

Aus der
Medizinischen Klinik III,
Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

Analyse der Proteinkorona von thermosensitiven DPPG₂-Liposomen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Patricia Schwarz
aus Augsburg

2022

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars. Lindner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Markus Rehberg Prof. Dr. Ernst Wagner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	_____
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	19.05.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Hintergrund	3
2.1	Aufbau von Liposomen	3
2.1.1	Lang zirkulierende Liposomenformulierungen	4
2.2	Hyperthermie	4
2.3	Thermosensitive Liposomenformulierungen	5
2.4	Verhalten der Liposomen <i>in vivo</i>	6
2.4.1	Konzept der Proteinkorona	7
2.4.2	Harte Korona - Weiche Korona	8
2.4.3	Vroman-Effekt	9
2.4.4	Einfluss von Proteinen auf das Freisetzungsprofil der Liposomen	10
2.4.5	Unterschiedliche Pharmakokinetik von DPPG ₂ -Liposomen in verschiedenen Spezies	10
2.5	Fragestellung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Liposomenherstellung	13
3.1.1	Verwendete Formulierungen	13
3.1.2	Herstellen eines Lipidfilms	14
3.1.3	Liposomenbildung und Extrusion	14
3.1.4	Säulenchromatographie	14
3.2	Liposomencharakterisierung	15
3.2.1	Größenmessung	15
3.2.2	Phosphatbestimmung	15
3.2.3	Dünnschichtchromatographie	15
3.2.4	Temperaturabhängige Freisetzung	16
3.3	Bildung der Proteinkorona <i>in vitro</i>	16
3.4	Säulenchromatographie zur Abtrennung von ungebundenem Protein .	17
3.4.1	Prinzip der Größenausschlusschromatographie	17
3.4.2	Trennung mit Sepharose CL-6B	18
3.4.2.1	Aufkonzentrierung der Proben	18
3.4.3	Trennung mit Sepharose CL-4B	19
3.4.3.1	Dialyse	19
3.4.3.2	Aufkonzentrierung der Proben	19

3.5	Gelelektrophorese	20
3.5.1	Herstellung von Pufferlösungen	20
3.5.2	Gelherstellung	20
3.5.3	Probenvorbereitung	21
3.5.4	Elektrophorese-Lauf	21
3.6	Färbungen	21
3.6.1	Coommassie-Färbung	21
3.6.2	Silber-Färbung	22
3.7	Quantitative Proteinbestimmung	22
3.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	23
3.7.2	Proteinbestimmung nach Lowry	23
3.7.3	Proteinbestimmung nach Smith	23
3.8	Massenspektrometrische Aufarbeitung der Proben und Analyse	24
3.8.1	Grundprinzip der Massenspektrometrie	24
3.8.2	Analyse der Trennung mit Sepharose CL-6B	24
3.8.2.1	Analyse der Daten mit MaxQuant	24
3.8.2.2	Prozessierung mit Perseus	24
3.8.3	Analyse der Trennung mit Sepharose CL-4B	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Überprüfung der Sepharose CL-6B Methode zur Trennung der Proteinkorona an DPPG ₂ -TSL von freiem Protein	26
4.2	Charakterisierung der verwendeten Liposomenformulierungen	27
4.3	SDS-PAGE	27
4.3.1	Bandenanzahl der verschiedenen Formulierungen	30
4.4	Proteinkonzentration	31
4.4.1	Wechsel der Proteinassays	31
4.4.2	Proteinkonzentration der verwendeten Liposomenformulierungen	32
4.4.3	Proteinkonzentrationsmessung in Negativprobe	32
4.5	Größen- und Zeta-Potential-Messungen	33
4.6	Massenspektrometrische Analyse	34
4.6.1	Analyse der Abtrennungsmethode	34
4.6.2	Vergleich von DPPG ₂ -Liposomen mit Lysolipid basierten Liposomen	36
4.6.3	Proteinkorona in Mausplasma	38
4.6.4	FCS und Kälberserum	39
4.6.5	Vergleich der Proteinkoronae verschiedener Spezies	41
4.6.5.1	Proteinkorona in Humanplasma	41
4.6.5.2	Proteinkorona in Mausplasma	43
4.6.5.3	Proteinkorona in Rattenplasma	45
4.6.5.4	Proteinkorona in Hamsterplasma	47

4.6.5.5	Proteinkorona in Beagleplasma	48
5	Diskussion	50
5.1	Anpassung der Methoden im Verlauf der Arbeit	50
5.1.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mit CF-Liposomen	50
5.1.2	Methode zur Trennung der Proteinkorona von freiem Protein	51
5.1.3	Auffälligkeiten bei den verwendeten Plasmen und FCS	53
5.1.4	Einfluss von Antikoagulantien in den Versuchen	54
5.1.5	Vergleich der beiden Abtrennungsmethoden anhand von Humanplasma inkubierten DPPG ₂ -TSL	54
5.2	Übereinstimmung der SDS-PAGE-Gele mit massenspektrometrischen Ergebnissen	56
5.3	Proteinprofile der Liposomenformulierungen	58
5.4	Interspeziespezifische Unterschiede der Proteinkoronae und Erklärung für die schlechtere Stabilität in Mausplasma	60
5.5	Ausblick und Möglichkeiten in der Proteinkoronaforchung	64
5.5.1	<i>In vivo</i> Isolation von Proteinkorona	64
5.5.2	“Pre-Coating” zur besseren Steuerung von Liposomen <i>in vivo</i>	64
6	Zusammenfassung und Fazit	66
	Literaturverweise	68
	Danksagung	78
	Affidavit	79
	Lebenslauf	80

Abbildungsverzeichnis

1.1	Todesursachen in Deutschland 2016 in Prozent (Quelle: Statistisches Bundesamt)	1
2.1	Aufbau eines Liposoms	3
2.2	Strukturformel von 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglyceroglycerin (DPPG ₂)	6
2.3	Schematische Darstellung einer Proteinkorona	7
2.4	Schematische Darstellung von harter und weicher Proteinkorona	9
3.1	Prinzip der Säulenchromatographie	17
4.1	Proteinkonzentrationsverlauf	26
4.2	SDS-Gel von Human- und Maus-Proteinkoronae in Coomassie-Färbung	28
4.3	SDS-Gel von Human- und Maus-Proteinkoronae in Silberfärbung	28
4.4	SDS-Gel von FCS- und Maus-Proteinkoronae in Coomassie-Färbung	29
4.5	SDS-Gel von FCS- und Maus-Proteinkoronae in Silber-Färbung	29
4.6	Bandenanzahl der Liposomenformulierungen in der Gelelektrophorese	30
4.7	Proteinkorona von DPPG ₂ -TSL	37
4.8	Proteinkorona von LTSL	37
4.9	Proteinkorona in Mausplasma	38
4.10	Proteinkorona von FCS an LTSL	40
4.11	Proteinverteilung Proteinkorona an DPPG ₂ -TSL in Humanplasma	42
4.12	Proteinverteilung Proteinkorona an DPPG ₂ -TSL in Mausplasma	44
4.13	Proteinverteilung Proteinkorona an DPPG ₂ -TSL in Rattenplasma	45
4.14	Proteinverteilung Proteinkorona an DPPG ₂ -TSL in Hamsterplasma	47
4.15	Proteinverteilung Proteinkorona an DPPG ₂ -TSL in Beagleplasma	49
5.1	Proteinkategorien mit der CL-6B-Abtrennungsmethode	55
5.2	Proteinkategorien mit der CL-4B-Abtrennungsmethode	55
5.3	Identifizierung der Banden in der Gelelektrophorese	57
5.4	Proteinverteilung der Korona an DPPG ₂ -TSL anhand von Proteingruppen	59
5.5	Proteinverteilung der Korona an LTSL anhand von Proteingruppen	59

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Liposomenformulierungen	13
4.1	Größe (Z-Average), Zeta-Potential und PDI der verwendeten Liposomenformulierungen	27
4.2	Einfluss von CF-Liposomen auf Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	31
4.3	Einfluss von CF-Liposomen auf Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	32
4.4	Proteinkonzentration der verwendeten Liposomenformulierungen bei 50 mM Lipidkonzentration (n=3)	33
4.5	Größen- und Zeta-Potentiale von Proteinkorona Liposomen	34
4.6	Detektierte Proteine in Negativkontrolle	35
4.7	Durchschnittliche Proteingrößen in Plasma und Proteinkorona	36
4.8	Proteinverteilung in unbehandeltem Mausplasma	39
4.9	Proteinverteilung in unbehandeltem FCS	41
4.10	Proteinverteilung in unbehandeltem Kälberserum	41
4.11	Proteinverteilung in gesäultem Humanplasma	43
4.12	Proteinverteilung in gesäultem Mausplasma	44
4.13	Proteinverteilung in gesäultem Rattenplasma	46
4.14	Detektierte Proteine in gesäultem Hamsterplasma	48
4.15	Detektierte Proteine in gesäultem Beagleplasma	49
5.1	Identifizierbare Proteine	57

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
CF	Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterol
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPG₂	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphodiglycerin
DPPG₂TSL	DPPG ₂ Thermosensitive Liposomen
DPTAP	1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propan
DSPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG₂₀₀₀	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-methoxy(polyethylenglycol)-2000
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
FCS	Fetales Kälber Serum
HSPC	Hydrogeniertes Soya Phosphocholin
HP	Humanplasma
IBAQ	Intensitätsbasierte absolute Quantifizierung
KL	Kationische Liposomen
LTSL	Lysolipid basierte thermosensitive Liposomen
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MP	Mausplasma
M_r	relative Molekülmasse
MWCO	Molekulargewichtsausschlusswert
PDI	Polydispersitätsindex
PEGL	Polyethylenglycol Liposomen
PE-PEG₂₀₀₀	Phosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol-2000
rcf	relative Zentrifugalkraft
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
S-Lyso-PC	1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine
SPION	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
TEMED	Tetramethylethylenediamin

T_M	Phasenübergangstemperatur
TSL	Termosensitive Liposomen

Kapitel 1

Einleitung

Im Jahr 2016 (das zuletzt ausgewertete Jahr des statistischen Bundesamtes) starben in Deutschland insgesamt 238.396 Menschen an Krebs (1). Damit ist dieses stark uneinheitliche Krankheitsbild nicht nur immer noch, sondern wird auch in Zukunft neben den Herz-Kreislaufkrankheiten die wichtigste Todesursache bleiben. Steigende Lebenserwartung und bessere diagnostische Möglichkeiten lassen die Inzidenzraten weiterhin ansteigen.

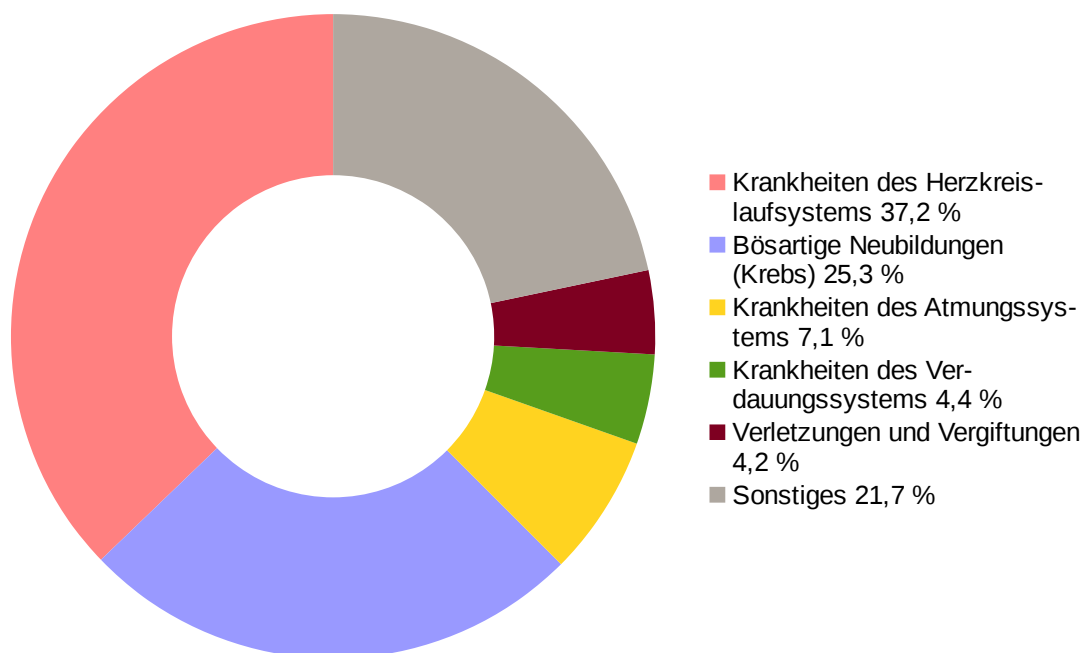


ABBILDUNG 1.1: Todesursachen in Deutschland 2016 in Prozent
(Quelle: Statistisches Bundesamt)

Durch die Vielfältigkeit der Krankheitsbilder ist ein einheitliches Therapiekonzept nahezu unmöglich. Jedoch ist einer der wichtigsten Pfeiler der Therapie von allen Krebsarten, seien es solide Tumoren oder hämatologische Neoplasien, die Pharmakotherapie mit klassischen Zytostatika. Diese sind trotz zahlreicher vielversprechender neuer therapeutischer Ansätze im Bereich von Antikörperforschung, Immunologie und Gentherapie, dank ihrer Effektivität trotzdem noch die relevantesten Pharmakotherapeutika im klinischen Alltag. Allerdings sind Zytostatika durch ihre teils starken und zahlreichen Nebenwirkungen bei Patienten sehr gefürchtete

Medikamente. Nicht nur unangenehme und stigmatisierende Nebenwirkungen wie Schleimhautentzündungen, Haarausfall oder Nervenschädigungen, sondern auch lebensbedrohliche Komplikationen, wie die vermehrte Infektanfälligkeit durch eigentlich harmlose Keime, bis hin zur Gefahr einer Sepsis, befinden sich im Spektrum der unerwünschten Wirkungen von systemischen Chemotherapeutika. Um derartige Nebenwirkungen zu verringern, gibt es schon zahlreiche Ansätze, die meist rechts spezifisch die Nebenwirkungen einzeln behandeln. Beispiele wären neuartige Antiemetika bei chemotherapiebedingter Übelkeit, oder Mesna bei hämorrhagischer Zystitis nach Cyclophosphamid-Gabe. Ein ganz anderer, primärprophylaktischer Ansatz, um Nebenwirkungen zu verringern, wäre eine gezieltere Anwendung der Zytostatika nur an den Krebszellen, und damit eine Schonung von gesundem Gewebe. Deswegen wird derzeit intensive Forschung auf dem Gebiet der Liposomen als Nanocarrier für Zytostatika betrieben, insbesondere auch von TSL, die durch Gewebeerwärmung ihren Wirkstoff freisetzen.

Die Möglichkeit, den Wirkstoff direkt am beabsichtigten Wirkort freizusetzen und damit, wie eben erwähnt, gesundes Gewebe zu schonen, verspricht deswegen nicht nur eine zielgenauere Ansteuerung der Neoplasie, und deswegen bessere Wirkung, sondern auch die Verringerung der systemischen Nebenwirkungen. Hiermit eröffnet sich ein unerwarteter neuartiger Bereich in der Chemotherapie, der diesen wichtigen Medikamenten neue Anwendungen bei zahlreichen Krebserkrankungen verschaffen könnte.

Kapitel 2

Hintergrund

2.1 Aufbau von Liposomen

Liposomen sind seit Jahrzehnten erfolgreiche Systeme zur Arzneimittelabgabe. Seit ihrer Entdeckung durch Alec D. Bangham in den 1960er Jahren am Babraham Institute, University of Cambridge (2), wurden sie wesentlich weiterentwickelt und gelten heute als eines der erfolgreichsten und vielversprechendsten Mittel zum Transport und zur Abgabe von Medikamenten. Liposomen, wie sie in dieser Arbeit vorkommen, sind 100 - 200 Nanometer große Vesikel, deren Membran aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht und eine wässrige Phase, den Kern, einschließt. Der jeweils in den Kern, bzw. nach außen reichende Teil der Lipidschicht besteht aus den hydrophilen Köpfen der Phospholipide, nach innen reichen die lipophilen Kohlenwasserstoffschwänze, die sich entropiebedingt, aneinanderlegen. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften von Phospholipiden, können sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Wirkstoffe erfolgreich eingeschlossen werden. Hydrophobe Wirkstoffe können dabei in die Lipiddoppelschicht integriert werden, hydrophile Wirkstoffe können entweder aktiv oder passiv in den Kern eingeschlossen werden (3).

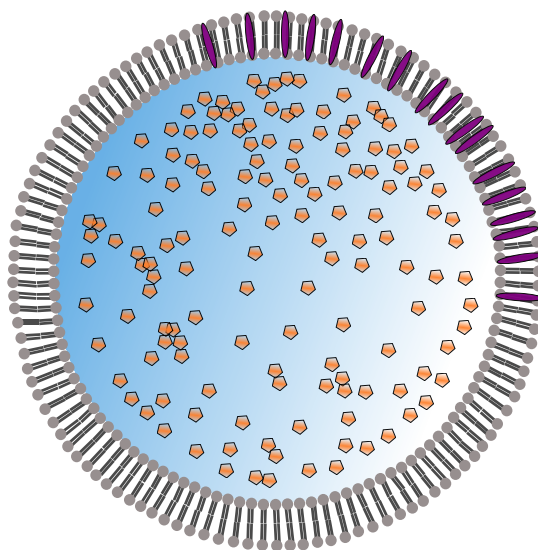


ABBILDUNG 2.1: Aufbau eines Liposoms

Abbildung 2.1 zeigt die schematische Darstellung eines Liposoms mit enkapsuliertem hydrophilen Wirkstoff (orange) und in die Membran integriertem hydrophoben Wirkstoff (lila). Das Liposom kann nun beispielsweise mit Zellmembranen fusionieren und so seinen enkapsulierten Wirkstoff direkt in die Zelle abgeben (4). Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Liposomen als ideale Medikamentenabgabesysteme. Im klinischen Alltag werden heutzutage bereits mehrere Formulierungen eingesetzt (bspw. Caelyx[®], Doxil[®], Onyvide[®]). Außerdem befinden sich zahlreiche weitere Formulierungen mit meist zytotoxischen Wirkstoffen in klinischen Studien (5), (6)

2.1.1 Lang zirkulierende Liposomenformulierungen

Durch den Unterschied von Tumorgewebe zu physiologischem Gewebe kann bei klassischen Liposomen bzw. auch anderen Makromolekülen der EPR-Effekt (Enhanced Permeability and Retention), genutzt werden (7). Der EPR-Effekt beschreibt die bessere Durchlässigkeit (Permeability) von Blutgefäßen in Tumoren und die bessere Anreicherung (Retention) von Makromolekülen im Tumorgewebe. Denn bei den allermeisten malignen Tumoren ist das Gewebe im Gegensatz zum normalen physiologischen Gewebe durch mehrere Unterscheidungsmerkmale geprägt. Durch meist starke Angiogenese ist Tumorgewebe stärker von Blutgefäßen durchsetzt, deren Endothelzellen durch stärkere Fenestrierung u.a. außerdem auch durchlässiger sind als physiologisches Endothel. Typischerweise ist das Lymphabflusssystem im Tumorgewebe auch nur mangelhaft ausgeprägt, weswegen Metabolite schlechter abtransportiert werden und sich dadurch eher im Tumorgewebe anreichern (7). Diese Aspekte sorgen dafür, dass schon die Anwendung von klassischen Liposomenformulierungen Vorteile gegenüber herkömmlichen Wirkstoffen verspricht. Bedingt durch längere systemische Zirkulationszeit der liposomalen Wirkstoffe kommt es zu einer vermehrten passiven Anreicherung im Tumorgewebe (8).

2.2 Hyperthermie

Bei der Hyperthermie, der künstlichen Erwärmung des menschlichen Körpers über die physiologische Temperatur hinaus wird lokal oder global die Temperatur erhöht (9). Dies wird vor allem in der onkologischen Behandlung von soliden Tumoren angewendet, wie beispielsweise in Kombination mit systemischer Zytostatikaapplikation bei Weichteilsarkomen, wo im Langzeit-Follow-Up ein Überlebensvorteil gegenüber dem klassischen Zytostatika-Regime gefunden wurde (10).

Über einen spezifischen Effekt auf Tumorgewebe in einer Temperaturspanne von 40° bis 43°C wurde bei der Applikation von lokaler Hyperthermie berichtet, was mit der Zytoarchitektur von Tumorgewebe und teilweise schlechter perfundierten Arealen im Tumor zusammenhängt. Diese werden durch die erhöhte Temperatur

irreversibel geschädigt und können sich mangels optimaler Gefäßversorgung wesentlich schlechter regenerieren als normales Gewebe (11). Darüber hinaus verstärkt Hitze die Zytotoxizität von zahlreichen Zytostatika (12), (13). Als Gründe hierfür werden beispielsweise eine vermehrte Alkylierung, verstärkte Gewebeaufnahme und verminderte Reparatur von therapiebedingten DNA-Doppelstrangbrüchen aufgeführt. Zusätzlich werden Hitzeschockproteine induziert, woraufhin es zu einer komplexen zellulären und humoralen Immunantwort gegenüber dem Tumorgewebe kommt. (14)

Eine sehr elegante Weise liposomenenkapsulierte Medikamente an ihr Ziel zu bringen ist nun, diese beiden Prinzipien zu kombinieren, und Liposomen zu entwickeln, die bei einer bestimmten Temperatur ihren Wirkstoff freigeben. Yatvin et al. (15) beschrieb 1978 zum ersten mal Liposomen, die genau dies tun und eröffnete damit ein neues Forschungsfeld in der Nanomedizin.

2.3 Thermosensitive Liposomenformulierungen

Was die medikamentöse Therapie von soliden Tumoren so schwierig macht, sind zum einen die mitunter sehr starken systemischen Nebenwirkungen einiger Zytostatika, die bei vielen Chemotherapieregimen die Compliance von Patienten stark beanspruchen. Zum anderen ist es die nur mäßige Bioverfügbarkeit der meist intravenös applizierten Chemotherapeutika im Zielgewebe. Deswegen ist das Konzept von TSL, das theoretisch diese beiden Probleme gleichzeitig löst, vielversprechend. Seit der Entwicklung der ersten TSL-Formulierung von Yatvin et al. (15), kam es zu mehreren Weiterentwicklungen. Needham et al. (16), sowie Landon et al. (17) entwickelten eine neue TSL-Formulierung, die derzeit in klinischen Studien untersucht wird: ThermoDox[®]. Die Doxorubicin beinhaltenden Liposomen, deren Membran aus DPPC, S-Lyso-PC und DSPE-PEG₂₀₀₀ besteht (90/10/4 mol/mol), wurden so entwickelt, dass sie ihren Wirkstoff bei mäßiger Hyperthermie (40°- 42°C) rapide abgeben und bei Körpertemperatur (~ 37°C) stabil sind. Bei diesen leicht erhöhten Temperaturen erreichen TSL, in dem Fall LTSL (Low Temperature Sensitive Liposomes) ihre Phasenübergangstemperatur (T_M). Dies ist die Temperatur, bei der die Lipiddoppelschicht des Liposoms ihre hoch-geordnete Struktur verliert, und dadurch für enkapsulierte Medikamente durchlässiger wird. Bei Körpertemperatur (~ 37°C) befindet sich die Phospholipiddoppelschicht in einer festen Gelphase, während sie beim Erhöhen der Temperatur über (T_M) in eine flüssige kristalline Phase wechselt. Bei T_M ist die Permeabilität am höchsten, da die zwei soeben beschriebenen Phasen koexistieren (18).

Die ThermoDox[®]-Formulierung beinhaltet unter anderem DSPE-PEG₂₀₀₀, ein PEGyliertes Phospholipid. Die Kombination mit dem hydrophilen Polymer Polyethylenglycol ist eine schon lange etablierte Methode (19), (20), um den Liposomen

einen sogenannten "Stealth"-Effekt zu verleihen (21). Die PEGylierung verspricht eine längere Blutzirkulation der Liposomen, sowie einen verminderten Abbau durch das Retikuloendotheliale System, da diese Modifikation das Immunsystem daran hindert, die Liposomen als fremd zu erkennen. Allerdings haben bis zum heutigen Zeitpunkt auch diverse Studien einen adversen Effekt der PEGylierung beschrieben, bspw. verringerte Gewebs- und Wirkstoffaufnahme, Bildung von anti-PEG-Antikörpern und Komplementaktivierung (22). Deswegen sollte die PEGylierung kritisch gesehen werden.

2004 wurde schließlich von Lindner et al. (23) eine neue thermosensitive Formulierung vorgestellt, die durch die Inkorporation von 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerin zu einer verlängerten Zirkulationszeit führt.

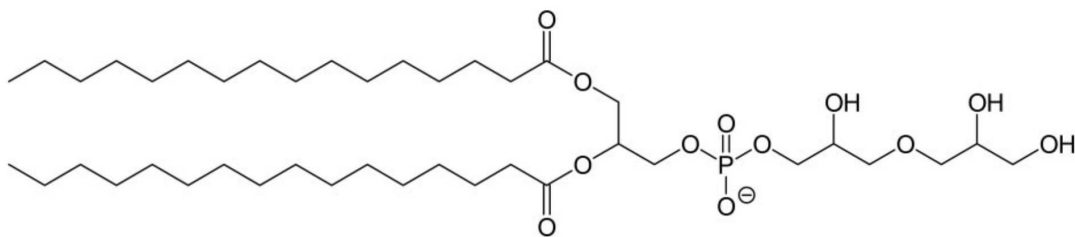


ABBILDUNG 2.2: Strukturformel von 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerin (DPPG₂)

Die Formulierung besteht aus: DPPC, DSPC, DPPG₂ (50/20/30 mol/mol). In allen weiteren Bereichen dieser Arbeit wird sie als DPPG₂-TSL bezeichnet.

Diese neuartige Formulierung zeigt eine Verbesserung der TSL-Formulierung *in vitro* im Vergleich zur DSPE-PEG₂₀₀₀-Formulierung. Lindner et al. (23) beschreiben nicht nur eine verlängerte *in vivo* Halbwertszeit, sondern auch eine Steigerung der Wirkstofffreisetzung. Außerdem zeigt sie eine größere Stabilität bei 37°C (24). Zusätzlich zeigten Zimmermann et al. (25), dass die DPPG₂-Formulierung mit encapsuliertem Doxorubicin an Hauskatzen mit spontanen Fibrosarkomen trotz niedriger Wirkstoffdosen in Kombination mit regionaler Hyperthermie eine Tumorstabilität bzw. teilweise sogar eine Tumorregression erreichen konnte, vollkommen ohne systemische Nebenwirkungen der Therapie. Dies macht diese neue Formulierung zu einem äußerst vielversprechenden Kandidaten im Feld der TSL-Formulierungen. Eine Charakterisierungsmöglichkeit dieser neuen TSL-Formulierung besteht nun in der Bestimmung der an sie bindenden Proteine

2.4 Verhalten der Liposomen *in vivo*

Was der Körper, bzw. das Immunsystems einer biologischen Entität "sieht", ist nach Applikation der Liposomen unterschiedlich zu der originalen Oberfläche des Nanopartikels. Durch sofortiges Binden von verschiedenen Plasmabestandteilen, hauptsächlich Proteinen, wird die Oberfläche von Nanopartikeln nach Applikation in den

Organismus modifiziert. Diese neue Proteinschicht wird auch als "Proteinkorona" bezeichnet (26), (27), (28).

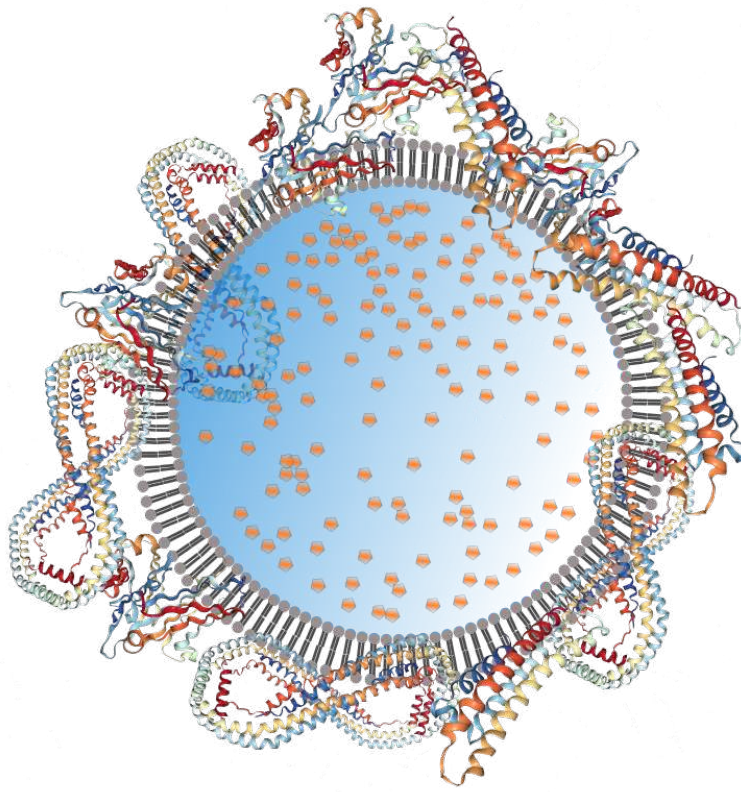


ABBILDUNG 2.3: Schematische Darstellung einer Proteinkorona an der Liposomenoberfläche nach Bindung von Proteinen an Membranphospholipide

2.4.1 Konzept der Proteinkorona

Die Proteinkorona bestimmt das Schicksal der Liposomen *in vivo*, und hat nicht nur Einfluss auf die provozierte Immunantwort des Organismus, sondern von ihrer Komposition hängt auch das Verteilungsverhalten der Liposomen, bzw. des Wirkstoffes und die Steuerbarkeit ab. Die Forschung um Proteinkoronae kann als ein sehr wichtiger Prädiktor im Verhalten von Nanopartikeln *in vivo* dienen. Eine Kenntnis der Proteinkorona könnte das Verständnis des *in-vivo*-Verhaltens erweitern, und die aktuell zugelassenen Formulierungen ergänzen (29). Obwohl es mehrere tausend Proteine im menschlichen Organismus, oder dem anderer vergleichbarer Säugetiere gibt, sind es typischerweise, abhängig von den Eigenschaften des Nanopartikels, nicht mehr als 10-50 verschiedene Proteine, die die Proteinkorona ausmachen (30). Abhängig von der Lipidzusammensetzung der verwendeten Liposomen ist sie ca. 10-40 nm dick (31).

