

Beeinflussung der Aufnahme und lysosomalen Azidifizierung durch die Steifigkeit kolloidaler Partikel in vitro**

Raimo Hartmann, Marcel Weidenbach, Martin Neubauer, Andreas Fery und Wolfgang J. Parak*

Abstract: Das Aufnahmeverhalten von Zellen wird maßgeblich durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften kolloidaler Partikel bestimmt. Um die Auswirkungen mechanischer Steifigkeit auf den Endozytosevorgang zu untersuchen, wurde ausschließlich dieser Parameter variiert, während weitere Eigenschaften wie Größe, Form und Ladung konstant gehalten wurden. Durch die Analyse einzelner Partikel-Trajektorien während des Aufnahmevergangs ließen sich bei gleichzeitiger Aufzeichnung des lokalen pH-Werts um jedes einzelne Partikel Rückschlüsse über den jeweiligen Endozytoseverlauf ziehen. Insgesamt ergeben sich genügend Anhaltspunkte dafür, dass weichere Partikel schneller in lysosomale Strukturen transportiert werden als steifere.

Die Zahl von Anwendungen, die auf Wechselwirkungen kolloidaler Partikel mit Zellen beruhen, hat sich innerhalb der letzten Jahre kontinuierlich erhöht. Besonders sticht dabei die wachsende Bedeutung von Partikeln für die Diagnostik sowie für die Pharmakotherapie zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen am Zielort hervor. Da viele Verfahren eine aktive Partikelaufnahme voraussetzen, werden besonders die beteiligten Zellaufnahmewege untersucht.^[1] Die Identifizierung und Charakterisierung aller für den Aufnahmeprozess relevanten Partikeleigenschaften hat sich als eine praktisch unlösbare Aufgabe herausgestellt, da oftmals viele Eigenschaften miteinander verknüpft sind und die Variation eines einzelnen Parameters das Konstanthalten aller übrigen erfordern würde.^[2] Beispiele systematischer Studien finden sich für Standardeigenschaften wie Größe,^[3] Form^[4] und Ladung.^[5] Daneben gibt es jedoch noch viele weitere wohldefinierte physikalische Eigenschaften, wie die Steifigkeit eines Partikels, die eine wichtige Rolle spielen könnten. So wurde beispielsweise gezeigt, dass hohle Mikropartikel abhängig von ihrer Steifigkeit während der Aufnahme durch Zellen komprimiert und verformt werden.^[6,7] Auf Basis

theoretischer Überlegungen vermuteten Yi et al., dass sich die Aufnahme und die intrazellulären Wege deformierbarer Partikel von denen inelastischer unterscheiden, da die letztgenannten schlechter von Zellmembranen umschlossen werden können.^[8] Hydrogelnanopartikel mit einem Elastizitätsmodul zwischen 30 und 140 kPa wurden von RAW-264.7-Makrophagen effizienter aufgenommen als weichere (< 30 kPa) oder steifere (> 140 kPa) Nanopartikel.^[9] Zusätzlich beobachteten Liu et al. in HepG2-Zellen eine höhere Aufnahmerate für Mikrometer-große Hydrogelpartikel (15–35 kPa) als für weniger elastische (75–160 kPa).^[10]

Polymerkapseln oder hohle Mikropartikel, die durch den Layer-by-Layer(LbL)-Aufbau unterschiedlich geladener Polyelektrolyte realisiert werden,^[11] eignen sich besonders gut als Modellsysteme für systematische Untersuchungen, da ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften unabhängig voneinander variiert werden können.^[12] Größe^[13] und Form^[14] lassen sich durch die Wahl der Templatpartikel verändern, während das Vorzeichen der Oberflächenladung durch die äußerste Polymerschicht festgelegt wird. Die Elastizität kann durch die Zahl der Polymerschichten oder durch die Wahl des Polymermaterials verändert werden.^[15,16] Dementsprechend eignen sich Polyelektrolytkapseln besonders gut, um den Zusammenhang zwischen Partikelsteifigkeit und Endozytoseverhalten zu untersuchen, da allein die Elastizität variiert wird, während Größe, Form und Oberflächenladung konstant gehalten werden können. Zusätzlich ermöglicht dieses System, ausschließlich diesen einen Parameter zu variieren, ohne dass die Partikeloberfläche verändert oder andere physikalisch-chemische Partikeleigenschaften beeinflusst werden.

