

Bindung von Nanopartikeln (NP) an Proteine aus dem Blutserum

Stefanie Fertsch

Aus dem Institut für Inhalationsbiologie des
Helmholtz Zentrums München, Neuherberg
(Leiter Prof. Dr. H. Schulz)

angefertigt unter der Leitung von Dr. W. G. Kreyling

vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie am Institut für Tierpathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. habil. W. Schmahl)

Bindung von Nanopartikeln (NP) an Proteine aus dem Blutserum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Stefanie Fertsch
aus
Dachau

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Gabius

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meinen Eltern und meiner Oma

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur/Background	2
2.1. Ultrafeine Partikel und Nanopartikel	5
2.1.1. Begriffserklärung UFP/NP	5
2.1.2. Entstehung von UFP/NP	5
2.1.3. Vorkommen von UFP/NP und mögliche Expositionen des menschlichen und tierischen Organismus	6
2.2. Proteine	7
2.2.1. Bindungsrelevante Eigenschaften von Proteinen	7
2.2.2. Proteine in der Lungenflüssigkeit und im Serum	7
2.2.3. Verwendete Proteine	8
2.2.3.1. Albumin	8
2.2.3.1.1. Struktur und biochemische Eigenschaften	8
2.2.3.1.2. Konzentration in der ELF und im Serum	9
2.2.3.2. Transferrin	10
2.2.3.2.1. Struktur und biochemische Eigenschaften	10
2.2.3.2.2. Konzentration in der ELF und im Serum	11
2.2.3.3. Apolipoprotein A-1	11
2.2.3.3.1. Struktur und biochemische Eigenschaften	11
2.2.3.3.2. Konzentration in der ELF und im Serum	12
2.3. Protein-NP-Komplexe	12
2.3.1. Arten von Protein-NP-Komplexen	12
2.3.2. Mess-Methoden	15
2.3.3. Effekte von Protein-NP-Komplexen	16
3. Material und Methoden	18
3.1. Geräte und Materialien	18
3.1.1. Geräte	18
3.1.2. Software	19
3.1.3. Verbrauchsmaterial	19
3.1.4. Proteine	20
3.1.4.1. Albumin	20
3.1.4.2. Transferrin	20

3.1.4.3. Apolipoprotein A-1	20
3.1.5. NP	20
3.1.5.1. Polystyrol-NP mit verschiedenen Oberflächen-Liganden Ø 50 nm	20
3.1.5.2. SiO ₂ -NP Ø 7 nm	21
3.1.5.3. TiO ₂ -NP P25 Ø 20 nm	21
3.1.5.4. TiO ₂ -NP Ø 4.5 nm	22
3.1.5.5. Kohlenstoffschwarz-NP Ø 14 nm und Ø 50 nm	22
3.1.6. Chemikalien	23
3.1.7. Gebrauchs-Lösungen	24
3.1.7.1. Lysis-Kit	24
3.1.7.2. Lösungen für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	24
3.1.7.3. Silberfärbung	25
3.1.7.4. gepufferte Kochsalzlösungen	26
3.2. Methoden	27
3.2.1. Herstellung von Protein-NP-Komplexen und Nachweis der an die NP gebundenen Proteinmenge	27
3.2.1.1. Herstellung der NP-Suspensionen	27
3.2.1.2. Herstellung von Proteinlösungen	27
3.2.1.3. Bildung von Protein-NP-Komplexen	28
3.2.1.4. Streulichtmessungen von NP in verschiedenen Medien	28
3.2.1.5. Zentrifugation und Ultrazentrifugation	28
3.2.1.6. Darstellung der an NP gebundenen Proteine auf einem SDS-PA-Gel	31
3.2.1.6.1. Optimierung des Protokolls	31
3.2.1.6.1.1. Waschen des Pellets	31
3.2.1.6.1.2. Überführen des Pellets in ein neues Gefäß	31
3.2.1.6.1.3. Wahl geeigneter Proteinkonzentrationen	32

3.2.1.6.2. Herstellung der SDS-PA-Gele und Elektrophorese	32
3.2.1.6.3. Silber-Färbung von SDS-PA-Gelen	33
3.2.1.6.4. Densitometrische Auswertung der Proteinbanden	34
3.2.1.7. Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels Bio-Rad Protein-Assay (Depletions-Methode)	34
3.2.1.7.1. Vorgehensweise	34
3.2.1.7.2. Korrektur der Messwerte	35
3.2.1.7.3. Berechnung der Depletion	35
3.2.1.7.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Protein-NP-Bindung	35
3.2.1.7.5. Vergleichende Bewertung der erhaltenen Daten: Bindungsindex	36
3.2.2. Statistische Methoden	36
3.2.3. Berechnung der Belegung der NP-Oberfläche mit Proteinen	36
4. Ergebnisse	38
4.1. Evaluierung und Optimierung bestehender Protokolle mit Hilfe von Modell-NP	38
4.1.1. Abtrennen der NP-Protein-Komplexe von den gelösten Proteinen durch Zentrifugation basierend auf bereits bestehenden Methoden	38
4.1.1.1. Ermittlung der erforderlichen NP-Zentrifugierzeiten	38
4.1.1.2. Abzentrifugierbarkeit der verwendeten NP	39
4.1.2. Korrektur der Messwerte aus dem Bio-Rad Protein-Assay	40
4.1.3. Aufbereitung der an NP gebundenen Proteine für die Darstellung auf einem SDS-PA-Gel	41
4.1.3.1. Überführen des Pellets in ein neues Gefäß	41
4.1.3.2. Waschen des Pellets	42
4.1.3.3. Wahl geeigneter Proteinkonzentrationen	42
4.1.3.4. Alternative Präparation der an NP gebundenen Proteine	43
4.2. Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels Bio-Rad Protein-Assay: Etablierung und Validierung mit Hilfe von Modell-NP	44
4.3. Bindung von Proteinen an verschiedene Modell-NP	45
4.3.1. Dynamische Streulichtmessung und Messung des pH-Wertes von NP-Suspensionen	45
4.3.2. Einfluss der Oberflächenmodifikation von NP	48
4.3.3. Einfluss der pH-Wertes	49

4.3.4. Einfluss der NP-Konzentration und vergleichende Betrachtung der Bindungskapazität der NP: Bindungsindex	50
4.3.4.1. Bindungsindex von BSA	50
4.3.4.2. Bindungsindex von humanem Transferrin	52
4.3.4.3. Bindungsindex von Apolipoprotein A-1	53
4.4. Bindung weiterer NP und Speziesvergleich	55
4.4.1. Weitere NP: Printex G, Printex 90, TiO ₂ 4.5 nm TiO ₂ P 25 und SiO ₂ .	55
4.4.2. Bindungsaktivität von Albumin verschiedener Spezies an TiO ₂ P25	57
5. Diskussion	58
5.1. Evaluierung und Optimierung bestehender Protokolle mit Hilfe von Modell-NP	58
5.2. Indirekte Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels Bio-Rad Protein-Assay: Etablierung und Validierung mit Hilfe von Modell-NP	59
5.3. Protein-NP-Bindung	60
5.3.1. Modell-NP	60
5.3.1.1. Bindung bei pH 7.4	60
5.3.1.2. Bindung in Abhängigkeit vom pH-Wert	62
5.3.2. Weitere NP	63
5.4. Bindung von BSA aus verschiedenen Spezies an TiO ₂ P25-NP	64
5.5. Ausblick	65
6. Zusammenfassung	66
7. Summary	67
8. Abkürzungsverzeichnis	68
9. Anhang	70
10. Literaturverzeichnis	76
Danksagung	

1. Einleitung

Ultrafeine Partikel (UFP) und Nanopartikel (NP) sind ins Zentrum des öffentlichen Interesses gerückt, unter anderem durch In-Kraft-Treten der verschärften Grenzwerte für Aerosolpartikel mit einer Größe unter 10 µm (PM₁₀) gemäß der Feinstaub-Richtlinie 99/30/EG (Rat der Europäischen Union 1999) am 01.01.2005.

In der Öffentlichkeit regt sich große Besorgnis über mögliche negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, zumal eingeatmete UFP/NP bis in die Alveolen der Lunge eindringen können (Kreyling et al. 2005) und bereits bekannt ist, dass UFP/NP negative gesundheitliche Effekte bei Menschen und Tieren auslösen können (Alessandrini et al. 2006; Calderon-Garciduenas et al. 2001; Nel et al. 2006; Nemmar et al. 2002; Schulz et al. 2005; Stoeger et al. 2006).

Ebenso ist bereits bekannt, dass bei Mensch und Ratte ein geringer Teil von in die Lunge verbrachten NP die Luft-Blut-Schranke der Lunge überwinden kann und so die NP über die Blutzirkulation in sekundäre Zielorgane (Leber, Milz, Nieren, Gehirn etc.) gelangen und akkumulieren können (Kreyling et al. 2002; Nemmar et al. 2002).

Da eingeatmete UFP/NP in der Lunge zu allererst mit dem proteinhaltigen Lungen-Surfactant und der Lungenflüssigkeit in Kontakt kommen (Peters et al. 2006), ist es möglich, dass die darin enthaltenen Proteine zusammen mit den inhalierten UFP/NP Komplexe bilden (Borm et al. 2006; Geiser et al. 2005). Diese Komplexe können möglicherweise bei der Translokation der UFP/NP über die Luft-Blut-Schranke der Lunge hinweg in die systemische Blutzirkulation gelangen und bei einer Akkumulation in sekundären Zielorganen eine entscheidende Rolle spielen (Donaldson et al. 2004; Kreyling et al. 2006; Yang et al. 2005).

Wenn Proteine sich an Fremdkörperoberflächen anlagern, kann sich möglicherweise ihre Konformation und Funktionalität verändern (Donaldson et al. 2004; Kreyling et al. 2005; Lynch et al. 2006). Neben einer Konformationsänderung der Proteine bis hin zu deren völligen Denaturierung ist auch eine Aggregation der Proteine möglich (Lynch et al. 2006). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Darstellung der Bindung von ausgewählten Proteinen an bestimmte NP und die Ermittlung der Bindungskapazität.

2. Literatur/Background

Die gesundheitlichen Effekte von Ultrafeinen Partikeln (UFP) sind nicht mehr von der Hand zu weisen, zumal ein Zusammenhang zwischen UFP-Exposition durch Umweltverschmutzung und kardiovaskulären Effekten sowie Asthma beim Menschen epidemiologisch belegt ist (Pekkanen et al. 2002; Penttinen et al. 2001; Peters et al. 1997; von Klot et al. 2002; Wichmann and Peters 2000).

Weshalb UFP nach pulmonaler Exposition stärkere gesundheitliche Effekte ausüben sollten als größere Partikel ist noch nicht vollständig geklärt, es gibt jedoch eine Reihe von Hypothesen dafür, welche Partikeleigenschaften und Mechanismen ausschlaggebend sein könnten (Kreyling et al. 2004):

- Die hohe spezifische Oberfläche katalysiert Reaktionen und adsorbiert toxische Stoffe.
- UFP dringen beim Atmen bis in die Alveolen ein und werden dort abgeschieden.
- UFP werden nur teilweise von Alveolarmakrophagen phagozytiert.
- UFP können in das Interstitium eindringen.
- UFP gelangen in die Blutzirkulation.
- UFP induzieren mehr oxidativen Stress und proinflammatorische Reaktionen als feine Partikel. Feine Partikel haben einen aerodynamischen Durchmesser $< 2.5 \mu\text{m}$, und werden daher kurz als $\text{PM}_{2.5}$ bezeichnet (Kreyling et al. 2004).
- UFP beeinträchtigen die Herz-Kreislauffunktion und die Blutgerinnung.
- UFP haben immunologische Auswirkungen.
- UFP formen u.U. Komplexe mit Proteinen und anderen Biomolekülen und verändern diese.

Bisher weisen die Forschungsergebnisse auf im Wesentlichen dreierlei Mechanismen hin, über die inhalierte UFP ihre schädliche Wirkung im Organismus entfalten können:

Erstens können pulmonale oder systemische Entzündungsreaktionen zu epithelialer Dysfunktion, einem prokoagulatorischem Zustand und/oder der Förderung von Atherosklerose führen.

Zweitens kann über Rezeptoren in der Lunge und über lokale und systemische Entzündungsstimuli die Funktion des autonomen Nervensystems beeinträchtigt werden.

Drittens ist eine beeinträchtigte Herzfunktion durch ischämische Reaktionen oder veränderte Ionenkanalfunktionen im Myokard möglich (Schulz et al. 2005).

Speziell zu den pulmonalen Effekten und zur Thrombose sind bereits viele Untersuchungen gemacht worden:

Polystyrol-NP (60 nm) ohne Oberflächenmodifikation und solche mit Karboxylierung riefen nach Instillation in die Lunge von Hamstern weder pulmonale noch prothrombotische Effekte hervor, während positiv geladene NP ab einer Schwellendosis die Thromboseneigung im peripheren Gefäßbett förderten und dosisunabhängig zur Erhöhung von verschiedenen Entzündungsparametern in der Lunge führten. Bei sehr hoher Dosis stieg auch der Proteingehalt in der Lungenflüssigkeit an. Positiv geladene feine Partikel (400 nm) hatten keine prothrombotische Wirkung, erhöhten allerdings den Gehalt an Entzündungsparametern und Proteinen in der Lunge. Bei in-vitro-Zugabe der feinen Partikel zu Blut wirkten jedoch auch diese prothrombotisch (Nemmar et al. 2003).

Für ultrafeine Diesel-Partikel und Silikat-Partikel (2 µm) konnte ebenfalls eine prothrombotische Wirkung im Hamster-Modell nachgewiesen werden (Nemmar et al. 2003; Nemmar et al. 2005).

Neben kardiovaskulären und pulmonalen Effekten sind für NP aber auch bereits immunologische Effekte im Mausmodell bekannt und für Partikel allgemein auch beim Menschen (Alessandrini et al. 2006; Heinrich and Wichmann 2004). Zusätzlich zu Effekten durch die Partikelexposition an sich sind Partikel auch in der Lage, die potentiellen Allergene (Pollen) selbst zu verändern (Behrendt et al. 1997).

Auch eine mutagene Wirkung des Feinstaubes wurde bereits für Mäuse und Ratten nachgewiesen (Borm et al. 2006; Samet et al. 2004), daneben gibt es Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Partikel-Exposition und neurodegenerativen Erkrankungen (Calderon-Garciduenas et al. 2002).

NP aus elementarem Kohlenstoff und TiO₂ induzieren Lipidmediatoren in in-vitro kultivierten primären Alveolarmakrophagen (Beck-Speier et al. 2001).

Konkrete gesundheitliche Folgen für die Lunge nach der Inhalation von NP können Lungenentzündung, Bronchitis, COPD, Emphysem und Fibrose sein (Kreyling et al. 2005), außerdem konnte für verschiedene Proteine der „epithelial lining fluid“ (ELF) ein Zusammenhang mit Feinstaub-Exposition bei Menschen und Tieren nachgewiesen werden. So finden sich bei Silikat-induzierten Entzündungen erhöhte Surfactant-Protein A-Konzentrationen beim Menschen und bei Tieren. Für Surfactant-Protein B konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration beim Schaf nach Zigarettenrauchexposition abnimmt und bei der Silikose der Ratte zunimmt. Die Konzentration von Surfactant Protein C nimmt bei Rauchern ab, im Falle einer Silikose wurden jedoch auch hier (zumindest bei Tieren) erhöhte Werte gemessen. Bei Rauchern sind verschiedene Proteine wie etwa die Vorform des Apolipoprotein A-1 herab reguliert (Hermans and Bernard 1999; Lindahl et al. 1998; Richard et al. 1997).

Von der Lungenperipherie (Alveolen) aus können die NP in die Blutbahn und weiter in andere Organe gelangen und akkumulieren, wobei bei dieser Translokation unter Umständen Proteine eine maßgebliche Rolle spielen (Kreyling et al. 2006; Yang et al. 2005), die genauen Mechanismen aber nicht bekannt sind.

Zum einem ist die Aufnahme von NP in Zellen durch Rezeptor-medierte Endozytose bekannt (Lynch et al. 2006), was einen möglichen Translokations-Mechanismus und eine Erklärung für die Aufnahme von NP in sekundäre Zielorgane wie das Gehirn (Kreuter 2002) darstellt. Bei der Internalisierung von Partikeln ≤ 200 nm sind vermutlich sogenannte clathrin-coated pits ausschlaggebend, während Partikel mit 500 nm vorwiegend über Caveolae (flaschenartige Einstülpungen der Plasmamembran) aufgenommen werden (Rejman et al. 2004). Im Gegensatz zu feinen Partikeln scheinen für UFP aber auch weitgehend unspezifische Eintrittsmöglichkeiten in Zellen zu existieren: zu nennen sind elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und sterische Interaktionen, die unter dem Term „adhesive interactions“ subsummiert werden (Geiser et al. 2005). Ein Transport von NP ins Gehirn ist auch über axonalen Transport möglich (s et al. 2004). Hydrophobe Partikel < 500 nm können bei Makrophagen labyrinthartige Systeme von Plasmamembran-Kompartimenten induzieren und somit durch „Patozytose“ in sogenannten „macrophage surface-connected compartments“ eindringen (Kruth et al. 1999). Für ins Zytosol injizierte und mit Proteinen verbundene Gold-NP konnte bereits eine Passage über Zellkern-Poren in den Zellkern nachgewiesen werden (Panté and Kann 2002) und bei Kopplung mit bestimmten Peptiden können Gold-NP auch aus dem Nährmedium via Endozytose in die Zellen gelangen und von dort in den Zellkern (Tkachenko et al. 2003).

Bezüglich der Translokation von NP wurden sehr verschiedene Werte ermittelt (Kreyling et al. 2005; Kreyling et al. 2004): so fanden Oberdörster et al. im Rattenmodell bei 26 nm großen Kohlenstoff-NP eine Translokation von mehr als 50 % in die Leber (Oberdörster et al. 2002). Kreyling et al. dagegen konnten unter Verwendung von 15 und 80 nm großen Iridium-NP partikelgrößenabhängig lediglich eine Translokation von jeweils weniger als 1 % nachweisen, dafür fanden sich die NP nicht nur in der Leber, sondern auch in Milz, Nieren, Gehirn und Herz (Kreyling et al. 2002).

TiO₂-UFP wurden nach Inhalation zu ca. 10 % in den Lungen-Kapillaren gefunden (Geiser et al. 2005).

Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse finden sich bei Studien mit humanen Probanden (Brown et al. 2002; Kreyling et al. 2002; Nemmar et al. 2002; Wiebert et al. 2006a; Wiebert et al. 2006b).

Somit mag zwar das Ausmaß der Translokation von der Art der UFP/NP abhängen, es darf aber davon ausgegangen werden, dass eine Translokation von UFP/NP über die Blut-Luft-Schranke stattfindet.

2.1. UFP und NP

2.1.1. Begriffserklärung UFP/NP

Allgemein werden nach einem Definitionsvorschlag der Europäischen Union (BSI-PAS71, 2005) Partikel, die kleiner als 100 nm sind, als ultrafeine Partikel (UFP) oder NP (NP) bezeichnet, wobei NP bereits dieser Definition unterliegen, wenn sie lediglich in einer Dimension unter dieser Größengrenze liegen (Kreyling et al. 2005).

Nach engerer Definition entstehen UFP unbeabsichtigt, insbesondere bei Verbrennungsprozessen, wohingegen NP gezielt hergestellt werden und daher eine bekannte gleich bleibende Zusammensetzung haben (Kreyling et al. 2005).

UFP und NP zeigen aufgrund ihrer geringen Größe andere chemische und physikalische Eigenschaften als größere Teilchen aus demselben Material, was auf quantenphysikalischen Prinzipien beruht (Kreyling et al. 2005).

2.1.2. Entstehung von UFP/NP

In der Umwelt vorkommende UFP entstehen hauptsächlich durch Verbrennungsprozesse und sekundäre Reaktionen in der Gasphase oder direkt durch Gasphasenreaktionen und weisen daher relativ komplexe Strukturen auf (Kreyling et al. 2005). Sie bestehen meist aus einem Kohlenstoff-Kern, auf den andere Komponenten organischer oder auch anorganischer Natur aufkondensiert sind. Durch den Einsatz moderner Motoren und Verbrennungstechnologien ist die Gesamtmasse der von Kraftfahrzeugen emittierten Partikel im Laufe der Zeit geringer geworden, insbesondere werden weniger Partikel ≥ 200 nm ausgestoßen, während der Anteil und die Anzahl der UFP unverändert hoch blieb, sodass der Anteil ultrafeiner Partikel in unserer Atemluft zugenommen hat (Kreyling et al. 2004).

UFP können aber neben anthropogenen Verbrennungsprozessen (Verkehr und Industrie) auch durch Brände, Vulkanausbrüche und photochemische Prozesse in der Atmosphäre entstehen (Borm et al. 2006).

NP können durch verschiedene physikalische (z.B. Funkengenerator, Lithografie, Einsprühen von Kohlenwasserstoffen in Flammen) und chemische (z.B. Sol-Gel-Methode) Methoden hergestellt werden (Kreyling et al. 2002; Roth et al. 2004; Wikipedia). Es gibt auch eine Vielzahl noch ganz neuer Methoden, z.B. die Herstellung

von Gold-NP durch Alfalfa-Pflanzen, die das dazu benötigte Gold aus dem Boden extrahieren können (Gardea-Torresdey et al. 2002).

2.1.3. Vorkommen von UFP/NP und mögliche Expositionen des menschlichen und tierischen Organismus

Während UFP vorwiegend als Umwelt-Aerosole vorkommen, finden NP gezielte Anwendung in Industrie, Forschung, Medizin und im alltäglichen Gebrauch (Kreyling et al. 2005). Sie sind in Lebensmitteln (TiO_2 -NP), kosmetischen Produkten (TiO_2 -NP), Lebensmittelverpackungen, Textilien, Küchengeräten, Lacken und Farben (Kohlenstoffschwarz-NP) und auch als Lebensmittelzusatzstoffe oder Nahrungsergänzungsmittel (SiO_2 -NP) zu finden (Bundesinstitut für Risikobewertung 2006; Degussa; U.S. Environmental Protection Agency Washington 2007).

TiO_2 -NP werden z.B. als Antihafbeschichtung für Fenster oder Brillengläser verwendet, so dass der Schmutz bei Benetzung mit Wasser einfach abperlt („Lotuseffekt“) (Beckers et al. 2005). Poly(butyl-cyanoacrylat)-NP dagegen sind vor allem als Vehikel für Arzneistoffe von pharmazeutischem Interesse (Kreuter 2002).

Als mögliche für Mensch und Tier relevante Expositionswege kommen Inhalation, Ingestion, dermale und okuläre Exposition in Betracht (U.S. Environmental Protection Agency Washington 2007). Die Aufnahme von NP in lebende Zellen des Organismus nach dermalen Exposition wird nach derzeitigem Wissensstand für gesunde intakte Haut ausgeschlossen (Borm et al. 2006), ob von der NP-Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt Risiken ausgehen können, ist noch nicht bekannt.

Bislang wird der Inhalation die größte Bedeutung bei der Exposition mit UFP/NP zugemessen (Bundesinstitut für Risikobewertung 2006), zumal der menschliche Atemtrakt eine bemerkenswert große Oberfläche von etwa 140 m^2 aufweist (Gehr et al. 1978). Wenn sie eingeatmet werden, dringen UFP/NP im Vergleich zu größeren Partikeln in größeren Mengen bis in die Lungenperipherie ein. Lediglich sehr kleine NP (kleiner 20 nm) gelangen aufgrund ihres Diffusionsverhalten zum größten Teil nicht bis in die Alveolen (Kreyling et al. 2005).

Die unten stehende Grafik (Abb. 1) stellt die Depositions-Verteilung eingeatmeter Partikel im menschlichen Atemtrakt dar (International Commission on Radiological Protection 1994).

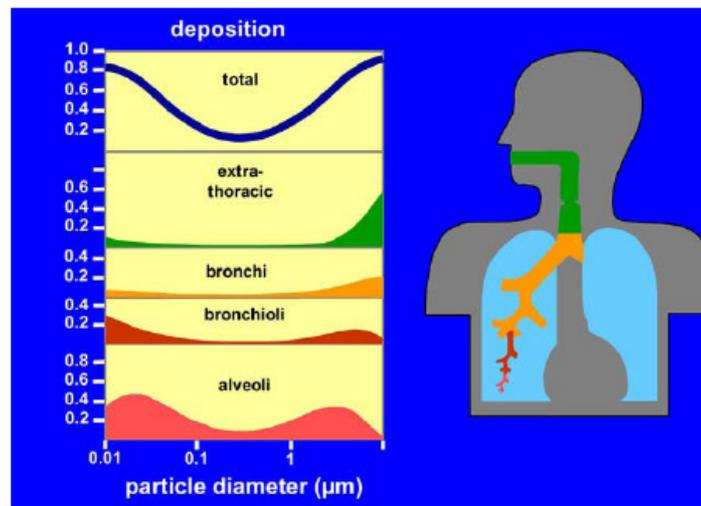


Abb. 1 : Depositions-Verteilung eingeatmeter Partikel im menschlichen Atemtrakt (International Commission on Radiological Protection 1994)

2.2. Proteine

2.2.1. Bindungsrelevante Eigenschaften von Proteinen

Die Ausbildung der Tertiärstruktur eines Proteins ist abhängig von der Aminosäurezusammensetzung und wird maßgeblich durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt, im Zuge derer sich hydrophobe Areale des Proteins in dessen Inneren anlagern und Wasser ausgeschlossen wird. Daneben spielen aber auch elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen, intramolekulare Wasserstoffbrücken und Disulfidbrücken eine Rolle.

Die räumliche Struktur (Konformation) ist nicht starr, sondern abhängig von äußeren Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert und den chemischen Eigenschaften des Lösungsmittels an sich.

Aus den reagiblen Gruppen in den Seitenketten eines Proteins resultiert auch sein elektrostatisches Potential und die biologischen Aktivitäten, wobei sich abhängig von der charakteristischen Aminosäurezusammensetzung für jedes Protein ein Isoelektrischer Punkt (pH-Wert) ergibt, bei dem die Nettoladung gleich Null ist (Löffler and Petrides 2003).

2.2.2. Proteine in der Lungenflüssigkeit und im Serum

Für die vorliegende Arbeit wurden im Hinblick auf die NP-Translokation über die Luft-Blut-Schranke der Lunge Proteine ausgewählt, die sowohl im epithelial lining fluid (ELF) der Lunge als auch im Serum vorkommen (Noël-Georis et al. 2002; Pieper et al. 2003). Es können sowohl Proteine aus der Lunge ins Serum übertreten (Hermans and Bernard

1999) als auch vom Serum in die Lunge (Noël-Georis et al. 2002; Wattiez et al. 1999), wobei das Ausmaß dieses Transportes über die Blut-Luft-Schranke proteinspezifisch ist (Kim and Malik 2003).

Normalerweise gelangen die Proteine des ELF über Diffusion aus dem Blut in die Lunge oder werden in der Lunge von pulmonalen T-Zellen, Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelzellen, alveolären T1- und T2- Zellen, Clara Zellen usw. produziert.

Das in der ELF überwiegende Protein ist Albumin mit einem Anteil von 50 %, gefolgt von Transferrin (5-6 %), α_1 -Antitrypsin (3-5 %) und den Immunglobulinen A und G (zusammen etwa 30 %) (Noël-Georis et al. 2002).

Im Serum finden sich ebenfalls vor allem Albumin und Globuline (Kraft et al. 1999).

Der Proteingehalt der Lungenflüssigkeit beträgt nur etwa 6.5 – 8.0 % des Plasmaproteingehaltes. Absolut sind beim Menschen 11.7 und bei der Ratte 7.9 mg/ml in der Lungenflüssigkeit enthalten.

2.2.3. Verwendete Proteine

2.2.3.1. Albumin

2.2.3.1.1. Struktur und biochemische Eigenschaften

Das Albumin-Molekül (Abb. 2) wird vorwiegend in der Leber synthetisiert, besteht aus 585 Aminosäuren (Quinlan et al. 2005) und hat sowohl beim Menschen als auch beim Rind ca. 66 kDa (Peters 1996).

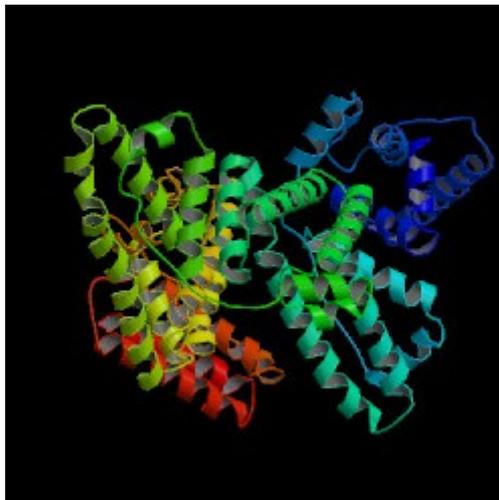


Abb. 2: humanes Serum-Albumin (HSA): Darstellung der Struktur (Sugio et al. 1999) aus der RCSB Protein Data Base, www.pdb.org (Berman et al. 2003; Berman et al. 2000), Identifikationscode PDB ID 1AO6

Der IEP liegt für humanes und bovines Serum-Albumin (HSA und BSA) bei pH 4.7, für das entfettete HSA-Molekül bei pH 5.8 (Peters 1996).