Die Bildung der Proteinkorona ist im physiologischen Milieu kein statischer Prozess, sondern vielmehr ein dynamischer Vorgang. Barrán-Berdón et al. (32) zeigten 2013, dass die Proteinkorona von DC-Chol-DOPE-Nanopartikeln (3β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol - dioleoylphosphatidylethanolamine) keineswegs konstant bleibt, sondern sich vielmehr nach initialer Bildung mehrmals ändert, bis sie in einer energetisch günstigen Konformation vorliegt (33). Diese Konformationsänderungen werden auch als Vroman-Effekt bezeichnet (s. Kapitel 2.4.3).

Grundsätzlich gibt es mehrere Faktoren, die die Zusammensetzung der Proteinkorona auf Liposomen bestimmen, darunter deren Größe, Ladung (Zeta-Potential), oder Lipidzusammensetzung (34), (35).

Hernández-Caselles et al. (34) haben schon 1993 elektrophoretisch versucht die Proteinkorona von verschiedenen Liposomen, die sich auch deutlich in ihren Eigenschaften (Größe, Zeta-Potential) unterschieden, zu bestimmen. Die Ergebnisse der damaligen Arbeit widersprechen allerdings den Erkenntnissen heutiger Proteinkorona Analysen, die hauptsächlich Apolipoproteine vertreten sehen. Trotzdem ist die Gel-Elektrophorese bis heute ein gut geeignetes Medium, um sich einen ersten Überblick über Unterschiede verschiedener Liposomenformulierungen zu verschaffen, weswegen sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Ein Punkt, der diese Arbeit und auch alle anderen Arbeiten in diesem Bereich stark limitiert, ist die Tatsache, dass sich die Proteinkorona, die sich physiologisch *in vivo* bildet nochmal deutlich von der *in-vitro*-Korona hier und in allen anderen Arbeiten in ihrer Komposition unterscheidet. Hadjidemetriou et al. (36) konnten elektronenmikroskopisch feststellen, dass PEGylierte, sowie unmodifizierte Liposomen nach Bildung einer Proteinkorona *in vitro* Faserstrukturen aufwiesen, ganz im Gegensatz zu den *in vivo* Proben. Gründe hierfür könnten beispielsweise die Dynamik der Liposomen *in vivo* sein, im Gegensatz zu homogener Rüttelbewegung der *in-vitro*-Inkubation, sowie je nach Verwendung von Inkubationsmedium (Serum oder Plasma) das Vorhandensein von Antikoagulantien. Dies ist zum aktuellen Zeitpunkt allerdings nur Spekulation. Deswegen sollten auch alle Ergebnisse dieser Arbeit nur als Näherung betrachtet werden und für eine genaue Analyse der Proteinkorona von Liposomen bedarf es in Zukunft, auf Basis solider *in-vitro*-Ergebnisse, weitere *in-vivo*-Experimente.

2.4.2 Harte Korona - Weiche Korona

Die Heterogenität der im Blut vorhandenen Biomoleküle, insbesondere der Proteine, ist der Grund warum einige Proteine eine wesentlich höhere Affinität zur Oberfläche des Liposoms zeigen. Dies resultiert in der Bildung von zwei verschiedenen Schichten, der harten Korona (HC): Einer Schicht aus Proteinen, die mit den Liposomen sehr stabile Bindungen eingehen (37); und der weichen Korona (SC) einer dynamischen Schicht mit häufigeren Kompositionsveränderungen und kürzerer Lebensdauer (36), (38). Bisher ist es aufgrund der schlechteren Stabilität nicht

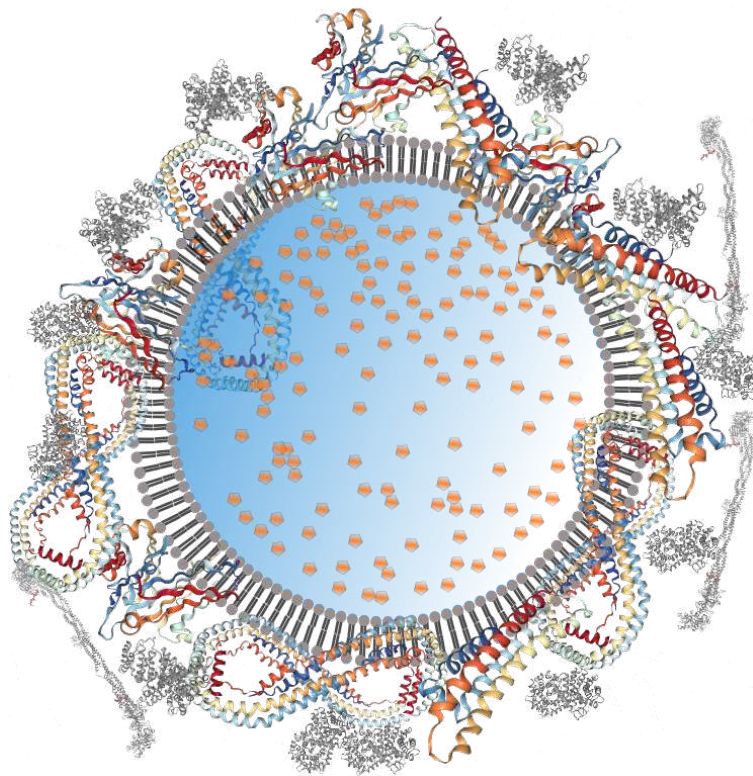


ABBILDUNG 2.4: Schematische Darstellung einer harten (bunt) und weichen (grau) Proteinkorona eines Liposoms

gelungen die SC zu charakterisieren. Auch in dieser Arbeit werden nur die Proteine analysiert, die mit hoher Affinität an die Liposomen binden. Die Charakterisierung in zwei verschiedene Schichten ist allerdings auch anfechtbar. Im physiologischen Milieu ist der komplette Prozess, wie im nächsten Kapitel beschrieben, vermutlich sehr dynamisch und nicht so dichotom.

2.4.3 Vroman-Effekt

Der Vroman-Effekt, der 1969 erstmals von Vroman und Adams (39) beschrieben wurde, und auch im Bezug auf Hämostase und Koagulation relevant ist, beschreibt einen kompetitiven Proteinaustausch, bei dem Proteine, die an eine Oberfläche (hier im Sinne einer Proteinkorona) gebunden sind, von neu ankommenden Proteinen verdrängt werden. Proteine, die eine kleinere Molekülmasse haben, binden typischerweise zuerst an Oberflächen (in diesem Fall Nanopartikeloberflächen) und werden später von größeren Molekülen verdrängt, die durch ihre Größe und oft auch stärkere Flexibilität in ihrer Konformation eine höhere Affinität an die jeweilige Oberfläche haben. Ein sehr wahrscheinlicher Mechanismus dafür ist die Drehung von mehrschichtigen Aggregaten, die aus multiplen Proteinen bestehen. Dabei adsorbiert die Oberfläche des Nanopartikels anfangs eine erste Schicht Proteine, in die hinein sich dann eine zweite Schicht lagert. Anschließend "dreht" sich dieser

Aggregat-Komplex, sodass die initial absorbierte Proteinschicht wieder dem umgebenden Medium ausgesetzt wird und zurück in die Plasmaumgebung diffundiert (40). Dies stellt die hohe Dynamik des Proteinkorona Komplexes dar, und ist auch ein Grund, warum *in-vitro*-Experimente stark limitiert sind, da hier Nanopartikel bzw. Liposomen nur eine gewisse Zeit in beispielsweise Plasma inkubiert werden. Dies unterstreicht nochmal die Wichtigkeit von *in-vivo*-Experimenten.

2.4.4 Einfluss von Proteinen auf das Freisetzungsprofil der Liposomen

Die Zusammensetzung der Proteinkorona von TSL spielt nicht nur im Bezug auf die Stabilität der Liposomen *in vivo* eine Rolle, sondern beeinflusst auch das Freisetzungsverhalten der enkapsulierten Wirkstoffe.

Schon länger ist bekannt, dass die Inkubation in Serum die Freisetzungsrates von liposomalen Wirkstoffen erhöhen kann (41), (42). Hossann et al. (43) stellten insbesondere fest, dass unter mehreren untersuchten Proteinen insbesondere Albumin in mehreren Liposomenformulierungen zu einer schnelleren Wirkstofffreisetzung führt. Außerdem führte IgG bei der DPPG₂- Formulierung zu einer Membrandestabilisierung.

2.4.5 Unterschiedliche Pharmakokinetik von DPPG₂-Liposomen in verschiedenen Spezies

Nachdem bei der weiteren Charakterisierung der neuartigen Liposomenformulierung mit DPPG₂ die Liposomen anhand ihrer Pharmakokinetik auch *in vivo* weiter klassifiziert wurden, gab es Hinweise auf eine Instabilität im Mausplasma (43), die sich bei Pharmakokinetik-Experimenten in der Ratte und in der Maus bestätigten (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Vor allem im Mausmodell waren die verwendeten TSL weniger stabil und hatten eine kürzere Halbwertszeit. Eine naheliegende Vermutung ist, dass es Proteine gibt, die nur im Mausplasma vorkommen, die die Lipiddoppelschicht infiltrieren bzw. destabilisieren.

Beim Untersuchen des Bindungsverhaltens von ausgewählten Proteinen (Apolipoprotein A1, Albumin, Transferrin, Fibrinogen) zeigten Mittag et al. (44), dass Apolipoprotein A1 eine wesentlich höhere Affinität zu den untersuchten Liposomen hat.

Darüberhinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Albumin die Freisetzungstemperatur von DPPG₂-TSL: T_r verändert. Da in dieser Arbeit (44) nur vier spezifische Plasmaproteine untersucht wurden, liegt die Vermutung nahe, dass darüber hinaus wesentlich mehr Proteine Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung bei TSL-Formulierungen nehmen. Insgesamt konnte in vorangegangenen Arbeiten allerdings keine zufriedenstellende Erklärung für das "Mausplasma-Phänomen" oder für den Einfluss aller vorhandenen Plasmaproteine auf die Pharmakokinetik gefunden werden.

Hierbei bedeutend ist zum einen, ob es Gründe gibt, die gegen das Verwenden

von Mäusen als Versuchstiere bei *in vivo*-Liposomen-Versuchen sprechen. Auf der anderen Seite gibt es die Möglichkeit, dass mit dem Finden einer zufriedenstellenden Erklärung auch die Pharmakokinetik im Humanmodell verbessert, bzw. auch besser steuerbar gemacht werden könnte, weswegen es wichtig ist, diesen Effekt genau zu verstehen.

Die Aufklärung der pathophysiologischen Zusammenhänge, die zu einem speziesspezifischen Effekt der TSL *in vivo* führt, ist von grundlegendem Interesse für die Liposomenforschung. Diese Erkenntnisse ließen sich auch für die Entwicklung neuer TSL für den Einsatz beim Menschen nutzen.

2.5 Fragestellung

TSL sind vielversprechende neuartige Nanocarrier zur zielgerichteten Applikation von Pharmazeutika. Die Erforschung der Protein-TSL-Interaktion *in vitro* ist ein wichtiger Schritt, um vorauszusagen, wie sich Liposomen in einem biologischen Milieu verhalten werden. Seit langem wurde etabliert, dass Nanopartikel, z.B. TSL von einer Proteinschicht umgeben werden, sobald sie in den Blutstrom gelangen. Diese Proteinkorona hat großen Einfluss auf das Verhalten der Liposomen, auf die biologische Halbwertszeit, v.a. auf die Stabilität und damit ungewollte Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs (Leakage), sowie auf die Pharmakokinetik des Wirkstoffs.

Diese Arbeit befasst sich mit zwei großen Themen, die zur Charakterisierung und zum besseren Verständnis des *in-vivo*-Verhaltens von DPPG₂-TSL beitragen sollen. Zum einen soll die Frage geklärt werden, ob es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Liposomenformulierungen in deren Proteinkorona Komposition gibt. Und wenn ja, ob aufgrund einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Proteinkorona Aussagen bezüglich des Einflusses der Korona auf das TSL-Verhalten *in vivo* getroffen werden können. Dadurch soll ein Teil zur Liposomenforschung beigetragen werden, um exakt steuerbare Liposomen zu kreieren, deren Halbwertszeit, Wirkstofffreisetzungzeit und -ort durch deren Formulierung oder Proteinkorona vorhersehbar sind.

Das zweite große Thema ist die Erklärung des Mausplasma-Phänomens. Aufgrund von mehreren Arbeiten (s. Kapitel 2.4.5), in denen auffiel, dass die Pharmakokinetik der DPPG₂-Liposomen sich vor allem im Mausmodell stark unterscheidet, war der zweite große Teilaspekt dieser Arbeit die Analyse der Proteinkorona in fünf verschiedenen Spezies. Allen voran natürlich der Vergleich von Human- und Mausmodell, um die Unterschiede hier zu verstehen.

Kapitel 3

Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma Aldrich GmbH (München), Merck KGaA (Darmstadt) oder Applichem (Darmstadt). Die Präparation von wässrigen Lösungen wurde mit deionisiertem und Reinstwasser durchgeführt. Dafür wurde eine Reinstwasseranlage (Milli Q Advantage, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) verwendet.

3.1 Liposomenherstellung

3.1.1 Verwendete Formulierungen

Um zu beweisen, dass sich die Proteinkorona tatsächlich von der Komposition der verwendeten Liposomen beeinflussen lässt, wurden mehrere, teils dem Labor bekannte, teils kommerziell schon angewandte Formulierungen verwendet. Diese wurden mit dem Ziel ausgewählt, möglichst unterschiedliche Liposomen in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften zu vergleichen. Die fünf verwendeten Formulierungen sind:

Bezeichnung	Lipidzusammensetzung	Lipidverhältnisse	Abkürzung
<i>DPPG₂-Liposomen:</i>	DPPC / DSPC / DPPG ₂	50/20/30 mol/mol	DPPG ₂ -TSL
<i>Kationische Liposomen:</i>	DPPC / DSPC / DPTAP / DSPE-PEG ₂₀₀₀	62,5/25/7,5/5 mol/mol	KL
<i>Lysolipid basierte TSL:</i>	DPPC / S-Lyso-PC / DSPE-PEG ₂₀₀₀	90/10/4 mol/mol	LTSL
<i>PEGylierte Liposomen:</i>	DPPC / DSPC / DSPE-PEG ₂₀₀₀	80/15/5 mol/mol	PEGL
<i>Caelyx[®]:</i>	HSPC / Chol / PE-PEG ₂₀₀₀	55/40/5 mol/mol	Caelyx [®]

TABELLE 3.1: Liposomenformulierungen, an denen die Proteinkorona isoliert wurde. Bis auf Caelyx[®], das Doxorubicin beinhaltetete, wurde in die vier anderen CF eingeschlossen.

Die Liposomenformulierung mit DPPG₂ basiert auf der Publikation von Lindner et al. (23), die anderen Liposomenformulierungen basieren auf gängigen Formulierungen in der Literatur, das Caelyx[®] wurde über die LMU Apotheke erworben. DPPC, DSPC, DPPG₂ stammen von Corden Pharma (Liestal, Schweiz), S-Lyso-PC von Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, USA), DPTAP und DSPE-PEG₂₀₀₀ stammen von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Alle Formulierungen bis auf Caelyx[®] wurden mit folgender Methodik hergestellt und charakterisiert.

3.1.2 Herstellen eines Lipidfilms

Alle verwendeten Liposomenformulierungen wurden mit der Lipidfilm Hydratations- und Extrusions-Methode hergestellt (41),(42). Dafür wurden die verwendeten Lipide (s. 3.1.1) in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 (v/v) gelöst und in einen Rundkolben pipettiert. Das Lösungsmittelgemisch wurde daraufhin mittels eines Rotationsverdampfers (Laborota 4001, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach) in mehreren Schritten mit verschiedenen Temperatur- und Druckeinstellungen evaporiert, um einen einmolekularen gleichmäßigen Lipidfilm zu erhalten. Dieser wurde anschließend für mindestens 1 h unter Vakuum getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung im Exsikkator gelagert.

3.1.3 Liposomenbildung und Extrusion

Der getrocknete Lipidfilm wurde für 7-12 min bei 60°C in einer 100 mM Carboxyfluorescein-Lösung (CF-Lösung) (pH: 7,2) hydratisiert und mit CF passiv beladen. Die Liposomendispersion nach Hydratation betrug 50 mM.

CF (Sigma Aldrich GmbH, München, Germany), das als freie Säure vorliegt, wurde vorher mit Natriumhydroxid in ein Natriumsalz umgewandelt, und anschließend weiter durch einen Sterilfilter aufgereinigt. Beim Lösen des Lipidfilms in der CF-Lösung bilden sich entropiebedingt spontan Liposomen in verschiedenen Größen. Außerdem reichert sich dabei automatisch auch ein Teil des CFs im Inneren der Liposomen ab. Grund für das Verwenden eines Farbstoffes (CF) als Beladung der Liposomen war die damit verbundene bessere Sichtbarkeit in allen darauffolgenden Schritten, da eine Liposomenlösung ohne Markierung milchig weiß ist, und damit vor allem Methoden, wie die Säulenchromatographie, deutlich erschwert. Desweiteren konnte damit die temperaturabhängige Freisetzung der TSL gezeigt werden.

Die nun erhaltene Lösung mit CF-Liposomen unterschiedlicher Größen wurde anschließend 10 mal durch zwei Polycarbonat Membranen mit einer Porengröße von 200 nm (Whatman® Nucleopore Tracked -Etched Membrane, Sigma Aldrich GmbH, München) in einem Hochdruckextruder (Lipex™ thermobarrel extruder, Northern Lipids Inc., Burnaby, Canada) bei 60°C extrudiert.

3.1.4 Säulenchromatographie

Das freie CF, das anschließend nicht in den Liposomen enthalten war, wurde mittels Größenausschlusschromatographie über PD-10-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) abgetrennt.

3.2 Liposomencharakterisierung

Um die Reproduzierbarkeit einzelner Liposomenchargen zu gewährleisten, wurde nach deren Herstellung die Liposomenchargen vor Verwendung für weitere Experimente vollständig mit Standardmethoden charakterisiert. Dazu zählen die Größenmessung, die Phosphatbestimmung, eine Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung der Lipidverhältnisse, und Temperaturöffnungskurven, die nur bei TSL relevant sind.

3.2.1 Größenmessung

Zur Größenmessung wird die Methode der dynamischen Lichtstreuung verwendet. Hierbei wird mithilfe des Prinzips der Stokes-Einstein-Gleichung ein Rückschluss auf globuläre Teilchen in Lösung, z.B. Proteine oder in diesem Fall Liposomen, aufgrund des Diffusionsverhaltens gewonnen. Das Diffusionsverhalten wird mit Hilfe des Streuverhaltens von Laserlicht an den zu messenden Partikeln bestimmt. Die Messungen dafür wurden in 0,9% iger NaCl-Lösung im Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Vereinigtes Königreich) durchgeführt.

3.2.2 Phosphatbestimmung

Da alle zur Liposomenherstellung verwendeten Lipide pro Molekül genau ein Phosphoratom besaßen, war der Phosphatgehalt der Liposomenlösung ein direkter Nachweis der Lipidkonzentration. Für die Messung des Phosphatgehalts wurde die etablierte Methode nach Eibl und Lands (45) verwendet. Vereinfacht formuliert, wurde unter Zugabe von Schwefelsäure, Perchlorsäure und durch Erhitzen der Proben auf 300°C, der organische Phosphorester in den Lipiden zu anorganischem Phosphat umgewandelt. Unter Zugabe von Ammoniumheptamolybdat bildete sich ein Komplex, dessen Trübung bei 660 nm in einem Spektrophotometer (Beckmann DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) gemessen werden konnte. Für die lineare Standardkurve wurden eine 1 g/l Phosphatlösung (Phosphat Standardlösung 1000 mg/ml, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurde regelmäßig mit einem definierten Phosphatstandard die Qualität der Bestimmung überprüft (Phosphorus ICP Standard 1000 mg/ml Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

3.2.3 Dünnschichtchromatographie

Die Lipidzusammensetzung und das Auftreten von Lysolipiden (Zersetzungsprodukte der Lipide) der fertigen Liposomenformulierungen wurden mithilfe von Dünnschichtchromatographie bestimmt.

Nach einer Methode von Hossann et al. (41) ist das Prinzip hierbei die Trennung einer Probe durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften in einem Zweiphasensystem. Verwendet wurde hierbei eine Kieselgelplatte, die als *feste Phase* dient, und

aufgrund deren Feinporigkeit ein organisches Lösungsmittel (*flüssige Phase*) durch Kapillarkräfte nach oben steigt.

Hier enthielt das Lösungsmittel die verwendeten Lipide der jeweiligen Liposomenformulierungen. Diese wechselwirkten aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften unterschiedlich stark mit der festen Phase, was im Endeffekt bedeutete, dass sie in verschiedenen Geschwindigkeiten auf der Platte nach oben wanderten. Bei einer Kieselgelplatte, die groß genug war, konnte man eine deutliche Trennung der verschiedenen Lipide voneinander erkennen, und die Lipidmengen anschließend auch quantifizieren. Dadurch erhielt man einen Rückschluss auf deren Mengenverhältnis zueinander. Kurz zusammengefasst, wurden 1500 nmol einer Liposomencharge in einem Reagenzglas mit 1 ml 0,9 % NaCl und 2 ml CHCl₃/MeOH 1:1 (v/v) gemischt. Nach Zentrifugation bildeten sich zwei Phasen, wobei die organische Phase in einem neuen Reagenzglas bei 40°C unter Stickstoff-Strom eingedampft wurde. Der Rückstand wurde in 100 µl CHCl₃/MeOH 9:1 (v/v) aufgelöst und anschließend 1,2 µl davon auf eine DC-Platte aufgetragen (Silica 60, Merck KGaA, Darmstadt). Die mobile Phase bestand aus CHCl₃/MeOH/CH₃COOH/H₂O 100:60:10:5 (v/v). Als Standard wurde eine Lösung gewählt, die P-Lyso-PC, DPPC, DPPG₂, und DSPE-PEG₂₀₀₀ enthielt. Zum Färben wurde ein Molybdän-Spray verwendet (46). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Gimp und ImageJ.

3.2.4 Temperaturabhängige Freisetzung

Bei TSL, wie sie unter anderem auch hier verwendet wurden, war es wichtig, zu wissen, ob diese auch in dem Temperaturbereich ihren Inhalt freisetzen, der zur therapeutischen Anwendung genutzt wird. Darum wurde als zusätzliche Charakterisierungsmethode ein Temperaturöffnungsprofil erstellt. Auch hier gab es eine standardisierte Methode von Hossann et al. (41).

Die TSL wurden dafür 1:50 in 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt (VL). Von dieser Lösung VL wurden 100 µl im 1:1 Verhältnis mit 10 %igem Triton X-100 gemischt und anschließend für 15 min 45°C inkubiert. Zu 20 µl von diesem Gemisch wurde 1 ml NaCl/Tris-Lösung pH 8 hinzugefügt. Die Fluoreszenzmessung der tritonbehandelten Liposomen wurde als 100 %-Wert angenommen. Für das Temperatur-Profil wurden 100 µl der verdünnten Liposomen-Lösung (VL) mit 1 ml FCS oder 0,9 % NaCl verdünnt. 20 µl von dieser Lösung wurden bei bestimmten Temperaturen (37-45°C für 5 min; 37/42°C für 1h) inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend in einem Spektrofluorometer gemessen (Cary Eclipse, Varian Inc., Palo Alto, California, USA)

3.3 Bildung der Proteinkorona *in vitro*

Die Bildung der Proteinkorona wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* untersucht. Dabei wurden Liposomen in verschiedenen Proteinlösungen inkubiert. Um anfänglich festzustellen, ob überhaupt Proteine an Liposomen binden würden, und trotz

späterer Denaturierungsschritte immer noch durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden können, wurden zuerst eine Humanalbumin-Lösung und eine humane IgG-Lösung getestet, um eine Methode zu entwickeln.

Für die Untersuchung der Proteinkorona an Liposomen wurden Plasmen von 5 verschiedenen Spezies, sowie FCS verwendet. Mausplasma, Beagleplasma, und Rattenplasma stammten von Seralab (BIOVIT, Hicksville, USA), Plasma des syrischen Goldhamsters stammte von Biotrend (Köln, Deutschland) und FCS von Biochrom (Berlin, Deutschland). Das verwendete Humanplasma war gepooltes Plasma aus der Blutbank des Klinikums Großhadern, LMU München. Kälberblut wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Armin M. Scholz des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim (Tierärztliche Fakultät, LMU München) zur Verfügung gestellt.

Um eine stabile Proteinkorona zu erreichen wurde eine Liposomenprobe 1:1 mit der jeweiligen Proteinlösungen verdünnt und für eine Stunde bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert.

3.4 Säulenchromatographie zur Abtrennung von ungebundenem Protein

3.4.1 Prinzip der Größenausschlusschromatographie

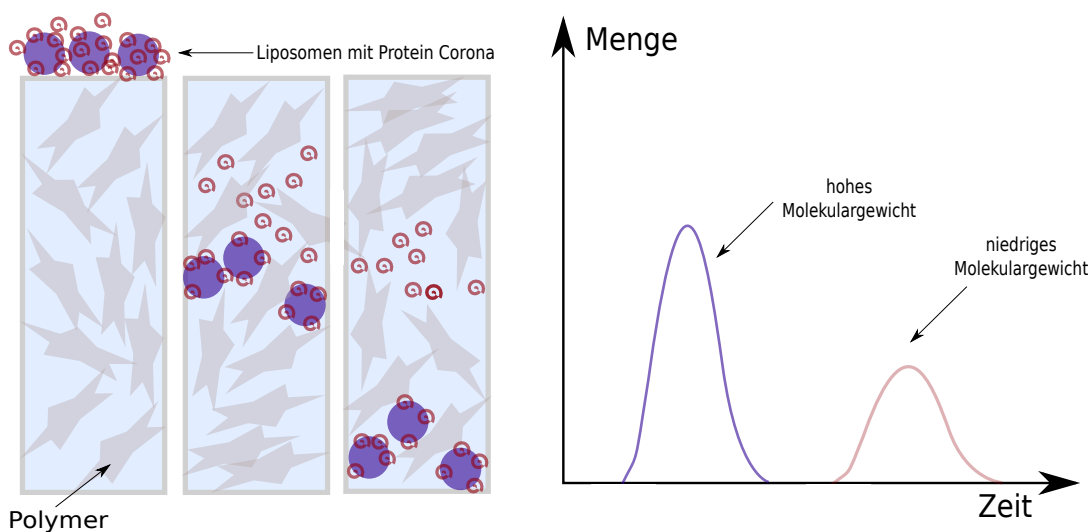


ABBILDUNG 3.1: Teilchen unterschiedlicher Größe wandern durch ein Polymer-Gel. Dabei sind aufgrund von Diffusionsprozessen größere Moleküle schneller als kleinere, sodass eine Größentrennung stattfinden kann.

Beim etablierten Prinzip der Größenausschlusschromatographie (47) beruht die Trennung von Molekülen verschiedener Größe nicht auf Filtration, sondern auf der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeln, abhängig von deren Größe in einer meist aus porösen Polymeren bestehenden stationären Phase. Diese porösen Polymere machen es kleineren Molekülen möglich, in diese einzudringen, wodurch sich das Diffusionsvolumen vergrößert und diese langsamer durch das Polymer diffundieren. Bei größeren Molekülen besteht diese Möglichkeit nicht, sodass diese schneller eluieren.

3.4.2 Trennung mit Sepharose CL-6B

Nach einer Methode von Hosokawa et al. (48) wurden 300 mm lange und 15 mm im Durchmesser fassende Chromatographiesäulen (Lenz Laborglas GmbH, Wertheim, Deutschland) mit eingeschmolzener Fritte und Hahn mit der Sepharose befüllt. Außerdem konnten die Säulen mit mehreren Glasaufstecksätzen zur Volumenerhöhung verlängert werden. Die Sepharose CL-6B wurde nach Herstellerangaben zuerst im Verhältnis 3:1 (v/v) mit der verwendeten Trägerlösung (0,9 % NaCl) gemischt und gewartet, bis die Agarose sich komplett gesetzt hatte. Auf den trockenen Agarosespiegel wurde dann 1,5 ml 1:1 (v/v) inkubierte Protein-Liposomen-Probe gegeben, und nach deren vollständiger Inkorporation in das Medium mit 0,9 % NaCl-Lösung nachgespült, bzw. mithilfe der Kochsalzlösung wurde der hydrostatische Druck auf die Säule und damit die Geschwindigkeit der Chromatographie erhöht. Aufgefangen wurden die Fraktionen, die durch das CF sichtbare Liposomen enthielten. Die gepackten Säulen wurden für die Chromatographie mehrmals verwendet und zwischen den Durchgängen mit jeweils dem 3fachen Säulenvolumen 0,9% NaCl-Lösung gespült, um eventuelle Protein- bzw. Liposomenreste zu eluieren.

