] could help to precisely investigate the effect of hydrodynamic drag forces on the binding of positively and negatively charged particles to cell monolayers. This would not only improve the present understanding of particle binding studies *in vitro*, but also might allow to

deduce an optimal particle size for the targeting of biological barriers with bioadhesive colloids.

Conclusions

As illustrated by the results presented, positively charged particles are not generally characterized by higher cytoadhesion than negatively charged particles. While binding studies with an intestinal epithelial cell model indicated a preferential binding of cationic particles, no such tendencies were observed on primary endothelial cells. In the future, it would be highly interesting to perform the same studies with primary intestinal epithelial cells. This could clarify if Caco-2 cells, despite originating from a tumour, are representative of intestinal epithelium in terms of cell membrane charges.

In the present study, the experiments were performed under stationary conditions. To investigate if the adhesive force of positively and negatively charged nano- and microparticles is sufficient to mediate binding under physiological conditions, experiments with dynamic assays should be performed. In combination with experiments in the presence of serum, it might be possible to elucidate if charged micro- and nanoparticles could serve as bioadhesive and potentially targeted drug carriers *in vivo*.

As indicated by the data presented, nanoparticles are characterized by a higher binding efficiency as microparticles. This becomes clear when the experimentally observed deposited particle mass is compared with the theoretical deposition rates. Although microparticles can carry a larger amount of drug due to their volume, nanoparticles might be more efficient for drug delivery because they spread in the tissue evenly and are less prone to removal by shear forces.

References

- [1] G. Ratzinger, C. Fillafer, V. Kerleta, M. Wirth, and F. Gabor. The role of surface functionalization in the design of plga micro- and nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 27(1):1–83, **2010**.
- [2] V. Labhasetwar, C. Song, W. Humphrey, R. Shebuski, and R. J. Levy. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: Effect of surface modifications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(10):1229– 1234, **1998**.
- [3] J. N. Mehrishi and J. Bauer. Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge. *Electrophoresis*, 23(13):1984– 1994, **2002**.
- [4] L. Thiele, B. Rothen-Rutishauser, S. Jilek, H.Wunderli-Allenspach, H.P. Merkle, and E. Walter. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *Journal of Controlled Release*, 76(1-2):59–71, **2001**.
- [5] L. Thiele, H.P. Merkle, and E. Walter. Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. *Pharmaceutical Research*, 20(2):221–228, **2003**.
- [6] D. J. Wilkins and P. A. Myers. Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat. *British Journal of Experimental Pathology*, 47(6):568–576, **1966**.
- [7] G. Thurston, J. W. McLean, M. Rizen, P. Baluk, A. Haskell, T. J. Murphy, D. Hanahan, and D. M. McDonald. Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 101:1401–1413, **1998**.
- [8] T. Trimaille, C. Pichot, and T. Delair. Surface functionalization of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid dna by the layer-by-layer

approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 221(1-3):39–48, **2003**.

- [9] G. Adam, P. Lauger, and G. Stark. *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer, Berlin, **2007**.
- [10] J.M. Martínez Gómez, N. Csaba, S. Fischer, A. Sichelstiel, T.M. Kundig, B. Gander, and P. Johansen. Surface coating of plga microparticles with protamine enhances their immunological performance through facilitated phagocytosis. *Journal of Controlled Release*, 130(2):161–167, **2008**.
- [11] A. Vila, A. Sánchez, M. Tobıo, P. Calvo, and M. J. Alonso. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 78(1-3):15–24, **2002**.
- [12] B.S. Kim, C.S. Kim, and K.M. Lee. The intracellular uptake ability of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 31(8):1050–1054, **2008**.
- [13] M.N.V.R. Kumar, S.S. Mohapatra, X. Kong, P.K. Jena, U. Bakowsky, and C.M. Lehr. Cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as efficient in vivo gene transfection agents. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4(8):990–994, **2004**.
- [14] M.N.V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, and C.M. Lehr. Preparation and characterization of cationic plga nanospheres as dna carriers. *Biomaterials*, 25(10):1771–1777, **2004**.
- [15] H. Yamamoto, Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi, and Y. Kawashima. Surface-modified plga nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of Controlled Release*, 102(2):373–381, **2005**.

- [16] S. Fischer, C. Foerg, S. Ellenberger, H.P. Merkle, and B. Gander. One-step preparation of polyelectrolyte-coated plga microparticles and their functionalization with model ligands. *Journal of Controlled Release*, 111(1-2):135–144, **2006**.
- [17] N. Nafee, S. Taetz, M. Schneider, U. F. Schaefer, and C. M. Lehr. Chitosan-coated plga nanoparticles for dna/rna delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(3):173–183, **2007**.
- [18] C. Guo and R.A. Gemeinhart. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2):597– 604, **2008**.
- [19] M.L. Manca, S. Mourtas, V. Dracopoulos, A.M. Fadda, and S.G. Antimisiaris. Plga, chitosan or chitosan-coated plga microparticles for alveolar delivery?: A comparative study of particle stability during nebulization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(2):220– 231, **2008**.
- [20] R. Yang, W.S. Shim, F.D. Cui, G. Cheng, X. Han, Q.R. Jin, D.D. Kim, S.J. Chung, and C.K. Shim. Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified plga nanoparticle and tumor. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1-2):142–147, **2009**.
- [21] R. Yang, S. G. Yang, W. S. Shim, F. Cui, G. Cheng, I. W. Kim, D. D. Kim, S. J. Chung, and C. K. Shim. Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan-modified plga nanoparticles via transient formation of microaggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(3):970–984, **2009**.
- [22] M.J. Tsung and D.J. Burgess. Preparation and characterization of gelatin surface modified plga microspheres. *AAPS Pharmaceutical Sciences*, 3(2):E11, **2001**.
- [23] C. Wischke, J. Zimmermann, B. Wessinger, A. Schendler, H. H. Borchert, J. H. Peters, T. Nesselhut, and D. R. Lorenzen. Poly(i:c) coated plga microparticles