Die Albuminmoleküle verschiedener Spezies unterscheiden sich nur relativ wenig. So werden für equines Serum-Albumin (ESA) Sequenzübereinstimmungen mit humanem Serum-Albumin (HSA), bovinem Serum-Albumin (BSA) und rabbit Serum-Albumin (RSA) von 76, 73 und 76 % beschrieben.

Das Molekül als Ganzes ist herzförmig (siehe Abb. 2), in der Ansicht ein gleichseitiges Dreieck mit einer Kantenlänge von ca. 80 Å und einer Tiefe von ca. 30 Å (Carter and Ho 1994). Dies gilt jedoch nur für die Röntgenkristallographie, in Lösung ist das Molekül ellipsoid (Quinlan et al. 2005). Rezwan et al. geben Maße von 5.5 * 5.5 * 9 nm an (Rezwan et al. 2004).

Was die Sekundärstruktur betrifft, sind 67 % des HSA helikal. Die Flexibilität der Konformation ist sehr hoch, so dass sich Albumin gut an veränderte Bedingungen (pH-Wert, Temperatur) anpasst, ohne zu denaturieren (Carter and Ho 1994).

Bei neutralem pH-Wert ist HSA stark negativ geladen, es gibt jedoch auch Regionen mit überwiegend neutralen Aminosäuren, die daher potentielle Bindungsstellen für z.B. lange Fettsäuren darstellen (Carter and Ho 1994).

In vivo ist die Bildung von Dimeren unwahrscheinlich aufgrund von sterischer Behinderung, ex vivo bilden sich aber bei Reinigung und Lagerung Dimere (Quinlan et al. 2005).

Albumin hat außerdem außergewöhnliche Liganden-Bindungs-Eigenschaften und ist daher beispielsweise Carrier für Fettsäuren und Bilirubin. Trotz der enormen Anzahl an Molekülen, die durch Albumin gebunden werden, ist diese Bindung nicht immer unspezifisch, sondern es gibt für viele Liganden distinkte Bindungsstellen (Carter and Ho 1994).

Manche der an Albumin gebundenen Moleküle können durch andere verdrängt werden, sie sind aber in einigen Fällen in der Lage, an einer anderen Bindungsstelle des Albumins wieder zu binden (Kragh-Hansen 1990).

Neben seiner Ligandenbindungs- und Transportfunktion ist Albumin im Körper wesentlich verantwortlich für die Ausbildung des onkotischen Druckes und den Säure-Basen-Haushalt im Blut sowie für zahlreiche weitere Funktionen (Peters 1996).

2.2.3.1.2. Konzentration in der ELF und im Serum

Serum-Albumin kommt im menschlichen Serum in einer Konzentration von 35-50 mg/ml vor und stellt somit 60 % des extrazellulären Gesamtproteins dar. (Carter and Ho 1994; Parent 1992; Peters 1996).

Bei den Haustieren sind die Werte etwas höher, insbesondere beim Schwein mit bis zu 86 mg/ml. Jungtiere haben niedrigere Werte (Kraft et al. 1999).

Zur Hypoalbuminämie kommt es z.B. bei Lebererkrankungen, Krebs, schwerer Sepsis, Unterernährung, bestimmten Nierenerkrankungen, Diabetes, bei Akute-Phase-Reaktionen, immunologischen Störungen (Bildung von Antikörpern gegen Albumin), Krebs oder entsprechender genetischer Veranlagung, zudem weisen Neonaten sowie ältere Patienten erniedrigte Albumin Konzentrationen auf. Erhöhte Werte unabhängig von Dehydratation und Hämokonzentration finden sich dagegen selten (Peters 1996; Quinlan et al. 2005).

In der ELF stellt es ca. 50 % des Gesamtproteins (Noël-Georis et al. 2002; Parent 1992) und gehört vermutlich zu den Proteinen, die neben der Diffusion auch durch rezeptor-medierte Transzytose oder Cotransport mit anderen Substraten über die Blut-Lungen-Schranke transportiert werden können (Kim and Malik 2003; Parent 1992).

Es ist bronchial mit 3.66 mg/ml und alveolär mit 5.35 mg/ml in der Lungenflüssigkeit enthalten.

2.2.3.2. Transferrin

2.2.3.2.1. Struktur und biochemische Eigenschaften

Humanes Transferrin wird in der Leber synthetisiert (Medico Consult), hat eine Größe von ca. 80 kDa, besteht aus 679 Aminosäuren und hat seinen IEP bei pH 5.6. Das Transferrin-Molekül besitzt zwei identische Lobi (siehe Abb. 3), die der Bindung von Fe^{3+} dienen, dabei hat jeder Lobus zwei Domänen von etwa gleicher Größe.

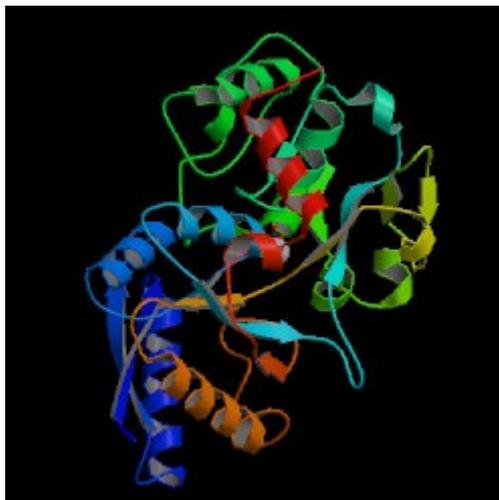


Abb. 3: humanes Transferrin: Darstellung der Struktur (Yang et al. 2000) aus der RCSB Protein Data Base, www.pdb.org (Berman et al. 2003; Berman et al. 2000), Identifikationscode PDB ID 1D3K

Transferrin erfüllt im Organismus die Funktion der Eisenbindung und ist antimikrobiell aktiv. Neben verschiedenen Metallen werden auch Anionen gebunden, des Weiteren befindet sich in Helix 5 ein hydrophobes Areal.

Die Transferrin-Moleküle von verschiedenen Spezies unterscheiden sich nur wenig, z.B. sind die von Mensch und Kaninchen zu 78 % identisch. Bei Fischen und bei rekombinantem Transferrin fehlt die Glycosylierung (Sun et al. 1999).

2.2.3.2.2. Konzentration in der ELF und im Serum

Transferrin stellt 4.1% des Gesamtproteins im Serum (2.5 mg/ml) und 5.5 % der Proteine in der ELF. In der ELF sind bronchial 0.16 mg/ml und alveolär 0.3 mg/ml enthalten (Parent 1992).

Erhöhte Serum-Werte finden sich bei Eisenmangelanämie, Schwangerschaft, akuter Hepatitis und bei Einnahme bestimmter Medikamente. Erniedrigte Werte kommen bei Infektionen, Tumorerkrankungen, Leberzirrhose, nephrotischem Syndrom, hereditärem Fehlen und bei Eisensupplementierung vor (DocCheck® Flexicon).

2.2.3.3. Apolipoprotein A-1

2.2.3.3.1. Struktur und Biochemische Eigenschaften

Apo A-1 (siehe Abb. 4) hat ein Molekulargewicht von 28 kDa und besteht aus 243 Aminosäuren (Cornelius et al. 2002), der IEP liegt bei pH 4.9 – 5.2 (Noël-Georis et al. 2002).

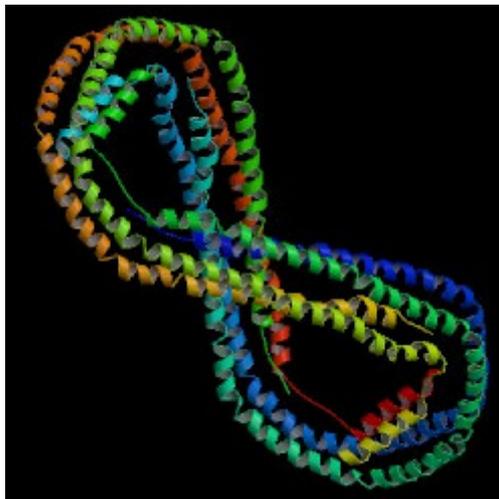


Abb. 4: humanes Apolipoprotein A-1: Darstellung der Struktur (Borhani et al. 1997) aus der RCSB Protein Data Base (www.pdb.org) (Berman et al. 2003; Berman et al. 2000), Identifikationscode PDB ID 1AV1

Apo A-1 wird in der Lunge (Noël-Georis et al. 2002) sowie in Leber und Darm (Cornelius et al. 2002) synthetisiert und stellt die Hauptkomponente der high density Lipoproteine

(HDL) dar; es kann aber auch frei im Plasma vorkommen, wobei die lipidgebundene Form thermodynamisch begünstigt ist, einen hohen Anteil an helikalen Strukturen aufweist und sehr stabil ist. Die freie Form kann dagegen leicht denaturiert werden, es sei denn, es liegt Selbstaggregation mit einem weiteren Apo A-1 vor. Die Plasmakonzentration von Apolipoprotein A-1 zeigt einen umgekehrten Zusammenhang mit der Inzidenz von koronarer Herzkrankheit. (Cornelius et al. 2002; Frank and Marcel 2000).

2.2.3.3.2. Konzentration in der ELF und im Serum

Die Konzentration im Plasma liegt bei 1.1-1.4 mg/ml (Cornelius et al. 2002), für die ELF liegen keine Konzentrations-Angaben vor, das Vorkommen von Apo A-1 in der ELF ist aber nachgewiesen (Noël-Georis et al. 2002; Wattiez et al. 1999).

2.3. Protein-NP-Komplexe

2.3.1. Arten von Protein-NP-Komplexen

Es wurde bereits gezeigt, dass manche Serum-Proteine an verschiedene verwendete Silikat-Partikel binden, andere nur an bestimmte Partikel (Barrett et al. 1999).

Semmler-Behnke et al. beschreiben die Komplex-Bildung von verschiedenen NP mit Proteinen aus dem Serum von Ratten, Mäusen und Menschen, sowie mit Proteinen aus der BAL von verschiedenen Ratten-Stämmen (Semmler et al. 2004). Es wird gezeigt, dass die verschiedenen Proteine in unterschiedlichem Umfang mit den eingesetzten NP (SiO_2 Ø 7nm, TiO_2 P25 Ø 20 nm, Printex 90 Ø 14 nm) reagieren und auch spezie- und stammabhängige Unterschiede bestehen (siehe Abb. 5). Offenbar spielt nicht nur die eingesetzte Oberfläche der NP eine Rolle, sondern auch andere NP-Eigenschaften (Semmler-Behnke et al. 2006).

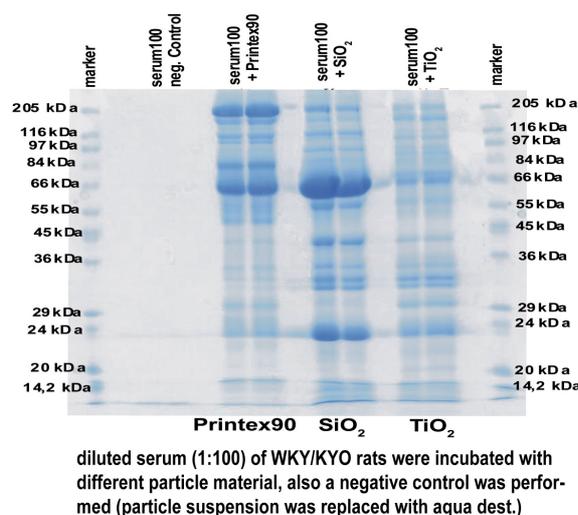


Abb. 5: Bindung von Serum-Proteinen an verschiedene NP (Semmler-Behnke et al. 2006)

Owens et al. stellen in einer Übersichtsarbeit die Bedeutung der Oponisierung (Bedeckung mit Blut-Serum-Komponenten und nachfolgender Erkennung und Eliminierung durch Phagozyten) von polymeren NP im Organismus dar (Owens and Peppas 2006). Dabei werden im Allgemeinen die hydrophoben Partikel im Vergleich zu hydrophilen schneller opsonisiert, da sich die Serum-Proteine schneller anlagern können. Manche Proteine, darunter auch Albumin, sollen aber sogar „dysopsonisierende“ Eigenschaften haben und der Aufnahme von Partikeln durch phagozytierende Zellen entgegenwirken (Thiele et al. 2003).

Sowohl für kolloidale Al_2O_3 -Partikel (116 nm) als auch für Poly(isobutylcyano acrylat)-partikel (220 nm) wurde gezeigt, dass Albumin sich innerhalb weniger Minuten an diese Partikel anlagert (Oliva et al. 2003; Olivier et al. 1995; Rezwan et al. 2004) und auch die Affinität von HSA an Poly(Methyliden-Malonat 2.1.2)-Partikel (500 nm) ist mit ca. 10^{10} M^{-1} sehr hoch (Bousquet et al. 1999).

Allgemein wird die Anlagerung von HSA an Partikel von inter- und intramolekularer Abstoßung beeinflusst (Oliva et al. 2003; Rezwan et al. 2004).

Der Einfluss der Ionenstärke des Mediums auf die Bindung scheint von der Art der Partikel abzuhängen: während bei TiO_2 -NP (20 nm) kein Einfluss auf die Bindung von HSA festgestellt wurde (Oliva et al. 2003), wurde bei Verwendung von Poly(isobutylcyano acrylat)-partikeln gezeigt, dass der Einfluss des pH-Wertes bei niedriger Ionenstärke wesentlich ausgeprägter ist als bei hoher (Olivier et al. 1995).

Bei niedriger Ionenstärke bindet am meisten HSA, wenn der pH-Wert dem IEP des Moleküls entspricht. Auch andere Moleküle mit weniger flexibler Konformation binden am besten bei ihrem IEP (Kondo et al. 1991).

Für HSA und TiO_2 -NP sind verschiedene Reaktionsmechanismen in Abhängigkeit vom pH-Wert beschrieben (Oliva et al. 2003):

Im pH-Bereich von 3.5 bis 6.0 überwiegen elektrostatische Anziehung und Ligandenaustausch von monokoordinierten OH-Gruppen sowie Wasserstoffbrückenbindungen von diskoordinierten OH-Gruppen mit den Karboxylgruppen des Proteins. Im pH-Bereich von 6.0 bis 7.0 herrschen elektrostatische Interaktionen von monokoordinierten OH-Gruppen mit den Karboxyl- und Aminogruppen des Proteins vor sowie elektrostatische Interaktionen von diskoordinierten OH-Gruppen und protonierten Aminogruppen des Proteins vor. Bei pH-Werten über 7.0 kommt es vermutlich vor allem zu Wasserstoffbrückenbindungen zwischen monokoordinierten OH-Gruppen und protonierten Aminogruppen des Proteins. Selbst bei pH-Werten, die ungünstige elektrostatische Gegebenheiten schaffen, läuft die Adsorption initial recht schnell ab, da offenbar andere spezifische Mechanismen oder aber eine

Konformationsänderung des Proteins bei Anlagerung an die TiO₂-Oberfläche diese kompensieren.

Olivier et al. stellen fest, dass bei hoher Ionenstärke die Ladungen durch die freien Ionen abgeschirmt werden, so dass der pH-Wert in diesem Fall keine so bedeutende Rolle spielt wie bei niedriger Ionenstärke (Olivier et al. 1995). In Anbetracht des hydrophoben Charakters der Poly(isobutylcyano acrylat)-Partikel wird davon ausgegangen, dass die Adsorption von HSA am wahrscheinlichsten aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen erfolgt. Durch pH-Wert-Veränderung nach der Adsorption lösen sich einige Proteine wieder, es stellt sich aber ein neues Gleichgewicht ein, wobei letztlich ein Großteil der Proteine an den Partikeln verbleibt. Man geht davon aus, dass die verbleibenden Proteine durch die Adsorption denaturiert sind und daher im adsorbierten Zustand verbleiben.

Auch für die Bindung von Albumin an Poly(methylidenmalonat 2.1.2)-Partikel gilt, dass die Affinität mit zunehmender Elektronegativität des Proteins sinkt (Bousquet et al. 1999).

Olivier et al. vermuten im Falle von Poly(isobutylcyano acrylat)-partikeln eine Anlagerung von humanem Albumin als Monolayer und diskutieren zwei grundlegende Anlagerungsmöglichkeiten des HSA (Olivier et al. 1995): 1. HSA lagert sich mit der größeren Seitenfläche an die Partikel an (side-on mode); 2. HSA lagert sich mit der kleineren Seitenfläche an die Partikel an (end-on mode). Die Autoren stellen jedoch fest, dass die ermittelten Werte für gebundenes HSA zwischen den rechnerisch ermittelten für eine side-on und eine end-on-Anlagerung liegen, was möglicherweise dadurch zu begründen ist, dass die Struktur von HSA beim IEP sehr kompakt ist, so dass viele Moleküle auf eine gegebene Fläche passen, während in anderen pH-Bereichen intra- und intermolekulare Abstoßungen die Adsorption behindern. Rezwan et al. halten den end-on-Modus bei der Anlagerung von Albumin (bovinen Ursprungs) an Al₂O₃-Partikel für unwahrscheinlich, aufgrund der unsymmetrischen Ladungsverteilung innerhalb des BSA-Moleküls (Rezwan et al. 2004). Vielmehr lagert sich BSA im side-on-Modus vermutlich aus elektrostatischen Gründen so an, dass die Anlagerungsstelle für ein weiteres BSA-Molekül nach Adsorption noch frei zugänglich ist und sich somit BSA-Dimere bilden können wodurch die maximale partikel-gebundene BSA noch erhöht wird, wenn dieses im Überschuss vorliegt. Für die Bedeckung von 1 cm² Partikeloberfläche im side-on-Modus wurde eine BSA-Menge von 175-200 ng ermittelt, was in etwa der nach theoretischen Überlegungen zu erwartenden Menge von 223 ng (ca. $1.8 \cdot 10^{12}$ Moleküle) entspricht.

Kondo et al. beschreiben Strukturveränderungen von Proteinen mit unterschiedlicher Flexibilität bei Adsorption an ultrafeine Silikat-NP mit einem Durchmesser von 15 nm (Kondo et al. 1991):

Die Konformationsänderung ist für BSA bei pH 5 am größten und nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Die Flexibilität des Moleküls nimmt zwar mit steigendem pH-Wert zu, während aber die Affinität zu den NP abnimmt. Nach Ablösung der BSA-Moleküle von den NP nehmen die BSA-Moleküle die ursprüngliche Konformation wieder an. Allgemein wird angenommen, dass für die Adsorption von Proteinen an NP dieselben treibenden Kräfte verantwortlich sind wie für die Adsorption an andere Oberflächen, nämlich Entropiegewinn durch Dehydratation oder Konformationsänderung, van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoff-Brücken-Bindungen.

Dabei spielt es zumindest im Falle von HSA und Poly(isobutylcyano acrylat)-Partikel keine Rolle, ob die Reaktion bei 25 °C oder bei 37 °C abläuft (Bousquet et al. 1999).

Da sich der Durchmesser von Gold-NP (20 nm) durch die Anlagerung von BSA-Peptid-Komplexen nur geringfügig erhöht, wird in diesem Fall davon ausgegangen, dass sich die BSA-Moleküle der Länge nach anlagern. Da sich auf jedem NP aber 160 +/- 8 BSA-Moleküle anlagern, liegen diese möglicherweise in mehreren Schichten (Tkachenko et al. 2003).

2.3.2. Mess-Methoden

Die Zentrifugation ist eine bewährte Methode, um Moleküle, die sich in ihrem Sedimentationsverhalten unterscheiden, aufzutrennen. Somit können Partikel mit evtl. anhaftenden Proteinen von freien Proteinen in einer Lösung abgetrennt werden. (Barrett et al. 1999; Kondo et al. 1991; Oliva et al. 2003; Olivier et al. 1995; Rezwan et al. 2004; Semmler et al. 2004).

Da die HSA-TiO₂-Suspensionen bei niedriger Ionenstärke sehr stabil sind, setzen Oliva et al. (Oliva et al. 2003) nach einem Zentrifugationsschritt zusätzlich einen Filtrationsschritt mit einem 0.22 µm Millipore-Filter ein.

Zum Nachweis der an die NP gebundenen Proteinfraction versetzen Semmler-Behnke (Semmler-Behnke et al. 2006; Semmler et al. 2004) und Barrett (Barrett et al. 1999) die abzentrifugierten Protein-Partikel-Komplexe mit einem SDS-haltigen Lysis-Kit und tragen nach erneuter Zentrifugation die wieder von den Partikeln abgelösten Proteine auf ein SDS-PA-Gel auf. Nach der Elektrophorese werden die Proteine im Gel angefärbt und ihre relative Laufweite mit Markerproteinen verglichen.

Verschiedene andere Autoren beschreiben eine indirekte Quantifizierung Partikelgebundener Proteine über die Quantifizierung der in der Stammlösung nach Abtrennung der Komplexe verbliebenen Proteine, dabei verwenden Brown et al. (Brown et al. 2000) den auf der Bradford-Methode basierenden Protein-Assay der Firma Bio-Rad, während Oliva et al. (Oliva et al. 2003) und Kondo et al. (Kondo et al. 1991) den Proteingehalt durch spektrophotometrische Messung bei 279 nm bestimmen.

Eine noch relativ junge Methodik ist die Kopplung eines Reaktionspartners an eine feste Phase, die innerhalb einer Flusszelle in Kontakt steht mit der Lösung, die den anderen Reaktionspartner enthält. Die Anlagerung des zweiten Reaktionspartners an den ersten, der sich an der festen Phase befindet, kann mittels Oberflächenplasmonenresonanz in Echtzeit verfolgt werden und auch Berechnungen zur Kinetik sind möglich. Bousquet et al. untersuchten auf diese Weise die Bindung von Poly(Methyliden-Malonat 2.1.2)-Partikeln (550 nm) an humanes Serum-Albumin und auch Cedervall et al. nutzen diese Messmethode zur Untersuchung von Protein-Partikel-Interaktionen (Bousquet et al. 1999; Cedervall et al. 2007).

2.3.3. Effekte von Protein-NP-Komplexen

Generell werden die NP durch Adsorption von Proteinen größer (Furumoto et al. 2004; Tkachenko et al. 2003) und sie nehmen mit zunehmender adsorbierter Proteinmenge immer mehr die Ladung des jeweiligen Proteins an (Olivier et al. 1995; Rezwan et al. 2004).

Obwohl die konkreten Mechanismen weitgehend ungeklärt sind, sind bereits verschiedene Hinweise auf mögliche gesundheitlich Effekte der Anlagerung von Proteinen an NP beschrieben worden, die sich zumeist als zelluläre Reaktionen oder veränderte pharmakologische Parameter äußern.

So wurde z.B. gezeigt, dass verschiedene proteinbeladene NP in vitro andere Effekte auf pulmonale Zellen haben als unbeladene NP (Rushton et al. 2006), wobei z.B. die Zugabe von Serum und auch von reinem Apolipoprotein A-1 die durch Silikat-Partikel in vitro induzierte Chemokin-Antwort von Typ II-Pneumozyten reduziert (Barrett et al. 1999).

Durch die Anlagerung von Serum-Proteinen an die Polymer-NP werden diese opsonisiert und somit für Makrophagen erkennbar (Owens and Peppas 2006). Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen der durch Adsorption induzierten Konformationsänderung von Proteinen und der Thrombozytenadhäsion in vitro (Hylton et al. 2005).

An Poly(butyl cyanoacrylate)-NP gebundene Pharmaka können mit Hilfe des Apolipoprotein B- und Apolipoprotein E-medierten Transports über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen (Kreuter 2002), außerdem spielt die Kopplung an Serum-Proteine für die Aufnahme von Polystyrol-NP (50 nm) in die Leber eine Rolle, wobei je nach Art des NP Scavenger-Rezeptoren von mehr oder weniger großer Bedeutung sind (Furumoto et al. 2004; Furumoto et al. 2002).

Kovalent mit Transferrin verbundene Gold-NP (ca. 20 nm) konnten über den Transferrin-Rezeptor in Zellen aufgenommen werden, während Albumin-gekoppelte NP in erheblich geringerem Umfang in die Zellen aufgenommen wurden (Yang et al. 2005).

Literatur/Background

Komplexe aus BSA-Peptid-Komplexen und Gold-NP (20nm) haben einen maximal 5 nm größeren Durchmesser als die Gold-NP alleine. Somit können in Abhängigkeit von der Art des Peptides diese Komplexe durch die Poren der Zellkernmembran gelangen, welche je nach Zelllinie einen Durchmesser von 20-50 nm haben (Tkachenko et al. 2003). Ohne Anknüpfung spezieller Peptide können BSA-belegte Gold-NP nicht in den Zellkern aufgenommen werden, sondern verbleiben im Zytoplasma (Panté and Kann 2002).

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Materialien

3.1.1. Geräte

Elektrophorese:

- Vertikales Elektrophorese-System „PerfectBlue™“ Modell „Twin L“ mit 1.5 mm dicken Abstandshaltern und einem Kamm mit 20 Zähnen (Peqlab)
- Vertikales Elektrophorese-System „XCell Sure Lock™ Mini-Cell“ (Invitrogen)
- Stromversorgung „ECPS 3000/150“ (Pharmacia)

pH-Wert-Messung:

- pH-Meter „PB-11“ (Sartorius)
- pH-Einstabmesskette „PY-P11“, Ø 12 mm (Sartorius)
- pH-Einstabmesskette „PY-P22“, Ø 5 mm (Sartorius) für Messungen in 1.5 ml Reaktionsgefäßen

Zentrifugation:

- Mikroliterzentrifuge „Mikro 120“ (Hettich)
- Ultrazentrifuge „Optima Max“ mit Rotor „TLA-55“ (Beckman Coulter)

Wägungen:

- Präzisionswaage „PC 4400“ (Mettler) für Wägebereich 0.1 g bis 400g
- Analysenwaage „2003 MP1“ (Sartorius) für Wägebereich 0.1 mg bis 0.1 g

Ultraschallbehandlung:

- Ultraschallbad „Sonorex TK 57“ (Bandelin)

Größenbestimmung von NP:

- HPPS-High Performance Particle Sizer 5001 (Malvern Instruments)

Sonstige:

- Thermostat „5320“ (Eppendorf)
- Reagenzgefäß-Schüttler „cat VM3“ (CAT Ingenieurbüro)
- Brutschrank (Mettler)

Material und Methoden

- Kühlschrank (Liebherr)
- Gefrierschrank -20 °C (Liebherr)
- Gefrierschrank -80 °C „MDF-U70V“ (Sanyo)
- Mikrotiterplatten-Photometer „Labsystems iEMS Reader MF V2.2-0“ (Labsystems)
- Rotationsschüttelgerät „3017“ (GFL)
- Flachbettscanner “hp officejet 7140xi all-in-one” (Hewlet Packard)
- Glaswanne zum Färben von SDS-PA-Gelen

3.1.2. Software

- Proteinquantifizierung: „Genesis“ II vs. 3.0 (Labsystems and Life Sciences int. (UK) LTD.)
- Auswertung von SDS-PA-Gelen: „ImageJ“ (National Institute of Health (USA); free download: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, (Abramhoff et al. 2004))
- Größenbestimmung von NP:
„ALV-Correlator Software Version 3.0“ (ALV GmbH)
- Darstellung und Vermessung von Proteinemolekülen: „Deep View / Swiss-PdbViewer 3.7“ (GlaxoSmithKline; <http://www.expasy.org/spdbv/>, (Guex and Peitsch 1997))
- Tabellenkalkulation und Statistik: „Microsoft® Excel 2000“ (Microsoft Corporation)

3.1.3. Verbrauchsmaterial

- PP-Röhrchen mit Rundboden „Falcon®“, 5 ml (Becton Dickinson Labware 352063)
- PP-Reaktionsgefäße 1.5 ml (Eppendorf/Greiner 616201)
- PP-Schraubröhre 1.5 ml (Sarstedt 72.607) mit Schraubdeckeln (Sarstedt 65.716.005)
- Zentrifugenfilterröhrchen „Ultrafree®-0.5“, NMWR = 5 kDa (Millipore UFV5 BCC 00)
- PA-Gefäße 1.5 ml (Beckman Coulter 357448)
- Gel loading Tips „SLG®“, 1-200 µl, 0.66 mm (Süd-Laborbedarf 44 1100)
- MultiFlex E Round Tips 0.57 mm: 0.5 – 10 µl (Sorenson™ BioScience, Inc.)
- 96-Loch-Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Nunc™ 167008)
- Filterpapier „MN 640 md“, Ø 11 cm (Macherey-Nagel 2040011)

Material und Methoden

- 10 % Bis-Tris-Gele „NuPAGE®Novex®“ 1.0 mm dick mit 10 Taschen (Invitrogen™ NP0301BOX)
- Küvetten 1.5 ml (Brand 759015)
- weitere allgemein übliche Laborutensilien

3.1.4. Proteine

3.1.4.1. Albumin

Die verwendeten Produkte enthalten jeweils ca. 99 % Albumin und sind im Wesentlichen γ -Globulin frei. Sie wurden durch weitere Aufreinigung der durch Cohn-Fraktionierung gewonnenen Fraktion V des Serums gewonnen.

