

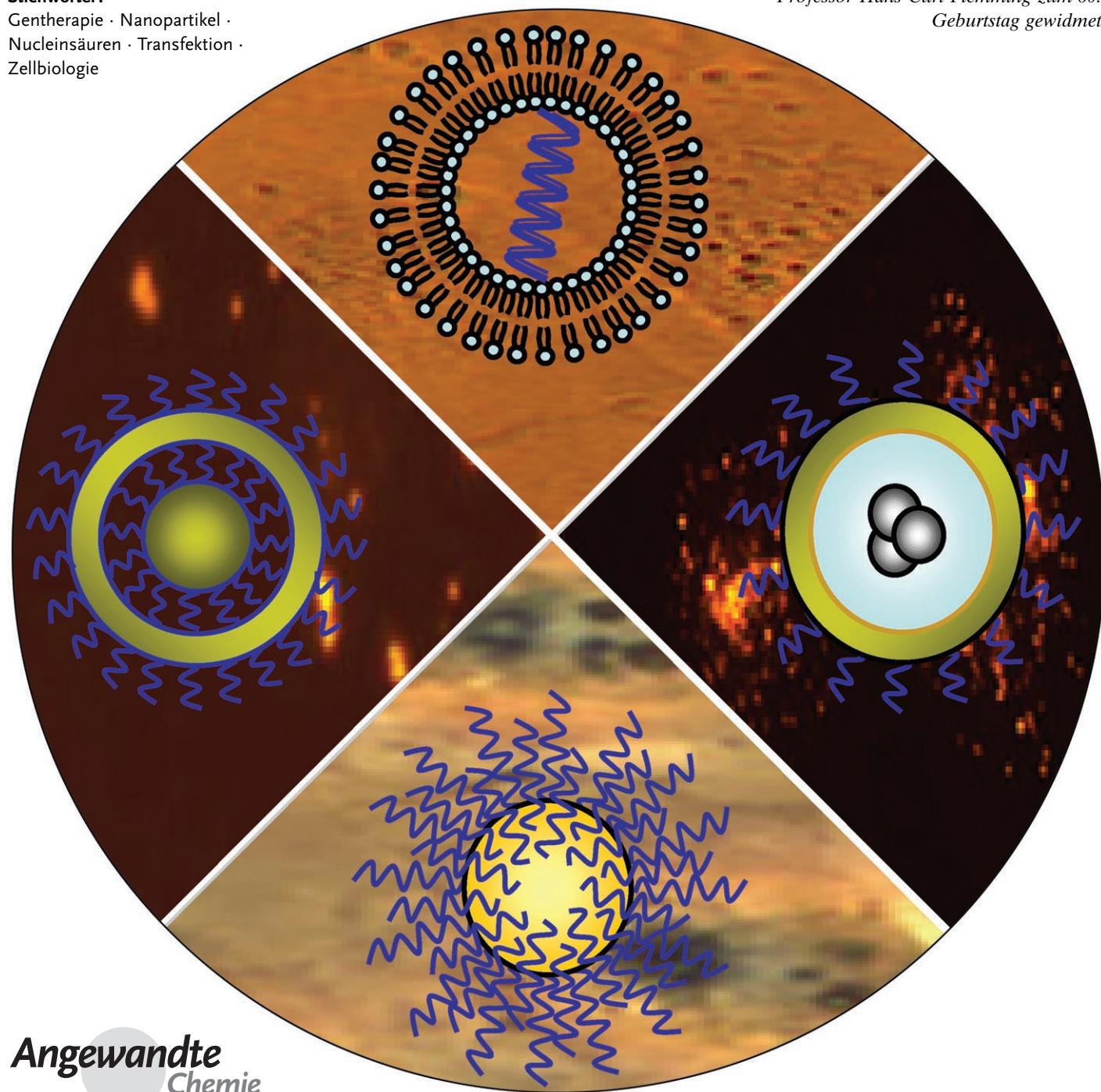
Anorganische Nanopartikel zum Transport von Nucleinsäuren in Zellen

Viktoriya Sokolova und Matthias Epple*

Stichwörter:

Gentherapie · Nanopartikel ·
Nucleinsäuren · Transfektion ·
Zellbiologie

Professor Hans-Curt Flemming zum 60.
Geburtstag gewidmet



Angewandte
Chemie

Die Aufnahme von Nucleinsäuren (DNA oder RNA) in lebende Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Diese wichtige Technik der modernen Biochemie und Molekularbiologie ermöglicht durch die Einschleusung von genetischem Material sowohl die Hochregulierung der Produktion bestimmter Proteine als auch die gezielte Inhibition der Proteinsynthese (Gen-Stummschaltung). Da Nucleinsäuren die Zellwand nicht allein durchdringen können, bedarf es geeigneter Träger. Neben viralen, polymeren und liposomalen Trägern sind anorganische Nanopartikel für diese Aufgabe besonders geeignet, da sie in vielfältiger Natur hergestellt und oberflächenfunktionalisiert werden können. In diesem Aufsatz wird der gegenwärtige Stand der Forschung aus chemischer Sicht vorgestellt; Vor- und Nachteile der verfügbaren Methoden werden diskutiert.

1. Einleitung

Der medizinische Einsatz von Nanopartikeln ist ein wichtiger Teilbereich der Nanobiotechnologie.^[1] Dank ihrer geringen Größe können Nanopartikel die Zellwand durchdringen und so pharmazeutische Wirkstoffe oder Biomoleküle in lebende Systeme einschleusen; dies kann für therapeutische Zwecke genutzt werden.^[2-5] Man kennt viele Arten von Nanopartikeln, von denen viele an biologischen Systemen getestet wurden und einige sich sogar in klinischen Testphasen befinden. In diesem Aufsatz beleuchten wir den Stand der Forschung bei der Anwendung anorganischer Nanopartikel als Träger für Nucleinsäuren (DNA, RNA und Oligonukleotide) zur Beeinflussung der Genexpression von Zellen. Da es bereits umfangreiche Arbeiten zur Anwendung von bioorganischen Nanopartikel-Systemen (z. B. polykationische und liposomale Agentien und Dendrimere) gibt, beschränken wir uns hier auf anorganische Nanopartikel.

2. Transfektion

Die Einschleusung von DNA, RNA oder Oligonukleotiden in eukaryotische Zellen bezeichnet man als Transfektion.^[6] Diese umfasst die Aufnahme der extrazellulären Moleküle durch die Zellmembran in das Cytoplasma und weiter in den Zellkern. Wenn DNA in den Zellkern transportiert wird, kann sie in das Genom der Zelle eingebaut werden und dadurch die Produktion spezifischer Proteine anregen.^[6-8] Man unterscheidet zwischen einer transienten Transfektion, bei der DNA nicht in das Wirtschromosom integriert wird, und einer stabilen Transfektion, bei der eine Integration in das Wirtschromosom und eine Weitergabe an die nächsten Generationen erfolgen. Als komplementäre Methode kann das Einbringen von small-interfering RNA (siRNA) die Produktion einzelner Proteine gezielt herabregeln (Gen-Stummschaltung oder gene silencing, antisense).^[9-15] Eine derartige, gezielte Einführung genetischer Sequenzen in Zellen ist heute ein wichtiges Instrument zur Analyse der Struktur, Funktion und Regulation von Genen; weiterhin bildet es die konzeptionelle Grundlage für die Gentherapie,

d. h. die gezielte Behandlung genetisch bedingter Krankheiten.

DNA allein ist nicht in der Lage, in eine Zelle einzudringen – es bedarf hierzu eines geeigneten Vektors.^[16] Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten über die direkte Injektion von DNA in verschiedene Organe, z. B. in die Skelettmuskulatur,^[17] in die Leber,^[18] in die Schilddrüse,^[19] in den Herzmuskel,^[20] ins Gehirn^[21] und in urologische Organe.^[22] Eine zelluläre Aufnahme von Plasmid-DNA durch Injektion erfolgt nur in sehr geringem Maße: So wurden z. B. von Muskelzellen weniger als 1 % der injizierten Dosis aufgenommen.^[17] Die Injektion von DNA in die Schwanzvene von Mäusen führte nicht zu einer Genexpression,^[23] da sie im Blut schnell durch Nucleasen abgebaut wurde.^[24,25]

Die Zellmembran besteht aus einer permeablen Lipiddoppelschicht, die die äußere Begrenzung einer Zelle bildet. Die amphiphilen Membranlipide (im Wesentlichen Phospholipide) enthalten eine polare, hydrophile Kopfgruppe und zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffgruppen.^[26,27] Weiterhin finden sich in der Zellmembran Rezeptorproteine, Erkennungssequenzen und Ionenkanäle. Der Transport kleiner Moleküle durch die Zellmembran kann über eine Diffusion durch geeignete Kanäle (passiver Transport) oder mithilfe von Transportproteinen erfolgen (aktiver Transport).^[28-30] Für den zweiten Prozess muss Energie aufgewendet werden, normalerweise in der Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die Aufnahme von Makromolekülen oder Nanopartikeln erfolgt bei den meisten Zellen durch Endozytose, d. h. die Penetration der Zellmembran und die Aufnahme in ein intrazelluläres Vesikel.^[31,32] Vonarbourg et al. lieferten eine Übersicht über die Faktoren, die die Aufnahme unterschiedlicher Nanopartikel durch das mononukleäre Phago-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1403
2. Transfektion	1403
3. Methoden zum Gentransfer in lebende Zellen	1404
4. Chemische Methoden auf der Basis von Nanopartikeln	1406
5. Zusammenfassung	1413

zytensystem (Monozyten und Phagozyten) bestimmen. Über diesen Mechanismus werden Nanopartikel typischerweise aus dem Blut entfernt.^[33]

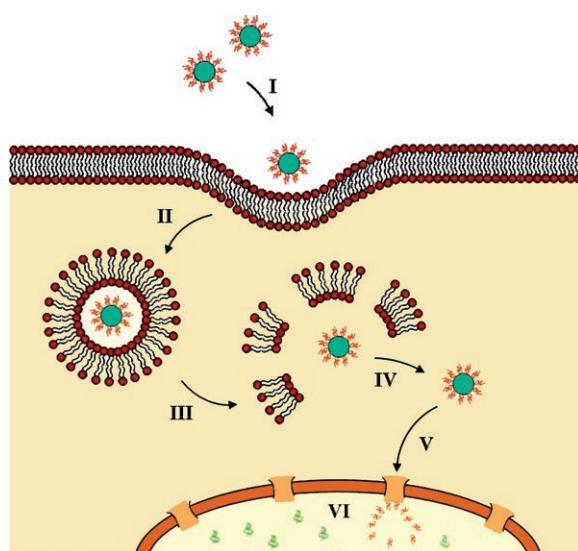


Abbildung 1. Weg von Nanopartikeln in eine Zelle und in den Zellkern. Grüne Kreise: anorganisches Nanopartikel, rot: Fremd-DNA, braun: Lipid, orange: Kernmembran, grün: Zell-DNA. I: Adsorption an der Zellmembran. II: Aufnahme durch Endozytose. III/IV: Freisetzung aus dem Endosom. V: Weg zum Zellkern. VI: Aufnahme in den Zellkern und Genexpression. Details siehe Text.