Der zugrunde liegende zelluläre Aufnahmemechanismus der Kapseln (d. h. Partikel) ist die Endozytose. Dabei werden die Partikel ausgehend vom neutralen extrazellulären Medium in immer saurer werdende intrazelluläre endozytotische Vesikel transferiert und lassen sich letztlich in lysosomale Strukturen wiederfinden.^[17] Der lokale pH-Wert, der sich um jedes Partikel einstellt, kann dabei genutzt werden, um den aktuellen Fortschritt des Aufnahmevergangs innerhalb der soeben beschriebenen Kaskade abzubilden. pH-empfindliche Fluorophore, z. B. basierend auf Fluoresceinderivaten^[18,19] oder Seminaphtharhodafluor (SNARF),^[19,20] eignen sich dazu, den lokalen pH-Wert in extra- und intrazellulärer Umgebung zeitaufgelöst auszulesen.^[6,20,21]

Basierend auf der LbL-Methode, der Adsorption von geladenen Polymeren um temporäre CaCO_3 -Templatkerne,^[11] wurden pH-empfindliche Kapseln unterschiedlicher Wanddicke und damit einhergehender variierender Steifigkeit synthetisiert. Dabei wurden zwei häufig genutzte Polymersysteme gewählt (nicht bioabbaubare Polymere: Po-

[*] R. Hartmann, M. Weidenbach, Prof. W. J. Parak
Fachbereich Physik, Philipps Universität Marburg
35037 Marburg (Deutschland)
E-Mail: wolfgang.parak@physik.uni-marburg.de
Prof. W. J. Parak
CIC biomaGUNE, San Sebastian (Spanien)
M. Neubauer, Prof. A. Fery
Fakultät für Chemie, Universität Bayreuth (Deutschland)

[**] Die vorliegende Arbeit wurde von LOEWE (Projekt Synchembio von WJP) unterstützt. Wir danken Dr. Andreas Schaper für die freundliche Einführung in Ultramikrotomie und Dr. Pilar Rivera Gil für anregende Diskussionen zu Projektbeginn.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409693> zu finden.

