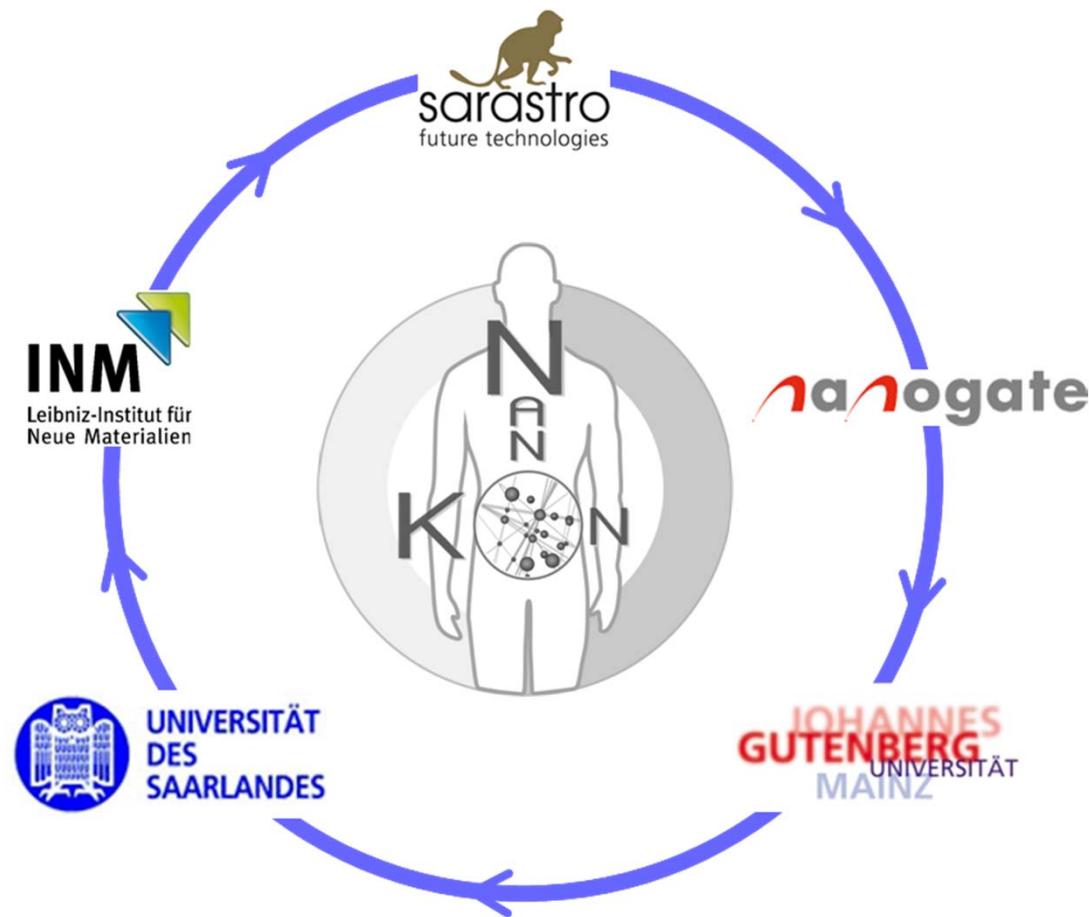


NanoKon - Systematische Bewertung der Gesundheitsauswirkungen nanoskaliger Kontrastmittel