Zur Erfolgskontrolle der Abtrennungsmethode wurden jeweils gleiche Volumina Humanplasma-inkubierte DPPG₂-TSL und Plasma-Kochsalz-Mischung zur selben Zeit auf zwei exakt gleich hohe CL-6B-Säulen gegeben. Dann wurden zur selben Zeit die Fraktionen beider Säulen aufgefangen, die mit den Liposomen eluiert wurden, und massenspektrometrisch auf Proteine untersucht (s. Kapitel 3.8).

3.4.2.1 Aufkonzentrierung der Proben

Zur weiteren Aufkonzentrierung wurden die gesäulten Proben anschließend mithilfe von Amicon-Ultra-Filtern (Amicon Ultra-0.5, MWCO=30k, Sigma Aldrich, Missouri, USA) weiter konzentriert. 500 μ l der jeweiligen Probe wurden in die Amiconfilter gegeben und anschließend nach Herstellerangaben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt 3 mal wiederholt um eine ausreichende Konzentrierung der Proben zu erhalten. Anschließend wurden die Proben nach Phosphatbestimmung durch Ausrechnung des Verdünnungsfaktors und mit Verdünnung durch

0,9% NaCl auf die jeweils gleiche Liposomenmenge gebracht, um die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben vergleichen zu können.

3.4.3 Trennung mit Sepharose CL-4B

Die Lipidkonzentration wurde für alle untersuchten Liposomen vor Beginn des Experiments mit 0,9 % NaCl auf 25 mM verdünnt. Die Glassäulen für die Säulenchromatographie wurden mit 0,9 % NaCl-Lösung befüllt und anschließend Sepharose CL 4b (GE Healthcare, Chicago, USA), 1:1 verdünnt mit 0,9 % NaCl dazu gegeben. Es wurde so viel Sepharoselösung verwendet, bis die Länge der fertig gepackten Säule 18 cm betrug.

Die Proben wurden 1:10 (100 μ l Liposomen mit 900 μ l zentrifugiertem Plasma) mit den verschiedenen Plasmen verdünnt und bei 37°C für 30 Minuten im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf die Säule gegeben und sofort 1 ml-Fraktionen aufgefangen. Die gesammelten Fraktionen 11 - 15 enthielten Liposomen, was durch das enthaltene CF sichtbar gemacht wurde. Als Kontrollprobe wurden 100 μ l 0,9 % NaCl-Lösung mit 900 μ l Plasma für 30 Minuten bei 37°C im Thermomixer inkubiert und gesäult. Auch hier wurden die Fraktionen 11 - 15 gesammelt und für die weitere Untersuchung verwendet.

3.4.3.1 Dialyse

Zur weiteren Reinigung der Proben durch eine eventuelle Verunreinigung von kontaminierende Molekülen mit geringem Molekulargewicht wurden die Proben durch die Verwendung von Floatalyzern (G2, MWCO 1000 kD, Spectrum-Labs, USA) gereinigt. Dazu wurden die Floatalyzer nach Herstellerangaben vorbereitet und anschließend im verwendeten Lösungsmittel (0,9 % NaCl-Lösung) gelagert. Die Proben wurden in die Floatalyzer gegeben und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur dialysiert und damit von kontaminierenden Proteinen befreit.

3.4.3.2 Aufkonzentrierung der Proben

Im weiteren Schritt erfolgte die Konzentrierung der Proben in Amicon Filtern. Dabei wurden die Proben aus den Floatalyzern in Amicon Ultra-15 10k Centrifugal Filtersysteme (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) gegeben und anschließend bei 4500 x g für eine Stunde zentrifugiert. Der weitere Schritt war den Überstand in den Amicon-Filtern durch Auf-und-ab-pipettieren zu mischen und in Vivaspin 500 Filter (Sartorius, Göttingen) zu geben. In diesen Filtern wurden die Proben bei 8600 x g für eine Stunde zentrifugiert. Danach wurden die Überstände mit 100 μ l 0,9 % NaCl-Lösung auf-und-ab-pipetiert bis eine homogene Lösung entstand und anschließend nochmal bei 8600 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmal mit 20 Minuten und danach mit 40 Minuten wiederholt. Die Proben wurden anschließend

mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 100 μ l aufgefüllt und anschließend bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20 °C gelagert.

3.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese nach Laemmli ist eine schon lange etablierte Methode in der Biochemie bei der elektrisch geladene Moleküle nach ihrer Ladung bzw. ihrer Größe in einem Trägermedium aus Gel durch ihre unterschiedliche Durchlaufgeschwindigkeit getrennt werden. Hier gibt es mehrere Verfahren. Eingesetzt wurde in dieser Arbeit die Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei wurde SDS als denaturierendes Agens eingesetzt und das Trägermedium bestand aus Polyacrylamid.

3.5.1 Herstellung von Pufferlösungen

Um den pH-Wert im System wegen der beim Elektrophoreselauf entstehenden Anionen und Kationen konstant zu halten, wurden für Trenngel, Sammelgel, Lauflösung und Probenlösung Puffer benötigt.

Der Sammelgelpuffer bestand aus 6,1 % Tris, gelöst in Reinstwasser. Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 molarer Salzsäure auf 6,8 eingestellt.

Als Trenngelpuffer (pH=8,8) wurden 18,2 % Tris in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mit 1 molarer Salzsäurelösung eingestellt.

Für den Laufpuffer wurden 3,9 % Tris, 14,4 % Glycin sowie 1,0 % SDS in Reinstwasser gelöst.

3.5.2 Gelherstellung

Das Sammelgel diente mit seinen größeren Poren, seinem geringeren pH-Wert und seiner geringeren Leitfähigkeit vor allem dazu, eine größere Bandengenauigkeit zu erreichen.

Verwendet wurde nach Testen einer weiteren Acrylamid-Konzentration schließlich ein Trenngel mit 33 % Bisacrylamid und ein Sammelgel mit 16,9 % Bisacrylamid. Für das Trenngel wurde Reinstwasser mit 33,5 % Bisacrylamid, 13,3 % Trenngelpuffer (pH: 8,8) 0,53 % 10%ige SDS-Lösung, 1 % 10 %ige APS-Lösung und 0,05 % TEMED in einem 50 ml Falcon vermischt. Vor Zugabe der letzten drei Bestandteile, wurde das Gemisch für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben um etwaige Luftblasen zu entfernen, die später nach Zugabe der APS-Lösung durch Sauerstoffradikalisierung die Polymerisierung des Gels verhindern könnten.

Die Trenngellösung wurde mit einer Glaspipette in die vorbereiteten Glasplatten, die in der Elektrophorese-Aparatur standen, pipettiert. Danach wurde sofort Isopropanol auf die Trenngellösung pipettiert, um zu verhindern, dass die Lösung beim Polymerisieren austrocknete. Für die Sammelgellösung wurde Reinstwasser mit 16,9 % Bisacrylamid, 24,9 % Sammelgelpuffer (pH=8,8), 1,0 % 10 %ige SDS-Lösung, 0,5

% APS-Lösung und 0,01 % TEMED in einem 50 ml Falconröhrchen gemischt. Wieder wurde das Gemisch vor Zugabe der letzten drei Bestandteile für 10 Minuten in einem Ultraschallbad entgast.

Dann konnte das Isopropanol auf dem Trenngel abgegossen werden, der Zwischenraum zweimal mit Reinstwasser gereinigt und nach guter Trocknung das Sammelgel darauf pipettiert werden. In dieses wurden Platzhalterkämme gegeben, die nach Auspolymerisierung die Taschen bildeten, in die anschließend die Proben gegeben wurden.

3.5.3 Probenvorbereitung

Die 10 μ l Proben wurden mit einem 40 μ l Probenpuffer (25 % Sammelgelpuffer, 40 % 10 %ige SDS-Lösung, 20 % Glycerol, 10 % 0,1 %ige Bromphenolblaulösung und 5 % Mercaptoethanol) gemischt. Dieser diente zur Denaturierung der beinhalteten Proteine, zur pH-Stabilisierung, der Farbstoff zur visuellen Detektion der Proben beim Elektrophoreselauf, das Glycerol zur Erhöhung der Dichte, um das Einsinken in die Geltasche zu erleichtern, und das reduzierende Mercaptoethanol zur Trennung von Disulfidbrücken und damit, zusätzlich zum SDS, zur Zerstörung der Tertiärstruktur und Linearisierung der Proteine. Die SDS-Lösung, ein anionisches Tensid, das die peptideigene Ladung als Surfactant überzieht, damit die Proteine in den Proben eine konstante negative Ladung aufweisen, diente außerdem auch zur Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine und damit zur Denaturierung. Die verdünnten Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C im Thermomixer inkubiert, und anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt.

3.5.4 Elektrophorese-Lauf

Nach Beladung des Gels mit den Proben und dem Proteinmarker (Roti[®]-Mark TRI-COLOR, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde der Elektrophorese-Lauf gestartet: 30 Minuten bei 80 V und 90 Minuten bei 100 V. Für die Elektrophorese wurde eine Elektrophorese-Kammer Mini Protean[®] Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) verwendet.

3.6 Färbungen

Um die Banden zu visualisieren, wurden sie nach der Gelelektrophorese gefärbt. Dafür gibt es mehrere Möglichkeiten, in dieser Arbeit wurden zwei Färbungen verwendet.

3.6.1 Coomassie-Färbung

Coomassie-brilliant-Blau ist ein Farbstoff der sich an basische Seitenketten von Proteinen anhaftet.

Für die Färbungen wurden eine Färbelösung und zwei Entfärbelösungen verwendet. Für die Färbelösung wurde eine methanolische Lösung aus 0,1 % Coomassie Brilliant Blau (m/v) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 45 % Methanol und 9,9 % Essigsäure gemischt. Die Färbelösung wurde nach der Färbung wiederverwendet. Für die erste Entfärbelösung wurden eine Lösung aus 40 % Methanol und sowie 7 % Essigsäure gemischt. Die zweite Entfärbelösung bestand aus 10 % Methanol und 7 % Essigsäure.

Nach zweimaligem Waschen mit Reinstwasser, um noch eventuell verbliebenes Bromphenolblau des Probenpuffers zu entfernen wurden die Gele für 10 Minuten in der Färbelösung geschwenkt. Danach wurden die Gele für 20 Minuten in die erste Entfärbelösung gegeben, und anschließend für 40 Minuten in die zweite Entfärbelösung.

3.6.2 Silber-Färbung

Die Silberfärbung ist hoch sensitiv und macht damit auch von der Coomassie-Färbung potentiell nicht angefärbte Banden sichtbar. Die hier verwendete Färbung basierte auf einem Protokoll der Rockefeller University (49).

Zunächst wurden die Gele in einer Lösung mit 50 % Methanol und 5 % Essigsäure für 20 Minuten und dann in einer 50 %igen Methanollösung für 10 Minuten fixiert. Danach wurden sie für 10 Minuten in Reinstwasser gewaschen.

Um die Banden für die Färbung zu sensitivieren, wurden diese für eine Minute in 0,02 %ige Natrium-Thiosulfatlösung gegeben und danach zweimal mit Reinstwasser gewaschen.

Für die Färbung wurden die Gele für 20 Minuten in einer Lösung aus 0,1 % Silbernitrat und 0,08 % Formalin (37 %) inkubiert und anschließend zweimal mit Reinstwasser gewaschen.

Zum Entwickeln wurden die Gele in einer Lösung aus 2 % Natriumcarbonat und 0,04 % Formalin (37%) geschwenkt, bis die Bandenabtrennung deutlich wurde. Dabei konnte die Lösung mehrere Male gewechselt werden, was die Hintergrundfärbung deutlich reduzierte.

Zum Stoppen der Entwicklungsreaktion wurden die Gele für 10 Minuten in 5 %iger Essigsäurelösung gewaschen. Anschließend wurden sie nochmals in Reinstwasser gewaschen, um sie länger haltbar zu machen.

3.7 Quantitative Proteinbestimmung

Die qualitative Proteinbestimmung bei der SDS-PAGE wurde außerdem noch durch eine quantitative Proteinbestimmung ergänzt. Diese wurde durch kommerziell erworbene Protein-Quantifizierungs-Assays durchgeführt.

3.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Verwendet wurde das Roti-Nanoquant-Assay von CarlRoth, basierend auf einer Proteinkonzentrationsmessung von Bradford (50). Die Standardreihe (Konzentrationsbereich 1 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde nach Herstellerangaben angesetzt, und die Proben zu den zwei verschiedenen Versuchslösungen pipettiert, um einen Farbumschlag zu erreichen. Anschließend wurde die Probe in einem Spektrophotometer (Beckmann DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei zwei verschiedenen Wellenlängen ($a = 450 \text{ nm}$, $b = 590 \text{ nm}$) gemessen. Von den Standardwerten wurde eine Eichgerade hergestellt und davon Steigung und Achsenabschnitt berechnet, mit deren Werte die Proteinkonzentration bestimmt werden konnte. Für das Problem der interferierenden mit CF beladenen Proben wurde vor der eigentlichen Messung der Probe ein blank-Wert der entsprechenden in der Probe enthaltenen Liposomenkonzentration gemessen, um den Absorptionswert zu subtrahieren.

3.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Es wurde noch eine weitere Proteinkonzentrationsmessung mit dem Proteinassay DC^{TM} von Bio-Rad, basierend auf einer Proteinkonzentrationsmessmethode von Lowry et al. (51) getestet. Dafür wurde eine Standardreihe (Konzentrationsbereich 200 - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nach Herstellerangaben angesetzt. Anschließend wurden alle Proben mit den enthaltenen Reagenzien gemischt, um einen Farbumschlag zu erreichen. Danach wurden die Proben der Standardreihe und die Messproben in einem Spektrophotometer (Beckmann DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 750 nm gemessen. Mit der erstellten Eichgerade der Standardreihe, konnten anhand von Steigung und Achsenabschnitt die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

3.7.3 Proteinbestimmung nach Smith

Der dritte Proteinassay wurde für die Proteinbestimmung der Proben bei der Sepharose CL-4B-Methode der Proteinkorona Separation verwendet, da bei der sehr hohen Anzahl an Proben ein Proteinassay mit einer relativ langsamen Entwicklungszeit benötigt wurde. Deswegen wurde das PierceTM BCA Proteinassay Kit von ThermoFisher nach einer erstmals entwickelten Methode von Smith et al. (52) verwendet. Eine Standardkurve (Konzentrationsbereich 5 - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde nach Herstellerangaben pipettiert, und die Proben wurden in einer 96-well Platte in einem Tristar LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bei 570 nm gemessen.

3.8 Massenspektrometrische Aufarbeitung der Proben und Analyse

3.8.1 Grundprinzip der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Messung von Molekülgrößen und wird unter anderem in der Proteomik zur Identifizierung von Proteinen eingesetzt (53). Das Verfahren besteht grundlegend aus einer Ionenquelle, einem Massen-Analysen-Gerät, das das Massen-Ladungs-Verhältnis der ionisierten Analyten misst und aus einem Detektor, der die Ionenanzahl registriert.

3.8.2 Analyse der Trennung mit Sepharose CL-6B

Die Proteinkorona-Proben, die mit der Methode aus Kapitel 3.4.2 isoliert wurden, wurden mit dem Massenspektrometrie Vorbereitungskit iST 8x von Preomics nach Herstellerangaben für die Vermessung vorbereitet. Anschließend wurden sie in das Massenspektrometrie-Labor von Preomics geschickt und dort vermessen. Verwendet wurden dort das EASY-nLC 1000 Ultra Hochdruck System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), das mit dem Q Exactive HF Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) über eine Nanoelektrospray Quelle (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verbunden war.

3.8.2.1 Analyse der Daten mit MaxQuant

Die Rohdaten der Massenspektrometrie-Messung wurden danach mit der Software MaxQuant analysiert. Dafür wurden zum besseren Vergleich IBAQ-Werte verwendet. Dies ist eine Methode in der Massenspektrometrie zur absoluten Quantifizierung von Proteinen. Diese Werte entstehen wenn man die Roh-Intensitäten durch die Anzahl an theoretischen Peptiden teilt. Daraus ergibt sich eine Kopienanzahl pro detektierten Protein (54). Die verwendeten fasta-Dateien zum Abgleich der Proteine kamen von uniprot.org, und wurden mit dessen Interface in verschiedene Kategorien annotiert.

3.8.2.2 Prozessierung mit Perseus

Die statistische Analyse der Daten wurde mit der Software Perseus durchgeführt. Dafür wurden Störfaktoren wie *only identified by site*, *contaminant*, oder *reverse* herausgefiltert. Mit den iBAQ-Werten der zu analysierenden Proteine wurde die Stoffmenge mit Teilung durch die Avogadro-Konstanten berechnet, und anschließend Mol%-Werte unter der Verwendung der Stoffmenge in der kompletten Probe berechnet.

3.8.3 Analyse der Trennung mit Sepharose CL-4B

Die erhaltenen Proben der CL-4B Abtrennungsmethode wurden gekühlt zur weiteren massenspektrometrischen Analyse geschickt. Diese wurde von der AG Mailänder des Max-Planck-Instituts für Polymer-Forschung in Mainz nach einem Protokoll von Schöttler et al. (55) durchgeführt. 25 μg der jeweiligen Probe wurde ausgefällt und mit Trypsin aufgeschlossen. Die daraus entstandenen Peptide wurden mit Methansäure und anschließend mit einem E. coli Standard versetzt. Für die quantitative Analyse wurde anschließend ein nanoACQUITY UPLC System (Waters Corp. Milford, USA), verbunden mit einem Synapt G2-Si Massenspektrometer (Waters Corp., Milford, USA) verwendet. Dies bestand aus einer C18 Trap-Column, sowie einer C18 Analytische Umkehrphasensäule (Waters Corp. Milford, USA). Anschließend erfolgte eine Chromatographie-Trennung in zwei mobilen Phasen. Daten-unabhängige-Erhebung (MSE) wurde auf dem Massenspektrometer im Resolutions-Modus umgesetzt. Elektrospray-Ionisation in einem positiven Ionen-Modus wurde mit einer NanoLockSpray Quelle durchgeführt. Die Daten wurden über eine Reichweite von m/z 50 - 5000 Da erhoben. Von allen Proben wurden zwei technische Replikate gemessen und deren Mittelwert errechnet. Datenerhebung und Prozessierungen wurden mithilfe von MassLynx v4.1, und Progenesis Q1 für die Proteomics v2.0 Software zur Datenverarbeitung und Proteinidentifikation durchgeführt. Die erstellten Peptide wurden gegen die jeweilige Protein Sequenz Datenbanken von UniProt abgeglichen.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Sepharose CL-6B Methode zur Trennung der Proteinkorona an DPPG₂-TSL von freiem Protein

Um zu überprüfen, ob es eine klare Separation zwischen der an Liposomen gebundenen Proteinkorona und freien Proteinen gibt, wurde eine Säulenchromatographie wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, durchgeführt. Als Probe wurden 1 ml DPPG₂-TSL verwendet, die mit 1 ml FCS wie in Kapitel 3.3 beschrieben, inkubiert wurden. Nach Beladen der Säulen mit den Proben wurden 500 μ l Aliquot Fraktionen aufgefangen.

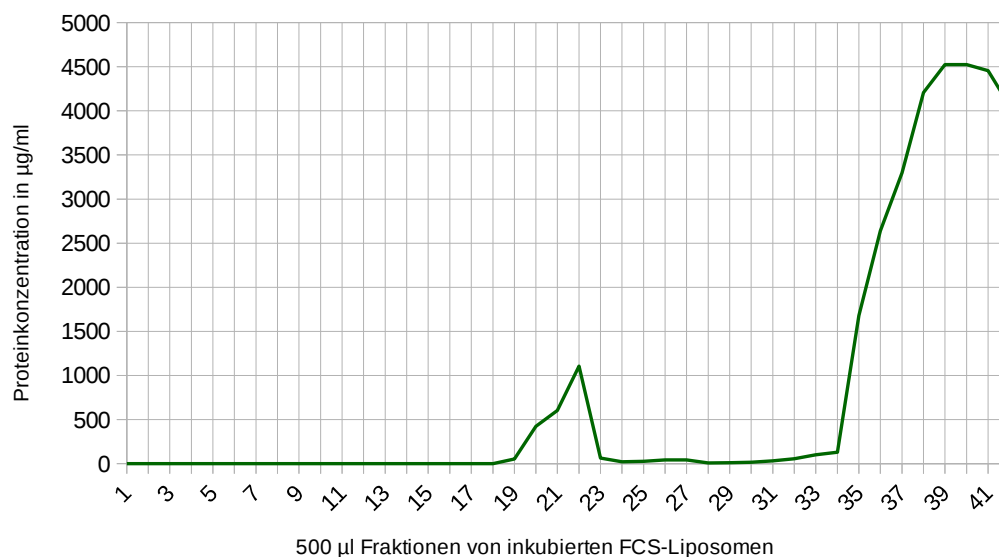


ABBILDUNG 4.1: Proteinkonzentrationsverlauf in der Säulenchromatographie von DPPG₂-TSL nach Inkubation mit FCS und anschließender Auftrennung mit Sepharose CL-6B von gesammelten 500 μ l Fraktionen

Von den insgesamt 42 aufgefangenen Fraktionen wurden Proteinkonzentrationsbestimmungen mit dem Proteinassay nach Bradford durchgeführt. Von den Fraktionen

18 - 27, die deutlich sichtbar Liposomen enthielten, wurden außerdem Phosphatkonzentrationen bestimmt, um den Liposomengehalt zu ermitteln. Die bestimmte Liposomenkonzentration wurde anschließend bei der Proteinkonzentrationsmessung als blank im Absorptionsspektrometer subtrahiert, um einen vergleichbaren Proteinkonzentrationswert zu erhalten. Proteinkonzentrationen, die den Messbereich des Kits überschritten, wurden so verdünnt, dass sie noch im optimalen Messbereich lagen. Bei dieser Messung wurde ein eindeutiger Peak in der Proteinkonzentration für die Liposomenfraktionen gezeigt, sowie eine klare Trennung der an Liposomen gebundenen Proteine, und der freien Proteine, deren Konzentration ab Fraktion 33 stark ansteigt.

4.2 Charakterisierung der verwendeten Liposomenformulierungen

Um einen Rückschluss auf das Binden bestimmter Proteine an die Liposomenoberfläche zu erhalten, war es wichtig Informationen über diese zu generieren. Tabelle 4.1 zeigt die jeweilige Größe und das Zeta-Potential der verwendeten Liposomen.

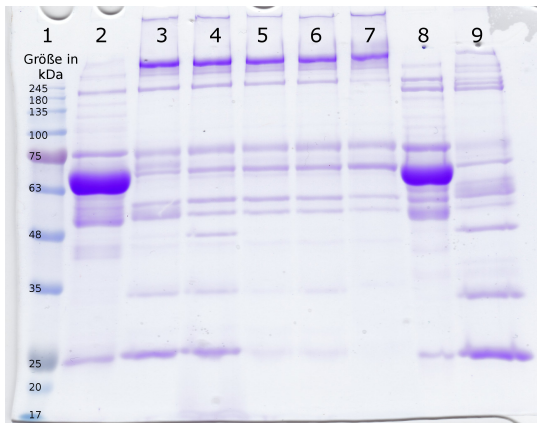
Liposomenformulierung	Größe (nm)	ζ -Potential (mV)	PDI
<i>DPPG₂-TSL</i> :	150,8	-24,83	0,096
<i>KL</i> :	112,8	-4,17	0,081
<i>LTSL</i> :	126,2	-2,47	0,074
<i>PEGL</i> :	126,5	-4,34	0,097
<i>Caelyx</i> [®]	129,5	-0,59	0,149

TABELLE 4.1: Größe (Z-Average), Zeta-Potential und PDI der verwendeten Liposomenformulierungen

Literaturangaben beschreiben die Größe von Caelyx[®] mit 80 - 90 nm (56), (57). Die hier davon deutlich abweichend gemessene Größe könnte durch Aggregatbildung der Liposomen verursacht worden sein, was auch den erhöhten PDI erklärt.

4.3 SDS-PAGE

In der Gelelektrophorese zeigten sich deutliche Unterschiede der Proteinbanden, sowohl bei der Verwendung von verschiedenen Liposomenformulierungen als auch zwischen den verwendeten Plasmen. Abbildung 4.2 zeigt ein SDS-Gel mit den 5 unterschiedlichen, verwendeten Liposomenformulierungen (Bahnen 3 - 7), inkubiert in Humanplasma, sowie zusätzlich noch die DPPG₂-TSL in Mausplasma (Bahn 9). Unterschiede fallen vor allem zwischen den DPPG₂-TSL, den KL, sowie den restlichen drei Formulierungen auf. Anhand der Markerbahn (Bahn 1) kann die Molekülgröße der anderen Banden abgeschätzt werden. Hierbei ist in den Plasma-Kontrollproben die deutlich prominente Albumin-Bande mit 68 kD zu sehen. Diese ist in den Prote-

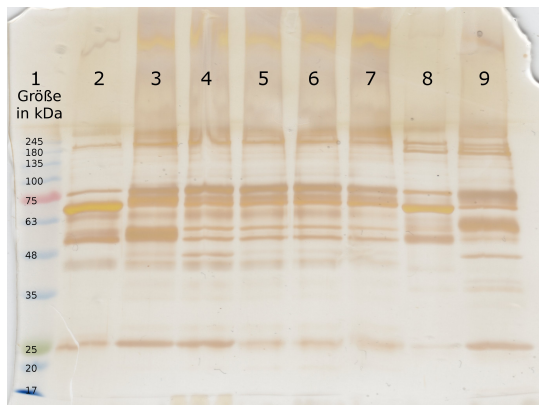


- 1 Marker
- 2 Humanplasma (5%)
- 3 DPPG₂-TSL, inkubiert in HP
- 4 KL, ink. in HP
- 5 LTSL, ink. in HP
- 6 PEG-L, ink. in HP
- 7 Caelyx[®], ink. in HP
- 8 Mausplasma (5%)
- 9 DPPG₂-TSL, ink. in MP

ABBILDUNG 4.2: SDS-Gel von Human Proteinkorona in Coomassie-Färbung an Liposomenformulierungen DPPG₂-TSL, KL, LTSL, PEG-L, Caelyx[®], sowie Maus Proteinkorona in Coomassie-Färbung von DPPG₂-TSL nach Abtrennung der freien Proteine in Sepharose CL-6B. Als Kontrolle diente Human- und Mausplasma.

inkoronae der Liposomenformulierungen weniger deutlich zu sehen.

Auch eine sehr dicke Bande bei ca. 25 kDa, die in den reinen Plasmaproben, sowie bei den DPPG₂-Liposomen (sowohl im Human- als auch im Mausplasma), und den kationischen Liposomen vorkommt ist deutlich erkennbar. Es fällt zusätzlich die Ähnlichkeit der Proteinkorona von LTSL, PEG-L und Caelyx[®] auf.

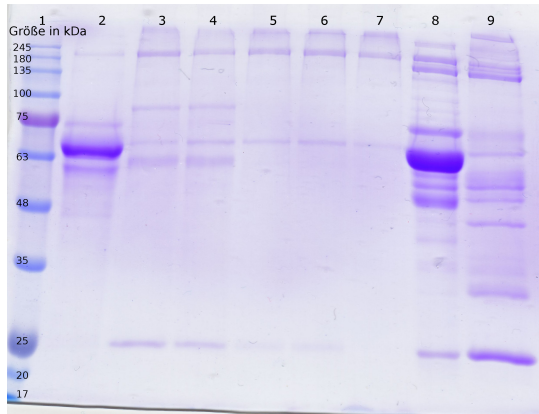


- 1 Marker
- 2 Humanplasma (0,5%)
- 3 DPPG₂-TSL, inkubiert in HP
- 4 KL, ink. in HP
- 5 LTSL, ink. in HP
- 6 PEG-L, ink. in HP
- 7 Caelyx[®], ink. in HP
- 8 Mausplasma (0,5%)
- 9 DPPG₂-TSL, ink. in MP

ABBILDUNG 4.3: SDS-Gel von Human Proteinkorona in Silber-Färbung an Liposomenformulierungen DPPG₂-TSL, KL, LTSL, PEG-L, Caelyx[®], sowie Maus Proteinkorona in Silber-Färbung von DPPG₂-TSL nach Abtrennung der freien Proteine in Sepharose CL-6B. Als Kontrolle diente Human- und Mausplasma.

