

4 Exakte Quantifizierung einzelner Plasmaproteine anhand von Kalibriergeraden an PEGylierten Styrenmodellpartikeln

4.1 Einführung

Die Interaktion von Plasmaproteinen mit Oberflächen, die mit Polyethylenglykol (PEG) modifiziert sind, ist in den vergangenen Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass solche Partikel längere Blutzirkulationszeiten sowie niedrige Phagozytoseraten aufweisen (Allen, Hansen et al. 1991; Norman, Williams et al. 1993; Gref 1995; Zalipsky, Hansen et al. 1996; Vandorpe, Schacht et al. 1997; Gessner 2001; Photos, Bacakova et al. 2003; Dalhaimer, Engler et al. 2004; Lemarchand, Gref et al. 2005). Dieses Phänomen wurde durch die allgemein niedrige Proteinadsorption auf PEG-Oberflächen erklärt (Gombotz, Wang et al. 1991; Jeon and Andrade 1991; Jeon, Lee et al. 1991a). Es konnte beobachtet werden, dass sehr große Moleküle wie Fibrinogen oder Immunglobuline mit steigender Dichte und höherem Polymerisierungsgrad der PEG-Ketten sehr viel weniger Affinität zur Oberfläche zeigten als Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten. Da die Polystyrenoberfläche als Substrat für die Proteinadsorption dient (Blunk 1994; Lück 1997), ist es bei steigender Kettendichte nur noch kleineren Proteinen möglich, zwischen den PEG-Ketten einen Weg zur Polystyrenoberfläche zu finden.

Zahlreiche Untersuchungen sind durchgeführt worden, um die auf den Oberflächen adsorbierten Proteine zu erfassen und zu quantifizieren (van Wachem, Beugeling et al. 1985; Blunk, Hochstrasser et al. 1993). Die 2-D PAGE hat sich bisher als die effektivste Methode zur Analytik von Proteinen erwiesen. Allerdings hat sie einen entscheidenden Nachteil in der Quantifizierung von Proteinen. Bei der Auswertung werden die einzelnen Spots zu einem Gesamtproteinmuster zusammengefasst. Der Anteil jedes einzelnen Spots wird dann prozentual bestimmt.

Da sich Proteine aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte und Aminosäuresequenzen während des Färbeprozesses nicht gleichartig verhalten, können Bereiche, auf denen ein Protein A vorliegt, stärker angefärbt werden als Bereiche, in denen sich ein Protein B befindet, das auf die Färbung schwächer reagiert. Ist beispielsweise für einen bestimmten Partikeltyp auf den Gelen ein Albuminwert von 20%Vol bestimmt worden, so bedeutet das also nicht, dass exakt 20% der Proteine auf dem Partikel tatsächlich Albuminmoleküle sind.

Um nun eine exakte Aussage bezüglich der Mengenverhältnisse auf einem Nanopartikel ermitteln zu können, muss für jedes detektierte Plasmaprotein eine Kalibriergerade erstellt werden, um sie dann mit den Werten auf den Pherogrammen der detektierten Nanopartikel abgleichen zu können. Zusätzlich wird anhand der Proteingröße der ungefähre Beladungsgrad der Kugeln mit Proteinen bestimmt.

Als Modellpartikel wurden zwei Styrenpartikel mit unterschiedlicher Dichte der PEG-Ketten auf der Oberfläche gewählt. PEG1 hatte einen Abstand von 0,52 nm (5,2 Å) zwischen jeder PEG-Kette, PEG2 lediglich 0,33 nm (3,3 Å). Die Partikel wurden von Herrn Dr. Bernd Reiner Paulke vom FIfAP, Golm, synthetisiert. Die Konzentrationen und Molekulargewichte der einzelnen Proteine wurden der Literatur entnommen (Haeberli 1992-1995).

4.2 Physikochemische Charakterisierung

Tabelle 4: Physikochemische Parameter von PEG1 und PEG2

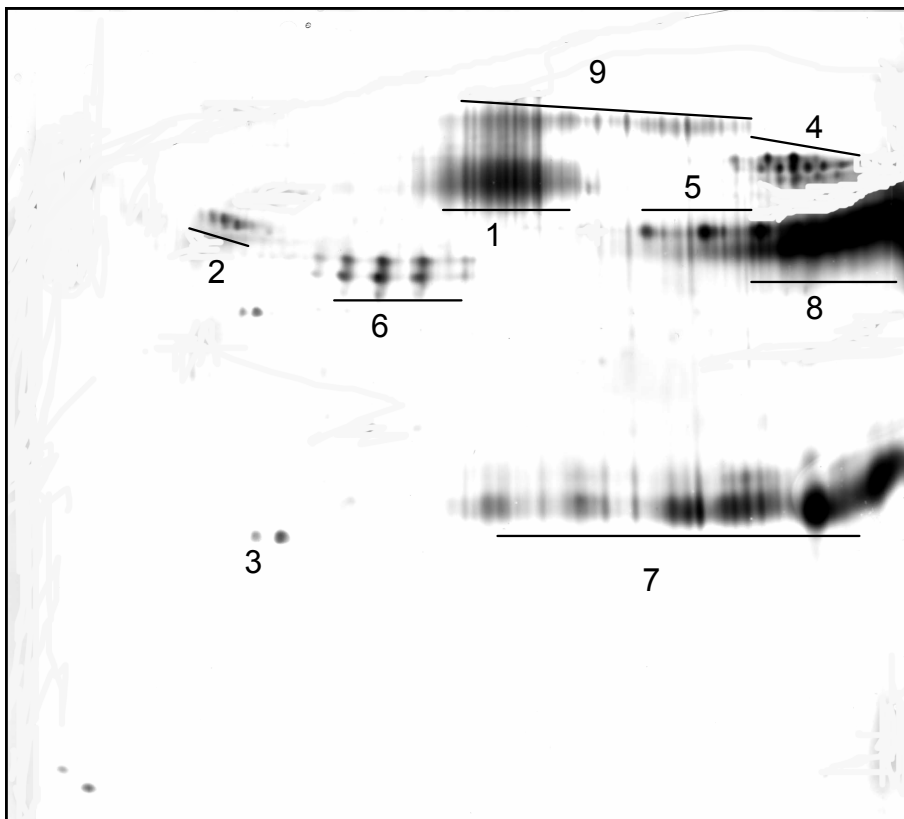
| | Partikeldurchmesser [nm], n=5 | PI | Maß für Hydrophobie [ml/m ²] | Konz. der Latexdispersion [%] |
|------|----------------------------------|-------|--|-------------------------------------|
| PEG1 | 120 ± 2,3 | 0,057 | 7,1 | 4,7 |
| PEG2 | 142 ± 2,4 | 0,162 | 5,1 | 6,5 |

