

dsRNA-funktionalisierte γ -Fe₂O₃-Nanokristalle: ein Instrument zur gezielten Adressierung von Rezeptoren an der Zelloberfläche**

Mohammed Ibrahim Shukoor, Filipe Natalio, Nadine Metz, Natalie Glube, Muhammad Nawaz Tahir, Helen Annal Therese, Vadim Ksenofontov, Patrick Theato, Peter Langguth, Jean-Paul Boissel, Heinz C. Schröder, Werner E. G. Müller und Wolfgang Tremel*

Die natürliche Immunantwort ist die erste Reaktion des Organismus auf eingedrungene Erreger. Die Entdeckung der Toll-artigen Rezeptoren (TLRs) in einfachen Organismen wie der Fliege *Drosophila melanogaster* aber auch in Säugern und Menschen sowie die Erkenntnis, dass diese Rezeptoren das gemeinsame molekulare Erkennungsmuster von Mikroorganismen und Viren sind, hat zu einem neuerlichen Boom der Immunforschung geführt.^[1] Säuger verfügen über mehr als zehn verschiedene (bekannte) TLRs, die phylogenetisch hochkonserviert sind und unterschiedliche spezifische Bestandteile von Mikroorganismen und Viren erkennen. Die Aktivierung der inflammatorischen Antwort durch TLRs kann den Aufbau von Rezeptor-Signalkomplexen einschließlich weiterer Transmembranproteine erfordern, welche die Signaltransduktion beeinflussen. Die TLR-induzierte inflammatorische Antwort hängt von einem gemeinsamen Signalweg ab, der durch Adapterproteine diktiert wird. Die Wechselwirkung unterschiedlicher TLRs mit bestimmten Kombinationen von Adaptermolekülen erzeugt eine Plattform für die Rekrutierung weiterer Kinasen, trans-Faktoren und anderer Moleküle. Diese Vorgänge führen im letzten Schritt zur Genregulation.^[2] Der Toll-Rezeptor 3 (TLR3)

erkennt lange doppelsträngige RNA (dsRNA), die ein Nebenprodukt der viralen Replikation ist und als Signalmolekül für virale Infektionen dient.^[3] Die Aktivierung von TLR3 durch eine dsRNA – Poly(I:C) (Polyinosin-Polycytidylsäure) – induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) und von Interferon(IFN)- α/β .^[4]

Eine der aufregenden Entwicklungen der jüngsten Zeit betrifft die Anwendung von magnetischen Nanopartikeln in biologischen Systemen, etwa für den Wirkstofftransport oder als Sensor in der Magnetresonanztomographie (MRT), generell in der Biosensorik, bei der schnellen Sortierung biologischer Substanzen oder in der Wärmebehandlung von Tumoren.^[5] Nanopartikel sind wegen 1) ihrer Größe (1–50 nm) und des damit verbundenen Oberfläche-Volumen-Verhältnisses, 2) der durch Größe, Zusammensetzung und Form einstellbaren physikalischen Eigenschaften, 3) dem ungewöhnlichen Targetierungsverhalten und 4) ihres strukturell robusten Verhaltens interessante Untersuchungsobjekte. Die Größe der Nanopartikel kann im Vergleich zum gewöhnlichen Feststoff ein besonderer Vorteil sein, weil die Bindung eines Targets einen signifikanten Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften haben kann. Der damit verbundene Modus der Signaltransduktion wird im entsprechenden makroskopischen Feststoff nicht notwendigerweise sichtbar.

Das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Nanomaterialien und lebenden Organismen hat nicht nur eine akademische, sondern auch eine praktische Bedeutung, die uns den Zugang zu interdisziplinären Forschungsfeldern eröffnet. Neueste Ergebnisse zeigen, dass die Konjugation von Zielmolekülen oder Antikörpern mit magnetischen Nanopartikeln wie Fe₃O₄ genutzt werden kann, um Zellen in vitro spezifisch zu adressieren.^[6] Die nichtkovalente Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln hat jedoch für biologische Anwendungen markante Nachteile, weil die Nanopartikel wegen ihrer aktiven Oberflächenionen im In-vivo-Modell cytotoxisch sein können.^[7] Um diesem Manko abzuweichen, haben wir die Herstellung biokompatibler Oberflächenliganden vorangetrieben, die als Schnittstelle zwischen Nanopartikeln und Wirkstoffen fungieren. Sie passivieren einerseits die Oberfläche der Nanopartikel durch Komplexierung, ermöglichen aber andererseits die Anbindung spezieller Targetmoleküle über spezifische Ankergruppen. Darüber hinaus enthalten sie Detektormoleküle, die eine optische Erkennung der funktionalisierten Nanopartikel ermöglichen. Besonders augenfällig ist letztlich die Tatsache, dass nur ein