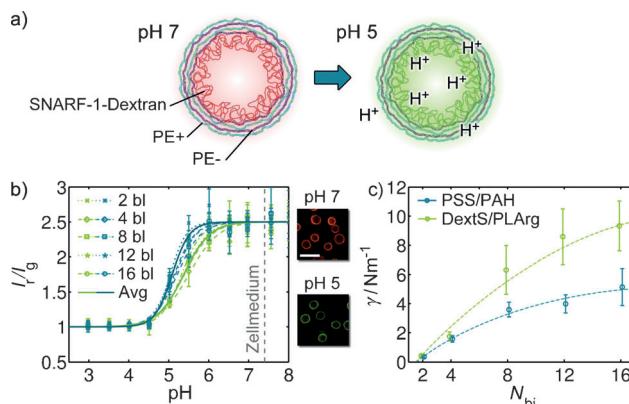


Abbildung 1. a) Skizze einer Polyelektrolytmikrokapsel, die aus $N_{bi}=2$ Doppelschichten aufgebaut ist, wobei sich diese wiederum aus einer negativ (PE- (violett), PSS oder DexTS) und einer positiv geladenen Schicht (PE+ (hellblau), PAH oder PLArg) zusammensetzen. Die äußerste, positiv geladene Schicht bestimmt dabei die Oberflächenladung des gesamten Partikels (siehe Abbildung SI-7). In der Kavität befinden sich pH-empfindliche SNARF-1-Fluoreszenzfarbstoffe, die mit Dextran konjugiert sind. b) Das Rot/Gelb-Verhältnis (I_r/I_g) des Fluoreszenzsignals I_r/I_g hängt dabei vom lokalen pH-Wert um jede Kapsel ab, das Verhalten für aus 2–16 Doppelschichten (Bilayers, bl) aufgebaute Kapseln der Größe „S“ kann aus den dargestellten Kalibrierkurven entnommen werden (grün: DexTS/PLArg, blau: PSS/PAH). Die Daten wurden auf den pH-Wert des Zellmediums normiert (pH 7.4). Die durchgezogene Linie („Avg“) entspricht dem über alle Schichtdicken gemittelten Verhalten beider Kapseltypen. Die pH-Wert-abhängige Farbänderung wird durch die ausgewählten Fluoreszenzmikroskopbilder sichtbar (Maßstab: 2 µm). c) Dargestellt ist die Abhängigkeit der mechanischen Steifigkeit γ (bestimmt durch AFM) von der Zahl der Doppelschichten N_{bi} der unterschiedlichen Partikeltypen ($d \approx 4.1$ µm, Größe „S“), verdeutlicht durch gestrichelte Hilfslinien.

ly(natrium-4-styrolsulfonat) (PSS) und Poly(allylamin-hydrochlorid) (PAH); bioabbaubare Polymere: Dextransulfat-Natriumsalz (DexTS) und Poly(L-arginin-hydrochlorid) (PLArg);^[17,22] vgl. Abbildung 1. Zwei verschiedene Serien von Templatkernen mit den mittleren Partikeldurchmessern von 4.1 µm (Größe „S“) und 4.7 µm (Größe „L“) wurden genutzt. Durch das Einbringen von SNARF-1^[19,20]-markiertem Dextran in die Kavität der Kapseln wurde pH-Empfindlichkeit erreicht. In Abbildung 1b ist die mittlere Reaktion der Kapselfluoreszenz, ausgedrückt durch das Verhältnis von Rot (I_r ; 615–700 nm) zu Gelb (I_g ; 560–615 nm, dargestellt in Grün), auf extern eingestellte pH-Stimuli gegeben, aus der die Beziehung $I_r/I_g(\text{pH})$ resultiert. Mit dieser Methode lassen sich Änderungen im pH-Wert bis 4.5 detektieren, wohingegen sich bei in DexTS/PLArg eingekapselten SNARF-1-Molekülen eine leicht verringerte Empfindlichkeit gegenüber niedrigen pH-Werten beobachten ließ.

Die Steifigkeit der Kapseln wurde für jeden Kapseltyp in Lösung mithilfe eines Rasterkraftmikroskops (AFM) bestimmt^[16] (Abbildung 1c). Wie erwartet erhöhte sich dieser Parameter bei steigender Zahl von Polyelektrolytschichten, was sich vermutlich auf die damit einhergehende vergrößerte Wanddicke zurückführen lässt. Im Falle der DexTS/PLArg-Kapseln variierten die absoluten Steifigkeitswerte außerdem von Ansatz zu Ansatz (siehe dazu die Hintergrundinformationen (SI), Abbildung SI-5).

Der Aufnahmeprozess wurde in adhärenten Zellen verschiedenen Typs untersucht (Zelllinien wie auch Primärzellen). Aus der ratiometrischen Analyse des Fluoreszenzsignals der sich in den Kapseln befindenden pH-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe^[20,21] lässt sich eine Änderung der lokalen Kapselumgebung von neutral (Zellmedium) zu sauer (Lysosom) nachvollziehen (Abbildung 2a). Vor der Aufnah-