- Bovines Serum-Albumin (Sigma A 3059)
- Humanes Serum-Albumin (Sigma A 8763)
- Ratten-Serum-Albumin (Sigma A 4538)

3.1.4.2. Transferrin

- Humanes apo-Transferrin (Sigma T 4382) :
Mindestens 98 % apo-Transferrin, Eisengehalt $\leq 30 \mu\text{g/g}$

3.1.4.3. Apolipoprotein A-1

- Humanes Apolipoprotein A-1 (Sigma A 0722):
Mindestens 85 % Apolipoprotein A-1

3.1.5. NP

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich NP als Modellpartikel verwendet, da zu diesen weiter gehende Informationen bezüglich Zusammensetzung, spezifischer Oberfläche und anderen Eigenschaften vorliegen und die Partikel gezielt mit bestimmten Eigenschaften ausgewählt werden konnten. Zudem können die NP in ausreichender Menge erworben und mit gleich bleibender Qualität nachgekauft werden.

3.1.5.1. Polystyrol-NP mit verschiedenen Oberflächen-Liganden \varnothing 50 nm

- Polystyrol „Plain“ (Postnova Z-PS-POS-800-0.05)
- Polystyrol „COOH“ (Postnova Z-PS-POS-807-0.05)
- Polystyrol „NH₂“ (Postnova Z-PS-POS-812-0.05)

Die verwendeten PS-NP haben einen mittleren Durchmesser von 50 nm und eine Dichte von 1.03 g/cm^3 . Für die karboxylierten und aminierten Teilchen wird eine Ladungsdichte von $120 \mu\text{mol/g}$ angegeben, das entspricht ca. 5000 Karboxyl- bzw.- Aminogruppen pro

NP (Herstellerangaben). Bei den Karboxylgruppen ist bei neutralem pH-Wert eine negative Ladung zu erwarten, bei den Aminogruppen dagegen eine positive.

Nach Angaben des Herstellers haben die PS-Plain-NP und die PS-COOH-NP im pH-Bereich von 3-10 Zetapotentialwerte unter 40 mV und keinen Isoelektrischen Punkt, für die PS-NH₂-NP liegen keine Daten vor.

Vergleichbare Teilchen mit einem Durchmesser von 60 nm wurden im Hamster-Modell hinsichtlich ihrer prothrombotischen und inflammatorischen Effekte beurteilt (Nemmar et al. 2003).

3.1.5.2. SiO₂-NP Ø 7 nm

„Silica, fumed“ (Sigma-Aldrich S 5005)

Die verwendeten SiO₂-NP werden durch Pyrolyse von Silizium-Tetrachlorid hergestellt, wodurch zunächst kugelige Gebilde aus Siliziumdioxid entstehen, die dann Aggregate bilden. Die Teilchen haben ein Molekulargewicht von 60.08 g/mol, eine spezifische Oberfläche von 400 +/- 20 m²/g, eine Dichte von 2.3 g/ml und sie sind weitgehend frei von Schwermetall-Ionen. Zu 40-60 % liegen sie als kurze Ketten mit zahlreichen Verzweigungen und einer Länge von 100 bis 200 nm vor. Eine 4%ige Dispersion weist einen pH-Wert von 3.7 – 4.3 auf. Sie sind aufgrund Ihrer eindickenden und thixotropen Eigenschaften von kommerziellem Interesse (Herstellerangaben). Die Konformationsänderung verschiedener Proteine bei Adsorption an Silikat-NP (15 nm) ist bereits beschrieben (Kondo et al. 1991).

3.1.5.3. TiO₂-NP P25 Ø 20 nm

„Aeroxide[®] TiO₂ P25“ (Degussa 23.8595.0000.72.)

Die verwendeten TiO₂-NP werden nach dem Aerosil[®]-Verfahren hergestellt und haben laut Herstellerangaben hydrophile und pyrogene Eigenschaften. Die NP setzen sich laut Hersteller aus 80 % Anatase und 20 % Rutil zusammen, für die Dichte kann daher diejenige von Anatase (3.8 g/ml) angenommen werden (Oberdörster et al. 1994). Die Primärteilchen sind 21 nm groß und weisen nach der BET-Methode eine spezifische Oberfläche von 50 m²/g auf. Der pH-Wert einer 4%igen Dispersion liegt bei 3,5-4,5 (Herstellerangaben).

Das Zetapotential liegt bei -11.6 +/- 1.2 mV in DMEM-Medium (pH 7.5) und bei -9,25 +/- 0.73 mV in HBSS-Medium (pH 7.6). Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass die NP UV-Licht absorbieren und entsprechend als photoreaktiv bezeichnet werden können (Kumar 2006; Long et al. 2006). Sie finden kommerzielle Verwendung als Katalysatorträger, als aktive Komponente für photokatalytische Reaktionen oder als Hitzestabilisator für Silikonvulkanisate (Herstellerangaben), daneben zur Reinigung von

Boden, Wasser und Luft und in letzter Zeit auch in Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen wie Zahnpasta und Sonnencreme. Aufgrund des breiten Einsatzgebietes kommt sowohl die Exposition durch Inhalation vor als auch Exposition über die Haut und den Gastrointestinaltrakt in Frage (Long et al. 2006).

Diese NP wurden gewählt, da mit diesen bereits Studien zur Translokation (Ferin and Oberdörster 1992), zu Effekten in der Lunge (Afaq et al. 1998; Baggs et al. 1997; Donaldson et al. 2000; Gallagher et al. 1994; Geiser et al. 2005; Oberdörster 1996; Oberdörster et al. 1994; Oberdörster et al. 2000; Rehn et al. 2003), zur Induktion von Lipidmediatoren (Beck-Speier et al. 2001) und auch zur Proteinbindung (Oliva et al. 2003) durchgeführt wurden.

3.1.5.4. TiO₂-NP Ø 4.5 nm

(Nanosolutions GmbH)

Die NP haben laut Hersteller einen Durchmesser von ca. 4.5 nm und eine Dichte von 3.8 g/cm³, woraus sich eine spezifische Oberfläche von 335 m²/g ergibt. Die Oberfläche ist mit einem polaren ungeladenen organischen Molekül belegt, das über OH-Gruppen verfügt und mit Diäthylenglycol vergleichbar ist.

Zudem enthalten die NP Chlorid, welches nach Herstellerangaben vermutlich zum Teil als HCl vorliegt, so dass Suspensionen dieser NP bei Konzentrationen unterhalb von 10 % einen pH-Wert von 4-5 aufweisen. Weiterhin gibt der Hersteller für das Zeta-Potential einen Wert von -42 mV an. Diese NP wurden gewählt, um ein vergleichbares NP zu den größeren TiO₂-NPn (P25) zu haben. Des Weiteren sollten sie mit den SiO₂-NP, die ebenfalls kleiner als 10 nm sind, verglichen werden.

3.1.5.5. Kohlenstoffschwarz-NP Ø 14 nm und Ø 50 nm

„Printex 90“ und „Printex G“ (Degussa 2510680000 und 2512500000)

Printex 90 gehört ebenso wie Printex G zur Gruppe der Carbon Blacks (Kohlenstoffschwarz-Partikel). Es liegen meist unterschiedlich große Aggregate aus mehreren Primärteilchen vor. Die Primärteilchen bestehen aus konzentrischen graphitähnlichen Kristalliten; deren Graphitschichten sind häufig gegeneinander verdreht, so dass Carbon Black als gestörte Form des graphitischen Kohlenstoffs bezeichnet werden kann. Verschiedene organische Gruppen sind als Verunreinigungen chemisch an die NP gebunden und lassen sich nur bei sehr hohen Temperaturen ablösen.

Printex-NP gehören zur Untergruppe der Pigmentruße und weisen eine Dichte von 1.8-1.9 g/cm³ auf. Beide NP-Arten weisen in 5%iger Suspension einen pH-Wert von 9 auf, sie unterscheiden sich somit lediglich in ihrer Größe und somit in ihrer spezifischen Oberfläche. Diese beträgt für Printex 90 nach der BET-Methode 300 m²/g und für Printex

Material und Methoden

G nur 30 m²/g. Printex 90- und Printex G-NP werden für Druckfarben und Lacke und auch zur UV-Stabilisierung von Polyolefinen verwendet (Degussa). Die Printex-NP sind in ihrer Größe vergleichbar mit von neueren Motoren ausgestoßenen Dieselruß-Partikeln (Kreyling et al. 2004) und wurden daher verwendet, um den Bezug zum Umwelt-Aerosol herzustellen. Stöger et al. verwendeten die genannten Printex-NP zur Instillation in Mäuselungen, um ihr inflammatorisches Potential zu beurteilen (Stoeger et al. 2006), des weiteren gibt es Untersuchungen bezüglich der Induktion von Lipidmediatoren und der Beeinflussung des Cytoskeletts von Makrophagen (Beck-Speier et al. 2005; Möller et al. 2005).

Eine Übersicht über die verwendeten NP und ihre Eigenschaften findet sich im Anhang (Abb. A-1).

3.1.6. Chemikalien

(Im Text verwendete Abkürzungen sind kursiv dargestellt.)

- Acrylamid-Lösung 40 % (Merck 100633)
- Aqua destillata - „*A. dest.*“ (hauseigene Herstellung)
- Ammoniumperoxodisulfat - „*Amper*“ (Sigma A 7460)
- Barbitol-Puffer (Sigma 5934)
- Bio-Rad Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat (Biorad 500-0006)
- Bromphenolblau (Serva 15375)
- Citronensäure-Monohydrat (Merck 1.00244)
- Di-Natriumhydrogenphosphat dibasisch (Merck 106566)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - „*PBS*“ ohne MgCl und CaCl (Sigma D 8537)
- Eisessig (Merck 100063)
- Ethanol, vergällt (Biesterfeld Graen 4030008)
- Formaldehyd (Merck 103999)
- Glycerol (Pharmacia 17-1325-01)
- Glycin (Sigma G 8898)
- Mercaptoethanol (Fluka 63689)
- Methanol (Merck 106009)
- Molekulargewichtsmarker Magic Mark XP™ (Invitrogen LC5602)
- Natriumcarbonat (Sigma S 2127)
- Natriumchlorid (Merck 1.06404)

- Natriumdodecylsulfat - „SDS“ (Merck 113760)
- Natriumorthovanadat (Sigma S 6508)
- Natriumthiosulfat (Sigma S 1648)
- N,N'-Methylenbisacrylamid - „Bis“ (Sigma M 7256)
- NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen NP0005)
- NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) (Invitrogen NP0001)
- Pepstatin A-Lösung (Sigma P 5318)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma P 2714)
- Salzsäure 32 % - „HCl“ (Merck 1.00319)
- Silber-Färbe-Kit „Silverquest™“ (Invitrogen LC6070)
- Silbernitrat (Fluka 85230)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin - „TEMED“-Lösung (Sigma T 9281)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan - „Tris“ (Sigma T 6066)

3.1.7. Gebrauchs-Lösungen

3.1.7.1. Lysis-Kit

- 24 µl Pepstatin A-Lösung: 1 mg/ml in 9 Teilen Methanol und 1 Teil Essigsäure 10 % v/v
- 441 µl Na₃VO₄-Lösung: 1 mg/ml, pH 10
- 12 µl SDS-Lösung: 20 % w/v
- 240 µl Protease Inhibitor Cocktail: Packungsinhalt gelöst in 5 ml A. dest.

3.1.7.2. Lösungen für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

- 1 M Tris-HCl-Lösung pH 8.5
- SDS-Lösung 20 % w/v
- Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung:
 - 28 % w/v Acrylamid
 - 0.75 % w/v N,N'-Methylenbisacrylamid
- Amper - Lösung 40 % w/v
- Tris-SDS-Lösung:
 - 0.96 M Tris-HCl-Lösung pH 7
 - 0.8 % SDS

Material und Methoden

Zusammensetzung der selbst gefertigten Tris-Glycin-SDS-PA-Gele im Format 20 x 20 cm:

Trenn-Gel (12 % w/v Acrylamid; %T=28.75; %C=2.61):

- 18 ml 1M Tris-HCl-Lösung pH 8.5
- 19.5 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung
- 8.1 ml A. dest.
- 0.24 ml SDS-Lösung 20 %
- 42 µl Amper-Lösung und 30 µl TEMED-Lösung

Sammel-Gel:

- 6.5 ml A. dest.
- 3.2 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung
- 1.5 ml Tris-SDS-Lösung
- 21 µl Amper-Lösung und 6 µl TEMED-Lösung

▪ Lauf-Puffer für 12 % Tris-Glycin-Gele im Format 20 x 20 cm:

- 25 mM Tris-Base
- 192 mM Glycin
- 0.1 % w/v SDS

▪ Lauf-Puffer für käufliche 10 % Bis-Tris-Minigele „NuPage® Novex®“ (Invitrogen™):

- Anodenkammer: MOPS-Puffer (Invitrogen)
- Kathodenkammer: MOPS-Puffer (Invitrogen) mit 0.25 % v/v Antioxidans (Invitrogen)

▪ Proben-Puffer (2x) (Barrett et al. 1999):

- 0.0625 M Tris-HCl-Lösung pH 7.0
- 2.3 % w/v SDS
- 10 % w/v Glycerol
- 5 % w/v Mercaptoethanol
- 0.4 % w/v Bromphenolblau

3.1.7.3. Silberfärbung

Färbung für selbst gefertigte 12 % Tris-Glycin-Gele im Format 20 x 20 cm (modifiziert nach Blum et al. (Blum et al. 1987)):

Material und Methoden

- Fixier-Lösung:
 - 40 % v/v Methanol
 - 10 % v/v Essigsäure
- Wasch-Lösung: 30 % v/v Ethanol
- Reduktions-Lösung: 0.02 % w/v Natriumthiosulfat
- Inkubations-Lösung:
 - 0.2 % w/v Silbernitrat
 - 0.02 % v/v Formaldehyd 37 %
- Entwickler-Lösung:
 - 3 % w/v Natriumcarbonat
 - 0.05 % v/v Formaldehyd 37%
 - 0.0005 % w/v Natriumthiosulfat
- Stopp-Lösung: 0.5 % w/v Glycin

Färbung für 10 % Bis-Tris-Minigele „NuPage® Novex®“ (Invitrogen™)
mit „Silverquest™“ (Invitrogen):

(für Minigele von Invitrogen)

- Fixierlösung:
 - 40 % Ethanol
 - 10 % Essigsäure
- Waschlösung: 30 % Ethanol
- Sensitizer-Lösung:
 - 30 % Ethanol
 - 10 % Sensitizer (Invitrogen)
- Färbelösung: 1 % Stainer (Invitrogen)
 - Entwickler-Lösung: (Invitrogen)
 - 1 Tropfen Developer Enhancer (Invitrogen)
- Stopp-Lösung: 10 % Stopper (Invitrogen) zur Entwickler-Lösung

3.1.7.4. gepufferte Kochsalzlösungen

Citrat-Phosphat-gepufferte Salzlösung (Stammlösung):

- 0.8 % NaCl
- 0.115 % NaH₂PO₄
- ca. 1.4 mMol Zitronensäuremonohydrat zur Titration auf pH 5.9

Die gewünschte pH-Werte wurden mit HCl (32 %) eingestellt.

Einsatz im pH-Bereich von 4.4 – 5.9.

Barbiturat-gepufferte Salzlösung:

- 0.8 % NaCl
- 0.05 M Barbiturat

Die gewünschte pH-Werte wurden mit HCl (32 %) eingestellt.

Einsatz im pH-Bereich von 6.9 – 8.4.

3.2. Methoden

3.2.1. Herstellung von Protein-NP-Komplexen und Nachweis der an die NP gebundenen Proteinmenge

3.2.1.1. Herstellung der NP-Suspensionen

Die NP (Pulver) wurden mit A. dest. versetzt und unter ständigem Aufklopfen 3 Minuten lang in einem Ultraschallbad gehalten, um die NP zu desaggregieren. Bei Bedarf wurden die Suspensionen weiter verdünnt und vor Verwendung nochmals mit Ultraschall behandelt.

Abweichungen von der oben beschriebenen Vorgehensweise:

- Die PS-NP wurden bereits in Suspension erworben, sie wurden daher lediglich vor Verwendung mit Ultraschall behandelt.
- Die TiO₂ 4.5 nm-NP wurden gemäß Herstelleranweisung nicht mit Ultraschall behandelt, sondern lediglich geschüttelt.
- Printex 90, Printex G und TiO₂ P25-NP sind für höher konzentrierte Suspensionen besser zu handhaben, wenn die NP direkt in einem Gefäß vorgelegt werden und A. dest. sowie die Proteinlösung zugefügt werden. Im Fall von Printex 90-NP wurde dies generell, von Printex G-NP bei einer angestrebten Endkonzentration von über 1 mg/ml und im Fall von TiO₂ P25-NP bei einer angestrebten Endkonzentration von über 8 mg/ml so gehandhabt. Die so erstellten Versuchsansätze wurden in Anlehnung an Kendall et al. nur 1 min lang unter ständigem Aufklopfen in einem Ultraschallbad gehalten, um die Proteinmoleküle nicht zu schädigen (Kendall et al. 2004).

3.2.1.2. Herstellung von Proteinlösungen

Zunächst wurde eine 5%ige BSA- bzw. Transferrin-Stammlösung in PBS hergestellt, zu je 0.5 ml aliquotiert und eingefroren. Aus diesen Stammlösungen wurden grundsätzlich die benötigten BSA-/Transferrin-Lösungen hergestellt. Eine Ausnahme bildeten die Ansätze für BSA-Lösungen mit NaCl-Lösungen, die auf verschiedene pH-Werte eingestellt wurden: hierfür wurden zu 895 µl NaCl-Lösung 5 µl einer 7.2%igen BSA-Lösung gegeben.

Material und Methoden

Im Falle von Apolipoprotein A-1 wurden für alle Versuche dieselben Mengen und Verdünnungen benötigt, daher wurde eine Lösung mit 0.4 mg/ml hergestellt, diese zu je 90 µl aliquotiert und eingefroren.

3.2.1.3. Bildung von Protein-NP-Komplexen

Proteine und NP wurden zusammen bei 37 °C für 1 Stunde unter Rotation auf einem Reagenzgefäß-Schüttler inkubiert, um eine Bindung zwischen den Reaktionspartnern unter annähernd physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.

3.2.1.4. Streulichtmessungen von NP in verschiedenen Medien

Die Größe der verwendeten PS-NP wurde durch Photonenkorrelationsanalyse mit dem HPPS-High Performance Particle Sizer 5001 (Malvern Instruments) bestimmt. Dazu wurden je 1 ml der NP-Suspension in eine PS-Küvette gegeben, und nach Temperierung auf 25 °C zehn Messungen von je 30 sek Dauer durchgeführt.

Kriterien für die Qualität der Messung waren neben der Form der aus den Rohdaten erstellten Kurve die Konstanz der Zählrate über die Dauer der Messung und die Übereinstimmung der einzelnen Messungen. Die PS-NP erfüllten alle diese Kriterien sehr gut.

Die erhaltenen Rohdaten werden mit Hilfe einer speziellen Software umgerechnet.

So war eine Zuordnung von NP-Größe und dem Gesamtsignal aller NP dieser Größe möglich.

3.2.1.5. Zentrifugation und Ultrazentrifugation

Nach der Inkubation von Proteinlösungen mit NP wurden die Ansätze zentrifugiert, um die im Vergleich zu den Proteinen schwereren NP mitsamt der daran gebundenen Proteine zu pelletieren. Der entstandene Überstand enthielt somit jeweils die ungebundenen frei in Lösung befindlichen Proteine. Für jede NP-Art wurde die Zeit berechnet, die erforderlich ist, um ein ganz oben im Gefäß befindliches NP bei Raumtemperatur bis ganz unten zum Gefäßboden sedimentieren zu lassen.

Hierfür wurde zunächst die Sedimentationskonstante s berechnet:

$$s = \frac{d^2(1-\varphi)(\rho_{NP}-\rho_{LM})}{18\eta} \quad (\text{Lottspeich et al. 1998}) \quad (\text{Gl. 1})$$

Wobei:

s Sedimentationskonstante [S]

d NP-Durchmesser [nm]

φ Quellung (wird bei kompakten Partikeln gleich 0 gesetzt)

ρ_{NP} Dichte der NP [g/ml]

Material und Methoden

- ρ_{LM} Dichte des Lösungsmittels [g/ml]
 η Viskosität des Lösungsmittels [Pa*s]

Ausgehend davon konnte die erforderliche Zentrifugationszeit berechnet werden:

$$t [h] = \{[\ln(r_{max}/r_{min})/\omega^2] * (10^{13}/3600)\}/s \text{ (Beckman Instruments 1998)}$$

$$t = \text{Ln}(r_{max}/r_{min})/((2*\pi*rpm/60)^2*s/10^{13}) \quad \text{(Gl. 2)}$$

Wobei:

- t Zeit [s]
 r_{max} Maximaler Radius: Entfernung eines Punktes am Gefäßboden zur Rotationsachse (Hersteller-Angabe: 55 mm)
 r_{min} Minimaler Radius: Entfernung eines Punktes am Flüssigkeitsmeniskus zur Rotationsachse (wurde berechnet, s.u.)
 ω Winkelgeschwindigkeit: $\omega = 2\pi U = 2\pi rps$

Als Werte für Dichte und Viskosität des Lösungsmittels wurden diejenigen für Wasser bei 23 °C verwendet:

$$\rho_{Wasser, 23 \text{ °C}} = 0.998 \text{ [g/ml]}$$

$$\eta_{Wasser, 23 \text{ °C}} = 0.00933 \text{ [P]}$$

Der minimale Radius r_{min} wurde anhand eines Modells berechnet:

Dazu wurde ein PA-Gefäß mit 1 ml Inhalt an einer schiefen Ebene mit 45°, entsprechend der Neigung der Rotorbohrungen angelegt.

In der untenstehenden Abbildung (Abb. 6) bezeichnet der Punkt A den rotationsachsennahen Meniskusstand, der Punkt B liegt Rotationsachsen-nah auf dem Gefäß am Rand der Bohrung. Die Strecke c zwischen A und B wurde vermessen.

Da die in der Grafik eingezeichneten Punkte und Strecken ein rechtwinkliges und gleichschenkeliges Dreieck ergeben, gilt nach Umformung folgende Gleichung:

$$a=c/\sqrt{2}$$

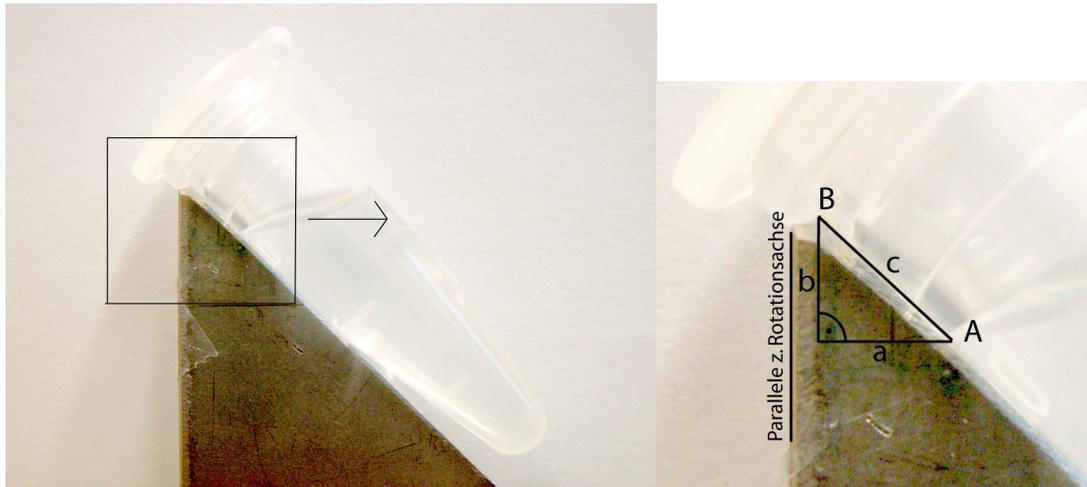


Abb. 6: Überlegungen zur Berechnung von r_{\min}

Die Summe aus a und der vom Hersteller angegebenen Entfernung des Randes der Bohrung von der Rotationsachse (25 mm) ergibt r_{\min} .

Mit Hilfe dieser rechnerischen Überlegungen konnte die Berechnung der Zentrifugierzeit t an beliebige Füllungszustände der Probengefäße angepasst werden.

Aufgrund der geringen Dichte der PS-NP (1.03 g/cm^3) musste für die Abtrennung dieser NP eine Ultrazentrifuge (s. Abb. 7) genutzt werden, da diese mit einer Maximalleistung von ca. 120000 g eine im Vergleich zur Mikroliterzentrifuge um den Faktor 7-9 (je nach Probenvolumen) höhere Zentrifugalbeschleunigung erzeugt.



Abb. 7: Ultrazentrifuge „Optima Max“

Für die Ultrazentrifugation müssen besonders robuste und vom Ultrazentrifugen-Hersteller vorgegebene Gefäße verwendet werden, daher wurden für die vorliegende Arbeit verschleißbare PA-Gefäße mit einem Fassungsvermögen von 1.5 ml benutzt.

3.2.1.6. Darstellung der an NP gebundenen Proteine auf einem SDS-PA-Gel

Die bei der Zentrifugation entstandenen Pellets wurden in 100 µl PBS aufgenommen und im Verhältnis 1:2 mit einem SDS-haltigen Lysis-Kit versetzt, um die Protein-NP-Komplexe aufzubrechen und die zuvor gebundenen Proteine wieder in Lösung zu bringen. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert und der erhaltene proteinhaltige Überstand mit einem Zentrifugenfilter aufkonzentriert.

Da der Lysis-Kit nicht bei allen NP in der Lage war, die daran gebundenen Proteine quantitativ wieder abzulösen, wurde die direkte Verwendung des Pellet als Probe für die SDS-PA-Gele angestrebt. Da die NP selbst offenbar nicht bzw. kaum auf dem Gel laufen und keine Artefakte provozieren, und zudem die Proteine offensichtlich bei der Elektrophorese oder auch schon bei der Probenaufbereitung mit Probenpuffer von den NP abgelöst werden, konnten nun alle Proteine, die vormals an NP gebunden hatten, quantitativ auf das SDS-PA-Gel aufgetragen werden.

Die Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C gehalten und anschließend wurde ein Aliquot (3 µl) auf das Gel aufgebracht.

3.2.1.6.1. Optimierung des Protokolls

Es sollte gewährleistet werden, dass Versuchsansätze ohne NP im SDS-PA-Gel keine artifiziellen Banden ergeben und eine Bande nur Proteine anzeigt, die vormals an NP gebunden haben.

3.2.1.6.1.1. Waschen des Pellets

Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet dreimal mit Pufferlösung (1.5 ml bzw. 100 µl für 100 µl-Ansätze mit Apolipoprotein A-1) gewaschen, damit ungebundene noch im Pellet befindliche Proteine eliminiert werden konnten.

Um die Effektivität dieser Waschgänge zu beurteilen, wurde jeweils nach Abkippen des Überstandes eine Probe aus der Flüssigkeit, die noch am Gefäß haftete und sich letztlich als verbliebener Überstand wieder sammelte, entnommen. Die Probe wurde auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen.

3.2.1.6.1.2. Überführen des Pellets in ein neues Gefäß

Um die Ablösung von an der Gefäßwand haftenden Proteinen bei Zugabe des Lysis-Kit zu vermeiden, wurde das gewaschene Pellet in ein neues Gefäß überführt.

Um den Nutzen dieser Maßnahme zu beurteilen, wurde das ursprüngliche Gefäß mit Lysis-Kit versetzt und der Gefäßinhalt nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (unter Schütteln) als Probe auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen.

3.2.1.6.1.3. Wahl geeigneter Proteinkonzentrationen

Für die Darstellung der gebundenen Proteine mit Mini-SDS-PA-Gelen wurde das Schema 900 µl bei 0.4 mg/ml mit 100 µl NP-Suspension getestet. Dieses erwies sich auch als geeignet, um die NP-gebundenen Proteine indirekt zu quantifizieren, nämlich durch Analyse des nach dem Zentrifugieren erhaltenen Überstandes mittels Bio-Rad Protein-Assay.

3.2.1.6.2. Herstellung der SDS-PA-Gele und Elektrophorese

selbst gefertigte 12%ige Tris-Glycin Gele (Format 20 * 20 cm, siehe Abb. 8):

Nach Eingießen von Trenn- und Separations-Gel in die Gel-Kassette wurde ein Kamm mit 20 Zähnen eingebracht, die so entstandenen Probestaschen wurden nach der Polymerisation des Gels dreimal mit Laufpuffer gewaschen und die Proben (20 µl / Probestasche) mit speziellen Pipettenspitzen (Gel loading Tips, Fa. Südlabor) in die Taschen eingebracht.

Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und konstanter Stromstärke von ca. 15 mA über ca. 16 h.

