

Untersuchung der Proteinkorona mittels asymmetrischer Fluss- Feld-Fluss-Fraktionierung

Diplomarbeit

Zur Erlangung des Grades der Diplomchemikerin im
Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
durchgeführt am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz

Eingereicht im: Oktober 2015

von: Claudia Weber

geboren am 8. April 1988

in Frankfurt am Main

Matrikelnummer: 2666950

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde am Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Katharina Landfester unter wissenschaftlicher Anleitung von Frau Dr. Kristin Mohr im Zeitraum von März bis Oktober 2015 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, sind als solche eindeutig kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Mainz, 29.10.2015

Claudia Weber

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1. Abstract	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Proteinkorona.....	3
2.2 Lichtstreuung.....	7
2.3 Auswertung der DLS	11
2.4 Asymmetrische Fluss-Feld Fluss Fraktionierung.....	14
2.5 Liposomen	19
2.6 SDS-PAGE.....	20
2.7 Proteinmengenbestimmung.....	21
2.8 Ziel der Arbeit	22
3. Ergebnisse und Diskussion	23
3.1 Methodenentwicklung	23
3.1.1 Optimierung der Trennparameter.....	23
3.1.2 Spülen der Membran mit Natriumhydroxid-Lösung	28
3.1.3 Proteinwiederfindungsrate	29
3.1.4 Membran mit PAH beschichten	30
3.2 Analytik von Protein-Partikel-Interaktionen	32
3.2.1 Effekt der Verdünnung auf die Aggregatbildung.....	32
3.3 Trennung der freien Proteine von Partikel mit Proteinkorona mit A4F.....	34
3.3.1 Polystyrol-Standardpartikel mit HSA.....	34
3.3.2 Polystyrol-Standardpartikel mit Plasma	41
3.3.3 SDS-PAGE von Plasma verglichen mit Fraktionen von PS 125 nm + Plasma	45
3.3.4 Vergleich A4F und Zentrifugation.....	47
3.3.5 Aminopartikel mit HSA	50
3.3.6 Aminopartikel mit Plasma	52
3.3.7 Vergleich der Proteinkorona des Aminopartikels nach A4F und nach Zentrifugation.....	58
3.4 Liposome	61

4	Zusammenfassung und Ausblick.....	63
5	Experimenteller Teil.....	65
5.1	Proteinkorona herstellen.....	65
5.2	Aufreinigung der Proteinkorona mittels Zentrifugation.....	65
5.3	Beschichtung der Membran.....	65
5.4	Nanopartikel-Synthese.....	66
5.5	Methoden.....	66
5.5.1	Lichtstreuung.....	66
5.5.2	SDS-PAGE.....	66
5.5.3	Proteinquantifizierung.....	67
5.5.4	Zeta-Potential.....	68
5.5.5	Asymmetrische Fluss - Feld Fluss Fraktionierung.....	68
5.6	Materialien.....	68
5.6.1	Blutplasma.....	68
	Literaturverzeichnis.....	xi
	Anhang.....	xiv
	Danksagung.....	xxi

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Identität und Schicksal eines Nanopartikels ^[1]	4
Abb. 2: Nanopartikel (dunkelblau) mit innerer harter Korona (hellblau) und äußerer weicher Korona (orange).....	6
Abb. 3: Intensitätsfluktuation (links) und daraus berechnet die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion (rechts). ^[27]	9
Abb. 4: Autokorrelationsfunktion einer Mischung bei 60°	13
Abb. 5: Aufbau des verwendeten A4F-Trennkanaals.....	15
Abb. 6: Vergleich Elutionsmodus (links) und Fokus/Relaxation (rechts). ^[36]	16
Abb. 7: Übersicht über den Trennmechanismus in der A4F. ^[38]	16
Abb. 8: Verschiedene Modi der A4F. ^[6]	17
Abb. 9: Liposom umgeben von einer Proteinkorona ^[45]	19
Abb. 10: Aufbau (links) und Trennprinzip (rechts) der SDS-PAGE ^[46]	20
Abb. 11: Elugramm mit konstantem Fluss, ohne Querfluss.....	24
Abb. 12: Elugramm mit konstantem Fluss und hohem Querfluss.....	24
Abb. 13: Elugramm mit linear stark abfallendem Fluss (früh kein Querfluss mehr).....	25
Abb. 14: Elugramm mit linear schwach abfallendem Fluss (langer Querfluss).....	25
Abb. 15: Elugramm exponentiell abfallender Fluss.....	26
Abb. 16: Retentionsverhalten der Aminopartikel.	27
Abb. 17: Retentionsverhalten des unfunktionalisierten Polystyrolpartikels (PS-Lut).....	28
Abb. 18: Elugramm von konzentriertem Plasma bei wiederholter Injektion.....	30
Abb. 19: Retentionsverhalten des mit Plasma inkubierten PS 40 nm Partikels auf der mit PAH beschichteten Membran.	31
Abb. 20: Retentionsverhalten des Aminopartikels auf der mit PAH beschichteten Membran	32
Abb. 21: Autokorrelationsfunktionen der Polystyrol-Standardpartikel, inkubiert mit HSA und ohne weitere Aufreinigungsschritte.....	35
Abb. 22: Elugramm von PS 20 nm + HSA.....	36
Abb. 23: Elugramm von PS nm + HSA.....	37
Abb. 24: Elugramm von PS 80 nm + HSA.....	37
Abb. 25: Elugramm von PS 125 nm + HSA.....	38
Abb. 26: Autokorrelationsfunktionen der mittels A4F erhaltenen Fraktionen von den mit HSA inkubierten Polystyrol-Standardpartikeln	39

Abb. 27: Intensitätsprozentage der mit HSA inkubierten Polystyrol-Standardpartikel vor und nach Aufreinigung mittels A4F.	40
Abb. 28: Autokorrelationsfunktionen der mit Plasma inkubierten Polystyrol-Standardpartikel vor weiteren Aufreinigungsschritten	42
Abb. 29: Elugramm von PS 20 nm + Plasma.	43
Abb. 30: Elugramm von PS 40 nm + Plasma.	43
Abb. 31: Elugramm von PS 80 nm + Plasma.	44
Abb. 32: Elugramm von PS 125 nm + Plasma.	44
Abb. 33: Elugramm von konzentriertem Plasma.	45
Abb. 34: SDS-PAGE von fraktioniertem Plasma und den Fraktionen von PS 125 nm + Plasma im Vergleich.	46
Abb. 35: SDS-PAGE der zentrifugierten Polystyrol-Standardpartikel 80 nm und 125 nm jeweils zuvor mit Plasma inkubiert.	49
Abb. 36: Elugramm der Aminopartikel, mit HSA inkubiert.	50
Abb. 37: Autokorrelationsfunktion der mit HSA inkubierten Aminopartikel vor Aufreinigung mittels A4F.	51
Abb. 38: Autokorrelationsfunktion der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.....	53
Abb. 39: Elugramm der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.....	53
Abb. 40: Autokorrelationsfunktionen der mittels A4F erhaltenen Fraktionen der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.....	56
Abb. 41: Intensitätsprozentage der verschiedenen Komponenten des mit Plasma inkubierten Aminopartikels vor und nach A4F.....	57
Abb. 42: Relaxationszeit der mit Plasma inkubierten Aminopartikel vor und nach A4F.....	58
Abb. 43: SDS-PAGE der mit Plasma inkubierten und anschließend zentrifugierten Aminopartikel im Vergleich mit den Fraktionen der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.	59
Abb. 44: SDS-PAGE der eingegangenen Fraktionen aus der A4F der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.	60
Abb. 45: Elugramm der Liposomen.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über gängige Charakterisierungsmethoden der Proteinkorona.	7
Tabelle 2: Signalfläche und Proteinmenge des injizierten Plasmas nach A4F.....	29
Tabelle 3: Übersicht Verdünnungsreihe PS-Lut + Plasma.	33
Tabelle 4: Radien der PS-Standard-Partikel ohne und mit HSA.	36
Tabelle 5: Radien der PS-Standard-Partikel ohne und mit Plasma.	41
Tabelle 6: Vergleich der Radien der Aggregate nach A4F und Zentrifugation.	48
Tabelle 7: Eigenschaften des Aminopartikels mit HSA.....	51
Tabelle 8: Größe des Aggregats von PS-NH ₂ + HSA der Fraktionen nach A4F.	52
Tabelle 9: Eigenschaften der Aggregate von PS-NH ₂ + Plasma vor A4F und nach Fraktionierung. 54	
Tabelle 10: Pipettierschema für die SDS-PAGE.	67
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.	xiv
Tabelle 12: Verwendete Instrumente und Verbrauchsmaterialien.	xv
Tabelle 13: Verwendete Software.....	xvi
Tabelle 14: Parameter der A4F für Methode "konstanter Fluss - kein Querfluss"	xvii
Tabelle 15: Parameter der A4F für Methode "konstanter Fluss - mit hohem Querfluss"	xvii
Tabelle 16: Parameter der A4F für Methode "linear abfallender Fluss - kurzer Querfluss"	xviii
Tabelle 17: Parameter für A4F Methode "linear abfallender Fluss - langer Querfluss"	xviii
Tabelle 18: Parameter der A4F für Methode "exponentiell abfallender Fluss"	xix

Abkürzungsverzeichnis

$F_s(\vec{q}, \tau)$	Dynamischer Streufaktor
$G_s(\vec{r}, \tau)$	Korrelationsfunktion der Streuintensitätsfluktuation
\vec{q}	Streuvektor
\vec{r}	Position des streuenden Teilchens
2D-PAGE	2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
A4F	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung
$a_{i,j}$	Amplituden der jeweiligen Streubeiträge
b_0	Kanalbreite des A4F-Trennkanaals am Einlass
BCA	Bicinchoinsäure
b_L	Kanalbreite des A4F-Trennkanaals am Auslass
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-((Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonsäure
$D_{app}(q)$	Apparenter Diffusionskoeffizient
d_h	Hydrodynamischer Durchmesser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
D_s	Diffusionskoeffizient
DTT	Dithiothreitol
f	Reibungskoeffizient
F_{cross}	Querfluss
f_j	Fit-Parameter
F_{out}	Detektorfluss
$g_i(t)$	Intensitätsautokorrelationsfunktion
HSA	Humanes Serumalbumin
$I(q,t)$	Streuintensität
IgG	Immunglobulin G
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
k	Boltzmann-konstante
L	Kanallänge
l	Schwerpunkt des Abstands der Partikel zur Akkumulationswand
M_i	Partikelmasse
MS	Massenspektrometrie
NaOH	Natriumhydroxid
n_D	Brechungsindex
n_i	Teilchendichte
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)
NP	Nanopartikel
$P(R_h)$	Größenverteilung
$P_i(q)$	Formfaktor
PS 125 nm	Unfunktionalisierter Standard-Polystyrolpartikel, Durchmesser 125 nm
PS 20 nm	Unfunktionalisierter Standard-Polystyrolpartikel, Durchmesser 20 nm
PS 40 nm	Unfunktionalisierter Standard-Polystyrolpartikel, Durchmesser 40 nm
PS 80 nm	Unfunktionalisierter Standard-Polystyrolpartikel, Durchmesser 80 nm
PS-Lut	Unfunktionalisierter Polystyrolpartikel, mit Lutensol stabilisiert
PS-NH ₂	Mit Aminogruppen funktionalisierter Polystyrolpartikel, auch „Aminopartikel“
q	Streuvektor
QCM	Quarzkristallmikrowaage
$\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle$	Mittlere quadratische Verschiebung

Abkürzungsverzeichnis

R_g	Trägheitsradius
R_h	Hydrodynamischer Radius
RL	Retentionslevel
rpm	Umdrehungen pro Minute
$SDS-PAGE$	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie)
T	Absolute Temperatur
t	Zeit
t^0	Totzeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
t_r	Retentionszeit
u_0	Geschwindigkeit des Querflusses an der Membranoberfläche
V^0	Totvolumen
w	Kanalhöhe
w_b	Peakbreite der Basis bei A4F-Eluogramm
y	Fläche des Spacers an den ausgesparten Bereichen am Kanaleinlass
z'	Kanalbreite des A4F-Trennkanaals am Injektionspunkt
Γ	Zerfallsrate
Δ	delta
η	Viskosität des Lösungsmittels
κ_1	1. Virialkoeffizient
κ_2	2. Virialkoeffizient
κ_3	3. Virialkoeffizient
λ	Wellenlänge
λ^*	Retentionsparameter
σ_D	Diffusionskoeffizientenverteilungsfunktion
σ_R	Größendispersität
τ	Korrelationszeit
τ_i	Relaxationszeit

1. Abstract

Als vielversprechende neue Wirkstofftransporter gelten Nanopartikel. Diese können einen Wirkstoff gerichtet zum Zielort transportieren, ohne systemisch zu wirken und ohne, dass ein Großteil des Wirkstoffs durch die Metabolisierung im Körper verloren geht.

Gelangt ein Nanopartikel aber in den Körper, so wird er dort umgehend von Proteinen bedeckt. Damit erhält der Partikel eine neue Oberfläche und diese entscheidet über das weitere Schicksal des Nanomaterials im Körper. Um das Verhalten des Nanopartikels im Organismus zu verstehen und voraussagen zu können, ist die Untersuchung dieser Proteinkorona unerlässlich.

Die Untersuchung der Proteinkorona gestaltet sich allerdings schwierig, da nur wenige Methoden zur Abtrennung der freien Proteine von den Proteinen, die die Proteinkorona bilden, existieren und diese Schwachstellen aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es mittels Asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung möglich ist, die Nanopartikel mit Proteinkorona von freien Proteinen zu trennen. Dabei handelt es sich um eine chromatographie-ähnliche Technik zur Auftrennung nach Größe. Da die Feld-Fluss-Fraktionierung über keine stationäre Phase verfügt, sind die auf die Probe wirkenden Scherkräfte besonders gering und so besteht die Möglichkeit, die Proteinkorona unbeschadet zu isolieren.

Die so erhaltenen Fraktionen sollen weiter untersucht und charakterisiert werden, denn nur so lässt sich die Identität und Quantität der adsorbierten Proteine in der Korona bestimmen und nur mit diesen Informationen lassen sich Aussagen über das Verhalten der Nanopartikel im Körper treffen. Die weitere Charakterisierung der Korona erfolgte mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung, so wie mittel Proteinmengenbestimmung und SDS-PAGE.

2. Einleitung

Nanomaterialien stellen vielversprechende therapeutische Mittel dar.^[1] Der Einsatz von Nanopartikeln (1-100 nm)^[2] als Wirkstoffträger („drug carrier“) bietet zum einen die Möglichkeit des gezielten Wirkstofftransports, zum anderen können systemische Nebenwirkungen des freien Wirkstoffs unterbunden werden.^[3,4] Nanopartikel werden dabei meist direkt in die Blutbahn injiziert und kommen direkt mit Blut und so mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine in Kontakt. Der Organismus reagiert direkt auf den Kontakt mit körperfremden Materialien, indem er diese mit Proteinen bedeckt. Bei diesem Prozess entsteht die sogenannte Proteinkorona.^[5] Diese Proteinkorona ist verantwortlich für die „biologische Identität“ eines Nanopartikels und damit für das weitere Schicksal des Partikels im Körper.^[1] Aus diesem Grund ist die Untersuchung und Charakterisierung der Proteinkorona von besonderem Interesse. Um die Proteinkorona zu untersuchen, müssen freie Proteine von den Partikeln mit Proteinkorona getrennt untersucht werden. Über Zentrifugation ist es möglich Partikel mit Proteinkorona zu isolieren und zu charakterisieren.^[2]

Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung der freien Proteine bietet die asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (A4F). Dabei handelt es sich um eine chromatographie-ähnliche Technik, die die injizierten Proben der Größe nach auftrennt.^[6] Der Vorteil der A4F ist die geringe Scherkraft, die auf die Probe einwirkt.^[7]

Zur Unterstützung der Methode der A4F dient die dynamische Lichtstreuung. Dazu sind keine vorherigen Reinigungsschritte nötig.

2.1 Proteinkorona

Sobald ein Nanopartikel in Kontakt mit einem biologischen Medium kommt, adsorbieren Proteine an dessen Oberfläche und bilden die sogenannte Proteinkorona. Der Nanopartikel an sich weist eine „chemische Identität“ auf, die durch die Synthese gegeben ist. Dabei handelt es sich um Größe, Form, Zusammensetzung, Funktionalisierung, etc. Die Oberfläche des Nanopartikels wird aber durch die adsorbierten Proteine abgeschirmt und damit bestimmen diese Proteine, was der Organismus vom Nanomaterial „sieht“. Aus diesem Grund wird hierbei

von der „biologischen Identität“ gesprochen. Die Proteinkorona ist verantwortlich für das weitere Schicksal der Nanopartikel im Körper und bestimmt auf zellulärer Ebene die Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren (Abb. 1). Damit ein Nanopartikel effizient als Wirkstoffträger eingesetzt werden kann, ist es somit essentiell, die „biologische Identität“ zu kennen.^[1]

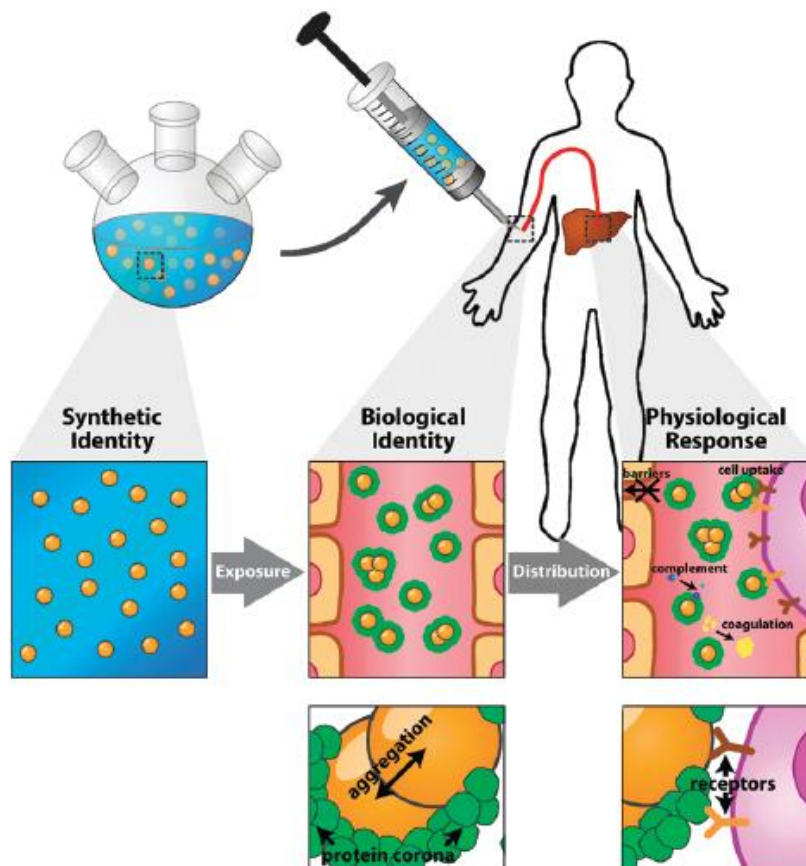


Abb. 1: Identität und Schicksal eines Nanopartikels^[1]: durch die Synthese ist dem Nanomaterial eine chemische, bzw. synthetische Identität gegeben. Kommt das Nanopartikel nun mit biologischen Medien in Kontakt, bildet sich die Proteinkorona aus und man spricht von der biologischen Identität. Die adsorbierten Proteine auf der Partikeloberfläche sind nun verantwortlich für die physiologische Antwort des Körpers.

Wechselwirkungen Nanopartikel - Protein

Die „chemische Identität“ bestimmt die Interaktionen des Nanopartikels mit Proteinen.^[5,8] Von besonderer Wichtigkeit für die Proteinadsorption ist dabei die Oberflächenkrümmung des Partikels.^[8] Befinden sich nun Proteine in direkter Nähe zum Nanopartikel, so adsorbieren sie spontan darauf, sofern dieser Zustand thermodynamisch begünstigt ist.^[1] Dabei scheint die Bindung der Proteine entropiegetrieben zu sein, da gebundenes Wasser von der

Partikeloberfläche frei wird.^[9] Die Bindung zwischen Proteinen und Nanopartikel ist dabei rein physikalischer Natur. Es handelt sich um van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, sowie hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, wobei letzteren die größte Bedeutung zukommt.^[10,11] Geladene und hydrophobe Nanopartikel gehen stabilere Interaktionen mit Proteinen ein.^[1] Hierbei kann es auch zu Konformationsänderungen und zur Denaturierung kommen, wodurch die Funktionen und Interaktionen der Proteine im physiologischen Umfeld beeinflusst werden können.^[1]

Zusammensetzung und Struktur der Proteinkorona

Wird der Nanopartikel injiziert, beispielsweise ins Blut, so konkurrieren zunächst viele Proteine um den Platz auf der Oberfläche des Nanopartikels.^[2,5] Die Proteinkorona erreicht aber nicht umgehend ihren Gleichgewichtszustand, sie ist hochdynamisch.^[9] Zunächst adsorbieren Proteine, die in hoher Konzentration vorhanden sind, wie Albumin, IgG und Fibrinogen. Sie werden aber innerhalb von Sekunden wieder abgelöst, und es kommt zur Adsorption von Proteinen mit höherer Bindungsaffinität. Dieser Effekt wird „Vroman-Effekt“ genannt.^[12] Das Vorkommen bestimmter Proteine in der Korona ist damit nicht abhängig von der relativen Häufigkeit der Proteine im Medium. Allerdings ändert sich die Korona auch bei Transport durch verschiedene Kompartimente und Organe. Daraus ergibt sich als wichtige Frage, zu welchem Zeitpunkt die Korona relevant ist und untersucht werden soll.^[13] Da die Proteinkorona ein hochdynamisches System ist, wird durch Prozesse wie Zentrifugation und Größenausschlusschromatographie die Proteinzusammensetzung der Korona zwangsläufig beeinflusst.

Harte und weiche Korona

Die Proteinkorona auf Nanopartikeln lässt sich in zwei Schichten unterteilen: die weiche und die harte Korona. Die Proteine der harten Korona weisen dabei eine hohe Affinität zum Nanopartikel und eine hohe Bindungskonstante auf.^[9] Die Verweildauer der Proteine wird dabei nicht absolut gesehen, sondern ist über die Dauer der biologischen Antwort oder des Experiments definiert.^[14] Die Bindung von Proteinen in der harten Korona wird daher auch als irreversibel bezeichnet.^[15] Wird der Nanopartikel nun durch verschiedene physiologische Medien transportiert, so ist die

harte Korona weitestgehend stabil, nur ein geringer Anteil an Proteinen wird ausgetauscht. Die harte Korona kann auch als Gedächtnis des Systems angesehen werden.^[13] Damit stellt sich die Frage, ob einzig die harte Korona die biologische Identität ausmacht.^[14]

Die weiche Proteinkorona tauscht ihre Proteine dagegen sehr schnell aus. Sie weisen niedrigere Bindungsaffinitäten auf.^[9] Die harte Korona ist umgeben von den Proteinen der weichen Korona (Abb. 2).

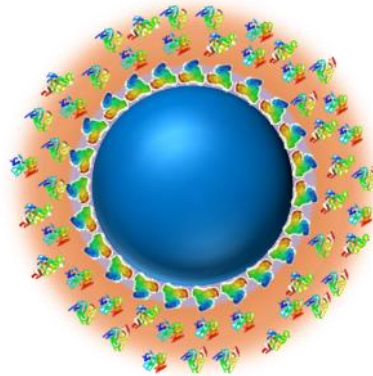


Abb. 2: Nanopartikel (dunkelblau) mit innerer harter Korona (hellblau) und äußerer weicher Korona (orange).

Zur Bindung der Proteine mit unterschiedlich starken Bindungsstärken existiert die Theorie, dass die Proteine der harten Proteinkorona direkt an den Nanopartikel binden und die Proteine der weichen Korona über schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der harten Korona interagiert.^[1] Die harte Proteinkorona ist so stabil, dass sie auch bei Aufreinigungsprozessen erhalten bleibt, während die weiche bei den meisten Analysemethoden entfernt wird. Aus diesem Grund ist die weiche Proteinkorona wenig charakterisiert und ihre biologische Rolle nicht genau definiert.^[15]

Analyse der Proteinkorona

Die bisher gängigen Methoden zur Charakterisierung der Proteinkorona sind in Tabelle 1 zusammengefasst.^[3,16] Dabei unterscheiden sich die Analysemethoden grundlegend in *in situ*- und *ex situ*-Verfahren. Bei *in situ*-Methoden findet die Messung in der Proteinlösung selbst statt, bei *ex situ*-Methoden werden die freien Proteine zuvor abgetrennt.

Tabelle 1: Übersicht über gängige Charakterisierungsmethoden der Proteinkorona.

Eigenschaft der Proteinkorona	Einfluss auf	Methode	Art der Messung
Proteinmenge	Größe	Protein Assay	<i>ex situ</i>
Identifizierung von Proteinen	Möglichkeit der biologischen Interaktionen	SDS-PAGE, 2D-PAGE ^[17] , MS ^[18] , N-terminale Mikrosequenzierung ^[19]	<i>ex situ</i>
Konformation, Anordnung	Aktivität eines Proteins, Zugänglichkeit von Bindestellen	CD-Spektroskopie ^[20,21] , NMR, MS ^[18]	<i>in situ, ex situ</i>
Affinität	Stabilität der Korona	ITC ^[22] , SPR ^[22] , QCM ^[23]	<i>in situ</i>
Größe	Zelluläre Antwort	DLS ^[24] , TEM ^[25,26]	<i>in situ, ex situ</i>
Oberflächenladung	Zelluläre Antwort	Zeta-Potential	<i>in situ, ex situ</i>

2.2 Lichtstreuung

Als eine *in situ*-Methode bietet die dynamische Lichtstreuung (DLS) die Möglichkeit die Proteinkorona in Lösung mit freien Proteinen zu beobachten. Das bedeutet, dass die Proteinkorona nicht durch äußere Einflüsse beschädigt wird.