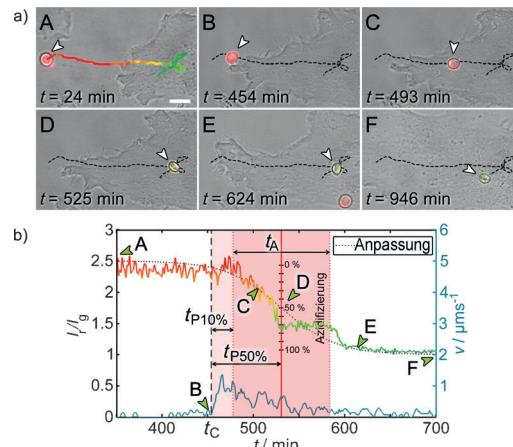


Abbildung 2. a) Typische zeitaufgelöste Ausschnitte einer Fluoreszenzbildserie einer PSS/PAH-Kapsel ($N_{bi}=8$, Größe „L“) während der Aufnahme durch eine HeLa-Zelle. Die Bilder (Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzsignal und Hellfeldaufnahme) wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 120 s aufgenommen, sodass sich die Partikeltrajektorie bestimmen lässt (Maßstab: 5 µm). b) Aus den Mikroskopaufnahmen wurde das Rot/Gelb-Verhältnis der Fluoreszenzsignale I_r/I_g für jedes Bild bestimmt und gegen die Zeit t aufgetragen. Die Zeitpunkte, die den Bildern in (a) entsprechen, sind mit A–F markiert. $I_r/I_g \approx 2.5$ entspricht pH 7.4, $I_r/I_g \approx 1$ einem pH-Wert < 4.5 (Abbildung 1b). Der Azidifizierungszeitraum spiegelt sich in t_A wider, während der Zeitraum vom ersten Kontakt der Kapsel mit der äußeren Zellmembran (B; hohe Geschwindigkeit) bis zum Einsetzen des Azidifizierungsprozesses als $t_{P10\%}$ (rot markierte Fläche) bezeichnet und der Zeitraum bis zum Wendepunkt der Kurve als $t_{P50\%}$ definiert wird (D).

me (Bild A) wird durch jede Kapsel der neutrale/leicht alkalische pH-Wert des Mediums gemessen, was zu einem hohen, konstanten Wert für I_r/I_g führt. Der Zeitpunkt, zu dem eine Anlagerung an der äußeren Zellmembran erfolgt, ist mit t_C gekennzeichnet (Bild B). Nach der Internalisierung reduziert sich der lokale pH-Wert stufenweise (Bild C) wegen des aktiven Transports in mehr und mehr azidische Kompartimente, bis sich ein konstantes, sehr niedriges pH-Niveau einzustellen scheint. An diesem Punkt (Bild E) befindet sich die Kapsel in lysosomalen Strukturen.^[17] Eine Reduzierung des pH-Wertes unter 4.5 oder ein Transport in eine noch saurere Umgebung lassen sich mit dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff wegen mangelnder Empfindlichkeit in diesem Bereich nicht mehr nachvollziehen (Abbildung 1b). Aus Abbildung 2b geht hervor, dass der Ansäuerungsprozess nicht kontinuierlich abläuft (Bild D). Diese Beobachtung kann wahrscheinlich durch Fusionereignisse des die Kapsel enthaltenden Kompartimentes mit anderen (größeren) Vesikeln sehr niedrigen pH-Werts erklärt werden (eine Korrelation der Fusionereignisse mit dem Verlauf des pH-Werts des

Kapselvésikels ist in Abbildung SI-16 dargestellt). Zur Quantifizierung der $(I_r/I_g)(t)$ -Trajektorien wurde jeweils eine sigmoidale Anpassung berechnet, sodass die Azidifizierungsduer t_A und die Zeiträume $t_{P10\%}/t_{P50\%}$ zwischen dem ersten Kontakt des Partikels mit der äußeren Zellmembran (t_C) und dem jeweiligen Azidifizierungsgrad (10 % bzw. 50 %) definiert werden konnten (Abbildung 2 b sowie, für mehr Details, Abbildung SI-9).