[*] M. I. Shukoor, Dr. M. N. Tahir, Dr. H. A. Therese, Dr. V. Ksenofontov, Prof. Dr. W. Tremel

Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität
Duesbergweg 10–14, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-39-25605
E-Mail: tremel@uni-mainz.de

F. Natalio, Prof. Dr. Dr. H. C. Schröder, Prof. Dr. W. E. G. Müller
Institut für Physiologische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität
Duesbergweg 6, 55099 Mainz (Deutschland)

Dr. N. Glube, Prof. Dr. P. Langguth
Institut für Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität
Staudingerweg 5, 55099 Mainz (Deutschland)

N. Metz, Dr. P. Theato
Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität
Duesbergweg 14, 55099 Mainz (Deutschland)

Dr. J.-P. Boissel
Pharmakologisches Institut, Johannes Gutenberg-Universität
Obere Zahlbacher Straße, 55131 Mainz (Deutschland)

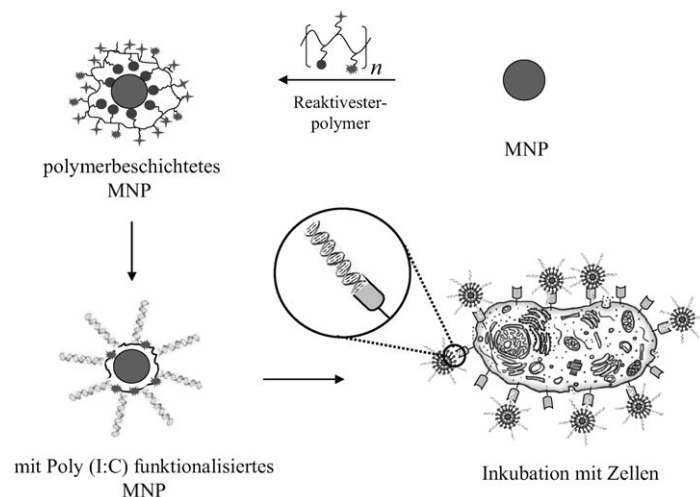
[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Materialwissenschaftlichen Forschungszentrum (MWFZ) der Universität Mainz für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

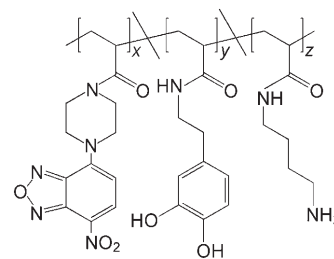
kleiner Teil der intravenös verabreichten monoklonalen Antikörper ihre parenchymalen Zielorte *in vivo* erreicht.^[8] Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften lassen sich die Eisenoxid-Nanopartikel sehr vorteilhaft zur gezielten Wirkstofffreisetzung am Zielort einsetzen. Darüber hinaus ermöglichen sie über die gebundenen Wirkstoffe auch die Erkennung der Zielstrukturen durch Magnetresonanztomographie (MRT).^[9]

Hier stellen wir einen neuen multifunktionellen Polymerliganden zur Immobilisierung der dsRNA Poly(I:C) an γ -Fe₂O₃-Nanokristallen vor, der den mehrstufigen Funktionalisierungsprozess von Nanopartikeln vereinfacht. Dieser Ligand hat die folgenden Eigenschaften: 1) eine Dopamin-Ankergruppe, die für die Funktionalisierung verschiedener Metalloxide (z. B. Fe₂O₃, TiO₂)^[10] geeignet ist, 2) einen Fluorophor (als optischen Marker) und 3) eine reaktive funktionelle Gruppe, welche die Bindung verschiedener Biomoleküle an die anorganischen Nanopartikel ermöglicht. Poly(I:C) enthält eine endständige 5'-Phosphatgruppe, die über eine EDC-Kupplung (EDC: 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid) zu Phosphoramidaten umgesetzt werden kann.^[11] Die biologische Aktivität dieser Poly(I:C)-funktionalisierten magnetischen Nanopartikel konnte an Nierenkrebszellen Caki-1 (humane renale Zelllinie) demonstriert werden. Schema 1 illustriert den Nachweis der spezifischen Bindung des Nanopartikel-Poly(I:C)-Komplexes an die Zellrezeptoren.