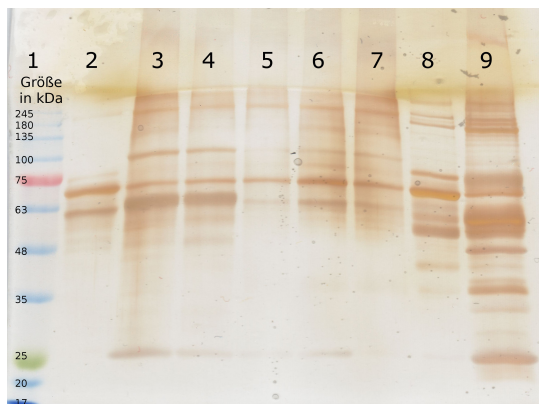
Die Silberfärbung (s. Abbildung 4.3) verdeutlicht gerade schwach erkennbare Banden der Coomassie-Färbung. Im Vergleich zu Coomassie-Brilliant-Blau, sind die Intensitäten der mit Silber gefärbten Banden allerdings nicht proportional zu den Proteinmengen pro Bande. Trotzdem fällt auch hier wieder die Ähnlichkeit der Banden von LTSL, PEG-L und Caelyx[®] auf, sowie die deutliche Bande bei ca. 25 kD.

Da als Standard für Versuche in biologischen Medien generell FCS verwendet wird, wurden die Proteinkoronaen der Liposomenformulierungen außerdem mit FCS gebildet.



- 1 Marker
- 2 FCS (5%)
- 3 DPPG₂-TSL, inkubiert in FCS
- 4 KL, ink. in FCS
- 5 LTSL, ink. in FCS
- 6 PEG-L, ink. in FCS
- 7 Caelyx[®], ink. in FCS
- 8 Mausplasma (5%)
- 9 DPPG₂-TSL, ink. in MP

ABBILDUNG 4.4: SDS-Gel von FCS Proteinkorona in Coomassie-Färbung an Liposomenformulierungen DPPG₂-TSL, KL, LTSL, PEG-L, Caelyx[®], sowie Maus Proteinkorona in Coomassie-Färbung von DPPG₂-TSL nach Abtrennung der freien Proteine in Sepharose CL-6B. Als Kontrolle diente Human- und Mausplasma.



- 1 Marker
- 2 FCS (0,5%)
- 3 DPPG₂-TSL, inkubiert in FCS
- 4 KL, ink. in FCS
- 5 LTSL, ink. in FCS
- 6 PEG-L, ink. in FCS
- 7 Caelyx[®], ink. in FCS
- 8 Mausplasma (0,5%)
- 9 DPPG₂, ink. in MP

ABBILDUNG 4.5: SDS-Gel von FCS Proteinkorona in Silber-Färbung an Liposomenformulierungen DPPG₂-TSL, KL, LTSL, PEG-L, Caelyx[®], sowie Maus Proteinkorona in Silber-Färbung von DPPG₂-TSL nach Abtrennung der freien Proteine in Sepharose CL-6B. Als Kontrolle diente Human- und Mausplasma.

FCS als verwendetes Inkubationsmedium zeigt bei der Visualisierung durch das Gel deutlich weniger prominente Banden (s. Abbildung 4.4). Auch hier ist die Albuminbande wieder gut erkennbar und wie auch schon im Humanplasma, eine Bande bei ca. 25 kDa. Insgesamt zeigen die Proteinkoronaen der DPPG₂-Liposomen, sowie der kationischen hier eine größere Bandenvielfalt als die der anderen drei Formulierungen. Bei der Beladung der Gele mit den Proben wurden jeweils gleiche Lipidkonzentrationen verwendet, um auch Unterschiede in der Proteinmenge auf dem Gel

darzustellen. Wie auch in den Humanplasma Gelen werden auch beim FCS in der Silberfärbung noch mehr Banden (s. Abbildung 4.5) sichtbar.

Nach der Durchführung der Gelelektrophorese-Versuche scheint es, als ob die DPPG₂-TSL-Formulierung eine größere Proteinvielfalt, visualisiert durch mehr Banden, bindet. Dagegen sprachen allerdings die quantitativen Proteinmessungen (s. Kapitel 4.4.2). Schwierig ist hier allerdings die Differenzierung der Banden ganz oben am Gel, wo sich die größeren Proteine befinden. Dies könnte eine Erklärung für die Diskrepanz sein.

4.3.1 Bandenanzahl der verschiedenen Formulierungen

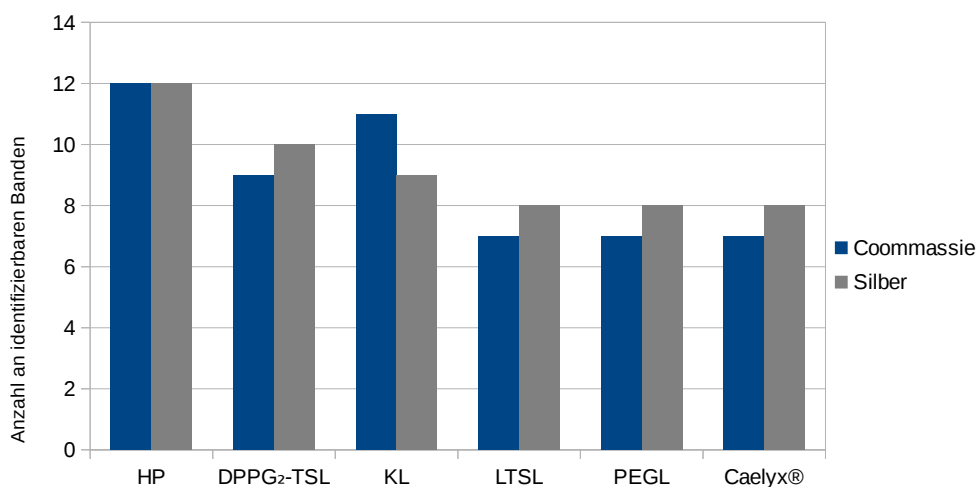


ABBILDUNG 4.6: Diese Grafik zeigt alle verwendeten Liposomenformulierungen DPPG₂-TSL, LTSL, KL, Caelyx[®], sowie eine Kontrollprobe Humanplasma und die jeweilige Anzahl der visuell gut sichtbaren Banden in den SDS-Gelen. Dargestellt sind zwei verwendete Färbungen: Coomassie und Silber

Abbildung 4.6 zeigt, dass die meisten Banden in der Kontrollprobe (Humanplasma) erkennbar sind. Bei den letzten drei Proben (LTSL, PEGL, Caelyx[®]) waren sowohl die Bandenanzahl, als auch deren Identität (s. Abb. 4.1, 4.2) gleich.

Die kationischen bzw. die DPPG₂-Liposomen haben hier, je nach Färbung die größte Anzahl an erkennbaren Banden

Da die Visualisierung durch ein SDS-Gel allerdings nur zur groben Orientierung dient, ist es schwierig daraus deutliche Erkenntnisse zu ziehen. Deswegen wurden die Proteinkorona-Proben zusätzlich massenspektrometrisch analysiert.

4.4 Proteinkonzentration

4.4.1 Wechsel der Proteinassays

Ein grundlegendes Problem der Proteinkonzentrationsmessung von CF-Liposomen war das Signal des CF's bei der verwendeten Wellenlänge der Proteinassays. Um trotzdem valide Aussagen zu treffen, wurden die verwendeten Proteinassays zuerst auf ihre Aussagekraft mit CF-Liposomen und Proteinen in den Proben getestet, sowie auf ihre Sensitivität bei geringen Proteinmengen. Der optimale Messbereich des Proteinassays nach Bradford (Roti Nanoquant) lag laut Herstellerangaben bei $0,25 \mu\text{g} - 250 \mu\text{g}/\text{ml}$. Dies wurde mit verschiedenen vorbekannten Proteinkonzentrationen bestätigt. Hierbei zeigte sich in den Messungen, dass das Proteinassay nach Bradford in dem Bereich von $1 - \text{ca. } 200 \mu\text{g}/\text{ml}$ akkurat misst. Proben, die Liposomen enthielten, konnten durch vorheriges Messen eines Blanks mit der entsprechenden Liposomenkonzentration in der Probe auf $\pm 10 - 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ in dem eben genannten Bereich genau gemessen werden.

Proben	Proteinkonzentration
10 μl FCS	498,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
10 μl FCS/Liposomen mit Liposomen-Blank	282,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1 μl FCS	144,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1 μl FCS/Liposomen mit Liposomen-Blank	134,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2 μl FCS/Liposomen	224,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2 μl FCS/Liposomen mit Liposomen-Blank	201,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$

TABELLE 4.2: Proteinkonzentrationsbestimmungen (Bradford) von vorbekannten Proteinmengen jeweils als native Probe und zum Vergleich mit Liposomen gemischt. Vor der Messung der Liposomen/Proteinproben wurde jeweils ein Blank mit der genauen Liposomenkonzentration gemessen.

Tabelle 4.2 zeigt einen Ausschnitt von den gemessenen Proteinkonzentrationsproben. Bei den Proben, die Liposomen enthielten, wurde vor der entsprechenden Messung eine Leerwertbestimmung mit der jeweiligen Liposomenkonzentration durchgeführt. Zu erkennen ist, dass die Messwerte ab $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ sehr inakkurat werden. Die Messwerte in dem Bereich unter $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ wurden durch den geringeren Ungenauigkeitsbereich (10 %) als valide für die Proteinkorona-Versuche betrachtet; vor allem vor dem Hintergrund, dass die quantitative Proteinbestimmung hier nur zur groben Orientierung diene.

Proben	Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$
Albumin 2000 $\mu\text{g/ml}$	1900 $\mu\text{g/ml}$
Albumin 500 $\mu\text{g/ml}$	482,7 $\mu\text{g/ml}$
Albumin 500 $\mu\text{g/ml}$ + Liposomen	625,2 $\mu\text{g/ml}$
Albumin 1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Albumin 1000 $\mu\text{g/ml}$ + Liposomen	1100 $\mu\text{g/ml}$

TABELLE 4.3: Quantitative Proteinbestimmung mit Proteinassay nach Lowry: Gemessen wurden Proben mit einer bestimmten Proteinmenge, die erste Messung zeigt die Genauigkeit des Assays ohne Liposomen, die zweiten Messpaare jeweils einmal ohne und einmal mit Liposomen in den Proben

Wegen des nicht optimalen Messbereichs sowie dem Störsignal durch das enkapsulierte CF wurde mit dem Proteinassay DC^{TM} von Bio-Rad (nach Lowry) eine weitere Proteinquantifizierungsmöglichkeit verwendet, die laut Herstellerangaben einen optimalen Messbereich von 200 - 1500 $\mu\text{g/ml}$ besitzt. Dieser war besser geeignet für die detektierten Proteinkorona-Konzentrationen. Tabelle 4.3 zeigt Messungen mit bekannten Proteinkonzentrationen, sowie Proben, in denen die selbe Proteinkonzentration sowie zusätzlich CF-Liposomen enthalten waren, um auch hier die Interferenz des CFs, bzw. der mit CF beladenen Liposomen im Hinblick auf die Proteinkonzentration zu überprüfen. Hierbei wurde auf die Leerwert-Messmethode, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, verzichtet.

4.4.2 Proteinkonzentration der verwendeten Liposomenformulierungen

Die Menge der Proteinkorona Proteine wurde für die fünf in dieser Arbeit verglichenen Liposomenformulierungen mit der quantitativen Proteinbestimmung untersucht. Dafür wurde der in dem Messbereich und für Liposomeninteraktionen besser geeignete Proteinassay nach Lowry (DC^{TM}) verwendet, sowie die Liposomenformulierungen mit Humanplasma inkubiert und von freiem Protein getrennt.

Tabelle 4.4 zeigt die Unterschiede der Proteinmenge der Korona zwischen den Formulierungen. Die PEGylierten Liposomen binden demnach nicht, wie aufgrund der Oberflächenmodifikation zu erwarten wäre, am wenigsten Proteinkorona. Das im klinischen Alltag eingesetzte Caelyx[®] bindet mit seiner ebenfalls durch PEG modifizierten Oberfläche sogar wesentlich mehr Protein als die anderen Formulierungen. Die geringste Proteinmenge zeigt sich für die DPPG₂-TSL.

4.4.3 Proteinkonzentrationsmessung in Negativprobe

Schließlich wurde noch eine Proteinkonzentrationsbestimmung einer Negativprobe gemessen. Dafür wurden, wie im entwickelten Protokoll Liposomen 1:1 mit Humanplasma inkubiert, sowie außerdem Humanplasma 1:1 mit Kochsalzlösung. Beide

Liposomenformulierung	Proteinkonzentration in mg/ml
DPPG ₂ -TSL	1,8 ± 0,1 mg/ml
KL	2,2 ± 0,1 mg/ml
LTSL	2,4 ± 0,4 mg/ml
PEGL	2,0 ± 0,3 mg/ml
Caelyx®	5,0 ± 1,6 mg/ml

TABELLE 4.4: Proteinkonzentration der verwendeten Liposomenformulierungen bei 50 mM Lipidkonzentration (n=3)

Proben wurden parallel auf jeweils eine Säule gegeben. Die Fraktionen der Negativkontrolle, die zeitgleich mit Liposomen-enthaltenden Fraktionen eluierten, wurden aufgefangen. Diese wurden noch mittels Amiconfiltern aufkonzentriert und anschließend eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Proteinassay nach Lowry durchgeführt.

Hierbei zeigte sich eine Proteinkonzentration in der Korona der inkubierten Liposomen von 3.56 mg/ml (bei ca. 76 mM Lipidkonzentration), sowie eine Proteinkonzentration derselben Fraktionen in der Negativkontrolle von 1.53 mg/ml. Dies lässt darauf schließen, dass mit den Protein Korona Liposomen außerdem noch sehr große Proteinkomplexe (Aggregate) die Sepharose-Säule gleich schnell durchwandern.

4.5 Größen- und Zeta-Potential-Messungen

Um einen Eindruck über die veränderten Liposomeneigenschaften im Bezug auf deren Größe bzw. Zeta-Potential nach Inkubation mit Proteinen zu erhalten, wurden diese nach Inkubation und Abtrennung von freiem Protein im Zetasizer mit dynamischer Lichtstreuung vermessen. Dies wurde bei den DPPG₂-Liposomen mit Human-, Maus-, Ratten-, Beagle- und Hamsterplasma durchgeführt.

Tabelle 4.5 zeigt zwei der verwendeten Liposomenformulierungen, LTSL und DPPG₂-TSL, und deren jeweilige Größe und das Zeta-Potential. LTSL sind fast 20% kleiner als DPPG₂-TSL. Außerdem sind die DPPG₂-TSL deutlich stärker negativ geladen.

Nach Inkubation mit dem jeweiligen Plasma, verschiebt sich das Zeta-Potential bei allen Proben mehr Richtung Null, am deutlichsten nach Inkubation mit Beagle-Plasma. Die Bildung einer Proteinkorona ist auch an der deutlichen Zunahme der Partikelgröße zu beobachten, am meisten bei Human- und Rattenplasma.

Probe	Größe (nm)	PDI	ζ -Potential (mV)
LTSL, nicht inkubiert	126,2	0,074	-7,41
DPPG ₂ -TSL, nicht inkubiert	156,6	0,102	-28,2
Humanplasma ink. DPPG ₂ -TSL	207,6	0,341	-20,8
Mausplasma ink. DPPG ₂ -TSL	163,5	0,129	-23,3
Rattenplasma ink. DPPG ₂ -TSL	217,3	0,389	-19,4
Hamsterplasma ink. DPPG ₂ -TSL	169,1	0,190	-21,0
Beagleplasma ink. DPPG ₂ -TSL	175,7	0,196	-17,9

TABELLE 4.5: Größen- und Zeta-Potentialmessungen: die später in Protein inkubierten Formulierungen LTSL und DPPG₂-TSL wurden hier jeweils vor Inkubation gemessen. Anschließend wurden Größe und Zeta-Potential der mit Human-, Maus-, Ratten-, Hamster-, bzw. Beagleplasma inkubierten DPPG₂-TSL bestimmt.

4.6 Massenspektrometrische Analyse

Zur genauen Identifizierung und Quantifizierung der Proteine wurden einige Proben weiter massenspektrometrisch analysiert. Die initiale Fokussierung lag auf den unterschiedlichen Liposomenformulierungen, weswegen unter anderem die Proteinkorona der DPPG₂-Liposomen mit der auch thermosensitiven LTSL-Formulierung verglichen wurde. Die hierbei gewonnenen Daten (s. Kapitel 4.4.3) legen allerdings nahe, dass die erste Abtrennungsmethode nicht optimal zur Abtrennung von freien Proteinen geeignet war.

4.6.1 Analyse der Abtrennungsmethode

Um auch massenspektrometrisch zu kontrollieren, ob durch die Säulenchromatographie-Methode eine klare Abtrennung zwischen Proteinkorona und nicht gebundenen freien Proteinen möglich war, wurde experimentell ein Abtrennungslauf mit inkubierten Liposomen mit einer Probe Plasma/Kochsalzlösung verglichen (s. Kapitel 3.4.2). Die massenspektrometrische Analyse der Negativkontrolle ergab jedoch, dass auch darin Proteine enthalten waren. Tabelle 4.6 zeigt die enthaltenen Proteine ab einer Menge von $\geq 1,00$ fmol. Die Summe der Stoffmenge aller detektierten Proteine in der Negativprobe beträgt 138,35 fmol. Im Vergleich dazu beträgt die Summe der Stoffmenge der mit Humanplasma inkubierten DPPG₂-Liposomen 77,85 fmol. Diese wurden, wie oben beschrieben, im selben Experiment zur exakt gleichen Zeit aufgefangen. Dies ist deutlich weniger aufgefangenes Protein.

Menge (fmol)	kDa	Protein Name
9.86	163.29	Alpha-2-macroglobulin
8.41	11.29	Ig lambda-2;6 chain C regions
8.16	94.97	Fibrinogen alpha chain
7.14	55.93	Fibrinogen beta chain
6.80	25.63	Immunglobulin Kappa
6.50	65.70	Ig mu chain C region
6.48	52.34	Fibrinogen gamma chain
6.30	45.21	Haptoglobin
5.90	30.78	Apolipoprotein A-I
5.30	37.65	Ig alpha-1 chain C region
4.91	20.05	Apolipoprotein C-II
3.44	69.37	Serum albumin
3.29	515.60	Apolipoprotein B-100;Apolipoprotein B-48
3.00	11.17	Immunglobulin Heavy Chain
2.70	18.12	Immunoglobulin J chain
2.28	11.78	Ig kappa chain V-III region SIE
1.85	11.04	Ig kappa chain V-II region TEW
1.76	11.61	Ig heavy chain V-III region TIL
1.71	11.79	Ig kappa chain V-I region EU
1.70	67.03	C4b-binding protein alpha chain
1.69	11.84	Ig kappa chain V-I various
1.67	8.65	Apolipoprotein C-I
1.66	12.82	Apolipoprotein C-III
1.58	48.80	Clusterin
1.52	65.33	Galectin-3-binding protein
1.34	12.64	Ig kappa chain V-IV region Len
1.26	26.46	Complement C1q subcomponent subunit B
1.11	14.91	Apolipoprotein A-II
1.03	46.74	Alpha-1-antitrypsin

TABELLE 4.6: Mengenverteilung der massenspektrometrisch detektierten Proteine in einer Kontrollprobe der Abtrennungsmethode, in der nur Humanplasma gesäult wurde. Dargestellt sind die Proteine, die auch in den aufgefangenen Fraktionen enthalten waren, die zur selben Zeit wie Liposomen einer vergleichbaren Säule aufgefangen wurden. Dargestellt sind alle Proteine, die mit ≥ 1 fmol festgestellt wurden.

Einige der am häufigsten detektierten Proteine besitzen in der Negativkontrolle eine vergleichsweise große Molekulargröße, beispielsweise Alpha-2-Macroglobulin, Apolipoprotein-B-100, Apolipoprotein B-48, oder Fibrinogen Alpha Chain. Die durchschnittliche Größe der 30 häufigsten Proteine in der Negativkontrolle ist 53,82 kD.

Im Vergleich dazu ist die durchschnittliche Größe der Proteine in der Probe, in der unbehandeltes Humanplasma (nicht säulenchromatographiert) massenspektrometrisch analysiert wurde, kleiner (44,71 kDa). (s. Tabelle 4.7).

Probe	Durchschnittsgröße (kDa)	Gewichteter Mittelwert (kDa)
Humanplasma unprozessiert	44,71	64,20
Humanplasma gesäult (Negativkontrolle)	53,82	78,53
Proteinkorona Humanplasma inkubierte DPPG ₂ -TSL	60,41	51,24

TABELLE 4.7: Durchschnittliche Proteingrößen, sowie gewichteter Mittelwert der 30 am häufigsten vertretenen Proteine der Vergleichsproben: unprozessiertes Humanplasma, gesäultes Humanplasma, Proteinkorona von Humanplasma inkubierten DPPG₂-TSL

Eine weitere Betrachtungsweise für Größenvergleiche in diesem Zusammenhang ist der gewichtete Mittelwert (s. Tabelle 4.7). Dafür wurden im Gegensatz zum normalen Mittelwert (Durchschnittsgröße) die 30 am häufigsten vertretenen Proteine der oben angeführten Vergleichsproben vor Addition mit ihrem prozentualen Anteil an der Gesamtproteinmenge multipliziert. Eine Betrachtung dieses Wertes ergibt hier einen prozentual höheren Anteil an großen Proteinen in der Negativkontrolle als bei unprozessiertem Humanplasma oder der Proteinkorona von DPPG₂-TSL.

4.6.2 Vergleich von DPPG₂-Liposomen mit Lysolipid basierten Liposomen

Um festzustellen ob es Unterschiede der Proteinkorona bei verschiedenen Formulierungen gibt, wurden sowohl von den LTSL als auch den DPPG₂-TSL massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Die Grafiken 4.7 und 4.8 zeigen die Zusammensetzungen der jeweiligen Proteinkoronae mit jeweils einer Vergleichsanalyse von unbehandeltem nicht-gesäultem Humanplasma:

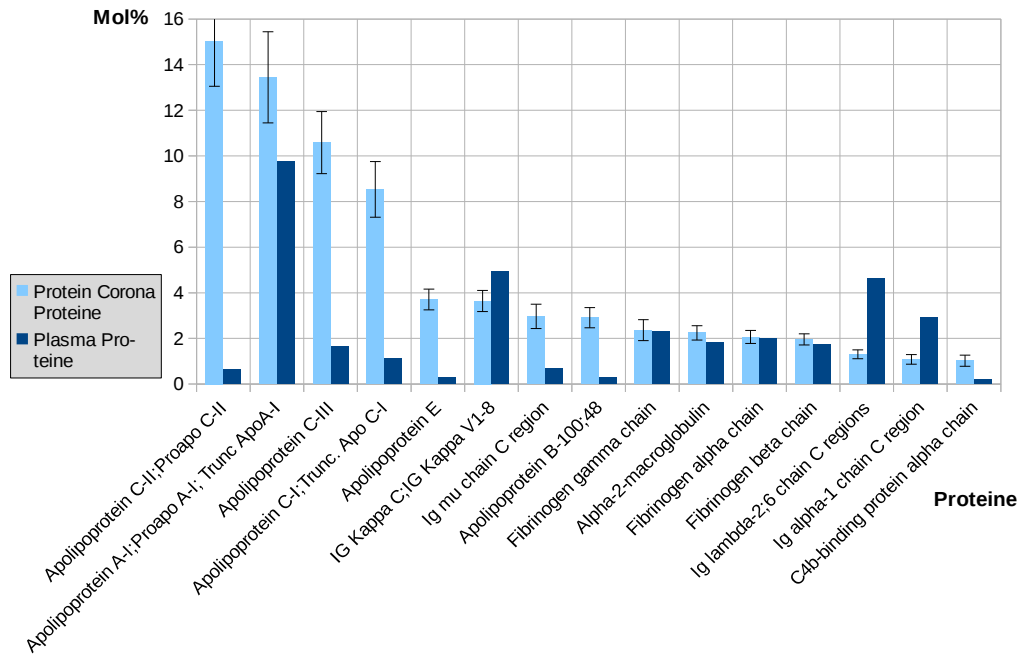


ABBILDUNG 4.7: Proteinkorona der DPPG₂-TSL (n=3). Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an DPPG₂-TSL (hellblau) dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in unbehandeltem Humanplasma angeführt (dunkelblau). Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol%-Wert ≥ 1 .

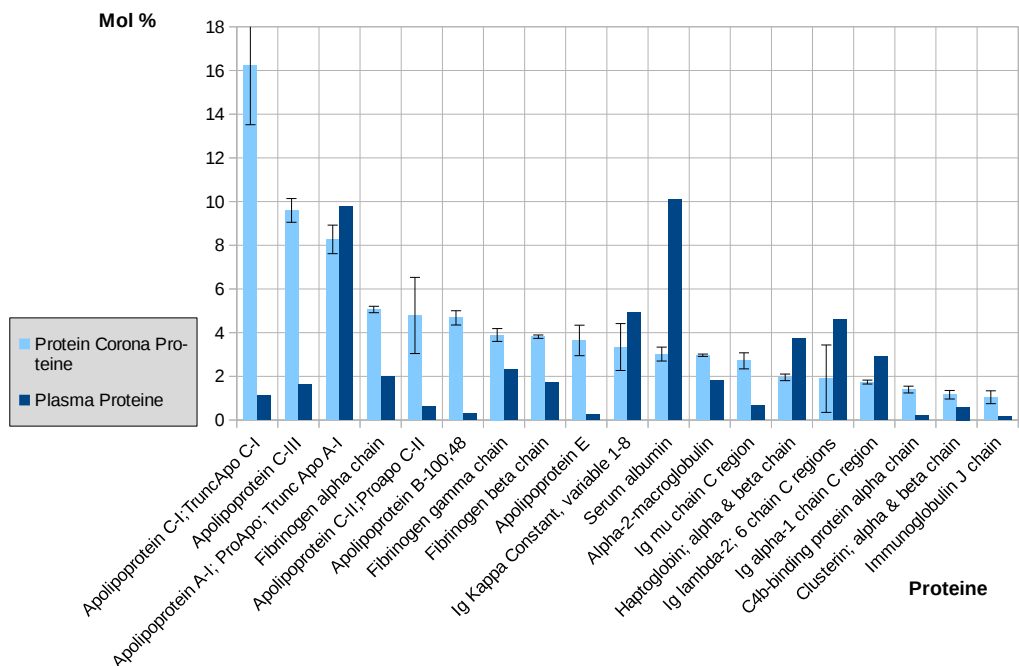


ABBILDUNG 4.8: Proteinkorona der LTSL (n=2). Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an LTSL (hellblau) dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in unbehandeltem Humanplasma angeführt (dunkelblau). Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol%-Wert ≥ 1 .

Dargestellt sind hier alle Proteine ≥ 1 Mol %. Die Proteinkorona der LTSL ist vielfältiger als die der DPPG₂-TSL. In der Proteinkorona der DPPG₂-TSL sind 15 verschiedene Proteine prozentual am häufigsten vertreten, wohingegen es bei den LTSL 19 sind. Ansonsten ist die Proteinverteilung vergleichbar. Es zeigen sich hauptsächlich Vertreter von Apolipoproteinen, sowie Immunglobulinbestandteile. Gerade die Fraktion der Apolipoproteine ist erwartungsgemäß sehr hoch, da vergleichbare Arbeiten an Liposomen und anderen Nanopartikeln sehr ähnliche Ergebnisse zeigten (55), (32), (36).

4.6.3 Proteinkorona in Mausplasma

Im Verlauf der Arbeit wurden die DPPG₂-Liposomen sowohl mit Humanplasma, als auch mit Mausplasma inkubiert, mit Sepharose CL-6B die Proteinkorona-Fraktion isoliert und massenspektrometrisch analysiert, später dann nochmal mit CL-4B. Das Interesse am Mausplasma lag wie in Kapitel 2.4.5 erwähnt, an der schlechteren Stabilität der Liposomen in dieser Spezies. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinkorona von DPPG₂-TSL in Mausplasma wurde hier mit der Proteinzusammensetzung von unbehandeltem Mausplasma verglichen, die ebenfalls massenspektrometrisch analysiert wurde.

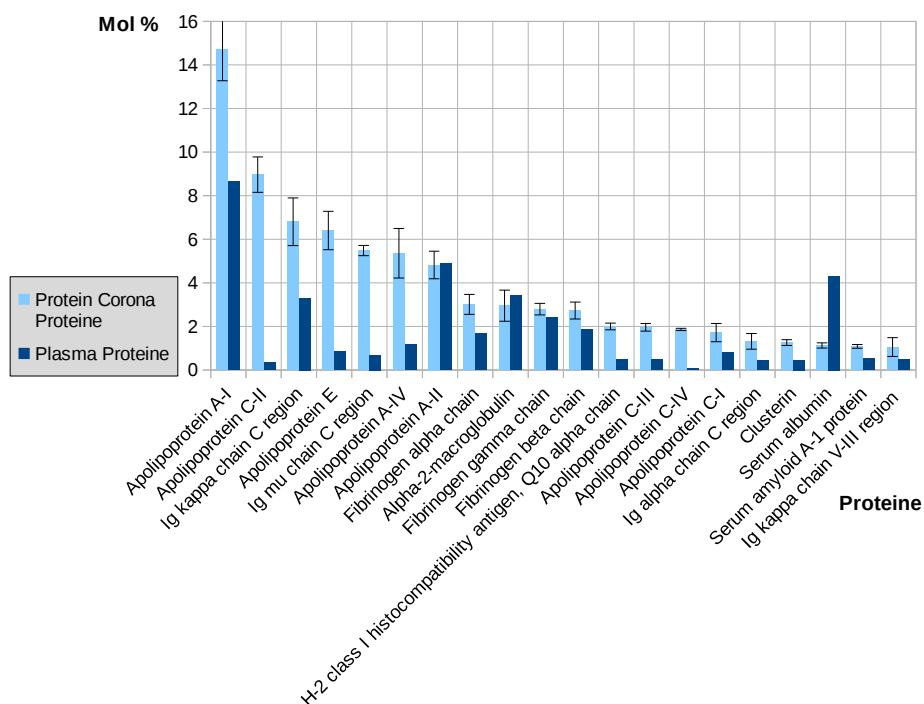


ABBILDUNG 4.9: Proteinkorona in Mausplasma an DPPG₂-TSL (n=3). Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an LTSL (hellblau) dargestellt. Die Abtrennung der Proteinkorona erfolgte hier mit Sepharose CL-6B. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in unbehandeltem Mausplasma angeführt (dunkelblau). Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol%-Wert ≥ 1 .