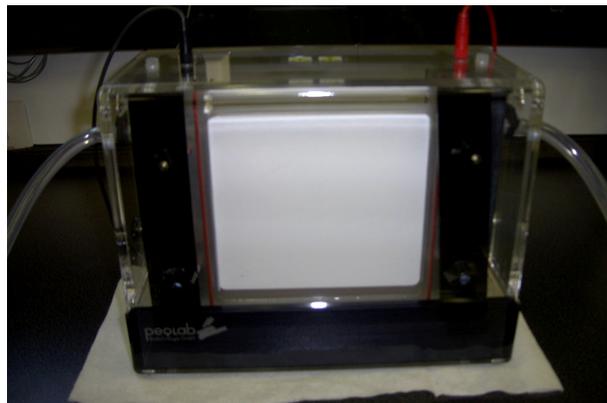


Abb. 8: Vertikales Elektrophorese-System „PerfectBlue™“ Modell „Twin L“

10 % NuPAGE® Bis-Tris-Mini-Gele (Invitrogen™, siehe Abb. 9):

Durch den Einsatz kommerziell erhältlicher Gele konnte bei einheitlicher Qualität der Gele mit einem deutlich geringeren Probenvolumen (5 µl / Probestasche) gearbeitet werden. Die Gele wurden in das zugehörige Elektrophorese-System (Invitrogen™) eingespannt, und die Puffer-Kammern wurden mit Lauf- Puffer befüllt. Der Lauf erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V und ca. 150 mA über 50 Minuten.



Abb. 9: Vertikales Elektrophorese-System "XCell Sure Lock™ Mini-Cell"

3.2.1.6.3. Silber-Färbung von SDS-PA-Gelen

Färbung von selbst gefertigten 12 % Tris-Glycin-Gele im Format 20 x 20 cm (modifiziert nach Blum et al.):

Nach Abspülen mit A. dest. wurden die Gele zunächst für 1 Stunde in die Fixierlösung gelegt und anschließend dreimal für 20 min mit der alkoholischen Waschlösung gewaschen.

Danach wurden die Gele für eine Minute in der Reduktions-Lösung belassen und anschließend dreimal für 20 sek in A. dest. gewaschen. Nun folgte die Inkubation in der Inkubationslösung für 20 min. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit A. dest. für jeweils 20 sek, wurden die Gele für 12-15 min in die Entwickler-Lösung gegeben. Nach Waschen mit A. dest. für 10 sek wurde das Gel für 5 min in die Stopp-Lösung verbracht. Abschließend wurde dreimal für je 20 min mit Wasser gespült. Während der einzelnen Färbeschritte wurde das Gel in einer Wanne auf einem Rotationsschüttelgerät in der entsprechenden Flüssigkeit bewegt.

Färbung von 10 % Bis-Tris-Minigelen „NuPage® Novex®“ (Invitrogen™):

Die Gele wurden nach der Elektrophorese kurz in A. dest. gewaschen, und dann für 20 min in der Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Eisessig) belassen. Nach 10 minütigem Waschen in 30 % Ethanol wurde 10 min lang in der Sensibilisierungs-Lösung inkubiert und anschließend jeweils 10 min lang in 30 % Ethanol gewaschen. Sodann wurden die Gele 15 min lang in der Färbe-Lösung inkubiert, und nach kurzem Waschen in A. dest. dann die Entwickler-Lösung zugegeben. Sobald der Marker deutlich sichtbar war, wurde die Stopp-Lösung zugegeben und die Gele abschließend 10 min lang in A. dest. gewaschen. Während der einzelnen Färbeschritte wurde das Gel in einer Wanne auf einem Rotationsschüttelgerät in der entsprechenden Flüssigkeit bewegt.

Die fertigen Gele wurden anschließend mit einem Flachbettscanner gescannt, so dass die digitale Archivierung und spätere Bearbeitung mit Bildbearbeitungs- oder Bildanalyse-Programmen möglich war.

3.2.1.6.4. Densitometrische Auswertung der Proteinbanden

Die eingescannten Elektropherogramme wurden als Dateien im TIF-Format mit der Software „ImageJ“ bearbeitet (Abramhoff et al. 2004): ausgewählte dunkle Bereiche (Banden) wurden als verschieden hohe Peaks dargestellt, abhängig von der Farbintensität des jeweiligen Bereiches. Die Fläche unter diesen Peaks wurde berechnet. Solchermaßen quantifiziert können die Banden untereinander oder mit Standards auf dem Gel verglichen werden.

3.2.1.7. Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels Bio-Rad Protein-Assay (Depletions-Methode)

Im nach dem ersten Zentrifugationsschritt entstandenen Überstand fehlen im Vergleich zum Zustand vor der Inkubation die Proteine, die an NP gebunden haben und mit diesen abzentrifugiert wurden. Die Proteinlösung hat somit eine Depletion erfahren.

Da diese Depletion durch die Bindung an die NP zu Stande kommt, fehlt sie in den Kontrollen, denen an Stelle von NP nur A. dest. zugeben wurde. Dadurch ist es möglich, die an NP gebundene Proteinmenge indirekt zu bestimmen.

3.2.1.7.1. Vorgehensweise

Zur Quantifizierung der Proteine im Überstand wurde der Bio-Rad Protein-Assay in Anlehnung an Brown et al. (Brown et al. 2000) durchgeführt.

In einer Mikrotiterplatte wurden zu jeweils 5 µl Probe je 200 µl des 1:5 verdünnten und durch einen Papierfilter gereinigten Bio-Rad-Farb-Konzentrates gegeben, wobei jede Probe dreifach aufgetragen wurde. Nach leichtem Rütteln der Platte und 15 min Inkubation bei RT wurde die optische Dichte der entstandenen Lösung bei 620 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (siehe Abb. 10) bestimmt.

Kalibrierung:

Bei jeder Messung wurde neben reinem PBS eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Proteins (BSA bzw. Transferrin) in PBS gemessen, so dass eine Standard-Kurve zur Kalibrierung der Messung und Ermittlung der Proteinkonzentration in den Proben erstellt werden konnte. Da Apo A-1 nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stand, wurden die Standardkurven für die Messung der entsprechenden Proben mit BSA erstellt.



Abb. 10: Mikrotiterplatten-Photometer „Labsystems iEMS Reader MF V2.2-0“

3.2.1.7.2. Korrektur der mit dem Bio-Rad Protein-Assay erhaltenen Messwerte

Nach Zentrifugation von PS-NP-Suspensionen in PBS wurde im Falle der aminierten NP mittels Bio-Rad Protein-Assay im Überstand ein Signal ermittelt, somit ergab sich der Hinweis, dass erstens die Zentrifugation der NP nicht vollständig war und zweitens diese NP im Zusammenhang mit der Bio-Rad-Proteinbestimmung einen Proteingehalt vortäuschen. Durch Titrationskurven konnte ermittelt werden, dass der abzentrifugierte NP-Anteil über 80 % betrug und somit die NP trotzdem zufrieden stellend abzentrifugiert werden konnten. Des Weiteren war es durch diese Untersuchungen möglich, einen Korrekturfaktor für die tatsächlich im Überstand vorhandene Proteinmenge zu ermitteln, indem der durch die NP simulierte Proteingehalt quantifiziert und vom Messwert der Probe subtrahiert wurde.

3.2.1.7.3. Berechnung der Depletion

Vom Messwert der im Versuch mitgeführten Kontrolle (MW_K) wurde jeweils der Messwert des Versuchsansätze (MW_V) subtrahiert. Die Differenz wurde in Beziehung gesetzt zum Messwert der Kontrolle:

$$\text{Depletion [\%]} = (MW_K - MW_V / MW_K) * 100 \quad (\text{Gl.3})$$

3.2.1.7.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Protein-NP-Bindung

In Anlehnung an Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma D 8537) wurden gepufferte Lösungen mit ebenfalls 0.8 % NaCl, aber unterschiedlichen pH-Werten hergestellt, um den Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Protein-NP-Komplexen zu untersuchen

Im pH-Wert-Bereich von 4.4 – 5.9 wurde ein Citrat-Phosphat-Puffer-System verwendet und im pH-Wert-Bereich von 6.9 - 8.4 ein Barbiturat-Puffer-System.

Für die Versuche wurden 5 µl eines 7.2%iges BSA-Konzentrates zu 895 µl der jeweiligen Pufferlösung gegeben, der pH-Wert kontrolliert und anschließend 100 µl einer NP-Suspension zugegeben.

3.2.1.7.5. Vergleichende Bewertung der erhaltenen Daten: Bindungsindex

Zur vergleichenden quantitativen Beurteilung der Bindungsfähigkeit der verschiedenen NP an die verwendeten Proteine wurde der Begriff des Bindungsindex (BI) definiert.

Zur Ermittlung dieses Wertes wurden unterschiedliche NP-Konzentrationen mit einer BSA- oder Transferrin-Lösung inkubiert und die Messwerte in ein Koordinatensystem eingetragen. Der Steigungswert einer Trendlinie durch die Datenpunkte und den Nullpunkt, entsprechend der Herleitung mit der Einheit % (0.36mg BSA) / mg NP) wird als Bindungsindex bezeichnet und bezieht sich auf die Bindung bei pH 7.4 soweit nicht anders angegeben.

3.2.2. Statistische Methoden

Für die statistische Datenanalyse wurde der T-Test nach Student angewendet. Hierfür wurde die Software Microsoft[®] Excel 2000 verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen.

3.2.3. Berechnung der Belegung der NP-Oberfläche mit Proteinen

Für mathematische Überlegungen hinsichtlich der Belegung der NP-Oberfläche mit Proteinen wurden die NP als ideale Kugeln betrachtet, so dass sowohl die NP-Oberfläche als auch unter Einbeziehung der Materialdichte die NP-Anzahl in den verwendeten NP-Suspensionen berechnet werden konnte. (Im Falle der PS-NP lag zusätzlich eine Herstellerangabe zur NP-Anzahl je ml vor.)

Ebenso konnte mit Hilfe des bekannten Molekulargewichtes der Proteine deren Anzahl in der Probe berechnet werden.

Die Proteine wurden idealisiert als kubische Gebilde mit Maßen für Länge, Breite und Tiefe angenommen. So konnten berechnet werden, welchen Anteil der NP-Oberfläche die gebundenen Proteine bedecken, je nachdem, mit welcher Seite sie sich anlagern.

Für BSA lagen bereits Maßangaben aus der Literatur vor (Rezwan et al. 2004), im Falle von Transferrin und Apolipoprotein A-1 wurden die Maße mit Hilfe des Computerprogrammes Deep View / Swiss-PdbViewer 3.7 ermittelt:

BSA: $5.5 * 5.5 * 9 \text{ nm}^3$

Transferrin: $16.1 * 8.0 * 6.2 \text{ nm}^3$

Apolipoprotein A-1: $10.8 * 8.8 * 2.5 \text{ nm}^3$

Folgende Gleichungen wurden verwendet:

$$\text{NP-Oberfläche } O \text{ [nm}^2\text{]} = 4 * \pi * r^2 \quad (\text{Gl. 4})$$

Material und Methoden

$$\text{NP-Volumen } V \text{ [nm}^3\text{]} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \quad (\text{Gl. 5})$$

Wobei:

$\pi \approx 3.14$ (Kreiszahl)

r NP-Radius [nm]

$$\text{Volumen } V_{\text{ges}} \text{ von } x \text{ mg NP [nm}^3\text{]} = [(1/\rho_{\text{NP}}) \cdot x] \cdot 10^{18} \quad (\text{Gl. 6})$$

Wobei:

ρ_{NP} Dichte des NP in g/cm³ oder mg/mm³

$$\text{NP-Anzahl } N_{\text{NP}} \text{ in } x \text{ mg} = V_{\text{ges}} / V \quad (\text{Gl. 7})$$

$$\text{Anzahl } N_{\text{Prot 360}} \text{ [nmol]} \text{ der Proteine in } 360 \mu\text{g} = (1/\text{MG}) \cdot 360 \quad (\text{Gl. 8})$$

Wobei:

MG Molekulargewicht [g/mol]

$$\text{Anzahl gebundene Protein } N_{\text{Prot geb}} \text{ [nmol]} = \text{gebundenes Protein [\%]} \cdot N_{\text{Prot 360}} \quad (\text{Gl. 9})$$

$$\text{Anzahl der gebundenen Proteinmoleküle je NP } N_{\text{Prot/NP}} =$$

$$N_{\text{Prot geb}} \cdot 6.022 \cdot 10^{23} \cdot 10^{-9} / N_{\text{NP}} \quad (\text{Gl. 10})$$

Wobei:

$6.022 \cdot 10^{23}$ Avogadro-Zahl

$$\text{Proteinbedeckte NP-Oberfläche [\%]} =$$

$$(\text{Anlagerungsfläche des Proteins [nm}^2\text{]} \cdot N_{\text{Prot/NP}} / O) \cdot 100 \quad (\text{Gl. 11})$$

4. Ergebnisse

4.1. Evaluierung und Optimierung bestehender Protokolle mit Hilfe von Modell-NP

Die bereits im Labor vorhandenen Protokolle wurden zunächst für die vorliegende Arbeit angepasst, damit anschließend die weiteren Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

4.1.1. Abtrennen der NP-Protein-Komplexe durch Zentrifugation

Aufgrund der Tatsache, dass die eingesetzten NP schwerer sind als die verwendeten Proteine, konnten die in einer Proteinlösung befindlichen NP durch Zentrifugation abgetrennt werden.

4.1.1.1. Ermittlung der erforderlichen NP-Zentrifugierzeiten

Neben den spezifischen Eigenschaften der NP sind zur Ermittlung der notwendigen Zentrifugationszeit der in Suspension befindlichen NP auch verschiedene Parameter der Zentrifuge mit einzubeziehen. Zudem muss die Füllmenge des Reaktionsgefäßes berücksichtigt werden, weil diese einerseits maßgeblich ist für die Strecke die ein NP zurücklegen muss bis es am Gefäßboden angelangt ist und andererseits der Füllstand die Entfernung zum Rotationsmittelpunkt und somit die Beschleunigung zu Beginn der Zentrifugation festlegt.

Für die Strecke zwischen dem rotationsachsennahen Meniskusstand (Punkt A) und einem Punkt (Punkt B), der rotationsachsennah am Rand der Rotorbohrung liegt, wurde eine Länge von 6 mm gemessen (s. 3.2.1.5.).

Mit Hilfe dieses Wertes wurde der Rotations-Radius ($r_{\min}(1 \text{ ml})$, $r_{\min}(100 \mu\text{l})$) am oberen Meniskusstand für die beiden verwendeten Volumina mit Hilfe der unter 3.2.1.5. angegebenen Gleichungen (Gl.1 und Gl. 2) errechnet:

$$r_{\min}(1 \text{ ml})= 29 \text{ mm}, \quad r_{\min}(100 \mu\text{l})= 44 \text{ mm}$$

Die unten stehende Tabelle (Tab. 1) zeigt die mit Hilfe dieser Werte errechneten Abzentrifugationszeiten für die in Suspension befindlichen NP bei RT (23 °C) und 14000 rpm (Mikroliterzentrifuge) bzw. 50000 rpm (Ultrazentrifuge) und einer zu zentrifugierenden Probenmenge von 1 ml bzw. 100 μl :

Ergebnisse

	1 ml		100 µl	
	Mikroliter-zentrifuge	Ultrazentrifuge	Mikroliter-zentrifuge	Ultrazentrifuge
Zentrifugalbeschleunigung am oberen Flüssigkeitsmeniskus	ca. 11800 g	ca. 81000 g	ca. 14200	ca. 123000 g
PS, 50 nm, ρ[g/ml]=1.03		1h 25 min		30 min
Printex G, 50 nm, ρ[g/ml]=1.5	30 min		10 min	
Printex 90, 14 nm, ρ[g/ml]=1.5	6 h			25 min
TiO ₂ P25, 20nm, ρ[g/ml]=4.26	30 min		10 min	
TiO ₂ , 4.5 nm, ρ[g/ml]=4.26	14 h			40 min
SiO ₂ , 7 nm, ρ[g/ml]=2.32	14 h			40 min

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Zentrifugen und die Dauer der Zentrifugation bei NP aus unterschiedlichem Material (PS = Polystyrol) und verschiedenen Probenvolumina

4.1.1.2. Abzentrifugierbarkeit der verwendeten NP und Proteine

Das oben beschriebene Abtrennverfahren von NP durch Zentrifugation wurde experimentell überprüft.

Polystyrol-NP (PS-NP) liefern im Bio-Rad Protein-Assay konzentrationsabhängig Messwerte. Durch Vergleich der aus dem Zentrifugationsüberstand erhaltenen Messwerte im Bio-Rad Protein-Assay mit der Kontrolle (jeweils nicht zentrifugierten NP-Suspension) kann beurteilt werden, welcher Anteil der NP tatsächlich durch die Ultrazentrifugation abzentrifugiert und pelletiert wird. Abb. 11 zeigt die Messwerte aus dem Protein-Assay der zentrifugierten NP-Suspension als Prozentanteil der Kontrolle: die NP konnten mit Hilfe der Zentrifugationen zu ca. 85 % - 90 % abzentrifugiert werden.

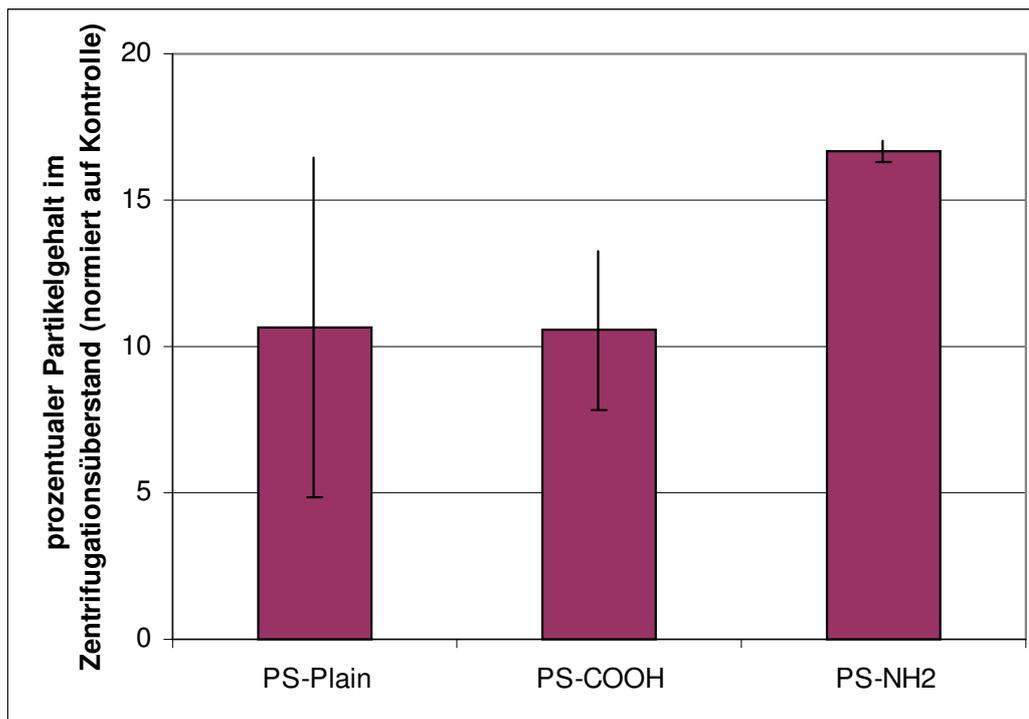


Abb. 11: Reduktion des NP-Gehaltes im Überstand durch Ultrazentrifugation einer NP-Suspension (2 mg/ml). Normierung der Messwerte aus dem Bio-Rad Protein-Assay auf die Messwerte der Kontrolle (nicht zentrifugierte Suspensionen) (n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

Die im Überstand verbliebenen NP können insbesondere im Fall der aminierten PS-NP (PS-NH₂-NP) bei der Datenerhebung mit dem später dargestellten Bio-Rad Protein-Assay stören; daher mussten bei Untersuchungen mit diesen NP die erhobenen Daten korrigiert werden (s. 4.1.2.).

Mit Hilfe einer reinen BSA-Lösung (100 µl; 360 µg/ml) konnte nachgewiesen werden, dass durch eine 30-minütige Ultrazentrifugation die Proteine nicht signifikant abzentrifugiert wurden. Der mit dem Bio-Rad Protein-Assay bestimmte Proteingehalt in der nicht zentrifugierten Proteinlösung einerseits und im Überstand der zentrifugierten Probe (Dreifach-Ansatz) andererseits, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4.1.2 Korrektur der Messwerte aus dem Bio-Rad Protein-Assay

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die NP größtenteils abzentrifugiert werden können (siehe Abb. 11), können die nach der in Tab. 1 dargestellten Zentrifugation noch im Überstand vorhandenen NP (Ausgangskonzentration 2 mg NP/ml Lösung) einen deutlich von Null verschiedenen Messwert im Bio-Rad Protein-Assay hervorrufen. Die Höhe dieses Wertes ist jedoch von der NP-Art abhängig. Ein deutlicher Effekt lässt sich nur bei den PS-NH₂-NP darstellen, bei den anderen PS-NP liegen die gemessenen Werte

Ergebnisse

innerhalb der Messgenauigkeit. Durch Subtraktion des Blindwertes (A. dest.) vom Messwert des Zentrifugationsüberstandes einer PS-NH₂-NP-Suspension wurde ein Korrekturwert von 53 µg/ml für BSA bei Verwendung von 2 mg PS-NH₂-NP/ml ermittelt. Dieser Korrekturwert wiederum wird vom Messwert einer zentrifugierten Protein-NP-Suspension subtrahiert, so dass der korrigierte Messwert die im Überstand noch vorhandene Proteinkonzentration der Probe wiedergibt.

4.1.3. Aufbereitung der an NP gebundenen Proteine für die Darstellung auf einem SDS-PA-Gel

Nach dem Pelletieren der NP-Protein Komplexe mittels Zentrifugation zeigte sich, dass durch bloßes Abkippen der proteinhaltige Überstand nicht vollständig entfernt werden kann und zudem ein Teil der Proteine auch an die Gefäßwand bindet. Daher war es nötig, das NP-Protein Pellet zu waschen und es vor einer weiteren Behandlung mit SDS-haltigen Reagenzien in ein neues Gefäß zu überführen (s.4.1.3.1.). Es zeigte sich auch, dass der im ursprünglichen Protokoll verwendete Lysis-Kit nicht in allen Fällen gleich gut in der Lage war, die entstandenen NP-Protein-Bindungen zu lösen. Es wurde daher eine alternative Möglichkeit zur Aufbereitung der an NP gebundenen Proteine erarbeitet, s. 4.1.3.4.

4.1.3.1. Überführen des Pellets in ein neues Gefäß

In einem Kontrollversuch (BSA-Lösung (200 µg/ml) ohne NP-Zugabe) wurde nach Inkubation und Zentrifugation die Proteinlösung vollständig entfernt und 100 µl Lysis-Kit in das leere Gefäß gegeben. Nach 15 min Reaktionszeit unter gelegentlichem Schütteln wurde der Gefäßinhalt gewonnen und mit Hilfe eines SDS-PA-Gels dargestellt, siehe Abb. 12. Dadurch wurde gezeigt, dass Proteine an die Gefäßwand binden können und der Lysis-Kit Proteine ablöst die an der Gefäßwand haften und nicht an NP gebunden haben. Um derartige Artefakte zu vermeiden ist es erforderlich, die abzentrifugierten NP-Protein-Komplexe vor Versetzen mit Lysis-Kit in ein neues Gefäß zu überführen.

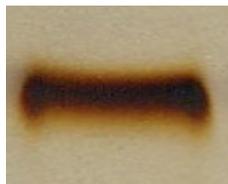


Abb. 12: Inkubation und Zentrifugation von 2.5 ml einer BSA-Lösung (200 µg/ml, Ursprungsspezies: Ratte) in einem PP-Reaktionsgefäß: Darstellung der nach Abkippen des Überstandes noch an der Gefäßwand haftenden und durch 100 µl Lysis-Kit abgelösten und somit ca. 25-fach aufkonzentrierten Proteine.

Ergebnisse

4.1.3.2. Waschen des Pellets

Durch die Zentrifugation einer mit NP versetzten Proteinlösung werden zwar die entstandenen NP-Protein-Komplexe pelletiert, allerdings ist nur durch Abkippen des Überstandes noch nicht gewährleistet, dass im Gefäß nur Proteine verbleiben, die fest an NP gebunden haben, da sich der Überstand zum einen nicht vollständig entfernen lässt und sich zum anderen eventuell noch freies Protein zwischen den pelletierten NP befindet. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden wurden Waschschriffe eingeführt, die sich an die Zentrifugation anschließen. Durch zweimaliges Waschen des Pellets mit PBS konnten meist nicht konstant an NP gebundene Proteine entfernt werden. Zur Absicherung des Vorganges wurde das NP-Protein Pellet dreimal gewaschen. Abb. 13 zeigt vergleichend Proteinmengen im Überstand nach den einzelnen Waschschriffen eines Versuches mit aminierten PS-NP.

PS-COOH-NP und PS-Plain-NP binden mehr BSA als die PS-NH₂-NP, so dass die bei den PS-NH₂-NP als ausreichend ermittelten Waschschriffe für die anderen untersuchten PS-NP auf jeden Fall ausreichend sind.



Abb. 13: 900 µl einer BSA-Lösung (400µg/ml) wurde mit 100µl einer PS-NH₂-NP-Suspension (2 mg/ml) versetzt und zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde PBS (1.5 ml) als Waschflüssigkeit zugegeben und erneut zentrifugiert. Nach Abnehmen des dadurch erhaltenen Überstandes (Lane 1) wurde der eben beschriebene Waschschriff noch zweimal wiederholt und wiederum der Überstand im PA-Gel aufgetragen (Lane 2 und 3).

4.1.3.3. Wahl geeigneter Proteinkonzentrationen

Bei Verwendung der kommerziell erhältlichen Minigele wurde durch Titrationsversuche mit PS-Plain-NP eine BSA-Arbeitskonzentration von 0.4 mg/ml ermittelt. Diese NP binden wie in Vorversuchen ermittelt vergleichsweise viel BSA, so dass die Ausgangsproteinkonzentration so gewählt werden musste, dass auch nach Abtrennen der NP-Proteinkomplexe noch Protein im Überstand mit dem Bio-Rad Protein-Assay bzw. mit einem SDS-PA-Gel nachweisbar war. Abb. 14 zeigt die bei unterschiedlichen NP-Konzentrationen erhaltenen Proteinbanden im SDS-PA-Gel (Depletions-Methode s. 3.2.1.7.). Selbst bei der Verwendung der höchsten getesteten NP-Konzentration (2 mg/ml) konnte beim Auftrag des Überstandes auf das SDS-PA-Gel nach der Ultrazentrifugation noch ein deutliches Signal ermittelt werden. Es wurde daher bei den Versuchen mit diesen Gelen angenommen, dass mit den üblicherweise verwendeten Konzentrationen

Ergebnisse

(0.4 mg Protein/ml, 0.25 -2 mg NP /ml) auch bei schlechter an Protein bindenden NP wie PS-COOH-NP und PS-NH₂-NP Effekte messbar sein würden.

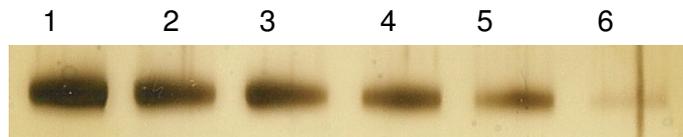


Abb. 14: Darstellung der nach Depletion durch verschiedene NP-Mengen (PS-NP ohne Oberflächenmodifikationen, Ø 50 nm) im Überstand verbliebenen Proteine bei einer BSA-Konzentrationen von 0.4 mg/ml; Darstellung auf einem SDS-PA-Minigel ohne zusätzliche Konzentrierung der Proteine in den Proben (Lanes 1-6: 0/0.25/0.5/1.0/1.5/2.0 mg NP/ml)

4.1.3.4. Alternative Präparation der an NP gebundenen Proteine

Durch Auftragen der gewaschenen NP-Protein-Pellets auf ein SDS-PA-Gel konnten unabhängig von der Wirksamkeit des Lysis-Kits die jeweils an die NP gebundenen Proteine dargestellt werden.

Es kann nicht bei allen NP gewährleistet werden, dass tatsächlich alle zuvor gebundenen Proteine mit Hilfe des Lysis-Kit abgelöst werden und somit quantitativ nachgewiesen werden können. Abb. 15 verdeutlicht die Problematik am Beispiel von an PS-NH₂-NP gebundenem BSA.



Abb. 15: Bindung von BSA an aminierte PS-NP; Darstellung des BSA-Gehaltes in verschiedenen Stadien und Fraktionen des Versuches (Lane 1: ursprünglicher Gesamtgehalt an Protein): die Proteinmenge auf einem unbehandelten NP-Protein-Pellet (Lane 2) und die nach Versetzen des Pellets mit Lysis-Kit noch auf dem Pellet verbliebene Proteinmenge (Lane 3) sind in etwa gleich. Entsprechend finden sich nach Versetzen mit Lysis-Kit im gewonnen Überstand keine abgelösten Proteine (Lane 4).

Der Lysis-Kit als solcher ist wie gezeigt so gut wie nicht in der Lage, die Proteine von den PS-NH₂-NP abzulösen. Durch Versetzen des NP-Protein Pellets mit dem SDS haltigen Probenpuffer, das Erhitzen der Proben und das Anlegen der elektrischen Spannung am Gel werden die Proteine und die NP getrennt, so dass die Proteine im Gel wandern und gefärbt werden können, während die NP in der Proben tasche des Gels zurückbleiben.

Ergebnisse

4.2. Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels Bio-Rad Protein-Assay mit Hilfe von Modell-NP (Depletions-Methode)

Bei der unter 3.2.1.7 beschriebenen Methodik wurde der nach Abtrennen der NP-Protein-Komplexe verbliebene Proteingehalt im Überstand bestimmt. Durch den Vergleich mit einer Kontrolle ohne NP konnte durch Subtraktion ermittelt werden, wie viel Protein an die NP gebunden hat.