Abbildung 1 zeigt den Weg der Aufnahme von DNA. Zunächst werden die Nanopartikel an die Zellmembran adsorbiert und anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.^[34,35] Auf dem Weg zum Zellkern kann die DNA durch unterschiedliche Prozesse abgebaut werden. Ein Abbau von DNA kann in einem Endosom geschehen, sofern die DNA nicht aus dem Endosom ins Cytoplasma freigesetzt wird, bevor eine Fusion mit Lysosomen erfolgt. In Lysosomen herrscht ein pH-Wert von unter 5.^[36] Im Cytoplasma kann die DNA durch spezialisierte Enzyme (Nucleasen) abgebaut werden. Für eine effiziente Transfektion ist es daher wichtig, dass die DNA diese Hindernisse überwindet und vor intrazellulärem Abbau geschützt wird. Im nächsten Schritt muss

die DNA in den Zellkern eindringen. Dies geschieht allgemein mithilfe von Kernporenkomplexen (nuclear pore complexes, NPCs), d.h. durch große Proteine (Nucleoporine), die sich in der aus zwei Lipiddoppelschichten bestehenden Kernmembran befinden.^[37,38] NPCs sind durchlässig für kleine Moleküle, verhindern aber den Zugang großer Moleküle. Makromoleküle, die eine Kernlokalisierungssequenz (nuclear localization sequence, NLS) tragen, können durch Importine erkannt und aktiv durch die Poren in den Zellkern transportiert werden.^[39,40]

Trotz umfangreicher Studien zur Aufnahme von Molekülen in den Zellkern^[41–43] ist immer noch nicht geklärt, auf welchem Weg DNA in den Zellkern gelangt, d.h. allein oder zusammen mit einem Nanopartikel. Eine Möglichkeit ist die langsame Auflösung der Nanopartikel in den endosomalen Vesikeln und/oder im Cytoplasma, die zur Freisetzung der DNA führt. Eine andere Möglichkeit ist, dass die mit DNA beladenen Nanopartikel bis zur Kernmembran gelangen, von wo aus die DNA dann in den Zellkern eindringt. Im zweiten Fall ist ein Schutz der DNA durch das Nanopartikel vor einem Abbau im Cytoplasma günstig für eine hohe Transfektionseffizienz.

3. Methoden zum Gentransfer in lebende Zellen

Als Gentherapie bezeichnet man die Behandlung genetisch bedingter Krankheiten durch eine genetische Manipulation des Organismus. Dafür bedarf es einer effizienten Methode zum Einschleusen eines therapeutischen Gens in Zellen.^[44] Allgemein unterscheidet man virale und nichtvirale Gentransfersysteme. In Tabelle 1 sind die gängigen Transfektionsmethoden zusammengestellt und hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile verglichen. Virale Träger (die nach dem gleichen Prinzip wie natürliche, infektionsübertragende Viren funktionieren) sind sehr effizient, aber wegen des Risikos der Rekombination, das zur Bildung replikationsfähiger Viren führen kann, auch relativ gefährlich. Die Elektroporation ist eine sichere, einfache und effiziente Methode, die jedoch eine große Menge an DNA benötigt und auch für jeden Zelltyp optimiert werden muss. Die Mikroinjektion ermöglicht nur eine sequenzielle Transfektion einer Zelle nach der anderen, d.h., sie ist für ein Organ nicht geeignet. Mit der Gene-Gun-Technik ist eine Penetration von DNA in den oberen



Viktoriya Sokolova schloss 2003 das Studium der Biologie an der V. N. Karazhin Khariv National University (Ukraine) ab und promovierte 2006 bis bei Prof. Epple an der Universität Duisburg-Essen. 2007 erhielt sie den Nachwuchswissenschaftlerpreis der Familie Klee („Klee-Preis“) der DGBMT, den Doktorandenpreis der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien und war im Finale des DSM Science & Technology Award 2007. In ihrer Dissertation beschäftigte sie sich mit der Synthese, der Charakterisierung und der Anwendung von Calciumphosphat-Nanopartikeln für die Transfektion von Zellen.



Matthias Epple studierte Chemie an der TU Braunschweig und promovierte 1992 bei Prof. Cammenga. Für ein Postdoktorat ging er an die University of Washington (Seattle) und habilitierte 1997 an der Universität Hamburg bei Prof. Reller. 2000 nahm er einen Ruf als Professor an die Ruhr-Universität Bochum an. Seit 2003 ist er Professor für Anorganische Chemie an der Universität Duisburg-Essen. Er befasst sich mit der Entwicklung von Biomaterialien, biomimetischer Kristallisation, der Anwendung synchrotronstrahlungsbasierter Methoden, der Synthese von Nanopartikeln und der Reaktivität von Festkörpern.

Tabelle 1: Vergleich unterschiedlicher Gentransfersysteme.

Transfektionsmethode	Vorteile	Nachteile
virale Methoden ^[44, 45, 202]	sehr effizient ^[46–50]	Immunogenität ^[48, 51, 52] Kanzerogenität ^[48, 51, 52] Entzündung ^[53]
physikalische Methoden	Elektroporation ^[59–63, 203–205]	einfach durchzuführen, effizient
	Mikroinjektion ^[17–24, 64]	exaktes Einbringen von DNA in eine Zelle
	„gene gun“ ^[65–69]	nützlich für die genetische Impfung
chemische Methoden	kationische Verbindungen ^[76]	einfache Herstellung
	rekombinante Proteine ^[56–58]	hohe Biokompatibilität
	Nanopartikel aus Polymeren, z. B. aus Polylactid ^[206, 207]	einfache Herstellung; Größe kontrollierbar; gute Funktionalisierbarkeit
	anorganische Nanopartikel ^[98, 99]	einfache Herstellung; Größe kontrollierbar; gute Funktionalisierbarkeit

Schichten eines Gewebes möglich. Kationische Verbindungen und rekombinante Proteine wurden in klinischen Tests eingesetzt; kationische Verbindungen sind aber normalerweise giftig, und rekombinante Proteine sind aufwändig in der Herstellung.

3.1. Virale Gentransfersysteme

Virale Gentransfersysteme beruhen auf der Fähigkeit von Viren, Zellen zu infizieren. Im viralen Träger wird ein Segment des ursprünglichen Gens durch ein Reportergen ersetzt. Dies ist die älteste Methode für den Gentransfer; sie wurde erstmals 1952 an *Salmonella* demonstriert.^[45] Später wurden zum Gentransfer in Zellen auch andere virale Vektoren, unter anderem basierend auf Retroviren,^[46, 47] Adenoviren,^[48] Adeno-assoziierten Viren^[49] und Herpes-simplex-Viren^[50] eingesetzt. Darüber hinaus ist dies die effizienteste Methode zum Einbringen von DNA in Zellen, birgt allerdings erhebliche Risiken wie eine mögliche Rekombination, starke Immunogenität, entzündliche Wirkung und Kanzerogenität.^[48, 51–53]

Derzeit gibt es keine virale Methode, die einen sicheren und effizienten Gentransfer in der Klinik ermöglichen würde.^[54] Aus diesem Grund bieten nichtvirale Systeme Vorteile, auch wenn ihre Transfektionseffizienz geringer ist. Helm et al. fassten die klinische Anwendbarkeit zur Fusion von Wirbeltörpfern durch die Induktion der Produktion knochenwachstumsfördernder Proteine (bone morphogenic proteins, BMPs) zusammen.^[55]

3.2. Rekombinante Proteine

Rekombinante Proteine, so genannte TAT-Proteine (TAT = trans-activating transcriptional activator), sind ein besonderer Typ von DNA-Vektoren, der eine Kernlokalisierungssequenz enthält. Wie Viren können sie die Zellmembran und auch die Kernmembran durchdringen, um ihr genetisches Material in den Zellkern einzuschleusen. Solche

Proteine können Polylysin-Segmente,^[56] Protamin^[57, 58] oder Histone zur Bindung von DNA in Form eines stabilen Komplexes enthalten und damit DNA teilweise vor dem intrazellulären Abbau durch Nukleasen schützen.^[58]

3.3. Elektroporation

Die Elektroporation ist eine häufig eingesetzte Methode, um Plasmid-DNA in lebende Zellen einzubringen; sie wurde 1982 eingeführt.^[59] Durch elektrische Pulse werden kurzfristig Poren in der Zellmembran geöffnet, durch die DNA ins Cytoplasma eindringen kann. Danach schließen sich die Poren wieder. Mit dieser Technik wurde Plasmid-DNA beispielsweise in Muskel-,^[60] Melanom-,^[61] und Leberzellen eingebracht.^[62] Die Effizienz hängt dabei stark von der verwendeten Zelllinie ab.^[60, 63]

3.4. Mikroinjektion

Konzeptionell ist die Mikroinjektion von DNA in eine Zelle die einfachste Methode der Applikation. Nachteilig ist hier der sequenzielle Charakter, d. h. die Tatsache, dass immer nur eine Zelle behandelt werden kann. Somit eignet sich die Mikroinjektion weder für große Zellzahlen noch für die In-vivo-Gentherapie.^[17–24, 64]

3.5. Gene gun

Die „Gene-Gun“-Technik, die auch als „biolistic particle delivery“ bezeichnet wird, ist die jüngste physikalische Transfektionsmethode.^[65] Sie beruht auf Gold-Nanopartikeln, die mit DNA beladen und dann in das Zielgewebe oder in die Zielzellen geschossen werden.^[66] Dadurch gelangt die DNA durch die Zellmembran in das Cytoplasma und gegebenenfalls sogar bis in den Zellkern, weitgehend unter Umgehung der Endosome und unter Vermeidung der enzymatischen Degradation. Nachteilig ist die Tatsache, dass die Eindring-

tiefe der Partikel in Gewebe begrenzt ist. Für den Skelettmuskel der Maus wurden Eindringtiefen bis 0.5 mm gemessen.^[67] Haut, Leber und Muskeln wurden mit der Gene-Gun-Technik transfiziert, wobei die Effizienz vom jeweiligen Gewebe abhing. Für epidermale Hautzellen wurden 10–20 % gefunden, für Muskelzellen dagegen nur 1–5 %.^[66–68] In vivo angewendet ergeben sich typischerweise eher kurzzeitige und begrenzte Genexpressionsraten. Dennoch sind Anwendungen in Form einer genetischen Impfung denkbar.^[69]

4. Chemische Methoden auf der Basis von Nanopartikeln

Die chemischen Transfektionsmethoden beruhen auf Nanopartikeln, Liposomen und Micellen, die entweder einen Komplex oder eine Verbindung mit DNA eingehen oder DNA einschließen können. Drei Klassen können unterschieden werden: kationische Verbindungen, rekombinante Proteine und anorganische Nanopartikel. Die unterschiedlichen Typen von Nanopartikeln sind in Abbildung 2 dargestellt.

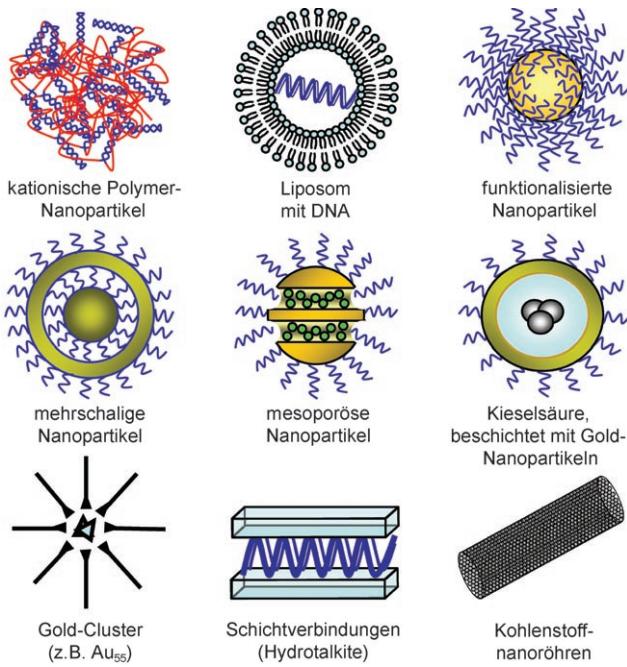


Abbildung 2. Unterschiedliche Typen von Nanopartikeln, die für den Transport von Nucleinsäuren in Zellen eingesetzt werden können.