Ferrimagnetische γ -Fe₂O₃-Nanokristalle wurden durch thermische Zersetzung von Eisenpentacarbonyl wie andernorts beschrieben hergestellt.^[12] Alle zugehörigen experimentellen Details sind in den Hintergrundinformationen zusammengestellt. Anschließend wurden die γ -Fe₂O₃-Nanokristalle mit einem mehrzähligen Blockcopolymerliganden funktionalisiert (Schema 2), der Catecholgruppen als Oberflä-



Schema 1. Modifizierung eines magnetischen Nanopartikels (MNPs) mit einem multifunktionalen Polymer und Anbindung einer dsRNA. Das Polymer trägt einen fluoreszierenden Detektorliganden und weist außerdem Aminfunktionen auf, welche die Konjugation mit Poly(I:C) durch EDC-Kupplung zu Phosphoramidaten ermöglichen. Die Poly(I:C)-gekuppelten Nanopartikel wurden mit Caki-1-Zellen inkubiert, die für die spezifische Bindung zuständige TLR3-Rezeptoren an ihrer Oberfläche aufweisen.



Schema 2. Multifunktionelles Copolymer mit 3-Hydroxytyramin(Dopamin)-Ankergruppen für die Bindung zum Metalloxid, Piperazinyl-4-chlor-7-nitrobenzofuran (pipNBD) als Fluorophor und einer freien Aminfunktion für die Konjugation von Poly(I:C).

chenanker für die Eisenoxidpartikel, einen organischen Fluorophor zur optischen Erkennung und eine freie Aminfunktion zur nachfolgenden Biofunktionalisierung durch Immobilisierung der Poly(I:C)-Liganden enthält. Der mittlere Durchmesser der Partikel ließ sich aus den TEM-Aufnahmen abschätzen; zwischen funktionalisierten und nicht-funktionalisierten Partikeln waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abbildung 1a,b). Dieser Befund ist mit der Bildung einer Polymer-Monoschicht im Einklang (Abbildung S1, Hintergrundinformationen). Abbildung 1c zeigt das Mößbauer-Spektrum der nicht-funktionalisierten Partikel bei Raumtemperatur. Da Maghämīt bei Partikeldurchmessern < 9 nm superparamagnetisch ist, tritt im Spektrum nur ein Quadrupol-Dublett auf. Die Mößbauer-Parameter bei Raumtemperatur ($IS = 0.37(3) \text{ mm s}^{-1}$, $QS = -0.35(2) \text{ mm s}^{-1}$) sind im Einklang mit den Werten für ferrimagnetisches Maghämīt-Volumenmaterial.^[13] Wegen des höheren Anteils von Oberflächenatomen weicht lediglich die Quadrupol-Aufspaltung geringfügig von den Literaturwerten für das Volumenmaterial ab. Die Hysteresekurve für γ -Fe₂O₃-Nanokristalle in Abbildung 1d weist auf superparamagnetisches Verhalten ohne jede Hysterese bei Raumtemperatur hin. Die Magnetisierung bei 40 kOe beträgt 65 emu g^{-1} .