Protein	Mol%		
Apolipoprotein A-I	8.65	Carboxylesterase 1C	2.01
Alpha-1-antitrypsin 1-1	4.98	Alpha-1-antitrypsin 1-5	2.00
Apolipoprotein A-II	4.87	Fibrinogen beta chain	1.88
Transthyretin	4.52	Haptoglobin	1.73
Serum albumin	4.32	Fibrinogen alpha chain	1.68
Serotransferrin	3.84	Hemopexin	1.47
Alpha-2-macroglobulin	3.41	Complement C3	1.43
Ig kappa chain C region	3.31	Alpha-2-HS-glycoprotein	1.36
Serine protease inhibitor A3K	2.47	Alpha-1-antitrypsin 1-4	1.32
Hemoglobin subunit alpha	2.42	Ig gamma-1 chain C region	1.29
Ig gamma-2B chain C region	2.41	Murinoglobulin-1	1.18
Fibrinogen gamma chain	2.39	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1.16
Hemoglobin subunit beta	2.18	Apolipoprotein A-IV	1.16

TABELLE 4.8: Proteinverteilung in unbehandeltem Mausplasma: Kommerzielles Mausplasma, das für die Inkubation der LTSL verwendet wurde, wurde hier als Vergleichsprobe ebenfalls massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt sind alle detektierten Proteine, absteigend nach ihrem prozentualen Vorkommen im Mol % ab einem Vorkommen von ≥ 1 Mol %.

Die Vergleichsprobe zu der Proteinkorona Probe ist hier reines unbehandeltes Mausplasma. Die generelle Verteilung sieht ähnlich aus wie bei den bisher betrachteten Humanplasmaproben. Auffallend ist die alpha Kette des H-2 class I histocompatibility antigens, einem Bestandteil des MHC Klasse 1 Komplexes, das in der Vergleichsprobe nur mit 0,48 Mol % vertreten ist (nicht mehr in Tabelle 4.8 dargestellt). Dieses Protein ist funktionell in die Präsentation von Fremdantigenen gegenüber dem Immunsystem involviert. Bemerkenswert ist, dass es nur in der Korona von in Mausplasma inkubierten DPPG₂-Liposomen vorkommt, nicht jedoch in den anderen untersuchten Spezies.

4.6.4 FCS und Kälberserum

Da FCS ein gängiges Standardmedium in Laboren ist, wurden die ersten Inkubations- und Elektrophoreseversuche zur Herstellung Proteinkorona beladener Liposomen in FCS getestet. Davon wurden auch zwei Proben massenspektrometrisch analysiert, sowie zum Vergleich noch unbehandeltes Serum.

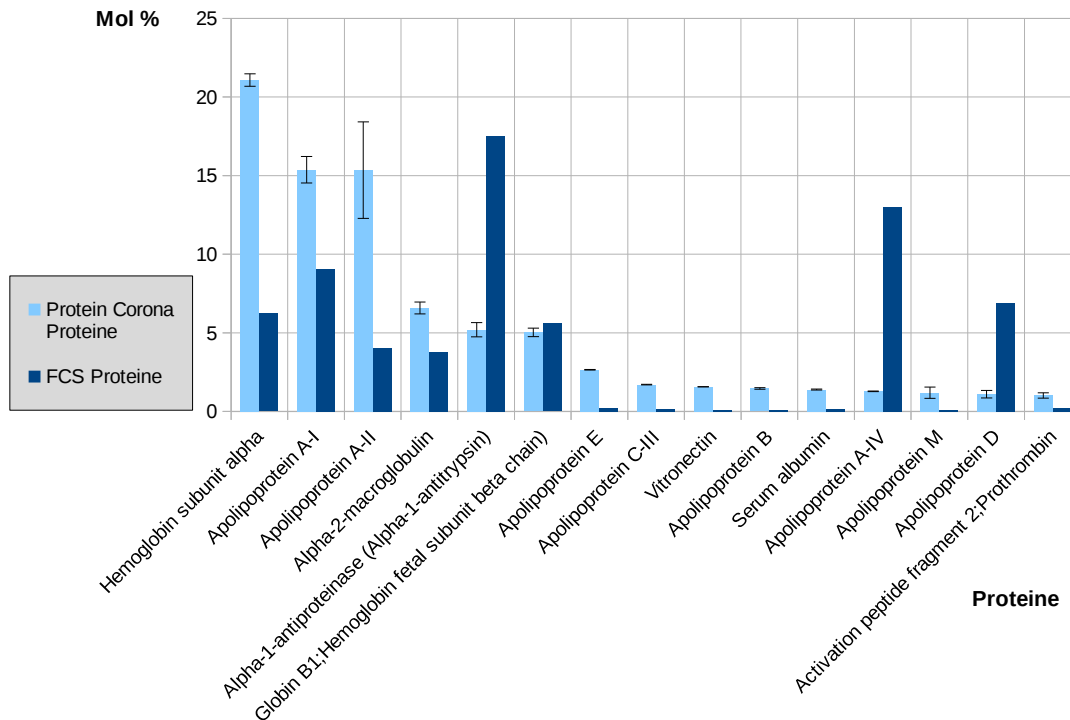


ABBILDUNG 4.10: Proteinkorona von FCS an LTSL (n=2). Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an LTSL (hellblau) dargestellt. Die Abtrennung der Proteinkorona erfolgte hier mit Sepharose CL-6B. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in FCS angeführt (dunkelblau). Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol%-Wert ≥ 1 .

Die meist vertretene Fraktion in der Proteinkorona bei FCS inkubierten Liposomen ist ein Bestandteil des Hämoglobins. Alpha und beta-Kette zusammen betragen 26,11 Mol%, die auf das Hämoglobin in der Proteinverteilung zusammenfallen.

Nach der ersten massenspektrometrischen Analyse des Preomics Labors fiel auf, dass die Proteinkorona von FCS an DPPG₂-TSL sehr viele Kontaminationsproteine enthielt (Hämoglobinbestandteile, Keratin in großen Mengen). Diese sollten physiologischerweise nicht im Serum vorkommen. Dies könnte mit der Herstellung des kommerziell erworbenen FCS zusammenhängen. Aus diesem Grund wurde noch Kälberserum analysiert. Die Proteinverteilungen von kommerziell unbehandeltem FCS sowie unbehandeltem Kälberserum sind deswegen in den Tabellen 4.9 und 4.10 dargestellt.

In den Tabellen 4.9 und 4.10 sieht man, dass auch im unbehandelten FCS Hämoglobinbestandteile einen wesentlich größeren Teil als im Kälberserum ausmachen. Bei der restlichen Proteinverteilung zeigen sich beide Proben ähnlich.

Protein	Mol%	Protein	Mol%
Alpha-1-antiproteinase (Alpha-1-antitrypsin)	13.09	Alpha-1-antiproteinase (Alpha-1-antitrypsin)	7.53
Serum albumin	9.73	Apolipoprotein A-I	6.80
Apolipoprotein A-I	6.77	Serum albumin	6.32
Transthyretin (Prealbumin)	5.69	Serotransferrin	4.84
Alpha-2-HS-glycoprotein	5.15	Serpin A3-4	4.65
Hemoglobin subunit alpha	4.65	Alpha-2-macroglobulin	4.33
Serotransferrin	4.58	Alpha-1-acid glycoprotein	4.10
Globin B1;Hemoglobin fetal subunit beta	4.18	Serpin A3-1 (Endopin-1A)	4.05
Fetuin-B	3.97	Alpha-2-HS-glycoprotein	3.70
Apolipoprotein A-II	3.01	Hemopexin	2.93
Alpha-2-macroglobulin	2.84	Apolipoprotein A-II	2.88
Alpha-1-acid glycoprotein	2.44	Transthyretin (Prealbumin)	2.46
Serpin A3-1,2 (Endopin-1A) (Muscle endopin-1A)	2.25	Hemoglobin subunit alpha	2.18
Serpin A3-4	1.89	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	2.10
Serpin A3-7	1.48	Serpin A3-7	2.07
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	1.25	Vitamin D-binding protein	1.61
Antithrombin-III	1.09	Acylation stimulating protein (ASP), Complement C3	1.49
Alpha-2-antiplasmin	1.03	Alpha-1B-glycoprotein	1.43
		Apolipoprotein A-IV	1.41
		Protein HP-25 homolog 2	1.09

TABELLE 4.9: Proteinverteilung in unbehandeltem FCS: Die im FCS enthaltenen Proteine sind absteigend nach ihrer Häufigkeit aufgeführt. Detektiert wurde diese durch eine massenspektrometrische Analyse (n=1). Aufgeführt sind alle Proteine mit einer Menge ≥ 1 Mol%.

TABELLE 4.10: Proteinverteilung in unbehandeltem Kälberserum: Die im Kälberserum enthaltenen Proteine sind absteigend nach ihrer Häufigkeit aufgeführt. Detektiert wurde diese durch eine massenspektrometrische Analyse (n=1). Aufgeführt sind alle Proteine mit einer Menge ≥ 1 Mol%.

4.6.5 Vergleich der Proteinkoronae verschiedener Spezies

Wie vorherige Arbeiten (43), (44) zeigten, veränderte sich die Stabilität, sowie die temperaturabhängige Wirkstofffreisetzung, je nachdem welchem Trägermedium die Liposomen ausgesetzt waren, bzw. in welchem Plasma (z.B. Ratte, Maus) die Pharmakokinetik der DPPG₂-Formulierung getestet wurde. Die Ergebnisse der folgenden Kapitel wurden in Versuchen erzielt die mit der CL-4B-Methode (s. Kapitel 3.4.3) zur Abtrennung von freien Proteinen durchgeführt wurden.

4.6.5.1 Proteinkorona in Humanplasma

Die Negativkontrolle in Abbildung 4.11 bzw. Tabelle 4.11 besteht aus Humanplasma, das analog zu den inkubierten Liposomen gesäult wurde (s. Kapitel 3.4.3). Auch hier (vgl. Kapitel 4.6.1) waren in der Negativkontrolle Proteine enthalten.

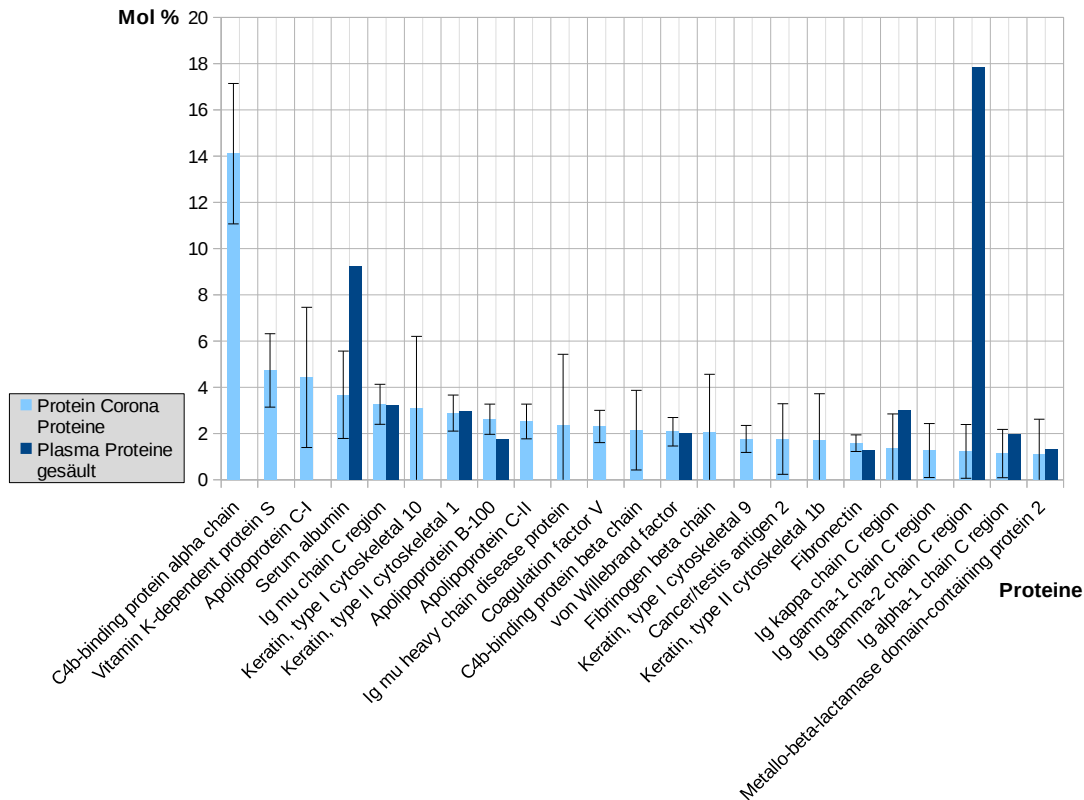


ABBILDUNG 4.11: Vergleich der Proteinverteilung der Proteinkorona an DPPG₂-TSL in Humanplasma (n=3) und der Negativkontrolle von gesäultem Humanplasma: Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an DPPG₂-TSL dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in gesäultem Humanplasma angeführt. Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol %-Wert ≥ 1 .

Die drei Proteine mit der höchsten Konzentration in der Proteinkorona sind in der Negativ-Kontrolle nicht zu finden, ebenso wie 10 weitere Proteine, die nur in der Proteinkorona zu finden waren. Was noch beim Vergleich deutlich wird ist eine andere Verteilung der Proteinmengen. Den größten Anteil der Korona macht die Alpha-Kette des C4b-bindenden Proteins aus, das zur Gruppe der Komplementfaktoren gehört, wohingegen bei der Negativkontrolle mit Abstand ein Immunglobulinbestandteil an erster Stelle steht, der in der Korona nur in geringer Menge vorkommt. Das zweithäufigst-vertretene Protein der Korona ist das Vitamin-K abhängige Protein S, das mit dem an erster Stelle stehenden C4b-bindenden Protein Komplexe bildet.

Betrachtet man die Verteilung der Proteine in reinem, aber gesäultem Plasma sieht man einen deutlichen Unterschied:

Protein	Mol%		
Ig gamma-2 chain C region	17.86	Galectin-3-binding protein	1.77
Apolipoprotein E	14.84	Apolipoprotein B-100	1.77
Serum albumin	9.23	Complement C3	1.75
Apolipoprotein C-IV	7.97	Ig lambda-3 chain C regions	1.65
Ig mu chain C region	3.21	Metallo-beta-lactamase dom.-cont. prot. 2	1.31
Ig kappa chain C region	2.99	Fibronectin	1.29
Keratin, type II cytoskeletal 1	2.95	Immunoglobulin heavy variable 3-21	1.26
Serotransferrin	2.56	Pre-rRNA-proc. prot. TSR2 homolog	1.21
von Willebrand factor	2.03	Cancer/testis antigen 2	1.16
Ig alpha-1 chain C region	1.95	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1.16
Cathelicidin antimicrobial peptide	1.94	Alpha-2-macroglobulin	1.14
		Complement C1q subcomp. subunit A	1.11

TABELLE 4.11: Detektierte Proteine in Humanplasma (Negativkontrolle): Aufgeführt sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol%, die in gesäultem (CL-4B) Humanplasma aufgefangen wurden. Dies diente als Negativ-Kontrolle der Proteinkorona Proteine (vgl. Abbildung 4.11)

Das häufigste Protein in Tabelle 4.11 Ig gamma-2 chain C region ist in der Proteinkorona der DPPG₂-TSL nur geringfügig vertreten (1,22 Mol %). Außerdem sind die Proteine Apolipoprotein E, Apolipoprotein C-IV, Serotransferrin, Cathelicidin antimicrobial peptide, Galectin-3-binding protein, Complement C3, sowie die letzten sechs Protein von Tabelle 4.11 nicht in der Proteinkorona der Liposomen enthalten.

4.6.5.2 Proteinkorona in Mausplasma

Analog zum Humanplasma wurde die Proteinkorona in Mausplasma von DPPG₂-Liposomen massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 4.12 und Tabelle 4.12 zeigen den Vergleich der Proteinkorona Proteinverteilung mit der Negativkontrolle Mausplasma:

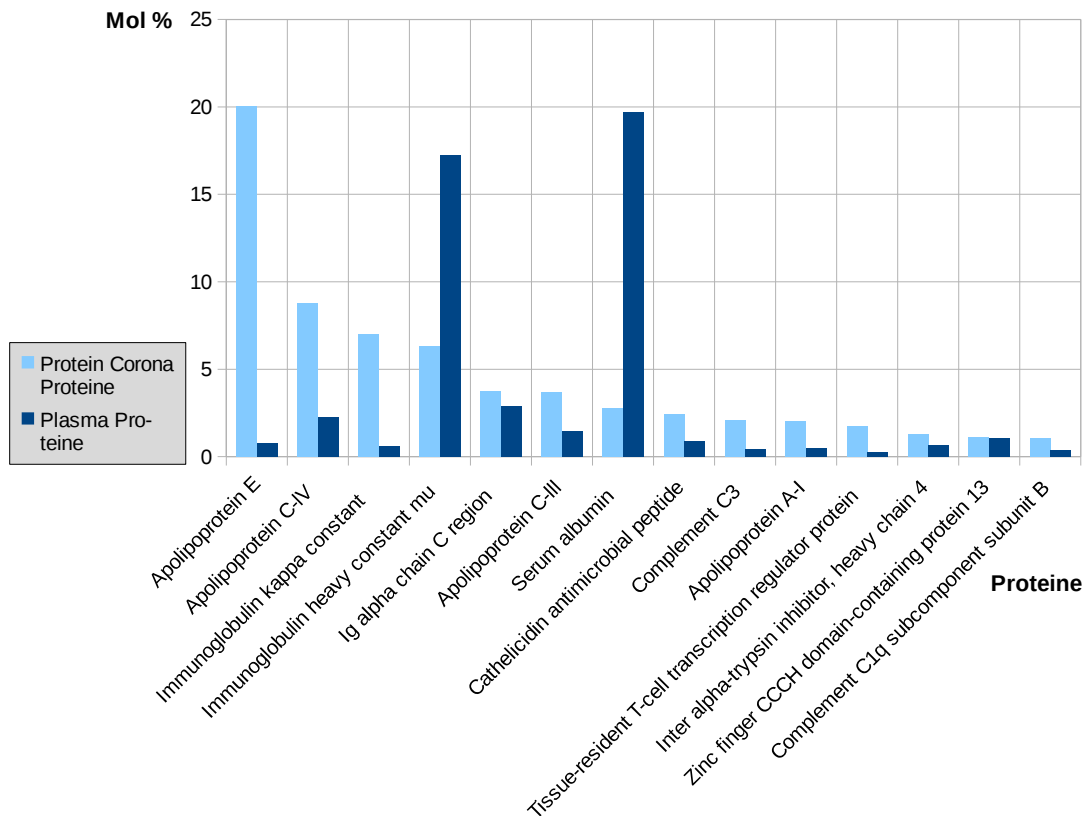


ABBILDUNG 4.12: Vergleich der Proteinverteilung der Proteinkorona an DPPG₂-TSL in Mausplasma (n=3) und der Negativkontrolle von gesülvtem Mausplasma: Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an DPPG₂-TSL dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in gesülvtem Mausplasma angeführt. Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol%-Wert ≥ 1 .

Protein	Mol%	Protein	Mol%
Serum albumin	19.72	Ig heavy chain V region AC38 205.12	1.50
Immunglobulin heavy constant mu	17.25	Keratin, type II cytoskeletal 1	1.50
Ig heavy chain V region RF	8.74	Apolipoprotein C-III	1.45
Ig alpha chain C region	2.91	Protein FAM122A	1.35
Complement C4-B	2.60	Keratin, type I cytoskeletal 10	1.28
Ig heavy chain V region 6.96	2.37	Keratin, type II cytoskeletal 73	1.09
Apolipoprotein C-IV	2.24	Pregnancy zone protein	1.04
Ig kappa chain V-II region 26-10	1.82	Zinc finger CCCH domain-cont. protein 13	1.04
Immunglobulin J chain	1.80	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1.03
		Fibrinogen alpha chain	1.02

TABELLE 4.12: Detektierte Proteine in Mausplasma (Negativkontrolle): Aufgeführt in dieser Tabelle sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol %, die in gesülvtem (CL-4B) Mausplasma aufgefangen wurden. Dies diente als Negativ-Kontrolle der Proteinkorona Proteine (vgl. Abbildung 4.12)

Wieder sind deutliche Unterschiede in der Verteilung der Proteine zu erkennen. Hier scheinen die Apolipoproteine eine noch größere Rolle zu spielen als in den Humanplasmaproben, da unter den 10 häufigsten Proteinen hier vier Vertreter der Apolipoproteinfamilie sind, die zusammengenommen ungefähr schon 35 % der Proteine ≥ 1 Mol % ausmachen (im Gegensatz zu 3 Proteinen in der Korona aus Humanplasma, die zusammengenommen nur ca. 10 % ausmachen). Außerdem sind unter den 5 häufigsten Proteinen auch Bestandteile der Immunglobuline: der κ -Anteil der Ig-Leichtkette, Bestandteile der μ und α -Kette. Eines der Proteine, das in der murinen Proteinkorona, aber nicht in der humanen vorkommt ist das Cathelicidin antimicrobial peptide, das auch eine entscheidende Rolle in der angeborenen unspezifischen Immunantwort spielt.

In der Negativkontrolle sieht man eine Proteinverteilung, die näher an der physiologischen Verteilung in Plasma liegt, mit Albumin als am häufigst vorkommendem Protein, das in der Proteinkorona nur einen geringen Teil ausmacht.

4.6.5.3 Proteinkorona in Rattenplasma

Nachfolgende Grafik und Tabelle zeigen die Proteinkorona von DPPG₂-TSL und die Proteinverteilung in gesäultem Rattenplasma.

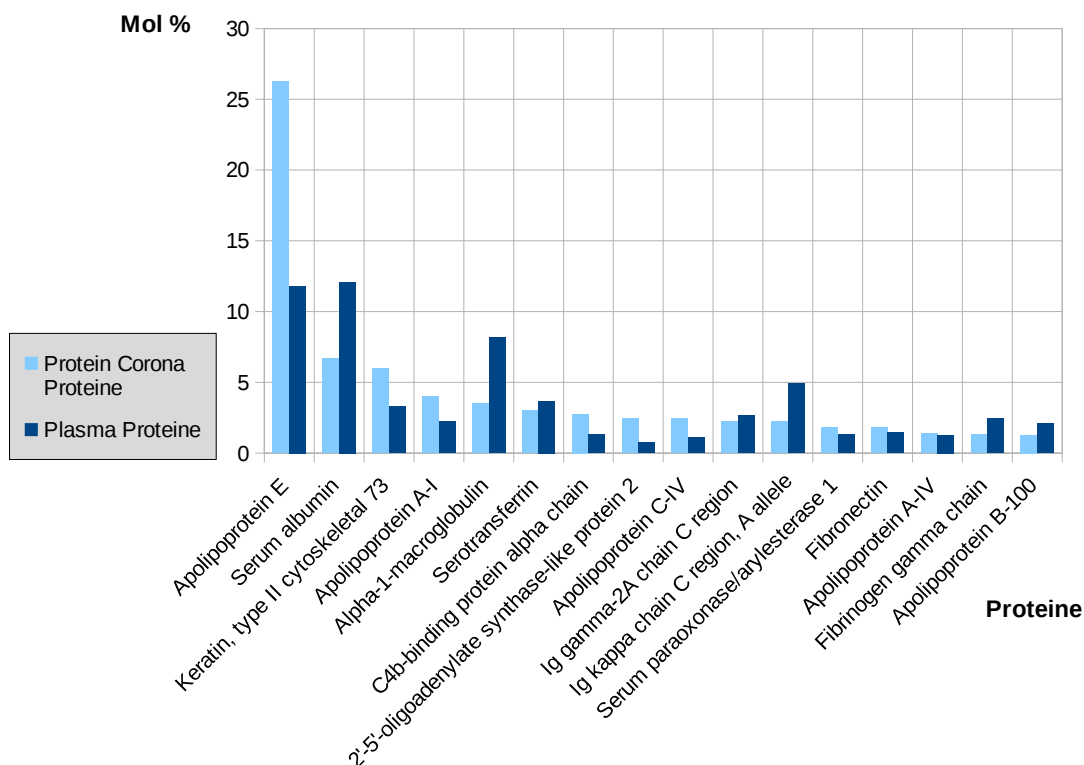


ABBILDUNG 4.13: Vergleich der Proteinverteilung der Proteinkorona an DPPG₂-TSL in Rattenplasma (n=3) und der Negativkontrolle von gesäultem Rattenplasma: Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an DPPG₂-TSL dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in gesäultem Rattenplasma angeführt. Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol %-Wert ≥ 1 .

Bei Rattenplasma war im Vergleich zu den Versuchen der anderen Spezies die Abtrennung des freien Proteins von liposomal gebundenen Proteinen am schwierigsten. Die Negativ-Kontrolle zeigte hier eine stärkere Verunreinigung bzw. wesentlich höhere Proteinmengen.

Protein	Mol %		
Serum albumin	12.09	Ig gamma-2B chain C region	1.67
Apolipoprotein E	11.81	Del. in malign. brain tumors 1 prot.	1.66
Alpha-1-macroglobulin	8.19	Fibrinogen alpha chain	1.63
Ig kappa chain C region, A allele	4.93	Fibronectin	1.47
Serine protease inhibitor A3L	3.87	C4b-binding protein alpha chain	1.34
Serotransferrin	3.69	Serum paraoxonase/arylesterase 1	1.30
Keratin, type II cytoskeletal 73	3.27	Apolipoprotein A-IV	1.30
Ig gamma-2A chain C region	2.66	Complement C3	1.19
Fibrinogen gamma chain	2.45	Complement C4	1.09
Apolipoprotein A-I	2.22	Apolipoprotein C-IV	1.09
Apolipoprotein B-100	2.10	Murinoglobulin-1	1.02

TABELLE 4.13: Detektierte Proteine in Rattenplasma (Negativkontrolle): Dargestellt sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol%, die in gesäultem (CL-4B) Mausplasma aufgefangen wurden. Dies diente als Negativkontrolle der Proteinkorona Proteine (vgl. Abbildung 4.13).

Eine Proteinkonzentrationsmessung der Negativkontrollen ergab im Rattenplasma im Vergleich zu den anderen Spezies überdurchschnittlich hohe Proteinwerte. Um dies näher zu untersuchen, wurde Rattenplasma (0,9 ml Plasma mit 0,1 ml 0,9 %-NaCl-Lösung) nochmal auf eine standardisierte Säule mit CL-4B gegeben und 1 ml Fraktionen aufgefangen und anschließend zum Vergleich des zeitlichen Verhaltens 0,1 ml Liposomen mit 0,9 ml 0,9 %-NaCl-Lösung ebenfalls auf eine Säule gegeben (n=2). Zur objektiven Quantifizierung der Liposomenfraktionen wurde eine CF-Bestimmung der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Liposomen eindeutig in Fraktionen 12-17 detektierbar waren. Der Beginn des aufgefangenen Rattenplasmas, gemessen durch eine Proteinbestimmung, war jedoch schon bei Fraktion 11/12 nachweisbar. Dies schließt eine genaue Trennung der freien Proteine von liposomal gebundenen Proteinen aus.

Dennoch werden die massenspektrometrischen Ergebnisse des Rattenmodells hier gezeigt, da die Proteinverteilung in der Negativkontrolle sich von der Proteinkorona Verteilung unterscheidet. Abbildung 4.13 und Tabelle 4.13 zeigen, dass Apolipoprotein E wesentlich stärker in der Proteinkorona vertreten ist. Weiterhin gibt es Unterschiede in der Verteilung von Serum Albumin, Alpha-1-Macroglobulin und der Ig Kappa C Kette, deren Vorkommen in der Proteinkorona etwa jeweils halb so groß ist, wie das im gesäulten Plasma.

4.6.5.4 Proteinkorona in Hamsterplasma

Ähnlich zum Rattenmodell zeigt die Analyse der Proteinkorona von DPPG₂-TSL in Hamsterplasma eine ähnliche Verteilung der Proteinhäufigkeiten in der Korona wie im gesäulten Plasma.