4.1. Kationische organische Moleküle und Polymere

Bei diesem Ansatz wird die elektrostatische Anziehung zwischen den negativ geladenen Nucleinsäuren und kationischen Verbindungen genutzt. Dabei handelt es sich um kationische Polyelektrolyte (z. B. Polylysin^[70,71] oder Polyethylenimin^[72–75]) sowie um Liposomen und Micellen aus kationischen Tensiden (im Allgemeinen Lipide).^[76] Solche Nanopartikel-Aggregate werden von Zellen aufgenommen.^[77] 1987 verwendeten Felgner et al. als Erste das kationische Lipid

Dioleoyltrimethylammoniumchlorid (DOTMA) in einem 1:1-molaren Gemisch mit dem neutralen Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) zur Kondensation von DNA für die Transfektion.^[78] Seitdem wurde eine Vielzahl kationischer Lipide für die Gentransfektion entwickelt, wobei auch Liposomen eine große Rolle spielen.^[79,80]

Eines der ersten Polymere für die nichtvirale Transfektion war Poly(L-lysin) (PLL).^[70,71] PLL-Partikel mit einer Größe von etwa 100 nm wurden schnell von Zellen aufgenommen, wobei die Transfektionseffizienz aber niedrig blieb.^[70] Die Genexpression wurde durch Hinzufügen dirigierender Moleküle wie Chloroquin^[81] oder fusogener (membranaktiver) Peptide verbessert. Allerdings ist Poly(L-lysin) giftig und nicht für den klinischen Einsatz zugelassen.^[82] Als weiteres kationisches Polymer wird Polyethylenimin (PEI) für die Transfektion eingesetzt. DNA-beladene PEI-Partikel wurden beispielsweise zur Transfektion in Leber^[73] und Lungengewebe^[74] eingesetzt. Auch hier ist der wesentliche Nachteil die Toxizität dieses Polymers.^[72,75] Zwei häufig verwendete kommerzielle Transfektionsmittel sind Polyfect und Lipofectamin. Polyfect besteht aus Dendrimer-Molekülen, die radial von einem Kern ausgehen. Positiv geladene Aminogruppen an den Enden der verzweigten Ketten gehen eine Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen von Nucleinsäuren ein, sodass eine kompakte Struktur entsteht.^[83] Lipofectamin ist ein Transfektionsmittel auf der Basis kationischer Lipide, das für die Einführung von DNA in eukaryotische Zellen verwendet wird. Es kann mit hoher Effizienz für viele Zelllinien eingesetzt werden, z. B. für NIH 3T3, COS-1 und Fibroblasten.^[84]

Die praktischen Probleme, die sich ergeben, wenn eine synthetische Verbindung aus dem Labor in den klinischen Einsatz überführt werden soll, wurden von McNeil und Perrie im Hinblick auf kationische Liposomen diskutiert.^[8] Die Toxizität von kationischen Polymeren^[72,75] und Liposomen^[82] ist problematisch, und ganz allgemein ist die Transfektionseffizienz nichtviraler Systeme kleiner als die viraler Systeme.^[7] Einige kationische Lipid-DNA-Komplexe wurden aber bereits in klinischen Studien eingesetzt.^[85,86] Auf diese Weise gelang die Einführung von Plasmid-DNA in Lunge,^[87] Gehirn,^[88] Tumoren^[89,90] und Haut.^[91]

4.2. Anorganische Nanopartikel als Träger von Nucleinsäuren

Die Tatsache, dass Zellen leicht Nanopartikel aufnehmen, kann zum Transport von Nucleinsäuren genutzt werden.^[92] Die Chemie anorganischer Nanopartikel ist mittlerweile weit entwickelt;^[93–96] dementsprechend wurden bereits viele unterschiedliche anorganische Nanopartikel als Träger getestet.^[97–99] So wurden bereits Nanopartikel aus Calciumphosphat, Kieselsäure, Gold, Magnetit, Strontiumphosphat, Magnesiumphosphat, Manganphosphat und anionischen Schichtmineralien (Hydrotalkiten) sowie Kohlenstoffnanoröhren (carbon nanotubes) und Quantenpunkten (quantum dots) untersucht.

Anorganische Nanopartikel weisen zwar im Allgemeinen nur mäßige Transfektionseffizienzen auf, haben aber doch einige Vorteile gegenüber organischen Nanopartikeln: Sie

sind unempfindlich gegen mikrobiellen Abbau, leicht herstellbar, oft kaum toxisch und lassen sich gut lagern. Es sei hier auch noch angemerkt, dass DNA vor einem intrazellulären Angriff durch eine geeignete „Verpackung“ geschützt werden muss. DNA, die nur an der Oberfläche eines Nanopartikels adsorbiert ist, wird leicht durch Nucleasen abgebaut. Lit. [64] gibt eine Übersicht über die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transfektion. In Tabelle 2 sind einige Eigenschaften anorganischer Nanopartikel im Hinblick auf ihre biologische Anwendbarkeit zusammengestellt.

4.2.1. Metallische Nanopartikel

Die Chemie metallischer Nanopartikel ist gut erforscht, insbesondere im Fall der Edelmetalle Gold, Silber, Palladium

und Platin.^[94] Gewöhnlich werden sie durch Reduktion der entsprechenden Metallsalze in Gegenwart geeigneter Schutzgruppen hergestellt, die die weitere Aggregation verhindern (z. B. Au_{55} -Cluster^[100]). Gold-Nanopartikel (typische Größen: 10–20 nm) werden leicht von Zellen aufgenommen.^[101–104] Kürzlich zeigten Schmid et al., dass Au_{55} -Cluster effizient mit DNA wechselwirken können^[105] und auch als Cytostatikum eingesetzt werden können.^[105] Dies ist offenbar eine Frage der Partikelgröße (1.4 nm für Au_{55} -Cluster), d. h., diese kleinen Goldcluster werden in DNA-Ketten eingelagert. Die Oberfläche von Gold kann leicht mit Thiolen kovalent funktionalisiert werden (entsprechend den selbstorganisierten Monoschichten, SAMs), und Oligonucleotide können an die Partikeloberfläche gebunden werden.^[106]

Tabelle 2: Wichtige Eigenschaften anorganischer Nanopartikel, die für die Transfektion eingesetzt werden.^[a]

Art des Nanopartikels	chemische Zusammensetzung ^[b]	typische Größe [nm]	Löslichkeit ^[c]	Kommentare
Cadmiumsulfid	CdS	2–5	0.69 ng L^{-1}	toxisch, fluoreszierend, halbleitend
Calciumphosphat	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (Hydroxylapatit)	10–100	6.1 mg L^{-1} ^[d]	biodegradierbar, biokompatibel; kann durch den Einbau von Lanthanoiden fluoreszierend gemacht werden; Kationen und Anionen können ausgetauscht werden; löslich in saurer Umgebung
Kohlenstoffnanoröhren	C_n	Durchmesser einige nm, Länge einige μm	0	nicht biodegradierbar, hohl; können kovalent funktionalisiert werden, um die Löslichkeit zu erhöhen; können mit Molekülen beladen werden
Cobalt-Platin	CoPt_3	3–10	ca. 0	ferromagnetisch oder superparamagnetisch; toxisch in ungeschützter Form
Gold	Au	1–50	ca. 0	gute Funktionalisierbarkeit, z. B. mit Thiolen
Eisenoxid (Magnetit)	Fe_3O_4	5–20	ca. 0	ferromagnetisch oder superparamagnetisch; schädlich für Zellen in ungeschützter Form; Löslichkeit nimmt mit fallendem pH-Wert zu
Hydrotalkite	$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{CO}_3)_1(\text{OH})_{16} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ (Hydrotalkit)	5200	begrenzt, erhöht sich unterhalb pH 5–6	sehr selektive Anionenaustauschkapazität; biodegradierbar in leicht saurer Umgebung; Kationen können ausgetauscht werden
Nickel	Ni	5–100	ca. 0	immunogen, toxisch
Kieselsäure	$\text{SiO}_2 \cdot n \text{ H}_2\text{O}$	3–100	ca. $120 \text{ mg SiO}_2 \text{ L}^{-1}$ (für Kieselsäure-Partikel)	biodegradierbar; herstellbar auch in mikro- oder mesoporöser Form (z. B. Zeolithe); leicht funktionalisierbar, z. B. durch Chlorsilane
Silber	Ag	5–100	ca. 0	bakterizide Wirkung; gelöste Silberionen (Ag^+) potenziell schädlich für Zellen
Zinkoxid	ZnO	3–60	$1.6\text{--}5 \text{ mg L}^{-1}$	fluoreszierend, halbleitend
Zinksulfid	ZnS	3–50	67 ng L^{-1}	fluoreszierend, halbleitend

[a] Allgemein muss unterschieden werden zwischen der hier angegebenen Löslichkeit in ionischer Form und der Löslichkeit in Form einer Nanopartikel-Dispersion (d. h. als intakte Nanopartikel). [b] Zum Teil idealisiert. [c] Die Löslichkeit wurde für reine Festkörper unter Standardbedingungen in reinem Wasser (pH 7) bei 25 °C berechnet. Dabei wurden die Löslichkeitsprodukte von CdS ($1.40 \times 10^{-29} \text{ M}^2$), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ($10^{-116.8} \text{ M}^{18}$) und ZnS ($2.91 \cdot 10^{-25} \text{ M}^2$) verwendet. Die weiteren angegebenen Löslichkeiten wurden aus der Literatur entnommen. Die Löslichkeiten der anderen Verbindungen können nicht berechnet werden, da sie von den chemischen Spezies auf der Oberfläche des Partikels abhängen. In jedem Fall haben nanoskopische Systeme eine höhere Löslichkeit als die makroskopischen (Standard-)Phasen. Eine geeignete Oberflächenfunktionalisierung kann die Löslichkeit stark verändern. Für Metalle und Legierungen hängt die Löslichkeit auch von der Zusammensetzung der umgebenden Lösung ab (z. B. von ihrem Oxidationspotential). [d] Berechnet für stöchiometrischen Hydroxylapatit.

Oishi et al. berichteten über Konstrukte aus Polymer-Nanopartikeln und Gold-Nanopartikeln, an die Thiol-funktionalisierte Oligonukleotide angebracht wurden.^[107] Oligonukleotid-funktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden von Mirkin et al. für Experimente zur Gen-Stummschaltung eingesetzt.^[108] Salem et al. berichteten über bimetallische Nannostäbchen aus Gold und Nickel als nichtvirales Transfektionssystem.^[109] Die Gold- und Nickelsegmente dieser Nannostäbchen können selektiv Plasmid-DNA und dirigierende Liganden binden. Der Weg von Gold-Peptid-Nanopartikeln in Zellen wurde von Tkachenko et al. untersucht.^[110]

Silber wird seit vielen Jahren als Bakterizid eingesetzt,^[111] z. B. um die Bildung von Biofilmen zu verhindern. Dies wurde in den letzten Jahren auf Silber-Nanopartikel erweitert.^[112] Diese können in unterschiedlichen Größen und Formen hergestellt werden,^[113] was wichtig ist, da die biozide Wirkung Größenabhängig zu sein scheint.^[114] Allerdings sind im Fall von Silber noch viele Fragen offen, z. B. nach der Dosisabhängigkeit und dem Risiko einer Bildung bakterieller Resistzenzen.^[115]

4.2.2. Eisenoxide

Die magnetischen Eigenschaften von Eisenoxid-Nanopartikeln (wie Magnetit, Fe_3O_4) können beispielsweise zur Sortierung von Zellen, zur Dirigierung im Körper durch externe Magnetfelder und für die Tumorthermotherapie eingesetzt werden.^[116–119] Wenn sie einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld ausgesetzt werden, können sie das umgebende Gewebe durch Hyperthermie zerstören.^[117,120] Die Führung durch externe Magnetfelder im Körper kann beispielsweise zur Adressierung von Tumoren dienen.^[121–124]