Die Untersuchungen wurden mit der kommerziell erhältlichen dsRNA Poly(I:C) in Konzentrationen von 2 mg mL^{-1} ausgeführt. Poly(I:C) enthält endständige 5'-Phosphatgruppen, welche die Immobilisierung als Phosphoramidat an polymerfunktionalisierten γ -Fe₂O₃-Nanokristalle durch EDC-Kupplung ermöglichen.^[11,14] Die Gelelektrophorese (Abbildung 2) zeigt in Spur 1 reines Poly(I:C) (1:10-Verdünnung in MeIm, 0.1M, Puffer pH 7.5) als Vergleich, in Spur 2 sind polymerfunktionalisierte Maghämīt-Nanopartikel aufgetragen, Spur 3 enthält die polymerfunktionalisierten Maghämīt-Nanokristalle mit gebundenem Poly(I:C).^[14] Um die Bindung zwischen dsRNA und den funktionalisierten Nanokristallen nachzuweisen, wurde der Komplex 5 Minuten auf 75 °C erhitzt und anschließend auf das Agarose-Gel aufgetragen. Das Auftreten einer Bande (Spur 4 in Abbildung 2) belegt eindeutig die Abspaltung von Poly(I:C) von den polymerfunktionalisierten γ -Fe₂O₃-Nanokristallen.

Die hier verwendeten Zellen der Zelllinien Caki-1 stammen aus kommerziellen Quellen. Auf diese Weise

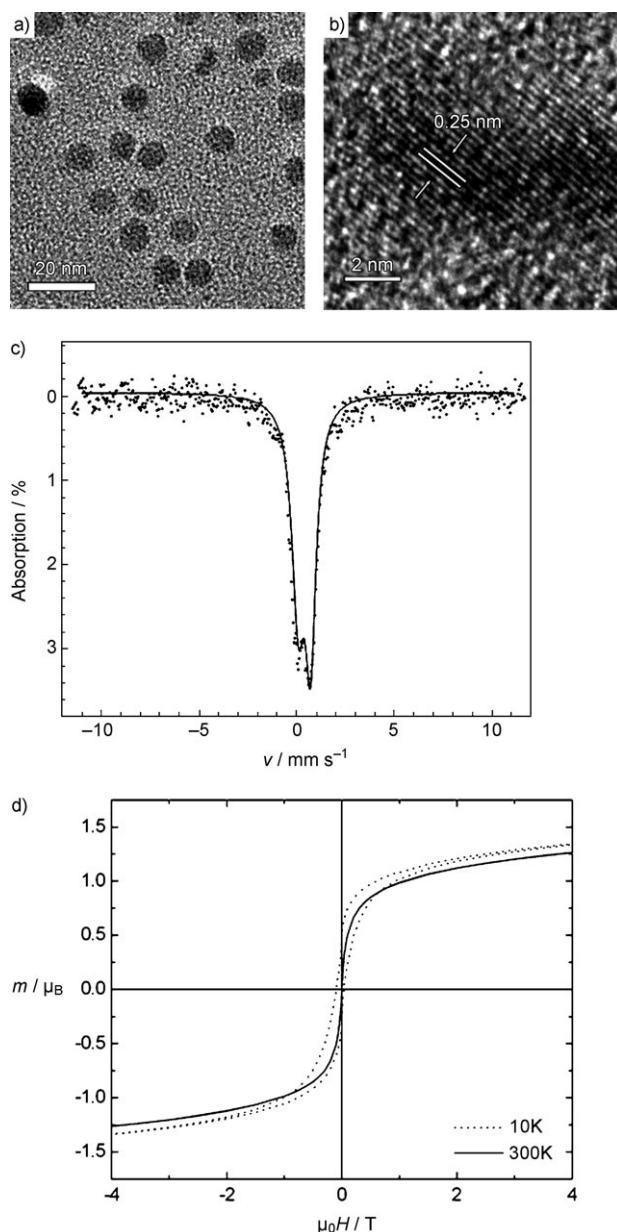


Abbildung 1. a,b) TEM-Bilder von γ -Fe₂O₃-Nanokristallen. Übersichtsbild (a) und hochaufgelöstes Bild (HRTEM) (b) der unfunktionalisierten Nanokristalle. c) Mößbauer-Spektrum von Maghämmit-Nanokristallen bei Raumtemperatur. d) Hysteresekurve für Maghämmit-Nanokristalle bei 300 K und 10 K. m : magnetisches Moment, $\mu_0 H$: Induktionsfeld.