Ein Molekül besteht aus elektrischen Ladungen. Trifft eine Lichtwelle, die sowohl Teilchen- als auch Wellencharakter besitzt, auf ein Molekül, so wird es zum oszillierenden Dipol. Dabei emittiert es senkrecht zum Oszillator elektromagnetische Strahlung, die die gleiche Wellenlänge besitzt wie das einfallende Licht. Bei kleinen Partikeln ($\leq \lambda/20$) emittiert das Licht isotrop in alle Richtungen. Bei Partikeln $> \lambda/20$ werden in einem Partikel gleichzeitig mehrere Dipole erzeugt. Dabei weisen die emittierten Lichtwellen einen Phasenunterschied auf und so kommt es zu Interferenzen. Damit breitet sich die Strahlung bei großen Partikeln anisotrop aus und die Intensität ist winkelabhängig. Das so entstehende Interferenzmuster ist charakteristisch für jedes Partikel und wird Partikel-Formfaktor genannt.

Partikel in einer Lösung weisen eine zufällige Bewegung auf. Diese rührt von thermischen Dichtefluktuationen des Lösungsmittels her. Sie ist dabei abhängig von der Zähigkeit der Flüssigkeit und nimmt mit abnehmender Teilchengröße zu. Diese zufällige Bewegung wird Brownsche Bewegung genannt. Sie führt zu Fluktuationen in der Streuintensität und ist die Grundlage der dynamischen Lichtstreuung. Diese Veränderung der Streuintensität kommt durch

die Veränderung des Interferenzmusters zustande, wenn sich die Position der Partikel zueinander ändert.

Die gemessene Streuintensitätsfluktuation wird mittels Fourier-Transformation in den dynamischen Streufaktor F_s umgewandelt:

$$F_s(\vec{q}, \tau) = \int G_s(\vec{r}, \tau) \exp(i\vec{q}\vec{r}) d\vec{r} \quad (1)$$

Dieser dynamische Streufaktor beinhaltet alle Informationen über die Bewegung des streuenden Partikels, wobei \vec{r} die Position des streuenden Teilchens angibt, \vec{q} den Streuvektor und τ die Differenz zum Zeitpunkt t . Dabei ist die Korrelationsfunktion der Streuintensitätsfluktuation G_s gegeben mit:

$$G_s(\vec{r}, \tau) = \langle n(\vec{0}, t) n(\vec{r}, t + \tau) \rangle_{V,T} \quad (2)$$

Geht man von einer isotropen Brownschen Bewegung aus, auch „random walk“ genannt, so lässt sich die Korrelationsfunktion auch folgendermaßen ausdrücken:

$$G_s(\vec{r}, \tau) = \langle n(\vec{0}, t) n(\vec{r}, t + \tau) \rangle_{V,T} G_s(r, \tau) = \left[\frac{2\pi}{3} \langle \Delta R(\tau)^2 \rangle \right]^{\frac{3}{2}} \exp \left[-\frac{3r(\tau)^2}{2\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle} \right] \quad (3)$$

mit $\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle$ als mittlere quadratische Verschiebung des streuenden Partikels.

Dabei gilt:

$$\langle \Delta R(\tau)^2 \rangle = 6D_s\tau \quad (4)$$

wobei D_s für den Diffusionskoeffizienten steht. Wird Gleichung (3) nun eingesetzt in (1) und die Funktion nach Fourier transformiert, so ergibt sich:

$$F_s(q, \tau) = \exp \left[-q^2 \langle R^2(\tau) \rangle_T \frac{\tau}{6} \right] = \exp(-D_s q^2 \tau) \quad (5)$$

Mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung lässt sich aus dem Diffusionskoeffizienten der hydrodynamische Radius R_h des Partikels ausrechnen:

$$D_s = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (6)$$

Bei den zu berücksichtigenden Parametern handelt es sich um die Boltzmann-Konstante (k), die absolute Temperatur (T), den Reibungskoeffizient (f) und die Viskosität (η).

Der angeschlossene Hardware-Korrelator wandelt die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion in eine zeitabhängige Autokorrelationsfunktion um. Dabei wird die Intensität I mit sich selbst

multipliziert, nachdem sie um die Zeit τ verschoben wurde. Dieses Produkt wird über den gesamten Zeitraum der Messung gemittelt und für verschiedene τ durchgeführt.

$$\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle \quad (7)$$

Die Korrelationsfunktion hängt mit dem dynamischen Strukturfaktor über die Siegert-Beziehung zusammen:

$$F_s(q, \tau) = \exp(-D_s q^2 \tau) = \langle E_s(q, t)E_s^*(q, t + \tau) \rangle = \sqrt{\frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t)^2 \rangle} - 1} \quad (8)$$

Die Intensitätsfluktuation wird somit umgewandelt in die Autokorrelationsfunktion wie in Abbildung 3 zu sehen ist.

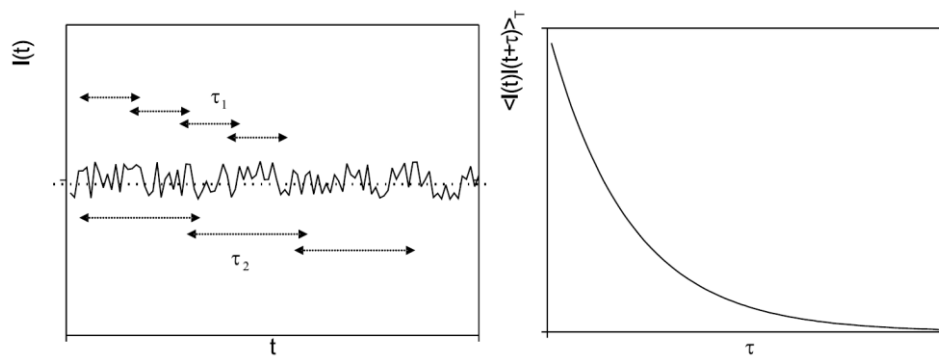


Abb. 3: Intensitätsfluktuation (links) und daraus berechnet die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion (rechts).^[27]

Bei einer monodispersen Probe ist der dynamische Streufaktor eine einfache Exponentialfunktion mit einer Zerfallsrate Γ von:

$$\Gamma = D_s q^2 \quad (9)$$

Polydisperse Proben weisen eine Größenverteilung $P(R_h)$ auf. Experimentell wird ein durchschnittlicher Selbstdiffusionskoeffizient bestimmt, welcher gegeben ist durch eine Verteilungsfunktion $P(D_s)$. Diese ist abhängig von der Partikeldichte der Spezies n_i , der Partikelmasse M_i und vom Partikelformfaktor $P_i(q)$:

$$I \sim n_i \cdot M_i^2 \cdot P_i(q) \quad (10)$$

Der dynamische Strukturfaktor ist hierbei eine Überlagerung mehrerer Exponentialfunktionen, die nach der Verteilungsfunktion der Selbstdiffusionskoeffizienten gewichtet wird:

$$F_s(q, \tau) = \int_0^\infty P(D_s) \exp(-q^2 D_s \tau) dD_s \quad (11)$$

Die quantitative Datenanalyse polydisperser Proben erfolgt durch eine Kumulantenanalyse, welche aber nur für geringe Polydispersität gilt:

$$\ln F_s(q, \tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{1}{2!} \kappa_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \kappa_3 \tau^3 + \dots \quad (12)$$

Der erste Kumulant κ_1 entspricht dabei dem Diffusionskoeffizienten, der zweite Kumulant κ_2 der quantitativen Messung der Polydispersität der Diffusionskoeffizientenverteilungsfunktion (σ_D):

$$\sigma_D = \frac{\sqrt{\langle D_s^2 \rangle - \langle D_s \rangle^2}}{\langle D_s \rangle} = \sqrt{\frac{\kappa_2}{\kappa_1}} \quad (13)$$

Wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Gauß'sche Größenverteilung handelt, so erhält man für die Größendispersität σ_R folgende Gleichung:

$$\sigma_R = \frac{\sqrt{\langle R_h^2 \rangle - \langle R_h \rangle^2}}{\langle R_h \rangle} \quad (14)$$

Bei polydispersen Proben ist der durchschnittliche Diffusionskoeffizient q -abhängig.

Bei q handelt es sich um den sogenannten Streuvektor. Dieser normiert die Winkelabhängigkeit großer Partikel und ist definiert als:

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi n_D \sin\left(\frac{\vartheta}{2}\right)}{\lambda} \quad (15)$$

Hierbei steht n_D für den Brechungsindex, ϑ für den Streuwinkel und λ für die Wellenlänge des einfallenden Lichts.

Tatsächlich wird also der apparente Diffusionskoeffizient D_{app} bestimmt. Dieser ist gegeben durch:

$$D_{app}(q) = \frac{\sum n_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum n_i M_i^2 P_i(q)} \quad (16)$$

Für Partikel im Größenbereich von 10 nm – 100 nm lässt sich dieser apparente Diffusionskoeffizient auch folgendermaßen formulieren:

$$D_{app}(q) = \langle D_s \rangle_z (1 + k \langle R_g^2 \rangle_z q^2) \quad (17)$$

Bei monodispersen Proben ist $k = 0$. Wird der apparente Diffusionskoeffizient gegen q^2 aufgetragen, so ergibt sich eine linear ansteigende Funktion, deren y-Achsenabschnitt den wahren Diffusionskoeffizienten angibt.

Der hydrodynamische Radius lässt sich nur in stark verdünnten Lösungen bestimmen, weil die Bewegung der Teilchen sonst auch von den intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen abhängt.

Eine ausführliche Abhandlung der Lichtstreuungstheorie ist in der Literatur zu finden.^[27-30]

2.3 Auswertung der DLS

Wird eine DLS-Messung der Proteinkorona direkt im biologischen Medium vorgenommen, so handelt es sich um eine Mischung verschiedener polydisperser Komponenten. Dabei stellt sich die Frage, ob neben den Signalen der Reinkomponenten auch Aggregate existieren und wie sich diese nachweisen lassen.

Um die Autokorrelationsfunktion $g(t)$ der Proteinlösung, z. B. Plasma, zu beschreiben, eignet sich ein Fit aus der Summe dreier Exponentialfunktionen:

$$g_{Protein}(t) = a_{1,Protein} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,Protein}}\right) + a_{2,Protein} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,Protein}}\right) + a_{3,Protein} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{3,Protein}}\right) \quad (18)$$

Dabei steht a_{ij} für die Amplituden der jeweiligen Streubeiträge, t für die Zeit und die Relaxationszeit τ ist gegeben durch:

$$\tau_i = \frac{1}{q^2 D_i} \quad (19)$$

mit q als Streuvektor und D_i als Diffusionskoeffizient der jeweiligen Komponente.

Nanopartikel sind dagegen theoretisch monodispers, verfügen aber dennoch über eine gewisse Größenverteilung und lassen sich aus diesem Grund mit einem biexponentiellen Fit besser beschreiben:

$$g_{NP}(t) = a_{1,NP} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,NP}}\right) + a_{2,NP} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,NP}}\right) \quad (20)$$

Wird eine Mischung aus Proteinlösung und Nanopartikel betrachtet, in der es zu keinerlei Interaktion zwischen den beiden Komponenten kommt, so lässt sich die Korrelationsfunktion durch die Summe der beiden obigen Korrelationsfunktionen exakt beschreiben. Dabei werden die erhaltenen Parameter aus Gleichung (18) und (19) nicht verändert, nur die Intensitätsbeiträge f der beiden Funktionen sind variabel:

$$g_{Mischung}(t) = f_{Protein} g_{Protein}(t) + f_{NP} g_{NP}(t) \quad (21)$$

Wechselwirken die beiden Komponenten aber miteinander, so entsteht eine weitere Komponente in der Mischung, ein Aggregat. Die Mischung lässt sich nicht länger aus der Summe der Proteinlösung und des Nanopartikels beschreiben. Das entstandene, unbekannte Aggregat wird mit einer einfachen Exponentialfunktion ausgedrückt:

$$g_{\text{Aggregat}}(t) = a_{1,\text{Aggregat}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,\text{Aggregat}}}\right) \quad (22)$$

Dieser Anteil wird zu der Autokorrelation der beiden anderen Komponenten addiert und so ergibt sich für eine Mischung aus Protein, Partikel und Aggregat folgende Autokorrelationsfunktion:

$$g_{\text{Mischung mit Aggregat}}(t) = f_{\text{Protein}}g_{\text{Protein}}(t) + f_{\text{NP}}g_{\text{NP}}(t) + f_{\text{Aggregat}}g_{\text{Aggregat}}(t) \quad (23)$$

Auch hier sind die Parameter der Protein- und der Partikelautokorrelationsfunktionen vorgegeben, ihre Intensitätsbeiträge sowie die Parameter der Aggregatfunktion sind variabel.

In Abbildung 4 sind die Datenpunkte einmal ohne und einmal mit zusätzlicher Aggregatfunktion gefittet. Es ist zu sehen, dass die Funktion ohne Aggregatfunktion deutlich von den Datenpunkten abweicht, wohingegen diese gut von der Funktion aus allen drei Komponenten beschrieben werden können .

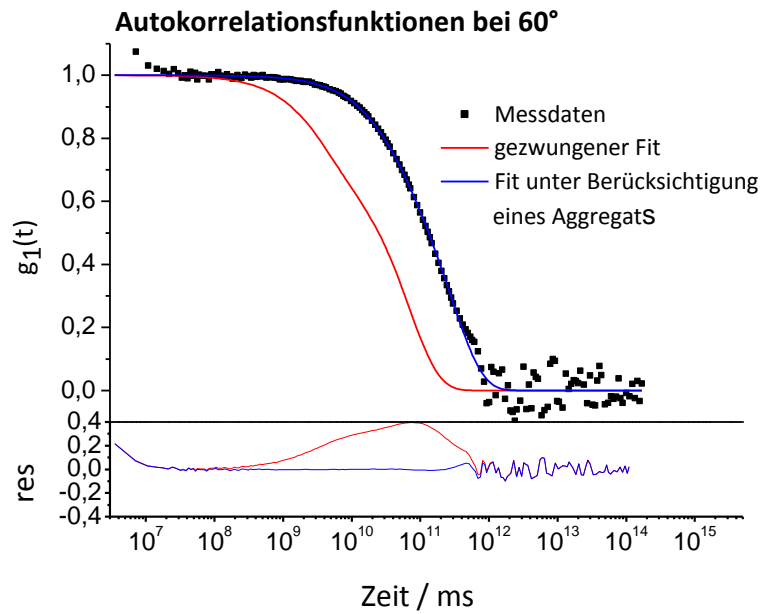


Abb. 4: Autokorrelationsfunktion einer Mischung bei 60° mit Datenpunkten (schwarz), Fit aus der Summe der Autokorrelationsfunktionen von Protein und Nanopartikel (rot) und Fit aus der Summe der Autokorrelationsfunktionen von Protein, Nanopartikel und zusätzlich Aggregat (blau). Da der blaue Fit wesentlich besser zu den Datenpunkten passt, ist davon auszugehen, dass sich hier ein Aggregat gebildet hat. Wäre kein Aggregat in der Lösung zu finden, so würde der rote Fit ebenfalls genau über den Datenpunkten liegen.

Der prozentuale Beitrag der verschiedenen Komponenten an der Gesamtstreuintensität geht dabei in die Gleichung mit ein. Da große Partikel stärker streuen als kleine, bedeutet beispielsweise eine gleiche Streuintensität der Komponenten nicht, dass diese in gleicher Konzentration vorliegen.

Die so angewendete Auswertung erfolgt nach Rausch *et al.*^[31]

2.4 Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) ist eine Trennmethode nach Teilchengröße und ist die am häufigsten verwendete Methode unter den verschiedenen Feld-Fluss-Fraktionierungen,^[32] die 1966 von Giddings vorgestellt wurden.^[33] Die A4F deckt einen weiten Größenbereich ab und ist dabei besonders auch für große, aggregierende und Scherkraft-sensitive Polymere geeignet.^[7] Es handelt sich um eine außerordentlich sanfte Trennmethode.^[32] Dabei ist es essentiell, dass die Probe sich im Lösungsmittel löst oder dispergierbar ist und nicht durch die poröse Membran der Akkumulationswand passt.^[34]

Aufbau

Der Trennkanal ist bandförmig und besteht aus einem dünnen Abstandshalter („Spacer“), der eine trapezoidale Aussparung aufweist. Oben ist der Kanal von einer Plexiglasplatte begrenzt, so dass das Verhalten farbiger Stoffe direkt verfolgt werden kann. Die Unterseite des Kanals besteht aus einer Fritte, auf die eine semipermeable Membran aufgelegt ist.^[6] Diese Membran muss für das Laufmittel permeabel sein, um den Querfluss zu ermöglichen, darf aber keine Bestandteile der Probe durchlassen.^[32] Daraus ergibt sich das untere Größenlimit der A4F, der sogenannte „cut-off“-Wert. Das obere Größenlimit der Methode ist bestimmt durch die Kanalhöhe. Durch unterschiedlich hohe Spacer kann diese leicht variiert werden.^[35] Der allgemeine Aufbau des Trennkannels ist in Abbildung 5 dargestellt.

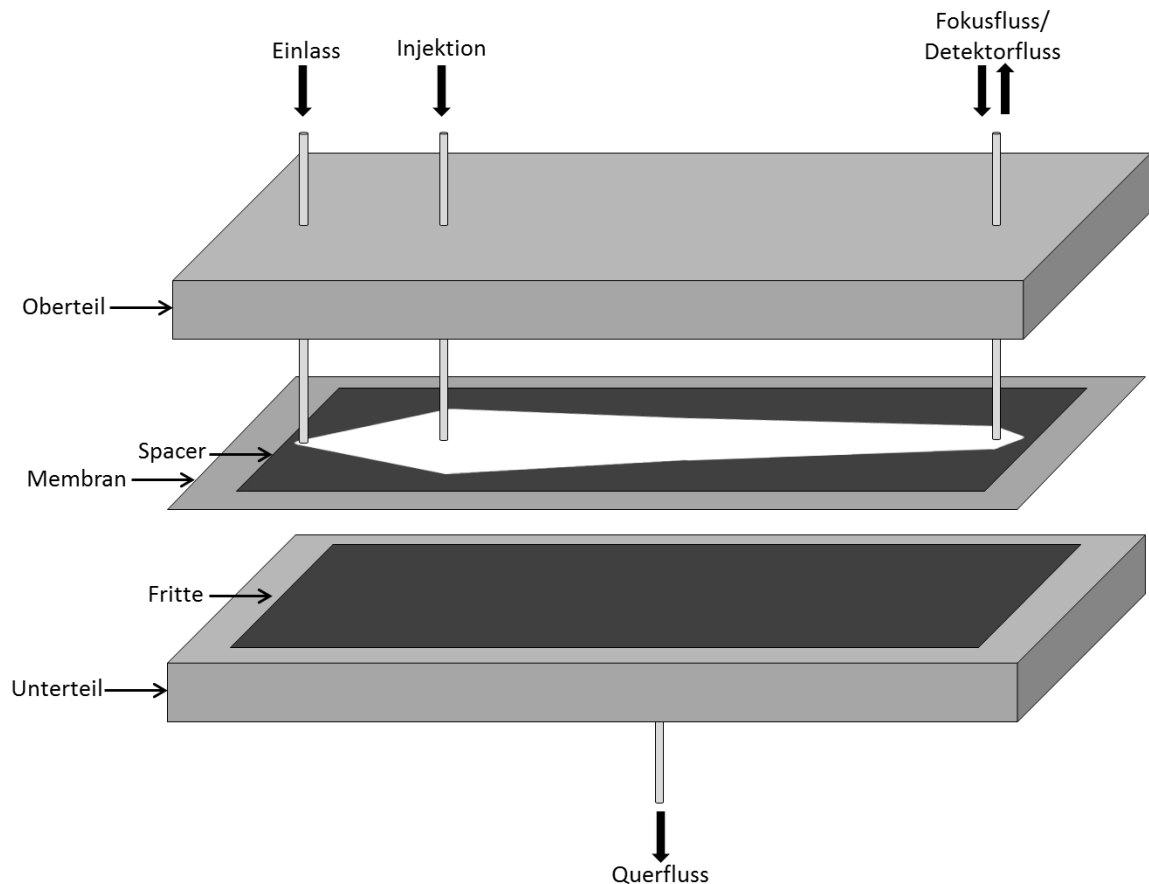


Abb. 5: Aufbau des verwendeten A4F-Trennkanales.

Allgemeines Trennprinzip

Entlang des Trennkanales herrscht ein Fluss, der die Proben vom Injektionspunkt zum Detektor transportiert. Zu diesem Fluss senkrecht ist von außen eine Kraft angelegt, der Querfluss. Dieser Querfluss interagiert mit den Partikeln und drückt diese in Richtung der unteren Kanalwand, weshalb diese Akkumulationswand genannt wird.^[36] Durch die so steigende Konzentration der Probe an der Akkumulationswand wird die Diffusion der Teilchen in die entgegengesetzte Richtung induziert. Diese Kräfte wirken in entgegengesetzte Richtung und erreichen zu einem bestimmten Zeitpunkt einen stationären Zustand.^[37] Je nach individuellem Diffusionskoeffizienten befinden sich die verschiedenen Partikel in unterschiedlichen Abständen zur Akkumulationswand. Der stationäre Zustand der Probe wird dabei zu Beginn im sogenannten Relaxations-/Fokusschritt eingestellt. In diesem wirkt nur der Querfluss auf die Teilchen.^[32] Der Elutionsmodus und der Relaxations-/Fokusschritt sind in Abbildung 6 veranschaulicht.

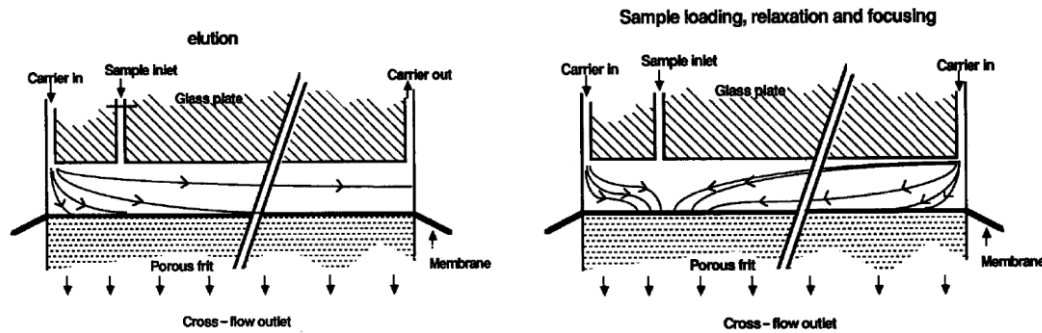


Abb. 6: Vergleich Elutionsmodus (links) und Fokus/Relaxation (rechts).^[36] Im Elutionsmodus wird die Probe zum Detektor hin bewegt, im Fokus-/Relaxationsschritt dagegen wird die Probe am Injektionspunkt fokussiert.

Der Transportfluss zwischen den parallelen Platten weist ein parabolisches Flussprofil auf. Durch den unterschiedlichen Abstand zur Akkumulationswand, den die Teilchen aufweisen, befinden sie sich in unterschiedlich schnellen Schichten des Flussprofils. Dadurch eluieren die Partikel unterschiedlich schnell, wobei kleine Partikel einen großen Diffusionskoeffizienten aufweisen, sich also weiter in der Mitte des Kanals befinden und deswegen früher eluieren.^[36] Eine Übersicht über den Trennmechanismus ist in Abbildung 7 zu sehen. Die Trennung aufgrund unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten stellt die am häufigsten verwendete Methode dar, gilt für Proben bis zu einem Durchmesser von 1 μm und wird als „normaler Modus“ bezeichnet.^[6]

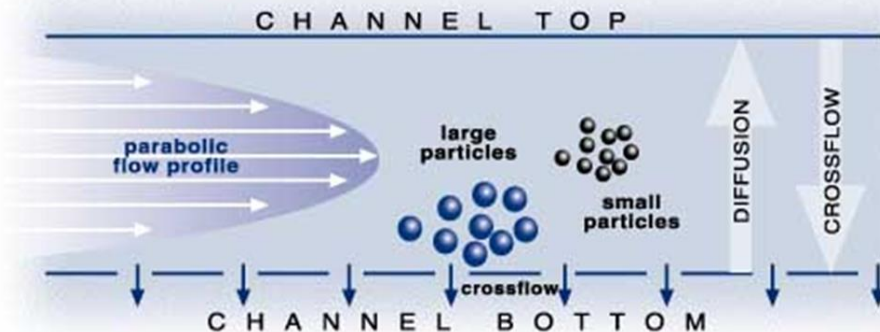


Abb. 7: Übersicht über den Trennmechanismus in der A4F.^[38]

Bei Partikeln größer als 1 μm oder besonders schneller Strömungsgeschwindigkeit stellen sich der sterische oder der Hyperlayer-Modus ein. Bei diesen beiden Modi spielen andere Mechanismen eine Rolle bei der Auftrennung: beim sterischen Modus, ist die Diffusion der Teilchen vernachlässigbar und beim Hyperlayermodus ist die Auftriebskraft entscheidend. Dies führt dazu, dass Auftrennung und Elution in genau umgekehrter Reihenfolge wie im normalen Modus erfolgen.^[6] Eine Übersicht über die verschiedenen Elutionsmodi ist in Abbildung 8 dargestellt.

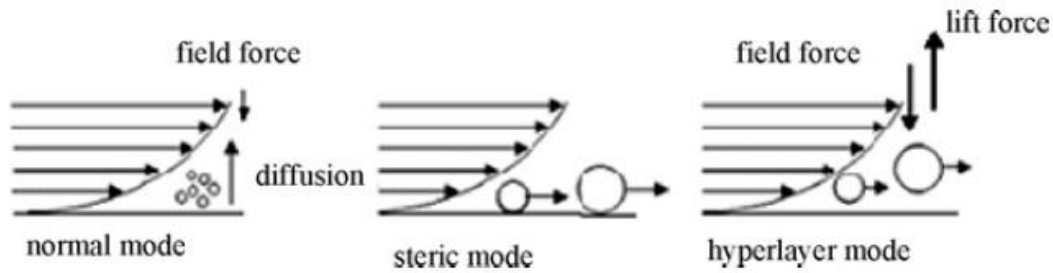


Abb. 8: Verschiedene Modi der A4F.^[6]

Die Trennleistung und Trennzeit sind dabei abhängig von den vier verschiedenen Flüssen: Injektionsfluss, Fokusfluss, Querfluss und Detektorfluss. Die optimale Einstellung dieser Parameter für das vorliegende Trennproblem ist dabei der Schlüsselschritt für eine erfolgreiche Auftrennung.^[32,34]

Theoretischer Hintergrund^[39]

Ein grundlegender Parameter der A4F-Trennung ist der Retentionslevel (RL) und gibt das Verhältnis zwischen Retentionszeit (t_r) und Totzeit (t_0) an:

$$RL = \frac{t_r}{t_0} \quad (24)$$

Dabei ist die Breite des Signals an der Basis (\bar{w}_b) abhängig von RL , was somit direkten Einfluss auf die Auflösung (R_s) hat, die sich wie folgt berechnen lässt:

$$R_s = \frac{\Delta t_r}{\bar{w}_b} \quad (25)$$

Die Totzeit sollte dabei besser berechnet als experimentell bestimmt werden, weil sich die Totzeit aus dem Chromatogramm nicht exakt bestimmen lässt. Sie lässt sich mit folgender Gleichung berechnen:

$$t_0 = \frac{V^0}{F_{cross}} \ln \left[1 + \frac{F_{cross}}{F_{out}} \left(1 - \frac{w \left(b_0 z' - \frac{b_0 - b_L}{2L} z'^2 - y \right)}{V_0} \right) \right] \quad (26)$$

Dabei ist V^0 das Totvolumen, F_{cross} der Querfluss und F_{out} der Detektorfluss. Bei den restlichen Parametern handelt es sich um geometrische Eigenschaften des Kanals (w : Kanalhöhe, b_0 : Kanalbreite am Einlass, z' : Kanalbreite am Injektionspunkt, b_L : Kanalbreite am Auslass, L : Kanallänge, y : Fläche des ausgesparten Bereichs am Kanaleinlass).

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der sogenannte Retentionsparameter λ^* und ist definiert als:

$$\lambda^* = \frac{l}{w} \quad (27)$$

l stellt den Abstand des Konzentrationsschwerpunkts der Probe zur Wand dar und lässt sich berechnen durch:

$$l = \frac{D}{u_0} \quad (28)$$

D gibt den Diffusionskoeffizienten an und u_0 die Geschwindigkeit des Querflusses an der Membranoberfläche.

Der Retentionsparameter und der Retentionslevel sind folgendermaßen verknüpft:

$$RL = \frac{1}{6\lambda^*} \quad (29)$$

Mit Gleichung (27) und (28) lässt sich dieser umformen zu:

$$RL = \frac{wu_0}{6D} = \frac{wF_{cross}}{6AD} \quad (30)$$

Aus dieser Gleichung kann entnommen werden, dass sich der Retentionslevel erhöht, sobald der Querfluss oder die Kanalhöhe erhöht werden. Des Weiteren zeigt Gleichung (30) nochmals deutlich, dass die Retention nur vom Diffusionskoeffizienten der Partikel abhängt.

Durch Umformen von Gleichung (24) und Einsetzen von Gleichung (26) und (30) lässt sich auch die Retentionszeit berechnen:

$$t_r = \frac{w^2}{6V^0D} F_{cross} t^0 \quad (31)$$

$$t_r = \frac{w^2}{6D} \ln \left(1 + \frac{F_{cross}}{F_{out}} \left(1 - \frac{w \left(b_0 z' - \frac{b_0 - b_L}{2L} z'^2 - y \right)}{V^0} \right) \right) \quad (32)$$

Da die Geometrie des Kanals in jedem Fall vorgegeben ist und der Diffusionskoeffizient durch die Probe bestimmt wird, geht aus Gleichung (32) hervor, dass die Retention eines Partikels nur durch das Verhältnis von F_{cross} zu F_{out} bestimmt wird. Im Umkehrschluss lässt sich aus der Retentionszeit, die experimentell bestimmt werden kann, der Diffusionskoeffizient eines Partikels berechnen. Aus dem Diffusionskoeffizienten lässt sich ähnlich wie in der Lichtstreuung

über die Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Durchmesser (d_h) der Partikel berechnen:

$$d_h = \frac{2V^0kT}{w^2\pi\eta t^0 F_{cross}} t_r \quad (33)$$

Parameter die in diese Gleichung eingehen sind außerdem die Boltzmann-Konstante (k), die absolute Temperatur (T) und die Viskosität (η).

2.5 Liposomen

Liposomen sind vesikuläre Strukturen bestehend einer Phospholipid-Doppelschicht. Im Inneren sind Liposomen hydrophil und so können hydrophile Wirkstoffe darin eingeschlossen werden. In das Innere der Doppelschicht (engl.: Bilayer) können dagegen hydrophobe Wirkstoffe eingebettet werden.^[40,41] Die verwendeten Lipide sind dabei natürlicher oder synthetischer Herkunft, biokompatibel und bioabbaubar.^[42] Diese Eigenschaften machen Liposomen zu vielversprechenden Wirkstofftransportern. Kommen sie wie andere Nanopartikel mit physiologischen Medien in Kontakt, so bildet sich auch hier eine Proteinkorona aus (Abb. 9).^[43,44] Dabei ist die Charakterisierung der Proteinkorona auf Liposomen besonders schwierig, da sie sich aufgrund des geringen Dichteunterschieds nicht mittels Zentrifugation abtrennen lassen.

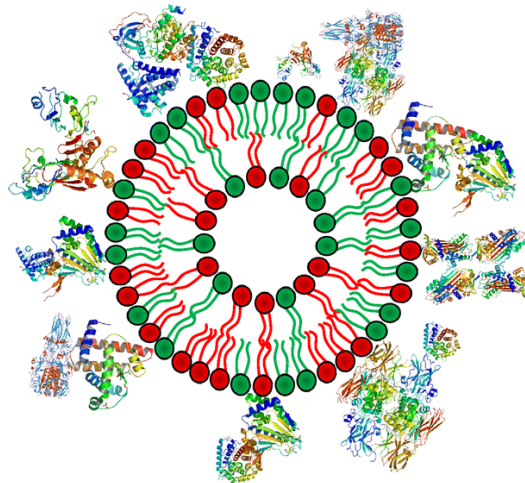


Abb. 9: Liposom umgeben von einer Proteinkorona^[45]

2.6 SDS-PAGE

Um die Zusammensetzung der Proteinkorona zu untersuchen, kann die SDS-PAGE (Sodiumdodecyl-Polyacrylamid Gelelektrophorese) verwendet werden. Zur Probenvorbereitung müssen zuvor die freien Proteine abgetrennt werden. Dies kann mittels Zentrifugation oder mit A4F erfolgen. Werden die erhaltenen Koronen auf dem Gel betrachtet, so lassen sich die Einflüsse der Reinigungsmethoden auf die Proteinzusammensetzung untersuchen.

Bei der SDS-PAGE wandert ein Molekül entsprechend seiner Nettoladung im elektrischen Feld. Der elektrischen Kraft wirkt dabei die Reibungskraft entgegen, die abhängig von der Masse und Form des Moleküls ist. Zur Auftrennung wird ein Gel, hier ein Polyacrylamidgel, verwendet, welches wie ein Sieb wirkt. Je größer das Molekül ist, desto langsamer wandert es durch die Poren. (Abb. 10)

Um eine Auftrennung nur abhängig von der Masse zu erreichen, wird Natriumdodecylsulfat zugesetzt, welches ein Detergenz ist, das die nicht-kovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Proteine zerstört. Da sich das SDS in einem konstanten Verhältnis an den Proteinen anlagert, überdeckt es die Nettoladung der Proteine und diese wird so vernachlässigbar. Um Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu zerstören, wird noch Dithiothreitol (DTT) zugegeben.

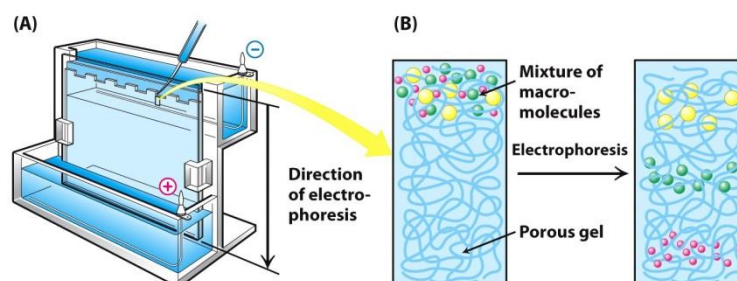


Abb. 10: Aufbau (links) und Trennprinzip (rechts) der SDS-PAGE^[46]: Das Gel wird senkrecht in eine mit Laufpuffer gefüllte Kammer eingespannt. Die Proben werden in Taschen injiziert und ein elektrisches Feld wird angelegt, wobei sich der positive Pol unten befindet. Aufgrund der negativen Nettoladung wandern die Proteine nun nach unten und werden je nach Größe unterschiedlich stark durch das Gel in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit beeinträchtigt.

Die Theorie der SDS-PAGE ist in der Literatur ausführlich beschrieben.^[46-48]

2.7 Proteinmengenbestimmung

Um die Frage zu beantworten, ob verschiedene Partikel unterschiedliche Mengen an Protein adsorbieren, können verschiedene Assays zur Quantifizierung durchgeführt werden. Dazu müssen die Proteine aber zuvor von den Partikeln abgelöst werden.

Bradford-Assay

Das verwendete Reagenz beim Bradford-Assay ist Coomassie-Brilliant-Blue G250, ein Triphenylmethanfarbstoff, der in freier, kationischer Form rot ist und ein Absorptionsmaximum bei 470 nm aufweist. In saurem Medium bindet Coomassie-Brilliant-Blue an kationische oder unpolare Seitenketten von Proteinen. Bei der Komplexbildung wird das Reagenz anionisch und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Die Absorption der nun blauen Lösung wird anschließend photometrisch gemessen.

Der Bradford-Assay ist in der Literatur ausführlich beschrieben^[49-51] und der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pierce-Test basiert auf dieser Theorie.

BCA-Assay

Dem BCA-Assay liegt eine zweistufige Reaktion in alkalischem Medium, die Biuret-Reaktion, zugrunde, welche ebenfalls zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration dient. Zunächst wird Cu^{2+} durch die Proteine zu Cu^{1+} reduziert. Anschließend bildet das Cu^{1+} mit Bicinchoninsäure einen tiefroten Chelatkomplex mit Absorptionsmaximum bei 562 nm. Genauere Ausführungen sind in der Literatur zu finden.^[52,53]

2.8 Ziel der Arbeit

Da die Proteinkorona den wichtigsten Einflussfaktor auf die Antwort eines Organismus auf einen Nanopartikel darstellt, ist ihre Charakterisierung von oberster Priorität. Dabei wird die Proteinkorona in zwei Bereiche eingeteilt. Die harte Korona besteht aus Proteinen mit einer hohen Bindungsaffinität zum Nanomaterial, die weiche Proteinkorona enthält dagegen Proteine mit niedrigen Affinitäten und es erfolgt ein ständiger Austausch der Proteine. Aufgrund dieser hohen Dynamik ist die weiche Proteinkorona für Analysemethoden besonders schwer zugänglich und ihre Untersuchung gestaltet sich als besonders schwierig. Dahingegen existieren bereits einige Untersuchungsmethoden für die harte Proteinkorona. Die einzige Möglichkeit, die weiche Korona zu betrachten, besteht bisher in *in situ*-Methoden, bei denen die Korona in einer Lösung mit freien Proteinen untersucht wird. Eine Isolierung der soften Korona von den freien Proteinen ist bisher noch nicht verlässlich möglich.

Da die A4F besonders niedrige Scherkräfte aufweist, ist sie für besonders empfindliche Proben geeignet,^[7] und es stellt sich die Frage, ob es mittels A4F möglich ist, freie Proteine und Partikel von Partikeln mit Proteinkorona und Aggregaten zu trennen, möglichst ohne Einfluss auf die Proteinkorona zu nehmen und somit die weiche Korona zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden passende Methoden entwickelt, auf deren Grundlage das gestellte Trennproblem angegangen werden konnte. Sofern sich die Proben auftrennen ließen, wurden die so erhaltenen Fraktionen mit anderen Methoden weiter untersucht, beispielsweise mittels dynamischer Lichtstreuung oder SDS-PAGE. Somit werden komplementäre Methoden verwendet, um ein möglichst vollständiges Bild der Proteinkorona zu erhalten.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methodenentwicklung

Die A4F bietet eine Möglichkeit zur Lösung unterschiedlicher Trennprobleme, wie beispielsweise die Trennung von synthetischen Nanopartikeln, Proteinen, etc. Die Trennleistung ist dabei abhängig von der verwendeten Methode, der Membran und dem Laufmittel. Um einen Überblick über die verschiedenen Trennmöglichkeiten für Nanopartikel in einem Größenbereich von 20-125 nm im Durchmesser zu erhalten, wurden einige Methoden getestet.

Von besonderer Wichtigkeit in der vorliegenden Arbeit war die Trennung von Gemischen aus Partikeln und Proteinen. Dazu wurde eine Polysulfonether-Membran (PES-Membran) verwendet. Diese ist besonders für Proteine geeignet. Wenn angenommen wird, dass die Nanopartikel komplett von Proteinen umgeben sind, interagieren sie in gleicher Weise mit der Membran wie reine Proteine.

3.1.1 Optimierung der Trennparameter

Prinzipielle Möglichkeiten sind ein konstanter, ein linear abfallender oder ein exponentieller Fluss. Konstante Flussverläufe üben eine konstant hohe Retention auf die Partikel aus. Sie werden sehr lange im Kanal festgehalten. Dadurch kommt es zu einer starken Peak-Verbreiterung und der abgedeckte Größenbereich ist aus diesem Grund entsprechend gering (Abb. 12). Dahingegen kommt es nicht zu einer Trennung, wenn kein Querfluss angelegt ist, wie in Abbildung 11 dargestellt.

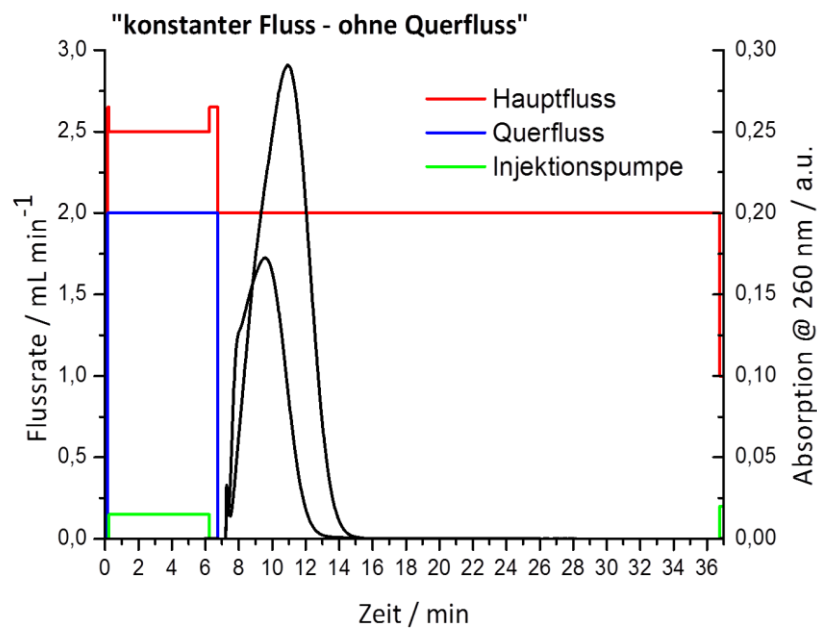


Abb. 11: Elogramm mit konstantem Fluss, ohne Querfluss, es findet praktisch keine Trennung der Komponenten statt.

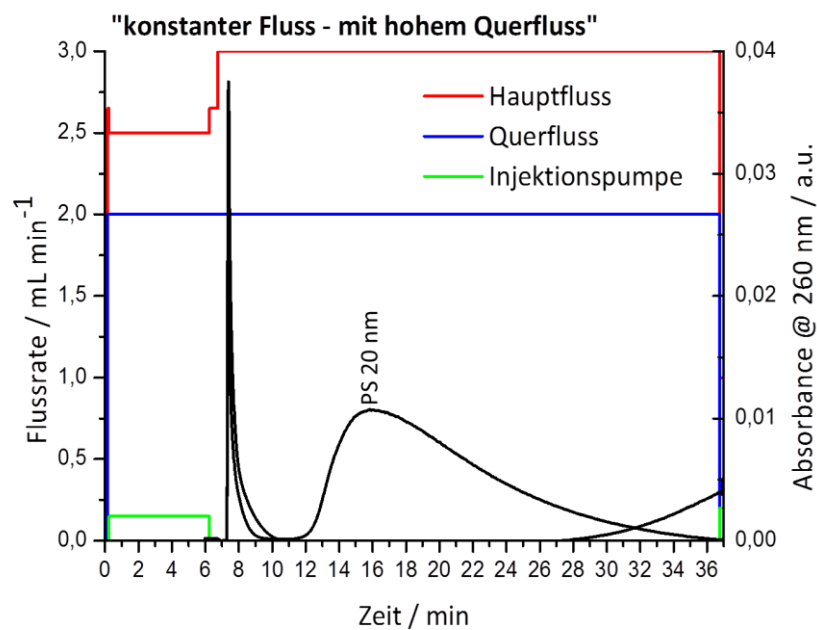


Abb. 12: Elogramm mit konstantem Fluss und hohem Querfluss. Es kommt zu einer starken Retention der Komponenten, größere können in der gegebenen Zeit nicht eluieren.

Vielversprechender sehen dagegen die linearen Methoden aus. Hier nimmt die Retentionskraft über die Zeit ab und somit eluieren die Partikel zügiger. Je niedriger der angesetzte Querfluss ist, desto früher erfolgt die Elution und desto schmaler sind die Peaks. Allerdings haben lineare Methoden den Nachteil, dass der Querfluss zu einem Zeitpunkt Null erreicht. Ab diesem Punkt

findet keine weitere Trennung mehr statt und die Partikel verlassen den Trennkanal in der gleichen Reihenfolge mit dem gleichen Abstand zueinander, wie zu dem Zeitpunkt, an dem der Querfluss zum ersten Mal Null erreicht. Zwei linear abfallende Methoden sind in Abbildung 13 und 14 dargestellt.

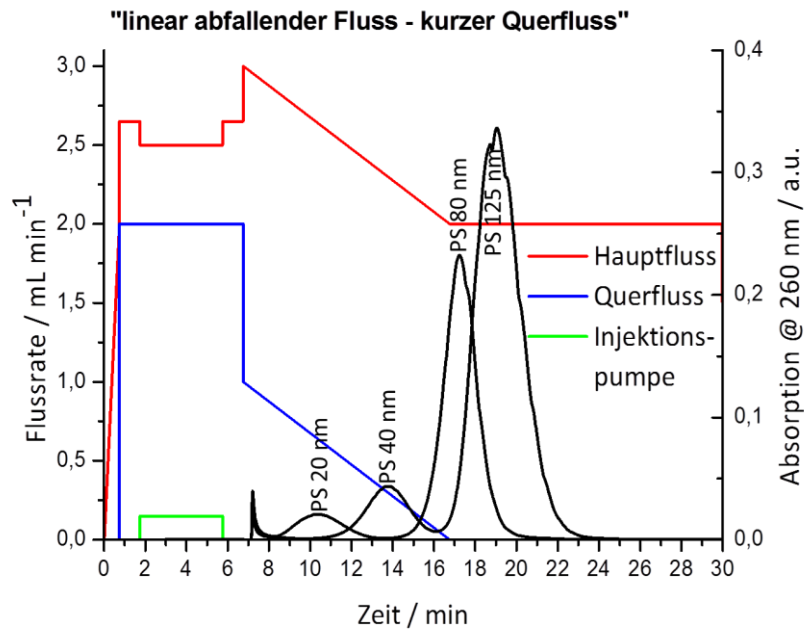


Abb. 13: Elugramm mit linear stark abfallendem Fluss (früh kein Querfluss mehr), führt zu einer schwachen Auflösung der beiden größeren Partikel, deckt aber einen großen Größenbereich ab.

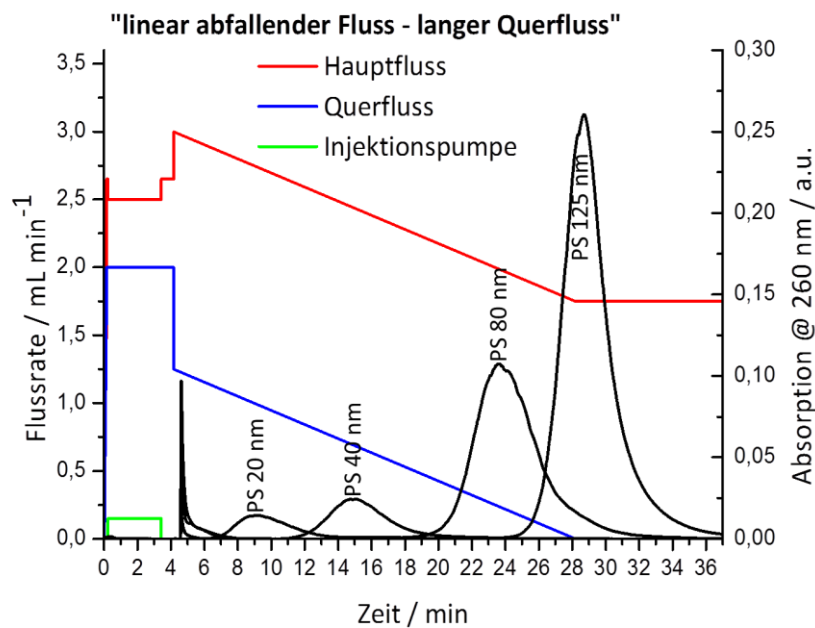


Abb. 14: Elugramm mit linear schwach abfallendem Fluss (langer Querfluss), führt zu einer guten Trennung der größeren Komponenten, maximal auftrennbare Größe aber schon erreicht.

Diesen Nachteil kompensieren die exponentiellen Methoden, da sich hierbei der Querfluss zwar Null annähert, aber nicht erreicht. So wird auch auf die großen Partikel, die sich länger im Kanal befinden, weiterhin eine Trennkraft ausgeübt. Dadurch lösen sie auch größere Größen besser auf und sind den linearen Methoden in der Regel überlegen (Abb. 15).

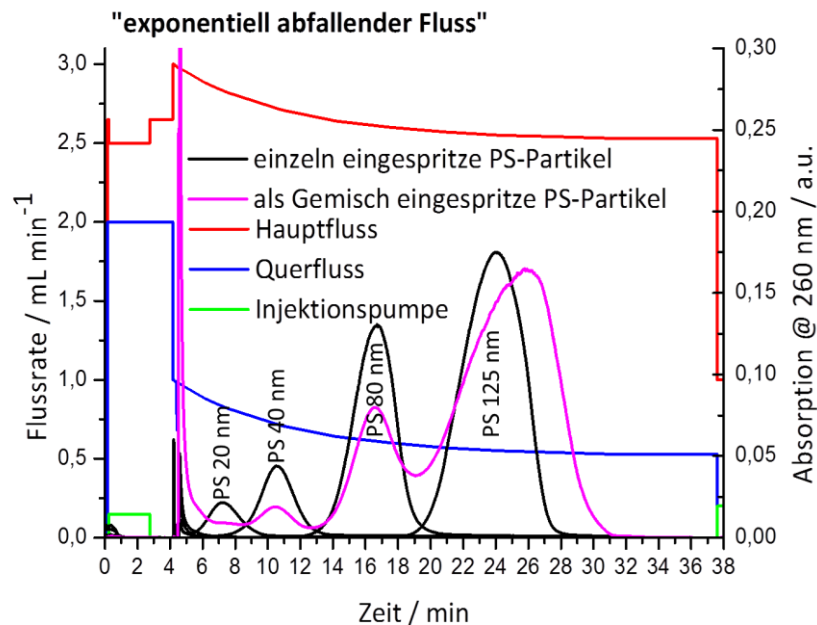


Abb. 15: Eluogramm mit exponentiell abfallender Fluss, der Querfluss bleibt über die Dauer des gesamten Laufs erhalten. Dadurch wird eine gute Auftrennung aller Komponenten erhalten. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Partikel einzeln oder als Gemisch injiziert werden.

Zu Beginn wurden Standard-Polystyrol-Partikel von Fischer Scientific verwendet. Sie decken einen großen Größenbereich ab und eluieren mit Methode „exponentieller Fluss“ alle über die gesamte Dauer des Laufs reproduzierbar und gut getrennt. Dabei spielt es keine Rolle, ob die verschiedenen Partikel einzeln oder als Partikelgemisch verwendet werden. Die Retentionszeiten bleiben konstant. Das Eluogramm der Methode ist in Abbildung 15 dargestellt.

Da diese Methode einen relativ breiten Größenbereich abdeckt, eignet sie sich gut, um auch die Partikel mit Proteinkorona von freien Proteinen abzutrennen, bei denen noch unbekannt ist, wie sie sich bei der Trennung verhalten. Exemplarisch wurden die Partikel mit dem Protein HSA als Einzelprotein inkubiert und später mit Vollplasma, welches eine Mischung zahlreicher verschiedener Proteine ist.

Zum Vergleich wurde ein mit Aminogruppen funktionalisiertes Polystyrolpartikel verwendet. Die Aminopartikel lassen sich im Gegensatz zu den bis dahin verwendeten Standards mit Methode

„linear abfallender Fluss – kurzer Querfluss“ (vergleiche Abb. 13) wesentlich besser auftrennen. Daraus ergibt sich das Chromatogramm aus Abbildung 16.

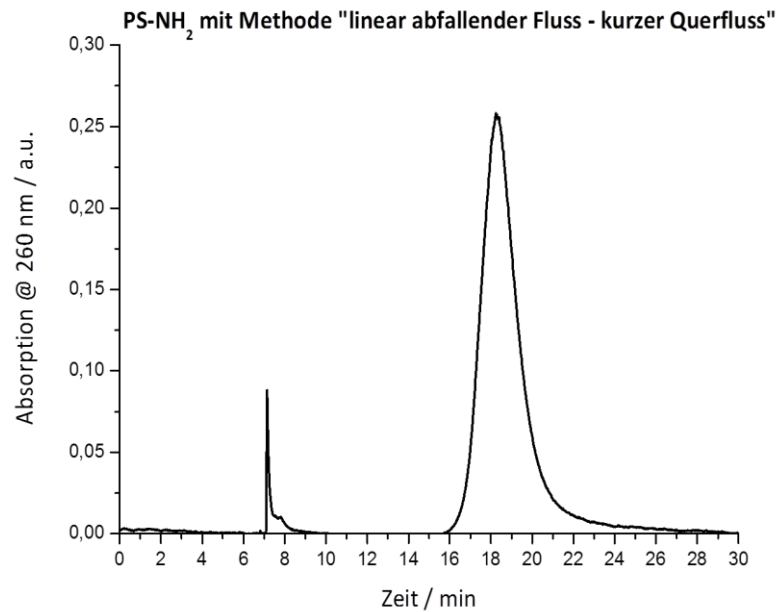


Abb. 16: Retentionsverhalten der Aminopartikel.

Die Aminopartikel besitzen einen hydrodynamischen Radius von $\langle \frac{1}{R_h} \rangle_z^{-1} = (55 \pm 6)$ nm.

Die mit Lutensol stabilisierten Polystyrol-Partikel (PS-Lut) weisen zwar eine ähnliche Retentionszeit auf wie die Aminopartikel und besitzen einen hydrodynamischen Radius von $\langle \frac{1}{R_h} \rangle_z^{-1} = (81 \pm 8)$ nm, ergeben allerdings ein sehr ungleichmäßiges Signal. (Abb. 17) Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit besprochenen Trennungen von Partikeln und Proteinen mittels A4F auf PS-NH₂ beschränkt.

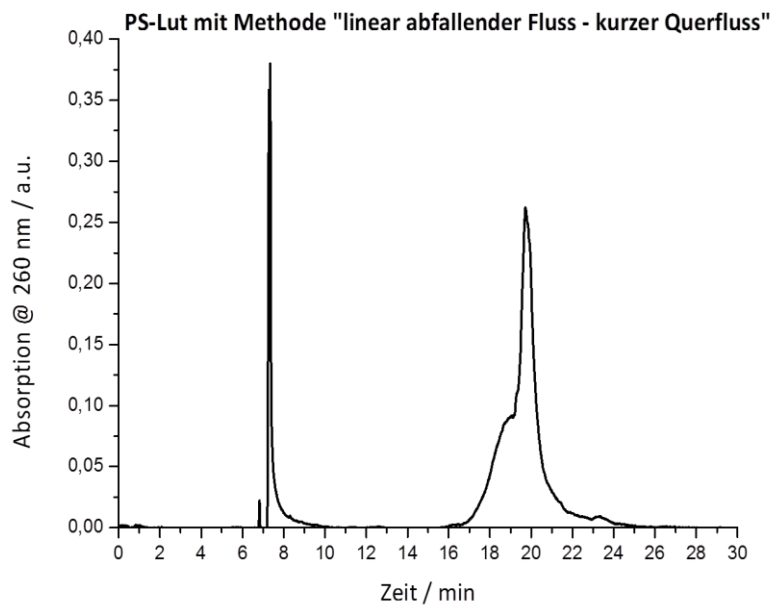


Abb. 17: Retentionsverhalten des unfunktionalisierten Polystyrolpartikels (PS-Lut).

3.1.2 Spülen der Membran mit Natriumhydroxid-Lösung

Bei den auf die Membran aufgegebenen Proteinen handelt es sich um HSA, bzw. Plasma, welches als Hauptbestandteil ebenfalls HSA enthält. Der isoelektrische Punkt von HSA beträgt 4,7.^[54] Das bedeutet, dass die Nettoladung des Proteins bei diesem pH-Wert nach außen hin neutral ist. Unter der Annahme, dass die Polysulfonether-Membran leicht negativ im Zusammenspiel mit den Proben wirkt, sollen die Proteine negativ geladen sein, um von der Membran abgestoßen zu werden und somit eine Adsorption der Proteine auf der Membran in jedem Fall zu unterbinden. Im Laufe der Versuche entstand häufig der Eindruck, dass die Membran größere Mengen Probe adsorbiert, deshalb wurde sie mit einem leicht basischen Flussmittel gespült. Es wurde eine NaOH-Lösung mit einem pH-Wert von ca. 8,5 verwendet. Dadurch sollte das HSA eine negative Ladung bekommen. Während dieses Spülens wurde ein extrem großes Signal im UV-Detektor sichtbar. Bei weiterem Spülen pendelte sich das Signal um die Basislinie ein. Somit war das System nach dem Spülen entweder frei von adsorbierten Proteinen und großen Aggregaten oder aber die Membran wurde „entsättigt“ und musste im Folgenden erst wieder mit genügend Material gesättigt werden, bis sich wieder ein reproduzierbares Signal ergab.

Mittels eines BCA-Assays wurde im Anschluss die Wiederfindungsrate der Proteine getestet. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.3 zu finden.

3.1.3 Proteinwiederfindungsrate

Da es beim Einspritzen von Partikeln mit adsorbierten Proteinen zu einer nicht reproduzierbaren, aber immensen Adsorption der Teilchen auf der Membran oder auch an anderen Orten des Systems kommt, wurde die Proteinwiederfindungsrate getestet.

Dazu wurde mehrmals eine definierte Menge Plasma injiziert und das Signal beobachtet. Außerdem wurde das gesamte Eluat aufgefangen um die Proteinmenge zu bestimmen, die das System wieder verlässt. Da die Probe in der A4F sehr stark verdünnt wird, wurden die Eluate vor der Proteinmengenbestimmung mittels Gefriertrocknung eingeengt.

Das Signal des injizierten Plasmas ist ab der ersten Injektion stabil, die Intensität nimmt aber nach einigen Durchläufen rapide ab, bis es sich kaum mehr als Signal definieren lässt. Die bei den ersten stabilen Durchgängen erhaltenen Proben weisen eine konstante Proteinmenge auf mit einer Wiederfindungsrate von ca. 76%.

In Tabelle 2 sind die genauen Werte zusammengefasst. Durch Integrieren der Signalflächen wird klar, dass das Signal mit zunehmenden Durchläufen einbricht und auch die erhaltene Proteinmenge steht in keinem Verhältnis mehr zu denen, die sich bei den Durchgängen 1-5 ergeben. Auch im erhaltenen Elugramm (Abb. 18) ist das deutlich zu erkennen.

Tabelle 2: Signalfläche und Proteinmenge des injizierten Plasmas nach A4F.

	Integral des Signals	Masse Protein / mg	% bezogen auf injizierte Menge
1. Injektion	0,91	5,2	79
4. Injektion	0,64	5	76
5. Injektion	0,56	4,9	74
7. Injektion	0,057	0,36	5

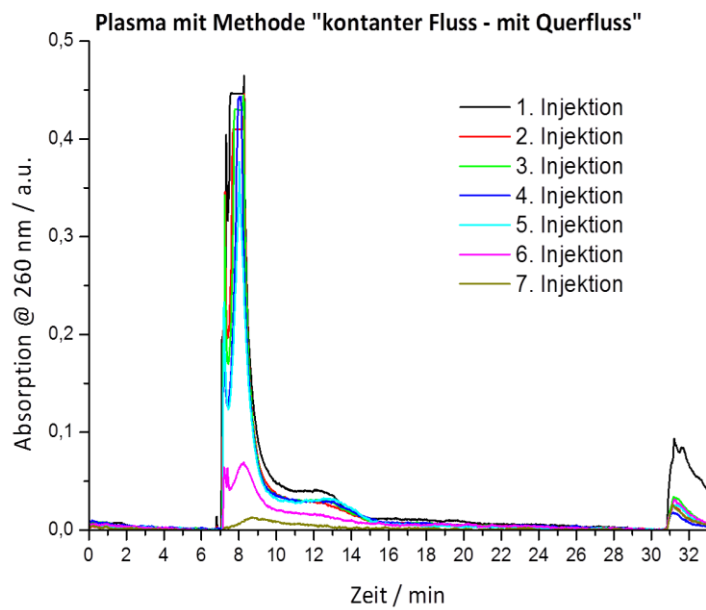


Abb. 18: Elogramm von konzentriertem Plasma bei wiederholter Injektion. Dabei nimmt die Signalfläche ab, je häufiger die Probe injiziert wird.

Zu Beginn der Messung ist die Wiederfindungsrate damit sehr gut, nimmt aber im Laufe der Zeit rapide ab.

Zukünftig wäre es aus diesem Grund sinnvoll, nach routinemäßig einsetzbaren Waschschritten zu suchen und diese anzuwenden. Eventuell eignet sich bereits der Waschschriff mit einer schwach basischen Natriumhydroxid-Lösung, wie in Kapitel 3.1.2 bereits beschrieben. Dies muss aber weiter untersucht werden. Des Weiteren wäre der Einsatz eines internen Standards zu empfehlen um die Qualität der Messung unbekannter Substanzen zu gewährleisten.

3.1.4 Membran mit PAH beschichten

Aufgrund der hohen Affinität der PES-Membran zu den mit Protein beschichteten Partikeln wurde als Alternative eine mit Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH) beschichtete regenerierte Cellulose-Membran verwendet. Um zu überprüfen, ob sich das Retentionsverhalten auf der PAH-Membran verändert, wurden sowohl ein mit Plasma inkubierter Polystyrol-Standard mit einem Durchmesser von 40 nm, als auch eine Probe mit reinen Aminopartikeln injiziert. Beide dieser Proben wurden zuvor bereits mit der PES-Membran untersucht.

Wie in Abbildung 19 zu sehen, ist weder auf der PES-Membran noch auf der PAH-Membran ein Peak für die mit Plasma inkubierten Polystyrol-Standardpartikel zu erkennen, sondern lediglich ein Proteinsignal. Damit eignet sich die mit PAH beschichtete Membran nicht besser für die Elution der mit Plasma inkubierten Standardpartikel. In Abbildung 20 sieht man außerdem, dass sich die Retentionszeit der Aminopartikel durch die Beschichtung der Membran nicht verändert. Die Signalform ist dabei durch das Erreichen der oberen Detektionsgrenze des UV-Detektors zu erklären.

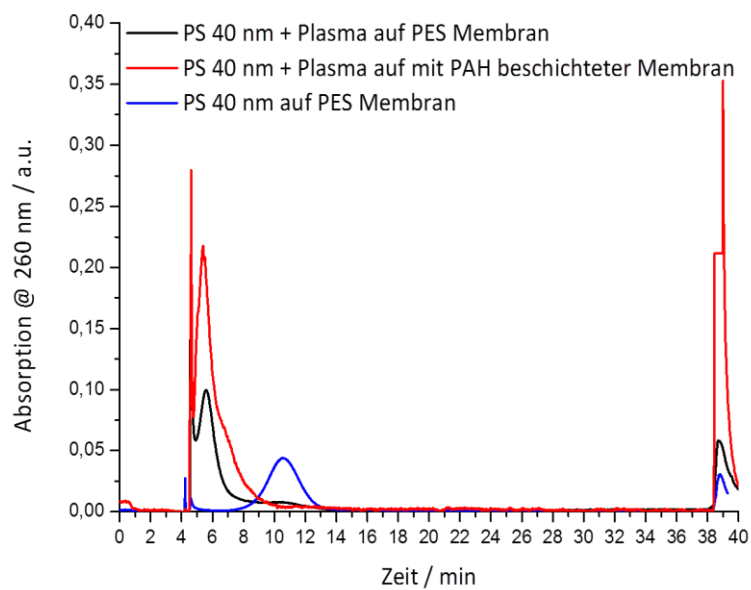


Abb. 19: Retentionsverhalten des mit Plasma inkubierten PS 40 nm Partikels auf der mit PAH beschichteten Membran im Vergleich zu dem Retentionsverhalten der Probe auf der PES Membran. Es ist kein signifikanter Unterschied im Retentionsverhalten zu erkennen.

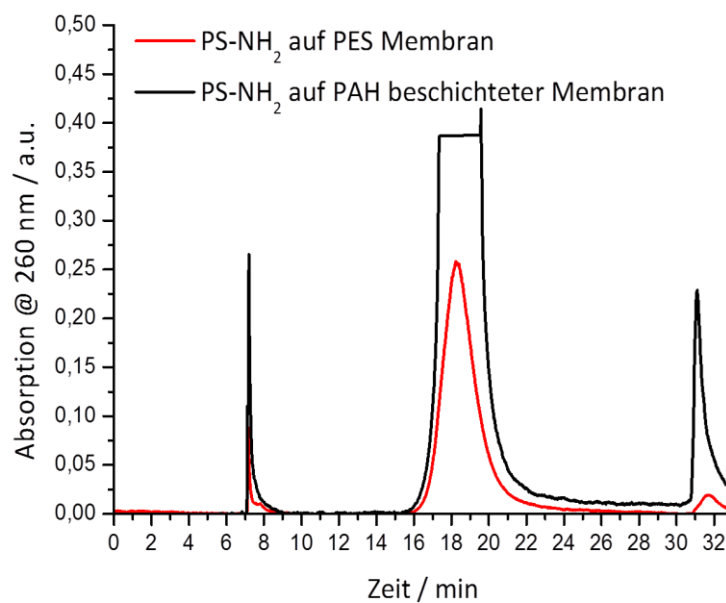


Abb. 20: Retentionsverhalten des Aminopartikels auf der mit PAH beschichteten Membran im Vergleich zu dem Retentionsverhalten der Probe auf der PES Membran. Die Retentionszeit bleibt dabei gleich, nur die Signalfäche variiert.

Damit verfügt die PAH-Membran über keinerlei Vorteile gegenüber der PES-Membran. Aus diesem Grund wurde die PES-Membran für alle Versuche verwendet.

3.2 Analytik von Protein-Partikel-Interaktionen

Bei Blutplasma handelt es sich um ein hochkomplexes Gemisch verschiedenster Proteine. Dadurch unterliegt dieses System besonders vielen Einflussfaktoren und unterscheidet sich von Mensch zu Mensch. Neben diesem Verhalten in Plasma wurden die Partikel auch in Gegenwart von reinem Serumalbumin untersucht. Bei Albumin handelt es sich um ein wichtiges Transportprotein. Dieses macht ca. 50% aller Plasmaproteine aus.^[55]

3.2.1 Effekt der Verdünnung auf die Aggregatbildung

Laut Ashby *et al.* wird die Probe in der A4F so massiv verdünnt, dass sich die Proteinkorona verändert. Durch die ständige Verdünnung mit frischem Laufmittel stellt sich zu jedem Zeitpunkt in der A4F ein neues Gleichgewicht ein. Dies kann dazu führen, dass die weiche Korona, die nur schwach gebunden ist, langsam entfernt wird.^[56,57]

Um den Einfluss der Verdünnung auf die Aggregatbildung zu untersuchen, wurde eine Partikel-Lösung (PS-Lut) mit Plasma inkubiert und anschließend in der dynamischen Lichtstreuung gemessen. Diese Lösung wurde schrittweise immer weiter verdünnt und die Veränderungen der Aggregatgröße eruiert. Stimmt es, dass die weiche Korona mit zunehmender Verdünnung abgewaschen wird, so sollte hier eine Größenveränderung zu erkennen sein. Die Partikel aggregieren im Plasma zu großen Aggregaten, die den Radius eines einzelnen Partikels weit überschreiten. Somit ist es nicht möglich ein einzelnes Partikel mit weicher Korona zu beobachten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht Verdünnungsreihe PS-Lut + Plasma.

Konzentration Partikel / mg/mL	Konzentration Protein / mg/mL	R _h Aggregat / nm	Intensität bei 60° Aggregat / %
0,01	60	167 ± 17	15,2
0,01	1,1	216 ± 22	65,1
0,005	0,55	167 ± 17	51,52
0,001	0,11	238 ± 24	46,5
Über Nacht bei 4 °C gelagert			
0,001	0,11	637 ± 64	80,6
0,0005	0,055	444 ± 44	83,0
0,0001	0,011	422 ± 42	79,4

Vergleicht man die Aggregation bei einer Plasmakonzentration von 60 g/L und 1,1 g/L, so fällt auf, dass die Aggregate in höher konzentriertem Plasma einen wesentlich geringeren Prozentsatz an der Gesamtintensität ausmachen. Das liegt daran, dass im ca. 60-fach höher konzentrierten Plasma die Konzentration der freien Proteine wesentlich höher ist und somit stammt die meiste Streuintensität hierbei von den freien Proteinen. Werden Plasma und Partikel in gleichem Maße weiter verdünnt, so ist die Größe des Aggregats weitestgehend konstant. Auch die Intensitätsprozente, die von den Aggregaten ausgehen, variieren nur wenig. Das Aggregat, hat es sich einmal gebildet, scheint also bei zunehmender Verdünnung konstant zu sein.

Wird die Probe aber über Nacht bei 4 °C gelagert, so verändert sich das Aggregationsverhalten. Der hydrodynamische Radius steigt dabei um mehr als das Doppelte an. Der Anteil an Aggregaten in Lösung steigt ebenfalls, was sich an der gestiegenen Streuintensität ablesen lässt.

Daraus ergibt sich, dass das Aggregationsverhalten des Partikels in Plasma durchaus zeitabhängig ist. Die Verdünnung scheint dahingegen aber keinen Einfluss auf das Aggregat auszuüben. Damit kann angenommen werden, dass die Verdünnung in der A4F auch keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten haben sollte und kann diesbezüglich für das vorliegende Trennproblem verwendet werden.

3.3 Trennung der freien Proteine von Partikel mit Proteinkorona mit A4F

3.3.1 Polystyrol-Standardpartikel mit HSA

Die Polystyrol-Standards mit den Durchmessern 20 nm, 40 nm, 80 nm und 125 nm wurden wie oben beschrieben mit HSA inkubiert. Nach dieser Inkubation kann davon ausgegangen werden, dass sich eine vollständige Proteinkorona ausgebildet hat.^[58] Zunächst wurden die unaufgereinigten Partikel mit Proteinkorona in Lösung mit Proteinüberschuss in der Lichtstreuung gemessen und auf existierende Aggregate hin untersucht (Abb. 21).

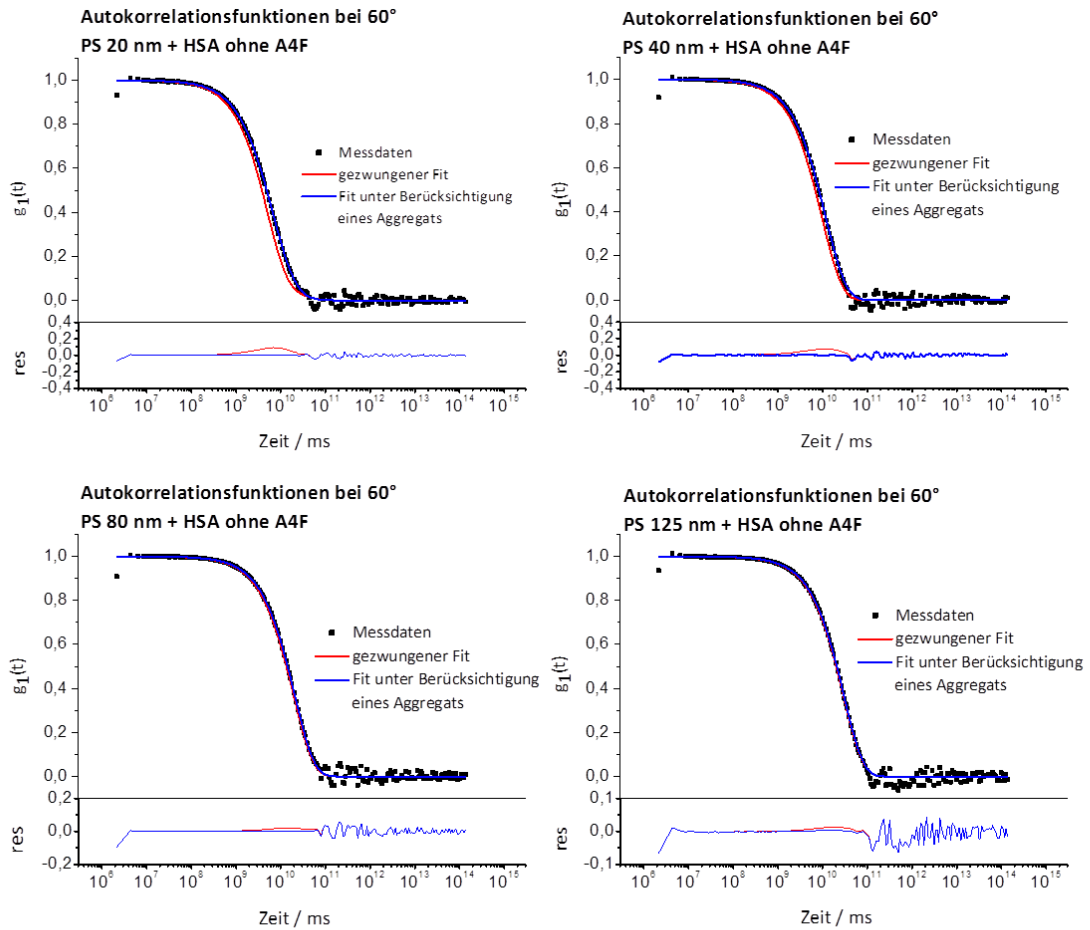


Abb. 21: Autokorrelationsfunktionen der Polystyrol-Standardpartikel, inkubiert mit HSA und ohne weitere Aufreinigungsschritte. Bei allen Proben ist eine, wenn auch nicht besonders ausgeprägte, Aggregatbildung zu beobachten.

Aus Tabelle 4 geht hervor, dass die Radien um ca. 10 nm zunehmen, wenn die entsprechende Partikelprobe mit HSA inkubiert wird. Da diese Größenzunahme bei allen verwendeten Partikeln konstant ist und auch knapp den Fehlerbereich überschreitet, gleichzeitig die Größe bei weitem nicht um das Doppelte zunimmt, muss angenommen werden, dass es sich hier um keine echten Aggregate handelt. Stattdessen wird das einzelne Partikel mit Proteinkorona sichtbar.

Tabelle 4: Radien der PS-Standard-Partikel ohne und mit HSA.

	R _h reiner Partikel nach A4F / nm	ζ-Potential Partikel nackt / mV	R _h Aggregat in Partikel-HSA-Mischung vor A4F / nm	ζ-Potential Partikel + HSA, Mischung / mV	R _h Aggregat in Partikel-HSA-Mischung nach A4F / nm
PS20+HSA	11 ± 1	-39	24 ± 2	-4	18 ± 2
PS40+HSA	20 ± 2	-38	31 ± 3	-9	31 ± 3
PS80+HSA	38 ± 4	-43	49 ± 5	-11	50 ± 5
PS125+HSA	54 ± 5	-42	69 ± 7	-29	75 ± 8

Es zeigt sich, dass das ζ-Potential der Standard-Polystyrolpartikel durch die Inkubation mit HSA in der Mischung abnimmt.

Werden die mit HSA inkubierten Proben nun in die A4F injiziert, so ergeben sich die Elugramme aus Abbildung 22-25.

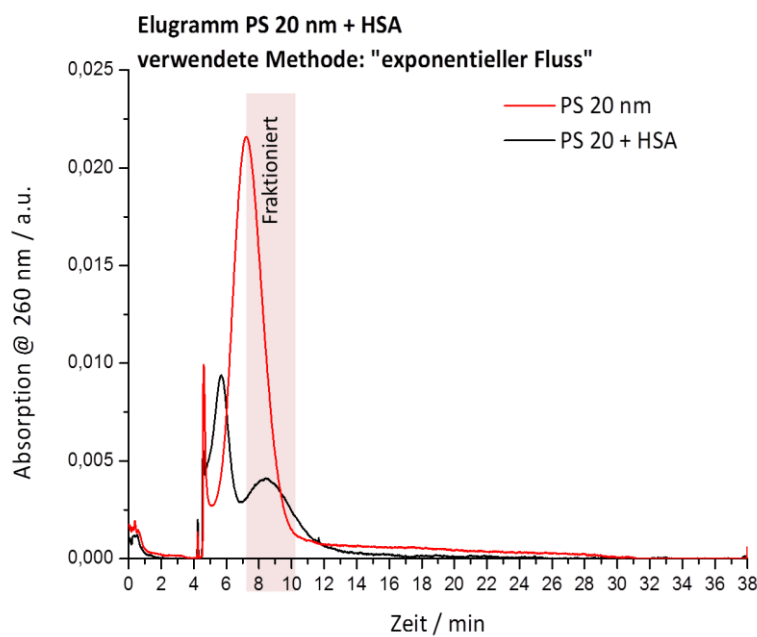


Abb. 22: Elogramm von PS 20 nm + HSA.

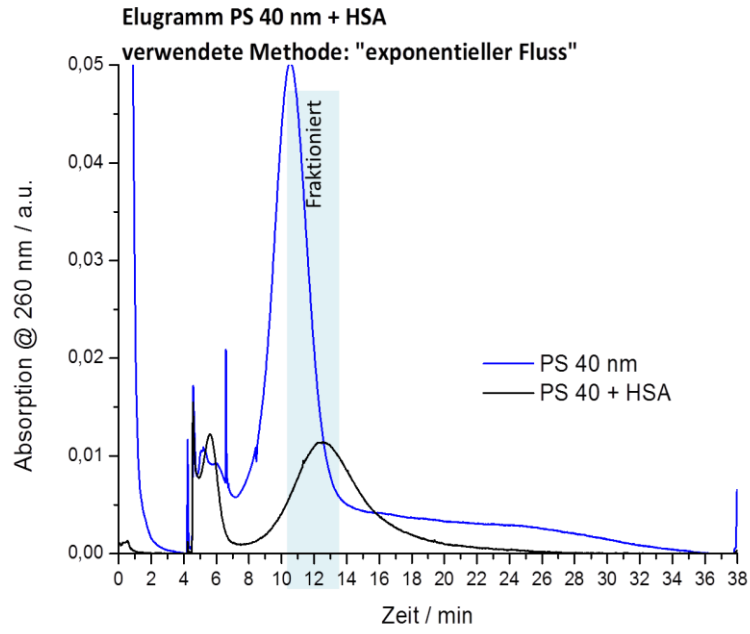


Abb. 23: Elugramm von PS nm + HSA.

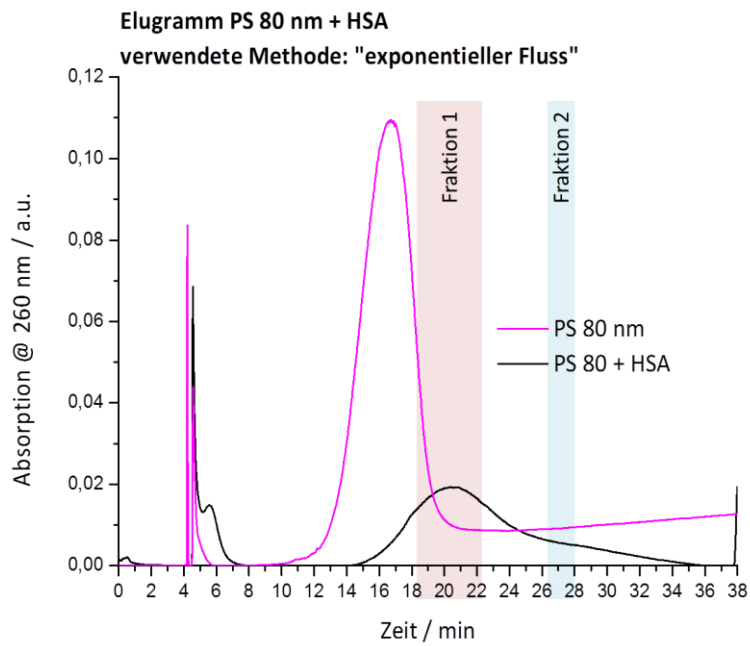


Abb. 24: Elugramm von PS 80 nm + HSA.

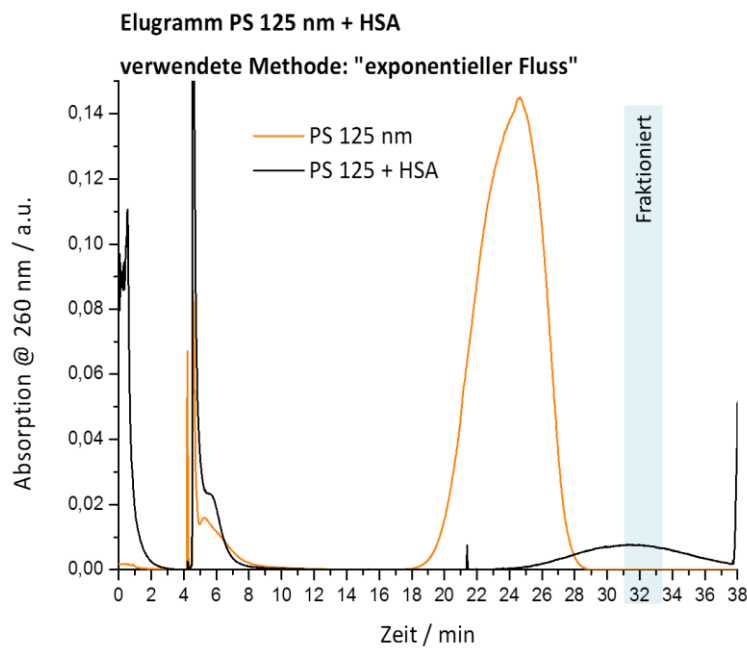


Abb. 25: Elugramm von PS 125 nm + HSA.

Die mit HSA behandelten Partikel verhalten sich ganz offensichtlich anders im Trennkanal als die reinen Polystyrol-Partikel. Zum Ersten ist ganz zu Beginn (Minute 3,5-7) ein größeres Signal zu sehen als bei den reinen Partikeln. Dabei muss es sich um freies HSA handeln. Dieses verfügt über einen hydrodynamischen Radius von ca. 3,5 nm und damit ist nicht davon auszugehen, dass das Protein durch den angelegten Querfluss auffällig zurückgehalten wird.

Zum Zweiten fällt auf, dass sich der vermeintliche Partikel-Peak bei allen injizierten Proben zu längeren Retentionszeiten verschoben hat. Das liefert einen Hinweis darauf, dass sich der Partikel um die Größe der Proteinkorona vergrößert hat und so der Querfluss die Probe weiter an die Akkumulationswand drückt, wodurch sie langsamer fließt als der Partikel ohne Korona, der entsprechend kleiner ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Lichtstreuung überein.

Zum Zeitpunkt des zweiten Peaks wurde immer eine Fraktion genommen und mittels der Lichtstreuung der hydrodynamische Radius bestimmt.

Dass diese kleinen Aggregate definitiv vorhanden sind, lässt sich deutlich aus den Korrelationsfunktionen ablesen, wie in Abbildung 26 deutlich zu erkennen ist.

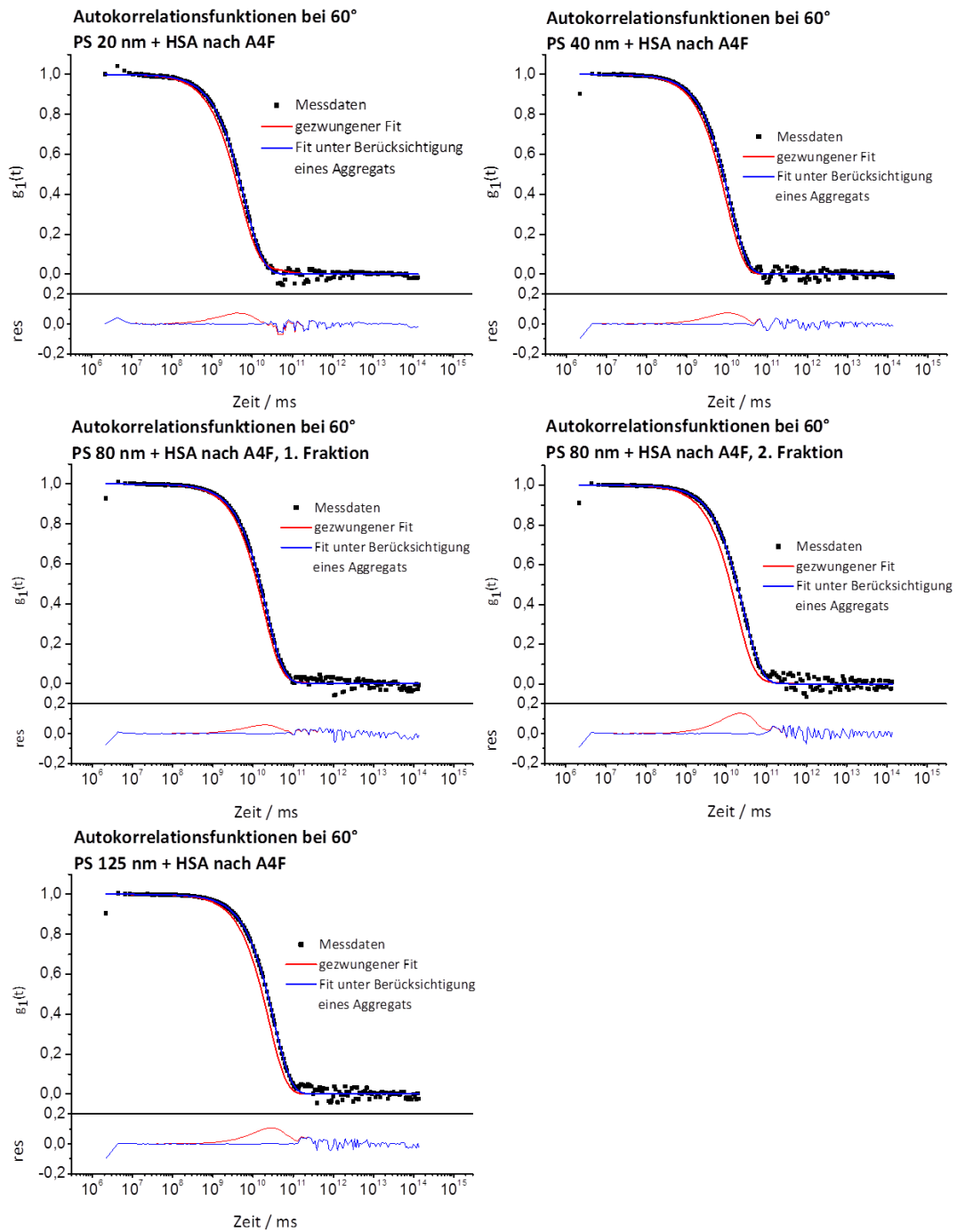


Abb. 26. Autokorrelationsfunktionen der mittels A4F erhaltenen Fraktionen von den mit HSA inkubierten Polystyrol-Standardpartikeln. Auch nach der Auftrennung in der A4F sind in jeder genommenen Fraktion Aggregate zu erkennen.

Aus Tabelle 4 geht ebenfalls hervor, dass die hydrodynamischen Radien vor und nach der A4F identisch sind. Damit zeigt dieses Experiment, dass die A4F das Partikel mit Korona offensichtlich nicht verändert.

Besonderes Augenmerk liegt auf der Frage, ob sich in der Fraktion mit den Aggregaten noch freies Protein befindet. Ziel ist es, das freie Protein komplett abzutrennen. Werden die Intensitätsprozente der verschiedenen Prozesse in der Lichtstreuung betrachtet, so zeigt sich, dass dies gelungen ist (Abb. 27).

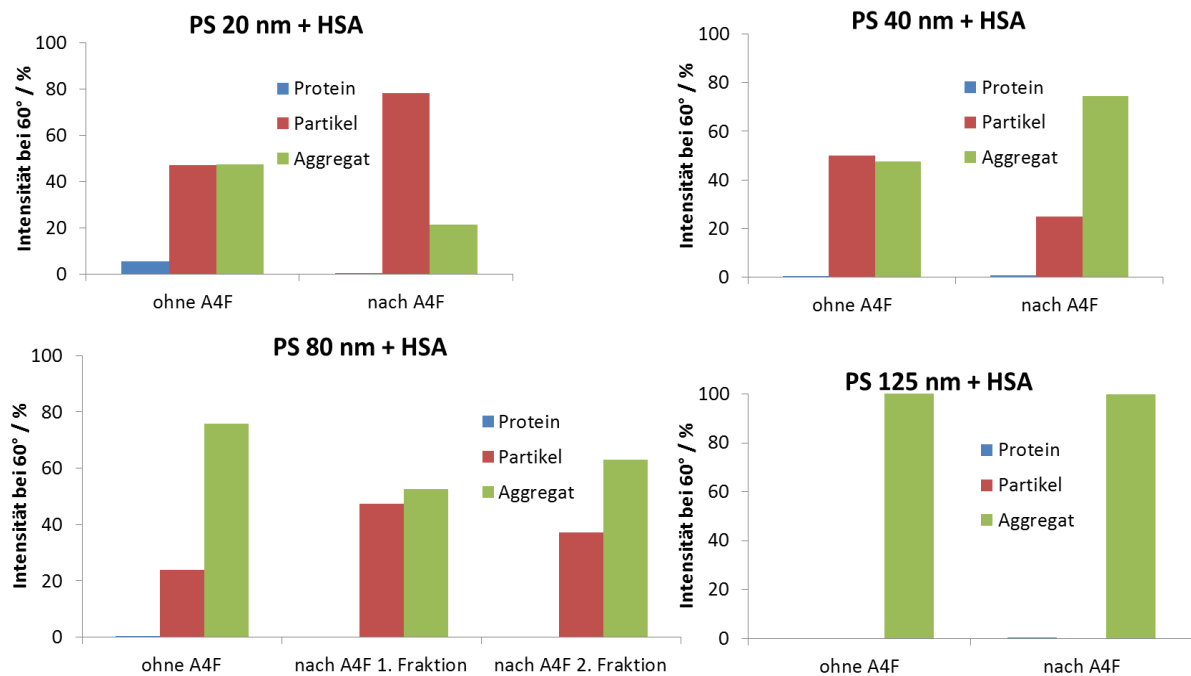


Abb. 27: Intensitätsprozente der mit HSA inkubierten Polystyrol-Standardpartikel vor und nach Aufreinigung mittels A4F. Vor der Aufreinigung sind kaum freie Proteine zu erkennen, da die Intensität der Partikel und Aggregate überwiegt. Aber auch nach der Aufreinigung sind keine freien Proteine zu erkennen.

Da sich der Radius des Aggregats nicht sehr stark von dem Radius des reinen Partikels unterscheidet, ist es möglich, dass die Software zum Auswerten die kleinen Aggregate den großen Partikeln zugeordnet hat. Dies kann ein Grund sein, warum der Partikel-Anteil bei den meisten Proben noch relativ hoch ist. Theoretisch wird das Protein so im Überschuss eingesetzt, dass die Oberfläche jedes Partikels komplett von Protein besetzt sein kann. Allerdings gibt es keine Hinweise darauf, wie gleichmäßig die Partikel mit Proteinen bedeckt sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die entstandene Proteinkorona in der A4F erhalten bleibt und der Partikel mit Proteinkorona erfolgreich von den freien Proteinen abgetrennt wurde.

3.3.2 Polystyrol-Standardpartikel mit Plasma

Die im obigen Kapitel verwendeten Polystyrol-Partikel wurden ebenfalls mit Plasma inkubiert. Wurden die Partikel direkt nach der Inkubation in der dynamischen Lichtstreuung gemessen, ergaben sich ganz eindeutige Aggregate. Die Radien sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Radien der PS-Standard-Partikel ohne und mit Plasma.

	R_h Partikel nackt nach A4F / nm	R_h Aggregat vor A4F / nm	Intensität Aggregat bei 60° / %	R_h Aggregat nach A4F, 2. Fraktion / nm	Intensität Aggregat bei 90° / %
PS20 + Plasma	11 ± 1	173 ± 17	95	247 ± 25	16
PS40 + Plasma	20 ± 2	146 ± 15	94	-	-
PS80 + Plasma	38 ± 4	351 ± 35	91	-	-
PS125 + Plasma	58 ± 6	186 ± 19	93	263 ± 26	53

Die Eindeutigkeit der Aggregate bestätigt sich auch bei Betrachtung der Korrelationsfunktionen in Abbildung 28.

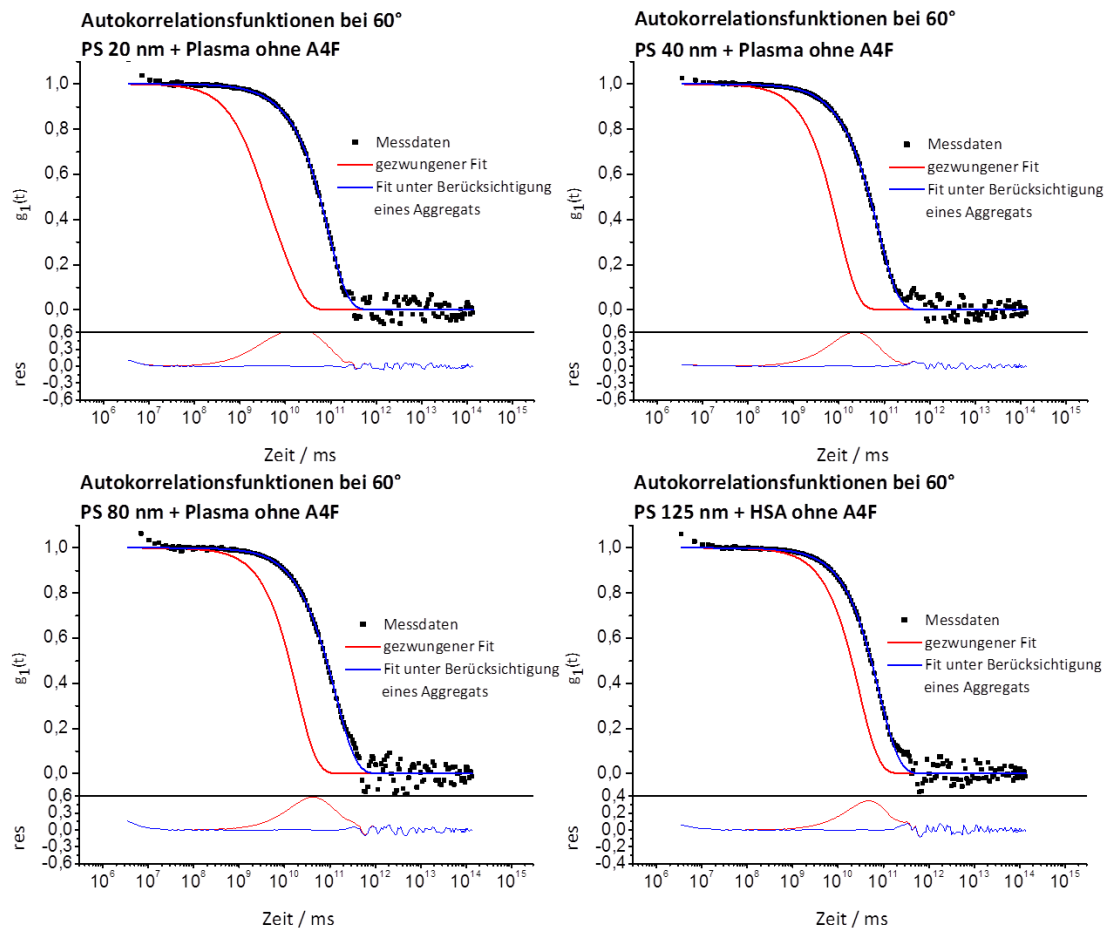


Abb. 28: Autokorrelationsfunktionen der mit Plasma inkubierten Polystyrol-Standardpartikel vor weiteren Aufreinigungsschritten. Hier ist bei jedem Partikel eine sehr deutliche Aggregatbildung zu erkennen.

Im Gegensatz dazu sind in der A4F praktisch keine Aggregate mehr zu isolieren. Die Streuintensität der genommenen Fraktionen ist so gering, dass sich die erhaltenen Daten teilweise nicht mehr auswerten lassen, bzw. es ist kein Signal im UV-Detektor zu erkennen. Das kann daran liegen, dass die Aggregate sehr groß sind. In diesem Fall wäre allerdings zu erwarten, dass sie trotzdem den Trennkanal verlassen, zumindest wenn der Querfluss abgeschaltet ist und so keine Kraft die großen Aggregate mehr zurückhält. Die Chromatogramme sind in Abbildung 29-32 dargestellt. Die Größe der Aggregate scheint dazu geführt zu haben, dass sie das System nicht mehr verlassen haben, die Fraktionen wurden nur auf Verdacht genommen.

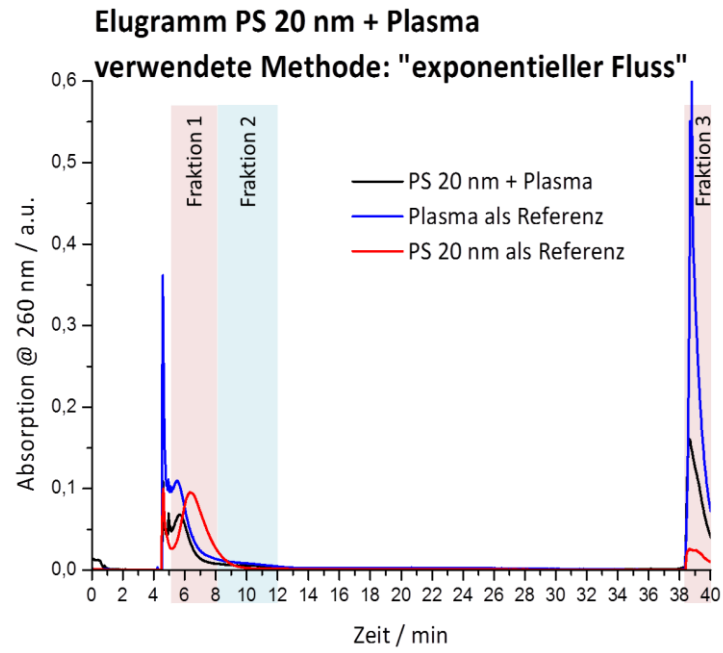


Abb. 29: Elugramm von PS 20 nm + Plasma.

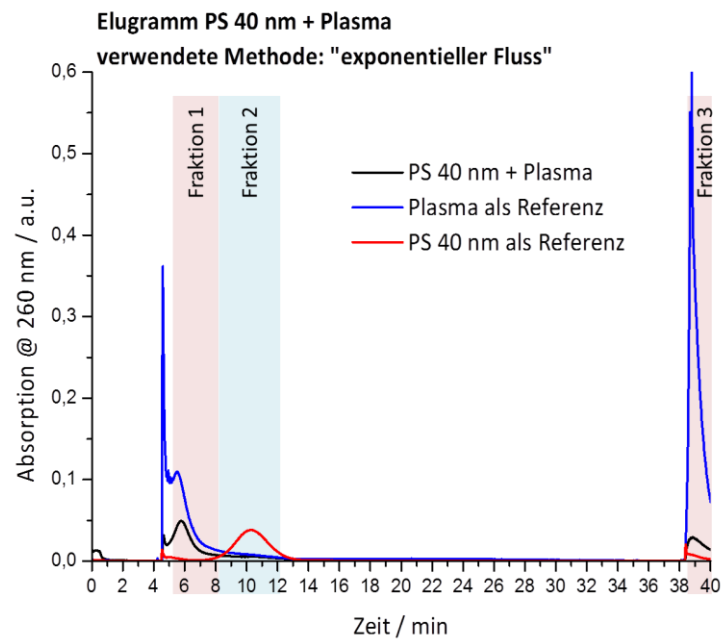


Abb. 30: Elugramm von PS 40 nm + Plasma.

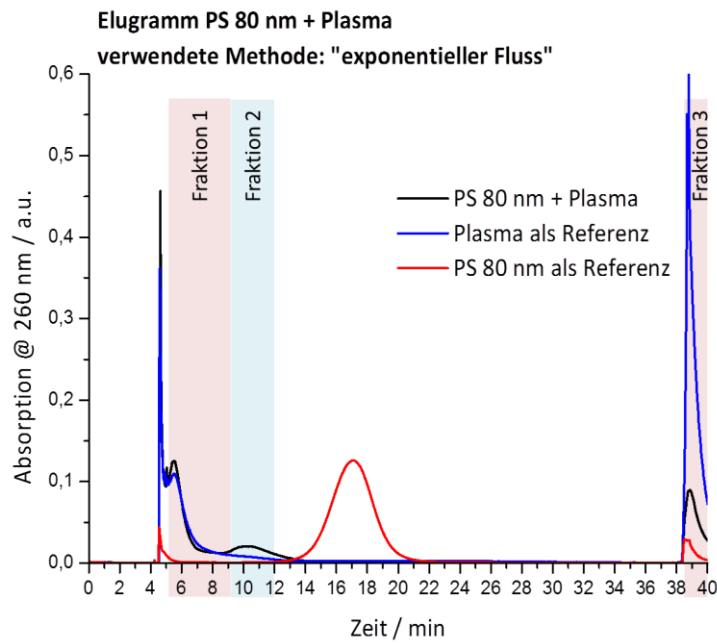


Abb. 31: Elugramm von PS 80 nm + Plasma.

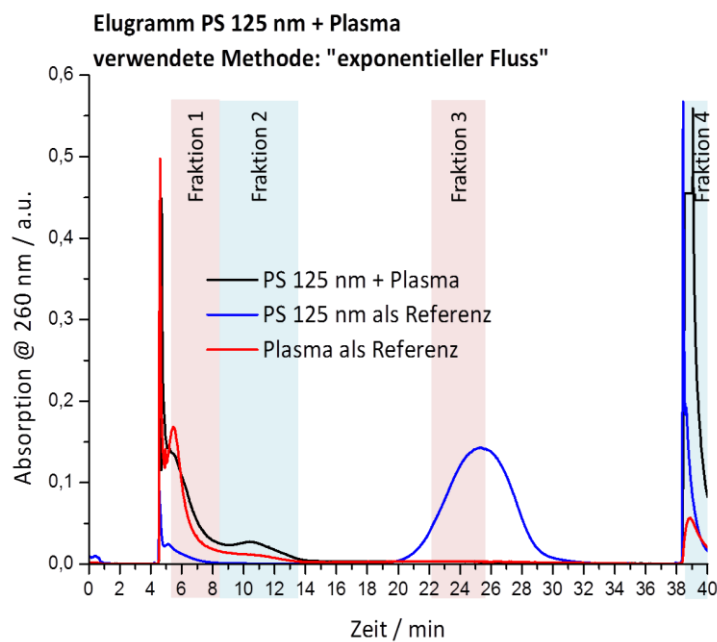


Abb. 32: Elugramm von PS 125 nm + Plasma.

Das System der Polystyrol-Standardpartikel mit Plasma ist deswegen ungeeignet für die weitere Analyse. In diesem Fall ist es nicht möglich den Partikel mit Korona oder ein Aggregat zu isolieren.

3.3.3 SDS-PAGE von Plasma verglichen mit Fraktionen von PS 125 nm + Plasma

Von den Fraktionen, die aus dem Lauf von PS 125 nm mit Plasma genommen wurden, wurde eine SDS-PAGE angefertigt. Zum Vergleich wurde fraktioniertes Plasma daneben aufgetragen. Das Chromatogramm des fraktionierten Plasmas ist in Abbildung 33 dargestellt und das Gel in Abbildung 34.

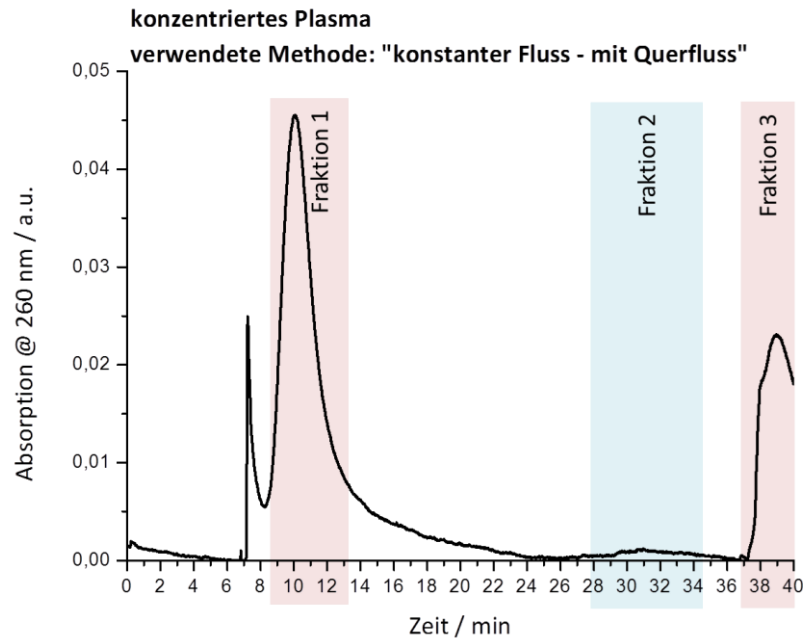


Abb. 33: Eluogramm von konzentriertem Plasma.

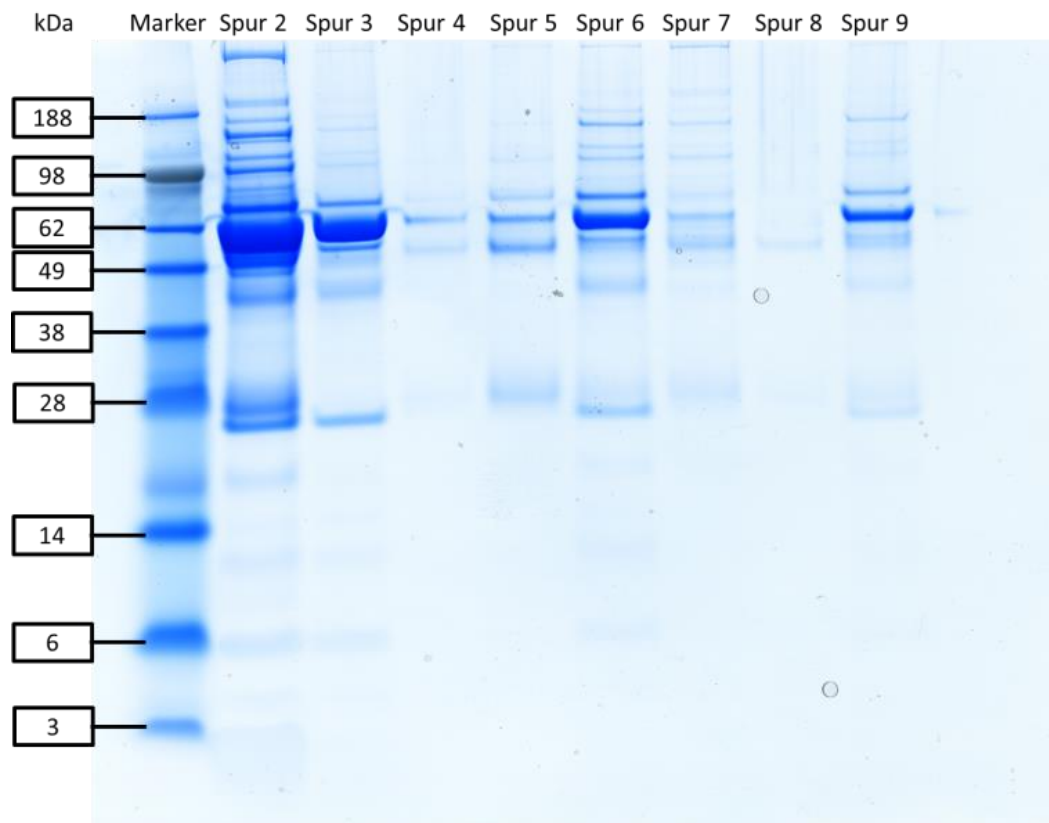


Abb. 34: SDS-PAGE von fraktioniertem Plasma und den Fraktionen von PS 125 nm + Plasma im Vergleich.

Spur 2:	Plasma
Spur 3:	Plasma nach A4F, 1. Fraktion, m(Protein) = 1,19 mg
Spur 4:	Plasma nach A4F, 2. Fraktion, m(Protein) = 0 mg
Spur 5:	Plasma nach A4F, 3. Fraktion, m(Protein) = 0,317 mg
Spur 6:	PS 125 nm + Plasma nach A4F, 1. Fraktion, m(Protein) = 3,2 mg
Spur 7:	PS 125 nm + Plasma nach A4F, 2. Fraktion, m(Protein) = 0,032 mg
Spur 8:	PS 125 nm + Plasma nach A4F, 3. Fraktion, m(Protein) = 0 mg
Spur 9:	PS 125 nm + Plasma nach A4F, 4. Fraktion, m(Protein) = 0,19 mg

Bei diesem Versuch wird klar, dass die Fraktionen des Laufs von PS 125 mit Plasma denen des reinen Plasmas ähnlich sind, besonders Spur 3 und 6. Allerdings ist unklar, ob tatsächlich Partikel in einer Fraktion zu finden war. Um ein eindeutigeres Ergebnis zu erhalten sind weitere Untersuchungen notwendig. Die 3. Fraktion des PS 125 + Plasma-Laufs wurde genommen für den Fall, dass der UV-Detektor kein Signal anzeigt. In Spur 8 ist zu sehen, dass diese Fraktion entweder keine Proteine enthält oder aber die Konzentration der aufgetragenen Proteine zu gering ist, um in der SDS-PAGE gesehen zu werden. Spur 6, 7 und 9 sind entsprechend ähnlich zu Spur 3, 4 und 5. In der ersten Fraktion dominiert jeweils HSA bei 60 kDa. Das zeigt erneut, dass es sich bei dem ersten Signal im UV-Detektor um das HSA-Signal handelt, auch beim Einsatz von Plasma. In den Spuren 3, 4, 5, 7 und 9 ist jeweils noch ein Rest HSA zu erkennen, welches in Spur

8 nicht mehr zu sehen ist. Im Waschschrift sind in beiden Fällen die gleichen Proteine zu erkennen. Diese sind teilweise auch im gleichen Größenbereich wie HSA. Sie sollten den Trennkanal deswegen schon zu Beginn des Laufs verlassen haben und nicht erst zum Schluss. Der Unterschied der Waschschrift beider Proben ist, dass die Bande bei 70 kDa in Spur 9 deutlich stärker ausgeprägt ist. Eventuell wurde ein geringer Anteil an Partikel mit Proteinkorona in diesem Schritt aus dem System gespült. Die stärker ausgeprägte Bande stammt dann von Protein, das auf den Partikel adsorbiert hat.

3.3.4 Vergleich A4F und Zentrifugation

Die bisher gängige Methode um freie Proteine von Partikeln mit Korona zu trennen ist die Zentrifugation. Dabei wird angenommen, dass die weiche Korona abgeschert wird und somit nur noch die harte Korona untersucht werden kann. Um die Zentrifugation mit der A4F zu vergleichen, wurde der gleiche Ansatz wie für die A4F mit HSA vorbereitet, aber anschließend wurden die freien Proteine abzentrifugiert und anschließend folgten 3 Waschschrift. Dazu wurde das Pellet in PBS resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert.

Problematisch dabei ist, dass sich nur die 80 nm und die 125 nm Partikel überhaupt zentrifugieren lassen. Selbst bei diesen großen Partikeln ist ganz offensichtlich noch Partikel im Überstand vorhanden. Somit geht viel Material verloren. Da sich noch Partikel mit Proteinkorona im Überstand befinden, der abgenommen wird, ergibt sich unter anderem eine fälschlicherweise niedrigere Proteinkonzentrationen.

Die Partikel wurden mit HSA inkubiert und die so vorbereiteten Proben ergeben in der Lichtstreuung die Radian (in Tabelle 6 aufgezeigt):

Tabelle 6: Vergleich der Radien der Aggregate nach A4F und Zentrifugation.

	R _h Aggregat vor A4F / nm	R _h Aggregat nach A4F / nm	R _h Aggregat nach 1. Zentrifugation / nm	R _h Aggregat nach 2. Zentrifugation / nm	R _h Aggregat nach 3. Zentrifugation / nm
PS 80 nm + HSA	49 ± 5	50 ± 5	70 ± 7	102 ± 10	61 ± 6
PS 125 nm + HSA	69 ± 7	75 ± 8	117 ± 12	146 ± 15	94 ± 9

Die durch Zentrifugation erhaltenen Aggregate sind größer als die Aggregate in der Lösung oder die, die in der A4F vom freien Protein abgetrennt wurden. Der Grund dafür wird sein, dass im Pellet, das durch Zentrifugation entsteht, viele Aggregate entstehen. Diese Aggregation ist aber kein natürlicher Vorgang, sondern kommt durch die Kräfte zustande, die in der Zentrifuge auf die Probe wirken. Allerdings lässt sich kein eindeutiger Trend erkennen was die Aggregatgröße betrifft, wenn die Anzahl der Zentrifugationsdurchgänge erhöht wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass nach drei Waschschritten kein Protein mehr im Überstand zu finden ist.^[22]

Um die Proteinzusammensetzung zu untersuchen, wurden die Polystyrolpartikel mit Plasma inkubiert und die freien Proteine wurden abzentrifugiert. Davon wurde eine SDS-PAGE angefertigt. Diese ist in Abbildung 35 zu sehen.

bestimmt werden konnte, so konnte in diesem Versuch dennoch gezeigt werden, dass sich die Größe des Aggregats durch A4F und Zentrifugation verändert. In beiden Fällen werden sie größer, besonders bei der Zentrifugation. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es bezüglich der Zusammensetzung der Proteinkorona keine Rolle spielt, welchen Radius das verwendete Polystyrolpartikel besitzt.

3.3.5 Aminopartikel mit HSA

Die Aminopartikel wurden ebenfalls mit HSA als Einzelprotein inkubiert. In diesem Fall ergeben sich für die Aggregate der inkubierten Mischung ohne Trennschritte besonders kleine Aggregate. Diese liegen noch im Fehlerbereich des Partikels. Auch im Vergleich der Fits der Korrelationsfunktion ist das Aggregat nur sehr klein (Abbildung 37). Unklar ist dagegen, warum das ζ -Potential des Aminopartikels negativ ist. Durch die Aminofunktionalisierung sollten sie eine positive Oberflächenladung aufweisen. Das Elugramm der Aminopartikel mit Plasma ist in Abbildung 36 zu sehen; die Eigenschaften sind in Tabelle 7 aufgeführt.

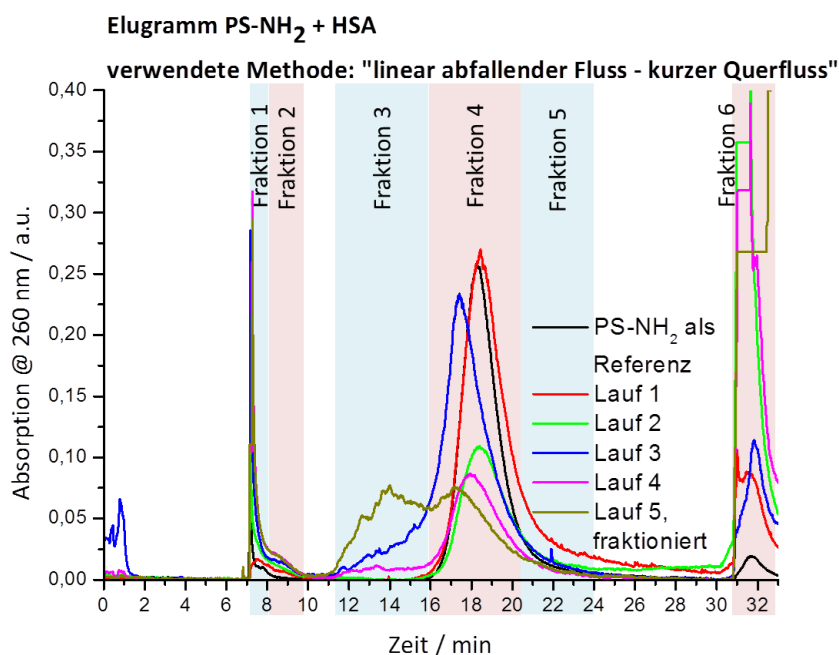


Abb. 36: Elugramm der Aminopartikel, mit HSA inkubiert. Die Retentionszeit bleibt bei wiederholter Injektion gleich, wohingegen die Signalfäche variiert.

Tabelle 7: Eigenschaften des Aminopartikels mit HSA.

	R_h Partikel / nm	ζ -Potential Partikel vor A4F / mV	ζ -Potential Partikel nach A4F / mV	R_h Aggregat / nm	ζ -Potential Aggregat / mV
PS-NH ₂	56 ± 6	-25	-19	61 ± 6	-18

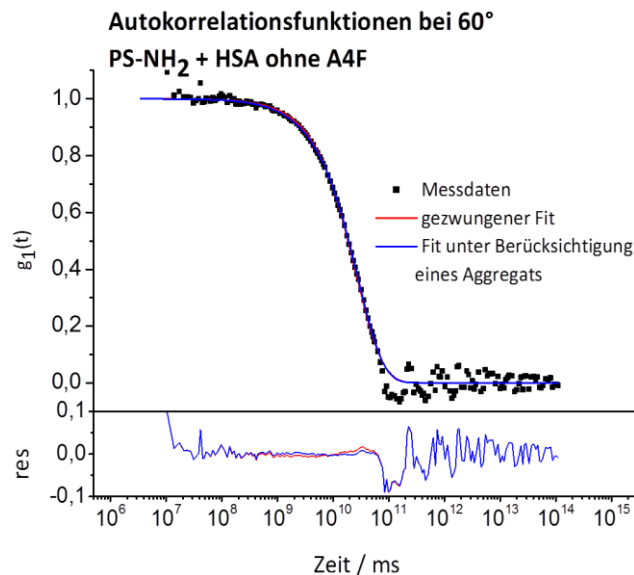


Abb. 37: Autokorrelationsfunktion der mit HSA inkubierten Aminopartikel vor Aufreinigung mittels A4F. Da der Fit mit Aggregatfunktion minimal besser zu den Datenpunkten passt, kann dies einen Hinweis auf ein kleines, aber nicht eindeutiges Aggregat geben.

Das Gemisch aus HSA und Partikel lässt sich auf der A4F auftrennen. Dabei ergibt sich ein wesentlich breiteres Signal, was darauf hindeutet, dass die Größenverteilung durch Inkubation mit HSA zunimmt.

Das Signal ist zwar reproduzierbar was die Retentionszeit betrifft, die Signalfläche allerdings nicht.

Auch hier wurde das Eluat fraktioniert. Dadurch ergeben sich für die Fraktionen die in Tabelle 8 gezeigten Werte.

Tabelle 8: Größe des Aggregats von PS-NH₂ + HSA der Fraktionen nach A4F.

	R _h Aggregat / nm	Intensität Aggregat / %
1. Fraktion	-	0
2. Fraktion	43 ± 4	10
3. Fraktion	69 ± 7	44
4. Fraktion	47 ± 5	39
5. Fraktion	58 ± 6	88
6. Fraktion	97 ± 10	3

Aus den Werten geht hervor, dass hier kein eindeutiges Aggregat vorliegt, die Radien der Aggregate befinden sich in fast allen Fällen im Fehlerbereich der Radien der Partikel. Teilweise sind die Radien der Aggregate sogar kleiner als die der Partikel. Diese Signale können von aggregiertem HSA stammen oder auch von zersetzten Partikel.

Die Auftrennung von dem mit HSA inkubierten Partikel hat sich insgesamt als sehr schwierig gestaltet und nicht zu sinnvollen Ergebnissen geführt. Diese Partikel-Protein-Kombination wurde aus diesem Grund nicht weiter untersucht.

3.3.6 Aminopartikel mit Plasma

Werden die Aminopartikel mit Plasma inkubiert, ergeben sich wie auch schon bei den Standard-Partikeln große Aggregate, allerdings sind die der Aminopartikel um ein Vielfaches größer. Das Aggregat hat einen hydrodynamischen Radius von $\langle \frac{1}{R_h} \rangle_z^{-1} = (476 \pm 48)$ nm und ist im Vergleich der Fits der Korrelationsfunktion mit und ohne Aggregat sehr deutlich zu erkennen (Abb. 38).

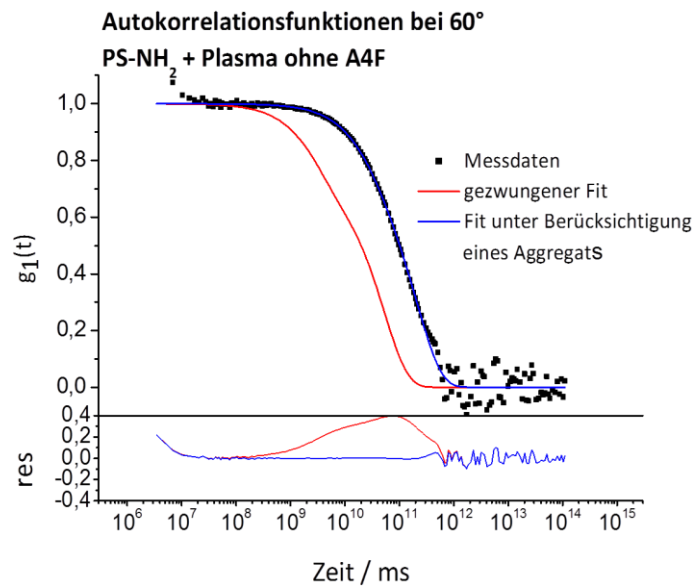


Abb. 38: Autokorrelationsfunktion der mit Plasma inkubierten Aminopartikel. Hier zeigt sich sehr deutlich die Bildung eines Aggregats.

Das Chromatogramm, das sich aus dem mit Plasma inkubierten Partikel ergibt, ist in Abbildung 39 zu sehen.

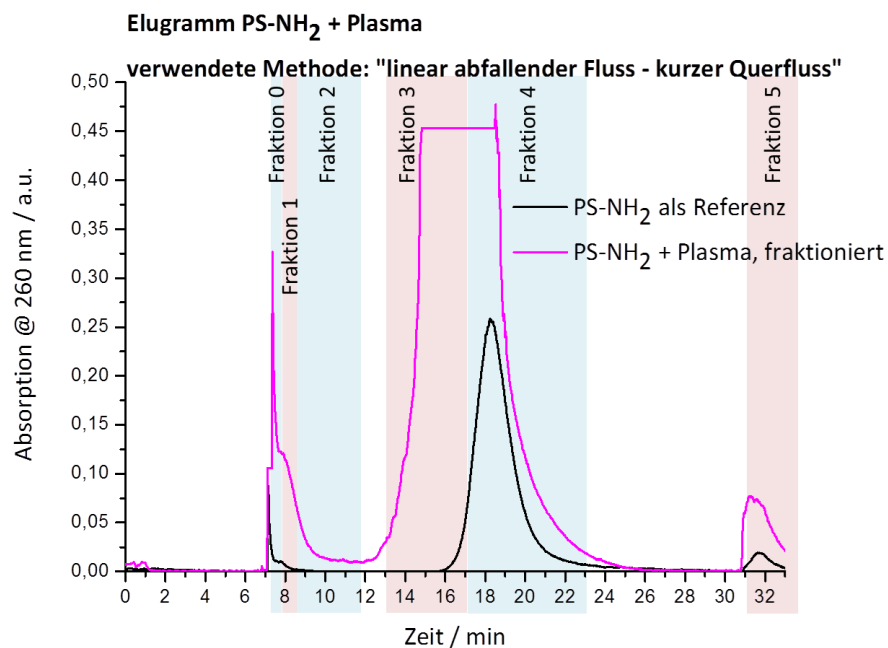


Abb. 39: Eluogramm der mit Plasma inkubierten Aminopartikel. Die Retentionszeit der Probe verändert sich durch die Inkubation dabei nicht, aber die Signalfäche vergrößert sich immens.

Hier verhält es sich ähnlich wie im Falle des Aminopartikels mit HSA. Zwar ist die Retentionszeit reproduzierbar, nicht aber die Signalfäche. Diese nimmt hier mit jeder Injektion zu. Dieses

Ergebnis widerspricht dem aus Kapitel 3.1.3, denn dort nimmt das Signal mit jeder Injektion ab. Hier dagegen scheint es sich um einen Sättigungseffekt der Membran zu handeln. Zu Beginn wird die Membran mit der Probe gesättigt und nur ein Teil der eingespritzten Probe verlässt den Trennkanal. Sobald die Membran aber vollständig gesättigt ist, kann die Probe komplett eluieren, was zu einem Anstieg der Signalfäche führt.

Es wurden diverse Fraktionen genommen und sowohl in der Lichtstreuung, als auch mittels SDS-PAGE untersucht. Die Größe der Aggregate der Fraktionen ist in Tabelle 9 aufgetragen.

Tabelle 9: Eigenschaften der Aggregate von PS-NH₂ + Plasma vor A4F und nach Fraktionierung.

	Rh Aggregat /nm	% Intensität bei 60°	ζ-Potential / mV
Ohne A4F	476	76	-25
1. Fraktion	110	71	-
2. Fraktion	84	74	-12
3. Fraktion	134	59	-14
4. Fraktion	136	57	-17
5. Fraktion	76	64	-12

Die 476 nm großen Aggregate sind nach der A4F nicht mehr zu finden. Sollte das Aggregat zu groß sein um den Trennkanal während des eingeschalteten Querflusses zu verlassen, so bleibt es zurück, sollte aber ab Minute 17 eluieren. Ab hier ist der Querfluss abgeschaltet und somit sollten alle Verbindungen im Kanal auch in der Lage sein, den Trennkanal zu verlassen. Es ergibt sich aber nur ein einziges Signal. Eventuell werden die besonders großen Aggregate abgetrennt, können das System aber insgesamt nicht mehr verlassen. Dahingegen verlassen die kleineren Aggregate den Trennkanal bei niedrigem oder ohne Querfluss.

Bei den Aggregaten in Fraktion 1 und 2 handelt es sich vermutlich um Protein-Oligomere. Hier waren in der A4F nur niedrige, bzw. sehr niedrige Signale zu erkennen. In Fraktion 1 kommen sehr viele Proteine auf einmal aus dem Trennkanal.

In Fraktion 3 und 4 sind eindeutige Aggregate zu sehen, die von den Partikeln stammen. Hier ist auch das Signal im UV-Detektor deutlich ausgeprägt. Diese Aggregate sind etwas mehr als doppelt so groß wie der nackten Partikel. Dabei wäre zu erwarten gewesen, dass ein Aggregat von dieser Größe im Vergleich zu reinen Partikeln zu deutlich späteren Retentionszeiten verschoben ist. Dies ist allerdings nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung dafür kann sein, dass die Partikel im Trennkanal nicht als Aggregate vorliegen. Nach der Fraktionierung befinden sie sich in einem statischen System und können dort ein neues Gleichgewicht zwischen Partikel mit Proteinkorona und Protein-Partikel-Aggregat einstellen. Eine weitere Erklärung für die

unverhältnismäßig frühe Elution des Aggregats ist, dass sich Proteine dieser komplexen Mischung auf der Membran anders verhalten als Partikel und die Aggregate wie Proteine eluieren, und nicht wie Partikel. Wahrscheinlicher ist es aber, dass das Signal nicht wirklich zu kürzeren Retentionszeiten hin verschoben ist, sondern es nur erscheint, weil der Peak um ein Vielfaches größer ist als das reine Partikelsignal.

Im Waschschrift (Fraktion 5) sind ebenfalls Aggregate zu sehen. Da in diesem Schritt alles aus dem System gespült werden soll, kann dieses Aggregat aus allem zusammengesetzt sein. Dabei ist es in erster Linie irrelevant, was in diesem Schritt eluiert, da sich Substanzen aus dem Waschschrift nicht zu einer Analyse eignen. Interessant ist allerdings, dass auch hier nicht die großen Aggregate zu sehen sind, die in der nicht aufgetrennten Lösung zu finden sind. Diese 476 nm großen Aggregate sind verloren gegangen. Möglicherweise wurden sie im Trennkanal durch die wirkenden Kräfte zerstört und existieren so nicht mehr. Möglich ist aber auch, dass sie im System hängen bleiben und dieses gar nicht mehr verlassen und so auch nicht mehr detektiert werden können.

Die erhaltenen Aggregate spiegeln sich in den Korrelationsfunktionen der genommenen Fraktionen wieder, auch wenn das große Aggregat fehlt (Abb. 40).

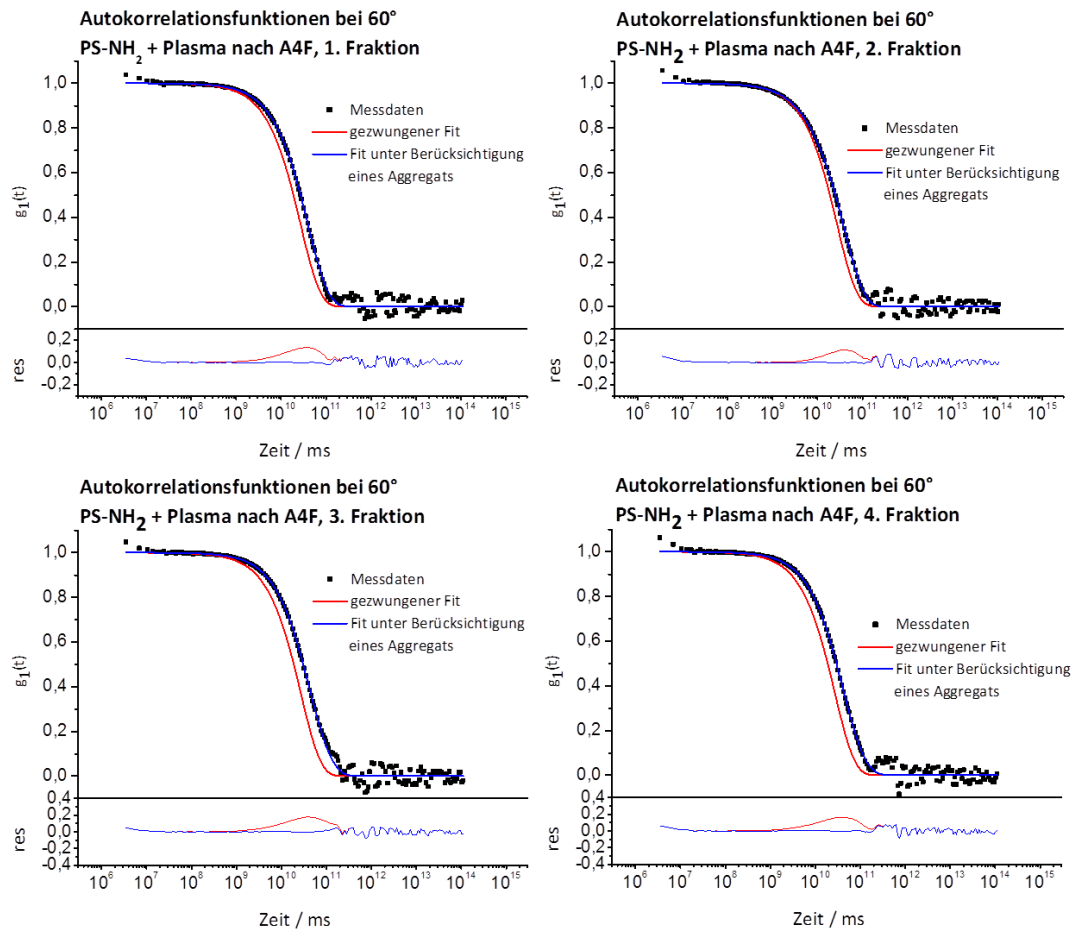


Abb. 40: Autokorrelationsfunktionen der mittels A4F erhaltenen Fraktionen der mit Plasma inkubierten Aminopartikel. Auch hier ist nach der Aufreinigung noch eine deutliche Aggregatbildung zu sehen.

Um einen Überblick zu erhalten, ob sich in den Fraktionen des Partikelaggregats noch freies Protein befindet, wurden die Intensitätsprozentage der Fraktionen gegeneinander aufgetragen (Abb. 41). In Abbildung 41 ist deutlich zu erkennen, dass in Fraktion 3 und 4 kein freies Protein mehr vorhanden ist. Damit konnte die Abtrennung des freien Proteins vom Partikel mit Protein erfolgreich erreicht werden. Dass in Fraktion 1 auch Partikel zu sehen sind, entspricht dem, was aus dem Chromatogramm des nackten Partikels zu erwarten ist. Auch hier weist der Peak des Totvolumens ein deutliches „Tailing“ auf.

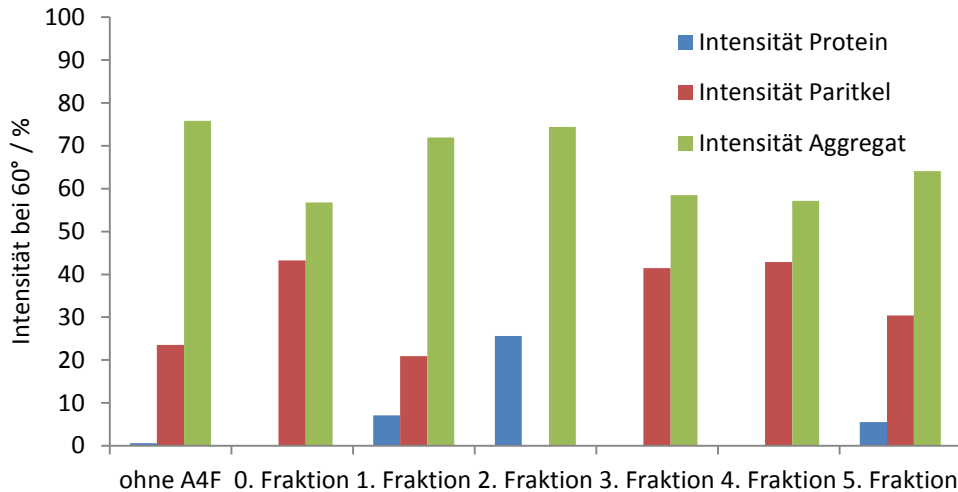


Abb. 41: Intensitätsprozente der verschiedenen Komponenten des mit Plasma inkubierten Aminopartikels vor und nach A4F. Dabei ist zu erkennen, dass in den vorderen Fraktionen wie zu erwarten ist auch freies Protein eluiert und in den Fraktionen, die zur gleichen Zeit wie der reine Partikel eluieren nur noch Partikel und Aggregat.

Da prinzipiell in der Lichtstreuung gilt, dass eine längere Relaxationszeit für einen größeren hydrodynamischen Radius der Teilchen steht, wurde die Relaxationszeit der verschiedenen Proben aufgetragen. In Abbildung 42 ist die Größenzunahme des Partikels zu erkennen. Die nackten Partikel sind vor (schwarz) und nach (blau) A4F ungefähr gleich groß. Vergleicht man dieses Signal nun mit denen der Partikel mit Plasma vor A4F-Trennung, so sind drei Prozesse zu erkennen (rot). Bei dem kleinsten Prozess handelt es sich wahrscheinlich um freies Protein, das mittlere Signal ist breit verteilt und beinhaltet die kleineren Aggregate. Das dritte Signal stammt von den besonders großen Aggregaten. Ein Signal von freien Partikeln ist nicht mehr zu erkennen. Die Signale von Fraktion 3 (grün) und 4 (hellblau) sind etwas größer, als die der nackten Partikel. Die Partikel liegen ganz offensichtlich nicht mehr frei vor. Fraktion 4 (hellblau) weist etwas höhere Relaxationszeiten auf als Fraktion 3 (grün). Dies sollte bei Auftrennung der Probe mittels A4F auch der Fall sein, da diese nach Größe auftrennt. Die zuvor erhaltenen Ergebnisse werden in diesem Graph somit bestätigt.

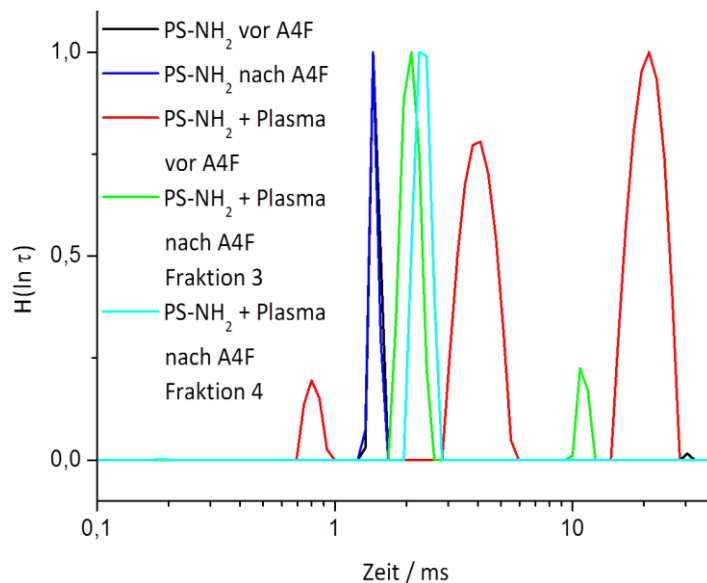


Abb. 42: Relaxationszeit der mit Plasma inkubierten Aminopartikel vor und nach A4F. Die Größenzunahme ist gut an der Zunahme der Relaxationszeit abzulesen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das System aus PS-NH₂ mit Plasma auf der A4F sinnvoll aufgetrennt werden konnte.

3.3.7 Vergleich der Proteinkorona des Aminopartikels nach A4F und nach Zentrifugation

Im weiteren wurde eine SDS-PAGE der Fraktionen von Aminopartikeln mit Plasma angefertigt (Abb. 43) und diese wurden verglichen mit dem Proteinmuster auf zentrifugierten Partikeln. Prinzipiell sieht man, dass in Fraktion 1 besonders viel HSA bei 60 kDa vorhanden ist, aber dieses ist auch in Fraktion 2 zu sehen, wenn auch weniger stark. Aber es sind noch weitere Plasmaproteine in Fraktionen 0, 1 und 2 zu erkennen. Sowohl größere als auch kleinere Proteine eluieren in den gleichen Fraktionen. Damit wird ganz offensichtlich, dass sich die verwendete Methode der A4F nicht für die Auftrennung von Plasmaproteinen nach Größe eignet.

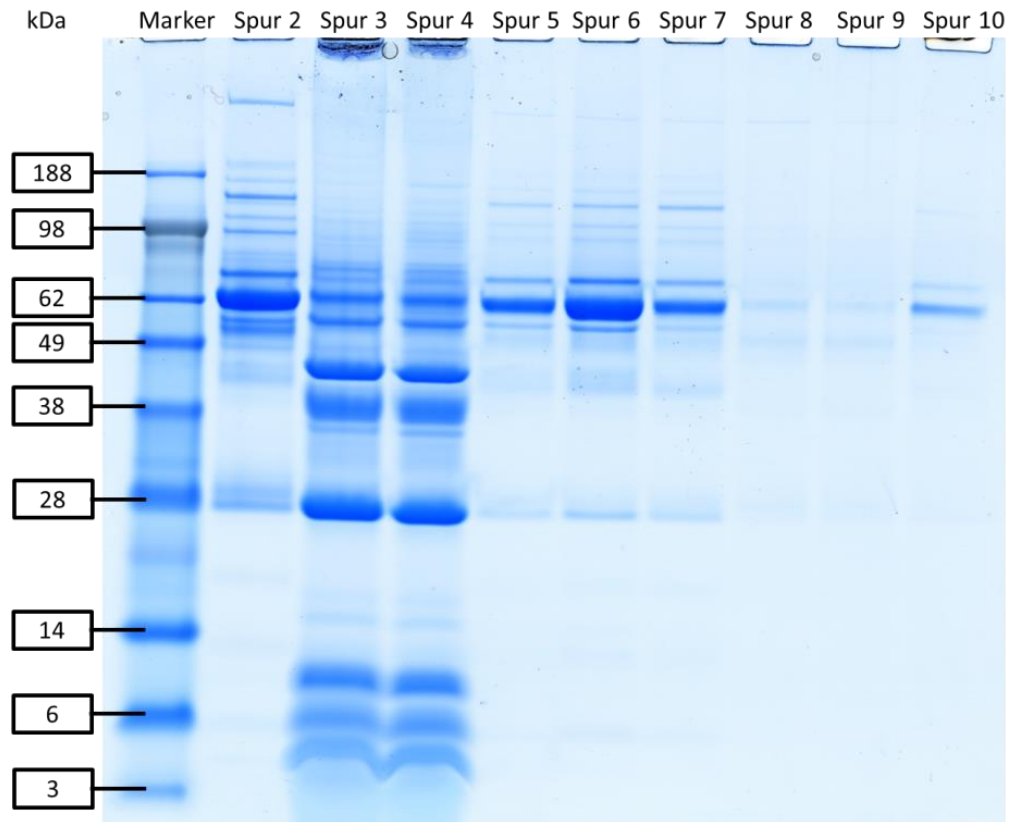


Abb. 43: SDS-PAGE der mit Plasma inkubierten und anschließend zentrifugierten Aminopartikel im Vergleich mit den Fraktionen der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.

Spur 2:	Plasma
Spur 3:	PS-NH ₂ + Plasma, zentrifugiert
Spur 4:	PS-NH ₂ + Plasma, zentrifugiert
Spur 5:	PS-NH ₂ + Plasma nach A4F, 0. Fraktion, m(Protein) = 0,18 mg
Spur 6:	PS-NH ₂ + Plasma nach A4F, 1. Fraktion, m(Protein) = 0,252 mg
Spur 7:	PS-NH ₂ + Plasma nach A4F, 2. Fraktion, m(Protein) = 0,384 mg
Spur 8:	PS-NH ₂ + Plasma nach A4F, 3. Fraktion, m(Protein) = 0,3 mg
Spur 9:	PS-NH ₂ + Plasma nach A4F, 4. Fraktion, m(Protein) = 0,36 mg
Spur 10:	PS-NH ₂ + Plasma nach A4F, 5. Fraktion, m(Protein) = 0,192 mg

Die interessanten Fraktionen 3 und 4 waren direkt aus der A4F zu verdünnt, um auf der SDS-PAGE sichtbar zu sein, wie in Abbildung 43 zu sehen. Aus diesem Grund wurden diese beiden Fraktionen mit der SpeedVac eingengt und erneut aufgetragen. Diese Einengung war erfolgreich, wie in Abbildung 44 zu sehen. Hier sind alle Banden sehr gut zu erkennen.

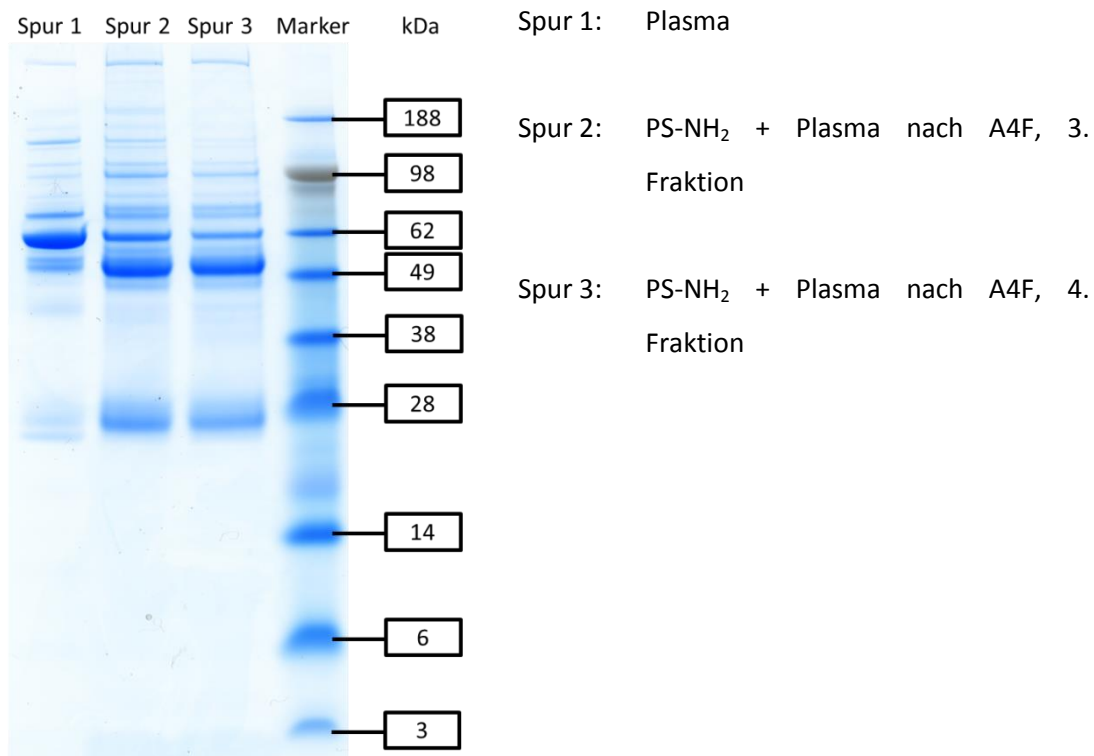


Abb. 44: SDS-PAGE der eingeengten Fraktionen aus der A4F der mit Plasma inkubierten Aminopartikel.

Vergleicht man nun Spur 3 und 4 aus Abbildung 43 mit Spur 2 und 3 aus Abbildung 44, so wird deutlich, dass sich das Proteinmuster der zentrifugierten Partikel von dem der in der A4F aufgetrennten Partikeln unterscheidet. Die HSA-Bande ist in beiden Fällen ähnlich stark ausgeprägt. Die Banden der hochmolekularen Proteine zwischen 62 und 188 kDa sind bei der mit der A4F aufgetrennten Probe stärker zu sehen. Auch die Bande bei 49 kDa ist bei den A4F-Proben wesentlich stärker ausgeprägt.

Dahingegen fehlen vor allem im niedermolekularen Bereich (< 28 kDa) bei der mit A4F aufgetrennten Probe zahlreiche Proteinbanden komplett, die nach der Zentrifugation allerdings noch auf den Partikeln zu finden sind. Eventuell handelt es sich um Verunreinigungen. Durch die Adsorption auf Partikeln können bestimmte Proteine aber auch angereichert werden und so erst für die SDS-PAGE sichtbar werden. Des Weiteren fehlen die Banden bei 38 kDa nach der A4F, die nach der Zentrifugation deutlich ausgeprägt sind. Die Fraktionen 3 und 4 der A4F enthalten dafür viele Banden im hochmolekularen Bereich über 70 kDa. Die Banden bei 28 kDa und 60 kDa sind sowohl bei der zentrifugierten Probe, als auch bei der mit A4F aufgereinigten Probe vorhanden, wobei die HSA-Bande bei 60 kDa bei der mit A4F aufgereinigten Probe wesentlich stärker ausgeprägt ist.

Dieser Versuch zeigt deutlich, dass sich die Zusammensetzung der Proteinkorona unterscheidet, je nachdem ob Zentrifugation oder A4F als Aufreinigungsmethode benutzt wird. Um die Zusammensetzung noch weiter zu untersuchen, wäre es möglich, von den erhaltenen Fraktionen der A4F eine LC-MS-Messung anzufertigen.

3.4 Verhalten von Liposomen in der A4F

Bei Liposomen handelt es sich um Vesikel aus Phospholipiden. Diese eignen sich besonders gut als Wirkstoffträger, weil sie sich gut beladen lassen und komplett bioabbaubar sind. Da sie genau wie Partikel eine Proteinkorona ausbilden, wenn sie in Kontakt mit einem biologischen Medium kommen, ist auch hier die Untersuchung der Proteinkorona unerlässlich. Dies gestaltet sich allerdings als schwierig, da die Dichte der Liposomen nicht ausreicht, um sie abzentrifugieren zu können. Zunächst wurde deshalb das Verhalten der Liposomen auf der A4F untersucht. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 45 dargestellt.

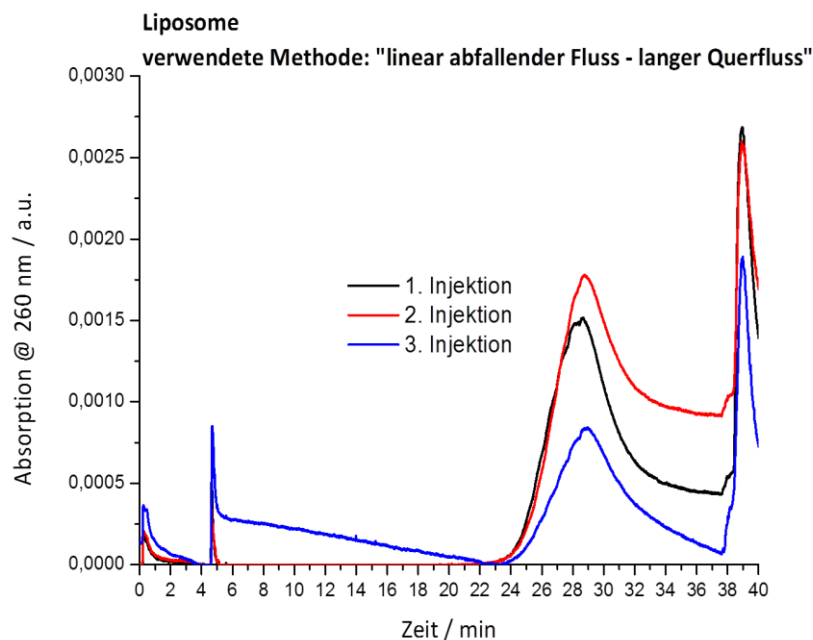


Abb. 45: Elugramm der Liposomen.

Die Liposomen verhalten sich auf der Membran anders als die bisherigen Partikel. Das Signal ist in dieser Messreihe reproduzierbar bezüglich der Retentionszeit, aber das Signal findet nicht mehr zur Basislinie zurück. Die Fläche des Signals ist dagegen nicht reproduzierbar. Dies ist bei

den Partikeln nur der Fall, wenn sie mit Protein inkubiert waren. Bei den Liposomen ist dies bereits ohne Proteine der Fall.

Bei der Messung der Liposomen ergaben sich zahlreiche Probleme. So war es beispielsweise nicht möglich, im Anschluss eine andere Probe zu messen. Um wieder andere Substanzen messen zu können, musste die Membran ausgewechselt werden. Außerdem ließ sich die Messung zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr reproduzieren.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Das große Potential, dass die A4F bietet, konnte in einer Methodenentwicklung angerissen werden. Mit den verwendeten Methoden ließ sich ein breiter Größenbereich abdecken. Somit bestand die Möglichkeit, kleine freie Proteine von Partikeln mit Proteinkorona zu trennen. Diese Möglichkeit war entscheidend zur Beantwortung der Fragestellung nach einer schonenden Reinigungsmethode der Proteinkorona um diese im Anschluss weiter zu charakterisieren.

Zunächst wurden verschiedene Partikel mit HSA inkubiert. Dabei ergab sich, dass unfunktionalisierte Polystyrolpartikel mit HSA eine Proteinkorona ausbilden. Der Partikel mit adsorbiertem HSA lässt sich in der A4F unverändert isolieren. Die Aminopartikel mit HSA ergaben zwar auch eine Korona, diese konnte allerdings im Gegensatz dazu nicht in der A4F isoliert werden.

Bei der Verwendung von Plasma statt HSA ergaben sich genau gegenteilige Ergebnisse. Die unfunktionalisierten Polystyrolpartikel bildeten zwar Aggregate, in der A4F konnte aber kein Signal beobachtet werden, weder von einem entstandenen Aggregat, noch vom Partikel selbst. Die Aminopartikel, inkubiert mit Plasma, bildeten besonders große Aggregate. Wurden sie mit der A4F untersucht, so konnten kleinere Aggregate isoliert werden, die größeren dagegen nicht. Es ist möglich, dass sie im Trennkanal zerstört wurden.

Die Auftrennung von Proteinen selbst konnte mit den verwendeten Methoden nicht verwirklicht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es für bestimmte Systeme möglich ist, Partikel mit Proteinkorona oder Aggregate zu isolieren. Je nach eingesetztem Partikel und Protein kommt es zu unterschiedlichen Ergebnissen. Daran zeigt sich deutlich, wie empfindlich das Zusammenspiel zwischen Partikel und Protein ist. Die Methodenentwicklung ist dabei der Schlüsselschritt der Analyse mittels A4F und auch der Zeit-konsumierenste Faktor. Dabei gibt es noch viel Potential. Neben der Einstellung der passenden Flussraten, kann der Einfluss verschiedener Membranen auf das Retentionsverhalten weiter getestet werden. Besonders entscheidend vor allem für die Trennung von Proteinen ist neben der Ionenstärke auch der pH-Wert des Flussmittels. Der Einfluss des pH-Werts kann aus Kapitel 3.1.2 bereits erahnt werden und sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

Wenn die Trennung mittels A4F erfolgreich war, so sollten genauere Charakterisierungen der erhaltenen Fraktionen vorgenommen werden, beispielsweise mit LC-MS. Besonderes Augenmerk sollte dabei auch der Reproduzierbarkeit der Methode gelten.