Die Aufnahme von Mikrokapseln kann sich signifikant innerhalb unterschiedlicher Zelltypen und Kapselmaterialien unterscheiden.^[6,17] In vorausgegangenen Studien wurde bislang hauptsächlich die Menge aufgenommener Partikel innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens untersucht, während das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf der Quantifizierung verschiedener Azidifizierungsparameter individueller Partikel/Kapseln liegt. Während PSS/PAH- und DextS/PLArg-Kapseln durch einzelne Zellen unterschiedlich „verarbeitet“ werden (nicht bioabbaubar gegenüber bioabbaubar),^[22] ist der Internalisierungsmechanismus ähnlich, und beide Typen lassen sich letztlich in lysosomalen Strukturen wiederfinden.^[17] Zusätzlich zu den Unterschieden von t_A oder t_p bei verschiedenen Zelllinien ist die Azidifizierungsduer t_A vom verwendeten Kapselmaterial (PSS/PAH gegenüber DextS/PLArg) abhängig, während die Werte für $t_{P50\%}$ für beide Materialien vergleichbar sind und hauptsächlich von der Größe der Partikel abhängen (vgl. Werte für Kapseln der Größe „S“ und „L“). Insgesamt sind die Unterschiede bei HeLa-Zellen ausgeprägter als bei Phagozyten, wie z.B. bei aus Monozyten gereiften Makrophagen (MDM) oder aus Monozyten gereiften dendritischen Zellen (MDDC), die beide für eine rasche Phagozytose von Partikeln im Mikrometerbereich bekannt sind.

In der Folge wurden HeLa-Zellen ausgewählt, um die Abhängigkeit des Aufnahmeverhaltens von der Steifigkeit der Partikel (dargestellt in Abbildung 1c) zu untersuchen. Abbildung 3a zeigt, dass die Azidifizierungsduer t_A für nicht bioabbaubare Kapseln unabhängig von der Partikelgröße linear mit der Kapselsteifigkeit γ ansteigt, während es keinen solchen Zusammenhang für bioabbaubare Kapseln aus DextS/PLArg gibt. Anders ausgedrückt erfolgt für die verwendeten bioabbaubaren Kapseln der Übergang von der neutralen/leicht alkalischen, extrazellulären Umgebung in azidische Lysosomen schneller als für nicht bioabbaubare. Außerdem ist keine Abhängigkeit der Dauer des Azidifizierungsprozesses von der Kapselsteifigkeit erkennbar. Daraus könnte man schlussfolgern, dass die Verweildauer innerhalb der Vesikelkaskade während des Aufnahmeprozesses für beide Kapseltypen unterschiedlich ist. Im Unterschied dazu wird der Wert für $t_{P10\%}$, der den zeitlichen Rahmen zwischen dem ersten Zellkontakt und der beginnenden Azidifizierung kennzeichnet, deutlich durch die Kapselsteifigkeit beeinflusst: Für $\gamma < 5 \text{ N m}^{-1}$ erhöht sich $t_{P10\%}$ in erster Ordnung sogar linear mit steigender Steifigkeit. Die Azidifizierungsduer spiegelt nur den Ansäuerungsprozess des Partikelhaltigen Vesikels wider, während $t_{P10\%}$ und $t_{P50\%}$ den gesamten Aufnahmevergäng mit einschließen. Letzterer umfasst das Umschließen des Partikels durch die äußere Plasmamembran, das Abschnüren und Bilden eines endozytotischen Vesikels und die darauf folgende stufenweise Azidifizierung.

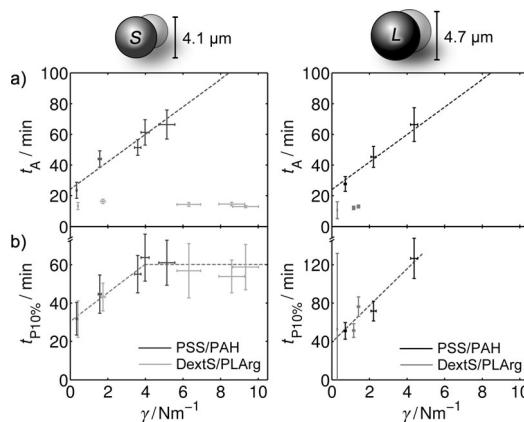


Abbildung 3. a) Azidifizierungsduer t_A und b) Zeitraum $t_{P10\%}$ zwischen dem ersten Zellkontakt und dem Beginn des Ansäuerungsprozesses für PSS/PAH- und DextS/PLArg-Kapseln unterschiedlicher Steifigkeit γ (durch Variation der Zahl an Polymerschichten N_{bi} ; Abbildung 1c) und unterschiedlichen mittleren Durchmessern (Größe „S“ und „L“), gemessen bei der Aufnahme durch HeLa-Zellen. Die Mediane von t_A oder $t_{P10\%}$ mit entsprechenden Konfidenzintervallen (y-Achse) sind gegen die mittleren Kapselsteifigkeiten $\gamma \pm$ Standardabweichung (x-Achse) aufgetragen (basierend jeweils auf mindestens 80 Messwerten (Zeitintervalle) und mehr als 40 Messpunkten für Steifigkeitswerte). Die gestrichelten Linien stellen Hilfslinien dar. Die auffällig großen Fehlerbalken in (b) für $t_{P10\%}$ und DextS/PLArg-Kapseln ($N_{bi} = 1$, Größe „L“) resultieren daher, dass die Kapseln sehr fragil sind, was die Bestimmung von t_C (Plasmamembrankontakt) erschwert.

Im Unterschied zu den Parametern $t_{P10\%}$ und $t_{P50\%}$, welche die Bestimmung des Kontaktzeitpunkts der Kapsel mit der Plasmamembran (t_C) erfordern, wird die Ansäuerungsperiode t_A ausschließlich über eine sigmoidale Anpassung an die experimentellen $I_r/I_g(t)$ -Trajektorien erzeugt und kann damit nicht durch fehlerhaftes Bestimmen von t_C verfälscht werden. Damit ist dieser Parameter als robuster und genauer bestimbar anzusehen, besonders bei hohen Zelldichten, bei denen vor der eigentlichen Aufnahme eines Partikels mehrfache Kontakte mit unterschiedlichen Zellen zu beobachten waren. Den Daten zufolge werden der eigentliche Aufnahmeprozess und der anschließende, endosomale Vesikeltransport stark von der Steifigkeit der Partikel beeinflusst, während die weitere Azidifizierung hauptsächlich durch die Chemie/Struktur der Partikel bestimmt wird.

Während der Endozytose und der damit verbundenen Verarbeitung innerhalb der Zelle vergrößert sich das Partikelhaltige Vesikel z. B. durch Fusion mit anderen (kleineren) Vesikeln kontinuierlich.^[23] Aus einer mechanistischen Perspektive entspricht diese Kaskade einem Sortievorgang. Partikel gelangen von einem Vesikel durch Fusion in ein anderes, wobei nach jedem Schritt ein verringelter pH-Wert messbar ist. Durch Fluoreszenzfärbung azidischer Vesikel konnten solche Fusionereignisse mit dem die pH-empfindlichen Kapsel enthaltenden Vesikel sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung SI-16). Man kann sich die Auswirkungen der Steifigkeit auf diesen Sortievorgang wie folgt vorstellen: Je flexibler ein Partikel aufgebaut ist, desto besser können sich seine Form und Größe dem Verlauf der vesikulären Kompartimente anpassen. Durch weniger deformierbare

(d.h. steifere) Partikel verzögert sich das Durchlaufen der Kaskade, da Veränderungen in der Vesikelform weniger schnell vollzogen werden können. Ein ähnliches Verhalten wurde für agglomerierte und damit weniger „flexible“ als ausreichend dispergierte Partikel beobachtet.^[23] Die vorliegenden Daten lassen den eindeutigen Schluss zu, dass der Transport von Partikeln von der äußeren Plasmamembran bis hin zu den Lysosomen von den mechanischen Eigenschaften der Partikel, besonders von ihrer Steifigkeit, abhängt.

Man könnte vermuten, dass diese Erkenntnisse im Umkehrschluss bedeuten, dass der gleiche Partikeltyp mit steigernder Deformierbarkeit von Zellen besser aufgenommen wird. Dazu müssten die Daten aus Abbildung 3b mit der Steifigkeit verschiedener Zelltypen in Beziehung gesetzt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich verschiedene Typen von Zellen im Hinblick auf ihre Steifigkeitswerte signifikant unterscheiden. Beispielsweise lassen Messungen darauf schließen, dass Zellen karzinomatösen Ursprungs weicher sind als Zellen des gleichen Typs gesunden Gewebes (MCF7 gegenüber MCF10).^[24] Mithilfe optischer Pinzetten lassen sich Richtwerte für die mittlere Steifigkeit von Zellen in Suspension erhalten,^[24] während sich durch AFM-Methoden die Steifigkeit adhärenter Zellen auf lokaler Ebene ermitteln lässt.^[25,26] Vom weichsten Bereich um die nukleare Region herum nimmt die Steifigkeit typischerweise zu den Randbereichen hin zu.^[26] Für die in dieser Studie verwendeten Zellen finden sich folgende Literaturwerte:

HeLa: (105 ± 17) kPa^[27] und (13 ± 7) kPa,^[28] A549: (12 ± 5) kPa,^[29] MDM: (44 ± 9) kPa (Regionen mit Podosomen) gegenüber (8 ± 2) kPa (Podosom-freie Regionen)^[30] und HUVEC: (6 ± 5) kPa.^[26]

Vergleicht man diese Werte mit den in Abbildung SI-15 dargestellten Daten, ist keine eindeutige Korrelation zwischen den Werten für t_p und den Elastizitätsmoduln E der verwendeten Zellen aus der Literatur ersichtlich. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Daten der unterschiedlichen Studien nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Zukünftige AFM-Experimente sind nötig, um die Elastizitätsmoduln unter kontrollierten Bedingungen zu bestimmen.

Es konnte gezeigt werden, wie die zelluläre Partikelaufnahme von einfachen physikalisch-chemischen Parametern abhängt, indem eine geringe Steifigkeit die Partikelaufnahme erleichtert. Um ein grundlegendes Verständnis aller Abhängigkeiten zu erlangen, bedarf es Partikel mit definierter Wechselwirkung auf zellulärer Ebene. Weiterhin könnte die eingeführte Methodik dabei helfen, bestimmte endozytische Mechanismen, die mit der lysosomalen Azidifizierung verknüpft sind, besser zu verstehen.

Experimentelles

SNARF-1-gefüllte, pH-empfindliche Polyelektrolytkapseln aus unterschiedlichen Polymeren (bioabbaubar/nicht bioabbaubar) und mit unterschiedlichen Steifigkeitswerten (resultierend aus einer variierenden Zahl von adsorbierten Polyelektrolytschichten) wurden, wie bereits in der Literatur beschrieben, hergestellt.^[17,21,22] Kraftspektroskopiemessungen wurden in wässriger Lösung an einem Nanowizard-I-Gerät von JPK Instruments durchgeführt. Die Kapselaufnahmevereekte (in HeLa-, A549-, MDM-, MDDC-, SH-SY5Y- und

HUVEC-Zellen) wurden mithilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM META 510 von Zeiss) bei einer zeitlichen Auflösung von $\Delta t < 2$ min aufgezeichnet. Bildanalyse und Kapseltracking erfolgten mit Matlab (Mathworks). Für eine ausführliche Beschreibung sei auf die Hintergrundinformationen verwiesen.

Eingegangen am 2. Oktober 2014
Online veröffentlicht am 5. Dezember 2014

Stichwörter: Biosensoren · Mechanische Eigenschaften · Nanopartikel · Polymerkapseln

- [1] S. Parveen, R. Misra, S. K. Sahoo, *Nanomed. Nanotechnol.* **2012**, 8, 147.
- [2] P. Rivera-Gil et al., *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 743.
- [3] a) W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 145; b) S. L. Zhang, J. Li, G. Lykotrafitis, G. Bao, S. Suresh, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 419.
- [4] L. C. Stoehr, E. Gonzalez, A. Stampfl, E. Casals, A. Duschl, V. Puntes, G. J. Oostingh, *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, 8, 3.
- [5] a) A. Muñoz Javier et al., *Small* **2006**, 2, 394; b) D. Hühn et al., *ACS Nano* **2013**, 7, 3253.
- [6] A. Muñoz Javier et al., *Adv. Mater.* **2008**, 20, 4281.
- [7] R. Palankar, B.-E. Pinchasik, S. Schmidt, B. G. De Geest, A. Fery, H. Möhwald, A. Skirtach, M. Delcea, *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 1175.
- [8] X. Yi, X. H. Shi, H. J. Gao, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, 107, 098101.
- [9] X. Banquy, F. Suarez, A. Argaw, J. M. Rabanel, P. Grutter, J. F. Bouchard, P. Hildgen, S. Giasson, *Soft Matter* **2009**, 5, 3984.
- [10] W. Liu, X. Zhou, Z. Mao, D. Yu, B. Wang, C. Gao, *Soft Matter* **2012**, 8, 9235.
- [11] J. Borges, J. F. Mano, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 8883.
- [12] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2201; *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2323.
- [13] a) H. G. Zhu, E. W. Stein, Z. H. Lu, Y. M. Lvov, M. J. McShane, *Chem. Mater.* **2005**, 17, 2323; b) C. S. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3762; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3850.
- [14] a) O. Shchepelina, V. Kozlovskaya, E. Kharlampieva, W. Mao, A. Alexeev, V. V. Tsukruk, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, 31, 2041; b) A. Yashchenok, B. Parakhonskiy, S. Donatan, D. Kohler, A. Skirtach, H. Möhwald, *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 1223; c) O. Shimoni, Y. Yan, Y. Wang, F. Caruso, *ACS Nano* **2013**, 7, 522.
- [15] C. Gao, E. Donath, S. Moya, V. Dudnik, H. Möhwald, *Eur. Phys. J. E* **2001**, 5, 21.
- [16] F. Dubreuil, N. Elsner, A. Fery, *Eur. Phys. J. E* **2003**, 12, 215; A. Fery, R. Weinkamer, *Polymer* **2007**, 48, 7221.
- [17] L. Kastl et al., *ACS Nano* **2013**, 7, 6605.
- [18] U. Reibetanz, M. H. A. Chen, S. Mutukumaraswamy, Z. Y. Liaw, B. H. L. Oh, S. Venkatraman, E. Donath, B. Neu, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 1779.
- [19] L. L. del Mercato, A. Z. Abbasi, W. J. Parak, *Small* **2011**, 7, 351.
- [20] O. Kreft, A. Muñoz Javier, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 4471.
- [21] P. Rivera-Gil, M. Nazarenus, S. Ashraf, W. J. Parak, *Small* **2012**, 8, 943.
- [22] P. Rivera-Gil, S. D. Koker, B. G. De Geest, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2009**, 9, 4398.
- [23] C. Brandenberger, C. Mühlfeld, Z. Ali, A.-G. Lenz, O. Schmid, W. J. Parak, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, *Small* **2010**, 6, 1669.
- [24] B. Lincoln, H. M. Erickson, S. Schinkinger, F. Wottawah, D. Mitchell, S. Ulwick, C. Bilby, J. Guck, *Cytometry Part A* **2004**, 59A, 203.

- [25] J. Domke, S. Dannöhl, W. J. Parak, O. Müller, W. K. Aicher, M. Radmacher, *Colloids Surf. B* **2000**, *19*, 367.
- [26] T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. A. Chizhik, R. I. Zhdanov, *Micron* **2007**, *38*, 824.
- [27] A. Berquand, A. Holloschi, M. Trendelenburg, P. Kioschis, *Microsc. Today* **2010**, *19*, 34.
- [28] J. Ren, S. Yu, N. Gao, Q. Zou, *Phys. Rev. E* **2013**, *88*, 052711.
- [29] L. Xiao, M. Tang, Q. Li, A. Zhou, *Anal. Methods* **2013**, *5*, 874.
- [30] A. Labernadie, C. Thibault, C. Vieu, I. Maridonneau-Parini, G. M. Charrière, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21016.