



# Steuerung der zellulären Aufnahme von Nanocarriern in Makrophagen durch gezielte Proteinadsorption

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des Grades „Bachelor of Science“

In Biologie

Vorgelegt am Fachbereich Biologie

An der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Von

Julia Marini

Geboren in Ebersberg

Max-Planck-Institut für Polymerforschung

AK Landfester

1. Prüfer: Univ.- Prof. Dr. Volker Mailänder  
III Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz  
Max-Planck Institut für Polymerforschung
2. Prüfer: Prof. Dr. H. Paulsen  
Institut für Allgemeine Botanik  
Johannes-Gutenberg Universität Mainz





# Inhaltsverzeichnis

Bachelorarbeit .....	1
Inhaltsverzeichnis .....	4
Abbildungsverzeichnis .....	6
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
1 Einleitung .....	11
1.1 Nanopartikel im physiologischen Umfeld .....	12
1.2 Ziel der Arbeit .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Methoden .....	16
2.1.1 Protein Corona .....	16
2.1.2 Pierce- Assay .....	17
2.1.3 SDS-PAGE .....	17
2.1.4 Zellkultur .....	18
2.1.5 Bestimmung der Eigenfluoreszenz der verwendeten Nanopartikel .....	18
2.1.6 Zellaufnahme mit Durchflusszytometrie .....	19
2.1.7 Bestimmung der Zellviabilität .....	21
2.2 Material .....	21
2.2.1 Nanopartikel .....	21
2.2.2 Blutplasma .....	23
2.2.3 Instrumente und Chemikalien in der Zellkultur .....	23
3 Ergebnisse .....	26
3.1 Charakterisierung der Protein Corona verschiedener Nanopartikel mittels SDS-PAGE .....	26
3.1.1 Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung .....	27
3.1.2 Einfluss der Präinkubation .....	29
3.2 Analyse der zellulären Aufnahme in Makrophagen mittels Durchflusszytometrie .....	31
3.2.1 Gezielte Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln mit verschiedenen Polymeren .....	31
3.2.2 Vergleich der zellulären Aufnahme in Medium ohne Proteine und in Anwesenheit von Plasma-Proteinen .....	33
3.2.3 Präinkubation der Nanopartikel mit einem komplexen Proteingemisch und verschiedenen einzelnen Proteinen .....	34
3.2.3.1 Präinkubation mit IgG-depleted Plasma .....	34
3.2.3.2 Präinkubation mit Fibrinogen .....	37
3.2.3.3 Präinkubation mit HSA, ApoA1 und ApoE .....	39
4 Diskussion .....	42

4.1	Einfluss der unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel (mit PEG und Phosphatpolymeren).....	42
4.2	Steuerung der Zellaufnahme durch Oberflächenfunktionalisierung und gezielte Präinkubation .....	43
5	Zusammenfassung.....	48
6	Literaturverzeichnis .....	51
7	Danksagung .....	54
	Prüfungsordnung Bachelor of Science Biologie .....	55

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Schematische Darstellung der Protein Corona um den Partikel [1].....	10
<b>Abbildung 1.2:</b> Schematische Darstellung der Beziehung zwischen synthetischer und biologischer Identität und der Antwort des physiologischen Systems [2].....	12
<b>Abbildung 1.3:</b> Schematische Darstellung der Aufnahme opsonierter Nanopartikel in eine Makrophage [6].....	14
<b>Abbildung 2.1:</b> Eine typische Eichgrade zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit einem BSA-Standard erstellt.....	17
<b>Abbildung 2.2:</b> Struktur von SDS .....	17
<b>Abbildung 2.3:</b> FCS vs. SSC. Darstellung der gegateten Zellpopulation. Beispiel: Zellen ohne Nanopartikel (Negativ-Kontrolle) .....	20
<b>Abbildung 2.4:</b> Histogramm des FL1-Channels. Beispiel: Zellen ohne Nanopartikel (Negativ-Kontrolle) .....	20
<b>Abbildung 2.5:</b> Darstellung der lebenden Zellen mit PI als Dotplot im FL3-Channel.....	21
<b>Abbildung 2.6:</b> Struktur des Surfactants Lutensol .....	22
<b>Abbildung 2.7:</b> Schematische Darstellung der Oberflächenmodifikationen der Poly(phosphorester)-Partikel (TW158d).....	22
<b>Abbildung 2.8:</b> Schematische Darstellung der Oberflächenmodifikation des PEGylierten Partikels (TW157) .....	22
<b>Abbildung 3.1:</b> Der Ausschnitt eines gels zeigt PS-NPs, die mit humanem Plasma vorinkubiert wurden. Aufgetragen wurden der Marker (1), PS-Lut (2), PS-Lut-COOH (3), PS-Lut-NH <sub>2</sub> (4), PS-Lut-Phosphat (5) und PS-NH <sub>2</sub> (6). Als Marker wurde Seeblue Plus 2 prestained standard von life technologies verwendet. Die Markierung der banden zeigt die Masse der Proteine in kDa. ....	27
<b>Abbildung 3.2:</b> PS-Lut-COOH wurde mit IgG-depleted Plasma (2), doppelt mit IgG-depleted Plasma und Plasma (3), Fibrinogen (4), doppelt mit fibrinogen und Plasma (5),präinkubiert. Zum Vergleich wurde noch reines Fibrinogen (6) und IgG-depleted Plasma (7) aufgetragen. Es wurde ebenfalls SeeBlue Plus2 prestained standard als Marker (1) verwendet. Die Banden des markers markieren die unterschiedlichen Molekülmassen der Proteine oder Proteinuntereinheiten in kDa. ....	29
<b>Abbildung 3.3:</b> Die Zellaufnahme von PS-NH <sub>2</sub> , PS-PEG, PS-PPE 30% und PS-PPE 40% wurde in Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) untersucht. ....	31
<b>Abbildung 3.4:</b> Die zelluläre Aufnahme von PS-Lut-COOH, PS-Lut-NH <sub>2</sub> und PS - NH <sub>2</sub> wurde in Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) gemessen. ....	33
<b>Abbildung 3.5:</b> Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH im Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) wurde nach der Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma mit der Zellaufnahme des nicht vorinkubierten (nackten) Partikels verglichen. ....	34
<b>Abbildung 3.6:</b> Die Zellaufnahme von PS-Lut-NH <sub>2</sub> im Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) wurde nach der Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma mit der Zellaufnahme des nicht vorinkubierten (nackten) Partikels verglichen. ....	

<b>Abbildung 3.7:</b> Die Zellaufnahme von PS-NH <sub>2</sub> im Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) wurde nach der Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma mit der Zellaufnahme des nicht vorinkubierten (nackten) Partikels verglichen. ....	36
<b>Abbildung 3.8:</b> Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH nach Inkubation mit unterschiedlichen Fibrinogenmengen wurde im Medium ohne und im Medium mit Proteinen verglichen. ....	37
<b>Abbildung 3.9:</b> Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH wurde nach Präinkubation mit Fibrinogen und ApoA1 im Medium mit oder ohne Proteinen im Vergleich mit dem nackten Partikel verglichen. ....	39
<b>Abbildung 3.10:</b> Die Zellaufnahme von PS-Lut-NH <sub>2</sub> wurde nach Präinkubation mit Fibrinogen und ApoA1 im Medium mit oder ohne Proteinen im Vergleich mit dem nackten Partikel verglichen.....	40
<b>Abbildung 3.11:</b> PS-Lut-NH <sub>2</sub> wurde mit ApoE, HSA und Fibrinogen vorinkubiert. Die zelluläre Aufnahme im Medium ohne Proteine untersucht.....	41
<b>Abbildung 5.1:</b> Übersicht der unterschiedlichen Zellaufnahmen.....	48

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> Beispiel für ein Pipettierschema bei einer SDS-PAGE.....	18
<b>Tabelle 2.2:</b> Übersicht der von Katja Klein synthetisierten Partikel.....	22
<b>Tabelle 2.3:</b> Übersicht der von Thomas Wolf synthetisierten Partikel im Vergleich mit PS- CTMA-Cl.....	23
<b>Tabelle 2.4:</b> In der Zellkultur verwendete Chemikalien.....	23
<b>Tabelle 2.5:</b> In der Zellkultur verwendetes Verbrauchsmaterial.....	24
<b>Tabelle 2.6:</b> In der Zellkultur verwendete Instrumente.....	25
<b>Tabelle 2.7:</b> Verwendete Software .....	25

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<b>ApoA1</b>	Apolipoprotein A1
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CD-Spektroskopie</b>	Circulardichroismus- Spektroskopie
<b>CTMA-CI</b>	Cetyltrimethylammonium Chlorid
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinacid
<b>Et al.</b>	Et alia
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FSC</b>	Forward scattered light
<b>FT-IR</b>	Fourier Transformations Infrarot Spektroskopie
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HSA</b>	Human Serum Albumin
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgG-depleted Plasma</b>	Immunglobulin G reduziertes Plasma
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>LC-MS</b>	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
<b>MPS</b>	Mononukleäres Phagozytensystem
<b>NP</b>	Nanopartikel
<b>PBS</b>	Phospahte Buffered Saline
<b>PEG</b>	Poly-ethylen-glykol
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PI</b>	Propidium-Iodid
<b>PS-NP</b>	Polystyrol-Nanopartikel
<b>SDS</b>	Sodium-Dodecyl-Sulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelectrophoresis

---

**SSC**

---

---

Side scattered light

---

# 1 Einleitung

Über die Jahre wurde die Möglichkeit, Medikamente durch Nanomaterialien, beispielsweise Nanokapseln, gezielt an ihren Bestimmungsort zu transportieren immer populärer. Dies liegt vor allem darin begründet, dass Nanopartikel nicht nur durch ihre Größe, sondern auch durch die Möglichkeiten der gezielten Pharmakotherapie vielversprechende Mittel zur Anwendung in der Medizin darstellen. Meist werden Nanopartikel intravenös verabreicht, was bei Kontakt des Partikels mit Blut zu einer komplexen biologischen Antwort führt [1]. Schnell adsorbieren Proteine an den Partikel, was zur Bildung der sogenannten Protein Corona führt. Stark an den Partikel adsorbierte Proteine, die lange Bestandteil der Protein Corona sind, bilden die „harte“ Protein Corona, während nur leicht gebundene und schnell austauschbare Partikel die sog. „weiche“ Protein Corona darstellen (vgl. Abb.1.1) [2]. Thermodynamische und kinetische Prozesse sind in die Bildung der Protein Corona involviert.

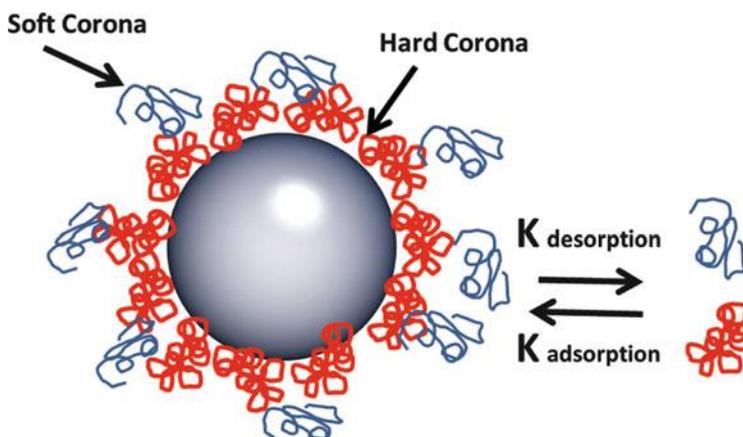


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Protein Corona um den Partikel [1]

Die Zusammensetzung der Protein Corona und damit die „biologische Identität“ des Partikels bestimmt das weitere Verhalten des Partikels im physiologischen Umfeld, wie beispielsweise Aggregation, Toxizität oder zelluläre Aufnahme [3]. Somit sind das Verständnis und die Kontrolle von Nanopartikel-Protein-Interaktionen für die erfolgreiche Anwendung in der Nanomedizin von essentieller Bedeutung.

## 1.1 Nanopartikel im physiologischen Umfeld

Tritt ein Nanopartikel in ein physiologisches Umfeld ein, adsorbieren Proteine an dessen Oberfläche. Dennoch wird die Zusammensetzung der Protein Corona durch die „synthetische Identität“ des Partikels beeinflusst. Unter dem Begriff der synthetischen Identität werden Größe, Form und die chemischen Eigenschaften des Partikels nach der Synthese zusammengefasst. Das Zeta-Potential eines Partikels bezeichnet die elektrische Ladung an seiner Oberfläche. Die Adsorption von Proteinen führt zu einer Änderung der Eigenschaften des Partikels. Auch die Aggregation und die Größe des Partikels mit Protein Corona können die Antwort des biologischen Systems beeinflussen. Der Partikel entwickelt eine sog. „biologische Identität“, die für das weitere Verhalten des Partikels und die Antwort des biologischen Systems verantwortlich ist [2]. Beispielsweise führt die Adsorption von Proteinen meistens zu einer Änderung des Zeta-Potentials des Partikels auf in etwa -10 bis 20 mV, unabhängig von dessen ursprünglichen chemischen Eigenschaften bei physiologischem pH-Wert [4], was auf den Isoelektrischen Punkt der adsorbierten Proteine (meist < 7,4) zurückzuführen ist.