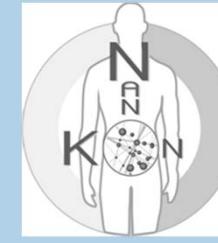


Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

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

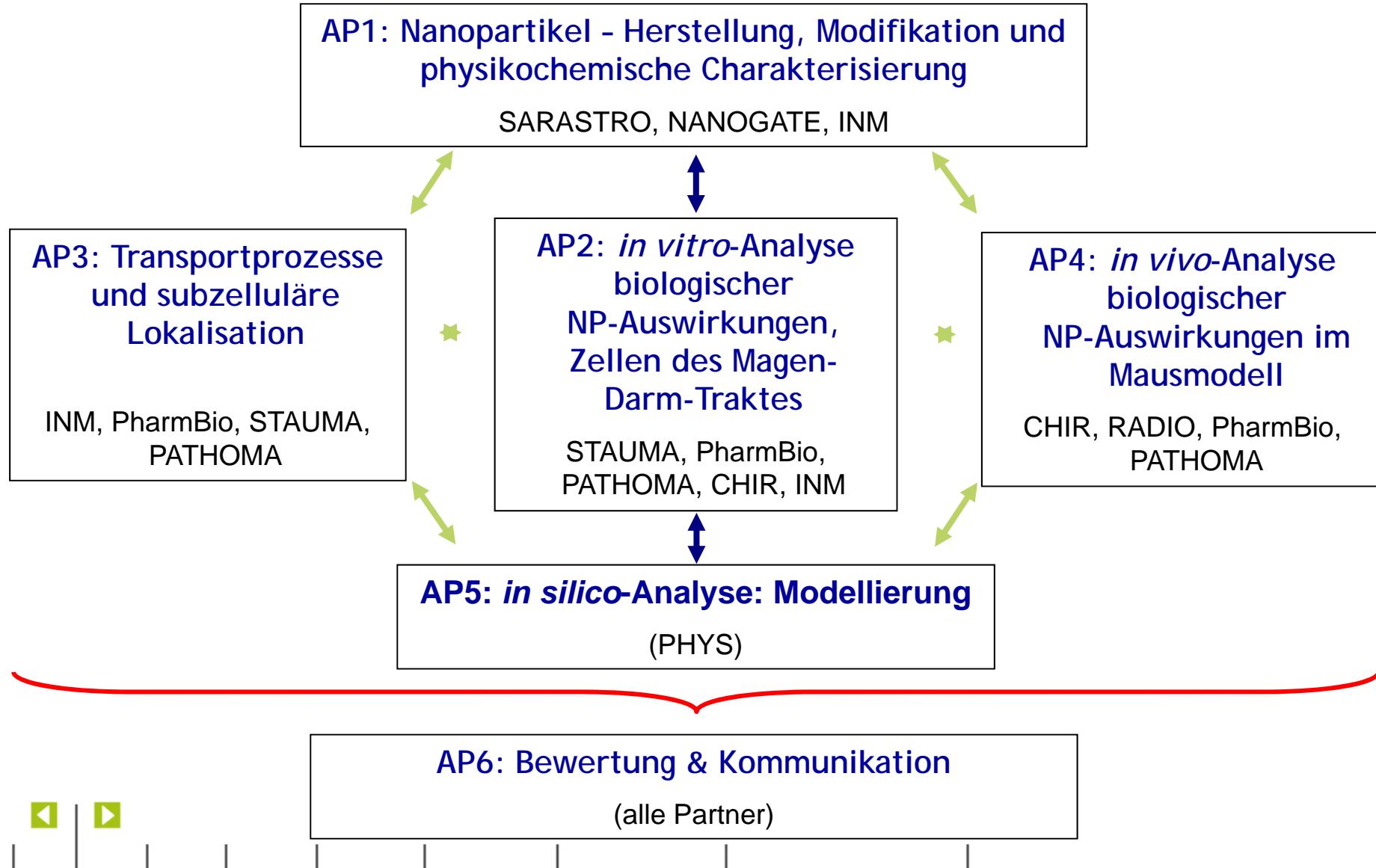
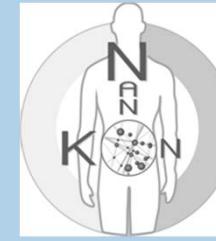
- Lösungsweg:

Systematische *in vitro*-, *in vivo*- und *in silico*-Untersuchungen

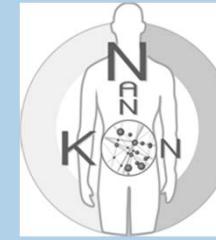
Korrelation von Partikeleigenschaften und biologischen Effekten



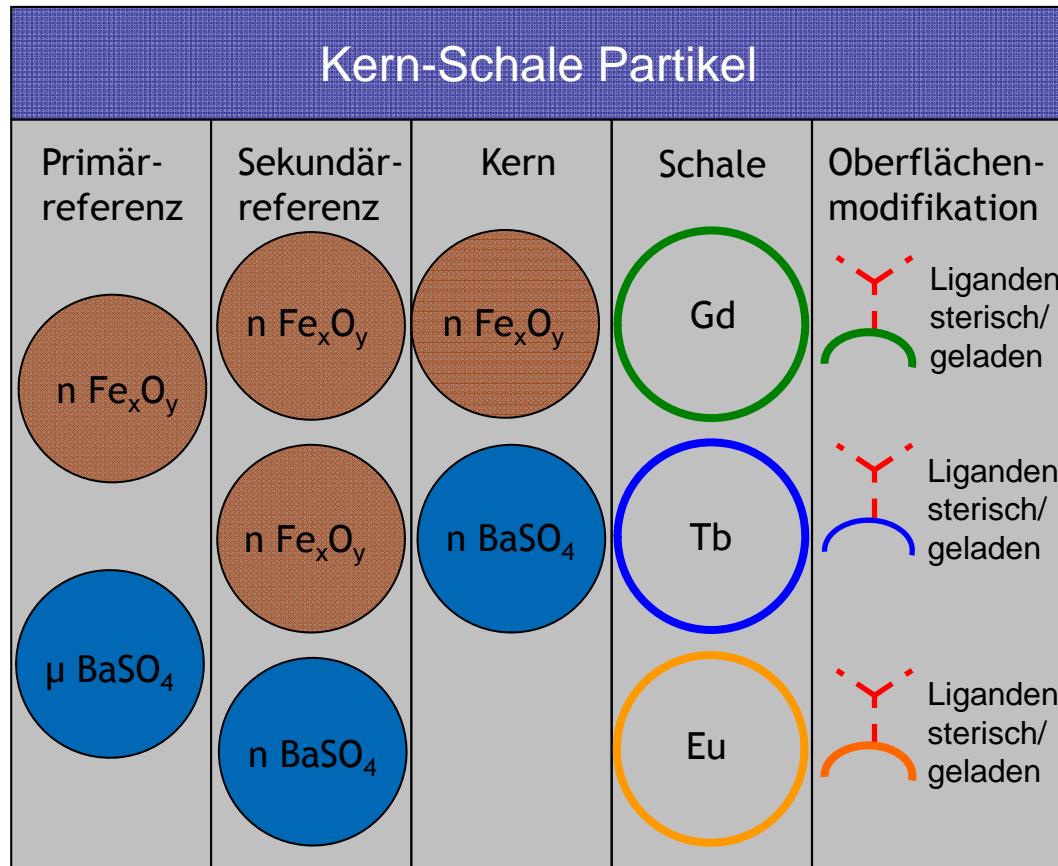
NanoKon: Arbeitspakte



AP 1: Nanopartikel-Herstellung, Modifikation und physikochemische Charakterisierung



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



Partikeleigenschaften auch unter physiol. Bedingungen:

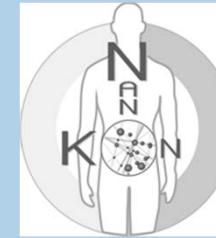
- Elementzusammensetzung
- Morphologie
- Größe und Größenverteilung
- Kristallinität
- Oberflächenpotenzial
- spektroskop. Eigenschaften
- Oberflächenmodifikation

- Agglomerationsverhalten
- Löslichkeit
- Proteinadhäsion
- Sterilität
- Endotoxingehalt

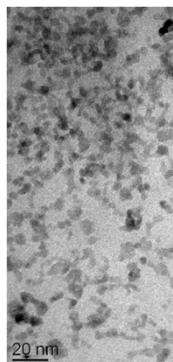


Weitere Informationen, Poster: Jung, Cavelius

AP 1: Materialtypen



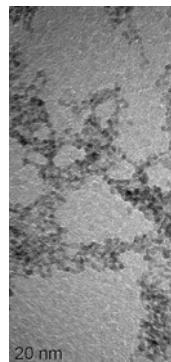
Primärreferenz (kommerziell)



nano Fe_xO_y

Partikelgröße: 5 nm (TEM)
D_{50} -Wert: 90-150 nm (DLS)
IEP: pH 4; pH 12,5
pH-Stabilität: pH 7-11
Stabilität unter physiol. Bedingungen: nein
Fluoreszenzmarkierung möglich: nein

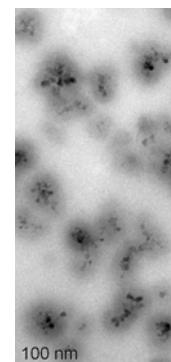
Sekundärreferenz



nano Fe_xO_y

Partikelgröße: 3 nm (TEM)
D_{50} -Wert: 15-25 nm (DLS)
IEP: < pH 1, > pH 12
pH-Stabilität pH 3 - pH 12
Stabilität unter physiol. Bedingungen: ja
Fluoreszenzmarkierung möglich: ja

Kern-Hülle Partikel



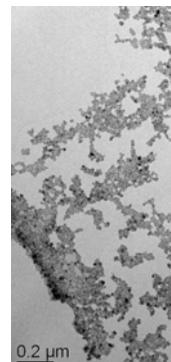
$\text{Fe}_x\text{O}_y@\text{SiO}_2$

Partikelgröße: 10-15 nm (TEM)
D_{50} -Wert: 20-30 nm (DLS)
IEP: < pH 1, > pH 12
pH-Stabilität pH 7-11
Stabilität unter physiol. Bedingungen: ja
Fluoreszenzmarkierung möglich: ja



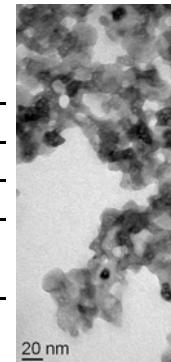
μBaSO_4

Partikelgröße: 2 μm (LM)
D_{50} -Wert: -- nm (DLS)
IEP: pH 2; pH 12,5
pH-Stabilität: pH 6-10,5
Stabilität unter physiol. Bedingungen: nein
Fluoreszenzmarkierung möglich: nein



nano BaSO_4

Partikelgröße: 25 nm (TEM)
D_{50} -Wert: 20-25 nm (DLS)
IEP: < pH 1, pH 4, > pH 12
pH-Stabilität pH 5,6 - 12
Stabilität unter physiol. Bedingungen: nein
Fluoreszenzmarkierung möglich: nein



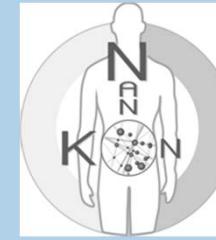
$\text{BaSO}_4@\text{SiO}_2$

Partikelgröße: 25-30 nm (TEM)
D_{50} -Wert: 30-35 nm (DLS)
IEP: < pH 1, pH 4, > pH 12
pH-Stabilität pH 1,3 - 12
Stabilität unter physiol. Bedingungen: ja
Fluoreszenzmarkierung möglich: ja



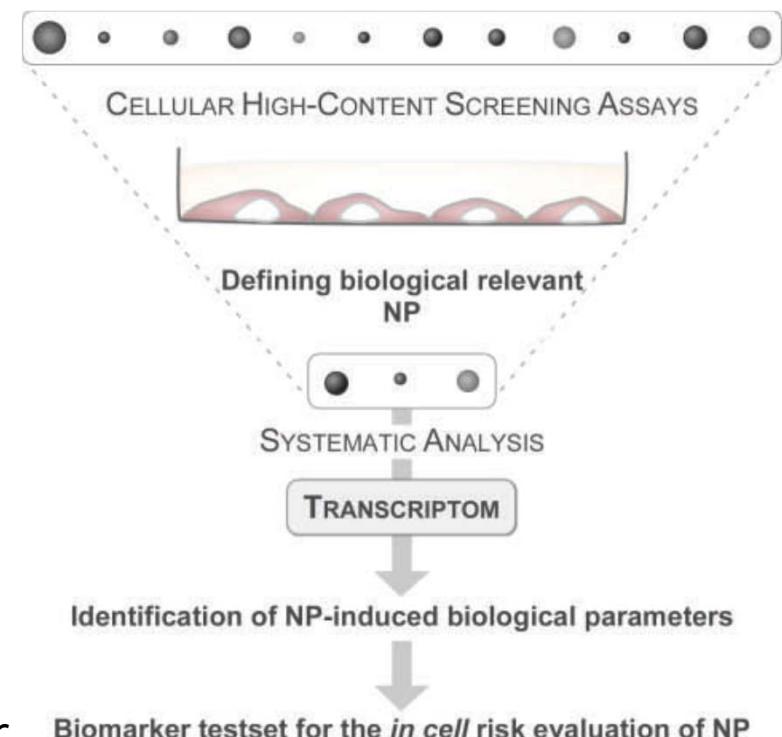
Weitere Informationen, Poster: Jung, Cavelius