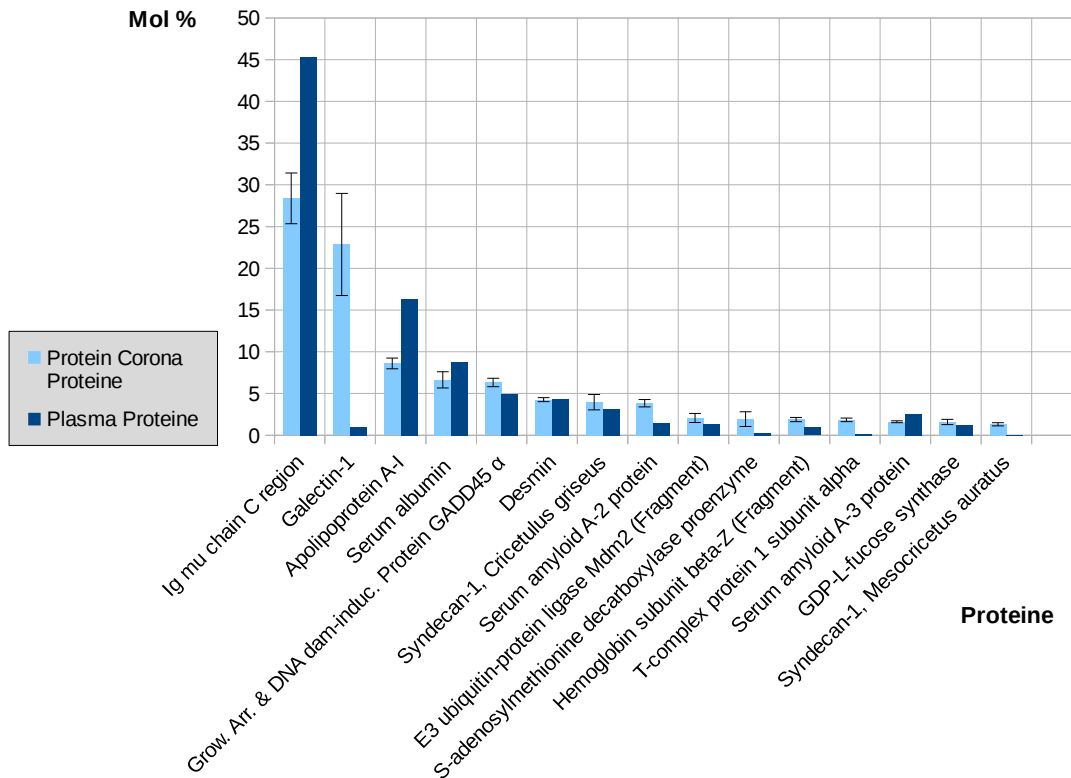


ABBILDUNG 4.14: Vergleich der Proteinverteilung der Proteinkorona an DPPG₂-TSL in Hamsterplasma (n=3) und der Negativkontrolle von gesäultem Hamsterplasma: Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an DPPG₂-TSL dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in gesäultem Hamsterplasma angeführt. Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol %-Wert ≥ 1 .

Auffallend in der Proteinkorona der DPPG₂-TSL in Abbildung 4.14 ist jedoch die Menge des Galectin-1, eines nur ca. 14 kD großen Lectins (58), das hauptsächlich als intrazelluläres Protein (59) fungiert, und sowohl als Mono- als auch Dimer vorkommt. In der Korona nimmt dies fast ein Viertel aller Proteine ein, in der Negativkontrolle nur ca. 1 %.

Protein	Mol%
Ig mu chain C region	45.35
Apolipoprotein A-I	16.35
Serum albumin	8.8
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitoch. (Frag.)	6.15
Growth arrest and DNA dam.-induc. protein GADD45 α	4.94
Desmin	4.32
Syndecan-1, Cricetulus griseus	3.17
Serum amyloid A-3 protein	2.5
Serum amyloid A-2 protein	1.47
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (Fragment)	1.32
GDP-L-fucose synthase	1.23
Keratin, type I cytoskeletal 19 (Fragments)	1.09
Galectin-1	1.02

TABELLE 4.14: Detektierte Proteine in Hamsterplasma (Negativkontrolle): Dargestellt sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol%, die in gesäultem (CL-4B) Hamsterplasma aufgefangen wurden. Dies diente als Negativ-Kontrolle der Proteinkorona Proteine (vgl. Abbildung 4.14).

4.6.5.5 Proteinkorona in Beagleplasma

Nachfolgende Abbildung zeigt die Verteilung der Proteinkorona Proteine im Beagle Plasma (s. Abbildung 4.15). Die Proteinverteilung der Negativkontrolle ist in Tabelle 4.15 dargestellt.

Die Proteinkorona Verteilung im Beagleplasma überrascht mit dem höchsten Anteil an Serumalbumin in der Korona, was in den anderen Spezies auch vertreten ist, aber nie an erster Stelle. Dies korreliert mit dem Anteil an Serumalbumin in der Negativkontrolle, der hier fast 50 % aller detektierten Proteine ausmacht. Vergleichbar zu den anderen Tiermodellen ist außerdem der hohe Anteil an diversen Apolipoproteinen, was auch in ähnlichen Studien gezeigt wurde (32), (36), (55), (60), (61), (62).

Aus den Apolipoproteinvertretern und Immunglobulinbestandteilen sticht außerdem noch Haptoglobin heraus, das zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine zählt. Des weiteren zeichnen sich wie auch bei allen anderen Spezies mehrere Keratin-Proteine ab. Diese stellen mit großer Wahrscheinlichkeit Verunreinigungen dar, die bei der Gewinnung des Plasmas entstehen.

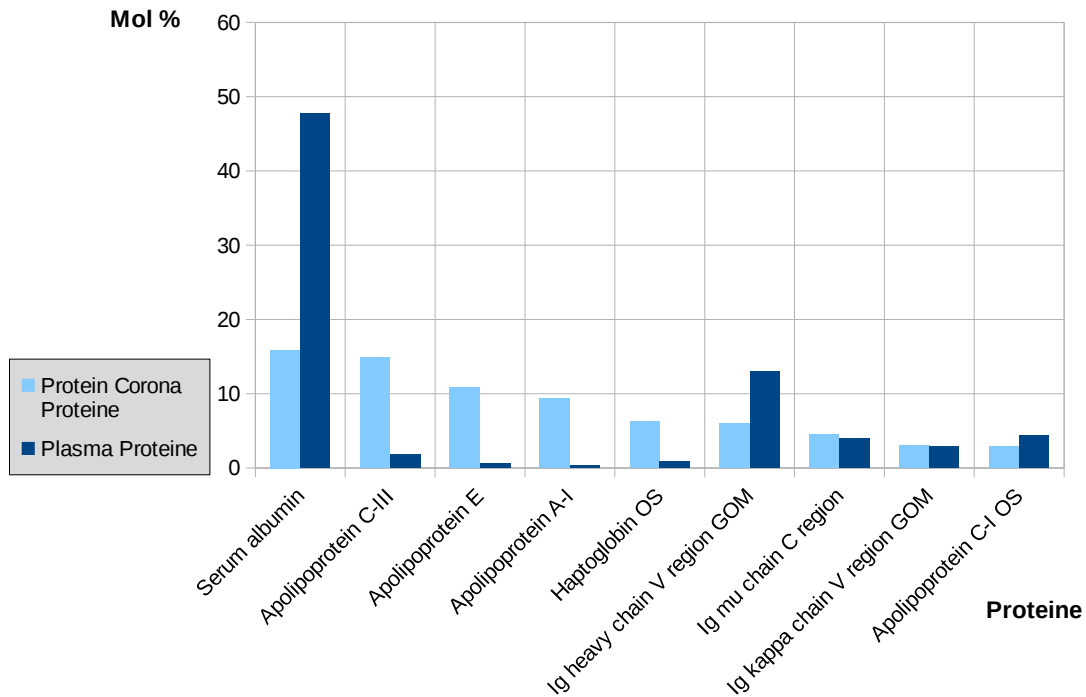


ABBILDUNG 4.15: Vergleich der Proteinverteilung der Proteinkorona an DPPG₂-TSL in Beagleplasma (n=3) und der Negativkontrolle von gesüultem Beagleplasma: Absteigend nach ihrem Vorkommen sind hier die häufigsten Proteine der Proteinkorona an DPPG₂-TSL dargestellt. Zum Vergleich ist deren jeweiliger prozentualer Anteil in gesüultem Beagleplasma angeführt. Dargestellt sind alle Proteine mit einem Mol %-Wert ≥ 1 .

Protein	Mol%
Serum albumin	47.73
Ig heavy chain V region GOM	12.97
Keratin, type II cytoskeletal 1	9.48
Keratin, type I cytoskeletal 10	7.97
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	7.07
Apolipoprotein C-I	4.33
Ig mu chain C region	4.02
Ig kappa chain V region GOM	2.85
Apolipoprotein C-II	1.88

TABELLE 4.15: Detektierte Proteine in Beagleplasma (Negativkontrolle): Dargestellt sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol%, die in gesüultem (CL-4B) Beagleplasma aufgefangen wurden. Dies diente als Negativ-Kontrolle der Proteinkorona Proteine (vgl. Abbildung 4.15).

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Anpassung der Methoden im Verlauf der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Trennung von liposomal gebundenem Protein und ungebundenem Protein etabliert werden. Desweiteren wurden verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Proteinkorona von TSL eingesetzt und an die experimentellen Bedingungen angepasst.

5.1.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mit CF-Liposomen

Wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben wurde, vereinfachte der Einschluss von CF in die TSL den Säulprozess wesentlich, da die Liposomen dadurch visuell deutlich einfacher detektierbar waren. Da Proteine posttranslational phosphoryliert werden, deswegen zum Teil auch in geringen Mengen Phosphat enthalten können, wäre eine Phosphatbestimmung absolut fehleranfällig. Dadurch kann keine sichere Aussage zum Beginn des Liposomen-Eluats im Säulprozess getroffen werden, was zum Verlust von Liposomen mit Proteinkorona führt. CF-Liposomen sind auch deutlich einfacher zu charakterisieren, da das temperaturabhängige Freisetzungsprofil leichter untersucht werden kann. Dies führte zur Entscheidung, die verwendeten TSL mit CF zu beladen. Da allerdings die meisten Proteinassays auf dem Prinzip der UV/VIS-Absorption bestehen, interferierte das Absorptionsspektrum des CFs mit den Absorptionsspektren der verwendeten Assays.

Im Vergleich der Proteinkonzentrationsmethoden von Lowry et al. (51) und Bradford (50) stellten Lucarini und Kilikian (63) fest, dass bei beiden Methoden wesentliche Störfaktoren existieren. Bei Lowry sind es bspw. verschiedene Puffer, Detergenzien, EDTA, Lipide, Zucker wie Glucose und Sucrose, Nukleinsäuren und verschiedene Salze wie Phosphate, Citrate, Kalium, Magnesium und Tris. Der Bradford Assay wird insgesamt durch weniger interferierende Faktoren beeinflusst, ist aber dennoch auch anfällig bei SDS, Triton X-100, kommerziellen Detergenzien, verschiedenen Puffern, Natriumhydroxid und Tris (>2 M)(50). Dies limitierte die Exaktheit von Proteinkonzentrationsmessungen, die nicht nur Proteinlösungen enthielten, sondern auch zusätzliche Komponenten wie bspw. Liposomen (Lipide).

Ein weiterer Störfaktor war das in Liposomen eingeschlossene CF. CF ist ein fluoreszierender Farbstoff mit einer Absorptionswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 517 nm (64). Als bei ersten Versuchen klar wurde, dass die gemessenen Absorptionswerte der Proteinbestimmung zu hoch waren, wurden mehrere Lösungsansätze getestet. Vor jeder Messung im Absorptionsspektrometer wurde ein Leerwert gemessen. Dieser diente zur Kalibrierung des Spektrometers und enthielt nach Vitha et al. (65) alle Stoffe in der exakt gleichen Konzentration, die in der Probe auch vorkamen, mit Ausnahme des gesuchten Analyten. Im Idealfall war die Leerwert-Kuvette also exakt identisch zur Probe, außer dass es die zu bestimmende Substanz nicht enthielt. Nach diesem Prinzip konnte die Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Assay nach Bradford (50) durchgeführt werden, solange vor den jeweiligen Messungen eine Leerwert-Kuvette mit der entsprechenden Liposomenkonzentration derselben Liposomencharge (wegen schwankender CF-Konzentrationen zwischen den Chargen) verwendet wurde. Diese Methode erwies sich anfangs als hinreichend genau, wie man in Kapitel 4.4.1 und Tabelle 4.2 sehen kann.

Die Proteinbestimmung mit dem Assay nach Bradford war trotz Verwendung eines CF-TSL-Leerwerts immer noch relativ ungenau. Außerdem waren die gemessenen Proteinwerte meist über dem optimalen Messbereich der Quantifizierungsmethode, sodass die Proben immer verdünnt werden mussten. Um die Proteinbestimmung zu verbessern, wurde für den weiteren Test eine adaptierte Methode nach Lowry et al. (51) verwendet. Dabei wurde die Absorption bei 750 nm gemessen. Da die Absorption im Gegensatz zu den zwei Absorptionswerten des Bradford-Assays ($a=450$ nm, $b=590$ nm) eine größere Differenz zum Absorptionsmaximum von CF (495 nm) bedeutete, wurde auf die Leerwert-Messung verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der Entscheidung für CF in den Liposomen die Proteinquantifizierung eine Näherung an die tatsächlichen Werte war, und vor allem eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander gegeben war. Wie zu Beginn des Kapitels angeführt, ist jedoch eine Verwendung von Liposomen ohne CF mit ausgesprochenen Nachteilen insbesondere im Säulprozess verbunden. Schließlich ist es am ehesten nicht die absolute Menge der an die Liposomenoberfläche gebundenen Proteine, die ausschlaggebend ist, sondern die Zusammensetzung der Proteinkorona. (66).

5.1.2 Methode zur Trennung der Proteinkorona von freiem Protein

Um die Zusammensetzung der Proteinkorona genau analysieren zu können, mussten die in Lösung vorliegenden ungebundenen Proteine vorher abgetrennt werden. Diese lagen entweder als *soft corona* vor oder waren gar nicht an das Liposom gebunden. Eine große Herausforderung dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Methode, die es ermöglichte, die an die Liposomenoberfläche gebundenen Proteine von den in Lösung befindlichen Plasmaproteinen zu trennen. Nachdem dies nur mit

Zentrifugation und Waschung nicht möglich war, da die SDS-PAGE Gele bei dieser Methode keinen Unterschied zwischen Liposomen-Proteinkorona-Proben und Kontroll-Plasma zeigten (Daten nicht gezeigt), wurde eine Methode nach Hosokawa et al. (48) getestet. Hierbei wurde analog zu dessen Versuchen als Säulenmaterial Sepharose CL-6B verwendet. Diese hat einen Trennbereich (M_r , Globuläre Proteine) von $1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$. In den SDS-PAGE Gelen zeigte sich durch diese Methode ein deutlicher Unterschied zwischen normalem Plasma und der Proteinzusammensetzung der Proteinkorona, weswegen sie bis zum Einsatz der massenspektrometrischen Analyse genutzt wurde.

Bei einigen kleineren Proteinen ist beschrieben worden, dass sie auch *in vitro* Oligomere bilden. Beispiele dafür sind Immunglobulin-Kettenbestandteile (Ig lambda-2 chain, Ig Kappa (67–69)), die auch unter den am häufigsten vertretenen Proteinen der Negativkontrolle waren. Diese Oligomere (Proteinagglomerate) würden ihrer Größe entsprechend nun auch viel früher eluieren.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Tabelle 4.7: Dort zeigt sich, dass die durchschnittliche Proteingröße in gesäultem Humanplasma größer ist als in nicht prozessiertem Humanplasma, was bedeutet, dass in gesäultem Plasma im Durchschnitt größere Proteine enthalten waren.

Zusätzlich unterstreicht auch die Betrachtung des gewichteten Mittelwerts diese Annahme. Hierbei wird in die Durchschnittsgröße außerdem der prozentuale Anteil der Proteinmenge miteinbezogen. Hierbei zeigte sich, dass in gesäultem Plasma anteilmäßig im Vergleich zu unprozessiertem Humanplasma und der Proteinkorona an DPPG₂-TSL aus Humanplasma am meisten große Proteine vertreten waren (s. Tabelle 4.7).

Dies ist ein weiterer Hinweis, dass bei der Säulenchromatographie von Plasma inkubierten Liposomen größere Proteine früher eluieren und es leider auch Proteine oder Proteinkomplexe und Aggregate gibt, die ein gleiches Säulenchromatographieverhalten bzw. eine ähnliche Größe wie Liposomen haben.

Aufgrund dieser Resultate wurde die Methode umgestellt und stattdessen als möglicher Problemlösungsansatz Sepharose CL-4B als Säulmaterial verwendet. Dessen Trennbereich (M_r , Globuläre Proteine) befindet sich bei $7 \times 10^4 - 2 \times 10^7$. Dies liegt vor allem an den verschiedenen Agarose-Konzentrationen (6 % bei der CL-6B, bzw. 4% bei CL-4B). Weiterhin ist die Fließgeschwindigkeit der Sepharose CL-4B bei Druck-Fließ-Technik mit 149 cm/h wesentlich geringer als die der Sepharose CL-6B (283 cm/h)(70). Die geringere Fließgeschwindigkeit versprach eine bessere Auftrennung von Molekülen verschiedener Größe.

Ein weiterer Unterschied zwischen erster und zweiter Abtrennungsmethode bestand in der Verwendung von Aufreinigungsschritten der Proben durch Dialyse nach der Säulenchromatographie, um eine höhere Reinheit der Proben von kleinmolekularen Verunreinigungen zu erreichen.

Die jeweiligen Negativkontrollen des säulenchromatographierten Plasmas unter

Verwendung der Methode mit Sepharose CL-4B zeigte allerdings auch das Vorliegen von Proteinen. Jedoch war die Proteinverteilung deutlich unterschiedlich zur Verteilung in der Proteinkorona. Deswegen wurden die Resultate der Massenspektrometrie zum Generieren von Hypothesen verwendet. Trotzdem sollte die Abtrennungsmethode bei weiteren Experimenten dieser Art auf jeden Fall noch verbessert werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit keine optimale Möglichkeit gab, freie Proteine von Protein-Liposomen Komplexen abzutrennen. Dies ist eine der größten Herausforderungen im Bereich der Proteinkorona-Forschung.

5.1.3 Auffälligkeiten bei den verwendeten Plasmen und FCS

Die verwendeten Plasmen zeigten in allen massenspektrometrischen Untersuchungen einige Proteine, die nicht in Plasma vorkommen sollten (v.a. verschiedenste Keratin-Typen). Keratin ist ein Faserprotein, das zu den häufigsten Kontaminanten in massenspektrometrischen Analysen zählt. Das typischerweise aus Hautzellen stammende Keratin kommt in Haushalts-, und Laborstaub vor (71) und kann bei jedem Schritt der Probenprozessierung, beginnend bei der Blutgewinnung, die Proben meist luftgebunden verunreinigen. Da das Keratin, wie in den Proteinkorona-Bestimmungen deutlich zu sehen war, andere Proteine überlagerte, wurde dies bei den prozentualen Proteinverteilungen herausgefiltert.

Was vor allem in den Abtrennungsversuchen mit Rattenplasma (s. Tabelle 4.13) auffiel, ist die Tatsache, dass vermutlich große Proteinaggregate zur selben Zeit wie die Proteinkorona beladenen Liposomen eluierten (s. Kapitel 5.1.2). Dies würde die schlechte Abtrennung der liposomalen Proteinkorona von ungebundenen Proteinen aus Rattenplasma auch gut erklären (s. Kap. 4.6.5.3). Wichtig bei zukünftigen Experimenten mit Proteinabtrennung durch Säulenchromatographie ist also die Verwendung von kontaminationsfreiem Plasma ohne Proteinaggregate.

Bei der ersten Massenspektrometriemessung fiel die schlechte Qualität des verwendeten FCS auf, beziehungsweise der hohe Anteil an Kontaminationen, vor allem von Hämoglobin. Die im FCS sehr prominenten und im Kalbsserum nur in geringen Mengen vorkommenden Hämoglobinbestandteile (Subunit alpha, Subunit Beta) wiesen auf eine intravasale Hämolyse hin, bzw. auf eine Verunreinigung des Serums durch Hämoglobin bei der Gewinnung. Hämoglobin, das unter physiologischen Bedingungen nur in Erythrozyten, und nicht frei im Plasma vorkommt, sollte deswegen *in vitro* auch nicht in der Lage sein, an Nanopartikel bzw. Liposomen zu binden. Dies wirft die Frage auf, inwieweit kommerziell erworbenes, standardisiertes FCS ein geeignetes Medium für *in-vitro*-Versuche (Proteinkorona-Bestimmung) ist, da zumindest ein Hauptbestandteil des FCS *in vivo* im Blutplasma nicht vorkommt.

5.1.4 Einfluss von Antikoagulantien in den Versuchen

Bis auf die anfänglichen Inkubationen und Gelelektrophoreseläufe mit FCS, wurden alle Experimente mit Plasma verschiedener Spezies durchgeführt. Dies entspricht dem natürlichen Milieu, in dem sich Nanopartikel befinden würden, wesentlich besser und erzielt auch eine reichere Proteinkorona, als bei der Verwendung von Serum (s. Abb. 4.2 und 4.4) (72). Zusätzlich zeigte Mirshafiee et al. (72), dass nicht nur Koagulationsfaktoren, sondern auch Komplementfaktoren eher an Nanopartikel binden, wenn diese in Humanplasma statt in Serum inkubiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Plasma bei der Proteinkorona-Generierung *in vitro* den physiologischen Bedingungen *in vivo* genauer entspricht als Serum. Jedoch enthält Plasma im Gegensatz zu Serum noch alle Gerinnungsfaktoren und würde ohne Zusatz von Antikoagulantien nicht verwendbar sein. Dementsprechend wirft dies die Frage auf, ob gängige Antikoagulantien wie bspw. EDTA oder Lithium-Heparin, wie bei den hier verwendeten Plasmen, die Proteinkorona *in vitro* beeinflussen. Lundqvist et al. (73) publizierten in einer Studie, in der die unterschiedlichen Proteinkoronae von Blut, EDTA-Blut, EDTA-Plasma und Serum an Silica-Nanopartikeln sowohl mit SDS-PAGE, als auch Massenspektrometrie untersucht wurden, dass deutliche Unterschiede zwischen allen verwendeten Medien vorhanden waren. Dies lässt darauf schließen, dass auch unter optimalen Bedingungen die Proteinkorona Bildung *in vitro* nur einer Annäherung an die *in vivo* Situation entspricht.

5.1.5 Vergleich der beiden Abtrennungsmethoden anhand von Humanplasma inkubierten DPPG₂-TSL

Durch die Umstellung der Abtrennungsmethode und den Wechsel des massenspektrometrischen Analyse-Labors wurden für diese Arbeit zwei unterschiedliche Methoden zur Generierung der Ergebnisse verwendet. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse beider Abtrennungsmethoden der humanen Proteinkorona von DPPG₂-Liposomen dargestellt und eventuelle Unterschiede deutlich gemacht werden.

Die Abbildungen 4.7 und 4.11 zeigen jeweils die Proteinkoronae von DPPG₂-TSL mit der CL-6B- bzw. der CL-4B-Abtrennungsmethode. Abbildungen 5.1 und 5.2 zeigen einen Vergleich der Proteinverteilungen mit den jeweiligen Abtrennungsmethoden. Dazu sind Proteine in ihre Familien kategorisiert.

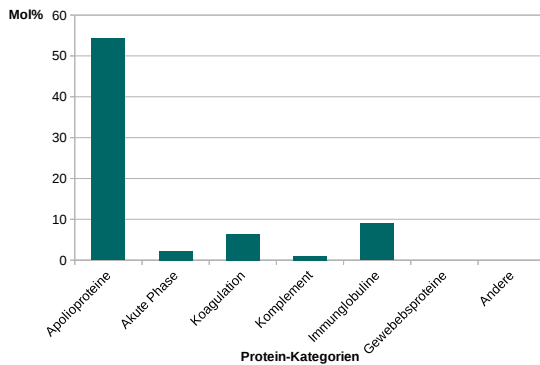


ABBILDUNG 5.1: Proteinkategorien mit der CL-6B-Abtrennungsmethode: Dargestellt sind hier Humanplasma-Proteine der DPPG₂-TSL-Korona, ihrer jeweiligen Kategorie zugeordnet. Miteingeschlossen sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol%. Dies sind hier 15 einzelne Proteine.

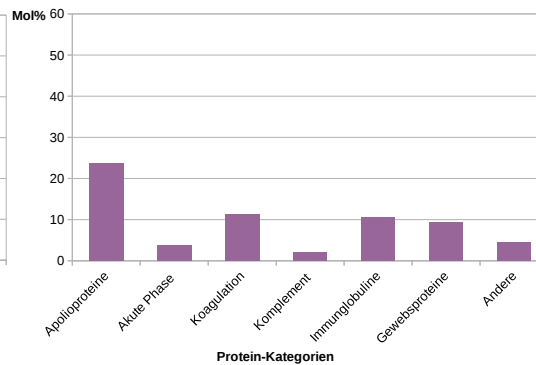


ABBILDUNG 5.2: Proteinkategorien mit der CL-4B-Abtrennungsmethode: Dargestellt sind hier Humanplasma-Proteine der DPPG₂-TSL-Korona, ihrer jeweiligen Kategorie zugeordnet. Miteingeschlossen sind alle Proteine mit einer Menge von ≥ 1 Mol%. Dies sind hier 23 einzelne Proteine.

Die beiden Proteinkoronaen stimmen, wie in der Abbildung deutlich wird, in ihrer Proteinzusammensetzung nicht überein. Zum einen ist die Anzahl an relevanten Proteinen (≥ 1 Mol%) bei der ersten Abtrennungsmethode deutlich geringer als bei der zweiten (15 im Gegensatz zu 23 Proteinen). Außerdem zeigt sich bei der ersten Methode das erwartete Bild der Apolipoprotein-Dominanz deutlicher als bei der zweiten, wo C4b-binding protein alpha chain am dominantesten ist, sowie an zweiter Stelle das Vitamin K-dependent Protein S. C4b-binding protein alpha chain ist bei der CL-6B-Abtrennungsmethode nur mit ca. 1 % vertreten.

Protein S ist unter anderem ein Mitglied der Gerinnungsfaktoren, bzw. auch ein Co-faktor von aktiviertem Protein C, die als Gegenspieler der Gerinnungskaskade das physiologische Gerinnungs-Gleichgewicht aufrechterhalten. Darüber hinaus bildet Protein S allerdings auch mit dem hier in seinen 2 Bestandteilen (α - und β -Kette) vertretenen C4-bindendem Protein einen Komplex (dies mit der β -Kette). Unter anderem zeigt der Komplex auch eine Affinität für negativ geladene Phospholipide (74), was eine interessante Konsequenz für DPPG₂-Liposomen darstellt, da diese das negativ geladene Phospholipid DPPG₂ zu 30 mol% in der Lipidmembran enthalten (23), was den hohen Anteil der α -, β -Ketten des C4-binding Proteins, sowie des Protein S erklären kann.

Weiterhin auffallend ist die Affinität vieler Apolipoproteine. Bertrand et al. (62) haben beschrieben, dass ein Mitglied der Apolipoproteinfamilie, ApoE, einen dysopsoninen Effekt auf Nanopartikel haben kann. Der Grund für die unterschiedlichen Proteinkoronaen könnte nun natürlich in dem unterschiedlichen Prozessieren liegen, allerdings wurde bei beiden Prozessen nicht die selbe Liposomencharge verwendet. Obwohl die Formulierungen an sich identisch waren, waren die Liposomen, die mit der CL-6B-Abtrennungsmethode analysiert wurden mit ca. 163 nm geringfügig größer als die mit der CL-4B-Abtrennungsmethode (ca. 156 nm). Zusätzlich haben die beiden verwendeten Formulierungen unterschiedliche

Zeta-Potentiale-Werte: -24,8 mV (CL-6B-Methode) bzw. -28,2 mV (CL-4B-Methode), was auf geringfügig verschiedene DPPG₂-Konzentrationen in der Membran der TSL hinweist.

Lundqvist et al. (35) fanden heraus, dass die Größe, sowie die Ladung von Nanopartikeln durchaus die Zusammensetzung der Proteinkorona beeinflusst. Durch die relativ geringe Größendifferenz der in dieser Arbeit verwendeten Liposomen im Vergleich zu der eben genannten Studie, wo die Differenz 50 nm betrug, ist hier allerdings mit einem wesentlich geringeren Unterschied zu rechnen. Die stärker negative Ladung der zweiten Liposomencharge könnte aber ein Grund für die stärkere Affinität des Protein S-C4b-binding Protein Komplexes sein, da dies vermehrt an negativ geladene Phospholipide bindet.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die verschiedenen Ergebnisse vermutlich auf einer Kombination der Abtrennungsmethoden, der massenspektrometrischen Analyse, sowie der zwei verwendeten Liposomenchargen beruht.

5.2 Übereinstimmung der SDS-PAGE-Gele mit massenspektrometrischen Ergebnissen

Da die Möglichkeit der massenspektrometrischen Analyse sich erst während des späteren Verlaufs dieser Arbeit bot, wurde versucht mit Hilfe von Gelelektrophorese Proteinbanden der Proteinkorona TSL spezifischen Proteinen zuzuordnen. Nach Erhalt der Massenspektrometrieergebnisse wurde versucht, die Ergebnisse beider Methoden zu korrelieren. Die Übereinstimmung der beiden Analyseverfahren ist jedoch trotzdem schwierig. Die Größenbestimmung mit Hilfe der Markerbande ist relativ ungenau und so lassen sich leider auch deutliche Banden nicht eindeutig bestimmen. Ein Beispiel dafür ist Abbildung 5.3.