- induce dendritic cell maturation. *International Journal of Pharmaceutics*, 365(1-2):61–68, **2009**.
- [24] K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van den Mooter, and A. Ludwig. Evaluation of ciprofloxacin-loaded eudragit® rs100 or rl100/plga nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1):72–82, **2006**.
- [25] M. Bivas-Benita, S. Romeijn, H. E. Junginger, and G. Borchard. Plga-pei nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(1):1–6, **2004**.
- [26] B. Mandal, M. Kempf, H.P. Merkle, and E. Walter. Immobilisation of gm-csf onto particulate vaccine carrier systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(1):259–265, **2004**.
- [27] C.G. Oster, N. Kim, L. Grode, L. Barbu-Tudoran, A. K. Schaper, S. H. E. Kaufmann, and T. Kissel. Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental dna vaccination. *Journal of Controlled Release*, 104(2):359–377, **2005**.
- [28] S.P. Kasturi, K. Sachaphibulkij, and K. Roy. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid dna vaccines. *Biomaterials*, 26(32):6375–6385, **2005**.
- [29] Y.W. Yang and P.Y.J. Hsu. The effect of poly(d,l-lactide-coglycolide) microparticles with polyelectrolyte self-assembled multilayer surfaces on the cross-presentation of exogenous antigens. *Biomaterials*, 29(16):2516–2526, **2008**.
- [30] S. Faraasen, J. Voros, G. Csucs, M. Textor, H.P. Merkle, and E. Walter. Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(l-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate. *Pharmaceutical Research*, 20(2):237–246, **2003**.

- [31] J.K. Vasir and V. Labhassetwar. Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials*, 29(31):4244– 4252, **2008**.
- [32] C. Cui and S.P. Schwendeman. Surface entrapment of polylysine in biodegradable poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles. *Macromolecules*, 34(24):8426–8433, **2001**.
- [33] M. Müller, J. Voros, G. Csucs, E. Walter, G. Danuser, H. P. Merkle, N. D. Spencer, and M. Textor. Surface modification of plga microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 66(1):55– 61, **2003**.
- [34] S.H. Kim, J.H. Jeong, K.W. Chun, and T.G. Park. Target-specific cellular uptake of plga nanoparticles coated with poly(l-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir*, 21(19):8852– 8857, **2005**.
- [35] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16):7297–7301, **1995**.
- [36] E. J. Ambrose, A.M. James, and J. H. B. Lowick. Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. *Nature*, 177:576–577, **1956**.
- [37] S. Ben-Or, S. Eisenberg, and F. Doljanski. Electrophoretic mobilities of normal and regenerating liver cells. *Nature*, 188:1200–1201, **1960**.
- [38] T. Osaka, T. Nakanishi, S. Shanmugam, S. Takahama, and H. Zhang. Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71:325– 330, **2009**.

- [39] V. R. Shinde Patil, C. J. Campbell, Y. H. Yun, S. M. Slack, and D. J. Goetz. Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal*, 80(4):1733–1743, **2001**.
- [40] A.O. Eniola and D.A. Hammer. Artificial polymeric cells for targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 87(1-3):15–22, **2003**.
- [41] H. S. Sakhalkar, M. K. Dalal, A. K. Salem, R. Ansari, J. Fu, M. F. Kiani, D. T. Kurjiaka, J. Hanes, K. M. Shakesheff, and D. J. Goetz. Leukocyte-inspired biodegradable particles that selectively and avidly adhere to inflamed endothelium in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26):15895–15900, **2003**.
- [42] B. Prabhakarandian, K. Pant, R. C. Scott, C. B. Patillo, D. Irimia, M. F. Kiani, and S. Sundaram. Synthetic microvascular networks for quantitative analysis of particle adhesion. *Biomedical Microdevices*, 10(4):585–595, **2008**.
- [43] O. C. Farokhzad, A. Khademhosseini, S. Jon, A. Hermmann, J. Cheng, C. Chin, A. Kiselyuk, B. Teply, G. Eng, and R. Langer. Microfluidic system for studying the interaction of nanoparticles and microparticles with cells. *Analytical Chemistry*, 77(17):5453– 5459, **2005**.
- [44] C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F. Gabor, and M.F. Schneider. An acoustically-driven biochip - impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers. *Lab on a Chip*, 9(19):2782–2788, **2009**.

Anhang B

B.1. Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung von Mikropartikeln - Kalibrationsgeraden

B.1.a. Polystyrol Mikropartikel (500nm)

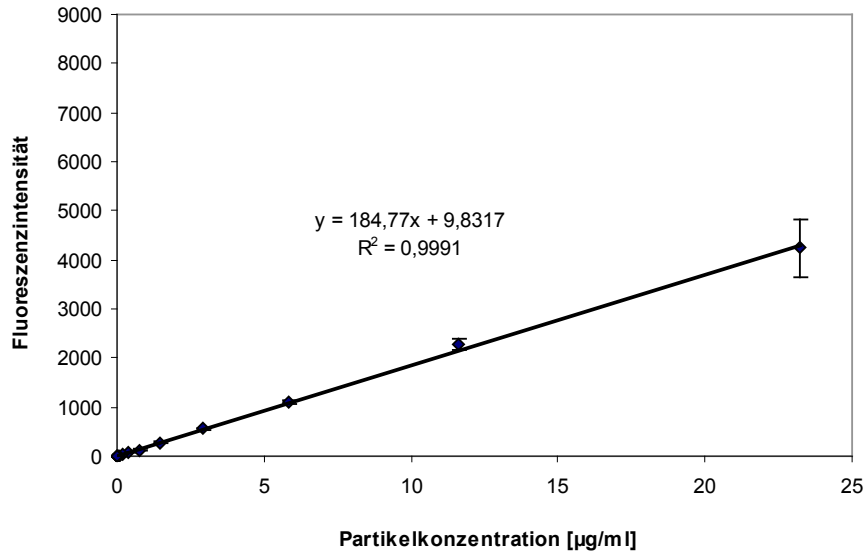


Figure 6: Fluoreszenzintensitäten (Gain: 109; Ex/Em 440/485nm; bottom read) einer Verdünnungsreihe von Mikropartikelsuspensionen. Partikelmaterial: PS; Partikeldurchmesser: 500 nm; Suspensionsmedium: isoHEPES pH 7,4; Konzentrationsbereich: ~ 0-24 $\mu\text{g/ml}$; jeder Datenpunkt setzt sich aus n=6 Einzelwerten zusammen; Mikrotiterplatten: 96-well Platten (Greiner BioOne); Probenvolumen: 100 μL