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



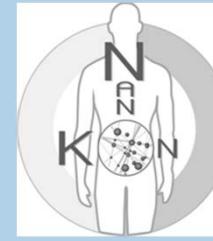
Ziel: mechanistische Aufklärung potenzieller toxikologischer Effekte, Identifizierung biologischer Indikatoren zur standardisierten Bewertung von NP

- 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



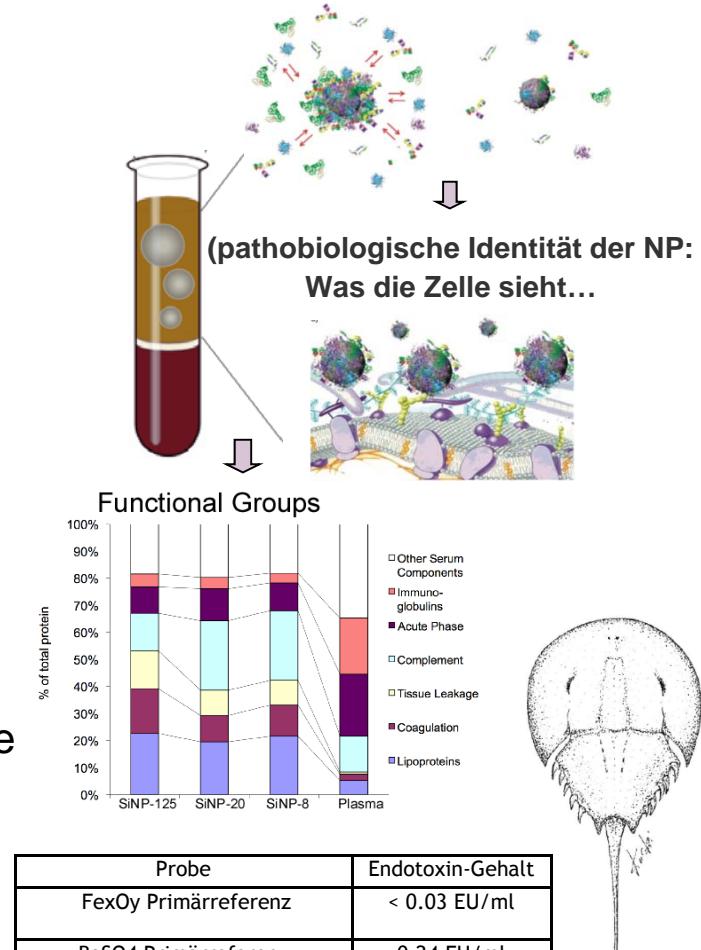
- Faktoren: physiko-chemische Eigenschaften der NP
Größe und Ladung der Proteine
- Die Korona spiegelt nicht die Mengenverhältnisse der Proteine in der biologischem Umgebung wider und bildet sich extrem schnell (<1 min)
- Nachweis der Protein-Korona mittels LC-MS

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

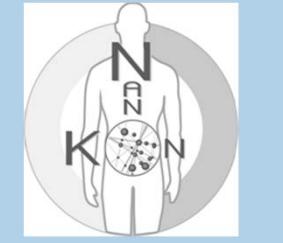


Weitere Informationen, Poster: Docter, Kucki

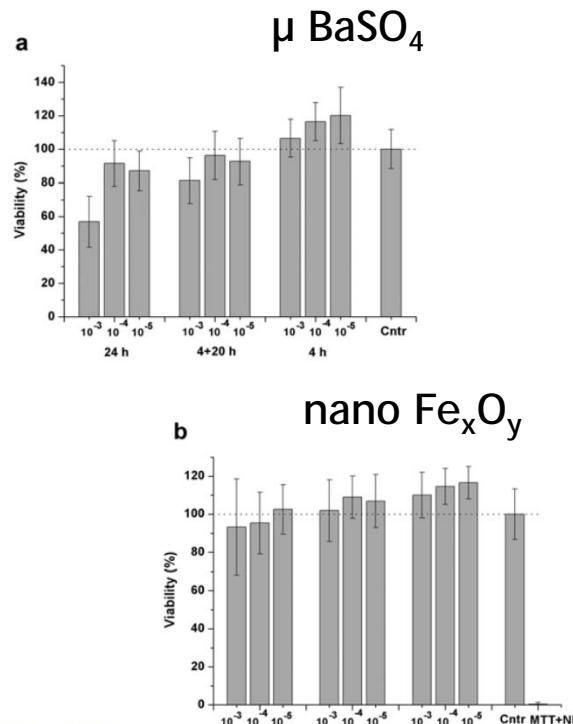


Probe	Endotoxin-Gehalt
FexOy Primärreferenz	< 0.03 EU/ml
BaSO ₄ Primärreferenz	0.24 EU/ml
FexOy Sekundärreferenz	≥ 0.5 EU/ml
FexOy@SiO ₂ a fluoreszenzmarkiert	0.24 EU/ml
FexOy@SiO ₂ b fluoreszenzmarkiert	≥ 0.5 EU/ml