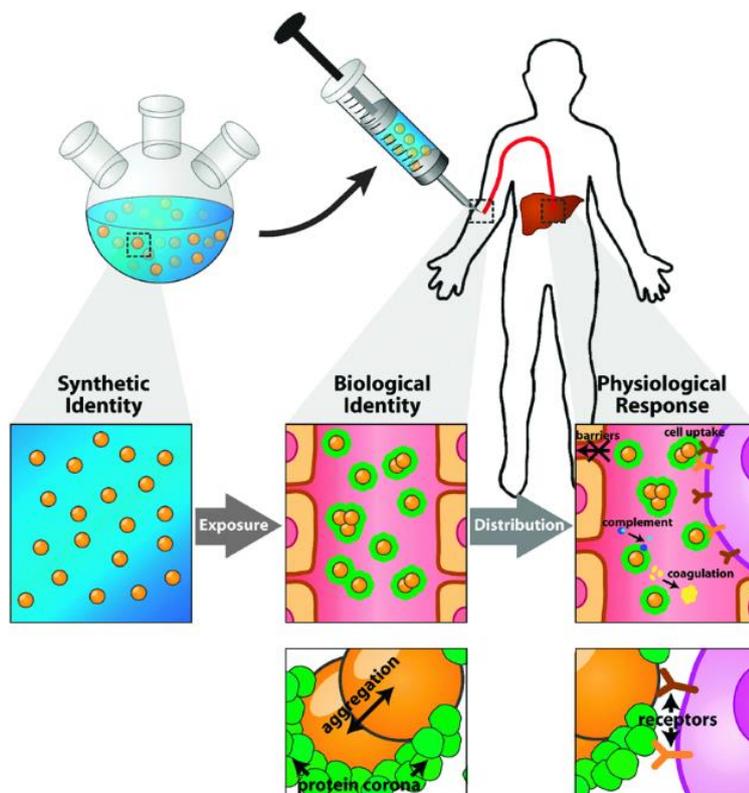


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen synthetischer und biologischer Identität und der Antwort des physiologischen Systems [2]

Um Nanomaterialien zu zuverlässigen „Drug Carriern“ etablieren zu können, müssen diese Vorgänge genau untersucht und verstanden werden. Beispielsweise werden Partikel, je nach der Beschaffenheit ihrer Protein Corona, schneller oder langsamer von Makrophagen des Mononukleäre Phagozytensystems (MPS) aus dem Blutstrom entfernt [5]. Dies führt dazu, dass die Partikel weder ihren Wirkort erreichen, noch ihren therapeutischen Nutzen entfalten können. Vor allem der Prozess der Opsonisierung, bei dem sog. Opsonine an den Partikel binden, erlaubt den Makrophagen ein schnelles Entfernen des Partikels aus dem Blutstrom. Opsonine werden Proteine genannt, die an den Partikel adsorbieren und diesen damit leichter erkennbar für phagozytierende Zellen machen [6]. Der opsonisierte Partikel interagiert über Rezeptoren an der Zelloberfläche von Makrophagen und sorgt durch eine Signalkaskade für die Aufnahme durch Endocytose. Proteine mit gegenteiligem Einfluss auf die Zellaufnahme bezeichnet man als Dysopsonine. Abbildung 1.1 zeigt die schematische Aufnahme des Partikels durch Phagozytose. Um den phagozytierten Partikel bildet sich das Phagosom, welches schließlich mit dem Lysosom fusioniert. In dem neu geformten Phagolysosom werden die Partikel aufgenommen um und falls möglich enzymatisch verdaut zu werden.

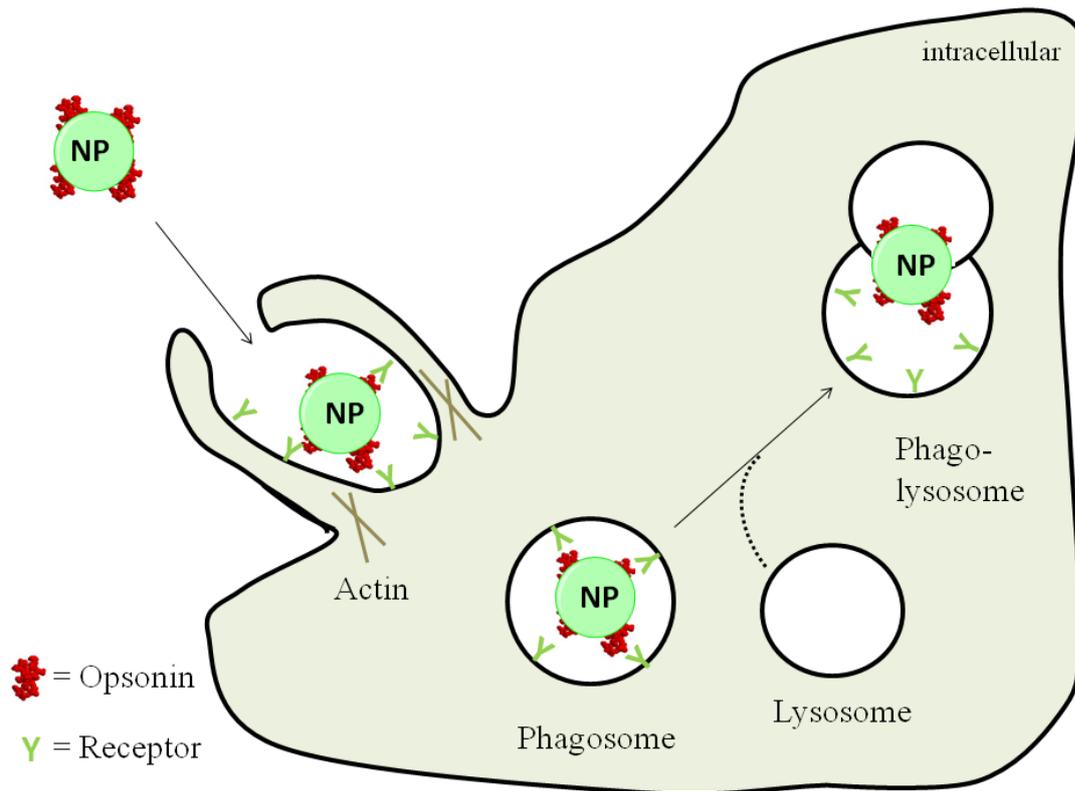


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Aufnahme opsonierter Nanopartikel in eine Makrophage [7]

Um die Adsorption von Opsoninen und die damit verstärkte Zellaufnahme zu überwinden, werden Nanopartikel mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen funktionalisiert. Ein häufig eingesetztes Beispiel ist die PEGylierung, bei der Poly(ethylenglykol)- Ketten kovalent an den Partikel gebunden werden. Diese sollen die Adsorption von Proteinen reduzieren und damit den Partikel vor den Makrophagen „tarnen“. Dieser Effekt wird als sog. „(primary) stealth effect“ bezeichnet [8]. Durch PEGylierung kann die Aufenthaltsdauer des Partikels im Blutstrom deutlich verlängert werden. Neuste Studien haben ergeben, dass die Adsorption von bestimmten Proteinen an die PEG-Ketten, vor allem Dysopsoninen, für die Reduktion der Zellaufnahme von essentieller Bedeutung ist. Diese neue Definition des „stealth effect“ wird „secondary stealth effect“ genannt [9].

## **1.2 Ziel der Arbeit**

Inwiefern die Zusammensetzung und Stabilität der Protein Corona durch chemische Modifikationen des Partikels, wie beispielsweise die Oberflächenmodifikation, beeinflusst werden kann ist Ziel dieser Arbeit. Nicht nur mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen versucht man, die Bildung der Protein Corona zu beeinflussen und damit das Verhalten des Partikels im physiologischen Umfeld zu steuern. Auch die Beeinflussung der Partikeleigenschaften auf der biologischen Ebene durch die gezielte Präinkubation mit bestimmten Proteinen oder Proteingemischen ist eine vielversprechende Möglichkeit, für zielgerichtete Pharmakotherapie [10]. Da Immunglobuline im Blutplasma als Opsonine bekannt sind [11], wurde für einige Versuche zur Präinkubation Immunglobulin G (IgG) weitestgehend aus Plasma (im Folgenden als IgG-depleted Plasma bezeichnet) entfernt. Das IgG-depleted Plasma wurde von Johanna Simon (AK Landfester) und Joelle Ronez (AK Landfester) über eine Protein-A-Säule mittels HPLC hergestellt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Methoden**

#### **2.1.1 Protein Corona**

Zur Untersuchung der Protein Corona wurde der gewählte Partikel mit 1ml humanem Plasma oder einem Proteingemisch für eine Stunde bei 37°C und 300rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Partikel eine weitere Stunde bei 20 000g und 4°C abzentrifugiert, um sie von den ungebundenen Proteinen im Überstand zu trennen. Das Partikel-Pellet wird drei Mal mit 1ml Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen, resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Nach dem letzten Mal zentrifugieren wird das Pellet in 100µl 2%igem Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) mit 62,5mM Tris-HCl resuspendiert und für fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer weiteren Stunde Zentrifugation kann der Überstand abgenommen und zur Quantifikation der abgelösten Proteine mittels Pierce Assay verwendet werden. Vor der Protein Quantifikation wird mit Hilfe der Pierce Detergent Removal Spin Columns das SDS entfernt.

### 2.1.2 Pierce- Assay

Die Protein Konzentration der vom Partikel abgelösten Protein Corona kann mittels Pierce- Assay bestimmt werden. Hierzu wurde Bovine Serum Albumin (BSA) als Standard verwendet. Durch die Änderung der Absorption der Pierce-Reagenz durch das Binden der Reagenz an Proteine konnte die Protein Konzentration photometrisch bei 660nm mit Hilfe des Tecan Platereader bestimmt werden.

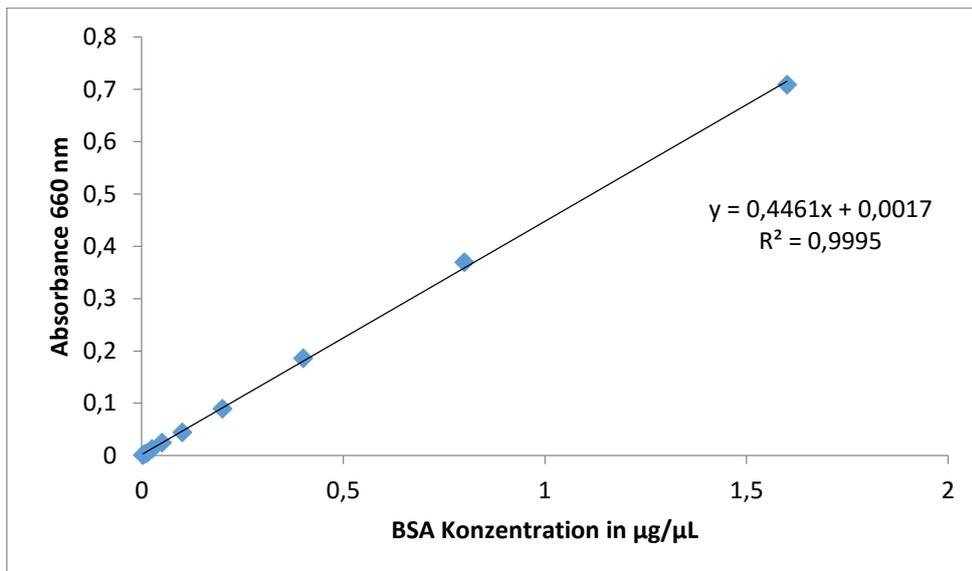


Abbildung 2.1: Eine typische Eichgrade zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit einem BSA- Standard erstellt

### 2.1.3 SDS-PAGE

Um Proteine der ihrer Größe, bzw. ihres Gewichts, nach zu trennen, eignet sich eine Sodium- Dodecyl- Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). SDS denaturiert Proteine indem es die Faltung und Struktur linearisiert.



Abbildung 2.2: Struktur von SDS

Auch überlagert die negative Ladung der Detergenz die Eigenladung von Proteinen und versieht sie mit etwa der gleichen negativen Ladung (~1g Protein pro 1,4g SDS) [7]. Durch das konstante Masse/Ladungsverhältnis unterscheiden sich diese nur noch in ihrer Größe und damit der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Kleine

Moleküle wandern schneller als Große. Die zurückgelegte Distanz kann mit Hilfe eines Markers genauer beschrieben werden. Für die in dieser Arbeit gezeigten Gele wurde SeeBlue Plus2 prestained Marker verwendet.

*Tabelle 2.1: Beispiel für ein Pipettierschema bei einer SDS-PAGE*

Probe in $\mu\text{l}$	Wasser in $\mu\text{l}$	Reducing Agent in $\mu\text{l}$	Sample Buffer in $\mu\text{l}$	Gesamtvolumen in $\mu\text{l}$
x	26-x	4	10	40

Nach der Zugabe des Reducing Agents und des Sample Buffers wurden die Proben für zehn Minuten auf 70°C erhitzt um die Proteine zu denaturieren. Für die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden 5 $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Das Gel (NuPAGE 4-12%) lief bei 100V für ca. 1,25 Stunden.

#### **2.1.4 Zellkultur**

Für die Versuche zur zellulären Aufnahme wurden Maus-Makrophagen der Linie RAW 264.7 verwendet. Diese wurden in Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), Glutamin und 10% Fetal Bovine Serum (FBS) kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit 0,25% Trypsin-EDTA wobei die Zellen mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Nach fünf minütigem Abzentrifugieren des Trypsins bei 500g wurde das Zellpellet in 10ml Medium resuspendiert und die Konzentration wurde mit dem Automated cell counter TC10 und Trypanblau bestimmt. Die Zellen wurden zwei bis drei Mal pro Woche passagiert.

#### **2.1.5 Bestimmung der Eigenfluoreszenz der verwendeten Nanopartikel**

Da die verwendeten Nanopartikel unterschiedliche Mengen des Farbstoffs enthalten, wurden die Unterschiede bestimmt und die Fluoreszenzintensität auf den unfunktionalisierten PS-Lut-Partikel genormt (siehe Formel 1). Hierzu wurde für jeden Partikel eine Verdünnungsreihe für die verschiedenen Konzentrationen (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) angesetzt. Von jeder Verdünnung wurden Duplikate angesetzt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurde mit dem Tecan Infinite R

M1000 PRO Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 523nm (Excitation) und 536nm (Emission) bestimmt.

$$nFI_{NP} = \frac{FI_{NP}}{FI_{PS-Lut}}.$$

*Formel 1: zur Normierung der Fluoreszenzintensität auf PS-Lut*

Bei der Auswertung der medianen Fluoreszenzintensität wurde jeder Wert durch die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Partikels geteilt (siehe Formel 2).

$$rFI_{NP} = \frac{mFI_{NP}}{nFI_{NP}}$$

*Formel 2: zur Errechnung der für die Auswertung verwendeten Fluoreszenzintensität ( $rFI_{NP}$ )*

### **2.1.6 Zellaufnahme mit Durchflusszytometrie**

Um einzelne Zellen genauer untersuchen und verschiedene Zellen trennen zu können, bedient man sich der Durchflusszytometrie. Hierzu passieren die einzelnen Zellen in Sheath-Puffer eine kleine Düse. Das durch die Zelle gebrochene Laserlicht und die Fluoreszenz wird durch zwei Detektoren, nämlich „forward scattered light“ (FSC) und „side scattered light“ (SSC), erkannt. Damit lassen sich die Größe (FCS) und die Granularität der Zellen bestimmen (SSC) [12]. Die Menge der von RAW 264.7 Zellen aufgenommenen NPs kann somit durch den Fluoreszenzfarbstoff BODIPY quantifiziert werden. Hierzu wurden am Tag vor dem Versuch  $1,5 \times 10^5$  Zellen (RAW 264.7) in 24 well-Platten in 1ml DMEM mit 10%FBS, 1% Glutamin und 1% Pen/Strep über Nacht ausgesät. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen mit PBS gewaschen, um die Proteine des FBS zu entfernen und in Medium ohne Proteine kultiviert. Die Partikel werden für eine Stunde bei 37°C und 300rpm auf dem Schüttler mit Proteinen oder Proteingemischen inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 20 000g und 4°C zentrifugiert. Je nach Versuchsansatz wurde für die Präinkubation eine bestimmte Protein-Menge, bezogen auf 0,05  $m^2$  Partikel, verwendet. Für jeden Partikel wurde eine Konzentration von 20 $\mu$ g/ml gewählt. Einzig PS-Lut-NH<sub>2</sub> wurde höher (75 $\mu$ g/ml) konzentriert verwendet. Der Überstand wird verworfen und die Partikel in Wasser resuspendiert. Im Anschluss werden die präinkubierten Partikel in Medium ohne Proteine oder Medium mit 10% humanem Plasma pipettiert und zu den Zellen gegeben. Es werden jeweils biologische Triplikate angesetzt. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit werden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, um