Gould et al. berichteten über Eisenoxidpartikel mit Durchmessern von <10 bis 300 nm, die als Träger für DNA eingesetzt wurden.^[125] Cheng et al. stellten magnetische Nanopartikel mit einem Durchmesser von 9 nm aus Fe^{2+} , Fe^{3+} und Tetramethylammoniumhydroxid her. Diese Nanopartikel zeigten beim Test an COS-7-Affennierenzellen keinen cytotoxischen Effekt bei unterschiedlichen Dosen von Magnetit.^[126] Hier sei angemerkt, dass magnetische Eisenoxide oft mit einer geeigneten Beschichtung versehen werden, um ihre Biokompatibilität und ihre Funktionalisierbarkeit zu verbessern. Kieselsäure-beschichtete Magnetit-Nanopartikel wurden von Bruce et al. hergestellt und mit Aminogruppen funktionalisiert, an die wiederum kovalent Oligonukleotide gebunden wurden (Abbildung 3).^[127,128]

Eine neue Methode wurde von Farle et al. entwickelt, nach der Magnetit erst in Kieselsäure eingebracht wurde und anschließend mit einer Hülle aus Gold versehen wurde. Diese magnetischen Nanopartikel können zusätzlich oberflächenfunktionalisiert werden und danach im Körper dirigiert werden, z. B. in Tumorzellen.^[129] Landfester und Ramirez berichteten über die Einkapselung von Magnetit-Nanopartikeln in Polymere durch Mikroemulsionen.^[130] Plank et al. entwickelten das Konzept der Magnetofektion: Die Aufnahme von DNA mit Transfektionsmitteln wird durch die Zugabe superparamagnetischer Partikel (Magnetit oder Neodym-Eisen-Bor) und das Anlegen eines externen Magnetfeldes stark erhöht (Abbildung 4).^[131–133]

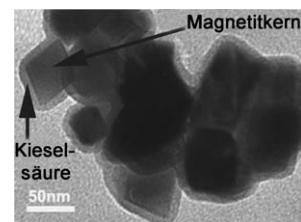


Abbildung 3. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM-)Aufnahme von Kieselsäure-umhüllten Magnetit-Nanopartikeln für die Transfektion. Die Kieselsäure-Schicht kann über die an der Oberfläche vorhandenen Silanol-Gruppen mit organischen Molekülen funktionalisiert werden. Nachdruck mit Genehmigung von Elsevier, Lit. [128], Copyright 2005.

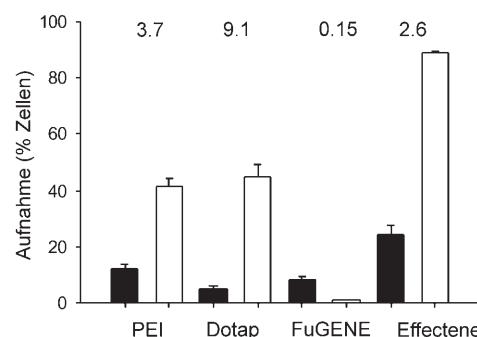


Abbildung 4. Effizienz der Antisense-Oligodesoxyribonucleotid(ODN)-Aufnahme durch Magnetofektion (Zugabe superparamagnetischer Partikel und Anwendung eines externen Magnetfeldes) mit unterschiedlichen Transfektionsmitteln. Vergleich der Aufnahme von (mit Cy3) fluoreszenzmarkierten Antisense-ODN vier Stunden nach einer 15-minütigen Standardtransfektion (schwarze Balken) und einer Magnetofektion (weiße Balken) mit unterschiedlichen Transfektionsmitteln (PEI/Dotap-Cholesterin, FuGENE, Effectene), gefolgt von intensivem Spülen und Zugabe von neuem Medium. Die Zahlen über den Balken geben die n -fache Zunahme der Transfektionseffizienz durch die Magnetofektion an. Nachdruck mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd., Lit. [133], Copyright 2003.

Die Erhöhung der Transfektionseffizienz viraler Vektoren durch superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, „SPION“) wurde von Morishita et al. demonstriert.^[134] Die Wechselwirkung oberflächenmodifizierter superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel mit Zellen wurde von Gupta et al. untersucht.^[135–137] Die nichtfunktionalisierten Eisenoxid-Nanopartikel waren cytotoxisch (Störung der Organisation des Cytoskeletts), allerdings zeigten die gleichen Nanopartikel nach einer Oberflächenfunktionalisierung mit Pullulan (einem Polysaccharid aus Hefe) keine solchen adversen Effekte mehr – dies unterstreicht die Bedeutung der Partikeloberfläche für die biologische Wirkung. Zhang et al. wiesen nach, dass Polyethylenglycol-funktionalisierte Magnetit-Nanopartikel durch Makrophagen (RAW 264.7) in erheblich geringerem Umfang aufgenommen wurden als nichtfunktionalisierte Magnetit-Nanopartikel. Für Brustkrebszellen (BT20) wurde der umgekehrte Effekt beobachtet. Offenbar verfügen unterschiedliche Zelllinien über eine unterschiedliche Selektivität für die Hydrophilie der Partikeloberfläche, wenn es um die Aufnahme von Nanopartikeln geht.^[138] Berry et al. un-

tersuchten die Wirkung reiner und mit Dextran oder Albumin funktionalisierter Eisenoxid-Nanopartikel (Durchmesser 8–10 nm) auf Fibroblasten. Sie fanden, dass alle drei Arten von Nanopartikeln von den Zellen leicht aufgenommen wurden und dass die nichtfunktionalisierten sowie die Dextrans-funktionalisierten Nanopartikel zelltoxisch waren. Im Unterschied dazu behinderten die Albumin-beschichteten Nanopartikel die Zellvermehrung nicht. Auch hier ist die Oberfläche der Nanopartikel offenbar wichtiger als die chemische Zusammensetzung ihres Kerns.^[139]

4.2.3. Kohlenstoffnanoröhren

Seit der Entdeckung der Kohlenstoffnanoröhren (carbon nanotubes, CNT) durch Iijima 1991^[140] steht diese Stoffklasse wegen ihrer besonderen strukturellen, mechanischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften im Zentrum vieler Untersuchungen. Zwei Arten sind bekannt: Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) und mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs),^[141] deren Durchmesser einige Nanometer beträgt und die bis zu 1 mm lang sein können.^[142,143] Ihre hervorstechende Eigenschaft ist das hohe Verhältnis von Länge zu Durchmesser. Heutzutage können Kohlenstoffnanoröhren im Gramm-Maßstab hergestellt werden und finden Anwendung als effiziente Biosensoren,^[144] als Substrate für das gerichtete Zellwachstum,^[145] als Träger für die Adhäsion von Liposacchariden, um die Zellmembran zu simulieren,^[146] für die Transfektion^[147] und zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung.^[148] Da Kohlenstoffnanoröhren praktisch unlöslich in biologischen (wässrigen) Medien sind, müssen sie durch eine Oberflächenfunktionalisierung, z. B. mit Polymeren, löslich gemacht werden. Ihre chemische Inertheit zusammen mit der Option zur Funktionalisierung und zur Beladung des inneren Hohlraumes mit Biomolekülen^[149] macht sie vielversprechend als Wirkstoffträger.^[141,148,150] Da Kohlenstoffnanoröhren allerdings nicht biologisch abbaubar sind, ist ihr Schicksal in der Zelle unklar, und es muss einen geeigneten Mechanismus zu ihrer Ausschleusung aus der Zelle geben. Kohlenstoffnanoröhren wirken *in vitro* cytotoxisch gegen unterschiedliche Zelllinien.^[148] Interessanterweise hängt ihre Cytotoxizität gegen Makrophagen stark von ihrer Struktur ab: Jia et al. beobachteten eine Abnahme der Cytotoxizität in der Reihe SWNT>MWNT (mit Durchmessern von 10–20 nm)> Quarz>C₆₀.^[151] Daher wurde intensiv daran geforscht, die Löslichkeit von Kohlenstoffnanoröhren zu erhöhen und ihre Toxizität zu reduzieren.

Harrison und Atala fassten die Anwendung von Kohlenstoffnanoröhren für das Gewebe-Engineering zusammen und schlossen mit den nachstehenden Sätzen, die den gegenwärtigen Stand und die möglichen Probleme auf den Punkt bringen:^[150] „*While new uses of carbon nanotubes for biomedical applications are being developed, concerns about cytotoxicity may be mitigated by chemical functionalization. However, there will be some limitations to this nanomaterial since it is not biodegradable. Yet, it has been shown to be excreted in vivo and so could be cleared from the body once it is no longer needed.*“

Kürzlich zeigten Liu et al., dass kovalent mit siRNA funktionalisierte Kohlenstoffnanoröhren für eine effiziente Aufnahme dieser Nucleinsäuren in humane T-Zellen und primäre Zellen eingesetzt werden können (Abbildung 5).^[147]

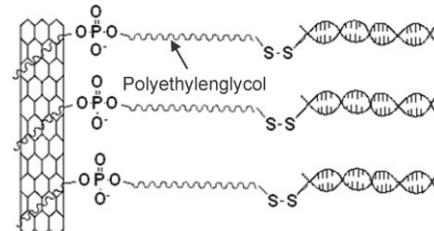


Abbildung 5. Kohlenstoffnanoröhren für den Transport von siRNA in humane T-Zellen, funktionalisiert mit PL-PEG2000-NH₂ (PL = Phospholipid; nichtkovalente Bindung; PEG2000 = Polyethylenglycol (M = 2000)), gefolgt von einer kovalenten Anbindung von Thiol-siRNA über Disulfidbrücken. Nachdruck mit Genehmigung aus Lit. [147].

4.2.4. Hydrotalkite/anionische Schichtmineralien

Hydrotalkite, die auch als anorganische Tonminerale bezeichnet werden (layered double hydroxides, LDHs; inorganic clays; hydrotalcites), sind eine Klasse schichtartig aufgebauter Mineralien, die positiv geladene Schichten aufweisen. Sie haben die allgemeine Formel M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)₂(A⁻)_x·nH₂O mit der namengebenden Stammverbindung Hydrotalkit, Mg₆Al₂(OH)₁₆CO₃·4H₂O.^[152] Zwischen den Schichten sind Anionen und Wassermoleküle eingelagert, die gegen andere Moleküle ausgetauscht werden können.^[153–155] Ihre Fähigkeit zur Einlagerung von Anionen hat Hydrotalkiten besondere Aufmerksamkeit im Bereich der biokompatiblen Nanomaterialien eingebracht. Hinzu kommen ihre hohe Biokompatibilität, ihre hohe chemische Stabilität und die Möglichkeit, eine zeitlich kontrollierte Freisetzung zu erzielen. Aus diesem Grund wurden Hydrotalkite als feste Wirtverbindungen für eine Reihe negativ geladener Biomoleküle untersucht: DNA, Vitamine, Wirkstoffe und Zucker sind einige Beispiele.^[153] Die Freisetzungsgeschwindigkeit organischer Moleküle aus Hydrotalkiten kann über den pH-Wert und die Ionenstärke des umgebenden Mediums kontrolliert werden.^[92,156] Choy et al. berichteten über solche anionisch-biomolekularen Hybridmaterialien mit eingelagelter DNA.^[157] Wegen ihrer negativen Ladung kann DNA fest in eine solche anorganische Wirtverbindung eingelagert werden. Stellt man diese Hybridmaterialien in Form von Nanopartikeln her, können sie auch für eine hocheffiziente Transfektion verwendet werden.^[157–159] Die Löslichkeit von Hydrotalkiten hängt stark von der Zusammensetzung des umgebenden Mediums ab und nimmt mit abnehmendem pH-Wert deutlich zu (siehe Lit. [160,161] für Daten zur Löslichkeit). Es ist daher wahrscheinlich, dass Hydrotalkit-Nanopartikel in der Zelle aufgelöst werden (z. B. in Lysosomen, in denen ein saures Milieu herrscht) und anschließend in ionischer (gelöster) Form wieder ausgeschieden werden.