Zur physikochemischen Charakterisierung wurde die Größe der Partikel mittels PCS bestimmt. Zusätzlich wurde eine Bengalrosaadsorption durchgeführt. Die Daten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die steigende Besetzungsdichte der Partikel mit PEG-Ketten ist im Bengalrosakoeffizienten erkennbar. Das Hydrophobiemass ist für beide Partikel sehr niedrig. Die hydrophobe Polystyrenoberfläche ist sowohl bei PEG1 als auch bei PEG2 nach außen abgeschirmt. Die Abstände der PEG-Ketten auf der Oberfläche ergaben sich durch Berechnung.

4.3 Detektion der Latexpartikel

Zur Ermittlung der Proteinadsorptionsmuster wurde eine 2-D PAGE-Analytik durchgeführt. Hierzu wurde eine Menge von PEG1 und PEG2, die 0,5 m² Partikeloberfläche entspricht, in 2,2 ml citratstabilisiertem Humanplasma inkubiert. Dazu wurden von der Latexdispersion von PEG1 0,23 ml und von Latexdispersion von PEG2 0,20 ml eingesetzt. Von der entstandenen Prüflösung wurden 100 µl durch 2-D PAGE untersucht. Die Abbildung 7 zeigt die entstandenen Pherogramme. Beide Gele zeigen das qualitative gleichwertige Proteinmuster, bestehend aus neun Spots. Die neun dazugehörigen Werte in Volume finden sich in Tabelle 5.



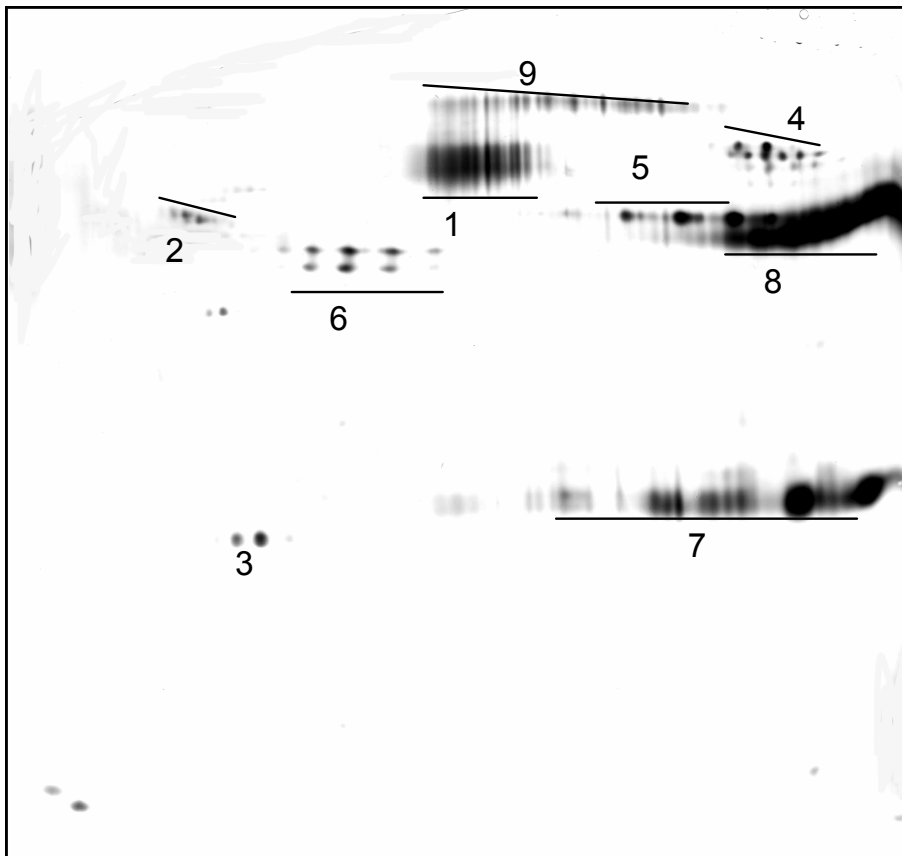


Abbildung 7: Pherogramme der 2-D PAGE-Analysen (PEG1, Seite 37, PEG2, Seite 38). Die Gele zeigen neun Hauptspots. 1: Albumin, 2: Antitrypsin, 3: ApoA-I, 4: Fibrinogen α , 5: Fibrinogen β , 6: Fibrinogen γ , 7: IgG γ 8; Ig leichte Ketten, 9: IgM

Die Gele zeigen neun Hauptspots. Auffallend sind die jeweils großen Spots von IgG γ sowie der Bereich der leichten Ketten. Zusätzlich sieht man die drei Spots der Fibrinogenbruchstücke α , β , γ und den Albuminspot. Die auf den Gelen ebenfalls sichtbaren Spots für ApoA-IV und Antitrypsin wurden in die Bewertung nicht mit einbezogen, da ihr Anteil unter 0,5%Vol lag.

Tabelle 5: Proteinadsorption auf PEG1 und PEG2 in Volume und das entsprechende Plasmavolumen ermittelt durch die Kalibriergeraden in Abbildung 9, n=4

| Plasmaproteine | PEG1 | Volumen Plasma [µl] | PEG2 | Volumen Plasma [µl] |
|----------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| Albumin | 10.672 ± 2.341 | 1,5 | 11.617 ± 3.443 | 1,7 |
| ApoA-I | 1.438 ± 1.007 | 1,8 | 822 ± 174 | 1,6 |
| Fibrinogen | 13.421 ± 1.993 | 3,8 | 8.378 ± 2.344 | 2,4 |
| IgG | 49.121 ± 5.286 | 12,4 | 39.419 ± 3.875 | 10,0 |
| IgM | 7.606 ± 1.539 | 6,3 | 4.303 ± 448 | 4,5 |

Wie in der Literatur beschrieben adsorbieren große Proteinmoleküle mit steigender PEG-Kettendichte schwächer. Die Werte für Fibrinogen, IgG und IgM fallen mit steigender Hydrophilie ab. Die Erkenntnis, dass kleinere Moleküle bei steigender Kettendichte stärker adsorbieren wird für das Albumin bestätigt.

Die Abbildung 8 und Tabelle 6 zeigt das aus Tabelle 5 resultierende Balkendiagramm für die relativen Proteinmengen in %Vol.

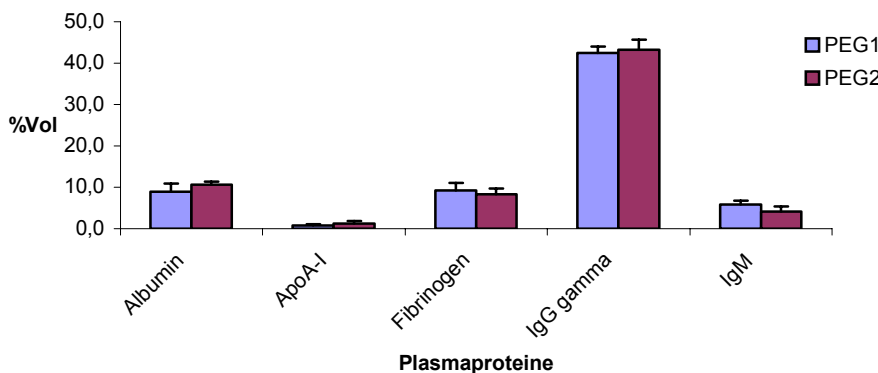


Abbildung 8: Proteinadsorption von PEG1 und PEG2 in %Vol

Es ist deutlich zu erkennen, dass IgG γ den Hauptspot bildet. Über 40% der detektierten Spots sind dem IgG γ zuzuordnen. Die leichten Ketten ergeben sich aus der Summe der adsorbierten Mengen an IgG γ und IgM. Sie sind prinzipiell für die Quantifizierung der Proteine unbedeutend, da sie sich aus der Gesamtmenge der Immunglobuline ergeben. Für die Auswertung werden lediglich die schweren Ketten herangezogen.

Für Albumin und Fibrinogen zeigt die Abbildung 8 deutlich niedrigere Werte von ca. 10%Vol an. Die Werte für ApoA-I sind vernachlässigbar klein. Hier lässt sich aufgrund der niedrigen Werte keine Tendenz erkennen. Trotzdem wurde ApoA-I als einziges Apolipoprotein, das auf PEGylierten adsorbiert, in die Berechnungen miteinbezogen.

Die mit MELANIE 3 ermittelten Werte lassen also den Schluss zu, dass IgG γ am stärksten auf den PEGylierten Latices vertreten ist. Dies erscheint widersinnig, da IgG γ im Blut einen opsonisierenden Effekt auf injizierte Nanocarrier besitzt (Absolom 1986; Patel 1992), während ein Protein wie Albumin, für das dysopsonierende Eigenschaften nachgewiesen wurden (Stolnik, Illum et al. 1995), nur zu etwa 10% auf den Partikeln adsorbiert ist.

Tabelle 6: Relative Mengen der adsorbierten Plasmaproteine in %Vol.

| Proteine | PEG1 | SD | PEG2 | SD |
|-------------------|------|-----|------|-----|
| Albumin | 8.9 | 2.0 | 10.6 | 0.8 |
| ApoA-I | 0.8 | 0.3 | 1.3 | 0.5 |
| Fibrinogen | 9.3 | 1.7 | 8.3 | 1.4 |
| IgG γ | 42.4 | 1.5 | 43.2 | 2.4 |
| Ig leichte Ketten | 30.1 | 2.5 | 28.7 | 4.4 |
| IgM | 5.8 | 1.0 | 4.2 | 1.2 |

4.4 Erstellen der Kalibriergeraden und Berechnung

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde citratstabilisiertes Humanplasma in vier unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Hierzu wurde folgende Plasmavolumen mit Rehydratisierungslösung gemischt. Anschließend wurden die IPG-Streifen damit inkubiert:

2,5 µl Plasma + 347,5 µl Rehydratisierungslösung
5 µl Plasma + 345 µl Rehydratisierungslösung
10 µl Plasma + 340 µl Rehydratisierungslösung
15 µl Plasma + 335 µl Rehydratisierungslösung

Das Erstellen der Kalibriergeraden hat sicherlich den Nachteil, dass bei Humanplasma schwankende Konzentrationen der einzelnen Plasmaproteine auftreten. Das Arbeiten mit entsprechenden Eichlösungen jedes einzelnen Proteins wäre sicherlich vorteilhafter gewesen. Solche Eichlösungen existieren jedoch nicht. Einzelne Plasmaproteine sind erhältlich, allerdings ist bei diesen Lösungen der Titer nicht eingestellt. Somit erschien das Arbeiten mit humanem Vollplasma und der Abgleich der Werte in Volume mit Werten aus der Literatur (Haeberli 1992-1995) als am ehesten geeignet, Kalibriergeraden zu erstellen.

Die Tabelle 7 zeigt die Werte, die bei der Erstellung der Kalibriergeraden für die jeweiligen Plasmaproteine im Vollplasma ermittelt wurden.

Tabelle 7. Werte der einzelnen Plasmaproteine für die Eichgerade in Volume. Die Werte ergaben sich aus n=2 Versuchen

| Plasma [μ l] | Albumin | ApoA-I | Fibrinogen | IgG | IgM |
|-------------------|---------|--------|------------|--------|--------|
| 2.5 | 18.764 | 2.115 | 9.245 | 9.321 | 5.143 |
| 5 | 35.500 | 3.856 | 17.263 | 14.677 | 14.081 |
| 10 | 64.141 | 9.373 | 32.865 | 35.094 | 17.779 |
| 15 | 116.182 | 13.591 | 62.304 | 63.882 | 28.744 |

Die Vorgehensweise und Auswertung soll nun am Beispiel von Albumin näher erläutert werden. Für jedes Plasmaprotein wurde nun eine Kalibriergerade erstellt. Die Abbildung 9 zeigt die entsprechende Kalibriergerade des Albumins. Anhand der Geraden wurde nun der für die Latexdispersionen ermittelte Wert mit dem dazugehörigen Volumen an Plasma korreliert.

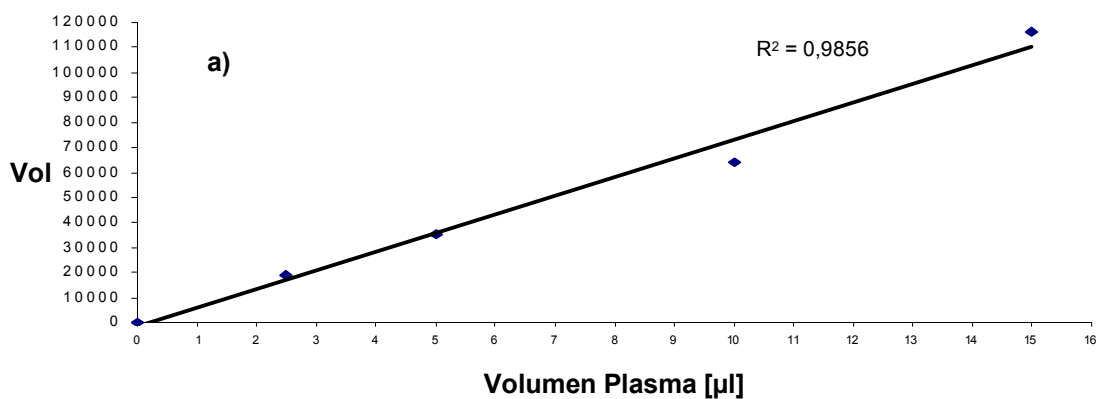
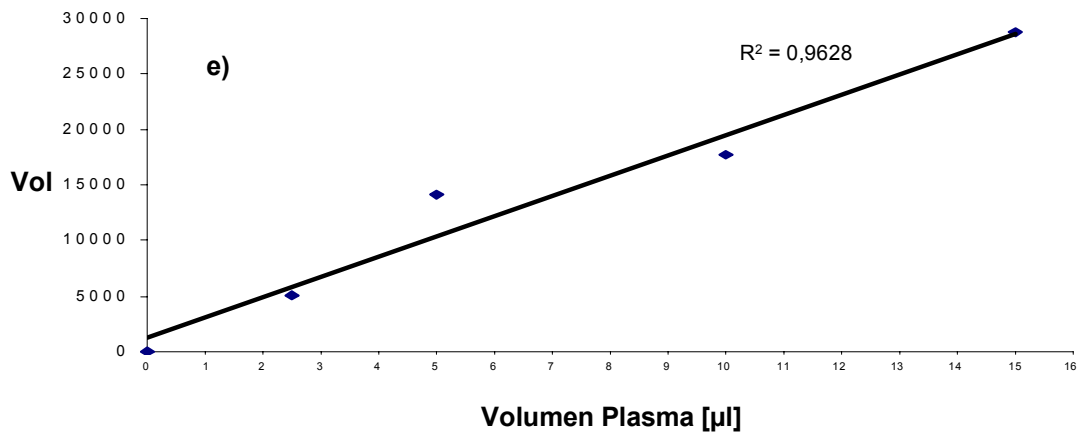
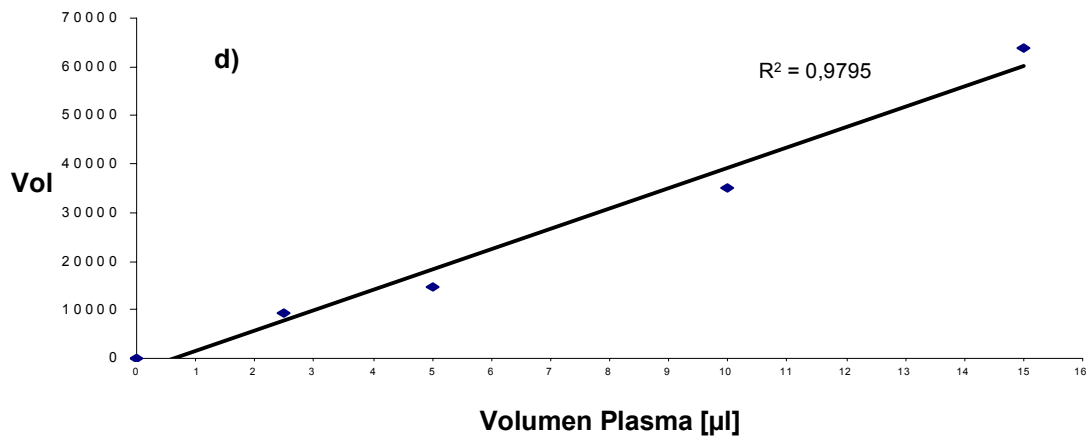
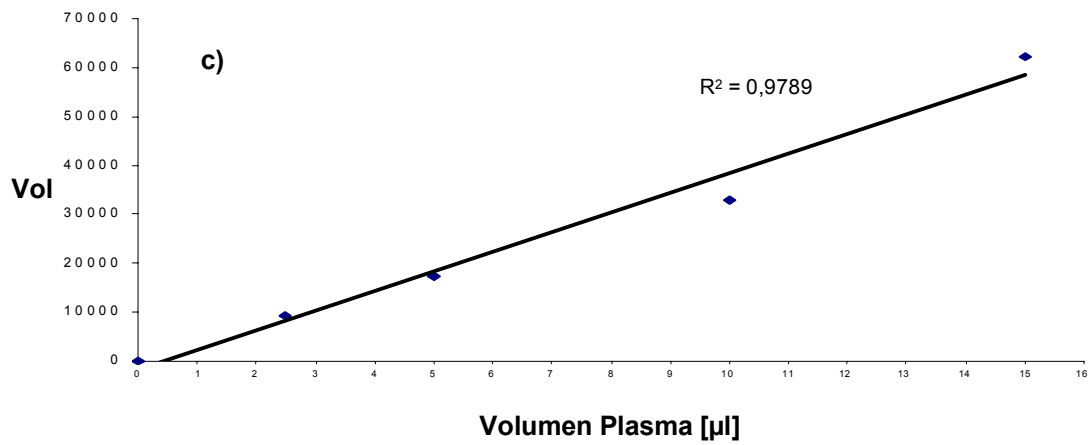
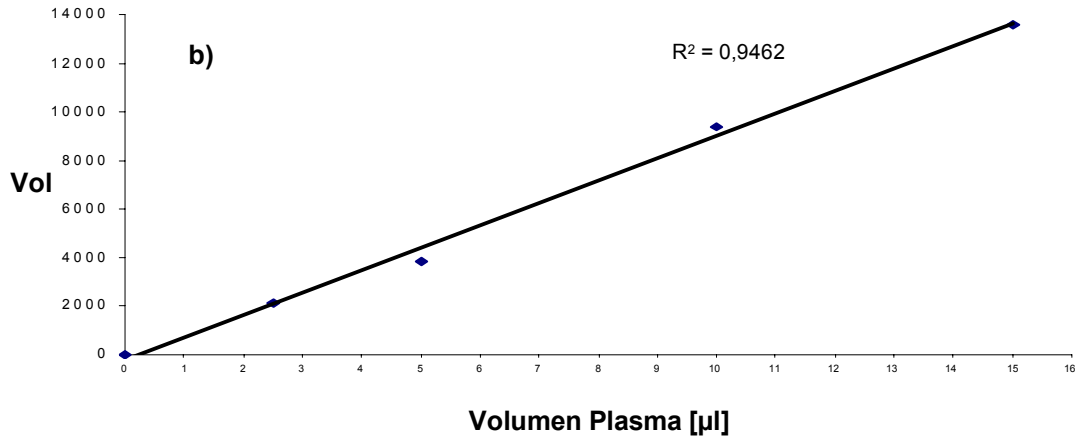


Abbildung 9: Kalibriergerade von Albumin (a) (Seite 42), ApoA-I (b), Fibrinogen (c), IgG γ (d), IgM (e) (Seite 43), ermittelt anhand von vier unterschiedlichen Plasmakonzentrationen, n=2

Erstellen der Kalibriergeraden und Berechnung



Einem Albuminwert von 10.672 für die Latexdispersion von PEG1 entspricht laut erhaltener Kalibriergerade (Abbildung 9) ein Plasmavolumen (PV) von ca. 1,5 µl.

Zur weiteren Berechnung war es notwendig, die Gesamtmenge an Partikeln zu berechnen, die mit Vollplasma inkubiert wurde. Wie bereits erwähnt, wurden von Latexdispersion PEG1 0,23 ml inkubiert. Für die für Dispersion PEG1 ermittelten physikochemischen Parameter entspricht das einer Partikelanzahl von $11,34 \times 10^{12}$ Partikeln. Da nur 100 µl der generierten 200 µl Prüflösung durch 2-D PAGE untersucht wurden betrug die Partikelanzahl $5,67 \times 10^{12}$. Anhand der Partikelanzahl sowie der Angaben aus Tabelle 8 konnte nun mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Gleichung die exakte Anzahl eines jeden Plasmaproteins auf der Oberfläche eines Latexpartikels berechnet werden.

Von Latexdispersion PEG2 wurden 0,2 ml in 2,2 ml Vollplasma inkubiert und anschließend 100 µl per 2-D PAGE analysiert. Dies entspricht einer Partikelanzahl von $4,11 \times 10^{12}$.

Gleichung 1: Gleichung zur Berechnung einer Proteinmenge auf der Partikeloberfläche am Beispiel von Albumin. PV: Plasmavolumen (ermittelt durch Eichgerade); N_A : Avogadro'sche Zahl ($6,023 \times 10^{23}$ mol⁻¹)

$$\frac{PV_{\text{Albumin}}[\text{l}] \times \text{Plasmakonzentration}_{\text{Albumin}}[\text{g/l}] \times N_A[\text{mol}^{-1}]}{\text{Molekulargewicht}_{\text{Albumin}}[\text{g/mol}] \times \text{Partikelpopulation}} = \text{Moleküle}_{\text{Albumin}} / \text{Latexpartikel}$$

Hier sei der exakte Weg zur Berechnung der Menge der einzelnen Proteine am Beispiel von Albumin auf PEG1 dargestellt.

Berechnung der inkubierten Partikelpopulation von PEG1:

Inkubierte Menge 0,23 ml Humanplasma

Konzentration: 4,7 % [m/V]

Detektierte Menge: 0,115 ml

Durchmesser PEG1= 120 nm

Dichte_{Styren}: 1,04 g/ml

Berechnung des Partikelvolumens:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$$

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times (60 \times 10^{-9} \text{ m})^3$$

$$V = 9 \times 10^{-22} \text{ m}^3$$

Berechnung des Volumens der Latexdispersion:

$$\frac{4,7 \text{ g/100ml} \times 2,3 \times 10^{-3}}{1,04 \text{ g/ml} \times 2} = 0,005 \text{ ml} (= 5 \times 10^{-9} \text{ m}^3)$$

Berechnung der Partikelanzahl:

$$\frac{5 \times 10^{-9} \text{ m}^3}{9 \times 10^{-22} \text{ m}^3} = 5,67 \times 10^{12} \text{ Partikel / Pherogramm}$$

Berechnung der Albuminmenge auf PEG1::

$$\frac{1,5 \times 10^{-6} \text{ l} \times 42 \text{ g/l} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{66.500 \text{ g/mol} \times 5,67 \times 10^{12} \text{ Partikel}} = \underline{\underline{101 \text{ Albuminmoleküle/PEG1-Partikel}}}$$

Tabelle 8: Proteinkennzahlen der adsorbierten Plasmaproteine nach (Perkins, Smith et al. 1990; Haerberli 1992-1995; Torffvit and Rippe 1999)

| Protein | Molekulargewicht [g/mol] | Konzentration im Plasma [g/l] | Größe [nm] | Radius [nm] | Fläche [nm ²] |
|--------------|--------------------------|-------------------------------|------------|-------------|---------------------------|
| Albumin | 66.500 | 42,0 | 8 x 3,8 | | 30 |
| ApoA-I | 28.000 | 1,37 | | 4,5 | 64 |
| Fibrinogen | 340.000 | 2,6 | 45 x 9 | | 405 |
| IgG γ | 150.000 | 8,5 | | 5,5 | 95 |
| IgM | 966.000 | 2,0 | | 12 | 452 |

Durch Einsetzen der jeweiligen Parameter in die oben aufgeführte Gleichung ergibt sich für die Proteinzusammensetzung auf jeweils einem einzigen Partikel ein recht gut überschaubares Bild, welches die tatsächliche Zusammensetzung der Proteine auf der Partikeloberfläche zutreffender wiedergibt als die ausschließlich mit MELANIE 3 ermittelten Werte. Tabelle 9 und Abbildung 10 geben die errechneten Werte tabellarisch und graphisch wieder. Es fällt sofort auf, dass Albumin mit Werten von 53% und 61% mit Abstand die größte Proteinfraction auf den Partikeln bildet. Mehr als die Hälfte aller adsorbierten Proteine sind Albuminmoleküle. Die hier ermittelte starke Präsenz von Albumin auf den mit PEG veredelten Oberflächen befindet sich nun auch im Einklang mit der beschriebenen dysopsonisierenden Eigenschaft des Albumins (Kreuter and Borchard 1992). Die zweitstärkste Fraction ist das IgG γ . Es ist mit 39% auf PEG1 und mit 33% auf PEG2 vertreten. IgG γ ist bekannt als opsonisierendes Protein, das eine Aufnahme der Partikel durch das MPS vermittelt. Die restlichen drei Proteine betragen weniger als 8% des Gesamtproteinmusters und sind von daher wohl für einen Effekt in vivo zu schwach vertreten. Betrachtet man das Adsorptionsverhalten von IgG γ und Albumin näher, so fällt auf, dass die Albuminkonzentration auf der Partikeloberfläche mit steigender PEG-Kettendichte um 8% zunimmt, während der Anteil von IgG um 6% abnimmt. Mit zunehmender Hydrophilisierung steigt also das Verhältnis zwischen Opsonin und

Dysopsonin zu Gunsten des Dysopsonins an. Bildet man einen Quotienten aus IgG γ und Albumin, so sinkt dieser von 0,73 für PEG1 auf 0,54 für PEG2 ab. Auf PEG2 sind also nahezu doppelt so viele Albuminmoleküle wie Immunglobuline vorhanden. Dieses Verhältnis scheint ausreichend, um den opsonisierenden Effekt der Immunglobuline zu überdecken.

Tabelle 9: Auf den Partikeln adsorbierte Proteine (absolute und prozentuale Mengen)

| Plasmaproteine | Proteinmoleküle auf PEG1 | Prozentualer Anteil auf PEG1, [%] | Proteinmoleküle auf PEG2 | Prozentualer Anteil auf PEG2 [%] |
|----------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Albumin | 101 | 53 | 157 | 61 |
| ApoA-I | 9 | 5 | 11 | 4 |
| Fibrinogen | 3 | 2 | 3 | 1 |
| IgG γ | 74 | 39 | 84 | 33 |
| IgM | 1 | 0,5 | 1 | 0,4 |

Abbildung 10 stellt den Unterschied zwischen den über Kalibriergeraden bestimmten und den lediglich mit MELANIE 3 erhaltenen Proteinmengen dar.

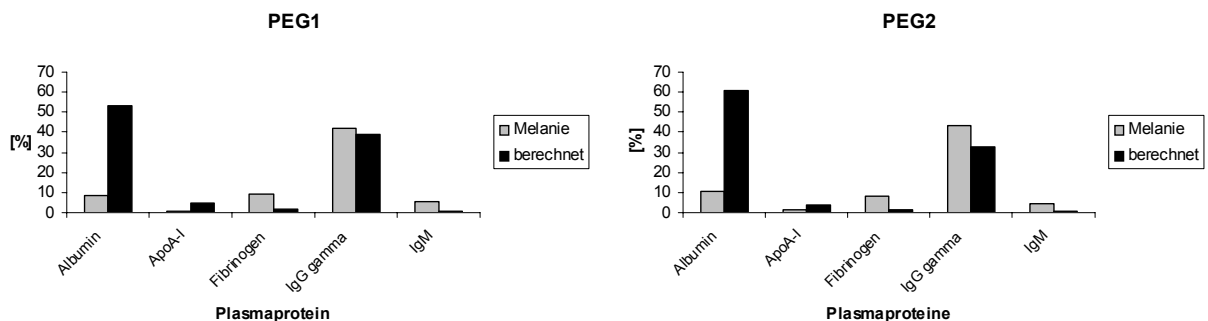


Abbildung 10: Gegenüberstellung der tatsächlichen Proteinmenge und der mit Melanie 3 erhaltenen Werte

Als besonders bemerkenswert stellt sich der Unterschied in der Menge an Albumin dar. Zeigte sich ursprünglich ein Wert von nur unter 10% am Proteingesamtmuster, so konnte hiermit gezeigt werden, dass der tatsächliche Wert an Albumin mehr als 50% der Gesamtmenge an Protein betrug. Das Ergebnis ist umso bemerkenswerter, die Menge an adsorbiertem Fibrinogen betrachtet wird. Die %Vol-Werte von Fibrinogen und Albumin sind in etwa auf demselben Niveau. Anhand der Eichgerade lässt sich aber zeigen, dass die Fibrinogenmenge tatsächlich nur einen Bruchteil der gesamten adsorbierten Proteinmenge beträgt.

4.5 Ermittlung der Proteinbeladung

Der zweite Grund, der neben der Anlagerung von Dysopsoninen für eine schwache Interaktion von PEGylierten Partikeln verantwortlich gemacht wird, ist der niedrige Beladungsgrad mit Plasmaproteinen im Allgemeinen. Anhand der ermittelten Proteinmengen (Tabelle 9) und der recherchierten Proteingrößen (Tabelle 8) kann näherungsweise der Beladungsgrad mit Proteinen errechnet werden. Für die Größe eines Proteins wird entweder der Proteinradius angegeben, wenn es sich um eher rundlich geformte Proteine handelt oder Länge und Breite, wenn sie eine andere Form besitzen. Für Immunglobuline wird im Allgemeinen der Radius angegeben. Diese Moleküle sind dichter gepackt und haben daher eine geringere Ausdehnung (Perkins, Nealis et al. 1991), während ein Protein wie das Fibrinogenmolekül eher gepackt ist und seine Ausdehnung im Raum mit der Form eines Vogels mit gespreizten Flügeln vergleichbar ist (Doolittle 1984). Für die Berechnung der Proteinbeladung wurde nun näherungsweise angenommen, dass die Immunglobuline und ApoA-I runde Form und Albumin und Fibrinogen die Form eines Rechteckes besitzen. Die Oberfläche der Partikel wurde durch folgende Formel zur Berechnung der Oberfläche einer Kugel errechnet:

$$O_G = 4 \cdot r^2 \cdot \pi$$

Hierbei ergab sich für die Partikel der Dispersion von PEG1 eine Gesamtoberfläche von 45.239 nm² und für die Partikel der Latexdispersion von PEG2 von 63.347 nm². Die jeweils errechneten Flächen für die Proteine finden sich in Tabelle 10.

Die Berechnung ergab, dass die Proteinbeladung auf PEG1 ca. 27% und die auf PEG2 sogar nur ca. 23% beträgt. Hier zeigen sich wieder die proteinresistenten Eigenschaften der Polyethylenglykole, die hinreichend in der Literatur beschrieben werden (Jeon and Andrade 1991; Jeon, Lee et al. 1991a; Zalipsky, Hansen et al. 1996). Diese niedrige Proteinbeladung wurde bereits mit einer sehr kurzen PEG-Kette von 200 Da erreicht. Mit steigendem Polymerisierungsgrad fällt die Menge an adsorbiertem Protein nochmals ab. Man kann also davon ausgehen, dass das Ausmaß der Proteinadsorption bei PEG-Ketten im kDa-Bereich nochmals erheblich absinkt und dadurch eine längere Blutzirkulationszeit ermöglicht.

Tabelle 10: Von den Proteinen besetzten Flächen auf den Latexpartikeln

| | PEG1 | | PEG2 | |
|--------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| | Anzahl / Partikel | Fläche [nm ²] | Anzahl / Partikel | Fläche [nm ²] |
| Albumin | 101 | 3070 | 157 | 4772 |
| ApoA-I | 9 | 346 | 11 | 423 |
| Fibrinogen | 3 | 1215 | 3 | 1215 |
| IgG γ | 74 | 7032 | 84 | 7982 |
| IgM | 1 | 452 | 1 | 452 |
| Summe | 188 | 12115 | 256 | 14844 |

Abbildung 11 verschafft einen graphischen Überblick über das Ausmaß der Proteinadsorption auf den beiden untersuchten Partikeln. Die Flächen geben die Proteinbeladung an, die für jedes Protein errechnet wurde.

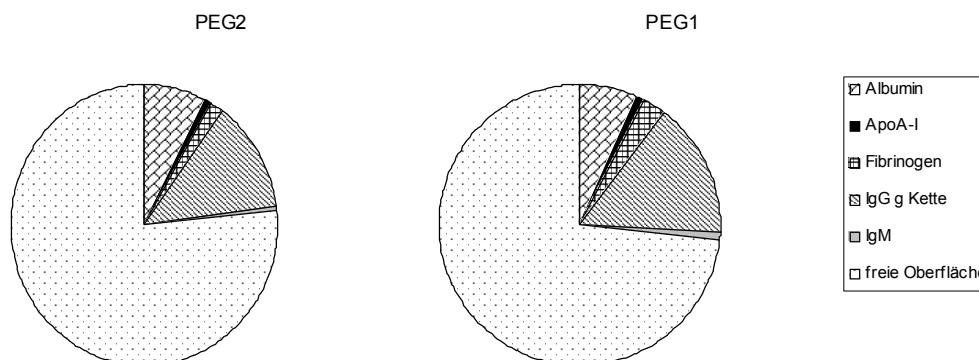


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Proteinbeladung auf beiden Partikeln

4.6 Fazit

Die durchgeführten Untersuchungen haben zwei wichtige Sachverhalte gezeigt:

Zum einen konnte gezeigt werden, dass die 2-D PAGE eine sehr gute und hochempfindliche Methode ist, Proteine auch in sehr kleinen Mengen zu detektieren. Bereits eine Menge eines großen Moleküls, wie IgM, pro Partikel lässt sich auf den Pherogrammen nachweisen. Aber auch niedrige Mengen kleinerer Proteine, wie ApoA-I stellen die 2-D PAGE vor keinerlei Problem. Probleme bestehen hingegen, wenn es darum geht, die Proteine mengenmäßig zu erfassen. Die 2-D PAGE wird als „semiquantitative“ Methode bezeichnet, was genau dies zum Ausdruck bringt. Die Auswertung mit der Software MELANIE 3 gibt keinerlei Auskunft über die tatsächliche Anzahl von Proteinen auf den untersuchten Nanopartikeln. Am Beispiel Albumin/Fibrinogen konnte diese Problematik besonders eindrucksvoll gezeigt

werden. Bei der Korrelation solcher Daten mit in-vivo-Daten lediglich anhand der MELANIE 3-Daten ermittelt muss dies berücksichtigt werden.

Zum zweiten ist diese Studie ein weiterer wichtiger Beleg für die dysopsonisierende Eigenschaft von Albumin. Diese Eigenschaft ist zwar schon beschrieben (Kreuter and Borchard 1992), jedoch ist sie nicht so gut belegt, wie beispielsweise die dysopsonisierende Wirkung der Immunglobuline. Wäre das Albumin nicht in solch hoher Menge vertreten, so wäre durch die starke Präsenz des IgG γ eine gesteigerte Interaktion mit dem MPS zu erwarten. Das Albumin scheint in der Lage zu sein, die opsonisierende Wirkung des IgG γ zu aufzuheben