Weiterhin wäre es wichtig herauszufinden, was mit den großen Aggregaten geschieht, die nach der Trennung nicht mehr zu finden sind und ob sie erfolgreich isoliert werden können.

Da auch Liposomen interessante Wirkstofftransporter sind und auch sie im Körper eine Proteinkorona ausbilden, ist die Trennung von Liposomen mit Proteinkorona zwar ebenfalls wichtig, konnte bisher aber noch nicht realisiert werden. Liposomen selbst können bereits über die A4F getrennt werden,^[40,59] aber diese Trennung gelang im Rahmen dieser Arbeit nur bedingt. Da wie schon erwähnt der Schlüssel zur Trennung mittels A4F aber die Methodenentwicklung ist, sind die Möglichkeiten der A4F bei diesem Problem noch lange nicht erschöpft.

Alles in allem ist die A4F nach wie vor eine vielversprechende Methode zur Aufreinigung von Nanopartikeln mit Proteinkorona und je besser das gelingt, desto intensiver kann diese untersucht werden und desto näher rückt der tatsächliche Einsatz von Nanopartikeln als Wirkstoffträger.

5 Experimenteller Teil

5.1 Proteinkorona herstellen

Ein Probevolumen mit einer Partikelgesamtoberfläche von $0,1 \text{ m}^2$ einer 1%-igen Suspension wurden mit einer 10 mM NaCl-Lösung auf ein kontantes Volumen von 0,5 mL verdünnt. 278 μL verschiedener Proteinlösungen wurden zugegeben und die Mischung bei 37 °C und 300 rpm für eine Stunde inkubiert.^[58] Als Proteinlösung wurde eine HSA-Lösung mit $c(\text{HSA}) = 10 \text{ g/L}$ oder konzentriertes Plasma verwendet und so eingesetzt, dass jeder Nanopartikel mehrfach von Proteinen umgeben werden kann.

5.2 Aufreinigung der Proteinkorona mittels Zentrifugation

Die Proteinkorona wurde hergestellt wie in Abschnitt 5.1 beschrieben. Anschließend wurde die Lösung für eine Stunde bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die freien Proteine befinden, wurde abgenommen und das Pellet wurde in 1 mL PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung wieder für eine Stunde bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in einem Urea/Thiourea-Puffer resuspendiert. Dieser dient der Proteindesorption und besteht aus 7 M Urea, 2 M Thiourea und 4% CHAPS. Die Lösung wurde für 5 min bei 37 °C und 600 rpm inkubiert und anschließend eine Stunde bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die desorbierten Proteine enthält, wurde abgenommen und konnte für weitere Experimente verwendet werden.^[58]

5.3 Beschichtung der Membran

Um die regenerierte Cellulose-Membran mit Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH) zu beschichten, wurde sie zunächst dreimal eine halbe Stunde mit entionisiertem Wasser gewaschen und anschließend für

zwei Stunden in eine 0,2%ige PAH-Lösung eingelegt. Vor dem Einbau wurde die Membran erneut mit Wasser gewaschen.

5.4 Nanopartikel-Synthese

Neben den Standard-Polystyrolpartikeln von Thermo Scientific wurden von Katja Klein am MPI-P synthetisierte Polystyrol-Partikel verwendet. Diese wurden über eine Miniemulsions-(Co)polymerisation hergestellt.^[60] Dabei handelt es sich entweder um unfunktionalisierte Polystyrol-Partikel (im Folgenden PS-Lut genannt) oder Polystyrol-Partikel mit Aminogruppen funktionalisiert (im Folgenden Aminopartikel genannt). Beide sind mit dem nicht-ionischen Tensid Lutensol stabilisiert.

5.5 Methoden

5.5.1 Lichtstreuung

Um streuende Verunreinigungen wie Staub, etc. zu entfernen, wurden die Proben mittels Spritzenfiltern filtriert. Für Plasma wurde dabei ein GS-Filter mit 220 nm Porengröße verwendet und für alle anderen Proben ein LCR-Filter mit einer Porengröße von 450 nm. Die Proben wurden in Quarzküvetten mit einem Innendurchmesser von 18 mm gemessen. Diese Küvetten wurden zuvor im Acetonbrunnen gespült, um zu gewährleisten, dass sie frei von Staub waren. Da konzentrierte Lösungen entsprechend trüb waren, mussten sie verdünnt werden. Fraktionen aus der A4F konnten direkt gemessen werden.

Die Auswertung der Lichtstreudaten erfolgte nach Rausch *et al.*^[31] mittels der HDRC-Software.^[61]

5.5.2 SDS-PAGE

Für die Auftragung auf das Gel wurden die Proben nach folgendem Pippetierschema vorbereitet:

Tabelle 10: Pipettierschema für die SDS-PAGE.

	10%iges Gel mit 25 μL Taschen / μL	10%iges Gel mit 40 μL Taschen / μL
Probe	16,25	26
LDS-Puffer	6,25	10
Reduzierungs-Reagenz	2,5	4
Gesamtvolumen	25	40

Diese Mischung wurde 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend das gesamte Volumen auf das Gel aufgetragen. Es wurden 5 μL des fertigen Markers (SeeBlue Pre-stained Proteinstandard, Thermo Scientific) verwendet und Plasma wurde 1:200 verdünnt, um eine Überladung zu vermeiden. Das Gel wurde ca. 1,7 h bei 100 V mit NuPAGE MES SDS Laufpuffer laufen gelassen.

Das fertige Gel wurde zunächst 2 Stunden fixiert. Dazu wurde eine Lösung mit 10% Essigsäure und 40% Ethanol verwendet. Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 min mit entionisiertem Wasser gewaschen und mit Färbelösung 24 h inkubiert. Als Färbelösung diente Coomassie Brilliant Blue. Es handelt sich dabei um eine Lösung mit 10% Ammoniumsulfat, 2% Phosphorsäure, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250 in 100 mL Wasser und 25 mL Methanol. Nach der Färbung wurde das Gel dreimal 10 min mit 1%iger Essigsäure-Lösung gewaschen und anschließend erneut in Wasser.

5.5.3 Proteinquantifizierung

Dieser Test dient dazu die Proteinmenge in einer Probe zu bestimmen. Dazu wurde eine BSA-Verdünnungsreihe hergestellt, um daraus eine Kalibriergerade zu erhalten.

BCA-Test

Die BCA-Lösung (Bicinchoninsäure) wurde in einem Verhältnis von 50:1 mit einer Kupfersulfatlösung gemischt. In jedes Well einer 96-well Platte wurden 190,5 μL des Reagenz und 9,5 μL der Probe pipettiert. Gemeinsam wurden die Reagenzien 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm gemessen.

Pierce-Test

In die Wells einer 96-well Platte wurden 12,5 μL Probe zu 187,5 μL Pierce-Reagenz gegeben und anschließend wurde die Absorption bei 600 nm gemessen.

5.5.4 Zeta-Potential

Das Zeta-Potential wurde in einer 0,001 molaren KCl-Lösung gemessen.

5.5.5 Asymmetrische Fluss - Feld Fluss Fraktionierung

Als Laufmittel wurde für alle Messungen eine 10 mM NaCl-Lösung verwendet. Es wurden 100 μL Probe injiziert. Die verwendeten Methoden ergaben sich aus der Methodenentwicklung in Kapitel 3.1 und sind dort beschrieben (siehe auch Anhang). Die A4F ist an einen UV-Detektor gekoppelt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde eine Polysulfonether-Membran verwendet mit einem „cut-off“-Wert von 5 kDa.

5.6 Materialien

5.6.1 Blutplasma

Das in dieser Arbeit verwendete Humanplasma wurde von der Transfusionszentrale der Uniklinik Mainz bezogen und enthielt Citrat als Antikoagulans. Zur besseren Randomisierung wurde das Plasma von sechs verschiedenen, gesunden Spendern gepoolt. Vor Verwendung wurde das Plasma für eine Stunde bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert und nur der Überstand verwendet.

Literaturverzeichnis

- [1] Walkey, C. D. et al., Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment, *Chem Soc Rev* **2012**, 41(7), S. 2780.
- [2] Maffre, P. et al., Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles - a fluorescence correlation spectroscopy study, *Beilstein J Nanotechnol* **2014**, 52036.
- [3] Li, L. et al., Analytical strategies for detecting nanoparticle-protein interactions, *Analyst* **2010**, 135(7), S. 1519.
- [4] Soppimath, K. S. et al., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release* **2001**, 701.
- [5] Aggarwal, P. et al., Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, 61(6), S. 428.
- [6] Messaud, F. A. et al., An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers, *Progress in Polymer Science* **2009**, 34(4), S. 351.
- [7] Leeman, M. et al., Programmed cross flow asymmetrical flow field-flow fractionation for the size separation of pullulans and hydroxypropyl cellulose, *J Chromatogr A* **2006**, 1134(1-2), S. 236.
- [8] Monopoli, M. P. et al., Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, *J Am Chem Soc* **2011**, 133(8), S. 2525.
- [9] Lynch, I. et al., Protein-nanoparticle interactions, *nanotoday* **2008**, 3(1-2), S. 40.
- [10] Roach, P. et al., Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 1278168.
- [11] Kang, B. et al., Kohlenhydrat-basierte Nanocarrier mit spezifischem Zell-Targeting und minimalem Einfluss durch die Proteinkorona, *Angewandte Chemie* **2015**, 127(25), S. 7544.
- [12] Vroman, L. et al., Interaction of High Molecular Weight Kininogen, Factor XII, and Fibrinogen in Plasma at Interfaces, *Blood* **1980**, 55(1), S. 156.
- [13] Monopoli, M. P. et al., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials, *Nat Nanotechnol* **2012**, 7(12), S. 779.
- [14] Cedervall, T. et al., Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46(30), S. 5754.
- [15] Winzen, S. et al., Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition, *Nanoscale* **2015**, 7(7), S. 2992.
- [16] Ge, C. et al., Towards understanding of nanoparticle-protein corona, *Archives of toxicology* **2015**, 89(4), S. 519.
- [17] Kim, H. R. et al., Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Lab-on-chip system, *Electrophoresis* **2007**, 28(13), S. 2252.
- [18] Cai, X. et al., Characterization of carbon nanotube protein corona by using quantitative proteomics, *Nanomedicine* **2013**, 9(5), S. 583.
- [19] Lück, M. et al., Identification of plasma proteins facilitated by enrichment on particulate surfaces: Analysis by two-dimensional electrophoresis and N-terminal microsequencing, *Electrophoresis* **1997**, 182961.
- [20] Greenfield, N. J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc* **2006**, 1(6), S. 2876.
- [21] Whitmore, L. et al., Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* **2008**, 89(5), S. 392.

- [22] Cedervall, T. et al., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*(7), S. 2050.
- [23] Gerdon, A. E. et al., Quartz Crystal Microbalance Detection of Glutathione-Protected Nanoclusters Using Antibody Recognition, *Anal. Chem.* **2005**, 77304.
- [24] Ipe, B. I. et al., Dynamic light-scattering analysis of the electrostatic interaction of hexahistidine-tagged cytochrome P450 enzyme with semiconductor quantum dots, *Chemphyschem* **2006**, *7*(5), S. 1112.
- [25] Selva Sharma, A. et al., Comprehensive Multispectroscopic Analysis on the Interaction and Corona Formation of Human Serum Albumin with Gold/Silver Alloy Nanoparticles, *J Phys Chem B* **2015**, *119*(30), S. 9461.
- [26] Zhao, X. et al., Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-protein corona and the related cytotoxicity, *J Hazard Mater* **2015**, 29298.
- [27] Schärtel, W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*; Springer Verlag Berlin: Heidelberg, 2007.
- [28] Kratochvil, P. *Classical Light Scattering from Polymer Solutions*; Elsevier: Amsterdam, 1987.
- [29] v Smoluchowski, M., Molekular-kinetische Theorie der Opaleszenz von Gasen im kritischen Zustande, sowie einiger verwandter Erscheinungen *Annalen der Physik* **1908**, 25.
- [30] Zimm, B. H., The Dependence of the Scattering of Light on Angle and concentration in Linear Polymer Solutions, *Journal of Physical and Colloid Chemistry* **1948**, 52.
- [31] Rausch, K. et al., Evaluation of Nanoparticle Aggregation in Human Blood Serum, *Biomacromolecules* **2010**, 112836.
- [32] Wagner, M. et al., Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine, *Anal Chem* **2014**, *86*(11), S. 5201.
- [33] Giddings, J. C., A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities, *Separation Science* **1966**, *1*(1), S. 123.
- [34] Wahlund, K. G. et al., Improved Flow Field-Flow Fractionation System Applied to Water-Soluble Polymers: Programming, Outleg Stream Splitting, and flow Optimization, *Anal. Chem.* **1986**, 58573.
- [35] Litzen, A., Zone Broadening and Dilution in Rectangular and Trapezoidal Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channels, *Anal. Chem.* **1991**, 631001.
- [36] Wahlund, K. G. et al., Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysaccharides and unicellular algae, *Journal of Chromatography* **1989**, 46173.
- [37] Litzen, A., Separation Speed, Retention, and Dispersion in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation as Functions of Channel Dimensions and Flow Rates, *Anal. Chem.* **1993**, 65461.
- [38] www.nanolytics.de/en/other_methods_colloidal_analytics/field-flow-fractionation, (Zugriff: 27.09.2015)
- [39] Wahlund, K. G. et al. *Flow FFF - Basic and Key Applications*; Springer Verlag: Wien, 2012.
- [40] Hupfeld, S. et al., Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: optimization of fractionation variables, *J Sep Sci* **2009**, *32*(9), S. 1465.
- [41] Fan, Y. et al., Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *8*(2), S. 81.
- [42] Laouini, A. et al., Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*(2), S. 147.
- [43] Caracciolo, G., Liposome-protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines, *Nanomedicine* **2015**, *11*(3), S. 543.
- [44] Hadjidemetriou, M. et al., In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles, *ACS Nano* **2015**, *9*(8), S. 8142.
- [45] Capriotti, A. L. et al., Analysis of plasma protein adsorption onto DC-Chol-DOPE cationic liposomes by HPLC-CHIP coupled to a Q-TOF mass spectrometer, *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398*(7-8), S. 2895.

- [46] Berg, J. M. et al. *Stryer Biochemie*; 7. Auflage; Springer-Verlag Berlin: Heidelberg, 2013.
- [47] Weber, K. et al., The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *The Journal of Biological Chemistry* **1969**, 244(16), S. 4406.
- [48] Shapiro, A. L. et al., Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, 28(5), S. 815.
- [49] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **1976**, 72248.
- [50] Zor, T. et al., Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies, *Anal Biochem* **1996**, 236(2), S. 302.
- [51] Compton, S. J. et al., Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal Biochem* **1985**, 151(2), S. 369.
- [52] Smith, P. K. et al., Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry* **1985**, 15076.
- [53] Wiechelman, K. J. et al., Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation, *Anal Biochem* **1988**, 175(1), S. 231.
- [54] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/human-albumin.html#PP>, (Zugriff: 03.09.2015)
- [55] Jacobs, J. M. et al., Utilizing Human Blood Plasma for Proteomic Biomarker Discovery, *Journal of Proteome Research* **2005**, 41073.
- [56] Ashby, J. et al., Dissociation-based screening of nanoparticle-protein interaction via flow field-flow fractionation, *Anal Chem* **2013**, 85(15), S. 7494.
- [57] Ashby, J. et al., Size and surface functionalization of iron oxide nanoparticles influence the composition and dynamic nature of their protein corona, *ACS Appl Mater Interfaces* **2014**, 6(17), S. 15412.
- [58] Ritz, S. et al., Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake, *Biomacromolecules* **2015**, 16(4), S. 1311.
- [59] Hupfeld, S. et al., Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: 2. Concentration detection and adsorptive loss phenomena, *J Sep Sci* **2009**, 32(20), S. 3555.
- [60] Musyanovych, A. et al., Effect of Hydrophilic Comonomer and Surfactant Type on the Colloidal Stability and Size Distribution of Carboxyl- and Amino-Functionalized Polystyrene Particles Prepared by Miniemulsion Polymerization, *Langmuir* **2007**, 235367.
- [61] Nischl, O., *Programmierung numerischer Modelle zur Molekülcharakterisierung gemessener Lichtstreudaten*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2007**.

Anhang

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.

Verwendete Chemikalien	Hersteller
Aceton	Thermo Scientific, USA
Ammoniumsulfat	Sigma Aldrich, USA
Blue Dextran	Sigma-Aldrich, USA
Bovine Serum Albumin	Serva, Deutschland
CHAPS	Serva, Detuschland
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Deutschland
Dulbecco'S Phosphate Buffered Saline	Lonza, Schweiz
Essigsäure	Sigma Aldrich, USA
Ethanol	Sigma Aldrich, USA
Human Serum Albumin	Sigma Aldrich, USA
Methanol	VWR, USA
Nanosphere Size Standards 125 nm	Thermo Scientific, Deutschland
Nanosphere Size Standards 20 nm	Thermo Scientific, Deutschland
Nanosphere Size Standards 240m	Thermo Scientific, Deutschland
Nanosphere Size Standards 40 nm	Thermo Scientific, Deutschland
Nanosphere Size Standards 80 nm	Thermo Scientific, Deutschland
Natriumchlorid, 99,9%	VWR, USA
Natriumdodecylsulfat, ≥99%	Carl Roth GmbH, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich, USA
Natriumhydroxid, 0,1 mol/L	Carl Roth GmbH, Deutschland
NuPAGE 10% Bis-Tris-Gel	Life technologies, USA
NuPAGE LDS Probenpuffer	Life technologies, USA
NuPage MES SDS Laufpuffer	Life technologies, USA
NuPAGE Reduzierenes Agenz	Life technologies, USA
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Deutschland
Pierce-Reagenz	Thermo Scentic, Detutschland
Polyallylamin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Reagent A (BCA-Lösung)	Serva, Deutschland
Reagent B (Kupfersulfat)	Serva, Deutschland

SeeBlue Plus2 prestained standard	Life technologies, USA
Thiourea	Sigma Aldrich, USA
Toluol	Sigma Aldrich, USA
Urea	Sigma Aldrich, USA

Tabelle 12: Verwendete Instrumente und Verbrauchsmaterialien.

Verwendete Instrumente	Hersteller
Asymmetrical Flow-Field Flow Fractionation	ConSensus, Deutschland
Entgaser Gastorr BG-12	FLOM, Japan
Lichtstreuanlage:	
CGS3 Kompakt Goniometersystem mit He/Ne-Laser (632,8 nm)	ALV, Deutschland
LSE-5004 Korrelator	ALV, Deutschland
Lichtstreu Küvetten 18 mm Durchmesser	Hellma, Deutschland
Lyophilisator Alpha 2-4 LD plus	Christ, Deutschland
Millex-Anlage (18 mΩ Wasser), Millipore	Merck, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Plate-Reader Infinite M1000	Tecan, Schweiz
RI-Detektor RI-101	Shodex, Japan
SDS-PAGE	
Kammer EI9001 XCELL II Mini Cell, Novex	Thermo Scientific, USA
Powersupply Model 250EX	Life Technologies, USA
10%ige Polyacrylamidgele	Life Technologies, USA
Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator	Thermo Scientific, USA
Spritzen, 5mL	Braun, Deutschland
Spritzenfilter Millex-GS 0,22 µm	Merck, Deutschland
Spritzenfilter Millex-LCR 0,45 µm, Millipore	Merck, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex RK 514 H	Bandelin, Deutschland
UV-Detektor SpectraSystem UV1000	Thermo Scientific, USA
Waage AB265-S	Mettler Toledo, Deutschland
Waage XS603S DeltaRange	Mettler Toledo, Deutschland
Zetasizer Nano series	Malvern Instruments Ltd., UK

Tabelle 13: Verwendete Software.

Verwendete Software	Hersteller
WINFF_CONTROL V4.1.06	Consensus, Deutschland
Chromatographica V1.0.22	Hs GmbH, Deutschland
ALV-Correlator Software Version 3.0	ALV GmbH, Deutschland
ALV/Static & Dynamic FIT and PLOT Version 4.42	ALV GmbH, Deutschland
HDRC	Oliver Nirschl ^[61]
Zetasizer Software 6.20	Malvern Instruments Ltd., UK
i-contorl 1.10	Tecan, Schweiz

Tabelle 14: Parameter der A4F für Methode "konstanter Fluss - kein Querfluss"

	Zeit / min	Hauptfluss / mL/min	Querfluss / mL/min	Injektionspumpe / ml/min
Vorlauf	0,017	1	0	0
	0,17	1	0	0
Fokusschritt Start	0,17	2,65	2	0
	0,25	2,65	2	0
Injektion Start	0,25	2,5	2	0,15
	6,25	2,5	2	0,15
Injektion Ende	6,25	2,65	2	0
Fokusschritt Ende	6,75	2,65	2	0
Elution Start	6,75	2	0	0
Elution Ende	36,75	2	0	0
Waschschritt Start	36,75	1	0	0,2
Waschschritt Ende	39,75	1	0	0,2
Ende	41,1	1	0	0

Tabelle 15: Parameter der A4F für Methode "konstanter Fluss - mit hohem Querfluss"

	Zeit / min	Hauptfluss / mL/min	Querfluss / mL/min	Injektionspumpe / ml/min
Vorlauf	0,017	1	0	0
	0,17	1	0	0
Fokusschritt Start	0,17	2,65	2	0
	0,25	2,65	2	0
Injektion Start	0,25	2,5	2	0,15
	6,25	2,5	2	0,15
Injektion Ende	6,25	2,65	2	0
Fokusschritt Ende	6,75	2,65	2	0
Elution Start	6,75	3	2	0
Elution Ende	36,75	3	2	0
Waschschritt Start	36,75	1	0	0,2
Waschschritt Ende	39,75	1	0	0,2
Ende	41,1	1	0	0

Tabelle 16: Parameter der A4F für Methode "linear abfallender Fluss - kurzer Querfluss"

	Zeit / min	Hauptfluss / mL/min	Querfluss / mL/min	Injektionspumpe / ml/min
Vorlauf	0,017	1	0	0
	0,17	1	0	0
Fokusschritt Start	0,17	2,65	2	0
	0,25	2,65	2	0
Injektion Start	0,25	2,5	2	0,15
	3,42	2,5	2	0,15
Injektion Ende	3,42	2,65	2	0
Fokusschritt Ende	4,17	2,65	2	0
Elution Start	4,17	3	1,25	0
	28,2	1,75	0	0
Elution Ende	28,2	1,75	0	0
	37,58	21,75	0	0
Waschschrift Start	37,6	1	0	0,2
Waschschrift Ende	40,6	1	0	0,2
Ende	41,1	1	0	0

Tabelle 17: Parameter für A4F Methode "linear abfallender Fluss - langer Querfluss"

	Zeit / min	Hauptfluss / mL/min	Querfluss / mL/min	Injektionspumpe / ml/min
Vorlauf	0,017	1	0	0
	0,75	1	0	0
Fokusschritt Start	0,75	2,65	2	0
	1,75	2,65	2	0
Injektion Start	1,75	2,5	2	0,15
	5,75	2,5	2	0,15
Injektion Ende	5,75	2,65	2	0
Fokusschritt Ende	6,75	2,65	2	0
Elution Start	6,75	3	1	0
	16,75	2	0	0
Elution Ende	30	2	0	0
Waschschrift Start	30	1	0	0,2
Waschschrift Ende	33	1	0	0,2
Ende	33,5	1	0	0

Tabelle 18: Parameter der A4F für Methode "exponentiell abfallender Fluss"

	Zeit / min	Hauptfluss / mL/min	Querfluss / mL/min	Injektionspumpe / ml/min
Vorlauf	0,017	1	0	0
	0,17	1	0	0
Fokusschritt Start	0,17	2,65	2	0
	0,25	2,65	2	0
Injektion Start	0,25	2,5	2	0,15
	2,75	2,5	2	0,15
Injektion Ende	2,75	2,65	2	0
Fokusschritt Ende	4,17	2,65	2	0
Elution Start	4,17	3	1	0
	4,18	3	1	0
	4,2	3	1	0
	4,23	3	1	0
	4,28	2,99	0,99	0
	4,33	2,99	0,99	0
	4,37	2,99	0,99	0
	4,43	2,98	0,98	0
	4,5	2,98	0,98	0
	4,84	2,96	0,96	0
	5,34	2,93	0,93	0
	5,84	2,9	0,9	0
	6,17	2,88	0,88	0
	6,84	2,85	0,85	0
	7,51	2,82	0,82	0
	10,85	2,71	0,71	0
	14,19	2,64	0,64	0
	17,53	2,6	0,6	0
	20,88	2,57	0,57	0
	24,22	2,55	0,55	0
27,6	2,54	0,54	0	
30,9	2,53	0,53	0	
34,24	2,53	0,53	0	
37,58	2,53	0,53	0	
Waschschritt Start	37,6	1	0	0,2
Waschschritt Ende	40,6	1	0	0,2
Ende	41,1	0,3	0	0

Danksagung

Zuallererst möchte ich Frau Professor Dr. Katharina Landfester danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchzuführen, genauso wie für die Vergabe dieses sehr interessanten Themas.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Projektleiterin Dr. Kristin Mohr, die mich während meiner gesamten Diplomarbeit unterstützt hat.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt der Polymeranalytik-Gruppe, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Besonderer Dank gilt dabei Johanna Simon, Svenja Winzen, Laura Müller und Christine Rosenauer. Aber genauso gilt mein Dank allen Mitgliedern des AK Landfester, durch die meine Zeit hier zu einer schönen Erfahrung geworden ist.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, denn dank ihnen hatte ich eine wunderbare Studienzeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung das alles nicht möglich gewesen wäre.