4.2.5. Kieselsäure

Die Herstellung von (Poly-)Kieselsäure-Nanopartikeln ($\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$) durch Sol-Gel-Verfahren ist mittlerweile ein gängiges Verfahren.^[162] Silanolgruppen an der Oberfläche ermöglichen eine gute Funktionalisierung, z.B. über eine Reaktion mit funktionalisierten Chlorsilanen. Diese gute Funktionalisierbarkeit, zusammen mit der hohen Biokompatibilität der Polykieselsäure, lieferte den Anreiz für zahlreiche Arbeiten zum Einsatz von Kieselsäure-Nanopartikeln als Trägern für Wirkstoffe und für die Transfektion. So berichteten Chen et al. über den erfolgreichen Transport von DNA in Zellen. Mit Natriumchlorid modifizierte Kieselsäure-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10–100 nm zeigten eine hohe Transfektionseffizienz von 70 %, ohne dabei cytotoxisch zu wirken. Die Verabreichung solcher Nanopartikel an Mäuse hatte keine pathologischen Auswirkungen.^[163] Radu et al. berichteten über ein Gentransfersystem, bei dem Polyamidoamin-Dendrimere kovalent an die Oberfläche mesoporöser Kieselsäure-Partikel gebunden werden. Diese Nanopartikel mit einem Durchmesser von 250 nm bilden einen Komplex mit Plasmid-DNA. Die Einführung dieser Nanopartikel in neuronale Gliazellen, humane zervikale Krebszellen und Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (Chinese hamster ovarian cells, CHO) ergibt eine höhere Transfektionseffizienz als bei Verwendung kommerzieller Transfektionsmittel.^[164] Dieses Konzept ist besonders interessant, da die mesoporösen Nanopartikel sowohl als Träger für Nucleinsäuren (an der Oberfläche) wie auch als Träger für Farbstoffmoleküle (in den Mesoporen) fungieren können. Die Farbstoffe können dabei eingesetzt werden, um – z.B. fluoreszenzmikroskopisch – den Weg der Nanopartikel in der Zelle zu verfolgen. Die Autoren fanden die Nanopartikel im Cytoplasma, nicht aber im Zellkern, was die Barrierefunktion der Kernmembran unterstreicht (Abbildung 6).

Luo et al.^[165] berichteten, dass nichtfunktionalisierte Kieselsäure-Nanopartikel als Mediatoren für die Aufnahme von DNA in Zellen wirken können, indem sie an die Zelloberfläche adsorbiert werden.^[166] Ausgehend von dieser Beobachtung wurde ein modulares System entwickelt, in dem Kieselsäure-Nanopartikel (Durchmesser ca. 225 nm) in Gegenwart eines Transfektionsmittels die Konzentration von

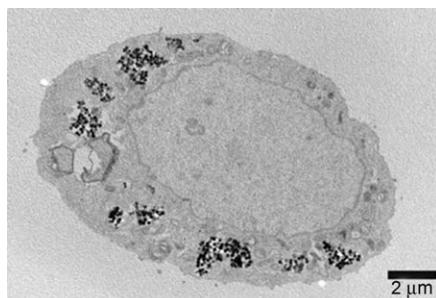


Abbildung 6. Farbstoffbeladene mesoporöse Silicatpartikel (schwarz), die mit DNA funktionalisiert wurden und von Ovarienzellen des chinesischen Hamsters aufgenommen wurden (TEM-Bild). Nachdruck mit Genehmigung der American Chemical Society, Lit. [164], Copyright 2004.

DNA an der Zelloberfläche erhöhen. Als entscheidender Schritt wurde dabei die Sedimentation der Nanopartikel auf den Zellen ausgemacht. Die Transfektionseffizienz stieg um einen Faktor zehn an. Für sich alleine waren die Kieselsäure-Nanopartikel nicht zur Transfektion befähigt.^[167] Die Sedimentation anderer anorganischer Partikel oder Polymerpartikel zusammen mit DNA auf die Zelloberfläche führte ebenfalls zu einer guten Transfektionseffizienz, vergleichbar mit derjenigen kommerzieller Transfektionsmittel. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Sedimentationsgeschwindigkeit gefunden, d.h., sehr kleine oder wenig dichte Nanopartikel zeigten keinen Effekt. Die chemische Zusammensetzung der Nanopartikel war nicht von Bedeutung, d.h., es handelt sich um eine Art „mechanischen“ Effekt, bei dem die Nanopartikel einen Druck auf die Zelloberfläche ausüben, der zur erhöhten Aufnahme von DNA führt.^[168]

4.2.6. Calciumphosphat

Calciumphosphat ist das anorganische Biomineral in vielen Hartgeweben, z.B. in Knochen, Zähnen und Sehnen; dort kommt es als carbonathaltiger Hydroxylapatit vor. Außer im Fall von Zahnschmelz handelt es sich dabei immer um Nanopartikel.^[169–171] Wegen seiner Biokompatibilität gibt es keine Bedenken hinsichtlich einer inhärent vorhandenen Zelltoxizität; allerdings können Calciumphosphate nach der Aufnahme in eine Zelle den (normalerweise sehr geringen) intrazellulären Calciumspiegel erhöhen, was unter Umständen letale Effekte für die Zelle zur Folge hätte. Daher kann man postulieren, dass Calciumphosphat-Nanopartikel, die von einer Zelle aufgenommen wurden, wieder aus der Zelle ausgeschleust werden müssen (in Partikel- oder in ionischer Form), bevor sie sich im Cytoplasma auflösen und dort den Calciumspiegel erhöhen können.

1973 entwickelten Graham und van der Eb eine einfache Calciumphosphat-Transfektionsmethode.^[172] Diese auch heute noch eingesetzte Methode besteht aus den folgenden Schritten: Zunächst wird eine Lösung von Calciumchlorid mit einer Lösung von DNA vermischt. Die folgende Zugabe einer Phosphat-gepufferten Kochsalz- oder Nährösung führt zur Ausfällung kleiner Nano- und Mikropartikel aus Calciumphosphat und DNA. Diese Dispersion wird auf eine Zellsuspension gegeben, und die Zellen nehmen die Nanopartikel mitsamt der DNA auf. Der Grund für die gute Wechselwirkung zwischen Calciumphosphat und DNA ist vermutlich die Affinität der Phosphat-Gruppen der Nucleinsäuren zur Oberfläche des Calciumphosphats (Abbildung 7).

Die Fällungsbedingungen der Calciumphosphat-Methode sind entscheidend für die Transfektionseffizienz. Die wesentlichen Parameter sind der pH-Wert, die Konzentrationen von CaCl_2 und DNA, die Temperatur und die Zeit zwischen Ausfällung und Transfektion.^[172] Die Transfektionseffizienz hängt außerdem stark von der Art der zu transfizierenden Zellen ab.^[172] Häufig ist die Reproduzierbarkeit schlecht. Orrantia und Chang verfolgten den Weg von ^{32}P -markierter DNA in einer Zelle und schlossen daraus, dass die Morphologie der Calciumphosphat-Kolloide (im Wesentlichen die Partikelgröße) und der Schutz vor Nucleinsäure abbauenden

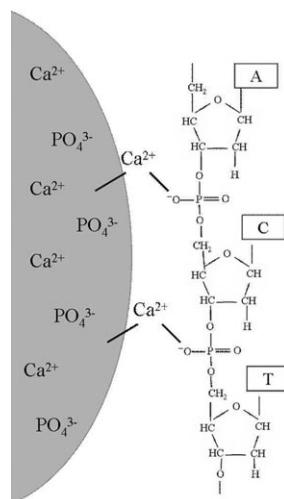


Abbildung 7. Modell für die Wechselwirkung zwischen der Oberfläche eines Calciumphosphat-Nanopartikels und einer Nucleinsäure.

Enzymen eine entscheidende Rolle für die Transfektionseffizienz spielen.^[173] Loyter et al. hoben ebenfalls die Bedeutung der Größe der Nanopartikel hervor, nachdem sie Transfektionsstudien mit ³H-markierter DNA durchgeführt hatten.^[34] Aus chemischer Sicht ist es verständlich, dass dieser Transfektionsprozess von vielen Einflussgrößen abhängt, die alle die Keimbildung und das folgende Kristallwachstum der Calciumphosphat-DNA-Aggregate beeinflussen. Mit der Zeit wachsen unzureichend von DNA umhüllte Nanokristalle durch Ostwald-Reifung zu Mikrokristallen heran, die nicht mehr in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen und eine Transfektion hervorzurufen.

Diesen Überlegungen folgend haben sich mehrere Gruppen damit beschäftigt, gezielt Calciumphosphat-Nanopartikel für die Transfektion herzustellen. Dies wurde auch dadurch angeregt, dass Calciumphosphate allgemein über eine hohe Biokompatibilität und eine gute Biodegradierbarkeit verfügen. Maitra bezeichnete sie sogar als „nichtvirale Vektoren der zweiten Generation für die Gentherapie“ (second-generation non-viral vectors in gene therapy).^[174] Eine Transfektion gelang mit DNA-beladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit Rinderserumalbumin (BSA) funktionalisiert waren (Partikeldurchmesser 23.5–34.5 nm).^[175] Blockcopolymer-Calciumphosphat-Aggregate wurden von Kakizawa et al. hergestellt und für die Zelltransfektion eingesetzt; dabei wurde besonders die hohe Biokompatibilität dieses Systems hervorgehoben.^[176–178] Olton et al. stellten monodisperse Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem ungewöhnlich hohen Ca/P-Verhältnis von 110–300 und einem typischen Durchmesser von 25–50 nm durch Fällung in Gegenwart von DNA her, die eine hohe Transfektionseffizienz ergaben.^[179] Hierzu merken wir an, dass das Ca/P-Verhältnis in kristallinen Calciumphosphaten typischerweise um 1.5 liegt,^[170] d.h., in diesem Fall ist es unklar, aus welcher chemischen Substanz diese Nanopartikel bestehen (der Röntgenbeugung zufolge liegt Hydroxylapatit vor). Andere Erdalkaliphosphat-Nanopartikel haben ähnliche Eigenschaften. Bhakta et al. stellten DNA-funktionalisierte Magnesiumphosphat- und Manganphosphat-Nanopar-

tikel mit Durchmessern von 100–130 nm her.^[180] Brash et al. berichteten über die Herstellung und Charakterisierung von Strontiumphosphat-Nanopartikeln und ihre Anwendung sowohl für die transiente als auch für eine stabile Transfektion.^[181]

Im Hinblick auf die Biokompatibilität von Calciumphosphat-Nanopartikeln berichteten Liu et al. über eine apoptotische Wirkung nichtfunktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm auf eine Hepatom-Zelllinie im Konzentrationsbereich von 50–200 mg L⁻¹.^[182] In diesem Fall bleibt allerdings die Frage nach der tatsächlichen Größe der untersuchten Nanopartikel offen, da in Abwesenheit einer Oberflächenfunktionalisierung mit einem Kristallwachstum zu rechnen ist. Die apoptotische Wirkung auf die Zellen könnte von einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels herrühren. Europium-dotierte Calciumphosphat-Nanopartikel fluoreszieren ausreichend, um eine Verfolgung ihres Weges in Pankreaszellen zu ermöglichen.^[183–185] Mit Terbium (grüne Fluoreszenz) und Europium (rote Fluoreszenz) dotierte Calciumphosphat-Nanopartikel wurden mit DNA kolloidal stabilisiert. Diese Partikel wurden gut von Zellen aufgenommen und waren in ihrem Inneren genügend kristallin, um ein deutliches Fluoreszenzsignal zu ergeben.^[186] Die Anreicherung von DNA-stabilisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln, die mit rot fluoreszierendem Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC)-BSA markiert waren, ermöglichte die Verfolgung der Nanopartikel in die Zelle und in den Zellkern (Abbildung 8).^[187] Eine Methode zur Herstellung funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel besteht aus einer schnellen Fällung, der sich unmittelbar eine Oberflächenfunktionalisierung mit DNA^[188] oder Oligonucleotiden^[189] anschließt.