Im Vorfeld dieser Versuche war es notwendig, den Standard Bio-Rad Protein-Assay auf diese Versuche anzupassen und zu validieren. Die Kalibrierung des Assay beruht auf der Messung der optischen Dichte von mehreren bekannten Konzentrationen einer BSA-Lösung. Eine typische Standardkurve ist in der Abb. 16 dargestellt.

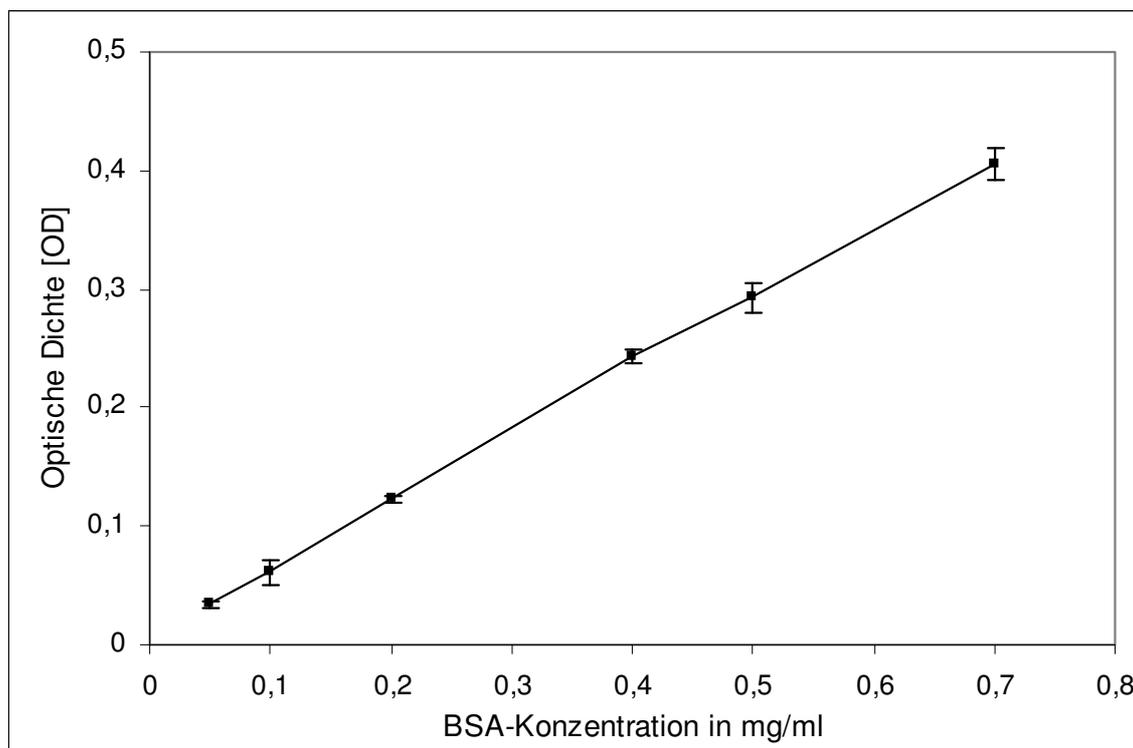


Abb. 16: typische Standardkurve aus verschiedenen BSA-Konzentrationen im Bio-Rad Protein-Assay bei Kalibrierung von 0.05 – 0.7 mg/ml: lineare Abhängigkeit von eingesetzter BSA-Konzentration und optischer Dichte (OD) der Lösung nach Versetzen mit Bio-Rad-Reagenz (n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

Im Konzentrationsbereich zwischen 25 und 400 µg/ml wird mit Abweichungen von maximal 8 % gemessen, bei 12.5 µg/ml beträgt die Ungenauigkeit ca. 12 %, bei noch niedrigeren Konzentrationen steigt die Ungenauigkeit weiter an (95 % bei 6.25 µl/ml).

Zusätzlich wurden die Proben (Zentrifugationsüberstände) aus Versuchen mit BSA und verschiedenen Konzentrationen an PS-NP parallel mit dem Biorad Protein-Assay und

Ergebnisse

mittels eines Elektropherogrammes (SDS-PAGE, Auftrag der Überstände auf ein SDS-PA-Gel) ausgewertet. Wie in Abb. 17 ersichtlich waren die Ergebnisse nicht signifikant voneinander abweichend.

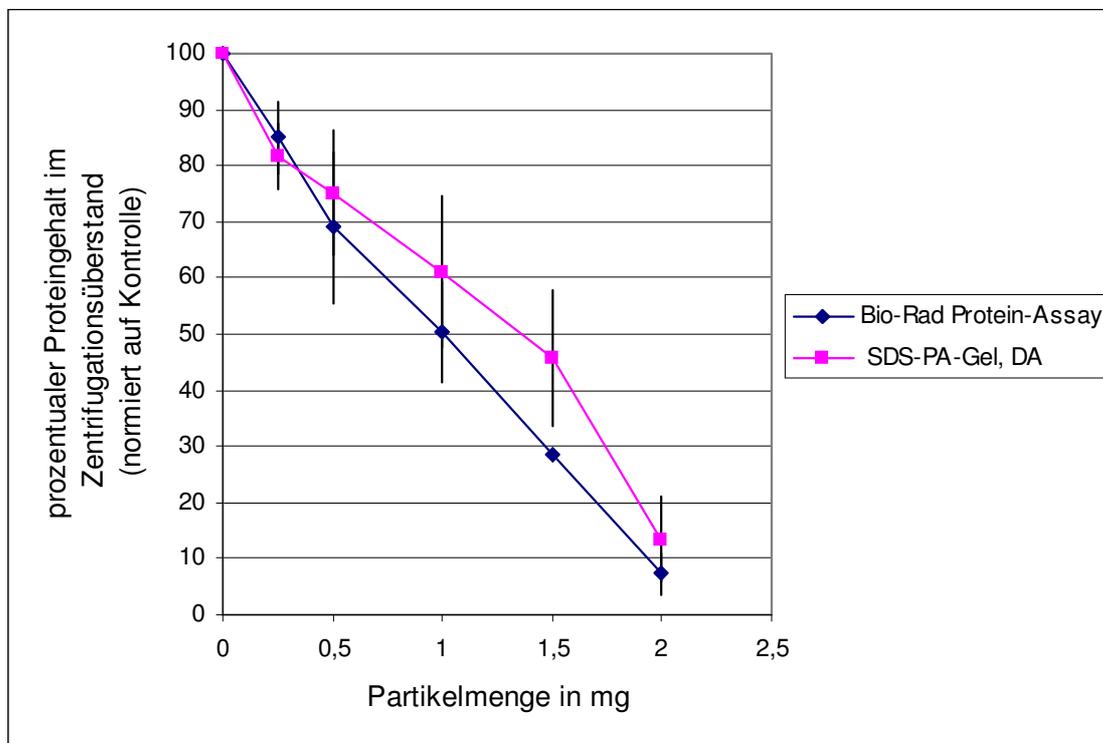


Abb. 17: Dosisabhängigkeit des BSA-Gehalts im Überstand nach Versetzen einer BSA-Lösung (0.4 mg/ml) mit unterschiedlichen Mengen an PS-Plain-NP und Zentrifugation: Vergleich der Auswertung mittels Bio-Rad Protein-Assay und der durch Auftragen der Überstände auf ein SDS-PA-Gel und densitometrischer Auswertung (DA) erhaltenen Werte (n=2)

4.3. Bindung von Proteinen an verschiedene Modell-NP

4.3.1. Dynamische Streulichtmessung und Messung des pH-Wertes von NP-Suspensionen

Für die drei verwendeten monodispersen PS-NP, die alle mit einem zertifizierten Durchmesser von 50 nm (Standardabweichung ist 10 nm) angegeben worden sind, wurde eine Größenbestimmung basierend auf dynamischer Lichtstreuung mit dem Malvern Particle Sizer durchgeführt. Tab. 2 zeigt die Messwerte für die einzelnen NP in verschiedenen Lösungen.

Ergebnisse

	Durchmesser in A. dest. [nm]	Durchmesser in PBS [nm]	Durchmesser in BSA-Lsg. [nm]	Durchmesser in Transferrin-Lsg. [nm]
PS-Plain	70	50	1190	930
PS-COOH	110	110	110	110
PS-NH ₂	170	110	90	90

Tab. 2: Größe der PS-NP in A. dest, PBS, BSA-Lösung (0.36 mg/ml) und Transferrin-Lösung (0.36 mg/ml)

In A. dest. suspendiert war der hydrodynamische Durchmesser der PS-Plain-NP am kleinsten, nämlich überwiegend bei einem Durchmesser von 70 nm. Für die aminierten NP (PS-NH₂-NP) und karboxylierten NP (PS-COOH-NP) dagegen wurden Durchmesser von 170 bzw. 110 nm bestimmt (s. Tab. 2 und Abb. A-8).

Bei Suspension in PBS haben die aminierten PS-NP dieselbe Größe wie die karboxylierten PS-NP (110 nm). Letztere sind somit in A. dest. und in PBS gleich groß. Die PS-Plain-NP liegen ebenfalls in etwa derselben Größenordnung wie in A. dest. (s. Tab. 2 und Abb. A-9).

In BSA- und Transferrin-Lösung (Lösungsmittel PBS) sind die PS-Plain-NP mit ca. 1.2 µm bzw. 930 nm wesentlich größer als in PBS (Tab. 2 und Abb. 18 sowie Abb. 19).

Diese Größenverschiebung nach Kontakt mit Proteinen belegt bereits eine Interaktion mit diesen und lässt auf Bindung schließen (siehe Diskussion).

Ergebnisse

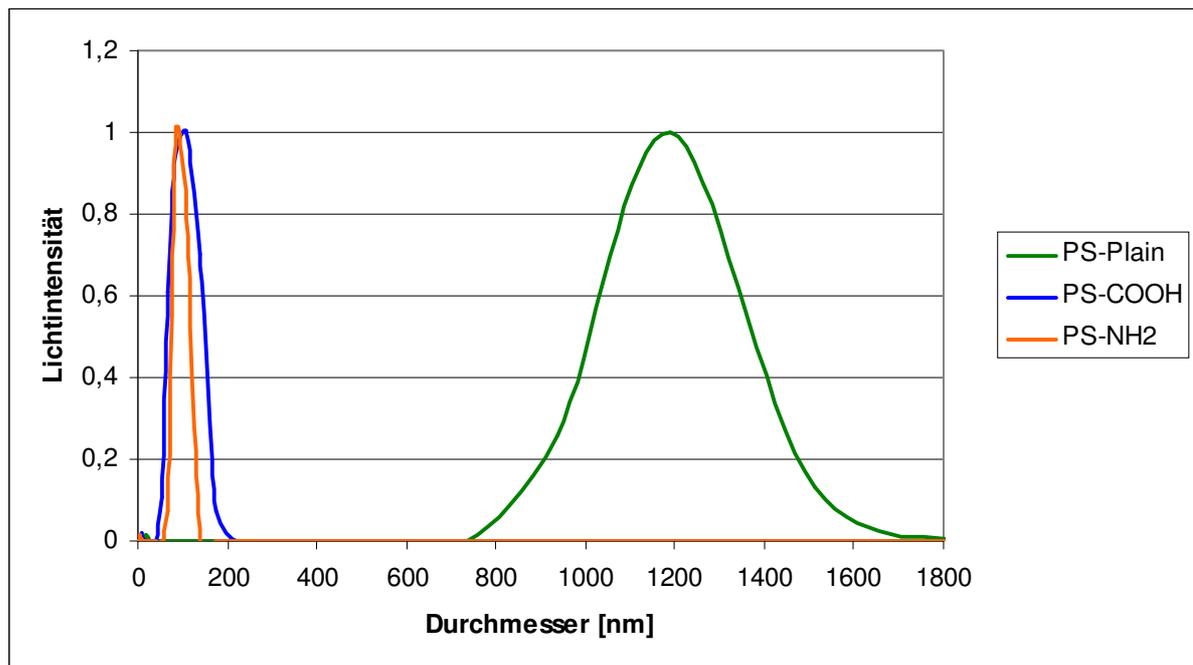


Abb. 18: Größenverteilung verschiedener PS-NP (2 mg/ml) nach Inkubation mit BSA (0.4 mg/ml) in PBS: PS-Plain-NP ca. 1190 nm, PS-COOH-NP ca. 110 nm, PS-NH₂-NP ca. 90 nm

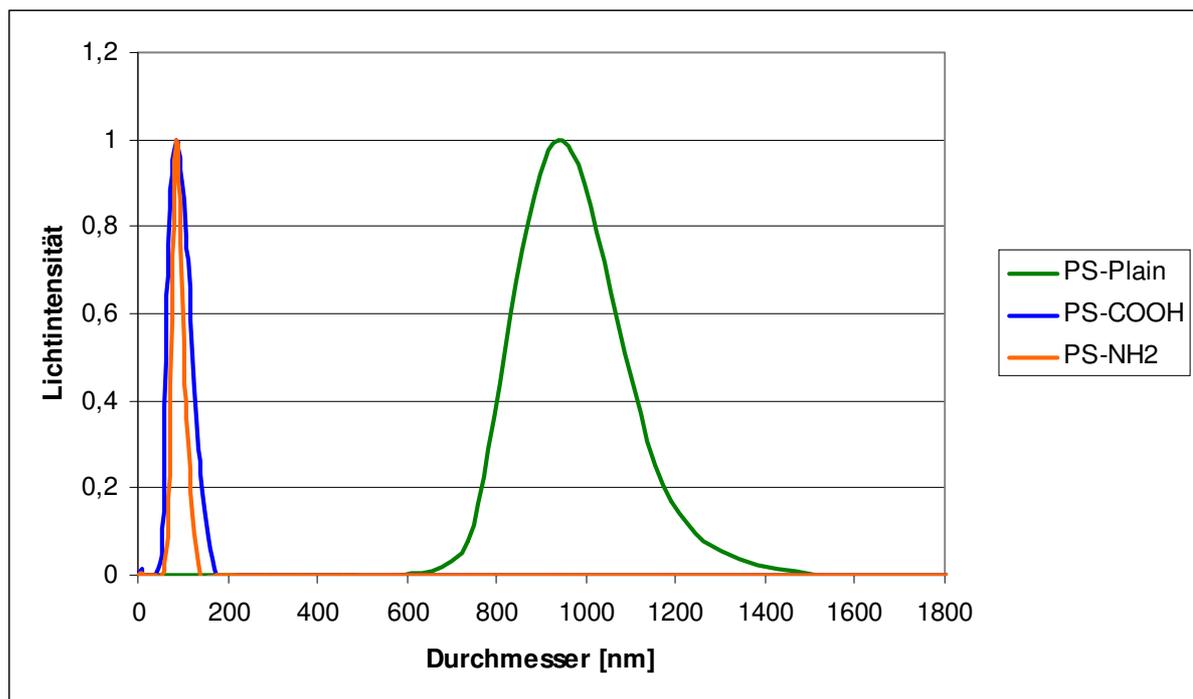


Abb. 19: Größenverteilung verschiedener PS-NP (2 mg/ml) nach Inkubation mit humanem Transferrin (0.4 mg/ml) in PBS: PS-Plain-NP ca. 930 nm, PS-COOH-NP ca. 110 nm, PS-NH₂-NP ca. 90 nm

Durch eigene Messungen wurde ermittelt, dass die karboxylierten Teilchen in höheren Konzentrationen eine leicht saure Reaktion zeigen, die aminierten Teilchen dagegen eine

Ergebnisse

basische. In geringeren Konzentrationen, wie sie in den Versuchsansätzen vorlagen, hat dies jedoch kaum mehr Einfluss auf den pH-Wert des Lösungsmittels. Wird als Lösungsmittel PBS gewählt, ist kein Effekt messbar (siehe Tab. 3).

<u>20 mg/ml in A. dest.</u>	pH-Wert
Plain	4.5
COOH	4
NH ₂	7
<u>2 mg/ml in A. dest.</u>	
Plain	4.5
COOH	4.5
NH ₂	ca. 6
<u>2 mg/ml in PBS mit pH 7.4</u>	
Plain	7
COOH	7
NH ₂	7

Tab.3: Einfluss verschiedener PS-NP auf den pH-Wert einer Lösung

4.3.2. Einfluss der Oberflächenmodifikation von NP

Bei Verwendung von PS-NP mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen (PS-Plain-NP, PS-COOH-NP, PS-NH₂-NP) und demselben Protein (BSA) zeigte sich, dass die Bindung wesentlich von den Eigenschaften der NP-Oberfläche abhängt. Die mit NP-Suspensionen (2 mg/ml) versetzten BSA-Lösungen (0.4 mg/ml) wurden zentrifugiert und die Proteingehalte des Überstandes einerseits und des Pellets andererseits wurden auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und durch Silberfärbung dargestellt (Abb. 20).

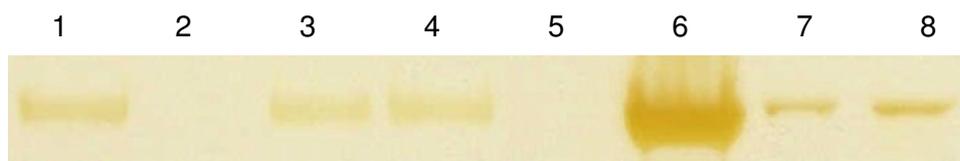


Abb. 20: BSA-Mengen jeweils im Zentrifugationsüberstand und im Pellet bei Verwendung verschiedener PS-NP (0.2 mg/ml in 0.36 mg/ml BSA), sowie in der Kontrolle (BSA-Lösung mit A. dest.): die Überstände enthalten freies nicht gebundenes Protein und die Pellets die gebundenen Proteine. (Überstände: Lane 1: BSA und A. dest. (Kontrolle), Lane 2: BSA und PS-Plain-NP, Lane 3: BSA und PS-COOH-NP, Lane 4: BSA und PS-NH₂-NP; Pellets: Lane 5: BSA und A. dest. (Kontrolle), Lane 6: BSA und PS-Plain-NP, Lane 7: BSA und PS-COOH-NP, Lane 8: BSA und PS-NH₂-NP)

Die PS-Plain-NP binden einen großen Teil des in Lösung gebrachten BSA (Abb. 20, Lane 6), so dass nach Zentrifugation bei den eingesetzten NP- und Proteinkonzentrationen kein

Ergebnisse

BSA mehr im Aliquot aus dem Überstand (1/50 der Gesamtmenge) nachgewiesen werden konnte (Abb. 20 Lane 2). Die anderen untersuchten NP (PS-NH₂-NP und PS-COOH-NP) binden im Vergleich zu den PS-Plain-NP ca. 90 % weniger BSA an ihrer Oberfläche (Abb. 20 Lane 7 und Lane 8, DA). Die Proteinlösung erfährt daher durch Abtrennen der NP-Protein-Komplexe bei diesen NP nur eine deutlich geringere Depletion gegenüber der Kontrolle (BSA-Lösung ohne NP, Abb. 20, Lane 1). Die Zentrifugationsüberstände im Vergleich mit Kontrolle sind in Abb. 20 Lane 1 - 4 dargestellt.

4.3.3. Einfluss des pH-Wertes

Die Proteinbindungskapazität der hier verwendeten PS-NP an BSA (0.36 mg/ml; PS-Plain-NP: 1 mg/ml, PS-COOH-NP und PS-NH₂-NP: je 2 mg/ml) wurde auch in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht (Abb. 21). Die aminierten und ungeladenen PS-NP zeigen in ihrem Bindungsverhalten keine Abhängigkeit vom pH-Wert, während die karboxylierten NP bei einem pH-Wert unterhalb von 5.4 signifikant mehr BSA binden als bei pH-Werten ab über 5.4 ($p < 0.05$) (s. Abb. 21).

Die PS-Plain-NP binden bei einer Konzentration von 2 mg/ml nahezu das gesamte angebotene BSA bei allen untersuchten pH-Werten, so dass pH-Wert bedingte Änderungen nicht erkennbar sind (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für die PS-Plain-NP aufgrund dieser starken Bindungsaktivität an BSA zusätzlich bei ausgewählten pH-Werten eine Suspension mit einer NP-Konzentration von 1 mg/ml verwendet, so dass beim physiologischen pH-Wert von 7.4 etwa 50 % des eingesetzten Proteins an NP gebunden wurden. Für die beiden anderen beim physiologischen pH-Wert sehr schwach bindenden NP (PS-NH₂-NP und PS-COOH-NP) wurden Suspensionen mit einer NP-Konzentration von 2 mg/ml verwendet. Die Anwendung von Barbiturat-Puffer ändert nichts Wesentliches an den Bindungsverhältnissen der erwähnten PS-NP bei pH 7.4 gegenüber der Verwendung von PBS (Daten nicht gezeigt), daher konnten Messwerte aus Versuchen mit PBS und Barbituratpuffer zusammengefasst werden.

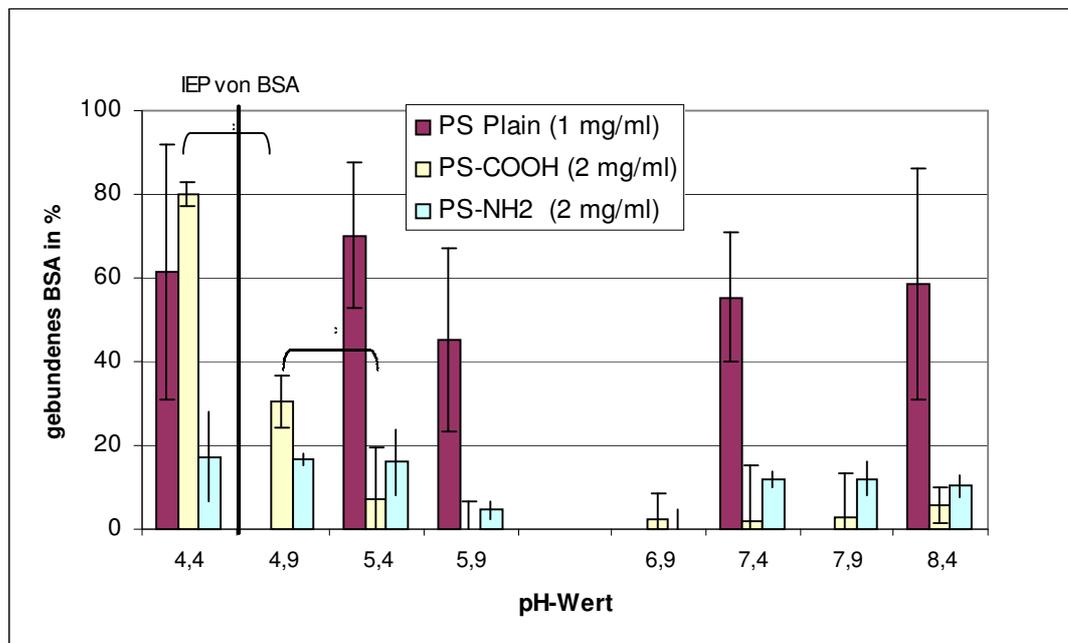


Abb. 21: Bindung von BSA (0.36 mg/ml) an ausgewählte NP (PS-Plain-NP: 1 mg/ml, PS-COOH-NP und PS-NH₂-NP: je 2 mg/ml) in Abhängigkeit vom pH-Wert (n=3 für PS-Plain-NP und PS-COOH-NP, n=2 für PS-NH₂-NP; * bei p<0.05). Der Isoelektrische Punkt (IEP) bezeichnet den pH-Wert, bei dem ein Molekül im elektrischen Feld nicht wandert, da die Summenladung neutral ist.

4.3.4. Einfluss der NP-Konzentration und vergleichende Betrachtung der Bindungskapazität der NP: Bindungsindex

Für den Wert des Bindungsindex (s. 3.2.1.7.8.) konnte sowohl eine direkte Abhängigkeit zur eingesetzten NP-Konzentration sowie eine Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation der NP nachgewiesen werden.

4.3.4.1 Bindungsindex von BSA

Die Bindung von BSA an verschiedene PS-NP wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten NP-Konzentration untersucht. Durch Bestimmung der nach Abtrennen der NP-Protein-Komplexe noch im Überstand verbliebenen Proteinmenge mittels Bio-Rad Protein-Assay konnte für PS-Plain-NP gezeigt werden, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen der eingesetzten NP-Konzentration und der Konzentration des gebundenen Proteins besteht (s. Abb. 22).

Ergebnisse

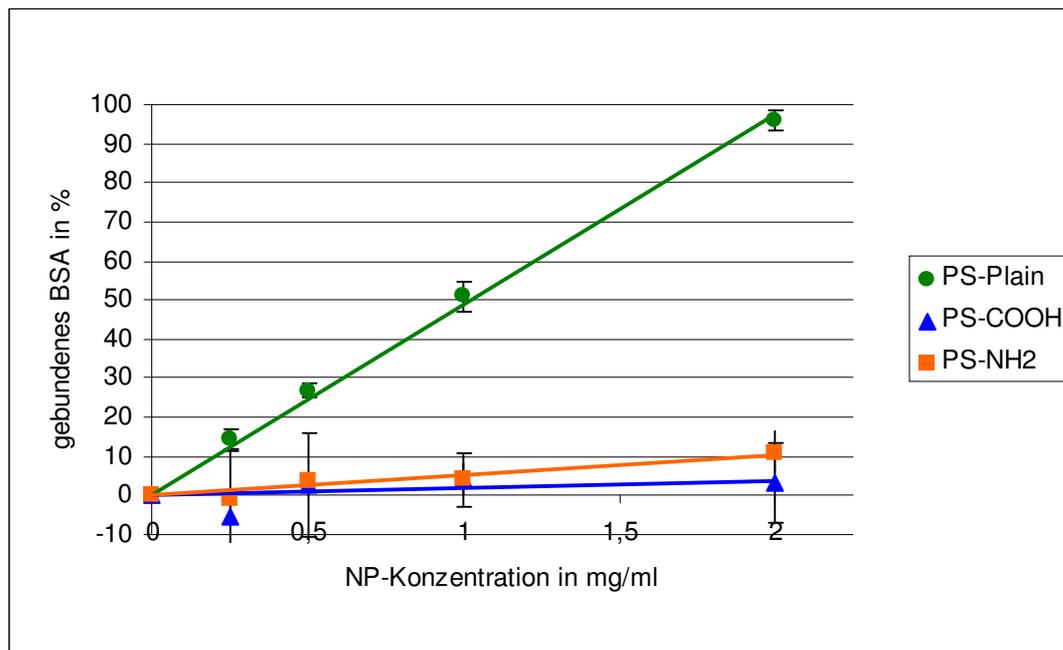


Abb. 22: Darstellung der Protein (BSA)-Depletion des Überstandes nach Abtrennen NP-Protein-Komplexe in Abhängigkeit von der NP-Dosis (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) ($n=3$, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an). Die Geraden stellen jeweils die lineare Regression durch den Nullpunkt dar.

Bei den PS-NP ist eine lineare Abhängigkeit von eingesetzter NP-Konzentration und Proteinbindung feststellbar, bei der PS-Plain NP-Konzentration von 2 mg/ml werden die im Ansatz vorhandenen Proteine fast vollständig durch die NP gebunden, wohingegen die karboxylierten und aminierten PS-NP unabhängig von ihrer Konzentration nur wenig BSA binden.

Der auf die eingesetzte NP-Konzentration bezogene Bindungsindex (BI_{Masse} , entsprechend der Herleitung mit der Einheit „% (0.36mg BSA) / mg NP“) beträgt 49 für PS-Plain-NP und ist somit fast 25-mal höher als der BI_{Masse} der PS-COOH-NP, welcher nur einen Wert von 2 erreicht. Im Falle der PS-NH₂-NP liegt der BI_{Masse} bei 5. (s. Tab. 4). In der Annahme, dass die NP eine ideale Kugel darstellen und die gebundenen BSA-Moleküle gleichmäßig auf die in der Probe vorhandenen NP verteilt sind konnte aus den Messdaten mit Hilfe von Gleichung 10 (s. 3.2.3.) errechnet werden, dass je NP die PS-Plain-NP ca. 105 BSA-Moleküle binden, die PS-NH₂-NP 5 und die PS-COOH-NP nur 3. Unter Annahme einer unspezifischen Bindung wurde davon ausgegangen, dass sich die Proteine mit der größeren der beiden möglichen Seitenflächen ($9 \cdot 5.5 \text{ nm}^2$) anlagern. Mit Hilfe von Gl. 11 (s. 3.2.1.7.8.) konnte somit der mit BSA bedeckte Anteil der NP berechnet werden: im Falle der PS-Plain-NP liegt dieser bei 66 %, die beiden geladenen PS-NP

Ergebnisse

werden jeweils zu weniger als 0.1 % mit BSA bedeckt.

4.3.4.2 Bindungsindex von humanem Transferrin

Neben BSA, welches als Modellprotein diente, wurde ergänzend zu den unter 4.3.4.1 beschriebenen BSA-Versuchen auch die dosisabhängige Bindung dieser NP an **humanes Transferrin** untersucht, die Dosisabhängigkeit ist in Abb. 23 dargestellt.