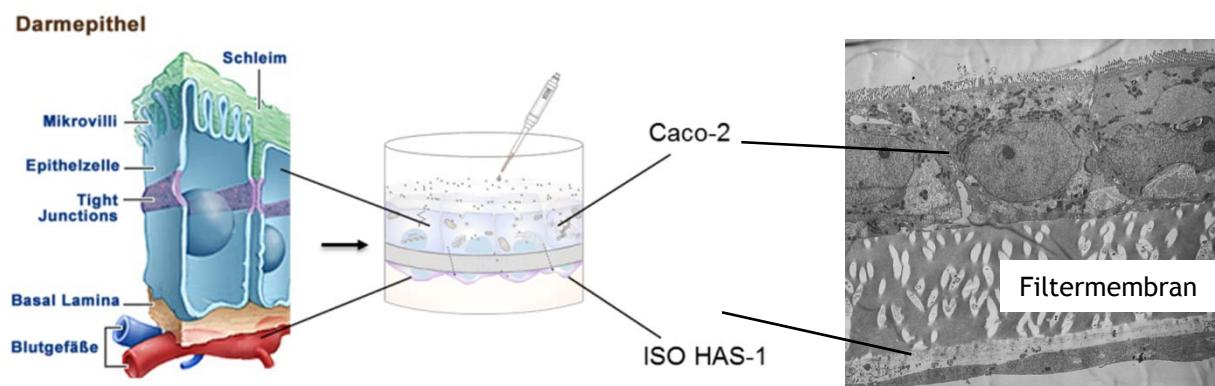
AP2: *in vitro*-Analyse der biologischen Auswirkungen



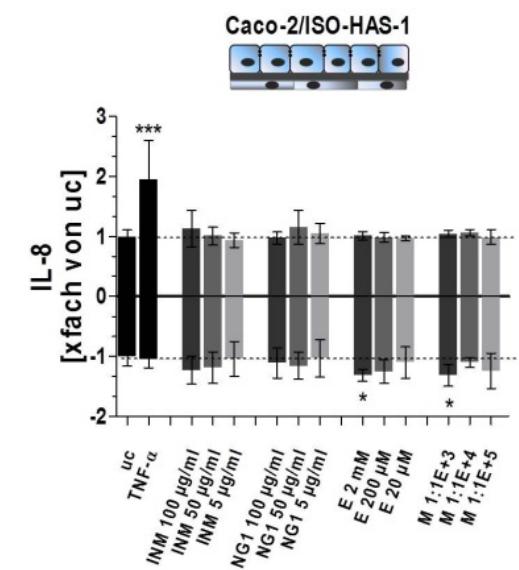
Zytotoxizität gegenüber
Zellen in Monokultur
(HMEC-1)



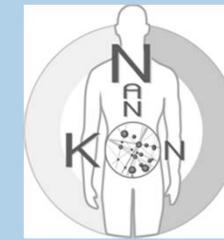
in vitro Kokulturmödell der intestinalen Barriere



TER erhöht sich minimal
nach 24h NP-Exposition

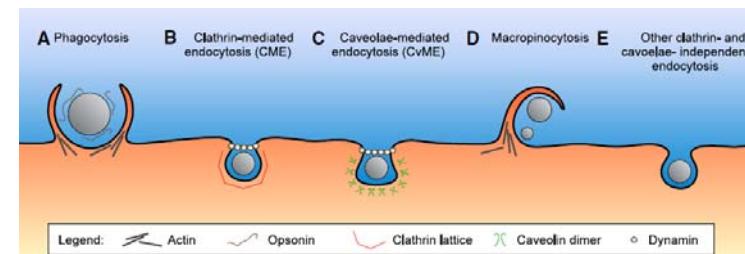
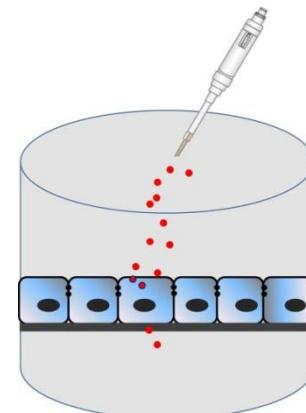


AP 3: Transportprozesse und subzelluläre Lokalisation

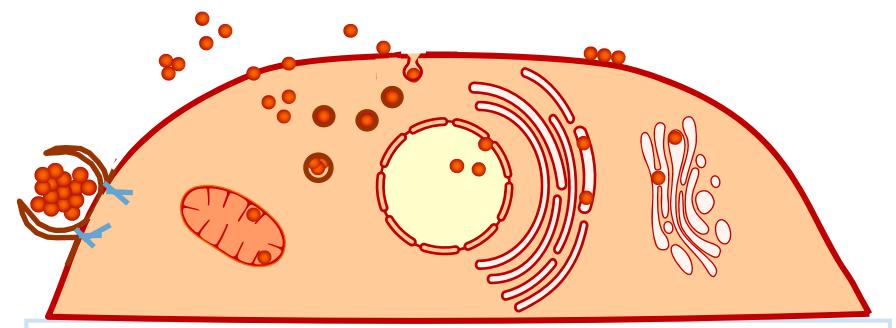


Ziel: Identifierung zellulärer Aufnahmeprozesse und Aufklärung der subzellulären Lokalisation, Korrelation mit dem entzündlichen Potenzial und der *in vivo*-Situation