kann man den Aufwand für ihre Trennung und Kultivierung aus frischem Gewebe umgehen. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 95–100 % kultiviert. Die experimentellen Bedingungen sind an anderer Stelle beschrieben.^[15] Die Expression von TLR3 in den Zellen wurde durch (reverse Transkriptase)-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Immunocytochemie nachgewiesen. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert und ihre Integrität durch Standard-Gelelektrophorese (1 % Agarose) nachgewiesen. Die Gesamt-RNA wurde direkt durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und danach mit PCR amplifiziert. Anschließend wurden die amplifizierten PCR-Produkte

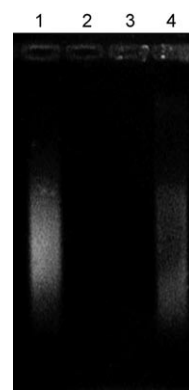


Abbildung 2. Agarose-Gel. Spur 1: Poly(I:C) (1:10-Verdünnung in Melm, 0.1 M, Puffer pH 7.5) als Positivkontrolle. Spur 2: polymerfunktionalisierte γ -Fe₂O₃-Nanokristalle. Spur 3: polymerfunktionalisiertes γ -Fe₂O₃, gekuppelt mit Poly(I:C) (EDC-Kupplung). Spur 4 (als zweite unabhängige Kontrolle): Produkt aus Spur 3 nach einer 5-minütigen Wärmebehandlung bei 75 °C, bei der die Amid-Bindung zwischen dem Polymer-Nanopartikel-Hybrid und Poly(I:C) gespalten wurde.

durch Gelelektrophorese (2-proz. Agarose-Gel) aufgetrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid neben dem DNA-Längenstandard dargestellt (DNA-Leiter 100 bp, Abbildung 3a). Das 2-proz. Agarose-Gel zeigte erwartungsgemäß

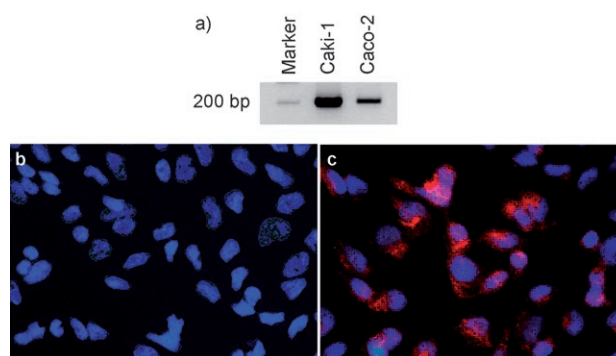


Abbildung 3. a) Expression von TLR3-mRNA in Caki-1- und Caco-2-Zellen (208 Basenpaare). b,c) Immunfluoreszenz für TLR3 in Caki-1-Zellen. b) Kontrolluntersuchung mit Präimmunsereum: kein Signal. c) Monoklonaler TLR3-Antikörper und die zugehörigen Texasrot-Fluorophore, konjugiert mit dem sekundären Antikörper (rot). Das rote Fluoreszenzsignal zeigt sich an den Oberflächen der Caki-1-Zellen. Die Zellkerne wurden mit 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) blau angefärbt.

eine Bande bei 208 Basenpaaren. Caco-2-Zellen exprimieren, wie kürzlich gezeigt wurde,^[16] ebenfalls TLR-Rezeptoren wie TLR3 und TLR9. Sie wurden daher als Positivkontrolle der hTLR3-mRNA-Expression verwendet, um die Spezifität der PCR und der verwendeten Primer sicherzustellen. Durch RT-PCR konnten wir zeigen, dass auch humane TLR3 (hTLR3) in Caki-1-Zellen mit 208 Basenpaaren exprimiert werden.

Zur Visualisierung der TLR3-Expression an Caki-1-Zellen wurde eine Immundetektionstechnik verwendet (Abbildung 3b,c). Nach einem Blocking-Schritt wurden die Zellen mit monoklonalen TLR3-Antikörpern der Maus

gegen hTLR3 (humaner Ursprung, volle Länge) inkubiert. Mit Texasrot gekuppelte Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG) wurden mit Caki-1-Zellen inkubiert und die Zellkerne mit 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt (Abbildung 3c). Anschließend wurden die Zellen lichtmikroskopisch unter Verwendung eines Reflexions-Fluoreszenz-Zusatzes bei Emissionswellenlängen von 456 und 620 nm untersucht, um die DAPI-Färbung und den sekundären Antikörper sichtbar zu machen. Kontrollexperimente mit Präimmunsereum zeigten kein Signal des Antikörpers (Abbildung 3b). Dagegen zeigt die Immunfärbung anhand der roten Fluoreszenz durch den mit Texasrot konjugierten Sekundärantikörper die Expression der TLR3-Rezeptoren in den Caki-1-Zellen an. Dieser Befund ist im Einklang mit den Ergebnissen der RT-PCR (Abbildung 3a).