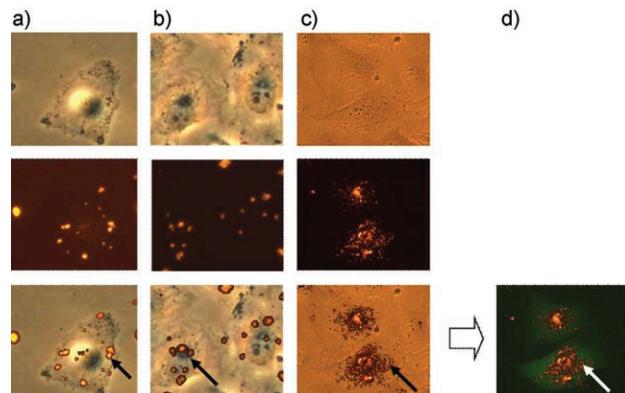


Abbildung 8. Transmissionslichtmikroskopie (obere Reihe), Fluoreszenzmikroskopie (mittlere Reihe) und Überlagerung beider Aufnahmen (untere Reihe) von Transfektionsexperimenten mit menschlichen Nabelschnur-Endothelzellen (T-HUVEC). In der Lichtmikroskopie (oben) sind die Zellen und ihre Zellkerne sichtbar. In der mittleren Reihe erscheinen Calciumphosphat/DNA/TRITC-BSA-Nanopartikel als helle rote Punkte. Pfeile zeigen die Anbindung der Nanopartikel an die Zelloberfläche nach 2 h (a), die Aufnahme ins Cytoplasma nach 8 h (b) und die Akkumulation an der Zellmembran nach 48 h (c). Nach 48 h sind die transfizierten Zellen durch die Expression von enhanced green-fluorescent protein (EGFP) grün gefärbt. Die in die Zelle aufgenommenen rot fluoreszierenden Nanopartikel sind auch deutlich sichtbar (d).

Derartige Partikel haben typische Durchmesser von 80 nm und bilden eine stabile kolloidale Dispersion.

Wie in Abschnitt 2 beschrieben, besteht ein Haupthindernis für eine Transfektion darin, dass die in den Nanopartikeln enthaltene DNA in der Zelle abgebaut wird, bevor sie den Zellkern erreichen kann. Mehrere Arbeiten befassen sich mit dem Weg von Calciumphosphat-DNA-Aggregaten in der Zelle. Strain und Wyllie fanden weniger als 7% der zugegebenen DNA im Cytoplasma und weniger als 4% im Zellkern. Nur 0.5% der DNA war unzersetzt und noch aktiv.^[190] Um dem zu begegnen, haben wir mehrschalige Nanopartikel hergestellt (Abbildung 9), in denen DNA sowohl im Inneren

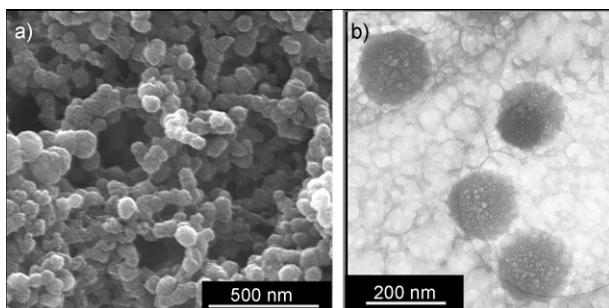


Abbildung 9. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Calciumphosphat/DNA/BSA-Nanopartikeln (links). Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Calciumphosphat/Oligonucleotid-Nanopartikeln (rechts).

geschützt ist als auch außen als Schutzschicht gegen Aggregation und Ausfällung dient.^[191] Auf diese Weise ließ sich die Transfektionseffizienz erheblich verbessern.^[192] Das gleiche Konzept ließ sich auf Gen-Stummschaltungsexperimente mit HeLa-EGFP-Zellen anwenden, bei denen die grüne Fluoreszenz effizient durch mehrschalige siRNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel inhibiert wurde.^[189]

4.2.7. Quantenpunkte

Als Quantenpunkte bezeichnet man kleine Nanopartikel mit typischen Durchmessern von einigen Nanometern (meist weniger als 10 nm), die aus II-VI- oder III-V-Halbleitern bestehen (z.B. CdS, CdSe, ZnS, ZnSe, ZnO, GaAs, InAs; manchmal auch in einer Kern-Schale-Struktur).^[193] Diese sind durch geeignete Moleküle vor der Aggregation geschützt und können auch noch weiter funktionalisiert werden. Interessant sind ihre optischen Eigenschaften: So zeigen sie eine sehr effiziente Fluoreszenz aufgrund von Quantum-Confinement-Effekten und eine hohe Stabilität gegen photochemisches Ausbleichen. Dies hat zu vielfältigen Anwendungen in der biomedizinischen Bildgebung geführt.^[194, 195] Daneben wurden Quantenpunkte aber auch für Transfektionsexperimente eingesetzt. Tan et al. stellten Chitosan-Nanopartikel (Durchmesser ca. 40 nm) mit eingebauten fluoreszierenden CdSe/ZnS-Quantenpunkten her und demonstrierten ihre Anwendbarkeit für die siRNA-Interferenz. Eine hohe Effizienz bei der Gen-Stummschaltung wurde nach einer Funktionalisierung der Partikeloberfläche mit geeigneten Antikörpern (HER2) beobachtet. Diese Antikörper sprechen

spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche an (Abbildung 10).^[196]

Akerman et al. zeigten, wie die Beschichtung von ZnS/CdSe-Quantenpunkten mit spezifischen Peptiden für eine

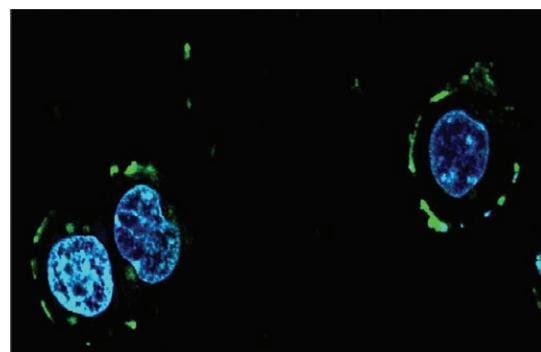


Abbildung 10. Grün fluoreszierende Chitosan/CdSe/ZnS-Nanopartikel, deren Oberfläche mit Antikörpern funktionalisiert wurde, die die Zellmembran erkennen (HER2-Antikörper). Die Kerne der SKBR3-Zellen wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) blau gefärbt. Vergrößerung 40x. Nachdruck mit Genehmigung von Elsevier, Lit. [196], Copyright 2007.

gezielte Ansteuerung von unterschiedlichen Zellen und Organen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, eingesetzt werden kann.^[197] Srinivasan et al. bauten CdSe/ZnS-Quantenpunkte in ein funktionalisiertes Block-Copolymer ein und banden DNA an die Partikeloberfläche. Die Fluoreszenz der Quantenpunkte ermöglichte es, den Weg der DNA in der Zelle während der Transfektion zu verfolgen.^[198] Nikolic et al. zeigten, wie unterschiedliche Nanopartikel (CdSe/CdS, Fe_3O_4 und CoPt_3) mit Amin-funktionalisiertem Polyethylenoxid umhüllt und damit wasserlöslich gemacht werden konnten.^[199]

Die Toxizität vieler II-VI- und III-V-Halbleiter-Quantenpunkte (wie CdSe, CdTe) ist ein ernstes Problem für eine biologische Anwendung. Aryal et al. zeigten, dass es zwei mögliche Ursachen für die Toxizität von Quantenpunkten gibt: Die Gegenwart von Oberflächenkationen (wie Cd^{2+}) und die Bildung photochemisch erzeugter Radikale.^[200] Die in der Zelle vorkommenden Metallothioneine (eine Klasse spezieller Cystein-reicher Proteine) können Cadmium von der Oberfläche eines Nanopartikels durch Komplexierung binden und damit mobilisieren. Dies führt zu einer erhöhten Auflösungsgeschwindigkeit und einer höheren Toxizität. Zur Lösung dieses Problems schlugen die Autoren vor, die Quantenpunktoboberfläche zu verkapseln (z.B. durch Kiesel säure) oder Verbindungen anzukuppeln, die stärkere Komplexe mit Cadmium bilden als Metallothioneine.^[200] Grundsätzlich lässt sich aber konstatieren, dass das langfristige Schicksal von toxischen Quantenpunkten in einer Zelle unklar ist, auch wenn die Oberfläche kinetisch gegen eine Auflösung stabilisiert wird. Allerdings ist ebenfalls zu bedenken, dass die absolute Stoffmenge in solchen Quantenpunkten sehr klein ist, d.h., die effektive Konzentration an toxischen Schwermetallen ist verhältnismäßig gering.

Ein Weg zur Erhöhung der Biokompatibilität und zur weitgehenden Behebung der toxischen Wirkung auf Zellen

wurde von Zhang et al. vorgeschlagen. In einer umfangreichen Analyse wurde die Genexpression von Fibroblasten untersucht, nachdem diese Kieselsäure-umhüllten Quantenpunkten ausgesetzt worden waren. Die Oberfläche von CdSe/ZnS-Quantenpunkten wurde mit Kieselsäure belegt und anschließend mit Polyethylenglycol funktionalisiert. Solcherart umhüllte Nanopartikel waren nicht schädlich für die untersuchten Zellen, was sich auch durch die Genexpression belegen ließ: Die Gene, die bei einer Schwermetallexposition hochreguliert werden, wurden durch diese umhüllten Nanopartikel nicht beeinflusst.^[201]

5. Zusammenfassung

Viele verschiedene Arten von Nanopartikeln können mit Nucleinsäuren (DNA oder RNA) beladen werden. Bei einer Aufnahme von Nanopartikeln durch Endozytose in Zellen spielt die chemische Natur der Nanopartikel (wenn überhaupt) nur eine geringe Rolle. Die Obergrenze für eine effiziente Aufnahme in Zellen liegt bei einem Durchmesser von etwa 100 nm. Viel wichtiger als die chemische Natur des „Kerns“ der Nanopartikel ist ihre Oberflächenbeschaffenheit, die die Aufnahme in Zellen und die kurz- und mittelfristige zelluläre Antwort beeinflusst. Eine Funktionalisierung der Oberfläche eröffnet daher weitreichende Steuerungsmöglichkeiten. Die Beschaffenheit des Kerns ist eher von Bedeutung für die langfristige biologische Abbaubarkeit und Biokompatibilität. Für eine Transfektion ist es wichtig, die Nucleinsäuren vor einem Abbau in der Zelle, z. B. durch Nucleasen, zu schützen, damit sie ihre genetische Information übertragen können. Sowohl magnetische als auch mechanische Faktoren können die Aufnahme von Nanopartikeln günstig beeinflussen. Während es für eine Transfektion mit DNA notwendig ist, dass die DNA in den Zellkern aufgenommen wird, ist dies für Gen-Stummschaltungsexperimente nicht erforderlich. Hier reicht es, dass siRNA in das Cytoplasma gelangt. Daher sind die optimalen Träger für beide Fälle unterschiedlich zu gestalten.

Für eine klinische Anwendung in der Gentherapie ist eine hohe Transfektionsrate sicherlich der entscheidende Faktor. Allerdings dürfen auch die Aspekte der Biokompatibilität, der langfristigen Biodegradation und der lokalen Applikation nicht vernachlässigt werden. Anorganische Nanopartikel eignen sich sehr gut zur Realisierung von Systemen mit definierter Partikelgröße, Oberflächenfunktionalisierung und Biokompatibilität. Auch ein Schutz der Nucleinsäuren durch den Einbau in ein Partikel ist möglich. Da die Nanostruktur anorganischer Nanopartikel durch Veränderung der Oberfläche und auch durch die Beladung nanoporöser Substrukturen einstellbar ist, sollten sich hier in der Zukunft weitere Anwendungen ergeben. Stichworte sind dabei die Abschirmung toxischer Bestandteile (wie Cadmium), der Schutz von Nucleinsäuren gegen einen Abbau in der Zelle und eine Feineinstellung von hydrophilen und hydrophoben Oberflächeneigenschaften. Wir sind der Ansicht, dass ein besseres Verständnis des Schicksals von Nanopartikeln in der Zelle sowie der Wechselwirkung zwischen organischen und anorganischen Komponenten entscheidend dazu beitragen wird,

in der Zukunft mit einem optimierten System in klinische Anwendungen zu gehen.