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



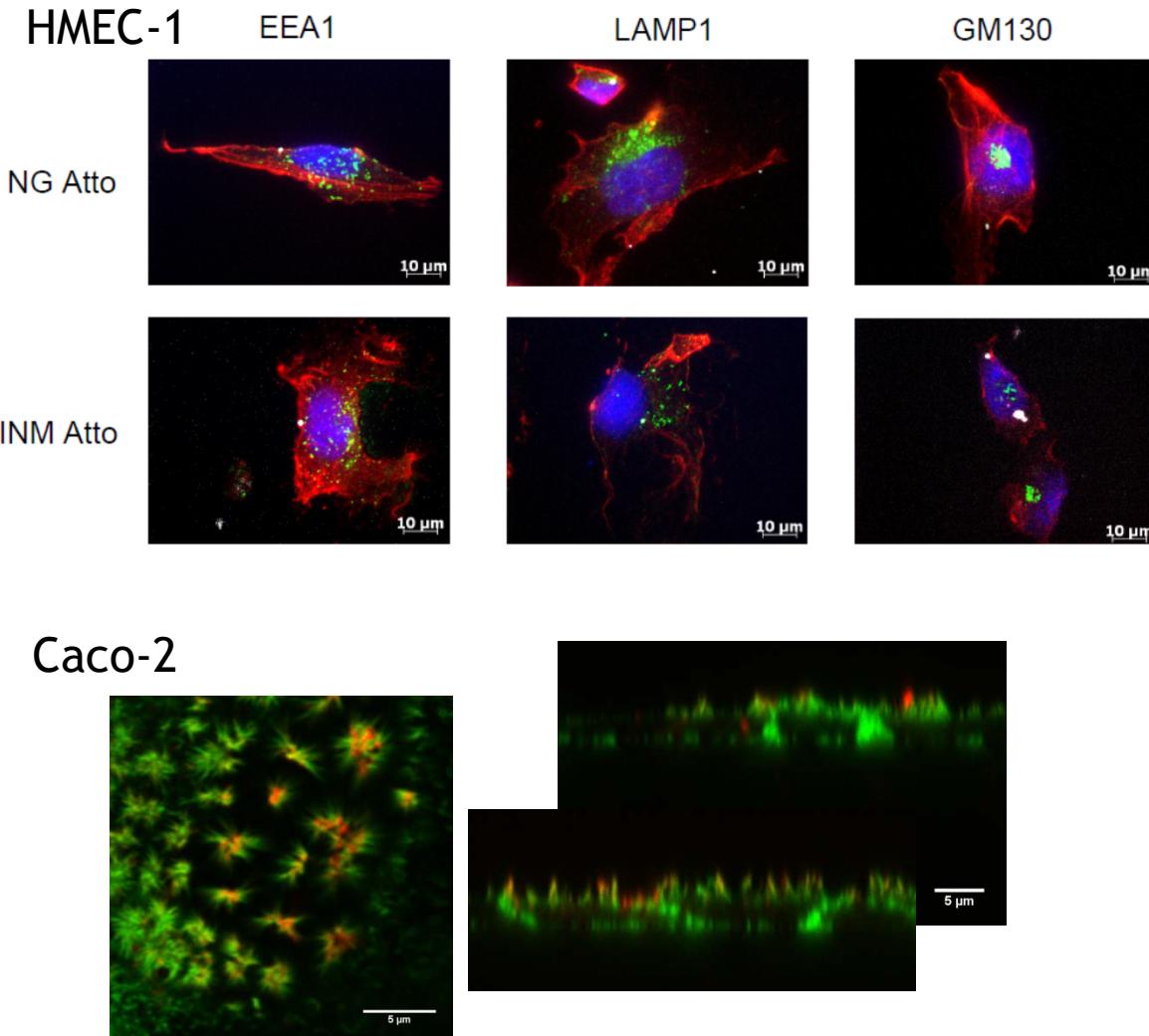
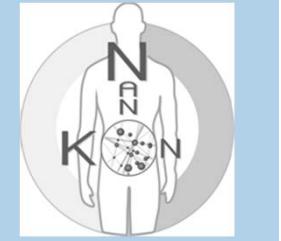
[Hillaireau et. al. 2009]



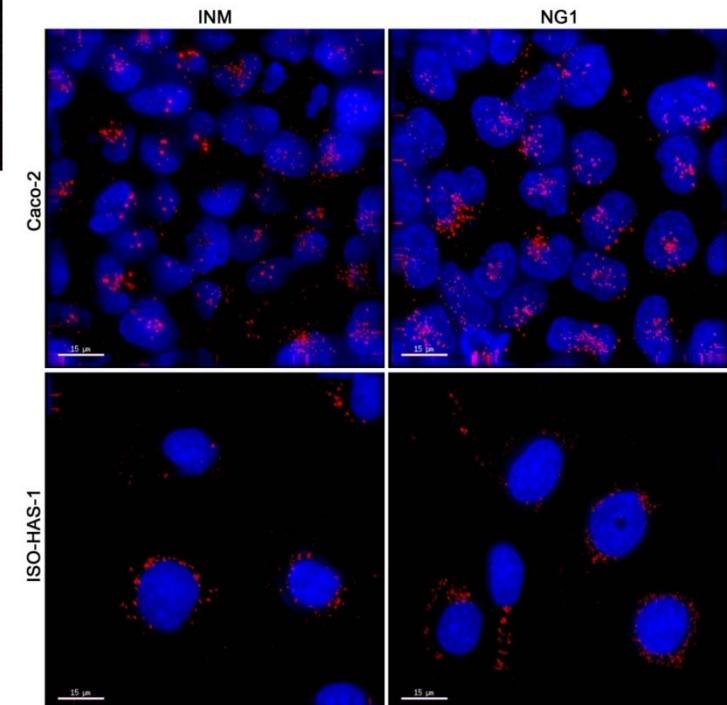
Weitere Informationen, Poster: Astanina, Kucki, Kasper