Auch hier zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der eingesetzten NP-Konzentration und der Konzentration des gebundenen Proteins bei den PS-Plain-NP, wobei bereits bei einer geringeren NP-Konzentration das gesamte Protein an die NP gebunden ist als dies bei BSA und PS-Plain-NP der Fall ist (Abb. 23): entsprechend höher ist auch der BI_{Masse} , er liegt bei 56. Auch im Fall der PS-COOH-NP ist der BI_{Masse} mit 13 mehr als sechsmal so hoch wie bei BSA. Die PS-NH₂-NP binden etwas mehr Transferrin als die PS-COOH-NP, der errechnete BI_{Masse} liegt bei 5 (s. Tab. 4).

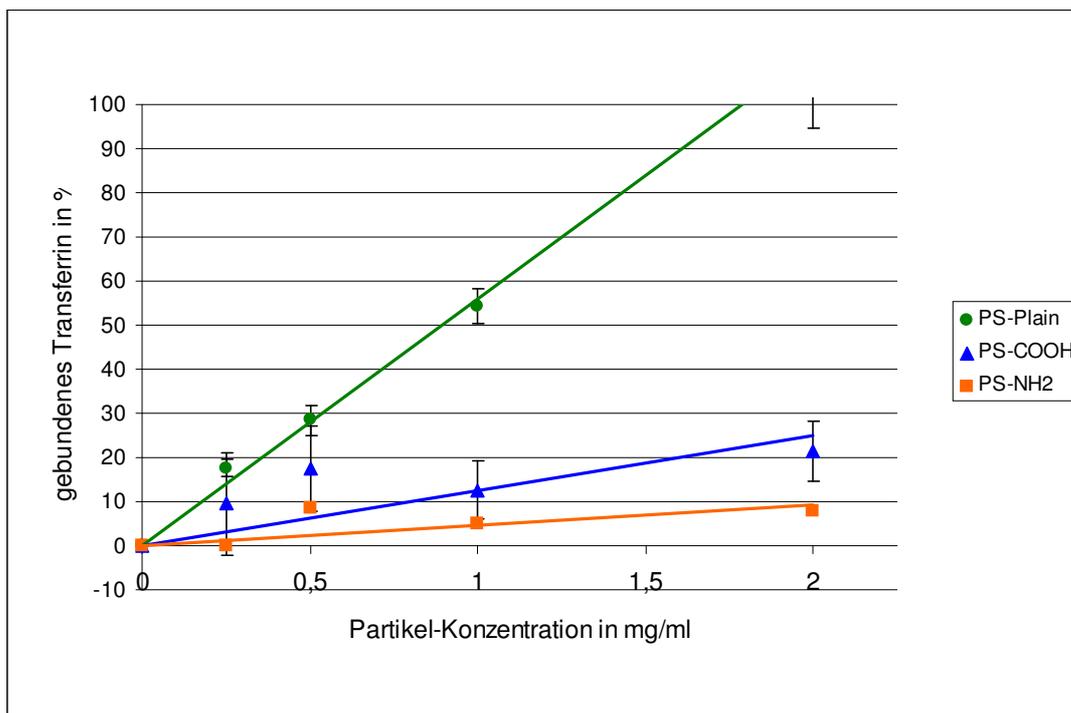


Abb. 23: Darstellung der Protein (Transferrin)-Depletion des Überstandes durch Abtrennen PS-NP in Abhängigkeit von der NP-Dosis (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) (n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an) Die Geraden stellen jeweils die lineare Regression durch den Nullpunkt dar.

Für die PS-Plain-NP ergibt sich eine Proteinbindung von 90 Transferrin-Molekülen pro NP, für die PS-COOH-NP sind es 3 Moleküle und für die PS-NH₂-NP sind es 7. Auch für Transferrin wurde zunächst analog zu BSA angenommen, dass es sich mit der

Ergebnisse

größtmöglichen Seitenfläche ($16.1 \cdot 8.0 \text{ nm}^2$) an die NP anlagert. Im Falle der PS-Plain-NP errechnet sich damit jedoch eine Belegung von 148 %, bei Anlagerung mit der Fläche von $16.1 \cdot 6.2 \text{ nm}^2$ ergäbe sich eine Oberflächenbedeckung von 115 %. Es wird daher angenommen, dass sich die Proteine in diesem Fall platzsparender anlagern bzw. sich ggf. umlagern und zumindest einzelne Transferrin-Moleküle mit der kleinstmöglichen Fläche von $16.1 \cdot 6.2 \text{ nm}^2$ oder sogar der kleinstmöglichen Fläche von $8.0 \cdot 6.2 \text{ nm}^2$ an diese NP binden. Würden sich alle Transferrin-Moleküle mit der schmalen Seitenfläche an die PS-Plain-NP anlagern, wären lediglich 57 % der Oberfläche bedeckt. Im Falle der schlechter bindenden NP wird wiederum angenommen, dass die einzelnen Transferrin-Moleküle sich mit der größtmöglichen Fläche anlagern, da genügend freie NP-Oberfläche zur Verfügung steht. Unter dieser Voraussetzung errechnet sich eine Bedeckung von 4 % der Oberfläche für die PS-COOH-NP und von 12 % für die PS-NH₂-NP.

4.3.4.3. Bindungsindex von Apolipoprotein A-1

Aufgrund seiner in der Literatur beschriebenen interessanten Bindungseigenschaften wurde das Bindungsverhalten von **Apolipoprotein A-1** (Apo A-1) an die verschiedenen PS-NP untersucht. Da davon ausgegangen wurde, dass auch bei Apo A-1 eine lineare Abhängigkeit der Proteinbindung von der Menge der eingesetzten NP besteht, wurden die Untersuchungen mit nur einer NP-Konzentration durchgeführt. Aufgrund der im Laufe der bisherigen Versuche festgestellten methodischen Herausforderungen wurden die Ergebnisse in diesem Fall durch Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden abgesichert. Die Messwerte wurden mit dem Bio-Rad Protein-Assay und außerdem durch das Auftragen des nach der Zentrifugation erhaltenen Überstandes sowie dem Auftragen der NP-Protein-Komplexe auf ein SDS-PA-Gel densitometrisch ermittelt. Die densitometrischen Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zu dem Bio-Rad Protein-Assay, ähnlich wie dies auch bei BSA und Transferrin beobachtet wurde. Daher beschränkt sich Abb. 24 auf die Darstellung der Ergebnisse aus dem Bio-Rad Protein-Assay.

Ähnlich wie bei BSA und Transferrin binden die PS-NP ohne Oberflächenfunktionalisierung sehr viel Apolipoprotein A-1 (ca. 85 %), die PS-COOH-NP-NP binden nur ca. 60 % weniger Apo-A1 als die PS-Plain-NP, somit ist der Unterschied weniger ausgeprägt als bei BSA und Transferrin. Auch der BI_{Masse} spiegelt diesen Sachverhalt wieder: dem Wert von 43 bei den PS-Plain-NP steht ein Wert von 13 (PS-COOH-NP) gegenüber (s. Tab. 3).

Im Falle des Apo A-1 ist keine Bindung an die PS-NH₂-NP messbar, der BI_{Masse} liegt in diesem Fall rechnerisch bei -5.

Ergebnisse

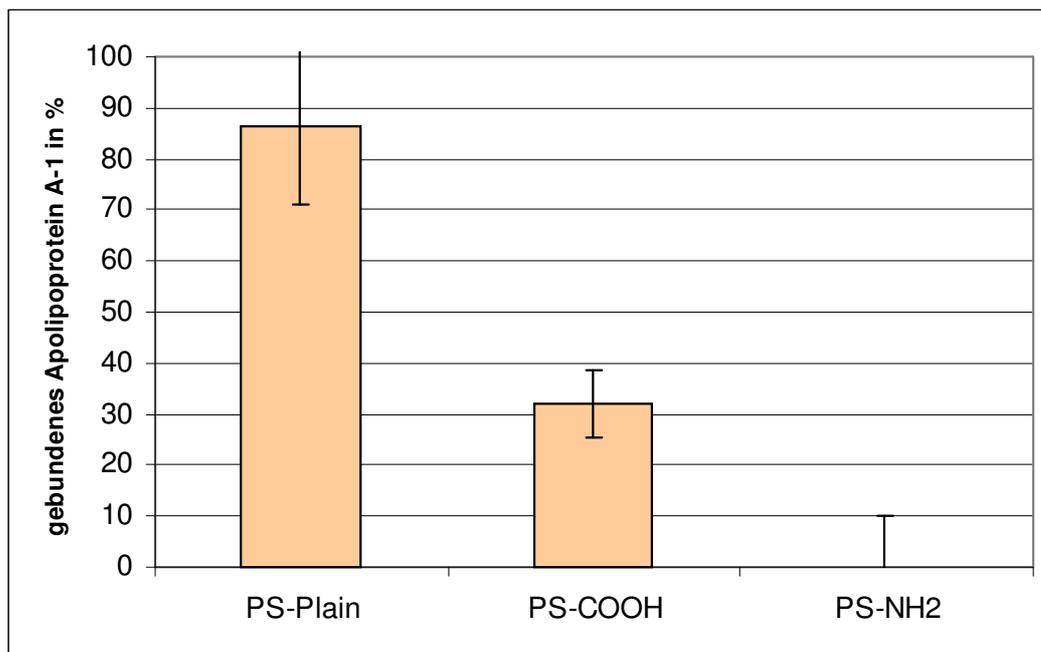


Abb. 24: Darstellung der Bindung von Apo A-1 (0.36 mg/ml) an jeweils verschiedene PS-NP (2 mg/ml) in Abhängigkeit von der eingesetzten NP-Art (Gesamtvolumen der Versuchsansätze: 100 μ l); Werte ermittelt durch Proteinbestimmung aus dem Überstand mittels Bio-Rad Protein-Assay (n=3), die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Pro NP werden im Falle der PS-Plain-NP ca. 222 Moleküle Apo A-1 gebunden, im Falle der PS-COOH-NP sind es 67 Moleküle. Die PS-NH₂-NP binden wie bereits erwähnt kein Apo A-1. Unter Annahme der Anlagerung von Apo A-1 mit der Fläche von 10.8 * 8.8 nm ergibt sich eine Oberflächenbedeckung von 82 % für die PS-COOH-NP und von knapp 300 % für die PS-Plain-NP, so dass im Falle der PS-Plain-NP eine Anlagerung vorwiegend mit einer kleineren Seitenfläche angenommen wird.

Bei vergleichender Betrachtung der drei untersuchten Proteine kann somit ausgesagt werden, dass die PS-Plain-NP alle untersuchten Proteine in großem Umfang binden.

Die PS-COOH-NP binden an BSA schlechter als an die beiden anderen Proteine, wohingegen die PS-NH₂-NP (2 mg/ml) an alle untersuchten Proteine schlecht binden, besonders gering ist aber die Bindung an Apo A-1.

Ergebnisse

	Durchm. [nm]	spez. Oberfl. [m ² /g]	BI _{Masse}			Oberflächenbedeckung [%]		
			BSA	Transf.	Apo A-1	BSA	Transf.	Apo A-1
PS-Plain	50	120	49	56	43	66	ca. 100	269
PS-COOH	50	120	2	13	13	<1	4	82
PS-NH ₂	50	120	5	5	-5	<1	12	k. B.

Tab. 4: Übersicht über die massenbezogenen Bindungsindices der PS-NP bei verschiedenen Proteinen

4.4. Bindung weiterer NP und Speziesvergleich

Die bisher vorgestellten PS-NP dienten als Modell-Bindungspartner für die untersuchten Proteine, ergänzend wurden jedoch weitere NP untersucht.

4.4.1. Weitere NP: Printex G, Printex 90, TiO₂ Ø 4.5 nm TiO₂ P25 und SiO₂.

Die Messung der Bindung von NP des Typs Printex G, Printex 90, TiO₂ Ø 4.5 nm, TiO₂ P25 und SiO₂ an die drei untersuchten Proteine ergab kein einheitliches Bild, so dass Vergleiche zwischen den verschiedenen NP Materialien kaum möglich sind, wie Tab. 5 zeigt:

	Durchm. [nm]	spez. Oberfl. [m ² /g]	BI _{Masse}			Oberflächenbedeckung [%]		
			BSA	Transf.	Apo A-1	BSA	Transf.	Apo A-1
Printex G	50	30	9	12	11	27	62	ca.100%
Printex 90	14	300	62	57	42	8	71	ca.100%
TiO ₂ P25	20	50	1	2	2	<1	38	58
TiO ₂ 4.5 nm	4.5	313	22	27	27	8	11	19
SiO ₂ 7 nm	7	400	7	15	25	<1	2	49

Tab. 5: Übersicht über die massenbezogenen Bindungsindices von ausgewählten NP bei verschiedenen Proteinen

Die beiden Printex-NP gleichen sich sowohl bezüglich des Kernmaterials als auch der Oberflächenliganden und können somit als gleichartig angesehen werden, während dies für die beiden TiO₂-NP nicht zutrifft, da nur die TiO₂ 4.5nm-NP gezielt aufgebrachte Moleküle (Diäthylenglycol) auf ihrer Oberfläche tragen.

Eine weitere Möglichkeit der Betrachtung der NP-Protein-Bindungen ist die oberflächenabhängige Betrachtung. Für den oberflächenabhängigen Vergleich empfiehlt sich ebenfalls die Verwendung eines Bindungsindex, der in diesem Fall als BI_{Oberfläche}, die Abhängigkeit von der eingesetzten NP-Oberflächenkonzentration und der erzielten Bindung in Prozent beschreibt (s. Tab. 6). Entsprechend der Herleitung hat der BI_{Oberfläche} die Einheit „% (0.36mg BSA) / m² NP“.

Die Umrechnung der eingesetzten NP-Massenkonzentrationen in die jeweilige NP-Oberflächenkonzentration ergab, dass die beiden untersuchten Printex-NP

Ergebnisse

erstaunlicherweise unterschiedliche Bindungsindices pro Oberfläche für alle drei Proteine aufweisen; dies deutet auf unterschiedliche chemische Zusammensetzungen und Kontaminationen hin sowie auf andere Effekte (s. 5.3.2.). Gleiches trifft auch für die beiden verwendeten TiO₂-NP zu.

	Durchm. [nm]	spez. Oberfl. [m ² /g]	B _{Oberfläche}			Oberflächenbedeckung [%]		
			BSA	Transf.	Apo A-1	BSA	Transf.	Apo A-1
PS-Plain	50	120	407	466	359	66	ca. 100	32
PS-COOH	50	120	17	104	116	<1	4	10
PS-NH ₂	50	120	44	39	-40	<1	11	k. B.
Printex G	50	30	313	398	360	27	62	ca.100%
Printex 90	14	300	205	269	139	8	71	ca.100%
TiO ₂ P25	20	50	7	45	43	0	38	58
TiO ₂ 4.5 nm	4,5	313	70	120	88	8	11	19
SiO ₂ 7 nm	7	400	18	38	62	0	2	49

Tab. 6: Übersicht über die oberflächenbezogenen Bindungsindices von ausgewählten NP bei verschiedenen Proteinen

Die Abhängigkeit der Proteinbindung von der zur Verfügung stehenden NP-Oberfläche zeigt sich auch beim Vergleich der pro NP gebundenen Anzahl an Proteinmolekülen (s. Tab.6), wobei auch hier deutlich wird, dass die Oberflächenliganden des NP eine bedeutende Rolle spielen. An die TiO₂ 4.5 nm-NP bindet statistisch gesehen weniger als ein Protein pro NP, allerdings ist bei einer NP-Konzentration von 2 mg/ml die Anzahl der Einzelpartikel sehr hoch, so dass die Proteinbindung nachgewiesen werden konnte. Ähnliches gilt für SiO₂-NP (Ø 7 nm).

Die größte Anzahl von Proteinmolekülen wird von den Printex G-NP gebunden, da diese nicht nur eine sehr große Oberfläche je Einzelpartikel bieten, sondern zudem auch gute Bindungseigenschaften haben (s. Tab. 7).

	Ø [nm]	Oberfläche [nm ²]	Anzahl der Proteine pro NP		
			BSA	Transferrin	Apo A-1
Printex G	50	7855	42	38	100
Printex 90	14	616	4	3	8
TiO ₂ 4.5 nm	4,5	64	0	0	0
TiO ₂ P25	20	1257	4	1	2
SiO ₂	7	154	0	0	1

Tab. 7: Durchmesser [nm] und Oberfläche [nm²] eines einzelnen NP vom Typ Printex G, Printex 90, TiO₂ 4.5 nm, TiO₂ P25 und SiO₂ sowie Anzahl der an ein einzelnes NP gebundenen Proteinmoleküle nach Inkubation mit BSA, Transferrin oder Apo A-1. „0“ bedeutet, dass zwar rechnerisch eine positive Anzahl an Proteinmolekülen an das NP bindet, dass diese Zahl, jedoch kleiner als 1 ist.

Ergebnisse

4.4.2. Bindungsaktivität von Albumin verschiedener Spezies an TiO₂ P25

Um Hinweise zu erhalten, inwieweit Ergebnisse mit bovinem Albumin auf andere Spezies übertragbar sind, wurde exemplarisch die Bindung an TiO₂ P25-NP an Rinder-, Ratten- und Human-Albumin untersucht. Die TiO₂ P25-NP wurden gewählt, da sie in zahlreichen kommerziellen Produkten (Sonnencreme, Zahnpasta) enthalten sind und daher im Alltag vielfältige Expositionsmöglichkeiten bestehen (s. 3.1.5.3.).

Abb. 27 stellt die Proteinbindung bei zwei verschiedenen NP-Konzentrationen sowie bei der Kontrolle (Proteinlösung ohne NP) für diese Proteine dar.

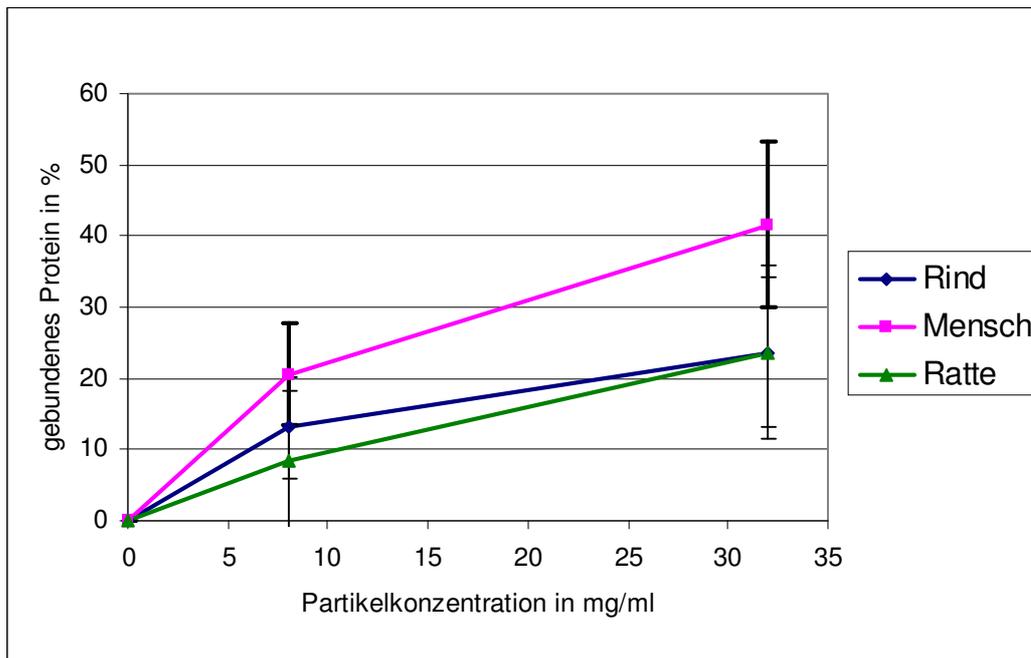


Abb. 27: dosisabhängige Bindung von Albumin (0.36 mg/ml) aus Mensch, Rind und Ratte an TiO₂ P25 (8, 16 und 32 mg/ml) (n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

Die Bindungsfähigkeit von Albumin verschiedener Spezies zeigt bei der Verwendung von TiO₂ keine signifikanten Unterschiede (s. Abb.27). Es wird aber ein Trend sichtbar, der dem humanen Albumin eine höhere Bindungsfähigkeit zuweist, als Rinder- und Ratten-Albumin, was sich im BI_{Masse} widerspiegelt (s. Tab. 8).

	Durchm. [nm]	spez. Oberfl. [m ² /g]	BI _{Masse}		
			Albumin _{Rind}	Albumin _{Mensch}	Albumin _{Ratte}
TiO ₂ P25	20	50	0.8	1.4	0.8

Tab. 8: Bindungsindex von TiO₂ P25-NP (bezogen auf die Massenkonzentration) für Albumin aus Rind, Mensch und Ratte

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von Nanopartikeln (NP) an ausgewählte Proteine, die sowohl im Blutserum als auch in bronchoalveolärer Flüssigkeit vorkommen, untersucht.

Folgende Hypothesen wurden überprüft:

- Unlösliche NP bilden Komplexe mit verschiedenen Proteinen aus Lungenepithel-Flüssigkeit und Blutserum.
- Die Proteinbindung ist proportional zu NP-Oberfläche.
- Die Proteinbindung ist abhängig von Art und Menge der Liganden auf der NP-Oberfläche.
- Die Proteinbindung ist abhängig von der Art des Proteins.

Als Modellprotein zur Etablierung der Methodik und zur Durchführung der Mehrzahl der Versuche diente das gut untersuchte und vielfach in der Forschung verwendete bovine Serumalbumin. Albumin hat zudem besondere klinische Relevanz, da es den größten Teil des Gesamtproteins im Serum (60 %) ausmacht. Des Weiteren wurden Transferrin (hoher Gehalt im Serum, Eigenschaft als Transportprotein) und Apolipoprotein A-1 (Transportfunktion, Bindungshinweise aus der Literatur (Barrett et al. 1999)) verwendet. Als NP wurden überwiegend monodisperse Polystyrol-NP verwendet, da diese gut charakterisiert sind und mit verschiedenen Oberflächeneigenschaften kommerziell erworben werden können. Die Größe von 50 nm wurde gewählt, da sie deutlich unter 100 nm liegt (Definition von NP) und die NP dabei aber noch genügend Masse für die Abtrennung mittels Ultrazentrifugation haben (s. Tab. 1).

Weitere NP (umweltrelevante bzw. industriell verwendete NP) wurden verwendet und mit den Polystyrol Modell-NP verglichen. So sollte der Bezug zur täglichen NP-Exposition der Bevölkerung und von tierischen Populationen hergestellt werden.

5.1 Evaluierung und Optimierung bestehender Protokolle mit Hilfe von Modell-NP

Bei der Methodik wurde zunächst auf die im Labor vorhandenen Protokolle zurückgegriffen.

Um die einzelnen NP in Suspension so gut wie möglich zu separieren, wurden diese grundsätzlich vor Verwendung mit Ultraschall behandelt und dann sogleich mit den Proteinen vermischt. Die Ultraschallbehandlung der NP ist bedeutend, da gezeigt wurde, dass z.B. TiO₂ P25-NP (TiO₂ Ø 20 nm) in physiologischer Pufferlösung massiv agglomerieren können und je nach Konzentration Größen von 800 bis 2400 nm erreichen (Long et al. 2006). Für die PS-NP konnte gezeigt werden, dass diese bei Suspension in A.

dest. bzw. physiologischer Kochsalzlösung nach Behandlung mit Ultraschall nur in geringem Maße agglomeriert sind (s. Tab 3, Abb. A-8).

In früheren Arbeiten werden für weiterführende Untersuchungen die gebundenen Proteine mit Hilfe eines Lysis-Kit von den NP wieder abgelöst (Barrett et al. 1999; Semmler-Behnke et al. 2006; Semmler et al. 2004), dies erwies sich für die vorliegende Arbeit jedoch nicht als geeignet, da sich die Bindungen nicht bei allen NP vollständig wieder lösen ließen und somit die an NP gebundene Proteinmenge nicht quantifiziert werden konnte. Insbesondere war der Lysis-Kit bei den aminierten PS-NP nicht ausreichend effektiv (s. Abb. 15); möglicherweise werden die BSA-Moleküle bei der Bindung an die Aminogruppen der PS-NP, die von Nemmar et al. 2002 als biologisch sehr aktiv beschrieben wurden so sehr denaturiert, dass ein Ablösen der Proteine nicht mehr möglich ist (Nemmar et al. 2002).

Für die Darstellung der an NP gebundenen Proteine auf einem SDS-PA Gel wurden daher die gesamten NP-Protein-Komplexe auf das Gel aufgetragen, da sich herausstellte, dass die Proteine im Zuge der Probenaufbereitung und der Elektrophorese von den NP getrennt werden und so auf dem SDS-PA Gel quantitativ dargestellt werden konnten. Die NP selbst verblieben aufgrund ihrer Größe in den Probetaschen des Gels ohne weitere Artefakte zu verursachen.

Die Reinigung der NP-Protein-Komplexe durch Waschschriffe (ein Waschschriff ist auch in der Literatur beschrieben (Barrett et al. 1999)) nach der Zentrifugation war unumgänglich. Zudem mussten die NP-Protein-Komplexe in ein neues Gefäß überführt werden, da der Probenpuffer für die Elektrophorese ebenso wie der Lysis-Kit SDS enthält, welches zur Ablösung freier Proteine von der Gefäßwand und damit zu falsch positiven Ergebnissen führt (s. Abb.12).

5.2. Indirekte Quantifizierung der gebundenen Proteine mittels Bio-Rad Protein-Assay: Etablierung und Validierung mit Hilfe von Modell-NP

Die Vorgehensweise bei der Erfassung der an NP gebundenen Proteine orientierte sich an Arbeiten verschiedener Autoren (Brown et al. 2000; Kondo et al. 1991; Oliva et al. 2003) und basiert auf der quantitativen Bestimmung der Depletion die eine Proteinlösung erfährt, wenn die in ihr suspendierten NP mit den daran gebundenen Proteinen abgetrennt werden. Zur Bestimmung der im Überstand verbliebenen Proteinmenge wurde der Nachweis mit dem kommerziell erhältlichen Bio-Rad Protein-Assay gewählt (Brown et al. 2000).

Zum Abtrennen der NP-Protein-Komplexe von den frei in Lösung befindlichen Proteinen bewährte sich die bereits von anderen Autoren (Barrett et al. 1999; Brown et al. 2000; Brown et al. 2001; Kondo et al. 1991; Oliva et al. 2003) genutzte Zentrifugation; die

Diskussion

Effektivität der rechnerisch ermittelten Zentrifugationszeiten für die einzelnen NP konnte experimentell bestätigt werden (s. 3.2.1.5. und Abb. 11). Trotz der anteilmäßig zufriedenstellenden Abtrennung von 85 % - 90 % der NP aus der ursprünglichen NP-Suspension ergaben die PS-NH₂-NP dennoch Messwerte im Überstand. Diese wurden möglicherweise durch abgelöste Oberflächenliganden oder einzelne nicht abgetrennte NP verursacht. Für diesen Effekt wurden die späteren Ergebnisse jedoch korrigiert (s. 4.1.2.). Ungebundenes BSA wurde bei den hier angewendeten Zentrifugationen nicht abgetrennt, was darauf schließen lässt, dass dieses auch für Transferrin (ähnliches Molekulargewicht wie BSA) und Apo A-1 (leichter als BSA) zutrifft.

5.3. Protein-NP-Bindung

5.3.1. Modell-NP

5.3.1.1. Bindung bei pH 7.4

Es konnte bestätigt werden, dass manche NP Komplexe mit verschiedenen Proteinen bilden, da durch Zugabe dieser NP zu einer Proteinlösung und nachfolgender NP-Abtrennung Proteine aus der Lösung entfernt wurden. Dieser Effekt weist auf eine Bindung von Proteinen an die NP hin, da eine Ausfällung der Proteine nicht beobachtet wurde. Es ergab sich eine lineare Abhängigkeit von eingesetzter NP-Menge und der Menge an gebundenem Protein (Abb. 22, 23 und Abb. A-3, A-5). Zum besseren Vergleich der erhobenen Daten für die verschiedenen Proteine und NP wurde der Begriff des Bindungsindex (BI) eingeführt, der einen unmittelbaren quantitativen Vergleich der Daten ermöglichte und ein Maß für die Bindungskapazität der NP abhängig von der NP-Masse (BI_{Masse}) bzw. NP-Oberfläche ($BI_{\text{Oberfläche}}$) darstellt. Durch Betrachtung mehrerer Proteine konnte gezeigt werden, dass die NP spezifische Bindungsmuster aufweisen, d.h. verschiedene Proteine binden an jeweils gleiche NP unterschiedlich stark. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang zu den Arbeiten von Semmler-Behnke et al. 2006 sowie Barret et al. 1999 (Barrett et al. 1999; Semmler-Behnke et al. 2006; Semmler et al. 2004).