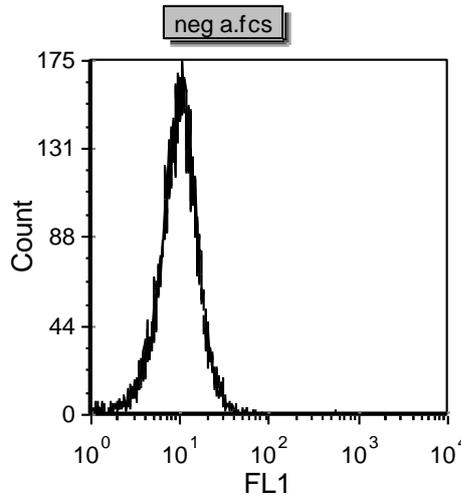


Abbildung 2.4: Histogramm des FL1-Channels. Beispiel: Zellen ohne Nanopartikel (Negativ-Kontrolle)

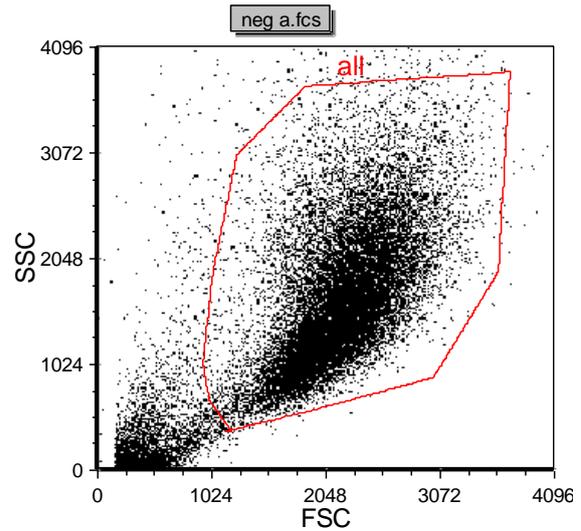


Abbildung 2.3: FCS vs. SSC. Darstellung der gegateten Zellpopulation. Beispiel: Zellen ohne Nanopartikel (Negativ-Kontrolle)

nicht aufgenommene Partikel zu entfernen. Nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA und fünfminütiger Zentrifugation bei 500g werden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt am Durchflusszytometer. Die Analyse der Zellaufnahme erfolgt mit dem Programm FCS Express V4, bei dem die Zellen in einem Dotplot gegatet (vgl. Abb 2.3) werden und Zelldebris ausgeschlossen werden kann. Die Fluoreszenzintensität wurde im FL1-Channel gemessen. Über das in Abb. 2.4 dargestellte Histogramm des FL1-Channels lässt sich die mediane Fluoreszenzintensität bestimmen, die mit der Menge der aufgenommenen Nanopartikel korreliert. Die mediane Fluoreszenzintensität der Negativ- Kontrolle wurde von jedem Wert abgezogen (vgl. Formel 3).

$$eFI_{NP} = rFI_{NP} - FI_{neg}$$

Formel 3: Berechnung der endgültigen Fluoreszenzintensität

### 2.1.7 Bestimmung der Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte durch die Färbung der toten Zellen [13] mit Propidium-Iodid (PI). Hierzu wurden unmittelbar vor der Messung am

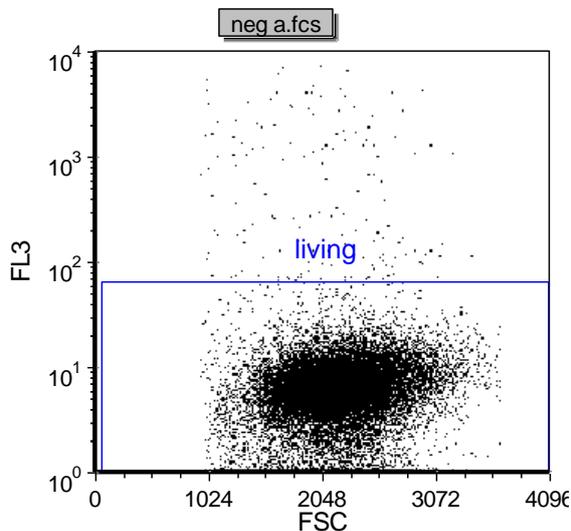


Abbildung 2.5: Darstellung der lebenden Zellen mit PI als Dotplot im FL3-Channel

Durchflusszytometer 10µl PI (c= 200µg/ml) zu der Zellsuspension in 1ml PBS gegeben. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Programm FCS Express V4 durch Gaten in einem Dotplot.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Nanopartikel

Die verwendeten Polystyrol-Nanopartikel wurden von Katja Klein (AK Landfester) und Thomas Wolf (AK Landfester) mittels Mini-Emulsions-Copolymerisation hergestellt [14]. Alle Partikel sind mit fluoreszierendem Farbstoff (BODIPY B523-MA) mit einer Absorption bei 523nm und einer Emission bei 536nm gefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde auf den unfunktionalisierten Lutensol-Partikel KK89 genormt (vgl. 2.1.5) und bei den Versuchen zur zellulären Aufnahme berücksichtigt. PS- NH<sub>2</sub>, PS-PEG, PS-PPE 30% und PS-PPE 40% unterscheiden sich nicht in ihrer Fluoreszenzintensität weshalb keine Normierung erforderlich war.

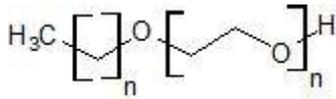


Abbildung 2.6: Struktur des Surfactants Lutensol

Tabelle 2.2. Übersicht der von Katja Klein synthetisierten Partikel

Partikel	Surfactant	Oberfläche	Durchmesser In Wasser	Zeta-Potential	Fluoreszenz-Intensität normalisiert	Anzahl der Ketten auf der Oberfläche
PS-Lut	Lutensol	Nicht funktionalisiert	120nm	-6,67mV	1	keine
PS-Lut-COOH	Lutensol	COO <sup>-</sup>	116nm	-7,21mV	1,27	45 000
PS-Lut-NH <sub>2</sub>	Lutensol	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	126nm	+7,58mV	1,14	4560
PS-Lut-Phosphat	Lutensol	Phosphonat	126nm	-37,9mV	1,06	Keine Daten
PS-NH <sub>2</sub>	CTMA-Cl (Cetyltrimethylammonium Chlorid)	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	105nm	+48,7mV	1,38	3586

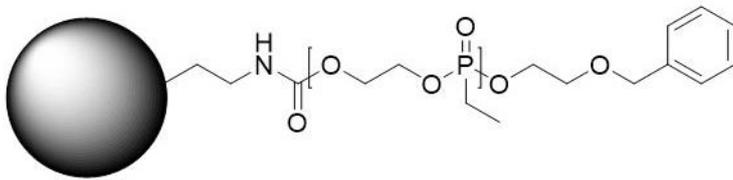


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Oberflächenmodifikationen der Poly(phosphoester)-Partikel (TW158d)

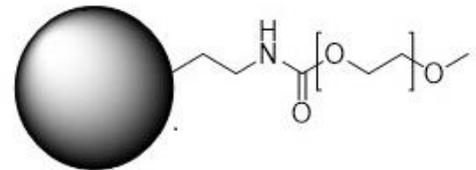


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Oberflächenmodifikation des PEGylierten Partikels (TW157)

Table 2.3: Übersicht der von Thomas Wolf synthetisierten Partikel im Vergleich mit PS-NH<sub>2</sub>

Partikel	Surfactant	Oberfläche	Durchmesser in Wasser	Zeta-Potential	Anzahl der Ketten auf der Oberfläche
PS-NH <sub>2</sub>	CTMA-Cl	(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) „Nackt“	105nm	+48,7mV	3586
PS-PEG	CTMA-Cl	PEG	169nm	+14,2mV	3000
PS-PPE	CTMA-Cl	Polyphosphonat (Polymer)	147nm	+18,4mV	1060 (Funktionalisierungsgrad 30%)
PS-PPE	CTMA-Cl	Polyphosphonat (Polymer)	179nm	+17,2mV	1400 (Funktionalisierungsgrad 40%)

## 2.2.2 Blutplasma

Das verwendete Blutplasma wurde an der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg Universität Mainz 10 gesunden Blutspendern entnommen. Der Blutgerinnung wurde durch die Zugabe von Heparin vorgebeugt. Durch Zentrifugation des Blutes wurden rote und weiße Blutkörperchen entfernt, im Überstand befand sich das Blutplasma. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Vor der Verwendung wurde das Plasma 30min. bei 4°C und 20 000g zentrifugiert und mit 0,2µm-Filtern steril filtriert.

## 2.2.3 Instrumente und Chemikalien in der Zellkultur

Table 2.4: In der Zellkultur verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen, USA
Penicillin	Invitrogen, USA
Trypsin EDTA 25%	Life technologies, USA
Streptomycin	Invitrogen, USA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, USA
Glutamin	Invitrogen, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Life technologies, USA
NuPAGE reducing agent	Life technologies, USA
NuPAGE sample buffer	Life technologies, USA
SeeBlue Plus2 prestained standard	Life technologies, USA
Simple blue safe stain (Coomassie G-250)	Life technologies, USA
Sheath fluid for flow systems	Partec, Deutschland
Propidium-Iodid	Sigma Aldrich, USA
Human Serum Albumin (HSA)	Sigma Aldrich, USA
Apolipoprotein A1	Biopur, Schweiz
Apolipoprotein E	Biopur, Schweiz
Fibrinogen	CSL Behring, Deutschland
Humanes Plasma	Universitätsmedizin Mainz
Pierce 660nm Protein Assay Reagent	Thermo Scientific

*Tabelle 2.5: In der Zellkultur verwendetes Verbrauchsmaterial*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Zellkultur-Flaschen	Greiner, Deutschland
Ibidi itreat $\mu$ -dishes	IBIDI, Deutschland
24 well Zellkultur Platten	Greiner, Germany
FACS tubes	Partec, Deutschland
Falcon tubes (15ml; 50ml)	
Pipetten (5,10,25 ml)	Greiner, Deutschland
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 $\mu$ l)	Greiner, Deutschland
NuPAGE 4-12% bis-tris-gel	Life technologies, USA
Pierce Detergent Removal Spin Columns	Thermo Scientific

Tabelle 2.6: In der Zellkultur verwendete Instrumente

<b>Instrument</b>	<b>Hersteller</b>
Automated cell counter TC10	Bio-Rad, USA
Cell culture flow c-(Max Pro) 3-130	Berner, Deutschland
Cell culture incubator C200	Labotech, Deutschland
Zentrifuge 5810/5430R	Eppendorf, Deutschland
Flow cytometry CyFlow ML	Partec, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Deutschland
Inverted microscope CKX41	Olympus, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipetting and accu-jet pro	Brand, Deutschland
Platereader infinite M1000	Tecan, Deutschland
SDS-PAGE chamber mini	Biometra, Deutschland
Thermo mixer	HL by Ditabis
Wasserbad	Memmert, Deutschland
Vacuum pump vacusafe comfort	IBS Integra Bioscience, Deutschland

Tabelle 2.7: Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
FCS Express V4.0	DeNovo Software, USA
Flow Max 3	Partec, Deutschland
i-control 1.6.19.0	Tecan, Deutschland

## 3 Ergebnisse

Polystyrol-Nanopartikel (PS-NPs) mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen wurden in komplexen Proteingemischen präinkubiert, um verschiedene Nanopartikel-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Im Folgenden werden die jeweiligen Ergebnisse aufgeführt und im Hinblick auf die Zusammensetzung der Protein Corona sowie deren Einfluss auf das Verhalten der PS-NPs in physiologischer Umgebung erläutert.

### 3.1 Charakterisierung der Protein Corona verschiedener Nanopartikel mittels SDS-PAGE

Zur Untersuchung der Protein Corona der PS-NPs wurden die an die Oberfläche der Partikel adsorbierten Proteine abgelöst (siehe 2.1.1) und mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurde der Einfluss der unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierungen verschiedener Partikel, sowie der Einfluss der Präinkubation auf die Zusammensetzung der Protein Corona analysiert.

### 3.1.1 Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung

Die Bildung und Zusammensetzung der Protein Corona und somit die „biologische Identität“ ist von mehreren Faktoren abhängig. Nicht nur die Größe der Nanopartikel, sondern vor allem auch die Modifikation und Ladung der Oberfläche spielen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von Proteinen mit Nanomaterialien [2]. Da die hier untersuchten PS-NPs mit ca. 120nm im Durchmesser in etwa gleich groß sind (siehe 2.2.1), können die Unterschiede in der Zusammensetzung der Protein Corona auf die unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen der Partikel zurückgeführt werden.