Wie danken unseren Kooperationspartnern auf diesem Gebiet, insbesondere Prof. R. Heumann (Bochum), für viele fruchtbare Diskussionen. Unsere Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Eingegangen am 8. Juli 2007

Online veröffentlicht am 21. Dezember 2007

- [1] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [2] A. Rolland, *Advanced Gene Delivery: From Concepts to Pharmaceutical Products*, Harwood, Amsterdam, **1999**.
- [3] G. P. H. Dietz, M. Bahr, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27*, 85–131.
- [4] R. Langer, N. A. Peppas, *AIChE J.* **2003**, *49*, 2990–3006.
- [5] W. C. Heiser, *Gene Delivery to Mammalian Cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey, **2004**.
- [6] T. Azzam, A. J. Domb, *Curr. Drug Delivery* **2004**, *1*, 165–193.
- [7] K. Kodama, Y. Katayama, Y. Shoji, H. Nakashima, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2155–2161.
- [8] S. E. McNeil, Y. Perrie, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16*, 1371–1382.
- [9] H. Schreier, *Pharm. Acta Helv.* **1994**, *68*, 145–159.
- [10] C. C. Mello, D. Conte, Jr., *Nature* **2004**, *431*, 338–342.
- [11] B. Mitterauer, *Med. Hypotheses* **2004**, *62*, 907–910.
- [12] G. Meister, T. Tuschl, *Nature* **2004**, *431*, 343–349.
- [13] P. Y. Lu, F. Xie, M. C. Woodle, *Adv. Genet.* **2005**, *54*, 115–142.
- [14] R. K. Leung, P. A. Whittaker, *Pharmacol. Ther.* **2005**, *107*, 222–239.
- [15] I. R. Gilmore, S. P. Fox, A. J. Hollins, S. Akhtar, *Curr. Drug Delivery* **2006**, *3*, 147–155.
- [16] J. A. Wolff, V. Budker, *Adv. Genet.* **2005**, *54*, 3–20.
- [17] J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadil, A. Jani, P. L. Felgner, *Science* **1990**, *247*, 1465–1468.
- [18] M. A. Hickman, R. W. Malone, K. Lehmann-Buinsma, T. R. Sih, D. Knoell, F. C. Szoka, R. Walzem, D. M. Carlson, J. S. Powell, *Hum. Gene Ther.* **1994**, *5*, 1477–1483.
- [19] M. L. Sikes, B. W. O’Malley, M. J. Finegold, F. D. Ledley, *Hum. Gene Ther.* **1994**, *5*, 837–844.
- [20] A. Ardehali, A. Fyfe, H. Laks, D. C. Drinkwater, J. H. Qiao, A. J. Lusis, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1995**, *109*, 716–720.
- [21] B. Schwartz, C. Benoit, B. Abdallah, R. Rangara, A. Hassan, D. Scherman, B. A. Demeneix, *Gene Ther.* **1996**, *3*, 405–411.
- [22] J. J. Yoo, S. Soker, L. F. Lin, K. Mehegan, P. D. Guthrie, A. Atala, *J. Urol.* **1999**, *162*, 1115–1118.
- [23] R. I. Mahato, K. Kawabata, Y. Takakura, M. Hashida, *J. Drug Targeting* **1995**, *3*, 149–157.
- [24] K. Kawabata, Y. Takakura, M. Hashida, *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 825–830.
- [25] F. Sakurai, T. Terada, K. Yasuda, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1120–1126.
- [26] H. Sato, J. B. Feix, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1245–1256.
- [27] E. T. Castellana, P. S. Cremer, *Surf. Sci. Rep.* **2006**, *61*, 429–444.
- [28] H. Hasegawa, W. Skach, O. Baker, M. C. Calayag, V. Lingappa, A. S. Verkman, *Science* **1992**, *258*, 1477–1479.
- [29] M. J. Chrispeels, P. Agre, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 421–425.
- [30] S. Y. Noskov, B. Roux, *Biophys. Chem.* **2006**, *124*, 279–291.
- [31] S. R. Pfeffer, *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, E17–E22.
- [32] O. Harush-Frenkel, N. Debotton, S. Benita, Y. Altschuler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 26–32.

- [33] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J. P. Benoit, *Biomaterials* **2006**, *27*, 4356–4373.
- [34] A. Loyter, G. Scangos, D. Juricek, D. Keene, F. H. Ruddle, *Exp. Cell Res.* **1982**, *139*, 223–234.
- [35] A. Coonrod, F. Q. Li, M. Horwitz, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1313–1321.
- [36] S. L. Schmid, R. Fuchs, P. Male, I. Mellman, *Cell* **1988**, *52*, 73–83.
- [37] M. W. Goldberg, J. M. Cronshaw, E. Kiseleva, T. D. Allen, *Protoplasma* **1999**, *209*, 144–156.
- [38] R. Y. H. Lim, B. Fahrenkrog, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 342–347.
- [39] L. Josephson, C. H. Tung, A. Moore, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 186–191.
- [40] M. Zhao, M. F. Kircher, L. Josephson, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 840–844.
- [41] M. Brisson, W. C. Tseng, C. Almonte, S. Watkins, L. Huang, *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 2601–2613.
- [42] W. C. Tseng, F. R. Haselton, T. D. Giorgio, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression* **1999**, *1445*, 53–64.
- [43] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5177–5181.
- [44] Z. Racz, P. Hamar, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2299–2307.
- [45] N. D. Zinder, J. Lederberg, *J. Bacteriol.* **1952**, *64*, 679–699.
- [46] S. Yang, R. Delgado, S. R. King, C. Woffendin, C. S. Barker, Z. Y. Yang, L. Xu, G. P. Nolan, G. J. Nabel, *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 123–132.
- [47] A. A. Bukovsky, J. P. Song, L. Naldini, *J. Virol.* **1999**, *73*, 7087–7092.
- [48] S. K. Tripathy, H. B. Black, E. Goldwasser, J. M. Leiden, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 545–550.
- [49] P. C. Hendrie, D. W. Russel, *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 9–17.
- [50] J. C. Glorioso, N. A. DeLuca, D. J. Fink, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 675–710.
- [51] J. P. Burand, M. D. Summers, G. E. Smith, *Virology* **1980**, *101*, 286–290.
- [52] R. G. Crystal, *Science* **1995**, *270*, 404–410.
- [53] N. Bessis, F. J. GarciaCozar, M. C. Boissier, *Gene Ther.* **2004**, *11*, S10–17.
- [54] A. G. Schatzlein, *Anti-Cancer Drugs* **2001**, *12*, 275–304.
- [55] G. A. Helm, H. Dayoub, J. A. Jane, *Neurosurg. Focus* **2001**, *10*(4), Article 5.
- [56] G. Y. Wu, C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14621–14624.
- [57] F. L. Sorgi, S. Bhattacharya, L. Huang, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 961–968.
- [58] B. Quintanilla-Vega, D. Hoover, W. Bal, E. K. Silbergeld, M. P. Waalkes, L. D. Anderson, *Am. J. Ind. Med.* **2000**, *38*, 324–329.
- [59] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, *EMBO J.* **1982**, *1*, 841–845.
- [60] H. Aihara, J. Miyazaki, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 867–870.
- [61] M. P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, J. Teissie, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 168–171.
- [62] R. Heller, M. Jaroszeski, A. Atakin, D. Moradpour, R. Gilbert, J. Wands, C. Nicolau, *FEBS Lett.* **1996**, *389*, 225–228.
- [63] L. M. Mir, M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J. M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz, D. Scherman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4262–4267.
- [64] D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 33–37.
- [65] J. P. Behr, *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 827–835.
- [66] N. S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9568–9672.
- [67] A. V. Zelenin, V. A. Kolesnikov, O. A. Tarasenko, R. A. Shafei, I. A. Zelenina, V. V. Mikhailov, M. L. Semenova, D. V. Kovalenko, O. V. Artemyeva, T. E. Ivaschenko, O. V. Evgrafov, G. Dickson, V. S. Baranovand, *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 319–322.
- [68] R. S. Williams, S. A. Johnston, M. Riedy, M. J. Devit, S. G. Mcelligott, J. C. Sanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2726–2730.
- [69] K. Moelling, *Cytokines Cell. Mol. Ther.* **1997**, *3*, 127–135.
- [70] E. Wagner, C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotton, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7934–7938.
- [71] M. A. Wolfert, P. R. Dash, O. Nazarova, D. Oupicky, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 993–1004.
- [72] R. Kircheis, L. Wightman, E. Wagner, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 341–358.
- [73] S. Kazuyoshi, S. W. Kim, *J. Controlled Release* **2002**, *79*, 271–281.
- [74] C. Rudolph, U. Schillinger, C. Plank, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2002**, *1573*, 75–83.
- [75] D. G. Anderson, D. M. Lynn, R. Langer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3261–3266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3153–3158.
- [76] M. C. Garnett, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2004**, *16*, 147–207.
- [77] A. R. Thierry, P. Rabinovich, L. C. Mahan, J. L. Bryant, R. C. Gallo, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 226–237.
- [78] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413–7417.
- [79] N. Ishii, J. Fukushima, T. Kaneko, E. Okada, K. Tani, S. I. Takana, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1997**, *13*, 1421–1428.
- [80] D. D. Lasic, N. S. Templeton, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *20*, 221–266.
- [81] C. W. Pouton, P. Lukas, B. J. Thomas, A. N. Udehi, D. A. Milroy, S. H. Moss, *J. Controlled Release* **1998**, *53*, 289–299.
- [82] H. T. Lv, S. B. Zhang, B. Wang, S. H. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109.
- [83] M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 703–714.
- [84] T. Byk, H. Haddada, W. Vainchenker, F. Louache, *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 2493–2502.
- [85] G. J. Nabel, E. G. Nabel, Z. Y. Yang, B. A. Fox, G. E. Plautz, X. Gao, L. Huang, S. Shu, D. Gordon, A. E. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11307–11311.
- [86] N. J. Caplen, E. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, C. Coutelle, L. Huang, D. J. Porteous, R. Williamson, D. M. Geddes, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 39–46.
- [87] K. L. Brigham, B. Meyrick, B. Christmann, M. Magnuson, G. King, L. C. Berry, *Am. J. Med. Sci.* **1989**, *298*, 278–281.
- [88] T. Ono, Y. Fujino, T. Tsuchiya, M. Tsuda, *Neurosci. Lett.* **1990**, *117*, 259–263.
- [89] G. E. Plautz, Z. Y. Yang, B. Y. Wu, Z. Gao, L. Huang, G. J. Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4645–4649.
- [90] K. Son, L. Huang, *Gene Ther.* **1996**, *10*, 343–345.
- [91] E. Raz, D. A. Carson, S. E. Parker, T. B. Parr, A. M. Abai, G. Aichinger, S. H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, M. A. Yankaukas, S. M. Baird, G. H. Rhodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9519–9523.
- [92] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, A. B. Yu, *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1027–1040.
- [93] G. Schmid, *Clusters and Colloids. From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **1994**.
- [94] G. Schmid, *Nanoparticles. From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [95] F. Caruso, *Colloids and Colloid Assemblies*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [96] M. P. Pileni, *Nanocrystals forming mesoscopic structures*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [97] E. Bourgeat-Lami, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2002**, *2*, 1–23.
- [98] E. H. Chowdhury, T. Akaike, *Curr. Gene Ther.* **2005**, *5*, 669–676.

- [99] Y. Fukumori, H. Ichikawa, *Adv. Powder Technol.* **2006**, *17*, 1–28.
- [100] G. Schmid, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1709–1727.
- [101] E. F. Fynan, R. G. Webster, D. H. Fuller, J. C. Santoro, H. L. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11478–11482.
- [102] K. K. Sandhu, C. M. Mcintosh, J. M. Simard, S. W. Smith, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 3–6.
- [103] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9138–9143.
- [104] C. P. Jen, Y. H. Chen, C. S. Fan, C. S. Yeh, Y. C. Lin, D. B. Shieh, C. L. Wu, D. H. Chen, C. H. Chou, *Langmuir* **2004**, *20*, 1369–1374.
- [105] Y. P. Liu, W. Meyer-Zaika, S. Franzka, G. Schmid, M. Tsoli, H. Kuhn, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2959–2963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2853–2857.
- [106] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 603–606; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 585–587.
- [107] M. Oishi, J. Nakaogami, T. Ishii, Y. Nagasaki, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 1046–1047.
- [108] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. R. Lytton-Jean, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Science* **2006**, *312*, 1027–1030.
- [109] A. K. Salem, P. C. Searson, K. W. Leong, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 668–671.
- [110] A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. L. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen, D. L. Feldheim, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 482–490.
- [111] A. D. Russell, F. R. C. Path, F. R. Pharm, W. B. Hugo, F. R. Pharm, *Prog. Med. Chem.* **1994**, *31*, 351–370.
- [112] S. K. Gogoi, P. Gopinath, A. Paul, A. Ramesh, S. S. Ghosh, A. Chattopadhyay, *Langmuir* **2006**, *22*, 9322–9328.
- [113] B. Wiley, Y. Sun, B. Mayers, Y. Xia, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 454–463.
- [114] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V. K. Sharma, T. Nevecna, R. Zboril, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- [115] D. W. Brett, *Ostomy/wound manage.* **2006**, *52*, 34–41.
- [116] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D* **2003**, *36*, R198–206.
- [117] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, C. J. Serna, *J. Phys. D* **2003**, *36*, R182–R197.
- [118] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D* **2003**, *36*, R167–R181.
- [119] Z. M. Saiyed, S. D. Telang, C. N. Ramchand, *Biomagn. Res. Technol.* **2003**, *1*, 2.
- [120] D. C. F. Chan, D. Kirpotin, P. A. Bunn, *J. Magn. Magn. Mater.* **1993**, *122*, 374–378.
- [121] A. E. Senyei, K. J. Widder, C. Czerlinski, *J. Appl. Phys.* **1978**, *49*, 3578–3583.
- [122] T. Kubo, T. Sugita, S. Shimose, Y. Nitta, Y. Ikuta, T. Murakami, *Int. J. Oncol.* **2000**, *17*, 309–315.
- [123] T. Kubo, T. Sugita, S. Shimose, Y. Nitta, Y. Ikuta, T. Murakami, *Int. J. Oncol.* **2001**, *18*, 121–125.
- [124] R. Jurgons, C. Seliger, A. Hilpert, L. Trahms, S. Odenbach, C. Alexiou, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, S2893–S2902.
- [125] P. Gould, *Mater. Today* **2004**, *7*, 36–43.
- [126] F. Y. Cheng, C. H. Su, Y. S. Yang, C. S. Yeh, C. Y. Tsai, C. L. Wu, D. B. Shieh, *Biomaterials* **2005**, *26*, 729–738.
- [127] I. J. Bruce, J. Taylor, M. Todd, M. J. Davies, E. Borioni, C. Sangregorio, T. Sen, *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *284*, 145–160.
- [128] A. Campo, T. Sen, J. P. Lellouche, I. J. Bruce, *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 33–40.
- [129] V. Salgueirino-Maceira, M. A. Correa-Duarte, M. Farle, A. Lopez-Quintela, K. Sieradzki, R. Diaz, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2701–2706.
- [130] K. Landfester, L. P. Ramirez, *J. Phys. Condens. Matter* **2003**, *15*, S1345–S1361.
- [131] C. Plank, F. Schere, U. Schillinger, C. Bergemann, M. Anton, *Lipid Res.* **2003**, *13*, 29–32.
- [132] C. Plank, U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J.-S. Remy, F. Kroetz, M. Anton, J. Lausier, J. Rosenecker, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 737–747.
- [133] F. Krötz, C. de Wit, H. Y. Sohn, S. Zahler, T. Gloe, U. Pohl, C. Plank, *Mol. Ther.* **2003**, *7*, 700–710.
- [134] N. Morishita, H. Nakagami, R. Morishita, S. Takeda, F. Mishima, B. Terazono, S. Nishijima, Y. Kaneda, N. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1121–1126.
- [135] A. K. Gupta, A. S. G. Curtis, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3029–3040.
- [136] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 1565–1573.
- [137] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- [138] Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553–1561.
- [139] C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, A. S. G. Curtis, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4551–4557.
- [140] S. Iijima, *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- [141] M. Grujicic, Y. P. Sun, K. L. Koudela, *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 3009–3021.
- [142] A. L. Dicks, *J. Power Sources* **2006**, *156*, 128–141.
- [143] K. Balani, R. Anderson, T. Laha, M. Andara, J. Tercero, E. Crumpler, A. Agarwal, *Biomaterials* **2007**, *28*, 618–624.
- [144] F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T. W. Ebbeesen, C. Mioskowski, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2036–2039; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1912–1915.
- [145] H. Hu, Y. Ni, V. Montana, R. C. Haddon, V. Parpura, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 507–511.
- [146] X. Chen, G. S. Lee, A. Zettl, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6237–6242; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6111–6116.
- [147] Z. Liu, M. Winters, M. Holodniy, H. Dai, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2069–2073; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2023–2027.
- [148] C. Klumpp, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 404–412.
- [149] K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small* **2005**, *1*, 180–192.
- [150] B. S. Harrison, A. Atala, *Biomaterials* **2007**, *28*, 344–353.
- [151] G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhao, X. Guo, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1378–1383.
- [152] T. Itoh, T. Shichi, T. Yui, K. Takagi, *J. Solid State Chem.* **2005**, *291*, 218–222.
- [153] S. Aisawa, H. Hirahara, K. Ishiyama, W. Ogasawara, Y. Umetsu, E. Narita, *J. Solid State Chem.* **2003**, *174*, 342–348.
- [154] A. H. Iglesias, O. P. Ferreira, D. X. Gouveia, A. G. S. Filho, J. A. C. de Paiva, J. M. Filho, O. L. Alves, *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 142–152.
- [155] B. Li, J. He, D. G. Evans, X. Duan, *Appl. Clay Sci.* **2004**, *27*, 199–207.
- [156] H. Zhang, K. Zou, S. Guo, X. Duan, *J. Solid State Chem.* **2006**, *179*, 1792–1801.
- [157] J. H. Choy, S. Y. Kwak, Y. J. Jeong, J. S. Park, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4207–4211; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4041–4045.
- [158] K. M. Tyner, M. S. Roberson, K. A. Berghorn, L. Li, R. F. Gilmour, C. A. Batt, E. P. Giannelis, *J. Controlled Release* **2004**, *100*, 399–409.
- [159] J. H. Choy, M. S. Park, J. M. Oh, *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 275–281.
- [160] R. K. Allada, A. Navrotsky, H. T. Berbeco, W. H. Casey, *Science* **2002**, *296*, 721–723.
- [161] C. A. Johnson, F. P. Glasser, *Clays Clay Miner.* **2003**, *51*, 1–8.
- [162] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston, 1990.
- [163] Y. Chen, Z. Xue, D. Zheng, K. Xia, Y. Zhao, T. Liu, Z. Long, J. Xia, *Curr. Gene Ther.* **2003**, *3*, 273–279.
- [164] D. R. Radu, C. Y. Lai, K. Jeftinija, E. W. Rowe, S. Jeftinija, V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216–13217.

- [165] D. Luo, E. Han, N. Belcheva, W. M. Saltzman, *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 333–341.
- [166] D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 893–895.
- [167] R. A. Gemeinhart, D. Luo, W. M. Saltzman, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 532–537.
- [168] H. Shen, J. Tan, W. M. Saltzman, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 569–574.
- [169] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 271–298.
- [170] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3260–3277; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3130–3146.
- [171] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschal, P. Roschger, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2115–2123.
- [172] F. L. Graham, A. J. van der Eb, *Virology* **1973**, *52*, 456–467.
- [173] E. Orrantia, P. L. Chang, *Exp. Cell Res.* **1990**, *190*, 170–174.
- [174] A. Maitra, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, *5*, 893–905.
- [175] T. Liu, A. Tang, G. Y. Zhang, Y. X. Chen, J. Y. Zhang, S. S. Peng, Z. M. Cai, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2005**, *20*, 141–149.
- [176] Y. Kakizawa, K. Kataoka, *Langmuir* **2002**, *18*, 4539–4543.
- [177] Y. Kakizawa, K. Miyata, S. Furukawa, K. Kataoka, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 699–702.
- [178] Y. Kakizawa, S. Furukawa, A. Ishii, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 368–370.
- [179] D. Olton, J. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, N. P. Kumta, C. Sfeir, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1267–1279.
- [180] G. Bhakta, S. Mitra, A. Maitra, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2157–2163.
- [181] D. E. Brash, R. R. Reddel, M. Quanrud, K. Yang, M. P. Farrel, C. C. Harris, *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7*, 2031–2034.
- [182] Z. S. Liu, S. L. Tang, Z. L. Ai, *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 1968–1971.
- [183] A. Doat, M. Fanjul, F. Pelle, E. Hollande, A. Lebugle, *Biomaterials* **2003**, *24*, 3365–3371.
- [184] A. Doat, F. Pelle, N. Gardant, A. Lebugle, *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 1179–1187.
- [185] A. Lebugle, F. Pellé, C. Charvillat, I. Rousselot, J. Y. Chane-Ching, *Chem. Commun.* **2006**, 606–608.
- [186] S. Padilla Mondejar, A. Kovtun, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4153–4159.
- [187] V. Sokolova, A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 174–179.
- [188] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2213–2217.
- [189] V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 721–727.
- [190] A. J. Strain, A. H. Wyllie, *Biochem. J.* **1984**, *218*, 475–482.
- [191] V. Sokolova, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, H. Cölfen, H. Rehage, A. Shukla, M. Epple, *Materialwiss. Werkstofftech.* **2006**, *37*, 441–445.
- [192] V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Epple, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3147–3153.
- [193] Y. Yin, A. P. Alivisatos, *Nature* **2005**, *437*, 664–670.
- [194] S. K. Poznyak, D. V. Talapin, E. V. Shevchenko, H. Weller, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 693–698.
- [195] A. P. Alivisatos, W. W. Gu, C. Larabell, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, *7*, 55–76.
- [196] W. B. Tan, S. Jiang, Y. Zhang, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1565–1571.
- [197] M. E. Akerman, W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12617–12621.
- [198] C. Srinivasan, J. Lee, F. Papadimitrakopoulos, L. K. Silburt, M. Zhao, D. J. Burgess, *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 192–201.
- [199] M. S. Nikolic, M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Förster, H. Weller, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6727–6731; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6577–6580.
- [200] B. P. Aryal, K. P. Neupane, M. G. Sandros, D. E. Benson, *Small* **2006**, *2*, 1159–1163.
- [201] T. Z. Zhang, J. L. Stilwell, D. Gerion, L. Ding, O. Elboudwarej, P. A. Cooke, J. W. Gray, A. P. Alivisatos, F. F. Chen, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 800–808.
- [202] I. M. Verma, N. Somia, *Nature* **1997**, *389*, 239–242.
- [203] L. M. Mir, H. Banoun, C. Paoletti, *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 15–25.
- [204] G. L. Andreason, G. A. Evans, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 269–275.
- [205] J. A. Nicoloff, R. J. Reynolds, *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 237–243.
- [206] R. A. Jain, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475–2490.
- [207] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1600–1603.