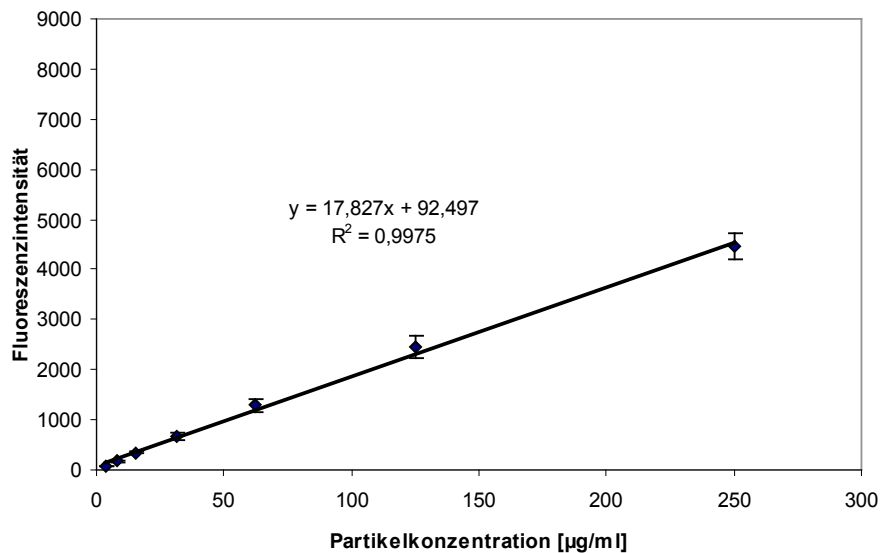


Figure 7: Fluoreszenzintensitäten (Gain: 80; Ex/Em 440/485nm; bottom read) einer Verdünnungsreihe von Mikropartikelsuspensionen. Partikelmaterial: PS; Partikeldurchmesser: 500 nm; Suspensionsmedium: isoHEPES pH 7,4; Konzentrationsbereich: ~ 5-250 $\mu\text{g/ml}$; jeder Datenpunkt setzt sich aus n=6 Einzelwerten zusammen; Mikrotiterplatten: 96-well Platten (Greiner BioOne); Probenvolumen: 100 μL

B.1.b. Polystyrol Mikropartikel (1000nm)

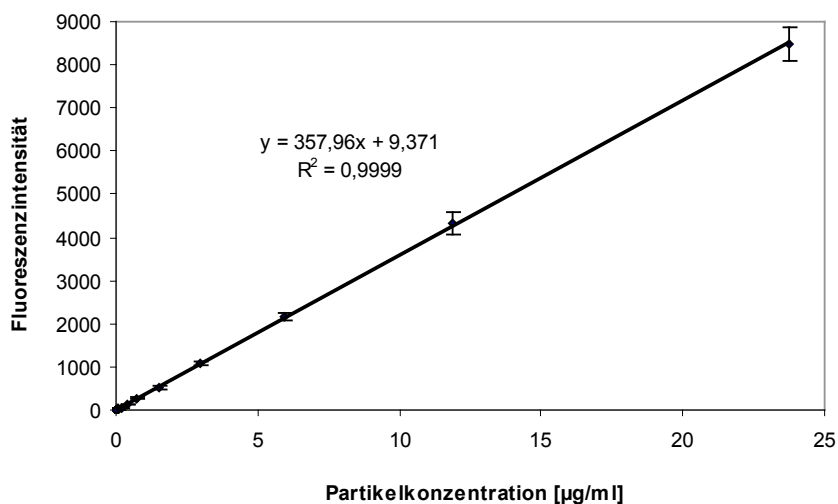


Figure 8: Fluoreszenzintensitäten (Gain: 109; Ex/Em 440/485nm; bottom read) einer Verdünnungsreihe von Mikropartikelsuspensionen. Partikelmaterial: PS; Partikeldurchmesser: 1000 nm; Suspensionsmedium: isoHEPES pH 7,4; Konzentrationsbereich: 0-24 µg/ml; jeder Datenpunkt setzt sich aus n=6 Einzelwerten zusammen; Mikrotiterplatten: 96-well Platten (Greiner BioOne); Probenvolumen: 100 µL

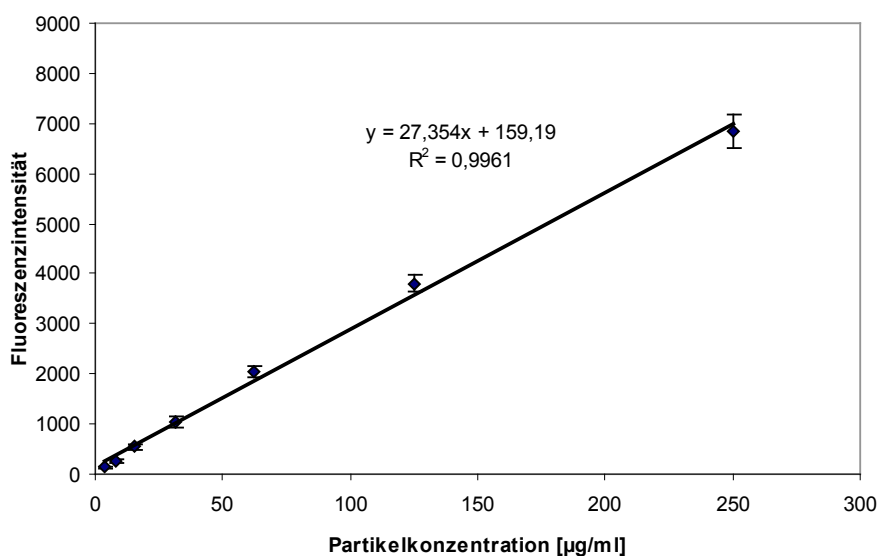


Figure 9: Fluoreszenzintensitäten (Gain: 80; Ex/Em 440/485nm; bottom read) einer Verdünnungsreihe von Mikropartikelsuspensionen. Partikelmaterial: PS; Partikeldurchmesser: 1000 nm; Suspensionsmedium: isoHEPES pH 7,4; Konzentrationsbereich: ~ 5-250 µg/ml; jeder Datenpunkt setzt sich aus n=6 Einzelwerten zusammen; Mikrotiterplatten: 96-well Platten (Greiner BioOne); Probenvolumen: 100 µL

B.1.c. Polystyrol Mikropartikel (2000nm)

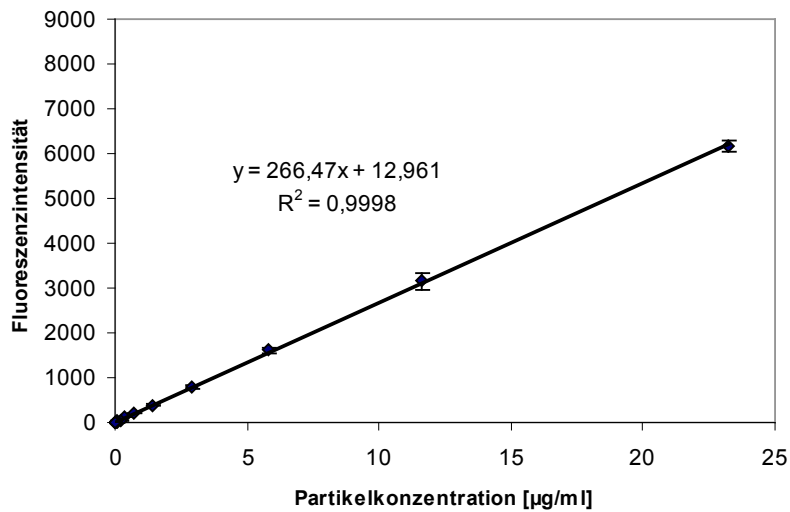


Figure 10: Fluoreszenzintensitäten (Gain: 109; Ex/Em 440/485nm; bottom read) einer Verdünnungsreihe von Mikropartikelsuspensionen. Partikelmaterial: PS; Partikeldurchmesser: 2000 nm; Suspensionsmedium: isoHEPES pH 7,4; Konzentrationsbereich: 0-24 $\mu\text{g/ml}$; jeder Datenpunkt setzt sich aus n=6 Einzelwerten zusammen; Mikrotiterplatten: 96-well Platten (Greiner BioOne); Probenvolumen: 100 μL

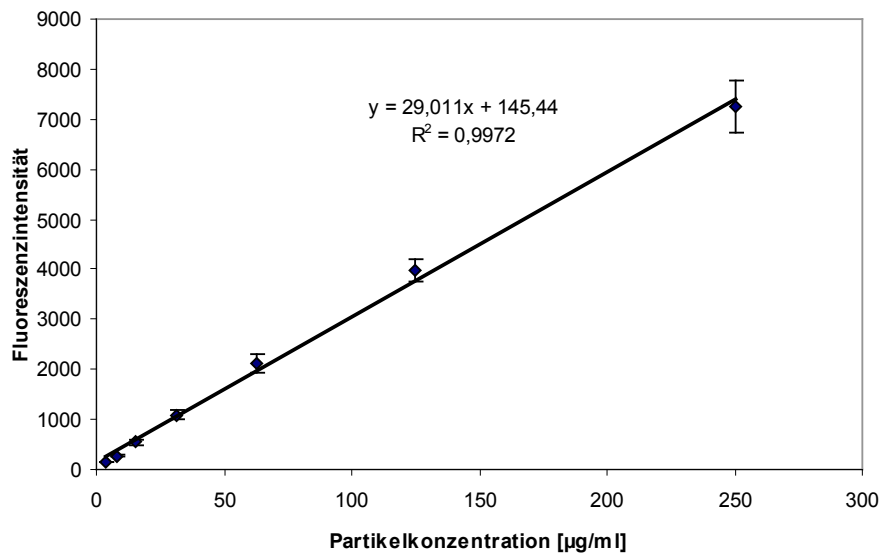


Figure 11: Fluoreszenzintensitäten (Gain: 80; Ex/Em 440/485nm; bottom read) einer Verdünnungsreihe von Mikropartikelsuspensionen. Partikelmaterial: PS; Partikeldurchmesser: 1000 nm; Suspensionsmedium: isoHEPES pH 7,4; Konzentrationsbereich: ~ 5-250 $\mu\text{g/ml}$; jeder Datenpunkt setzt sich aus n=6 Einzelwerten zusammen; Mikrotiterplatten: 96-well Platten (Greiner BioOne); Probenvolumen: 100 μL

B.2. Bindungsstudien mit positiv und negativ geladenen Mikropartikeln (1µm)

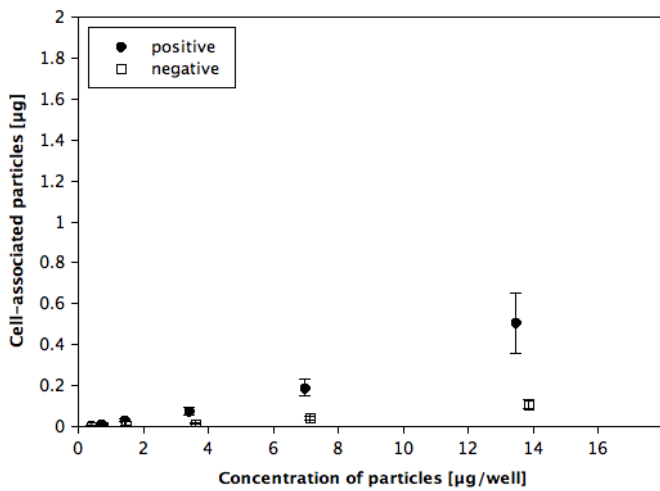


Figure 12: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von positiv (gefüllte Symbole) und negativ geladenen 1000nm PS-Partikel (leere Symbole) an Caco-2-Zellmonolayer nach 30 min Inkubation in isoHEPES pH 7,4 bei Raumtemperatur.

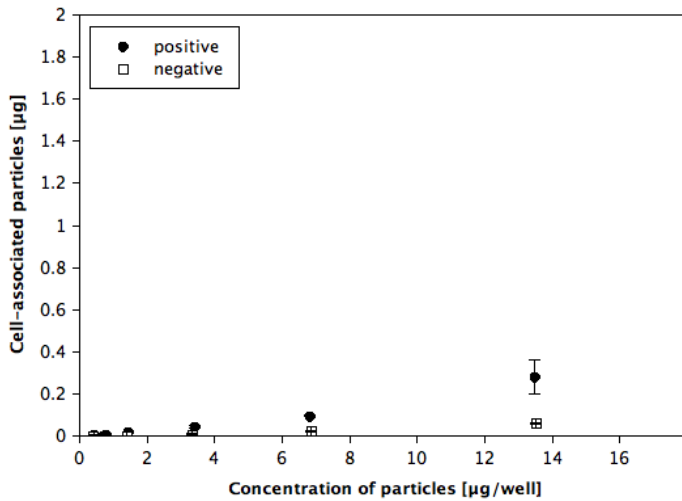


Figure 13: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von positiv (gefüllte Symbole) und negativ geladenen 1000nm PS-Partikel (leere Symbole) an Caco-2-Zellmonolayer nach 30 min Inkubation in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) bei Raumtemperatur.

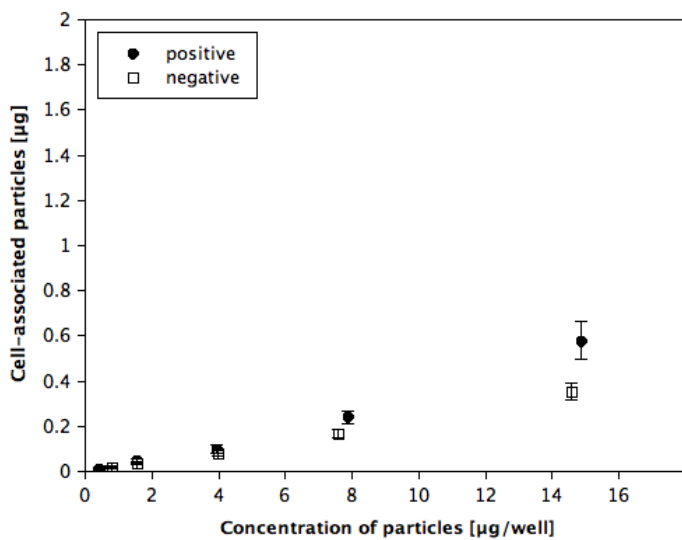


Figure 14: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von positiv (gefüllte Symbole) und negativ geladenen 1000nm PS-Partikel (leere Symbole) an HUVEC-Zellmonolayer nach 30 min Inkubation in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) bei Raumtemperatur.

B.3. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu B.2.

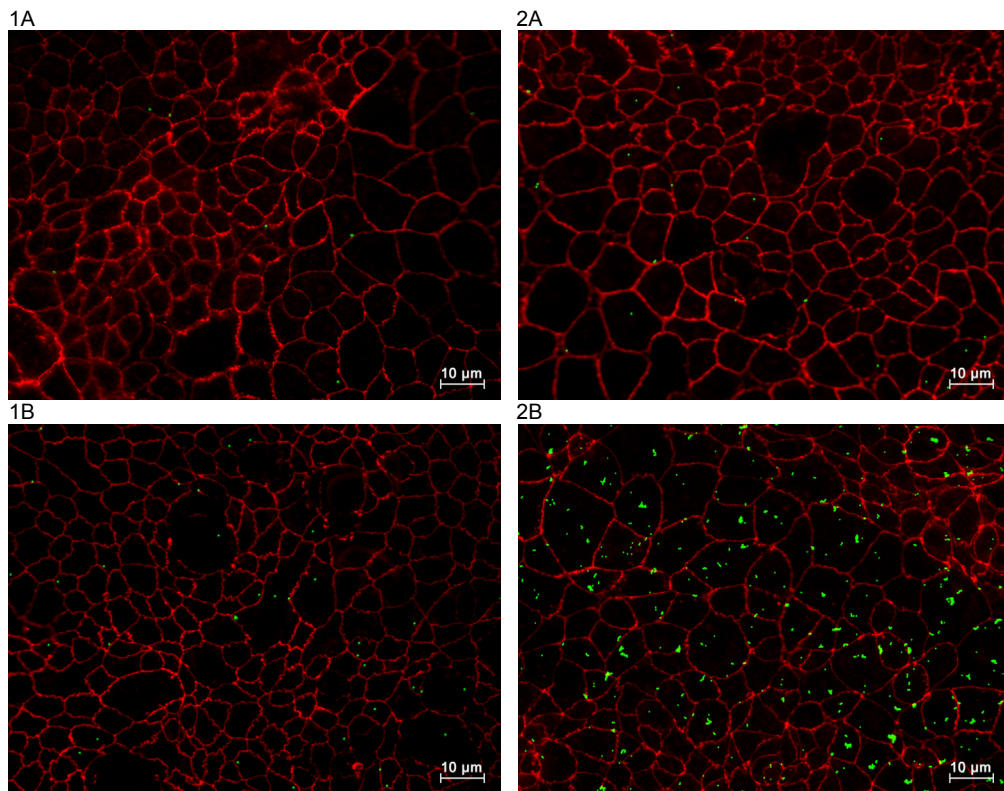


Figure 15: An Caco-2-Zellmonolayer gebundene negativ (1) und positiv (2) geladene 1000nm PS-Partikel (grün) nach 30 min Inkubation in isoHEPES pH 7,4. Konzentration der eingesetzten Partikelsuspensionen: ~ 1µg/100µl (A) und ~ 8µg/100µl (B). ZO-1 im tight junction Komplex (rot).

