



Studiengang

Applied Life Sciences

PO Version 2009

Masterarbeit

Lipoproteine in der Protein Corona von Nanocarriern

Lipoproteins in the protein corona of
nanocarriers

vorgelegt von

Joy Braun

04. Oktober 2016

Betreuung: Prof. Dr. Dr. Oliver Müller

Zweitkorrektur: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Mailänder

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Joy Braun, geboren am 10. Juli 1991 in Backnang, ehrenwörtlich, dass ich meine Masterarbeit mit dem Titel:

„Lipoproteine in der Protein Corona von Nanocarriern“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als in der Abhandlung angegebenen Hilfen benutzt habe.

Die Übernahme wörtlicher Zitate aus der Literatur sowie die Verwendung der Gedanken anderer Autoren an den entsprechenden Stellen habe ich innerhalb der Arbeit gekennzeichnet.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben kann.

Auenwald, 01.10.2016

Inhaltsverzeichnis

FORMEL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
KURZFASSUNG.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Ziel der Arbeit.....	2
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1 Die Protein Corona.....	3
2.2 Lipide und Lipoproteine	6
2.2.1 Apolipoproteine	7
2.2.1.1HDL.....	9
2.2.1.2LDL.....	10
2.3 Aufbau des Immunsystems	11
2.3.1 Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln in die Zelle	12
3 MATERIAL UND METHODEN.....	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Verwendete Reagenzien.....	14
3.1.2 Verwendete Kits	15
3.1.3 Verwendete Geräte	15
3.1.4 Verwendete Software.....	16
3.1.5 Verwendete Nanopartikel	16
3.2 Methoden	17
3.2.1 LDL/VLDL und HDL Purification	17
3.2.1.1Durchführung.....	18
3.2.2 Bildung der Corona.....	19
3.2.2.1Durchführung.....	19
3.2.3 SDS-PAGE	20
3.2.3.1Durchführung.....	20
3.2.3.1.1 Silberfärbung.....	22
3.2.4 Zellaufnahme.....	22
3.2.4.1Zellkultur	23
3.2.4.1.1 Durchführung	24
3.2.4.1.1.1 Durchführung CLSM	25
3.2.5 Massenspektrometrie	25

3.2.6	Statistische Auswertung	26
4	ERGEBNIS	27
4.1	HDL und LDL Fraktionen.....	27
4.1.1	SDS-PAGE der HDL und LDL Fraktion.....	27
4.1.2	Analyse der HDL und LDL Fraktionen mittels Massenspektrometrie	28
4.1.3	TEM Aufnahmen der HDL und LDL Fraktion.....	31
4.2	Die HDL und LDL Coronen an den verschiedenen Nanopartikeln	32
4.2.1	SDS-PAGE der Coronen.....	33
4.2.1.1	Proteinkonzentration.....	35
4.2.1.2	Stabilitätstest	36
4.2.2	Mikroskopie Aufnahmen der Corona	38
4.2.3	Untersuchung der Corona Zusammensetzung mittels MS	40
4.2.3.1	Zusammensetzung der HDL und LDL kombinations Corona	42
4.3	Analyse der zellulären Aufnahme der Partikel mittels Durchflusszytometrie	43
4.3.1	Zellaufnahme.....	44
4.3.1.1	Untersuchung der Zellaufnahme mittels CLSM.....	46
5	DISKUSSION	49
5.1	Reinheit der HDL und LDL Fraktion.....	49
5.2	Analyse der Corona Zusammensetzung.....	49
5.3	Analyse der Corona Zusammensetzung mittels MS	53
5.4	Die Zellaufnahme mittels Durchflusszytometrie	54
6	AUSBLICK	57
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
8	TABELLENVERZEICHNIS	60
9	LITERATURVERZEICHNIS	61
10	ANHANG	64

Formel- und Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AG	Antigen
AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
CETP	Cholesterinester Transferprotein
DC	dendritische Zellen
CLSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
et al.	et alli (und andere)
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Bovine Serum
FSC	Vorwärtsstreulicht
ggf.	gegebenenfalls
°C	Grad Celsius
h	hora (Stunde)
HDL	High-density Lipoprotein
IA	Immunantwort
IDL	Intermediate-density Lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
IS	Immunsystem
kDa	Kilo Dalton
LCAT	Lecitin-Cholesterin Acetyltransferase
LDL	Low-density Lipoprotein
Lut	Lutensol

µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NP	Nanopartikel
NK	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PS	Polystyrol
m²	Quadratmeter
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	Seitwärtsstreulicht
V	Volt
VLDL	Very-low-density Lipoprotein
W	Watt
x g	relative centrifugal force
z. B.	zum Beispiel

Kurzfassung

Die Masterarbeit befasst mit der Proteincorona aus high density und low density Lipoproteinen (HDL und LDL). Dabei lag der Fokus auf der Untersuchung der Corona Zusammensetzung sowie deren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von Makrophagen. Hierzu wurden HDL und LDL mittels HDL und LDL/VLDL Aufreinigungskit aus humanem Plasma isoliert. Da die gängige Methode zur Gewinnung von Lipoproteinen die der Ultrazentrifuge ist, wurde vor der weiteren Arbeit die Reinheit der Fraktionen bestimmt. Diese wurde zunächst qualitativ mithilfe der SDS-PAGE und anschließend quantitativ mittels massenspektrometrischer (MS) Analyse bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich beide Fraktionen stark voneinander unterscheiden und die jeweilige Hauptkomponente das für das Lipoprotein charakteristische Apolipoprotein ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Coronen aus HDL, LDL, Plasma und einer Kombination beider Lipoproteine an unterschiedlich funktionalisierten Nanopartikel (NP) hergestellt. Auch diese wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Hauptkomponente der HDL Fraktion, das Apo A1, den dominierenden Part dieser Corona darstellt. Im Fall der Corona aus LDL, stellt das Apo B100 die häufigste Komponente dar. Beide Lipoproteine bilden somit eine Corona an den NP. Die aus der SDS-PAGE gewonnene Erkenntnis, stimmt mit den erhobenen Daten der MS Analyse überein. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigte sich weiterhin, dass sich die Bestandteile der HDL Fraktion selektiver an den Partikeln anreichern, als die der LDL Fraktion. Insbesondere Apo A4 und E, welche in der reinen HDL Fraktion nur in sehr geringen Mengen vorhanden waren, konnten in der Corona in > 5% bestimmt werden. Außerdem hat sich sowohl qualitativ als auch quantitativ gezeigt, dass die unfunktionalisierten und aminofunktionalisierten Partikel hohe Ähnlichkeit in ihrem Bindungsverhalten haben. Lediglich die carboxyfunktionalisierten Partikel weichen in ihrem Verhalten davon ab.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei einer gemeinsamen Inkubation von HDL und LDL, in der darauffolgenden SDS-PAGE ausschließlich die für die HDL Fraktion charakteristischen Banden detektiert werden können. Aus diesem Grund wurde ein sogenannter Stabilitätstest durchgeführt. Hierzu wurde beispielsweise die erste Stunde in HDL und die zweite Stunde in LDL inkubiert. Dieser Versuchsaufbau wurde in diversen Variationen an HDL, LDL sowie Plasma getestet. Die mit den Proben durchgeführte SDS-PAGE konnte zeigen, dass HDL

und LDL, unabhängig von der Inkubationsreihenfolge mit Plasma, in der Corona vorhanden sind. Die für LDL charakteristischen Banden konnten nur dann detektiert werden, wenn die erste Inkubationsperiode auch in LDL durchgeführt wurde.

Wurden HDL und LDL in diesem Versuchsaufbau gemeinsam inkubiert, war die LDL Menge um 250 µg kleiner als die des HDL. In einem weiteren Experiment wurden HDL und LDL in gleichem Verhältnis inkubiert. Auch in dieser SDS-PAGE konnten lediglich die Banden des HDL detektiert werden. Die MS Daten konnten jedoch zeigen, dass im Fall einer steigenden LDL Menge die prozentualen Anteile, des im HDL vorhanden Apo A1 sowie des Apo 4 in der Corona abnehmen und die Anteile an Apo B100 steigen, sodass ein quantitativer Effekt des Verhältnisses von HDL zu LDL zu bemerken war.

Abschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Inhibierung der NP Aufnahme in die Zelle untersucht. Dabei zeigten alle NP mit Corona (HDL, LDL, Plasma sowie HDL+LDL) eine signifikant geringere Zellaufnahme. Bei den unfunktionalisierten und den aminofunktionalisierten NP war die Aufnahme bei derjenigen Corona am geringsten, die beide Lipoproteine beinhaltete. Diese war im Fall der carboxyfunktionalisierten Partikel am höchsten, wohingegen die geringste Zellaufnahme mit den Coronen aus HDL bzw. LDL erzielt werden konnte

Abstract

The thesis deals with the protein corona out of high and low density lipoproteins (HDL and LDL). Focus of the investigations is the corona composition as well as the influence of the cellular uptake in macrophages. Therefore, HDL and LDL was separated from human plasma by using a HDL and LDL/VLDL Purification kit. Currently, certain Lipoproteins are obtained by using an ultracentrifuge. Hence, the exact purity of the fractions was unknown. To determine the purity for the subsequent investigations, the fraction was analysed qualitative with the SDS-PAGE and quantitative with the mass spectroscopy. It could be shown, that there are broad variations between the fractions. Further could be proven, that the main component of the fractions is the characteristic apolipoprotein.

With these fractions, coronas out of HDL, LDL, a combination of both Lipoproteins and Plasma were made on the surface of different functionalized Nanoparticles. It could be shown, that the main component of the HDL Fraction, Apo A1, is also the dominating part of the Corona which is made of this fraction. Equally to that, the main part of the LDL Corona is Apo B100, the most abundant Apolipoprotein in this fraction. These results were shown in the SDS-PAGE and confirmed with the MS Data. Another result from this experiment is, that the components of the HDL fractions bind more selective on the particles than the LDL. Especially Apo A4 and E, which were small parts in the pure HDL fraction are in the NP Corona an element in an abundance over 5%. Furthermore it could be shown, that the binding behaviour of the unfunctionalized and the aminofunctionalized particles are quite similar. Only the carboxyfunctionalized exhibits a different behavior.

If HDL and LDL were incubated together only the characteristic HDL bands, could be detected in the SDS-PAGE. Because of this, a so called stability test was performed. In this case there were two incubation periods, the first hour for example in HDL and the second hour in LDL. These investigations were made with HDL, LDL and Plasma in all kinds of combination. The SDS-PAGE of this samples showed, that HDL and LDL were part of the Corona, independent of the in incubation order. The characteristic LDL bands could only be detected in case the first hour of the incubation was performed with LDL.

In the SDS-PAGE of the Coronas with HDL and LDL together, the amount of LDL were 250 µg smaller than the HDL. Because of this, the experiment was repeated with the same amount of

HDL and LDL. Even in this case, only the Bands of the HDL could be detected. The MS analysis showed, that in case of an increasing LDL amount, the amount of Apo B100 is also increasing in the Corona while the characteristic Apolipoproteins like Apo A1 as well as Apo A4 are decreasing. Therefore, a quantitative effect of the HDL-LDL ratio could be detected.

Finally the cell uptake of the NP was investigated by using the flow cytometry. All NP with Coronas showed a significant smaller uptake in the cells. The least uptake in the unfunctionalized and the aminofunctionalized particles were detected in the Corona with both Lipoproteins. In case of using carboxyfunctionalized particles, the Corona is showing the highest uptake while the Corona with HDL only, as well as only LDL shows the highest inhibition.

1 Einleitung

Nanocarrier gelten als vielversprechendes medizinisches Tool für den Transport von Medikamenten. Durch Oberflächenmodifikationen solcher Carrier (z. B. mit RGD Peptid [1]), kann ein zielgerichteter Transport sowie eine selektive Freisetzung des Wirkstoffes ermöglicht werden. In Verbindung damit können die unerwünschten Arzneimittelwirkungen minimiert und somit die Anwenderfreundlichkeit verbessert werden.

Die Interaktion der NP mit dem biologischen System wird durch die sogenannte Protein Corona bestimmt. Diese bildet sich wenn die Nanocarrier mit biologischen Flüssigkeiten, wie z. B. Blut, in Kontakt gelangen. Dabei adsorbieren verschiedene extrazelluläre Proteine an der Oberfläche des Carriers, wodurch die von den Nanopartikeln genutzten Zellrezeptoren [2], die Immunantwort [3] sowie die intrazellulären Signalwege [4] kontrolliert werden. Die Bildung und der Einfluss dieses Partikel-Proteinkomplexes sind von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, welche bislang weitestgehend unbekannt sind. So gibt es derzeit noch kein Modell mit dem man voraussagen kann, welchen Einfluss die synthetische Identität des Partikels - darunter fällt unter anderem deren Form und Größe sowie insbesondere dessen Oberflächenfunktionalisierung - auf die Art der adsorbierten Proteine hat. Weiterhin ist nicht bekannt, ob alle in der Corona vorhandenen Proteine das Verhalten des Partikels beeinflussen oder nur einige wenige [5].

Apolipoproteine sind, als Bestandteil der Lipoproteine, für den Transport von Lipiden durch den Körper verantwortlich. Ritz et al. konnten zeigen, dass es zu einer Anreicherung von verschiedenen Apolipoproteinen an unterschiedlich funktionalisierten Nanopartikeln kommt [6]. Sie stellen somit einen großen Teil der Corona dar und beeinflussen die biologische Identität der Nanopartikel im Organismus. So könnten beispielsweise Apo A1 und Apo B100 für eine gezielte Pharmakotherapie von Nutzen sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine kovalente Kopplung dieser Apolipoproteine an Nanocarriern, den Transport durch das zentrale Nervensystem fördert [7]. Für eine dieser Drug Delivery Anwendung gilt es die Frage zu klären, wie sich die Bindung solcher Apolipoproteine an Nanocarriern auf das Verhalten dieser im Körper auswirkt.

1.1 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Bestimmung des Einflusses der Corona aus Lipoproteinen, auf die zelluläre Aufnahme in Makrophagen. Studien haben gezeigt, dass Apolipoproteine den Transport von Nanocarriern durch das zentrale Nervensystem fördern und somit einen zielgerichteten Transport von Medikamenten durch den Körper ermöglichen könnten [7]. Für eine solche Anwendung gilt es jedoch zunächst zu detektieren, welchen Einfluss solche Proteine als Teil der Corona auf die Zellaufnahme haben. Apolipoproteine stellen den Proteinanteil der Lipoproteine dar, der im menschlichen Organismus für den Transport der Lipide verantwortlich ist. Da sie somit als Teil eines Proteinkomplexes agieren gilt es zu klären, welchen Einfluss solche Lipoproteine auf die Zellaufnahme haben. Hierzu sollen die beiden Lipoproteinfraktionen, HDL und LDL mithilfe eines Kits aus humanem Plasma isoliert werden. Mit diesen Fraktionen sollen Coronen an verschiedenen funktionalisierten NP hergestellt und diese hinsichtlich ihrer Zusammensetzung sowie ihres Einflusses auf die zelluläre Aufnahme untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Protein Corona

Bei Kontakt eines Nanocarriers mit biologischer Umgebung (z. B. Blut) kommt es zur Ausbildung der sogenannten *Protein Corona* [8]. Darunter versteht man eine Ansammlung verschiedener Plasmaproteine, welche an der Oberfläche der Partikel adsorbieren. Die Corona beeinflusst die biologische Identität der NP und bestimmt dadurch die physiologische Reaktion des Körpers auf diese [9]. So stellt sie einen wichtigen Faktor in der Bluthalbwertszeit, der Distribution sowie der Toxizität dar [10]. Ferner kontrolliert sie die von den NP genutzten Zellrezeptoren [11], die Immunantwort [3] und die intrazellulären Signalwege [4].

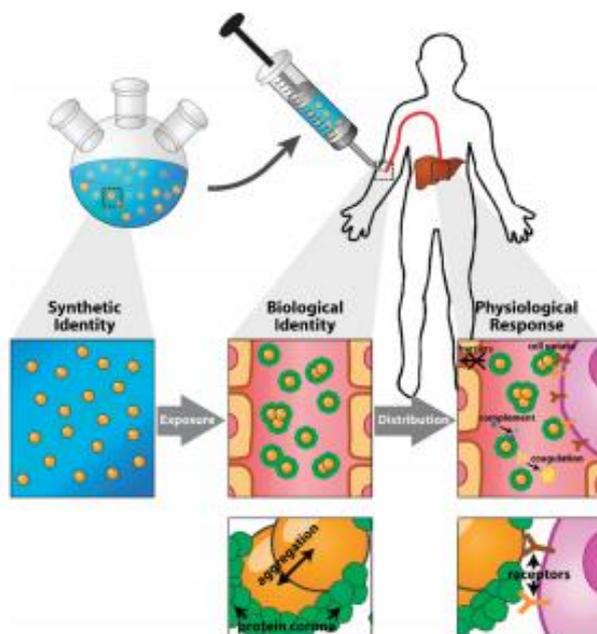


Abbildung 1: Einfluss der synthetischen und biologischen Identität auf die physiologische Antwort sowie deren gegenseitige Beeinflussung [12].

Unklar ist inwieweit die synthetische Identität der NP (Größe, Form, Oberflächenmodifikationen etc.) die Art der adsorbierten Proteine beeinflusst. Walkey und Chan konnten zeigen, dass verschiedene Apolipoproteine, darunter Apo A4, Apo B, Apo C3 und Apo E, bevorzugt an hydrophobe Quantum Dots adsorbieren, wohingegen Apo A1, Apo A2 und Apo C1 stärker an hydrophile, mit NH₂ modifizierte Quantum Dots binden [12].

Allgemein gibt es verschiedene Parameter anhand derer sich die Corona charakterisieren lässt, diese sind in Tabelle 1 dargestellt. So werden die physiologischen Reaktionen des Körpers weniger durch den Nanopartikel selbst, als durch die in der Corona vorhandenen Proteine bestimmt.

Tabelle 1: Parameter anhand derer sich die Corona charakterisieren lässt [12]

Parameter	Einfluss
Dichte und Dicke der Proteine	Gesamtgröße des Partikels
Identität und Konzentration der Proteine	Mögliche biologische Effekte sowie deren Stärke
Anordnung und Orientierung	Erreichbarkeit potentieller Bindungs- und Katalytischer Domänen
Konformation	Proteinaktivität und Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen
Affinität	Bestimmt ob es zur Bindung, Adsorption oder Dissoziation kommt

Die Zusammensetzung der Corona wird zu jedem Zeitpunkt durch die Konzentration der über 3.700 Proteine im Plasma sowie deren Kinetik und Dissoziationskonstante bestimmt [13]. Dabei stellt das im Blutplasma in höchster Konzentration vorhandene Protein nicht zwangsläufig die Hauptkomponente der Corona dar.

Das Mittel der Wahl zur Unterdrückung unspezifischer Proteinadsorption ist der Prozess der PEGylierung. Dabei werden Polyethylenglycol-Ketten kovalent an die Partikel gebunden, wodurch die Protein-Adsorption inhibiert, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden kann [14]. Dieser als „primary stealth effect“ bezeichnete Vorgang erhöht die Bluthalbwertszeit der Carrier, indem er die Zellaufnahme durch das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) minimiert. Schöttler et al. konnten zeigen, dass neben der verminderten unspezifischen Proteinadsorption auch eine durch die PEGylierung hervorgerufene spezifische Adsorption Clusterin - auch Apolipoprotein J genannt eine Rolle in der verlängerten Blutzirkulation spielt. Dieser weitere Effekt wird als „secondary stealth effect“ oder „biologische Identität“ bezeichnet [15].

Beim Eintritt der NP in das biologische System und anschließender Ausbildung der Corona, werden die adsorbierten Proteine nach ihrer Affinitäten in die sogenannte „harte und weiche Corona“ differenziert. Proteine mit hoher Affinität bilden die harte Corona, sie sind festgebunden und können somit nicht leicht desorbieren. Die weiche Corona besteht hingegen aus Proteinen schwacher Bindung [12].

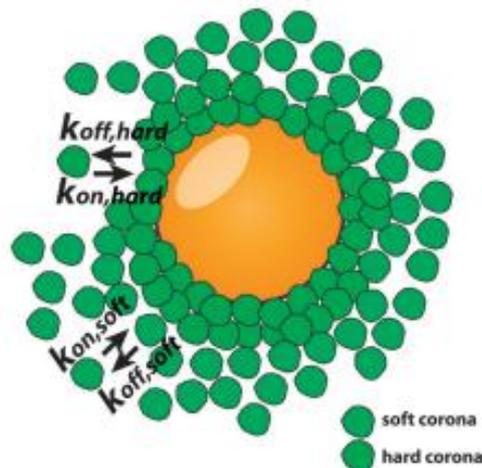


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Protein Corona um den Partikel, eingeteilt in die harte und weiche Corona [12]

Der Prozess der Corona Bildung ist dynamisch, weshalb es jederzeit zu einer Desorption eines Proteins kommen kann, wodurch eine freie Bindungsstelle an dem Partikel entsteht. Diese Stelle kann fortfolgend von dem gleichen Protein oder einem Protein höherer Affinität besetzt werden. Der aus kontinuierlicher Desorption und Adsorption bestehende Prozess wird auch als *Vroman-Effekt* bezeichnet. So konnte gezeigt werden, dass in frühen Stadien der Corona Albumin, Immunglobuline (IgG) und Fibrinogen in hohen Mengen vorhanden sind. Diese werden jedoch binnen weniger Sekunde durch Apolipoproteine und Coagulationsfaktoren höherer Affinität ersetzt. Apolipoproteine tragen damit zur biologischen Identität der Partikel bei [13] [12].

Der Zusammenhang zwischen biologischer und synthetischer Identität sowie der darauffolgenden physiologischen Antwort ist weitgehend unklar. Alle drei Faktoren definieren sich durch stark variable Parameter. Die Forschung in diesem Bereich stellt sich allerdings als sehr komplex dar. Schon der Vergleich verschiedener Studien ist oftmals kaum möglich, da die Zusammensetzung der Corona nicht nur von der synthetischen Identität der Nanopartikel beeinflusst wird, sondern auch von der Blutressource, deren Aufarbeitung als Serum oder Plasma,

der Spezies, der Verdünnung oder der Reinigungsmethode [12]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, die einzelnen Coronen, welche sich unter bestimmten Bedingungen bilden, vorherzusagen. Außerdem ist noch unklar, ob alle in der Corona vorhandenen Proteine Einfluss auf das Verhalten der Partikel in physiologischer Umgebung haben oder nur einige weniger [5]. Zur Beantwortung dieser Frage müssen die Coronen unterschiedlicher Partikel, in ihre einzelnen Bestandteile zerlegt werden (durch Desorption mit z. B. Detergentien) um diese hinsichtlich ihres Zellverhaltens zu untersuchen. Der Fokus liegt hierbei auf Proteinen, die in hoher Konzentration im Plasma vorhanden sind oder solche, die immunologisch oder pharmakologisch eine wichtige Rolle spielen. Vor allem das Verständnis darüber wie Apolipoproteine das Verhalten der Partikel beeinflussen ist von großer Relevanz. So kann eine kovalente Bindung von Apo E an verschiedene Nanocarrier deren Transport durch die Blut-Hirn-Schranke [16] unterstützen, wohingegen Apo A1 sowie Apo B100 den Transport durch das zentrale Nervensystem [7] fördern.

2.2 Lipide und Lipoproteine

Lipoproteine sind Mizellen-ähnliche Komplexe, welche für den Transport der hydrophoben Lipide durch das Blut verantwortlich sind. Alle im Körper vorhandenen Lipide, mit Ausnahme der freien Fettsäuren, werden mithilfe dieser Lipoproteine durch den Körper transportiert. Der unpolare Kern der kugelförmigen Partikel besteht aus Triglyzeriden und Cholesterinester, welche von einer Schicht aus amphiphilen Lipiden (freies Cholesterin und Phospholipide) sowie den Apolipoproteinen bedeckt sind.

Die Einteilung dieser Lipid-Transportvehikel erfolgt nach ihrer hydratischen Dichte und somit nach ihrer Trennung in der Ultrazentrifuge. Man unterscheidet 4 Hauptfraktionen:

- Chylomikronen,
- Very Low Density Lipoproteine (VLDL),
- Low Density Lipoproteine (LDL) und
- High Density Lipoproteine (HDL).

Die Größe und Dichte der Lipoproteine wird durch das Lipid-Protein-Verhältnis bestimmt. Dieses steigt mit abnehmendem Lipid- und zunehmenden Proteingehalt. Bei den Chylomikronen

beträgt dieses Verhältnis 98:2, wohingegen es bei den HDL auf 50:50 abnimmt. Für die einzelnen Lipoproteine sind verschiedene Apolipoprotein-Klassen charakteristisch. Eine Übersicht der Dichten und Zusammensetzungen der Fraktionen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Übersicht über die Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteinfractionen und deren Dichte [17] [18].

Fraktion	Dichte [g/ml]	Zusammensetzung
Chylomikronen	0,93	Apo A1, Apo A4, Apo B48, Apo C1, Apo C2 und Apo C3
VLDL	1,006	Apo 5, Apo B100, Apo E, Apo A1, Apo C1, Apo C2, Apo C3, Apo E
LDL	1,006-1,06	Apo B100, Apo E
HDL	1,06-1,21	Apo A1, Apo A2, Apo A4, Apo A5, Apo C1, Apo C2, Apo C3, Apo D, Apo E

2.2.1 Apolipoproteine

Apolipoproteine stellen die funktionelle Einheit der Lipoproteine dar. Sie tragen zum einen zur Löslichkeit der Partikel sowie deren Transport im Blut bei und sind zum anderen für die Lipidresorption, die Aktivierung der Lipoproteinlipase sowie der Steuerung der Lipolyse verantwortlich.

Die Apolipoprotein-Zusammensetzung und somit die Funktion der Lipoproteine variiert von Partikel zu Partikel. Lipoproteine, die beispielsweise Apo B enthalten (Chylomikronen, VLDL und LDL) sind lipidreich und spielen eine wichtige Rolle im Cholesterin und Triglycerin Transport. Im Gegensatz dazu stellen die Apo A1 und Apo A2 reichen HDL eine wichtige Komponente des reversen Cholesterin Transportes dar. In Tabelle 3 ist eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Apolipoproteine und deren Funktion wiedergegeben. Aufgrund der Komplexität des Lipoprotein-Metabolismus wird dieser in den folgenden Kapiteln kurz erläutert.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Apolipoproteinen und deren Funktion [17] [18].

Apolipoprotein	Molekülmasse [kDa]	Funktion
Apo A1	28,5	Strukturelement, Aktivator Lecitin-Cholesterin-Acetyltransferase (LCAT), beteiligt am revers Cholesterintransport
Apo A2	17	Strukturelement, Aktivator hepatischer Lipase
Apo A4	46	Strukturelement, Aktivator LCAT, involviert im Triglycerid Metabolismus
Apo A5	38	Aktivator hepatische Lipase
Apo B48	241	Strukturelement
Apo B100	550	Strukturelement, bindet an LDL Rezeptor
Apo C1	7,6	Inhibiert Lipoproteinbindung an LDL Rezeptor, Aktivator LCAT
Apo C2	8,9	Aktiviert Lipoproteinlipase
Apo C3	8,7	Inhibiert Lipoproteinlipase, Antagonist des Apo E, Inhibiert die Aufnahme von VLDL in die Leber
Apo D	33	Strukturelement, Aktivator LCAT
Apo E	34	LDL und LRP-Rezeptor Ligand, integraler Bestandteil des reversen Cholesterintransport und der Triglycerol Clearance

2.2.1.1 HDL

Mithilfe von HDL kann Cholesterin aus der Peripherie zur Leber transportiert werden, wo es anschließend eliminiert wird. Die Grundstruktur des Moleküls wird in Abbildung 3 dargestellt.

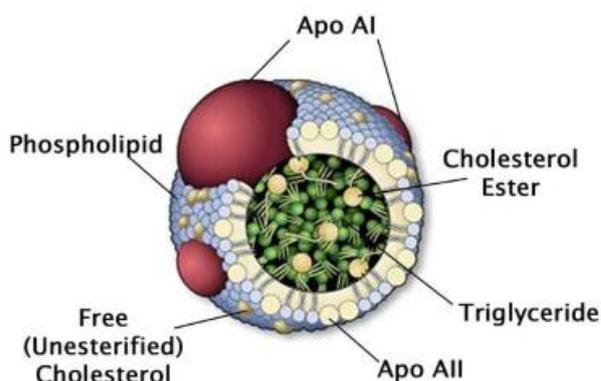


Abbildung 3: Grundstruktur des HDL Moleküls [19].

Der Stoffwechsel der HDL beginnt mit den scheibenförmigen, aus Apo A1 bestehenden prä-HDL. Neben der Synthese in Darm und Leber können sie aus Oberflächenremnants von Chylomykronen oder VDL stammen. Diese Remnants können auch als Stoffwechselfartikel bezeichnet werden, welche aus einem nicht kompletten Umwandlungsprozess entstehen.

Die Partikel nehmen freies Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe auf, wobei der Cholesterintransfer aus der Membran durch den ATP-abhängigen Lipidtransporter ABCA1 erfolgt. Das von der Leber synthetisierte und sezernierte Enzym Lecitin-Cholesterin Acetyltransferase (LCAT) wird von Apo A1, welches hier als Cofaktor agiert, gebunden. Mithilfe dieses Enzyms wird das freie Cholesterin mit den Fettsäuren aus Phospholipiden verestert. Die dabei entstehenden Cholesterinester sind hydrophober als das freie Cholesterin. Sie werden in das Innere der Partikel transportiert, wodurch die Aufnahmekapazität der prä-HDL gesteigert wird. Dabei werden aus den scheibenförmigen Partikeln größere kugelförmige HDL 3 Partikel. Diese HDL 3 Partikel werden durch fortlaufende Aufnahme von Cholesterin zu den HDL 2. Das Ester-Cholesterin wird anschließend mithilfe des Cholesterinester Transferprotein (CETP) auf triglyceridreiche Lipoproteine übertragen, durch welche das Cholesterin über die Leber eliminiert wird. Dieser Prozess erfolgt im Austausch mit den jeweiligen Triglyceriden. Anschließend wird den HDL 2 Partikeln das aufgenommene Triglycerid sowie die Phospholipasen von der hepatischen Lipase entzogen.

Dadurch entstehen aus den HDL 2, neben HDL 3, auch HDL 1 bzw. prä-HDL Partikel. Diese HDL Fraktion enthält als einzige Apo E, wodurch es an alle LDL Rezeptor tragenden Zellen binden kann, um diese mit Cholesterin zu versorgen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Cholesterinaufnahme durch Phagozytose der Leberzellen.

2.2.1.2 LDL

Um die Entstehung der LDL zu verstehen, muss zunächst auf den Stoffwechsel der VLDL eingegangen werden. Diese in der Leber gebildeten Lipoproteine sind für den Transport endogener Fette verantwortlich. Zur Synthese der Triglyceride werden die nach der Mahlzeit vorhandenen Kohlenhydrat-Überschüsse, freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe sowie umgewandelte glukoplastische Aminosäuren verwendet. Cholesterin wird mit Hilfe von Hepatozyten generiert.

Die Lipoproteinlipase hydrolysiert 90 % der Triglyceride von den im Blut zirkulierenden VLDL. Daraus resultieren schließlich Cholesterinester und Apo E-reiche kleine Lipoproteine, welche auch als VLDL-Remnants bezeichnet werden. Die Verstoffwechslung dieser Remnants kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Sie können über den LDL Rezeptor in die Leber aufgenommen und so eliminiert werden oder über die Zwischenstufe der Intermediate Density Lipoproteine (IDL) zu LDL verstoffwechselt werden [20].

LDL stellt das Haupttransportelement des Cholesterins in das Gewebe dar. Etwa 75 % der Partikel werden über den Apo E und Apo B erkennenden LDL Rezeptor in die Leber aufgenommen. Hier wird das Cholesterin zur Synthese von VLDL, Gallensäure und Membranstrukturen verwendet [21].

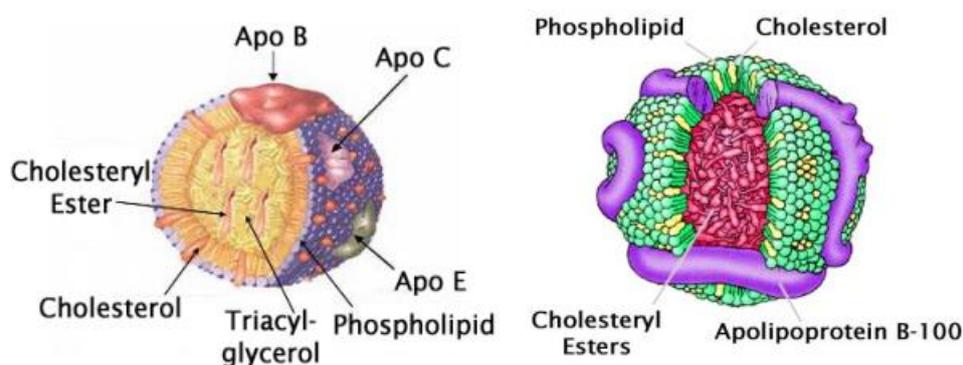


Abbildung 4: Grundstruktur des VLDL (links) und des LDL (rechts) Molekül [19].

Ein erhöhter Plasmaspiegel an Cholesterin und Apo B gilt als wichtiger Kausalfaktor in der Atherogenese, des Entstehungsprozesses der Atherosklerose [22]. Aus diesem Grund sind LDL und HDL auch in der Klinik von Relevanz.

2.3 Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem (IS) dient dem Körper als Abwehrmechanismus vor Infektionen durch Pathogene wie Bakterien oder Viren. Es besitzt zusätzlich die Fähigkeit körpereigene Zellen mit Fehlfunktionen zu erkennen und den Körper so z. B. vor potentiellen Tumorzellen zu schützen. Man unterscheidet zwischen der angeborenen, unspezifischen und der adaptiven, spezifische Immunabwehr, welche wiederum aus einem zellulären und humoralen Anteil bestehen. Im Folgenden soll jedoch nur auf die zellulären Bestandteile eingegangen werden.

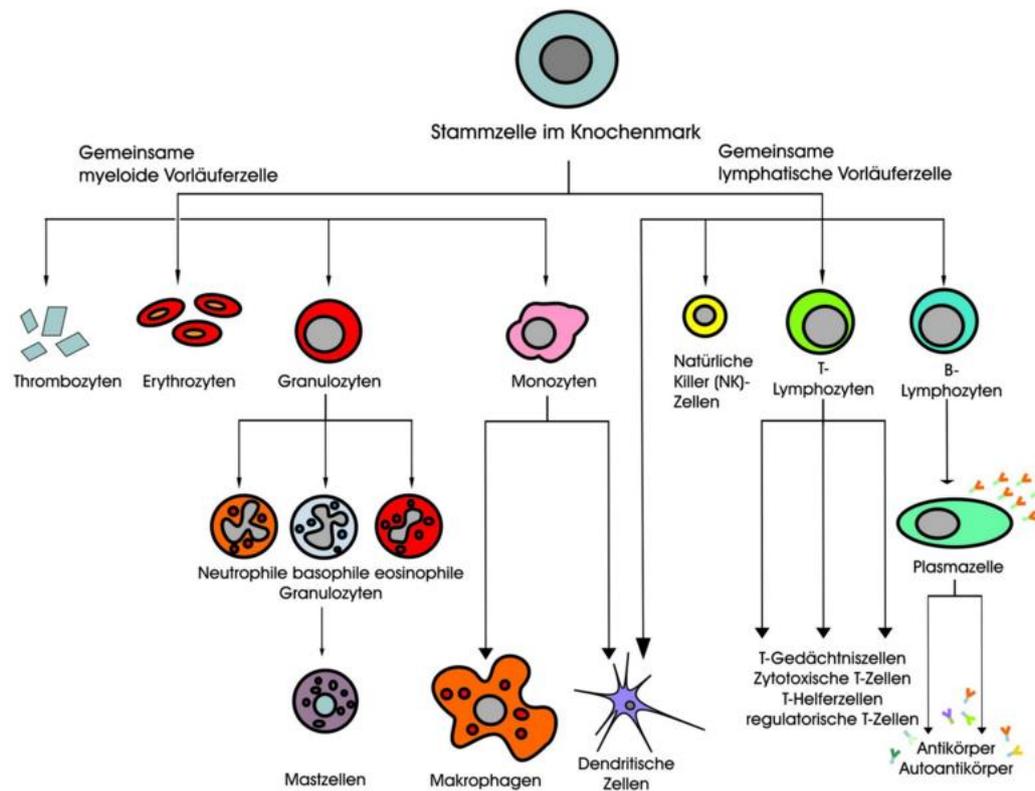


Abbildung 5: Übersicht über die zellulären Bestandteile des Immunsystems mit den Granulozyten und den Monozyten als unspezifische und den natürlichen Killerzellen sowie den B- und T- Lymphozyten als adaptive Immunantwort [23].

Zu den Zellen des unspezifischen IS gehören neben den Granulozyten, den natürlichen Killerzellen (NK), und den dendritischen Zellen (DC) auch die aus Monozyten differenzierten Makrophagen. Solche Zellen tragen Mustererkennungsrezeptoren, wie die Toll-ähnlichen-Rezeptoren, über die Pathogene erkannt und durch Phagozytose eliminiert werden. Makrophagen spielen außerdem eine wichtige Rolle im Clearance-Mechanismus der NP.

Die adaptive Immunabwehr wird mithilfe der natürlichen Immunabwehr aktiviert. Sie kann körpereigene Strukturen von fremden unterscheiden und ist in der Lage ein immunologisches Gedächtnis zu generieren. Mithilfe dessen wird bei einer Folgeinfektion desselben Pathogens eine schnellere und stärkere Immunantwort (IA) gewährleistet.

Die zelluläre spezifische IA besteht aus B- und T-Lymphozyten sowie die von den B-Lymphozyten produzierten IgG. B-Lymphozyten tragen Antikörper (AK) auf ihrer Oberfläche, mit denen die Antigene (AG) der Pathogene erkannt werden. Nach der Differenzierung zu Plasmazellen sezernieren sie IgG's.

Die Hauptkomponente stellen jedoch die T-Lymphozyten dar, welche mithilfe ihrer Rezeptoren sogenannte antigenpräsentierende Zellen erkennen. Dies ist möglich, wenn das AG durch spezielle Glykoproteine, den MHC I- und MHC II-Molekülen an der Wirtszelle präsentiert wird. Das MHC Klasse I Molekül kommt auf allen Körperzellen vor und präsentiert endogene AG, wohingegen die MHC Klasse II-Moleküle nur auf antigenpräsentierenden Zellen vorhanden sind. Sie sind für die Präsentation exogener AG zuständig. Nach Aktivierung kommt es schließlich zur Differenzierung des jeweiligen Zelltyps und zur Reaktion, welche abhängig vom MHC-Komplex ist.

2.3.1 Aufnahmemechanismen von Nanopartikeln in die Zelle

Die Wechselwirkung zwischen NP mit den Monozyten bzw. den Makrophagen spielt eine wichtige Rolle in der Clearance der Partikel, der Partikeltoxizität sowie dem therapeutischen Effekt [24]. Dabei kontrolliert die Zusammensetzung der Corona den Mechanismus der Aufnahme in die Zelle. Hierbei unterscheidet man zwischen der Phagozytose (Aufnahme von Feststoffen) und der Pinozytose (Aufnahme von Flüssigkeiten).

Die Phagozytose kann in drei Grundmechanismen eingeteilt werden: der Clathrin oder Caveola vermittelten Endozytose, der Makropinozytose sowie der Clathrin und Caveola unabhängigen Endozytose [25].

Ein wichtiger Teil für die Vermittlung der Phagozytose spielen die sogenannten Opsonine. Hierzu zählen verschiedene Proteine, wie Immunglobuline und Komplementfaktoren, welche den Makrophagen des MPS helfen die NP als Fremdkörper zu erkennen. Als Teil der Corona können diese das Verhalten der Nanocarrier im Körper und somit auch deren Effektivität beeinflussen.

Bis heute ist der Mechanismus mit welchem die Zellen bestimmte Nanomaterialien aufnehmen Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dieser kann, von Material zu Material, variieren. Auch die Größe und Form des Carriers kann die Art der Phagozytose beeinflussen. Hinzu kommt der Einfluss der Corona selbst, die wiederum von verschiedenen Variablen bezogen auf das Material, so wie das Individuum in dem der Carrier zum Einsatz kommt, abhängig ist [26]. Weiter besteht die Möglichkeit, dass die Zellaufnahme über neue, noch unbekannte Prozesse stattfindet [5].

Ritz et al. gehen davon aus, dass Apolipoproteine als Teil der Corona als Dysopsonine wirken, also solche Proteine welche einen gegenteiligen Effekt als die Opsonine auf das IS haben und somit die Blutzirkulation verlängern [10]. Sie stellen somit relevante Proteine für die Untersuchung in der Corona dar, da man durch gezielte Adsorption dieser an den Partikeln deren Blut-halbwertszeit verlängern könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Reagenzien

In Tabelle 4 werden die in der Arbeit verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Lot
Bovine Serum Albumin	Sigma	SLBM5275V
CellMask™ Orange	Life technologies	1370415
Cleaning Solution	Sysmex	1510500025
Decontamination Solution	Sysmex	1421800004
Dodecyl sulfate-Na-salt	Serva	110082
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	1753499
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma	RNBF1393
Essigsäure (Eisessig)	Fisher Scientific	1400245
Ethanol	Merck	K47696783 613
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom	1462 B
GlutaMAX™-I (100x)	Gibco	1735245
Humanes Plasma Citrat	Universitätsmedizin Mainz	18.08.15
Hypochlorite Solution	Sysmex	4A011597-23
Ionic Detergent Compatibility Reagent	Thermo scientific	QL225624
NuPage™ 10% Bis-Tris Gel	Novex Life technologies	15121170
NuPage™ 20x MES SDS running buffer	Life technologies	1675886

Reagenz	Hersteller	Lot
NuPage™ reducing Agent	Life technologies	1762059
NuPage™ LDS sample buffer	Life technologies	1768687
Penicillin Stretomycin	Gibco	15140-122
Pierce 660 nm Protein Assay Reagent	Thermo Fisher	RB226148
Roti®-Histofix 4%	Roth	515238173
SeeBlue Plus2 prestained standard	Invitrogen	1305630
Trypanblau	Sigma	T8154
Trypsin-EDTA	Gibco	25200-056

3.1.2 Verwendete Kits

In Tabelle 5 werden die in der Arbeit verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller	Lot
LDL/VLDL and HDL Purification Kit	Cell Biolabs. Inc	6312017
SilverQuest™	Invitrogen	1691897

3.1.3 Verwendete Geräte

In Tabelle 6 werden die in der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Automated cell counter	TC10™	Bio-Rad
Brutschrank	C200	Labotec
Durchflusszytometer	CyFlow ML	Partec

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikroskop	CKX41	Olympus
Netzteil	PowerPac™ HC	Bio Rad
Platereader	Infinite M1000	Tecan
SDS-Kammer	Bolt Mini Gel Tank	Novex
Schüttler	PS-M3D	Grant Bio
Schüttler	HLC	Itabis
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf
Zentrifuge	Heraeus Pico 21	Thermo Scientific
Zentrifuge	Avanti J-26S XP	Beckman Coulter

3.1.4 Verwendete Software

In Tabelle 7 wird die in der Arbeit verwendete Software aufgeführt.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Software

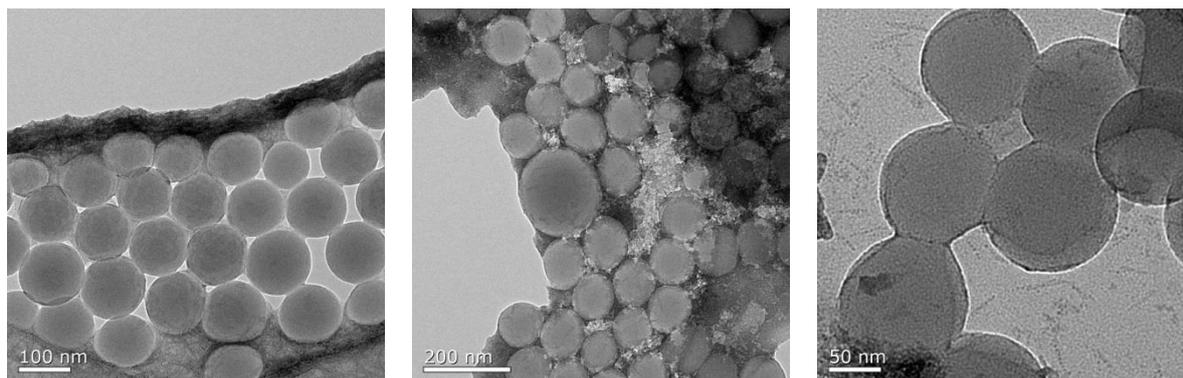
Gerät	Hersteller
FCS Express V4.0	DeNovo Software
Flow Max 3	Partec
I-control 1.6.19.0	Tecan

3.1.5 Verwendete Nanopartikel

Die in der Arbeit verwendeten Polystyrol (PS) Nanopartikel wurden von Katja Klein (Max-Planck Institut für Polymerforschung Mainz; AK Landfester) synthetisiert und charakterisiert. Die Herstellung erfolgte mittels Mini-Emulsions-Copolymerisation unter Verwendung verschiedener Comonomere. Tabelle 8 zeigt die Eigenschaften der NP. Zusätzlich werden in Abbildung 6 Aufnahmen eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) der verschiedenen Partikel gezeigt.

Tabelle 8: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Nanopartikel

Partikel	Surfactant	Durchmesser [nm]	Oberflächen- funktionali- sierung	Zeta Potential	Farbstoff
PS-Lut	Lutensol (Lut)	134	-	-6,67	Bodipy (523/536)
PS-Lut- COOH	Lutensol	130	COO ⁻	-7,21	Bodipy (523/536)
PS-Lut- NH ₂	Lutensol	131	NH ³⁺	+7,58	Bodipy (523/536)



PS-Lut

PS-Lut-COOH

PS-Lut-NH₂

Abbildung 6: TEM-Aufnahmen der unterschiedlich funktionalisierten Partikel nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat (Durchgeführt von Maria Kokkinopoulou (AK Landfester)).

3.2 Methoden

3.2.1 LDL/VLDL und HDL Purification

Es ist möglich LDL/VLDL bzw. HDL mithilfe von Polyanionen und divalenten Kationen zu fällen [27]. Dabei können sulfonierte Polysaccharide bei neutralem pH unlösliche Komplexe mit LDL formen. Der Ablauf der Reaktion hängt dabei vom Molekulargewicht (MW) des Polysaccharids ab. Bei hohem MW ist die Fällung ohne Zugabe divalenter Kationen möglich. Wird die Fällung

aber beispielsweise mit Heparin, welches ein geringes MW hat, durchgeführt so ist die Zugabe eines divalenten Kations erforderlich. Dabei bestimmt das Kation die Bedingungen für die Reaktion [28].

Die Trennung von LDL/VLDL und HDL mittels Fällung ist durch die Nutzung bestimmter Polyanionen (ausgeschlossen Heparin) möglich. Dabei erfolgt diese über die unterschiedlichen Konzentrationen des Polyanions sowie des Kations. So wird es möglich im ersten Schritt LDL/VLDL aus dem Plasma zu entfernen und im zweiten Schritt HDL zu fällen [27]. Der dem Kit zugrundeliegende Mechanismus ist nicht bekannt, es wird allerdings angenommen, dass Dextran Sulfat und $MnCl_2$ der Fällung dienen.

3.2.1.1 Durchführung

Vor jedem Versuch mit Plasma wurde dieses zunächst 30 Minuten bei 20.000 x g bei 4 °C zentrifugiert um ggf. vorhanden Überstände zu entfernen.

Zu 10 ml Plasma auf Eis wurden 50 µl Dextran-Lösung sowie 500 µl Precipitation Solution A zugegeben und anschließend 5 Minuten inkubiert. Nachdem 10 Minuten bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abgenommen und für die spätere HDL Fällung bei 4 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 400 µl Bicarbonat Lösung resuspendiert, wieder um 10 Minuten unter denselben Bedingungen zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurden 10 ml der 1 x Precipitation Solution B zugegeben. Diese wurde hergestellt, indem zu 1 ml der 10 x Precipitation Solution B in 9 ml Wasser gegeben wurde. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet zunächst in 200 µl NaCl Lösung resuspendiert bevor 10 ml 1x Precipitation Solution C zugegeben wurde. Diese wurde aus 1 ml 10 x Precipitation Solution C und 9 ml Wasser hergestellt. Daraufhin wurde 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und der vorherige Schritt wiederholt. Nach weiterer 10-minütiger Zentrifugation wurde das Pellet nochmals in 200 µl NaCl resuspendiert bevor 80 µl Dextran Removal Solution zugegeben wurde und 1 h bei 4 °C inkubiert wurde. Der Überstand nach dem Zentrifugieren enthielt das VLDL/LDL und wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt.

Zur HDL Fraktion wurden 600 µl Dextran Solution sowie 1,5 ml Precipitation Solution A gegeben bevor 2 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde. Danach wurde 30 Minuten bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Pellet in 5 ml Resuspension Buffer resuspendiert. Dieser wurde aus 50 µl Dextran Solution, 0,5 ml Precipitation Solution A sowie 4,45 ml Tris Solution hergestellt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 6.000 x g zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde 1 x in HDL Wash Solution resuspendiert und 30 Minuten unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zur Herstellung dieser Wash Solution wurden 1,2 ml 5x Wash Solution mit 4,8 ml Wasser vermengt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde nochmals bei 10 Minuten bei 6.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt und 900 µl Dextran Removal Solution zugegeben, bevor 1 h bei 4 °C inkubiert wurde. Danach wurde nochmals zentrifugiert und der HDL enthaltende Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführt.

3.2.2 Bildung der Corona

Die Coronen wurden auf den unterschiedlich funktionalisierten Nanopartikeln hergestellt. So sollten Unterschiede in der Corona und deren Verhalten, abhängig von der Funktionalisierung der Partikel, bestimmt werden.

Wie bereits in Kapitel 2.1 erläutert wurde, differenziert sich die Corona in die sogenannte „harte und weiche Corona“. Die vorliegende Arbeit bezieht sich dabei auf die fest gebundenen und nicht leicht desorbierbaren Proteine der harten Corona. Durch diverse Waschschrte während der Corona Herstellung werden die Proteine der weichen Corona entfernt.

Mittels TEM und einer Negativfärbung mit Uranylacetat wurden von Maria Kokkinopoulou (AK Landfester) zusätzlich Aufnahmen der verschieden Coronen gemacht.

3.2.2.1 Durchführung

Zunächst wurden je 0,05 m² Nanopartikel auf 300 µl mit H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden zu den jeweiligen Partikeln, abhängig von der angestrebten Corona, 420 µg HDL, 180 µg LDL, 1000 µl Plasma (65x10³ µg) oder 1 ml Wasser gegeben und 1 h auf dem Schüttler bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde, wie in allen weitere Zentrifugationsschritten, 1 h bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Partikel-Pellet mit 1 ml PBS gewaschen und 1 h zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Anschließend wurde die Protein Corona für weitere Untersuchungen von den Partikeln desorbiert. Hierzu wurde das Pellet nach dem letzten Waschschrte mit 100 µl 2% (w/v) SDS, 62,5 mmol Tris-HCL Lösung resuspendiert und 5 Minuten bei 95 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Danach wurde nochmals für 1 h zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführt.

Für die TEM-Aufnahmen wurden nach dem ersten Resuspensionschritt sowie nach dem letzten Waschschrift 10 µl NP entnommen.

3.2.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Form der Elektrophorese bei der Proteine anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld getrennt werden. Diese Geschwindigkeit wird im Allgemeinen durch folgenden Proteineigenschaften bestimmt:

- Größe der Proteine - Kleine Moleküle wandern leichter durch das Gel, wohingegen Große Moleküle stärker zurückgehalten werden
- Struktur der Proteine - Kompakt gefaltete Proteine wandern schneller durch die Gelporen im Vergleich zu längeren Proteinfäden, da mehr Wechselwirkungen zwischen Gel und Protein besteht
- Ladung der Proteine - Die Ladung der Proteine beeinflusst ebenfalls die Wanderungsgeschwindigkeit. Proteine mit negativer Nettoladung wandern zur Anode, Proteine mit einer positiven Ladung wandern zur Kathode

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine, durch die Denaturierung mit SDS, ausschließlich anhand ihrer Größe getrennt. Diese Trennung erfolgt auf einem Polyacrylamidgel, welches wie ein Sieb wirkt. Der Gehalt an Polyacrylamid im Gel richtet sich nach der Masse der Moleküle, welche getrennt werden sollen.

Hierzu wird das SDS im Überschuss zu der Probe gegeben und diese anschließend erhitzt. Dabei werden die tertiär und sekundär Strukturen zerstört. Das SDS lagert sich an die gestreckten Proteine an und besetzt deren Oberfläche mit negativer Ladung. Somit wird die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar und das Ladungs-, Größenverhältnis der Proteine annähernd gleich. Durch das zusätzliche Aufbringen eines Markers, welcher Proteine bekannter Größe enthält, können die während der SDS-PAGE entstandenen Banden einer ungefähren Proteingröße zugeordnet werden. Dies ermöglicht einen ersten qualitativen Überblick über die in der Corona vorhandenen Proteinen.

Die entstandenen Banden werden mithilfe einer Silberfärbung detektiert. Dabei werden die Proteine zunächst mit einer Eisessig/Ethanol-Lösung innerhalb des Gels fixiert und eine Silbernitratlösung auf das Gel gegeben. Die Silberionen binden dabei an verschiedene funktionelle Gruppen der Proteine. Durch anschließendes Behandeln mit alkalischem Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert, wodurch die proteinhaltigen Stellen schwarz erscheinen.

3.2.3.1 Durchführung

Zunächst wurde die Proteinkonzentration mithilfe des Pierce 660 nm Protein Assay Reagenz bestimmt. Hierzu wurde zunächst ein Standard von 2000 µg/ml hergestellt und daraus die Verdünnungen für eine Kalibriergerade hergestellt (1.600, 1.200, 800, 400, 200 und 100 µg/ml). Anschließend wurden 10 µl/Well Verdünnung bzw. Probe pipettiert und 150 µl Pierce Reagenz zugegeben. In 20 ml von dieser wurden zuvor 1 mg Ionic Detergent Compatibility Reagent gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation auf dem Schüttler bei 300 rpm wurde die Adsorption bei 660 nm gemessen und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels Kalibriergerade bestimmt.

Für die anschließende SDS-PAGE wurden je 1 mg der Probe mit ultrareinem H₂O auf ein Volumen von 16,25 µl aufgefüllt. Danach wurden 6,25 µl LDS und 2,50 µl Reducing Agent zu der Probe gegeben und 5 Minuten bei 70 °C und 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Nachdem die Elektrophorese Kammer mit 1 x MES Laupuffer befüllt und das Gel platziert wurde, wurden 10 µl Standard in die erste Gel Tasche gefüllt. Die anderen Taschen wurden mit je 20 µl Probe befüllt. Die Parameter für die Durchführung werden in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Parameter für die Durchführung der SDS-PAGE

Zeit [h]	Stromstärke [A]	Spannung [V]	Leistung [W]
2	0,03	30	1
0,5	0,09	150	14

3.2.3.1.1 Silberfärbung

Zur Detektion der Banden wurde anschließend eine Silberfärbung durchgeführt. Hierzu wurde das Gel aus der Plastikhülle entfernt und 10 Sekunden mit 50 ml ultrareinem H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten mit 50 ml Fixativ auf dem Schüttler (300 rpm bei RT) inkubiert. Das Fixativ wurde aus 40 % Ethanol (EtOH), 10 % CH₃COOH hergestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel mit 50 ml 30 % EtOH für 10 Minuten gewaschen, bevor es für weitere 10 Minuten in 50 ml Sensitizing-Lösung inkubiert wurde. Diese besteht aus 30 % EtOH, 5 ml Sensitizer und H₂O. Danach wird das Gel 10 Minuten in je 50 ml 30 % EtOH und weiteren 10 Minuten in Wasser gewaschen, bevor es 15 Minuten in 50 ml Staining Solution inkubiert wurde. Die Herstellung dieser Lösung erfolgte aus 49,5 ml H₂O und 0,5 ml Stainer. Nach der Färbung wurde der Entwickler zugegeben. Hierzu wurde das Gel nochmals 5 Sekunden in Wasser gewaschen. Daraufhin wurden 50 ml der Developer Solution (5 ml Developer, 1 Tropfen Develop Enhancer und 45 ml H₂O) auf das Gel gegeben. Nach deutlichem Erkennen der Banden (zwischen 4-8 Minuten) wurde die Entwicklungsreaktion mithilfe 5 ml Stopplösung beendet.

3.2.4 Zellaufnahme

Der Einfluss der verschiedenen Coronen auf die Zellaufnahme, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Diese Methode detektiert zum einen die Lichtstreuung und zum anderen die Fluoreszenzintensität der Zellen. Die in der Arbeit verwendeten Nanopartikel enthalten den Fluoreszenzfarbstoff Bodipy, welcher sein Absorptionsmaximum bei 523 nm und sein Emissionsmaximum bei 536 nm hat. Kommt es zur Aufnahme der Partikel, kann deren Fluoreszenz in den Zellen bestimmt werden. Somit korreliert die Stärke der Fluoreszenz direkt mit der Menge an aufgenommenen Partikeln.

Die Methode der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass einzelne Zellen innerhalb eines laminaren Flusses eine sogenannte Durchflusszelle passieren. Hier trifft ein Laserstrahl auf die Zellen und das Streu- sowie das Fluoreszenzlicht wird mittels verschiedener Spiegel und Filter zu den einzelnen Detektoren geleitet, wo das optische in ein elektrisches Signal umgewandelt wird.

Durch die Beugung des einfallenden Lichtes an den verschiedenen Zellen, kommt es zur Entstehung des Streulichtes. Dabei unterscheidet man das Vorwärtstreulicht (FSC) und das Seitwertstreulicht (SSC). Das FSC liegt in der gleichen Ebene wie der Laserstrahl und ist ein

Maß für die Zellgröße. Es entsteht durch die Ablenkung des Lichtes an der Zelloberfläche. Das SSC ist hingegen ein Maß für das Licht, welches im rechten Winkel von den Zellen gestreut wird. Es gibt Auskunft über die Zellgranularität und die Zellkomplexität und entsteht durch Lichtbeugung an z. B. der Zellmembran oder dem Zellkern.

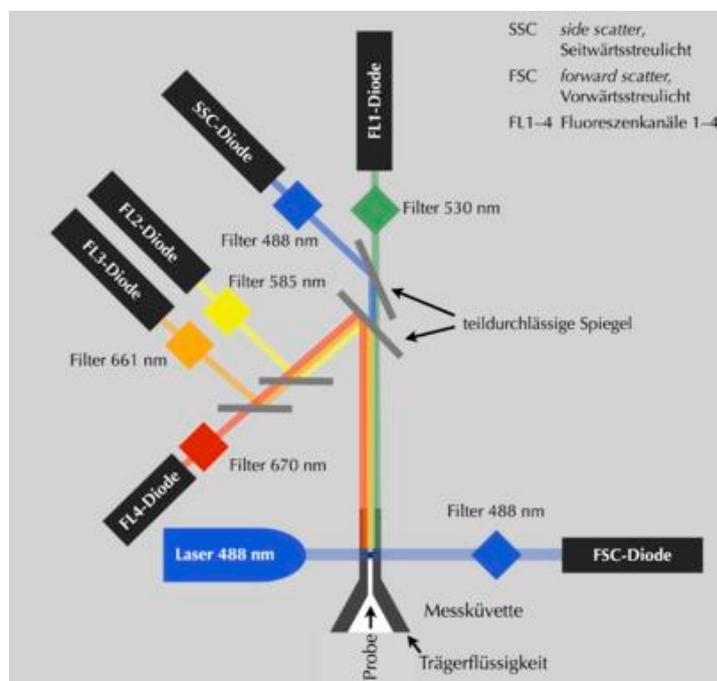


Abbildung 7: Beispiel für einen schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers [29].

Da mithilfe des Durchflusszytometers nicht bestimmt werden kann, ob die Partikel von der Zelle aufgenommen werden oder ob es nur zu Adsorption dieser an der Zelloberfläche kommt, wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop (CLSM) genutzt. Die Aufnahmen der Probe wurden von Jonas Reinholz (AK Landfester) gemacht.

3.2.4.1 Zellkultur

In der Arbeit wurden Maus-Makrophagen der Linie RAW 264.7 verwendet. Diese wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium welches 10 % FBS und 1% PenStrep sowie Glutamin enthält in Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Passagiert wurden die Zellen immer dann, wenn das Zellwachstum nahezu konfluent war. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt und die Kulturflasche mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 7,5 ml 0,25 % Trypsin/EDTA zugegeben und 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 7,5 ml Medium zugegeben um die Reaktion zu stoppen, 5 Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert bevor die überschüssige Lösung abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert

wurde. Die Zellzahl sowie die Viabilität wurden anschließend mit dem Automated cell counter mithilfe von Trypanblau bestimmt.

3.2.4.1.1 Durchführung

Zunächst wurden in eine 24 Well Platte 200.000 Zellen/Well ausgesät und 24 Stunden in 1 ml Medium inkubiert. Für den Versuch wurden dann 0,05 ml des jeweiligen NP auf 300 µl mit Wasser aufgefüllt und hierzu 420 µg HDL, 180 µg LDL, 1000 µl (65×10^3 µg) Plasma oder 300 µl Wasser gegeben. Anschließend wurde 1 Stunde bei 37 °C und 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert bevor 1h bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Danach wurde das Pellet in FBS freiem Medium resuspendiert. Das Volumen an Medium wurde so gewählt, dass die Konzentration bei 75 µg/ml NP lag.

Bevor 1 ml der NP auf die Zellen gebracht wurde, wurden diese zunächst zwei Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach aufbringen der Partikel wurden die Zellen 2 Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das FBS freie Medium mit den NP Partikel abgesaugt, drei Mal mit 1ml PBS gewaschen und 500 µl Trypsin in jedes Well pipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 500 µl Medium abgestoppt und die Zellen in Eppendorf Tubes überführt. Anschließen wurde für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und das Zellpellet für die darauffolgende Messung mit dem Durchflusszytometer mit 1 ml PBS resuspendiert. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität mit dem FL1 Kanal gemessen

Die darauffolgende Auswertung wurde mit dem FCS Express 4 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst in einem Dotplot gated und somit der Zelldebris ausgeschlossen (Abbildung 8 links). Anschließend wurde die mediane Fluoreszenzintensität mithilfe des Histogramms (Abbildung 8 rechts) bestimmt. Für die weitere Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen ohne Partikel von den einzelnen Proben subtrahiert.

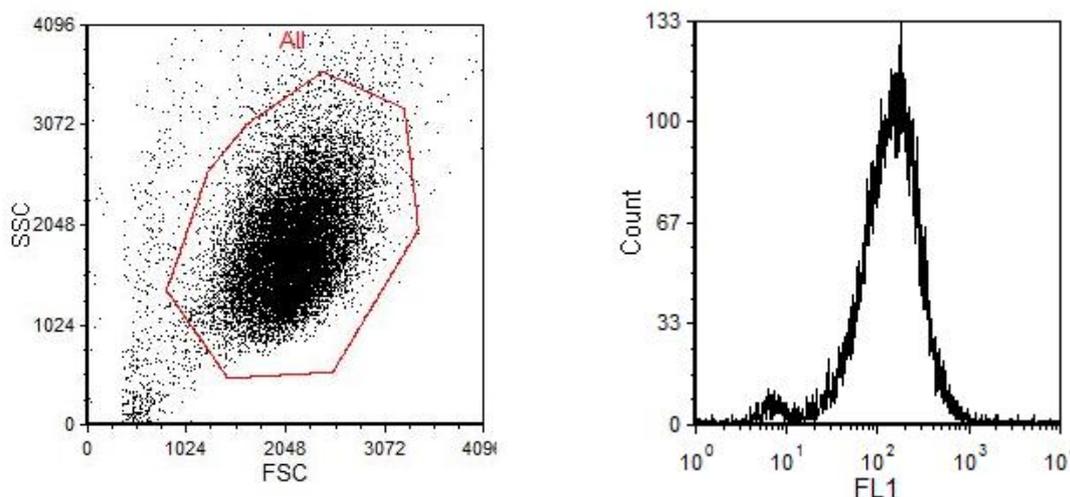


Abbildung 8: Bestimmung der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie. Für die Auswertung wurden die Zellen zunächst gegatet (links) um so Zelldebris auszuschließen. Anschließend wurde mithilfe des FL 1 Kanals und einem Histogramm (rechts) die mediane Fluoreszenzintensität bestimmt.

3.2.4.1.1.1 Durchführung CLSM

Zunächst wurden 30.000 Zellen in 1 μ -Slide Ibidi ausgesät und diese in 250 μ l Medium für 24 Stunden inkubiert. Die Corona für die Zellaufnahme wurde wie in Punkt 3.2.4.1.1 hergestellt. Nachdem das NP Pellet in FBS-freiem Medium resuspendiert wurde, wurden 250 μ l/Well pipettiert und anschließend 2 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde drei Mal mit 250 μ l PBS gewaschen, bevor 250 μ l Roti®-Histofix in jedes Well pipettiert wurde und 15 Minuten bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde nochmals 1x mit PBS gewaschen. Nun wurden 250 μ l einer 5 μ mol CellMask™ Orange Lösung in jedes Well pipettiert und weitere 5 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde einer weiteres Mal mit PBS gewaschen und anschließend für die Aufnahmen in jedes Well weitere 250 μ l PBS pipettiert.

3.2.5 Massenspektrometrie

Die beiden Fraktionen sowie die zugehörigen Coronen wurden von Artur Ghazaryan (AK Landfester) auf ihre genaue Zusammensetzung mittels Massenspektrometrie untersucht. Hierzu wurden die Proteine zunächst mit Trypsin in Peptide gespalten, bevor diese analysiert wurden. Die Trennung erfolgte durch eine Ultra High Performance Liquid Chromatographie (UPLC) auf

einer reversed phase 18C Säule. Die anschließende Ionisation erfolgt durch eine Nano-Elektrosprayionisation (ESI)

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der verschiedenen Experimente erfolgte mithilfe von GraphPad Prism®. Ob und zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede in der Zellaufnahme bestehen, wurde mit einem One-way ANOVA untersucht. Das Konfidenzintervall wurde auf 99,0 % gelegt. Dies wurde bewusst klein gewählt um sicherzustellen, dass tatsächlich signifikante Unterschiede vorliegen. Eine Übersicht der einzelnen Signifikanzstufen wird in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 10: Übersicht der einzelnen Signifikanzstufen

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bezeichnung für den Unterschied	Symbol
$\alpha > 5\% / p > 0,05$	Nicht signifikant	ns
$\alpha \leq 5\% / p \leq 0,05$	Signifikant	*
$\alpha \leq 1\% / p \leq 0,01$	sehr signifikant	**
$\alpha \leq 0,1\% / p \leq 0,001$	höchst signifikant	***

[30]

4 Ergebnis

4.1 HDL und LDL Fraktionen

Das für die Arbeit verwendete HDL und LDL wurde aus humanem Plasma gewonnen. Die Trennung erfolgt hierbei durch eine Fällungsreaktion mittels Kit und Zentrifugation.

Um einen ersten Überblick über die qualitative Zusammensetzung der Fraktionen zu erhalten, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Anschließend wurden die Fraktionen mittels MS analysiert, um die exakte Zusammensetzung zu bestimmen.

Zusätzlich sind in Abbildung 12 TEM-Aufnahmen der beiden Fraktionen dargestellt.

4.1.1 SDS-PAGE der HDL und LDL Fraktion

Die folgende SDS-PAGE zeigt die Auftrennung der HDL und LDL Fraktionen sowie die des reinen Plasmas, aus welchem die einzelnen Fraktionen mittels Kit gewonnen wurden.

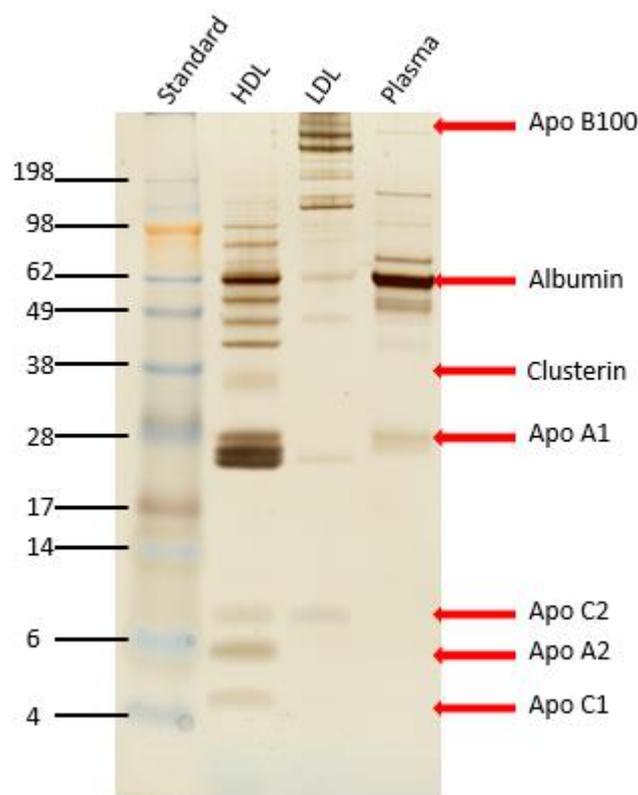


Abbildung 9: SDS-PAGE der HDL und LDL Fraktion sowie des Plasmas in einem 10% Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit 1 µg Protein beladen. Der Standard zeigt die Masse der Proteine in kDa.

Beim Vergleich der einzelnen Banden sind deutliche Unterschiede ersichtlich. So stellt Albumin die dominierende Bande in der Plasma Probe dar, wohingegen in der HDL Fraktion eine breite Bande in der Höhe von ca. 28 kDa zu erkennen ist. Diese Bande weist auf das Apolipoprotein A1 hin, welches die Hauptkomponente des HDL darstellt. Auch die Plasma Probe zeigt eine schwache Bande in diesem Bereich. Zusätzlich weist die HDL Fraktion verschiedene schwache Banden im Bereich von 38 – 98 kDa auf, welche mithilfe der SDS-PAGE nicht identifiziert werden können. Weiterhin ist eine schwache Bande im Bereich von 38 kDa zu erkennen, die möglicherweise auf das Protein Clusterin hindeutet.

Die HDL Fraktion zeigt neben der breiten Apo A1 Bande zusätzlich eine deutliche Albumin Bande. Verglichen zu der Albumin Bande des reinen Plasmas ist diese jedoch geringer ausgeprägt, in der LDL Fraktion ist diese kaum noch zu erkennen. Weiter weist die Plasma Probe keine Banden unterhalb eines Molekulargewichtes von 14 kDa auf. Die unterschiedlichen Banden in diesem Bereich der Lipoprotein Fraktionen stellen mit großer Wahrscheinlichkeit das Apo C1, 2 und 3 sowie das Apo A2 dar.

Die LDL Fraktion zeigt mehrere Banden im Bereich > 98 kDa, welche über die SDS-PAGE nicht identifiziert werden können. Die verschiedenen Banden im Bereich > 198 kDa können einen Hinweis auf das Apo B100 darstellen, welches ein Molekulargewicht von 550 kDa besitzt und somit nicht mithilfe des Standards identifiziert werden kann.

4.1.2 Analyse der HDL und LDL Fraktionen mittels Massenspektrometrie

In Abbildung 10 wird die prozentuale Zusammensetzung der HDL Fraktion wiedergegeben. Mit 17,8 % stellt das aus dem HDL stammende Apo A1 das dominierende Protein der Fraktion dar.

Zahlreiche Proteine sind in einem prozentualen Anteil von weniger als 3 % vorhanden. Hierzu zählen auch das Apo A4 (1,6 %), das Apo E (0,7 %) sowie das Apo A2 (0,4 %) welche auch Bestandteil der HDL Fraktion sind. Auch der Anteil an Clusterin ist mit 0,9 % sehr gering.

Zusätzlich wurden noch acht weitere Proteine in der Fraktion gefunden, die in einem Anteil von > 3 % vorhanden sind. Darunter verschiedene Fibrinogen Ketten, Fibronektin oder auch Complement C3. Diesem kann jedoch keine HDL Zugehörigkeit zugewiesen werden. Daher sind sie für die weitere Arbeit irrelevant. Auch Albumin stellt mit 5,3 % eines dieser Proteine dar. Obgleich keine Verbindung zu den Lipoproteine besteht, stellt es eine wichtige Komponente für das Verständnis der Corona dar, da es in vielen Coronen den dominierenden Part darstellt [31].

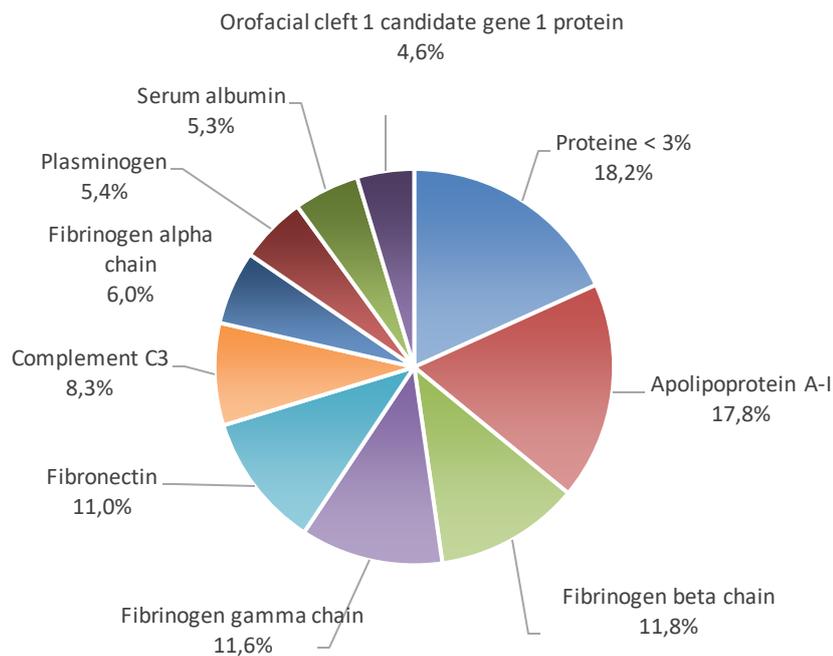


Abbildung 10: Prozentuale Zusammensetzung der HDL Fraktion nach Aufreinigung mittels Purification Kit aus humanem Plasma

Die Zusammensetzung der LDL Fraktion wird in Abbildung 11 aufgezeigt. Das aus dem LDL stammende Apo B100 stellt mit 54,2 % die Hauptkomponente dar. Zusätzlich wurde Apo C3 mit einem Anteil von 3 % detektiert.

Auch in dieser Fraktion wurden einige Proteine in einem prozentualen Anteil von weniger als 3 % detektiert. Darunter fallen nur, für die Arbeit weniger relevanten Proteine, wie Clusterin mit 1,6 %, Apo A1 mit 1,5 % sowie das Albumin mit 1,1 %.

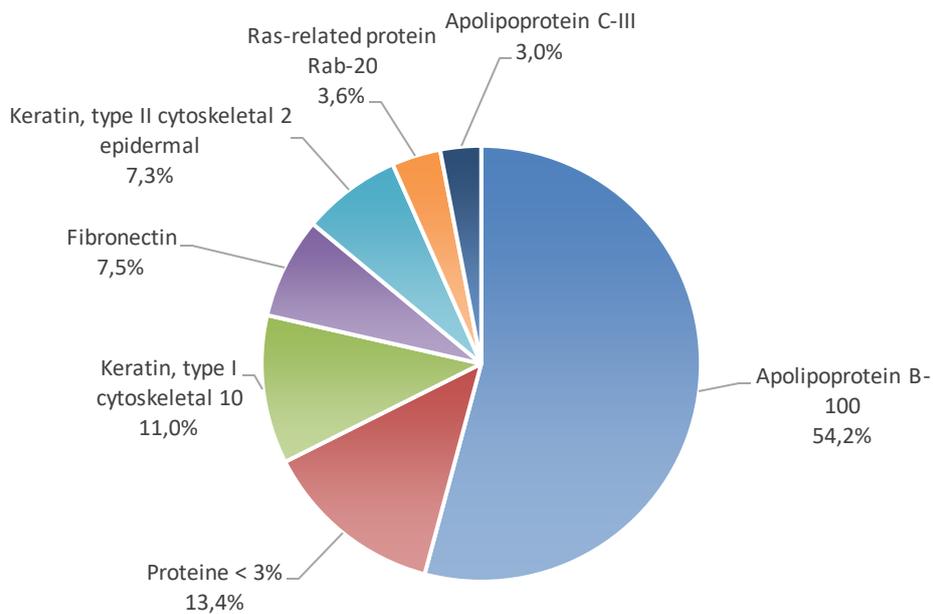


Abbildung 11: Prozentuale Zusammensetzung der LDL Fraktion nach Aufreinigung mittels Purification Kit aus humanem Plasma

4.1.3 TEM Aufnahmen der HDL und LDL Fraktion

Die beiden untenstehenden Aufnahmen (vgl. Abbildung 12) zeigen die beiden Fraktion nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat.

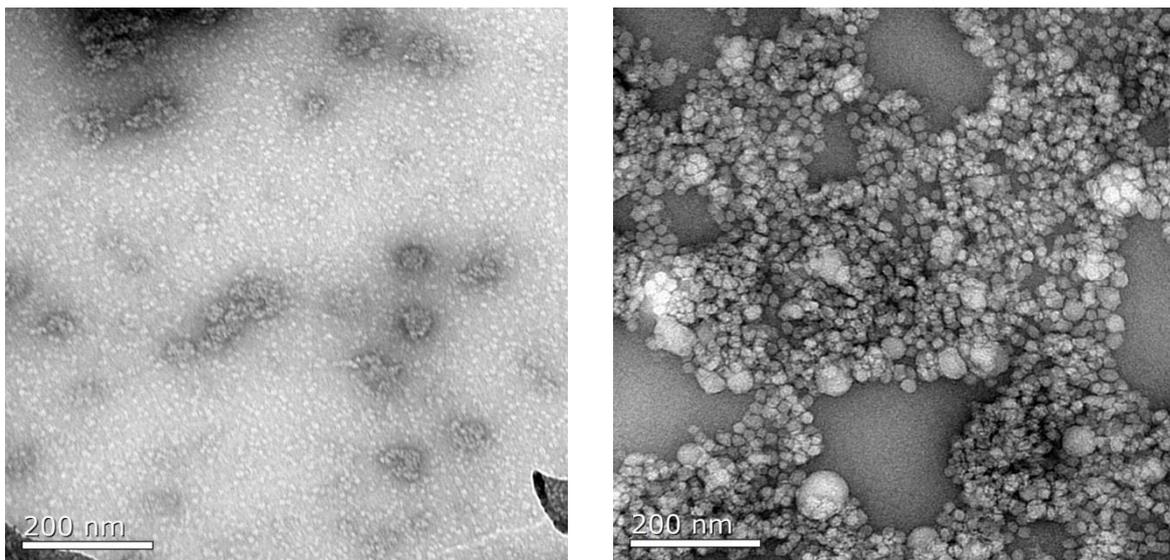


Abbildung 12: Aufnahme der HDL (links) und LDL (rechts) Fraktion mittels TEM nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat (Durchgeführt von Maria Kokkinopoulou (AK Landfester)).

Die beiden Aufnahmen der Fraktionen zeigen deutliche Unterschiede in den darauf sichtbaren Strukturen sowie deren Größen. Wie bereits in Punkt 3.2.1 erwähnt, wird mit dem HDL und LDL Purification Kit HDL von LDL getrennt, jedoch ist in der LDL Fraktion zusätzlich das VLDL vorhanden. Dies lässt sich auch in den TEM Aufnahmen erkennen. So zeigt die LDL Fraktion (rechts) Vesikel unterschiedlicher Größe. Diese Unterschiede lassen sich auch in der HDL Fraktion (links) erkennen. Dabei handelt es sich jedoch um Aggregate der Vesikel.

Das LDL ist mit 20-25 nm deutlich größer als das 10 nm Durchmesser fassende HDL. Dieser Größenunterschied ist in den Aufnahmen erkennen. So sind die in der HDL Fraktion zu sehenden Vesikel deutlich kleiner als die der LDL Fraktion.

4.2 Die HDL und LDL Coronen an den verschiedenen Nanopartikeln

Für die Untersuchung der einzelnen Coronen wurden 0,05 m² der unterschiedlichen NP mit 420 µg HDL, 180 µg LDL, 65x10³ µg Plasma oder 300 µl Wasser inkubiert. Außerdem wurde eine Corona aus HDL und LDL aufgebaut um zu detektieren, welches Lipoprotein die höhere Affinität zu den Partikeln aufweist. Hierzu wurden HDL und LDL in der gleichen Menge wie in den einzelnen Lipoprotein Coronen (HDL=420µg und LDL=180 µg) gemeinsam mit den NP inkubiert. Nachdem die „weiche“ Corona durch mehrere Waschschriffe entfernt wurde, wurde die „harte“ Corona mittels SDS von der NP entfernt und mithilfe der SDS-PAGE sowie dem MS analysiert. Zur Visualisierung wurden mikroskopische Aufnahmen mithilfe des TEM gemacht.

Des Weiteren wurde ein sogenannter Stabilitätstest durchgeführt. Hierbei sollte analysiert werden, ob die in der ersten Inkubationsphase gebundenen Proteine, durch die in der zweiten Phase auf die Corona treffenden Proteine verdrängt werden. Die NP wurden hierzu zunächst eine Stunde in z. B. HDL inkubiert und anschließend ein Waschschriff mit PBS durchgeführt. Daraufhin wurde eine weitere Stunde z. B. LDL inkubiert, bevor mit weiteren Waschschriffen die „weiche“ Corona entfernt und die „harte“ Corona von dem Partikel für die weitere Analyse gelöst wurde. Dieser Versuch wurde mit HDL, LDL sowie Plasma in sämtlichen Kombinationen durchgeführt.

4.2.1 SDS-PAGE der Coronen

Die SDS-PAGE zeigt die HDL/LDL Fraktion und das humane Plasma, aus welcher die Coronen hergestellt wurden, sowie die zugehörigen Coronen an den verschiedenen NP. Die Banden der Partikel PS-Lut und PS-Lut-NH₂ weisen dabei eine große Ähnlichkeit auf.

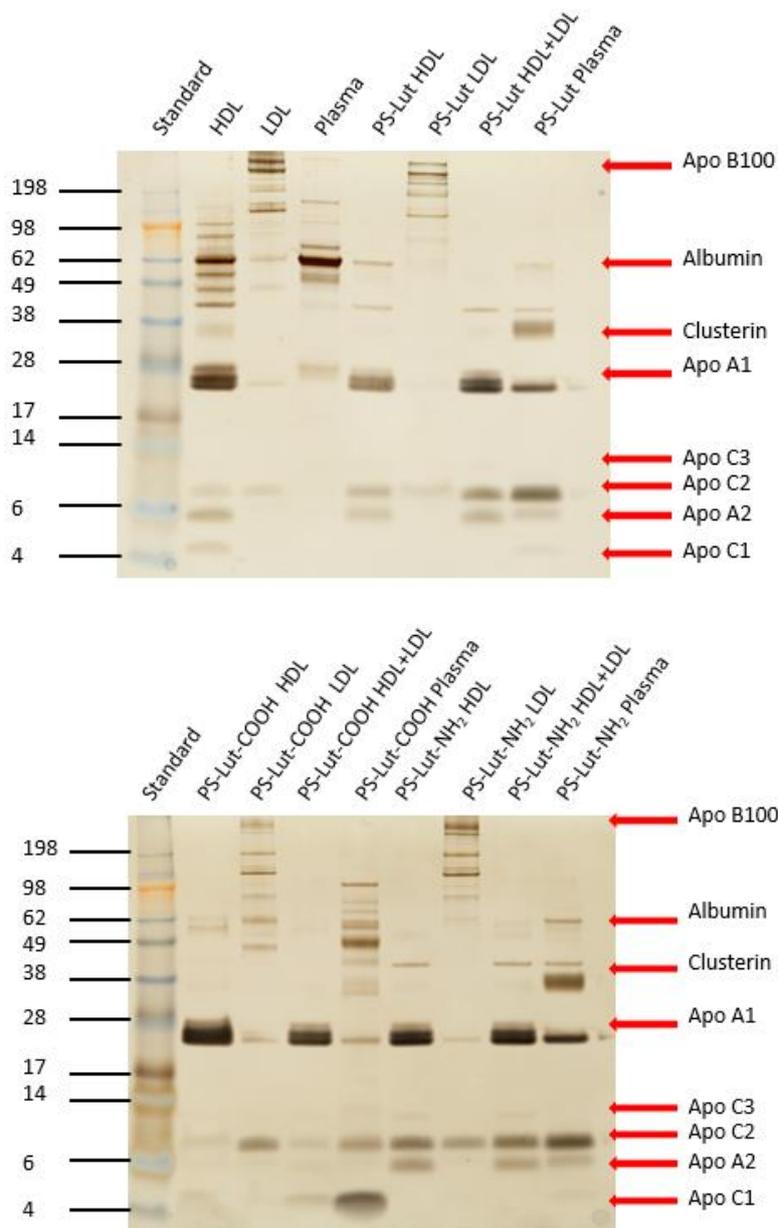


Abbildung 13: SDS-PAGE der Coronen aus 1 μ g HDL, LDL, einer Kombination aus beiden Lipoproteinen (HDL+LDL) sowie aus humanem Plasma an verschiedenen funktionalisierten NP in einem 10 %igem Polyacrylamid Gel. Der Standard zeigt die Masse der Protein in kDa.

Beim Betrachten die verschiedenen Coronen aus der HDL Fraktion fällt auf, dass Apo A1 eine hohe Affinität zu allen drei Partikel aufweist.

Ausschließlich der Partikel PS-Lut zeigt eine deutliche Bande im Bereich von 62 kDa in der HDL Corona. Diese Bande weist auf das Protein Albumin hin, welche verglichen mit der Bande der reinen Fraktion deutlich schwächer erscheint.

Die Banden der LDL Coronen weisen eine hohe Ähnlichkeit zu denen der reinen LDL Fraktion auf. Nur der PS-Lut-COOH Partikel zeigt zusätzlich einige unbekannte Banden im Bereich von 98-49 kDa.

Bei Inkubation der NP mit HDL und LDL in Kombination, scheint ausschließlich die HDL Fraktion zu binden. Während eine deutliche Bande im Bereich von 28 kDa ersichtlich ist, was für das Protein Apo A1 spricht, sind keine Banden im Bereich 98-198 kDa erkennbar. Die reine LDL Fraktion zeigt in diesem Bereich jedoch verschiedene charakteristische Banden. Da HDL in einer größeren Menge als LDL eingesetzt wurde, wurde der Versuch wiederholt. Hierzu wurden von beiden Lipoproteinen die gleichen Proteinmengen eingesetzt. So sollte nachgewiesen werden, ob die Konzentration an LDL in den eben gezeigten Ergebnissen zu gering war.

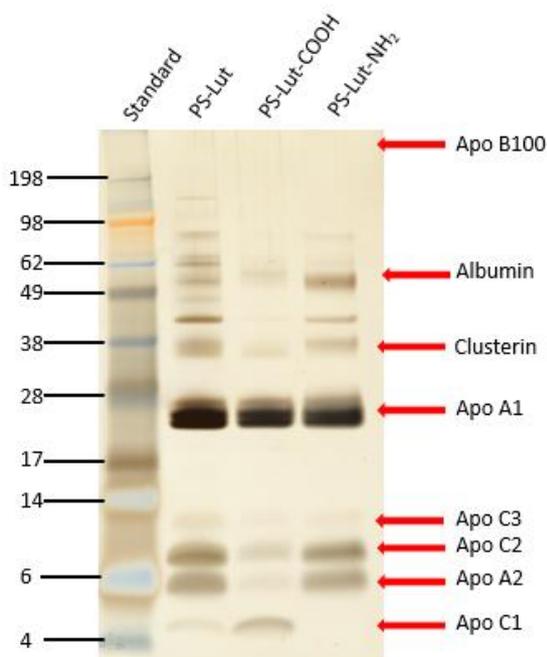


Abbildung 14: SDS-PAGE der Coronen aus 1 µg einer Kombination beider Lipoproteinen in gleicher Konzentration an verschiedenen funktionalisierten NP in einem 10%igem Polyacrylamid Gel. Der Standard zeigt die Masse der Protein in kDa.

Die SDS-PAGE zeigt, dass auch hier im Bereich von 89-198 kDa und höher, keine Banden detektiert werden können. Werden HDL und LDL in gleicher Proteinkonzentration (420µg) verwendet, bindet ebenfalls ausschließlich HDL in einer für die Silberfärbung ausreichender Konzentration.

Während die Albumin Bande in der humanen Plasma Probe als dominierende Bande stark hervorsteht, ist diese in den verschiedenen Coronen nur schwach erkennbar. Hier stellt das Apo A1 die deutlichste Bande dar. Es zeigen sich verschiedene Banden, welche in der Plasma Probe kaum bis nicht erkennbar sind. In der Höhe von ca. 38 kDa ist bei allen drei Partikeln eine breite Bande, welche auf das Protein Clusterin hinweist, erkennbar. Diese ist ausschließlich in den Plasma Coronen erkennbar. Weiter zeigen sich verschiedene Banden im Bereich 14 - 4 kDa, welche für die verschiedenen Apo C's sowie das Apo A2 steht.

4.2.1.1 Proteinkonzentration

Neben der qualitativen Analyse der gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE, wurde die Proteinkonzentration mithilfe des Pierce 660 nm Protein Assay und einer zugehörigen Kalibriergerade bestimmt. Aus der Proteinkonzentration wurde anschließend die Menge an gebundenem Protein bestimmt. Daraufhin wurde mithilfe dieser und der ursprünglich eingesetzten Konzentration der prozentuale Anteil an gebundenem Protein berechnet, welche in Tabelle 11 dargestellt wurde.

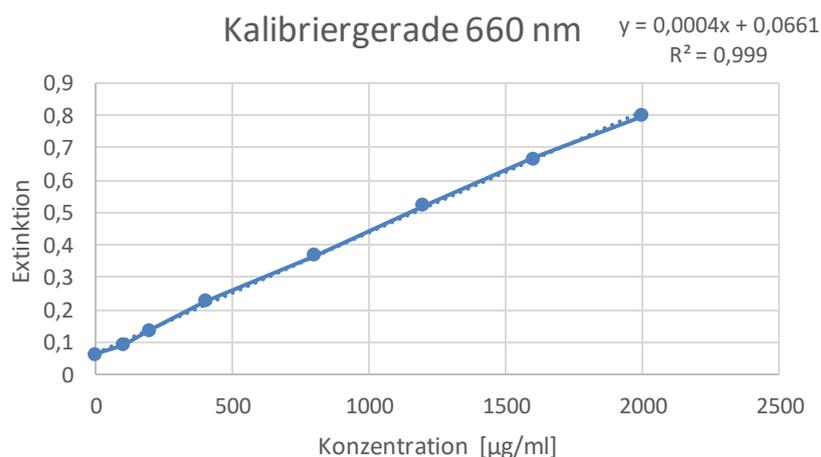


Abbildung 15: Kalibriergerade für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce 660 nm Protein Assay.

Tabelle 11: Eingangs- und Ausgangsproteinkonzentration der Coronen an den unterschiedlich funktionalisierten NP sowie die Mengen an gebundenem Protein in %.

Partikel	Probe	Proteinmenge _{total} [µg]	Proteinmenge nach Desorption [µg]	Anteil an ge- bundenem Protein [%]
	HDL	420	38,7	9,21
	LDL	180	57,27	31,81
PS-Lut	HDL+LDL ¹	600	39,91	6,65
	HDL=LDL ²	840	18,47	2,20
	Plasma	65*10 ³	33,08	0,05
	HDL	420	34,02	8,10
	LDL	180	47,75	26,53
PS-Lut-COOH	HDL+LDL ¹	600	60,36	10,10
	HDL=LDL ²	840	77,75	9,23
	Plasma	65*10 ³	54,51	0,08
	HDL	420	35,08	8,35
	LDL	180	50,93	28,29
PS-Lut-NH ₂	HDL+LDL ¹	600	35,84	5,97
	HDL=LDL ²	840	33,00	3,92
	Plasma	65*10 ³	38,00	1,09

1) HDL 420 µg + LDL 180 µg 2) HDL und LDL in gleicher Konzentration (420 µg)

Die Tabelle zeigt, dass bei allen drei Partikeln der Anteil an gebundenem LDL um ca. 20 % höher ist als der des HDL. Analog zur SDS-PAGE zeigen die Werte des unfunktionalisierten und des aminofunktionalisierten NP eine Homologie zueinander. Sowohl bei HDL als auch bei LDL ist der Anteil an gebundenem Protein größer, als im Falle einer gemeinsamen Inkubation beider Lipoproteine mit den Partikeln. Werden HDL und LDL zusammen in gleicher Konzentration

(HDL=LDL) eingesetzt, ist die gebunden Proteinmenge kleiner, als beim Einsatz unterschiedlicher Mengen (420 µg + 180 µg).

Betrachtet man die Werte des carboxyfunktionalisierten Partikels fällt auf, dass die Proteinmenge auf den Partikeln zunimmt wenn beide Lipoproteine gemeinsam inkubiert werden. So liegt der Anteil an gebundenem Protein in beiden Fällen (HDL+LDL sowie HDL=LDL) über dem Wert des HDL.

4.2.1.2 Stabilitätstest

Abbildung 16 zeigt den Stabilitätstest der verschiedenen Coronen. Wurden HDL und LDL gemeinsam inkubiert, konnten in der anschließenden SDS-PAGE ausschließlich Banden detektiert werden, welche für die HDL Fraktion charakteristisch waren. Dieses Ergebnis stimmt in diesem Versuch jedoch nur bei den beiden Partikeln PS-Lut und PS-Lut-NH₂ überein, wenn die erste Inkubationsphase in HDL durchgeführt wurde. Wurde zunächst in LDL und später in HDL Inkubiert sind die, im Bereich von 98-198 kDa, charakteristischen LDL Banden neben Apo A1 bei ca. 28 kDa detektierbar. Bei den carboxyfunktionalisierten Partikeln sind sowohl die für HDL wie auch die für die LDL charakteristischen Banden unabhängig von der Inkubationsreihenfolge zu erkennen.

Die Bandenmuster des Stabilitätstests von HDL und Plasma sind bei allen drei Partikel nahezu identisch. Es zeigt sich lediglich bei den Partikeln PS-Lut und PS-Lut-NH₂ eine zusätzliche unbekannte Bande im Bereich von 49-38 kDa, wenn die erste Stunde in HDL inkubiert wurde. Diese ist bei Umkehr der Reihenfolge nur schwach erkennbar.

Ebenfalls scheint die Inkubationsreihenfolge von LDL und Plasma irrelevant. In allen drei Partikeln lässt sich neben der Albumin Bande auch die LDL Bande erkennen. Zusätzlich scheint hier die Clusterin Bande bei den Partikeln PS-Lut und PS-Lut-NH₂ am stärksten ausgeprägt zu sein. Weiterhin findet sich eine Bande zwischen 28-17 kDa in allen 6 Proben wieder, welche ein Teil der IgG sein könnten.

Die verschiedenen Apo C's sowie das Apo A2 sind in allen Proben unabhängig von der Inkubationsreihenfolge wieder zu finden. Die Apo C1 Bande bei 4 kDa lässt sich dabei vor allem bei dem PS-Lut-COOH Partikel deutlich erkennen.

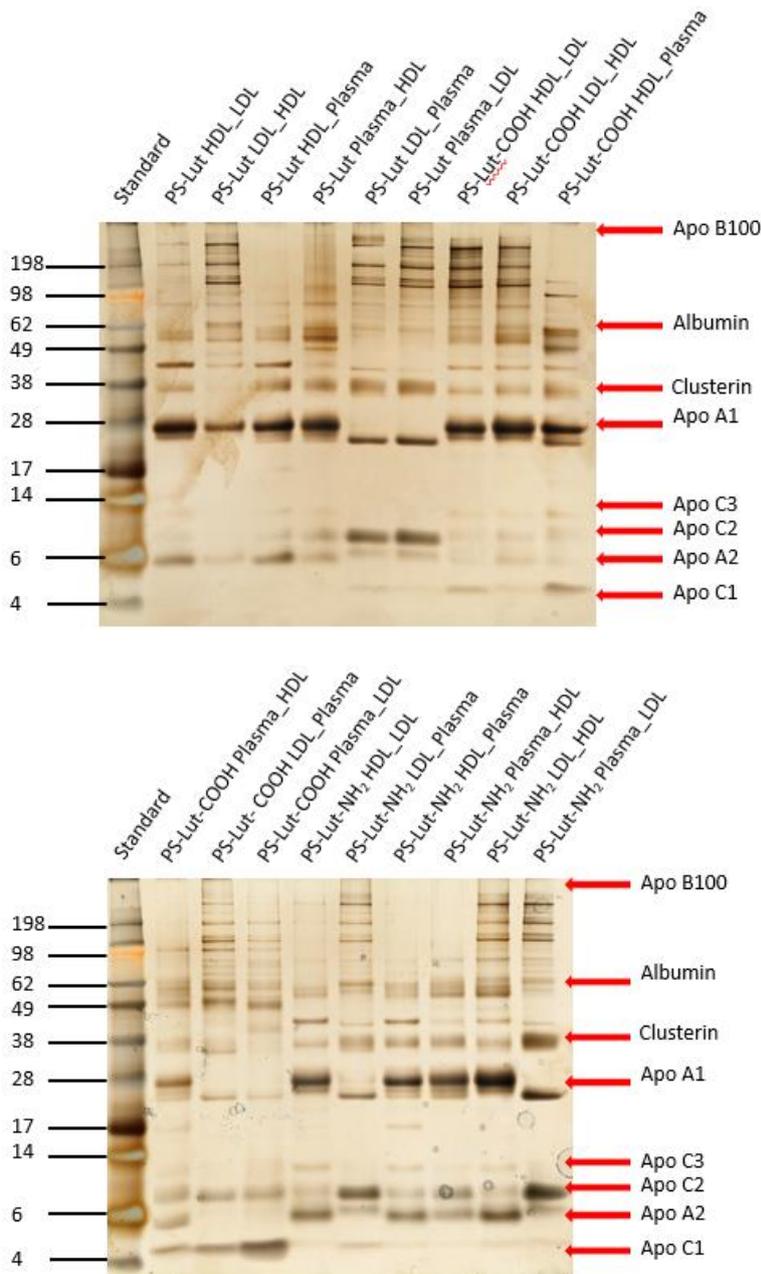


Abbildung 16: SDS-PAGE der Coronen aus dem Stabilitätstest in einem 10 % Acrylamidgeld und einer Proteinladung von 1 µg. Die Reihenfolge der Nennung zeigt die Inkubationsreihenfolge auf.

4.2.2 Mikroskopie Aufnahmen der Corona

Die folgenden TEM-Aufnahmen zeigen die Corona Evolution an dem PS-Lut-NH₂ Partikel. Die Aufnahmen der anderen beiden Partikel verhalten sich analog zu den hier dargestellten Aufnahmen. Die Mikroskopie Bilder zeigen die Lipoprotein Coronen nach der ersten Zentrifugation sowie nach den drei Waschstufen.

In Abbildung 17 wird die HDL Corona um die Partikel gezeigt. Dabei stellt die linke Aufnahme die Corona nach der Inkubation und die rechte die Corona nach dem dritten Waschschrift dar. Die violetten Pfeile zeigen den NP und die roten die ihn umschließende Corona. Bei Betrachtung der linken Aufnahme fällt auf, dass um den NP deutlich mehr Strukturen zu erkennen sind als um die NP der rechten Aufnahme. Weiterhin erkennt man auf der linken Aufnahme einige Strukturen, welche sich nicht direkt um den Partikel scharen.

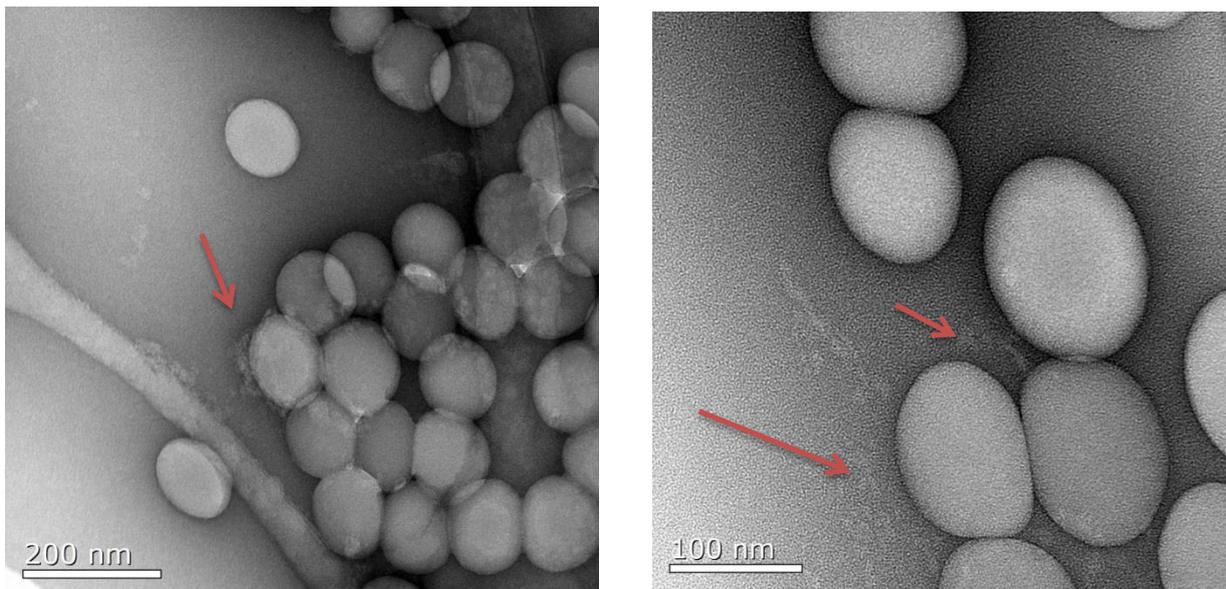


Abbildung 17: TEM Aufnahmen der HDL Corona (roter Pfeil) des aminofunktionalisierten NP nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat. Die linke Aufnahme zeigt die Corona nach der Inkubation und die rechte Aufnahme zeigt sie nach dem dritten Waschschrift.

In Abbildung 18 wird die Aufnahme der Corona aus LDL gezeigt. Vergleicht man die Bilder mit der Corona aus HDL fällt auf, dass deutlich mehr Strukturen um den Partikel erkennbar sind. In diesen Aufnahmen ist die Evolution der Corona, also die Abnahme bzw. der Austausch an Protein während der Waschschriffe, besser als in der HDL Corona zu erkennen. Auf der linken Aufnahme sind, verglichen zur rechten Aufnahmen, wesentlich mehr Strukturen um den Partikel erkennbar. So nimmt die Anzahl gebundener und freier Proteine scheinbar mit Anzahl der Waschschriffe ab.

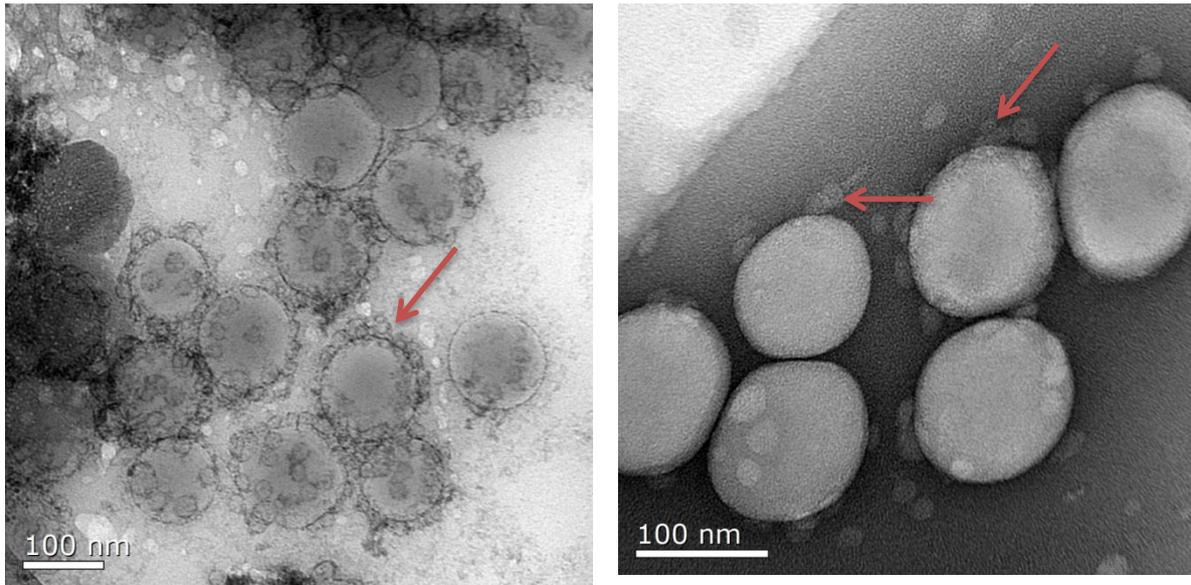


Abbildung 18: TEM Aufnahmen der LDL Corona (roter Pfeil) des Aminofunktionalisierten NP nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat. Die linke Aufnahme zeigt die Corona nach der Inkubation und die rechte Aufnahme zeigt sie nach dem dritten Waschschrift (Durchgeführt von Maria Kokkinopoulou (AK Landfester)).

4.2.3 Untersuchung der Corona Zusammensetzung mittels MS

Da die Partikel PS-Lut und PS-NH₂ in den vorangegangenen Versuchen ein ähnliches Verhalten zeigen, wurde in den folgenden MS Untersuchungen nur der PS-Lut und der PS-Lut-COOH Partikel analysiert.

Die Abbildung 19 zeigt die Zusammensetzung der Coronen aus HDL an den beiden Partikeln, sowie die Fraktion aus welcher diese hergestellt wurden.

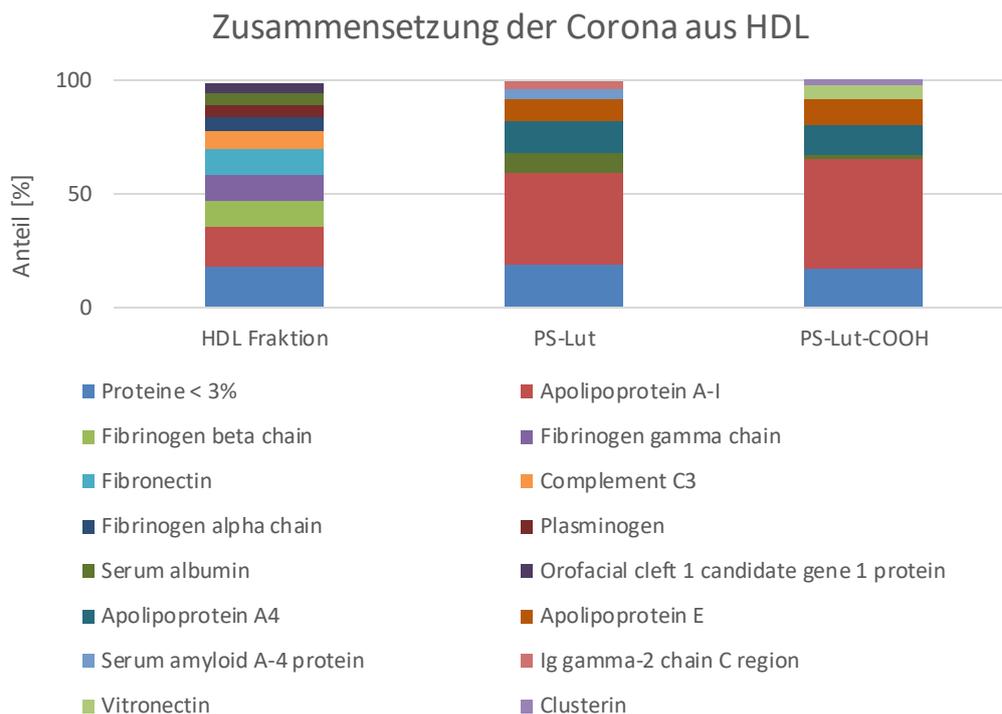


Abbildung 19: Zusammensetzung der HDL Corona des unfunktionalisierten sowie des carboxyfunktionalisierten NP sowie der Fraktion aus welcher diese hergestellt wurden.

Betrachtet man die Abbildung zeigt sich, dass die drei häufigsten Corona Komponenten in beiden Partikeln Apo A1, Apo A4 sowie Apo E sind. Das hauptsächlich im HDL vorhandene Apo A1 stellt den Hauptanteil aller Proben dar. Vergleicht man die Anteile der genannten Apolipoproteine in der Corona, mit denen der reinen HDL Fraktion wird ersichtlich, dass sich alle stark selektiv an den Partikeln anreichern. Während die reine HDL Fraktion aus 17,7 % Apo A1 besteht, macht dieses Apolipoprotein in den Coronen über 40 % aus. Dieses selektive Bindungsverhalten wird noch deutlicher bei den Apolipoproteinen A4 und E. Während das Apo A4 in der HDL Fraktion zu 1,6 % vorhanden ist, wurde dies in den PS-Lut Partikel mit 14,3 % und im PS-Lut-COOH mit 12,9 % bestimmt. Somit ist der Anteil dieser Lipoproteine in der Corona um mehr als das Achtfache gestiegen. Dies trifft auch das das Apo E zu. Während der Anteil in der HDL Fraktion < 1 % beträgt, wurde es in beiden Fraktionen mit einem Anteil von > 9 % bestimmt.

Weiter zeigen alle Proben einen > 10 %igen Anteil an Proteinen die in Mengen von < 3 % vorkommen. Diese Proteine nehmen allerdings ausschließlich in der HDL Fraktion den höchsten Prozentanteil ein, in den Coronen sinkt dieser. Auch die LDL Fraktion, sowie die daraus herge-

stellten Coronen bestehen zu > 10 % aus Proteinen, welche in einem Anteil von < 3 % vorhanden sind. Im Gegensatz zur HDL Fraktion nimmt dieser Anteil bei den Coronen der LDL Fraktion zu. Während er in der reinen Fraktion bei rund 13% liegt, wächst er in den Coronen auf > 20 %.

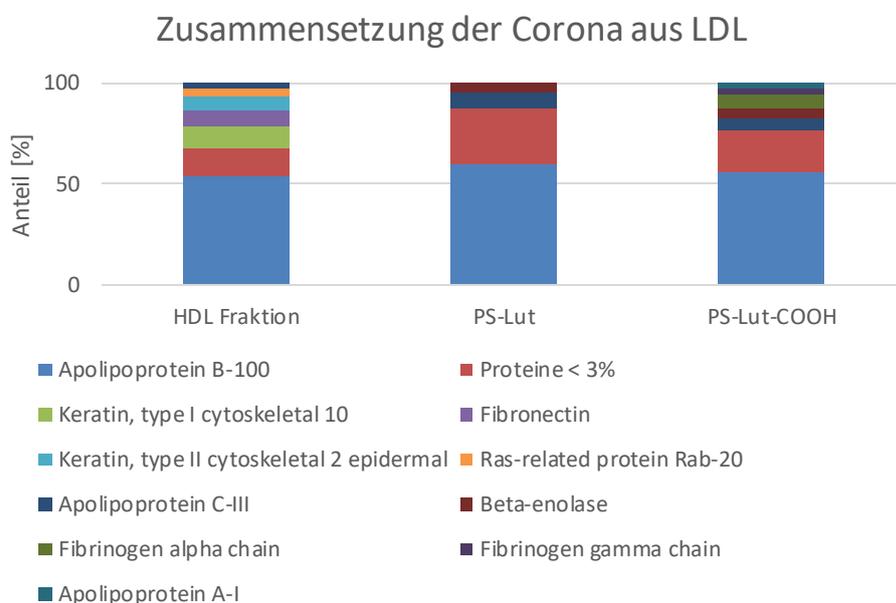


Abbildung 20: Zusammensetzung der LDL Corona des unfunktionierten sowie des carboxyfunktionierten NP sowie der Fraktion aus welcher diese Hergestellt wurden.

In den gezeigten Coronen unterscheiden sich die NP nicht in der Reihenfolge der am häufigsten vorhandenen Proteine. Dazu gehören das Apo B100, welches in allen drei Proben die häufigste Komponente darstellt, das Apo C3 sowie das Apo A1. Auch hier kommt es zu einer selektiven Anreicherung verschiedenen Apolipoproteine, jedoch ist diese nicht so stark ausgeprägt wie die der HDL Fraktion. Der Anteil an gebundenem Apo B100 steigt verglichen zur reinen Fraktion lediglich um ca. 2-6 % abhängig von der betrachteten Corona.

4.2.3.1 Zusammensetzung der HDL und LDL kombinations Corona

Die folgenden MS Daten sollten zeigen wie sich die Corona Zusammensetzung verändert, wenn HDL und LDL:

- in unterschiedlicher Menge inkubiert werden
Gleiches Verhältnis wie in den Einzel Coronen (HDL → 420 µg und LDL → 180µg)
- in gleicher Menge inkubiert werden (HDL=LDL = jeweils 420 µg)

Aus diesem Grund wurde in der Darstellung der Ergebnisse ausschließlich auf die Apolipoproteine, Albumin und Clusterin eingegangen. Proteine, welche nicht im Kontext dieser Arbeit stehen, wurden in der Graphik als „andere Proteine“ bezeichnet.

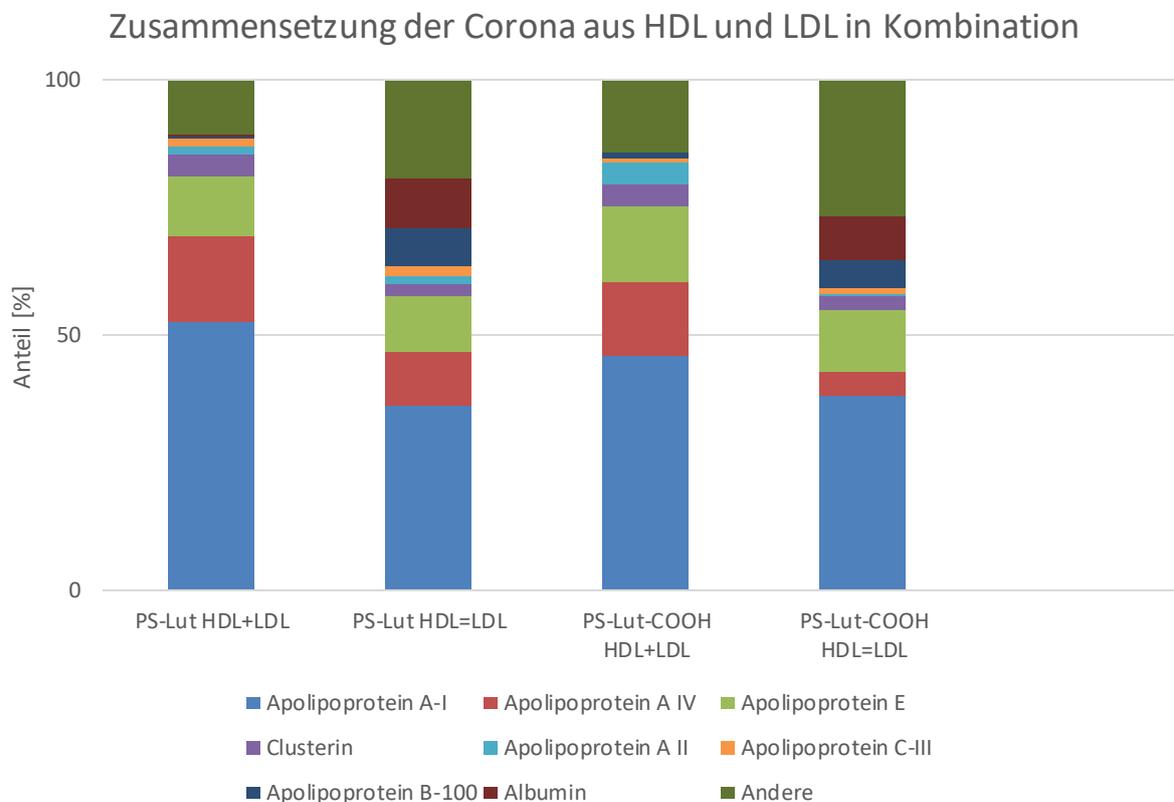


Abbildung 21: Zusammensetzung der Corona aus beiden Lipoproteinen zusammen des unfunktionalisierten sowie des carboxyfunktionalisierten NP. Das (+) gibt an, dass HDL und LDL im gleichen Verhältnis wie bei der einzel Coronen genutzt wurden (420µg+180µg), das (=) bedeutet das beide in der gleichen Menge eingesetzt wurden (420µg)

Auch in diesem Versuch zeigen die beiden NP ein sehr ähnliches Verhalten hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Corona. Betrachtet man Abbildung 21 wird deutlich, dass die größere Menge an LDL vor allem Einfluss auf den Anteil an gebundenem Apo A1, Apo B100, Albumin und „Andere“ hat. Wird LDL in der gleichen Menge wie HDL eingesetzt, nimmt der Anteil an gebundenem Apo A1 stark und der Anteil an Apo A4 leicht ab. Im Gegensatz dazu steigt der Anteil an Apo B100, Albumin sowie den hier als „andere“ bezeichneten Proteine.

Die größere Menge an LDL scheint weiter keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Clusterin, Apo E, Apo A2 sowie Apo C3 zu haben.

4.3 Analyse der zellulären Aufnahme der Partikel mittels Durchflusszytometrie

Der Einfluss der verschiedenen Coronen auf die zelluläre Aufnahme, wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden 200.000 Zellen/Well der Raw 264.7 für 2 Stunden mit den unterschiedlichen NP in einer Konzentration von 75 µg/ml inkubiert. Im Rahmen des Versuchs wurde die Zellaufnahme der „nackten“ NP sowie der Partikel mit den unterschiedlichen Coronen aus Plasma, HDL, LDL und einer Kombination beider Lipoproteine untersucht. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert hierbei direkt mit dem, durch die NP aufgenommenen Bodipy (523/536).

Weiterhin wurde mithilfe des CLSM untersucht, ob die NP in die Zelle aufgenommen wurden und die gemessene Fluoreszenzintensität somit mit der tatsächlichen zellulären Aufnahme korreliert oder ob diese lediglich an der Zelloberfläche adsorbiert werden. Hierzu wurden die Plasmamembran der Zelle mittels CellMask™ Orange gefärbt.

4.3.1 Zellaufnahme

Die Abbildungen 22 und 23 stellen graphisch das Experiment zur Zellaufnahme mittels Durchflusszytometrie dar. Dabei wurde die Inhibierung der Zellaufnahme relativ zum maximalen Wert angegeben. Dieser wird bei den „nackten“ Nanopartikeln erreicht, also jene welche in Wasser inkubiert wurden.

Mithilfe eines One-way ANOVA wurde untersucht, ob die Unterschiede zwischen den Aufnahmen signifikant waren. Das Konfidenzintervall lag hierbei bei 99 %. Die Inhibierung der zellulären Aufnahme aller Coronen, unterscheidet sich signifikant von der der nackten Partikel.

Betrachtet man die Ergebnisse der Partikel PS-Lut und PS-Lut-NH₂ in Abbildung 22 fällt auf, dass die Aufnahme des aminofunktionalisierten Partikel zwar deutlich geringer ist, die Stärke der Inhibierung bezogen auf die verschiedenen Coronen jedoch Ähnlichkeiten aufweisen. Lediglich die Plasma Coronen unterscheiden sich deutlich. Während die Inhibierung der Plasma Corona des PS-Lut Partikels keinen signifikanten Unterschied zur HDL+LDL Corona aufweist, liegt sie im Falle des PS-Lut-NH₂ auf gleicher Höhe wie die LDL Corona allein.

Weiter fällt auf, dass die Inhibierung bei der Corona aus HDL in Kombination mit LDL signifikant stärker ist, als die der einzelnen Lipoproteine. Dies trifft ebenfalls auf beide Partikel zu.

Die zelluläre Aufnahme der HDL Corona verglichen mit der LDL Corona unterscheidet sich nur im Falle des PS-Lut-NH₂ signifikant. Bei den beiden anderen Partikeln liegt kein Unterschied bzgl. der Stärke der Inhibierung vor.

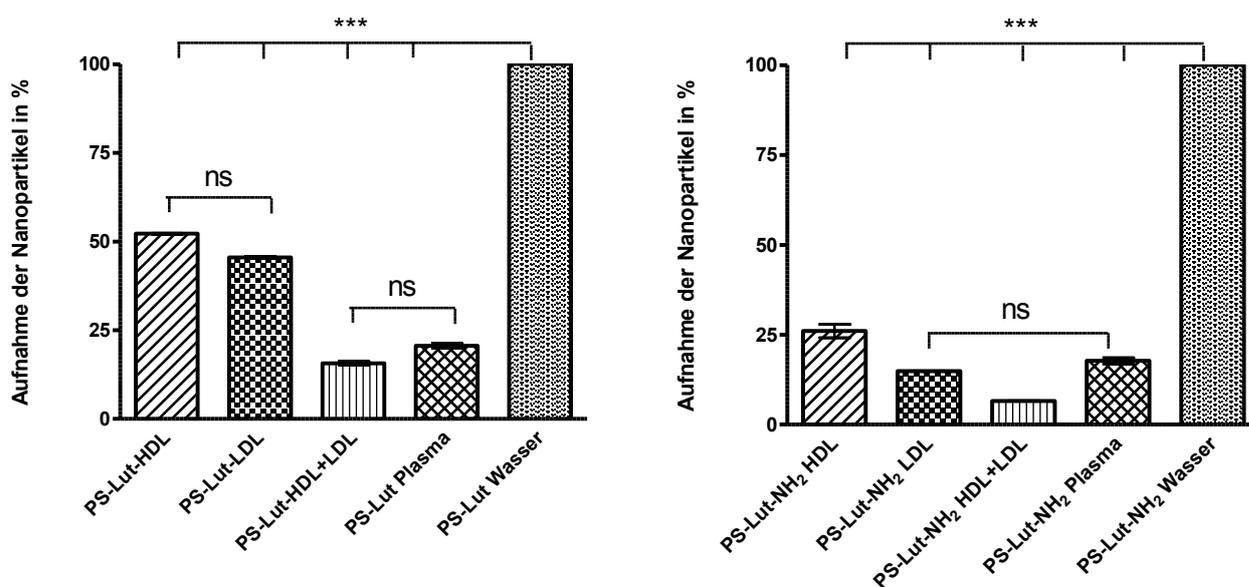


Abbildung 22: Stärke der Zellaufnahme des unfunktionalierten sowie des aminofunktionalisierten NP mit einer Corona aus HDL, LDL, beiden Lipoproteinen zusammen, Plasma und des „nackten“ Partikel welcher mit der stärksten Aufnahme als 100% gesetzt wurde. Mit einem One-way ANOVA konnten sehr signifikante Unterschiede in der zellulären Aufnahme zwischen den „nackte“ und den Corona enthaltenden NP festgestellt werden ($p < 0,001 = ***$)

In Abbildung 23 wird der Graph zur zellulären Aufnahme des PS-Lut-COOH Partikel dargestellt. Wie in den vorangegangenen Versuchen, unterscheidet sich das Ergebnis dieses Partikels von den Ergebnissen des PS-Lut und des PS-Lut-NH₂ Partikels deutlich.

Auch hier ist die Aufnahme der Partikel, welche eine Corona aus HDL, LDL, HDL+LDL sowie Plasma besitzen signifikant geringer, verglichen zu der Aufnahme der „nackten“ in Wasser inkubierten Partikel. Jedoch zeigt sich die geringste Zellaufnahme bei der HDL Corona und somit auch LDL, da kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme vorliegt. Verglichen dazu erreicht die Zellaufnahme des PS-Lut und des PS-Lut-NH₂ ihr Minimum, bei der aus beiden Lipoprotein bestehenden Corona. Im Fall der carboxyfunktionalisierten Partikel ist die Aufnahme durch

die Coronen aus HDL und LDL in Kombination schwächer inhibiert als durch die Fraktionen alleine.

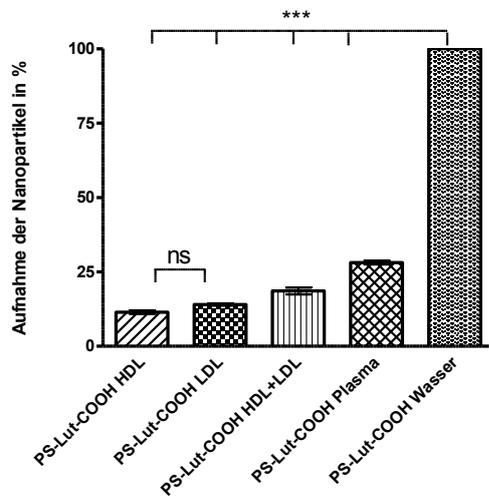
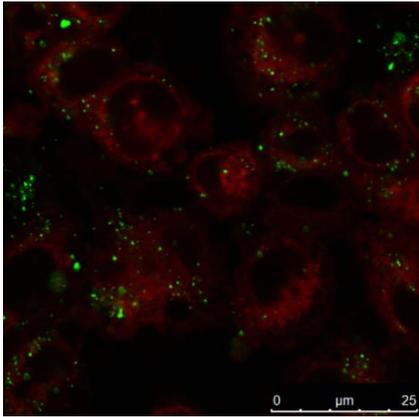


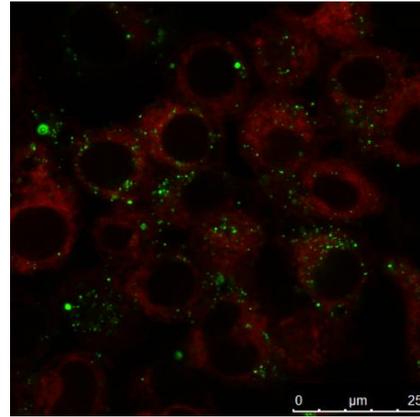
Abbildung 23: Stärke der Zellaufnahme des carboxyfunctionalisierten NP mit einer Corona aus HDL, LDL, beiden Lipoproteinen zusammen, Plasma und des „nackten“ Partikel welcher mit der stärksten Aufnahme als 100% gesetzt wurde. Mit einem One-way ANOVA konnten sehr signifikante Unterschiede in der zellulären Aufnahme zwischen den „nackte“ und den Corona enthaltenden NP festgestellt werden ($p < 0,001 = ***$)

4.3.1.1 Untersuchung der Zellaufnahme mittels CLSM

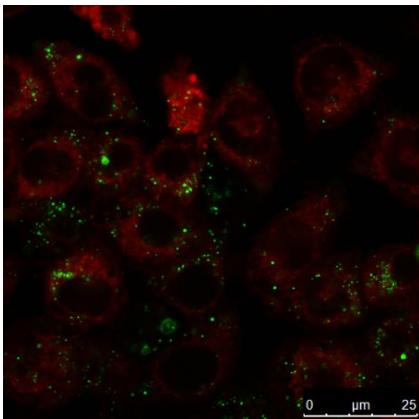
Abbildung 24 zeigt die Aufnahme der PS-Lut-NH₂ NP in die Zelle. Betrachtet man die mikroskopischen Aufnahmen des PS-Lut und des PS-Lut-COOH Partikels, lassen sich keine Unterschiede zu dem hier gezeigten Partikel erkennen. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet.



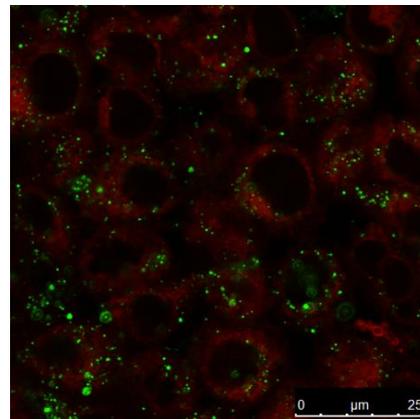
a) HDL



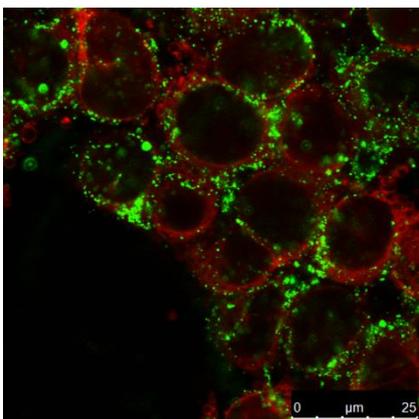
b) LDL



c) HDL+LDL



d) Plasma



e) Wasser („nackter“ Partikel)

Abbildung 24: CLSM Aufnahmen zum Versuch der zellulären Aufnahme des unfunktionalisierten NP mit einer Corona aus HDL, LDL, einer Kombination beider Lipoproteine, Plasma sowie des „nackten“ Partikels. Die Membran der Zelle wurde mithilfe CellMask™ Orange gefärbt. (Durchgeführt von Jonas Reinholz (AK Landfester)).

Die NP sind anhand ihrer grünen Fluoreszenz durch den Farbstoff Bodipy(523/536) zu erkennen. Die Membran sowie der Zellkörper wurde mittels CellMask™ Orange angefärbt und ist auf den Aufnahmen deutlich in orangen-rot zu sehen.

Wie auch bei dem Versuch zur zellulären Aufnahme mittels Durchflusszytometer, wurden hier die Coronen aus HDL, LDL, HDL+LDL, Plasma und die in Wasser inkubierten „nackten“ Partikel analysiert. Die Aufnahmen zeigen alle Partikel, unabhängig von der Corona, in die Zelle aufgenommen werden. Somit korreliert das, während der Durchflusszytometrie gemessene, Fluoreszenzsignal direkt mit der Zellaufnahme

Betrachtet man die Aufnahmen a)-d) lässt sich kein deutlicher Unterschied in der Anzahl der aufgenommenen Partikel erkennen. Aufnahme e) zeigt im Vergleich dazu eine deutlich höhere Anzahl an grün fluoreszierender Partikel. Die „nackten“ Partikel werden besser von der Zelle aufgenommen als jene, die mit einer Corona umhüllt sind.

5 Diskussion

5.1 Reinheit der HDL und LDL Fraktion

Die Reinheit der beiden Fraktionen nach der Purification wurde mithilfe der SDS-PAGE und dem MS analysiert.

Vergleicht man die Probe aus HDL und LDL in Abbildung 9, mit der Plasmaprobe aus welcher die Fraktionen gewonnen wurden, sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Alle drei Proben zeigen, in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen, charakteristische Banden. Während in der Plasmaprobe Albumin die dominierende Bande darstellt, ist diese in der HDL-Probe deutlich geringer und in der LDL-Probe kaum noch zu detektieren. Daraus lässt sich schließen, dass sich das Albumin, welches die häufige Blutkomponente darstellt [32], mittels Purification Kit von den Lipoproteinen trennen lässt. Dabei ist die Trennung von LDL und Albumin effektiver als die von HDL und Albumin. Ein möglicher Grund hierfür könnte die verlängerte Inkubationsphase und die größere Menge an Dextran Solution und Purification Solution A während der HDL Fällung sein. Weiterhin könnte bei beiden Fraktionen eine unsaubere Trennung von Pellet und Flüssigkeitsrückständen für das detektierbare Albumin verantwortlich sein.

Während in der HDL Fraktion die Apo A1 Bande bei 28 kDa die dominierende Bande darstellt, sind die einzelnen Banden in der LDL Fraktion nicht identifizierbar. Die Fraktion zeigt verschiedene Banden im Bereich von 98-198 kDa und höher. Da der verwendete Standard nur bis 198 kDa reicht, kann das für LDL charakteristische Apo B100 über die SDS-PAGE nicht direkt identifiziert werden. Da sich die HDL, LDL und Plasma Fraktionen jedoch deutlich unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass die Trennung mithilfe des HDL und LDL/VLDL Purification Kit erfolgreich war und die unbekannt Banden der LDL Fraktion charakteristisch für diese sind.

Nachdem mittels SDS-PAGE ein erster qualitativer Eindruck für die Reinheit der Fraktionen gewonnen wurde, wurden diese mit Hilfe des MS auf ihre exakte Zusammensetzung analysiert. Bei Betrachtung dieser Daten zeigt sich, dass die Hauptkomponente der HDL Fraktion mit 17,8 % Apo A1 und Apo B100 mit 54,2 % die Hauptkomponente der LDL Fraktion darstellt. Beide Fraktionen enthalten zusätzlich > 10 % Proteine, welche mit einem Anteil von < 3 % vorhanden sind und einige weniger, die in einem prozentualen Anteil > 3 % detektiert wurden.

Vergleicht man das menschliche Blut, welches aus über 3.700 Proteinkomponenten besteht [13], mit den in den Fraktionen gefundenen Proteinen, wird ein deutlicher Unterschied ersichtlich. So besteht die HDL Fraktion aus lediglich neun Proteinen, die in einem Anteil von > 3 % vorhanden sind, in der LDL Fraktion sind es hingegen nur sieben. Zusätzlich ist das Protein, welches in beiden Fraktionen dominiert jenes, welches für das einzelne Lipoprotein charakteristisch ist. Aus diesem Grund wurden die Fraktionen für die weitere Arbeit als ausreichend rein betrachtet.

Zu den Proteinen, welche in der LDL Fraktion mit einem Anteil von < 3 % detektiert wurden, zählen Apo A1 sowie Apo C3. Beide sind kein Bestandteil des LDL. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein dieser Proteine, könnte am Kit selbst liegen. So kann es zwar HDL und LDL trennen, jedoch ist in der LDL Fraktion auch VLDL vorhanden. Beide gefundenen Apolipoproteine sind Bestandteil dieser Fraktion. Weiter besteht die Möglichkeit einer unsaubereren Trennung, sodass das Apo A1 sowie C 3 Bestandteile der HDL Fraktion sind.

Zusätzlich wurden Aufnahmen der Fraktionen, nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat, mit dem TEM aufgenommen. Betrachtet man die Aufnahmen in Abbildung 12, sieht man in der HDL Fraktion (links) neben den hellen kleinen Strukturen, welche mit großer Wahrscheinlichkeit HDL darstellen, größere Strukturen. Diese könnten Aggregate der HDL Vesikel darstellen. Die LDL Fraktion zeigt Strukturen verschiedener Größe. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die LDL Fraktionen zusätzlich das Lipoprotein VLDL beinhalten. Allgemein ist die Auswertung der Aufnahmen mit dieser Färbemethode, nur von geringer Aussagekraft.

5.2 Analyse der Corona Zusammensetzung

Die SDS-PAGE in Abbildung 13 zeigt, dass in allen Partikeln das Apolipoprotein der jeweiligen Lipoprotein Fraktion die charakteristische Bande darstellt. Weiter lässt sich vermuten, dass sich die Apo C's sowie das Apo A2 stark selektiv an den Partikeln anreichern. Während in der HDL Fraktion die Bande für das Apo C1 und 2 sowie das A2 zu erkennen sind, ist in der LDL Fraktion lediglich die C2 Bande ersichtlich. Die Plasma Probe zeigt hingegen keine dieser Banden. Die verschiedenen Coronen selbst zeigen jedoch, unabhängig von HDL, LDL oder Plasma, alle Banden im Bereich von 14-3 kDa. Also jenem MW in welchem die Apo C's und des A2 liegen.

Werden HDL und LDL zusammen mit den NP inkubiert treten lediglich Banden auf, welche vergleichbar mit den Banden der Corona aus ausschließlich HDL sind. LDL bindet in diesem Fall gar nicht oder in nur sehr geringer, über die Silberfärbung nicht detektierbarer Konzentration. Da das HDL mit einem Durchmesser von 10 nm deutlich kleiner ist als das 20-25 nm große LDL, besteht die Möglichkeit, dass es schneller durch die Flüssigkeit „diffundiert“ und so die Oberfläche der Partikel vollständig besetzen könnte. Dabei wird angenommen, dass die Affinität der HDL Vesikel zum Partikel nur geringfügig höher ist als die des LDL, sodass es zu einer schwachen Konkurrenzreaktion kommt. Die kleinere Größe, die höhere Mobilität und Affinität könnte eine mögliche Erklärung sein, weshalb in Kombination ausschließlich HDL bindet.

Ein Hinweis darauf, dass HDL eine höhere Affinität zu den Partikeln aufweist könnte sein, dass selbst wenn HDL und LDL in gleicher Konzentration eingesetzt werden ausschließlich für HDL charakteristischen Banden in der SDS-PAGE detektiert werden können.

Allgemein betrachtet, weisen die Banden des PS-Lut und des PS-Lut-NH₂ eine starke Ähnlichkeit auf. Dies könnte daher kommen, dass sich an der Oberfläche des PS-Lut-NH₂ Partikels nur wenige Aminogruppen befinden und er sich somit ähnlich, wie der PS-Lut Partikel verhält. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die funktionelle Gruppe in diesem Fall keinen Einfluss auf die Bindung hat.

In Tabelle 11 sind die Proteinmengen dargestellt, welche an die NP binden. Dabei zeigt sich, dass der Anteil an gebundenem LDL bei allen 3 Partikel mindestens 20 % höher ist, als bei HDL oder einer Kombination aus beiden. Damit liegt der höchste Anteil an gebundenem Protein bei jenen Coronen, welche aus der kleinsten Proteinmenge (LDL → 180 µg) hergestellt wurden. Auch bei den Coronen aus HDL und LDL in gleicher (jeweils 420 µg) und unterschiedlicher (420 µg + 180 µg) Konzentration liegt die Mengen an gebundenem Protein unter dem des LDL. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die kleinste eingesetzte Menge Protein (LDL → 180 µg) ausreicht, um die Oberfläche der Partikel zu sättigen oder die Konzentration sogar noch weiter verringert werden könnte. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass durch andauernde Konkurrenzreaktion der beiden Lipoproteine, die Oberfläche der NP nicht vollständig besetzt werden kann. Dies könnte ein weiterer Grund für die geringe Menge an gebundenem Protein, bei der Corona beider Lipoproteine zusammen sein. Dies trifft jedoch nur auf den PS-Lut und PS-Lut-NH₂ Partikel zu. Wie bereits in der SDS-PAGE gezeigt wurde, verhalten sich diese Partikel auch hier nahezu identisch. Die Proteinkonzentration des PS-Lut-COOH bei der Corona aus

beiden Lipoproteinen ist höher als die, aus reinem HDL bzw. LDL hergestellte Corona. Möglicherweise beeinflusst die Oberflächenfunktionalisierung und die damit verbundene negative Ladung, das Bindungsverhalten der Proteine. So könnte die negative Ladung die Bindung der Lipoproteine nebeneinander oder das zusätzliche Binden anderer, in der Fraktion enthaltener Proteine, fördern.

Vergleicht man die eingesetzte Proteinmenge zur Bildung der Corona aus Plasma, mit der an dem Partikel gebundenen, fällt eine große Differenz auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass an den Partikel nur einige wenige Proteine spezifisch binden und diese offensichtlich stark aus der Fraktion der LDL und HDL Fraktionen stammen.

Der Stabilitätstest sollte zeigen was passiert wenn HDL und LDL nicht gemeinsam, sondern nacheinander inkubiert werden. Auch hier verhalten sich der PS-Lut und der PS-Lut-NH₂ Partikel sehr ähnlich. Werden HDL und LDL gemeinsam inkubiert sind nur die für HDL charakteristischen Banden in der SDS-PAGE zu erkennen. Wird die erste Stunde in HDL und die zweite Stunde in LDL inkubiert, verhält sich das Ergebnis des Stabilitätstests analog zu dem eben genannten. Wird die Reihenfolge der Inkubation jedoch umgekehrt, sodass die erste Stunde in LDL inkubiert wird, sind ebenfalls die für LDL charakteristischen Banden zu erkennen (98-198 kDa). Auch hierfür könnten der Unterschied in der Größe sowie die angenommene Unterschiede in der Affinität ein Grund sein. So könnte, würde die erste Inkubationsphase in HDL stattfinden, die komplette Partikeloberfläche von den kleinen HDL bedeckt werden. Die größeren LDL Partikel würden in der darauffolgenden Inkubation die Oberfläche nicht erreichen und könnten die, mit etwas höherer Affinität gebunden HDL, nicht verdrängen. Wird aber die erste Stunde in LDL Inkubiert, besetzten diese, als auch die HDL, die komplette Oberfläche der NP. Dabei würden die LDL aufgrund der Größe und Form, zwischen den Vesikeln Platz an der Oberfläche lassen, welcher in der zweiten Inkubationsphase von den HDL Partikeln genutzt werden kann (siehe Abbildung 25)

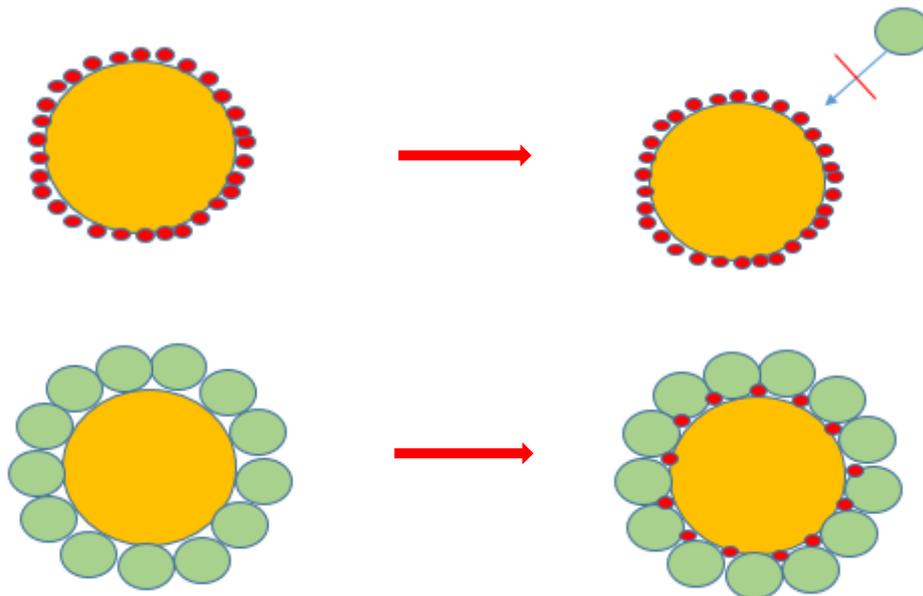


Abbildung 25: Mögliche Erklärung für das Ergebnis des Stabilitätstest. Wird die erste Stunde in HDL inkubiert (oben) und die zweite in LDL lassen die HDL Vesikel keinen Platz an der Oberfläche. Bindet LDL in der ersten Inkubationsphase (unten) lassen die Vesikel Platz in den Zwischenräumen in denen im zweiten Schritt HDL bindet.

Die Inkubationsreihenfolge von HDL und LDL mit Plasma, beeinflusst die Bindung des Apo A1 und des Apo B100 nicht. So konkurrieren nur HDL und LDL. Die anderen im Plasma vorhanden Proteine scheinen darauf keinen Einfluss zu haben. Dies zeigt ebenfalls, dass beide Lipoproteine mit hoher Affinität binden.

Mithilfe des TEM wurden die Coronen, nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat, visualisiert. Die entsprechenden Aufnahmen sind in Abbildung 17 und 18 zu entnehmen. Im Allgemeinen sind bei der HDL Corona deutlich weniger helle Strukturen um den Partikel zu erkennen. Dies könnte einerseits an der kleineren Größe der Lipoproteine, andererseits an der geringeren Menge an gebundenen Protein liegen. Wie bereits diskutiert, konnte in der LDL Corona eine größere Proteinmenge, verglichen zur HDL Corona, bestimmt werden. Die TEM Aufnahmen scheinen dieses Ergebnis nochmals zu bestätigen.

Weiter sind v. a. in den LDL Coronen kreisförmige Strukturen um den Partikel zu erkennen. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass das komplette Lipoprotein Vesikel an den Partikel bindet. Somit würde es zu keinem Zerfall der Vesikel-Struktur durch die Bindung kommen. Dies könnte zur Folge haben, dass die Zellaufnahme nicht nur durch die in den Lipoproteinen

enthaltenen Apolipoproteine beeinflusst wird, sondern auch durch die anderen darin enthaltenen Bestandteile wie z. B. den Lipiden.

Allgemein betrachtet können aus den TEM-Aufnahmen lediglich Vermutungen aufgestellt werden, da die verwendete Färbemethode keine eindeutigen Nachweise zulässt.

5.3 Analyse der Corona Zusammensetzung mittels MS

In Punkt 4.2.3 wurde die genaue Zusammensetzung der Corona aus HDL und LDL mittels MS analysiert. Da sich die in den voran gegangenen Versuchen unfunktionalisierten und aminofunktionalisierten Partikel nahezu identisches Verhalten, wurden nur der PS-Lut und der PS-Lut-COOH hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert. Dabei wurde deutlich, dass unabhängig von HDL und LDL die am häufigsten Vorhandenen Apolipoproteine in beiden Partikeln identisch sind. Dies legt die Vermutungen nahe, dass sich die Ladung der NP nicht auf das Bindungsverhalten der Apolipoproteine auswirkt, wenn diese in den HDL bzw. LDL Vesikeln eingeschlossen sind.

Betrachtet man die Corona aus HDL mit der HDL Fraktion fällt auf, dass vor allem Apo A1 als Hauptkomponente, Apo A4 sowie Apo E einen großen Teil der Corona ausmachen. Alle drei Apolipoproteine kommen in deutlich kleinerem Anteil in der HDL Fraktion vor. Sie zeigen somit eine hohe Affinität zu den Partikeln. In der Corona aus LDL stellt das Apo B100 die Hauptkomponente dar. Während der Anteil des Apo A1 in der HDL Fraktion bei 17,7 % liegt, liegt er mit > 40 % in den Coronen deutlich darüber. Die Zunahme des Apo B100 in den Coronen, verglichen zu der LDL Fraktion, steigt lediglich um 2-6% abhängig vom betrachteten Partikel. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass HDL bzw. Apo A1 eine höhere Affinität zu den NP als LDL hat und somit zu dem Ergebnis der SDS-PAGE passt, in welcher HDL und LDL in unterschiedlicher Konzentration gemeinsam inkubiert wurden.

Eine weitere Möglichkeit für die mangelnde Bindung des LDL, könnte die deutlich geringere Konzentration dessen sein. Aus diesem Grund wurden die Zusammensetzungen der Coronen aus HDL und LDL in gleicher Konzentration (420µg) sowie aus unterschiedlicher Konzentration (HDL → 420 µg, LDL → 180µg) verglichen. Dabei hat sich gezeigt, dass mit zunehmender LDL Konzentration der Anteil an Apo B100 zunimmt, wohingegen der Anteil an Apo A1 und Apo A4 abnimmt. Aus diesem Versuch ergibt sich die Frage, ob die Möglichkeit einer vollständigen

Verdrängung der für HDL charakteristischen Apolipoproteinen besteht, wenn LDL in einer genügend hohen Konzentration eingesetzt wird.

5.4 Die Zellaufnahme mittels Durchflusszytometrie

Das Ziel dieses Versuchs war herauszufinden, ob die Zellaufnahme der Partikel verringert werden kann, wenn diese von einer Corona aus HDL oder LDL umhüllt sind. Bei späteren Drug Delivery Anwendungen könnte, mithilfe einer gezielten Beschichtung, die zelluläre Aufnahme gesteuert werden.

Wie der Versuch zeigte, werden alle von einer Corona umhüllten NP deutlich weniger aufgenommen als die „nackten“ Partikel. Ein Grund für die verringerte Zellaufnahme der Plasma Corona, könnte das darin enthaltene Clusterin und Albumin sein. Beide gelten als Dysopsone, also solche Proteine die eine Phagozytose verhindern und somit die Blutzirkulation verlängern. Auch die Coronen HDL, LDL und einer Kombination beider führt zu einer verringerten Zellaufnahme, woraus sich schließen lässt, dass die Lipoproteine ebenfalls als Dysopsone wirken. Dabei verhalten sich auch hier der PS-Lut und PS-Lut-NH₂ Partikel ähnlich. LDL inhibiert die Aufnahme des PS-Lut-COOH Partikel stärker als das HDL. Im PS-Lut Partikel liegt zwischen beiden Lipoproteinen kein signifikanter Unterschied vor. Werden beide gemeinsam inkubiert, wird die Zellaufnahme am stärksten inhibiert, obwohl die Menge an gebundene Protein am geringsten ist. In beiden Fraktionen waren, wie in den Abbildungen 10 und 11 gezeigt, Albumin und Clusterin vorhanden. Die Konzentration dieser ist in den Coronen aus HDL und LDL gemeinsam höher und könnte damit ein Grund für die geringere Aufnahme sein. In diesem Fall würde die Inhibierung durch eine Kombination der verschiedenen Lipoproteinen, Clusterin und Albumin hervorgerufen werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass die beiden Lipoproteine die Zellaufnahme durch unterschiedliche Rezeptoren „blockieren“. Somit würden trotz geringerer Proteinkonzentrationen, unterschiedliche Aufnahmewege inhibiert.

Der PS-Lut-COOH Partikel widerspricht allerdings beiden Theorien. Auch hier wird, durch alle vier Coronen, die Aufnahmen in die Zelle verringert. Jedoch zeigen die HDL Corona sowie die LDL Corona die stärkste Inhibierung und die der Corona aus beiden Lipoproteinen (ausgenommen die Plasma Corona) die schwächste, obwohl hier zusätzlich die höchste Proteinkonzentration gefunden wurde. Es ist daher unklar wie die Menge an gebundenem Protein, die Zellaufnahme und die Corona Zusammensetzung, zusammenhängen.

Das Experiment zeigt, dass sich die Zellaufnahme der Corona aus HDL und LDL alleine nur im PS-Lut-NH₂ Partikel unterscheiden. Trotz nahezu gleichem Inhibierungsverhalten scheinen sich die Lipoproteine, kommen sie neben einander vor, gegenseitig zu beeinflussen. In welcher Weise dies geschieht, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

Weiter ist nicht bekannt, ob die Apolipoproteine selbst die Aufnahme in die Zelle verringern oder ob auch andere Bestandteile der Lipoproteine diese beeinflussen. In diesem Fall könnten die in den Vesikeln transportierten Lipide oder die Menge an Cholesterin eine Rolle spielen. Wäre dies der Fall, müsste auch geklärt werden, ob die verschiedenen Bestandteile alleine den identischen Effekt hätten oder ob die verringerte Zellaufnahme durch Wechselwirkung dieser hervorgerufen wird.

Da aus der Messungen nicht hervorgeht, ob die NP an der Oberfläche der Zellen adsorbieren oder ob es tatsächlich zu einer Aufnahme in die Zelle kommt, wurden sie nach einem Experiment zur zellulären Aufnahme mit dem CLSM untersucht.

Die Aufnahmen haben gezeigt, dass es bei allen Partikeln zu einer Zellaufnahme kommt. Außerdem zeigt sich deutlich, dass die höchste Zellaufnahme bei den „nackten“ Partikeln stattfindet. Vergleicht man die Coronen untereinander wirkt es so, als ob die höchste NP Aufnahme bei der Coronen aus HDL und LDL zusammen stattfindet. Diese mit dem Auge erkennbaren Unterschiede stimmen jedoch nicht mit dem, im Durchflusszytometer, gemessenen Ergebnis überein. Dieses Ergebnis zeigt, dass mikroskopische Aufnahmen, zumindest in dieser Arbeit, nur einen qualitativen Hinweis geben können und die dargestellten Ergebnisse unterstützen können.

6 Ausblick

Die Arbeit hat gezeigt, dass eine HDL Corona und eine Corona aus LDL die zelluläre Aufnahme der ausgewählten Partikel inhibiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich HDL und LDL in Kombination gegenseitig beeinflussen. In welcher Weise diese geschieht ist allerdings nicht klar, da der Effekt (positive oder negative Beeinflussung) scheinbar von der Oberflächenfunktionalisierung des Partikels abhängt.

Eine weitere wichtige Frage, welche sich mithilfe der Arbeit nicht klären lässt, ist ob die Apolipoproteine oder andere Bestandteil das Zellverhalten beeinflussen. Die TEM Aufnahmen lassen vermuten, dass das komplette Lipoprotein an den Partikel bindet. So stellt sich die Frage, ob nicht die in den Vesikeln transportierten Lipide Einfluss auf das Zellverhalten nehmen. Weiter könnte das komplette Lipoprotein beteiligt sein, sodass der Effekt keinem bestimmten Part zugeordnet werden kann, sondern aus Wechselwirkung untereinander hervorgerufen wird. Aus diesem Grund sollten in weiteren Versuchen zunächst die Lipide und die Proteine des HDL bzw. LDL getrennt und die Versuche der Zellaufnahme mit den einzelnen Bestandteilen wiederholt werden. Erst wenn Bekannt ist, welcher Teil der Lipoproteine für die Inhibierung verantwortlich ist, sollte untersucht werden wie sich HDL und LDL beeinflussen und welchen Einfluss die Oberflächenfunktionalisierung auf das Bindungsverhalten hat.

Weiter wäre es von Interesse herauszufinden, wie sich die Coronen auf die zelluläre Aufnahme von anderen relevanten Immunzellen wie z. B. die von primären Monozyten, dendritischen Zellen oder auch Endothelzellen auswirkt.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfluss der synthetischen und biologischen Identität auf die physiologische Antwort sowie deren gegenseitige Beeinflussung [12].	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Protein Corona um den Partikel, eingeteilt in die harte und weiche Corona [12].	5
Abbildung 3: Grundstruktur des HDL Moleküls [19].	9
Abbildung 4: Grundstruktur des VLDL (links) und des LDL (rechts) Molekül [19].	10
Abbildung 5: Übersicht über die zellulären Bestandteile des Immunsystems mit den Granulozyten und den Monozyten als unspezifische und den natürlichen Killerzellen sowie den B- und T-Lymphozyten als adaptive Immunantwort [23].	11
Abbildung 6: TEM-Aufnahmen der unterschiedlich funktionalisierten Partikel nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat (Durchgeführt von Maria Kokkinopoulou (AK Landfester)).	17
Abbildung 7: Beispiel für einen schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers [29].	23
Abbildung 8: Bestimmung der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie. Für die Auswertung wurden die Zellen zunächst gegatet (links) um so Zelldebris auszuschließen. Anschließend wurde mithilfe des FL 1 Kanals und einem Histogramm (rechts) die mediane Fluoreszenzintensität bestimmt.	25
Abbildung 9: SDS-PAGE der HDL und LDL Fraktion sowie des Plasmas in einem 10 % Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit 1µg Protein beladen. Der Standard zeigt die Masse der Proteine in kDa.	28
Abbildung 10: Prozentuale Zusammensetzung der HDL Fraktion nach Aufreinigung mittels Purification Kit aus humanem Plasma	30
Abbildung 11: Prozentuale Zusammensetzung der LDL Fraktion nach Aufreinigung mittels Purification Kit aus humanem Plasma	31
Abbildung 12: Aufnahme der HDL (links) und LDL (rechts) Fraktion mittels TEM nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat.	31
Abbildung 13: SDS-PAGE der Coronen aus 1µg HDL, LDL, einer Kombination aus beiden Lipoproteinen (HDL+LDL) sowie aus humanem Plasma an verschiedenen funktionalisierten NP in einem 10 %igem Polyacrylamid Gel. Der Standard zeigt die Masse der Protein in kDa.	33
Abbildung 14: SDS-PAGE der Coronen aus 1 µg einer Kombination beider Lipoproteinen in gleicher Konzentration an verschiedenen funktionalisierten NP in einem 10 %igem Polyacrylamid Gel. Der Standard zeigt die Masse der Protein in kDa.	34
Abbildung 15: Kalibriergerade für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce 660 nm Protein Assay.	35
Abbildung 16: SDS-PAGE der Coronen aus dem Stabilitätstest in einem 10 % Acrylamidgel und einer Proteinladung von 1 µg. Die Reihenfolge der Nennung zeigt die Inkubationsreihenfolge auf.	38
Abbildung 17: TEM Aufnahmen der HDL Corona (roter Pfeil) des aminofunktionalisierten NP nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat. Die linke Aufnahme zeigt die Corona nach der Inkubation und die rechte Aufnahme zeigt sie nach dem dritten Waschschrift.	39
Abbildung 18: TEM Aufnahmen der LDL Corona (roter Pfeil) des Aminofunktionalisierten NP nach einer Negativfärbung mit Uranylacetat. Die linke Aufnahme zeigt die Corona nach der Inkubation und die rechte Aufnahme zeigt sie nach dem dritten Waschschrift.	40
Abbildung 19: Zusammensetzung der HDL Corona des unfunktionalisierten sowie des carboxyfunktionalisierten NP sowie der Fraktion aus welcher diese hergestellt wurden. .	41
Abbildung 20: Zusammensetzung der LDL Corona des unfunktionalisierten sowie des carboxyfunktionalisierten NP sowie der Fraktion aus welcher diese Hergestellt wurden. .	42

Abbildung 21: Zusammensetzung der Corona aus beiden Lipoproteinen zusammen des unfunktionalisierten sowie des carboxyfunktionalisierten NP. Das (+) gibt an, dass HDL und LDL im gleichen Verhältnis wie bei der Einzel Coronen genutzt wurden (420µg+180µg), das (=) bedeutet das beide in der gleichen Menge eingesetzt wurden (420µg)43

Abbildung 22: Stärke der Zellaufnahme des unfunktionalisierten sowie des aminofunktionalisierten NP mit einer Corona aus HDL, LDL, beiden Lipoproteinen zusammen, Plasma und des „nackten“ Partikel welcher mit der stärksten Aufnahme als 100% gesetzt wurde. Mit einem One-way ANOVA konnten sehr signifikante Unterschiede in der zellulären Aufnahme zwischen den „nackte“ und den Corona enthaltenden NP festgestellt werden ($p < 0,001 = ***$)45

Abbildung 23: Stärke der Zellaufnahme des carboxyfunktionalisierten NP mit einer Corona aus HDL, LDL, beiden Lipoproteinen zusammen, Plasma und des „nackten“ Partikel welcher mit der stärksten Aufnahme als 100% gesetzt wurde. Mit einem One-way ANOVA konnten sehr signifikante Unterschiede in der zellulären Aufnahme zwischen den „nackte“ und den Corona enthaltenden NP festgestellt werden ($p < 0,001 = ***$)46

Abbildung 24: CLSM Aufnahmen zum Versuch der zellulären Aufnahme des unfunktionalisierten NP mit einer Corona aus HDL, LDL, einer Kombination beider Lipoproteine, Plasma sowie des „nackten“ Partikels. Die Membran der Zelle wurde mithilfe CellMask™ Orange gefärbt.47

Abbildung 25: Mögliche Erklärung für das Ergebnis des Stabilitätstest. Wird die erste Stunde in HDL inkubiert (oben) und die zweite in LDL lassen die HDL Vesikel keinen Platz an der Oberfläche. Bindet LDL in der ersten Inkubationsphase (unten) lassen die Vesikel Platz in den Zwischenräumen in denen im zweiten Schritt HDL bindet.53

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parameter anhand derer sich die Corona charakterisieren lässt [12]	4
Tabelle 2: Übersicht über die Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteinfraktionen und deren Dichte [17] [18].	7
Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Apolipoproteinen und deren Funktion [17] [18].	8
Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien	14
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits	15
Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte	15
Tabelle 7: Liste der verwendeten Software	16
Tabelle 8: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Nanopartikel	17
Tabelle 9: Parameter für die Durchführung der SDS-PAGE	21
Tabelle 10: Übersicht der einzelnen Signifikanzstufen	26
Tabelle 11: Eingangs- und Ausgangsproteinkonzentration der Coronen an den unterschiedlich funktionalisierten NP sowie die Mengen an gebundenem Protein in %	36

9 Literaturverzeichnis

- [1] E. A. Murphy, B. K. Majeti, L. A. Barnes, M. Makale, S. M. Weis, K. Lutu-Fuga, W. Wrasidlo und D. A. Cheresh, „Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 105, Nr. 27, pp. 9343-9348, 2008.
- [2] G. W. Doorley und C. K. Payne, „Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins,“ *Chemical Communications*, Bd. 47, pp. 444-468, 2011.
- [3] Y. Yan, K. Gause, M. Kamphuis, C. Ang, N. O'Brien-Simpson, C. Lenzo, E. Reynolds, E. Nice und F. Caruso, „Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines,“ *ACS Nano*, Bd. 7, Nr. 12, pp. 10960-10970, 2013.
- [4] G. Doorley und C. Payne, „Nanoparticles act as protein carriers during cellular internalization,“ *Chem Commun*, Bd. 48, Nr. 24, pp. 2961-2963, 2012.
- [5] M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati und K. Dawson, „Biomolecular coronas provide the biological,“ *Nature Nanotechnology*, Bd. 7, pp. 779-786, 2012.
- [6] S. Ritz, S. Schöttler, N. Kotman, G. Baier, A. Musyanovych, J. Kuharev, K. Landfester, H. Schild, O. Jahn, S. Tenzer und V. Mailänder, „Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake,“ *BioMacromolecules*, Bd. 4, Nr. 16, pp. 1311-1321, 2015.
- [7] J. Kreuter, T. Hekmatara, S. Dreis, T. Vogel, S. Gelperina und K. Langer, „Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain,“ *Journal of Control Release*, Bd. 118, Nr. 1, pp. 54-58, 2006.
- [8] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. Dawson und S. Linse, „Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles,“ *Proc. Natl Acad. Sci*, Bd. 104, Nr. 7, pp. 2050-2055, 2007.
- [9] S. Tenzer und et al., „Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology,“ *Nature Nanotechnology*, Nr. 8, pp. 772-781, 2013.
- [10] G. Caracciolo, S. Palchetti, V. Colapicchioni, L. Digiacoimo, D. Pozzi, A. Capriotti, G. La Barbera und A. Lagana, „Stealth effect of biomolecular corona on nanoparticle uptake by immune cells,“ *Langmuir*, Bd. 31, Nr. 39, pp. 10764-10773, 2015.
- [11] W. Doorley und C. Payner, „Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins,“ *Chemical Communications*, Bd. 47, Nr. 1, pp. 466-468, 2011.
- [12] C. D. Walkey und W. C. Chan, „Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment,“ *Chem Soc Rev*, Bd. 41, Nr. 7, pp. 2780-2799, 2012.
- [13] T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggard, S. Donnelly, G. Cagney und S. Linse, „Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer Nanoparticles,“ *Angew Chem Int Ed Engl*, Bd. 46, Nr. 30, pp. 5754-5756, 2007.

- [14] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk und R. H. Müller, „'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by poly(ethylene glycol) (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption,“ *Colloids Surf B Biointerfaces*, Bd. 18, Nr. 3-4, pp. 301-313, 2000.
- [15] S. Schöttler, G. Becker, S. Winzen, T. Steinbach, K. Mohr, K. Landfester, V. Mailänder und F. Wurm, „Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers,“ *Nature Nanotechnology*, Nr. 11, pp. 372-377, 2016.
- [16] A. Zensi, W. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Büchel, H. von Briesen und J. Kreute, „Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are,“ *Journal of Controlled Release*, Bd. 137, Nr. 1, pp. 78-86, 2009.
- [17] P. Heinrich, M. Müller und L. Graeve, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Heidelberg, Springer-Verlag, 2014, p. 301.
- [18] H. Yassine, in *Lipid Management*, Schweiz, Springer, 2015, p. 4.
- [19] Cell Biolabs, Inc, „Cellbiolabs,“ Cellbiolabs, [Online]. Available: <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-608-ldl-vldl-and-hdl-purification-kit.pdf>. [Zugriff am 22 April 2016].
- [20] P. Schwandt und K. Parhofer, in *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention*, Mainz, Schattauer, 2006, p. 38.
- [21] W. Piper, in *Innere Medizin*, Heidelberg, Springer, 2007, pp. 480-483.
- [22] A. Sniderman, S. Shapiro, D. Mapole, B. Skinner, B. Teng und P. Kwiterovich Jr, „Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 77, Nr. 1, pp. 604-608, 1980.
- [23] [Online]. Available: http://das-immunsystem.de/fileadmin/_processed_/csm_Grafik___Immunzellen_Stammbaum_V3_ab609e3184.jpg. [Zugriff am 04 Mai 2016].
- [24] M. Dobrovolskaia und S. E. McNeil, „Immunological properties of engineered,“ *Nature nanotechnology*, Bd. 2, pp. 469-478, 2007.
- [25] S. D. Conner und S. L. Schmid, „Regulated portals of entry into the cell,“ *Nature*, Bd. 6927, Nr. 422, pp. 37-44, 2003.
- [26] N. Oh und J. Park, „Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells,“ *International Journal of Nanomedicine*, Bd. 9, pp. 51-63, 2014.
- [27] G. B. Warnick, J. Benderson und J. J. Albers, „Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol,“ *Clin. Chem*, Bd. 28, Nr. 6, pp. 1379-1388, 1982.
- [28] M. Burstein, H. R. Scholnick und R. Morfin, „Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions,“ *Journal of Lipid Research*, Bd. 11, Nr. 6, pp. 583-593, 1970.

- [29] „Wikipedia,“ [Online]. Available:
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b1/Duchflusszytometer.png/400px-Duchflusszytometer.png>. [Zugriff am 24.06.2016].
- [30] Ü. d. e. Signifikanzstufen, „Vergleich von Mittelwerten und Signifikanzen,“ in *Skript Chemometrie Bachelor*, Reutlingen, pp. 30-33.
- [31] C. C. Fleischer und C. K. Payne, „Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes,“ *Acc Chem Res*, Bd. 47, Nr. 8, pp. 2651-2659, 2014.
- [32] M. Rahman und et al., *Protein-Nanoparticle Interactions*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2015.
- [33] „Universität Zürich,“ [Online]. Available:
<http://www.methodenberatung.uzh.ch/datenanalyse/unterschiede/zentral/mann.html>. [Zugriff am 08. Januar 2015].
- [34] E. A. Murphy, B. K. Majeti, L. A. Barnes, M. Makale, S. M. Weis, K. Lutu-Fuga, W. Wrasidlo und D. A. Cheresh, „Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 105, Nr. 27, pp. 9343-9348, 2008.
- [35] Y. Yan, K. T. Gause, M. M. Kamphius, C. S. Ang, N. M. O'Brien-Simpson, J. C. Lenzo, E. C. Reynolds, E. C. Nice und F. Caruso, „Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines,“ *ACS Nano*, Nr. 7, p. 10960–10970, 2013.
- [36] G. W. Doorley und C. K. Payne, „Nanoparticles act as protein carriers during cellular internalization,“ *Chemical Communications*, Nr. 48, pp. 2961-2963, 2012.
- [37] C. C. Fleischer und C. K. Payner, „Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes,“ *Accounts of chemical research*, Nr. 47, pp. 2651-2659, 2014.

10 Anhang

Prozentuale Zusammensetzung der HDL Corona des PS-Lut Partikels.

Apolipoprotein A-I	40,076
Apolipoprotein A-IV	14,264
Apolipoprotein E	9,342
Serum albumin	8,776
Serum amyloid A-4 protein	4,569
Ig gamma-2 chain C region	3,525
Clusterin	2,661
Ig gamma-1 chain C region	1,509
Ig kappa chain C region	1,494
Vitronectin	1,404
Apolipoprotein A-II	1,372
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,817
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,791
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,630
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0,536
Apolipoprotein C-III	0,516
Serotransferrin	0,469
Haptoglobin	0,440
Keratin, type II cytoskeletal 5	0,426
Fibrinogen beta chain	0,359
Ig alpha-1 chain C region	0,354
Fibrinogen gamma chain	0,314
Alpha-1-antitrypsin	0,272
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0,257
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,255
Complement C3	0,254
Hemopexin	0,232
Apolipoprotein L1	0,226
Fibrinogen alpha chain	0,220
Keratin, type II cytoskeletal 6B	0,196
Alpha-2-macroglobulin	0,192
Ig gamma-4 chain C region	0,176
Keratin, type II cytoskeletal 6C	0,159

C4b-binding protein alpha chain	0,155
Complement C4-A	0,151
Beta-2-glycoprotein 1	0,147
Transthyretin	0,143
Alpha-1-antichymotrypsin	0,139
Keratin, type I cuticular Ha1	0,136
Keratin, type I cuticular Ha5	0,135
RNA binding motif protein, X-linked-like-1	0,111
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1C	0,102
Alpha-2-HS-glycoprotein	0,100
Ig gamma-3 chain C region	0,097
Ig mu chain C region	0,096
Dermcidin	0,093
Serum amyloid A-1 protein	0,089
Ig kappa chain V-III region WOL	0,087
Ig heavy chain V-III region BRO	0,085
Prothrombin	0,081
Alpha-1-acid glycoprotein 1	0,074
Keratin, type I cuticular Ha6	0,066
Keratin, type II cytoskeletal 1b	0,064
Apolipoprotein M	0,062
Kininogen-1	0,058
Keratin, type I cytoskeletal 14	0,055
Keratin, type I cytoskeletal 28	0,051
Ig kappa chain V-I region AG	0,045
Protein CASP	0,045
Ig alpha-2 chain C region	0,044
Keratin, type II cytoskeletal 3	0,043
Ceruloplasmin	0,043
Keratin, type I cytoskeletal 16	0,041
Ig heavy chain V-III region VH26	0,038
Serum amyloid P-component	0,034
Haptoglobin-related protein	0,032
Ig mu heavy chain disease protein	0,029
Ig kappa chain V-II region TEW	0,028
Histidine-rich glycoprotein	0,025
Keratin, type II cytoskeletal 75	0,017
Dehydrogenase/reductase SDR family member 1	0,017

Keratin, type I cytoskeletal 15	0,016
Keratin, type I cytoskeletal 13	0,013
Keratin, type I cytoskeletal 18	0,009
Syndecan-3	0,008
Protein FAM204A	0,005
Keratin, type I cytoskeletal 19	0,004
Keratin, type I cytoskeletal 17	0,002
Keratin, type I cuticular Ha3-II	0,002

Prozentuale Zusammensetzung der LDL Corona des PS-Lut Partikels.

Apolipoprotein B-100	60,168
Apolipoprotein C-III	8,214
Beta-enolase	4,536
CX3C chemokine receptor 1	2,660
Apolipoprotein F	2,140
Apolipoprotein A-I	2,126
Apolipoprotein(a)	1,944
Apolipoprotein E	1,823
Fibrinogen alpha chain	1,601
Serum albumin	1,374
Apolipoprotein M	1,317
Serum paraoxonase/arylesterase 1	1,236
Serum amyloid A-4 protein	1,129
Keratin, type I cytoskeletal 10	1,052
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,949
Apolipoprotein A-II	0,806
Apolipoprotein D	0,732
Vitronectin	0,609
Prenylcysteine oxidase 1	0,577
Fibrinogen beta chain	0,524
Keratin, type I cytoskeletal 19	0,519
Clusterin	0,489
Ig alpha-1 chain C region	0,323
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,305
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,293
Keratin, type I cuticular Ha2	0,293
Keratin, type I cuticular Ha1	0,279
Keratin, type I cytoskeletal 16	0,270
Complement C3	0,266
Ig gamma-2 chain C region	0,201
Apolipoprotein L1	0,199
Ig lambda-3 chain C regions	0,182
Keratin, type I cytoskeletal 14	0,161
Fibrinogen gamma chain	0,145
Cathelicidin antimicrobial peptide	0,120
Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1	0,116
Keratin, type I cuticular Ha6	0,093

Keratin, type I cytoskeletal 15	0,055
Keratin, type II cytoskeletal 5	0,047
Keratin, type I cytoskeletal 13	0,036
Keratin, type I cytoskeletal 17	0,033
Signal-regulatory protein gamma	0,032
Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3	0,028

Prozentuale Zusammensetzung der HDL Corona des PS-Lut-COOH Partikels.

Apolipoprotein A-I	47,983
Apolipoprotein A-IV	12,932
Apolipoprotein E	11,795
Vitronectin	5,971
Clusterin	3,655
Serum amyloid A-4 protein	2,241
Apolipoprotein A-II	2,146
Serum albumin	1,832
Ig gamma-2 chain C region	1,745
Keratin, type II cytoskeletal 1	1,018
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,910
Ig kappa chain C region	0,726
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,676
Fibrinogen alpha chain	0,485
Keratin, type II cytoskeletal 5	0,482
Apolipoprotein C-III	0,481
Ig gamma-1 chain C region	0,374
Alpha-1-antitrypsin	0,310
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,291
Serum amyloid A-1 protein	0,266
Fibrinogen beta chain	0,244
Keratin, type II cytoskeletal 3	0,215
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0,182
Keratin, type II cytoskeletal 6B	0,161
Complement C4-A	0,159
Keratin, type II cytoskeletal 6C	0,131
Keratin, type I cuticular Ha1	0,129
C4b-binding protein alpha chain	0,128
Alpha-1-antichymotrypsin	0,112
RNA binding motif protein, X-linked-like-1	0,107
Keratin, type II cytoskeletal 1b	0,106
Serotransferrin	0,106
Haptoglobin	0,099
Keratin, type I cuticular Ha5	0,098
Apolipoprotein L1	0,088
Beta-2-glycoprotein 1	0,086
Transthyretin	0,082

Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0,079
Fibrinogen gamma chain	0,079
Protein CASP	0,078
Complement C3	0,076
Dermcidin	0,074
Keratin, type I cuticular Ha6	0,073
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1C	0,071
Alpha-2-macroglobulin	0,068
Ig gamma-4 chain C region	0,063
Ig alpha-1 chain C region	0,056
Hemopexin	0,054
Keratin, type I cytoskeletal 14	0,052
Prothrombin	0,051
Ig gamma-3 chain C region	0,050
Keratin, type I cytoskeletal 16	0,048
Apolipoprotein M	0,038
Kininogen-1	0,034
Histidine-rich glycoprotein	0,033
Keratin, type II cytoskeletal 75	0,032
Ig mu chain C region	0,026
Alpha-1-acid glycoprotein 1	0,025
Ig kappa chain V-II region TEW	0,025
Dehydrogenase/reductase SDR family member 1	0,022
Alpha-2-HS-glycoprotein	0,021
Keratin, type I cytoskeletal 15	0,020
Ig kappa chain V-III region WOL	0,019
Protein FAM204A	0,019
Ig heavy chain V-III region BRO	0,018
Serum amyloid P-component	0,016
Keratin, type I cytoskeletal 28	0,015
Keratin, type I cytoskeletal 18	0,014
Syndecan-3	0,014
Ceruloplasmin	0,013
Haptoglobin-related protein	0,011
Ig alpha-2 chain C region	0,011
Keratin, type I cytoskeletal 13	0,011
Ig mu heavy chain disease protein	0,011
Ig heavy chain V-III region VH26	0,010

Keratin, type I cytoskeletal 19	0,008
Ig kappa chain V-I region AG	0,005
Keratin, type I cytoskeletal 17	0,004
Keratin, type I cuticular Ha3-II	0,003

Prozentuale Zusammensetzung der LDL Corona des PS-Lut-COOH Partikels.

Apolipoprotein B-100	56,019
Fibrinogen alpha chain	6,360
Apolipoprotein C-III	6,002
Beta-enolase	4,612
Fibrinogen gamma chain	3,100
Apolipoprotein A-I	3,086
Apolipoprotein E	2,862
Fibrinogen beta chain	2,480
Serum amyloid A-4 protein	1,568
Apolipoprotein M	1,526
Serum paraoxonase/arylesterase 1	1,340
Apolipoprotein(a)	1,055
Serum albumin	1,055
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,970
Apolipoprotein D	0,861
Apolipoprotein F	0,770
Prenylcysteine oxidase 1	0,749
Clusterin	0,623
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,614
Vitronectin	0,581
CX3C chemokine receptor 1	0,564
Keratin, type I cytoskeletal 19	0,528
Complement C3	0,350
Apolipoprotein L1	0,321
Apolipoprotein A-II	0,309
Keratin, type I cuticular Ha2	0,248
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,176
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,176
Ig alpha-1 chain C region	0,161
Ig lambda-3 chain C regions	0,153
Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3	0,122
Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1	0,121
Ig gamma-2 chain C region	0,112
Keratin, type I cuticular Ha6	0,086
Keratin, type I cytoskeletal 16	0,067
Cathelicidin antimicrobial peptide	0,053
Keratin, type I cytoskeletal 15	0,052

Keratin, type I cuticular Ha1	0,050
Keratin, type II cytoskeletal 5	0,037
Signal-regulatory protein gamma	0,036
Keratin, type I cytoskeletal 14	0,033
Keratin, type I cytoskeletal 13	0,008
Keratin, type I cytoskeletal 17	0,005

Prozentuale Zusammensetzung der HDL und LDL Corona in der gleichen Konzentration des PS-Lut Partikels.

Apolipoprotein A-I	36,075
Apolipoprotein E	11,180
Apolipoprotein A-IV	10,476
Serum albumin	9,581
Apolipoprotein B-100	7,621
Serum amyloid A-4 protein	5,760
Clusterin	2,322
Vitronectin	2,101
Apolipoprotein C-III	1,834
Apolipoprotein A-II	1,624
Complement factor H	1,110
Apolipoprotein(a)	0,969
Ig kappa chain C region	0,827
Ig gamma-1 chain C region	0,745
Serotransferrin	0,706
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1C	0,670
Ig mu chain C region	0,541
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,494
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0,444
Apolipoprotein L1	0,438
Apolipoprotein D	0,338
Apolipoprotein M	0,317
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,266
Ig lambda-2 chain C regions	0,234
Fibrinogen gamma chain	0,217
Ig alpha-1 chain C region	0,206
Haptoglobin	0,206
Fibrinogen alpha chain	0,191
Fibrinogen beta chain	0,186
Complement C3	0,181
Alpha-1-acid glycoprotein 1	0,164
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,148
Ig gamma-2 chain C region	0,146
Apolipoprotein C-IV	0,133
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,131
Hemopexin	0,130

Ig gamma-3 chain C region	0,127
Transthyretin	0,125
Serum amyloid A-1 protein	0,112
Ras-related protein Rab-36	0,109
Ig gamma-4 chain C region	0,108
Protein phosphatase inhibitor 2	0,099
Alpha-2-macroglobulin	0,091
C4b-binding protein alpha chain	0,073
Lymphocyte-specific protein 1	0,070
Fibronectin	0,064
Keratin, type II cytoskeletal 6B	0,061
Haptoglobin-related protein	0,060
Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,058
Oxysterol-binding protein-related protein 5	0,055
Kininogen-1	0,044
Complement C1q subcomponent subunit C	0,036

Prozentuale Zusammensetzung der HDL und LDL Corona in unterschiedlicher Konzentration des PS-Lut Partikels.

Apolipoprotein A-I	52,508
Apolipoprotein A-IV	16,907
Apolipoprotein E	11,800
Clusterin	4,286
Serum amyloid A-4 protein	3,943
Apolipoprotein A-II	1,527
Apolipoprotein C-III	1,431
Vitronectin	1,106
Apolipoprotein L3	0,958
Ig kappa chain C region	0,944
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,845
Apolipoprotein B-100	0,613
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,509
tRNA modification GTPase GTPBP3, mitochondrial	0,397
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,347
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0,310
Keratin, type II cytoskeletal 5	0,205
Apolipoprotein L1	0,186
Serum albumin	0,177
Apolipoprotein M	0,162
Brain acid soluble protein 1	0,157
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,146
Keratin, type I cytoskeletal 17	0,114
Serum amyloid A-1 protein	0,102
Keratin, type I cuticular Ha1	0,085
Keratin, type I cytoskeletal 15	0,071
Dermcidin	0,053
Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1	0,040
Keratin, type I cytoskeletal 28	0,031
Keratin, type I cytoskeletal 14	0,026
WW domain-binding protein 4	0,008
Keratin, type I cytoskeletal 24	0,003
Serum amyloid A-2 protein	0,002

Prozentuale Zusammensetzung der HDL und LDL Corona in der gleichen Konzentration des PS-Lut-COOH Partikels.

Apolipoprotein A-I	38,072
Apolipoprotein E	12,274
Serum albumin	8,625
Serum amyloid A-4 protein	7,821
Vitronectin	5,637
Apolipoprotein B-100	5,463
Apolipoprotein A-IV	4,566
Clusterin	2,731
Apolipoprotein(a)	1,548
Complement factor H	1,244
Apolipoprotein C-III	1,004
Fibrinogen beta chain	0,772
Fibrinogen gamma chain	0,753
Fibrinogen alpha chain	0,694
Ig kappa chain C region	0,650
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,578
Serotransferrin	0,554
Apolipoprotein A-II	0,548
Ig gamma-1 chain C region	0,520
Ig mu chain C region	0,500
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1C	0,489
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0,451
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,381
Complement C3	0,374
Apolipoprotein C-IV	0,352
Apolipoprotein D	0,325
Apolipoprotein L1	0,247
C4b-binding protein alpha chain	0,246
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,226
Ig lambda-2 chain C regions	0,223
Serum amyloid A-1 protein	0,201
Apolipoprotein M	0,170
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,166
Haptoglobin	0,158
Ig alpha-1 chain C region	0,153
Ig gamma-2 chain C region	0,129

Ig gamma-4 chain C region	0,101
Complement C1q subcomponent subunit C	0,099
Alpha-1-acid glycoprotein 1	0,093
Hemopexin	0,092
Fibronectin	0,087
Lymphocyte-specific protein 1	0,084
Alpha-2-macroglobulin	0,083
Transthyretin	0,071
Keratin, type II cytoskeletal 6B	0,070
Haptoglobin-related protein	0,068
Ig gamma-3 chain C region	0,065
Protein phosphatase inhibitor 2	0,064
Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,058
Ras-related protein Rab-36	0,051
Kininogen-1	0,042
Oxysterol-binding protein-related protein 5	0,030

Prozentuale Zusammensetzung der HDL und LDL Corona in unterschiedlicher Konzentration des PS-Lut-COOH Partikels.

Apolipoprotein A-I	45,754
Apolipoprotein E	14,998
Apolipoprotein A-IV	14,734
Vitronectin	6,569
Apolipoprotein A-II	4,454
Clusterin	4,047
Serum amyloid A-4 protein	2,829
Ig kappa chain C region	0,962
Apolipoprotein B-100	0,960
Keratin, type II cytoskeletal 1	0,907
Apolipoprotein C-III	0,753
Apolipoprotein L3	0,662
Serum amyloid A-1 protein	0,321
Keratin, type I cytoskeletal 10	0,239
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0,238
tRNA modification GTPase GTPBP3, mitochondrial	0,224
Keratin, type II cytoskeletal 5	0,215
Serum albumin	0,190
Brain acid soluble protein 1	0,166
Keratin, type I cytoskeletal 9	0,102
Apolipoprotein M	0,100
Keratin, type I cytoskeletal 17	0,100
Keratin, type I cytoskeletal 15	0,092
Keratin, type I cuticular Ha1	0,090
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0,079
Apolipoprotein L1	0,074
Keratin, type I cytoskeletal 28	0,047
Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1	0,041
Keratin, type I cytoskeletal 14	0,023
Dermcidin	0,014
Serum amyloid A-2 protein	0,011
WW domain-binding protein 4	0,005
Keratin, type I cytoskeletal 24	0,001