Ungeachtet der Tatsache, dass TLR3 als intrazelluläre Proteinkomplexe beschrieben wurden (während die gegen extrazelluläre Pathogene gerichteten TLRs auf der Zelloberfläche und TLR7, TLR8 sowie TLR9 in endosomalen Kompartimenten vorliegen), wurde berichtet, dass auch TLR3-Rezeptoren in subzelluläre Kompartimente internalisiert werden, z.B. in Zelltypen wie den durch Umwandlung von Monocyten entstehenden unreifen dendritischen Zellen (iDCs).^[17] TLR3 findet sich auch auf der Oberfläche der humanen Darmkrebs-Zelllinie T84^[18] und der humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5,^[18] um virale und andere intrazelluläre Erreger zu detektieren, die eine antivirale Rolle bei der natürlichen Immunität spielen.^[17a] Die Anordnung dieser Rezeptoren ist jedoch noch nicht vollständig verstanden und wird teilweise kontrovers diskutiert.

Zur Prüfung der Proliferation von polymerfunktionalisierten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikeln wurde ein XTT-Assay durchgeführt (XTT = 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid). Caki-1-Zellen wurden in 96er Mikrotiterplatten gemäß dem Protokoll in Lit. [15] bei 3×10^4 Zellen pro Vertiefung kultiviert.^[15] Die Zellen wurden dazu mit den funktionalisierten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikeln (bei Konzentrationen von 10, 50 und 100 mg mL^{-1}) 12 h in dreifacher Ausfertigung inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und ihre Proliferation danach mithilfe des XTT-Assays bestimmt.^[19]

Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen zeigt den Einfluss der funktionalisierten $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanokristalle auf die Überlebensrate der Caki-1-Zellen. Dabei wird deutlich, dass die polymerfunktionalisierten Nanokristalle im Vergleich zur Kontrollprobe nahezu keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen haben. Die Zellen blieben bei Konzentrationen von 10 und $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ohne Schaden, erst deutlich höhere Konzentrationen von $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ führten in 15 % der Fälle zum Zelltod. Da die Toxizität der Nanokristalle sogar bei hohen Konzentrationen sehr gering ist, lassen sich polymerfunktionalisierte und -geschützte $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanokristalle als Träger für den Transport von Poly(I:C) einsetzen.

Die phasenkontrastmikroskopischen Bilder in Abbildung 4 belegen, in welchem Ausmaß Poly(I:C)-konjugierte $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikel an der Zellwand verankert sind. Für diese Untersuchungen wurden Caki-1-Zellen mit gut dispergierten Poly(I:C)-gekuppelten polymerfunktionalisierten Maghämite-Nanokristallen inkubiert (37°C , 5 % CO_2 , 3 h). Im

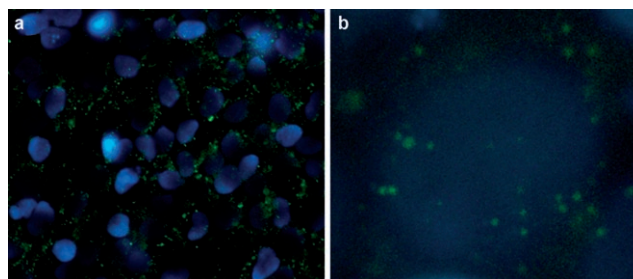


Abbildung 4. Caki-1-Zellen, inkubiert mit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanokristallen, die mit Poly(I:C) und einem mit grünem NBD-Fluorophor markierten multifunktionalen Polymer funktionalisiert wurden. a) Poly(I:C)-konjugierte Nanokristalle binden spezifisch an TLR3, der in Caki-1-Zellen exprimiert wird. b) Bei stärkerer Vergrößerung zeigen sich die (grün markierten) Nanokristalle an den Zelloberflächen. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