Weitere Messungen ergaben, dass im Falle der PS-NP das Ausmaß der Agglomeration der NP untereinander bei ansonsten gleichen Bedingungen vom Vorhandensein und der Art der funktionellen Molekülgruppen auf der NP-Oberfläche abhängt. Diese Daten konnten in Verbindung mit den ermittelten BIs gebracht werden: Die PS-Plain-NP wurden in PBS mit einem Durchmesser von 50 nm gemessen (s. Abb. A-8), d.h. es liegt keine Agglomeration vor. In BSA-Lösung jedoch wurde ein Durchmesser von 1190 nm gemessen (s. Abb. 18). Dieser Effekt bestätigt die aus den anderen Versuchen erhaltenen Ergebnisse, dass die PS-Plain-NP eine große Menge an Proteinen binden können. Da die gebundenen BSA-Moleküle rechnerisch alle als Monolayer auf einem PS-Plain-NP

Diskussion

Platz finden würden (je nach Anlagerungsmodus sind 41 % oder 66 % der NP-Oberfläche bedeckt), ist diese erhebliche Größenzunahme um mehr als den Faktor 20 nur durch massive Agglomeration einzelner mit Albumin gecoateter NP zu erklären. Es wird vermutet, dass die Proteine als Bindungsglieder zwischen den Primärpartikeln fungieren und dadurch die Entstehung von Agglomeraten verursachen. Insbesondere eignen sich BSA-Moleküle als Bindungsglied zwischen Partikeln, da sie Dimere bilden können. Jedes Einzelmolekül kann sich so mit dem für die Bindung günstigsten Areal an ein NP anlagern und mit der ggf. noch freien Dimer-Bindungsstelle (vgl. (Rezwan et al. 2004) an ein zweites BSA-Molekül andocken, welches seinerseits an ein anderes NP gebunden hat. Durch Bindung von BSA erhöht sich der Durchmesser einer PS-Plain-NP um 11 nm (Anlagerung mit der 5.5 nm * 9 nm großen Fläche), d.h. in einer Dimension liegen rechnerisch 19 - 20 Einzelpartikel nebeneinander. Bei dreidimensionaler Betrachtung dieses Agglomerats ergibt sich, dass dieses aus ca. 7400 Einzelpartikeln besteht. Für den Fall, dass sich die BSA-Moleküle mit der Fläche von 5.5 nm * 5.5 nm anlagern, errechnen sich Aggregate aus ca. 5400 Einzelpartikeln. Mit welcher Fläche sich die BSA-Moleküle anlagern, kann nicht ausgesagt werden, aber die große Anzahl von Einzelpartikeln in der Suspension lässt vermutlich beide Formen innerhalb eines NP Agglomerates zu. Eine Agglomeration von PS-Plain NP ohne gebundenes BSA als Vermittler ist nicht wahrscheinlich, da die PS-Plain NP in PBS nicht zur Agglomeration neigen (Tab. 3).

Bei den PS-COOH-NP ist kein Effekt der BSA-Bindung messbar, diese NP haben in A. dest, PBS und BSA-Lösung denselben Durchmesser (s. Tab. 3, Abb. 18 und 19, A-8 und A-9). Dieser beträgt 110 nm und lässt auf direkte Agglomeration von ca. 11 Primärpartikeln schließen, welche in allen drei Suspensionsmitteln gleichermaßen stattfindet. Dies überrascht nicht, da gezeigt wurde, dass die PS-COOH-NP nur sehr wenig BSA binden.

Die PS-NH₂-NP agglomerieren in PBS weniger als in A. dest. und stellen sich in BSA-Lösung als noch kleinere Agglomerate dar (s. Abb. 18, A-8 und A-9). Vermutlich erleichtert bereits die leicht basische PBS-Lösung mit höherem Gehalt an Hydroxyl-Ionen, verglichen mit A. dest, die Suspension der positiv geladenen aminierten Primärpartikeln. Durch die eben genannten Hydronium-Ionen ist die Bildung einer Hydrathülle um das NP möglich. Offenbar wirken die wenigen gebundenen BSA-Moleküle im Falle dieser NP dem Mechanismus der Agglomeration entgegen. Möglicherweise spielt es in diesem Zusammenhang eine Rolle, dass bei nur wenigen gebundenen BSA-Molekülen die Wahrscheinlichkeit einer BSA-Dimer-Bildung geringer ist. Während die Agglomerate in A. dest. aus ca. 39 Primärpartikeln bestehen, bestehen sie in PBS rechnerisch aus nur 11 Partikeln und in BSA-Lösung aus nur 3 Partikeln.

Diskussion

Die Berechnung der mit BSA belegten Oberfläche der PS-NP ergibt, dass bei keinem dieser NP die gesamte Partikeloberfläche mit BSA bedeckt ist, so dass alle BSA-Moleküle als Monolayer auf den NP Platz finden.

Die Partikelgrößenmessung bei Verwendung einer **Transferrin**-Lösung (s. Abb. 19) ist ähnlich wie im Falle des BSA und passt zur hohen Transferrin-Bindungskapazität der PS-Plain-NP (s.u.), wobei die Transferrin-NP-Komplexe hier etwas kleiner bleiben. Die geladenen PS-NP binden nur sehr wenig Transferrin; die gemessenen Partikelgrößen entsprechen denen in BSA-Lösung. Die Berechnung der mit Transferrin belegten Partikeloberfläche von PS-Plain-NP (s. 4.3.4.2.) zeigt, dass bei Anlagerung mit der größtmöglichen Protein-Seitenfläche nicht alle der gebundenen Transferrin-Moleküle auf der NP-Oberfläche Platz finden können. Da aber für Transferrin keine Dimer-Bildung wie beim BSA beschrieben ist, wird davon ausgegangen, dass sich die Transferrin-Moleküle zumindest teilweise platzsparender auf der NP-Oberfläche anordnen, so dass auch in diesem Fall eine Bedeckung mit einem Monolayer angenommen wird.

Beim Vergleich der gebundenen BSA- bzw. Transferrin-Moleküle pro NP fällt auf, dass mit Ausnahme der PS-NH₂-NP und der TiO₂ 4.5 nm von allen NP weniger Transferrin-Moleküle als BSA-Moleküle gebunden werden (s. Tab 7), d.h. der Bl_{Masse} ist bei Transferrin im Falle der meisten NP höher als bei BSA. Durch die lineare Abhängigkeit von eingesetzter NP-Menge und der Menge an gebundenem Protein kann von einer unspezifischen Bindung von NP und Proteinen ausgegangen werden. Dadurch dass Transferrin größer ist als BSA und eine unspezifische Bindung zwischen den Bindungspartnern Protein und NP vorliegt, können sich pro NP weniger Transferrinmoleküle anlagern. Bei einem spezifischen Bindungsmechanismus würde die Größe des Reaktionspartners, der die Ligandenbindungsstelle, aufweist keine Rolle spielen.

Apo A-1 bindet an die PS-NP ohne signifikanten Unterschied zu BSA und Transferrin. Erwartungsgemäß ist die Zahl der Proteinmoleküle pro NP bei diesem recht kleinen Protein in der Regel höher als bei BSA und Transferrin, was wiederum den unspezifischen Charakter der Partikel-Protein-Bindung unterstreicht. Des Weiteren zeigt sich rechnerisch auch in diesem Fall dass vermutlich die Apo A-1 Proteine sich als Monolayer auf der NP Oberfläche der PS- Plain- und PS-COOH-NP befinden, im Falle der PS-Plain-NP ist dies allerdings nur möglich, wenn sich nicht alle Apo A-1-Moleküle mit der größtmöglichen Seitenfläche anordnen (s. Transferrin).

5.3.1.2. Bindung in Abhängigkeit vom pH-Wert

Oliva und Mitarbeiter zeigten, dass der Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung von der Art des NP abhängt (Oliva et al. 2003); dies konnte zumindest im Hinblick auf die

Wasserstoffionenstärke bei den PS-COOH-NP bestätigt werden (s. Abb. 21). Die hohe BSA-Bindungskapazität der ungeladenen PS-NP erwies sich als weitgehend unabhängig vom pH-Wert, was wiederum dafür spricht, dass die Bindung in diesem Fall weitgehend durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt wird. Auf die geringe Bindungskapazität der PS-NH₂-NP (s. Abb. 21) hat der pH-Wert ebenfalls keinen deutlich messbaren Einfluss.

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass BSA im pH-Bereich um seinen IEP besser an PS-COOH-NP bindet als bei basischeren pH-Werten. Während BSA oberhalb des IEP negativ geladen ist, trägt es unterhalb davon eine positive Nettoladung, zudem nimmt bei den PS-COOH-NP die negative Ladung mit steigender Azidität ab, so dass die elektrostatische Abstoßung dieser beiden Bindungspartner abnimmt. Im Falle PS-Plain-NP ist die Bindung zwar bei pH-Werten in Nähe des IEP sehr hoch, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede zur Bindung bei anderen pH-Werten gefunden, da die pH-Wert-abhängigen elektrostatischen Wechselwirkungen bei diesen NP vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Olivier et al. untersuchten pH-Wert-Effekte, speziell für die Adsorption von Proteinen an Poly(isobutylcyano acrylat)-NP mit einer Größe von 220 nm (Olivier et al. 1995). Da die von diesen Autoren verwendeten NP kaum Ladungen trugen, wurden elektrostatische Wechselwirkungen bei der Adsorption weitgehend ausgeschlossen, hydrophobe Wechselwirkungen dagegen wurden als ausschlaggebend betrachtet. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (s.o.).

5.3.2 Weitere NP

Wie schon im Falle der Modell-NP aus PS konnte für alle weiteren untersuchten NP eine lineare Abhängigkeit der Bindung an BSA und Transferrin von der eingesetzten NP-Masse festgestellt werden.

Für zwei bis auf die Primärteilchengröße identische Kohlenstoff-haltige NP (Printex G und Printex 90) konnte gezeigt werden, dass letztlich die eingesetzte Gesamtoberfläche ein wichtiger Parameter für die Bindung an **BSA** ist. Wenn wie in den dargestellten Untersuchungen gleiche Massen verschieden großer NP verglichen werden, dann binden die kleineren NP entsprechend der höheren spezifischen Oberfläche mehr Proteine als die größeren NP (S. Tab. 5 sowie Abb. A-3, A-5 und A-7). Nach Cedervall und Mitarbeiter binden größere NP bei Betrachtung eines Einzelpartikels mehr Protein als kleinere, da pro Einzelpartikel eine entsprechend größere Oberfläche für die Anlagerung der Proteine zur Verfügung steht (Cedervall et al. 2007). Des Weiteren bestimmt aber auch der Partikeldurchmesser die Krümmung der Partikeloberfläche und wirkt sich somit zusätzlich auf die Anlagerungsmöglichkeiten von Proteinen aus. Bei kleinen NP verhindert eine

Diskussion

entstehende starke Oberflächenkrümmung eine enge Packung der zu bindenden Proteine (Cedervall et al. 2007), dies erklärt den etwas niedrigeren $BI_{\text{Oberfläche}}$ von Printex 90 im Vergleich zu jenem vom Printex G (s.Tab.6).

Für die beiden TiO_2 -NP konnte der Zusammenhang mit gleicher eingesetzter NP-Oberfläche nicht bestätigt werden (vgl. PS-NP unter 4.3.4.). Allerdings tragen die TiO_2 4.5 nm Diäthylenglycol-Moleküle auf ihrer Oberfläche, wohingegen die TiO_2 P25 keine bei der Herstellung beabsichtigten Oberflächenmodifikationen aufweisen. Dieses Ergebnis, sowie die oben genannten Ergebnisse mit den PS- und Printex-NP zeigen klar auf, dass nicht nur die Größe der Oberfläche sondern auch die chemisch-physikalischen Eigenschaften der NP bei der Beurteilung der Bindungsfähigkeit von NP mit Proteinen von entscheidender Bedeutung ist.

Für die verwendeten NP wird angenommen, dass BSA sich bei den verwendeten Konzentrationen als Monolayer anlagert, da rechnerisch wie bereits bei den PS-NP beschrieben auch keine Oberflächenbedeckung von 100 % erreicht wird.

Die für BSA gefundenen Zusammenhänge der Bindungseigenschaften von Printex G und Printex 90 konnten auch für **Transferrin** beobachtet werden. Für die beiden TiO_2 -NP ergibt sich wie schon im Falle des BSA keine Übereinstimmung der Bindung im Bezug auf die eingesetzte Partikeloberfläche.

Ähnlich wie bei den PS-Plain-NP binden die beiden Printex-NP sehr viel **Apo A-1**, was eine platzsparende Anordnung der Proteine auf der NP-Oberfläche erfordert um als Monolayer vorzuliegen (s.o.). Auf den übrigen NP lagern sich nur vergleichsweise wenige Apo A-1-Moleküle an, so dass in jedem Fall noch NP-Oberfläche unbedeckt bleibt und keine weitere Aussage über die zur Anlagerung genutzte Proteinfläche gemacht werden kann.

Barret und Mitarbeiter fanden bei der Inkubation von verschiedenen Silikat-NP mit Serum, dass Apolipoprotein A-1 trotz seiner im Vergleich zu anderen Proteinen geringen Serumkonzentration in deutlichem Umfang mit diesen NP reagiert (Barrett et al. 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass bei gleicher Massenkonzentration mehr Apolipoprotein A-1 an die SiO_2 -NP gebunden wird als BSA und Transferrin. Somit kann ein Protein wie Apo A-1 trotz geringer Konzentration im Blutserum möglicherweise die biologischen Effekte der (SiO_2 -)NP weit mehr beeinflussen als das z.B. im Blutserum vorrangige Albumin.

5.4. Bindung von BSA aus verschiedenen Spezies an TiO_2 P25-NP

Für die Interpretation der erhaltenen Daten war interessant, ob es speziesabhängige Unterschiede in den NP-Protein Bindungen gibt. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich keine Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen den Albumin-Molekülen aus

verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Rind) was die exemplarische untersuchte Bindung an die in Alltagsprodukten häufig enthaltenen TiO_2 P25-NP betrifft, jedoch ist ein Trend sichtbar, der dem humanen Albumin einen höheren Bl_{Masse} zuweist als dies für die Spezies Ratte und Rind der Fall ist. Um hier weitere Aussagen hinsichtlich der biologischen Bedeutung dieses Ergebnisses zu erhalten sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

5.5. Ausblick

In der Literatur wurde bereits in-vivo für verschiedene NP von einer Eintrittspforte (Lungenoberfläche, intravenöser Zugang, Riechepithel) eine Translokation in sekundäre Zielorgane (Leber, Milz, Herz, Hirn etc.) beschrieben (Geiser et al. 2005; Kreyling et al. 2006; Kreyling et al. 2002; Oberdörster et al. 2002). Bisher sind die diesem Phänomen zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht geklärt, es wird aber der Zusammenhang von entstehenden NP-Protein Komplexen und dem Übertritt von NP durch biologische Membranen diskutiert (Kreyling et al. 2004, Semmler et al. 2004). Eine Aufnahme von NP-Protein Komplexen über ansonsten von Proteinen genutzte Pfade erscheint gut vorstellbar, zumal die Öffnungen z.B. von Caveolae einen Durchmesser zwischen 0.05 und 0.1 μm haben (Gumbleton 2001) und Proteine über Caveolae transportiert werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass verschiedene Proteine in unterschiedlich starkem Maße an NP binden. Weitere Untersuchungen müssen nun gezielt hergestellte NP-Protein Komplexe bei ihrem Weg durch biologische Membranen beobachten, so dass Kandidatenproteine bzw. NP-Oberflächenfunktionalisierungen erkennbar werden, die eine Translokation in sekundäre Zielorgane begünstigen bzw. unterbinden.

Bei einer in-vivo Untersuchung von Nemmar et al. 2002 konnte nach der intravenösen Verabreichung von aminierten PS-NP (\varnothing 60 nm) biologisch eine höhere Thrombogenizität im Blut der behandelten Tiere gefunden werden, als dies für karboxylierte PS-NP und unmodifizierte PS-NP der Fall war (Nemmar et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte nahezu kein Bindungsvermögen für die aminierten Partikel und kaum ein Bindungsvermögen für die karboxylierten PS-NP nachgewiesen werden. Bei den unmodifizierten PS-NP wurde ein hohes Bindungsvermögen an Proteine nachgewiesen. Auch hier müssen weiterführende Untersuchungen den Einfluss der NP-Proteinbindung auf die Thrombogenizität des Blutes in vivo weiter beleuchten um die Gesetzmäßigkeiten dieses Vorganges besser verstehen zu können.

6. Zusammenfassung

Mensch und Tier sind in der Umwelt täglich ultrafeinen Partikeln aus verschiedenen Quellen ausgesetzt, zudem nimmt die Verwendung von synthetischen Nanopartikeln (NP) in Wissenschaft und Technik rapide zu, sodass NP in immer mehr alltäglichen Produkten sowie medizinischen Anwendungen zum Einsatz kommen.

Da die Exposition vorwiegend über den Weg der Inhalation erfolgt, und die UFP/NP in der Lunge auf eine proteinhaltige Flüssigkeit treffen, sollte untersucht werden, inwieweit NP in der Lage sind, Proteine zu binden und wodurch diese Bindungen beeinflusst werden.

Als Modelle dienten bovines Serumalbumin, Transferrin und Apolipoprotein A-1 sowie verschiedene NP (PS-NP unterschiedlicher Ladung, SiO₂-NP, TiO₂ P25-NP, TiO₂ 4.5 nm-NP sowie Printex G- und Printex 90-NP).

Allgemein konnte bestätigt werden, dass manche NP Komplexe mit verschiedenen Proteinen bilden, wobei NP mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften unterschiedliche Bindungsaktivität aufweisen. Für alle NP wurde eine lineare Abhängigkeit von eingesetzter NP-Menge und der Menge an gebundenem Protein gefunden. Diese Bindungsaktivität kann durch Bindungsindices quantitativ beschrieben werden.

Die Bindung der Proteine an die NP erfolgt durch unspezifische Mechanismen und erfolgt vermutlich als unvollständige Monolayer.

Neben den chemischen Eigenschaften der NP-Oberfläche ist die zur Verfügung stehende Gesamtoberfläche der eingesetzten NP entscheidend für das Ausmaß der Bindung in einer gegebenen Proteinlösung.

BSA, Transferrin und auch Apo A-1 wurden im größten Umfang durch hydrophobe NP gebunden, doch auch für die hydrophilen NP konnte eine Bindungsaktivität nachgewiesen werden, so dass je nach Art von Protein und NP hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Kräfte für die Bindung von Bedeutung sein dürften.

Die vorliegende Arbeit zeigt daher, dass inkorporierte NP in teils erheblichem Ausmaß mit körpereigenen Proteinen interagieren können und bietet die Basis für weitergehende Untersuchungen zur Translokation von NP und deren Effekten im Organismus sowie die Wirkung der NP auf Proteine in der Lunge und im Blut.

7. Summary

Binding of Nanoparticles (NP) to Proteins of the Blood Serum

The human population as well as animals are daily exposed to ultrafine particles from different ambient sources; additionally the use of synthetic nanoparticles (NP) in science and technology is rapidly increasing, so that NP are part of more and more daily products and medical applications.

The exposure occurs mainly by inhalation and the UFP/NP deposit on the epithelial lining fluid in the lung which contains proteins. So the purpose of this study was to find out to which extent the NP are able to bind proteins and which parameters influence these bindings.

As models bovine serum albumin, transferrin and apolipoprotein A-1 as well as different NP (polystyrene NP with different loading, SiO₂ NP, TiO₂ P25 NP, TiO₂ 4.5 nm NP as well as Printex G und Printex 90 NP) were used.

Generally it could be confirmed that some NP form various complexes with different proteins. NP of different chemical and physical properties showed different binding activities.

For all NP a linear dependency of the added NP amount and the amount of bound protein was found. This binding activity can be described quantitatively with binding indices.

The binding is driven by non-specific mechanisms and probably results in a monolayer on the NP surface.

Beside the chemical properties of the NP surface the available total amount of the NP surface is crucial for the extent of the binding in a given protein solution.

BSA, transferrin and apo A-1 were bound to the largest extent by hydrophobic NP, but also the binding activity of hydrophilic NP was proven, which may indicate the predominant importance of either hydrophobic interactions or electrostatic forces. Both depend on the type of the protein and the NP.

Therefore this thesis shows that incorporated NP interact to a considerable extent with body proteins and provides the basis for further studies featuring the translocation of NP and their effects in the organism as well as the effect of NP on proteins in the lung and the blood.

8. Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Amper	Ammoniumperoxodisulfat
Apo A-1	Apolipoprotein A-1
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BI	Bindungsindex
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
DA	Densitometrische Auswertung
ELF	Epithelial Lining Fluid
ESA	Equines Serum-Albumin
g	Gramm
Gl.	Gleichung
h	Stunde(n)
HSA	Humanes Serum-Albumin
IEP	Isoelektrischer Punkt
k. A.	keine Angabe
k. B.	keine Bindung
Ln	Logarithmus naturalis
Lsg.	Lösung
(m)M	(milli)Mol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MOPS	3(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MW _k	Messwert der Kontrolle
MW _v	Messwert des Versuchsansatzes
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
PA	Polyallomer
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphate Buffered Saline
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PS-COOH	karboxylierte Polystyrol-Partikel
PS-NH ₂	aminierte Polystyrol-Partikel
PS-Plain	Polystyrol-Partikel ohne Oberflächenmodifikation
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RSA	Rabbit Serum-Albumin
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdocecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Electrophorese
sek	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
UFP	Ultrafeine Partikel

Anhang

Bezeichnung	PS-Plain	PS-NH ₂	PS-COOH	TiO ₂ P25	TiO ₂ 4.5 nm	SiO ₂	Printex 90	Printex G
Durchmesser [nm]	50	50	50	20	4.5	7	14	50
Spezif. Oberfläche [m ² /g]	120	120	120	50	313	400	300	30
Liganden	keine	NH ₂	COOH	k. A.	Diäthylen-Glycol	k. A.	k. A.	k. A.
Ladung bei neutr. pH-Wert	keine	positiv	negativ	-10 mV	-42 mV*	-30 mV*	-40 mV	-26 mV
Hydrophilie	hydrophob	+/- hydrophil	+/- hydrophil	hydrophil	+/- hydrophil	+/- hydrophil	hydrophob	hydrophob
Dichte [g/cm ³]	1.03	1.03	1.03	3.8	3.8	2.32	1.8-1.9	1.8-1.9
Ladungsdichte/g		120 µmol/g	120 µmol/g	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Ladungsdichte/m ²		1 µmol/m ²	1 µmol/m ²	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Ladungsdichte/Part.		4800/Partikel	4800/Partikel	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.

*im Sauren

Abb. A-1: Übersicht über die verwendeten Nanopartikel und ihre Eigenschaften

Anhang

	BSA	Transferrin	Apo A-1
Molekulargewicht [kDa]	66	ca. 80	28
IEP	4.7	5.6	4.9-5.2
Ladung bei neutralem pH-Wert	negativ	negativ	negativ
Aminosäuren	585	679	243
Sekundärstruktur	67% helikal		größtenteils helikal
Gehalt im Serum [mg/ml]	35-50	2.5	1.1 – 1.4
Anteil am Gesamtprotein [%] im Serum	60-85	4.1	1.8 – 1.7
Anteil am Gesamtprotein [%] im ELF	50	5.5	k. A.
Form	ellipsoid bis „herzförmig“	zwei identische Lobi, mit je zwei etwa gleichen Domänen	zirkulär, in sich verdreht
Fähigkeit zur Dimerbildung mit sich selbst	ja	k. A.	ja
Funktion	Carrier (Fettsäuren, Billirubin), onkotischer Druck, Säure-Basen-Haushalt	Bindung von Fe ³⁺ , antimikrobielle Aktivität	Bindung und Transport von LDL

Abb. A-2: Übersicht über die verwendeten Proteine und ihre Eigenschaften

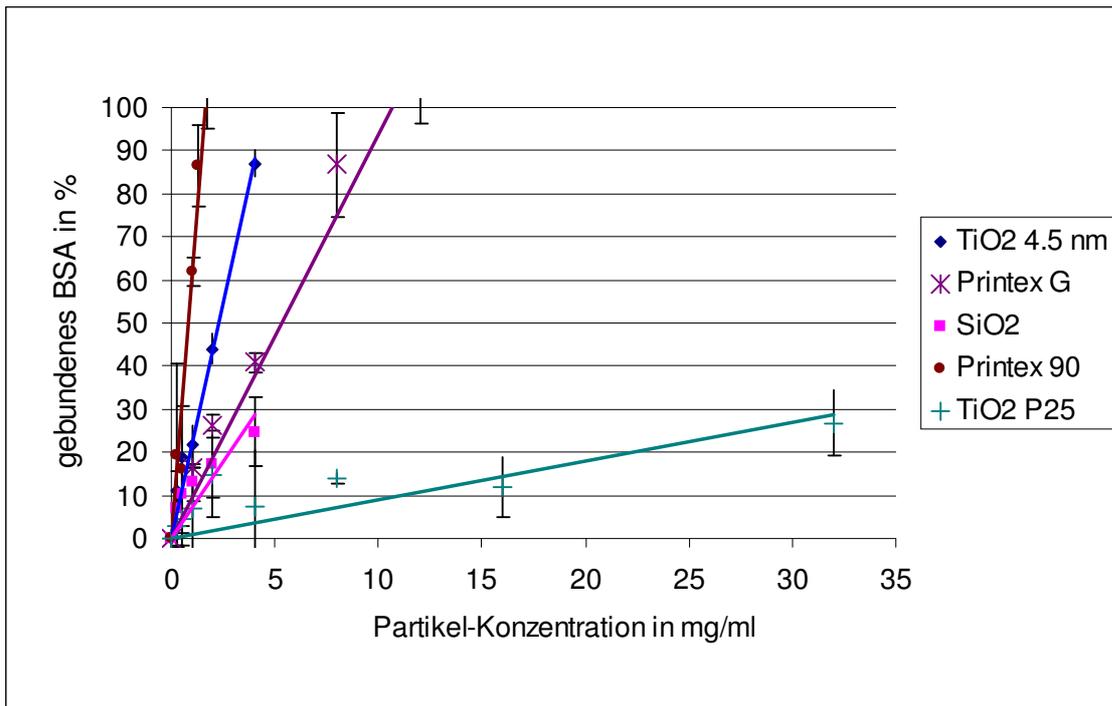


Abb. A-3: partikeldosisabhängige Bindung von BSA an verschiedene Partikel, Darstellung der Protein-Depletion des Überstandes durch Zugabe und nach folgendem Abtrennen verschiedener Nanopartikel; 0.25/0.5/1.0/2.0/4.0 mg/ml bei SiO₂, TiO₂ Ø 4.5 nm und Printex 90 sowie zudem 8.0/12.0/16.0/32.0 mg/ml bei Printex G und TiO₂

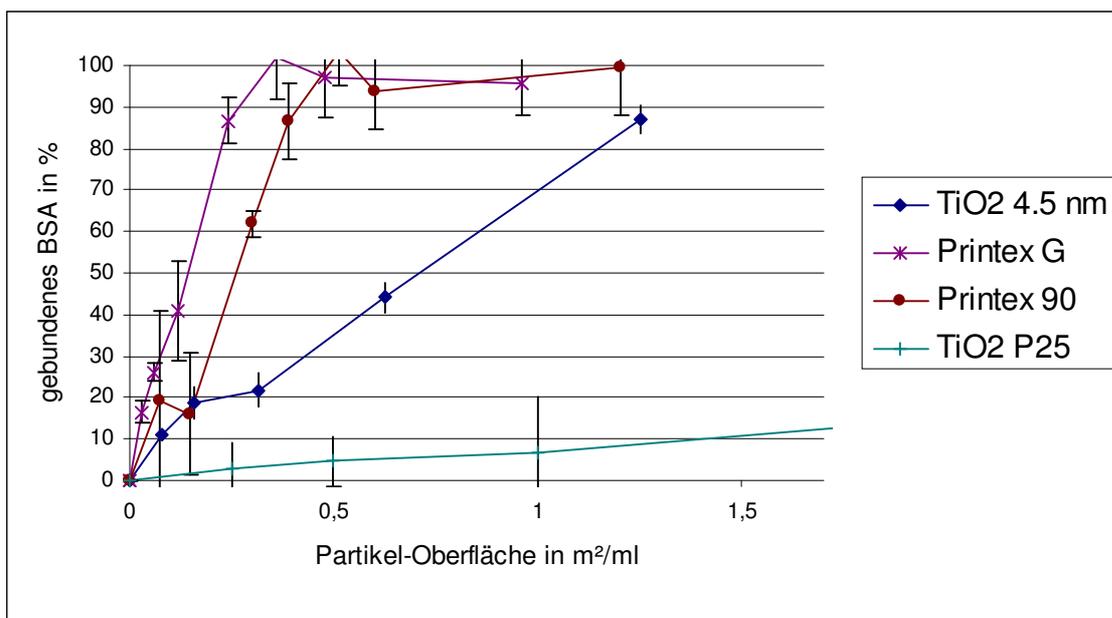


Abb.