Einige Banden sind sehr deutlich zu identifizieren, wie beispielsweise Albumin (gelber Pfeil), das in den reinen Plasma-Proben das häufigste Protein darstellt, und in jeder der in Abbildung 5.3 aufgeführten Proben vorkommt, inklusive in den letzten beiden Spuren, die aus Maus Plasma, bzw. Maus Plasmakorona bestehen.

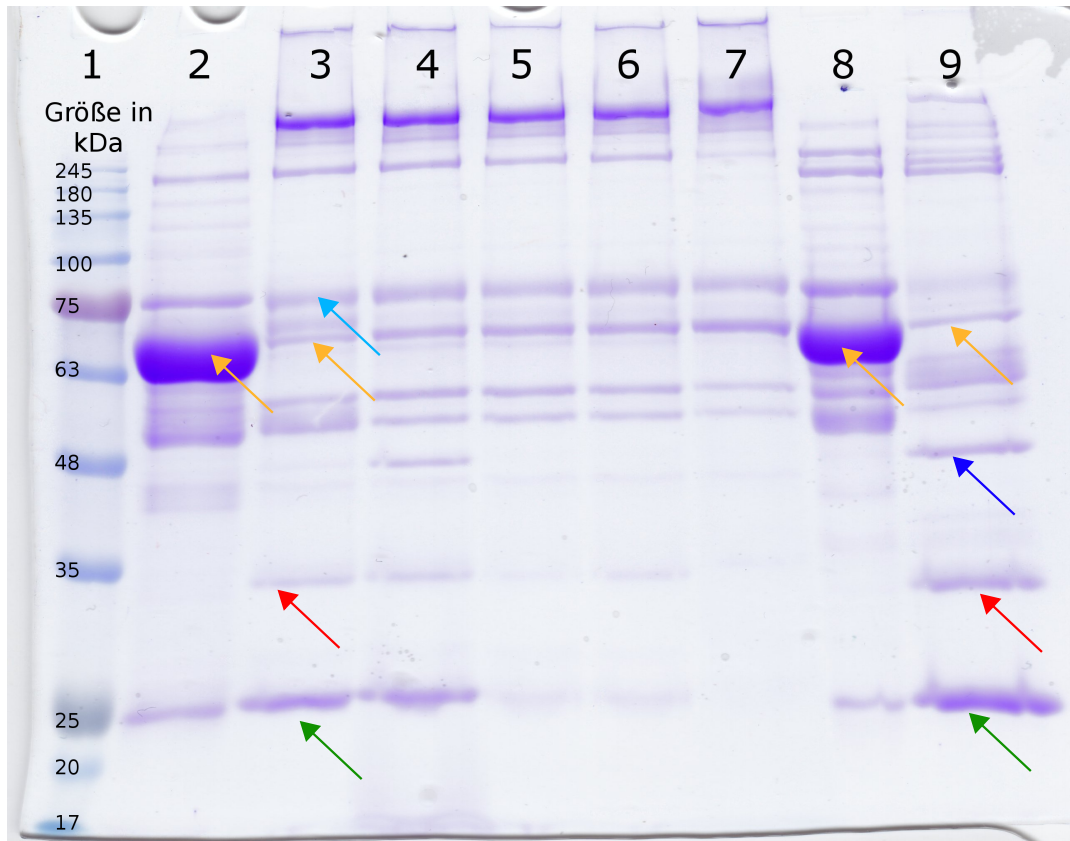


ABBILDUNG 5.3: Banden, deren Größe und Mengenverteilung aus der Massenspektrometrie bekannt sind, wurden hier mit Pfeilen gekennzeichnet, die Spuren hier bestehen aus: Marker (Spur 1), Reines Humanplasma (Spur 2), Human-Proteinkorona an DPPG₂-TSL (Spur 3), Human-Proteinkorona an KL (Spur 4), Human-Proteinkorona an LTSL (Spur 5), Human-Proteinkorona an PEGL (Spur 6), Human Proteinkorona an Caelyx® (Spur 7), Reines Mausplasma (Spur 8), Maus-Proteinkorona an DPPG₂-TSL. Hellblau = Vitamin K depend. Protein S, Gelb = Serum Albumin, Dunkelblau = Ig μ chain C region, Rot = Apolipoprotein E, Grün = Apolipoprotein A-I

Pfeile	Protein	Größe (in kDa)
hellblau	Vitamin K dep. Protein S	75,12
gelb	Serum Albumin	69,37 (hu), 68,70 (mu)
dunkelblau	Ig μ chain C region	49,94
rot	Apolipoprotein E	36,15 (hu), 35,87 (mu)
grün	Apolipoprotein A-I	30,78 (hu), 30,61 (mu)

TABELLE 5.1: Proteine, die anhand der Massenspektrometrieanalyse identifiziert wurden. Die Größe der Proteine ist in der letzten Spalte angeführt. Bei dreien der aufgeführten Proteine, gibt es zwei Größen, je nachdem, ob sie in menschlichem (hu) oder murinen (mu) Plasma enthalten sind. Anhand der Pfeilfarben kann man sie als Elektrophoresebanden in Abbildung 5.3 identifizieren

Vor der massenspektrometrischen Untersuchung, war die Vermutung, dass die Bande in Abbildung 5.3 (grüner Pfeil) die leichte Kette von IgG ist, da diese ca. 25 kDa groß ist. Jedoch ist in den massenspektrometrischen Analysen dieses Protein

nicht in der Menge vorhanden, dass es eine derart deutliche Bande hinterlassen würde. Vielmehr ist die mit dem grünen Pfeil gekennzeichnete Bande wahrscheinlich Apolipoprotein A-I, mit einer Größe von ca. 30 kDa. Die Markerbande gibt hier in Spur 1 hier eine Größe von 25 kDa an. Dies hätte eine Identifizierung der Banden ohne die spätere Massenspektrometrie-Messung nicht möglich gemacht. Apolipoprotein E (roter Pfeil), das in der Humanplasma-Korona von DPPG₂-TSL, von KL, sowie in der Mausplasma-Korona von DPPG₂-TSL vorkommt, ist ebenfalls auf dem Gel zu erkennen. Ein anderes deutlich in allen Spuren vorhandenes Protein ist das Vitamin K abhängige Protein S (hellblauer Pfeil).

5.3 Proteinprofile der Liposomenformulierungen

Proteinbestimmungen haben gezeigt, dass die DPPG₂-Liposomen am wenigsten Protein binden (s. Tabelle 4.4). Dies könnte sich günstig auf die Plasmahalbwertszeit auswirken. Unklar ist jedoch, ob nicht vielmehr die Zusammensetzung der Korona ausschlaggebend für das pharmakokintische Verhalten *in vivo* ist (60), (75), weswegen letztere hier betrachtet wird.

Eine Herangehensweise zum Design und zur Formulierung neuartiger Liposomen wäre es, diese anhand ihrer Proteinkorona zu strukturieren. Deswegen war ein Ziel dieser Arbeit, Unterschiede in der Proteinkorona verschiedener gängiger Formulierungen festzustellen und wenn möglich zu erklären.

Daten hierfür wurden in Form von SDS-PAGE Gelen für die jeweils fünf in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Liposomenformulierungen, sowie zusätzlich für die DPPG₂-TSL, sowie LTSL in Form von massenspektrometrischen Ergebnissen erfasst. Letztere beide wurden gewählt, um einen Vergleich zwischen zwei thermosensitiven Formulierungen zu erhalten, die derzeit in der klinischen Entwicklung sind (17), (76). Beim Blick auf die SDS-PAGE-Gele sieht man in Abbildung 4.2 beim Vergleich der 5 verwendeten Liposomenformulierungen einen deutlichen Unterschied zwischen den DPPG₂-Liposomen und den kationischen Liposomen. Die kationischen besitzen auch im Vergleich zu den restlichen drei Formulierungen eine zusätzliche Bande bei ca. 45 kDa. Die Silberfärbung der mit Humanplasma inkubierten Liposomen zeigt dann schließlich noch deutlichere Unterschiede. Die DPPG₂-Liposomen scheinen mehr Banden im Bereich zwischen 50 und 100 kDa zu haben. Wie in Kapitel 5.2 beschrieben, ist die genaue Identifikation der Proteine definitiv herausfordernd. Was jedoch deutlich ersichtlich wird ist, dass es durchaus Unterschiede der Proteinprofile der einzelnen Formulierungen gibt. Abbildungen 5.4 und 5.5 zeigen nun die Proteinverteilung nach Proteingruppen aufgeteilt.

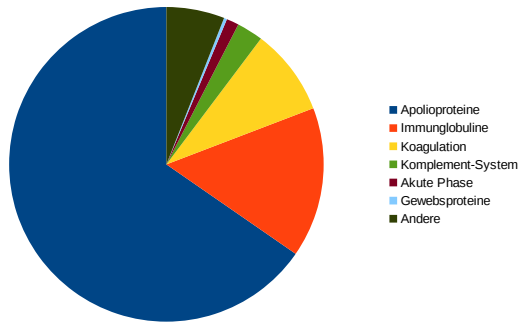


ABBILDUNG 5.4: Proteinverteilung der Proteingruppen an DPPG₂-TSL: Apolipoproteine, Immunglobuline, Koagulations-Proteine, Komplement-System-Bestandteile, Akute-Phase-Proteinen, Gewebsproteine und Andere. Mitein flossen alle Proteinmengen (fmol) ab einem prozentualen Anteil von $\geq 0,1$ %. Ausgeschlossen wurden damit 3,87 % aller detektierten Proteine (n=3)

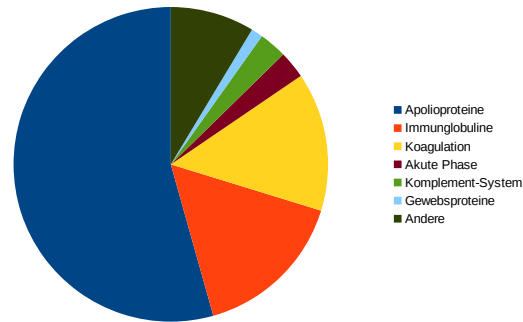


ABBILDUNG 5.5: Proteinverteilung der Proteingruppen an LTSL: Apolipoproteine, Immunglobuline, Koagulations-Proteine, Komplement-System-Bestandteile, Akute-Phase-Proteinen, Gewebsproteine und Andere. Mitein flossen alle Proteinmengen (fmol) ab einem prozentualen Anteil von $\geq 0,1$ %. Ausgeschlossen wurden damit 3,5 % aller detektierten Proteine (n=2).

Bei beiden Formulierungen ist erwartungsgemäß die Apolipoproteinfraktion am häufigsten vertreten, wie auch schon Barrán-Berdón et al. (32) und Schöttler et al. (55) herausfanden. Allein von einem physiologischen Standpunkt aus, ist dies bei Liposomen sehr wahrscheinlich. Apolipoproteine sind eine Reihe von Proteinklassen (bisher sind sieben Klassen: A, B, C, D, E, H, L mit mehreren Subklassen bestimmt), deren Hauptfunktion es ist, als strukturelle Komponenten von Lipoproteinen im Transport von Lipiden zu agieren. Apolipoproteine binden demnach Lipide im Lipoproteinstoffwechsel (77). Da Liposomen in den allermeisten Fällen aus Phospholipiden bestehen, ist es wahrscheinlich, dass Apolipoproteine an Liposomen binden. In anderen Arbeiten (61), (78), (79) wurde gezeigt, dass Nanopartikel, in deren Proteinkorona Apolipoproteine vermehrt angereichert waren, besondere Eigenschaften zeigten. Vor allem Apolipoprotein E beladene Nanopartikel werden zum einen von humanen Endothelzellen vermehrt aufgenommen. Zum anderen werden sie langsamer aus dem Blutkreislauf eliminiert (62) und sind darüber hinaus in der Lage, durch die Anreicherung mit ApoE und ApoA-I in ihrer Korona die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Allerdings wurde auch beschrieben, dass Nanopartikel, deren Proteinkorona mit verschiedenen Apolipoproteinen (ApoB-100, Apo A-I, ApoE) beladen war auch leichter von Hepatozyten aufgenommen und dementsprechend schneller aus dem System eliminiert wurden. Vor allem ApoA-I und ApoE4 haben eine hohe Affinität zum auf Endothelzellen exprimierten LDL-Rezeptor, was Rückschlüsse auf die Internalisation von Liposomen zulässt (29).

Im Gegensatz zu anderen Proteinen wie Immunglobulinen oder Komplementfaktoren, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Proteinkorona als Opsonine ausmachen, scheinen Apolipoproteine einen dysopsoninen Effekt auf Nanopartikel zu haben, wie auch die Arbeit von Bertrand et al. (62) zeigt. Hier sieht man, dass die Apolipoproteinfraktion mit zunehmender PEGylierung des Nanopartikels zunimmt. Nun

beinhaltet die lysolipid-basierte Liposomen-Formulierung, die hier verwendet wurde unter anderem auch DSPE-PEG₂₀₀₀, hat damit also auch eine schützende PEG-Schicht. Dies dient dazu, es vor dem Immunsystem und vor Opsonierung "unsichtbar" zu machen. Unter anderem geschieht dies, indem die PEGylierung mit PEG₂₀₀₀ die Oberflächenladung auf den Liposomen abschirmt (gut zu sehen am fast neutralen ζ -Potential in Tabelle 4.1) (80).

In den Grafiken 5.4 und 5.5 ist zu erkennen, dass die Apolipoproteinfraktion bei den DPPG₂-Liposomen um ca. 10 % höher ist als bei den Lysolipid-basierten Liposomen. Dies geschieht v.a. zugunsten von Koagulationsfaktoren, bzw. anderer Proteine. Zum einen unterscheiden sich die Formulierungen in ihrer Größe sowie Ladung: bei den LTSL sind es 126,2 nm und -2,37 mV, bei den DPPG₂-Liposomen sind es 163,1 nm und -24,8 mV. Letztere sind also deutlich größer und stärker negativ geladen, was einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Proteinkorona von Nanopartikeln hat (35), (81). In der Arbeit von Schmidt (24), in der unter anderem die Pharmakokinetik *in vivo* von LTSL und DPPG₂-TSL untersucht wurde, wurde gezeigt, dass die Plasmahalbwertszeit des in Liposomen enkapsulierten Wirkstoffes (Doxorubicin) bei DPPG₂-TSL im Mausmodell um knapp 30 % größer war.

Möglich wäre, dass ein größerer Anteil an Apolipoproteinen in der Proteinkorona durch einen größeren Durchmesser der Liposomen verursacht wird. Es gibt mehrere Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen der Nanopartikelgröße und der Proteinkorona-Zusammensetzung zeigen (82), (83). In der Literatur gibt es jedoch wenig Erklärungsansätze hierfür. Die Liposomengröße beeinflusst auf jeden Fall die Oberflächenkrümmung. Eine weniger gekrümmte Oberfläche könnte sich günstiger auf die Bindung von z.B. Apolipoproteinen auswirken. Der größere Anteil an Apolipoproteinen der Proteinkorona könnte auch durch die negativere Ladung bedingt sein. Beide Aspekte können damit günstige Effekte auf die Plasmahalbwertszeit des Wirkstoffes bzw. die Bioverfügbarkeit haben. Erwähnenswert ist allerdings noch, dass vor allem bei nicht optimal sterisch geschützten Partikeln, wie es bei den DPPG₂-Liposomen der Fall ist (keine PEGylierung), Apolipoprotein E eine wichtige Rolle im Schutz vor Opsonierung zu spielen scheint (62).

5.4 Interspeziespezifische Unterschiede der Proteinkoronae und Erklärung für die schlechtere Stabilität in Mausplasma

Beim Vergleich der Proteinkoronae der Spezies Mensch, Maus, Ratte, Hamster und Beagle (zum besseren Vergleich werden hier nur die Proben, die mit der CL-4B Methode analysiert wurden miteinbezogen), fällt auf, dass die des Humanplasmas wesentlich vielfältiger sind. Dies kann an der verwendeten Datenbank (uniprot.org) liegen, da bei den Proteomen der einzelnen Spezies unterschiedlich viele Proteine identifiziert sind. Das Proteom des Menschen (*Homo sapiens*) enthält hier 73112

unterschiedliche Proteine, die anderen jeweils 55197 (*Mus musculus*, Maus), 29961 (*Rattus norvegicus*, Ratte), 28696 (Golden Hamster, Hamster), 25492 (*Canis Lupus familiaris*, Beagle) (84). Diese Proteinmengen korrelieren gut mit der Proteinanzahl der detektierten Proteinkoronae. Die unterschiedliche Vielfalt der Proteinkoronae *in vitro* ist also wahrscheinlich nicht auf geringere Affinität von Proteinen, sondern auf ein schlechter untersuchtes Proteom zurückzuführen.

Die Proteinkorona im Humanplasma zeigt neben starken Keratinverunreinigungen eine große Anzahl verschiedenster Immunglobulinbestandteile, sowie Apolipoproteine, Komplementfaktoren bzw. der C4b-Protein S Komplex (zu dessen genaueren Analyse s. Kapitel 5.1.5).

Im Rattenplasma, bei dem wie in Kapitel 4.6.5.3 gezeigt, Abtrennungsprobleme in der Säulenchromatographie bestanden, kommen neben hohen Mengen an Apolipoprotein E und Albumin noch weitere seltenere Proteine vor wie beispielsweise das 2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 2 (OAS2), ein Protein, das Interferon-induziert bei der viralen Immunabwehr eine Rolle spielt (85). Außerdem noch interessant ist das Protein Serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1), ein Enzym, dessen primäre Substrate Phosphotriester, Ester, und Lactone sind (86). Durch die Ester-Bindungen der Phospholipide in den verwendeten Liposomenformulierungen, ist PON1 ein mögliches Enzym, das zur Instabilität von Liposomen durch Spaltung der Phospholipide beiträgt und deswegen ein Grund für eine schlechtere Stabilität von Liposomen wäre.

Die Proteinkorona in Hamsterplasma hat am meisten Bestandteile, die von den bisher häufigen Apolipoproteinen, bzw. Immunglobulinen abweichen. Die Proteinverteilung der Proteinkorona im Hamsterplasma war sehr ähnlich zu dessen Negativkontrolle, weswegen es allerdings möglich ist, dass die Abtrennung durch die Säulenchromatographie nicht optimal verlief. An den im Hamsterplasma inkubierten DPPG₂-TSL lässt sich zum einen Galectin-1 nachweisen, das wie in Kapitel 4.6.5.4 erwähnt vermutlich aufgrund von Verunreinigungen so stark vertreten ist. Galectin-1 ist ein intrazelluläres Protein und im Gegensatz zu allen anderen detektierten Proteinkorona Bestandteilen beim Hamster im Vergleich zur Negativkontrolle sehr viel mehr in der Korona enthalten. Dies ist vor allem erstaunlich, da es zur Familie der Kohlenhydrat-bindenden Proteine gehört, und es deswegen unwahrscheinlich ist, dass es eine Bindung zu Phospholipiden eingeht. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Galectin-1 auch an Protein-Protein Bindungen involviert ist. Dies geschieht aber vermehrt intrazellulär (59). Theoretisch könnte Galectin-1 hier aber einen Teil der *soft corona* ausmachen, indem es an Kohlenhydrat-Anlagerungen anderer Proteinkorona-Proteine bindet. Über Galectin-13 ist außerdem beschrieben, dass es an Glycerin bindet (87), welches als Diglycerin auch Bestandteil von DPPG₂ ist. Denkbar wäre, dass auch Galectin-1 als Bestandteil dieser Proteinfamilie eine ähnliche Bindung eingeht.

Die Proteinkorona im Beagleplasma zeigt das übersichtlichste Spektrum. Die

Abtrennung war hier verglichen mit den anderen Plasmaproben (ähnlich zu Hamsterplasma) eher schlecht. Ein Hinweis darauf ist, dass Albumin mit deutlichem Abstand zu den anderen Proteinen am häufigsten in der Korona vertreten ist. Beim Betrachten der Proteinkorona Proben in den anderen Spezies ist Albumin, das am häufigsten vertretene Protein in reinem Plasma, in den Proteinkoronae prozentual gering vertreten. Dies lässt darauf schließen, dass das in der hier analysierten Proteinkorona gezeigte Albumin wahrscheinlich eher ein Zeichen der schlechten Trennung in der Säulenchromatographie ist. Dies ist in allen anderen Modellen so bisher in keiner Weise vorgekommen, auch wenn Albumin eine schwache Affinität zu den DPPG₂-TSL besitzt (44). Allerdings befinden sich hier auch einige Apolipoproteine in der Korona: C-III, E, A-I, und C-I. Diese sind in der Negativkontrolle jeweils zu einem geringeren Anteil vertreten. Dies stützt die generelle Annahme, dass wie bei allen vorherigen Ergebnissen, die Apolipoproteinfraktion bei Liposomen einen der wichtigsten Bestandteile der Proteinkorona ausmachen.

Im Vergleich zu den eben genannten Spezies war die Proteinkorona in Mausplasma von besonderem Interesse, da die Stabilität von DPPG₂-TSL in Mäusen deutlich schlechter war (24). Hier gibt es nun mehrere Erklärungsansätze.

Die erste Analyse der Proteinkorona im Mausplasma von DPPG₂-Liposomen ergab neben ähnlichen Proteinprofilen wie bei den anderen untersuchten Spezies (große Mengen an Apolipoproteinen) noch ein weiteres bisher nicht unter den häufigsten 1% gefundenes Protein: ein Bestandteil des MHC-1 Komplexes. Dieser in Wirbeltieren vorkommende Proteinkomplex, der an T-Zellen bindet, ist verantwortlich für die Expression von Proteinbestandteilen, die, sollten es sich um dem Organismus fremde Proteine (bspw. bei einer viralen Infektion) handeln, von zytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert werden (88). Interessant ist allerdings, dass im Gegensatz zum Aufbau bakterieller oder viraler Organismen, bei der Synthese von Liposomen keine Proteine zum Einsatz kommen, was die Frage aufwirft, warum der Bestandteil des MHC-1 Komplexes sich so deutlich präsent in der Proteinkorona von Liposomen befindet. Da dieser auch prozentual wesentlich geringer in der Vergleichsprobe von normalem Mausplasma vertreten ist, kann angenommen werden, dass der Komplexbestandteil wesentlicher Teil der harten Korona ist. Allerdings müsste der MHC-1 Komplex auch körperfremde Proteine exprimieren, um das Liposom dem zellulären Immunsystem als fremd anzuzeigen. Nur dann würde es eliminiert werden. Da in der hier verwendeten Liposomenformulierung keine Proteine enthalten sind, kommen, wenn überhaupt, nur Verunreinigungen in Frage. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass dies mit der schlechteren Stabilität der Liposomen in Mausplasma zusammenhängt, da man von einem ähnlichen Mechanismus in den anderen Spezies ausgehen müsste.

Die zweite massenspektrometrische Analyse der Proben, die mit Sepharose CL-4B chromatographiert wurden, ergab nochmal ein weiteres Ergebnis. Von den häufigsten fünf vertretenen Proteinen sind drei unterschiedliche Bestandteile von Immunoglobulinen. Auch bei den Proben, die mit Sepharose CL-6B chromatographiert

wurden sind es zwei. Bekannterweise ist eine Hauptfunktion der Immunglobuline, sowie auch der Bestandteile des Komplementsystems, die Opsonierung von Fremdkörpern im physiologischen Milieu. Die konstante Region eines Antikörpers wird von anderen Bestandteilen des Immunsystems erkannt und der Fremdkörper anschließend eliminiert. Die relative Häufigkeit der Immunglobulinbestandteile (fast ausschließlich von konstanten Regionen) in der murinen Proteinkorona, vor allem in Betrachtung der anderen untersuchten Spezies, ist durchaus auffällig und könnte mitunter ein Grund für die schlechtere Stabilität sein, zumal bekannt ist, dass IgG bei anionischen TSL (also auch DPPG₂-TSL) die Membran destabilisiert (43). Allerdings ist noch unklar, worauf diese größere Affinität im Mausplasma beruht. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Immunglobulinen bspw. im Vergleich von humanen und murinen Ig-Bestandteilen sind zwar vorhanden aber gering (89). Dies herauszufinden, überstieg jedoch den Umfang dieser Arbeit.

Ein weiteres Protein fiel ebenfalls auf: das Cathelicidin antimicrobial peptide. Dieses mit ca. 2.5 % in den CL-4B Proben, allerdings nur mit $\approx 0,1$ % in den CL-6B Proben vertretene Protein spielt eine zentrale Rolle in der Abwehr gegen Bakterien (90). Gallo et al. (91) haben in CRAMP (Cathelicidin related antimicrobial peptide) ein murines Cathelicidin-Protein entdeckt, das in seiner Funktion denen der anderen Spezies sehr ähnelt. LL37, z. B., das einzige humane Mitglied der Cathelicidin Familie zeigt starke Affinität zu Phospholipiden wie DPPC, je nach Ladung der Kopfgruppe und Länge des Kohlenstoffschwanzes (92). Die Cathelicidin-Proteine im Menschen und in der Maus sind sich zwar sehr ähnlich, doch divergieren sie auch in entscheidenden Punkten (93), wie beispielsweise einer weniger starken Chemokin Induktion im murinen Modell im Vergleich zum humanen. Bei beiden Molekülen scheint die Neutralisation von bakteriellen Antigenen (Lipopolysacchariden) die Hauptfunktion zu sein. In Zusammenschau ist es wahrscheinlich, dass auch beim murinen Cathelicidin eine Affinität zu Phospholipiden, wie sie in Liposomen vorkommen besteht, weswegen dies ebenfalls zu der Instabilität von DPPG₂-TSL im Mausmodell beitragen könnte.

Der letzte und wahrscheinlichste Grund für die schlechtere Stabilität von DPPG₂-TSL im Mausmodell besteht möglicherweise im Vorhandensein aktiver Phospholipid spaltender Enzyme. Ein Enzym, das in Frage kommt ist eine Phospholipase A1 im Mausplasma (94), (95). Wie die eben genannten Arbeiten zeigen, wurde in Mausplasma wesentlich höhere Aktivitäten einer Phospholipase im Vergleich zu Mensch oder Ratte gefunden. Ein postulierter Grund ist, dass dieses Enzym im Menschen nur gebunden an Hepatozyten vorkommen, in der Maus jedoch im Plasma zirkuliert. Tatsächlich findet sich in der Proteinkorona der mit Mausplasma inkubierten TSL der Nachweis einer Phospholipase A1 (nur mit 0.02 Mol%). Im reinen Mausplasma fehlt die Detektion dieses Enzyms, a.e. bei zu geringer Menge.

Gillett et al. (96) zeigten jedoch später, dass ein anderes Enzym ebenfalls eine hohe Phospholipidlipaseaktivität zeigt: Hepatische Triglycerid-Lipase. Auch hier wurde

die Hypothese aufgestellt, dass dieses Protein nur in der Maus frei im Plasma zirkuliert, bzw. eine viel höhere Aktivität in der Maus, als in Ratte oder Mensch hat, wo es möglicherweise nur fest an Hepatozyten gebunden vorkommt. In dieser Arbeit konnte sowohl in reinem Mausplasma (mit 0,002 Mol%), und in deutlich größerer Menge in der Proteinkorona von TSL aus Mausplasma (mit 0,03 Mol%) Hepatische Triglycerid-Lipase nachgewiesen werden.

Ein möglicher Ansatzpunkt, diese Hypothese zu prüfen, ist die hepatische Triglycerid-Lipase durch ein spezifisches Antiserum zu inaktivieren (98). Bei relevantem Einfluss eines Phospholipid-spaltenden Enzyms sollten die Stabilität von TSL nach Inaktivierung der Hepatischen Triglycerid-Lipase deutlich profitieren.

5.5 Ausblick und Möglichkeiten in der Proteinkoronaforschung

5.5.1 *In vivo* Isolation von Proteinkorona

Eine vermutlich bessere Alternative zur *in-vitro*-Isolation und Analyse der Proteinkorona, wie sie in dieser Arbeit stattfand, ist die *in vivo* Isolation und Analyse. Denn die *in vivo* Isolation von Proteinkorona auf Nanopartikeln ist wesentlich genauer, verglichen mit der *in-vitro*-Situation. Sakulku et al. (103) fanden heraus, dass bei negativ geladenen superparamagnetischen Nanopartikeln (SPIONs) nur 8% der Proteinkorona *in vivo* und *in vitro* übereinstimmen. Dies deutet auf ein großes Manko der gesamten Proteinkorona Forschung hin, weswegen alle *in-vitro*-Ergebnisse unter Vorbehalt interpretiert werden sollten. Zum selben Ergebnis kamen auch Hadjide metriou et al. (36). In Zukunft sollten deswegen *in-vitro*-Daten nur für das Grundlagenverständnis einzelner Protein-Nanopartikel Interaktionen verwendet werden. Für eine genaue Voraussage müssen *in vivo* Daten gewonnen werden. Dies wird durch die stark erschwerte Rückgewinnung der Liposomen *in vivo* erschwert.

5.5.2 "Pre-Coating" zur besseren Steuerung von Liposomen *in vivo*

Ein sehr interessanter Ansatz, das Verhalten von Nanopartikeln und Liposomen *in vivo* zu steuern, ist, diese vor Applikation mit Plasma, Serum oder anderen physiologischen Gemischen zu inkubieren. Beispielsweise kann dies mit IgG depletiertem Plasma passieren. Daraus entsteht eine Proteinkorona ohne diesen Bestandteil. Dieser ist nachweislich ein verantwortlicher Bestandteil der Opsonierung der mit Hilfe des Fc-Rezeptors die Aufnahme durch Macrophagen vermittelt (104). Simon et al. (105) zeigten, dass die Aufnahme von Nanopartikeln durch Macrophagen, die mit IgG depletiertem Plasma inkubiert wurden, signifikant reduziert ist und demonstrieren so, dass es möglich ist, Nanopartikel dadurch zu steuern. Ein weiteres Verständnis jedes einzelnen Bestandteils einer Proteinkorona im Bezug auf deren Einfluss zur Pharmakokinetik, Opsonierung und Gewebeaufnahme könnte die Steuerung von Nanopartikeln allein auf diese Weise möglich machen.