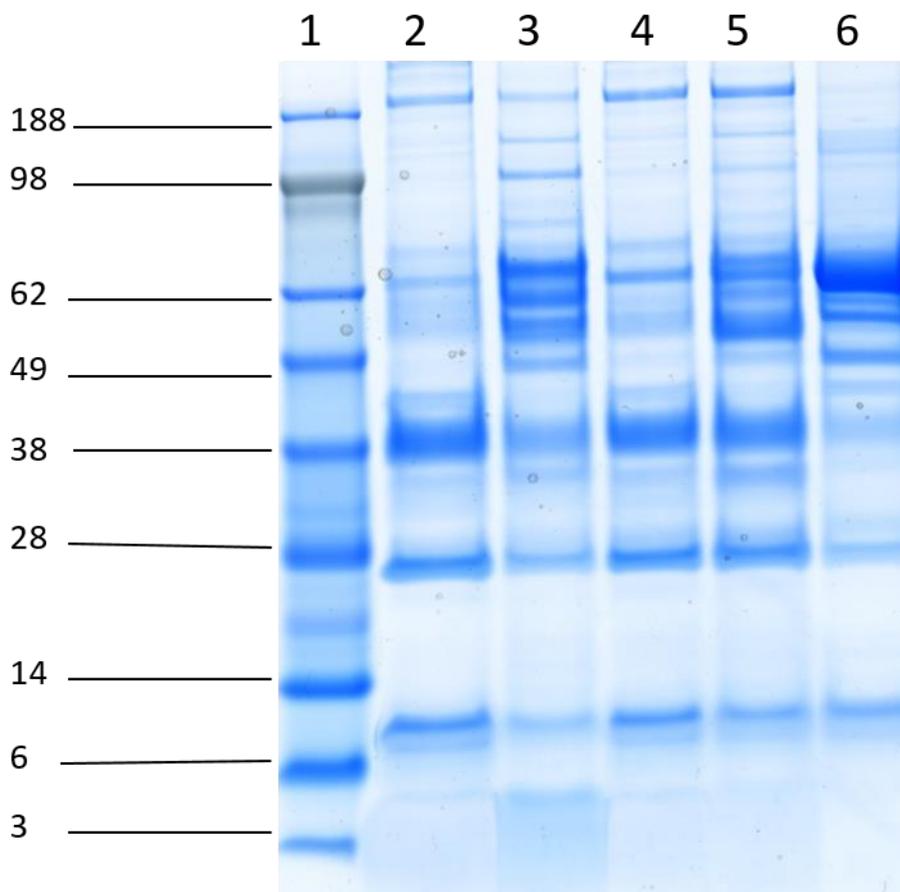


Abbildung 3.1: Der Ausschnitt eines Gels zeigt PS-NPs, die mit humanem Plasma vorinkubiert wurden. Aufgetragen wurden der Marker (1), PS-Lut (2), PS-Lut-COOH (3), PS-Lut-NH<sub>2</sub> (4), PS-Lut-Phosphat (5) und PS-NH<sub>2</sub> (6). Als Marker wurde Seeblue Plus 2 prestaines standard von life technologies verwendet. Die Markierung der Banden zeigt die Masse der Proteine in kDa.

Abbildung 3.1 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Bestandteile der Protein Corona verschiedener Partikel. Die Banden des Gels wurden durch Coomassie-Brilliant-Blue (siehe 2.1.2) gefärbt.

Vergleicht man die einzelnen Bahnen miteinander, so werden große Unterschiede zwischen den verschiedenen funktionalisierten Partikeln deutlich. Während das Protein-Muster des Lutensol-Partikels ohne Oberflächenfunktionalisierung (PS-Lut; 2) und das des Amino-Partikels (PS-Lut-NH<sub>2</sub>; 5) nahezu identische Banden aufweisen, unterscheidet sich das des Carboxy-Partikel (3) sowie der Partikel mit Phosphat-Gruppen an der Oberfläche (5) deutlich voneinander. Der CTMA-Cl-Partikel mit Amino-Gruppen (6) unterscheidet sich trotz der ähnlichen Oberflächenfunktionalisierung von PS-Lut-NH<sub>2</sub>.

Betrachtet man die Bahnen einzeln, fallen verschiedene dominante Banden deutlich ins Auge.

Bei PS-Lut findet sich eine breite Bande in Höhe von in etwa 38kDa, die unter diesen reduzierenden Bedingungen einen Teil des Proteins Clusterin [15] darstellen könnte, sowie eine Bande bei ca. 25kDa, bei der es vermutlich um die leichte Kette von IgG handelt [16]. Das Muster hier ähnelt sehr dem von PS-Lut-NH<sub>2</sub>. Die Ähnlichkeit im Muster dieser beiden Partikel kann durch die verhältnismäßig geringe Anzahl an Amino-Ketten auf der Oberfläche von PS-Lut-NH<sub>2</sub> bedingt sein (siehe 2.2.1). Das Bandenmuster von PS-Lut-COOH (3) deutet auf eine große Proteinvielfalt in der Corona hin. Deutlicher zu sehen sind drei nahe zusammenliegende Banden im Bereich zwischen 65-52kDa, und eine Bande bei ca. 48kDa, die auf die schwere Kette von IgG hinweist [16]. Zwischen 65kDa-50kDa scheint die Zusammensetzung der Protein Corona des PS-Lut-Phosphat (5) eher der des Carboxy-Partikels zu ähneln, doch auch hier finden sich deutliche Unterschiede in der Intensität der Banden. Bei PS- NH<sub>2</sub> wiederum fällt zunächst die sehr breite Bande in Höhe von 66kDa auf, die zwar auch bei allen anderen Partikeln vorhanden ist, aber dort deutlich weniger intensiv. Dies deutet auf einen großen Anteil an Albumin [18] in der Protein Corona dieses Partikels hin.

Insgesamt lassen sich demnach durchaus Unterschiede in der Zusammensetzung der Protein Corona der Partikel erkennen, die sich auf die verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen zurückführen lassen. Vor allem im Hinblick auf die dominantesten Banden werden die Unterschiede deutlich. Während in der Protein Corona von PS-Lut und PS-Lut-NH<sub>2</sub> Clusterin dominiert, finden sich in der Corona von PS-Lut-COOH weniger dominante Banden. Die Protein Corona des PS-NH<sub>2</sub>-Partikels weist einen hohen Anteil an Albumin auf. Inwiefern diese Modifikationen der

Oberfläche und damit die Zusammensetzung der Protein Corona einen Einfluss auf das Verhalten der Partikel im physiologischen Umfeld hat, kann unter Anderem in Versuchen der zellulären Aufnahme beobachtet werden.

### 3.1.2 Einfluss der Präinkubation

Eine Protein Corona, die zur verminderten Zellaufnahme des Partikels führt, wird als „stealth corona“ bezeichnet. Durch die Entfernung des Opsonins IgG aus dem Blutplasma, ist es möglich diesen Effekt durch die Präinkubation mit dem so entstandenen Proteingemisch zu erzielen [6]. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung dieser stealth corona aufgeführt.

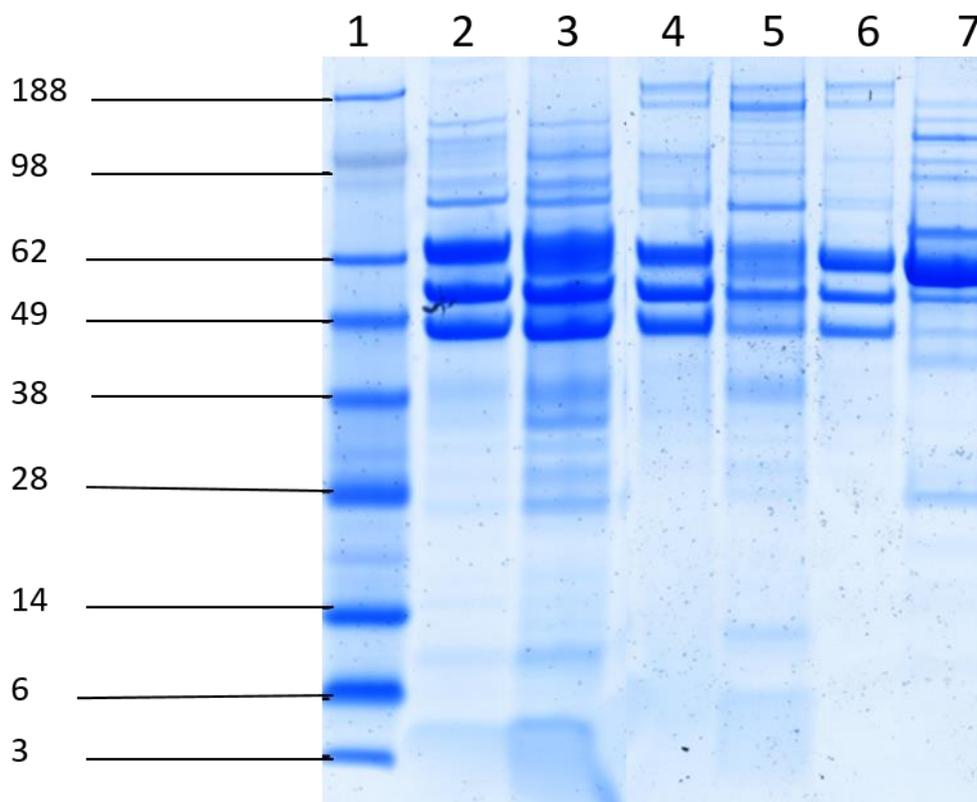


Abbildung 3.2: PS-Lut-COOH wurde mit IgG-depleted Plasma (2), doppelt mit IgG-depleted Plasma und Plasma (3), Fibrinogen (4), doppelt mit Fibrinogen und Plasma (5), präinkubiert. Zum Vergleich wurde noch reines Fibrinogen (6) und IgG-depleted Plasma (7) aufgetragen. Es wurde ebenfalls SeeBlue Plus2 prestained Standard als Marker (1) verwendet. Die Banden des Markers markieren die unterschiedlichen Molekülmassen der Proteine oder Proteinuntereinheiten in kDa.

Dieses ebenfalls mit Coomassie gefärbte Gel dient dem Vergleich der Protein Corona von PS-Lut-COOH, welcher entweder mit IgG-depleted Plasma oder mit reinem Fibrinogen präinkubiert wurde. Auf die Bahnen 2 und 3 wurden Proben der Protein Corona Untersuchung von Johanna Simon (AK Landfester) aufgetragen. Verglichen

mit Abb.3.1 zeigt das Protein- Muster des Carboxy-Partikels nach der Inkubation mit IgG-depleted Plasma (Abb. 3.2, Bahn 2) Unterschiede zu der Inkubation mit vollem Plasma. Deutlich erkennbar sind nach der Inkubation mit IgG-depleted Plasma die drei Banden im Bereich zwischen 65kDa- 52kDa, die recht nahe beisammen liegen. Bei der Inkubation mit IgG-depleted Plasma (2) sind diese deutlicher getrennt als bei der doppelten Inkubation (3), doch auch hier dominieren diese eindeutig das Protein Muster der Corona. Da diese drei Banden, die man bei der Präinkubation mit Fibrinogen betrachten kann, sich auch bei den Vorinkubationen mit IgG-depleted Plasma finden, kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um die das Protein Fibrinogen handelt. Die drei Banden resultieren vermutlich in der Auftrennung des gesamten Proteins in einzelne Untereinheiten unter reduzierenden Bedingungen [17]. Die Inkubation mit IgG-depleted Plasma führt demnach zu einem anderen Bandenmuster als die Inkubation mit vollem Plasma. Nach der doppelten Inkubation mit IgG-depleted Plasma und vollem Plasma (3) unterscheidet sich das Proteinmuster nicht signifikant von dem der einfachen Inkubation mit IgG-depleted Plasma, aber deutlich von der Inkubation mit vollem Plasma (vgl. Abb. 3.1). Dies lässt auf eine stabile Protein Corona nach der Inkubation mit IgG-depleted Plasma schließen. Interessanterweise scheint Albumin, obwohl es das Protein mit dem größten Anteil im Blutplasma ist [1], kein Bestandteil der Protein Corona nach Inkubation mit IgG-depleted Plasma zu sein. Diese Beobachtungen konnten von Johanna Simon (AK Landfester) am LC-MS bestätigt werden.

## 3.2 Analyse der zellulären Aufnahme in Makrophagen mittels Durchflusszytometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die Zellaufnahme der PS-NPs in Maus- Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 durch verschiedene Oberflächenmodifikationen (chemisch) oder Präinkubationen (biologisch) beeinflussen lässt.

### 3.2.1 Gezielte Oberflächenfunktionalisierung von Nanopartikeln mit verschiedenen Polymeren

Bislang wurde in der Nanomedizin häufig das kovalente Binden von Poly(ethylenglykol) (PEGylierung), zur Verminderung der nicht-spezifischen Interaktionen von Partikel mit Plasma Proteinen verwendet [19]. PEG soll die Adsorption opsonierender Proteine verhindern und somit die Aufnahme des Partikels verhindern. So kann durch PEGylierung die Aufenthaltsdauer des Nanopartikels im Blutstrom erheblich verlängert werden. Als mögliche Alternative zu PEG können auch Poly(phosphorester) (PPE) verwendet werden [20]. Inwiefern sich diese Polyphosphonate eignen, die zelluläre Aufnahme der PS-NPs zu reduzieren soll im Folgenden untersucht werden. Zum Vergleich wurde zudem noch ein PEGylierter Partikel herangezogen. Die verwendeten Partikel wurden aus PS-NH<sub>2</sub> synthetisiert.

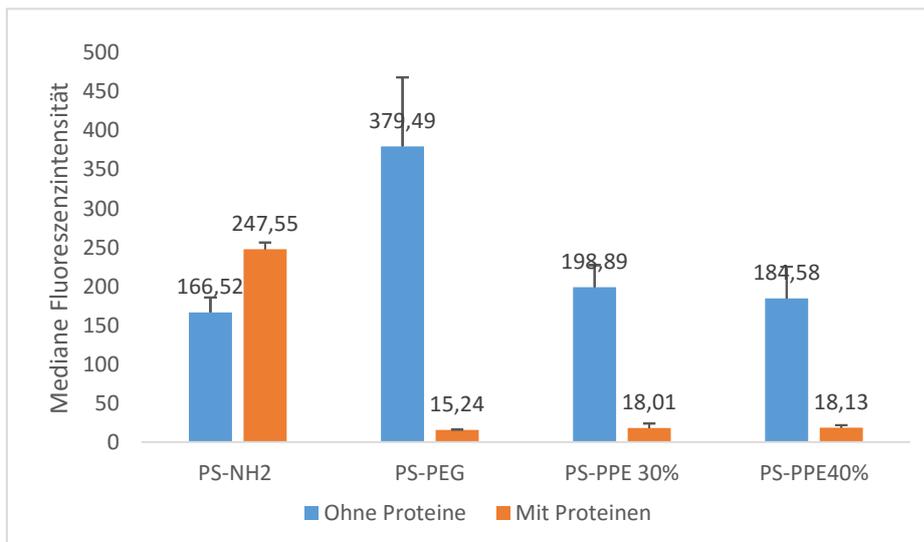


Abbildung 3.3: Die Zellaufnahme von PS-NH<sub>2</sub>, PS-PEG, PS-PPE 30% und PS-PPE 40% wurde in Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) untersucht.

Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der zellulären Aufnahme der nicht-präinkubierten Partikel in Medium ohne Proteinen, hier blau, und im Medium mit 10% humanem Plasma, in orangenen Balken dargestellt. Im Vergleich mit PS- NH<sub>2</sub>, in diesem Versuch auch als „nackter Partikel“ bezeichnet, werden PS-PPE 30% und PS-PPE 40% ähnlich aufgenommen. Auch der PEGylierten Partikel wird im Medium ohne Proteine gut aufgenommen. Da keine Proteine in diesem Medium vorhanden sind, kann man die Aufnahme der Partikel nicht auf Opsonine zurückführen. Im Medium mit Proteinen ist die Aufnahme des PEGylierten Partikels verringert. Dies deutet darauf hin, dass die PEGylierung nicht nur wie ursprünglich angenommen eine Adsorption eines Großteils der Proteine verhindert, sondern die Adsorption dysopsonierender Proteine begünstigen kann [9]. Auch für die Polyphosphonat-Partikel konnte dieser Effekt beobachtet werden. Bei beiden Partikeln wurde die zelluläre Aufnahme im Vergleich mit der im Medium ohne Proteine ebenso verringert, auch wenn je nach Funktionalisierungsgrad (vgl. 2.2.1) keine Unterschiede in der Aufnahme festgestellt werden konnten.