AP 3: mikroskopische Methoden und subzelluläre Lokalisation



Kokultur Caco-2 / ISO-HAS-1



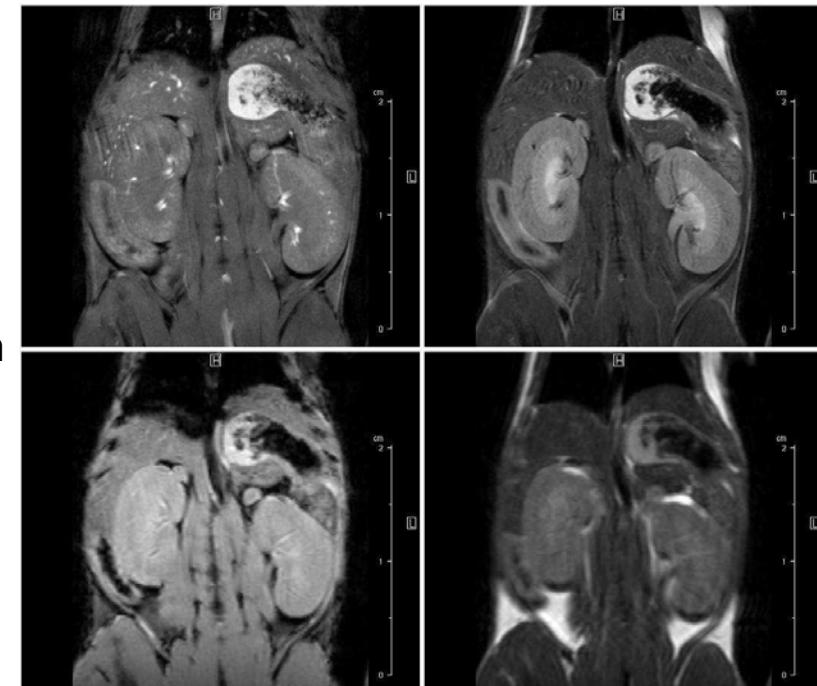
Weitere Informationen, Poster: Astanina, Kasper, Kucki

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

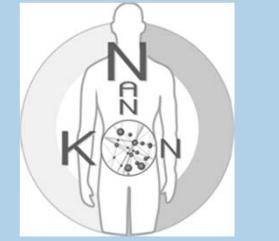


MRT-Aufnahmen des Abdomens eines gesunden Tieres nach Applikation von Fe_xO_y NP. A) T1, B) T2 C) und D) parametrische Bilder der Relaxometrie.



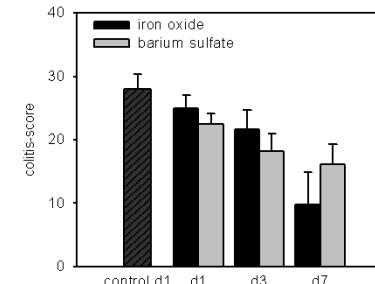
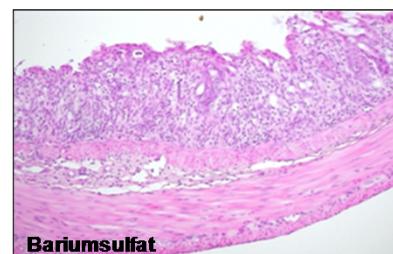
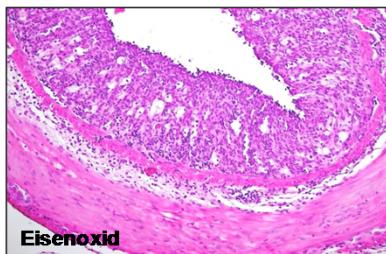
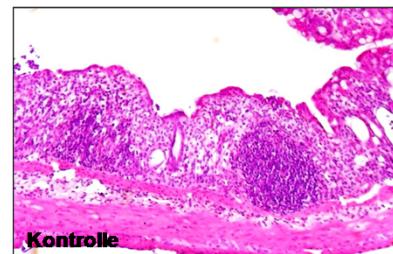
Weitere Informationen, Poster: Müller

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



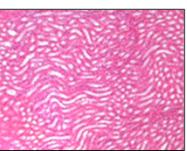
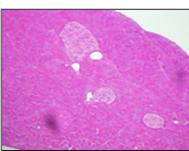
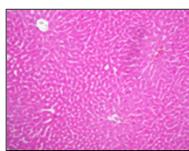
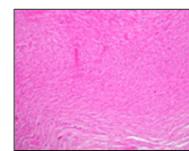
Toxizitätsanalyse Primärreferenzen

Kolitis-Score

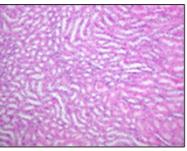
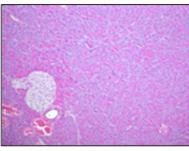
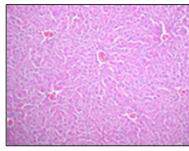
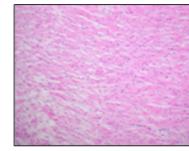


Organmorphologie

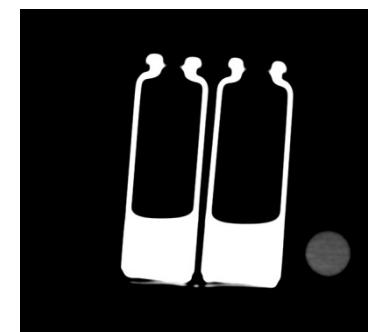
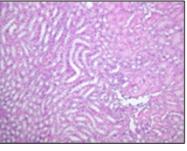
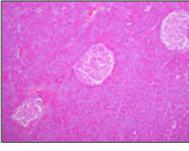
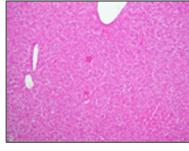
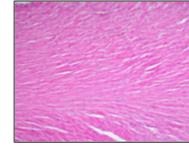
Kontrolle



Eisenoxid



Bariumsulfat



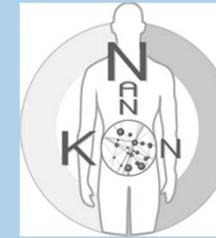
→ keine toxische Wirkung der Primärreferenzen Eisenoxid und Bariumsulfat



Weitere Informationen, Poster: Müller

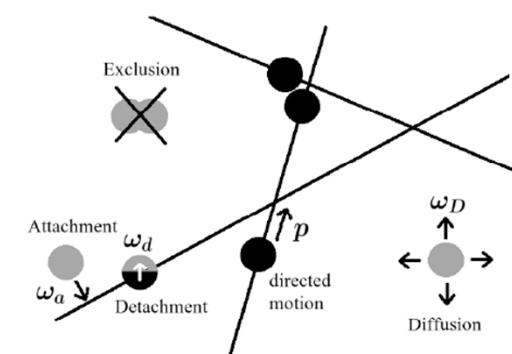
n BaSO₄ im CT

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



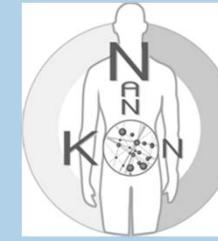
Ziel: Modellierung intrazellulärer Transportprozesse und der Aggregation von NP

- 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



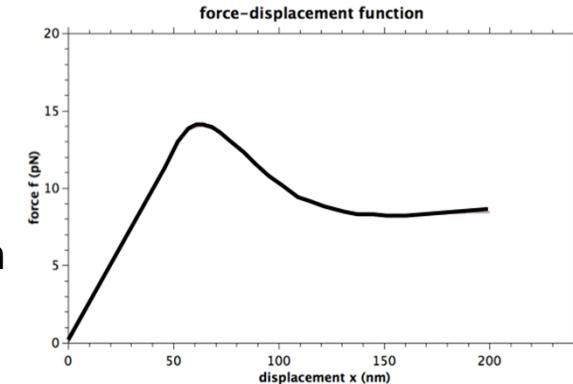
Weitere Informationen, Poster: Thewes

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



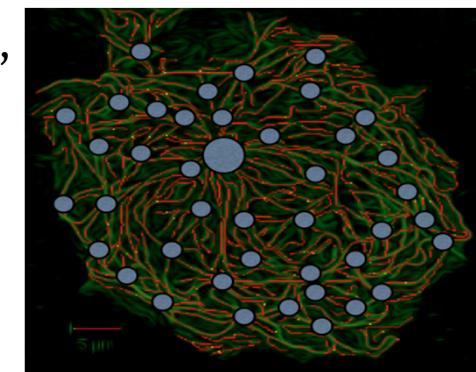
Entwicklung des Interfaces Mikroskopie vs. *in silico* Analyse:

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



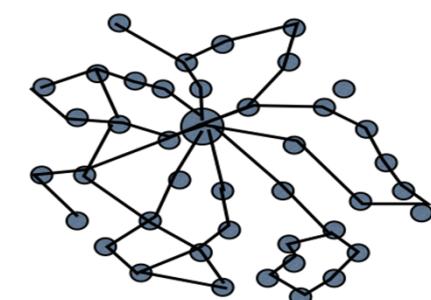
Modellierung der Filamentdynamik:

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



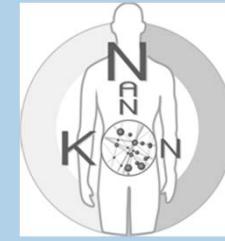
Lokalisierungsphänomene:

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

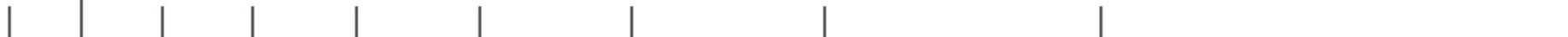
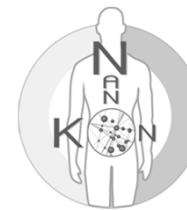


Weitere Informationen, Poster: Thewes

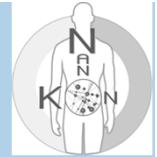
AP 6: Bewertung und Kommunikation



- 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



Dr. R. Danzebrink



Dr. A. Kraegeloh



INM
Leibniz-Institut für
Neue Materialien

Entwicklung und Produktion nanotechnologischer Produkte



Prof. R. Stauber
Molekulare u.
Zelluläre
Onkologie



Pathomechanismen in Onkologie und regenerativer Medizin



Prof. M. Menger
Klinisch-
Experimentelle
Chirurgie



Entzündungsbiologie, vaskuläre Pathophysiologie, Tumorbiologie



Prof. A. K. Kiemer
Pharmazeutische
Biologie



Entzündungsprozesse auf molekularer und zellulärer Ebene



Prof. C. J. Kirkpatrick
Pathologie



Anatomisch pathologische Diagnostik, investigative Pathologie, Biomaterialien



Prof. L. Santen
Theoretische
Physik



Stochastische Transportprozesse



Prof. A. Bücker
Diagnostische und
Interventionelle
Radiologie



Bildgebung in Diagnostik und Forschung