Ein Beispiel dafür bietet sich auch in der Neuroonkologie: Eines der großen Probleme bei der Therapie von intrazerebralen onkologischen Erkrankungen ist das Überqueren der Blut-Hirn-Schranke. Die Anreicherung der Proteinkorona mit Apolipoprotein E ist vermutlich eine vielversprechende Möglichkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Göppert und Müller (106) erreichten dies durch die Stabilisierung von SLN (solid lipid nanoparticles) mit Polysorbat 80. Dies könnte auch eine Möglichkeit sein, Liposomen zu modifizieren um diese in der Therapie von intrazerebralen Tumoren anzuwenden.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, zu ergründen, welche Proteine sich an Liposomen anlagern, und welche Schlussfolgerungen sich daraus auf das Verhalten vor allem von TSL *in vivo* ziehen lassen können. Zusätzlich war es wichtig, für zukünftige Untersuchungen zur Protein-TSL-Interaktion, eine reproduzierbare Methodik zur Isolation der Proteinkorona zu etablieren.

Es konnte schließlich gezeigt werden, dass es nicht nur in der Gelelektrophorese, in denen fünf verschiedene Liposomenformulierungen miteinander verglichen wurden, Unterschiede in der Proteinkorona-Zusammensetzung gibt. Auch massenspektrometrisch zeigten sich anschließend verschiedene Zusammensetzungen der Proteinkorona Profile zwischen den zwei dabei untersuchten thermosensitiven Formulierungen. Diese ließen sich durch die biochemischen Eigenschaften der Liposomenformulierung auch theoretisch nachvollziehen.

Besonders interessant ist, dass ein prozentual hoher Anteil an Apolipoproteinen, wie es bei der Proteinkorona an der DPPG₂-Formulierung der Fall ist, sich günstig auf die Plasmahalbwertszeit des enkapsulierten Wirkstoffes auszuwirken scheint. Grund für die Anlagerung der Apolipoproteine sind womöglich Größe und Ladung der DPPG₂-Liposomenformulierung. Größere Liposomen begünstigen möglicherweise durch eine weniger stark ausgeprägte Oberflächenkrümmung das Anlagern von bestimmten Proteinen, z.B. Apolipoproteine. Dies ist dementsprechend neben dem Oberflächen-Coating mit bspw. PEG ein weiterer Ansatzpunkt, die Zusammensetzung der Proteinkorona zu beeinflussen.

Bezüglich des zweiten Aspekts der Analyse von Proteinkorona in Bezug auf die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Koronae nach Inkubation in Human-, Maus-, Ratten-, Hamster- und Beagleplasma lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Grundsätzlich besteht eine Dominanz aus Apolipoproteinen in allen fünf Spezies.

Eine Erklärung für die schlechtere Stabilität der DPPG₂-TSL in Mausplasma könnten zum einen mehr Immunglobulinbestandteile unter den am häufigsten vertretenen Proteinen sein, die bekanntermaßen zur wärmeinduzierten Freisetzung aus TSL beitragen. Weiterhin gibt es einzelne Proteine wie Bestandteile des MHC1 Komplexes oder Cathelicidin, die mitunter zur schlechteren Stabilität beitragen könnten.

Grund hierfür wäre jeweils eine Opsonierung der TSL und anschließende Elimination durch das Immunsystem. Ein sehr wichtiger Punkt ist außerdem die Aktivität einer Phospholipase (Phospholipase A1, Hepatische Triacylglycerol-Lipase) im Mausplasma, die die Phospholipide in der Liposomenmembran spalten kann und diese somit destabilisiert. Beide in Frage kommenden Enzyme konnten in der Proteinkorona von in Mausplasma inkubierten DPPG₂-TSL nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Methoden zur Abtrennung von freien Proteinen von Proteinkorona, deren zentraler Punkt die Säulenchromatographie ist, sind vielversprechende Möglichkeiten, die Proteinkorona an TSL *in vitro* zu isolieren. Gerade die Ergebnisse bei den Human- und Mausproben zeigen einen deutlichen Unterschied der Proteinverteilung im Vergleich zu den Negativkontrollen. Die Weiterentwicklung dieser Methode ist definitiv ein wichtiger Bestandteil der Proteinkorona Forschung.

Diese Arbeit gibt einen ersten Einblick in die Wichtigkeit der Proteinkorona in der Liposomenforschung und dient als Basis weiterer Experimente, um die Proteinkorona an TSL genauer zu charakterisieren. Dies sollte auch auf jeden Fall in naher Zukunft durch *in-vivo*-Experimente geschehen und ist die Voraussetzung für einen zielgenauen Einsatz von TSL, nicht nur in der Onkologie.

Literaturverweise

- (1) Zahl der Todesfälle Deutschland im Jahr 2016, Statistisches Bundesamt. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle-2016.html>, abgerufen am 06.06.2019.
- (2) Bozzuto, G., und Molinari, A., (Feb. 2015). Liposomes as Nanomedical Devices. *International Journal of Nanomedicine* 10, 975–999.
- (3) Allen, T. M., und Cullis, P. R., (Jan. 2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 36–48.
- (4) Cevc, G., und Richardsen, H., (Aug. 1999). Lipid Vesicles and Membrane Fusion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 38, 207–232.
- (5) Olusanya, T. O. B., Ahmad, R. R. H., Ibegbu, D. M., Smith, J. R., und Elkordy, A. A., (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules*.
- (6) Allen, T. M., und Cullis, P. R., (2012). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Review*.
- (7) Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., und Hori, K., (März 2000). Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *Journal of Controlled Release* 65, 271–284.
- (8) Hofheinz, R.-D., Gnad-Vogt, S. U., Beyer, U., und Hochhaus, A., (Aug. 2005). Liposomal Encapsulated Anti-Cancer Drugs: *Anti-Cancer Drugs* 16, 691–707.
- (9) Deutsche Gesellschaft für Hyperthermie., <https://www.dght-ev.de/Hyperthermie>, abgerufen am 19.05.2019.
- (10) Issels, R. D., et al. (Apr. 2018). Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology* 4, 483–492.
- (11) Issels, R. D., (Nov. 2008). Hyperthermia Adds to Chemotherapy. *European Journal of Cancer* 44, 2546–2554.
- (12) Urano, M., Kuroda, M., und Nishimura, Y., (1999 Mar-Apr). For the Clinical Application of Thermochemotherapy given at Mild Temperatures. *International Journal of Hyperthermia* 15, 79–107.

- (13) Kampinga, H. H., (Jan. 2006). Cell Biological Effects of Hyperthermia Alone or Combined with Radiation or Drugs: A Short Introduction to Newcomers in the Field. *International Journal of Hyperthermia* 22, 191–196.
- (14) Puric, E., Stutz, E., Lindner, I., Meister, A., Kern, T., Datta, N. R., Rogers, S. J., und Riesterer, O., (2020). Hyperthermie in der Therapie von malignen Beckentumoren. *InFo Hämatologie + Onkologie*.
- (15) Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H., und Blumenthal, R., (Dez. 1978). Design of Liposomes for Enhanced Local Release of Drugs by Hyperthermia. *Science* 202, 1290–1293.
- (16) Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., und Dewhirst, M. W., (2000). A New Temperature-sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model. *Cancer Research* 60, 1197–1201.
- (17) Landon, C. D., Park, J.-Y., Needham, D., und Dewhirst, M. W., (Jan. 2011). Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Pre-clinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *Open Nanomedicine Journal* 3, 38–64.
- (18) Mozafari, M. R., (2010). Nanoliposomes: Preparation and Analysis., eng *Methods in Molecular Biology* 605, 29–50.
- (19) Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., und Barenholz, Y., Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-Glycol Coated Liposomes., 7.
- (20) Gabizon, A. A., Barenholz, Y., und Bialer, M., (Mai 1993). Prolongation of the Circulation Time of Doxorubicin Encapsulated in Liposomes Containing a Polyethylene Glycol-Derivatized Phospholipid: Pharmacokinetic Studies in Rodents and Dogs. *Pharmaceutical Research* 10, 703–708.
- (21) Immordino, M. L., Dosio, F., und Cattell, L., Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential. *International Journal of Nanomedicine*, 19.
- (22) Verhoef, J. J. F., und Anchordoquy, T. J., (Dez. 2013). Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery. *Drug Delivery and Translational Research* 3, 499–503.
- (23) Lindner, L. H., Eichhorn, M. E., Eibl, H., Teichert, N., Schmitt-Sody, M., Issels, R. D., und Dellian, M., (März 2004). Novel Temperature-Sensitive Liposomes with Prolonged Circulation Time. *Clinical Cancer Research* 10, 2168–2178.
- (24) Schmidt, R., Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren - Charakterisierung in vitro und in vivo -, Dissertation.

- (25) Zimmermann, K., et al. (2017). A pilot trial of doxorubicin containing phosphatidylglycerol based thermosensitive liposomes in spontaneous feline soft tissue sarcoma. *International Journal of Hyperthermia* 33, PMID: 27592502, 178–190.
- (26) Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., und Linse, S., (Feb. 2007). Understanding the Nanoparticle–Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 104, 2050–2055.
- (27) Lindman, S., Lynch, I., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., und Linse, S., (2007). Systematic Investigation of the Thermodynamics of HSA Adsorption to N-Iso-Propylacrylamide/N-Tert-Butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity. *Nano Letters* 7, 7.
- (28) Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F., und Dawson, K. A., (März 2011). Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 133, 2525–2534.
- (29) Digiacomo, L., Cardarelli, F., Pozzi, D., Palchetti, S., Digman, M. A., Gratton, E., Capriotti, A. L., Mahmoudi, M., und Caracciolo, G., (2017). An Apolipoprotein-Enriched Biomolecular Corona Switches the Cellular Uptake Mechanism and Trafficking Pathway of Lipid Nanoparticles. *Nanoscale* 9, 17254–17262.
- (30) Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., und Laurent, S., (Sep. 2011). Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chemical Reviews* 111, 5610–5637.
- (31) Caracciolo, G., Pozzi, D., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Barbera, G. L., Amici, A., und Laganà, A., (Okt. 2014). The Liposome–Protein Corona in Mice and Humans and Its Implications for in Vivo Delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 2, 7419–7428.
- (32) Barrán-Berdón, A. L., Pozzi, D., Caracciolo, G., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Riccioli, A., Palchetti, S., und Laganà, A., (Mai 2013). Time Evolution of Nanoparticle–Protein Corona in Human Plasma: Relevance for Targeted Drug Delivery. *Langmuir* 29, 6485–6494.
- (33) Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., und Dawson, K. A., (Dez. 2012). Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials. *Nature Nanotechnology* 7, 779–786.
- (34) Hernández-Caselles, T., Villalaín, J., und Gómez-Fernández, J. C., (März 1993). Influence of Liposome Charge and Composition on Their Interaction with Human Blood Serum Proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 120, 119–126.

- (35) Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., und Dawson, K. A., (Sep. 2008). Nanoparticle Size and Surface Properties Determine the Protein Corona with Possible Implications for Biological Impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* 105, 14265–14270.
- (36) Hadjidemetriou, M., Al-Ahmady, Z., Mazza, M., Collins, R. F., Dawson, K., und Kostarelos, K., (Aug. 2015). In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles., en *ACS Nano* 9, 8142–8156.
- (37) Zanganeh, S., Spitler, R., Erfanzadeh, M., Alkilany, A. M., und Mahmoudi, M., (Juni 2016). Protein Corona: Opportunities and Challenges. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 75, 143–147.
- (38) Maiolo, D., Bergese, P., Mahon, E., Dawson, K. A., und Monopoli, M. P., (Dez. 2014). Surfactant Titration of Nanoparticle–Protein Corona. *Analytical Chemistry* 86, 12055–12063.
- (39) Vroman, L., und Adams, A., (Aug. 1969). Findings with the Recording Elipsometer Suggesting Rapid Exchange of Specific Plasma Proteins at Liquid/Solid Interfaces. *Surface Science* 16, 438–446.
- (40) Hirsh, S. L., McKenzie, D. R., Nosworthy, N. J., Denman, J. A., Sezerman, O. U., und Bilek, M. M., (März 2013). The Vroman Effect: Competitive Protein Exchange with Dynamic Multilayer Protein Aggregates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103, 395–404.
- (41) Hossann, M., Wiggenhorn, M., Schwerdt, A., Wachholz, K., Teichert, N., Eibl, H., Issels, R. D., und Lindner, L. H., (Okt. 2007). In Vitro Stability and Content Release Properties of Phosphatidylglyceroglycerol Containing Thermosensitive Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768, 2491–2499.
- (42) Hossann, M., Wang, T., Wiggenhorn, M., Schmidt, R., Zengerle, A., Winter, G., Eibl, H., Peller, M., Reiser, M., Issels, R. D., und Lindner, L. H., (Nov. 2010). Size of Thermosensitive Liposomes Influences Content Release. *Journal of Controlled Release* 147, 436–443.
- (43) Hossann, M., Syunyaeva, Z., Schmidt, R., Zengerle, A., Eibl, H., Issels, R. D., und Lindner, L. H., (Sep. 2012). Proteins and Cholesterol Lipid Vesicles Are Mediators of Drug Release from Thermosensitive Liposomes. *Journal of Controlled Release* 162, 400–406.
- (44) Mittag, J. J., Kneidl, B., Preiß, T., Hossann, M., Winter, G., Wuttke, S., Engelke, H., und Rädler, J. O., (Okt. 2017). Impact of Plasma Protein Binding on Cargo Release by Thermosensitive Liposomes Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 119, 215–223.

- (45) Eibl, H., und Lands, W. E. M., (Juli 1969). A New, Sensitive Determination of Phosphate. *Analytical Biochemistry* 30, 51–57.
- (46) Dittmer, J. C., und Lester, R. L., (Jan. 1964). A Simple Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *Journal of Lipid Research* 5, 126–127.
- (47) Porath, J., und Flodin, P., (Juni 1959). Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature* 183, 1657–1659.
- (48) Hosokawa, T., Sami, M., Kato, Y., und Hayakawa, E., (2003). Alteration in the Temperature-Dependent Content Release Property of Thermosensitive Liposomes in Plasma. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51, 1227–1232.
- (49) Protocol for Silver Staining, The Rockefeller University., abgerufen am 06.06.2019.
- (50) Bradford, M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding., 7.
- (51) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J., (Nov. 1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- (52) Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., und Klenk, D., (Okt. 1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.
- (53) Aebersold, R., und Mann, M., (2003). Mass Spectrometry-Based Proteomics. 422, 10.
- (54) Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., und Selbach, M., (Mai 2011). Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control. *Nature* 473, 337–342.
- (55) Schöttler, S., Becker, G., Winzen, S., Steinbach, T., Mohr, K., Landfester, K., Mailänder, V., und Wurm, F. R., (Feb. 2016). Protein Adsorption Is Required for Stealth Effect of Poly(Ethylene Glycol)- and Poly(Phosphoester)-Coated Nanocarriers. *Nature Nanotechnology* 11, 372–377.
- (56) Gabizon, A., Alberto (2001). Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. *Cancer Investigation*.
- (57) Martin, F. J., (1998). Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL (pegylated liposomal doxorubicin). *Medical Applications of Liposomes*, (Accessed on 10/01/2020).
- (58) Cho, M., und Cummings, R. D., (Okt. 1995). Galectin-1, a β -Galactoside-Binding Lectin in Chinese Hamster Ovary Cells I. Physical and Chemical Characterisation. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5198–5206.

- (59) Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., und Kiss, R., (Nov. 2006). Galectin-1: A Small Protein with Major Functions. *Glycobiology* 16, 137R–157R.
- (60) Bigdeli, A., Palchetti, S., Pozzi, D., Hormozi-Nezhad, M. R., Baldelli Bombelli, F., Caracciolo, G., und Mahmoudi, M., (März 2016). Exploring Cellular Interactions of Liposomes Using Protein Corona Fingerprints and Physicochemical Properties. *ACS Nano* 10, 3723–3737.
- (61) Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., und Stauber, R. H., (Okt. 2013). Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology. *Nature Nanotechnology* 8, 772–781.
- (62) Bertrand, N., Grenier, P., Mahmoudi, M., Lima, E. M., Appel, E. A., Dormont, F., Lim, J.-M., Karnik, R., Langer, R., und Farokhzad, O. C., (Dez. 2017). Mechanistic Understanding of in Vivo Protein Corona Formation on Polymeric Nanoparticles and Impact on Pharmacokinetics. *Nature Communications* 8.
- (63) Lucarini, A. C., und Kilikian, B. V., (Feb. 1999). Comparative Study of Lowry and Bradford Methods: Interfering Substances. *Biotechnology Techniques* 13, 149–154.
- (64) Parish, C. R., (Dez. 1999). Fluorescent Dyes for Lymphocyte Migration and Proliferation Studies., en *Immunology and Cell Biology* 77, 499–508.
- (65) Vitha, M. F., Carr, P. W., Mabbott, G. A., und Paul, S., The Appropriate Use of Blanks, Standards, and Controls in Chemical Measurements. *Journal of Chemical Education* 2005, 14.
- (66) Pozzi, D., Colapicchioni, V., Caracciolo, G., Piovesana, S., Capriotti, A. L., Palchetti, S., Grossi, S. D., Riccioli, A., Amenitsch, H., und Laganà, A., (Feb. 2014). Effect of Polyethyleneglycol (PEG) Chain Length on the Bio–Nano-Interactions between PEGylated Lipid Nanoparticles and Biological Fluids: From Nanostructure to Uptake in Cancer Cells. *Nanoscale* 6, 2782–2792.
- (67) Schirrmann, T., Menzel, C., Hust, M., Prilop, J., Jostock, T., und Dübel, S., (2010). Oligomeric Forms of Single Chain Immunoglobulin (scIgG). *MAbs* 2, 73–76.
- (68) Sikkink, L. A., und Ramirez-Alvarado, M., (März 2008). Biochemical and Aggregation Analysis of Bence Jones Proteins from Different Light Chain Diseases. *Amyloid* 15, 29–39.
- (69) Bliznyukov, O. P., Kozmin, L. D., Vysotskaya, L. L., Golenkov, A. K., Tishchenko, V. M., Samoylovich, M. P., und Klimovich, V. B., (Apr. 2005). Human Immunoglobulin Light Chains Lambda Form Amyloid Fibrils and Granular Aggregates in Solution. *Biochemistry Moscow* 70, 458–466.

- (70) Nweke, M. C., McCartney, R. G., und Bracewell, D. G., (Dez. 2017). Mechanical Characterisation of Agarose-Based Chromatography Resins for Biopharmaceutical Manufacture. *Journal of Chromatography A* 1530, 129–137.
- (71) Fox, K., Castanha, E., Fox, A., Feigley, C., und Salzberg, D., (2008). Human K10 epithelial keratin is the most abundant protein in airborne dust of both occupied and unoccupied school rooms. *J. Environ. Monit.* 10, 55–59.
- (72) Mirshafiee, V., Kim, R., Mahmoudi, M., und Kraft, M. L., (Juni 2016). The Importance of Selecting a Proper Biological Milieu for Protein Corona Analysis in Vitro: Human Plasma versus Human Serum. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 75, 188–195.
- (73) Lundqvist, M., Augustsson, C., Lilja, M., Lundkvist, K., Dahlbäck, B., Linse, S., und Cedervall, T., (Apr. 2017). The Nanoparticle Protein Corona Formed in Human Blood or Human Blood Fractions. *PLoS One* 12.
- (74) Rezende, S. M., Simmonds, R. E., und Lane, D. A., (Feb. 2004). Coagulation, Inflammation, and Apoptosis: Different Roles for Protein S and the Protein S–C4b Binding Protein Complex. *Blood* 103, 1192–1201.
- (75) Dobrovolskaia, M. A., Neun, B. W., Man, S., Ye, X., Hansen, M., Patri, A. K., Crist, R. M., und McNeil, S. E., (2014). Protein corona composition does not accurately predict hematocompatibility of colloidal gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 10, 1453–1463.
- (76) Eibl, H., Lindner, L., und Hossann, M., Thermosome GmbH. *thermosome.com*, abgerufen am 15.01.2020.
- (77) Feingold, K. R., und Grunfeld, C., (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. *Endotext*.
- (78) Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., und McNeil, S. E., (Juni 2009). Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins as It Relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy. *Advanced Drug Delivery Review* 61, 428–437.
- (79) Zensi, A., Begley, D., Pontikis, C., Legros, C., Mihoreanu, L., Wagner, S., Büchel, C., von Briesen, H., und Kreuter, J., (Juli 2009). Albumin Nanoparticles Targeted with Apo E Enter the CNS by Transcytosis and Are Delivered to Neurones. *Journal of Controlled Release* 137, 78–86.
- (80) Webb, M. S., Saxon, D., Wong, F. M., Lim, H. J., Wang, Z., Bally, M. B., Choi, L. S., Cullis, P. R., und Mayer, L. D., (1998). Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly(ethylene glycol): effects on the pharmacokinetics of liposomal vincristine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1372, 272–282.
- (81) Asuri, P., Bale, S. S., Karajanagi, S. S., und Kane, R. S., (Dez. 2006). The Protein–Nanomaterial Interface. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 562–568.

- (82) Lima, T., Bernfur, K., Vilanova, M., und Cedervall, T., (Jan. 2020). Understanding the Lipid and Protein Corona Formation on Different Sized Polymeric Nanoparticles. *Scientific Reports*.
- (83) Piella, J., Bastús, N. G., und Puentes, V., (2017). Size-Dependent Protein–Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona. *Bioconjugate Chemistry* 28, PMID: 27997136, 88–97.
- (84) UniProt., <https://www.uniprot.org/>.
- (85) Choi, U. Y., Kang, J.-S., Hwang, Y. S., und Kim, Y.-J., (März 2015). Oligoadenylylate Synthase-like (OASL) Proteins: Dual Functions and Associations with Diseases. *Experimental and Molecular Medicine* 47, e144.
- (86) Khersonsky, O., und Tawfik, D. S., (Apr. 2005). Structure-Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest That Its Native Activity Is Lactonase. *Biochemistry* 44, 6371–6382.
- (87) Su, J., Wang, Y., Si, Y., Gao, J., Song, C., Cui, L., Wu, R., Tai, G., und Zhou, Y., (Jan. 2018). Galectin-13, a different prototype galectin, does not bind -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138. *Nature News*.
- (88) (Jan. 1990). In Search of the ‘Missing Self’: MHC Molecules and NK Cell Recognition. *Immunology Today* 11, 237–244.
- (89) Mestas, J., und Hughes, C. C. W., (März 2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 172, 2731–2738.
- (90) Zanetti, M., (Jan. 2004). Cathelicidins, Multifunctional Peptides of the Innate Immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 39–48.
- (91) Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., Merluzzi, L., und Gennaro, R., (Mai 1997). Identification of CRAMP, a Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Expressed in the Embryonic and Adult Mouse. *Journal of Biological Chemistry* 272, 13088–13093.
- (92) Sevcsik, E., Pabst, G., Jilek, A., und Lohner, K., (Okt. 2007). How Lipids Influence the Mode of Action of Membrane-Active Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768, 2586–2595.
- (93) Coorens, M., Scheenstra, M. R., Veldhuizen, E. J. A., und Haagsman, H. P., (Jan. 2017). Interspecies Cathelicidin Comparison Reveals Divergence in Antimicrobial Activity, TLR Modulation, Chemokine Induction and Regulation of Phagocytosis. *Scientific Reports* 7, 40874.
- (94) Gillett, M. P., Costa, E. M., und Owen, J. S., (Feb. 1980). Evidence for Active Phospholipase a in Mouse Plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 617, 237–244.

- (95) Gillett, M. P. T., und Vieira, E. M., (Juni 1987). The Phospholipase A₁ Activity in Mouse Preheparin Plasma Indicates High Levels of Unbound Hepatic Lipase in This Species. *Biochemical Society Transactions* 15, 488–489.
- (96) Gillett, M. P., Vieira, E. M., und Dimenstein, R., (März 1993). The Phospholipase Activities Present in Preheparin Mouse Plasma Are Inhibited by Antiserum to Hepatic Lipase. *International Journal of Biochemistry* 25, 449–453.
- (97) Owen, J., Ramalho, V., Costa, J., und Gillett, M., (Jan. 1979). Determination of Lecithin:Cholesterol Acyltransfer in Mouse Plasma and the Influence of Mercaptoethanol and Sulphydryl Blocking Agents on Its Activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 63, 261–265.
- (98) Peterson, J., Bengtsson-Olivecrona, G., und Olivecrona, T., (Aug. 1986). Mouse Preheparin Plasma Contains High Levels of Hepatic Lipase with Low Affinity for Heparin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 878, 65–70.
- (99) Mohamed Shakir, K. M., (Juni 1981). Phospholipase A₂ Activity of Post-Heparin Plasma: A Rapid and Sensitive Assay and Partial Characterization. *Analytical Biochemistry* 114, 64–70.
- (100) Dicciani, M. B., Mistry, M. J., Hug, K., und Harmony, J. A., (Okt. 1990). Inhibition of Phospholipase A₂ by Heparin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1046, 242–248.
- (101) Shirai, K., Matsuoka, N., und Jackson, R. L., Interaction of Lipoproteinlipase with Phospholipid Vesicles, Role of Apolipoprotein C-H and Heparin., 7.
- (102) Schoonderwoerd, K., Hülsmann, W. C., und Jansen, H., (Aug. 1981). Stabilization of Liver Lipase in Vitro by Heparin or by Binding to Non-Parenchymal Liver Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 665, 317–321.
- (103) Sakulkhu, U., Maurizi, L., Mahmoudi, M., Motazacker, M., Vries, M., Gramoun, A., Ollivier Beuzelin, M.-G., Vallée, J.-P., Rezaee, F., und Hofmann, H., (2014). Ex Situ Evaluation of the Composition of Protein Corona of Intravenously Injected Superparamagnetic Nanoparticles in Rats. *Nanoscale* 6, 11439–11450.
- (104) Akula, S., Mohammadamin, S., und Hellman, L., (Mai 2014). Fc Receptors for Immunoglobulins and Their Appearance during Vertebrate Evolution. *PLoS One* 9.
- (105) Simon, J., Müller, L. K., Kokkinopoulou, M., Lieberwirth, I., Morsbach, S., Landfester, K., und Mailänder, V., (2018). Exploiting the Biomolecular Corona: Pre-Coating of Nanoparticles Enables Controlled Cellular Interactions. *Nanoscale* 10, 10731–10739.

-
- (106) Göppert, T. M., und Müller, R. H., (Apr. 2005). Polysorbate-Stabilized Solid Lipid Nanoparticles as Colloidal Carriers for Intravenous Targeting of Drugs to the Brain: Comparison of Plasma Protein Adsorption Patterns. *Journal of Drug Targeting* 13, 179–187.

Danksagung

Zuallererst würde ich gerne meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Lars Lindner danken, der mich in die Arbeitsgruppe aufnahm, mir die Gelegenheit gegeben hat, eine experimentelle Arbeit im faszinierenden Feld der Liposomen durchzuführen, und jederzeit bei Fragen und Problemen zur Seite stand.

Außerdem würde ich gerne Dr. Barbara Wedmann, meiner Mitbetreuerin danken, die nicht nur die beste Betreuerin war, die man sich vorstellen konnte, sondern mit der Zeit auch zu einer guten Freundin wurde.

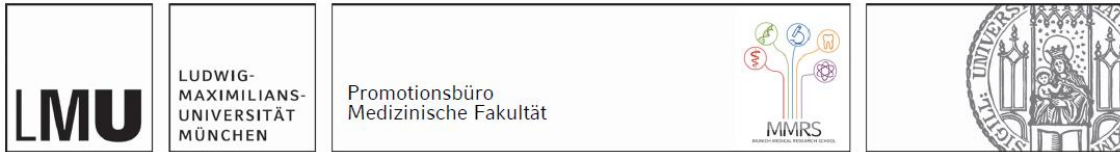
Ich würde auch gerne Dr. Martin Hossann danken für seinen immer freundlichen und großzügigen Input in die Arbeit, auch in den sehr stressigen Zeiten, die nicht besonders selten vorkamen.

Ich danke herzlich Dr. Wouter Lokerse für die Mitarbeit an der Methodenentwicklung.

Danken möchte ich außerdem dem ganzen liposomalen Team, insbesondere Angela Knauerhase für die nötige Bemutterung, Verpflegung und seelische und technische Unterstützung, Simone Limmer ebenfalls für die seelische Unterstützung und die angenehme Laboratmosphäre und Lisa Pointner für die tatkräftige Mitarbeit und die Laboreinlernung.

Zu guter Letzt möchte ich meiner besten Freundin Theresa danken für den sehr oft nötigen energischen Zuspruch, meinen Eltern, die mich immer in allem unterstützt haben, sowie meiner Schwester Lucia, deren stetes Vorbild und Inspiration mich meine selbstgesetzten Grenzen überwinden ließen.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Schwarz, Patricia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Analyse der Proteinkorona von thermosensitiven DPPG₂ - Liposomen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Tübingen, 26.09.2022

Ort, Datum

Patricia Schwarz

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand