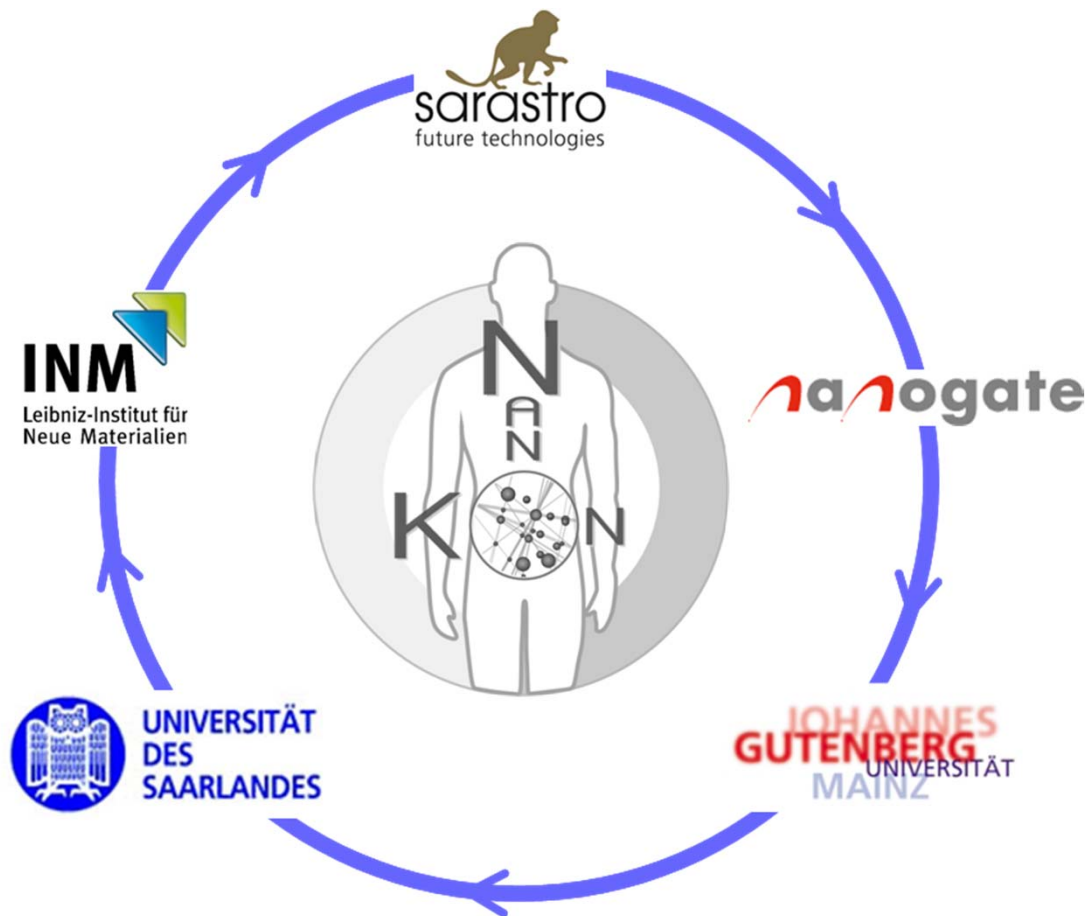


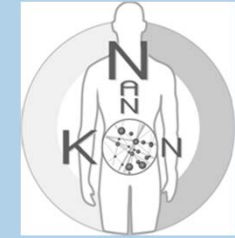
NanoKon - Systematische Bewertung der Gesundheitsauswirkungen nanoskaliger Kontrastmittel



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

PTJ
Projekträger Jülich
Forschungszentrum Jülich

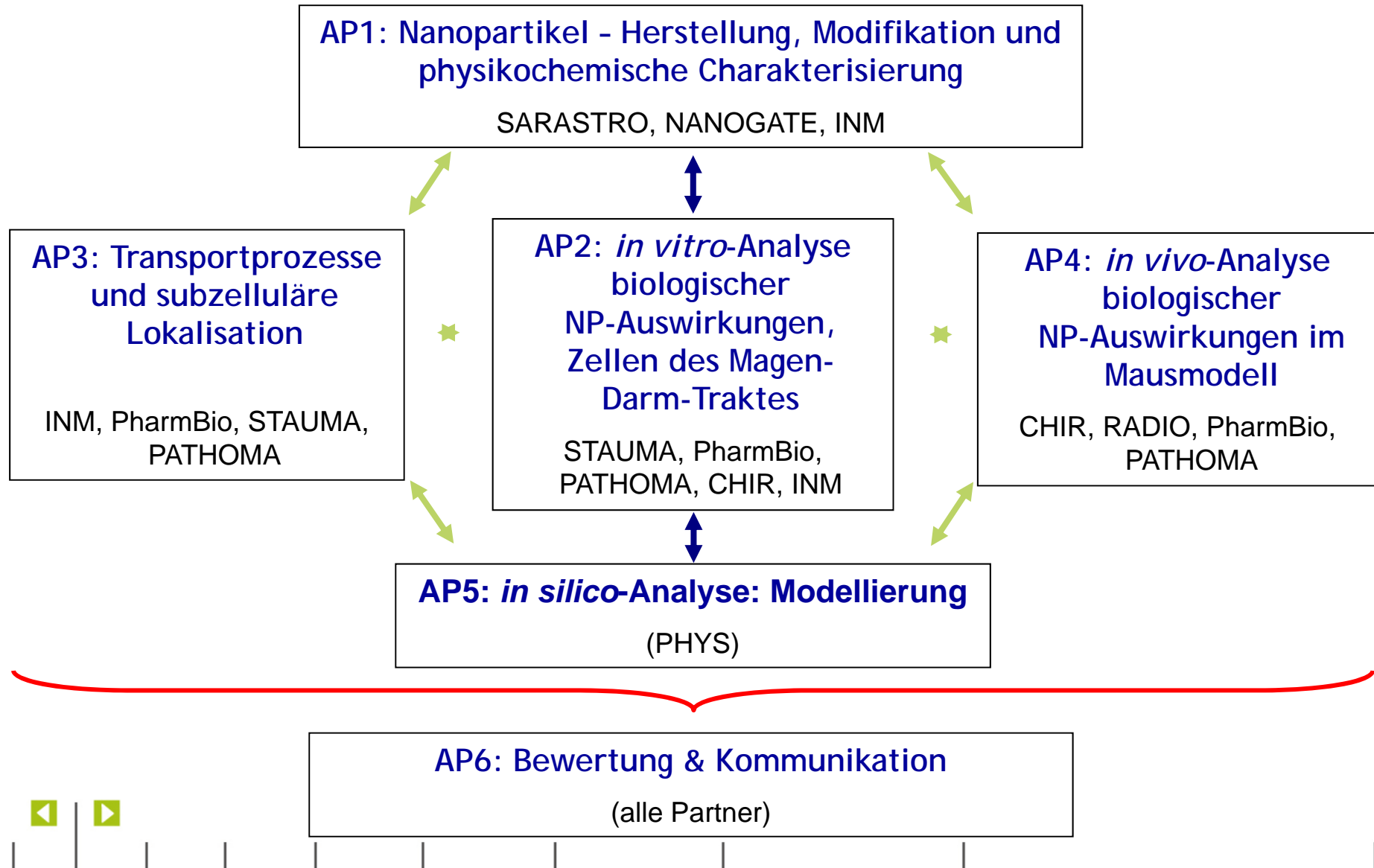
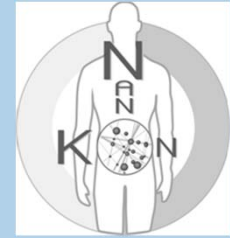


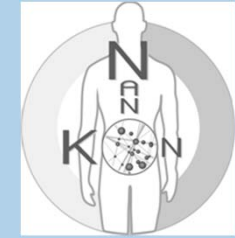


NanoKon - im Überblick

- Hintergrund:
Hohes Anwendungspotenzial nanoskaliger Kontrastmittel im Bereich der medizinischen Diagnostik
- Ziel:
Identifizierung und Verständnis NP-induzierter Effekte auf molekularer/mechanistischer Ebene
Systematische Bewertung der gesundheitlichen Auswirkungen von NP
Entwicklung von Referenzsystemen zur Evaluierung von NP-Effekten
- Fokus:
Gastro-Intestinaltrakt
- Hypothese:
Die NP-Eigenschaften (Oberflächenmodifikation) bestimmen den biologischen Effekt auf zellulärer Ebene sowie im gesamten Organismus
- Lösungsweg:
Systematische *in vitro*-, *in vivo*- und *in silico*-Untersuchungen
Korrelation von Partikeleigenschaften und biologischen Effekten







AP 1: Nanopartikel-Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung

Ziel: Herstellung und Charakterisierung von Nanopartikeln mit Kern-Schale Struktur, intrinsischer Lumineszenz und paramagnetischen Eigenschaften

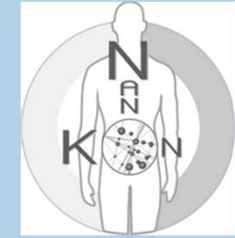
Kern-Schale Partikel				
Primär-referenz	Sekundär-referenz	Kern	Schale	Oberflächen-modifikation
$n \text{ Fe}_x\text{O}_y$	$n \text{ Fe}_x\text{O}_y$	$n \text{ Fe}_x\text{O}_y$	Gd	Liganden: sterisch/ geladen
$\mu \text{ BaSO}_4$	$n \text{ Fe}_x\text{O}_y$	$n \text{ BaSO}_4$	Tb	Liganden: sterisch/ geladen
	$n \text{ BaSO}_4$		Eu	Liganden: sterisch/ geladen

Partikeleigenschaften auch unter physiol. Bedingungen:

- ☐ Elementzusammensetzung
- ☐ Morphologie
- ☐ Größe und Größenverteilung
- ☐ Kristallinität
- ☐ Oberflächenpotenzial
- ☐ spektroskop. Eigenschaften
- ☐ Oberflächenmodifikation
- ☐ Agglomerationsverhalten
- ☐ Löslichkeit
- ☐ Proteinadhäsion
- ☐ Sterilität
- ☐ Endotoxingehalt

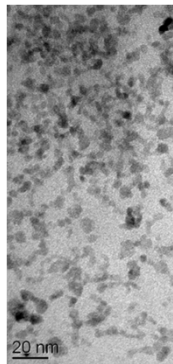


Weitere Informationen, Poster: Jung, Cavelius



AP 1: Materialtypen

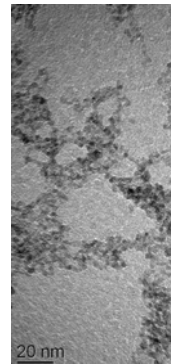
Primärreferenz (kommerziell)



Partikelgröße: 5 nm (TEM)
D₅₀-Wert: 90-150 nm (DLS)
IEP: pH 4; pH 12,5
pH-Stabilität: pH 7-11
Stabilität unter physiol.
Bedingungen: nein
Fluoreszenzmarkierung
möglich: nein

nano Fe_xO_y

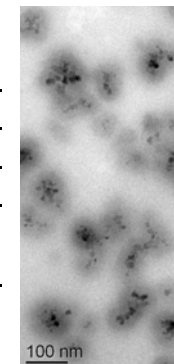
Sekundärreferenz



Partikelgröße: 3 nm (TEM)
D₅₀-Wert: 15-25 nm (DLS)
IEP: < pH 1, > pH 12
pH-Stabilität pH 3 - pH 12
Stabilität unter physiol.
Bedingungen: ja
Fluoreszenzmarkierung
möglich: ja