Anschluss wurden die Zellen mit DAPI angefärbt, um die Zellkerne blau zu markieren. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop bei Emissionswellenlängen von 456 nm und 530 nm untersucht, wobei die DAPI-Färbung bzw. die fluorophorgekuppelten Maghämite-Nanopartikel visualisiert wurden. Die grüne Fluoreszenz in Abbildung 4a und b belegt die Anwesenheit der funktionalisierten Nanopartikel als Träger von Poly(I:C) an den Zelloberflächen, an denen TLR3 exprimiert wird. Die zugehörigen Kontrollmessungen wurden unter vergleichbaren Bedingungen mit polymerfunktionalisierten Maghämite-Nanopartikeln ohne Poly(I:C) durchgeführt. Dabei wurden Nanopartikel weder intrazellulär noch extrazellulär (an den Zellwänden) beobachtet (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Um schließlich die spezifische Affinität von Poly(I:C) als Ligand für TLR3 zu demonstrieren, wurden Human-Monocyten, die keine TLR3-Rezeptoren enthalten,^[20] zur Negativkontrolle verwendet. Einkernige Zellen wurden mittels Ficoll-Hypaque-Gradienten aus Humanblut gewonnen. Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen belegt, dass nach Inkubation der Humanzellen mit dsRNA-konjugierten Nanopartikeln keine Anlagerung an oder in den Zellen auftrat. Die Wechselwirkung von Nanopartikeln und Zellen hängt also neben Faktoren wie Größe und Form auch von Oberflächenliganden ab, die das Verhalten gegenüber Zellen definieren. Dies konnte im vorliegenden Fall an $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanokristallen gezeigt werden, die in definierter Größe hergestellt, mit einem Polymer als mehrzähliger Schutz- und Reaktionsschnittstelle funktionalisiert und schließlich mit Poly(I:C) konjugiert wurden. Auf diese Weise konnten hochspezifisch Zellrezeptoren adressiert und die Endocytose unterdrückt werden, da die dsRNA-gekuppelten Nanopartikel eine hohe Affinität zur Zellmembran aufweisen.

Die vorliegenden Befunde eröffnen neue Möglichkeiten für die selektiven Markierung von Zellen, bei denen die magnetischen Eigenschaften der Träger, etwa für die Entwicklung zellulärer Therapien, von Interesse sind. Der Transport und die ortsspezifische Freisetzung von Wirkstoffen kann die Toxizität von Therapeutika erheblich reduzieren und so zu einer verbesserten therapeutischen Wirksamkeit beitragen. Ein aus den sensorischen Einsatzmöglichkeiten

resultierendes Verständnis der Vorgänge, in denen TLRs die erworbene Immunität steuern, könnte darüber hinaus Therapieansätze für Infektionskrankheiten liefern und die Behandlung und Prävention von Allergien und Autoimmunerkrankungen verbessern.

Eingegangen am 12. Oktober 2007,
veränderte Fassung am 21. Januar 2008
Online veröffentlicht am 15. Mai 2008

Stichwörter: Biosensorik · Maghämit · Nanopartikel · Zellmarkierung · Zelloberflächenrezeptoren

- [1] A. Aderem, R. J. Ulevitch, *Nature* **2000**, 406, 782–787.
- [2] L. A. O'Neill, K. A. Fitzgerald, A. G. Bowie, *Trends Immunol.* **2003**, 24, 286–290.
- [3] M. Chhowalla, G. A. J. Amaratunga, *Nature* **2000**, 407, 164–167.
- [4] a) K. H. Edelmann, S. Richardson-Burns, L. Alexopoulou, K. L. Tyler, R. A. Flavell, M. B. A. Oldstone, *Virology* **2004**, 322, 231–238; b) L. Alexopoulou, A. Czopik Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, *Nature* **2001**, 413, 732–738.
- [5] a) H. B. Na, J. H. Lee, K. An, Y. I. Park, M. Park, I. S. Lee, D.-H. Nam, S. T. Kim, S.-H. Kim, S.-W. Kim, K.-H. Lim, K.-S. Kim, S.-O. Kim, T. Hyeon, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 5493–5497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5397–5401; b) I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4724–4737; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4576–4588; c) K. A. Hinds, J. M. Hill, E. M. Shapiro, M. O. Laukkanen, A. C. Silva, C. A. Combs, T. R. Varney, R. S. Balaban, A. P. Koretsky, C. E. Dunbar, *Blood* **2003**, 102, 867–872; d) H. L. Grossman, W. R. Myers, V. J. Vreeland, R. Bruehl, M. D. Alper, C. R. Bertozzi, J. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 101, 129–134; e) P. S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J. L. Viovy, *Science* **2002**, 295, 2237–2237.
- [6] a) O. Veisheh, C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbogen, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson, M. Zhang, *Nano Lett.* **2005**, 5, 1003–1008; b) Y. Jun, Y. Huh, J. Choi, J. Lee, H. Song, S. Kim, S. Yoon, K. Kim, J. Shin, J. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9992–9993; c) J. Lange, R. Kotitz, A. Haller, L. Trahms, W. Semmler, W. Weitschies, *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, 252, 381–383; d) F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2474–2478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2372–2376.
- [7] a) C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. M. Javier, H. E. Gaub, S. Stölzle, N. Fertig, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2005**, 5, 331–338; b) D. A. Limaye, Z. A. Shaikh, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 154, 59–66; c) R. A. Goyer, *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 61, 646s–650s.
- [8] K. C. P. Li, S. D. Pandit, S. Guccione, M. D. Bednarski, *Biomed. Microdevices* **2004**, 6, 113–116.
- [9] a) R. N. Muller, A. Roch, J.-M. Colet, A. Ouakssim, P. Gillis, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging* (Hrsg.: A. E. Merbach, E. Toth), Wiley, New York, **2001**, S. 417; b) D. K. Kim, Y. Zhang, J. Kehr, T. Klason, B. Bjelke, M. Muhammed, *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, 225, 256–261.
- [10] a) N. M. Dimitrijevic, Z. V. Saponjic, B. M. Rabatic, T. Rajh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1344–1345; b) M. N. Tahir, T. Gorelik, U. Kolb, H.-C. Schröder, W. E. G. Müller, W. Tremel, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4921–4927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4803–4809.
- [11] a) B. C. F. Chu, G. M. Wahl, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1983**, 11, 6513–6529; b) V. Lund, R. Schmid, D. Rickword, E. Hornes, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 10861–10880.
- [12] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12798–12801.
- [13] a) N. N. Greenwood, T. G. Gibb, *Mössbauer Spectroscopy*, Chapman and Hall, London, **1971**; b) R. M. Taylor, U. Schwertmann, *Clay Miner.* **1974**, 10, 299–310.
- [14] M. I. Shukoor, F. Natalio, V. Ksenofontov, M. N. Tahir, M. Eberhardt, P. Theato, H.-C. Schröder, W. E. G. Müller, W. Tremel, *Small* **2007**, 3, 1374–1378.
- [15] N. Glube, E. Closs, P. Langguth, *Mol. Pharm.* **2007**, 4, 160–168.
- [16] a) A. Sato, M. Iizuka, O. Nakagomi, M. Suzuki, Y. Horie, S. Konno, F. Hirasawa, K. Sasaki, K. Shindo, S. Watanabe, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, 21, 521–530; b) E. Furrie, S. Macfarlane, G. Thomson, G. T. Macfarlane, Microbiology & Gut Biology Group, Tayside Tissue & Tumour Bank, *Immunology* **2005**, 115, 565–574; Gut Biology Group, Tayside Tissue & Tumour Bank, *Immunology* **2005**, 115, 565–574.
- [17] a) M. Matsumoto, S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, T. Seya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 293, 1364–1369; b) M. Matsumoto, K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, T. Seya, *J. Immunol.* **2003**, 171, 3154–3162.
- [18] E. Cario, D. K. Podolsky, *Infect. Immun.* **2000**, 68, 7010–7017.
- [19] N. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, A. L. Glasebrook, *J. Immunol. Methods* **1991**, 142, 257–265.
- [20] M. Muzio, D. Bosisio, N. Polentarutti, G. d'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinella, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, A. Mantovani, *J. Immunol.* **2000**, 164, 5998–6004.