Somit lässt sich sagen, dass die Adsorption von bestimmten Proteinen an die Partikel von essentieller Bedeutung für die Verminderung der Zellaufnahme in Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 darstellt. Des Weiteren ist zu erkennen, dass eine PEGylierung zwar im Stande ist, die Zellaufnahme zu vermindern, aber dies nicht wie bisher angenommen auf eine allgemeine Verhinderung der Adsorption von Proteinen an die Partikel, sondern auf eine gezielte Adsorption dysopsonierender Proteine zurückzuführen ist. Der gleiche Effekt konnte auch für die Polyphosphonat-Ketten als Oberflächenfunktionalisierung beobachtet werden. Dies deckt sich mit kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Forschern des Max Planck Instituts für Polymerforschung. Diese fanden zum ersten heraus, dass die zelluläre Aufnahme von sowohl PEG- als auch PPE-funktionalisierten Partikeln nur in Anwesenheit von Plasma-Proteinen verringert ist. Des Weiteren wird die Adsorption von Dysopsoninen, beispielsweise Clusterin, durch die Funktionalisierung begünstigt [9].

### 3.2.2 Vergleich der zellulären Aufnahme in Medium ohne Proteine und in Anwesenheit von Plasma-Proteinen

Es wurde im Folgenden untersucht, ob die Aufnahme von PS-Lut-COOH, PS-Lut-NH<sub>2</sub> und PS-NH<sub>2</sub> durch die Anwesenheit von Plasmaproteinen beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

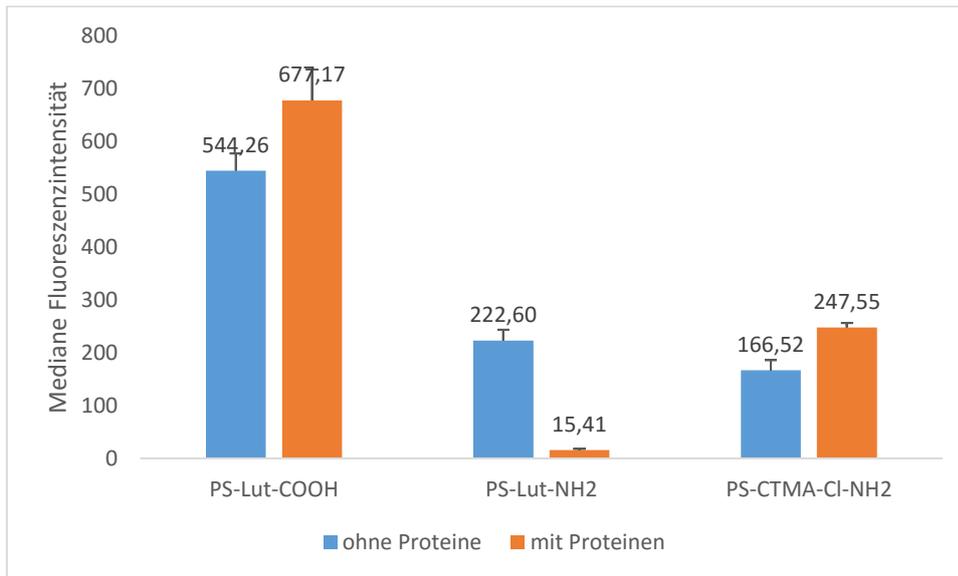


Abbildung 3.4: Die zelluläre Aufnahme von PS-Lut-COOH, PS-Lut-NH<sub>2</sub> und PS-NH<sub>2</sub> wurde in Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) gemessen.

Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH und PS-NH<sub>2</sub> ist im Medium mit Proteinen der Aufnahme im Medium ohne Proteine ähnlich. Einzig für PS-Lut-NH<sub>2</sub> wird die zelluläre Aufnahme durch die Anwesenheit von Plasmaproteinen deutlich verringert.

### 3.2.3 Präinkubation der Nanopartikel mit einem komplexen Proteingemisch und verschiedenen einzelnen Proteinen

Immunglobulin G (IgG) ist neben Albumin das häufigste Protein in Blutplasma [21]. Um genauere Auskunft über die Zusammensetzung der Protein Corona in Abwesenheit dieses Proteins zu erhalten, wurde IgG über eine Protein A Säule mit HPLC entfernt. Dies wurde von Johanna Simon (AK Landfester) und Joelle Ronez (AK Landfester) durchgeführt. Auch wurde untersucht, ob Apolipoproteine, wie beispielsweise Apolipoprotein A1 (ApoA1) als Dysopsonin wirkt [22].

#### 3.2.3.1 Präinkubation mit IgG-depleted Plasma

Für die Untersuchung der Präinkubation mit IgG-depleted Plasma wurden ein Carboxy-Partikel (PS-Lut-COOH), ein Amino-Partikel (PS-Lut-NH<sub>2</sub>), sowie ein weiterer Amino-Partikel (PS-NH<sub>2</sub>). Im Folgenden sind die Ergebnisse der zellulären Aufnahme für die jeweiligen Partikel aufgeführt.

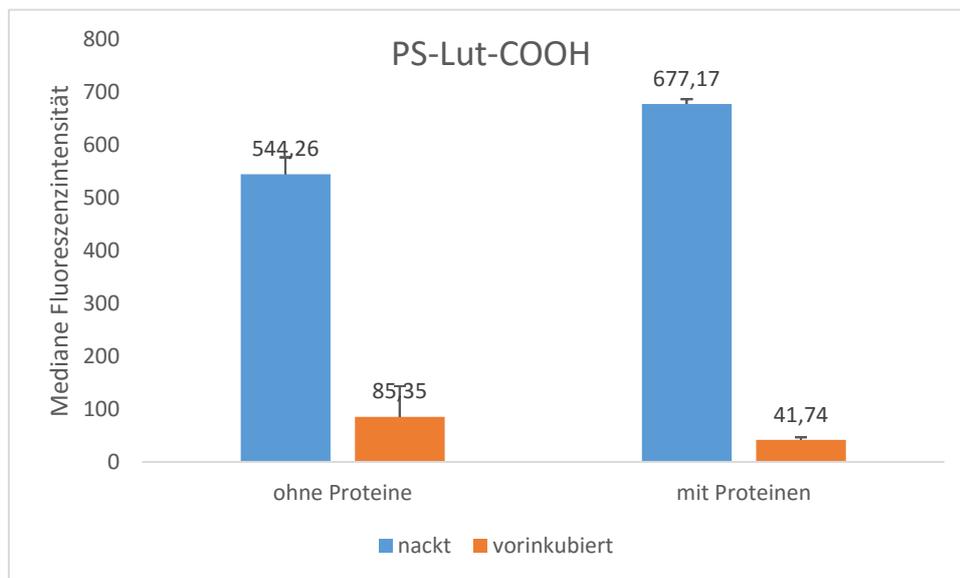


Abbildung 3.5: Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH im Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) wurde nach der Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma mit der Zellaufnahme des nicht vorinkubierten (nackten) Partikels verglichen.

Abbildung 3.5 zeigt die Unterschiede in der Zellaufnahme von PS-Lut-COOH in RAW-Zellen. Links wurde der Partikel in Medium ohne Proteine mit den Zellen inkubiert, während rechts die Inkubation in Medium mit 10%igem humanem Plasma stattfand. Der nackte Partikel wird in beiden Medien gleich aufgenommen. Vergleicht man die

Zellaufnahme des Partikels im Medium ohne Proteine, fällt auf, dass diese sich durch die Präinkubation deutlich verringert. Auch in Medium mit Proteinen wird der nackte Partikel stark aufgenommen während die Zellaufnahme durch die Vorinkubation deutlich verringert werden konnte.

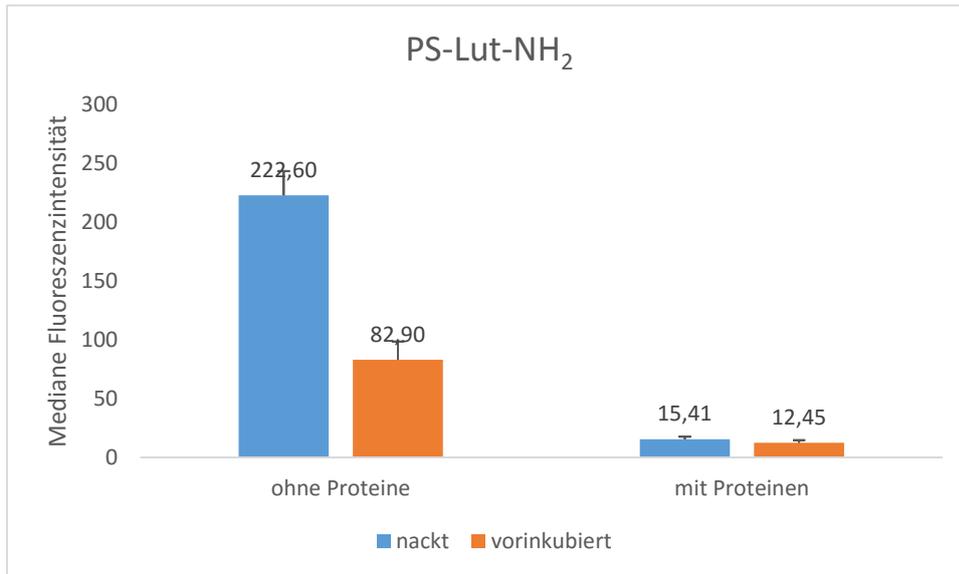


Abbildung 3.6 Die Zellaufnahme von PS-Lut-NH<sub>2</sub> im Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) wurde nach der Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma mit der Zellaufnahme des nicht vorinkubierten (nackten) Partikels verglichen.

Vergleicht man die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH (Abb 3.5) mit der von PS-Lut-NH<sub>2</sub> (Abb.3.6), muss beachtet werden, dass die Aufnahme von PS-Lut-NH<sub>2</sub> durch die Anwesenheit von Plasmaproteinen auch ohne Präinkubation reduziert wird (vgl. Abb. 3.4). In Abwesenheit von Proteinen hingegen wird der nackte Amino-Partikel gut aufgenommen. Im Medium mit Proteinen ist die Aufnahme des Partikels mit und ohne Vorinkubation schwächer als nach der Inkubation mit IgG-depleted Plasma im Medium ohne Proteine.

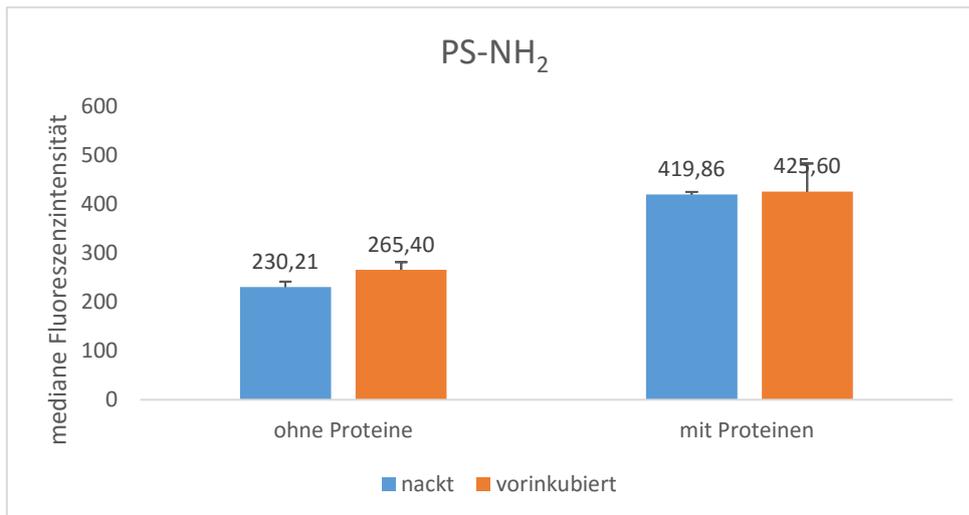


Abbildung 3.7: Die Zellaufnahme von PS-NH<sub>2</sub> im Medium ohne Proteine und im Medium mit 10% humanem Plasma (mit Proteinen) wurde nach der Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma mit der Zellaufnahme des nicht vorinkubierten (nackten) Partikels verglichen.

Für PS-NH<sub>2</sub> werden die Ergebnisse der Zellaufnahme in RAW-Zellen in Abbildung 3.7 dargestellt. Im Medium ohne Proteine, hier links dargestellt, kann man keine verminderte Zellaufnahme erkennen. Sowohl der nackte Partikel, als auch der mit IgG-depleted Plasma vorinkubierte Partikel werden gleich von den Zellen aufgenommen. In Medium mit 10% humanem Plasma ist die Aufnahme des Partikels ebenfalls gleich. Insgesamt lässt sich für diesen Partikel kein Effekt der Präinkubation beschreiben.

Für den Carboxy-Partikel ergibt sich demnach eine deutliche Verringerung der zellulären Aufnahme, die auch in Medium mit Proteinen Bestand hat. Eine solche Beobachtung lässt sich für den Lutensol-Amino-Partikel nur im Medium ohne Proteine machen, da die Aufnahme dieses Partikels bereits durch die Anwesenheit von Plasmaproteinen verringert wird. Scheinbar keinen Effekt hat die Vorinkubation auf den CTMA-Cl- Amino-Partikel.

### 3.2.3.2 Präinkubation mit Fibrinogen

Wie schon die Ergebnisse der Untersuchung der Protein Corona zeigen (siehe 3.1.2), ist Fibrinogen ein Bestandteil der Protein Corona des mit IgG-depleted Plasma vorinkubierten Carboxy-Partikels. Inkubiert man den Partikel mit stetig steigenden Proteinmengen, so kommt es zur Aggregation den Partikels. Es wurde mit 100µg, 200µg, 500µg, 1000µg und 5000µg (vgl. 2.1.6) Fibrinogen vorinkubiert. Im Falle dieses Versuches ließ sich der Partikel ab einer Proteinmenge von 1000µg nur schwer resuspendieren, was auf die Aggregation des Partikels zurückzuführen ist. Dennoch werden im Folgenden die Ergebnisse für alle Proteinmengen aufgeführt.

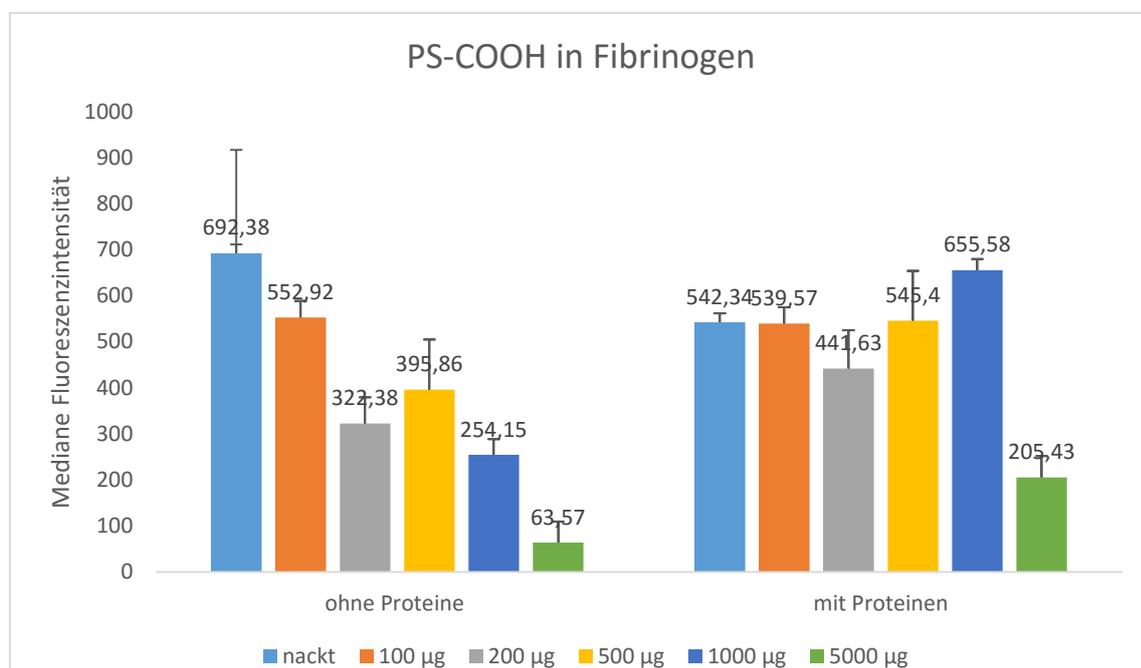


Abbildung 3.8: Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH nach Inkubation mit unterschiedlichen Fibrinogenmengen wurde im Medium ohne und im Medium mit Proteinen verglichen.

Abbildung 3.8 zeigt die zelluläre Aufnahme des mit Fibrinogen vorinkubierten Carboxy-Partikels. Links abgebildet ist die Zellaufnahme in Medium ohne Proteine, während die zelluläre Aufnahme in Medium mit 10% humanem Plasma rechts dargestellt ist. Der nackte Partikel wird, wie bereits in den vorherigen Versuchen beobachtet, im Medium ohne Proteine gut aufgenommen. In 100 µg Fibrinogen wird die Aufnahme des Partikels bereits etwas verringert. In 200 µg Fibrinogen wird dieser Effekt noch deutlicher. Man kann bis hierhin eine verminderte Aufnahme erkennen, doch bei einer Inkubation mit 500 µg Fibrinogen, ist die Aufnahme wieder verstärkt. Bei den höheren Proteinmengen von 1000 µg und 5000 µg Fibrinogen kann zwar wieder verminderte Aufnahme beobachten, doch da es hier zu deutlicher Aggregation den Partikels kam,

kann man über diese Präinkubation keine genauen Aussagen treffen. Insgesamt lässt sich jedoch ein Trend beobachten, der auf eine Reduktion der zellulären Aufnahme mit steigender Proteinmenge hinweist. In Medium mit Protein unterscheiden sich die einzelnen Werte für die Aufnahme des vorinkubierten Partikels kaum von dem „nackten“ Partikel. Vor allem für 100 µg und 500µg ergeben sich kaum unterschiedliche Werte in der medianen Fluoreszenzintensität. Bei 200 µg ist die Aufnahme verringert, ebenso wie bei 5000 µg, wo die Aufnahme ebenfalls vermindert ist. Erhöht wird die Aufnahme bei einer Fibrinogenmenge von 1000 µg. Doch auch bei diesen Werten muss das Aggregationsverhalten des Carboxy-Partikels bei höheren Proteinmengen beachtet werden. Somit lässt sich insgesamt kein einheitlicher Einfluss der Präinkubation mit Fibrinogen im Medium mit Proteinen beobachten. Verglichen mit der Zellaufnahme nach der Präinkubation mit IgG-depleted Plasma (siehe 3.2.1.1) ist kein ähnlicher Effekt erkennbar. Dies kann unter anderem an der räumlichen Orientierung der Proteine, die Bestandteil der Corona sind, liegen.

### 3.2.3.3 Präinkubation mit HSA, ApoA1 und ApoE

Im Gegensatz zu Fibrinogen werden Albumin und Apolipoproteine oftmals als Dysopsonine bezeichnet [23]. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei Polystyrol-Nanopartikel beobachtet werden kann, wurden der Carboxy- sowie der Lutensol-Amino-Partikel mit Apolipoprotein A1 (ApoA1) vorinkubiert. Des Weiteren wurde PS-Lut-NH<sub>2</sub> noch mit humanen Serum Albumin (HSA) und Apolipoprotein E präinkubiert.

Abbildung 3.9 zeigt die mediane Fluoreszenzintensität des Carboxy-Partikels und somit die Zellaufnahme in Makrophagen (RAW-Zellen). Zunächst fällt die sehr geringe

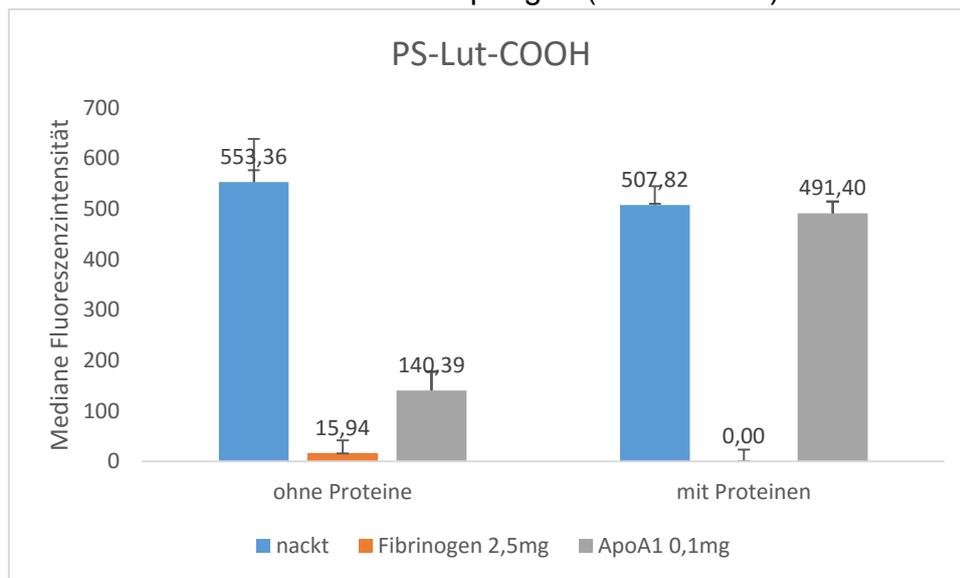


Abbildung 3.9: Die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH wurde nach Präinkubation mit Fibrinogen und ApoA1 im Medium mit oder ohne Proteinen mit dem nackten Partikel verglichen.

Aufnahme des Partikels in beiden Medien nach der Präinkubation mit Fibrinogen ins Auge. Hier muss beachtet werden, dass es bei der verwendeten Proteinmenge von 2,5mg Fibrinogen (vgl. 2.1.6) zur Aggregation des Partikels kommt und deshalb das Ergebnis nicht reproduzierbar ist. Betrachtet man die Präinkubation mit 0,1mg ApoA1 (vgl. 2.1.6) ist eine Verminderung der Zellaufnahme im Medium ohne Proteine zu erkennen. Doch dieser Effekt bleibt in Medium mit 10%igem humanem Plasma nicht bestehen.

Insgesamt wird die Zellaufnahme von PS-Lut-COOH zuverlässig nur durch die Präinkubation mit IgG-depleted Plasma vermindert, während bei den anderen Vorinkubationen, wie beispielsweise mit Fibrinogen oder ApoA1, kein stabiler Effekt beobachtet werden kann. Bei ApoA1 kann dennoch eine Verminderung der Zellaufnahme im Medium ohne Proteine beobachtet werden. Dies gilt jedoch nicht für die Zellaufnahme im Medium mit 10% humanem Plasma, was darauf schließen lässt, dass die durch die Präinkubation gebildete Corona in Gegenwart von anderen Proteinen nicht mehr stabil ist. Der gleiche Versuch wurde auch für PS-Lut-NH<sub>2</sub> durchgeführt.

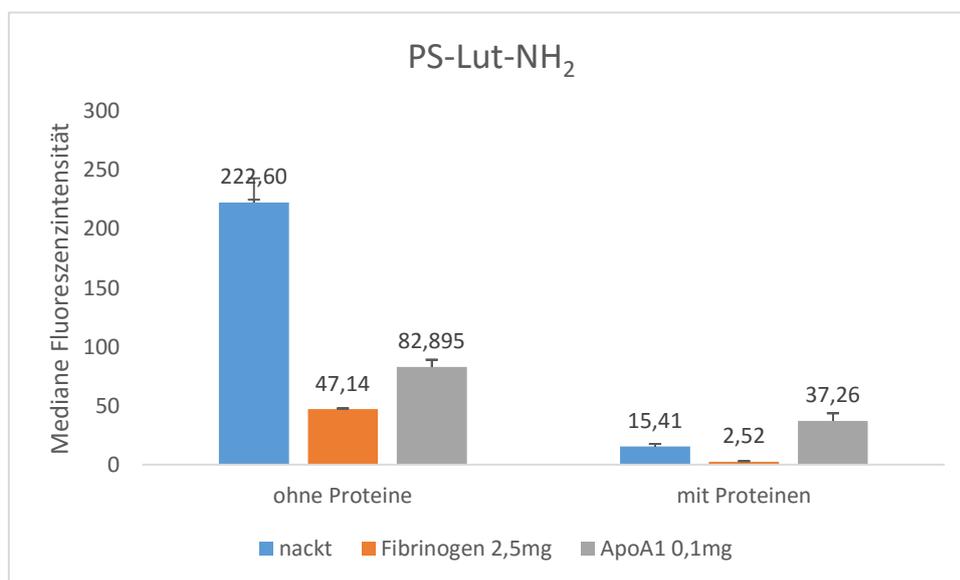


Abbildung 3.10: Die Zellaufnahme von PS-Lut-NH<sub>2</sub> wurde nach Präinkubation mit Fibrinogen und ApoA1 im Medium mit oder ohne Proteinen mit dem nackten Partikel verglichen.

Auch hier lässt sich eine Verringerung der Aufnahme des Partikels durch RAW-Zellen nach der Präinkubation mit 2,5mg Fibrinogen beobachten. Doch da PS-Lut-NH<sub>2</sub> ebenfalls bei dieser hohen Proteinmenge aggregiert, kann auch dieses Ergebnis nicht als reproduzierbar betrachtet werden. Im Medium ohne Proteine kann bei einer Präinkubation mit 0,1mg ApoA1 eine Verminderung der zellulären Aufnahme beobachtet werden. Die Aufnahme des Partikels im Medium mit Proteinen ist unabhängig von der Präinkubation vermindert.

Auch Apolipoprotein E (ApoE), welches für einige andere Nanopartikel bereits als Dysopsonin identifiziert wurde [23], wurde für die Präinkubation des Amino-Partikels genutzt und mit HSA, welches ebenso als Dysopsonin gilt, verglichen. Auch wurde ein weiteres Mal der Einfluss von Fibrinogen (0,1mg/ 0,05m<sup>2</sup>) auf die Zellaufnahme im Medium ohne Proteine überprüft.

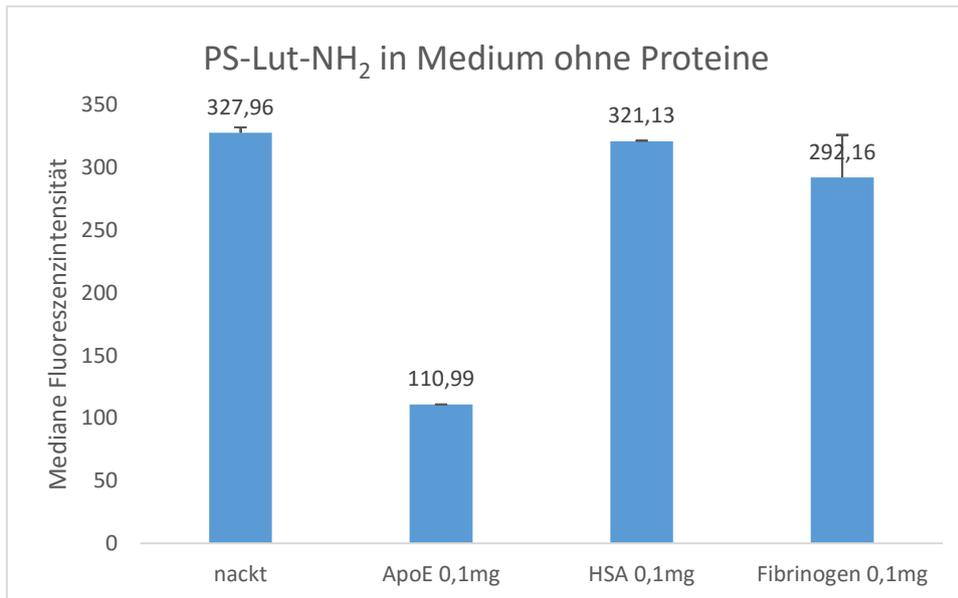


Abbildung 3.11: PS-Lut-NH<sub>2</sub> wurde mit ApoE, HSA und Fibrinogen vorinkubiert. Die zelluläre Aufnahme im Medium ohne Proteine untersucht.

ApoE vermindert, wie in Abbildung 3.11 ersichtlich, die zelluläre Aufnahme des Amino-Partikels. Dieser Effekt kann bei HSA nicht beobachtet werden, da die Zellaufnahme nur sehr gering im Vergleich mit dem nackten Partikel verringert wird. Ein so geringer Unterschied kann nicht auf die Präinkubation mit HSA zurückgeführt werden. Die Vorinkubation mit Fibrinogen wies kaum einen Effekt auf. Dies kann auf die geringen Proteinmengen, die zur Vorinkubation verwendet wurden zurückzuführen sein. Dennoch konnte durch die Präinkubation mit ApoE die zelluläre Aufnahme des Partikels reduziert werden.

## 4 Diskussion

Die oben aufgeführten Ergebnisse sollen im Folgenden näher betrachtet und erläutert werden. Es soll vor allem ein Augenmerk auf die verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen und die damit verbundenen Einflüsse auf die Protein Corona sowie auf die zelluläre Aufnahme in Maus-Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7, und die Möglichkeiten der Steuerung der Zellaufnahme durch Präinkubation, gelegt werden.

### 4.1 Einfluss der unterschiedlichen Oberflächenfunktionalisierung der Nanopartikel (mit PEG und Phosphatpolymeren)

Eine häufig angewandte Methode in der Nanomedizin, um die zelluläre Aufnahme eines Partikels zu verhindern, ist die PEGylierung [5]. Die Poly(ethylenglykol)-Ketten an der Oberfläche des Partikels sollen die nicht-spezifischen Interaktionen der Partikel mit Proteinen bzw. die Adsorption von Proteinen und damit die Aufnahme in Makrophagen verhindern. Es wurde jedoch bereits festgestellt, dass PEG nicht vollständig die Adsorption von Proteinen verhindert [2]. Eine mögliche Alternative zu PEG stellen Poly-phosphorester dar. Auch diese Polymere können als Oberflächenmodifikation genutzt werden. Polyphosphorester kommen überall in der Natur vor, beispielsweise in der DNA. Im Gegensatz zu PEG ist somit die Wahrscheinlichkeit des Abbaus zu toxischen Nebenprodukten deutlich geringer. Des Weiteren sind Polyphosphorester biologisch abbaubar [24]. In Abbildung 3.3 ist der Vergleich eines „nackten“, eines PEGylierten und zweier mit Phosphat-Polymeren funktionalisierter Partikel dargestellt. Die zelluläre Aufnahme in Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 wird erst im Medium mit 10% humanem Plasma vermindert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Adsorption von Proteinen an PEGylierte Partikel durchaus eine große Rolle beim „Tarnen“ der Partikel, dem sog. „stealth effect“ [25], spielen. Es scheint nicht nur die Reduktion opsonierender Proteine, sondern auch die Adsorption bestimmter „tarnender“ Proteine an den Partikel durch PEGylierung begünstigt zu werden [8]. Schöttler et. al. bezeichneten dieses Phänomen als „secondary stealth effect“, da erst nach Adsorption von Proteinen die dem PEG nachgesagte Wirkung deutlich eintritt. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen des Versuches 3.2.1 wieder. Auch für die Phosphat-Polymere konnte die Reduktion der

Zellaufnahme im Medium mit Proteinen beobachtet werden. Somit scheinen sie in ihrer Funktion einer PEGylierung ähnlich zu sein.

## **4.2 Steuerung der Zellaufnahme durch Oberflächenfunktionalisierung und gezielte Präinkubation**

Um Nanopartikel zu zuverlässigen „Drug Carriern“, die in der Nanomedizin wirksam genutzt werden können, die gezielt Medikamente an deren Bestimmungsort transportieren können, zu machen, ist das Verhalten der Partikel im physiologischen Umfeld genau zu untersuchen und zu verstehen. Die Eigenschaften der „biologische Identität“ des Partikels sind vor Allem durch die Adsorption von Proteinen an seine Oberfläche, bedingt [2]. Die Bildung und Zusammensetzung der Protein Corona wird unter anderem von der Beschaffenheit der Oberfläche des Nanopartikels beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, mehrere Oberflächenmodifikationen sowie gezielte Präinkubationen und deren Einfluss auf die Protein Corona zu vergleichen.

Wie schon die Untersuchung der Protein Corona verschieden funktionalisierter Partikel (Abb. 3.1) zeigt, ergibt sich für die unterschiedlichen Partikel ein jeweils eigenes Protein Muster. Am ähnlichsten sind sich die Banden des unfunktionalisierten Lutensol-Partikels und des Lutensol-Amino-Partikels in ihrem Bandenmuster. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Amino-Gruppe an der Oberfläche von PS-Lut-NH<sub>2</sub> dafür sorgt, dass ähnliche Proteine wie bei dem „nackten“ Partikel adsorbieren. Viel wahrscheinlicher ist allerdings, dass sich diese beiden Partikel in der Zusammensetzung ihrer Protein Corona so wenig unterscheiden, da auf PS-Lut-NH<sub>2</sub> verhältnismäßig wenige Amino-Ketten an der Oberfläche zu finden sind (siehe 2.2.1) und er somit fast „nackt“ ist. Auch zeigt Abb.3.1 bei PS-Lut und PS-Lut-NH<sub>2</sub> eine ausgeprägte Bande bei 38kDa, die auf eine Untereinheit des Proteins Clusterin, bzw. Apolipoprotein J, zurückzuführen ist [15]. Erheblichere Unterschiede kann man bei dem Lutensol-Carboxy-Partikel beobachten. Die negative Ladung der Carboxyl-Gruppe an der Oberfläche dieses Partikels sorgt für die Adsorption anderer Proteine. Beim Vergleich der Abbildungen 3.1 und 3.2 ist zu erkennen, dass es sich bei den Banden in Höhe von 49kDa und 25kDa auf Abbildung 3.1 um zwei Ketten von IgG handeln muss, da diese in den Bahnen, wo IgG-depleted Plasma aufgetragen wurden fehlen. Obwohl PS-NH<sub>2</sub> ebenfalls ein Amino-Partikel ist, unterscheidet er sich deutlich von PS-Lut-NH<sub>2</sub>. Albumin (66kDa) [18] scheint bei diesem Partikel einen großen Anteil

an Protein in der Corona darzustellen, während dies bei keinem anderen Partikel der Fall zu sein scheint. Dies ist bemerkenswert, da Albumin ein häufig im Plasma vorkommendes Protein ist [21]. Auch scheint IgG, bzw. die schwere Kette von IgG (49kDa) stärker an PS-NH<sub>2</sub> zu adsorbieren als bei PS-Lut-NH<sub>2</sub>. Diese Unterschiede können auf die unterschiedlichen Surfactans zurückzuführen sein. Da dies jedoch nicht direkt eine Modifikation der Oberfläche darstellt, kann es auch durch das unterschiedliche Zeta- Potential (siehe 2.2.1) bedingt sein. Dennoch können sich Unterschiede bei der zellulären Aufnahme dieser Partikel insgesamt auf die Unterschiede in der Zusammensetzung der Protein Corona beziehen lassen. Die größten Unterschiede in der Zusammensetzung der Protein Corona weisen der positiv geladenen Lutensol-Amino-Partikel und der negativ geladenen Carboxy-Partikel auf. Somit wird deutlich, dass die Ladung der funktionellen Gruppen der Partikel in der Adsorption unterschiedlicher Proteine resultiert.

Die Steuerung der Zellaufnahme auf biologischer Ebene, wurde durch gezielte Präinkubation der Partikel untersucht. Zunächst wurden für die Präinkubation mit einem komplexen Proteingemisch, in diesem Fall IgG-depleted Plasma, drei verschiedene Partikel, ein Carboxy- und zwei Amino-Partikel mit unterschiedlichen Surfactants verwendet. Die Ergebnisse für die Zusammensetzung der Protein Corona für den Carboxy-Partikel sind in Abb.3.2 dargestellt. Vergleicht man das Bandenmuster des mit IgG-depleted Plasma voinkubierten Partikels mit dem des mit Fibrinogen vorinkubierten, wird schnell ersichtlich, dass Fibrinogen ein Bestandteil der Protein Corona des mit IgG-depleted Plasma präinkubierten Partikels zu sein scheint. Inwiefern sich diese Zusammensetzung der Protein Corona auf die zelluläre Aufnahme in Makrophagen auswirkt wurde durch Präinkubation mit IgG-depleted Plasma (vgl. 3.2.3.1) und Fibrinogen (vgl. 3.2.3.2) untersucht.

Die reduzierte Aufnahme von PS-Lut-NH<sub>2</sub> im Medium mit Proteinen kann auf den hohen Anteil von Clusterin in der Protein Corona (vgl. 3.3.1) des Partikels zurückzuführen sein. Dieses Protein gilt als Dysopsonin [7] und kommt in der Corona der anderen beiden Partikel in wesentlich geringerem Anteil vor. Die erhöhte Aufnahme von PS-Lut-COOH und PS-NH<sub>2</sub> im Medium mit Proteinen im Vergleich mit dem Medium ohne Proteine könnte auf die Adsorption von Opsoninen, die ebenfalls an den Partikel adsorbieren (vgl. Abb. 3.1), zurückzuführen sein.

Die in Abb.3.5 dargestellten Ergebnisse der Untersuchung der Zellaufnahme zeigen, dass die Vorinkubation des Carboxy-Partikels mit IgG-depleted Plasma die zelluläre Aufnahme sowohl in Medium ohne Proteine, als auch in Medium mit 10% humanem Plasma, im Vergleich mit dem nicht vorinkubierten Partikel verringert. Dies lässt mehrere Schlüsse zu. Zum ersten scheint IgG-depleted Plasma die zelluläre Aufnahme zu reduzieren, zum zweiten ist die gebildete Protein Corona nach der Präinkubation stabil, da die zelluläre Aufnahme auch im Medium mit Proteinen gering bleibt. Auch die Ergebnisse der doppelten Inkubation (Abb.3.2) ,durchgeführt von Johanna Simon (AK Landfester), mit IgG-depleted Plasma und Plasma sprechen für eine stabile Zusammensetzung der Protein Corona, da sich das Bandenmuster der Protein Corona nach der Präinkubation mit IgG-depleted Plasma und nach der doppelten Inkubation mit IgG-depleted Plasma und Plasma nicht sehr stark unterscheidet. Auch hier scheint wieder Fibrinogen ein Bestandteil der Protein Corona zu sein. Zum Vergleich wurde PS-Lut-COOH noch mit reinem Fibrinogen vorinkubiert (vgl.Abb.3.8). Hier wird schnell ersichtlich, dass die Präinkubation mit dem reinen Protein nicht den gleichen Effekt zeigt wie die Vorinkubation mit IgG-depleted Plasma, da die Zellaufnahme zwar im Medium ohne Proteine verringert werden kann, aber kein Effekt im Medium mit Proteinen erkennbar ist. Die Unterschiede in der zellulären Aufnahme können auch auf eine unterschiedliche räumliche Orientierung des Fibrinogens in den verschiedenen Versuchen (vgl. 3.1.2 und 3.2.3) zurückzuführen sein.

Auch für die beiden unterschiedlichen Amino-Partikel wurde ein Versuch zur zellulären Aufnahme nach Präinkubation mit IgG-depleted Plasma durchgeführt. Für den Lutensol-Amino-Partikel sind die Ergebnisse in Abb. 3.6 dargestellt. Zwar scheint auch hier die Vorinkubation, zumindest im Medium ohne Proteine, die Zellaufnahme in Makrophagen zu vermindern, doch da der Partikel im Medium mit Proteinen grundsätzlich wenig aufgenommen wird, kann keine Aussage über den Effekt der Präinkubation im Medium mit 10% humanem Plasma getroffen werden. Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der Zellaufnahme nach Präinkubation mit IgG-depleted Plasma für den CTMA-Cl-Amino-Partikel. Verglichen mit den anderen beiden Partikeln scheint die Präinkubation mit IgG-depleted Plasma bei diesem Partikel nahezu keinen Effekt zu haben. Auch im Medium mit Proteinen ist kein Effekt erkennbar. Insgesamt haben die Versuche zur Präinkubation mit IgG-depleted Plasma nur für den Carboxy-Partikel eine stabile, die zelluläre Aufnahme verringernde Wirkung gezeigt. Für diesen Partikel

kann man davon ausgehen, dass die Protein Corona nach der Präinkubation mit IgG-depleted Plasma für den sog. „stealth effect“ [19] und damit die „Tarnung“ des Partikels vor den Makrophagen, in beiden verwendeten Medien sorgt. Dies kann man für die Amino-Partikel nicht beobachten.

Da Fibrinogen als Bestandteil der Protein Corona von PS-Lut-COOH identifiziert wurde (siehe 3.1.1) wurde es ebenfalls zur Präinkubation für PS-Lut-NH<sub>2</sub> verwendet. Für den Carboxy-Partikel sind die Ergebnisse in Abbildung 3.8 dargestellt. Im Medium ohne Proteine lässt sich ein leichter Trend in Richtung Verringerung der Zellaufnahme beobachten. Im Medium mit Proteinen ist kein Trend erkennbar, einzig ab 5mg Fibrinogen (vgl. 2.1.6) scheint die zelluläre Aufnahme verringert. Dies zeigt zum einen, dass eine Vorinkubation mit Fibrinogen nicht in einer stabilen Protein Corona resultiert und dass Fibrinogen ein Dysopsonin darstellen könnte. Da jedoch auch hier eine hohe Proteinmenge verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass diese Beobachtungen in der Aggregation des Partikels begründet liegen. Das Gleiche konnte auch für PS-Lut-NH<sub>2</sub> in Abb.3.10 beobachtet werden. Auch hier scheint die Präinkubation mit Fibrinogen in beiden Medien zu einer verminderten zellulären Aufnahme zu führen. Es lassen sich für geringe Proteinmengen keine Effekte beobachten, erhöht man jedoch die eingesetzte Menge Protein, kommt es zur Aggregation des Partikels. Somit kann man nur vage Vermutungen äußern, inwiefern die Präinkubation mit Fibrinogen einen Effekt erzielen kann.

Da Apolipoproteine als Dysopsonine bezeichnet werden [23] wurden diese auch hier für PS-Lut-COOH und PS-Lut-NH<sub>2</sub> zur Präinkubation gewählt. Die Ergebnisse (vgl. 3.2.3.3) lassen darauf schließen, dass es nicht zur Bildung einer stabilen Protein Corona kommt, wenn der Partikel allein mit ApoA1 vorinkubiert wird (vgl. Abb.3.9) . Auch bei der Präinkubation von PS-Lut-NH<sub>2</sub> (vgl. Abb. 3.10) mit ApoA1 kommt es zur Adsorption anderer Plasmaproteine, möglicherweise auch einiger Oponine, an den Partikel und damit zur Destabilisierung der Corona. Auch ist es möglich, dass ApoA1 als einzelnes Protein nicht die gleiche Wirkung zeigt wie es beispielsweise in einem Proteingemisch der Fall sein könnte. Dies würde bedeuten, dass nicht nur ein einzelnes Protein in der Protein Corona einen Einfluss auf das Verhalten des Partikels im physiologischen Umfeld hat, sondern dass auch Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Protein Corona von Bedeutung für die Stabilität der Corona und die zelluläre Aufnahme des Partikels sein könnten. Neben der Präinkubation mit ApoA1

wurde PS-Lut-NH<sub>2</sub> noch mit ApoE und HSA vorinkubiert. Die Ergebnisse der zellulären Aufnahme im Medium ohne Proteinen sind in Abb.3.11 dargestellt. Hier kann für ApoE eine verminderte Aufnahme beobachtet werden, was darauf hinweist, dass ApoE für PS-Lut-NH<sub>2</sub> ein Dysopsonin sein könnte. Ob die Corona nach der Präinkubation stabil ist, bzw. ob der Effekt der Verringerung der Zellaufnahme auch in Medium mit Proteinen bestehen bleibt, konnte hier allerdings nicht untersucht werden. Für die Präinkubation mit HSA konnte kein Effekt beobachtet werden. Somit scheint auch hier nicht zur Dysopsonierung gekommen zu sein.

Insgesamt gesehen zeigen diese Ergebnisse, dass die Möglichkeit besteht, Nanopartikel gezielt vorzuinkubieren und damit beispielsweise die Zellaufnahme zu steuern. Am effektivsten stellte sich die Präinkubation mit IgG-depleted Plasma für den Carboxy-Partikel dar. Diese resultierte nicht nur in einer Verminderung der Zellaufnahme, sondern auch in einer stabilen Zusammensetzung der Protein Corona. Auch die Vorinkubation mit einzelnen Proteinen scheint eine vielversprechende Möglichkeit zu sein, den sog. „stealth effect“ zu erzielen. Dennoch muss an dieser Stelle weiter untersucht werden, ob die Möglichkeit besteht, eine Protein Corona aus einzelnen Proteinen zu stabilisieren. Ebenso muss in Betracht gezogen werden, dass die Präinkubation mit einzelnen Proteinen nicht so effektiv ist wie die Präinkubation mit einem komplexen Proteingemisch, da auch Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sein können.

Diese Ergebnisse zeigen, dass genaue Kenntnis über die Bildung, Zusammensetzung und Stabilität der Protein Corona von großer Bedeutung für die Nanomedizin sind. Die Untersuchung der räumlichen Orientierung der adsorbierten Proteine mittels FT-IR-Spektroskopie und die genaue Analyse der Zusammensetzung der Protein Corona mittels LC-MS bieten ein weites Feld für zukünftige Studien, ebenso wie gezielte Steuerung des Partikelverhaltens im physiologischen Umfeld durch Präinkubation mit bestimmten Proteinen oder Proteingemischen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Unterschiede verschiedener Oberflächenmodifikationen und deren Auswirkung zu untersuchen und vergleichen. Des Weiteren wurde versucht, die zelluläre Aufnahme verschiedener Nanopartikel durch Präinkubation mit Proteinen beziehungsweise Proteingemischen gezielt zu beeinflussen.

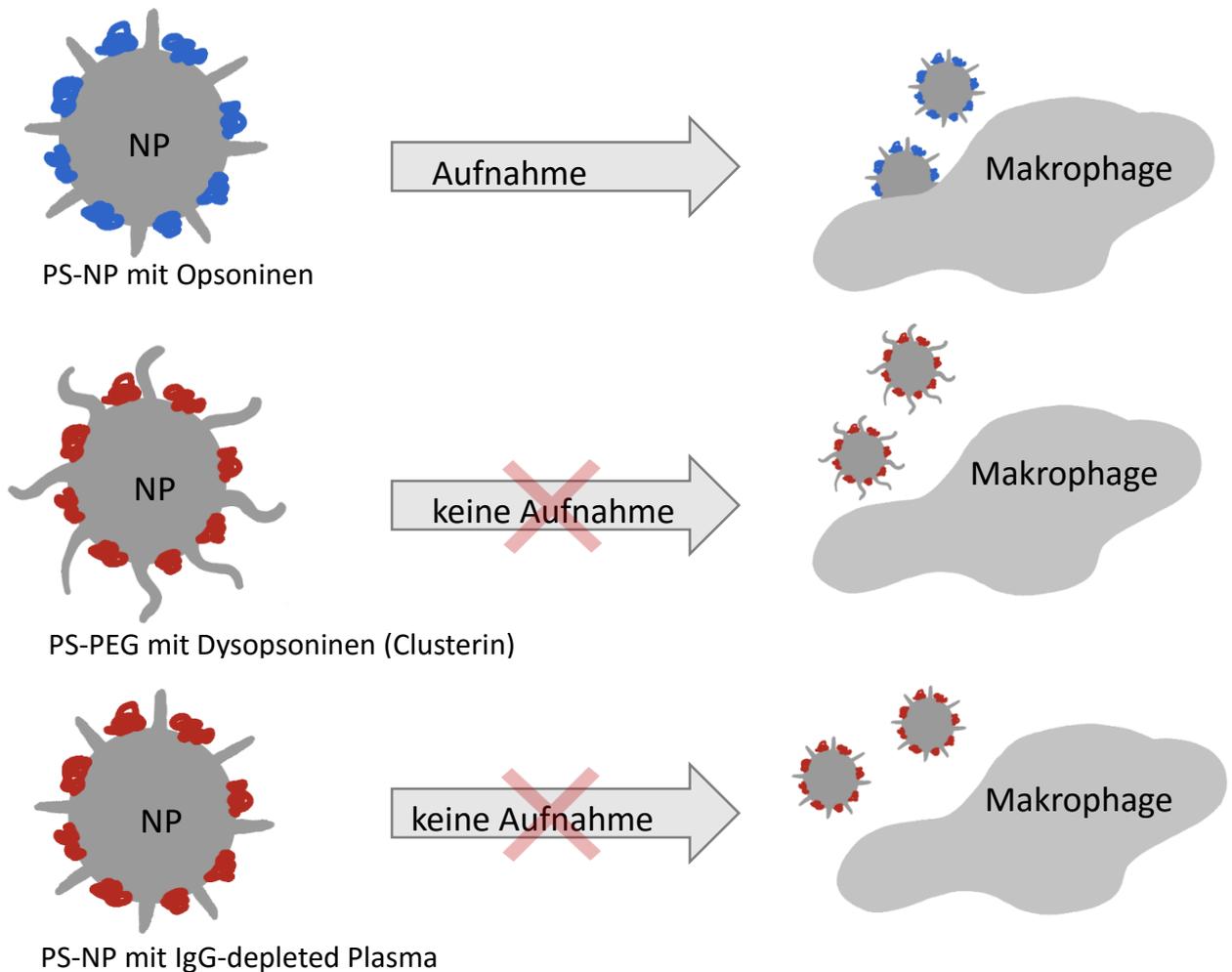


Abbildung 5.1: Übersicht der unterschiedlichen Zellaufnahmen.

Zunächst wurde die Zusammensetzung der Protein Corona von Partikeln mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen mittels SDS-PAGE untersucht. Damit konnte gezeigt werden, dass die Bandenmuster der adsorbierten Proteine für die einzelnen Partikel zwar einige Ähnlichkeiten aufwiesen, insgesamt im Hinblick auf die dominanten Proteinbanden aber doch deutlich erkennbare Unterschiede zu beobachten waren. Dies lässt den Schluss zu, dass die einzelnen Oberflächenfunktionalisierungen in der Bildung einer unterschiedlichen Protein Corona resultieren. Für den Carboxy-Partikel wurde die gleiche Analyse auch nach Präinkubation mit IgG-depleted Plasma und Fibrinogen durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Interessanterweise waren sich die Bandenmuster der beiden Vorinkubationen so ähnlich, dass geschlussfolgert werden konnte, dass Fibrinogen ein Bestandteil der Protein Corona des mit IgG-depleted Plasma vorinkubierten Partikels zu sein scheint. Dennoch konnte in späteren Versuchen der zellulären Aufnahme durch die Präinkubation mit Fibrinogen nicht der gleiche Effekt wie durch die Präinkubation mit IgG-depleted Plasma erzielt werden.

Die Untersuchung der zellulären Aufnahme gliederte sich insgesamt in zwei Teile. Es wurde gezeigt, dass PEGylierung und die Oberflächenfunktionalisierung mit Phosphat-Polymeren, nur im Beisein von Plasmaproteinen zur Verringerung der Zellaufnahme führt. Somit scheint PEGylierung nicht durch das generelle Vermeiden von Oponinadsorption an den Partikel zu einem effektiven Mittel zur Reduktion der Zellaufnahme, sondern auch durch das Binden bestimmter Proteine an die Oberfläche des Partikels, geworden zu sein. Dies deckt sich mit neuen Ergebnissen von Schöttler S. et al., die diese Beobachtung 2016 als „secondary stealth effect“ beschrieben haben.

Zudem wurde mit, wie oben bereits erwähnt, verschiedener Präinkubation versucht, die Zellaufnahme verschiedener Partikel in Makrophagen zu reduzieren. Hierbei erwies sich die Vorinkubation mit einem Proteingemisch, in diesem Fall IgG-depleted Plasma als wesentlich effektiver als die Präinkubation mit einzelnen Proteinen. Die nach der Präinkubation mit IgG-depleted Plasma konnte als zumindest für den Carboxy-Partikel, evtl. auch dem Amino-Partikel, als stabil nachgewiesen werden. Obwohl die Untersuchung der Protein Corona des mit IgG-depleted Plasma vorinkubierten Carboxy-Partikels auf die Anwesenheit von Fibrinogen in der Corona hinweist, konnte nach der Präinkubation mit reinem Fibrinogen nicht der gleiche Effekt

erzielt werden. Dies mag durch eine Änderung der räumlichen Struktur des Proteins bedingt sein. Die Apolipoproteine A1 und E konnten als Dysopsonine bestätigt werden, auch wenn die hier gebildete Protein Corona nicht stabil zu sein scheint.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln, sei es mit Amino-, Carboxy- oder auch PEG-Ketten, großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Protein Corona und damit auch auf das Verhalten der Partikel im physiologischen Umfeld, wie beispielweise die zelluläre Aufnahme in Makrophagen, hat. Vor Allem die Erkenntnisse in der Verwendung von PEG oder Polyphosphoestern und die Entdeckung des „secondary stealth effect“ sind im Hinblick auf zukünftige Studien von essentieller Bedeutung. Ebenso lässt sich die zelluläre Aufnahme durch gezielte Präinkubation beeinflussen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Rahman M. et al., *Protein-Nanoparticle Interactions*, Springer Series in Biophysics 15, DOI 10.1007/978-3-642-37555-2\_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015
- [2] Walkey C., Chan W. *Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment*, Chem. Soc. Rev., 2012, 41, 2780-2799
- [3] Ritz S. et al., *Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake*, Biomacromolecules, 2015, 16, 1311-1321
- [4] Fadeel B. et al., *Bridge over troubled waters: understanding the synthetic and biological identities of engineered nanomaterials*, WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2013, 5:111-129. Doi:10.1002/wnan.1206
- [5] Kettler K. et al., *Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions and cell type*, Environmental Toxicology and Chemistry, 2014, Vol.33, No.3, pp. 481-492
- [6] Owens D.E.III, Peppas N.A., *Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*, International Journal of Pharmaceutics, 2006, 307, 93-102
- [7] Simon J., *Influencing Cellular Uptake by Tailoring the Protein Corona*, Diplomarbeit, 2015
- [8] Meng F. et al., *PEGylated polystyrene particles as a model system for artificial cells*, Wiley InterScience, 2004, DOI:10.1002/jbm.a.30068
- [9] Schöttler S. et al., *A new definition of the stealth effect: The necessity of protein adsorption for stealth effect of nanocarriers*, Nature Nanotechnology, 2016
- [10] Mirshafiee V. et al., *Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake*, Biomaterials, 2016, 75, 295-304
- [11] Aggarwal P. et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61, 428-437

- [12] Hulett H.R. et al., *Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence*, Science, 1969,166 (3906)
- [13] Nicoletti I et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*, Journal of Immunological Methods, 1991, 139, 271-279
- [14] Crespy D., Landfester K., *Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers*, Beilstein J Org Chem. 2010, 6, 1132–1148.
- [15] Jones S. E., Jomary C., *Molecules in focus Clusterin*, The international Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2002, 34, 427-431
- [16] Herr M., *Humorale Immunglobulin G und –M- Bestimmungen mittels kompetitivem ELISA im letzten Trimester der Gravidität sowie im peripartalen Zeitraum bei Milchrindern unter besonderer Berücksichtigung intra- und postpartaler Komplikationen*, urn:nbn:de:hebis:26-opus 701 38
- [17] Nowak P. et al., *Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences*, Thrombosis research, 2007, 121, 163-174
- [18] Coon J.J. et al., *Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry*, PNAS, 2005, 102, 9463-9468
- [19] Kang B. et al. *Carbohydrate-Based Nanocarriers Exhibiting Specific Cell Targeting with Minimum Influence from the Protein Corona*, Angew.Chem. Int. Ed., 2015, 54, 7436-7440
- [20] Veronese F. M., Pasut G., *PEGylation, successful approach to drug delivery*, Drug Discovery Today, 2005, 10, 1359-6446
- [21] Dati F. et al., *Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470)*, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1996, 34, 517-520

[22] Gossmann R. et al., *Comparative examination of adsorption of serum proteins HAS- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015, 93, 80-87

[23] Schmidt S., Müller R.H., *Plasma protein adsorption patterns on surfaces of Amphotericin B-containing fat emulsions*, International Journal of Pharmaceutics 254 ,2003, 3–5

[24] Wolf T., *Poly(alkylene alkylphosphonate)s: Degradable polymers for potential biomedical applications*, Diplomarbeit, 2015

[25] Milton Harris J., Chess R. B., *Effect of PEGylation on pharmaceuticals*, Nature Reviews, 2003, 2, 214-221

## 7 Danksagung

Zuerst möchte ich Univ.-Prof Dr. Volker Mailänder für die Möglichkeit, diese Arbeit am Max Planck Institut für Polymerforschung zu verfassen herzlich danken. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Harald Paulsen (Institut für allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) für die interne Betreuung dieser Arbeit seitens des Fachbereichs Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und die Bereitschaft jederzeit alle Fragen zu beantworten möchte ich meiner Betreuerin Johanna Simon danken.

Auch Katja Klein und Thomas Wolf danke ich für die Synthese der Partikel, die ich im Rahmen dieser Arbeit verwendet habe.

Zuletzt möchte ich der gesamten AG Mailänder für das wunderbare Arbeitsklima und die Unterstützung während meiner Zeit im Labor herzlich danken.

## **Versicherung gemäß Paragraph 15, Absatz 8 der Prüfungsordnung Bachelor of Science Biologie**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in der Arbeit verwendet habe. Weiterhin bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit, oder Teile davon, nicht als Arbeit in einer anderen Fakultät oder für eine andere Prüfung benutzt habe.

Mainz, den 30.03.2016