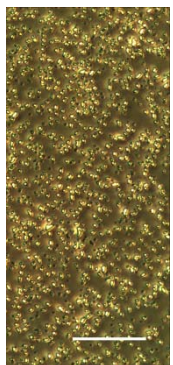
nano Fe_xO_y

Kern-Hülle Partikel



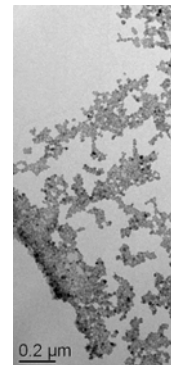
Partikelgröße: 10-15 nm (TEM)
D₅₀-Wert: 20-30 nm (DLS)
IEP: < pH 1, > pH 12
pH-Stabilität pH 7-11
Stabilität unter physiol.
Bedingungen: ja
Fluoreszenzmarkierung
möglich: ja

Fe_xO_y@SiO₂



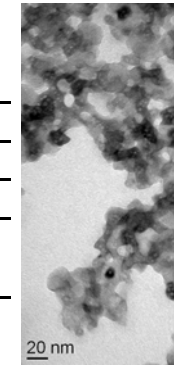
Partikelgröße: 2 μm (LM)
D₅₀-Wert: -- nm (DLS)
IEP: pH 2; pH 12,5
pH-Stabilität: pH 6-10,5
Stabilität unter physiol.
Bedingungen: nein
Fluoreszenzmarkierung
möglich: nein

μ BaSO₄



Partikelgröße: 25 nm (TEM)
D₅₀-Wert: 20-25 (DLS)
IEP: < pH 1, pH 4, > pH 12
pH-Stabilität pH 5,6 - 12
Stabilität unter physiol.
Bedingungen: nein
Fluoreszenzmarkierung
möglich: nein

nano BaSO₄

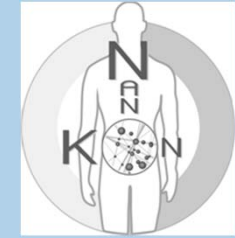


Partikelgröße: 25-30 nm (TEM)
D₅₀-Wert: 30-35nm (DLS)
IEP: < pH 1, pH 4, > pH 12
pH-Stabilität pH 1,3 - 12
Stabilität unter physiol.
Bedingungen: ja
Fluoreszenzmarkierung
möglich: ja

BaSO₄@SiO₂



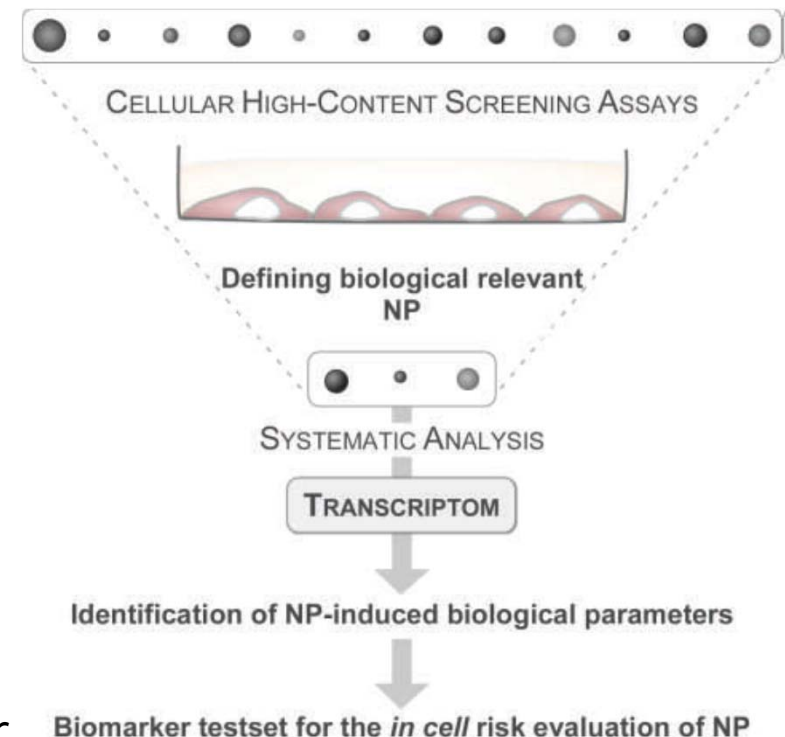
Weitere Informationen, Poster: Jung, Cavelius



AP 2: *in vitro*-Analyse der NP-Auswirkungen, Identifizierung molekularer Wirkmechanismen

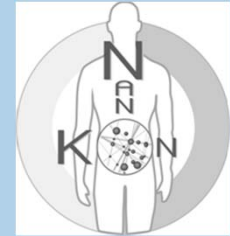
Ziel: mechanistische Aufklärung potenzieller toxikologischer Effekte, Identifizierung biologischer Indikatoren zur standardisierten Bewertung von NP

- Einsatz zell-basierter Assays unter Beachtung der Partikeleigenschaften
- Zelluläre Hochdurchsatzanalyse „High-Content Screening“:
Mikroskopie-basiert: Cellomics® ArrayScan-Vti
Impedanz-basiert: ECIS
- Transkriptomanalyse:
Affymetrix Microarray-Plattform
- Identifizierung von Wirkmechanismen und Schlüsselfaktoren (Expression und Aktivität regulatorischer Proteine)
- Überprüfung der *in vivo*-Relevanz identifizierter Proteine aus Biopsiematerial)



Weitere Informationen, Poster: Astanina, Docter, Kasper

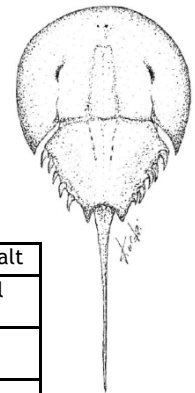
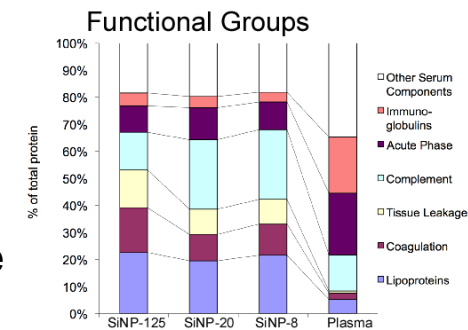
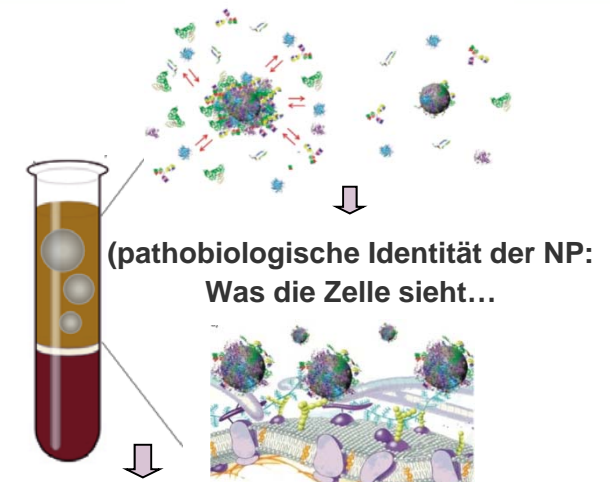
AP2: Analyse der Nanopartikel-Protein Korona Bestimmung des Endotoxingehaltes



- Faktoren: physiko-chemische Eigenschaften der NP
Größe und Ladung der Proteine
- Die Korona spiegelt nicht die Mengenverhältnisse der Proteine in der biologischen Umgebung wider und bildet sich extrem schnell (<1 min)
- Nachweis der Protein-Korona mittels LC-MS

Publikation: Tenzer et al, ACS Nano 2011

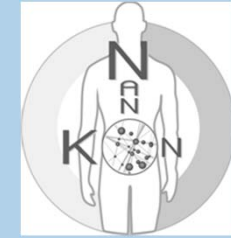
- Endotoxine beeinflussen die Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Assays und deshalb die Risikobewertung sowie die Zulassung von NP für biomed. Anwendungen
- Testdurchführung in Anlehnung an European Pharmacopoeia und ISO 29701:2010



Probe	Endotoxin-Gehalt
FexOy Primärreferenz	< 0.03 EU/ml
BaSO4 Primärreferenz	0.24 EU/ml
FexOy Sekundärreferenz	≥ 0.5 EU/ml
FexOy@SiO2 a fluoreszenzmarkiert	0.24 EU/ml
FexOy@SiO2 b fluoreszenzmarkiert	≥ 0.5 EU/ml

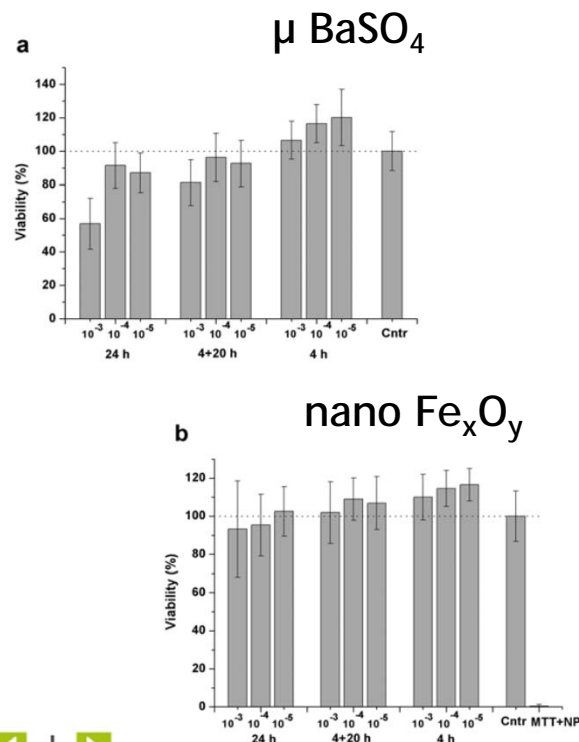


Weitere Informationen, Poster: Docter, Kucki

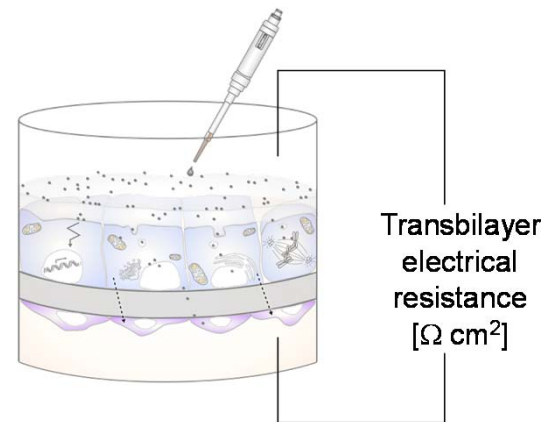
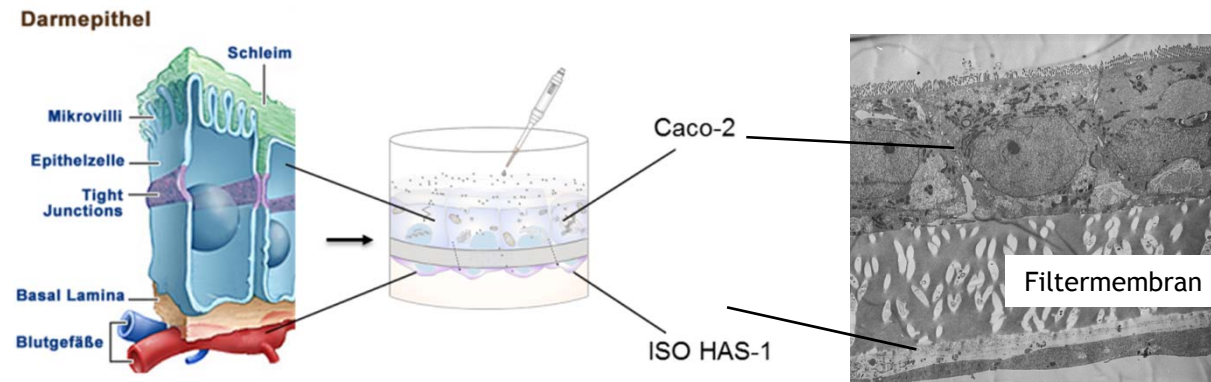


AP2: *in vitro*-Analyse der biologischen Auswirkungen

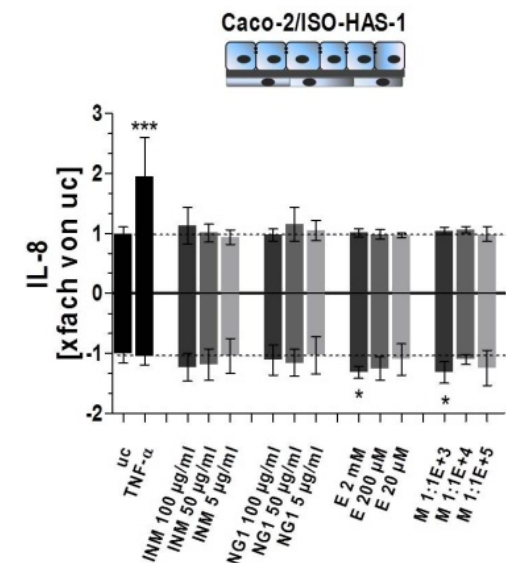
Zytotoxizität gegenüber
Zellen in Monokultur
(HMEC-1)



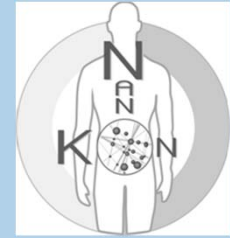
in vitro Kokulturmodell der intestinalen Barriere



TER erhöht sich minimal
nach 24h NP-Exposition

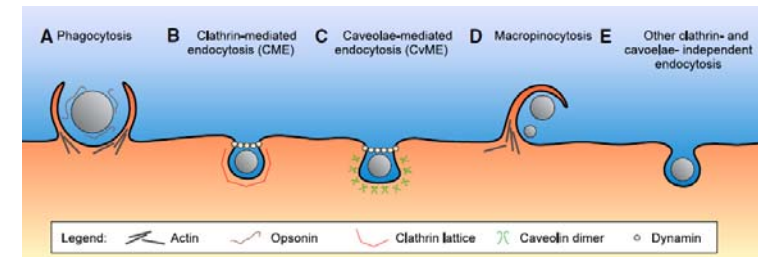


AP 3: Transportprozesse und subzelluläre Lokalisation

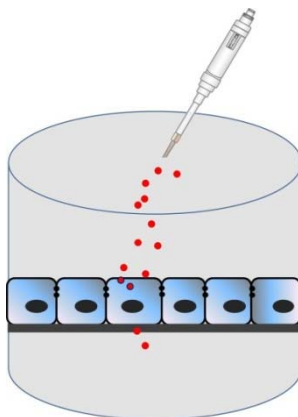
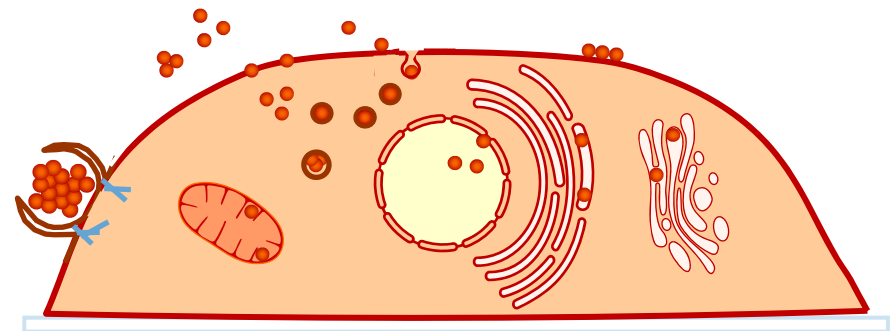


Ziel: Identifizierung zellulärer Aufnahmeprozesse und Aufklärung der subzellulären Lokalisation, Korrelation mit dem entzündlichen Potenzial und der *in vivo*-Situation

- Mechanismen der Partikelaufnahme
- Intrazelluläre Lokalisation
- Mikroinjektion und Analyse der Partikelverteilung
- Intrazellulärer Partikeltransport (AP5)
- Transcytose von Nanopartikeln

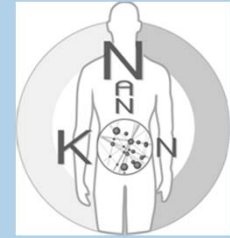


[Hillaireau et. al. 2009]



Weitere Informationen, Poster: Astanina, Kucki, Kasper

AP 3: mikroskopische Methoden und subzelluläre Lokalisation



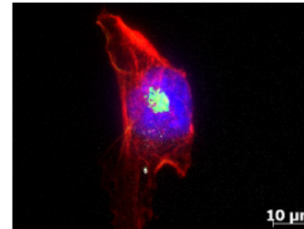
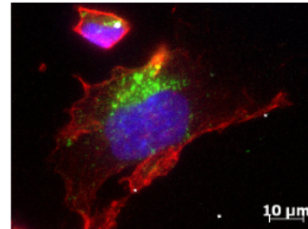
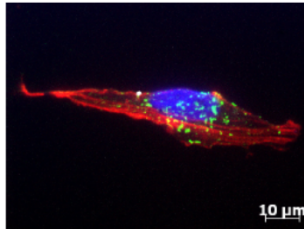
HMEC-1

EEA1

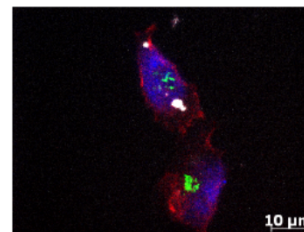
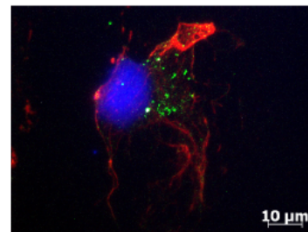
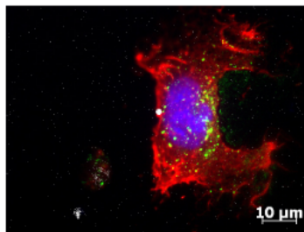
LAMP1

GM130

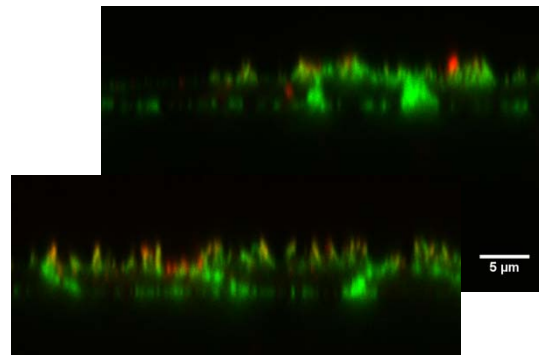
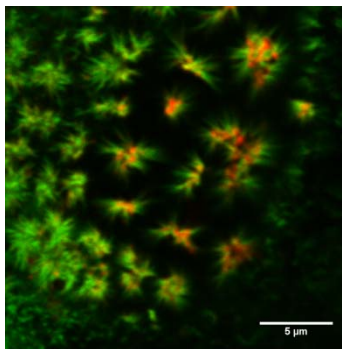
NG Atto



INM Atto



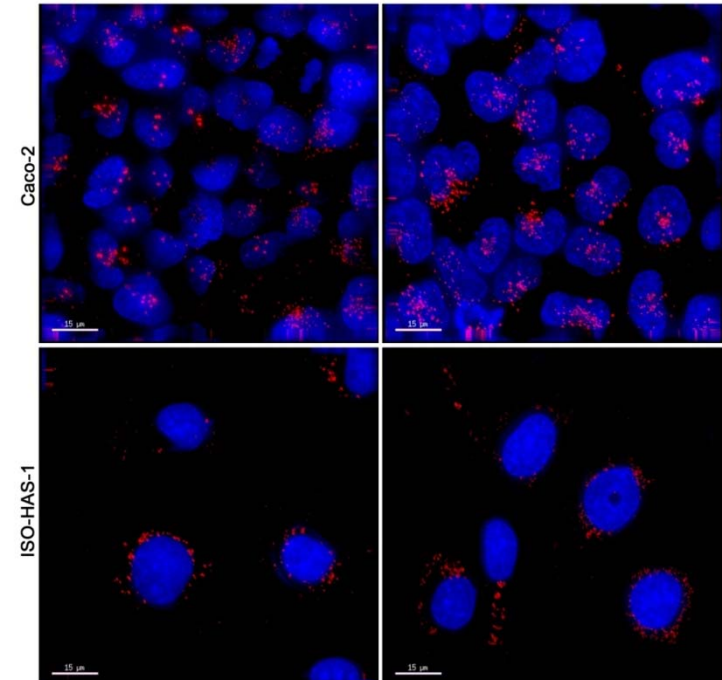
Caco-2



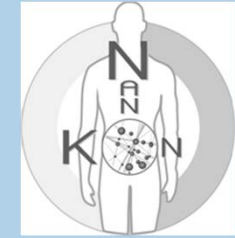
Kokultur Caco-2 / ISO-HAS-1

INM

NG1



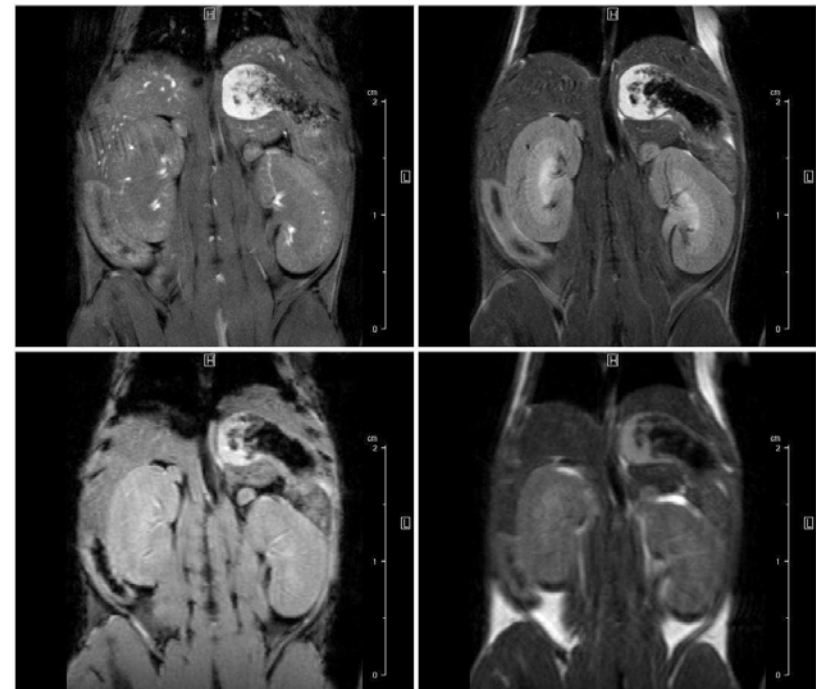
Weitere Informationen, Poster: Astanina, Kasper, Kucki



AP 4: NP-Auswirkungen im Mausmodell (*in vivo*-Analyse)

Ziel: Analyse der Akkumulation und Wirkung der NP in verschiedenen Organsystemen

- Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung der NP im Mausmodell und Kolitismodell
- Methoden:
Magnetresonanztomographie (9,4 Tesla)
Intravitalfluoreszenzmikroskopie
Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Analyse zur Partikeldetektion in Gewebeproben
- Zelluläre und molekulare Analyse der NP-Auswirkungen auf das gesunde und entzündete Gewebe des Magen-Darm-Traktes
- Methoden:
histologische und immunhistochemische Analyse
Identifizierung relevanter Zelltypen

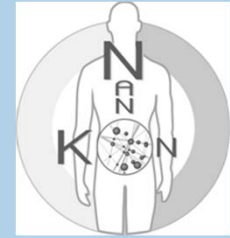


MRT-Aufnahmen des Abdomens eines gesunden Tieres nach Applikation von Fe_xO_y NP. A) T1, B) T2 C) und D) parametrische Bilder der Relaxometrie.



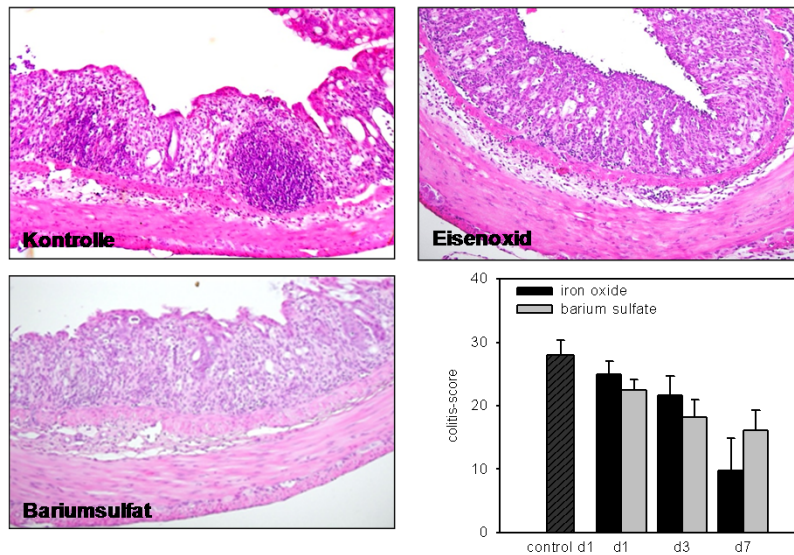
Weitere Informationen, Poster: Müller

AP 4: *in vivo*-Analyse der Aufnahme, Verteilung und Toxizität nanoskaliger Kontrastmittel

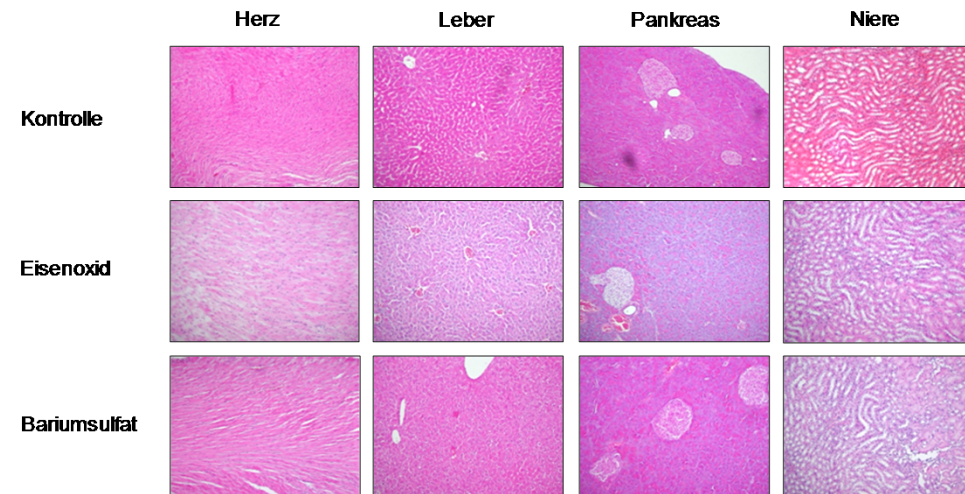


Toxizitätsanalyse Primärreferenzen

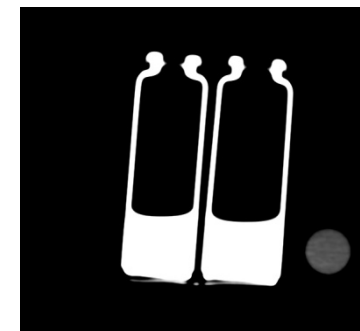
Kolitis-Score



Organmorphologie



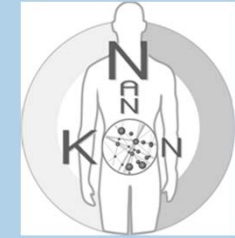
→ keine toxische Wirkung der Primärreferenzen
Eisenoxid und Bariumsulfat



n BaSO₄ im CT



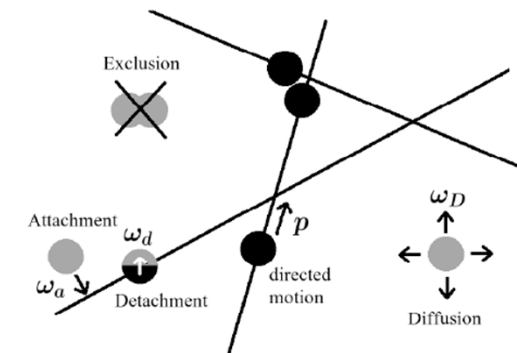
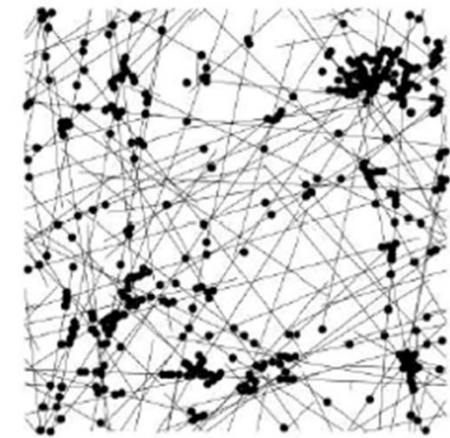
Weitere Informationen, Poster: Müller



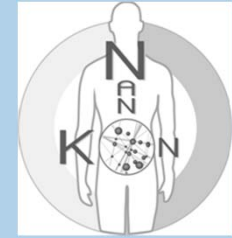
AP 5: *in silico*-Analyse: stochastische Modellierung des NP-Transports

Ziel: Modellierung intrazellulärer Transportprozesse und der Aggregation von NP

- Entwicklung von Programmodulen zur Nutzung von Mikroskopiedaten: Vesikeltracking, Rekonstruktion des Zytoskeletts & der Zellmembran
- Charakterisierung der Partikeldynamik und der Struktur des Zytoskeletts aus Live-Cell Imaging Verfahren
- Entwicklung eines stochastischen Modells zur Beschreibung des intrazellulären Transports von NP und der Dynamik des Zytoskeletts
- Bestimmung des Einflusses von NP Agglomeraten auf intrazelluläre Transportprozesse
- Etablierung des Zusammenhangs zwischen Aufnahme von NP und subzellulärer Verteilung durch Anpassung der Randbedingungen



Weitere Informationen, Poster: Thewes



AP 5: *in silico*-Analyse: Modellierung des NP-Transports

Entwicklung des Interfaces Mikroskopie vs. *in silico* Analyse:

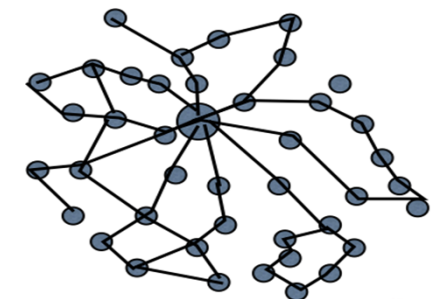
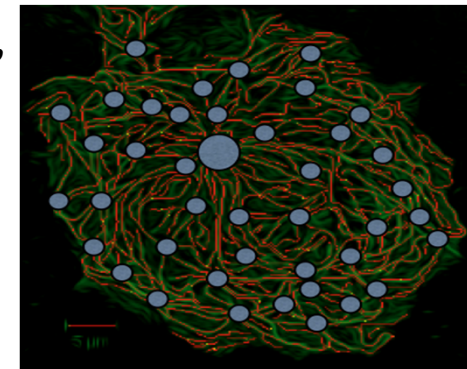
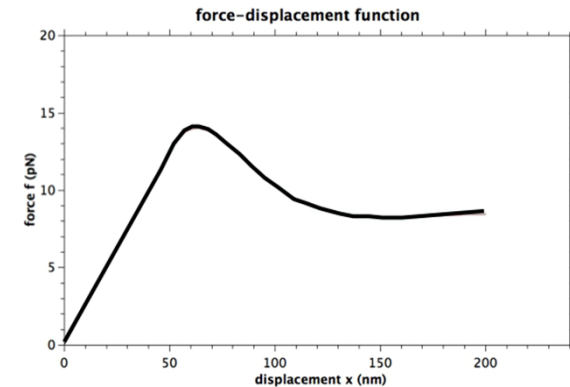
- maßgeschneiderte Algorithmen zum Partikel-Tracking
- Kostenfunktion für Signalcharakteristika
- Optimierung: hohe Identifikationsrate für Partikeltrajektorien

Modellierung der Filamentdynamik:

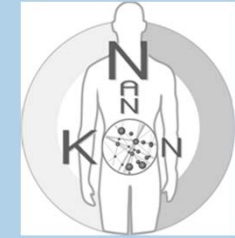
- Dynamische Stabilisierung von MT: Lokalisation an der Zellmembran, Reduktion der Polymerisationsraten
- Übergänge zur Depolymerisation werden durch langsames Wachstum induziert

Lokalisierungsphänomene:

- Lokalisierung von Partikeln an Grenzflächen und Verzweigungspunkten
- Skalenfreies Referenznetzwerk:
Einfluss des Verzweigungsgrades auf die Transportkapazität
- Derzeit: Zusammenhang zwischen Netzwerkdynamik und Clustering

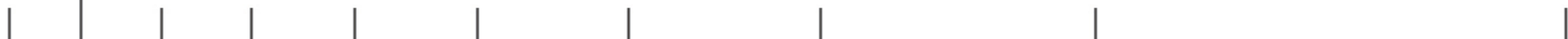
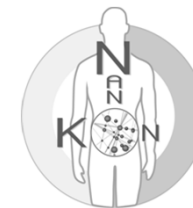
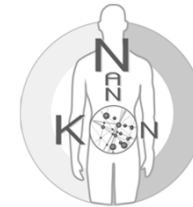


Weitere Informationen, Poster: Thewes

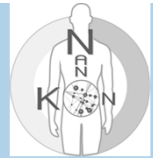


AP 6: Bewertung und Kommunikation

- Standardisierung der im Projekt eingesetzten Methoden
- Erstellung von SOPs (nach QM-Vorlage) mit entsprechender Kodierung
Abstimmung mit DaNa und Veröffentlichung
- Entwicklung eines Referenzsystems zur Evaluierung von NP-Effekten
- Selektion biologischer Parameter zur Bewertung der Materialien
- Weiterentwicklung in eine Plattform zur Riskobewertung
- Publikation in Fachzeitschriften, Teilnahme an Tagungen, Teilnahme an und Veranstaltung von Workshops
- Weitergabe relevanter Erkenntnisse und des aktuellen Stand an DaNa



NanoKon - Partner



Dipl.-Chem.
Hermann Schirra



Entwicklung und Produktion nanotechnologischer Produkte



Dr. R. Danzebrink



Dr. A. Kraegeloh



Nano Zell Interaktionen



Prof. R. Stauber

Molekulare u.
Zelluläre
Onkologie



**Pathomechanismen in Onkologie
und regenerativer Medizin**



Prof. A. K. Kiemer

Pharmazeutische
Biologie



**Entzündungsprozesse auf
molekularer und zellulärer Ebene**



Prof. L. Santen

Theoretische
Physik



Stochastische Transportprozesse



Prof. M. Menger

Klinisch-
Experimentelle
Chirurgie



**Entzündungsbiologie, vaskuläre
Pathophysiologie, Tumorbologie**



Prof. C. J. Kirkpatrick

Pathologie



**Anatomisch pathologische
Diagnostik, investigative
Pathologie, Biomaterialien**



Prof. A. Bücker

Diagnostische und
Interventionelle
Radiologie



**Bildgebung in Diagnostik und
Forschung**