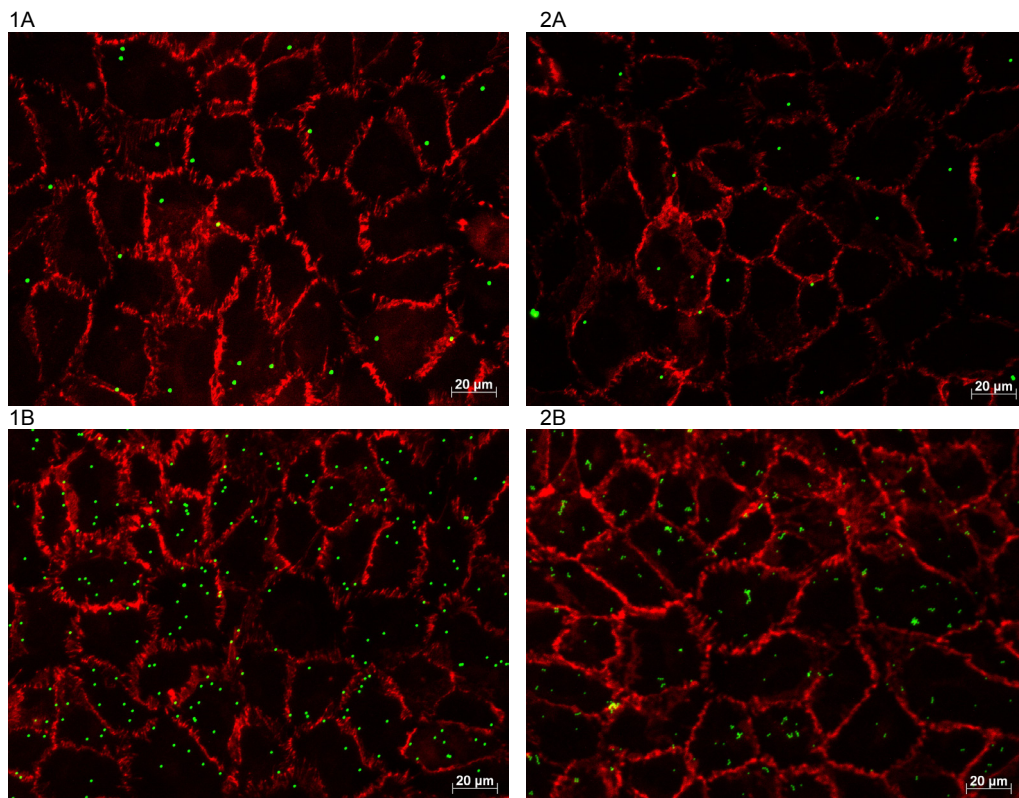


Figure 16: An HUVEC-Zellmonolayer gebundene negativ (1) und positiv (2) geladene 1000nm PS-Partikel (grün) nach 30 min Inkubation in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺). Konzentration der eingesetzten Partikelsuspensionen: ~ 1µg/100µl (A) und ~ 8µg/100µl (B). Vascular endothelial cadherin (rot).

B.4. Morphologie von HUVEC Zellmonolayern während der *in vitro* Kultivierung

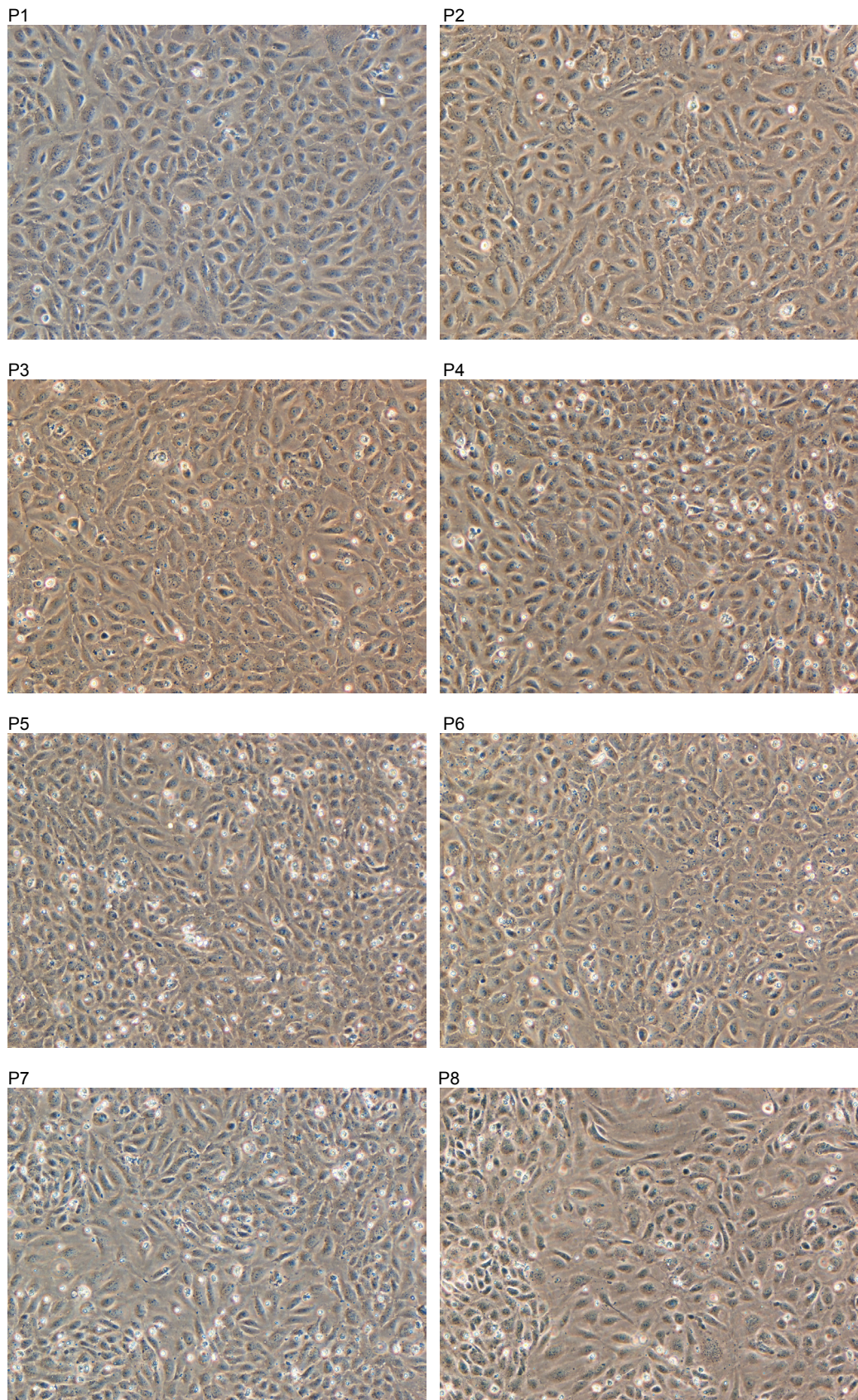


Figure 17: Morphologie von HUVEC Zellmonolayern im Rahmen der Kultivierung in Zellkulturflaschen. Aufnahmen mit Inversmikroskop Nikon Diaphot 300 jeweils kurz vor dem Passagieren. (Passagen 1-8)

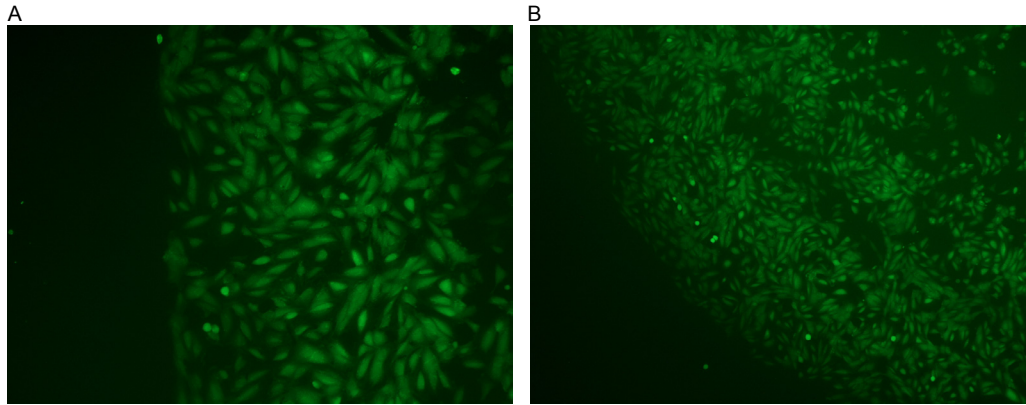


Figure 18: HUVEC-Monolayer, kultiviert in Kanälen aus Polydimethylsiloxan (PDMS), gefärbt mit Fluoresceindiacetat (FDA); Aufnahmen mit Objektiv Nikon Plan Fluor 40x (A) und Nikon LU Plan Fluor 10x (B).

B.5. Oberflächenfunktionalisierung von PS-Partikeln mit PEI

Partikelsuspensionen:

- 500nm Partikel: 5 mg/ml in Aqua dest.
- 1000nm Partikel: 10 mg/ml in Aqua dest.
- 2000nm Partikel: 20 mg/ml in Aqua dest.

PEI-Lösung:

- 5mg/ml PEI in Phosphatpuffer pH 5.8

Reaktionsansatz:

100µl Partikelsuspension + 100µl PEI-Lösung

Die PEI-Lösung wird in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter steter Durchmischung im Ultraschallbad wird die Partikelsuspension zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wird die Suspension für weitere 10min beschallt. Als Negativkontrolle wird die Partikelsuspension mit Phosphatpuffer ohne PEI versetzt.

Danach werden 1300µl Phosphatpuffer pH 5.8 zugesetzt. Nach Durchmischung im Ultraschallbad (1min.) werden die Partikel bei 14000 UpM 3min (500nm Durchmesser), 2min (1000nm Durchmesser) bzw. 1min (2000nm Durchmesser) lang abzentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig abgehoben und 1300µl Phosphatpuffer pH 5.8 zugesetzt. Nach Durchmischen, Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wird mit 20mM HEPES/NaOH Puffer pH 7.4 auf 1ml aufgefüllt.

Die Suspension wird kurz gevortext und 5min lang im Ultraschallbad geschwenkt. Nach Aliquotierung (500µl) in Eppendorfgefäße wird die Partikelsuspension für 15sec (500nm Durchmesser), 18sec (1000nm Durchmesser) bzw. 20 sec (2000nm Durchmesser) mit einem Ultraschallstab (Bandelin electronic UW 70/HD 70; tip: MS72/D, Berlin, Germany) bei niedrigster Intensität (20%) behandelt.

Für die Bestimmung der Oberflächenladung mittels Laser Doppler Elektrophorese (ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Großbritannien) werden 80µl der erhaltenen Suspension mit 920µl 20mM HEPES/NaOH Puffer pH 7.4 verdünnt. Die Teilchengrößenverteilung wird mikroskopisch im direkten Vergleich zur nichtmodifizierten Negativkontrolle beurteilt.

Literaturverzeichnis

- [1] D.T. O'Hagan, *Adv Drug Deliv Rev* **1998**, 34, 305.
- [2] A.T. Florence, *Pharm Res* **1997**, 14, 259.
- [3] D. Duchêne, G. Ponchel, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1997**, 44, 15.
- [4] G. Ratzinger, C. Fillafer, V. Kerleta, M. Wirth, and F. Gabor. The role of surface functionalization in the design of plga micro- and nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 27(1):1–83, **2010**.
- [5] K.E. Fischer, B.J. Alemán, S.L. Tao, R.H. Daniels, E.M. Li, M.D. Bünger, G. Nagaraj, P. Singh, A. Zettl and T. A. Desai. Biomimetic nanowire coatings for next generation adhesive drug delivery systems. *Nanoletters* **2009**, 9, 716-720.
- [6] V. Labhasetwar, C. Song, W. Humphrey, R. Shebuski, and R. J. Levy. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: Effect of surface modifications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(10):1229–1234, **1998**.
- [7] J. N. Mehrishi and J. Bauer. Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge. *Electrophoresis*, 23(13):1984–1994, **2002**.
- [8] A. Vila, A. Sánchez, M. Tobío, P. Calvo, and M. J. Alonso. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, 78(1-3):15–24, **2002**.
- [9] B.S. Kim, C.S. Kim, and K.M. Lee. The intracellular uptake ability of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 31(8):1050–1054, **2008**.

- [10] M.N.V.R. Kumar, S.S. Mohapatra, X. Kong, P.K. Jena, U. Bakowsky, and C.M. Lehr. Cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as efficient in vivo gene transfection agents. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4(8):990–994, **2004**.
- [11] M.N.V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, and C.M. Lehr. *Preparation and characterization of cationic plga nanospheres as dna carriers*. *Biomaterials*, 25(10):1771–1777, **2004**.
- [12] H. Yamamoto, Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi, and Y. Kawashima. Surface-modified plga nanosphere with chitosan Improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of Controlled Release*, 102(2):373–381, **2005**.
- [13] S. Fischer, C. Foerg, S. Ellenberger, H.P. Merkle, and B. Gander. One-step preparation of polyelectrolyte-coated plga microparticles and their functionalization with model ligands. *Journal of Controlled Release*, 111(1-2):135–144, **2006**.
- [14] N. Nafee, S. Taetz, M. Schneider, U. F. Schaefer, and C. M. Lehr. Chitosan-coated plga nanoparticles for dna/rna delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(3):173–183, **2007**.
- [15] C. Guo and R.A. Gemeinhart. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2):597–604, **2008**.
- [16] M.L. Manca, S. Mourtas, V. Dracopoulos, A.M. Fadda, and S.G. Antimisiaris. Plga, chitosan or chitosan-coated plga microparticles

for alveolar delivery?: A comparative study of particle stability during nebulization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(2):220–231, **2008**.

- [17] R. Yang, W.S. Shim, F.D. Cui, G. Cheng, X. Han, Q.R. Jin, D.D. Kim, S.J. Chung, and C.K. Shim. Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified plga nanoparticle and tumor. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1-2):142–147, **2009**.
- [18] R. Yang, S. G. Yang, W. S. Shim, F. Cui, G. Cheng, I. W. Kim, D. D. Kim, S. J. Chung, and C. K. Shim. Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan-modified plga nanoparticles via transient formation of microaggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(3):970–984, **2009**.
- [19] G.T. Zugates, W. Peng, A. Zumbuehl, S. Jhunjhunwala, Y.-H. Huang, R. Langer, J. A. Sawicki and D.G. Anderson. Rapid Optimization of Gene Delivery by Parallel End-modification of Poly(β -amino ester)s. *The American Society of Gene Therapy*, 15, 1306-1312, **2007**.
- [20] S.R. Little, D.M. Lynn, Q. Ge, D.G. Anderson, S.V. Puram, J. Chen, H.N. Eisen and R. Langer. Poly-beta- amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101. 9537, **2004**.
- [21] G.T. Zugates, N.C. Tedford, A. Zumbuehl, S. Jhunjhunwala, C.S. Kang, L.G. Griffith, D.A. Lauffenburger, R. Langer and D.G. Anderson. Gene Delivery Properties of End-Modified Poly(beta-amino ester)s. *Bioconjugate Chem.*18, 1887-1896, **2007**.
- [22] I. Bala, S. Hariharan, M.N.V.R. Kumar, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2004**, 21, 387.

- [23] C. Cortez, E. Tomaskovic-Crook, A.P.R. Johnston, A.M. Scott, E.C. Nice, J.K. Heath, F. Caruso, *ACS Nano* **2007**, 1, 93.
- [24] T. Trimaille, C. Pichot, and T. Delair. Surface functionalization of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid dna by the layer-by-layer approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 221(1-3):39–48, **2003**.
- [25] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16):7297–7301, **1995**.
- [26] E. J. Ambrose, A.M. James, and J. H. B. Lowick. Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. *Nature*, 177:576–577, **1956**.
- [27] S. Ben-Or, S. Eisenberg, and F. Doljanski. Electrophoretic mobilities of normal and regenerating liver cells. *Nature*, 188:1200–1201, **1960**.
- [28] T. Osaka, T. Nakanishi, S. Shanmugam, S. Takahama, and H. Zhang. Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71:325–330, **2009**.
- [29] J.G. Teeguarden, P.M. Hinderliter, G. Orr, B.D. Thrall, J.G. Pounds. Particokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 95:300-312, **2007**.
- [30] V. R. Shinde Patil, C. J. Campbell, Y. H. Yun, S. M. Slack, and D. J. Goetz. Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal*, 80(4):1733–1743, **2001**.
- [31] A.O. Eniola and D.A. Hammer. Artificial polymeric cells for targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 87(1-3):15–22, **2003**.

- [32] H. S. Sakhalkar, M. K. Dalal, A. K. Salem, R. Ansari, J. Fu, M. F. Kiani, D. T. Kurjiaka, J. Hanes, K. M. Shakesheff, and D. J. Goetz. Leukocyte-inspired biodegradable particles that selectively and avidly adhere to inflamed endothelium in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26):15895–15900, **2003**.
- [33] B. Prabhakarandian, K. Pant, R. C. Scott, C. B. Patillo, D. Irimia, M. F. Kiani, and S. Sundaram. Synthetic microvascular networks for quantitative analysis of particle adhesion. *Biomedical Microdevices*, 10(4):585–595, **2008**.
- [34] O. C. Farokhzad, A. Khademhosseini, S. Jon, A. Hermmann, J. Cheng, C. Chin, A. Kiselyuk, B. Teply, G. Eng, and R. Langer. Microfluidic system for studying the interaction of nanoparticles and microparticles with cells. *Analytical Chemistry*, 77(17):5453– 5459, **2005**.
- [35] C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F. Gabor, and M.F. Schneider. An acoustically-driven biochip - impact of flow on the cell-association of targeted drug carriers. *Lab on a Chip*, 9(19):2782–2788, **2009**

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Bettina Luser
Geboren am: 22.10.1984
Geburtsort: Stockerau
Wohnort: Dr. Wallekstr. 15/3/1/6,
2000 Stockerau
Staatsbürgerschaft: Österreich
Eltern: Gertrude und Kurt Luser
Geschwister: Ing. Andreas Luser



Ausbildung

1991 - 1995 Volksschule, 2000 Stockerau
1995 - 2003 Bundesgymnasium, 2000 Stockerau
2003 - 2012 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufserfahrung

2000 – 2009 pro Jahr ein Monat Ferialpraxis bei der Firma Sanova Pharma GesmbH,
Haidestraße 4, 1110 Wien
Juli 2009 Ferialpraktikum in der Löwenapotheke, 2000 Stockerau
2011-2012 Löwenapotheke, 2000 Stockerau

Weitere Tätigkeiten

WS 2009 Tutorin in den Übungen „Grundpraktikum aus pharmazeutischer
Technologie“
SS 2010 Tutorin in den Übungen „Magistrale Arzneimittelherstellung“