A-4: Darstellung der dosisabhängigen Bindung von BSA an verschiedene Nanopartikel

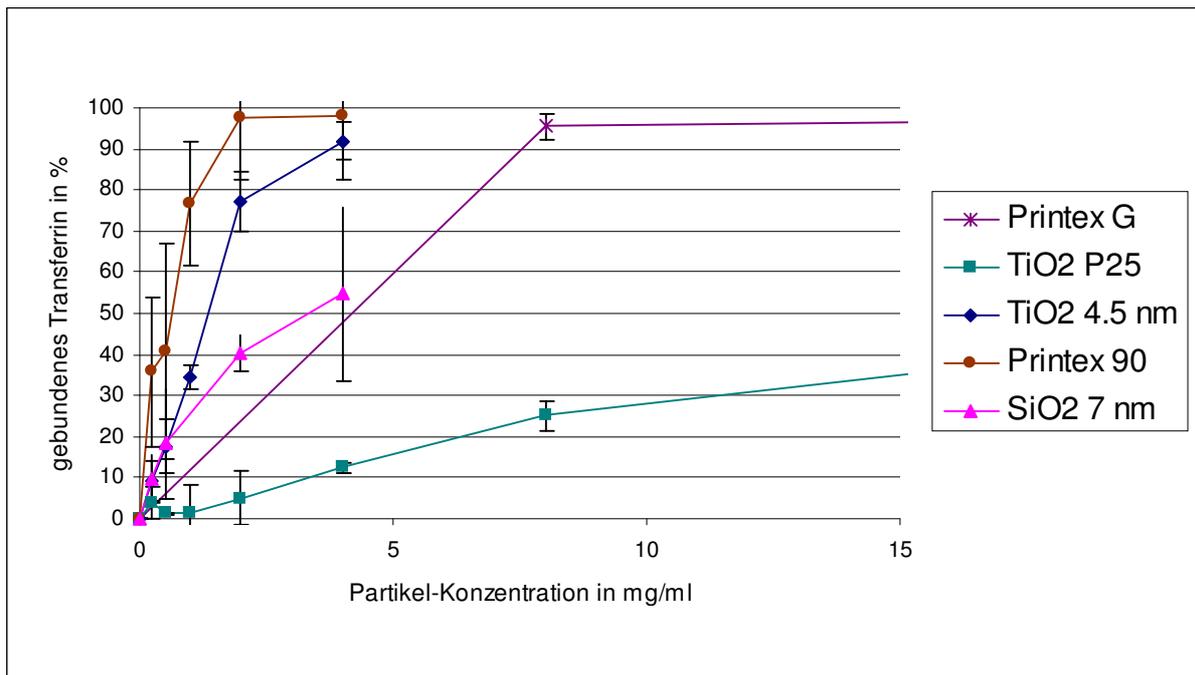


Abb. A-5: Darstellung der dosisabhängigen Bindung von humanem Transferrin an verschiedene Nanopartikel

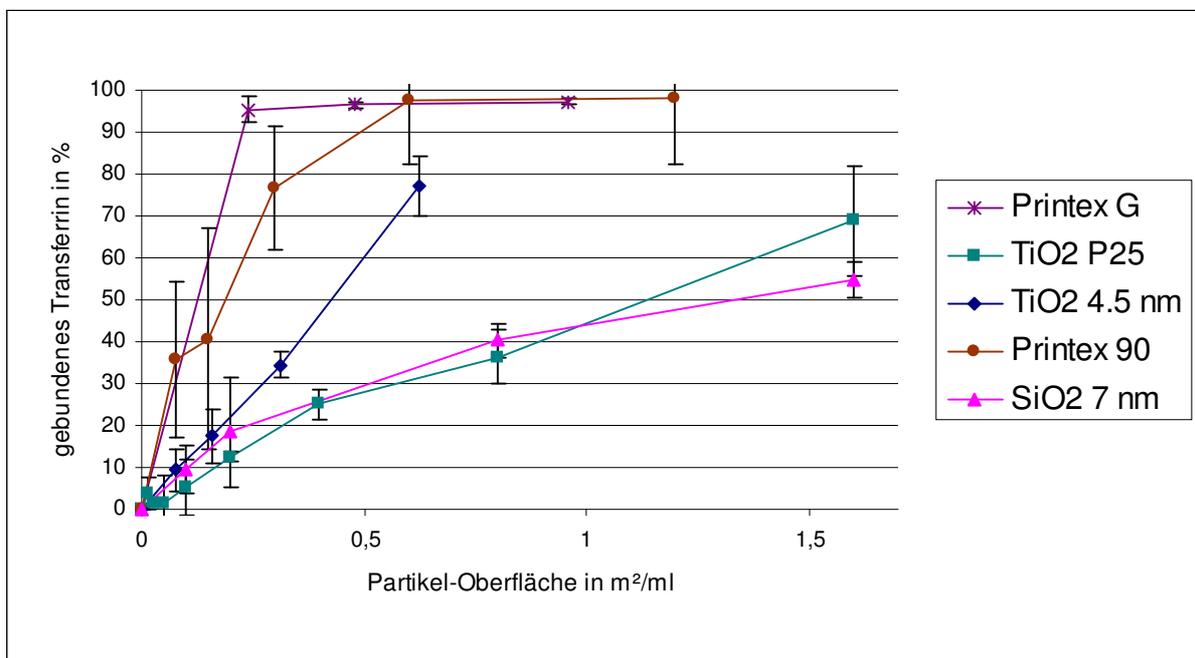


Abb. A-6: Darstellung der dosisabhängigen Bindung von humanem Transferrin an verschiedene Nanopartikel (Werte bei 0.4 m² waren nicht auswertbar) (n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

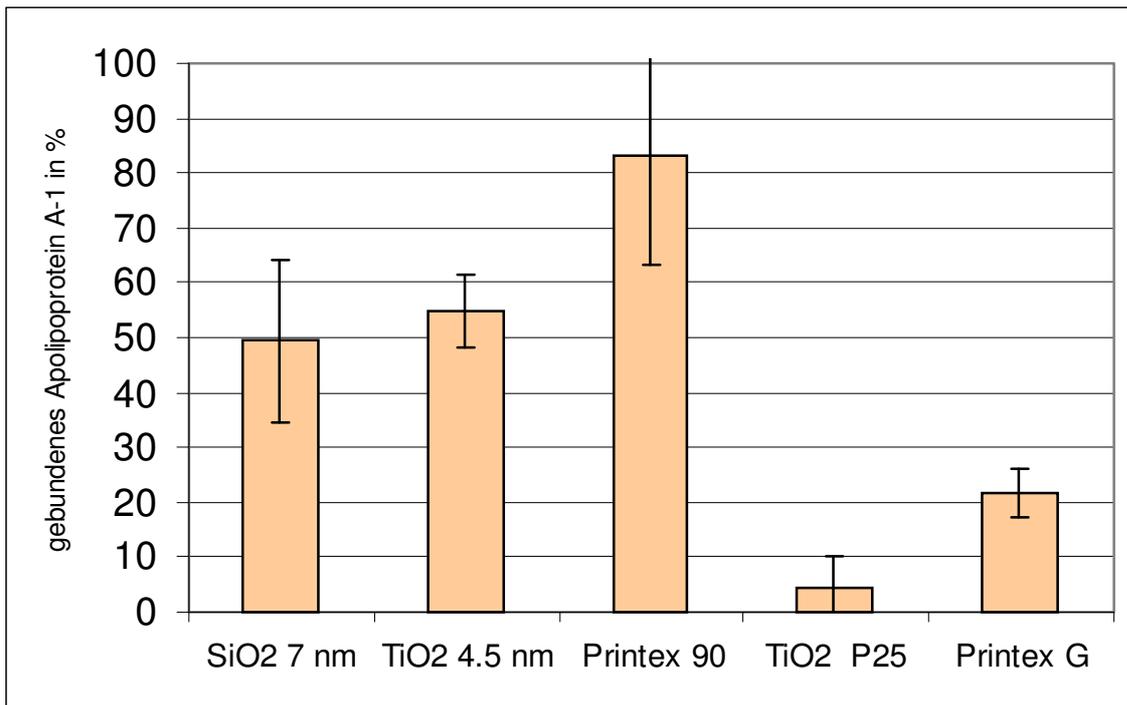


Abb. A-7: Darstellung der Bindung von Apolipoprotein A-1 (0.36 mg/ml) an verschiedene Nanopartikel (2 mg/ml) in Abhängigkeit von der eingesetzten Partikelart (Gesamtvolumen der Versuchsansätze: 100 μ l); Werte erhalten durch Proteinbestimmung aus dem Überstand mittels Bio-Rad Protein-Assay (n=3, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an)

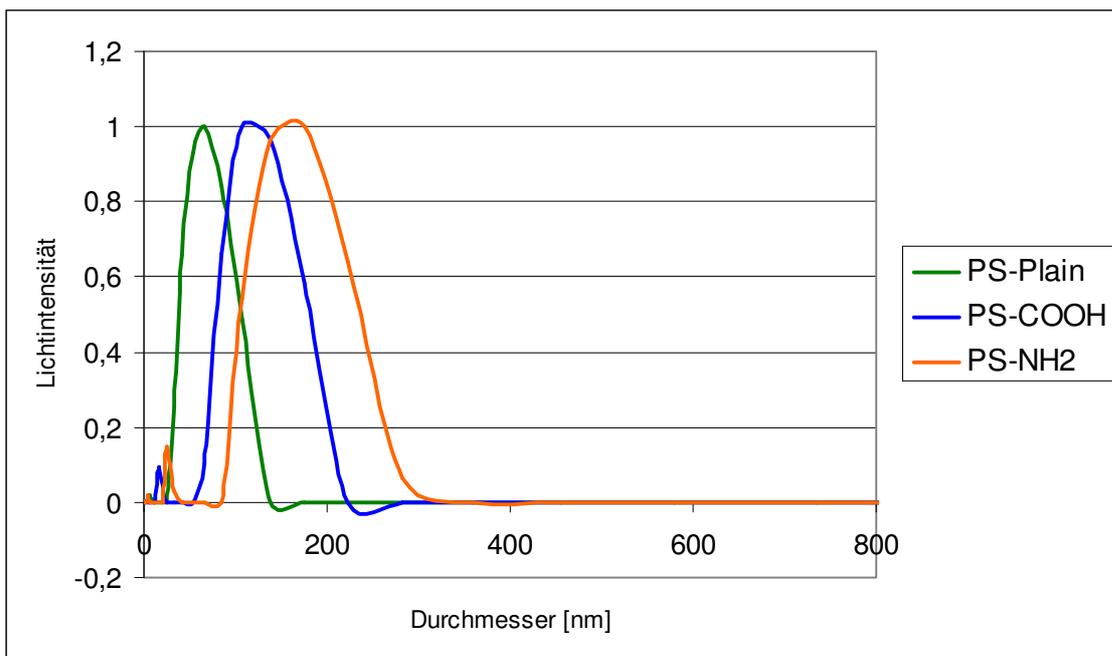


Abb.

A-8: Größenverteilung verschiedener Polystyrol-Partikel bei Suspension in A. dest. (2 mg/ml): PS-Plain ca. 70 nm, PS-COOH ca. 110 nm, PS-NH₂ ca. 170 nm

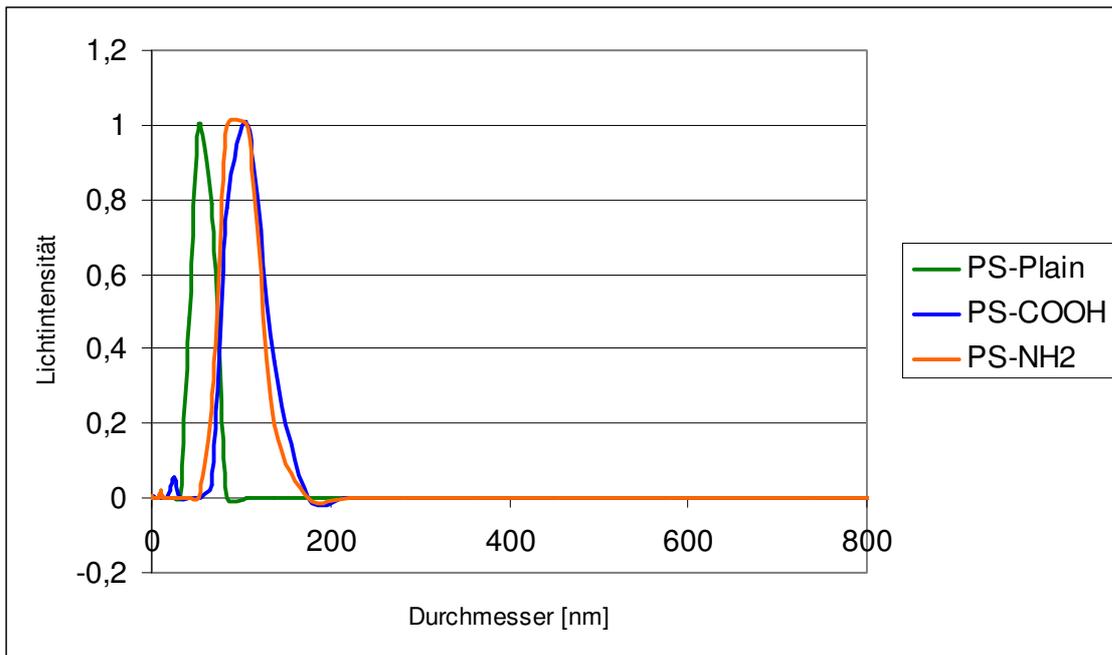


Abb. A-9: Größenverteilung verschiedener Polystyrol-Partikel (2 mg/ml) in PBS: PS-Plain ca. 50 nm, PS-COOH ca. 110 nm, PS-NH₂ ca. 110 nm

10. Literaturverzeichnis

- Abramhoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7):36-42.
- Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q. 1998. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol* 18(5):307-312.
- Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, et al. 2006. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* 117(4):824-830.
- Baggs RB, Ferin J, Oberdörster G. 1997. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol* 34(6):592-597.
- Barrett EG, Johnston C, Oberdörster G, Finkelstein JN. 1999. Silica binds serum proteins resulting in a shift of the dose-response for silica-induced chemokine expression in an alveolar type II cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 161(2):111-122.
- Beckers JF, Behrendt H, Cyrus J, Duggen S, Frankenberger M, Heinrich J, et al. 2005. Großes Netzwerk für kleine Teilchen - Aerosolforschung in der GSF:GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.
- Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier KL, Roth C, Ziesenis A, et al. 2001. Agglomerates of ultrafine particles of elemental carbon and TiO₂ induce generation of lipid mediators in alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4:613-618.
- Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier KL, Schumann G, Schulz H, et al. 2005. Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* 38(8):1080-1092.
- Beckman Instruments. 1998. TLA-55 Rotor.8.
- Behrendt H, Becker WM, Fritzsche C, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Friedrichs KH, et al. 1997. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int Arch Allergy Immunol* 113(1-3):69-74.
- Berman H, Henrick K, Nakamura H. 2003. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol* 10(12):980.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28(1):235-242.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins. RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- Borhani DW, Rogers DP, Engler JA, Brouillette CG. 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12291-12296

Literaturverzeichnis

- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol 3:11.
- Bousquet Y, Swart PJ, Schmitt-Colin N, Velge-Roussel F, Kuipers ME, Meijer DK, et al. 1999. Molecular mechanisms of the adsorption of a model protein (human serum albumin) on poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles. Pharm Res 16(1):141-147.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. Am J Respir Crit Care Med 166(9):1240-1247.
- Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. 2000. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. Occup Environ Med 57(10):685-691.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. Toxicol Appl Pharmacol 175(3):191-199.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. 2006. Ausgewählte Fragen und Antworten zur Nanotechnologie. Available: http://www.bfr.bund.de/cm/276/ausgewaehlte_fragen_und_antworten_zur_nanotechnologie.pdf [accessed 08.01.2007 2007].
- Calderon-Garciduenas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, et al. 2002. Air pollution and brain damage. Toxicol Pathol 30(3):373-389.
- Calderon-Garciduenas L, Gambling TM, Acuna H, Garcia R, Osnaya N, Monroy S, et al. 2001. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part 2. Cardiac pathology. Toxicol Sci 61(2):356-367.
- Carter DC, Ho JX. 1994. Structure of serum albumin. Adv Protein Chem 45:153-203.
- Cedervall T, Lynch I, Lindmann S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A 104(7):2050-2055.
- Cornelius RM, Archambault J, Brash JL. 2002. Identification of apolipoprotein A-I as a major adsorbate on biomaterial surfaces after blood or plasma contact. Biomaterials 23(17):3583-3587.
- Degussa. Was ist Carbon Black?
- DocCheck® Flexicon. Serum-Transferrin. Available: <http://flexicon.doccheck.com/Serumtransferrin> [accessed 05.02.2007].

Literaturverzeichnis

- Donaldson K, Stone V, Gilmour PS, Brown DM, MacNee W. 2000. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 358(1775):2741-2748.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJ. 2004. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 61(9):727-728.
- Ferin J, Oberdörster G. 1992. Translocation of particles from the pulmonary alveoli into the interstitium. *JAerosol Med* 5(3):179-187.
- Frank PG, Marcel YL. 2000. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* 41(6):853-872.
- Furumoto K, Nagayama S, Ogawara K-i, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, et al. 2004. Hepatic uptake of negatively charged particles in rats: possible involvement of serum proteins in recognition by scavenger receptor. *Journal of Controlled Release* 97(1):133-141.
- Furumoto K, Ogawara K, Nagayama S, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, et al. 2002. Important role of serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition. *J Control Release* 83(1):89-96.
- Gardea-Torresdey JL, Parson JG, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani HE, Santiago P, et al. 2002. Formation and Growth of Au Nanoparticles in live side Live Alfalfa Plants. *Nano Letters* 2(4):397-401.
- Gallagher J, Heinrich U, George M, Hendee L, Phillips DH, Lewtas J. 1994. Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis* 15(7):1291-1299.
- Gehr p, Bachofen M, Weibel ER. 1978. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation and diffusion capacity. *Respiration Physiology* 32(2):121-140.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, et al. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 113(11):1555-1560.
- Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18(15):2714-2723.
- Gumbleton M. 2001. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv Drug Delivery Rev* 49:281-300.
- Heinrich J, Wichmann HE. 2004. Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(5):341-348.
- Hermans C, Bernard A. 1999. Lung Epithelium-specific Proteins. *Am J Respir Crit Care Med* 159:646-678.

Literaturverzeichnis

- Hylton DM, Shalaby SW, Latour RA, Jr. 2005. Direct correlation between adsorption-induced changes in protein structure and platelet adhesion. *J Biomed Mater Res A* 73(3):349-358.
- International Commission on Radiological Protection. 1994. ICRP PUBLICATION 66: HUMAN RESPIRATORY TRACT MODEL FOR RADIOLOGICAL PROTECTION, 66. *Annals of the ICRP* 24:1-3.
- Kendall M, Brown L, Trought K. 2004. Molecular adsorption at particle surfaces: a PM toxicity mediation mechanism. *Inhal Toxicol* 16 Suppl 1:99-105.
- Kim KJ, Malik AB. 2003. Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(2):L247-259.
- Kondo A, Oku S, Higashitani K. 1991. Structural Changes in Protein Molecules Adsorbed on Ultrafine Silica Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 143(1):214-221.
- Kraft W, Dürr UM, Füll M, Bostedt H, Heinritzi K. 1999. Serum-Protein:Schattauer.
- Kragh-Hansen U. 1990. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* 37(1):57-84.
- Kreuter J. 2002. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 10(4):317-325.
- Kreyling WG, Fertsch S, Schmid G, Wenk A, Semmler-Behnke M. 2006. Cross-Membrane Translocation of 1.5 nm Versus 18 nm Gold Particles Is Size Dependent in Rats after Intratracheal or Intravenous Application 2006, A146.
- Kreyling W, Semmler M, Möller W. 2005. Ultrafeine Aerosole und Nanopartikel. *Atemw-Lungenkrkh Jahrgang* 31(8):411-419.
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Moller W. 2006. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J Aerosol Med* 19(1):74-83.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, et al. 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* 65(20):1513-1530.
- Kreyling WG, Semmler M, Moller W. 2004. Dosimetry and toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 17(2):140-152.
- Kreyling WG, Semmler M, Möller W. 2004. Health effects of ultrafine particles. *Journal of Aerosol Science* 35(Supplement 2):1155-1156.
- Kreyling W, Semmler-Behnke M, Möller W. 2006. Health implications of nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 8(5):543-562.
- Kruth HS, Chang J, Ifrim I, Zhang WY. 1999. Characterization of patocytosis: endocytosis into macrophage surface-connected compartments. *Eur J Cell Biol* 78(2):91-99.
- Kumar CSSR. 2006. *Nanomaterials-Toxicity, Health and Environmental Issues*:Wiley VCH.

Literaturverzeichnis

- Lindahl M, Stahlbom B, Svartz J, Tagesson C. 1998. Protein patterns of human nasal and bronchoalveolar lavage fluids analyzed with two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19(18):3222-3229.
- Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. 2006. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol* 40(14):4346-4352.
- Lottspeich F, Zorbas H, (Hrsg.). 1998. *Bioanalytik*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Löffler G, Petrides PE. 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer Verlag.
- Lynch I, Dawson KA, Linse S. 2006. Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Sci STKE* 2006(327):pe14.
- Medico Consult. Transferrin. Available: <http://www.medicoconsult.de/wiki/Transferrin> [accessed 05.02.2007].
- Möller W, Brown DM, Kreyling WG, Stone V. 2005. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. *Part Fibre Toxicol* 2:7.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622-627.
- Nemmar A, Hoet PHM, Dinsdale D, Vermeylen J, Hoylaerts MF, Nemery B. 2003. Diesel Exhaust Particles in Lung Acutely Enhance Experimental Peripheral Thrombosis. *Circulation* 107:1202-1208.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105(4):411-414.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Dinsdale D, Smith T, Xu H, et al. 2002. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* 166(7):998-1004.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Vermeylen J, Nemery B. 2003. Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 186(1):38-45.
- Nemmar A, Nemery B, Hoet PH, Van Rooijen N, Hoylaerts MF. 2005. Silica particles enhance peripheral thrombosis: key role of lung macrophage-neutrophil cross-talk. *Am J Respir Crit Care Med* 171(8):872-879.
- Noël-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R. 2002. Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins. *Journal of Chromatography B* 771:221-236.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16(6-7):437-445.

Literaturverzeichnis

- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Env Heal A* 65(20):1531-1543.
- Oberdörster G. 1996. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhal Toxicol* 8 Suppl:73-89.
- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5:173-179.
- Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, et al. 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst(96)*:5-74; disc 75-86.
- Oliva FY, Avalle LB, Camara OR, De Pauli CP. 2003. Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO₂ particles, Part I. *J Colloid Interface Sci* 261(2):299-311.
- Olivier J, Vauthier C, Taverna M, Ferrier D, Couvreur P. 1995. Preparation and Characterisation of biodegradable poly(isobutylcyano acrylate) nanoparticles with the surface modified by the adsorption of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4 4:349-356.
- Owens DE, 3rd, Peppas NA. 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307(1):93-102.
- Panté N, Kann M. 2002. Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~ 39 nm. *Molecular Biology of the Cell* 13:425-434.
- Parent RA. 1992. *Comparative Biology of the Normal Lung*:CRC.
- Pekkanen J, Peters A, Hoek G, Tiittanen P, Brunekreef B, de Hartog J, et al. 2002. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) study. *Circulation* 106(8):933-938.
- Penttinen P, Timonen KL, Tiittanen P, Mirme A, Ruuskanen J, Pekkanen J. 2001. Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J* 17(3):428-435.
- Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. 1997. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 155(4):1376-1383.
- Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, et al. 2006. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol* 3:13.

Literaturverzeichnis

- Peters TJ. 1996. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications: Biochemistry, Genetics and Medical Applications: Academic press San Diego inc., U.S.
- Pieper R, Gatlin CL, Makusky AJ, Russo PS, Schatz CR, Miller SS, et al. 2003. The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* 3(7):1345-1364.
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. 2005. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41(6):1211-1219.
- Rat der Europäischen Union. 1999. Richtlinie 1999/30/EG des Rates vom 22. April 1999 über Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid, Partikel und Blei in der Luft.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 377(Pt 1):159-169.
- Rezwan K, Meier LP, Rezwan M, Vörös J, Textor M, Gauckler LJ. 2004. Bovine Serum Albumin Adsorption onto Colloidal Al₂O₃ Particles: A New model based on Zeta Potential and UV-Vis Measurements. *Langmuir*.
- Rehn B, Seiler F, Rehn S, Bruch J, Maier M. 2003. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol Appl Pharmacol* 189(2):84-95.
- Richard F, Marecaux N, Dallongeville J, Devienne M, Tiem N, Fruchart JC, et al. 1997. Effect of smoking cessation on lipoprotein A-I and lipoprotein A-I:A-II levels. *Metabolism* 46(6):711-715.
- Roth C, Ferron GA, Karg E, Lentner B, Schumann G, Takenaka S, et al. 2004. Generation of Ultrafine Particles by Spark Discharging. *Aerosol Science & Technology* 38(3):228-235.
- Rushton EK, Oberdörster G, Finkelstein JN. 2006. Nanomaterials can Associate with Proteins Which Alters Their Effect In Vitro. In: American Thoracic Society May 19-24 2006 (Thematic Poster Session, [a126] HEALTH EFFECTS OF NANOMATERIALS)2006, San Diego, California, USA, A146, Poster Board #C142.
- Samet JM, DeMarini DM, Malling HV. 2004. Do airborne particles induce heritable mutations? *Biomedicine* 304(5673):971-972.
- Schulz H, Harder V, Ibaldo-Mulli A, Khandoga A, Koenig W, Krombach F, et al. 2005. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J Aerosol Med* 18(1):1-22.
- Semmler-Behnke M, Oberdörster G, Fertsch S, Kreyling WG. 2006. Binding of lung-lining fluid proteins to different ultrafine insoluble particles. *Eur Respir J* 28: Suppl. 50:617s.

Literaturverzeichnis

- Semmler M, Regula J, Oberdörster G, Heyder J, Kreyling WG. 2004. Lung-linig fluid proteins bind to ultrafine insoluble particles: a potential way for particles to pass air-blood barrier of the lung? *European Respiratory Journal* 24: Suppl. 48:100s.
- Stoeger T, Reinhard C, Takenaka S, Schroepel A, Karg E, Ritter B, et al. 2006. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect* 114(3):328-333.
- Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng* 12:439-446.
- Sun H, Li H, Sadler PJ. 1999. Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chemical Reviews* 99(9):2817-2842.
- Thiele L, Diederichs JE, Reszka R, Merkle HP, Walter E. 2003. Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials* 24(8):1409-1418.
- Tkachenko AG, Xie H, Coleman D, Glomm W, Ryan J, Anderson MF, et al. 2003. Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *J Am Chem Soc* 125(16):4700-4701.
- U.S. Environmental Protection Agency Washington D. 2007. U.S. Environmental Protection Agency Nanotechnology White Paper (Council SP, ed).
- von Klot S, Wolke G, Tuch T, Heinrich J, Dockery DW, Schwartz J, et al. 2002. Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J* 20(3):691-702.
- Wattiez R, Hermans C, Bernard A, Lesur O, Falmagne P. 1999. Human bronchoalveolar lavage fluid: Twodimensional gel electrophoresis, amino acid microsequencing and identification of major proteins. *Electrophoresis* 20:1634-1645.
- Wichmann H-E, Peters A. 2000. Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *PhilTransRSocLondA* 358:2751-2769.
- Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Falk R, Philipson K, Lundin A, Larsson S, et al. 2006a. No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhal Toxicol* 18(10):741-747.
- Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Seitz J, Falk R, Philipson K, Kreyling WG, et al. 2006b. Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J* 28(2):286-290.
- Wikipedia. Nanoteilchen. Available: <http://de.wikipedia.org/wiki/Nanopartikel2006>].
- Yang AH, MacGillivray RT, Chen J, Luo Y, Wang Y, Brayer GD, et al. 2000. Crystal structures of two mutants (K206Q, H207E) of the N-lobe of human transferrin with increased affinity for iron. *Protein Sci* 9:49-52.

Literaturverzeichnis

Yang PH, Sun X, Chiu JF, Sun H, He QY. 2005. Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjug Chem* 16(3):494-496.

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei Prof. Dr. Wolfgang Schmahl für die Überlassung des Themas und die wohlwollende und unkomplizierte Betreuung sowie den netten Kontakt bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinem Mentor, Herrn Dr. Wolfgang Georg Kreyling, der mich mit seiner langjährigen Erfahrung und seinem umfangreichen Wissen unterstützt hat und durch sorgfältiges Hinterfragen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso möchte ich mir bei Frau Dr. Manuela Behnke bedanken, die mir als tiermedizinische Kollegin zur Seite stand und durch ihr engagiertes Korrekturlesen meine Arbeit geprägt hat.

Selbstverständlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei allen anderen aus meiner Arbeitsgruppe bedanken, die mir durch ihre offene und humorvolle Art den Arbeitsalltag auflockerten, insbesondere bei Frau Carola Eggert, die mich im Labor unterstützt hat. Auch bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich bedanken, die mich so herzlich aufgenommen haben und für Fragen aller Art ein offenes Ohr hatten.

Für die angenehme und hilfreiche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. Andreas Stampfl aus dem Institut für Toxikologie und seinen Mitarbeitern Roman Radykewicz und Melanie Meier. Zudem danke ich Herrn Dr. Kristian Schilling (Fa. Nanolytics), der mich wesentlich mit seinem Know-how zum Thema Zentrifugation unterstützte, sowie Frau Dr. Gabriele Möller aus dem Genomanalysezentrum, die mich in technischen und methodischen Fragen beraten hat.

Ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern immer zu mir standen und mich meinen Weg gehen ließen.

Ebenso meinem Freund Florian, der so manche Belastung geduldig mitgetragen hat. Er hat mich durch seine Kreativität immer wieder erstaunt und mich zum Lachen gebracht.

Dank gilt auch meinem Patenkind Bastian, der die knappe gemeinsame Zeit stets durch seine fröhliche Art und seinen unglaublichen Ideenreichtum bereichert hat und mir die notwendige Erdung verliehen hat.

Daneben danke ich allen Freunden, Verwandten und Bekannten, die mich alle auf ihre Art unterstützt haben.

