

**Aufnahme und Funktion von
konventionellen, targetisierten und PEGylierten
Glucose-Oxidase-Liposomen in
NADPH-Oxidase-defiziente Granulozyten:**

Untersuchungen an Blutzellen und der
gp91^{phox-/-} B6 129S6 Cybb^{tml^{din}}-Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Iris Schwantzer

Aus dem Institut für
Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. E. Petzinger

und

der Abteilung für Hämatologie und Onkologie
der Universitätskinderklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. R. Handgretinger
Betreuer: Prof. Dr. G. Bruchelt

**Aufnahme und Funktion von
konventionellen, targetisierten und PEGylierten
Glucose-Oxidase-Liposomen in
NADPH-Oxidase-defiziente Granulozyten:**

Untersuchungen an Blutzellen und der
gp91^{phox-/-} B6 129S6 Cybb^{tml^{din}}-Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von
Iris Schwantzer
Tierärztin aus Mainz

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. E. Petzinger

Prof. Dr. G. Bruchelt

Tag der Disputation: 27.11.2007

Nach § 10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei der von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchung habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Tübingen den 05.05.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
Glossar	12
1. Einleitung	13
1.1. Immunologische Grundlagen	13
1.1.1. Das retikuloendotheliale System	13
1.1.2. Die physiologische Granulozytenfunktion	13
1.1.3. Das Komplementsystem	17
1.1.4. Immunglobuline	19
1.2. Septische Granulomatose als Folge der NADPH-Oxidase-Defizienz	21
1.3. Die Therapie der septischen Granulomatose	22
1.3.1. Rekonstitution des oxidativen Bursts der Phagozyten mit Hilfe eines geeigneten Enzyms	23
1.3.1.1. Glucose-Oxidase (GO) als Modellprotein zur Rekonstitution des oxidativen Bursts	23
1.3.2. Liposomen	25
1.3.2.1. Modifizierung von Liposomen mit PEG-Phospholipiden	26
1.3.2.2. Koppelung von Liganden an liposomalen Oberflächen	27
1.3.2.3. Verkapselung von GO in Liposomen	28
1.3.2.4. Das Serum in Wechselwirkung mit Liposomen	29
1.4. Das CGD-Mausmodell	31
2. Ziele der Arbeit	34
3. Material und Methoden	35
3.1. Material	35
3.1.1. Biologisches Material	35
3.1.1.1. Bakterienstämme	35
3.1.1.2. Mäuse	35
3.1.2. Reagenzien	35
3.1.2.1. Antikörper	35
3.1.2.2. Chemikalien und Reagenzien	36
3.1.2.3. DNA-Analyse	37
3.1.2.3.1. DNA-Isolierung und Primer	37
3.1.2.3.2. Gele	38
3.1.2.4. Liposomen	38
3.1.2.4.1. Lipide	38

3.1.2.4.2.	Liposomenzusätze	38
3.1.2.4.3.	Liposomenpräparationen	39
3.1.2.5.	Stammlösungen und Puffer	41
3.1.3.	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	43
3.1.3.1.	Verbrauchsmaterialien	43
3.1.3.2.	Geräte	43
3.1.3.2.	Software	44
3.2.	Methoden	45
3.2.1.	Herstellung und Charakterisierung der Liposomenpräparationen	45
3.2.1.1.	Inkorporation von Substanzen in Liposomen	46
3.2.1.1.1.	Markierung von Liposomen mit RhodaminB-PE	46
3.2.1.1.2.	Verkapselung von Glucose-Oxidase und FITC-Dextran	46
3.2.1.2.	Liposomencharakterisierung	47
3.2.2.	Bestimmung des menschlichen Blutbildes	48
3.2.2.1.	Blutentnahme	48
3.2.2.2.	Mikroskopische Bestimmung des Differentialblutbildes	48
3.2.2.3.	Bestimmung des großen Blutbildes mit dem ADVIA 120	49
3.2.2.4.	Isolierung von Granulozyten, mononukleären Zellen bzw. Gesamtleukozyten aus menschlichem Vollblut	51
3.2.3.	Gewinnung und Charakterisierung von Mausblut	52
3.2.3.1.	Blutentnahme, Serumgewinnung, Blutglucosemessung	52
3.2.3.2.	Mikroskopische Bestimmung des Differentialblutbildes der Maus	53
3.2.3.3.	Bestimmung des großen Blutbildes mit dem ADVIA 120	53
3.2.4.	Analyse von humanen und murinen Blutzellen am FACSCalibur	55
3.2.4.1.	Kurzbeschreibung des Geräts	55
3.2.4.2.	Art und Vorbereitung der Blutproben	57
3.2.4.3.	Aufnahme der markierten Liposomen in Leukozyten	58
3.2.4.3.1.	Analyse liposomenhaltiger Zellen am FACSCalibur	59
3.2.4.3.2.	Vorinkubation mit IgG	60
3.2.4.4.	Messung der intrazellulären H ₂ O ₂ -Produktion mit Hilfe des DHR-Assays	60
3.2.4.5.	Messung der Komplementrezeptorexpression auf murinen Blutzellen	61
3.2.5.	Messung reaktiver Sauerstoffspezies mit Hilfe der Chemilumineszenz	62
3.2.6.	Zucht, Haltung und Genotypisierung der CGD-Mäuse	63
3.2.6.1.	Zucht und Haltung der Mäuse	63
3.2.6.2.	Molekularbiologische Charakterisierung der Mäuse	63

3.2.7.	Methoden im direkten Zusammenhang mit den Tierversuchen	66
3.2.7.1.	Monitoring der Mäuse, Blutentnahme und Bestimmung der Blutbilder, Blutzuckermessungen, Probenentnahme	66
3.2.7.2.	Bestimmung der GO-Konzentration und des funktionellen Enzyms in Serum und Organproben	67
3.2.8.	Tierversuche	69
3.2.8.1.	Langzeituntersuchung an CGD-Mäusen nach Dreifachgabe von GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (GOL) im Vergleich zu unverkapselter GO und PBS	69
3.2.8.1.1.	Bestimmung der Antikörper gegen GO im Serum	70
3.2.8.	Infektionsversuche	72
3.2.8.1.	Mikrobiologische Methoden	72
3.2.8.2.	Therapie mit GO-Liposomen nach <i>Staphylococcus aureus</i> -Infektion	75
3.2.8.3.	Therapie mit GO-Liposomen nach <i>Burkholderia cepacia</i> -Infektion	75
3.2.9.	Pharmakokinetik von GO-Anker und GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach einmaliger i.v.-Applikation in gesunde Mäuse	78
4.	Ergebnisse	80
4.1.	Herstellung und Charakterisierung der Liposomen	80
4.2.	Zucht der CGD-Mäuse	80
4.2.1.	Molekularbiologische Charakterisierung der Mäuse	81
4.3.	Vergleichende Charakterisierung von humanen und murinen Blutbildern mit Hilfe der Mikroskopie und des ADVIA 120	82
4.3.1.	Mikroskopische Bestimmung von humanen und murinen Leukozyten	82
4.3.2.	Bestimmung von humanen und murinen Blutbildern am ADVIA 120	85
4.3.2.1.	Humanes System: Vergleich des Blutbildes eines gesunden Probanden mit dem eines CGD-Patienten	85
4.3.2.2.	Murines System	87
4.3.2.2.1.	Vergleich der Blutbild-Auswertung am ADVIA 120 von Wildtyp (C57Bl6/J) Mäusen mit humanem und murinem Auswerteprogramm	87
4.3.2.2.2.	Charakterisierung des Blutes von CGD-Mäusen ohne und mit Infektion mit Hilfe des murinen Auswerteprogramms	89
4.4.	Durchflusszytometrische Untersuchungen von humanen Blutzellen mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS)	91
4.4.1.	Aufnahme von FITC- bzw. RhodaminB-PE-markierten 200 nm großen Liposomen in humane Blutzellen	91
4.4.1.1.	Methodische Optimierung der Liposomenaufnahme	91
4.4.1.2.	Aufnahme der Liposomen in Abhängigkeit von Markierungsgrad und Inkubationsdauer	95

4.4.1.3.	Vergleich von Rhodamin-markierten Liposomen und FITC-Dextran-markierten Liposomen	100
4.4.1.4.	Aufnahme markierter Liposomen in isolierte Blutzellen im Vergleich zur Aufnahme in Vollblutproben	101
4.4.1.5.	Aufnahme von Rhodamin-markierten 200 nm großen Liposomen in Leukozyten eines CGD-Patienten	102
4.5.	In vitro-Untersuchungen zur Rekonstitution der Bildung von ROS bei NADPH-Oxidase defizienten humanen und murinen Leukozyten	106
4.5.1.	Messung der intrazellulären H ₂ O ₂ Produktion nach Inkubation mit GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (GOL) mit Hilfe des DHR-Assays	107
4.5.2.	Messung der Bildung von ROS mit Hilfe der Chemilumineszenz	109
4.5.2.1.	Vorversuche	109
4.5.2.1.1.	Vergleich der Chemilumineszenzsignale von gesunden und NADPH-Oxidase-defizienten murinen und humanen Leukozyten unter Stimulation	109
4.5.2.1.2.	Chemilumineszenzmessungen mit GOL in Abwesenheit von Leukozyten	110
4.5.2.1.3.	Inkubation von murinen Leukozyten mit EPC:EPG:Chol- und GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen	111
4.5.2.1.4.	Direktinkubation von gesunden murinen und humanen Leukozyten und Vorinkubation in Vollblut mit GOLs	112
4.5.2.3.	Vergleich der Rekonstitution des oxidativen Burst in humanen und murinen NADPH-defizienten Zellen mit Hilfe von GOL	113
4.6.	Langzeituntersuchung an CGD-Mäusen nach Dreifachgabe von GOL im Vergleich zu unverkapselter GO und PBS	114
4.6.1.	Allgemeinbefinden nach Gabe unverkapselter GO und GOLs	114
4.6.2.	Blutglucosespiegel nach Gabe unverkapselter GO und GOLs	115
4.6.3.	GO-Protein-Konzentration und Konzentration funktioneller GO in Organen und Serum	116
4.6.4.	Messung der intrazellulären H ₂ O ₂ -Produktion eine Stunde nach GO-Gabe mit Hilfe des DHR-Assays	117
4.6.5.	Bestimmung des GO-Antikörpertiters im Serum	118
4.7.	Therapie von CGD-Mäusen mit GOL nach Infektion mit <i>Staph. aureus</i>	120
4.7.1.	Gewichtsentwicklung bei gesunden und infizierten CGD-Mäusen nach Gabe von GOL	120
4.7.2.	Blutglucosekonzentration bei gesunden und infizierten CGD-Mäusen nach Gabe von GOL	121
4.7.3.	Keimzahlen und Abszessformation als Parameter für den Therapieerfolg	122
4.7.4.	GO-Gehalt in Organen und Serum 24 h nach i.v.-Gabe von GOL	123
4.7.5.	Funktionelle GO in verschiedenen Organen und Serum 24 h nach i. v.-Gabe von GOL	124
4.7.6.	Untersuchungen auf GO-Antikörper unter <i>Staph. aureus</i> Infektion 24 h nach GOL-Gabe	124

4.7.7.	Messung der Expression von Komplementrezeptoren auf Leukozyten 24 h nach der Gabe von GOL	125
4.7.7.1.	Expression von CD 11b/ 18	125
4.7.7.2.	Expression von CD 21/ 35	127
4.8.	Therapie von CGD-Mäusen mit GOL nach Infektion mit <i>Burk. cepacia</i>	129
4.8.1.	Vorversuche:	129
4.8.2.	Therapieversuche mit GOL	133
4.8.2.1.	Therapieversuch 1: Intraperitoneale Einfachgabe von GOL nach Infektion mit 10^5 KfE <i>Burk. cepacia</i>	133
4.8.2.2.	Therapieversuch 2: GOL vorinkubiertes Vollblut i.p., gefolgt von zwei GOL-Gaben in dreistündigem Abstand	134
4.8.3.	Untersuchung auf GO-Ak im Serum nach GOL-Gabe	138
4.9.	Aufnahme von proteingekoppelten EPC:Chol-Liposomen in Vollblut und isolierte Leukozyten	139
4.9.1.	Aufnahme von IgG-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen in Vollblut und Leukozyten im Vergleich zur Aufnahme konventioneller EPC:Chol-Liposomen	139
4.9.2.	Rolle des Serums/ Plasmas bei der Aufnahme von Liposomen	143
4.9.3.	Vergleich der Aufnahme von IgG-gekoppelten mit BSA-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen in Vollblut und isolierte Granulozyten	142
4.9.4.	Kinetik der Aufnahme verschiedener gekoppelter und ungekoppelter EPC-Chol-Liposomen in Vollblut	143
4.9.5.	Aufnahme von IgG- und HSA-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen unterschiedlichen Proteingehalts in Vollblutproben und isolierte Leukozyten	145
4.9.6.	Einfluss des Alters von gekoppelten Liposomen auf die Aufnahme	147
4.9.7.	Aufnahme von EPC:Chol-Liposomen mit und ohne verschiedene über PEG-gekoppelte Proteine nach Vorinkubation von humanem Vollblut mit nativem und hitzeaggregiertem IgG	151
4.9.8.	Aufnahme verschiedener Liposomenpräparationen in Vollblutproben von CGD-Patienten und CGD-Mäusen	153
4.9.8.1.	Aufnahme in Vollblut eines CGD-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Probanden	153
4.9.8.2.	Aufnahme der Liposomen in Vollblut von CGD-Mäusen im Vergleich zur Aufnahme in Vollblut eines CGD-Patienten	154
4.10.	Pharmakokinetik von GO-Anker- und GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach einmaliger i. v.-Gabe bei gesunden CGD-Mäusen	155
4.10.1.	Organverteilung und GO-Gehalt des Serums nach i.v.-Gabe von GO-EPC:EPG:Chol:PEG- und GO-Anker-Liposomen bei CGD-Mäusen	156
4.10.2.	Quotient aus GO-Konzentration im Serum und der Leber	158

4.10.3.	Messung der intrazellulären H ₂ O ₂ -Produktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach der i. v.-Gabe von GO-Anker und GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen mit Hilfe des DHR-Assays	160
4.10.4.1.	Untersuchung auf GO-Antikörper im Serum nach Anker- bzw. PEG-GOL-Gabe	161
5.	Diskussion	162
5.1.	Aufnahme von 200 nm großen, fluoreszenzmarkierten Liposomen in humane Leukozyten	162
5.1.1.	Aufnahme von RhodaminB-PE- bzw. FITC- markierten Liposomen in humane Leukozyten.	162
5.1.1.1.	Einfluss der Stabilität und Reinheit auf die Aufnahme	162
5.1.1.2.	Optimierung des Versuchsaufbaus zur Unterscheidung von Aufnahme und Anlagerung der Liposomen	163
5.1.1.3.	Eignung von FITC-Dextran als Label	164
5.1.2.	Unterschiede bei der Aufnahme der verschiedenen Liposomentypen in Vollblut und isolierte Zellen	165
5.2.	Rekonstitution des oxidativen Bursts durch EPC:EPG:Chol-GOL <i>in vitro</i>	166
5.2.1.	DHR-Assay	166
5.2.2.	Chemilumineszenz	167
5.2.3.	Vergleichbarkeit des oxidativen Bursts von humanen und murinen Leukozyten <i>in vitro</i>	169
5.3.	Überprüfung der Eignung von GOL im Tierversuch	169
5.3.1.	Verträglichkeit und Verteilung von GOL	169
5.3.1.1.	Auswirkungen der GOL-Gabe auf den Blutglucosespiegel	170
5.3.1.3.	Antikörpertiter gegen GO	172
5.3.1.4.	Expression von Komplementrezeptoren 24h nach GOL-Gabe	172
5.3.1.5.	Schlussfolgerungen aus der Verträglichkeit der GOL	173
5.3.2.	Wirksamkeit von GOL im Tierversuch	173
5.3.2.1.	Rekonstitution des oxidativen Bursts	173
5.3.2.2.	Therapieversuch nach <i>Staph. aureus</i> - Infektion	174
5.3.2.3.	Therapieversuch nach <i>Burk. cepacia</i> - Infektion	175
5.3.2.4.	Elimination der GOL durch das RES	176
5.4.	Entwicklung targetisierter Liposomen	177
5.4.1.	Einfluss des Alters der Liposomen auf die Aufnahme	177
5.4.2.	Aufnahme der Liposomen <i>in vitro</i> in Abhängigkeit von Liposomeneigenschaften und Inkubationsbedingungen	178
5.4.2.1.	Einfluss des Serums auf die Aufnahme	178
5.4.2.2.	Einfluss der gekoppelten Proteine auf die Aufnahme	179

5.5.	Pharmakokinetik kleiner GO-EPC:EPG:Chol-PEG- und Anker-Liposomen im Mausmodell	182
5.5.1.	Rekonstitution des oxidativen Bursts durch GO-EPC:EPG:Chol-PEG- und Anker-Liposomen	184
5.6.	Eignung der Glucoseoxidase	186
5.6.1.	Auswirkung der liposomalen Verkapselung von GO auf die Antikörperbildung	186
5.7.	Die liposomale Verkapselung ROS-bildender Enzyme unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse in der Granulozytenforschung und aktueller Entwicklungen in der Therapie der CGD	187
5.7.1.	Problematik des Tiermodells CGD-Maus	188
5.7.2.	Ablauf des oxidativen Bursts in den Granulozyten im Hinblick auf die Bedeutung der verschiedenen ROS	189
5.7.3.	Alternativen zur GO: Der Einsatz von Xanthin-Oxidase	191
5.7.4.	Aktuelle Entwicklungen in der Therapie der CGD	191
5.7.5.	Zukünftige Einsatzgebiete der Therapie mit ROS-produzierenden Liposomen	193
6.	Zusammenfassung	194
7.	Summary	197
8.	Literaturverzeichnis	199
9.	Anhang	208
10.	Danksagung	239

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ABTS	2,2- Aza- bis (3- ethylbenzthiazolen-6-sulfonsäure)
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
Baso	Basophile Granulozyten
bidest.	zweifach destilliert (bidestilata)
Bl6	Black six
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BPS	ethoxyliertes Sojasterolgemisch (PEG-Kettenlänge 30 Etylenoxid-Einheiten)
Burk.	Burkholderia
C	Cytosin
C°	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calziumionen
CD	Cluster of Differentiation
CGD	Chronic Granulomatous Disease
Chol	Cholesterol
CL	Chemilumineszenz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	Complementrezeptor
CyD	Cytochalasin D
d	Tag
Da	Dalton
DE	Direkter ELISA
DHR	Dihydrorhodamin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DSPE	Diasterol-Sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetid acid
EE	Einschlusseffizienz
ELISA	enzyme linked immuno sorbant assay
EPC	Eiphosphatidylcholin
EPG	Eiphosphatidylglycerol
EtOH	Ethanol
Fab	antigenbindendes Fragment (Ig)
f.c.	final concentration
FACS	Fluorescence activated cell sorter
Fc	kristallines Fragment (Ig)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
gEPC	große Eiphosphatidylcholin-Liposomen

ggf.	gegebenenfalls
GO	Glucose-Oxidase
GOL	Glucose-Oxidase-Liposomen
gP	Glycoprotein
Gran.	Granulozyten
H	Heavy chain (Ig)
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid (chem. Formel)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HDL	Lipoproteine hoher Dichte
HLA	human leucocyte antigen
HOCl	Hypochlorige Säure
HRP	Meerrettichperoxidase (horse-radish-peroxidase)
HSA	Humanes Serum Albumin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kEPC	kleine Eiphasphatidylcholin-Liposomen
Konz.	Konzentration
L	Light chain (Ig)
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	large unstain cells
Lym.	Lymphozyten
μM	Mikromolar
M	Maus
m/v	Masse pro Volumen
mab	monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
Mac	Leukozytenintegrin
MCVs	Multilamellare Vesikel
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
Mol%	Molarer Anteil
Mon.	Monozyten
MPO	Myeloperoxidase
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenyldiamin
p. inf.	post infectionem

p. P.	post productionem
pab	polyclonal Antibody (polyklonaler Antikörper)
PBMC	periphere, mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PE	R-Phycoerythrin
PEG	Distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamin-N-[methoxy- poly(ethylenglycol)-2000]
PEROX (P)	Peroxidase Kanal
PMA	Phorbolmyristinacetat
POD	Peroxidase
ram	rat anti mouse
RES	Retikuloendotheliales System
RLU	Relative Light Units
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
rpm	rotations per minutes
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SE	Sandwich- ELISA
SSC	Side Satter
Staph.	Staphylococcus
t	Zeit
T	Thymin
Taq	Termus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethyldiamin
U	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VB	Vollblut
VBh	heparinisiertes Vollblut
vgl.	vergleiche
VP	Verdünnungspuffer
VS/ NS	vor Säule/ nach Säule
Wt	Wildtyp
XO	Xanthin-Oxidase

Glossar

Liposomen: Arzneistoffträgersysteme, die in ihrem Aufbau Zellmembranen ähneln. Es gibt verschiedene Liposomentypen:

Konventionelle Liposomen: Membranen aus Phospholipiden und Cholesterol

Stealth-Liposomen: mit Oberflächenmodifikationen, meist durch PEGylierte Phospholipide, zur Verlängerung der Halbwertszeit im Blut.

targetisierte Liposomen: Die Liposomen werden durch Oberflächenmodifikation, wie die Kopplung von Proteinen, funktionalisiert. Die „Funktion“ ist die Ausrichtung auf ein Ziel, hier die Phagozyten.

Ankerliposomen: Die terminale Tressylgruppe des Lipidankers, an die normalerweise das Protein gekoppelt wird, wird stattdessen abhydrolysiert. Es handelt sich somit um eine Vorstufe für gekoppelte Liposomen, die in ihren Eigenschaften PEG-Liposomen entspricht.

Glucose-Oxidase-Liposomen (GOL): Liposomen, die im wässrigen Innenraum das Enzym GO enthalten.

Leerliposomen: Liposomen ohne Inhalt (lediglich Puffer)

CGD-Mäuse: Knock-out-Maus für die NADPH-Oxidase, im Falle des Stammes gp91^{phox-/-}B6 129S6 Cybb^{tm1din} wird das membranständige Glycoprotein (gp) 91 nicht gebildet.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS): Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal ($\cdot OH$), hypochlorige Säure (HOCl) u.a.

DHR-Assay: Dihydrorhodamin 123 permeiert in Zellen und wird dort durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffverbindungen, welche von stimulierten Granulozyten oder Monozyten gebildet werden, durch Oxidation in das fluoreszierende Rhodamin umgewandelt. Es kann die Zellen nicht mehr verlassen und wird mittels FACS-Analyse in Kanal FL1 gemessen. (Emmendorffer et al., 1990)

Chemilumineszenz: Die ROS reagieren u.a. mit Verbindungen, die ungesättigte Doppelbindungen enthalten, wobei unter anderem Derivate des Dioxetandions entstehen. Diese sehr energiereiche Verbindung gibt Energie an fluoreszenzfähige Moleküle in der Zelle ab, die dadurch in einen angeregten Zustand versetzt werden. Beim Übergang in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt (Biolumineszenz). Als Verstärkersubstanz wurde **Luminol** verwendet. Bei dieser 3-Aminophalsäure sendet das Dianion nach der Oxidation vor allem durch hypochlorige Säure (HOCl) Licht aus. HOCl wird mit Hilfe der Myeloperoxidase aus H_2O_2 gebildet (Albrecht et al. 1992).

Myeloperoxidase (MPO): Enzym in Granulozyten und Monozyten, das die Bildung von HOCl katalysiert und für die grünliche Färbung von Eiter verantwortlich ist.

1. Einleitung

Vorbemerkung:

In dieser Arbeit sollte die Wirkung von Glucose-Oxidase enthaltenden Liposomen auf die Wiederherstellung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen nach deren Aufnahme in Phagozyten, insbesondere Granulozyten, *in vitro* und im Mausmodell untersucht werden. Aus diesem Grunde werden im Folgenden die Eigenschaften normaler und NADPH-Oxidase-defizienter Granulozyten, die Bedeutung des Komplementsystems, sowie die Eigenschaften von Liposomen und der verwendeten Mausstämme näher charakterisiert.

1.1. Immunologische Grundlagen

1.1.1. Das retikuloendotheliale System

Das retikuloendotheliale System (RES) wird heute auch als mononukleäres Phagozyten-System (MPS) bezeichnet (Kimmelberg 1976; Kaye und Richardson 1979).

Die Definition aus dem Roche Lexikon Medizin (2003) lautet:

„Funktionseinheit aus Zellen, die zur Phagozytose und Speicherung von Stoffen/Partikeln befähigt sind. Besteht aus Retikulumzellen des retikulären Bindegewebes, aus Blut- und Lymphgefäßendothelien und den die Blut- und Lymphsinus endothelartig auskleidenden Zellen (= Retikuloendothel), aus Fibrozyten und aus eigenständigen Histozyten; dient wesentlich der Beseitigung von Abfall- und Fremdstoffen einschließlich eingedrungener Mikroorganismen, wobei Antikörper (Immunglobuline der Klasse G = IgG) und das Komplement C3 eine Hilfsfunktion haben.“

1.1.2. Die physiologische Granulozytenfunktion

Granulozyten spielen in der ersten Phase der Infektionsabwehr die größte Rolle und sind mit einer Lebensdauer von 2-3 Tagen relativ kurzlebig. Ihre Bildung erfolgt im Knochenmark. Über das Blut, in dem sie einen Anteil von ca. 50-70% der Leukozyten ausmachen, gelangen sie an den Ort der Entzündung.

Dort kommt es, bedingt durch die geringere Fließgeschwindigkeit aufgrund erweiterter Gefäße, zu einer Wechselwirkung mit dem Gefäßendothel. Die dafür notwendigen Integrinrezeptoren werden bei Kontakt mit Fremdstoffen und Entzündungsmediatoren durch spezifische Rezeptoren aktiviert. Die Granulozyten ändern ihre Form und binden verstärkt an die auf der Innenseite der Blutgefäße vorkommenden Endothelzellen

(Halliwell et al., 1995). Sie suchen entlang des chemotaktischen Gradienten ihren Weg aus der Blutbahn zum Ort der Entzündung ins Gewebe. Diesen Vorgang bezeichnet man als Diapedese. Die Auflösung des Gewebes bzw. der extrazellulären Matrix gelingt durch Freisetzung verschiedener Proteasen aus den Granula, wie z. B. Collagenase, Elastase und Gelatinase (Weiss et al., 1989).

Über Rezeptoren binden die Granulozyten die Fremdstoffe und „umfließen“ sie. Man spricht von „coiling phagocytose“, da sich ein zunehmend länger werdender Zytoplasmafortsatz um den zu phagozytierenden Partikel wickelt. Schließlich wird dieses Knäuel in das Zytoplasma hineingezogen (G.R. Burmester und A. Pezuto, 1998). Prinzipiell existieren drei Mechanismen der Keimabtötung in Granulozyten: das Extrazelluläre Killing, die Abtötung durch lysosomale Enzyme und der oxidative Burst. Brinkmann et al. (2004) haben gezeigt, dass neutrophile Zellen nach Aktivierung extrazelluläre Fasern bilden, welche an gram-positive und -negative Bakterien binden. Diese „neutrophil extracellular traps“ (NETs) genannten Gebilde degradieren Virulenzfaktoren und töten Bakterien ab (extracellular killing).

Bis vor einigen Jahren ging man davon aus, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Hampton, 1998), insbesondere hypochlorige Säure (HOCl) (Klebanoff 1968), die dominierende Rolle bei der Keimabtötung durch neutrophile Granulozyten spielen.

Reeves et al. (2002) hingegen betonen die Bedeutung lysosomaler Enzyme, vor allem der Elastase. Während der Phagozytose kommt es zu einem massiven Verbrauch an Sauerstoff. Granulozyten gewinnen ihre gesamte Energie mit Hilfe der anaeroben Glykolyse. Der Sauerstoffverbrauch wird daher bei Hemmung der oxidativen Phosphorylierung nicht vermindert. So ist der Granulozyt im häufig sauerstoff- und glucosearmen Entzündungsmilieu voll funktionsfähig. Das zur Phagozytose benötigte Glykogen wird während der Reifung im Knochenmark synthetisiert und eingelagert. So wird der wenige zur Verfügung stehende Sauerstoff ausschließlich zur Bildung von Superoxidanionen in der NADPH-Oxidase-Reaktion verwendet.

Diese ist die Voraussetzung sowohl für die HOCl-Bildung als auch für die Aktivierung der Elastase. Die NADPH-Oxidase, auf die im Anschluss eingegangen wird, akzeptiert Elektronen von dem Coenzym Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH) auf der zytosolischen Seite und gibt sie an molekularen Sauerstoff auf der Außenseite der Membran ab. Die Abgabe erfolgt so entweder an den Extrazellularraum oder über Einstülpungen der Membran in das sich dabei bildende Phagosom. Es entsteht dabei durch Reduktion das Superoxidanion (O_2^-).

Das Enzym NADPH-Oxidase kommt in funktionsfähigen Granulozyten in hohen Konzentrationen vor.

Die NADPH-Oxidase wird aufgrund der englischen Bezeichnung „Phagocyte Oxidase“ in der Regel mit „phox“ abgekürzt. Sie besteht aus mehreren Untereinheiten. Membranständig sind die Glycoproteine gp91^{phox} und gp22^{phox}. Die Zahlen geben jeweils das relative Molekulargewicht in Kilodalton an. Außerdem spielt das membranständige und durch Phosphorylierung hemmbare kleine GTP-bindende Protein rap1a eine Rolle.

Frei im Zytoplasma liegen gp40^{phox}, gp47^{phox} und gp67^{phox} vor. Mutationen können zu Störungen in allen Untereinheiten führen (Cross et al., 1996; Heyworth et al., 1997, Heyworth et al., 2001; Roos et al., 1996).

Am häufigsten von Mutationen betroffen ist das auf dem X-Chromosom gelegene Gen des gp91^{phox}. Auf die Folgen solcher Erbgutveränderungen wird später (Kap. 1.2.) eingegangen.

Das Enzym liegt in unstimulierten Phagozyten inaktiv vor. Der membranständige Anteil (gp91^{phox} und gp22^{phox}) ist das Redoxzentrum und liegt in der Regel bereits als Heterodimer vor. Es wird als Flavohämoprotein Cytochrom b558 bezeichnet.

Bei einer Aktivierung der Granulozyten werden gp47^{phox} sowie ein kleines GDP-bindendes Protein über ein second messenger System von der Proteinkinase C unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Gp47^{phox} und die entstandene Guanosintriphosphatase (rac) wandern dann zusammen mit gp40^{phox} und gp67^{phox} binnen kurzer Zeit an die Plasmamembran (Björgvinsdóttir et al., 1996).

Es kommt dann zur Superoxidbildung. Protonen strömen durch das O₂⁻-bedingte Ladungsgefälle in das Phagosom ein.

Aus den Superoxidanionen entsteht durch Disproportionierung oder mit Hilfe der Superoxid-Dismutase Wasserstoffperoxid ($O_2^- + H^+ \rightleftharpoons HO_2$; $2HO_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Durch die Verschmelzung mit Lysosomen entsteht das Phagolysosom. Lysosomen enthalten vor allem Myeloperoxidase (MPO). Dieses Enzym katalysiert die Bildung von hypochloriger Säure (HOCl) aus H₂O₂ und Cl⁻.

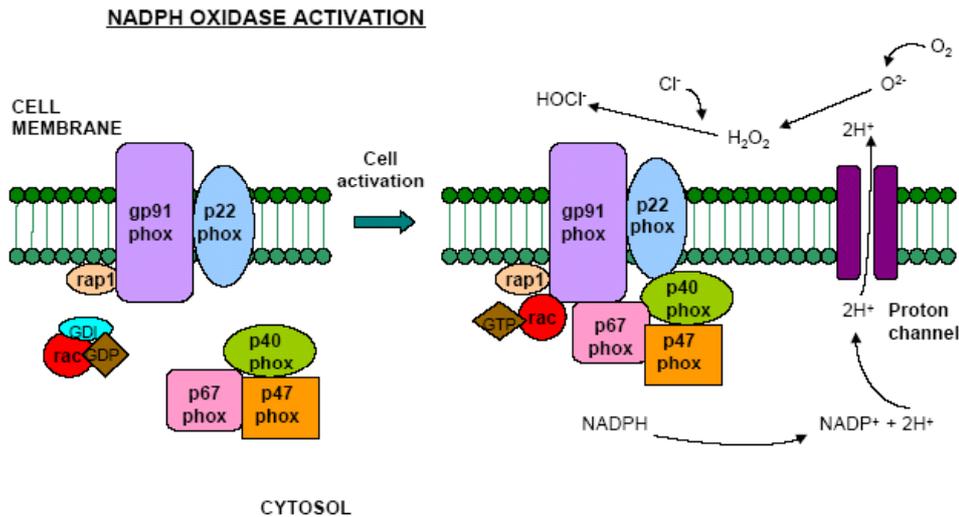


Abb. 1: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase (Assari et al. 2006). Die Aktivierung erfolgt durch das Anlagern der zytosolischen Anteile. Zur räumlichen Orientierung des Enzyms im Phago(lyso)som siehe Abb. 2

Die Abtötung des Keims durch reaktive Sauerstoffverbindungen wie HOCl wurde lange für den entscheidenden Mechanismus der Keimabtötung gehalten. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass totaler Myeloperoxidasemangel keine vermehrte Infektanfälligkeit zur Folge hat. Das hat die Einführung automatischer Hämatologiesysteme vom Typ des ADVIA gezeigt. Hier werden die Leukozyten über ihre Peroxidaseaktivität differenziert. Die Myeloperoxidase der Granulozyten fehlt bei einem erheblichen Teil der Bevölkerung (1:4000).

Laut Reeves et al. (2002) findet nach der Superoxidbildung der Ladungsausgleich in den Phagolysosomen nicht durch Protonen, sondern durch eingeströmte K^+ -Ionen statt. An sulfatierte Glykoproteine der Membran des Lysosoms sind positiv geladene Proteasen, vor allem Elastase, gebunden. In dieser Form sind die Proteasen inaktiv. Die K^+ -Ionen jedoch verdrängen die Elastase von den Membranbindestellen und leiten so ihre Aktivierung ein. Das Enzym katalysiert den Abbau der phagozytierten Stoffe.

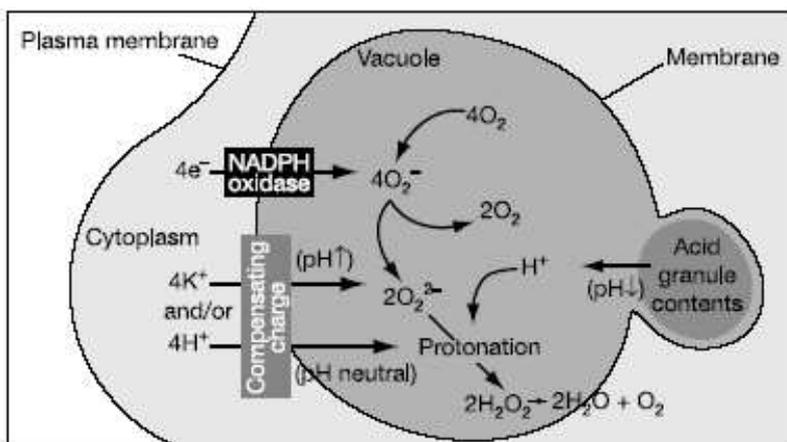


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ladungsausgleiches an der phagosomalen Membran beim Ablauf des oxidativen Bursts (Reeves 2002).

1.1.3. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Bestandteil der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr und stellt eine der ersten Barrieren des Körpers gegen eingedrungene Bakterien, Pilze und Viren dar (Fujita et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass es sich um Proteine handelt, die in einem Komplex miteinander agieren und deren Aktivität in einer Kaskade abläuft. Mittlerweile weiß man, dass das Komplementsystem aus mehr als 20 Plasma- und Membran-Glykoproteinen besteht, die vor allem von Leberzellen synthetisiert werden und an das Blut abgegeben werden (Caroll, 2004). Die einzelnen Komponenten des Komplementsystem werden mit „C“ bezeichnet (Mutschler et al., 2001). Die meisten Komplement-Proteine sind Vorstufen von Enzymen, die erst nach proteolytischer Spaltung aktiviert werden (Vollmar et al., 2005).

Es gibt drei Wege der Komplementaktivierung:

1. der alternative Weg (Vollmar et al., 2005), durch den das Komplementsystem stets auf geringem Niveau eingeschaltet ist,
2. der klassische Weg (Whaley und Schwaeble 1997), der Antikörper-abhängig ist, und
3. der Lektin-Weg, der über Kohlenhydratreste auf Oberflächen vermittelt wird (Reid und Turner, 1994).

Die Aktivierung geschieht durch eine Abfolge von Wechselwirkungen verschiedener Komplementproteine, die in der Bildung der so genannten C3-Konvertase-Aktivität zusammengefasst werden. Das Komplementsystem vermittelt eine Erregerabwehr beispielsweise durch Opsinisierung sowie Zytolyse und dient der Entzündungsvermittlung. Der „Membran-attack-complex (C5-C9) bewirkt die Zytolyse durch Bildung transmembranärer Poren (Walport, 2001). Als Entzündungsmediatoren wirken vor allem die Komponenten C3a und C5a. So induziert C5a als klassisches Anaphylatoxin eine zum Infektionsort gerichtete Migration (Chemotaxis) neutrophiler Granulozyten. Diese sezernieren lysosomale Enzyme und Arachidonsäurederivate, die zu Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung und Ödembildung führen. C3a und C5a vermögen zudem die Gefäßpermeabilität durch Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten bzw. Mastzellen zu erhöhen. C3a setzt ferner Serotonin aus Thrombozyten frei. Außerdem wird eine direkte Wirkung dieser Peptide auf die Gefäßwand angenommen.

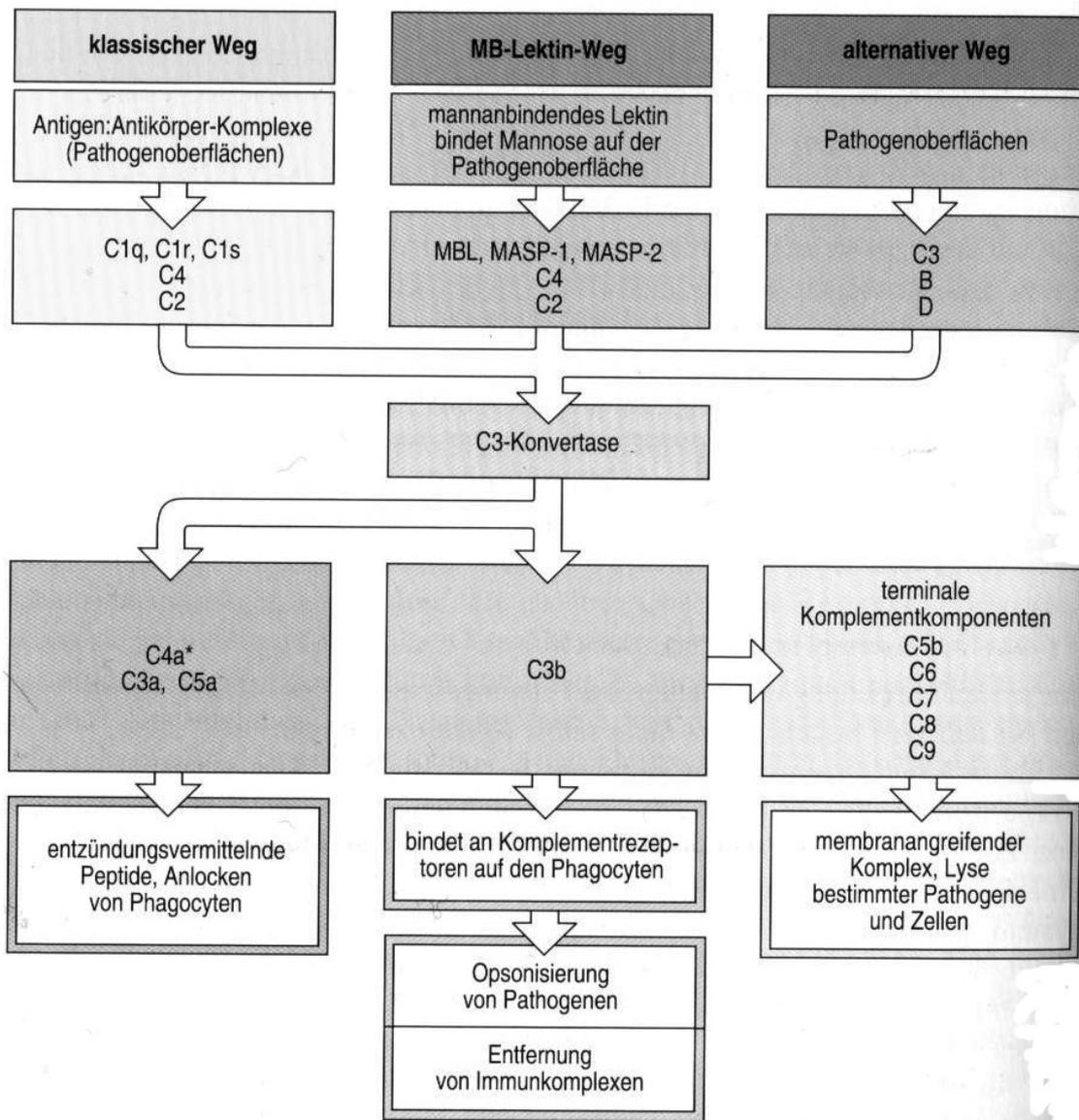


Abb. 3: Wesentliche Komponenten und Effektormechanismen des Komplementsystems (Janeway 2002). Bei allen drei Arten der Komplementaktivierung finden zu Beginn eine Reihe von Spaltungsreaktionen statt, die zur Bildung der C3-Konvertase führen. Diese spaltet C3 zu C3a und C3b. Durch Bindung von C3b an die C3b-Konvertase entsteht die C5 Konvertase (nicht in Abb.) Diese spaltet C5 in C5a und C5b.

Unter Opsonisierung versteht man eine Förderung der Phagozytose durch bestimmte Substanzen (Opsonine). So wird beispielsweise die Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten aufgrund der Bindung der Komplement-Komponenten C3b und C5a an entsprechende Rezeptoren gesteigert.

Andere Beispiele für Opsonine sind die Immunglobuline (Weissman et al., 1975, Hsu und Juliano, 1982), Albumin (Hernandez-Caselles et al., 1993), Fibronectin (Rossi und Wallace, 1983) und α 2-Makroglobuline (Yan, 2005).

Die Regulation des Komplementsystems schützt den Körper vor Überreaktionen. Sie erfolgt durch Komplementregulatorproteine, z. B. Properdin, Faktor H, Faktor I und Protektin (Bureeva et al., 2005).

1.1.4. Immunglobuline

Immunglobuline oder Antikörper werden von Plasmazellen, zu Effektorzellen differenzierten B-Lymphozyten, sezerniert. Sie kommen im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit der Gewebe vor. Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Globuline. Sie werden von Wirbeltieren als Reaktion auf bestimmte eingedrungene Fremdstoffe (Antigene) gebildet und dienen ihrer Abwehr.

Als Antigene wirken fast ausschließlich Makromoleküle oder an Partikel gebundene Moleküle, zum Beispiel Lipopolysaccharide an der Oberfläche von Bakterien. Ein bestimmtes Antigen induziert in der Regel die Bildung nur eines bestimmten, dazu passenden Antikörpers, der spezifisch nur an diesen Fremdstoff gebunden wird.

Die Bildung und Bindung von Antikörpern kann zur Immunität führen.

Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (heavy chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (light chains, L), die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne. Bezeichnet werden diese als V_L und C_L . Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und drei konstante Domänen. Bezeichnet werden diese analog als V_H und C_{H1-3} . Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden die Antigenbindungsstelle. Die Domäne C_{H2} besteht u.a. auch aus einer Kohlenhydratkette, die eine Bindungsstelle für das Komplementsystem bildet. Die Domäne C_{H3} ist die Fc-Rezeptor-Bindungsstelle zur Opsonisierung.

Die beiden Leichtketten bilden zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion (hinge region) liegenden Anteil der schweren Ketten das antigenbindende Fragment Fab, welches enzymatisch mit Hilfe von Papain von dem darunterliegenden kristallinen Fragment Fc abgespalten werden kann.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Gen-Abschnitte für die konstanten Teile der schweren Kette werden Antikörper in 5 Klassen eingeteilt. Ig steht für Immunglobulin. Die verschiedenen Isotypen kommen in verschiedenen Kompartimenten des Körpers vor und haben unterschiedliche Aufgaben.

IgG wird erst in einer verzögerten Abwehrphase (3 Wochen) gebildet und bleibt lange erhalten. Das Fc-Stück vermittelt die Phagozytose. Über zwei antigengebundene IgG wird außerdem das Komplementsystem aktiviert (Löffler 2000).

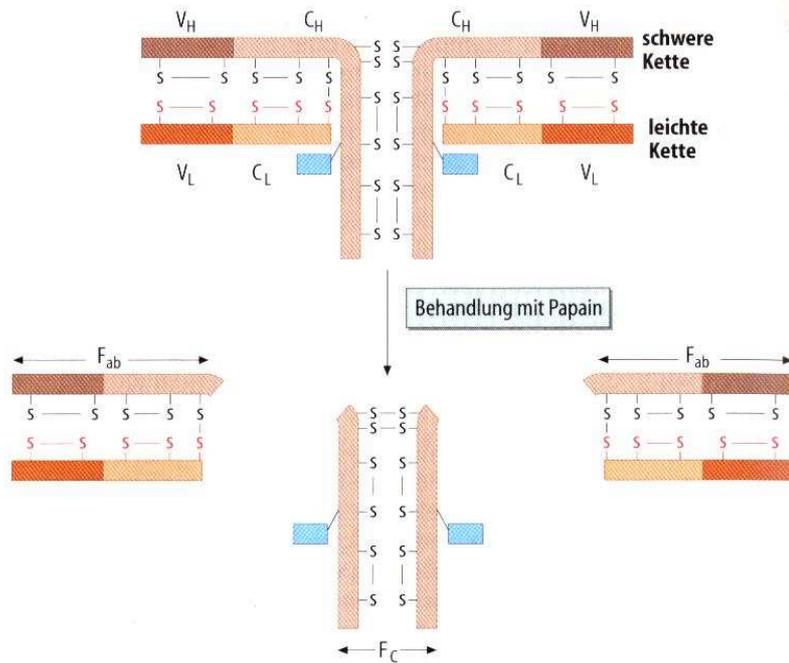


Abb. 4: Aufbau eines Antikörpers der IgG-Klasse (Löffler 2000). Die Ketten sind über nicht kovalente Bindungen sowie drei Sulfidbrücken miteinander verbunden. Auch innerhalb einer Kette werden jeweils innerhalb einer Homologieregion (V_L , C_L , V_H , C_H 1-3) Disulfidbrücken ausgebildet. Die Aufspaltung mit Papain führt zu 2 Fab- und einem Fc-Fragment.

Immunglobuline sind für diese Arbeit in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. IgG spielt bei der Eliminierung der Liposomen aus dem Blutkreislauf eine Rolle, worauf in Kapitel 1.4.5. näher eingegangen werden soll. Natürlich vorkommende Antikörper gegen Phospholipide kommen im Blut der meisten Spezies vor (Alving, 1984) und lösen Komplement-vermittelte Opsonisierung von Liposomen aus (Wassef, 1984). Auf der anderen Seite kommt IgG als Ligand für targetierte Liposomen in Frage (Kap. 1.3.2.2.).

1.2. Septische Granulomatose als Folge der NADPH-Oxidase-Defizienz

Wenn die NADPH-Oxidase nicht funktioniert, entsteht das Krankheitsbild der septischen Granulomatose, auch Chronic Granulomatous Disease (CGD) genannt. Es handelt sich dabei um eine Erbkrankheit, die zumeist X-chromosomal, gelegentlich auch autosomal-rezessiv weitergegeben wird.

Die septische Granulomatose ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:1 000 000 bis 1:250 000. Zumeist wird die Erkrankung bereits im Kindesalter, häufig unter zwei Jahren, manifest (Roos et al., 1996). Gelegentlich wird sie auch erst im Erwachsenenalter diagnostiziert (Liese et al., 1996, Lun et al., 2002).

Die Betroffenen leiden unter schweren, wiederkehrenden bakteriellen und mykotischen Infekten. Betroffen sind in erster Linie die Atemwege, aber auch Manifestationen an Lymphknoten und der Haut sind keine Seltenheit. Komplikationen entstehen häufig durch abszedierende Krankheitsverläufe. Meistens handelt es sich dabei um subkutane Prozesse, gefolgt von Abszessen der Lunge und Leber. Seltener sind Perirektal- und Hirnabszesse (Winkelstein et al., 2000). Neben den wiederkehrenden Infektionen leidet ein Teil der Patienten unter den namengebenden, meist sterilen, chronischen granulomatösen Entzündungsreaktionen. Diese werden nicht ausgeheilten Infektionen oder schlecht funktionierenden Feed-Back-Mechanismen bei den Granulozyten zugeschrieben.

Die häufigsten krankheitsverursachenden Erreger sind die katalasepositiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Nocardia spp.* sowie Pilze der *Aspergillus* Familie (Segal et al., 2000).

Katalasenegative Erreger spielen für den klinischen Verlauf der Erkrankung eine untergeordnete Rolle. Bakterien bilden im Rahmen des normalen Stoffwechsels H_2O_2 . Dieses wird bei katalasepositiven Keimen durch das Enzym Katalase sofort wieder abgebaut, während katalasenegative Keime der granulozytären Myeloperoxidase das Substrat liefern (Klebanoff, 1974).

Am häufigsten ist eine Mutation auf dem Gen für gp91^{phox} die Ursache für septische Granulomatose. Meist findet überhaupt keine Expression von gp91^{phox} statt (60% der Erkrankungen), das Glykoprotein kann aber auch reduziert (3%) oder normal (<1%) exprimiert werden. Der Erbgang ist in diesen Fällen immer X-chromosomal.

In 25% der Fälle findet aufgrund einer Mutation im Gen von gp47 keinerlei Proteinexpression statt, während in 5% der Fälle gp22 komplett ausfällt. Der Erbgang hierbei ist autosomal.

Die CGD wird über den sogenannten Nitroblue Tetrazolium Test (NBT)-Test, mittels Chemilumineszenz oder molekularbiologisch über Western Blot und PCR diagnostiziert.

1.3. Die Therapie der septischen Granulomatose

Bisher wird fast ausschließlich symptomatisch therapiert. Dabei müssen die Patienten andauernd überwacht werden, da sie selbst bei akuten Infektionen oft keine typische Symptomatik zeigen (Gallin et al., 1983). Besonders wichtig ist die Beachtung der Resistenzlage der bereits erwähnten Keime. Zur Senkung des Risikos schwerer Infektionen wird zudem eine prophylaktische antimikrobielle Dauertherapie durchgeführt. Mittel der Wahl sind derzeit eine Kombination aus Trimethoprim und Sulfathoxazol (Magrolis et al., 1990; Weening et al., 1983) sowie das Antimykotikum Itraconazol (Gallin et al., 2003). Sind Abszesse erst einmal entstanden, müssen sie in der Regel chirurgisch entfernt werden. Zusätzlich zur antimikrobiellen Therapie werden viele Patienten mit Interferon γ behandelt. Es wirkt über die Stimulation von Makrophagen, die genaue Wirkungsweise ist jedoch noch nicht bekannt. Derzeit nimmt man an, dass nicht an den oxidativen Burst gebundene antimikrobielle Mechanismen des Immunsystems aktiviert werden. Es gibt Studien, die einen deutlichen Benefit der Prophylaxe mit Interferon γ zeigen (Jackson et al., 2001; Ma et al., 2003).

Die Gabe von Leukozytentransfusionen wird vor allem in lebensbedrohlichen Situationen eingesetzt. Hier stützt man sich auf die Annahme, dass auch ein kleiner Prozentsatz normaler Neutrophiler ausreicht, um die Abwehrfunktion der Granulozyten aufrechtzuerhalten. Dies konnte zum einen *in vitro* gezeigt werden (Rex et al., 1990), zum anderen wird es bei einzelnen weiblichen Merkmalsträgern der x-chromosomalen Form der CGD deutlich, bei denen nur 5% der Granulozyten funktionstüchtig sind und die Betroffene gesund ist (Winkelstein et al., 2000).

Die Transfusionen werden gut vertragen, leider liegen keine gesicherten Studien über die Wirksamkeit vor. Trotz ständiger Behandlung erreichen heute noch immer ca. 50% der CGD-Patienten nicht das 20. Lebensjahr.

Es wird auch an **kurativen Therapieansätzen** geforscht. Die Ergebnisse sind jedoch bisher noch nicht überzeugend:

Knochenmarkstransplantationen wurden bereits an einigen Patienten durchgeführt. Alle überlebenden Patienten zeigten nach der Behandlung eine annähernd normale

Resistenz gegenüber Infektionen (Clavino et al., 1996; Seger und Ezkowitz, 1994; Watanabe et al., 2001). Allerdings ist ein guter Gesundheitszustand für den Eingriff erforderlich. Außerdem ist es oft schwierig, einen passenden Spender zu finden.

Zukunftsweisend ist der Ansatz der **Gentherapie**. Da aufgrund der Knochenmarkstransplantationen sicher ist, dass wenige Neutrophile zur Heilung ausreichen, ist die CGD ein optimaler Kandidat für eine somatische Gentherapie. Zelllinien und Mausmodelle liefern hierzu vielversprechende Ergebnisse (Brenner et al., 2003, Kumer und Dinauer, 2000; Saulnier et al., 2000). Jedoch ist auch für diese Therapieform ein guter Allgemeinzustand vor dem Eingriff wichtig.

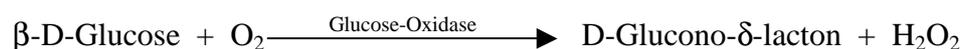
Erste klinische Versuche verliefen ebenfalls vielversprechend (Malech et al., 1997). Die Beobachtungen eines Therapieversuchs an zwei erwachsenen Patienten sind noch nicht abgeschlossen und werden in Kapitel 5.7.4 erläutert (Ott et al 2006, Zeit online 2006). Auch für diese Therapieform ist ein guter Allgemeinzustand vor dem Eingriff wichtig.

1.3.1. Rekonstitution des oxidativen Bursts der Phagozyten mit Hilfe eines geeigneten Enzyms

In dieser Arbeit sollte der oxidative Burst der Phagozyten durch GO-enhaltende Liposomen wieder hergestellt werden. Diese Therapie war vor allem für den Einsatz in der Intensivmedizin und zur Vorbereitung kurativer, aber für den Körper sehr belastender Therapien wie Knochenmarktransplantation oder die Gentherapie gedacht.

1.3.1.1. Glucose-Oxidase (GO) als Modellprotein zur Rekonstitution des oxidativen Bursts

Die Glucose-Oxidase ist ein saures, gut wasserlösliches Flavoprotein. In der von ihr katalysierten Reaktion wird β D-Glucose in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu D-Gluconolacton oxidiert, dabei entsteht Wasserstoffperoxid:



GO reagiert vor allem spezifisch mit β -D-Glucose, aber auch langsam mit anderen Mono- oder Disacchariden wie α -Glucose, Mannose, Galactose, Saccharose oder Laktose (Gibson et al., 1964).

Glucose-Oxidase kann aus verschiedenen Pilzspezies wie *Aspergillus niger* und

Penicillium amagasakiense gewonnen werden. Die in dieser Arbeit verwendete Glucose-Oxidase stammt von *Aspergillus niger* und wurde rekombinant hergestellt.

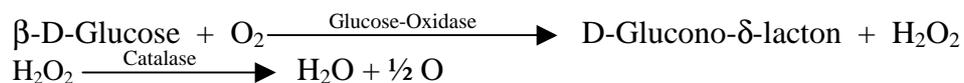
Ihr Molekulargewicht beträgt etwa 156.000 Da. Insgesamt 604 Aminosäuren bilden zwei identische Untereinheiten. Als Cofaktoren des Enzyms dienen 2 Moleküle FAD pro Molekül Glucose-Oxidase.

Die Glucose-Oxidase ist sehr stabil. Die Denaturierungstemperatur liegt bei über 72 °C (Nakamura et al., 1976; Tsuge et al., 1975). Die pH-Stabilität des Enzyms reicht von pH 5 bis 8. Als pH-Optimum werden Werte zwischen pH 5,5 und 6 angegeben. Die Lagerstabilitäten des aufgereinigten Enzyms liegen bei mehreren Jahren, ebenso die des lyophilisierten Enzyms.

Zur Stabilität des Enzyms in Pufferlösung (pH 7,4) wurden bereits Untersuchungen durchgeführt (Falk, 1999). Die wässrige Lösung des Enzyms zeigte nach 4 Wochen Lagerung bei 4 °C in einer Pufferlösung mit pH 7,4 noch 60% der Ausgangsaktivität. Dies ließ sich durch einen Zusatz von Albumin auf 83% steigern. In der zitierten Arbeit wurden ebenfalls Langzeitaktivitätsstudien mit liposomal verkapselter GO durchgeführt. In liposomaler Umgebung zeigte die GO nach 4 Wochen noch eine Aktivität von 90% der Ausgangsaktivität.

Eine schwache Produkthemmung erfolgt durch das entstandene D-Gluconolacton (Gibson et al., 1964; Nakamura und Ogura, 1962), welches sich im katalytischen Zentrum der GO anlagert.

Glucose-Oxidase wird bislang hauptsächlich in der Diagnostik zur Messung von Sauerstoff- bzw. Glucosekonzentrationen eingesetzt. In Kombination von GO mit Katalase entsteht ein antioxidatives System,



welches auch pharmazeutische Anwendungen finden könnte (Uppoor und Niebergall, 1996; Uppoor et al., 2001). Voraussetzung hierfür wäre natürlich eine ausreichende Verträglichkeit der GO. Laut *in vivo* Studien ist diese zumindest im Mausmodell gegeben (Samoszuk et al., 1993). Befürchtungen einer Methämoglobinämie bzw. einer Hypoglykämie haben sich bis zu Dosen von 500 U GO/kg Körpergewicht (ca. 10 U/Maus) bei i. v. Gabe von Lösungen freien Enzyms nicht bestätigt (Kimpfler, 2003).

Es existieren bereits mehrere Ansätze zur Verwendung von liposomal verkapselter GO. Taylor et al. (1995) machten Versuche zur Verwendung von liposomaler GO in immobilisierter Form als Biosensor in der Diagnostik bei Diabetes mellitus.

Die H₂O₂-Bildung von GO-Liposomen wurde in Hinblick auf eine antitumorale

Wirkung bei bestimmten Arten des Plasmacytoms (Samoszuk et al., 1996) und bei soliden Tumoren (Ben-Yoseph und Ross, 1994) untersucht.

Ob die Glucoseoxidase beim Menschen eingesetzt werden kann, hängt unter anderem von dem Ausmaß der Antikörperbildung ab, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Des weiteren war zu klären, ob die von GO katalysierte Reaktion unter den im Entzündungsgebiet herrschenden Bedingungen stattfinden kann.

1.3.2. Liposomen

Liposomen ähneln im Aufbau Zellmembranen (vgl. Abb. 5) und werden schon seit einigen Jahren als Arzneistoffträgersysteme genutzt. In der Literatur sind sie als nicht toxisch und nicht immunogen beschrieben (Lasic et al., 1998). Sie eignen sich als Träger für hydrophile und für lipophile Arzneistoffe. In ihrem wässrigen Innenraum können **hydrophile Stoffe** verkapselt werden. In dieser Arbeit betraf das in PBS gelöste Enzym Glucose-Oxidase und für Aufnahmeversuche das FITC-Dextran.

Die Doppelmembranen eignen sich zur Inkorporation von **lipophilen Stoffen**, was in dieser Arbeit bei den Aufnahmeversuchen zur Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-PE genutzt wurde.

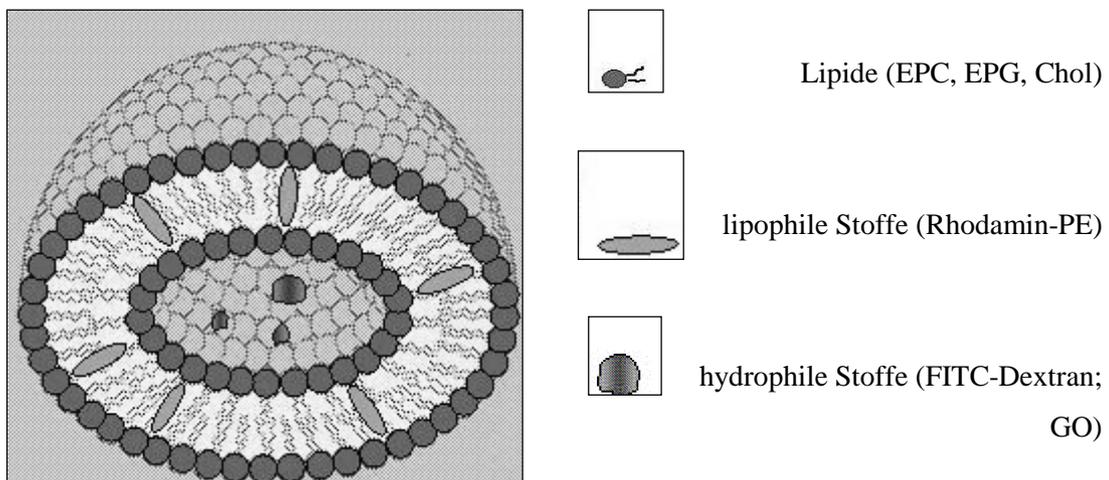


Abb. 5: Schematische Darstellung eines unilamellaren Liposoms mit verkapseltem hydrophilem und inkorporiertem lipophilem Wirkstoff

Neben vielen topischen, therapeutischen und kosmetischen Präparaten gibt es bereits eine Auswahl liposomaler Zubereitungen, die intravenös appliziert werden (z.B. Daunoxome®, Doxil®, Ambisome®).

Hierbei handelt es sich um Präparate mit problematischen, nebenwirkungsreichen Arzneistoffen. Durch das Einbringen der Stoffe in die liposomale Matrix werden in vielen Fällen Nebenwirkungen abgeschwächt (Güthlein, 2001; Moog, 1998). Die Wirkstoffe liegen sozusagen maskiert in den Liposomen vor. Die Wirkungen der Arzneistoffe auf den Zielorganismus, wie auch die Verteilung der Wirkstoffe ist so nicht mehr nur von den Eigenschaften der Stoffe selbst abhängig, sondern in großem Maße von den Eigenschaften der liposomalen Matrix.

Liposomen können aber auch für empfindliche Arzneistoffe, wie z. B. Enzyme, eine mögliche Applikationsform darstellen. Die liposomale Membran kann einen Schutz des Stoffes vor enzymatischem oder hydrolytischem Abbau bzw. der Erkennung durch eventuell bereits vorhandene Antikörper bieten.

Intravenös applizierte Liposomen verbleiben nur eine gewisse Zeit im Blutkreislauf. Diese Verweilzeit hängt stark von der durchschnittlichen Größe der Vesikel ab.

Große Liposomen (>200 nm) werden aufgrund einer stärkeren Aktivierung des Komplementsystems schneller durch das RES aus dem Blutkreislauf eliminiert, als Vesikel mit einer Größe kleiner als 200 nm (Harashima et al., 1995).

Die in den Vorarbeiten verwendeten ca. 200 nm großen EPC:EPG:Chol-Liposomen waren etwa nach 70 min zur Hälfte aus dem Blut eliminiert (Kimpfler 2003). Die Kumulation, unter anderem in der Leber, lässt jedoch hoffen, die dort bei CGD-Patienten häufig vorkommenden Abszesse mit ihrer Hilfe behandeln zu können.

Das, abgesehen von der erhofften Wirkung in der Leber, unerwünschte Clearance-Verhalten der Liposomen, kann durch Oberflächenmodifikationen abgeschwächt werden.

1.3.2.1. Modifizierung von Liposomen mit PEG-Phospholipiden

Die Verlängerung der Zirkulationszeit von Liposomen wurde in vielen Arbeiten angestrebt. Der Einbau von Gangliosid GM1 in Liposomenmembranen verlängert die Halbwertszeit im Blut deutlich (Allen und Chonn, 1987; Allen et al., 1989). Der Grund dafür ist vermutlich eine Verringerung der Opsoninanlagerung durch das große Volumen, die Hydrophilie und Flexibilität der Zuckerkopfgruppe.

Nach dem gleichen Prinzip funktionieren Polyethylenglykol (PEG)-Kopfgruppen, wobei die Verträglichkeit im Organismus deutlich besser ist. Die Halbwertszeiten mit den neuen PEG-Lipiden waren sogar noch deutlich länger (Blume und Cevc, 1990). Für die langzirkulierenden Liposomen wurde der kommerzielle Name "Stealth®-

Liposomen“ eingeführt.

Heute haben sich PEG-Lipide mit einer Molekularmasse von 1-5 kDa durchgesetzt (Woodle und Lasic, 1992; Woodle et al., 1994). Die eingesetzte Menge an PEG-Lipid hängt von der Kettenlänge des PEG-Restes ab. Sie wird für die am häufigsten verwendeten Derivate mit einer PEG-Kettenlänge von 2 kDa (entsprechend 45 Ethylenoxid (EO)-Einheiten) mit 5 Mol% angegeben. Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von PEG-Derivaten gesättigter Phosphatidylethanolamine (PEG-PE) wie PEG2000-5000-Diasteraol-SN-Glycero-3-Phosphoethanolamin (DSPE).

Der hydrophile PEG-Anteil der Derivate ist für die Entstehung einer flexiblen, hydrophilen Corona um das Liposom verantwortlich. Die Verankerung in der Lipidmembran geschieht durch die Fettsäurereste. Die Methoxygruppe am distalen Ende der PEG-Kette verhindert die Bildung von Lipid-PEG-Lipiden (Dimeren).

Doxil® bzw. Caelyx ist das erste zugelassene Präparat, in dem MPEG2000-DSPE eingesetzt wird.

Doxorubicin-haltige Liposomen werden in der Chemotherapie eingesetzt. Sie entgehen der schnellen Eliminierung aus der systemischen Zirkulation (Allen et al., 1991) und zeigen weniger schwere Nebenwirkungen als der reine Wirkstoff.

Der genaue Mechanismus, der zur Umgehung des RES führt, ist noch nicht eindeutig geklärt (Price et al., 2001). In der Literatur wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass das hoch hydratisierte PEG-Polymerschicht um das Liposom sowohl elektrostatische als auch hydrophobe Interaktionen sterisch unterbindet. Dadurch wird die Anlagerung von Plasmakomponenten verhindert (Lasic et al. 1991; Woodle & Lasic 1992; Torchilin et al. 1994; Papisov 1998; Ishida et al., 2002a).

Auch die Lagerungsstabilität der Liposomen wird durch PEGylierte Lipide günstig beeinflusst. Aggregation und Fusion werden reduziert (Needham et al., 1992) und die Stabilität der Vesikel gegenüber chemischem und enzymatischem Abbau gesteigert.

Da PEG-Liposomen von Phagozyten nicht ohne weiteres aufgenommen werden, war für unsere Zwecke eine Modifizierung notwendig.

1.3.2.2. Koppelung von Liganden an liposomale Oberflächen

Um ein aktives Targeting mit Liposomen zu erreichen, bedarf es einer weiteren Modifikation der Vesikeloberfläche. Liganden sollen spezifisch mit einem Zielgewebe interagieren. Dadurch wird die Konstruktion eines intelligenten Drug-Carrier-Systems möglich.

Zur Fixierung von Liganden an den Liposomen werden in der Regel gesättigte Phospholipid-Derivate verwendet. Der Einbau in die Liposomenmembran erfolgt meist direkt während der Herstellung der Vesikel, was die Verkapselungsmöglichkeiten einschränkt. Moderne Ligand-modifizierte Liposomen zeichnen sich durch die Kopplung des Vektors an den PEG-Terminus aus.

Eine grundsätzlich für die Verkapselung von GO geeignete Kopplungsform ist beim Kooperationspartner in Freiburg für BSA etabliert (Steenpaß, 2006). Dabei wird die liposomale Oberfläche durch PEGylierte Sojasterole nachträglich funktionalisiert.

1.3.2.3. Verkapselung von GO in Liposomen

Schon 1979 (Ismail et al.) gab es die Überlegung, das Wasserstoffperoxid-bildende Enzym Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger* mit Hilfe von Liposomen in Phagozyten einzubringen. Dadurch könnte ein defektes NADPH-Oxidase-System umgangen werden. Aufgrund von Fortschritten in der Liposomentechnologie wurde diese Idee in Kooperation mit dem Institut für pharmazeutische Technologie der Universität Freiburg wieder aufgegriffen.

Dabei ist die meist unerwünschte schnelle Blutclearance der Liposomen durch Aufnahme in Granulozyten und Makrophagen von grundsätzlichem Vorteil: In verkapselter Form sollte das Enzym GO als neuer H₂O₂-Donor schnell in die Zelle eingeschleust werden.

Wird den CGD-Zellen H₂O₂ zur Verfügung gestellt, sind sie aufgrund der intakten Myeloperoxidase in der Lage, HOCl zu bilden (Gerber et al., 2001). Die Substrate der GO, Glucose und O₂, liegen im Körper in ausreichender Menge vor. Aus der Literatur ist bekannt, dass die liposomale Membran von beiden Substraten permeiert werden kann (Bresseleers et al., 1984; Subczynski et al., 1989).

In vorausgegangenen Arbeiten (Falk, 1999) konnte gezeigt werden, dass einfache, nicht modifizierte Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzungen direkt in die Fresszellen aufgenommen werden. Bei einer Inkubation isolierter Zellen mit Liposomen wurden deutlich höhere Aufnahmewerte mit negativ geladenen Liposomen erreicht, diese Unterschiede nivellieren sich allerdings bei Inkubation der Liposomen im Vollblut.

Die Wirksamkeit von in EPC:EPG:Chol-verkapselte GO wurde *in vitro* mittels Killing-Assay anhand der Reduktion der K_bE von Staph. aureus von Gerber et al. (2001) nachgewiesen.

Es gibt Hinweise, dass das Lipid EPG Auslöser pseudoallergischer Reaktionen sein könnte (Szebeni, 2001). Die Arbeiten von Kimpfler und Gerber an Mäusen (Kimpfler, 2003) ergaben diesbezüglich keinerlei Anhaltspunkte. Allerdings kann eine höhere Empfindlichkeit beim Mensch nicht ausgeschlossen werden.

Außerdem stellen die Vorschriften für Parenteralia im deutschen Arzneibuch bei den bisher gewählten Liposomengrößen (200 nm) ein Problem dar. Bei der vorgeschriebenen Sterilfiltration mit 200 nm großen Poren wird viel GO freigesetzt. Daher sind von technologischer Seite betrachtet Liposomen mit kleinerem Durchmesser wünschenswert. Diese werden allerdings ohne Modifikationen voraussichtlich kaum durch Phagozyten aufgenommen. Als Modifikation kommt die bereits erwähnte Kopplung von Proteinen in Frage. Die gut wasserlösliche Glucose-Oxidase kann im wässrigen Innenraum der Liposomen verkapselt werden. Aufgrund der Größe von ca. 156.000 Da verbleibt ein einmal verkapseltes Enzym im Liposomeninnenraum. Eine Diffusion durch die Membran findet bei lipophoben Stoffen lediglich bis zu einer Molekülgröße von 1.000 Da statt. Die Extrusion stellt ein geeignetes Herstellungsverfahren für stabile und gut charakterisierbare Liposomen dar (Falk, 1999). Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Liposomenmembranen konnten damals bereits ausgeschlossen werden.

Mit den Glucose-Oxidase-Liposomen hat sich ein System gefunden, durch welches den CGD-Granulozyten die Fähigkeit der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (H_2O_2) zurückgegeben werden kann.

1.3.2.4. Das Serum in Wechselwirkung mit Liposomen

Die Anhaftung von Plasmaproteinen auf der Oberfläche der Liposomen, die sogenannte Opsonisierung, führt zu einer raschen Phagozytose durch Phagozyten. Diese sorgen für einen Abtransport der Vesikel in Leber und Milz (Lasic et al., 1991; Van Etten et al., 1998). Die Menge und Arten der Opsonine, die sich auf liposomalen Oberflächen anhaften, hängen stark von den Eigenschaften der Liposomen wie z. B. ihrer Größe, Oberflächenladung und Lipidkomposition ab (Yan, 2005).

Bestimmte Liposomen umgehen diese Mechanismen und haben daher eine längere Bluthalbwertszeit. Die sogenannten Stealth-Liposomen sind durch einen hydratisierten PEG-Polymermantel um das Liposom gegen elektrostatische und hydrophobe Interaktionen mit Plasmakomponenten abgeschirmt. Bisher nicht geklärt ist, warum es bei wiederholter Injektion in Maus, Ratte und Resusaffe zu einer dramatischen

Verkürzung der Zirkulationszeit mit einer Anreicherung der Liposomen in der Leber kommt (Bendas et al., 2003, Ishida et al., 2004). Probleme bei mehrfacher Applikation von sterisch stabilisierten Liposomen wurden beim Menschen noch nicht publiziert, allerdings wurde in der Regel Doxorubicin verkapselt, das die Aufnahme in Makrophagen hemmen kann (Lavermann, 2001).

Ein Problem bei intravenöser Gabe von Liposomen besteht in der geringen Serumstabilität und somit einer beschleunigten Freigabe von liposomal eingeschlossenen Substanzen (Allen und Cleland, 1980). Dabei spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Zum einen werden Phospholipide aus dem Liposomenbilayer in die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) aufgenommen. Dadurch wird die Liposomenmembran durchlässiger (Scherphof et al., 1978). Cholesterol kann Wechselwirkungen zwischen Liposomen und HDL weitgehend verhindern. Dadurch werden die Liposomen wesentlich stabiler im Serum (Gregoriadis und Davis, 1979). Interaktion und Fusionsprozesse mit den Lipoproteinen geringerer Dichte (LDL) werden durch Cholesterin jedoch nicht verhindert (Zakarova et al., 1993).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Liposomen zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen können. Diese Aktivierung wurde im Serum von Menschen (Alving et al., 1977; Marjan und Devine, 1994; Bradley et al., 1998; Price et al., 2001), Ratten (Funato et al., 1992; Devine et al., 1994; Harashima et al., 1996; Ishida et al., 1997, 2000 und 2001), Meerschweinchen (Chonn et al., 1991; Huong et al., 1999 und 2001) und Rind (Liu et al., 1997) nachgewiesen. Das Komplementsystem wird beispielsweise durch die Bindung von C3b an die Liposomen aktiviert. Es kommt zu einer Destabilisierung der Liposomen. *In vivo* kommt es zur Phagozytose der Liposomen durch Makrophagen (Funato et al., 1992).

Diese meist *in vitro* durchgeführten Studien lieferten vielfältige, aber auch manchmal widersprüchliche Berichte über Komplement-Liposomen-Interaktion. Grund dafür waren die Unterschiede in der Versuchsdurchführung, den Serumspezies oder den Eigenschaften der benutzten Liposomen.

Allgemein scheint zu gelten, dass Liposomen das Komplementsystem über den klassischen oder den alternativen Weg aktivieren. Dabei spielen die Eigenschaften der Liposomen eine wichtige Rolle (Yan, 2005).

In Bezug auf die vorliegende Arbeit spielt Folgendes eine Rolle:

Neben der Liposomenoberfläche und -größe spielt ebenso die Lipidzusammensetzung

der Liposomen eine wichtige Rolle in der Komplementaktivierung (Ishida et al., 2001). Neutrale Liposomen (z.B. EPC:Chol) sind schwache Aktivatoren des Komplementsystems. Negativ geladene Phospholipide (wie EPG) können eine Komplementaktivierung auslösen (Szebeni 1998; Devine et al., 1994).

Die Liposomengröße besitzt ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Opsonisierung durch das Komplementsystem. So werden Liposomen größer als 200 nm bevorzugt durch das Komplementsystem angegriffen (Liu et al., 1988). Sie werden somit von den Phagozyten besser erkannt und im Serum schneller eliminiert als kleine Liposomen (Harashima et al., 1995).

Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle in der *in vitro* Aufnahme von Liposomen in isolierte Leberzellen (Harashima et al., 1995).

Die Aufnahme durch humane neutrophile Granulozyten in nativem Serum ist signifikant höher als in hitzeinaktiviertem Serum (Sciezka et al., 1990).

Vorarbeiten zu dieser Arbeit haben gezeigt, dass *in vitro* EPC:EPG:Chol-Liposomen zu einer Hochregulation des Mac1, einem Leukozytenintegrin bei Granulozyten und Makrophagen führen. Sie war für den Anteil CD 18 ausgeprägter als für CD 11b. Der CR1 Rezeptor (CD 35) wurde ebenfalls hochreguliert (Doktorarbeit Johanna Bayer, Tübingen, in Preparationem.)

Die Aktivierung des Komplementsystems durch i.v. applizierte Liposomen kann zu anaphylaktischen Reaktionen führen (Szebeni et al., 1999 und 2000; Wassef et al., 1989), dabei sind lebensbedrohliche Symptome aber selten. Diese anaphylaktischen Reaktionen lassen sich bei geeigneter Applikationsdurchführung (z. B. langsamere Infusion der Liposomenpräparation) deutlich vermindern (Szebeni, 1998).

1.4. Das CGD-Mausmodell

Es gibt für die septische Granulomatose zwei Tiermodelle, beide auf der Basis von C57BL6/J-Mäusen (Pollock et al., 1995).

Wichtig ist es, die Besonderheiten des Stammes im Hinblick auf Probleme bei der Zucht der defizienten Mäuse zu kennen.

C57Bl/6J-Mäuse werden häufig als Grundlage für die Generation transgener Mäuse genutzt. Sie sind gut zu züchten, haben eine hohe Lebenserwartung und sind wenig anfällig für Tumore. Allerdings neigen sie zu ernährungsbedingter Obesitas mit den Folgen Typ II Diabetes und Atherosklerose. Es liegt eine hohe Inzidenz für Mikrophthalmie und assoziierte Augenabnormalitäten vor. Erblicher Hydrozephalus

kommt bei 1-4% der Tiere vor. Die Knochenmarksdichte ist gering. Es kommt zu Haarverlust durch übertriebenes Putzverhalten (Jax®Mice data sheet).

X-CGD gp91^{phox-/-} Mäuse (CGD-Mäuse): Sie werden bei Jackson Laboratory unter dem Namen *B6.129S6-Cybb^{tm1Din}* geführt. Auch ein Protokoll für die Genotypisierung ist angegeben. Der Erbgang ist X-chromosomal (Pollock et al., 1995). Abweichende Molekulargewichte bei den einzelnen Glykoproteinen der Maus sind durch eine geringere Glycosylierung bedingt. Die Aminosäuremuster sind weitgehend identisch, es können sogar funktionelle Maus/Mensch Heterodimere hergestellt werden (Björgvinsdóttir et al., 1996).

Von Dinauer (2001) wurden CGD-Mäuse für Gentherapieversuche genutzt. Hemizygoten Männchen sowie homozygote Weibchen sind, genau wie betroffene Menschen, aufgrund der fehlenden ROS-Produktion, anfällig für *Staph. aureus*, *Aspergillus fumigatus* und *Burkholderia cepacia* (Dinauer et al., 2001). In der Literatur sind keine Angaben über das Blutbild des Stammes zu finden, es soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die Applikation aller Lipiddispersionen bei C57Bl6-Mäusen hatte in der Vorarbeit (Kimpfler) Gewichtsschwankungen der Tiere zur Folge.

Verlieren Mäuse im Verlauf einer Applikation mehr als 10-15 % ihres ursprünglichen Gewichtes befindet man sich im Bereich der maximal tolerierten Dosis. Nach einer internen Richtlinie des deutschen Institutes für Krebsforschung ist ein Gewichtsverlust von 20 % ein Kriterium zur vorzeitigen Tötung der Tiere. Lediglich bei der höchsten Dosierung (150 U/kg Körpergewicht GOL, 60 mM Gesamtlipid) war bei den Versuchen von Kimpfler eine Gewichtsabnahme im Median bis zu 20 % zu beobachten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Dosierungen gewählt, die im Vorversuch keine massiven Gewichtsverluste zur Folge hatten und Kontrollen mit reiner PBS-Gabe durchgeführt. Damit wurde der Einfluss des Stresses bei der i.v.-Applikation als Ursache für die Gewichtsabnahme einschätzbar.

Bei den Vorarbeiten mit GO-Lösungen kam es, wie erwartet, zu Todesfällen, wenn auch die zu beobachtenden Nebenwirkungen längst nicht das Ausmaß der von Samoszuk et al. (1993) beschriebenen erreichten. Eine Erklärung hierfür könnten die unterschiedlichen Mausexemplare sein, die für die Versuche eingesetzt wurden, sowie Enzyme aus verschiedenen Quellen.

Die Verteilung von konventionellen EPC:EPG:Chol-Liposomen wurde ebenfalls in der vorhergehenden Arbeit (Kimpfler, 2003) untersucht. Dabei waren die

Liposomenmembranen markiert mit ^3H -Cholesteryloleyether, und als Modellsubstanz für GO wurde ^{14}C -Carboxyl-Dextran in die Liposomen verkapselt.

Die Blutclearance der Liposomen verlief wie erwartet in einem recht kurzen Zeitraum. Schon nach ca. 70-80 min war die Hälfte der ^3H -bzw. ^{14}C -Aktivität aus dem Blutkreislauf verschwunden. Dies deckt sich mit bereits vorliegenden Literaturwerten. Bei der höher konzentrierten Lipiddispersion stellte sich nach einer schnell eliminierenden Anfangsphase ein Lipidlevel von ca. 30 % der Ausgangslipidmenge ein, während die niedriger dosierte Liposomendispersion innerhalb der 8 Stunden fast komplett aus dem Blutkreislauf eliminiert wurde. Dies könnte durch eine Absättigung des RES erklärt werden. Das RES von Mäusen kann schon mit 1 mg Lipid / Maus abgesättigt werden (Mauk und Gamble, 1979). Eine bessere Absättigung der im Blut zirkulierenden phagozytierenden Zellen (Makrophagen, Granulozyten) wird bei der höher dosierten Präparation ebenfalls mit in Betracht gezogen werden. Das ist für unseren Therapieansatz von Vorteil.

2. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Aufnahme und Funktion von konventionellen, targetisierten und PEGylierten Glucose-Oxidase-Liposomen in NADPH-Oxidase defiziente Phagozyten *in vitro* und im Mausmodell untersucht.

Die Aufnahme verschiedener Liposomentypen in Leukozyten soll mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen durchflusszytometrisch untersucht werden. Die Rekonstitution des oxidativen Bursts durch GO-Liposomen soll mit Hilfe von FACS-Analysen und Chemilumineszenzmessungen überprüft werden.

Für die CGD-Mäuse gibt es keine Literaturangaben zum Blutbild. Das Blutbild und die Rekonstitution des oxidativen Bursts *in vitro* im Vergleich zu Humanblut sollen überprüft werden.

Die GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen sollen im defizienten Mausmodell insbesondere im Hinblick auf die Rekonstitution des oxidativen Bursts untersucht werden. Die Verträglichkeit der Liposomen soll überprüft werden, insbesondere die Antigenität von verkapselter im Gegensatz zu unverkapselter GO. Dazu wird die Etablierung eines ELISAs zum Nachweis muriner Antikörper gegen GO angestrebt. Ob eine Aktivierung des Komplementsystems unter Therapiebedingungen stattfindet, soll anhand der Expression geeigneter Komplementrezeptoren auf Leukozyten überprüft werden.

Die Effizienz der GOL soll anhand von Therapieversuchen an infizierten defizienten Mäusen überprüft werden. Als Infektionsmodelle kommen die *Staph. aureus*-Peritonitis und die *Burk. cepacia*-Sepsis in Frage.

Neue Liposomenformulierungen werden aus zwei Gründen angestrebt:

Andere Lipidzusammensetzungen sind aufgrund des Risikos pseudoallergischer Reaktionen auf negative konventionelle Liposomen erstrebenswert (Szebeni, 2001). Aufgrund der Größe der Liposomen (200nm) wird bei der im deutschen Arzneibuch für Parenteralia vorgeschriebenen Sterilfiltration zu viel Inhalt freigesetzt. Kleine Liposomen werden jedoch durch Phagozyten nicht ohne weiteres aufgenommen, weshalb eine Targetisierung durch Proteinkopplung angestrebt wird. Dazu soll IgG im Hinblick auf den Fc-Rezeptor der Granulozyten verwendet werden.

Um die Effekte der Targetisierung beurteilen zu können, soll die Verteilung und Effizienz kleiner, PEGylierter Liposomen als Ausgangsliposomen für die Kopplung untersucht werden. Im Tierversuch soll ihre Pharmakokinetik überprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Biologisches Material

3.1.1.1. Bakterienstämme

Bakterien	Herkunft
Staphylococcus aureus Stamm 502 A	Mary Dinauer, Indianapolis
Burkholderia cepacia Stamm 25609	Mary Dinauer, Indianapolis

3.1.1.2. Mäuse

Mäuse	Herkunft/Lieferant
gp91 ^{phox^{-/-}} B6 129S6 Cybb ^{tm1din} (CGD-Mäuse)	Dr. M. Grez (GSH, FB 16), Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus Frankfurt Dr. F. von Loewenich, Prof. C. Bogdan, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Mikrobiologie, Freiburg dann Eigenzucht
C57Bl6/J (Wildtyp)	Charles River, Sulzfeld/ Eigenzucht Kinderklinik
Balb c	Eigenzucht Kinderklinik

3.1.2. Reagenzien

3.1.2.1. Antikörper

Antikörper	Abkürzung, ggf. Konzentration	Ziel	Firma
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- conjugated Rat anti mouse (ram) CD21/35 (CR2/CR1, CD21a/21b) Monoclonal Antibody (mab)	CD21/35 FITC, 0,5 mg/ml	Komplement -rezeptoren 1 und 2	Pharmingen (BD) San Diego, CA, USA
FITC-conjugated Rat IgG _{2b} Isotype Control Immunglobulin	Rat IgG _{2b} FITC 0,2 mg/ml	Isotypen- kontrolle	Pharmingen (BD) San Diego, CA, USA
FITC-conjugated ram CD18 (integrin β_2 chain) mab	CD 18 FITC 0,5 mg/ml	Leukozyten- integrin, β_2 - Kette	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA
Human IgG, purified Immunoglobulin Reagent Grade	IgG	unspezifisch	Sigma Deisen- hofen
Monoclonal Anti-Glucose Oxidase (mouse IgG ₁ isotype) Clone GO-40 Mouse Ascites Fluid	Mab anti GO	Glucose- Oxidase	Sigma Deisen- hofen

Antikörper	Abkürzung, ggf. Konzentration	Ziel	Firma
Polyclonal Antibody (pab) to Mouse IgG Fc-HRP, Rabbit	Anti-Maus-HRP	Maus-Antikörper IgG (Fc-Teil)	Acris, Hiddenhausen
PE-conjugated Rat IgG _{2b} Isotype Control Immunglobulin	Rat IgG _{2b} PE 0,5 mg/ml 1:2 in PBS	Isotypenkontrolle	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA
Pab to Glucose Oxidase (<i>Aspergillus niger</i>): Horseradish Peroxidase (HRP), Rabbit	Anti-GO-HRP 10 mg/ml	Glucose-Oxidase	DPC Biermann, Bad Nauheim
R-Phycoerythrin (PE)-conjugated ram CD11b (Integrin α M-chain, Mac-1 α chain) mab	CD 11b PE 0,2 mg/ml 1:2 in PBS	Leukozytenintegrin, α M-Kette	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA

3.1.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Substanzen	Hersteller/Vertrieb
Acrylamid (30% mit 0.8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Aqua bidest. (<i>Ampuwa</i>)	Fresenius, Bad Homburg bzw. aus Millipore-Anlage
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
β D-Glucose	Sigma, Steinheim
Catalase from bovine liver (105 mg Protein/ml, 58000 U/mg, $6,09 \times 10^6$ U/ml)	Sigma, Deisenhofen
Complete, Mini (Protease-Inhibitoren-Cocktail)	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 100 mM)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dihydrorhodamin 123 (DHR) 29 mM	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethylendiamin-tetraacetic acid)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol (100%, RNase- und DNase-frei)	ApplieChem, Darmstadt
Ether "Aether zur Narkose"	Chinosol, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Fixativ 10%	Universitätsklinik-Apotheke Tübingen
Glucose-Oxidase (GO) 281 U/mg	Roche Diagnostics, Mannheim
H ₂ O ₂ 30% (Wasserstoffperoxid)	Sigma, Deisenhofen

Chemikalien/Substanzen	Hersteller/Vertrieb
HCl (Salzsäure, 1 M)	Merck, Darmstadt
Hexanucleotide-Mix (10x)	Roche Diagnostics, Mannheim
Histopaque 1119 und 1077	Sigma, Deisenhofen
Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dion)	Sigma, Deisenhofen
May-Grünwald-Lösung eosinsaures Methylenblau in Methanol: Glycerin (2:1)	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker Nr. VIII (110-1114 bp)	Roche Diagnostics, Mannheim
o-Phenyldiamin 5 mg Tabletten	Sigma, Deisenhofen
Peroxidase Type II (horseradish)	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen
Primer	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Zymosan	Sigma, Deisenhofen

3.1.2.3. DNA-Analyse

3.1.2.3.1. DNA-Isolierung und Primer

Blood & Cell Culture DNA Kit Mini	Hersteller
25 Qiagen Genomic-tip 20/G (Säulen), Säulenhalter, Cell Lysis Buffer C1, General Lysis Buffer G2, Equilibration Buffer QBT, Wash Buffer QD, Elution Buffer QF, Quiagen Protease, Handbuch	Qiagen, Hilden

Primer	Sense/Antisense	Sequenz (5'-3')	Produktlänge
IMR 0517 Firma Roth, Karlsruhe	Antisense	AAG AFA AAC TCC TCT GCT GTG AA	240 bp (=Wildtyp)
	Sense	IMR 0518	
IMR 0518 Firma Roth, Karlsruhe	Sense	CGC ACT GGA ACC CCT GAG AAA GG	240 bp oder 195 bp (disrupted allele)
	Antisense	IMR 0517/0519	
IMR 0519 Firma Roth, Karlsruhe	Antisense	GTT CTA ATT CCA TCA GAA GCT TAT CG	195 bp (disrupted allele)
	Sense	IMR 0518	

3.1.2.3.2. Gele

8% Polyacrylamidgel für DNA-Gelelektrophorese (25 ml für zwei Gele)

Material	Benötigte Menge
Acrylamid 30% mit 0,8% Bisacrylamid	16,6 ml
APS 10% in Aqua bidest.	174,3 µl
Aqua bidest.	15,7 ml
Tris-Borat-EDTA (TBE) 10x	2,5 ml
N,N,N'N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	24,9 µl

3.1.2.4. Liposomen

3.1.2.4.1. Lipide

Chemikalien/Substanzen	Hersteller/Vertrieb
Cholesterol (Chol)	Caelo, Hilden
Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-poly(ethylenglycol)-2000] (PEG)	Genzyme Pharmaceuticals
Eiphosphatidylcholin (EPC)	Lipoid, Ludwigshafen
Eiphosphatidylglycerol (EPG)	Lipoid, Ludwigshafen

3.1.2.4.2. Liposomenzusätze

Chemikalien /Substanzen	Hersteller /Vertrieb
ethoxilierte Sojasterole, BPS 30, (Anker)	Nikko Chemicals, Tokio, Japan
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Fluoresceinisothiocyanatdextran M _r =148000 (FITC-Dextran)	Sigma, Deisenhofen
Glucose-Oxidase (GO) 281 U/mg	Roche Diagnostics, Mannheim
IgG from human serum (IgGh)	Sigma, Deisenhofen
IgG from murin serum (IgGm)	Sigma, Deisenhofen
Lissamine TM rhodamine B1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine./triethylammonium salt	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

3.1.2.4.3. Liposomenpräparationen

Große konventionelle Liposomen mit Rhodamin- bzw. FITC- Markierung, steril

Liposomentyp	Lipid-verhältnis [Mol%]	Durchmesser [nm]	Lipid-konz. [mM]	Poly-Index (1)	Label
EPC:Chol	70:30	230	40	0,207	0,1 mol% Rhodamin
EPC:EPG: Chol	40:30:30	214	40	0,096	
EPC:EPG: Chol:PEG	37,5: 27,5: 27,5: 7,5	191	40	0,123	
EPC:Chol	s.o.	239	40	0,196	0,5 mol% Rhodamin
EPC:EPG: Chol	s.o.	202	40	0,11	
EPC:EPG: Chol:PEG	s.o.	195	40	0,106	
EPC:Chol	s.o.	219	40	0,073	2,5 mol% Rhodamin
EPC:EPG: Chol	s.o.	204	40	0,059	
EPC:EPG: Chol:PEG	s.o.	196	40	0,116	
EPC:Chol	s.o.	201	40	0,117	EE (2) 7% FITC-Dextran
EPC:EPG: Chol	s.o.	180	40	0,074	
EPC:EPG: Chol:PEG	s.o.	165	40	0,08	

Liposomen für Chemilumineszenz und DHR- Assay

Liposomentyp	Lipid-verhältnis [Mol%]	Durchmesser [nm]	Lipid-konz. [mM]	Poly-Index	GO (EE n.d.) (3)
EPC:EPG:Chol	40:30:30	186	40		ohne GO
EPC:EPG:Chol-GO	40:30:30	178	ca. 6,2	0,124	mit GO

GO verkapselt in Liposomen für Tierversuche (GOLs), steril

Versuchsreihe	Liposomentyp	Lipid-verhältnis [Mol%]	Durchmesser [nm]	Lipid-konz. [mM]	Poly-Index	EE (2b) (%) GO	
AK-Bildung	EPC:EPG: Chol-GO	40:30:30	172,6	37	0,081	12,7	
Staph. aureus			178	36,55	0,096	8,1	
Burkh. cepacia			177,6	33	0,086	14,5	
							ca. 30%
							niedriger
Kinetik nach i.v.-Gabe	EPC:EPG: Chol-PEG-GO	37,5: 27,5:	111	40	0,069	4	
	s.o. -BPS-Anker-GO	27,5: 7,5	113	40	0,075	4	

Proteingekoppelte EPC:Chol-Liposomen

Liposomentyp	Lipid-verhältnis [Mol%]	Durchmesser [nm]	Lipid-konz. [mM]	Poly-Index	Label	Protein-gehalt µg Protein/ µmol Lipid			
EPC:CHOL	70:30	130	20	alle unter 0,1 also mono- modale Ver- teilung	alle 0,5 mol% Rhodamin Aufnahme- versuche	n.d. (nicht be- stimmt)			
s.o. IgG gekoppelt		140	2						
s.o. BSA gekoppelt		137	1,6						
s.o. IgG gekoppelt		140	2						
s.o. HSA gekoppelt		140+/- 10	2,1						
s.o. BSA gekoppelt		140+/- 10	2,1						
BPS-Anker		120nm	20						abhydrolisiert
EPC:Chol		120nm	20						
EPC:Chol-IgG	140+/- 10	2,1			26,5				
	140+/- 10	1,66			21				
EPC:Chol-HSA	140+/- 10	2,1			26,5				
	140+/- 10	2,1			13,25				
	140+/- 10	2,25			6,5				
	140+/- 10	2,1			3,25				
EPC:Chol-IgG		160	2	0,07		26,5			
EPC:Chol-HSA		160	2	0,07		not done			
EPC:Chol		100	20	0,07		n. d.			
EPC:Chol (kEPC)	k = klein	104	20	0,069		ohne			
EPC:Chol (gEPC)	g = groß	237,2	20	0,249		Protein			
EPC:Chol-IgG murin		165,3	2,01	0,035		n. d.			
s.o. human		174,7	2,11	0,126		n. d.			
EPC- BSA		196,8	2,08	0,081		n. d.			
EPC:Chol		100			Aufnahme nach Vorinku- bation mit IgG	ohne			
EPC:Chol-HSA		160				n.d.			
EPC:Chol-IgG		160				n.d.			

- (1) **Polydispersitätsindex:** Maß für die Breite der jeweiligen Größenverteilung gemessen mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie.
- (2) **Einschlusseffizienz:** für FITC-Dextran geschätzter Wert, **2b:** bestimmter Wert
- (3) **n.d.:** not done, keine Charakterisierung

3.1.2.5. Stammlösungen und Puffer

Stammlösung /Puffer	Zusammensetzung /Hersteller
Acrylamidlösung für Polyacrylamidgele	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid in Wasser; Roth, Karlsruhe
Ammoniumchloridpuffer (1 l) (Lyse)	8,42 g NH ₄ Cl, 1 g KHCO ₃ und 0,037 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O in 1 l Aqua bidest. Universitätsapotheke Tübingen
APS 10% (50 ml)	50 ml Aqua bidest. und 10% APS
Blockpuffer	400 mg BSA in 40 ml PBS (1% m/v)
Bromphenolblau 1%	0,1 g Bromphenolblau auf 10 ml EtOH
Citrat-/Phosphatpuffer 0,2 M	Stammlösung A (0,1 M): 21,01 g C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O Stammlösung B (0,2 M): 28,4 g Na ₂ HPO ₄ jeweils auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen 48,5 ml A+ 51,5 ml B, pH 5,0 einstellen
Coatingpuffer für Sandwich-und funktionellen GO- ELISA 0,1 M	1,78 g Na ₂ CO ₃ 4,2 g NaHCO ₃ auf 500 ml mit Aqua bidest. auffüllen und pH 9,6 einstellen
Coatingpuffer für ELISA zur GO-Antikörperbestimmung in Mausserum	5 µl GO in 6 ml Citrat-/Phosphatpuffer
DNA-Färbelösung	60% Sucrose/5 mM Cresolrot (6 g Sucrose, 19,12 mg Cresolrot, 1 ml H ₂ O)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , (PBS spezial)	Biochrom KG, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (PBS)	Biochrom KG, Berlin
Einfriermedium für Bakterien	90% LB-Medium, 10% Glycerol
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (1 µg/ml; 500 ml)	10 ml Ethidiumbromid-Stammlösung auf 490 ml Aqua bidest.
Ethidiumbromid-Stammlösung (50 µg/ml; 100 ml)	5mg Ethidiumbromid auf 100 ml Aqua bidest.
FACS Lysing Solution (10x)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow (Laufpuffer FACS)	Becton-Dickinson, Heidelberg
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd-Lösung 4% (v/v)	Universitätsklinik-Apotheke
Formaldehyd-Fixierpuffer für FACS	Formaldehydlösung 4% (v/v) 1:2 mit PBS spezial
Giemsa-Lösung: Azur II und eosinsaures Azur II in Methanol: Glycerin (1:1)	Merck, Darmstadt
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , ohne Phenolrot)	Biochrom, Berlin
Heparin Canusal 100 Units/ml, 2 ml Ampullen	CP-Pharmaceutics Ltd Werxhan UK

Stammlösung /Puffer	Zusammensetzung /Hersteller
Ladepuffer (6x, für PCR)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ladepuffer für DNA-Gelelektrophorese (1x; 16 µl)	5,3 µl 3x Ladepuffer und 10,7 µl TE-Puffer ergeben 16 µl 1x Ladepuffer
Ladepuffer für DNA-Gelelektrophorese (3x)	6x Ladepuffer mit TE-Puffer 1:2 verdünnen und so 3x Ladepuffer erstellen
Laufpuffer 1 bzw. 10x TBE	Uniklinik-Apotheke Tübingen
PBS spezial eigene Herstellung (2 l) (PBS spez. e. H.)	0,4 g KCl, 0,4 g KH ₂ PO ₄ , 16,0 g NaCl und 2,3 g Na ₂ HPO ₄ auf 2 l mit Aqua bidest. auffüllen und auf pH 7,0 einstellen
Primergebrauchslösung (4 µM)	Sense- und Antisense-Primerstammlösungen (100 µM) werden 1:5 in DEPC-Wasser verdünnt (= 20 µM); Beide 20 µM Primerlösungen werden zusammen mit DEPC-Wasser 1:5 verdünnt und ergeben eine 4 µM Primergebrauchslösung
Primerstammlösung (100 µM)	lyophilisierte Primer werden in TE-Puffer nach Anweisung gelöst, es entsteht eine 100 µM Stammlösung
Proteinaseinhibitorpuffer	1 Tablette complete mini in 7 ml PBS spezial ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Rinse (Spüllösung für FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Safe (Hypochlorid zur FACSreinigung)	Becton Dickinson, Heidelberg
Substratpuffer für Sandwich- und GO-Ak-ELISA	1 Tablette o-Phenyldiamin (5 mg) in 12,5 ml Citrat-Phosphatpuffer lösen und unmittelbar vor Gebrauch 10 µl H ₂ O ₂ (30%) zugeben
Substratpuffer für Aktivitäts-ELISA	125 mg Glucose in 12,414 ml Citrat-Phosphatpuffer lösen, 86 µl POD und 5mg Tablette o-Phenyldiamin hinzufügen
Tris-Borat-EDTA (TBE) 10x	Uniklinik-Apotheke Tübingen
TBE-Laufpuffer für DNA-Gelelektrophorese (10X, 1 l)	108 g Tris, 70,9 g Borsäure und 7,44 g EDTA-Dinatrium werden mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt
TBE-Laufpuffer für DNA-Gelelektrophorese (1X, 1 l)	ein Teil 10x TBE-Laufpuffer auf 9 Teile Aqua bidest
N,N,N'N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TE-Puffer (pH 8)	Fluka, Taufkirchen
Verdünnungspuffer (ELISA) (VP)	45 ml PBS spezial eigene Herstellung und 5 ml FCS (10%), ggf. mit 50 µl Triton
Waschpuffer (ELISA)	2 l PBS spezial eigene Herstellung und 1 ml Tween 20

3.1.3. Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

3.1.3.1. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Vertrieb
BD-Falcon 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube (FACS-Röhrchen)	BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Blutagarplatten	Heipha, Heidelberg
C8 Maxi-Sorb Nunc Immuno Module	Nunc, Wiesbaden
Clinitubes 100 µl, caps, mixing wires	Radiometer, Willich
Einfrierröhrchen	Costar, Fernwald
Einwegpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Costar, Fernwald
Hämatokritkapillare 32 mm/9 µl	WDT, Garbsen
Höllenstein-Ätztift (Silbernitrat)	Ryma-Pharm, Staufen
Kapillarblutentnahmesystem GK 150 EDTA, 200 µl, neutrale Kapillaren	KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
Kapillarenküvetten heparinisiert (50 µl)	Pfaff, Neuburg
Kunststoff Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
LB-Medium	Kinderklinik Forschung
Mikrotiterplatten (96 Kammern)	Nunc, Wiesbaden
Müller-Hinton-Agar	Heipha, Heidelberg
Objektträger ca. 77 x 26 mm	R. Langenbrinck, Teningen
Pipettenspitzen (10 µl)	Biozym, Hess
Pipettenspitzen (200 µl und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße für PCR (200 µl)	Biorad, Willich
Softasept N (Desinfektionsmittel)	Braun, Melsungen
Spritzen (Insulin, 1 ml, 5 ml, 20 ml, 50 ml)	Braun, Melsungen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zucht- und Haltungsfutter	Kliba, Heidelberg

3.1.3.2. Geräte

Geräte	Hersteller /Vertrieb
ADVIA 120	Bayer, Fernwald (ab 2007 Siemens, Fernwald)
Brutschrank, Heracell	Heraeus, London, England
Coolpix 4500 (Kamera für Mikroskop)	Nicon, Münster
Diana/95 1,6 (Kamera für Gele)	Raytest, Straubenhardt
einzelventiliierten Käfige (IVCs)	Tecniplast, Hohenpeißenberg
FACSCalibur (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage MC1	Sartorius, Göttingen
Gen Quant II Spectrophotometer	Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA
Hämatokritzentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Micro Tissue Grinder Kit (Mörser)	Wheaton, Millville, NJ, USA
Mikroskop 473047	Zeiss, Oberkochen
Milenia Kinetik Analyser (ELISA-Reader)	DPC-Biermann, Bad Nauheim
Minigel Twin (Gelelektrophoresekammer)	Biometra, Göttingen
One Touch Ultra Blutzuckermeßgerät	Life Scan, Neckargemünd
pH-Meter, pH 535 MultiCal [®]	WTW, Weilheim

Geräte	Hersteller /Vertrieb
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl), Pipetman	Gilson, Villiers-le Bel, Frankreich; Eppendorf, Hamburg
Scheren, Pinzetten	Braun, Tuttlingen
Spannungsquellen für DNA-Gelelektrophorese, PowerPac 1000	Bio-Rad, München
Sterile Werkbank, HeraSafe	Heraeus, Osterode
Thermocycler, Thermocycler 60	Biomed, Dübendorf, Schweiz
Titramax 100 (Schüttler)	Heidolph, Kelheim
Tropix TR 717 Microplate Luminometer	PE Applied, Forster City, USA
Ultrospec Plus Spectrometer	Pharmacia Biosystems, Forster City, USA
UV-Transilluminator	Raytest, Straubenhardt
Vortexer, Reax top	Heidolph, Kelheim
Waage E 400 D OHAUS	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmet, Schwabach
Wasserdistillationssystem zur Herstellung von Aqua bidest., Milli-Q biocel	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge Mikro 22R (Eppendorf-Gefäße)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge, Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.3.2. Software

Software /Version	Verwendung	Hersteller /Vertrieb
AIDA 2.1	Gel-Dokumentation	Raytest, Straubenhardt
CellQuest	FACS-Auswertung	Becton Dickinson, Heidelberg
GIMP	Graphikbearbeitung	Freeware
Microsoft [®] -Excel 2000 Microsoft [®] -Word 2000	Tabellenkalkulation Textverarbeitung	Microsoft-Corporation, Redmont, USA
Origin 6.1	Berechnung von Graphen	OriginLab-Corporation, Northhampton, MA, USA
Soft Max Pro	Auswertung ELISA	Molecular Devices Downigtown, PA, USA
Winglow-Software	Chemilumineszenz	Berthold Tech, Bad Wildbad

3.2. Methoden

3.2.1. Herstellung und Charakterisierung der Liposomenpräparationen

Die Herstellung und Charakterisierung der Liposomen erfolgte durch Markus Gantert (Prof. Rolf Schubert), Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Universität Freiburg.

Herstellung und Charakterisierung der Liposomenpräparationen

Die in dieser Arbeit verwendeten Präparationen wurden durch das Extrusionsverfahren hergestellt: Es wurden Lipidfilme auf einen Trägerfilm aufgetragen. Die trockenen Filme wurden durch Zusatz der entsprechenden Menge Phosphatpuffer (mit oder ohne Zusatz einer zu verkapselnden hydrophilen Substanz) abgelöst, wobei sich spontan große multilamellare Vesikel (MLVs) bildeten. Das Verhältnis der verwendeten Lipide ist in Kap. 3.1.2.4.3 angegeben.

Sollte in die extrudierten Liposomen eine hydrophile Substanz verkapselt werden (z.B. GO), wurden die Präparationen nach der MLV-Bildung noch fünf Frier-/Tauzyklen unterworfen, bevor der eigentliche Extrusionsvorgang erfolgte. Dazu wurden die MLVs milliliterweise mittels eines LiposoFast[®]-Extruders durch Polycarbonatmembranen extrudiert. Für die konventionellen Liposomen wurden Membranen mit einer Porengröße von 200 nm gewählt, durch die die Präparation 21x bis zur Größenkonstanz gepresst wurde. Sollten beispielsweise für gekoppelte Liposomen kleinere Vesikel hergestellt werden, wurde die Prozedur mit einer 80 nm-Membran wiederholt. Die Liposomengrößen wurden mittels PCS-Messungen kontrolliert.

Um zur Verbesserung des therapeutischen Effekts eine bessere Aufnahme in Phagozyten zu erreichen, wurden targetisierte Glucose-Oxidase-Liposomen entwickelt.

Durch IgG-Moleküle sollen die Fc-Oberflächenrezeptoren der Phagozyten angesteuert werden. Als Vergleichsproteine dienen BSA und HSA.

Die Proteine wurden dabei mit Hilfe einer neuen Technik an die Liposomen gekoppelt. Diese wird als „post functionalization technique“ bezeichnet und wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg für das Protein BSA bereits etabliert (Steenpaß et al. 2006).

Bei dieser Methode wird in einem ersten Schritt ein mit einer am PEG-Kettenende befindlichen Trifluorethansulfonsäure (Tresyl-Gruppe) aktiviertes PEG-Sterol mit dem entsprechenden Protein umgesetzt. Bei pH 8,4 kommt es zur kovalenten Bindung von Protein und PEG-Sterol unter Abgang der Tresyl-Gruppe. Die Bindung erfolgt über die freien Amino-Funktionen des Antikörpers. Diese Reaktion wird zu bestimmten Zeitpunkten mit einem Überschuss an Histidin-HCl-Lösung gestoppt. Im zweiten Schritt der Reaktion lagert sich das PEG-Sterol-Proteinkonjugat bei Raumtemperatur in fertige Liposomenpräparationen ein. Das nicht eingelagerte Proteinkonjugat wird mittels Gelchromatographie abgetrennt. Diese Art der Kopplung sollte nun an das System der Glucose-Oxidase-Liposomen mit IgG adaptiert werden. Um die angestrebten Eigenschaften garantieren zu können, musste eine ausreichende liposomale Antikörperlast und gleichzeitig eine Größen- bzw. Lagerstabilität der Liposomen gewährleistet sein.

Als Kontrolle dienten sogenannte Ankerliposomen, bei denen lediglich abhydrolisiertes PEG-Sterol eingesetzt wurde.

3.2.1.1. Inkorporation von Substanzen in Liposomen

3.2.1.1.1. Markierung von Liposomen mit RhodaminB-PE

In dieser Arbeit wurde RhodaminB-PE (Rhodamin) verwendet, das im FACS im Kanal FL2 detektiert wird. Es handelt sich dabei um ein Phosphatidylethanolamin, bei dem an der Kopfgruppe der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gebunden ist. Rhodamin-PE wurde der Lipidmischung vor dem Lösen in organischem Lösungsmittel in den Konzentrationen von 0,1 Mol%, 0,5 Mol%, oder 2,5 Mol% zugesetzt. Da bei hohen Konzentrationen Membranübergänge des Farbstoffes beschrieben sind (Scherphof und Crommelin, 1996), wurde eine möglichst geringe Konzentration bei gut sichtbaren Ergebnissen ermittelt. Für die Versuche mit gekoppelten Liposomen wurde dann durchweg eine Konzentration von 0,5 Mol% eingesetzt. Der weitere Herstellungsvorgang verlief wie unter 3.2.1 beschrieben.

3.2.1.1.2. Verkapselung von Glucose-Oxidase und FITC-Dextran

Die in der Arbeit verwendeten hydrophilen Substanzen wurden dem Herstellungspuffer zugesetzt. Nach der Herstellung wurde der Anteil nichtverkapselter Substanz mittels Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Dabei wurden die Präparationen verdünnt und mussten anschließend aufkonzentriert und auf den gewünschten Lipidgehalt eingestellt werden. Dies geschah mittels Ultrazentrifugation.

Das Enzym **Glucose-Oxidase** (GO) hat eine Molmasse von 156.000 Da. Es wurde in der Regel in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS gelöst.

Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) diente bei den Aufnahmeversuchen als fluoreszierender hydrophiler Marker und Modellsubstanz der GO. Es wurde ein FITC-Dextran mit einer der Größe der GO annähernd entsprechenden Molmasse von 148.000 Da eingesetzt und in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS gelöst.

Nach der Lösung der hydrophilen Substanzen in PBS wurde die Liposomenherstellung im Extrusionsverfahren (siehe 3.2.1.) durchgeführt. In den meisten Fällen wurde anschließend zur Aufkonzentration eine Ultrazentrifugation durchgeführt. Dies war jedoch für die proteingekoppelten Liposomen nicht möglich, da sie sich danach nicht mehr resuspendieren ließen.

3.2.1.2. Liposomencharakterisierung

Die Liposomencharakterisierung wurde in Freiburg von Markus Gantert durchgeführt, daher sollen hier nur kurz die Grundprinzipien erläutert werden, um die Eigenschaften der Liposomen verständlich zu machen.

Die Bestimmung des **mittleren Liposomendurchmessers** (Z-average, Zave) und des **Polydispersitätsindex**, welcher ein Maß für die Breite der jeweiligen Größenverteilung darstellt, erfolgte mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie.

Lipidgehalt: Die Quantifizierung des Lipidgehaltes erfolgte nach Bartlett. In jedem Molekül eines Phospholipids befindet sich ein Phosphoratom. Die Bestimmung der Lipidkonzentration einer Präparation kann somit über eine Bestimmung der Phosphorkonzentration erfolgen. Über die Phospholipidkonzentration konnte dann bei Präparationen, in denen auch andere Lipide wie z. B. Cholesterol beinhaltet waren, die Gesamtlipidkonzentration berechnet werden. Hierzu wurde mit einer modifizierten Methode nach Bartlett die Phospholipidkonzentration nach oxidativer Veraschung ermittelt (Bartlett et al., 1959).

Einschlusseffizienz (EE%):

Unter Einschluss- oder Verkapselungseffizienz versteht man die Menge Substanz, die durch den entsprechenden Herstellungsvorgang liposomal verkapselt wird, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Substanz, normiert auf 100 %. Über die entsprechenden Methoden werden die Anteile freier und liposomaler Fraktionen bestimmt.

Die tatsächliche Einschlusseffizienz (EE%) berechnet sich dann aus:

$$\text{Einschlusseffizienz (\%)} = \frac{\text{liposomale Fraktion}}{\text{liposomale Fraktion} + \text{freie Fraktion}} \times 100$$

Die EE% für den Einschluss von GO konnte über die Aktivität bestimmt werden. Für die Gesamtmenge der eingesetzten GO wurde eine Probe direkt nach der Extrusion vor der Abtrennung der unverkapselten Substanz (vor Säule = VS) gezogen. Die Aktivität der Probe nach Abtrennung der freien Fraktion unverkapselter GO (nach Säule = NS) stellte die Menge verkapselter GO dar. Diese Proben wurden in 1:10-Schritten mit Puffer verdünnt, im ersten Verdünnungsschritt wurde zur Freisetzung der GO ein Teil Puffer durch 200 mM Natriumcholat-Lösung ersetzt. Der Zusatz von Natriumcholat beeinflusst die Aktivität der GO nicht (Falk, 1999). Die Proben VS wurden insgesamt 1:10.000, die Proben NS 1:1.000 verdünnt.

Mittels eines ABTS (=2,2'-Aza-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))-Assays wurden die Aktivitäten der Proben bestimmt. ABTS liegt als stabiles Radikal in der reduzierten Form vor. Durch Oxidantien wie H₂O₂ kann es in der Gegenwart von Peroxidase in die oxidierte Form überführt werden. Dabei verschiebt sich das UV-Absorptionsmaximum von 340 nm zu 405 nm (Arnao et al., 1990). Eine Zunahme von H₂O₂ macht sich also über eine Absorptionzunahme bei 405 nm bemerkbar. Beim ABTS-Assay berechnet man aus der Zunahme der Absorption pro Minute (=Steigung) die Aktivität der Enzymlösung. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungen:

$$\text{EE\%} = \frac{\text{Aktivität NS}}{\text{Aktivität VS}} \times 100$$

3.2.2. Bestimmung des menschlichen Blutbildes

3.2.2.1. Blutentnahme

Die freiwilligen Blutspenden erfolgten gemäß Ethikantrag (Projektnummer 16/2002V).

Das benötigte Blut wurde jeweils kurz vor dem Versuch abgenommen.

Dabei wurde 1 ml Heparin [100 Units] auf 20 ml Vollblut verwendet. Zur Serumgewinnung wurde Blut in eine gesonderte Spritze aufgezogen. Plasma wurde beim Isolieren der Zellen oder vor der Erythrozytenlyse gewonnen. Dazu wurde nach einer Zentrifugation über acht Minuten bei 400 x g der Überstand abgenommen.

Von jedem Spender wurde ein Blutbild mittels ADVIA 120 erstellt und auf Auffälligkeiten geprüft. Es wurde nur Blut von gesunden Spendern und einem CGD-Patienten ohne akute Infektionen verwendet.

3.2.2.2. Mikroskopische Bestimmung des Differentialblutbildes

Zur Anfertigung eines **Blutausstriches** wurde ein Tropfen EDTA- oder Heparin-Blut mit einem Objektträger auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Blutausstriche wurden mittels der panoptischen Färbung nach Pappenheim gefärbt. Die Objektträger wurden zunächst 5 Minuten in der May-Grünwald-Lösung gefärbt und kurz mit Aqua bidest. gespült. Danach erfolgte die Färbung in Giemsa-Gebrauchslösung für 15 Minuten und erneutes Wässern. Die mikroskopische Differenzierung der Leukozyten erfolgte bei 800-facher Vergrößerung. Die Ausstriche wurden mäanderförmig durchgemustert, bis 100 Leukozyten ausgezählt waren.

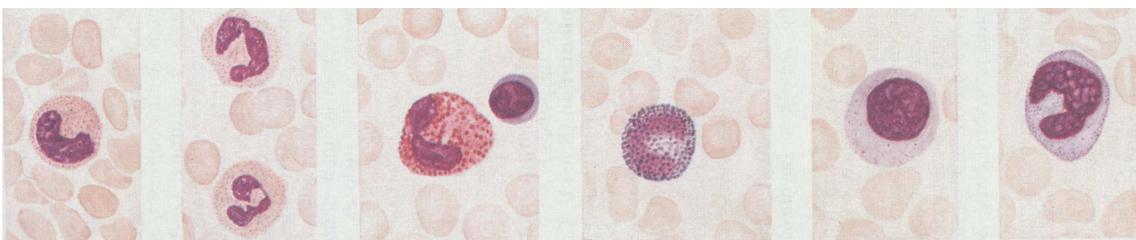


Abb. 6.: Leukozyten im Blutausstrich, gefärbt nach Pappenheim (Pschyrembel 1993)
Von links nach rechts: Stabkerniger neutrophiler Granulozyt, zwei segmentkernige neutrophile Granulozyten, eosinophiler Granulozyt und kleiner Lymphozyt, basophiler Granulozyt, großer Lymphozyt (Virozyt), Monozyt

Bei der Differenzierung der Leukozyten wurden folgende Zellfraktionen nach Größe, Form, Struktur und Anfärbbarkeit von Zellkernen und Zellplasma unterschieden:

- **Neutrophile Granulozyten:** Sie zeichnen sich durch ein neutrophiles Zytoplasma mit vereinzelt blassviolett Granula aus. Der Kern ist dunkelviolett und grobschollig strukturiert. Beim segmentkernigen Neutrophilen sind die Kernsegmente durch Brücken verbunden, welche schmaler als 1/3 der Segmentbreite sind. Bei der juvenilen Form, dem stabkernigen Neutrophilen, ist der Kern etwas weniger dunkel, grobschollig und lediglich gebogen, bei Mäusen auch ringförmig.
- **Eosinophile Granulozyten:** Das Plasma enthält orange, grobe, gleichgroße und ungleichmäßig verteilte Granula. Der Kern ist oft zweilappig, kann auch stab- oder segmentkernig sein.
- **Basophile Granulozyten:** Das Plasma enthält schwarzviolette Granula ungleichmäßiger Größe, Farbtintensität und Verteilung.
- **Monozyten:** Das Plasma stellt sich blassblau dar. Der Kern ist vielgestaltig, blassviolett aufgelockert, meist mit plasmatische und nukleären Vakuolen.
- **Lymphozyten:** Sie sind recht vielgestaltig. Meist ist der Zytoplasmasaum schmal und blaugrau. In der aktivierten Form, die auch als Virozyt bezeichnet wird, ist er etwas breiter. Der Kern ist rund bis polygonal, blass- bis dunkelviolett und feinstrukturiert.

Die einzelnen Zellfraktionen wurden in Prozentwerten angegeben.

3.2.2.3. Bestimmung des großen Blutbildes mit dem ADVIA 120

Messprinzip:

Ca. 120 µl gerinnungsgehemmtes Vollblut (EDTA oder Heparin) werden angesaugt und über ein Scherventil in verschiedene Reaktionskammern [Hämoglobinmessung, Vorbereitung der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten] verteilt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Es werden ca. 40 000 Erythrozyten und 10 000 Leukozyten ausgewertet.

Leukozyten werden am ADVIA 120 im Peroxidase- und im Basophilen-Messkanal optisch gemessen und differenziert.

In der PEROX-Reaktionskammer (Abb. 7) werden die Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Peroxidaseaktivität charakterisiert. Hierzu werden die Erythrozyten in einem ersten Schritt lysiert und dann die Leukozyten mit 4-Chloro-Naphthol und H₂O₂ versetzt. Neutrophile Granulozyten und Monozyten besitzen Myeloperoxidase, eosinophile Granulozyten eine eosinophile Peroxidase. Dadurch kommt es zu einer Oxidation des 4-Chlor-Naphtols und einer Anfärbung der Zelle. Lymphozyten, basophile Granulozyten und große, peroxidase-negative Zellen (large unstained cells, LUC) besitzen keine Peroxidaseaktivität und bleiben deshalb ungefärbt.

Nach der Färbung werden die Zellen einzeln vermessen und validiert. Dabei wird ein Vorwärtsstreulichtsignal (Forward Scatter) und die Absorption jeder Zelle gemessen. Die Absorption kommt durch die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen zustande. Die Messung wird in ein Zytogramm (Leukogramm) projiziert. Je höher die Peroxidaseaktivität der Zellen ist, desto weiter sind sie im Peroxkanal nach rechts auf der x-Achse verschoben. Auf der Grundlage des zellulären Peroxidase-musters und der Zellgröße wird mittels Cluster-Analyse eine exakte Trennung der Zellpopulationen voneinander erreicht. Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten können allein anhand dieses Kanals differenziert werden.

Basophile Granulozyten und Lymphozyten müssen erst mit Hilfe des Basophilen-Kanals differenziert bestimmt werden. Eine besondere Kategorie bilden "große, Peroxidase-negative Zellen (LUC)". Sie sind in der Routinediagnostik beim Menschen oft lymphatischer Natur, und werden bei Limitüberschreitung nachdifferenziert.

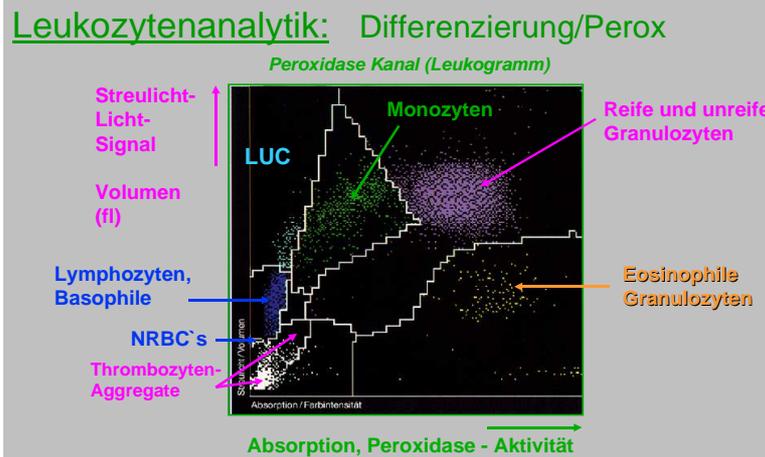


Abb. 7: Leukogramm anhand der ADVIA-Messung (Bayer-Vital, Fernwald), die „Perox“-Graphik zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Auf der y-Achse ist das Streuverhalten der Zellen aufgetragen. Die einzelnen Zellpopulationen sind beschriftet.

Im **Basophilen oder Kernsegmentierungsmesskanal** (Abb. 8) wird die Zellkernbeschaffenheit mittels LASER-Diode ($\lambda = 670 \text{ nm}$) optisch gemessen und beurteilt. Nach der Erythrozytenlyse werden die Leukozyten mit speziellen Reagenzien (Phthalsäure und HCl) zytoplasmatisch "gestrippt". Dabei bleiben lediglich die basophilen Granulozyten unverletzt. Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung werden jeweils singuläre Zellkerne gemessen und validiert. Das Doppelwinkel-Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter in zwei Streulichtwinkeln: $2-3^\circ$ und $5-15^\circ$) jedes Zellkerns wird von Detektoren aufgefangen und in ein Zytogramm (Nukleogramm) projiziert. Die Trennung der Zellkerne und unverletzten Basophilen erfolgt über die Kerngröße und die Chromatindichte auf der Grundlage der Cluster-Analyse. Es werden vier Cluster unterschieden. Mononukleäre Zellkerne stammen von Monozyten und Lymphozyten. Polymorphe Kerne stammen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Basophile Granulozyten sind als ganze Zellen klar differenzierbar. Außerdem können Blasten beider Genesen vorkommen. Bei Blastenalarm und Linksverschiebung mit oder ohne unreife Granulozyten wird in der Routinediagnostik nachdifferenziert.

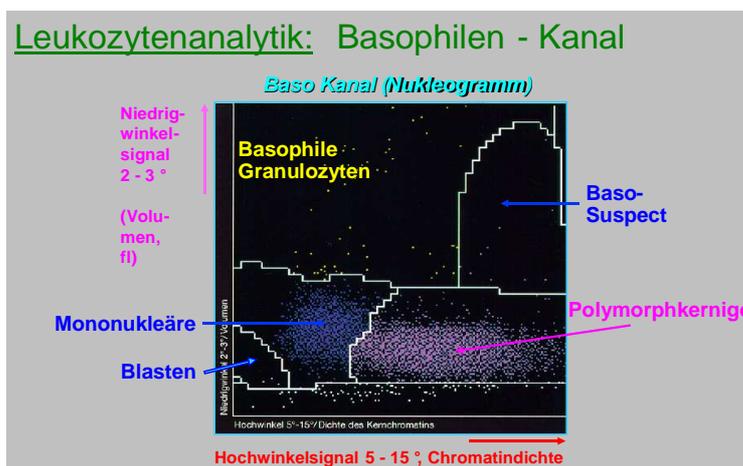


Abb. 8. Nukleogramm anhand der ADVIA-Messung (Bayer-Vital), in der „Baso“-Graphik werden die basophilen Granulozyten und die Zellkerne der anderen Leukozyten nach Zerstörung der Plasmamembran mittels Detergentien dargestellt. Dabei wird Kleinwinkel ($2-3^\circ$) gegen Großwinkel ($5-15^\circ$) aufgetragen.

Auf die anderen Parameter, die der ADVIA 120 misst, soll hier nur kurz eingegangen werden, da sie für die Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen.

Erythrozyten: Sie werden vor der Analyse isovolumetrisch „gekugelt“. Dann wird mit Hilfe des Lasers die Größe (MCV) und der Hb-Gehalt (MCH) jeder einzelnen Zelle bestimmt.

Thrombozyten: Messung direkt mittels Laser, Auswertung bei Verwendung von heparinisiertem Vollbut nicht möglich (falsch erniedrigt).

3.2.2.3. Isolierung von Granulozyten, mononukleären Zellen bzw. Gesamtleukozyten aus menschlichem Vollblut

Prinzip:

Zur Gewinnung von Gesamtleukozyten wurden lediglich die Erythrozyten lysiert. Wurden hingegen einzelne Blutbestandteile benötigt, erfolgte die Auftrennung über Dichtegradienten. Zur Isolierung von Granulozyten und peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut, wurde in der vorliegenden Arbeit Histopaque 1119 und 1077 verwendet. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Größen und Dichten der Zellen. Im Gegensatz zur ebenfalls sehr gebräuchlichen Ficoll-Trennung werden dabei die Erythrozyten weitgehend von den Granulozyten isoliert.

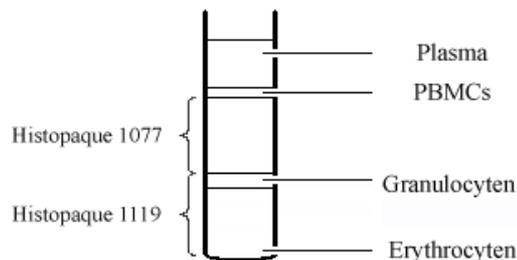


Abb. 9.: Auftrennung von Vollblut durch Dichtegradienten mit Hilfe von Histopaque 1119 und 1077, Schichtung nach Zentrifugation

In ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen wurden 15 ml Histopaque 1119 vorgelegt und vorsichtig mit 15 ml Histopaque 1077 überschichtet. In gleicher Weise wurden dann 20 ml Vollblut aufgetragen. Es folgte eine Zentrifugation bei 18° C und 633 x g für 25 Minuten, wonach vorsichtig abgebremst wurde. Die Schichtung der einzelnen Fraktionen kann Abb. 9 entnommen werden.

Das Plasma, die PBMC und die Granulozyten wurden nacheinander vorsichtig abgenommen und in je ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde mit PBS spezial aufgefüllt und 10 Minuten bei 400 x g und 15° C zentrifugiert. Nach Absaugen des Großteils des Überstandes erfolgte die Lyse der noch vorhandenen Erythrozyten. Hierzu wird das Pellet in den belassenen Resten des Überstandes resuspendiert und das Zentrifugenröhrchen mit Ammoniumchloridpuffer aufgefüllt. Eine gute Durchmischung vor und während der Lyse ist wichtig. Daher wurde zunächst vorsichtig gevortext und dann auf dem Schüttler 15 min auf Eis lysiert. Danach wurde bei 400 x g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit PBS spezial gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe des ADVIA 120 bestimmt und auf eine bestimmte Anzahl pro ml eingestellt.

Bei der Gewinnung von Gesamtleukozyten durch Erythrozytenlyse wurde ähnlich vorgegangen. 5 ml heparinisiertes Vollblut wurden mit 45 ml Lysepuffer behandelt. 50 oder 100 µl wurden direkt im Facsröhrchen mit 3 ml Ammoniumchloridpuffer lysiert

und jeweils 5 min bei 350 g zentrifugiert.

Wenn für den anschließenden Versuch die Zellen in Plasma, Serum oder inaktiviertem Serum benötigt wurden, wurden sie nach dem letzten Waschen in der entsprechenden Menge resuspendiert.

3.2.3. Gewinnung und Charakterisierung von Mausblut

3.2.3.1. Blutentnahme, Serumgewinnung, Blutglucosemessung

Die Blutentnahme am lebenden Tier erfolgte in der Regel an der Schwanzspitze. Blutglucose wurde direkt durch das Abnehmen eines Tropfens mit dem Teststreifen des betriebsbereiten One Touch Ultra-Messgerätes ermittelt.

Zur Bakterienanzucht bei Sepsisversuchen wurde vor der Blutentnahme die Schwanzspitze mit Softasept N desinfiziert und 10 µl Blut in eine sterile mit 90 µl sterilem Ampuwa versehene Insulinspritze aufgezogen.

Wenn größere Mengen Blut benötigt wurden (50 µl bzw. 100 µl), wurde das Blut in entsprechende Heparinkapillaren aufgenommen. Zur Gewinnung von Plasma wurde die Kapillare (Pfaff) in der Hämatokritzentrifuge zentrifugiert, zwischen Blutkuchen und Plasma aufgebrochen und das Plasma anschließend mit einer Eppendorfpipette entnommen.

Zur Erstellung von Blutbildern mit Hilfe des ADVIA oder zur Durchführung bestimmter *in-vitro*-Versuche wurden unter Ethernarkose größere Mengen Blut retrobulbär entnommen. Die narkotisierte Maus wurde mit dem zu punktierenden Auge nach oben auf die Arbeitsplatte gelegt. Mit Zeigefinger und Daumen der linken Hand wurde das Tier im Genick so fixiert, dass es zugleich zur Stauung der Jugularvene kam. Mit der rechten Hand wurde retrobulbär die heparinbeschichtete Mikrohämatokritkapillare (WDT) unter leichten Drehbewegungen vorsichtig am Bulbus vorbei in okzipitaler Richtung etwa 1-2 mm tief eingeführt und so der retrobulbäre Venenplexus punktiert.

Das Blut wurde entweder in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl Heparin oder in einem EDTA-Kapillarblutentnahmesystem zur Aufnahme von 200 µl Blut nach Entfernung der Kapillare aufgefangen. Nach Lösen des Staudruckes auf die Jugularvene wurde die Mikrohämatokritkapillare entfernt.

In vielen Fällen erfolgte die Blutentnahme bei der Tötung unter CO₂-Betäubung. Hierbei hat es sich bewährt, zunächst heparinisiertes Vollblut am Auge zu gewinnen, dann den Brustkorb zu eröffnen und am rechten Vorhof mit einer etwas Heparin

enthaltenden Insulinspritze zunächst heparinisiertes und dann nicht gerinnungsgehemmtes Vollblut zu entnehmen.

Zur Gewinnung von Serum wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß 5 min bei 400 x g zentrifugiert.

3.2.3.2. Mikroskopische Bestimmung des Differentialblutbildes der Maus

Die Bestimmung erfolgte analog zum menschlichen Differentialblutbild (siehe 3.2.2.2.). Die Morphologie von Mausleukozyten stimmt weitgehend mit der von humanen Leukozyten überein und ist in Kapitel 3.2.2.2. beschrieben.

Eine geringe Granulozytenzahl ist für C57Bl6-Mäuse in der Literatur dokumentiert. Charles et al. 1975 nennen die in Tabelle 1 gelisteten Leukozytenzahlen. Im Vergleich dazu sind die Leukozytenzahlen beim Menschen dargestellt (Pschyrembel, 1993).

Tabelle 1: Differentialblutbild von C57Bl6-Mäusen im Vergleich zu den Werten beim Menschen. Es werden die Werte für männliche und weibliche Tiere im Alter von 3 Monaten gezeigt.

	Lymphozyten	Granulozyten neutrophile	eosinophile	Monozyten
C57Bl6 weibl.	91%	6%	0,1%	1,6%
männl.	89%	8%	0,4%	1,7%
Mensch	20-30%	60-70%	2-4%	2-6%

3.2.3.3. Bestimmung des großen Blutbildes mit dem ADVIA 120

Mausblut wurde in der Regel zu VetMedLab (Ludwigsburg) geschickt, da dieses Labor über das Multispecies-Programm verfügt.

Um eine erste Einschätzung von Blutproben zu bekommen oder zur Zellzahlbestimmung bei lysiertem Vollblut, wurden die Proben am ADVIA 120, der im Labor der Kinderklinik zur Verfügung steht, gemessen. Allerdings ist an diesem Gerät nur das Auswertungsprogramm für humane Blutproben vorhanden. Da das Messprinzip aber 100% identisch mit dem für Mäuseblut ist, konnte anhand der graphischen Ausdrücke ein orientierendes Blutbild erhalten werden. Ein direkter Vergleich der Auswertungen aliquotierter Mausblutproben mit dem humanen und murinen ADVIA-120-Programmen ist im Ergebnisteil, Kap. 4.3.2.2., gezeigt.

Abb. 10 zeigt Ausschnitte eines mit dem Multi-Spezies-Programm erstellten Runscreens.

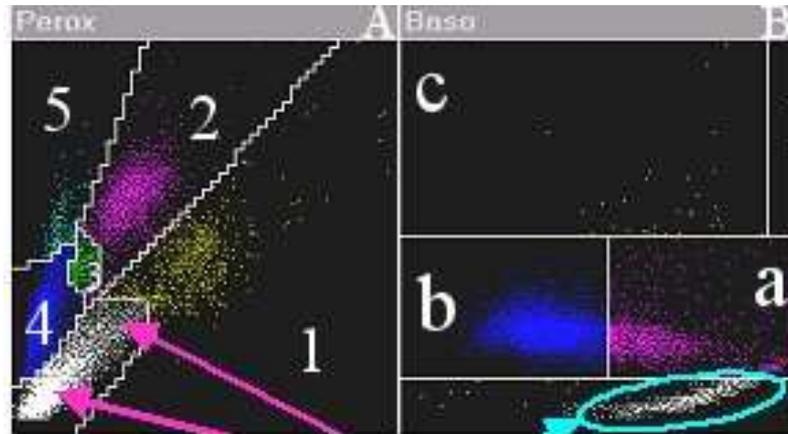


Abb. 10: Ausdruck einer ADVIA-120 Messung von murinem Blut einer Maus mit Multispecies-Programm (BayerVital)

A: Die „Perax“-Graphik zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Auf der y-Achse ist das Streuverhalten der Zellen aufgetragen. Die Pfeile bzw. der Kringel weisen auf die für Mäuse typischen Thrombozytenaggregate hin.

1. eosinophile Granulozyten,
2. neutrophile Granulozyten,
3. Monozyten,
4. Lymphozyten und basophile Granulozyten;
5. Large unstained cells (LUCs)

B: In der „Baso“-Graphik werden die basophilen Granulozyten und die Zellkerne der anderen Leukozyten nach Zerstörung der Plasmamembran mittels Detergentien dargestellt. Dabei wird Kleinwinkel (2-3°) gegen Großwinkel (5-15°) aufgetragen. Der Pfeil weist auf für Mäuse typische Zelltrümmer im Rauschen hin.

- a) polymorphkernige Zellkerne (Neutrophile und Eosinophile);
- b) runde Zellkerne (Lymphozyten und Monozyten)
- c) Basophile Zellen

Aus den Ergebnissen berechnet das Gerät die Zellzahlen der einzelnen Leukozytenpopulationen und das Differentialblutbild.

Zur raschen Abschätzung von Zellzahlen waren wir darauf angewiesen, auf den ADVIA der Kinderklinik ohne Mausprogramm zurückzugreifen. Was man dabei beachten musste, wird im Ergebnisteil (Kap. 4.3.2.2.) dargestellt.

3.2.4. Analyse von humanen und murinen Blutzellen am FACSCalibur

3.2.4.1. Kurzbeschreibung des Geräts

Prinzip:

Wie bei der Messung am ADVIA handelt es sich auch hier um eine durchflusszytometrische Zellcharakterisierung. Ein Laserstrahl trifft auf eine Zelle und wird als Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter, FSC) und als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) detektiert. Mit der gemessenen FSC-Intensität kann eine Aussage über die Größe der Zelle gemacht werden. Das SSC lässt eine Aussage über die Granularität der Zelle zu.

Zusätzlich zu diesem Messprinzip regt der Laserstrahl einer definierten Wellenlänge die Elektronen eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffes zum Übergang in einen höheren Energiezustand an. Bei der Rückkehr in den Grundzustand geben die Elektronen die Energie in Form von Licht ab, das als spezifisches Emissionsspektrum detektiert werden kann.

In der Arbeit wurden die Kanäle FL1 (DHR, FITC) und FL2 (Rhodamin PE, PE) verwendet, der Laser hat eine Wellenlänge von 488 nm.

Aufgrund der Morphologie und der Eigenfluoreszenz lassen sich Leukozytensubpopulationen mit Hilfe des Durchflusszytometers differenzieren.

Wegen ihrer höheren morphologischen Komplexität unterscheiden sich die Granulozyten im SSC von mononukleären Zellen (PBMC). PBMCs können wiederum aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe im FSC differenziert werden, da Monozyten und Makrophagen im Durchschnitt größer als Lymphozyten sind. Nicht berücksichtigt werden die basophilen und eosinophilen Granulozyten, wobei deren Anteil am Blutbild vernachlässigbar ist.

Bei der Auswertung mit dem Programm CellQuest (Firma Becton-Dickinson) können durch das Setzen von Gates im Dot-Plot bestimmte Zellpopulationen einzeln auf ihre Eigenschaften hin betrachtet und in Histogrammen oder Vierfelderdiagrammen ausgewertet werden. Mit Hilfe der Negativkontrolle wurde zwischen positiven und negativen Zellen durch Setzen eines Markers oder Einteilung in Quadranten unterschieden. Der Anteil fluoreszierender Zellen im jeweiligen Gate (% gated) oder Quadranten (Upper Right, Upper Left, Lower Right, Lower Left) wurde in Prozent angegeben.

Nach der Messung wurde das Gerät je 5 min durch das Einspannen eines Röhrchens mit „Safe“, „Rinse“ und destilliertem Wasser gereinigt.

Beim Mensch (Abb. 11) sind Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Forward-Sideward-Scatter gut als separate Populationen im Dot-Plot zu erkennen. Die größte Population stellen die Granulozyten, gefolgt von Monozyten und Lymphozyten.

Auf die Auswertung der Fluoreszenz wird im Zusammenhang mit den einzelnen Markierungen eingegangen.

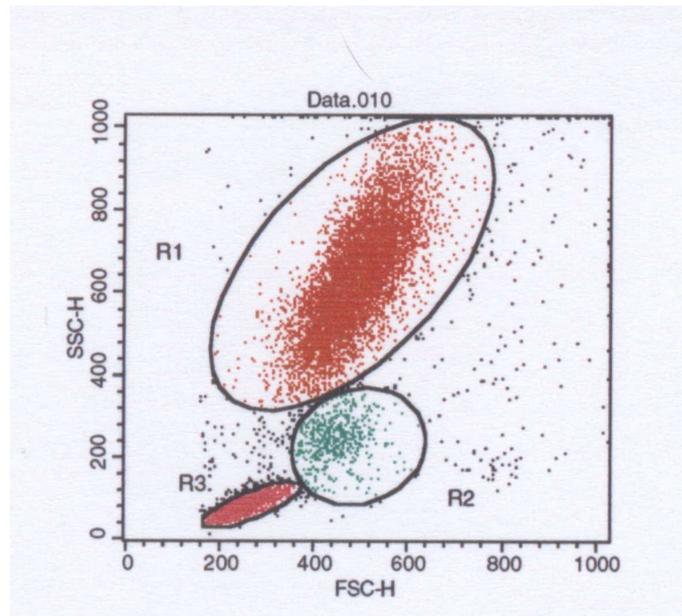


Abb. 11: Charakteristische durchflusszytometrische Zweiparameterdarstellungen („Dot-Plot“) humaner Leukozyten, im Rahmen der Versuche erstellt mit CellQuest. In der Abbildung ist der „forward scatter“ (FSC-H) gegen den „side scatter“ (SSC-H) aufgetragen. Dabei werden die morphologischen Eigenschaften der Zellen miteinander korreliert. Die Abszisse entspricht der Zellgröße und die Ordinate der Granularität der Zelle. Die gesetzten Ausschnitte (Gates) entsprechen den Populationen von

- R1) Granulozyten,
- R2) Monozyten,
- R3) Lymphozyten

Die Differenzierung der Zellpopulationen im Mausblut (Abb. 12) ist schwieriger, ein zweiter Dotplot, in dem SSC gegen FL aufgetragen ist, dient als Hilfe. Im Gegensatz zum Mensch stellen bei der Maus die Lymphozyten die größte Population dar, gefolgt von den Monozyten. Bei gesunden Tieren sind lediglich wenige Granulozyten vorhanden (vgl. Kap. 3.2.3.2).

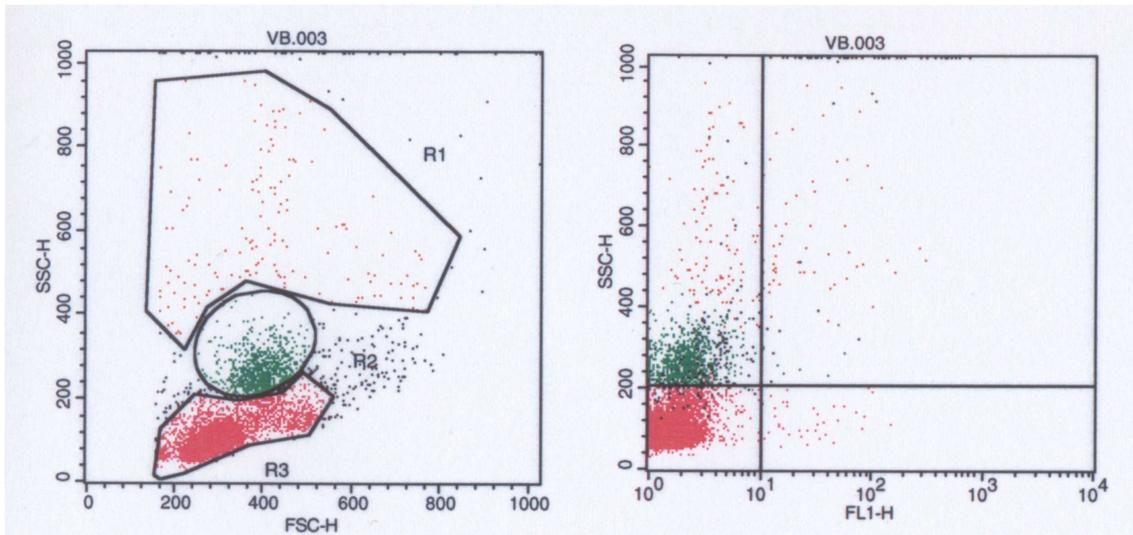


Abb. 12: Charakteristische durchflusszytometrische Zweiparameterdarstellungen („Dot-Plots“) muriner Leukozyten. Die Abbildung stammt aus der Messung einer Negativkontrolle (CGD-Maus, Blut inkubiert mit DHR, keine Zusätze) im DHR-Assay.

Linkes Diagramm: „forward scatter“ (FSC) gegen „side scatter“ (SSC).

Es werden morphologische Eigenschaften der Zellen miteinander korreliert. Die Abszisse entspricht der Zellgröße und die Ordinate der Komplexität der Zelle. Die gesetzten Ausschnitte (Gates) entsprechen den Populationen von

R1) Granulozyten, R2) Monozyten, R3) Lymphozyten

Rechtes Diagramm: Vierfeldertafel „side scatter“ (SSC-H)1 gegen FL1 (FL-H) zur besseren Differenzierung der Zellpopulationen.

Dabei haben die Lymphozyten die geringste und die Granulozyten die höchste Komplexität. Die Messung der Fluoreszenz der Zellen erfolgte in Kanal 1. Da es sich um ungefärbte Zellen handelt, sind im oberen und unteren rechten Quadranten nur eigenfluoreszierende Zellen zu erkennen.

Im Folgenden werden die Aufnahmeversuche mit markierten Liposomen, der DHR-Assay sowie die durchflusszytometrische Bestimmung der Komplementrezeptoren erläutert.

3.2.4.2. Art und Vorbereitung der Blutproben

Nach der Blutabnahme (siehe Kapitel 3.2.2.1.) wurde Vollblut mit Ammoniumchlorid- oder FACS-Lysepuffer lysiert. Humane Blutproben wurden teilweise durch Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgetrennt. Die Lyse mit Ammoniumchloridpuffer ist bereits in Kap. 3.2.2.3., beschrieben. Hier bleiben die Leukozyten unfixiert und können beispielsweise noch Liposomen aufnehmen. In der Regel erfolgt dann vor der Messung eine Fixation mit 2% Formalin.

Bei der Lyse mit FACS-Lysepuffer erfolgt die Fixation direkt während der Lyse. Es kommt dann zu keinen Veränderungen mehr. Wann und wie genau lysiert wurde, ist bei den einzelnen Versuchen beschrieben.

3.2.4.3. Aufnahme der markierten Liposomen in Leukozyten

Vorbereitung der Proben: Die meisten Aufnahmeversuche wurden mit humanem Vollblut von gesunden Spendern, einige auch mit Vollblut eines CGD-Patienten durchgeführt. Wenn isolierte Granulozyten und PBMC oder lysiertes Vollblut verwendet wurden, ist dies gekennzeichnet.

Bei den Aufnahmeversuchen mit CGD-Mausblut wurde Vollblut und lysiertes Vollblut verwendet. Die Resuspension der humanen wie murinen Blutzellen erfolgte je nach Bedarf in den Puffern PBS spezial oder HBSS, in nativem (nicht inaktiviertem) Plasma oder Serum oder in mit über 30 min bei 56°C hitzeinaktiviertem Serum oder Plasma.

Die verwendeten Liposomen sind in Kapitel 3.2.1. beschrieben. In der Regel wurden die Liposomen für die Aufnahmeversuche auf 2 mM vorverdünnt.

Inkubation der Proben mit den Liposomen: Das Blut oder die Zellsuspension wurde in FACSRöhrchen vorgelegt und in der Regel mit dem gleichen Volumen Liposomensuspension versetzt und vorsichtig gevortext. Üblicherweise betrug die Endkonzentration der Liposomen 1 mM. Bei Liposomen mit unter 2 mM Ausgangskonzentration wurde gegebenenfalls das Volumen der Liposomensuspension und das Endvolumen vergrößert. Das Endvolumen betrug mindestens 100 µl (davon 50 µl Vollblut oder Zellsuspension) und maximal 225 µl (davon 100 µl Vollblut oder Zellsuspension). Die Inkubation erfolgte über 30, 60 oder 120 Minuten im Wasserbad bei 37°C. Ein Teil der Proben wurde auf Eis inkubiert und diente als Negativkontrolle. Bis zur erfolgreichen Etablierung der Negativkontrolle auf Eis wurden Zellen mit ungelabelten Liposomen zum Einstellen des FACScalibur als Negativkontrolle mitgeführt.

Teilweise wurde **Cytochalasin D** als Phagozytosehemmstoff zugefügt, um die Phagozytose besser als durch reine Kühlung zu hemmen. Dazu wurden 100 µl Vollblut je FACSRöhrchen vorgelegt und ein Teil mit 2 µM, 10 µM oder 50 µM Cytochalasin D 10 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Alle Proben wurden dann vor der Zugabe der Liposomen auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von 100 µl 2 mM mit 0,5 Mol% Rhodamin gelabelten EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen. Die Endkonzentration (f.c.) der Liposomen betrug 1 mM, die des Cytochalasin D 1 µM, 5 µM oder 25 µM.

Die Positivkontrolle, Vollblut mit Liposomen ohne Cytochalasin D, wurde 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Auch eine Probe ohne Cytochalasin D auf Eis wurde

mitgeführt. Proben mit Cytochalasin D wurden zur Feststellung der optimalen Konzentration bei 37° inkubiert. Um beide Hemmeffekte zu nutzen, wurde eine Probe mit der hohen Cytochalasin D-Konzentration bei 0°C auf Eis inkubiert.

Lysieren und Waschen: Es wurde im Verlauf der Versuche mehrfach modifiziert:

In den ersten Versuchen wurde das Vollblut mit Ammoniumchloridpuffer lysiert und dreimal mit PBS spezial gewaschen. Anschließend wurde mit 2% Formaldehydlösung im Verhältnis 1:2 fixiert. Dabei wurde das Einhalten der Kühlkette, insbesondere im Hinblick auf die Negativkontrollen, zunehmend optimiert, unter anderem durch das Kühlen der Pufferlösungen. Einige technische Probleme beim Waschen, wie das Erwärmen der Zentrifuge beim Beladen und das Erwärmen der Zellpellets beim Resuspendieren, stellten sich als unüberwindbar heraus. Deshalb wurde auf die Lyse mit fixierendem FACS-Lysepuffer (formalinhaltig) umgestellt.

Auch die Behandlung der isolierten Granulozyten und PBMC wurde modifiziert. Zunächst wurde, wie bereits beschrieben, direkt nach der Isolierung mit Ammoniumchloridpuffer lysiert. Zur Schonung der Zellen wurde die Lyse der verbliebenen Erythrozyten bei späteren Isolationen erst nach der Inkubation mit Liposomen durchgeführt. Dabei wurde in beiden Fällen nach dem Waschen mit 2% Formalin fixiert. Schließlich wurde stattdessen nach der Inkubation und vor dem Waschen mit FACS-Lysepuffer lysiert und fixiert, um „Stress“ für die Zellen zu vermeiden.

3.2.4.3.1. Analyse liposomenhaltiger Zellen am FACSCalibur

Die durchflusszytometrische Analyse der Liposomenaufnahme erfolgte mit dem FACSCalibur. Es wurden jeweils 10 000 Zellen ausgezählt. Im Vollblut wurden die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gated. Bei den isolierten Granulozyten diente das Gaten lediglich dem Ausschluss von toten Zellen und der besseren Auswertung. Bei den PBMC wurden Monozyten und Lymphozyten gated und separat ausgewertet. Mit Hilfe von Histogrammen wurde dann die Anzahl fluoreszierender Zellen an den im Gate befindlichen Zellen ermittelt (% gated). Dazu wird mit Hilfe der Negativkontrolle ein Marker gesetzt. Maximal 5% positive Zellen in der Negativkontrolle wurden aufgrund der Eigenfluoreszenz aktivierter Zellen toleriert.

3.2.4.3.2. Vorinkubation mit IgG

Derksen et al. (1986) beschrieben Aufnahmeversuche mit Kaninchen IgG-gekoppelten Liposomen und Kupferschen Sternzellen von Ratten. Dabei wurde die Aufnahme durch hitzeaggregiertes IgG von Menschen oder Kaninchen um über 75% gehemmt, nicht jedoch durch gleiche Mengen BSA.

Rezeptoren für den Fc-Teil von Antikörpern gibt es sowohl auf Monozyten als auch auf neutrophilen Granulozyten (Messner et al 1970). IgG-Antikörper können unterschiedlich gut an die zwei Zelltypen binden, wobei auch die Antikörperdichte eine Rolle spielt.

Die Aufnahme von EPC:Chol-Liposomen mit und ohne gekoppelte Proteine (IgG und HSA) wurde nach Vorinkubation von Vollblut mit nativem und hitzeaggregiertem IgG untersucht. Dazu wurde humanes IgG in einer Konzentration von 5mg/ml in 0,9% NaCl gelöst und ein Teil davon bei 56°C 30 Minuten hitzeaggregiert.

Humanes heparinisiertes Vollblut wurde 15 min mit der gleichen Menge NaCl 0,9% (Kontrolle), inaktivierter IgG-Lösung und nativer IgG-Lösung vorinkubiert.

Jeweils 100 µl dieses Gemisches wurde anschließend eine Stunde lang mit 100 µl 2 mM Liposomen im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

3.2.4.4. Messung der intrazellulären H₂O₂-Produktion mit Hilfe des DHR-Assays

Prinzip:

Dihydrodihydrodamin 123 permeiert in Zellen und wird dort durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffverbindungen, welche von stimulierten Granulozyten oder Monozyten gebildet werden, durch Oxidation in das fluoreszierende Rhodamin umgewandelt. Es kann die Zellen nicht mehr verlassen und wird mittels FACS-Analyse in Kanal FL1 gemessen. (Emmendorffer et al., 1990). Diese Methode wurde sowohl im Tierversuch als auch bei menschlichen Zellen eingesetzt. In beiden Fällen diente der Assay zur Überprüfung, ob Zellen NADPH-Oxidase-defizient sind oder diente zur Messung der Rekonstitution des oxidativen Bursts in NADPH-defizienten Zellen.

Benötigte Lösungen:

- Lyse-Puffer (ohne Formalin)
- DHR 123: 29 µM in PBS-Puffer
- HBSS
- PMA: 10 ng/ml in PBS-Puffer
- Catalase-Lösung (auf 500 U/ml in PBS verdünnt)

Durchführung: 30 µl- 50 µl heparinisiertes Vollblut wurde mit 3 ml Lyse-Puffer versetzt, die Erythrozyten für 10 min lysiert und danach 2 mal mit PBS spezial bei 350x g und 4 °C gewaschen. Die Pellets wurden in 100 µl HBSS resuspendiert. Nach Resuspendieren und der Zugabe der Catalase wurde 1 µl PMA hinzugefügt und der

Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl DHR 123-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation über 15 min bei 37 °C wurden die Zellen bis zur Messung auf Eis gestellt. Die Zugabe von PMA vor der Zugabe von DHR bewährte sich an dieser Stelle.

Als Positivkontrolle dienten PMA-stimulierte, nicht NADPH-Oxidase-defiziente Zellen. Um eine zeitbedingte Oxidation des DHR und somit falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde die Negativkontrolle (in der Regel NADPH-Oxidase-defiziente Zellen, die mit PMA und DHR inkubiert wurden) stets als letzte Probe nochmals gemessen. Versuche, bei denen die Negativkontrolle im Verlauf der Messung positiv wurde, wurden nicht gewertet. Die Auswertung erfolgte am FACSCalibur.

3.2.4.5. Messung der Komplementrezeptorexpression auf murinen Blutzellen

Es wurden die murinen Komplementrezeptoren CD11b, CD18, CD21 und CD35 untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob die Liposomen *in vivo* das Komplementsystem aktivieren, speziell, ob sie eine Hochregulation der Rezeptordichte verursachen.

Bei den Faktoren **CD 11b und CD 18** handelt es sich um Untereinheiten von Leukozyten-integrinen. Sie kommen auf Makrophagen, myeloischen dendritischen Zellen, Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten vor. Die b2-Kette (CD 11b) und die aM-Kette (CD 18) bilden zusammen den Komplementrezeptor 3 (CR3) (Janeway et al. 2002). Daran bindet der Komplementfaktor C3b (Moghimi, S. M., Patel, H.M. 2002).

CD 21/35 wird in erster Linie von reifen B-Zellen und folliculären dendritischen Zellen exprimiert. CD 21 entspricht dem Leukozyten-Komplementrezeptor 2 (CR2), CD 35 dem Leukozyten-Komplementrezeptor 1 (CR1). Beide dienen an Fremdartigen kovalent gebundenem C3d als Rezeptor. Bei Mäusen ist CD 21 auch für iC3b und CD 35 für C4b und C3b Rezeptor. (Haas, K.M. et al. 2002).

Antikörpermarkierung: Mit PE markierte Antikörper (vgl. 3.1.2.1.) wurden zuvor 1:2 mit PBS verdünnt. 30 µl murines Vollblut wurde mit je 1 µl Antikörperlösung versetzt. Als Isotypenkontrolle dienten Rat IgG2b FITC und Rat IgG2b PE. Die entsprechenden Rezeptoren wurden mit CD11b PE ram, CD 18 FITC ram und CD 21/35FITC ram markiert. Die Inkubation erfolgte über 15 Minuten bei 4°C. Es wurde zweimal mit 3 ml PBS gewaschen und bei 350 x g 5 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und gevortext. Die Fixierung erfolgte mit 100 µl Formaldehyd-Fixierpuffer. Anhand von Negativ- und Positivkontrolle wurden die Messeinstellungen modifiziert und Gates gesetzt.

3.2.5. Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit Hilfe der Chemilumineszenz

Prinzip:

Die Chemilumineszenz dient dem Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) in lysiertem Vollblut oder isolierten Granulozyten beziehungsweise PBMC.

Die ROS reagieren mit ungesättigten Doppelbindungen innerhalb der Zelle, wobei unter anderem Derivate des Dioxetandions entstehen. Diese sehr energiereiche Verbindung gibt Energie an fluoreszenzfähige Moleküle in der Zelle ab, die dadurch in einen angeregten Zustand versetzt werden. Beim Übergang in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Biolumineszenz. Als Verstärkersubstanz wurde Luminol verwendet. Bei dieser 3-Aminophalsäure sendet das Dianion nach der Oxidation vor allem durch hypochlorige Säure (HOCl) Licht aus. HOCl wird mit Hilfe der Myeloperoxidase aus H_2O_2 gebildet (Albrecht et al. 1992).

Zur Stimulation des oxidativen Burst werden der Phorbolster PMA und opsonisiertes Zymosan eingesetzt.

PMA löst eine 2nd-messenger-Kaskade mit Aktivierung der Proteinkinase C aus, die gp47 (ein zytoplasmatisches Protein der NADPH-Oxidase) phosphoryliert. Zymosan wird aus Zellwänden der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen und von Phagozyten aufgenommen, wodurch der oxidative Burst ausgelöst wird.

In einer nicht-translumineszenten 96-well-Platte wurden Zellen mit HBSS bzw. Liposomen inkubiert. In alle "Wells" wurde durch das Tropix TR 717 Microplate Luminometer Luminol pipettiert, und zu einigen Wells wurde zusätzlich vom Gerät PMA oder von Hand Zymosan zugegeben.

Die Zellen wurden auf 100 000 in 50 μ l mit Hilfe von HBSS eingestellt.

Das Luminol (1,75 mg/ml) wurde 1:50 mit PBS vorverdünnt, das PMA (2 mg/ml)

1: 2500 in HBSS verdünnt.

Wenn die Liposomen in höheren Konzentrationen vorlagen, wurde auf 4 mM verdünnt und 50 μ l eingesetzt.

Je nach Ansatz wurden in die einzelnen Wells folgende Mengen vorgelegt:

- Zellen mit HBSS (175 μ l)
- Zellen mit HBSS (150 μ l) vor PMA-Zugabe (durch Gerät) oder vor Zugabe von 25 μ l Zymosan (0,25 mg/ml f.c., kurz vor Messung)
- Zellen mit der benötigten Menge Liposomen zum Erreichen einer 1 mM Konzentration

Wurden Vorinkubationen mit Liposomen durchgeführt, wurde Vollblut 15 min bei 37°C mit den Liposomen vorinkubiert und dann lysiert. Anschließend wurden die Zellen auf 20 000 Zellen pro ml HBSS eingestellt und in die Wells pipettiert.

Bei der Stimulation mit PMA erfolgte die Zugabe von 25 μ l (100 ng/ml f.c.) unmittelbar vor der Messung durch das Gerät. Die Zugabe von 25 μ l Luminol (4 ng/ml f.c.) in jedem Well wurde ebenfalls durch das Gerät durchgeführt. Die Messung und

Auswertung erfolgte kontinuierlich über 30 Minuten mit dem Photomultiplier. Dieses Gerät zeichnet den Verlauf der Lichtemission als Kurve auf und berechnet die Fläche unter der Kurve für die Auswertung (Integrale). Die Photonenabgabe wird in der Einheit „Relative Light Units“ (RLU) gemessen.

Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Sie ermöglichten eine Aussage über den Grundzustand, der eine Beurteilung der stimulierten Zellen zulässt.

3.2.6. Zucht, Haltung und Genotypisierung der CGD-Mäuse

3.2.6.1. Zucht und Haltung der Mäuse

Die Mäuse wurden mit einer Dichte von maximal 6 adulten Tieren in einzeln ventilierten Käfigen (IVCs, Firma Tecniplast) in der spezifisch pathogenfreien Tierhaltung der Kinderklinik gehalten.

Der Lichtrhythmus für Mäuse betrug 12 Stunden hell und 12 Stunden dunkel. Die Luftfeuchte betrug 55% bei maximal 10% Abweichung und eine Raumtemperatur von 21°C. Futter und autoklaviertes Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2.6.2. Molekularbiologische Charakterisierung der Mäuse

Für die *in vitro* und *in vivo*-Versuche mit den CGD-Mäusen ist es von großer Bedeutung, dass der X-chromosomale Gendefekt homozygot vorliegt.

Dies wurde daher bereits bei der Einführung des ersten Zuchtpaares und im Rahmen dieser Arbeit für nachfolgende Zuchttiere überprüft.

Isolierung der DNA aus Vollblut

Prinzip:

Die Isolation der DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Blood & Cell Culture DNA Kit. Die gereinigte DNA ist gemäß Handbuch gut zum Screenen von transgenen Tieren geeignet. Die gewonnene genomische DNA ist 20-150 kb lang, mit einem Durchschnitt von 50-100 kb. Es wurden zunächst die Zellen und die Kerne lysiert bzw. Proteine verdaut. Das Lysat wurde über eine Anionenaustauscher-Säule geschickt, wo die DNA an das „Quiagen Anion Exchange Resin“ bindet. RNA, Proteine, Farbstoffe und niedermolekulare Verunreinigungen wurden durch Waschen entfernt. Die DNA wurde dann mit einem stark salzhaltigen Puffer eluiert und durch Isopropanolpräzipitation gefällt.

Den Elterntieren wurden ca. 50 µl Vollblut abgenommen. Die einzelnen Puffer sind in Kap. 3.1.2.3.1 erläutert. Puffer C1, Ethanol 70% und destilliertes Wasser wurden auf 4°C gekühlt; die anderen Puffer wurden zimmerwarm verwendet. Die Blutprobe wurde mit gleicher Menge eiskalten Puffer C1 und 3-facher Menge eiskaltem destillierten Wasser in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde bei 1300 x g und 4°C 15 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des

Überstandes wurde das Pellet in 0,25 ml eiskalten Puffer C1 und 0,75 ml eiskaltem dest. Wasser resuspendiert und erneut gewaschen. Danach wurde die Probe bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die weiteren Isolierungsschritte fanden unmittelbar vor der Durchführung der PCR statt. Die aufgetaute Probe wurde in 1 ml Puffer G2 resuspendiert und gründlich gevortext. Nach Hinzufügen von 25 μl Proteinase K wurde 60 min bei 50°C inkubiert. Das Quiagen Genomic Tip wurde auf 15 ml Röhren gesetzt und mit 2 ml Puffer QBT equilibriert. Das aufgetaute Probenpellet wurde 10 s stark gevortext und sofort eingefüllt. Während des Durchfließens fand die Bindung der DNA statt. Anschließend wurde die Säule 3 x mit 1 ml Puffer QC gewaschen. Danach wurde die DNA mit 1 ml warmen Puffer QF aus der Säule in ein sauberes Röhren eluiert. Mittels 1,4 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Nach dem Mischen wurde sofort bei $8000 \times g$ 15 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 1 ml kaltem 70% Ethanol kurz gevortext und erneut bei $8000 \times g$ 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen fand die Trocknung im Heizblock bei 59°C statt. Schließlich wurde die DNA in 0,1-2 ml Puffer (TE, pH 8) 1-2 h bei 55°C resuspendiert.

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Prinzip:

Die Proben wurden im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (Maximum Nucleotide) und 280 nm (Maximum Aminosäuren) gemessen.

Durchführung: Eine Probe der DNA wurde 1:50 in DEPC-Wasser verdünnt und in einer Quarzküvette mit Hilfe eines Spektrophotometers bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Die unverdünnte DNA kann bei 4°C aufbewahrt werden.

Auswertung: Die Konzentration der DNA wird vom Spektrophotometer berechnet (Angabe in $\mu\text{g/ml}$). Das Verhältnis OD 260/OD 280 ergibt den Reinheitsquotienten, der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte. Bei niedrigeren Werten kann man von einer Verunreinigung der DNA durch Proteine ausgehen.

Identifizierung der defekten Gene mit Hilfe der PCR

Prinzip:

Die „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) dient dem Nachweis bestimmter DNS-Sequenzen mit spezifischen Primern. Durch das Verfahren der Amplifikation können geringste DNS-Mengen nachgewiesen werden. Für eine PCR braucht man die Ausgangs-DNS mit der zu amplifizierenden Sequenz, zwei spezifische Oligonukleotidprimer (sense und antisense), eine thermostabile DNA-Polymerase, Ausgangsmaterial, Puffer und die vier Desoxy-Nukleotide.

Der Sense-Primer bindet sich an einen DNS-Strang, der Antisense-Primer bindet an den komplementären Strang und das dazwischenliegende Stück wird von der DNA-Polymerase amplifiziert. Bei einer PCR wiederholen sich ständig 3 Schritte: Die Trennung hybridisierter Stränge (Denaturierung) findet bei einer hohen Temperatur statt. Die Anlagerung der Primer (Annealing) an die Einzelstränge erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur, die nicht höher sein sollte als die Schmelztemperatur der Primer. Danach ermöglicht die optimale Temperatur der Taq-Polymerase die Strangverlängerung (Elongation) und zuletzt gibt eine lange Zeitspanne der Taq die Möglichkeit, ihre Arbeit zu beenden.

In dem verwendeten Mausmodell ist das X-chromosomale Gen für die gP-91 Untereinheit der NADPH-Oxidase ausgeknockt. Der allgemeine sense Primer IMR0518 amplifiziert mit dem Primer IMR0517 das Wildtypallel (240 bp) und mit dem Primer IMR0519 das disrupted allele (195 bp) (Dinauer et al. 1995).

Im Wesentlichen wurde das Genotypisierungs-Protokoll für Mäuse des Stammes *B6.129S6-Cybb^{TM1Din}* verwendet.

Die Primer wurden in TE-Puffer gelöst und als 100 µM-Stocklösung bei -20 °C eingefroren. Vor dem PCR-Versuch wurde die Stocklösung (100 µM) mit DEPC-Wasser 1:5 verdünnt.

Um Pipettierfehler möglichst gering zu halten, wurde ein **Mastermix** hergestellt. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

3,15	µl DEPC-Wasser
1,20	µl 10x PE-Puffer II
1,20	µl MgCl ₂ (25 mM)
0,96	µl dNTP (2,5 mM)
1,66	µl DNA-Färbelösung
0,03	µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

8,2 µl Mastermix

In ein spezielles Reaktionsgefäß wurden jeweils 0,6 µl Primer (20 µM; f.c. im Reaktionsansatz 1 µM) vorgelegt, dazu kamen 8,2 µl Mastermix und 2 µl DNA.

Cycler-Einstellungen:

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94°C	3min
2	94°C	30 sec
3	56°C	30 sec
4	72°C	30 sec
5	72°C	30 sec
6	4°C	

Die DNS-Pellets in den Reaktionsgefäßen wurden für zehn Minuten bei 60°C getrocknet. Im Anschluss an die PCR erfolgte die DNA-Gelelektrophorese.

DNA-Gelelektrophorese

Prinzip:

Die Gelelektrophorese dient in der Molekularbiologie dazu, Proteine oder Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Als Trägermatrix wird dabei Agarose oder Polyacrylamid verwendet. Bei DNA-Größen bis zu 1000 bp werden Polyacrylamidgele empfohlen.

Negativ geladene Phosphatgruppen sind am Aufbau des Zucker-Phosphat-Rückrats von Nukleinsäuren beteiligt. Dies ist der Grund, weshalb die DNA während einer Elektrophorese in Richtung Anode wandert und dabei nach ihrer Größe aufgetrennt wird. Dabei ist die Wandergeschwindigkeit nur von der Molekülgröße abhängig, die das Verhalten der Nukleinsäure bei unterschiedlicher Spannung und Porengröße der Trägermatrix beeinflusst.

Die Visualisierung der Banden erfolgt über Ethidiumbromid. Die planare Struktur des Moleküls erlaubt eine Interaktion mit der Nukleinsäure. Dabei entsteht eine Wechselwirkung zwischen den aromatischen Ringen des Ethidiumbromids und den heteroaromatischen Ringen der Nukleinsäurebasen. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt, und die DNA somit sichtbar gemacht werden.

Es wurden 8% Polyacrylamidgele zwischen die Platten der Minigel Twin Gelelektrophoresekammer gegossen (vgl. Kap. 3.1.2.3.2). Die auspolymerisierten Gele wurden in die dafür vorgesehenen Kammern eingespannt und mit 1x TBE-Laufpuffer überschichtet. Die Taschen wurden mit den DNA-Proben (16 µl) und dem „Molekulargewichtsmarker Nr. VIII“ (5 µl) beladen. Die Auftrennung der Nukleinsäure erfolgte bei 200 mV so lange, bis die Markerbande (Cresolrot) das Ende des Gels erreicht hatte (circa 1 h). Danach wurden die Gele 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (1 µg/ml) gebadet und dann schnellstmöglich unter UV-Licht fotografisch erfasst. Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgte mit der Software AIDA (Firma Raytest).

3.2.7. Methoden im direkten Zusammenhang mit den Tierversuchen

3.2.7.1. Monitoring der Mäuse, Blutentnahme und Bestimmung der Blutbilder, Blutzuckermessungen, Probenentnahme

Die Mäuse wurden gemäß Versuchsprotokoll gewogen und der Gesundheitszustand regelmäßig kontrolliert.

Die Blutentnahme und die Blutglucosemessung wurde, wie in Kap. 3.2.3. beschrieben, durchgeführt. Die mikroskopische Bestimmung der Differentialblutbilder wurde im Anschluss an die entsprechenden Untersuchungen des menschlichen Blutes in Kap. 3.2.2. abgehandelt.

Nach der Tötung der Mäuse wurden die gesamte Leber, Milz, beide Nieren und das Ileum als kotfreies Stück des Dünndarms aus der Bauchhöhle entnommen und entweder

in Formalin fixiert oder bis zum Wiegen in PBS auf 12-well-Platten auf Eis gekühlt. Bei einigen Versuchen wurden zusätzlich Thymus, Herz, Lunge, der Femur als Quelle für Knochenmark, sowie Gehirn entnommen. Die Anzahl und Art der entnommenen Organe sowie ihre Konservierung (Formalin oder -20°C) können den Tierversuchsprotokollen (Vgl. Anhang) entnommen werden.

3.2.7.2. Bestimmung der GO-Konzentration und des funktionellen Enzyms in Serum und Organproben

Um eine Aussage über die Verteilung der Glucose-Oxidase (GO) im Organismus treffen zu können ist es wichtig, die GO-Konzentration in den Geweben und im Serum ermitteln zu können. Außerdem stellt sich die Frage, ob das Enzym noch aktiv vorliegt und somit seinen Zweck erfüllen kann.

Dabei wurden Testsysteme für zwei verschiedene Bestimmungsverfahren verwendet.

a) Bestimmung der GO-Konzentration

Prinzip:

Die Platte wird mit dem Primärantikörper, der gegen GO gerichtet ist, „gecoatet“. Darauf kommen die Proben bzw. eine Standardverdünnungsreihe. Die probeneigene GO bzw. die GO aus dem Standard binden an die Platte und werden im nächsten Schritt von dem mit Meerrettichperoxidase (=HRP) -gekoppelten Detektionsantikörper erkannt. Im Substratpuffer ist o-Phenyldiamin (OPD) und H_2O_2 enthalten, jedoch keine Glucose. Die HRP der gebundenen Detektionsantikörper setzt das im Substratpuffer enthaltene OPD mit Hilfe des H_2O_2 um, wodurch es zu einer Gelbfärbung kommt. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt.

Die Menge des umgesetzten OPDs ist damit der gebundenen Menge an Antikörpern und somit der GO direkt proportional. Mit dem ELISA-Reader wird die Extinktion gemessen. Daraus wird anhand der aus der Standardverdünnungsreihe aufgestellten Eichkurve von dem Programm Soft Max Pro der GO-Gehalt berechnet. Da es sich um eine Konzentration handelt, ist die Einheit bei Gewebeproben μg Protein pro ml Organhomogenisat, für Blutproben μg Protein pro ml Serum oder Plasma.

96-well Maxi-Sorb-Platten wurden mit 50 μl Coating-Puffer, in dem 1 μl mab anti-GO in 5 ml gelöst sind, über Nacht bei 4°C gecoatet. Danach wurde viermal mit 200 μl Waschpuffer pro Well gewaschen und mit 200 μl Blockpuffer zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt und dann erneut viermal gewaschen. Es wurden, wenn möglich, 50 mg der tiefgefrorenen Organe abgewogen und 1:2 (m/v) mit 4°C kaltem Proteinaseinhibitorpuffer (mindestens jedoch 50 μl), versetzt und mit dem Mörser homogenisiert. Danach wurde bei 15000 x g 15 Minuten bei 10°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Probe wurde 1:50 verdünnt (107,8 μl Verdünnungspuffer und 2,2 μl Überstand).

Erstellung der **Eichkurve**: Die GO-Stammlösung (10 mg/ml) wurde 1:1000 mit PBS spezial verdünnt. Danach erfolgte die weitere Verdünnung mit Verdünnungspuffer. Als Standard 1 dienten 0,5 µg/ml, dann wurde bis Standard 7 (0,007 µg/ml) 1:2 verdünnt.

Je 50 µl Verdünnungspuffer (Leerwert), Standard bzw. Proben wurden im Doppelausatz auf die Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach erneutem Waschen wurde mit dem Detektionsantikörper, anti-GO-HRP 1:10000 in Verdünnungspuffer, jeweils 100 µl/well 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte erneutes Waschen und die Inkubation mit 50 µl/well Substratpuffer Sandwich/Ak für 15-30 min, bis zu einer deutlichen Gelbfärbung. Die Reaktion wurde mit 50 µl H₂SO₄ (1M) /well gestoppt. Die Messung erfolgte bei 490 nm gegen 650 nm im ELISA-Reader und wurde mit Soft Max Pro ausgewertet.

b) Bestimmung der funktionellen GO

Prinzip:

Die ersten Schritte ähneln denen des Sandwich-ELISAs, lediglich die Antikörpermenge beim Coaten der Platten ist deutlich höher und die Konzentration des Standards wird anders gewählt. Nach dem Auftragen der Proben und der Standardverdünnungsreihe wird mit einem Glucose- und HRP-haltigen Substratpuffer inkubiert. Die probeneigene GO bzw. die GO aus dem Standard produziert H₂O₂, mit dessen Hilfe die Meerrettichperoxidase das OPD umsetzt, es erfolgt eine Gelbfärbung. Das Abstoppen der Reaktion, die Messung und die Auswertung erfolgen wie im Sandwich-ELISA beschrieben. Die Einheit ist funktionelles Protein pro ml. Es wird dabei nur Enzym erfasst, welches in der Lage ist, Glucose umzusetzen und dabei H₂O₂ zu produzieren.

Durchführung:

96-well Maxi-Sorb-Platten wurden mit 50µl Coating-Puffer, in dem 6 µl mab anti-GO pro 5ml gelöst war, über Nacht bei 4°C gecoatet. Das Waschen, Blocken und Homogenisieren der Organe erfolgte wie beim Sandwich-ELISA beschrieben. Die Überstände wurden 1:20 verdünnt.

Erstellung der Eichkurve: Die GO-Stammlösung (10 mg/ml) wurde 1:1000 mit PBS spezial verdünnt. Danach erfolgte die weitere Verdünnung mit Verdünnungspuffer. Als Standard 1 dienten 1 µg/ml, dann wurde bis Standard 7 (0,016 µg/ml) 1:2 verdünnt.

Standard, Leerwert und Proben wurden wie im Sandwich-ELISA beschrieben aufgetragen, inkubiert und anschließend gewaschen. 50 µl/well Substratpuffer (funktionelle GO) wurden binnen 30 bis 45 min direkt von der GO aus der Probe umgesetzt. Bei deutlicher Gelbfärbung wurde, wie oben beschrieben, abgestoppt, gemessen und die Konzentration funktioneller GO berechnet.

3.2.8. Tierversuche

3.2.8.1. Langzeituntersuchung an CGD-Mäusen nach Dreifachgabe von GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (GOL) im Vergleich zu unverkapselter GO und PBS

Prinzip:

Zu beantworten war die Frage, ob es durch die Applikation der GOLs zu einer Antikörperbildung gegen GO kommt.

Theoretisch sind drei Auswirkungen denkbar:

- Die Liposomen könnten das körperfremde Enzym GO vor der Erkennung durch das Immunsystem schützen (= keine Antikörper-Bildung).
- Es könnte GO im Körper aus den Liposomen freigesetzt werden, so dass Antikörper gebildet werden (= gleichbleibende Antikörperbildung).
- Es könnte im Vergleich zu freier GO sogar zu einer verstärkten Antikörperbildung durch das längere Verweilen der GO im Organismus und eine Adjuvanswirkung der Liposomen, wie sie für DNA-Vakzinen genutzt wird (Gregoriadis et al 2002), kommen.

Um die Auswirkung von in Liposomen verkapselter GO (GOL) im Vergleich zu freier GO zu überprüfen wurde ein Tierversuch durchgeführt und die gewonnenen Seren auf Antikörper untersucht.

Es standen 8 CGD-Mäuse, davon 5 Weibchen und 3 Männchen, aus eigener Zucht zur Verfügung. Sie wurden im Alter von 11 Wochen gegen verkapselte bzw. freie Glucoseoxidase immunisiert, beziehungsweise als Negativkontrolle mit PBS spezial behandelt. Zur Herstellung der Stammlösung für die freie wie auch die verkapselte Form, wurden 5 mg des Enzyms (281 U/mg GO) in 1 ml PBS gelöst.

Die verwendeten GOL-EPC:EPG:Chol-Liposomen sind in Kap. 3.1.2.4.3. charakterisiert. Entsprechend der Verkapselungseffizienz der Liposomen wurde zur Gabe der freien GO die Stammlösung (5 mg/ml) mit PBS auf 12,7% verdünnt und sterilfiltriert. Die Aktivität einer Injektionsdosis (100 µl) lag somit bei 17,84 Units GO.

Im Verlauf des Versuches wurde das Monitoring der Mäuse wie beschrieben durchgeführt. Zwei Mäuse erhielten als Negativkontrolle lediglich PBS, jeweils 3 Mäuse erhielten GO-Lösung und GO-Liposomen.

Am Tag vor der ersten Gabe wurden Gewicht und der Blutglucosegehalt der Tiere ermittelt. Die Gewichtskontrolle erfolgte während des Versuchs täglich.

An Tag 0 wurden jeweils 100 µl PBS spezial, gelöste bzw. liposomal verkapselte Glucoseoxidase intravenös appliziert. Den Tieren wurde eine Stunde nach der Injektion Blut an der Schwanzvene entnommen, das zur Ermittlung des Blutglucosespiegels und zur Durchführung des DHR-Assays verwendet wurde. Acht Stunden nach der Injektion wurde die Blutglucose erneut kontrolliert.

An Tag 1 wurde der erste Boost durch die Applikation von jeweils 100 µl Flüssigkeit i.v. gesetzt. Das Monitoring der Blutglucose erfolgte an Tag 1 und 2 wie an Tag 0.

An Tag 2 erfolgte erneut ein i.v.-Boost. An den folgenden Tagen wurden ggf. Läsionen am Schwanz mit Wundsalbe behandelt.

An Tag 11 erfolgte die Tötung der Tiere mit Serumgewinnung, Blutglucosemessung und Organentnahme. Der GO-Gehalt und die GO-Aktivität der Organe und des Serums wurde mittels Sandwich-bzw. funktionellem GO -ELISA ermittelt (siehe 3.2.7.2.-3.)

Zur Bestimmung des Antikörpertiters im Serum wurde ein ELISA etabliert, der im folgenden Kapitel erläutert wird.

3.2.8.1.1. Bestimmung der Antikörper gegen GO im Serum

Prinzip:

Ziel der Untersuchung war es, die Antikörperbildung nach Gabe von freier GO bzw. GOL-Gabe vergleichen zu können. Ein in der Immunologie übliches Verfahren ist die Ermittlung des Antikörpertiters. Hierbei wird das Serum so lange verdünnt, bis keine Antikörper mehr nachweisbar sind. Die letzte Verdünnungsstufe, in der noch Antikörper nachzuweisen sind, stellt den Titer da. Dazu wurde ein ELISA etabliert.

Etablierung des ELISA:

Als GO-Stammlösung wurden 10 mg GO in 1 ml PBS spezial gelöst und als 10 µl-Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Zunächst wurden die Maxi-Sorb 96-well Platten mit verschiedenen GO-Konzentrationen (0,25 µl-10 µl Stammlösung auf 6 ml Puffer) in verschiedenen Puffern (Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5; PBS spezial pH 7 und Coatingpuffer pH 9,6) über Nacht mit 50 µl pro Well bei 4°C gecoatet.

Der Erfolg wurde nach 4 maligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer pro well und zweistündigem Blocken mit 200 µl Blockpuffer pro Well mit Hilfe des polyklonalen anti-GO-HRP-Antikörpers überprüft. Nach 1 h Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler folgte erneutes Waschen und die Inkubation mit 50 µl Substratpuffer pro Well für 15-30 min. Bei deutlicher Gelbfärbung wurde die Reaktion wie bereits bei dem Sandwich-ELISA (3.2.7.2) beschrieben gestoppt, gemessen und ausgewertet.

Coating:

Bei insgesamt sehr guter Bindung der GO lieferten 5 µl GO in 6 ml Citrat-Phosphatpuffer die besten Ergebnisse. Das entspricht einer Menge von 0,83 µg GO/ml bzw. 7,025 Units Enzym pro Well.

Erst- bzw. Serumantikörper:

Als Erstantikörper wurde in der Positivkontrolle mab anti-GO [Monoclonal Anti-Glucose Oxidase (mouse IgG₁ isotype) Clone GO-40 Mouse Ascites Fluid] verwendet. Mit seiner Hilfe wurde der Antikörpertiter den Serumproben zu ermittelt.

In der Titration gegen den Detektionsantikörper anti-Maus-HRP (Polyclonal Antibody to Mouse IgG F(c)-HRP, Rabbit) stellte sich eine Verdünnung des **mab anti-GO** von 1: 25 000 bis 1 600 000 in Verdünnungspuffer als gut detektierbar heraus. Die Nachweisgrenze wurde daher bei 1: 1 600 000 festgelegt.

Detektionsantikörper:

Der Detektionsantikörper **anti-Maus-HRP** wurde in Verdünnungen von 1 : 625 bis 1: 20 000 überprüft und lieferte die besten Ergebnisse in einer Konzentration von 1: 2 500. Die Inkubation mit dem Substratpuffer Sandwich/Ak und die Messung erfolgte wie oben beschrieben.

Einfluss des Mausserums auf die Messung:

Zur Überprüfung der Eignung der Methode zum Screenen von murinen Serumproben wurde zunächst mab-anti-GO (Maus) zu Seren von unbehandelten Mäusen gegeben. Bei geringen Verdünnungen wurde die Messung recht deutlich beeinflusst. Die Werte fielen niedriger aus als in Verdünnungspuffer, es kam jedoch nicht zu falsch negativen Ergebnissen. Bei stärkeren Verdünnungen wurde die Differenz zwischen in Serum bzw. Verdünnungspuffer gelöstem Antikörper geringer.

Der Grad des Serumeinflusses hing jedoch vom einzelnen Serum ab. Stärker hämolytische Seren beeinflussten die Ergebnisse bei geringen Verdünnungen etwas stärker. Bis zu einem Standard von 1: 1 600 000 mab anti-GO in Verdünnungspuffer traten selbst bei unverdünnten Serumproben keine falsch positiven Ergebnisse auf. Bei 1: 3 200 000 kam es bei einzelnen Seren zu falsch positiven Ergebnissen, daher wurde als Detektionsgrenze die Verdünnung des mab anti-GO (Maus) von 1:1 600 000 gewählt.

Aufgrund der Serumeigenschaften bot sich der Antikörpertiter als Auswertungskriterium also an. Der Wert entspricht der Verdünnungsstufe des Serums, in dem gerade noch Antikörper nachweisbar sind. Der Einfluss des Serums auf die Messung wird also minimiert.

Die Verdünnung der Proben erfolgte zunächst 1:10. Nachdem so der zu erwartende Bereich eingegrenzt war, wurde in diesem Bereich mit 1:2-Verdünnungen gearbeitet. Jede Serumprobe wurde also zunächst 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt. War

beispielsweise 1:100 das letzte positive Ergebnis, wurden 1:64 (Kontrolle, üblicher Wert), 1:128, 1:256 und 1:512 überprüft. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Titern (1:16 bis über 1:2048) hat sich dieses Vorgehen bewährt.

Durchführung des Serumtests auf Antikörper:

96-well Maxi-Sorb-Platten wurden mit 50 µl Coating-Puffer, in dem 5 µl GO in 6 ml Citrat-Phosphatpuffer gelöst sind über Nacht bei 4°C gecoatet. Danach wurde viermal mit 200 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und mit 200 µl Blockpuffer zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt und dann erneut viermal gewaschen.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde mab anti GO von 1: 25 000 bis 1:1 600 000 verdünnt. Je 50 µl Verdünnungspuffer (Leerwert), Standard bzw. Serumproben wurden im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen. Die Titration der **Serumproben** erfolgte zur Eingrenzung des Titerbereiches zunächst 1:10, und in diesem Bereich wie beschrieben 1:2.

Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach erneutem Waschen wurde mit dem **Detektionsantikörper**, anti-Maus-HRP 1:2500 in Verdünnungspuffer, jeweils 100 µl/well 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte erneutes Waschen und die Inkubation mit 50 µl/well Substratpuffer Sandwich/Ak für 15-30 min, bis zu einer deutlichen Gelbfärbung. Die Reaktion wurde mit 50 µl H₂SO₄ (1M) /well gestoppt. Die Messung erfolgte bei 490 nm gegen 650 nm im ELISA-Reader und wurde mit Soft Max Pro ausgewertet.

3.2.8. Infektionsversuche

Prinzip:

Mit Hilfe der Infektionsversuche sollte die Effektivität der Liposomen *in vivo* am Mausmodell überprüft werden. Als Infektionserreger wurden zwei bei CGD-Patienten häufig Probleme verursachende Bakterien gewählt: **1) *Staph. aureus*** wird mit 30-50% der Isolate aus Patientenproben am häufigsten nachgewiesen und verursacht verschiedene Krankheitsbilder (Wahn et al 1998). Bei dem gewählten Infektionsprotokoll steht die Peritonitis im Vordergrund. **2) *Burk. cepacia*** ist bei 13% der Bakteriämien bei CGD-Patienten die Ursache (Winkelstein et al 2000). Gegenüber den häufiger nachgewiesenen Salmonellen bietet dieser Krankheitserreger den Vorteil, dass er bei CGD-Patienten, nicht aber bei Menschen oder Mäusen mit normaler Abwehrlage zur Infektion führt.

3.2.8.1. Mikrobiologische Methoden

Anzucht der Bakterien für die Infektionsversuche

Bei -80°C gelagerte Aliquote von in Einfriermedium suspendierten Bakterien *Staphylococcus aureus* Stamm 502 A bzw. *Burkholderia cepacia* Stamm 25609 wurden aufgetaut. Jeweils 100 µl daraus wurden über Nacht bei 37°C in LB Medium kultiviert.

Davon wurden jeweils 10 µl fraktioniert ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Für *Staph. aureus* wurden zum Ausplattieren stets Blutagarplatten verwendet, für *Burk. cepacia* Mueller-Hinton-Platten. Eine so gewonnene Kolonie wurde erneut in LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde in Einfriermedium aufgenommen und aliquotiert. Die so gewonnenen Aliquots wurden für alle Versuche verwendet.

Vor dem eigentlichen Versuch wurden die Bakterien wie oben beschrieben aufgetaut und kultiviert. Von der Platte wurden 1-4 Kolonien abgenommen und in 1 ml PBS eingerieben. Die Trübung der Bakteriensuspension wurde mit dem Photometer bei 600 nm gemessen. Durch weitere Verdünnung wurde der Messwert bei *Staph. aureus* auf 0,600 eingestellt. Das entspricht etwa einer Keimzahl von 6×10^8 Kolonie bildenden Einheiten pro ml. Es erfolgte eine Verdünnung mit PBS auf 1×10^8 KbE/ml. Die Infektionsdosis betrug $0,2 \times 10^8$ KbE/ml und wurde durch intraperitoneale Injektion von 200 µl der Suspension verabreicht.

Die *Burk. cepacia*-Suspension wurde auf eine Absorption von 1,000 eingestellt, entsprechend 2×10^9 KbE/ml. Aufgrund der zu erwartenden hohen Virulenz wurde die Suspension mit PBS verdünnt. Die Infektionsdosis wurde im Verlauf der Versuche angepasst. Sie wurde durch intraperitoneale Injektion von 100 µl entsprechender Verdünnungen verabreicht.

Den Tieren ohne Infektion wurde eine entsprechende Menge steriles PBS injiziert.

Zur Berechnung der tatsächlichen Keimzahl wurde die Ausgangssuspension 1:10⁴, 1:10⁵ und 1:10⁶ verdünnt und 10 µl davon ausplattiert. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die durchschnittliche Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter und daraus die tatsächliche Infektionsdosis berechnet.

Bakterienanzucht aus Peritoneallavage, Blut und Leber

Probengewinnung:

Das Fell der mit CO₂ betäubten Mäuse wurde im Bauchbereich durch Einsprayen mit SoftaseptN vor der Blutentnahme am Auge und danach desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte mit einer Schere in der Medianen sowie in der Inguinalgegend, das Fell wurde zur Seite präpariert. Die Tötung erfolgte durch Ausbluten am Herz. Mit einer sterilen Schere und Pinzette wurde dann die Bauchhöhle eröffnet und mit Kanülen seitlich so aufgespannt, dass ca. 2 ml steriles PBS im Bauchraum Platz hatten. Aus einer vollen 5 ml Spritze mit aufgesetzter gelber Kanüle wurden ca. 1,5 ml steriles PBS in den

Bauchraum gegeben, wieder aufgesogen und in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Dieser Vorgang wurde ca. 3x wiederholt, bis die Spritze leer war. Dabei wurden die Organe vorsichtig verlagert und pathologisch-anatomisch, insbesondere im Hinblick auf Abszesse, beurteilt.

Ggf. wurden 50 mg aus dem mittig-abdominal gelegenen Lappen für die Keimzahlbestimmung steril entnommen.

Bakterienanzucht

Ziel der Bakterienanzucht war es, Parameter für den Verlauf und die Schwere der Erkrankung zu erhalten.

Die Bakterienanzucht aus der Leber wurde aufgrund der homogenen Verteilung milliärer Abszesse bei Burkholderiainfektionen durchgeführt. Dazu wurde die Leber mit sterilen Stempeln aus 1 ml Spritzen in 2 ml Eppendorfgläsern homogenisiert und 1:5, 1:100 sowie 1:10000 mit sterilem PBS verdünnt und die Ergebnisse der Anzucht auf KbE/mg Leber hochgerechnet.

Die Anzucht aus der Peritoneallavage wurde sowohl nach Staphylococcus- als auch nach Burkholderiainfektion vorgenommen.

Bei Staphylococcusversuchen wurden 2,5 ml der Peritoneallavage bei 3000 x g zentrifugiert, das Pellet in 250 µl PBS resuspendiert und 10 µl davon in 90 µl Ampuwa zwecks Freisetzung eventuell intrazellulärer Keime gegeben. Drei mal 33 µl wurden ausplattiert. Die Keimzahlangabe erfolgte dann als Mittelwert (KbE/Platte).

Weitere 10 µl der PBS-Suspension wurden über Nacht in 990 µl LB-Medium bei 37°C kultiviert und ggf. am nächsten Tag gemäß Versuchsprotokoll ausplattiert.

Bei Burkholderiaversuchen erfolgte die Anzucht direkt aus der Peritoneallavage (50 µl/Platte), sowie nach 1:100 und 1:10000-Verdünnung. Die Ergebnisse wurden auf KbE/ml hochgerechnet.

3.2.8.2. Therapie mit GO-Liposomen nach *Staphylococcus aureus*-Infektion

Für den Versuch wurden 23 CGD-Mäuse aus der eigenen Zucht verwendet, davon 11 Weibchen und 12 Männchen, alle zwischen 12 und 14 Wochen alt.

Als Negativkontrolle wurden sowohl 3 nicht infizierte unbehandelte, als auch zwei nicht infizierte behandelte (ursprünglich 3, ein Ausfall), sowie 8 (ursprünglich 9, ein Ausfall) infizierte, nicht behandelte Tiere mitgeführt. Die Todesursache der beiden Tiere konnte trotz Einsendung zur Pathologie und bakteriologischen Untersuchung bei VetMedLab nicht geklärt werden. Der eigentliche Therapieversuch fand an 9 infizierten Tieren statt.

Die Tiere wurden an Tag 0 mit 200 µl Staph.-aureus-Suspension, entsprechend einer Infektionsdosis von 2×10^7 KBE, intraperitoneal infiziert. An Tag 5 wurde 100 µl in EPC:EPG:Chol-Liposomen verkapselte GO, entsprechend 3,65 µg Lipid und 0,041 mg GO (11,52 Units) i.v. in die Schwanzvene verabreicht. Nach der GOL-Gabe wurde die Blutglucose sofort, sowie nach 60, 120, 240 und 480 Minuten gemessen. Die Beendigung des Versuches und die Tötung der Mäuse folgte an Tag 6. Mit dem gewonnenen Blut wurde die Expression von Komplementrezeptoren durchflusszytometrisch untersucht. Das Ausplattieren der Peritoneallavage zur Feststellung der KBE erfolgte sofort nach der Aufkonzentration. Serum, sowie die Organe Leber, Milz, Niere, Darm (Ileum), Thymus, Herz, Lunge, Muskel, Knochen und Gehirn, wurden bis zur Durchführung des GO-ELISAs bei -20°C gelagert.

3.2.8.3. Therapie mit GO-Liposomen nach *Burkholderia cepacia*-Infektion

Prinzip:

CGD-Patienten neigen aufgrund ihrer gestörten Abwehr zur Bakteriämien (Sepsis), also der Vermehrung von Bakterien im Blut.

Burkholderia cepacia wird nach Winkelstein et al. (2000) in 13% der Bakteriämien gefunden. Das Besondere an diesem Keim ist, dass er beim gesunden Menschen, im Gegensatz zu *Staph. aureus*, keine Infektion auslöst. Aus diesem Grund wurde für die Infektionsversuche ein deutlicher Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe erwartet. Der Verlauf der Bakteriämien lässt sich anhand von Blutkulturen überprüfen (Dinauer et al. 2001).

Allerdings mussten bei Knochenmarkstransplantationen bei CGD-Mäusen mindestens 30% Granulozyten zum oxidativen Burst fähig sein, um hohe Überlebensraten nach Infektion mit 10^3 KBE Burk. cepacia zu erreichen (Dinauer et al. 2001).

Beim Menschen hingegen gibt es klinisch unauffällige weibliche Merkmalsträger, bei denen lediglich 5% der Granulozyten NADPH-Oxidase besitzen (Winkelstein et al. 2000).

Übersicht über die Teilversuche

Die Tiere wurden an Tag 0 mit 100 μ l *Burk. cepacia*-Suspension intraperitoneal infiziert. Der verwendete Stamm 25609 wurde aus einem CGD-Patienten gewonnen, vor der Verwendung zur Sicherung der Monoklonalität jedoch zwei bis dreimal passagiert.

Insgesamt wurden 4 Teilversuche durchgeführt, wovon der zweite ein reiner Infektionsversuch war. Es wurde pro Behandlung 100 μ l in EPC:EPG:Chol-Liposomen verkapselte GO gegeben, entsprechend 3,3 μ g Lipid und 0,05 mg (14,5 Units) GO.

Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, dass die Sterilfiltration bereits vor dem Versand aus Freiburg und den Analysen stattfand, um das Risiko einer LPS-Kontamination zu minimieren. Bei der Sterilfiltration wird GO freigesetzt, weshalb die tatsächliche Einschlusseffizienz nach Voruntersuchungen ca. 30% niedriger liegt. Es wurde daher 10% Einschlusseffizienz (EE) angenommen. Die genauen Eigenschaften der Liposomen können Kap. 3.1.2.4.3. entnommen werden.

- Vorversuch 1: Therapie durch einmalige intraperitoneale Gabe von GOL eine Stunde nach Infektion mit 10^3 KBE *Burk. cepacia*, Tötung der Tiere zwei Tage nach der Infektion.
- Vorversuch 2: Titration der Infektionsdosis: Untersuchung der Pathogenität der verwendeten Bakterien anhand des Krankheitsverlaufes bei verschiedenen Infektionsdosen, Ermittlung einer für Therapieversuche geeigneten Infektionsdosis.
- Therapieversuch 1: Therapie analog zu Vorversuch 1 mit veränderter Infektionsdosis (10^5 KBE) und dem Krankheitsverlauf angepassten Tötungszeitpunkt
- Therapieversuch 2: Dreifachgabe, erste Gabe modifiziert durch Vorinkubation der GOL mit Vollblut von CGD-Spendertieren (Simulation ex-vivo- Inkubation von Eigenblut mit Liposomen)

Das Gewicht der Tiere wurde in allen Versuchen täglich kontrolliert.

Die Aufarbeitung der Organproben sowie die Bestimmung von GO-Gehalt und Aktivität (Kap. 3.2.7.2.), die Gewinnung des Serums (Kap. 3.2.3.1) und die Bestimmung des Antikörpertiters gegen GO im Serum (Kap.3.2.8.1.1.) erfolgte für die Teilversuche wie bereits beschrieben.

Vorversuch 1: Es standen 3 Männchen und 5 Weibchen im Alter von 10 Wochen zur Verfügung. Als Negativkontrolle wurde ein nicht infiziertes unbehandeltes und zwei nicht infizierte behandelte Tiere mitgeführt. Zwei Tiere wurden infiziert sowie nicht behandelt und drei Tiere infiziert sowie behandelt, wovon eines bereits nach 3 h getötet wurde.

Der Versuch erfolgte gemäß eines für den verwendeten Bakterienstamm bestehenden Protokolls der Arbeitsgruppe Mary Dinauer, Indianapolis. Dabei werden die Tiere zwei Tage nach der Infektion mit 10^3 KbE getötet.

Zur Überprüfung der Sepsis wurden 10 μ l Vollblut am zuvor desinfizierten Schwanz in 90 μ l Ampuwa aufgenommen und jeweils 33 μ l im Dreifach-Ansatz ausplattiert. Von der Peritoneallavage wurden 50 μ l unverdünnt, 50 μ l 1:100 sowie 1: 10000 verdünnt in Ampuwa ausplattiert. Der Keimnachweis in der Leber erfolgte nach Homogenisierung von ca. 50 mg Leber 1:2 in PBS, sowie in einer 1:100 und 1.1000 Verdünnung ebenfalls durch Ausplattieren. Weitere Untersuchungen sind oben beschrieben.

Vorversuch 2: Es galt nach den Ergebnissen des Vorversuches für die verwendeten, zweimal passagierten Keime die Pathogenität anhand des Krankheitsverlaufs zu ermitteln. Aufgrund der Ergebnisse wurde ein eigenes Infektionsprotokoll erarbeitet. Außerdem wurde die Organaufarbeitung im Hinblick auf den Keimnachweis optimiert. Dabei stand die Frage, ob an der Keimzahl in Leber und Peritoneallavage die Schwere der Erkrankung festgemacht werden kann, im Mittelpunkt.

Es wurden 5 Mäuse, davon 4 weibliche und eine männliche, infiziert. Die Infektionsdosis betrug 10^3 , 10^4 und bei drei Tieren 1×10^5 KbE/100 μ l. Die Tiere wurden bei deutlicher Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, nach hohen Keimzahlen in der Blutkultur des Vortages oder einem Gewichtsverlust von mehr als 20% des Ausgangsgewichtes getötet. Der Keimnachweis aus Blut und Peritoneallavage erfolgte wie oben beschrieben. Die Aufarbeitung des Leberstückes wurde etwas modifiziert. Es wurde stets ein etwa gleich großes Stück an der gleichen Stelle unmittelbar nach der Peritoneallavage entnommen. Nach der Homogenisierung 1:5 (m/v) mit PBS erfolgte eine kurze Zentrifugation. Aus dem Überstand sowie aus einer 1:100 und einer 1:1000 Verdünnung wurden je 50 μ l ausplattiert.

Therapieversuch 1: Aufgrund der Ergebnisse des reinen Infektionsversuches wurde eine Infektionsdosis von 1×10^5 KbE/100 μ l gewählt und die Tiere wie bereits im Vorversuch beschrieben behandelt und nach den oben beschriebenen Kriterien getötet.

Die Mäuse waren 10 Wochen alt, 6 weiblichen und 6 männlichen Geschlechts. Ein nicht infiziertes Tier wurde mit GOL behandelt, 5 Tiere wurden lediglich infiziert und 6 Tiere wurden infiziert und mit GOL behandelt.

Therapieversuch 2: Es wurde eine Optimierung des Therapieprotokolls angestrebt. Dazu wurde eine Dreifachgabe mit besonderer Modifizierung der ersten Gabe gewählt. Vor der ersten, intraperitonealen Liposomengabe wurden die GOLs 1:2 mit Vollblut von einem ebenfalls defizienten Spender 10 min vorinkubiert und davon 200 µl 1 h nach der Infektion intraperitoneal gegeben. Bei den folgenden Gaben wurden je 100 µl reine GOL gegeben. Die zweite Gabe erfolgte intravenös 4 h und die dritte Gabe 7 h nach der Infektion intraperitoneal. Die Tötungskriterien und die Aufarbeitung der Proben wurde beibehalten und die bereits beschriebenen Messungen durchgeführt. Soweit möglich, wurden zusätzlich von den Tieren zum Zeitpunkt der Tötung Blutaussstriche angefertigt.

3.2.9. Pharmakokinetik von GO-Anker und GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach einmaliger i.v.-Applikation in gesunde Mäuse

Prinzip:

Untersucht werden sollte die Halbwertszeit der Liposomen und ihre Verteilung im Blut und den Organen.

Für den Einsatz im Mausversuch werden Liposomenzubereitungen ausreichender Konzentration benötigt, da kaum mehr als 100 µl appliziert werden können. Eine Aufkonzentration der IgG-gekoppelten Liposomen mit Hilfe der Ultrazentrifugation war jedoch nicht möglich und der Einsatz von 2 mM Präparationen erschien nicht sinnvoll.

Bei der Sterilfiltration von kleineren Liposomen (100 nm-150 nm Durchmesser) sollte weniger GO freigesetzt werden. Allerdings ist auch eine andere Pharmakokinetik zu erwarten. Um dies zu überprüfen wurden kleine EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen, sowie die dem gleichen Herstellungsprozess wie die geplanten IgG-Liposomen unterworfenen Ankerliposomen, Mäusen intravenös gegeben. Im Idealfall sollten die Ankerliposomen die gleichen Eigenschaften haben wie die EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen. Das würde dann für die Qualität des für die Kopplung notwendigen Verfahrens sprechen.

Wenn die technologischen Schwierigkeiten bei der Herstellung von IgG-Liposomen überwunden sind, können dann ihre Eigenschaften mit denen der Ausgangsliposomen verglichen werden.

Durchführung:

Für den Versuch standen 22 CGD-Mäuse (vgl. Anhang) zur Verfügung. Allerdings konnten einige Tiere aufgrund von Injektionsschwierigkeiten nicht in die Auswertung aufgenommen werden.

Zwei Tiere erhielten als Negativkontrolle PBS, 10 Tiere GO-Anker-Liposomen und 10 Tiere GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen (vgl. Kap. 3.1.2.4.3.) gespritzt.

Die Liposomen hatten aufgrund ihrer geringen Größe (ca. 112 nm) lediglich eine

Einschlusseffizienz von 4%. Eine Dosis (100 μ l) der 40 mM Liposomen enthielt also 0,02 mg GO (5,62 Units). Leider war aufgrund von Produktionsschwierigkeiten auch die Gesamtmenge begrenzt.

Bei einigen Tieren wurden im Verlauf des Versuches Plasmaproben an der Schwanzspitze entnommen. Zu verschiedenen Zeitpunkten (vgl. Anhang) zwischen 5 min und 24 h wurden die Tiere getötet, Vollblut und Serum gewonnen und die Organe entnommen. Mit dem Vollblut wurde sofort ein DHR-Assay durchgeführt. Das Plasma, Serum und die Organe wurden auf GO-Gehalt und die Funktionalität des Enzyms untersucht.

Mit Hilfe der Plasma- und Serumwerte wurde die Eliminationsgeschwindigkeit aus dem Blut beurteilt. Der GO-Gehalt in der Leber als einem der entscheidenden Clearanceorgane für Liposomen wurde in Verhältnis zum GO-Gehalt des Serums gesetzt (Serum/Leber Quotient).

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung und Charakterisierung der Liposomen

Die Herstellung und Charakterisierung der Liposomen wurde von Herrn Gantert in Freiburg vorgenommen. Die Eigenschaften der verwendeten Liposomen sind in Material und Methoden (Kap. 3.1.2.4.) aufgeführt.

4.2. Zucht der CGD-Mäuse

Die Zucht verlief meist relativ problemlos. Als kritischer Punkt ist das Lichtprogramm aufgefallen. Das Fehlen der Dunkelheit nachts hatte die Einstellung der Reproduktion zur Folge, sie setzte nach der Korrektur wieder ein.

Große, sich gut entwickelnde Würfe ergaben frische Verpaarungen relativ junger Mäuse (ca. 6 Wochen). Die Jungen sollten etwas länger gesäugt werden als normale Mäuse (ca. 14 Tage).

Im SPF- Screening waren die Tiere stets unauffällig. Vereinzelt traten Granulome auf, ein Keimnachweis war jedoch nicht möglich. Die Tiere wurden von Versuchen ausgeschlossen.

Verschiedene, für den Ausgangsstamm C57Bl6/J typische Probleme traten bei der Zucht und insbesondere bei älteren Tieren auf. Obesitas war bei älteren Tieren in aller Regel zu beobachten und vermutlich eine Ursache des Nachlassens der Reproduktion. Hypertrophe Kardiomyopathie wurde bei einzelnen, alten, wegen schlechten Allgemeinbefindens eingeschlaferten Mäusen beobachtet.

Angeborene Mikrophtalmie und Hydrocephalus wurden bei je einem Tier beobachtet. Die Tiere wurden euthanasiert.

Haarverlust aufgrund übertriebenen Putzverhaltens trat bei erwachsenen Tieren öfters auf. Schlecht heilende Läsionen als Folge davon führten zu einigen Euthanasien bei älteren Tieren.

Einige Würfe waren abdominal kaum behaart. Das Allgemeinbefinden war ungestört und die Tiere wurden für Versuche eingesetzt, die Eltern jedoch aus der Zucht genommen. Ältere, vollkommen gesunde Tiere wurden noch zur Blutentnahme, aber nicht mehr für Tierversuche genutzt.

4.2.1. Molekularbiologische Charakterisierung der Mäuse

Ziel:

Durch diese Untersuchung soll die homozygote Defizienz der Mäuse in Bezug auf die NADPH-Oxidase sichergestellt werden. Dabei ist bei defizienten Tieren die DNA-Bande mit dem 195 bp großen disrupted allele, und bei Wildtypmäusen die Bande des Wildtypallels mit 240 bp zu erwarten.

Reinheit und Menge der aus dem Vollblut isolierten und mittels PCR amplifizierten DNA waren bei den 11 getesteten Mäusen für die Gelelektrophorese geeignet.

Auf den Acrylamidgelen waren sowohl der Längenstandard VIII, als auch die Banden der DNA getesteter Mäuse gut zu erkennen (Abb. 13). Die DNA-Banden bei den Zuchtmäusen lagen knapp oberhalb der 190 bp-Markerbande. Die Bande bei der Wildtypmaus lag etwa auf der Höhe des 242 bp-Markers.

Bei sehr breiten Banden (1, 3, 5 und 7) trat eine schwache Bande zwischen 501 und 692 bp auf. Es war keine Korrelation mit dem Geschlecht festzustellen.

Der verwendete sense Primer IMR0518 amplifiziert mit dem Primer IMR0517 das Wildtypallel mit 240 bp und mit dem Primer IMR0519 das disrupted allele mit 195 bp.

Damit bestätigten die Hauptbanden den homozygoten Knock-out-Status der Zuchtmäuse. Es gab im Gegensatz zur Positivkontrolle keinen Hinweis auf das Vorliegen intakter DNA für das Glycoprotein 91 der NADPH-Oxidase.

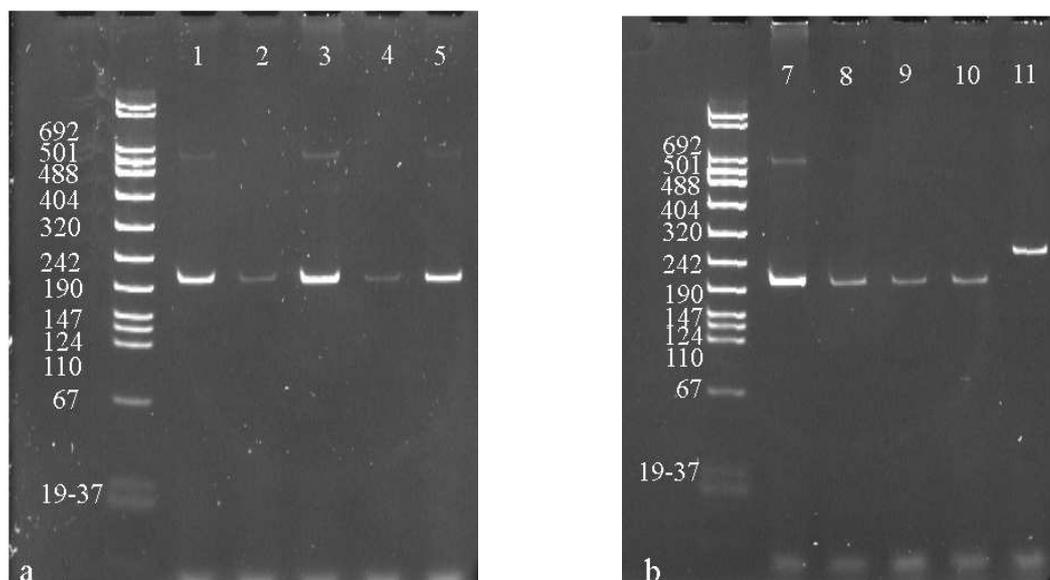


Abb. 13: Fotografie zweier Acrylamidgele mit der Kamera Diana/95 1.6 unter Verwendung des Ethidiumbromidfilters. Die Aufnahmedauer betrug 2 s. Die DNA-Proben von den Mäusen 1-5 sind auf das Gel in Abb. 13a, von den Mäusen 6-11 auf das Gel in Abb. 13b aufgetragen. Bei Maus 1-5 und 7-10 handelte es sich um *cgd*-Zuchtmäuse, davon waren 4 männlich (1, 3, 7 und 9) und fünf weiblich (2, 4, 5, 8, und 10). Maus 11 wurde als Wildtyp-Kontrolle mitgeführt.

4.3. Vergleichende Charakterisierung von humanen und murinen Blutbildern mit Hilfe der Mikroskopie und des ADVIA 120

Die CGD-Maus dient als Modell für den humanen CGD-Patienten. Daher wurde im Folgenden das Blut von Mensch und Maus verglichen.

4.3.1. Mikroskopische Bestimmung von humanen und murinen Leukozyten

Die Morphologie von Blutzellen lässt sich mittels Blutausstrich darstellen. Es wurden in dieser Arbeit Aufnahmen von typischen Ausschnitten nach Pappenheim gefärbter Blutausstriche gemacht.

Das Blut stammt von einem gesunden Menschen (Abb. 14), einer C57Bl6/J-Maus (Abb. 15) und einer CGD-Maus (Abb. 16). NADPH-defiziente Zellen sind bei dieser Färbung nicht zu erkennen.

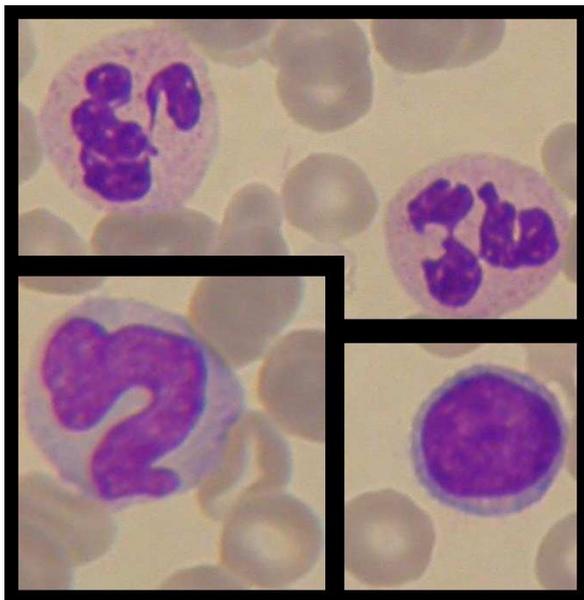


Abb. 14:
Leukozyten aus nach Pappenheim gefärbten Blutausstrichen eines Menschen bei 800-facher Vergrößerung. Dargestellt sind oben zwei segmentkernige Granulozyten, unten links ist ein Monozyt und unten rechts ein Lymphozyt zu sehen.

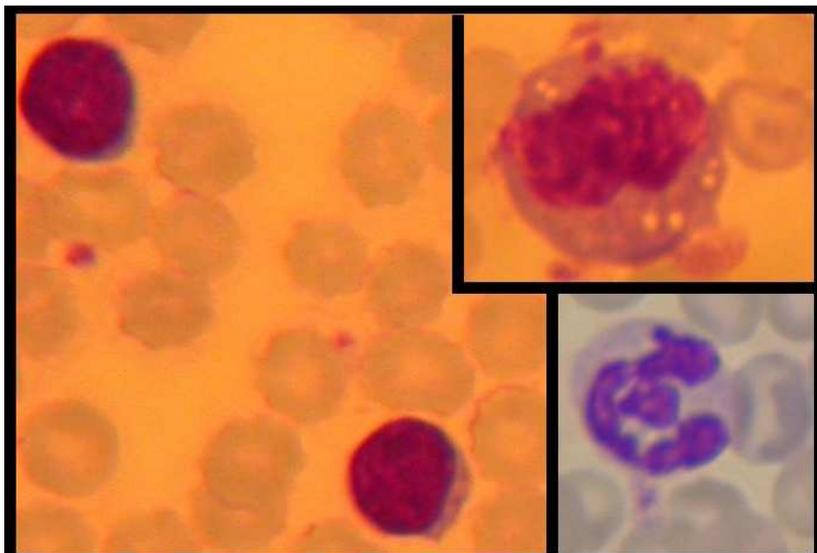


Abb. 15:
Leukozyten aus nach Papanheim gefärbten Blutaussstrichen einer C57Bl6/J-Maus bei 800-facher Vergrößerung. Dargestellt sind links zwei Lymphozyten, oben rechts ist ein Monozyt und unten rechts ein Granulozyt.

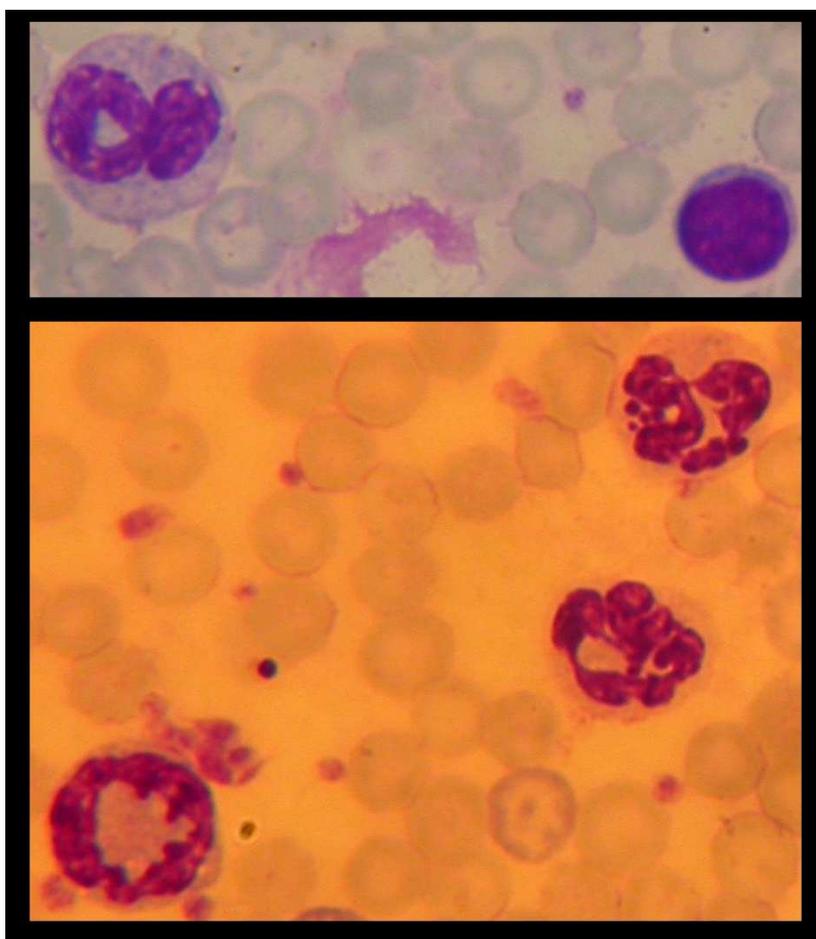


Abb. 16:
Leukozyten aus Blutaussstrichen einer CGD-Maus während *Burk. cepacia*-Sepsis. Der Blutaussstrich wurde nach Papanheim gefärbt und bei 800-facher Vergrößerung fotografiert. Oben: links ein Granulozyt mit Vakuolen, rechts unten ein Lymphozyt Unten: drei Granulozyten mit toxischer Granulation.

Beim Menschen (Abb. 14) wurde das Bild von Granulozyten dominiert, während bei Mausblut (Abb. 15-16) die Lymphozyten im Vordergrund standen. Granulozyten waren in Mausproben nur sehr vereinzelt zu finden. In größerer Zahl waren sie bei Tieren mit Sepsis zu finden. Dann waren sie meist sehr stark segmentiert oder wiesen eine deutliche Granulierung auf. Darauf soll in Kap. 5.4.3. eingegangen werden.

Eine geringe Granulozytenzahl ist für C57Bl6/J-Mäuse in der Literatur dokumentiert (Charles et al. 1975, vgl. Kap 3.2.3.2.). Da für den verwendeten Mausstamm *B6 129S6 Cybb^{tml^{dm}}* (CGD-Mäuse) im Gegensatz zum Wildtyp keine Literaturdaten über Blutbilder vorliegen, wurden drei Ausstriche von gesunden CGD-Mäusen ausgezählt, sowie fünf von mit *Burkholderia cepacia* infizierten CGD-Mäusen (Tabelle 2). Bei letzteren konnten aufgrund der in Abb. 16 beschriebenen Veränderungen Granulozyten nicht von Monozyten unterschieden werden. Die Lymphozyten waren gut zu erkennen. Aus diesem Grund wurde lediglich zwischen Lymphozyten und Phagozyten unterschieden. Bei den gesunden Tieren wurden im Mittel ca. 91% Lymphozyten, 7% neutrophile Granulozyten und je 1% eosinophile Granulozyten und Monozyten gezählt. Bei der infizierten Gruppe wurden im Mittel 13% Lymphozyten und 87% Phagozyten gezählt.

Tabelle 2: Leukozytenverteilung in Blutausstrichen von CGD-Mäusen gefärbt nach Pappenheim

CGD gp91 -/-	Lymphozyten	Granulozyten neutrophile	eosinophile	Monozyten
gesund	95	5	0	0
	94	3	0	3
	85	13	1	1
n = 3				
Mittelwert +/-SD	91,33 +/-5,51	7 +/-5,52	0,33 +/-0,58	1,33 +/-1,53
	Lymphozyten	Phagozyten		
infiziert mit <i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i>	23	77		
	9	89		
	12	88		
	15	85		
	10	90		
n = 5				
Mittelwert +/-SD	14 +/-5,63	85,8 +/-5,26		

Eine Infektion führt demnach zu massivem Ansteigen des Granulozyten- und Monozytenanteils im Blut, während die Anteile der Phagozyten im Blut gesunder Tiere sehr gering sind.

Die Unterschiede im Blutbild von Maus und Mensch wurden auch mit Hilfe des ADVIA 120 untersucht.

4.3.2. Bestimmung von humanen und murinen Blutbildern am ADVIA 120

4.3.2.1. Humanes System: Vergleich des Blutbildes eines gesunden Probanden mit dem eines CGD-Patienten

Die septische Granulomatose ist mittels ADVIA nicht zu erkennen, da wie bereits beschrieben, H_2O_2 im Gerät zugeführt wird, um 4-Chlornaphtol zu oxidieren. Das zur Oxidation benötigte Enzym Myeloperoxidase (MPO) ist im Gegensatz zur NADPH-Oxidase bei CGD-Patienten vorhanden. Daher ist zwischen dem Blutbild gesunder Spender (Abb. 5a) und des CGD-Patienten (Abb. 5b) kein prinzipieller Unterschied zu erkennen.

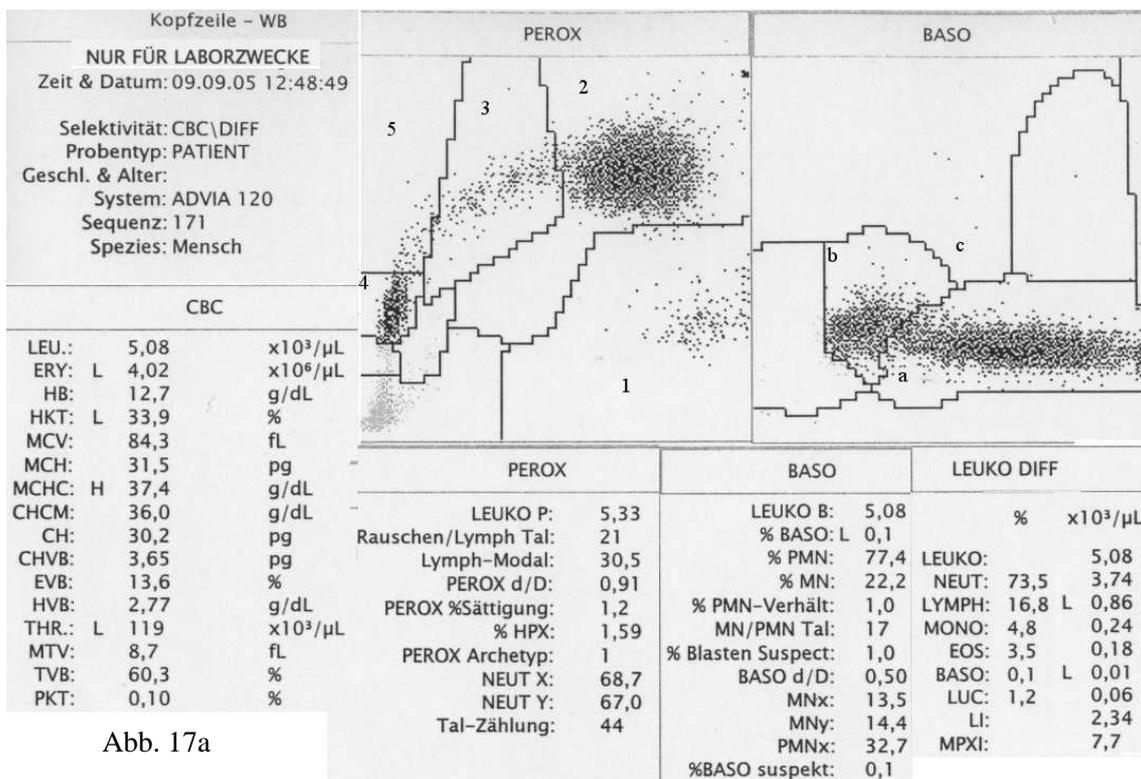


Abb. 17a

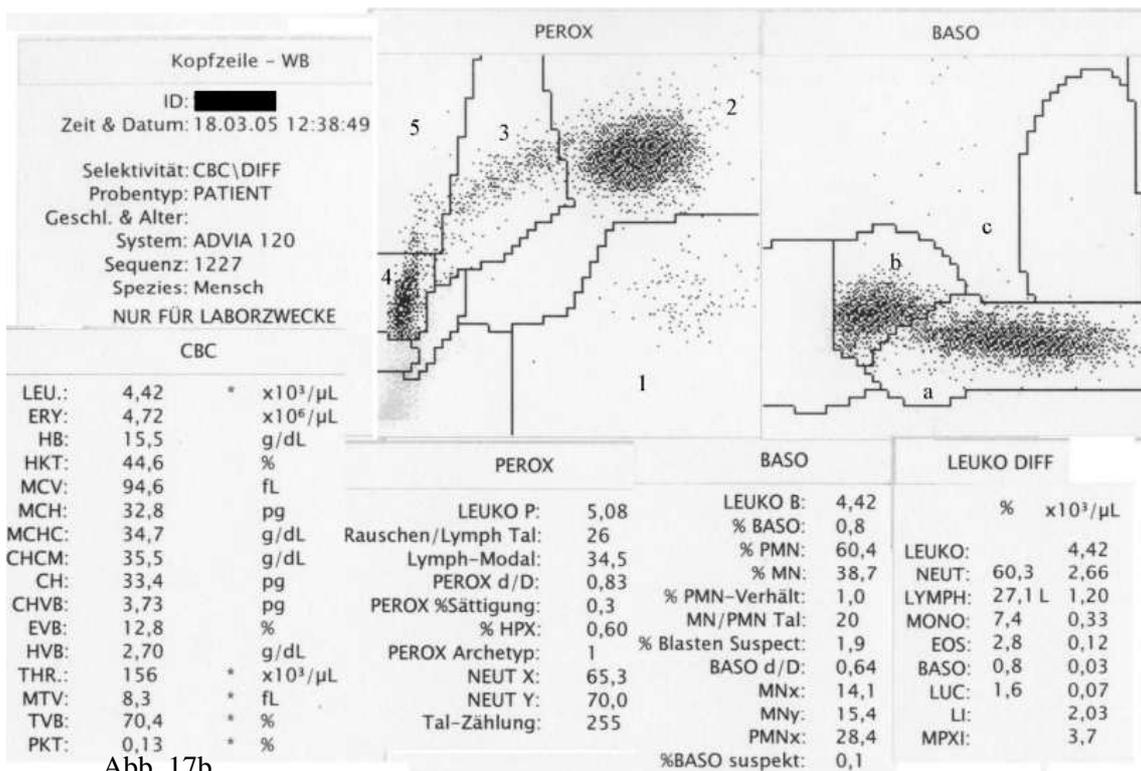


Abb. 17b

Abb. 17: ADVIA-120 Messung von humanem Blut einer gesunden Person (Abb. 17a) und einer Person mit CGD (Abb. 17b). Die „Peroxx“-Graphik zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Auf der y-Achse ist das Streuverhalten der Zellen aufgetragen:

- 1) eosinophile, 2) neutrophile Granulozyten, 3) Monozyten,
- 4) Lymphozyten und basophile Granulozyten, 5) large unstained cells (LUC)

In der „Baso“-Graphik werden basophile Granulozyten und Zellkerne der anderen Leukozyten nach Zerstörung der Plasmamembran dargestellt. Dabei wird Klein- (2-3°) gegen Großwinkel (5-15°) aufgetragen: a) polymorphkernige Zellkerne (Neutrophile und Eosinophile);

- b) runde Zellkerne (Lymphozyten und Monozyten), c) Basophile Zellen

Zellzahlen der Leukozytenpopulationen und Differentialblutbild werden korreliert.

4.3.2.2. Murines System

Wie bereits erwähnt, ist an der Kinderklinik ein ADVIA 120 mit einem humanen, nicht aber murinen Auswerteprogramm (Multi-Species-Programm) vorhanden. Da das Messprinzip in beiden Fällen das Gleiche ist, nur die Zuordnung über die verschiedenen Auswerteprogramme Unterschiede macht, wurde zur schnellen Orientierung bei den Mäuseversuchen das Blut routinemäßig am ADVIA 120 der Kinderklinik bestimmt. So konnten beispielsweise Zellsuspensionen auf eine bestimmte Gesamtleukozytenzahl pro ml eingestellt werden. In ausgewählten Fällen wurde parallel dazu Blut von der gleichen Maus zu VetMedLab nach Ludwigsburg geschickt.

4.3.2.2.1. Vergleich der Blutbild-Auswertung am ADVIA 120 von Wildtyp (C57Bl6/J) Mäusen mit humanem und murinem Auswerteprogramm

In Abbildung 18a und b sind vergleichend die Blutbilder von C57Bl6/J (Bl6)-Mäusen dargestellt, die mit dem murinen (a) und dem humanen (b) Auswerteprogramm erhalten wurden. Da es sich bei beiden Messgeräten um die gleiche Art von Bestimmung handelt, ist die Verteilung der Punktwolken grundsätzlich identisch. Allerdings ist die von der unterschiedlichen Software vorgenommene Klassifizierung der Leukozytenfelder unterschiedlich. Die richtige Zuordnung der Graphik zu den numerischen Werten ist nur über das Mausprogramm möglich. Bei Kenntnis der Lage der Zellen in der Graphik ist es allerdings möglich, aus dem am ADVIA 120 mit dem Auswerteprogramm für humanes Blut eine erste ungefähre Abschätzung der Leukozytenverteilung vorzunehmen.

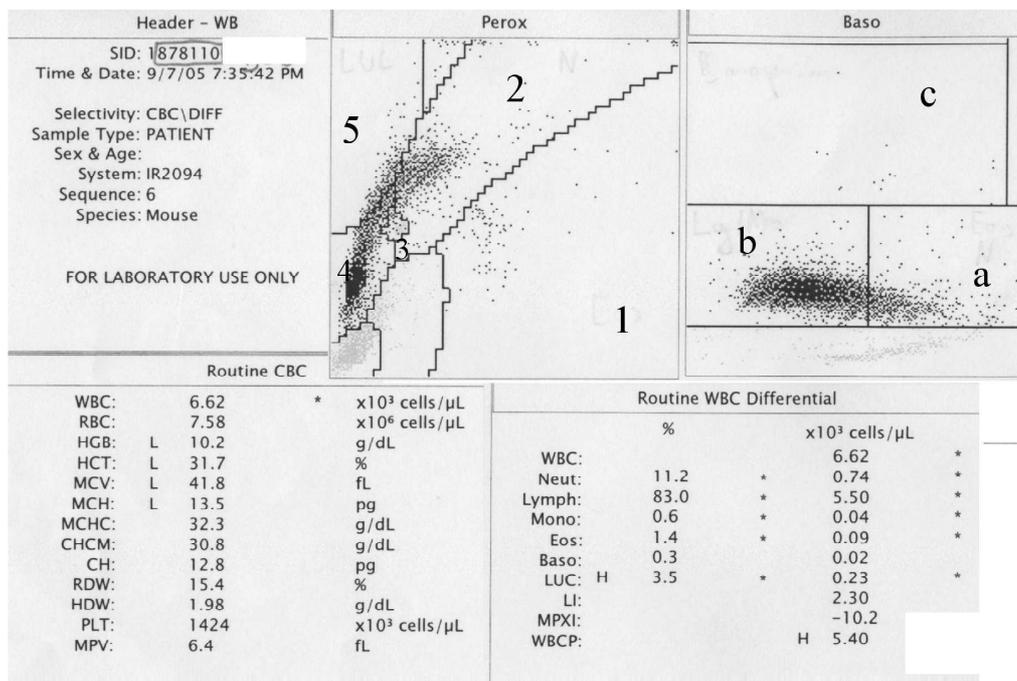


Abb. 18a

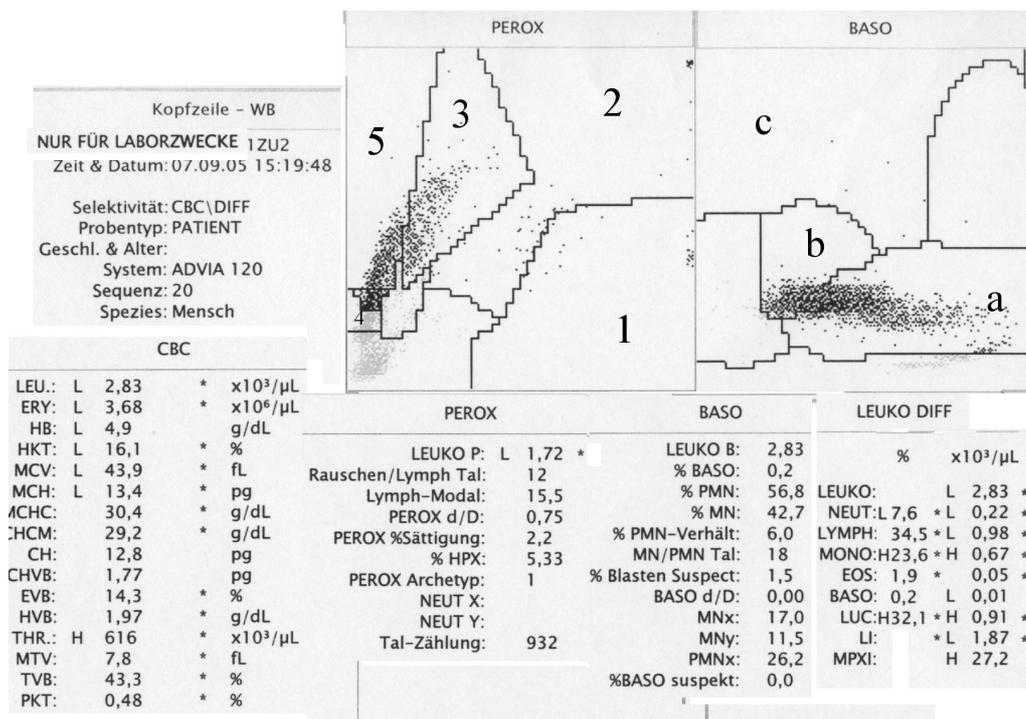


Abb. 18b

Abb. 18: ADVIA-120 Messung von Blut einer Bl6-Maus mit murinem (Abb. 18a) und mit humanem Auswerteprogramm (Abb. 18b), in b wurde 1 zu 2 verdünnt.

Die „Perox“-Graphik (1-5) zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Auf der y-Achse ist das Streuverhalten der Zellen aufgetragen:

- 1) eosinophile, 2) neutrophile Granulozyten, 3) Monozyten,
- 4) Lymphozyten und basophile Granulozyten 5) large unstained cells (LUC)

In der „Baso“-Graphik (a-c) werden die basophilen Granulozyten und die Zellkerne der anderen Leukozyten nach Zerstörung der Plasmamembran dargestellt. Dabei wird Klein- (2-3°) gegen Großwinkel (5-15°) aufgetragen: a) polymorphkernige Zellkerne (Neutro- und Eosinophile);

- b) runde Zellkerne (Lymphozyten und Monozyten), c) Basophile Zellen

Auffällig am murinen im Vergleich zum humanen Blut ist der sehr hohe Anteil an Lymphozyten (83%) und der niedrige Anteil an neutrophilen Granulozyten (11,2%), sowie die im Vergleich zu humanen Neutrophilen stark nach links verschobene Punktwolke im Perox-Kanal. Diese ist auf eine im Vergleich zum Menschen stark reduzierte Aktivität der Mäuse-Myeloperoxidase zurückzuführen.

Die murinen Granulozyten liegen in der humanen Auswertung überwiegend im Monozytenfeld. Bei der Nutzung des humanen ADVIA 120 kann daher der Monozytenwert näherungsweise zum Abschätzen der Granulozytenzahl bei Mäusen herangezogen werden.

4.3.2.2.2. Charakterisierung des Blutes von CGD-Mäusen ohne und mit Infektion mit Hilfe des murinen Auswerteprogrammes

Die CGD-Mäuse basieren auf dem Wildtyp C57BL6/J (B16). Da es in der Literatur für den relativ neu entwickelten Knock-out-Stamm keine Daten über das Blutbild gibt, wurde überprüft, ob es in der Verteilung der Blutzellen dem des Wildtypes entspricht.

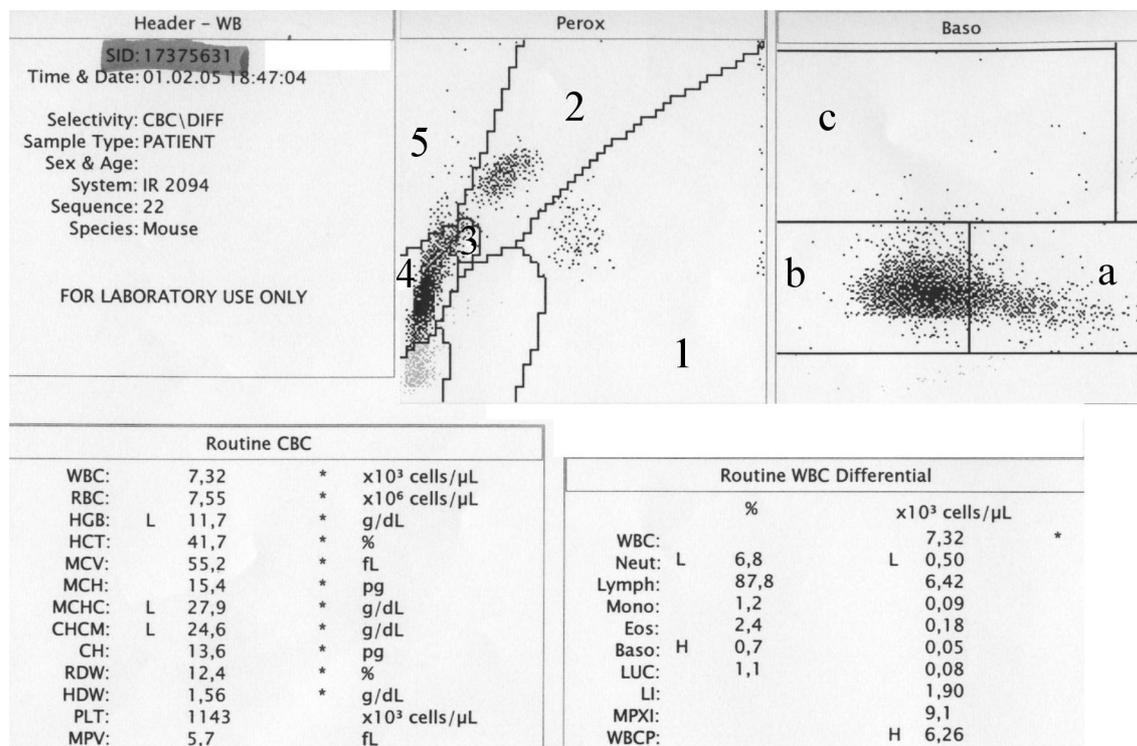


Abb. 19: ADVIA-120 Messung von Blut einer CGD-Maus. Die „Perox“-Graphik zeigt auf der x-Achse die Peroxidaseaktivität der Zellen. Auf der y-Achse ist das Streuverhalten aufgetragen: 1) eosinophile, 2) neutrophile Granulozyten, 3) Monozyten, 4) Lymphozyten und basophile Granulozyten, 5) LUC

In der „Baso“-Graphik (a-c) werden basophile Granulozyten und Zellkerne der anderen Leukozyten dargestellt. Dabei wird Klein- (2-3°) gegen Großwinkel (5-15°) aufgetragen:

- a) polymorphkernige Zellkerne (Neutro- und Eosinophile);
- b) runde Zellkerne (Lymphozyten und Monozyten), c) Basophile Zellen

Auffällig war wieder die geringe Granulozytenzahl (7%) und die hohe Lymphozytenzahl (88%). Wie auch beim Menschen wiesen weder Größe noch Lage der Leukozytenpopulationen von defizienten (Abb. 19) und gesunden (Abb. 18a) Tieren prinzipielle Unterschiede auf.

Von einer an für septische Granulomatose typischen Veränderungen leidenden Maus (Granulom an der Schnauze) wurde ebenfalls Blut untersucht. Pathologisch-histologisch waren Kokken in granulomatös verändertem Gewebe nachweisbar; die Bakteriologie blieb jedoch ergebnislos. Ein Enterokokkenproblem im Bestand war bekannt. Diese gramnegativen, normalerweise apathogenen Darmbakterien können auch bei menschlichen CGD-Patienten zu Problemen führen.

Die Granulozytenzahl bei dem erkrankten Tier (Abb. 20) [58%] war deutlich höher als bei den gesunden Tieren (Abb. 19) [7%].

Blut von im Rahmen der Tierversuche infizierten Tieren wurde aus infektionsrechtlichen Gründen nicht verschickt.

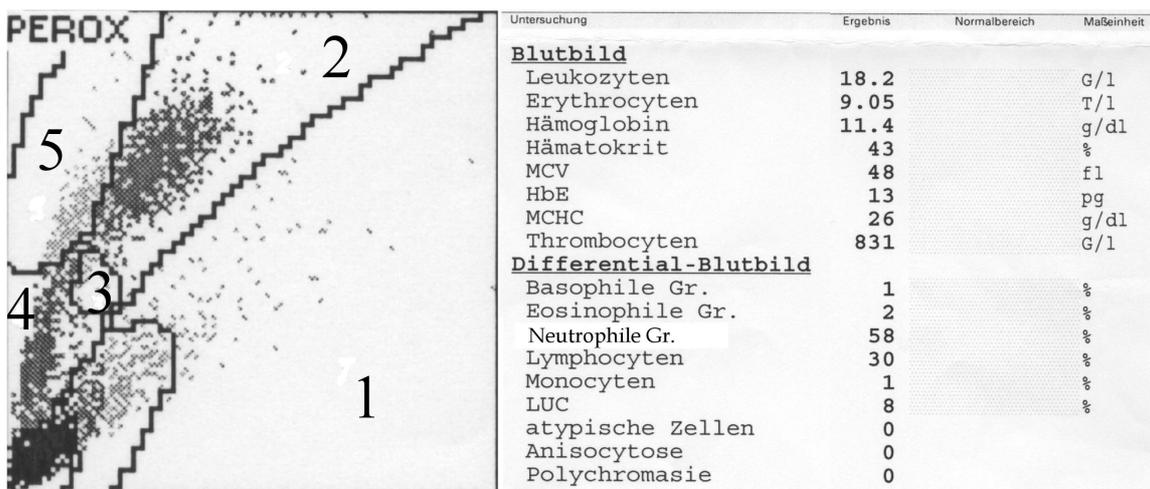


Abb. 20: ADVIA 120 Messung ausgewertet mit Multi-Species-Programm. Das Blut stammt von einer an Granulomen leidenden CGD-Maus. Die „Perox“-Graphik zeigt auf der x-Achse nach rechts ansteigend die Peroxidaseaktivität. Auf der y-Achse ist das Streuverhalten der Zellen aufgetragen:

- 1) eosinophile, 2) neutrophile Granulozyten, 3) Monozyten,
- 4) Lymphozyten und basophile Granulozyten, 5) Large unstained cells (LUCs)

4.4. Durchflusszytometrische Untersuchungen von humanen Blutzellen mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS)

4.4.1. Aufnahme von FITC- bzw. RhodaminB-PE-markierten 200 nm großen Liposomen in humane Blutzellen

Zunächst wurden Aufnahmeversuche mit humanem Vollblut bzw. isolierten PBMCs und Granulozyten in HBSS sowie mit konventionellen, großen EPC: Chol-, EPC:EPG: und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen gemacht. Diese waren entweder mit RhodaminB-PE (Rodamin) oder mit FITC gelabelt. Die Inkubation erfolgte über 30, 60 und 120 Minuten.

4.4.1.1. Methodische Optimierung der Liposomenaufnahme

Die Aufnahme der Liposomen erfolgt über Phagozytose. Diese kann man durch konstante Kühlung der Proben bei 4°C inhibieren. Deshalb wurde für die Aufnahmeversuche in Blutzellen je ein Ansatz auf Eis mitgeführt.

Bei Verwendung von FITC-Dextran-markierten Liposomen waren die Zahl der Fluoreszenz-positiven Anteile auf Eis insgesamt gering (unter 3%). Lediglich der Anteil der positiv „gegateten“ Monozyten war bei FITC-Dextran- markierten EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen höher.

Im Gegensatz dazu wurden nach Inkubation auf Eis bei Verwendung von Rhodamin-markierten Liposomen teilweise hohe Messwerte festgestellt. Daher werden im Folgenden die Optimierungsmaßnahmen nur für Rhodamin-markierte Liposomen besprochen.

Durch eine konstantere Kühlung während des Waschens, Verwendung von eisgekühltem PBS und längere Vorlaufzeit für die Kühlung der Zentrifuge wurde die Aufnahme gesenkt. Das Ziel, Negativkontrollen mit Werten unter 5%, wurde jedoch nicht erreicht. Daher wurde die Wirkung des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D untersucht. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die verwendeten Liposomen bereits über 4 Wochen bei 4°C gelagert waren.

Cytochalasin D Wirkung

Wechselwirkung mit Granulozyten:

Das Hauptaugenmerk bei den Aufnahmeversuchen galt den Granulozyten, da hier der Defekt der NADPH-Oxidase die gravierenden Folgen der Septischen Granulomatose verursacht. Der geringste Anteil positiver Granulozyten nach Inkubation auf Eis war bei Inkubation mit **EPC:Chol-Liposomen** zu verzeichnen (Abb. 21). Eine ungehemmte Probe, die dem normalen Versuchsansatz entspricht, diente als Positivkontrolle. Nach Inkubation bei 37° über eine Stunde waren 19% der Granulozyten positiv (= % gated). Allein die Phagozytosehemmung durch Kühlung senkte hier die Aufnahme von 19% auf 2%. Dieser Wert wurde auch bei Zugabe von Cytochalasin D in höheren Konzentrationen nicht mehr unterschritten. Durch Inkubation bei 37°C mit niedrigen Konzentrationen von Cytochalasin D (1-5 µM) wurde keine Hemmung erreicht.

25 µM Cytochalasin D senkte den Anteil positiver Zellen auf 10%.

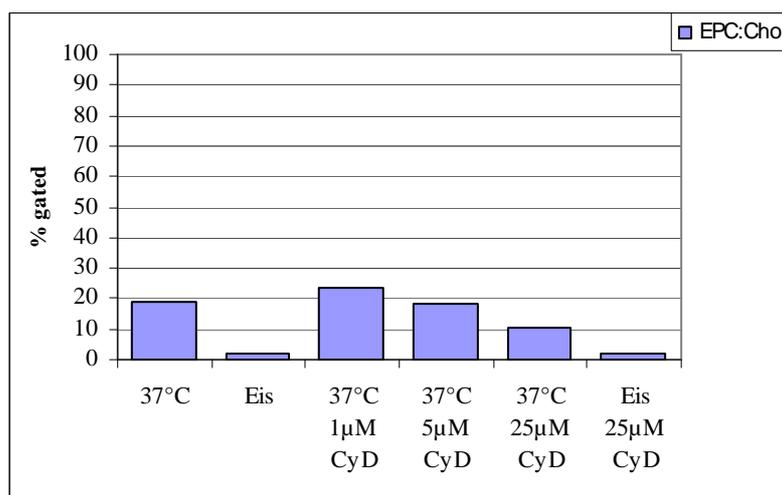


Abb. 21:
Anteil positiver Zellen am Granulozytengate nach einstündiger Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-Liposomen bei 37° oder auf Eis mit und ohne Cytochalasin D (CyD), n=1

Bei Inkubation mit **EPC:EPG:Chol-Liposomen** war die Senkung des Anteils positiver Granulozyten bei Inkubation auf Eis zwar deutlich, jedoch als Negativkontrolle ungeeignet (Abb. 22). Cytochalasin D bei 37°C führte nur zu einer leichten, im verwendeten Bereich (1-25 µM) konzentrationsunabhängigen Senkung des positiven Anteils.

Sehr deutlich sank der Anteil positiver Zellen bei Inkubation auf Eis in Gegenwart von 25 µM Cytochalasin D. Er lag mit unter 4% in einem für Negativkontrollen akzeptablen Bereich.

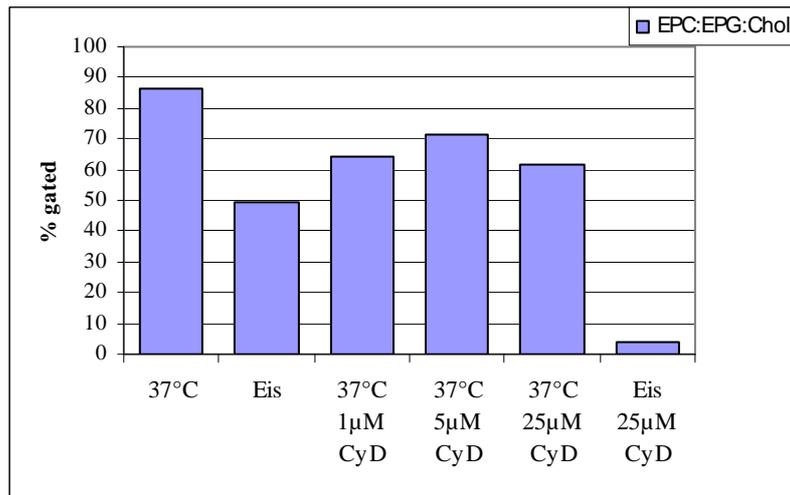


Abb. 22:

Anteil positiver Zellen am Granulozytengate nach einstündiger Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin markierten EPC:EPG:Chol-Liposomen bei 37°C oder auf Eis mit und ohne Cytochalasin D (CyD), n = 1

Bei Inkubation mit **EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen** wurde festgestellt, dass die ungehemmte Aufnahme ebenso hoch wie bei den EPC:EPG:Chol-Liposomen war (Abb. 23). Eine Reduzierung des positiven Anteils durch reine Eiskühlung war nicht feststellbar.

Mit Cytochalasin D (1-25 µM) bei 37°C wurde die Anzahl der positiven Granulozyten um ca. 40% reduziert. Dies war bereits bei der niedrigen Cytochalasin D-Konzentration von 1 µM zu beobachten. Der Effekt nahm allerdings bei den höheren Konzentrationen kaum zu. Mit Cytochalasin D auf Eis konnte eine Abnahme der positiven Granulozyten um 81% erreicht werden.

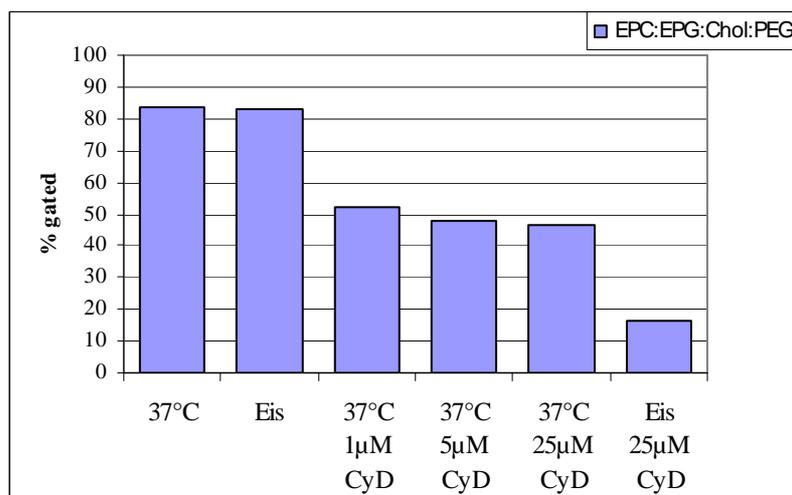


Abb. 23:

Anteil positiver Zellen am Granulozytengate nach einstündiger Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin markierten EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei 37° oder auf Eis mit und ohne Cytochalasin D (CyD), n = 1

Wechselwirkung mit Monozyten:

Abb. 24 zeigt in analoger Weise die Hemmung der Aufnahme von mit Rhodamin markierten konventionellen Liposomen bei Monozyten.

EPC:Chol-Liposomen reagieren mit Monozyten ähnlich wie mit Granulozyten. Bei den **EPC:EPG:Chol-** und **EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen** konnte in keinem Fall eine deutliche Senkung der Anzahl der positiven Monozyten erreicht werden.

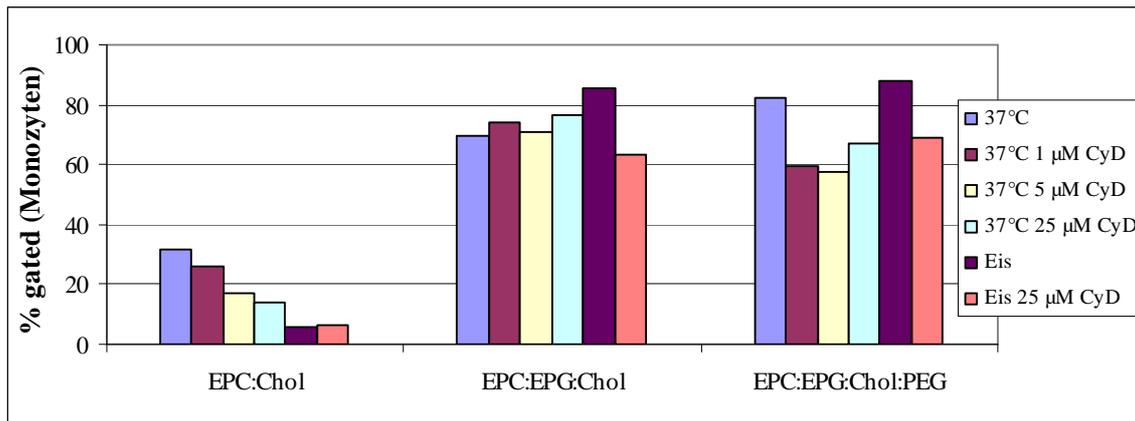


Abb. 24: Anteil positiver Zellen am Monozytengate nach einstündiger Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-, EPC:EPG:CHOL- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei 37° oder auf Eis mit und ohne Cytochalasin D, n = 1.

Wechselwirkung mit Lymphozyten:

In Abb. 25 ist die Hemmung der Aufnahme bzw. Anlagerung von mit Rhodamin-markierten EPC-, EPG-, und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei Lymphozyten dargestellt. Bei **EPC:Chol-Liposomen** kommt es auf Eis mit und ohne Cytochalasin D zu einer deutlichen Abnahme des positiven Anteils, bei den **EPC:EPG:Chol-** und **EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen** ist die Anzahl der positiven Zellen in den gehemmten Proben mindestens so hoch wie in dem Ansatz ohne Hemmung.

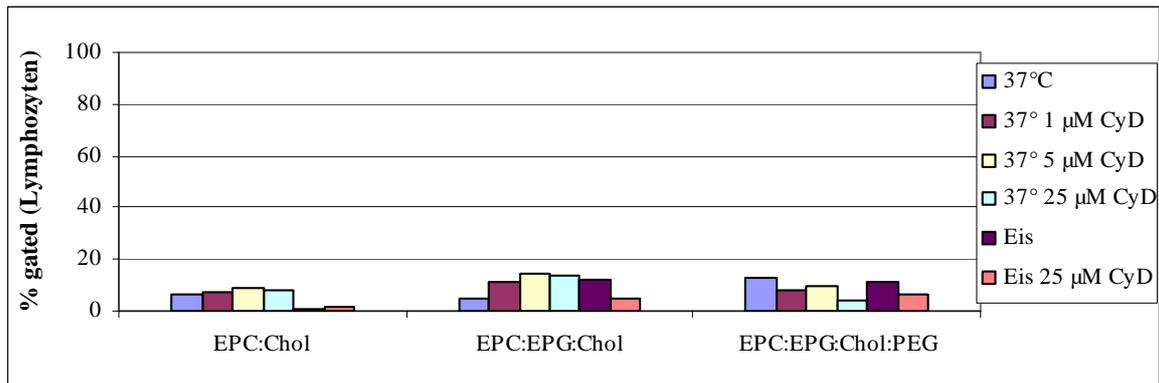


Abb. 25: Anteil positiver Zellen am Lymphozytengate nach einstündiger Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei 37° oder auf Eis mit und ohne Cytochalasin D, n = 1.

Nachdem somit auch die Kombination von Inkubation auf Eis und Cytochalasin D das Problem hoher positiver Zellpopulationen nicht vollständig behob, wurde der gesamte Versuchsaufbau noch einmal hinterfragt. Es ist bekannt, dass sich bei Eiskühlung Liposomen an Zellen anlagern und bei darauf folgender Erwärmung sehr rasch aufgenommen werden (Higashi et al. 1995).

Als kritische Punkte fielen zeitweilige Temperaturanstiege in der Zentrifuge sowie das Vortexen nach dem Zentrifugieren und Abkippen des Überstandes auf. Da diese Arbeitsschritte zeitlich hinter Inkubation und Erythrozytenlyse liegen, wurden die Zellen in einem verbesserten Versuchsansatz bereits beim Lysieren durch formalinhaltigen FACSlysepuffer fixiert. Durch diese Maßnahme wurde erreicht, dass der Anteil der positiven Zellen nach Inkubation mit EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen auf Eis (Negativkontrolle) auf unter 5% gesenkt werden konnte. Dieser Wert wurde auch in Abwesenheit von Cytochalasin D erreicht.

4.4.1.2. Aufnahme der Liposomen in Abhängigkeit von Markierungsgrad und Inkubationsdauer

Rhodamin-PE-markierte Liposomen wurden bereits in vorhergehenden Arbeiten (Kimpfner et al. 2003, Gerber et al 1999) eingesetzt. Da in der Literatur für hohe Rhodaminkonzentrationen Membranübergänge beschrieben sind (Scherphof und Crommelin, 1996), sollte eine möglichst niedrige Konzentration bei guter Erkennbarkeit der Effekte gefunden werden.

Es wurden die Rhodamin-PE Konzentrationen 0,1 mol%, 0,5 mol% sowie 2,5 mol% eingesetzt und die verschiedenen Liposomenpräparationen über einen Zeitraum von 30, 60 bzw. 120 min bei 37°C in Vollblut inkubiert.

Wechselwirkung von Granulozyten mit Rhodamin-markierten Liposomen

Die Aufnahmen zwischen den verschiedenen Spendern zeigten große numerische Unterschiede, die Tendenzen innerhalb eines Versuches waren jedoch immer gleich. Das ist in Abb. 26 exemplarisch für Granulozyten und 0,5mol%ige Rhodamin Markierung gezeigt. Im Folgenden werden dann immer die Mittelwerte verschiedener Spender mit Standardabweichung dargestellt.

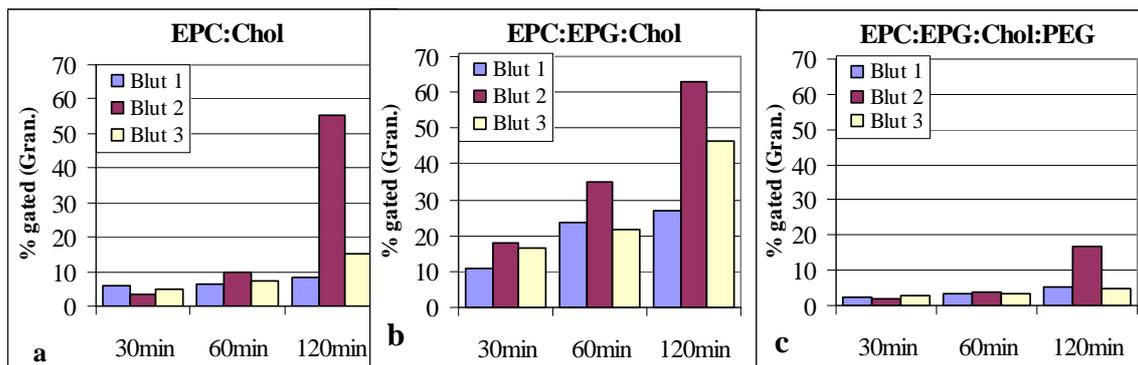


Abb. 26: Anteil positiver Zellen am Granulozytengate nach 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-(a), EPC:EPG:CHOL-(b) und EPC:EPG:Chol:PEG-(c) Liposomen bei 37°C. Es standen 3 verschiedene Spender zur Verfügung.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Anteil der positiven Granulozyten mit der Zeit zunimmt. Die auch als Stealth-Liposomen bekannten EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen (Abb. 26c) wurden am wenigsten aufgenommen. Etwas stärker aufgenommen wurden die neutralen EPC:Chol-Liposomen (Abb. 26a) und mit Abstand am besten die negativ geladenen EPC:EPG:Chol-Liposomen (Abb. 26b). Letztere wiesen bei 2,5mol% und 2mM Liposomenkonzentration (Daten nicht gezeigt) bei sehr hohen Absolutwerten keine Zeitabhängigkeit mehr auf.

Bei der **0,1 mol% Rhodamin** Markierung (Abb. 27a) sind die positiven Anteile an den Granulozyten insgesamt sehr gering (unter 10%) und Unterschiede daher schwer zu beurteilen.

Bei der **0,5 mol% Rhodamin** Markierung (Abb. 27b) sind deutliche Unterschiede sowohl in Bezug auf die Inkubationszeiten als auch auf die Liposomentypen zu erkennen.

Bei **2,5 mol% Rhodamin** (27c) sind die Werte insgesamt deutlich höher als bei 0,1 bzw. 0,5 mol%.

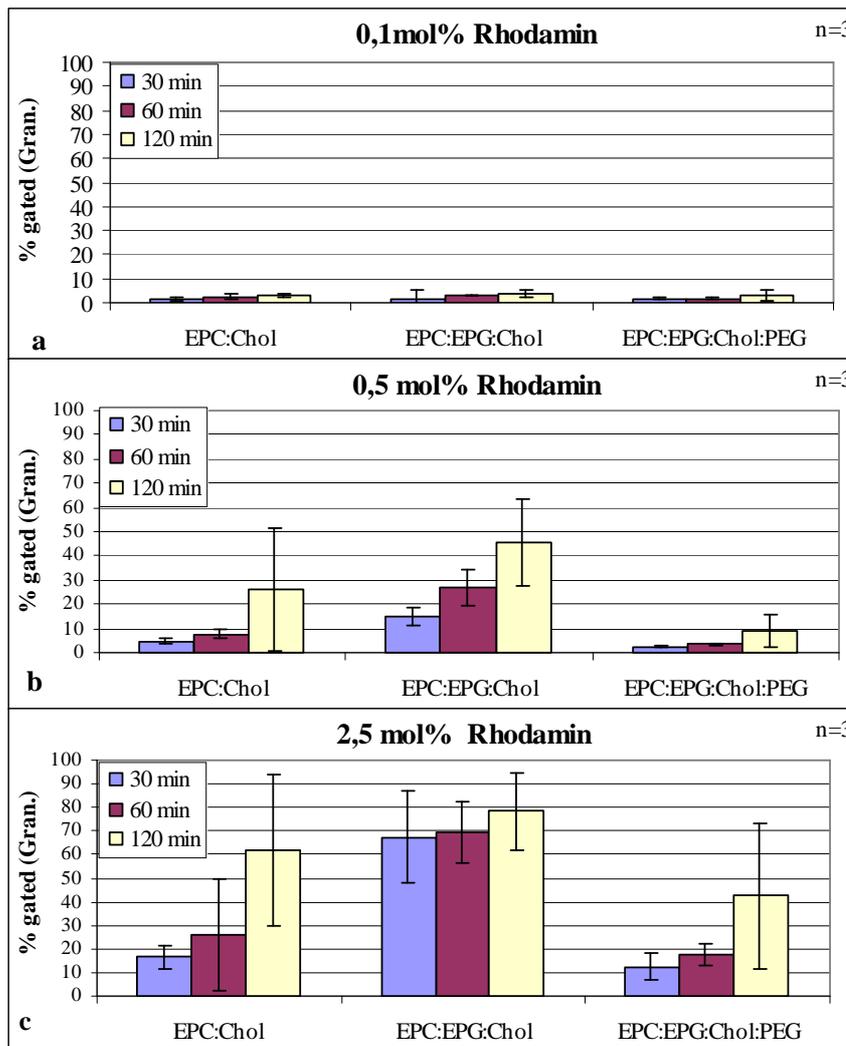


Abb. 27: Anteil positiver Zellen am Granulozytengate nach 30, 60 und 120 min Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,1 mol% (a), 0,5 mol% (b) und 2,5 mol% (c) Rhodamin-markierten EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei 37°C; n = 3, MW ± SD (verschiedene Spender)

Bei Verwendung von 2 mM Liposomenkonzentration waren die Werte etwas höher als bei der 1 mM Konzentration (Daten nicht gezeigt).

Die EPC:EPG:Chol-Liposomen werden am besten, die EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen am schlechtesten von den Granulozyten aufgenommen.

Wechselwirkung von Monozyten mit Rhodamin-markierten Liposomen

Die Aufnahme der markierten Liposomen in Monozyten unterschied sich deutlich von der Aufnahme in Granulozyten (Abb. 28).

Der positive Anteil bei den Monozyten liegt bei Rhodamin 0,1 mol% mit bis zu knapp über 20% etwas über dem der Granulozyten. Er ist wiederum deutlich geringer als bei den höheren Rhodaminkonzentrationen. Auffällig ist, dass die EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen mit Monozyten höhere Werte ergeben als mit Granulozyten.

Diese Tendenz ist bei 0,5 mol%-Markierung weit deutlicher zu erkennen. Hierbei liegen die positiven Anteile in ähnlichen Bereichen wie bei den Granulozyten.

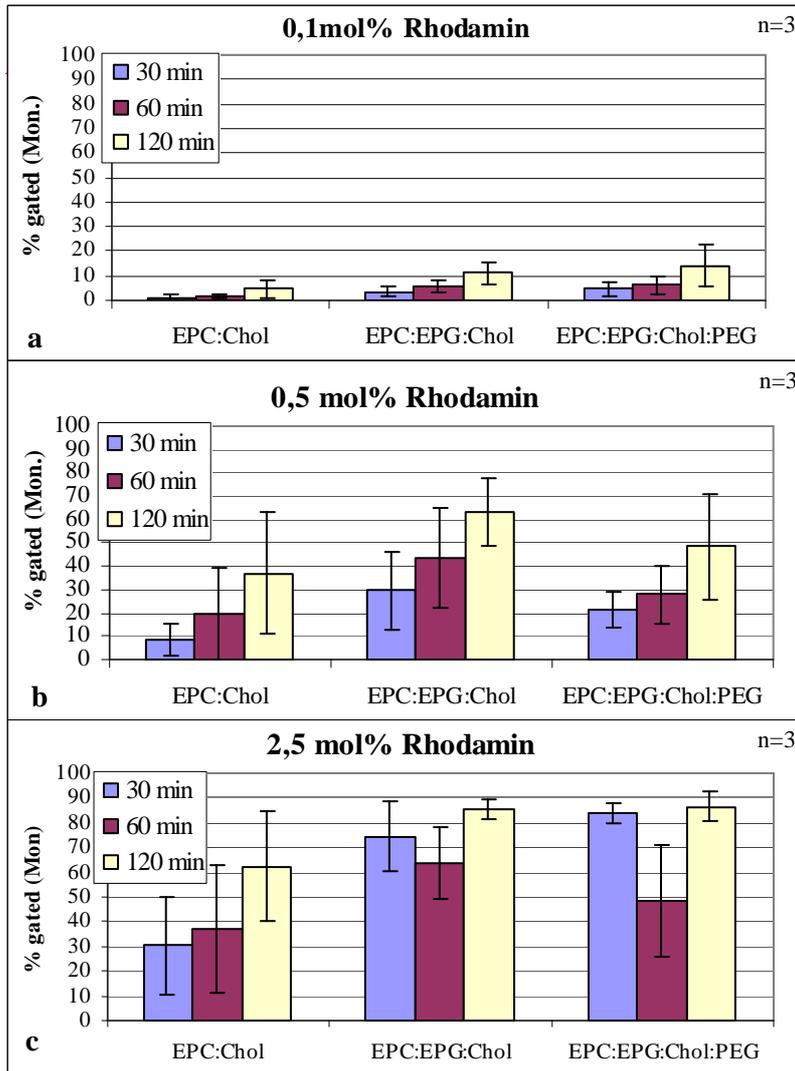


Abb. 28:

Anteil positiver Zellen am Monozytengate nach 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von Vollblut bei 37°C mit 1 mM 0,1 mol% (a), 0,5 mol% (b) und 2,5 mol% (c) Rhodamin-markierten EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei 37°C; n = 3, MW ± SD (verschiedene Spender)

Wechselwirkung von Lymphozyten mit Rhodamin-markierten Liposomen

Die Aufnahme aller Präparationen in Lymphozyten war gering, wie aus Abb. 29 zu ersehen ist.

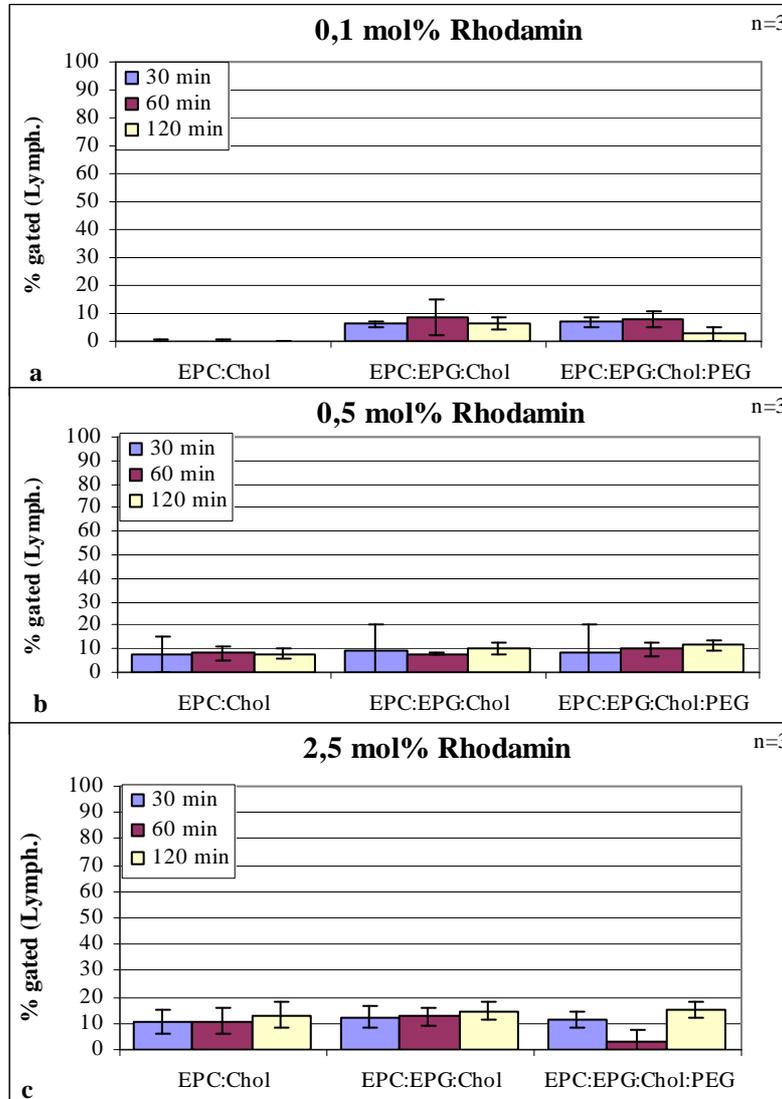


Abb. 29:

Anteil positiver Zellen am Lymphozytengate nach 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von Vollblut bei 37°C mit 1 mM 0,1 mol% (a), 0,5 mol% (b) und 2,5 mol% (c) Rhodamin-markierten EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen bei 37°C; n = 3, MW ± SD (verschiedene Spender)

4.4.1.3. Vergleich von Rhodamin-markierten Liposomen und FITC-Dextran-markierten Liposomen

In Abb. 30 sind vergleichend die Aufnahmen von Rhodamin- und FITC-Dextran-markierten Liposomen bei Inkubationszeiten von 30 min, 1h und 2h in die verschiedenen Leukozytenpopulationen im Vollblut gezeigt. Als Vergleichssystem wurde die 0,5 mol%ige Rhodaminkonzentration gewählt.

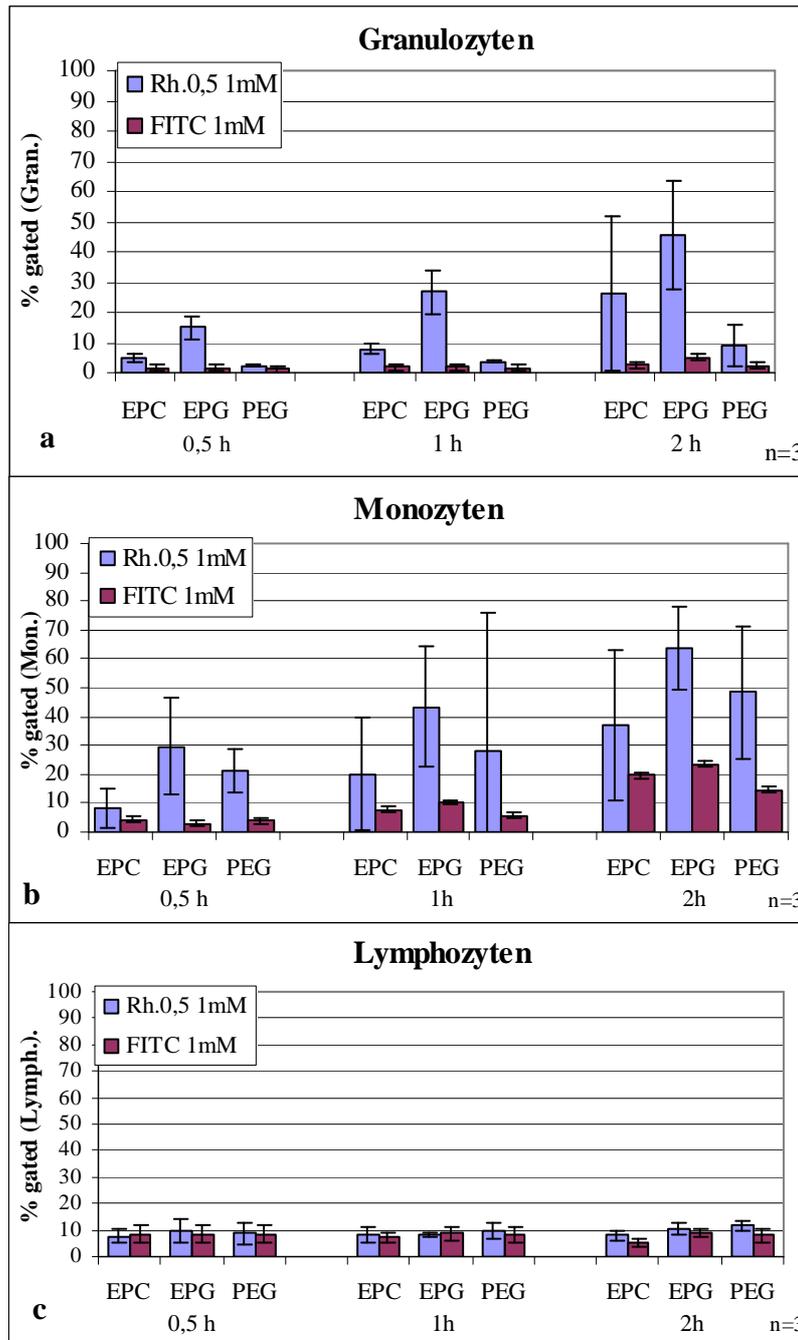


Abb. 30: Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate nach 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von Vollblut bei 37° C mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin- im Vergleich zu mit FITC-Dextran-markierten EPC:Chol- (EPC), EPC:EPG:Chol- (EPG) und EPC:EPG:-Chol:PEG (PEG)-Liposomen, n=3, MW ± SD, verschiedene Spender

a) Granulozyten
b) Monozyten
c) Lymphozyten

Die rhodamingelabelten Liposomen haben in Granulozyten und Monozyten einen deutlichen Anteil positiver Zellen hervorgerufen. Bei den Lymphozyten waren lediglich rund 10% positiv. Die Liposomen mit verkapseltem FITC-Dextran haben nur bei den Lymphozyten ein dem Rhodamin vergleichbares Signal ausgelöst, bei den Monozyten waren positive Zellen zu messen, jedoch um ein vielfaches weniger als beim Rhodaminlabel. Bei den Granulozyten kam es bei FITC- Markierung zu keinen positiven Zellen.

4.4.1.4. Aufnahme markierter Liposomen in isolierte Blutzellen im Vergleich zur Aufnahme in Vollblutproben

Bisher wurde ausschließlich mit Vollblutproben gearbeitet. In diesem Versuchsblock wurde untersucht, wie gut markierte Liposomen von isolierten Blutzellen aufgenommen werden. Hierzu wurde zunächst ein Versuch mit mittels Histopaque isolierten Granulozyten sowie PBMC (FACS: gated in Monozyten und Lymphozyten) in PBS durchgeführt (Abb. 31a). Dabei konnten nach Inkubation mit liposomal verkapseltem FITC-Dextran weder bei den Granulozyten noch bei den Lymphozyten nennenswerte positive Zellpopulationen nachgewiesen werden. Auffällig ist die hohe Anzahl positiver Monozyten (über 50%), sowohl bei Verwendung von Rhodamin- als auch bei Verwendung von FITC-Dextran gelabelten Liposomen.

Vergleichend sind die entsprechenden Vollblutinkubationen der vorherigen Versuche dargestellt (n=3, Abb. 31b).

Große, mit Rhodamin gelabelte EPC:Chol-, EPC:EPG:Chol- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen werden gut in isolierte Granulozyten und Monozyten aufgenommen. Ebenso entspricht bei Lymphozyten das Bild bei isolierten Zellen etwa dem von Vollblut. Auffällig sind die hohen Werte für FITC-markierte Liposomen nach Inkubation mit isolierten Monozyten.

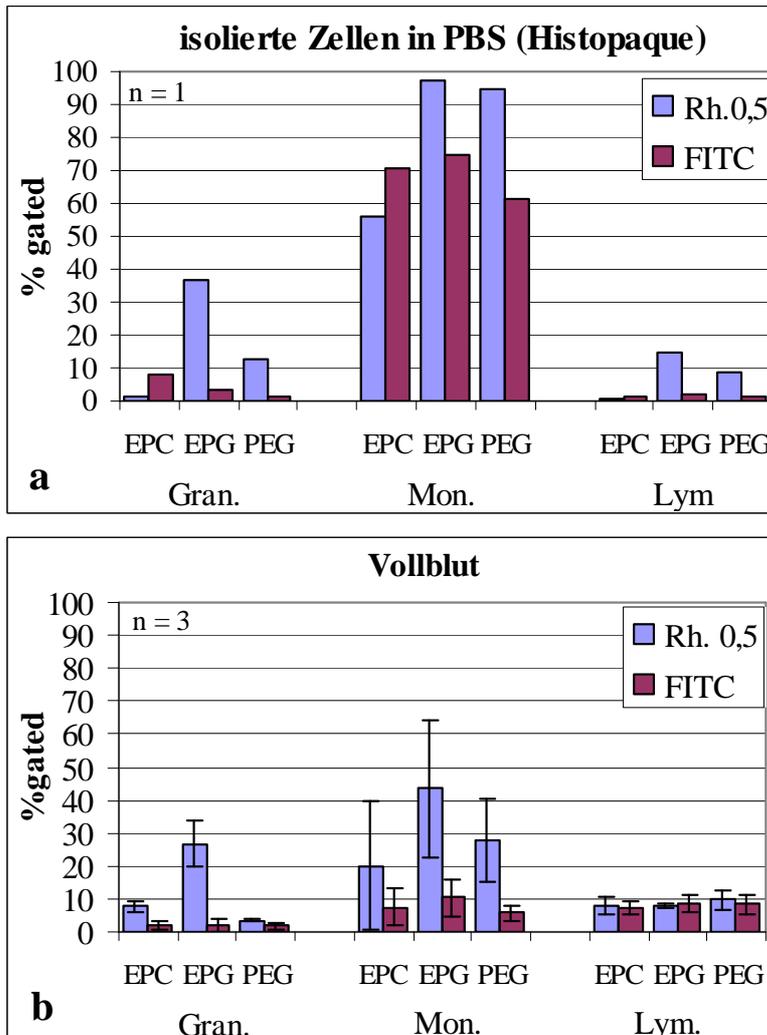


Abb. 31:

Aufnahme von FITC-Dextran- und 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC: Chol- (EPC), EPC:EPG:Chol (EPG)- und EPC:EPG:Chol:PEG- (PEG) Liposomen durch isolierte Granulozyten und PBMC [(a) n=1] bzw. Vollblut [(b) n= 3)]. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und 60 min mit 1 mM f. c. Liposomen bei 37° C inkubiert. Die PBMC wurden durch Gates in Monozyten und Lymphozyten unterteilt.

Anmerkung zu a: Die Liposomen waren zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich über einen Monat bei 4°C gelagert.

4.4.1.5. Aufnahme von Rhodamin-markierten 200 nm großen Liposomen in Leukozyten eines CGD-Patienten

Abb. 32-34 zeigen die Aufnahme der verschiedenen Liposomenpräparationen in Granulozyten (Abb. 32), Monozyten (Abb. 33) und Lymphozyten (Abb. 34) eines Patienten mit CGD. Vollblut wurde mit 0,1 mol%, 0,5 mol% und 2,5 mol% Rhodamin-markierten Liposomen über 30, 60 und 120 min inkubiert. In Abb. 34 werden diese Messwerte mit denen von gesunden Probanden verglichen.

Granulozyten:

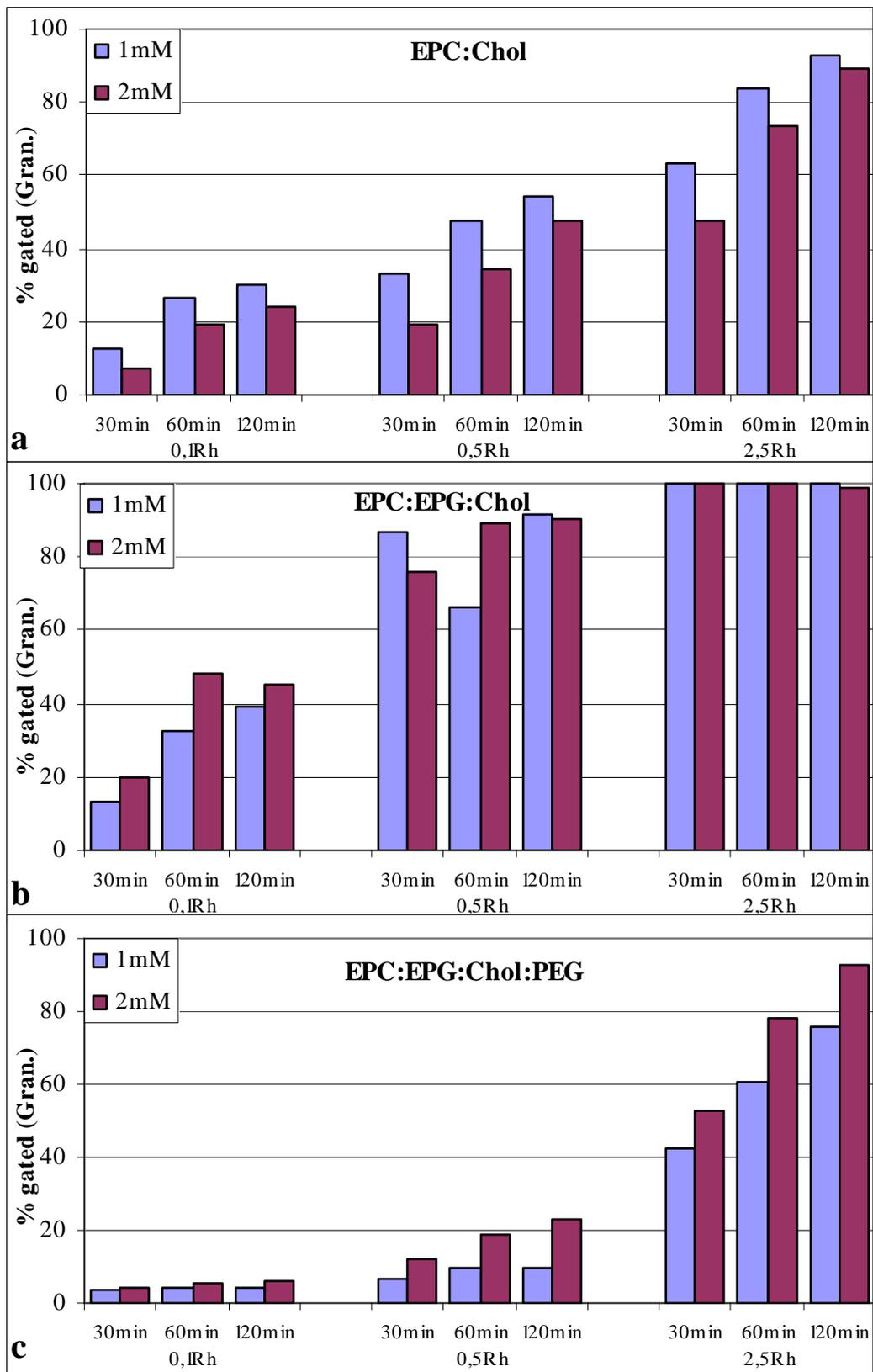


Abb. 32: Anteil positiver Zellen am Granulozytengate nach 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von Vollblut eines CGD-Patienten mit 1 mM oder 2 mM 0,1 mol%, 0,5 mol% oder 2,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol- (a), EPC:EPG:Chol- (b) und EPC:EPG:Chol:PEG- (c) Liposomen bei 37°C, n = 1

Monozyten:

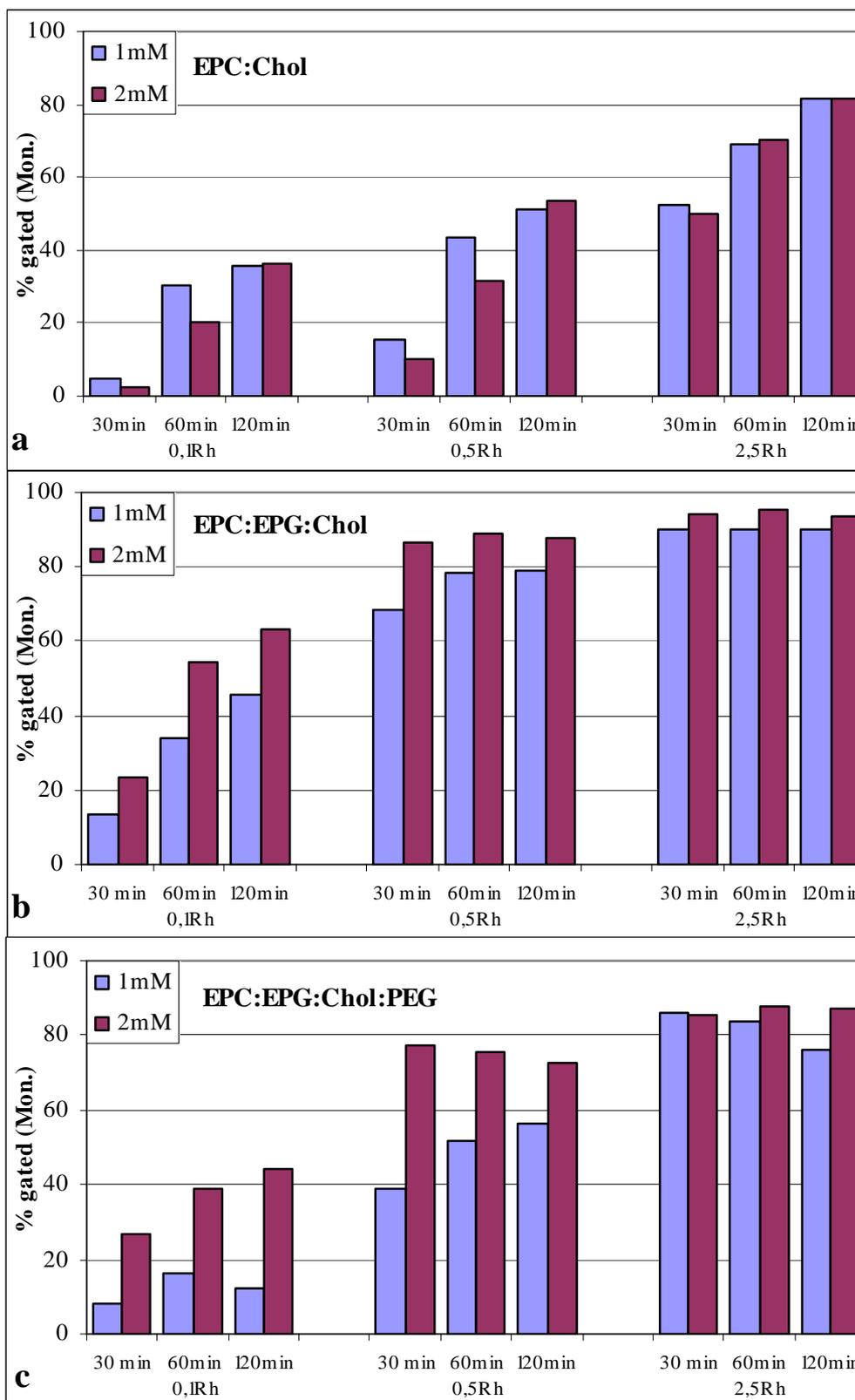


Abb. 33: Anteil positiver Zellen am Monozytengate bei 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von Vollblut eines CGD-Patienten mit 1 mM oder 2 mM 0,1 mol%, 0,5 mol% oder 2,5 mol% Rhodamin- markierten EPC:Chol- (a), EPC:EPG:Chol-(b) und EPC:EPG:Chol:PEG (c)- Liposomen bei 37°C, n=1

Lymphozyten:

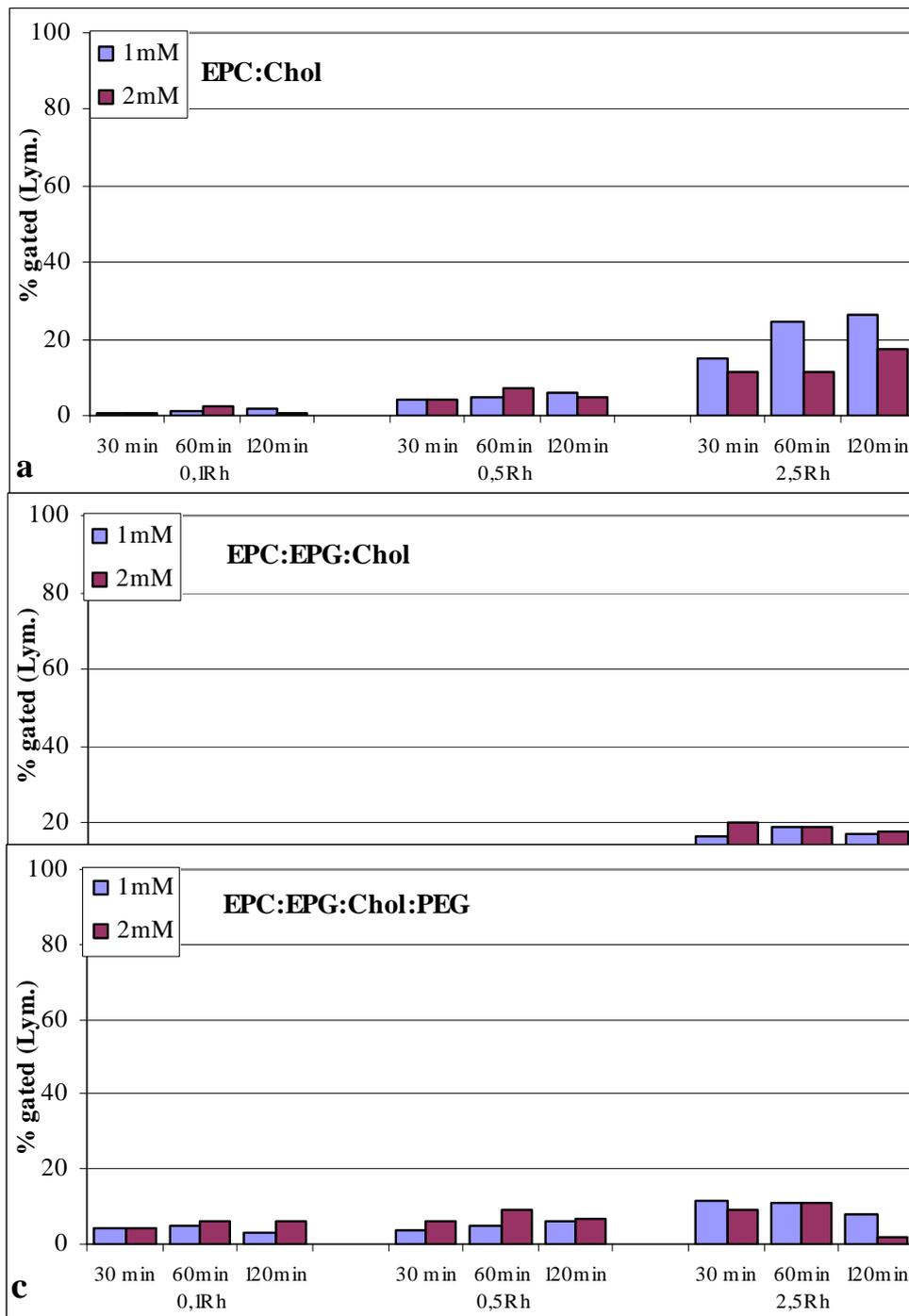


Abb. 34: Anteil positiver Zellen am Lymphozytengate nach 30, 60, und 120 min Inkubation von Vollblut eines CGD-Patienten mit 1 mM oder 2 mM 0,1 mol%, 0,5 mol% oder 2,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-(a), EPC:EPG:Chol-(b) und EPC:EPG:Chol:PEG-(c) Liposomen bei 37°C, n=1

Insgesamt sind die Werte im Vergleich zu anderen Probanden relativ hoch. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 35 die Werte des CGD-Patienten unter der exemplarischen Verwendung von 0,5 mol% Rhodamin gelabelten 1 mM Liposomen nach einstündiger Inkubationszeit den Durchschnittswerten von gesunden Spendern (n=3) gegenübergestellt.

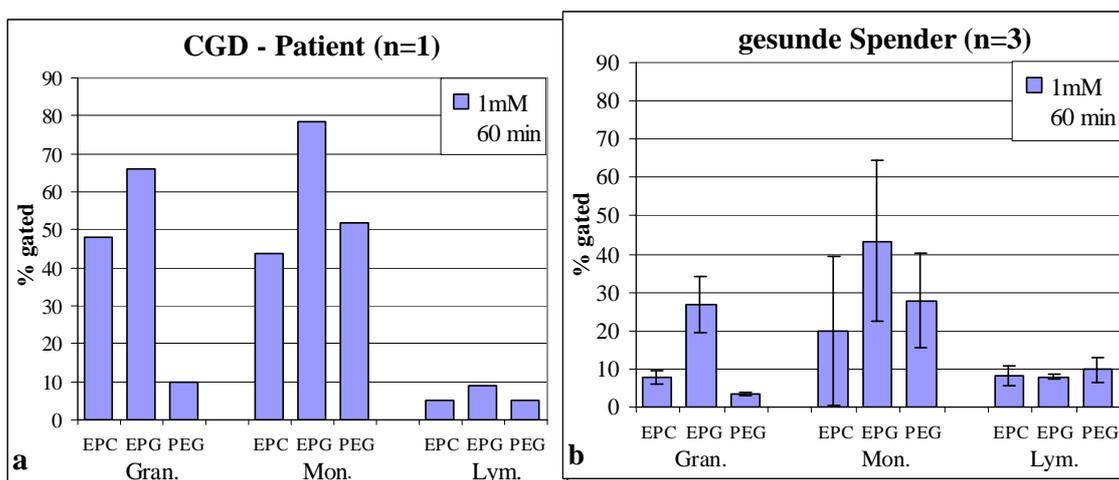


Abb. 35: Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate nach 60 min Inkubation von Vollblut eines CGD-Patienten (a) im Vergleich zu den Mittelwerten von 3 gesunden Spendern (b) nach Inkubation mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol- (EPC), EPC:EPG:Chol (EPG)-und EPC:EPG:Chol:PEG- (PEG) Liposomen bei 37°C

4.5. *In vitro*-Untersuchungen zur Rekonstitution der Bildung von ROS bei NADPH-Oxidase defizienten humanen und murinen Leukozyten

Der „oxidative Burst“ wurde zum einen mit Hilfe des DHR-Assays gemessen, bei dem DHR intrazellulär oxidiert wird und die so markierte Zelle durchflusszytometrisch erfasst wird. Zum anderen wurde die Chemilumineszenz eingesetzt, mittels der die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies über 30 Minuten kontinuierlich erfasst wurde. Für diese Versuchsreihe wurde GO in EPC:EPG:Chol-Liposomen verkapselt. Dieser Liposomentyp wurde bei den Aufnahmeversuchen (Kap. 4.4). am besten aufgenommen.

4.5.1. Messung der intrazellulären H₂O₂ Produktion nach Inkubation mit GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (GOL) mit Hilfe des DHR-Assays

Im Folgenden wurde mit Hilfe von FACS-Analysen (DHR-Assay, siehe Kap. 3.2.4.4.) überprüft, ob der oxidative Burst in NADPH-defizienten Zellen mit in EPC:EPG:Chol-Liposomen verkapselter GO wiederhergestellt werden kann.

Als Negativkontrolle wurden die Leukozyten lediglich mit DHR inkubiert. Dabei wurden sowohl für die Wildtypmaus (murin, gesund) als auch für den gesunden Spender (human, gesund) keine nennenswerten positiven Signale festgestellt (<2%). Die Ergebnisse sind in Abb. 36-38 dargestellt und werden im Folgenden für die einzelnen Gates erläutert.

Granulozyten: Die murinen und humanen NADPH-defizienten Granulozyten waren erwartungsgemäß auch unter Stimulation mit PMA nicht zum oxidativen Burst fähig.

Bei der C57Bl6/J-Maus (= Wildtyp) lag der positive Anteil der Granulozyten nach Stimulation bei 81,9%, bei denen des gesunden menschlichen Spenders lag der Wert bei 42,6%.

Nach GO-Liposomen-Gabe waren bei der C57Bl6/J-Maus 67,0% und beim gesunden menschlichen Spender fast 99,2% der Granulozyten positiv.

Die NADPH-Oxidase-defizienten Granulozyten waren bei der Maus nach GO-Liposomeninkubation zu 25,2%, beim CGD-Patienten jedoch zu 99,7% positiv.

Monozyten: Die murinen und humanen CGD-Monozyten sind wie erwartet mit PMA nicht stimulierbar. Der Werte für die nicht defizienten humanen Monozyten blieben bei der Stimulation mit PMA unter 5%. Nach der Inkubation mit GOL lagen sie beim Spender und beim CGD-Patienten knapp über 10%. Bei der C57Bl6/J-Maus hingegen lag der Wert nach Stimulation mit PMA bei knapp 66,7% und nach GOL-Inkubation bei 53,6%.

Der Anteil positiver Zellen nach GOL-Inkubation bei der CGD-Maus lag jedoch ähnlich wie beim CGD-Patienten nur bei ca. 15,2%.

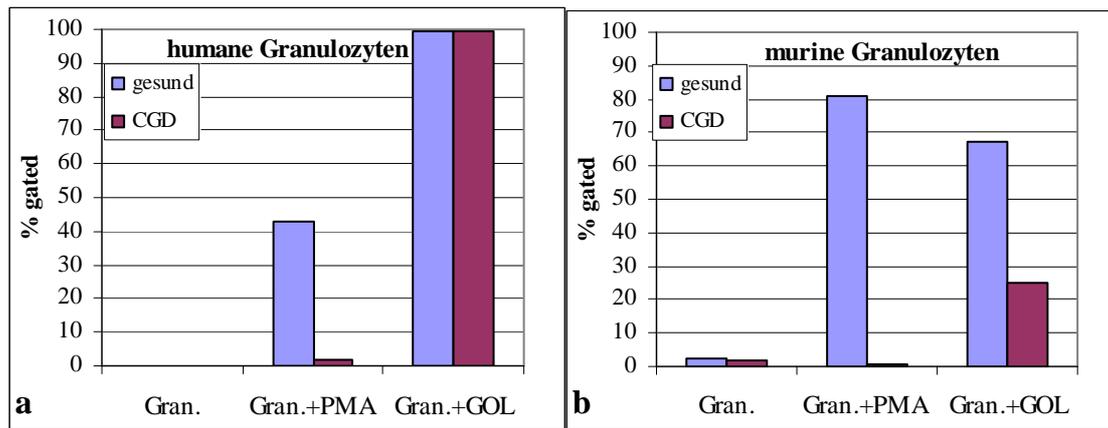


Abb. 36

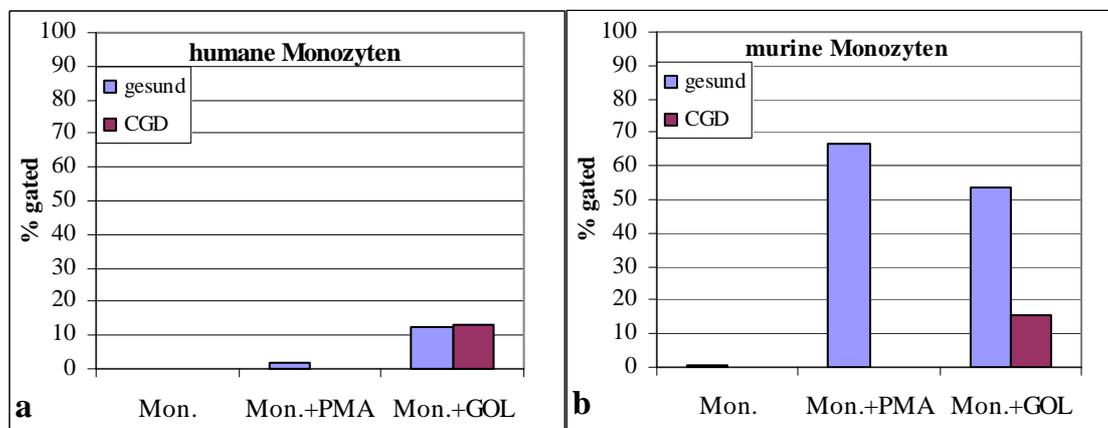


Abb. 37

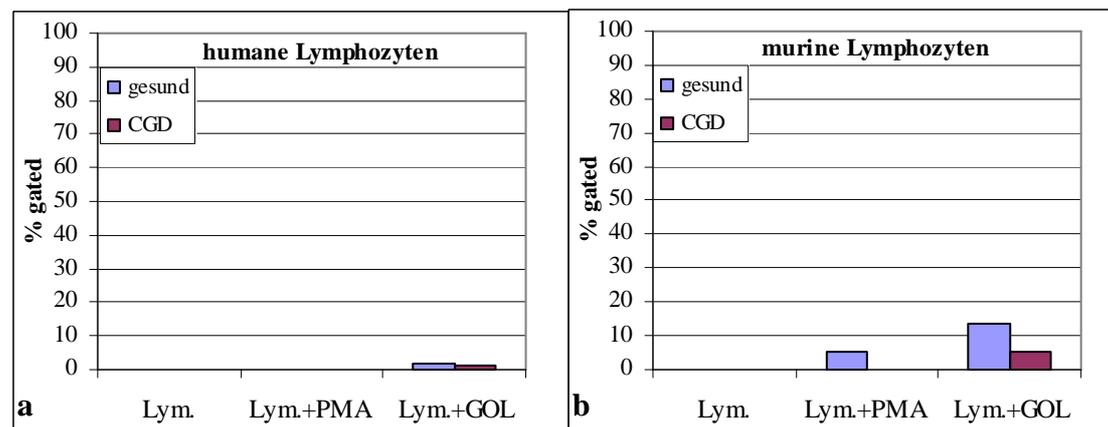


Abb. 38

Abb. 36-38: Anteil positiver Granulozyten (Abb. 36), Monozyten (Abb. 37) und Lymphozyten (Abb. 38) am jeweiligen Gate im DHR-Assay nach 15 min Inkubation von Gesamtleukozyten in Vollblut

- eines CGD-Patienten und eines gesunden Spenders und
- einer CGD- bzw. C57Bl6/J-Maus (gesund)

Die Leukozyten wurden nach der Erythrozytenlyse in HBSS resuspendiert, ggf. mit PMA stimuliert oder mit EPG:EPC:Chol-GOL inkubiert (1mM f.c.) und mit DHR markiert. n = 1

Lymphozyten: Die PMA-Stimulation führte bei der CGD-Maus nicht zu positiven Signalen.

Der positive Anteil an den Lymphozyten beim Mensch liegt selbst nach Inkubation mit GOL lediglich bei 2% beim gesunden Spender und bei 1,4% beim CGD-Patienten. Inkubation mit PMA bei der C57Bl6/J-Maus führte zu 5,6% und bei GOL-Inkubation zu rund 13,8% positiven Lymphozyten. Bei der CGD-Maus nach GOL-Inkubation wurden rund 5,6% der Zellen positiv.

4.5.2. Messung der Bildung von ROS mit Hilfe der Chemilumineszenz

In der Chemilumineszenzmessung wird im Gegensatz zu der Momentaufnahme des DHR-Assays der oxidative Burst kontinuierlich eine halbe Stunde lang gemessen. Die gemessene Einheit ist „relative light units“ (RLU). Die Grundemission liegt in der Regel im Bereich von $10^4 - 10^5$ RLU. Um die Werte möglichst übersichtlich darzustellen wurde im Folgenden als Einheit $RLU \times 10^{-4}$ sowie eine logarithmische Darstellung gewählt.

Da im Gegensatz zum DHR-Assay bei der Messung nicht im Hinblick auf die einzelnen Zellen differenziert wird, ist hier ein Einfluss der niedrigen Granulozytenzahl und der niedrigen MPO-Aktivität im Mausmodell zu erwarten. Der Einsatz isolierter Granulozyten war aufgrund der geringen Menge Mausblut nicht möglich.

Daher wurde Vollblut nach Erythrozytenlyse (Kap. 3.2.2.4) verwendet. Die Gesamtleukozytenzahl betrug 100 000 Zellen pro Ansatz (Well). Es wurde mit Dreifachansätzen gearbeitet.

4.5.2.1. Vorversuche

Es galt einen Versuchsaufbau zu finden, bei dem sich humanes und murines Blut einigermaßen vergleichen lässt.

4.5.2.1.1. Vergleich der Chemilumineszenzsignale von gesunden und NADPH-Oxidase-defizienten murinen und humanen Leukozyten unter Stimulation

Die unterschiedlichen Eigenschaften von humanem und murinem Blut wurden in den vorhergehenden Kapiteln (4.3.1 und 4.3.2.) bereits beschrieben.

Es galt zunächst festzustellen, ob ein Vergleich von murinem und humanem Blut möglich ist.

Die Chemilumineszenzmessung wird in der Kinderklinik Tübingen routinemäßig zur Diagnose der septischen Granulomatose eingesetzt. Auch das Blut des zur Verfügung stehenden Spenders mit CGD (männlich, ca. 30 Jahre) wurde bereits mehrfach nach Stimulation mit PMA und Zymosan gemessen, ohne dass je ein Effekt nach Stimulation zu sehen war. Es werden die Effekte bei Gesamtleukozyten nach Vollblutlyse von einer CGD-Maus, einer Wildtypmaus (C57Bl6/J) eines gesunden menschlichen Spenders und eines CGD-Patienten verglichen (Abb. 39).

Die Werte bei humanem Vollblut waren unstimuliert etwas höher als bei der Wildtypmaus, stimuliert lag der Unterschied bei gut einer Zehnerpotenz. Bei dem Blut der defizienten CGD-Mäuse und des CGD-Patienten zeigte die Stimulation mit PMA keinen Effekt.

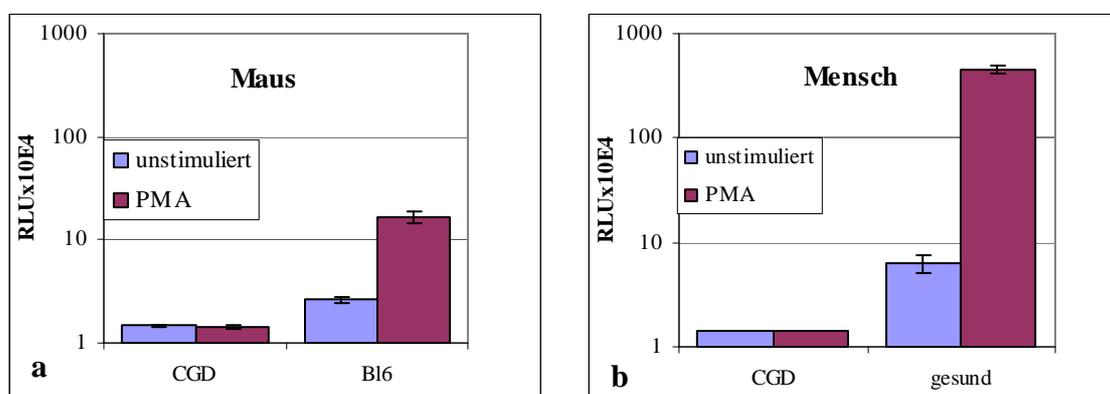


Abb. 39: Chemilumineszenz von Gesamtleukozyten nach Erythrozytenlyse unstimuliert sowie nach Stimulation mit PMA. a) CGD- und C57Bl6/J (B16)-Mäusen

b) CGD-Patienten und gesunder Spender

Es wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit Hilfe der Luminol-vermittelten Chemilumineszenz von 100 000 Leukozyten pro well im Dreifachansatz ($n = 3$, $MW \pm SD$) über 30 Minuten bei 37°C gemessen.

4.5.2.1.2. Chemilumineszenzmessungen mit GOL in Abwesenheit von Leukozyten

Ein weiterer Versuch sollte klären, in welchem Ausmaße GOLs von sich aus in Gegenwart von Glucose Chemilumineszenzsignale erzeugen und ob Plasma Auswirkungen auf diese Prozesse hat. Dazu wurden EPC:EPG:Chol-Liposomen eingesetzt (Abb. 40).

Die Liposomen wurden mit 1mM Endkonzentration eingesetzt. Die Endkonzentration des Plasmas lag bei 25%.

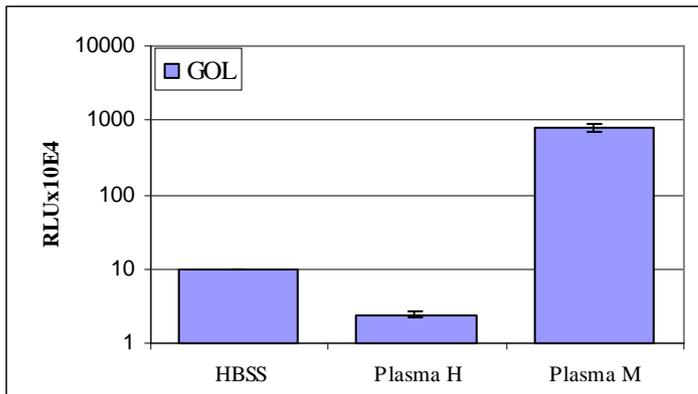


Abb. 40:
Inkubation von 1 mM EPC:EPG:Chol-GOLs in HBSS, humanem Heparinplasma (H) und murinem Heparinplasma (M) (je 25 %). Es wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies über die Luminol- vermittelte Chemilumineszenz 30 min bei 37°C gemessen.

Die Chemilumineszenz von Liposomen in glucosehaltigem Puffer (HBSS) lag bei 10×10^4 RLU. Bei dem Ansatz mit humanem Plasma war der Wert um etwa ein Viertel verringert, im murinen Plasma hingegen um eine Zehnerpotenz erhöht. Der hohe Wert nach Inkubation von GOL mit murinem Plasma war reproduzierbar.

4.5.2.1.3. Inkubation von murinen Leukozyten mit EPC:EPG:Chol- und GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen

Ziel dieses Versuches war es zu überprüfen, ob die Inkubation mit Leerliposomen (d.h. ohne Einschluss von GO) bei den Wildtypmäusen (C57Bl6/J) zu einer CL-Antwort führt.

Alle Ansätze enthielten Gesamtleukozyten nach Erythrozytenlyse und 15% Plasma. Die Leukozyten von C57Bl6/J -Mäusen und im Vergleich dazu von CGD-Mäusen wurden ohne Liposomen (HBSS, Negativkontrolle), mit Leerliposomen (EPC:EPG:Chol-Liposomen) und mit GOLs (GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen) inkubiert.

Abb. 41 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse. Leerliposomen führten zu keiner signifikanten Steigerung bei der Inkubation mit C57Bl6/J -Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle (HBSS). Die Inkubation der Leukozyten mit GOLs führte hingegen sowohl bei den Ansätzen mit C57Bl6/J als auch bei den CGD-Leukozyten zu einer Steigerung der Chemilumineszenzsignale im Vergleich zur zellfreien GOL-Inkubation (Abb. 41).

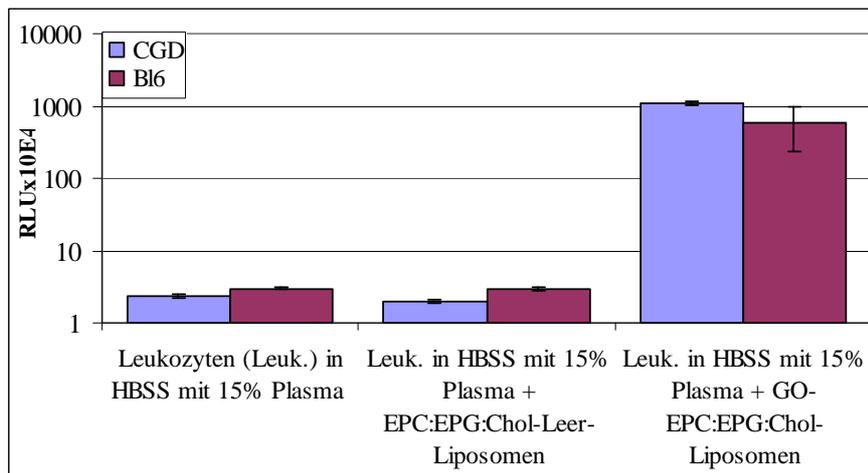


Abb. 41: Chemilumineszenz von Gesamtleukozyten von CGD- und Bl6-Mäusen in HBSS mit 15% Plasma f.c.. Es wurde ohne, mit EPC:EPG:Chol-Leer-Liposomen und mit GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (f.c. 1mM) inkubiert und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch 100 000 Leukozyten über die Luminol-vermittelte Chemilumineszenz 30 Minuten bei 37°C gemessen (n = 3, MW ± SD).

4.5.2.1.4. Direktinkubation von gesunden murinen und humanen Leukozyten und Vorinkubation in Vollblut mit GOLs

Bei der **Direktinkubation** wurden nach Erythrozytenlyse die Gesamtleukozyten, Plasma und Liposomen gleichzeitig auf die Platte gegeben und über 30 Minuten gemessen. Bei der **Vorinkubation** wurden die Liposomen für 15 Minuten bei 37°C zu Vollblut gegeben. Durch die anschließende Erythrozytenlyse und durch die darauf folgenden Waschschrte befindet sich kein Plasma im Ansatz. Abb. 42 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse.

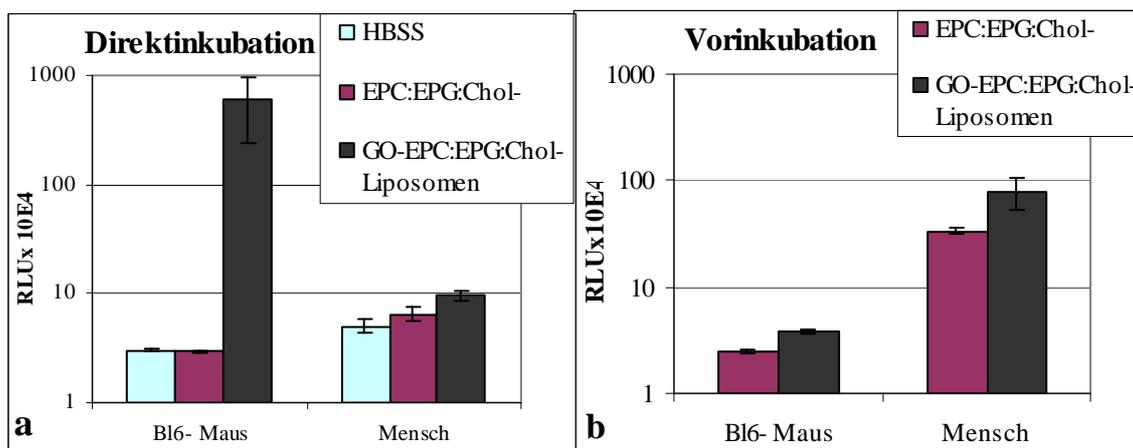


Abb. 42: Chemilumineszenz von Gesamtleukozyten von Bl6-Mäusen sowie einem gesunden humanen Spender in HBSS bzw. inkubiert mit EPC:EPG:Chol-Leer- und EPC:EPG:Chol-GO-Liposomen. Bei der Direktinkubation (a) betrug die f.c. des Plasmas 15%. Die Messung nach Vorinkubation über 15 Minuten bei 37°C in Vollblut (b) erfolgte im plasmafreien Ansatz. Die Messung der Luminol-abhängigen CL erfolgte über 30 Minuten (n = 3, MW ± SD).

Wie aus Abb. 42 zu ersehen ist, führt die Direktinkubation muriner Leukozyten mit Leerliposomen zu keiner mit GO-Liposomen hingegen zu einer massiven Chemilumineszenz.

Die Vorinkubation führte sowohl bei Verwendung von Leer-, als auch bei Verwendung von GO-Liposomen bei den Maus-Leukozyten nur zu einer geringen Chemilumineszenz. Im Gegensatz dazu führte bei humanen Leukozyten sowohl die Vorinkubation mit Leerliposomen als auch die Vorinkubation mit GO-Liposomen zu einer messbaren Erhöhung der Chemilumineszenz.

4.5.2.3. Vergleich der Rekonstitution des oxidativen Burst in humanen und murinen NADPH-defizienten Zellen mit Hilfe von GOL

Murines Plasma führt also zusammen mit GO-Liposomen zu einer massiven Chemilumineszenz. Im Gegensatz dazu nimmt die Chemilumineszenz in Gegenwart von humanem Plasma etwas ab. Um das murine und humane System besser vergleichen zu können, wurde auf Plasma verzichtet.

Im folgenden Versuch (Abb. 43) wurden Leukozyten eines CGD-Patienten, eines gesunden Spenders, einer CGD- und einer Bl6-Maus nach der Erythrozytenlyse in HBSS resuspendiert. Die Messung erfolgte entweder ohne Zusätze, oder unter Stimulation mit PMA bzw. Zymosan bzw. in Anwesenheit von 1mM f.c. EPC:EPG:Chol- bzw. GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen.

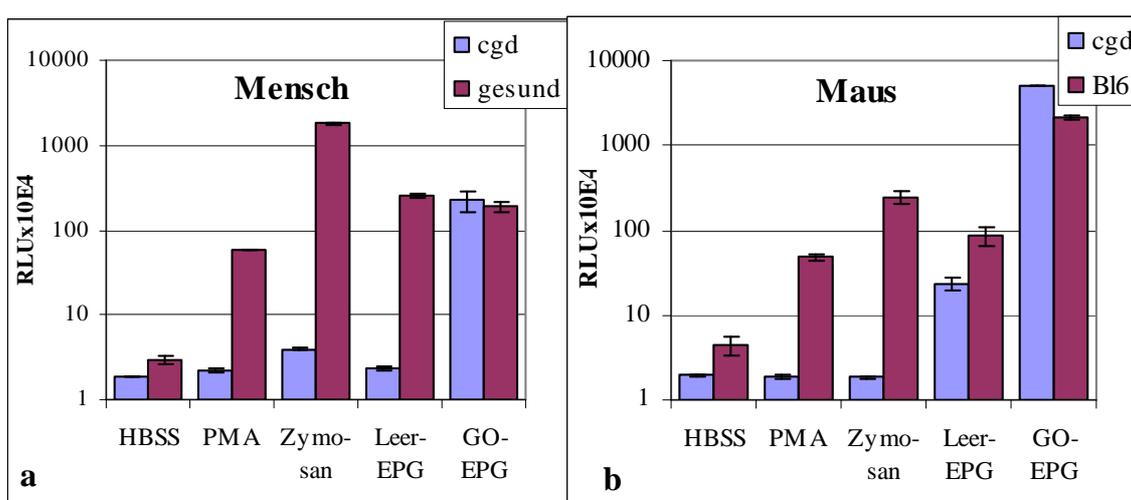


Abb. 43: Chemilumineszenz von Leukozyten

a) eines CGD-Patienten und eines gesunden Spenders b) einer CGD- und einer Bl6-Maus in HBSS ohne Zusätze, mit PMA, Zymosan und 1mM f.c. EPC:EPG:Chol- (Leer-EPG) bzw. 1mM f.c. GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (GO-EPG). Die Messung der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz erfolgte über 30 min bei 37°C (n = 3, MW ± SD).

Bei den Versuchen mit humanen Leukozyten fiel eine hohe Chemilumineszenz nach Inkubation mit Leerliposomen beim gesunden Spender auf, ähnlich wie nach der Inkubation mit Zymosan.

In der Tendenz ähneln die Werte bei den murinen Leukozyten denen des Menschen, die GO-Liposomen haben einen stärkeren Effekt.

4.6. Langzeituntersuchung an CGD-Mäusen nach Dreifachgabe von GOL im Vergleich zu unverkapselter GO und PBS

Der Zustand und das Verhalten der Mäuse unter dreifacher intravenöser Gabe von freier GO und GOLs im Abstand von 24 h wurde beobachtet. Besonders geachtet wurde auf Symptome möglicher Unverträglichkeitsreaktionen wie Fellveränderungen oder Nekrosen von Hautpartien. Als messbarer Parameter für den Gesundheitszustand wurde das Gewicht protokolliert.

Vor allem bei den Männchen traten an der Injektionsstelle Veränderungen auf. Hier gelangte aufgrund der schlechten Sichtbarkeit der Venen wahrscheinlich Injektionsflüssigkeit paravenös ins Gewebe. Die lokalen, teilweise erheblichen nekrotischen Veränderungen sind für die jeweiligen Tiere nach Tagen aufgeschlüsselt im Anhang verzeichnet.

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsgruppen

Maus	PBS	GO(PBS)	GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen
M1-M2	3x (Tag 0, 1, 2)	-	-
M3-M5	-	3x	-
M6-M8	-	-	3x

4.6.1. Allgemeinbefinden nach Gabe von unverkapselter GO und GOLs

Parameter zur Beurteilung des Allgemeinbefindens bei Mäusen sind die Gewichtsentwicklung, das Verhalten und der Zustand des Fells. Bei den behandelten Mäusen waren keine Verhaltensänderungen zu beobachten, auch das Fell war unauffällig.

Die Gewichtsentwicklung ist in Abb. 44 dargestellt. Dabei wurde das Gewicht am Tag vor dem Versuchsbeginn als 100% festgesetzt. Das Gewicht der Tiere schwankte im Mittel lediglich um 5% und nahm im Gesamtverlauf sogar etwas zu.

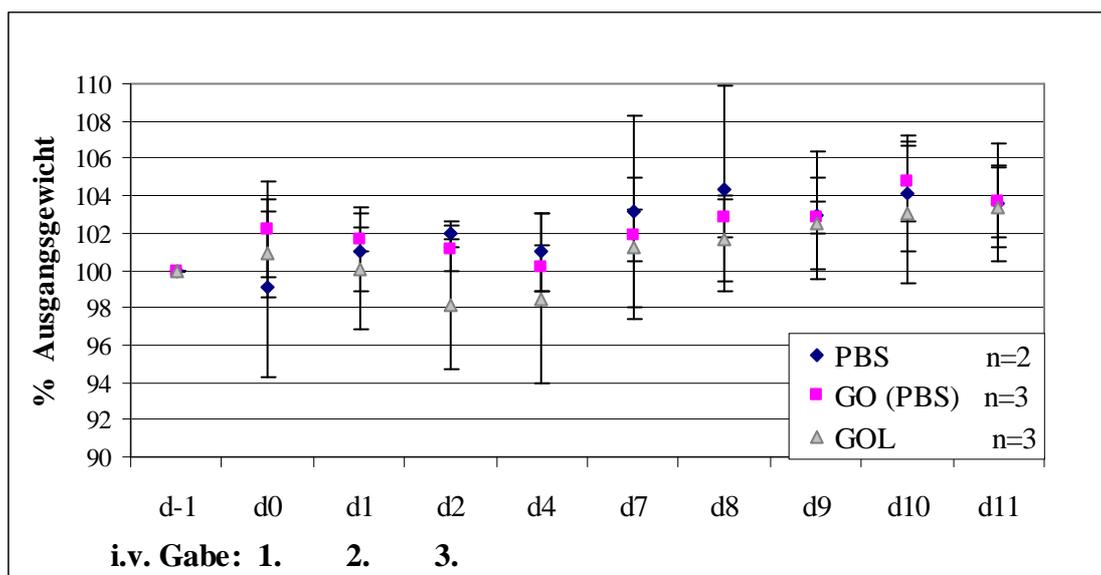


Abb. 44: Gewichtsentwicklung als Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe nach Gabe von Puffer [PBS, n=2] und GO in gelöster [GO(PBS), n=3] bzw. in EPC:EPG:Chol-GOL verkapselter Form (GOL, n=3, MW \pm SD). Die Gabe erfolgte an Tag 0, 1 und 2 intravenös.

Das Gewicht bot also ebenfalls keine Anhaltspunkte für ein gestörtes Allgemeinbefinden.

4.6.2. Blutglucosespiegel nach Gabe von unverkapselter GO und von GOLs

Die Blutprobe zur Glucosemessung wurde in der Regel an der Schwanzvene, lediglich bei der Tötung an Tag 11 am Herzen entnommen. Die Messung erfolgte an den Tagen 0, 1 und 2 je 60 bzw. 480 Minuten nach der i.v.-Gabe, sowie an Tag 4 bei der Kontrolle der Tiere und an Tag 11 nach der Tötung. An den Blutglucosewerten (Abb. 45) waren keine klaren Tendenzen zu erkennen. Nach der Gabe von freier GO bzw. GOL wurde keine signifikante Abnahme der Glucose beobachtet.

Starke Abweichungen nach oben, wie bei GO(PBS) an Tag 4 waren meist mit erfolgreicher Flucht vor dem Einfangen oder bei der Tötung an Tag 11 mit beginnender Gerinnung des Blutes verbunden mit der Anzeige „Ketones?“ auf dem Display des Messgeräts korreliert.

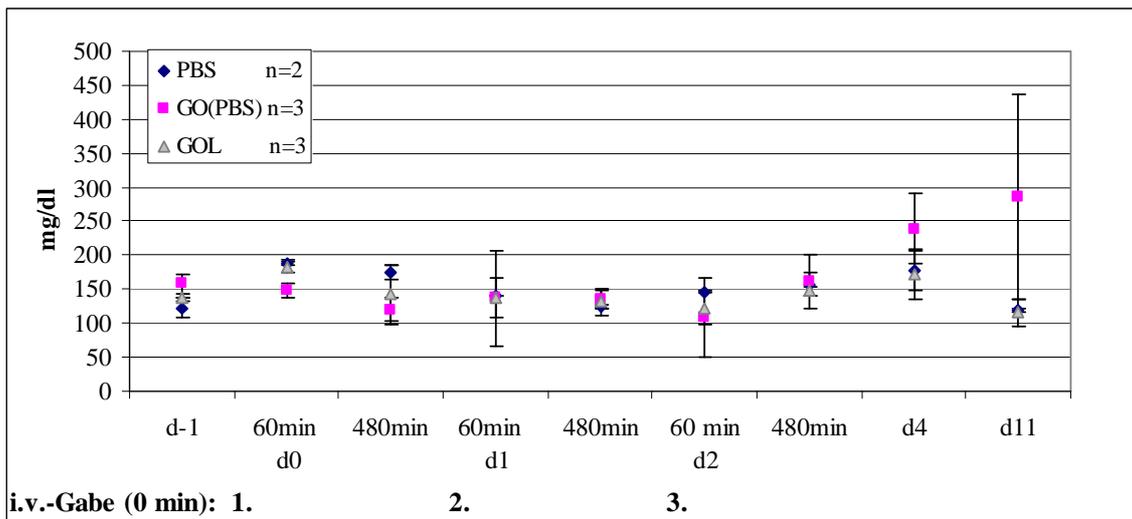


Abb. 45: Blutglucosewerte der Versuchsgruppen nach Gabe von Puffer [PBS, n=2, MW \pm SD], gelöster GO [GO(PBS), n=3, MW \pm SD] und GO-Liposomen [GOL, n=4, MW \pm SD]. Die Gabe erfolgte an Tag 0, 1 und 2 intravenös, die Messung an Tag 0-2 je 60 und 480 min danach, an Tag 4 bei der Kontrolle und an Tag 11 nach der Tötung.

4.6.3. GO-Protein-Konzentration und Konzentration funktioneller GO in Organen und Serum

Die GO-Konzentration ausgewählter Organe und des Serums wurde am Ende des Versuches (d11) ermittelt. Die Beendigung des Versuches erfolgte spät, um auch mögliche Spätfolgen (z.B. Nekrosen an Ohrenspitzen, Samoszuk et al. 1993) der GO-Gabe beurteilen zu können.

Da bekanntermaßen Liposomen im retikuloendothelialen System von Milz und Leber abgebaut werden, stellte sich die Frage, ob GO dort nachgewiesen werden kann und ob dort gefundene Glucoseoxidase noch aktiv ist.

Daher wurden neben der GO-Proteinkonzentrationsbestimmung im Sandwich-ELISA in einem „direkten“ ELISA die „funktionelle“ GO nachgewiesen. Dabei wurde die GO aus dem Gewebe bzw. Serum zur Umsetzung von Glucose genutzt. Dabei entsteht H_2O_2 , das mit Hilfe einer Meerrettichperoxidase zur Umsetzung eines photometrisch messbaren Farbstoffes verwendet wird.

Im Serum war erwartungsgemäß zum Zeitpunkt der Tötung 9 Tage nach der letzten Gabe (= d11) keine GO mehr nachweisbar, ebenso nicht in Niere und Knochenmark. Der Gehalt in Leber und Milz ist in Abb. 46 dargestellt. Die Organe von Maus (M) 3 und 6 wurden zur histologischen Untersuchung formalinfixiert und standen daher nicht für den ELISA zur Verfügung.

Die gemessenen Werte liegen alle in der Nähe der Nachweisgrenze des Assays. Diese ist abhängig von der eingesetzten Organmenge und liegt bei dieser Messung bei

0,7 µg/ml Organhomogenisat. Bei Maus 7, einem Männchen, das Liposomen erhalten hatte und massive Schwanzläsionen entwickelt hatte, war keine GO in den untersuchten Organen nachweisbar.

Bei Maus 8, einem Weibchen, das GOL erhalten hatte, war zwar noch etwas GO-Protein nachweisbar, jedoch kein funktionelles Enzym.

Bei den beiden getesteten Mäusen, die reine GO erhalten hatten (Abb. 46a), war etwas GO nachweisbar, die auch noch geringfügige Aktivität zeigte.

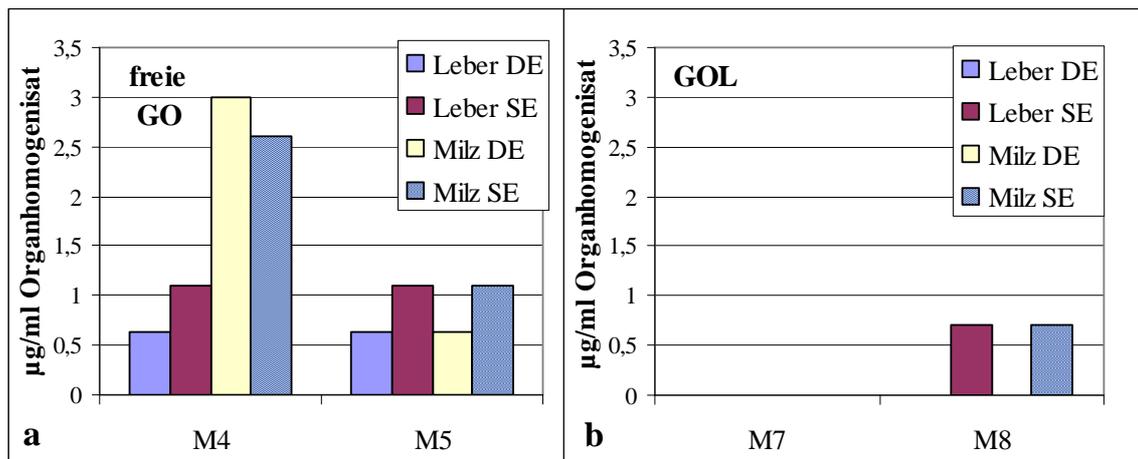


Abb. 46: GO-Konzentration in Leber und Milz 9 Tage nach Dreifachgabe von GO (a) und GOL (b). Die Bestimmung des funktionellen Enzyms wurde mit Hilfe eines direkten ELISAs (DE) und die der Protein-Konzentration mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (SE) durchgeführt. M4/5:GO (PBS) M7/8: GOL

4.6.4. Messung der intrazellulären H₂O₂-Produktion eine Stunde nach GO-Gabe mit Hilfe des DHR-Assays

Um die Rekonstitution des oxidativen Bursts zu überprüfen, wurde ein DHR-Assay mit dem eine Stunde nach der ersten GO-Gabe (freie GO und GOLs) entnommenen Vollblut durchgeführt (Tab. 4). Alle Proben wurden mit PMA stimuliert. Zum Vergleich diente Blut einer „Balb c Maus“, da diese in Bezug auf die NADPH-Oxidase Wildtypeigenschaften besitzt. Diese Kontrolle zeigte ein deutlich positives Bild, während die Proben der behandelten und der unbehandelten CGD-Mäuse negativ waren.

Tabelle 4: Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate nach PMA-Stimulation der mit PBS, mit in PBS gelöster GO sowie mit GOL behandelten CGD-Mäuse sowie einer Balb c-Maus 60 Minuten nach i.v-Gabe von PBS, GO in PBS gelöst bzw GO-Liposomen.

Gruppe	Maus 1-8: CGD- Mäuse	% gated		
		Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten
PBS	1	3,21	0,54	0,82
	2	0,88	0,53	1,29
GO in PBS	3	0,68	1,07	2,96
	4	1	0	0,22
	5	0,79	3,28	0,94
GOL	6	1,79	3,15	0,86
	7	0,98	2,52	0,31
	8	0,4	0	0,11
Balb c Maus	9	91,99	67,62	39,63

4.6.5. Bestimmung des GO-Antikörpertiters im Serum

Dieser Tierversuch sollte vor allem die Frage beantworten, ob die Gabe von GO eine Antikörperbildung zur Folge hat und inwiefern die Verkapselung in Liposomen eine Auswirkung auf die Höhe des Titers hat. Bei Mäusen werden binnen 2 Tagen Antikörper gebildet (Kenny und Herzberg, 1967). Bei dreifacher Gabe an aufeinanderfolgenden Tagen ist daher ein Boost-Effekt zu erwarten. Der Einfluss der liposomalen Verkapselung der GO auf ihre Antigenwirkung sollte also deutlich werden. Mit Hilfe der Seren aus dem Versuch wurde ein ELISA auf Antikörper gegen GO etabliert. Etabliert wurde folgendes Vorgehen (siehe auch Kap. 3.2.8.1.1.):

Coaten: 96-Well Platten mit 7,025 U GO/Well (in Citrat-Phosphatpuffer, 12h bei 4° C).

Positivkontrolle: Es wurde ein monoklonaler muriner IgG₁-Antikörper gegen GO verwendet. In der Titration gegen den Detektionsantikörper (anti-Maus-HRP) war eine Verdünnung des monoklonalen murinen IgG₁-Antikörper gegen GO von 1:25 000 bis 1:3 200 000 in Verdünnungspuffer gut detektierbar. Wurde zur Verdünnung Mausserum verwendet, fielen die Extinktionen etwas niedriger aus als bei Verwendung von Verdünnungspuffer. Bei verdünntem Serum wurde die Differenz geringer. Der Grad des Einflusses des Serums hing vom einzelnen Serum ab. Stärker hämolytische Seren beeinflussten die Ergebnisse bei geringen Verdünnungen etwas stärker.

Bei der 1: 3 200 000-Verdünnung kam es bei deutlich hämolytischen Seren zu falsch negativen Ergebnissen. Daher wurde als **Nachweisgrenze** 1: 1 600 000 gewählt.

Als **Negativkontrolle** diente Mausserum von unbehandelten Mäusen. Bis zu einer Verdünnung der Positivkontrolle von 1: 3 200 000 kam es nicht zu falsch positiven Ergebnissen.

Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde das Serum der Versuchsmäuse auf Antikörper untersucht. Es wurden stets Negativkontrollen mitgeführt. Als positiv galten Proben, deren Extinktion größer oder gleich der Nachweisgrenze war.

Detektionsantikörper: Optimale Ergebnisse stellten sich bei einer Verdünnung von 1:2500 ein. Die Inkubation mit dem Substratpuffer und die Messung erfolgte wie in Kap. 3.2.7.2. beschrieben.

Aufgrund der Serumeigenschaften bot sich der **Antikörpertiter** als Auswertungskriterium also an. Der Vorteil lag darin, dass hier die höchst mögliche Verdünnung zur Bewertung herangezogen wird und somit die Serumeffekte minimiert wurden. Die Verdünnung der Proben erfolgte zunächst 1:10. Nachdem so der zu erwartende Bereich eingegrenzt war, wurde in diesem Bereich mit 1:2-Verdünnungen gearbeitet. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Titern (1:16 bis über 1:2048) hat sich dieses Vorgehen bewährt.

Tabelle 5:

Antikörpertiter im Serum von CGD-Mäusen ermittelt mit Hilfe des AK-ELISA. Die Gabe von 100 µl GO in PBS (GO in PBS) bzw. GO verkapselt in EPC:EPC:Chol-Liposomen (GOL) mit einer Aktivität von 14,05 Units erfolgte an Tag 0, 1 und 2 i.v. Das Blut wurde an Tag 11 retrobulbär und mittels Herzpunktion gewonnen. *Bei Maus 7 ist eine korrekte i.v.-Boosterung nicht gewährleistet.

d0-d2 je 14,05 U i.v.	Maus Nr. (Geschlecht)	AK-Titer an Tag 11
GO in PBS	3 (m.)	1:256
	4 (w.)	1:128
	5 (m.)	1:128
GOL	6 (w.)	1:1024
	7 (m.)	1:128*
	8 (w.)	>1:2048

Nach PBS-Gabe waren keine Antikörper nachweisbar. Bei den Tieren, die GO in gelöster Form erhalten hatten, lag der Antikörpertiter zwischen 1:128 und 1:256.

Bei den Tieren, denen GOL verabreicht wurden, waren die Titer recht unterschiedlich. Die beiden Weibchen, bei denen die i.v.-Applikation problemlos verlaufen war, zeigten sehr hohe Titer (> 1:1024). Bei dem Männchen* lag der Titer lediglich bei 1:128. Möglicherweise war die korrekte i. v.-Boosterung nicht gewährleistet, wie die massiven nekrotischen Veränderungen am Schwanz vermuten lassen.

4.7. Therapie von CGD-Mäusen mit GOL nach Infektion mit *Staph. aureus*

Tabelle 6:
Übersicht über die
Versuchsgruppen

Anzahl der Mäuse	Staph. aureus (Tag 0)	GOL (Tag 5)
3	-	-
2	-	+
9	+	-
9	+	+

Die Tiere wurden an Tag 0 mit 2×10^7 Kbe *Staph.-aureus* intraperitoneal infiziert. An Tag 5 wurden i.v. 100 μ l in EPC:EPG:Chol-Liposomen verkapselte GO gegeben, entsprechend 3,65 μ g Lipid und 0,041mg GO (11,52 Units). Nach der GOL-Gabe wurde die Blutglucose sofort, sowie nach 60, 120, 240 und 480 Minuten gemessen. Die Beendigung des Versuches folgte an Tag 6. Mit dem gewonnenen Blut wurde die Expression von Komplementrezeptoren mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Das Ausplattieren der Peritoneallavage zur Feststellung der Kbe erfolgte sofort nach der Aufkonzentration. Serum, sowie die Organe Leber, Milz, Niere, Darm (Ileum), Thymus, Herz, Lunge, Muskel, Knochen und Gehirn, wurden bis zur Durchführung des GO-ELISAs bei -20°C gelagert.

4.7.1. Gewichtsentwicklung bei gesunden und infizierten CGD-Mäusen nach Gabe von GOL

Um den Krankheitsverlauf zu beurteilen und Auswirkungen der Therapie aufzeigen zu können, sollen im Folgenden infizierte behandelte und infizierte unbehandelte Tiere gegenübergestellt werden. Um Einflüsse des Versuchsablaufes (z.B. Stress durch „Handling“) einschätzen zu können, wurden auch drei nicht infizierte, lediglich mit PBS behandelte Kontrollen mitgeführt. Zur Überprüfung von Nebenwirkungen der GO-Liposomen dienten die zwei nicht infizierten behandelten CGD-Mäuse.

Die Gewichtsschwankungen waren insgesamt recht gering (Abb. 47). Bei den 3 nicht infizierten und lediglich mit PBS behandelten Mäusen waren die Schwankungen mit rund 1% sehr gering. Die gesunden, mit GO-Liposomen behandelten Mäuse hatten einen leichten Gewichtsverlust von weniger als 3%.

Die 18 infizierten Mäuse nahmen im Laufe des Versuches relativ konstant sowie unabhängig von der Behandlung im Mittel ca. 5% ab. Allerdings war in beiden Gruppen jeweils ein Tier dabei, das mit ca. 20% Gewichtsverlust bis zum Versuchsende dem Kriterium für unzumutbar schwere Erkrankungen nahe kam.

Insgesamt war das Gewicht bei den gesunden Tieren auch unter Behandlung (PBS und GOL) fast konstant. Bei den infizierten Tieren sind die Gewichtsverläufe zwischen den Einzeltieren recht unterschiedlich, ähneln sich jedoch im Mittel.

Da der Versuch einen Tag nach der GOL-Gabe beendet wurde, war ein Einfluss auf das Gewicht nicht zu erwarten. Auffallend waren die sehr unterschiedlich schweren Krankheitsverläufe bei gleicher Infektion und Behandlung.

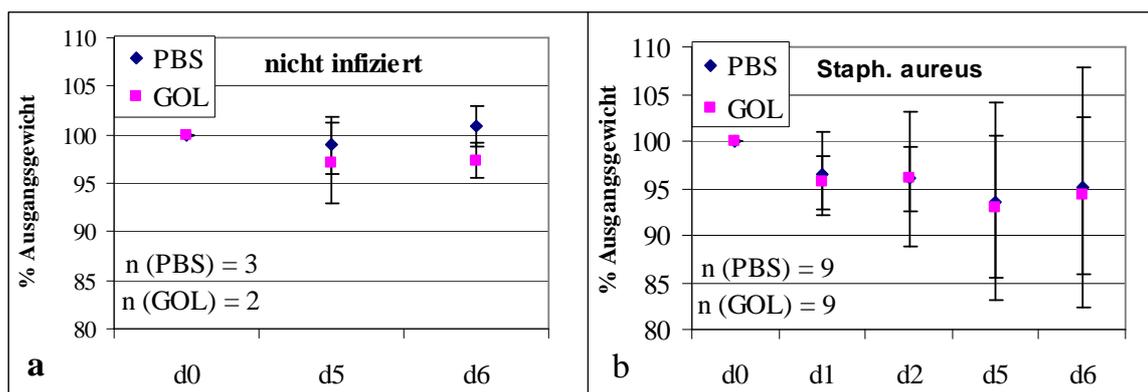


Abb. 47: Gewichtsentwicklung bei (a) gesunden und (b) mit *Staph. aureus* infizierten CGD-Mäusen unter Therapie (GOL, a: n=3, b: n=9, MW \pm SD) im Vergleich zur Scheinbehandlung (PBS, a: n=2, b: n=9, MW \pm SD).

4.7.2. Blutglucosekonzentration bei gesunden und infizierten CGD-Mäusen nach Gabe von GOL

Der Blutglucosewert, dargestellt in Abb. 48, ist stark stressabhängig. Dennoch zeigten sich in diesem Versuch gewisse Tendenzen. Die Ausgangswerte lagen bei den gesunden Tieren, ähnlich wie vor dem Versuch am Behandlungstag, über 150 mg/dl. Bei den infizierten Tieren liegt der Ausgangswert vor der GOL-Gabe im Mittel etwa 50 mg/dl niedriger. In der ersten Stunde nach PBS-Gabe ist ein leichter Anstieg, nach GOL-Gabe ein leichter Abfall des Blutzuckerspiegels zu beobachten. Danach ist bei allen Gruppen ein leichter Abfall festzustellen. Der 8h-Wert ist in beiden Fällen am niedrigsten. 24 h nach der Behandlung wurde bei den gesunden Tieren das Ausgangsniveau wieder erreicht, bei den infizierten wurde es sowohl bei PBS-Gabe als auch bei GOL-Gabe leicht übertroffen.

Aufgrund der starken Schwankungen der Einzelwerte sind diese Tendenzen jedoch nicht überzubewerten. Einzelne sehr niedrige Werte schienen mit schlechtem Allgemeinbefinden der jeweiligen Maus zu korrelieren. Ansonsten scheint das Handling die Werte stark zu beeinflussen.

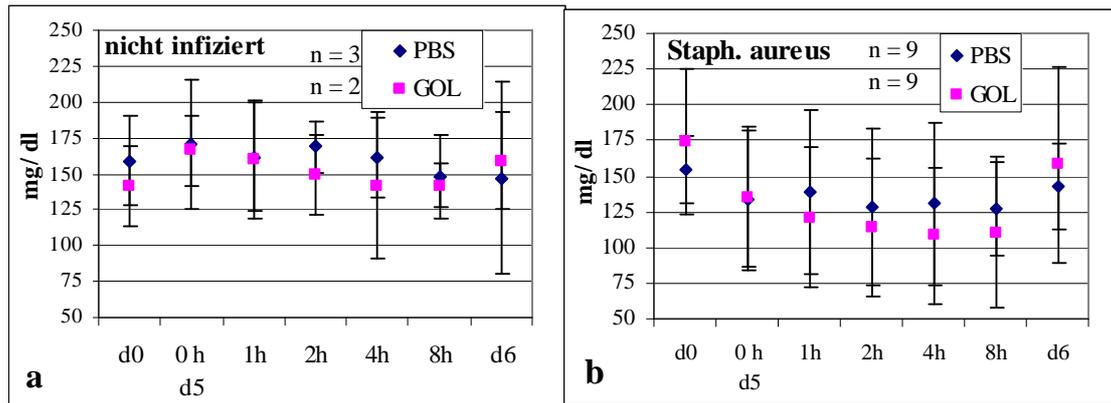


Abb. 48: Blutglucose bei (a) gesunden und (b) mit *Staph. aureus* infizierten CGD-Mäusen unter Therapie (GOL, a: n=3, MW \pm SD, b: n=9, MW \pm SD) im Vergleich zur Scheinbehandlung (PBS, a: n=2, MW \pm SD, b: n = 9, MW \pm SD), gemessen mit dem One Touch ultra-Blutglucosemessgerät.

4.7.3. Keimzahlen und Abszessformation als Parameter für den Therapieerfolg

Zur Beurteilung der Infektion sollte ursprünglich die *Staph. aureus* Kultur aus der Peritoneallavage dienen. Allerdings hing die Anzahl der Keime (KbE) in erster Linie mit der Lokalisation der Abszesse zusammen. Wurde beim Eröffnen der Bauchhöhle ein Abszess getroffen oder waren Abszesse aufgrund von Verklebungen gerissen, wurden in der Peritoneallavage extrem hohe Keimzahlen gezählt. Bei unbeschädigten Abszessen war die Peritoneallavage unabhängig von deren Anzahl und Größe steril.

Abb. 49 zeigt die mittlere Anzahl der Abszesse in der Leber bei der unbehandelten im Vergleich zur behandelten Gruppe. Die hohe Standardabweichung aufgrund der sehr verschiedenen Ausprägung der Entzündungen bei den einzelnen Mäusen zeigt die Problematik des Parameters. Er lässt zudem, ebenso wie die Kultur aus Peritoneallavage, keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennen. Der pathologisch-anatomische Befund der Sektion ist im Anhang für jede einzelne Maus aufgelistet.

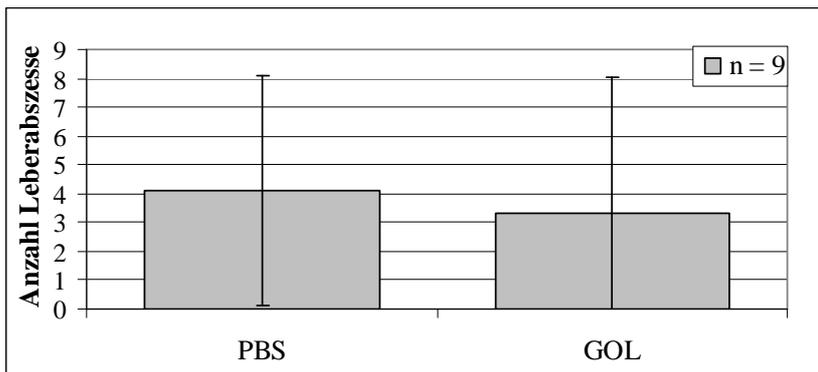


Abb. 49: Anzahl der Abszesse bei *Staph. aureus* infizierten, unbehandelten (PBS) und behandelten (GOL) Mäusen anhand der pathologisch anatomischen Untersuchung im Rahmen der Sektion. $n = 9$, $MW \pm SD$

4.7.4. GO-Gehalt in Organen und Serum 24 h nach i.v.-Gabe von GOL

Die 24 h nach GOL-Applikation entnommenen Organe und das Serum wurden mit dem Sandwich-ELISA auf ihre GO-Konzentration untersucht. In der Milz und der Leber von sieben der acht mit GOL behandelten und untersuchten Mäuse konnte GO nachgewiesen werden (Abb. 50). Die Proben der mit PBS behandelten Tiere waren alle negativ.

Bei der achten Maus war es unter der i. v.-Injektion zu einer massiven Kreislaufschwäche gekommen und der Erfolg der Gabe war fraglich. Das Tier wurde daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Viel GO konnte in Leber und Milz von Maus 1 und Maus 4 nachgewiesen werden. Dabei lag die Proteinkonzentration in der Leber über der in der Milz. Die Konzentration in den Organen von Maus 2–7 war geringer. Im Mittel war in den Organen der infizierten Tiere mit rund 50 μg weniger GO nachweisbar als bei den nicht infizierten mit 100 μg (Milz) bzw. 150 μg (Leber).

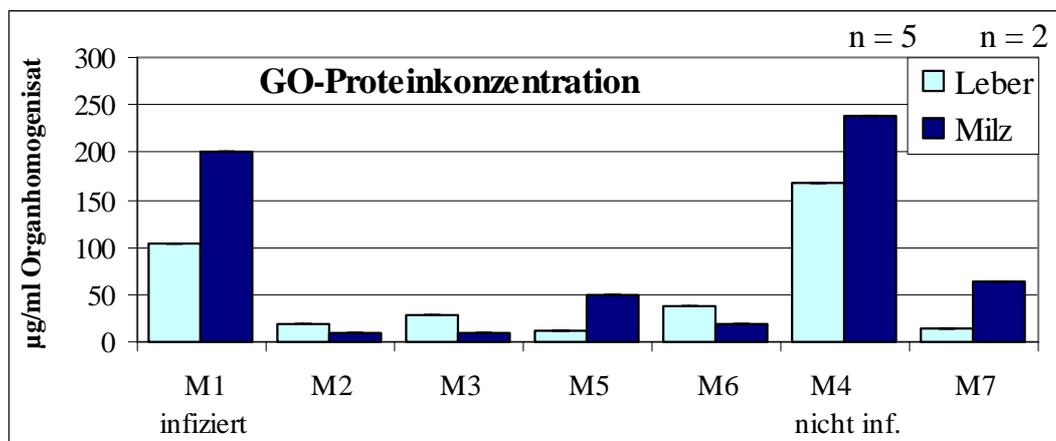


Abb. 50: GO-Proteinkonzentration bestimmt mit dem Sandwich-ELISA. Dargestellt sind die Organe, in denen GO enthalten war (Milz und Leber) mit *Staph. aureus* infizierten (inf., M1-M6) und nicht infizierten (nicht inf., M4, M7) Mäusen 24 h nach GOL-Gabe.

4.7.5. Funktionelle GO in verschiedenen Organen und Serum 24 h nach i. v.-Gabe von GOL

Dieser ELISA wurde zusätzlich zu dem Sandwich-ELISA mit den gleichen Proben durchgeführt (Abb. 51). Er war ebenfalls bei Milz und Leber der gleichen sieben behandelten Mäuse positiv. Somit war nicht nur das Vorhandensein sondern auch die Funktionalität der GO in den Organen nachgewiesen.

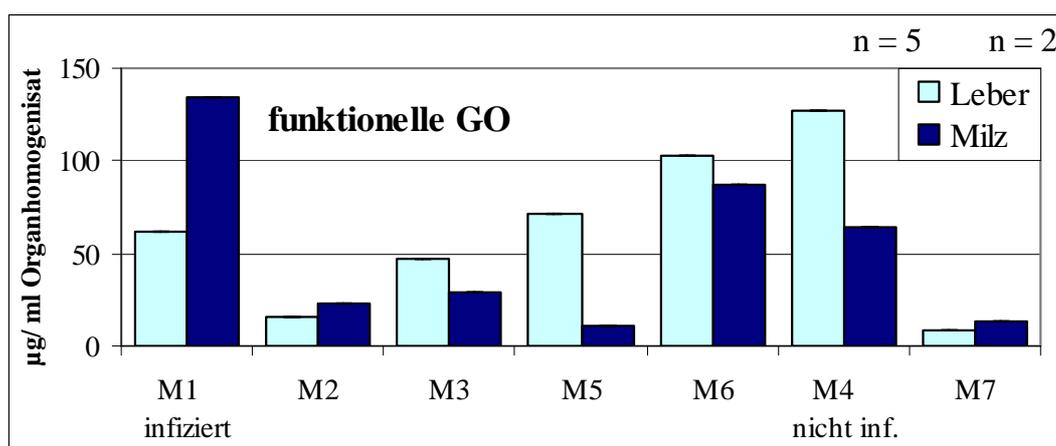


Abb. 51: Funktionelle GO bestimmt mit dem direkten ELISA. Dargestellt sind die Organe, in denen GO-Aktivität gemessen wurde (Milz und Leber) von mit *Staph. aureus* infizierten (inf., n=5, M1-M6, MW \pm SD) und gesunden (ges., n=2, M4, M7, MW \pm SD) Mäusen 24 h nach GOL-Gabe.

Insgesamt sind die Unterschiede im Gehalt an funktioneller GO geringer als bei der Messung der Proteinkonzentration. Sowohl bei den infizierten als auch bei den gesunden Tieren sind in Leber und Milz im Mittel rund 50 μ g aktive GO nachweisbar.

4.7.6. Untersuchungen auf GO-Antikörper unter *Staph. aureus* Infektion 24 h nach GOL-Gabe

Antikörper gegen GO waren im Serum der Mäuse bei diesem Versuch, wie aufgrund der Tötung nach 24 h erwartet, nicht nachweisbar.

4.7.7. Messung der Expression von Komplementrezeptoren auf Leukozyten 24 h nach der Gabe von GOL

Im Rahmen des Tierversuches wurden durchflusszytometrische Messungen im Hinblick auf die Expression von Komplementrezeptoren gemacht (vgl. Kap. 3.2.4.5). Die Messung erfolgte mit dem FACS im Kanal FL1 und FL2, die Auswertung in einer Vierfeldertafel.

Die Beurteilung ist nicht einfach, da bakterielle Infektion die Expression von Komplementrezeptoren auf der Leukozytenoberfläche beeinflussen (siehe Abb.52).

Daher wurde zum einen untersucht, ob sich die Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren unterscheidet. Zum anderen wurde die Expression bei mit GOL behandelten im Vergleich zu lediglich mit PBS behandelten infizierten und nicht infizierten Tieren untersucht.

4.7.7.1. Expression von CD 11b/ 18

Generell konnten bei der Markierung mit CD 11b CD 18 im FL1-Kanal positive Zellen (CD 18 FITC) und FL2 positive Zellen (CD 11b PE) sowie doppelt positive Zellen (CD 11b 18) unterschieden werden. Es wurden jedoch in keinem Fall einfach CD 11b positive Zellen gemessen.

Granulozyten: Abb. 52a zeigt die Expression der Komplementrezeptoren CD11b und CD 18 bei nicht infizierten Tieren, die mit GOL bzw. als Negativkontrolle mit PBS behandelt wurden. In Abb. 52b ist die Expression bei infizierten, mit GOL bzw. PBS behandelten Tieren dargestellt. Bei den nicht infizierten Tieren (Abb. 52a) wird auf rund 60% der Granulozyten lediglich CD 18 expremiert. Doppelt positiv (CD11b/18) sind rund 40%. Zwischen den behandelten (GOL) und den unbehandelten (PBS) Tieren wurde kein Unterschied gefunden. Bei den infizierten Tieren (Abb. 52b) wurden ca. 20% einfach CD18 positive Granulozyten gemessen. Doppelt positiv waren ca. 80% der Granulozyten. Es ist ebenfalls kein Einfluss der Behandlung festzustellen.

Der einfach positive Anteil (CD18) nimmt also unter der Infektion ab, der doppelt positive Anteil (CD 11b/18) deutlich zu. Die Behandlung mit GOL beeinflusste die Komplementrezeptorenexpression von CD 11b/ 18 auf Granulozyten bei der CGD-Maus nicht.

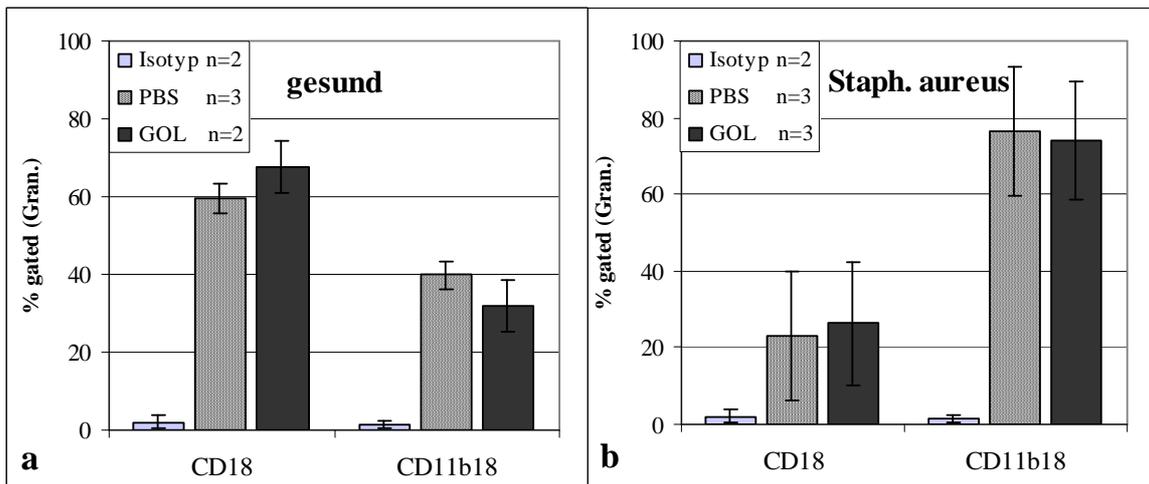


Abb. 52: Expression von CD 11b und CD 18 auf Granulozyten von gesunden (a) und mit *Staph. aureus* infizierten (b) CGD-Mäusen nach Behandlung mit PBS und GOL. Die Messung erfolgte mit dem FACS in Kanal FL1 und FL2, die Auswertung in einer Vierfeldertafel (MW±SD).

Monozyten: Bei den gesunden Tieren (Abb. 53a) sind zwischen 80 und 90%, bei den infizierten Tieren 70-80% CD 11b positiv. Doppelt positiv sind in der nicht infizierten Gruppe ca. 10% und in der infizierten Gruppe etwa 20-30%. Insgesamt sind die Werte bei der infizierten Gruppe größeren individuellen Schwankungen unterlegen.

Auf Monozyten wurde also mehr CD 11b als bei Granulozyten exprimiert, der doppelt positive Anteil stieg unter der Infektion zwar deutlich, blieb insgesamt jedoch recht gering.

Wie bei den Granulozyten konnte kein Hinweis auf einen Einfluss der Behandlung mit GOL im Hinblick auf die Komplementrezeptorenexpression festgestellt werden.

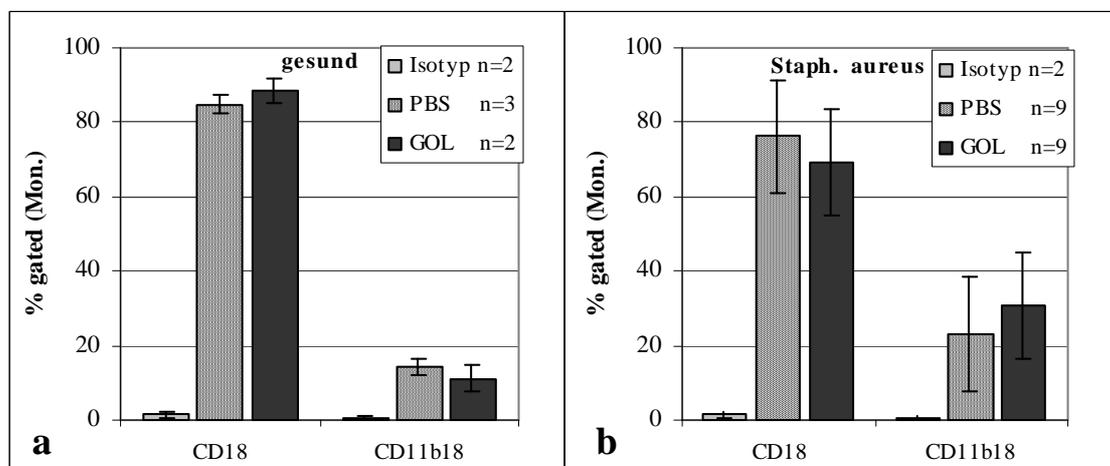


Abb. 53: Expression von CD 11b und CD 18 auf Monozyten von gesunden (a) und mit *Staph. aureus* infizierten (b) Mäusen nach Behandlung mit PBS und GOL, MW±SD

Lymphozyten: Auf über 90% der Lymphozyten (Abb. 54) gesunder wie infizierter Mäuse wurde CD 18 exprimiert, unter 5% waren doppelt positiv.

Es war kein ebenfalls Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe zu sehen.

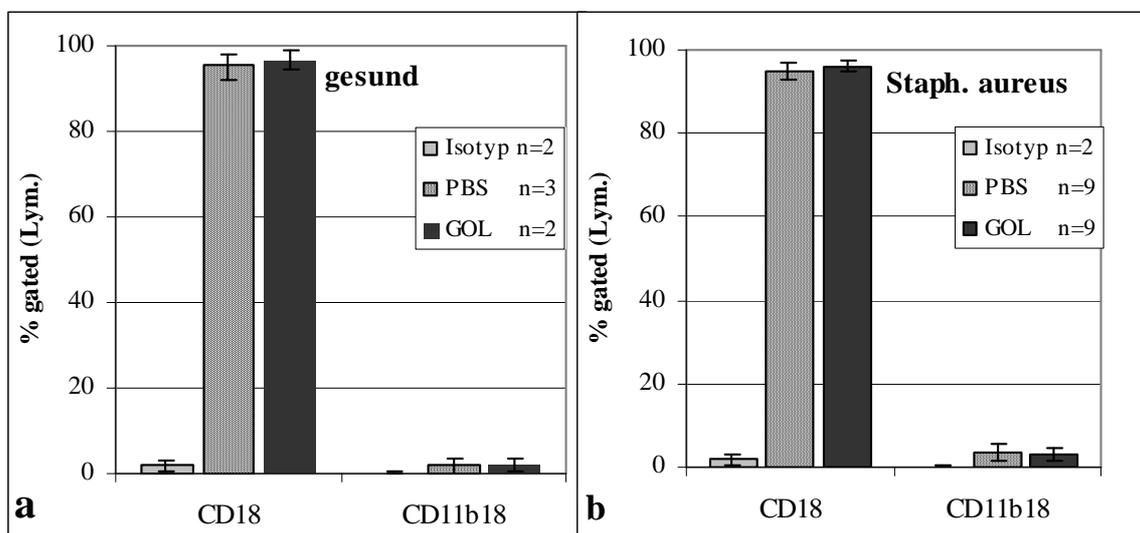


Abb. 54: Expression von CD 11b und CD 18 auf Lymphozyten von gesunden (a) und mit *Staph. aureus* infizierten (b) Mäusen nach Behandlung mit PBS und GOL, MW \pm SD

4.7.7.2. Expression von CD 21/ 35

Insgesamt waren die Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren innerhalb der Gruppen sehr groß. Die behandelte und unbehandelte Gruppe verhielt sich im Schnitt jedoch ähnlich, weswegen im Folgenden vor allem die gesunden mit den infizierten Tieren verglichen werden.

Granulozyten (Abb. 55): Bei gesunden Tieren (a) waren die Hälfte der Granulozyten CD 21/35 positiv, bei infizierten Tieren (b) nur ein Fünftel. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei gesunden Tieren die Granulozytenzahl sehr gering ist und sich die Population im Dotplot nur undeutlich darstellt. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Zellen anderer Leukozytenpopulationen miterfasst wurden.

Monozyten (Abb. 56): Sie waren bei infizierten (b) wie auch bei gesunden Tieren (a) zu 30-40% CD 21/35 positiv.

Lymphozyten (Abb. 57): Sie waren bei den gesunden (a) und bei den infizierten (b) Mäusen zu 60-80% positiv.

Insgesamt schien sich also weder das Krankheitsgeschehen noch die GOL-Gabe bei Lymphozyten und Monozyten auf die Expression von CD 21/35 auszuwirken.

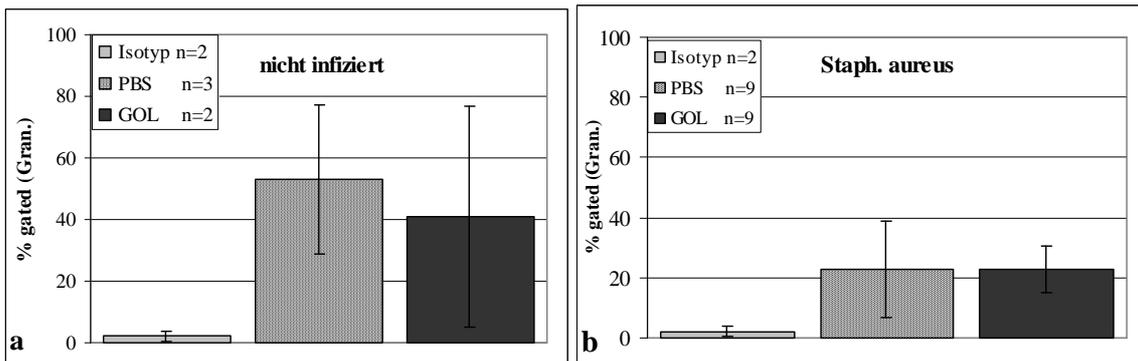


Abb. 55: Granulozyten

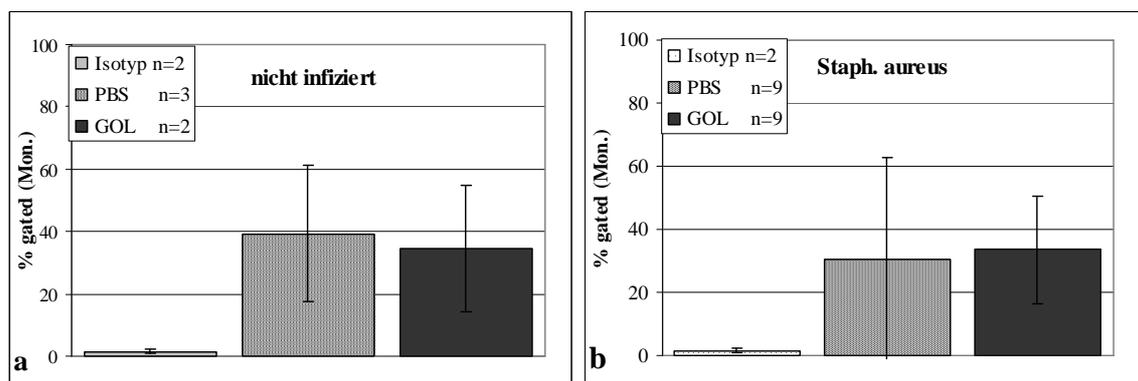


Abb. 56: Monozyten

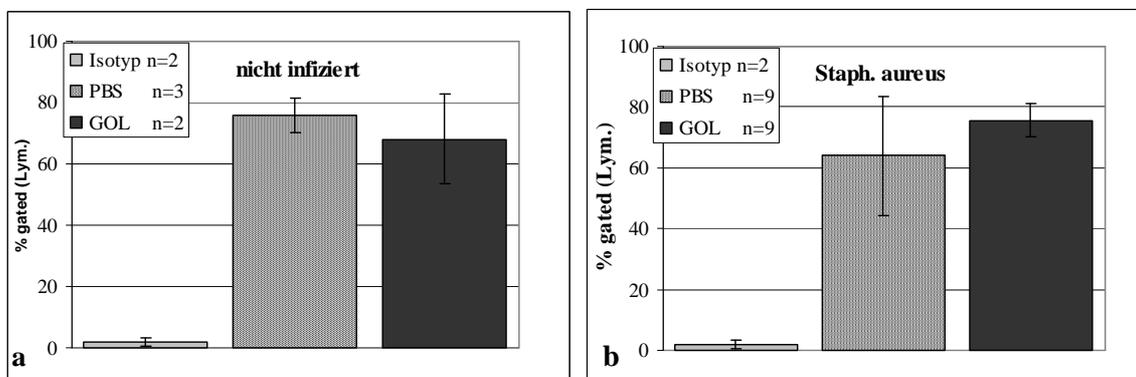


Abb. 57: Lymphozyten

Abb. 55-57: Expression von CD 21/35 auf Granulozyten (Abb. 55), Monozyten (Abb. 56) und Lymphozyten (Abb. 57) von gesunden (a) und mit *Staph. aureus* infizierten (b) Mäusen 24 h nach Behandlung mit PBS und GOL, MW \pm SD

4.8. Therapie von CGD-Mäusen mit GOL nach Infektion mit *Burkholderia cepacia*

4.8.1. Vorversuche:

Monitoring der Mäuse im Hinblick auf den Krankheitsverlauf

Es wurde nach einem in Indianapolis von Mary Dinauer eingesetzten Protokoll vorgegangen, das auf den verwendeten Stamm ausgelegt war. Es wurde also mit 10^3 KbE Burk. cepacia infiziert, tags darauf mit GOL i.p. behandelt und der Versuch an Tag 2 p. inf. beendet.

Um Einflüsse des Versuchsablaufes wie z.B. Stress durch „Handling“ einschätzen zu können, wurde auch eine nicht infizierte, lediglich mit dem Puffer PBS behandelte, Kontrolle mitgeführt. Zur Überprüfung von Nebenwirkungen der GO-Liposomen diene eine nicht infizierte behandelte Kontrolle.

Die Gewichtsschwankungen waren insgesamt recht gering. Die meisten Tiere haben leicht zugenommen, einige maximal 0,5 g abgenommen (Daten nicht gezeigt). Auffällig war das Fehlen jeglicher Krankheitsanzeichen. Das Ausplattieren des Vollblutes führte zu keinerlei Keimwachstum. Damit war zumindest das beschriebene Problem mit kontaminierenden Hautkeimen nicht aufgetreten, jedoch auch keine Sepsis nachzuweisen. Auch die Kultur aus einem Teil der Leber sowie aus der Peritoneallavage blieb negativ.

GO-Gehalt der Organe

Die zur Homogenisierung entnommenen Organe und das Serum wurden mit dem Sandwich-ELISA und dem Aktivitäts-ELISA auf ihren GO-Gehalt untersucht (Tab. 7). In der Milz und der Leber konnte GO bei zwei von fünf mit GOL behandelten und untersuchten Mäusen nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Organe und das Serum waren negativ. Die Proben der mit PBS behandelten Tiere waren erwartungsgemäß alle negativ. Auffällig war neben dem unerwarteten Fehlen jeglicher Krankheitsanzeichen, dass bei drei der fünf behandelten Tiere keine GO in den Organen nachweisbar war.

Tabelle 7: Nachweisbarkeit von GO in Leber und Milz von CGD-Mäusen nach Einfachgabe von GOLs bzw. PBS.

Zusammengefasste Tiere	d0 Inf.	1h p.inf. i.p.-Inj. GOL	Beendigung des Versuchs an Tag	GO-Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	
				Leber funktionelle GO GO-Proteingehalt	Milz funktionelle GO GO-Proteingehalt
1	-	-	2	0,0 0,0	0,0 0,0
1	-	+	2	23,6 14,5	27,2 17,7
2	+	-	2	0,0 0,0	0,0 0,0
1	+	+	2	5,2 2,2	13,7 9,7
1	+	+	2	0,0 0,0	0,0 0,0
1	+	+	0 (5h p. inf)	0,0 0,0	0,0 0,0

Die Tiere wurden an Tag 0 mit 10^3 KbE *Burk. cepacia* infiziert (+) oder mit PBS behandelt (-) eine Stunde später mit GOL (+) oder PBS (-) intraperitoneal behandelt. Die Tötung folgte an Tag 2 p.inf. und in einem Fall 5h p. inf. Einzelheiten können dem Anhang entnommen werden.

Titration der geeigneten Infektionsdosis

Nach den dargestellten Ergebnissen musste zunächst ein neues Infektionsprotokoll erarbeitet werden. In Tabelle 8 sind die Infektionsdosis, das Allgemeinbefinden und die Blutkultur als Kontrolle der Sepsis aufgetragen.

Wie aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Versuchs anzunehmen, waren bei der Infektion mit 10^3 KbE an Tag 1 und 2 keine Keime im Blut der CGD-Mäuse nachzuweisen, ebenso verhielt es sich an Tag 3. An Tag 4 waren in $10 \mu\text{l}$ Vollblut zwei KbE, an Tag 5 sechs KbE nachweisbar. An Tag 5 wurde die Maus aufgrund des schlechten Allgemeinbefindes getötet.

Bei den höheren Infektionsdosen war an Tag 2 in allen Fällen Keimwachstum in der Blutkultur nachweisbar. Bei einer Maus mit der Infektionsdosis 10^5 KbE waren an Tag 2 nur zwei KbE und an Tag 3 keine KBE nachweisbar. Bei allen anderen waren an Tag 2 zwischen 20 und 44 KbE und an Tag 3 zwischen 262 und 1458 KbE nachweisbar. Dabei hatte das Tier mit der Infektionsdosis 10^4 KbE einen massiveren Krankheitsverlauf bei höherer Keimzahl im Blut, als zwei der Tiere mit 10^5 KbE Infektionsdosis.

Tabelle 8: Allgemeinbefinden und Blutkultur nach verschiedenen Infektionsdosen.

Maus Nr.	Infektionsdosis	Tötung	Allgemeinbefinden	Burkholderia-Anzucht			
				aus 10 μ l Vollblut (d1=0)	[KbE]		
				d2	d3	d4	d5
M1	10 ³	d5	d3 gut d4 Fell etwas stumpf, leicht aufgekürmmte Haltung d5 schlecht	0	0	2	6
M2	10 ⁴	d3	d2 gut d3 vollkommen apathisch, aufgekürmmte Haltung u. stumpfes Fell	20	1458		
M3	10 ⁵	d3	d2 gut, d3 matt, aufgekürmmte Haltung und etwas stumpfes Fell	2	0		
M4	10 ⁵	d3	d2 gut, d3 apathisch, aufgekürmmte Haltung und stumpfes Fell	44	262		
M5	10 ⁵	d3	d2 gut, d3 sehr apathisch, aufgekürmmte Haltung u. stumpfes Fell	29	1616		

Die Tiere wurden an Tag 0 mit 10³, 10⁴ bzw 10⁵ (n=3) KbE Burk. cepacia i.p. infiziert. Die Tötung erfolgte bei deutlicher Störung des Allgemeinbefindens. Einzelheiten können dem Anhang entnommen werden.

Neben dem Verhalten und dem Haarkleid wurde das Gewicht als Parameter für den Gesundheitszustand erhoben. Der Gewichtsverlauf ist in Abbildung 58 dargestellt. Bei der niedrigen Dosis von 10³ KBE ist das Gewicht an Tag 2 noch über dem Ausgangsgewicht. Danach nahm das Tier jedoch deutlich ab und wurde an Tag 5 wegen schlechten Allgemeinbefindens getötet.

Bei den höheren Infektionsdosen (10⁴ bzw. 10⁵) setzten Gewichtsverlust und Verschlechterung des Allgemeinzustandes rascher ein. Die Tiere wurden aus diesem Grund an Tag 3 getötet.

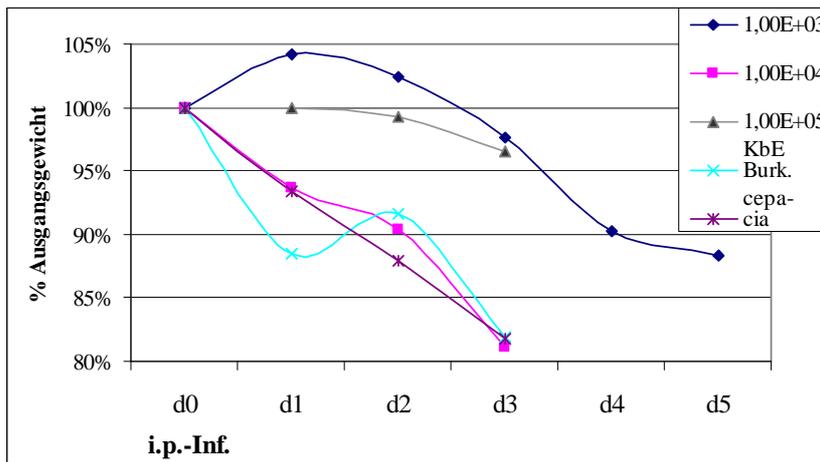


Abb. 58: Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Die Infektionsdosis ist als KbE Burk. cepacia angegeben und wurde in 100 µl PBS i. p. an Tag 0 gegeben. Die Tiere wurden nach deutlichem Gewichtsverlust oder deutlich gestörtem Allgemeinbefinden getötet.

Der Infektionsversuch sollte zeigen, ob die Bakterienkultur aus Peritoneallavage und Lebergewebe bei der *Burk. cepacia*-Infektion ein geeigneter Parameter für die Schwere der Erkrankung darstellt (Abb. 59).

Die Keimzahl in der Leber war stets deutlich höher als in der Peritoneallavage. Bei Maus 3, die mit dem am geringsten gestörten Allgemeinbefinden getötet worden war, waren lediglich eine geringe Anzahl Keime in der Leber und keine Keime in der Peritoneallavage nachweisbar. Bei allen anderen Mäusen waren deutlich Keime in der Peritoneallavage und extrem hohe Keimzahlen in der Leber nachweisbar.

Beide Parameter scheinen also mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren.

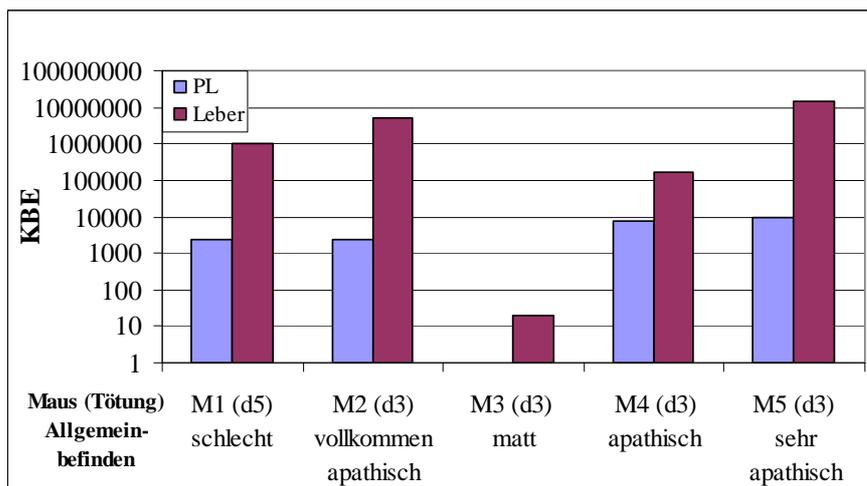


Abb. 59: Bakterienkultur aus Leber und Peritoneallavage, Keimzahl [KbE/ ml PL bzw. Leberhomogenisat] im Vergleich zum Allgemeinbefinden der jeweiligen Maus (M) zum Zeitpunkt der Tötung (d).

4.8.2. Therapieversuche mit GOL

4.8.2.1. Therapieversuch 1: Intraperitoneale Einfachgabe von GOL nach Infektion mit 10^5 KbE *Burk. cepacia*

Aufgrund des Ergebnisses des Infektionsversuches (Kap. 4.8.1.1) wurde für den nächsten Therapieversuch eine Infektionsdosis von 10^5 KbE gewählt. Die GOL wurden den CGD-Mäusen eine Stunde nach der intraperitonealen Infektion ebenfalls i.p. verabreicht. Die Tötung erfolgte bei deutlich gestörtem Allgemeinbefinden.

Die Überlebensdauer, der Keimgehalt von Blut, Leber und Peritoneallavage sowie die Gewichtsentwicklung wurden als Maß für den therapeutischen Erfolg gewählt.

Wie aus der Tabelle 9 zu entnehmen ist, war die mittlere Überlebensdauer beider Gruppen (GOL-Behandlung bzw. PBS-Kontrolle) etwa gleich. Die einzelnen Todeszeitpunkte jedoch waren sehr unterschiedlich.

GO konnte nur bei der nicht infizierten behandelten Kontrolle und bei einem infizierten, behandelten und an Tag 4 getöteten Tier nachgewiesen werden. Allerdings waren die Werte alle sehr nahe an der Nachweisgrenze. Die intraperitoneale Applikationsform und das späte Töten der Tiere macht den Nachweis in diesem Fall recht schwierig.

Tabelle 9: Überlebensdauer und Nachweisbarkeit von GO in Leber und Milz nach Einfachgabe von GOLs bei CGD-Mäusen.

Zusammen- gefasste Tiere	Infektion	1h p.inf. i.p.-Inj. GOL	Überlebens- dauer (Tage)	GO-Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	
				Leber funktionelle GO GO-Proteingehalt	Milz funktionelle GO GO-Proteingehalt
1	-	+	7 (Versuchsende)	2,0	2,0
				1,2	1,8
6	+	-	3,4,5,6,7(n=2)	0,0	0,0
				0,0	0,0
Überlebensdauer unbehandelt				5,5 +/- 1,6 d	
1	+	+	4	0,8	2,0
5	+	+	3,5,6(n=2),7	0,7	1,0
				0,0	0,0
Überlebensdauer behandelt				5,17 +/- 1,9 d	

Die Tiere wurden an Tag 0 mit 10^5 KbE *Burk. cepacia* infiziert (+) oder mit PBS behandelt (-) eine Stunde später mit GOL (+) oder PBS (-) intraperitoneal behandelt. Die Tötung folgte bei schlechtem Allgemeinbefinden. Einzelheiten können dem Anhang entnommen werden.

Die Gewichtsentwicklung ist in Abb. 60 lediglich im Gruppenmittel gezeigt. Getötete Tiere wurden jeweils bis zum Tötungstag berücksichtigt.

In dieser etwas vereinfachten Darstellungsform wird besonders deutlich, dass es keine nennenswerten Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe gab. Beide verloren im Mittel konstant an Gewicht. Das Erreichen eines nicht zu verantwortenden Gewichtsverlustes spielte als Tötungskriterium an den letzten beiden Tagen eine Rolle.

Die nicht infizierte, aber mit GOL behandelte Kontrolle war in ihrem Gewicht sehr stabil.

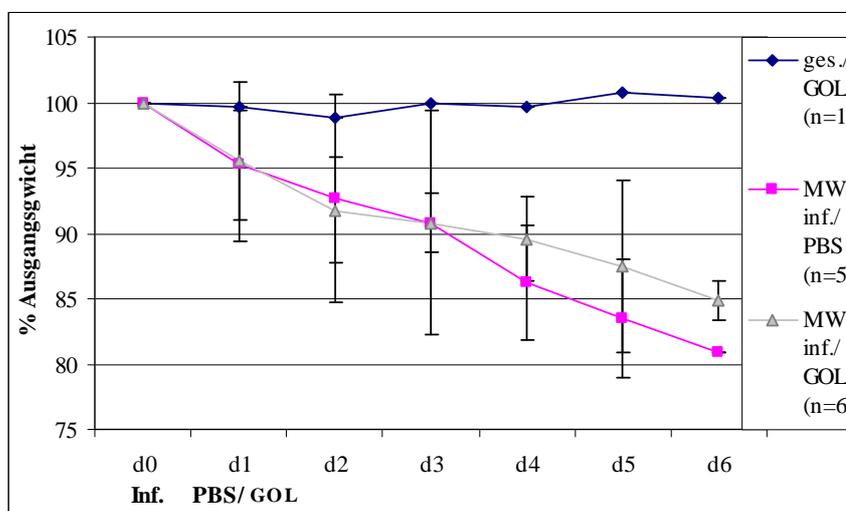


Abb. 60: Gewichtsentwicklung der CGD-Mäuse nach Infektion mit 10^5 KBE *Burk. cepacia* (inf.) und Einfachgabe von GOL bzw. PBS im Vergleich zur nicht infizierten (ges.), mit GOL behandelte Kontrolle. Getötete Tiere wurden lediglich bis zum Tag der Tötung berücksichtigt. MW \pm SD

Anzahl der Mäuse: d0-d2: inf./ PBS	n=6	inf./GOL:	n=6
d3:	n=5		n=5
d4:	n=4		n=4
d5:	n=3		n=3
d6:	n=2		n=1

4.8.2.2. Therapieversuch 2: GOL vorinkubiertes Vollblut i.p., gefolgt von zwei GOL-Gaben in dreistündigem Abstand

Da bei dem in 4.8.2.1. beschriebenen Versuchsprotokoll der therapeutische Erfolg ausblieb, wurde in diesem Ansatz die therapeutische Applikationsform verändert, um bessere Erfolge zu erzielen. Es wurde eine Dreifachgabe (vgl. Tab. 10) gewählt, wobei bei der ersten Gabe Blut einer Spendermaus 10 min mit der gleichen Menge GOL vorinkubiert und dann eine Stunde nach der Infektion lokal (i.p.) gegeben wurde. Drei Stunden danach wurden GOL intravenös und nochmals drei Stunden danach i.p. verabreicht.

Tabelle 10: Therapieschema 2

Tag 1, t=0	t = 1h p. inf.	t= 4h p. inf	t= 7h p. inf
Infektion	mit GOL vorinkubiertes Spenderblut i.p.	GOL i.v.	GOL i.p.

Tabelle 11 zeigt die Verteilung der GO in den Organen. Bei diesem Behandlungsschema war bei den vier mit GOL behandelten, aber nicht infizierten Tieren, deren Organe zur Messung zur Verfügung standen, in der Leber GO nachweisbar. Bei drei Tieren dieser Gruppe war GO auch in der Milz nachweisbar, jeweils in etwas geringeren Konzentrationen als in der Leber.

Bei den drei infizierten und behandelten Tieren waren die gemessenen Werte an der Nachweisgrenze, obwohl sie am gleichen Tag oder einen Tag vor der Kontrolle getötet wurden. Bei der nicht infizierten aber mit GOL behandelten Kontrolle lagen die Werte also deutlich höher.

Der Zeitpunkt, an dem das Allgemeinbefinden der Tiere die Tötung erforderlich machte, variierte zwischen den einzelnen Tieren recht deutlich. Auch unter dieser massiven Therapie war kein Unterschied zwischen behandelter und unbehandelte Gruppe festzustellen (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Überlebensdauer und Nachweisbarkeit von GO in Organen nach 3-fach-Gabe.

Zusammen- gefasste Tiere	d0 Inf.	1, 4, 7h p. inf. GOL	Überlebensdauer (Tage)	GO-Gehalt [µg/ml]	
				Leber funktionelle GO GO-Proteingehalt	Milz funktionelle GO GO-Proteingehalt
1	-	+	"7" (Ende)	9,4	8,3
				7,7	6,6
4	+	-	4,7 (n=3)	0	0
				0	0
Überlebensdauer unbehandelt (n=4)			6,25 +/- 1,5 d		
1	+	+	7	0,8	0
1	+	+	7	0,9	0
				1,2	0,8
2	+	+	6	1,2	0,8
				keine Proben, gestorben	
Überlebensdauer behandelt (n=4)			6,5 +/- 0,6 d		

Die Tiere wurden an Tag 0 infiziert (+) oder mit PBS behandelt (-) und eine Stunde später mit GOL vorinkubiertem Blut einer CGD Spendermaus (+) oder mit PBS vorinkubiertem Blut einer CGD-Spendermaus (-) intraperitoneal, und nach 4 h i.v. und nach 7 h i.p. mit GOL (+) bzw. PBS (-) behandelt. Die Tötung folgte bei schlechtem Allgemeinbefinden. Dargestellt sind nur Organe, in denen GO nachzuweisen war (Leber und Milz). Einzelheiten können dem Anhang entnommen werden.

Gewichtsentwicklung (Abb. 61): Es spiegelte sich der individuell sehr unterschiedliche Verlauf der Erkrankung (M2- M9), aber die insgesamt ähnliche Tendenz im Verlauf bei den beiden Gruppen wieder.

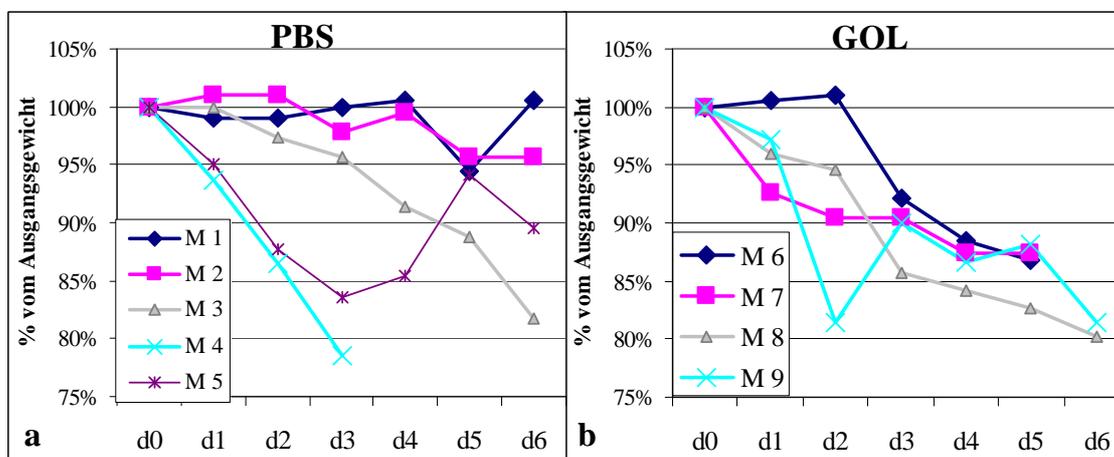


Abb. 61: Gewichtsentwicklung und Versuchsende bei PBS- (a) bzw. GOL-Gabe (b) nach dem in Tab. 10 beschriebenen Infektions- und Therapieprotokoll. Es sind die einzelnen Mäuse (M1: ohne Infektion, M2-M9: Infektion mit 10^5 KbE *Burk. cepacia*) dargestellt.

In diesem Versuch wurde deutlich, dass die Blutkultur (Tab. 12) als Monitoring-Maßnahme zwar sinnvoll ist, jedoch massive Verschlechterungen damit nicht immer vorauszusehen sind.

In der behandelten Gruppe sind in zwei Fällen Mäuse über Nacht gestorben. Davon war bei der zwei Tage zuvor entnommenen Blutprobe bei einer Maus noch kein, bei der anderen lediglich minimales Keimwachstum (2 KBE) festzustellen. Die Blutkultur vom Vortag wies jedoch in beiden Fällen hohe Keimzahlen auf. Zwei Mäuse aus der nicht therapierten Gruppe konnten trotz deutlicher Sepsis (11 bzw. 16 KbE in 10 μ l Vollblut) noch einen weiteren Tag am Leben gelassen werden und hatten dann am Tötungstag sehr hohe Keimzahlen im Blut (558 bzw. 764 KbE). Drei Mäuse wurden aufgrund des schlechten Allgemeinbefindens getötet, ohne dass auf der Platte vom Vortag Keime nachweisbar waren. Zwei davon (eine aus der PBS-, eine aus der GOL-Gruppe) hatten zum Zeitpunkt der Tötung geringe Bakterienzahlen (1 bzw. 6 KbE) und eine Maus (GOL Gruppe) eine hohe Bakterienzahl (100 KbE) im Blut.

Im Verlauf der Sepsis war kein Unterschied zwischen der behandelten Gruppe und der PBS-Kontrolle zu erkennen.

Tabelle 12:

KbE in 10 µl Vollblut am jeweiligen Versuchstag. Die Mäuse 2-5 wurden mit PBS, die Mäuse 6-9 mit GOL behandelt. Die nicht infizierte Negativkontrolle (M1) war stets negativ, die Blutproben an Tag 0 und 1 ebenfalls.

	d2	d3	d4	d5	d6
PBS					
M 2	0	0	0	0	1
M 3	0	0	0	16	558
M 4	1	56	-	-	-
M 5	0	0	0	11	764
GOL					
M 6	0	0	0	70	-
M 7	0	0	2	428	-
M 8	0	0	0	0	6
M 9	0	0	0	0	100

Keimgehalt in Leber und Peritoneallavage (Abb. 62)

Die höchste Keimzahl in der Leber wurde zwar bei der Maus mit dem schlechtesten Allgemeinzustand bei der Tötung gefunden. Allerdings schwankten die Werte der Kultur der Peritoneallavage sehr stark. Auch sind die Keimzahlen der Leberkultur teilweise bei Tieren, die ein ähnliches Allgemeinbefinden aufwiesen, unterschiedlich.

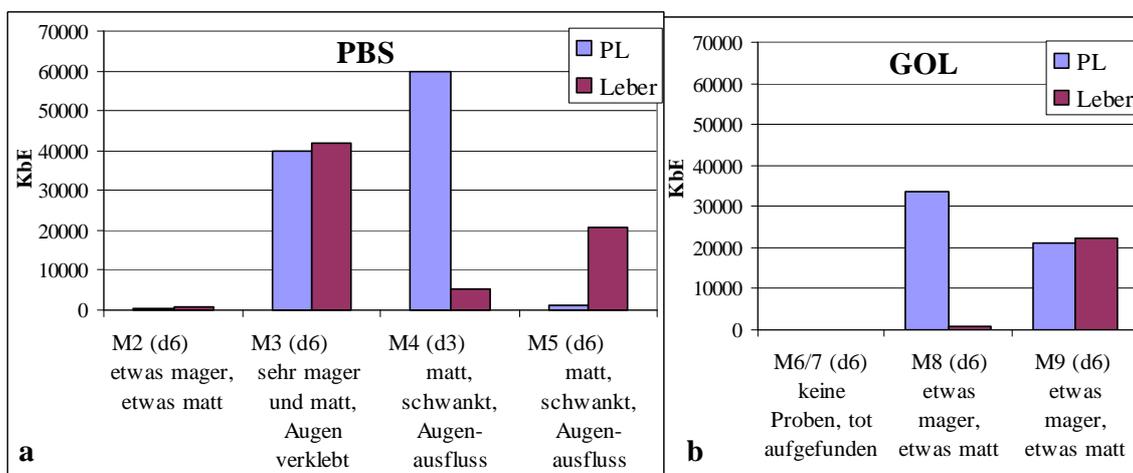


Abb. 62 : Bakterienkultur aus Leber und Peritoneallavage, Infektionsdosis 10^5 KbE , Gabe von PBS (a) bzw. GOL (b) gemäß Tab. 10 Angabe der Keimzahl [KbE/ml PL bzw. Organhomogenisat] im Vergleich zum Allgemeinbefinden der jeweiligen Maus (M) zum Zeitpunkt der Tötung (d).

4.8.3. Untersuchung auf GO-Ak im Serum nach GOL-Gabe

Lediglich bei den drei nach dem Therapieprotokoll 2 (Tab. 10) behandelten CGD-Mäusen waren mit Hilfe des Ak-ELISAs Antikörpertiter im Serum der GOL-behandelten CGD-Mäuse nachweisbar (Tab. 13). Bei den Einfachgaben kam es, trotz der teilweise recht späten Tötungszeitpunkte, zu keiner messbaren Antikörperbildung.

Tabelle 13: Antikörpertiter gegen GO bei nach Therapieprotokoll 2 (Tab 10) mit GOL behandelten CGD-Mäusen.

CGD-Maus	Titer	Infektion	GOL
M1	1:16	nicht infiziert	3-fach-Gabe je 1h p. inf + VB 4 u. 7h p.inf
M8	1:128	Burk. cepacia	
M9	1:16	Burk. cepacia	

4.9. Aufnahme von proteingekoppelten EPC:Chol-Liposomen in Vollblut und isolierte Leukozyten

In dieser Versuchsreihe wurde die Aufnahme der in Freiburg von Markus Gantert neu entwickelten, proteingekoppelten Liposomen (Durchmesser 100 nm - 160 nm) untersucht. Die genauen Eigenschaften der eingesetzten Liposomen sind in Kap. 2.1.2. aufgelistet.

Die Aufnahmeversuche wurden überwiegend in Vollblutproben bzw. an isolierten Zellen gesunder Probanden in HBSS durchgeführt, die Aufnahme bei CGD-Patienten und Mäusen ist in Kap. 4.9.6. dargestellt.

4.9.1. Aufnahme von IgG-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen in Vollblut und Leukozyten im Vergleich zur Aufnahme konventioneller EPC:Chol-Liposomen

Zeitabhängigkeit der Aufnahme IgG-gekoppelter Liposomen

In Abbildung 63 ist die Zeitabhängigkeit der Aufnahme IgG-gekoppelter Liposomen in Vollblutproben sowie in Gesamtleukozyten nach Erythrozytenlyse, resuspendiert in HBSS, dargestellt. Die Aufnahme der IgG-gekoppelten Liposomen im Vollblut erfolgte sehr rasch: Bereits nach 30 Minuten Inkubation mit IgG-Liposomen ist ein Großteil der Granulozyten (Abb. 63a) positiv (knapp 80%). Nach 120 min sind über 90% positiv. Bei den Monozyten (Abb. 63b) und Lymphozyten (Abb. 63c) ist nach 30 Minuten keine weitere Steigerung mehr zu beobachten. Allerdings ist der Schwankungsbereich bei den Lymphozyten bei Werten durchweg unter 12% sehr hoch.

Im Gegensatz zu den sehr hohen Aufnahmen in Vollblut findet in HBSS bei Granulozyten keine, bei Monozyten und Lymphozyten fast keine Aufnahme statt (unter 10%).

Es ist zu beachten, dass dieser Versuch zwei Tage nach Produktion stattfand. Die Aufnahme in Monozyten war deutlich höher als einen Tag nach der Produktion (Abb. 64).

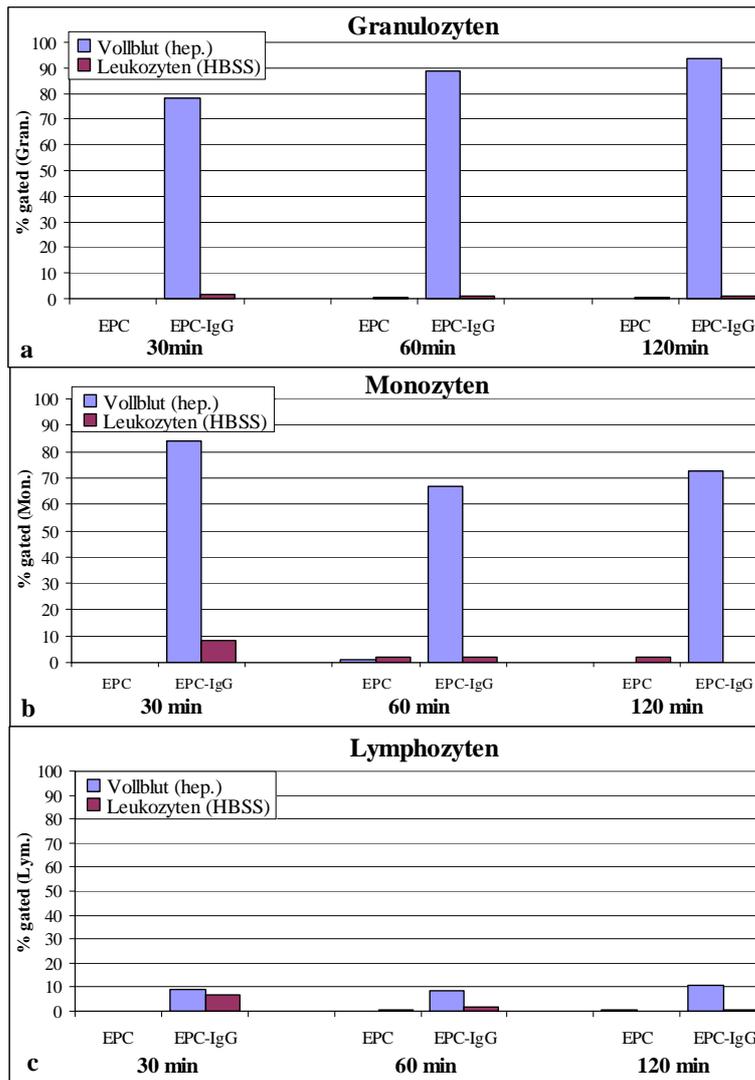


Abb. 63:
Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate:
a) Granulozyten,
b) Monozyten,
c) Lymphozyten
nach 30 min, 60 min und 120 min Inkubation von heparinisiertem Vollblut (hep.) oder Gesamtleukozyten nach Erythrozytenlyse in HBSS mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-Liposomen mit und ohne Kopplung von humanem IgG. Die Aufnahme fand zwei Tage nach der Präparation statt.

In Abbildung 64 ist die Aufnahme von IgG-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen im Vergleich zu konventionellen EPC:Chol-Liposomen durch Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im Vollblut bzw. durch mit Histopaque isolierte Granulozyten bzw. PBMC in HBSS nach 60-minütiger Inkubation dargestellt. Versuche mit dem Blut von Spender 1 wurden einen Tag, mit dem Blut von Spender 2 zwei Tage nach der Präparation der Liposomen durchgeführt.

Wie in Abb. 64a deutlich zu sehen ist, wurden unter den gewählten Versuchsbedingungen nur die IgG-gekoppelten kleinen EPC:Chol-Liposomen in Granulozyten in deutlichem Maße (> 60%) aufgenommen. Allerdings war auffällig, dass das nur bei Inkubation im Vollblut, nicht bei Verwendung von isolierten, in HBSS resuspendierten Granulozyten stattfand. Die Werte der Aufnahme für konventionelle EPC:Chol-Liposomen sind extrem gering.

Analoge Werte ergaben sich bei einem der beiden Blutspender bei der Aufnahme der eingesetzten Liposomen in Monozyten (Abb. 64b).

Bei Spender 1 (Abb. 64b) blieb die Aufnahme von IgG-gekoppelten Liposomen in Monozyten der Vollblutprobe aus. Mögliche Ursachen werden in Kapitel 5.6.1 besprochen.

Der Anteil der positiven Zellen am Lymphozytengate nach Inkubation mit IgG-gekoppelten Liposomen war zwar relativ zu den anderen Liposomenpräparationen am höchsten, blieb aber in allen Fällen unter 10% (Abb. 64c).

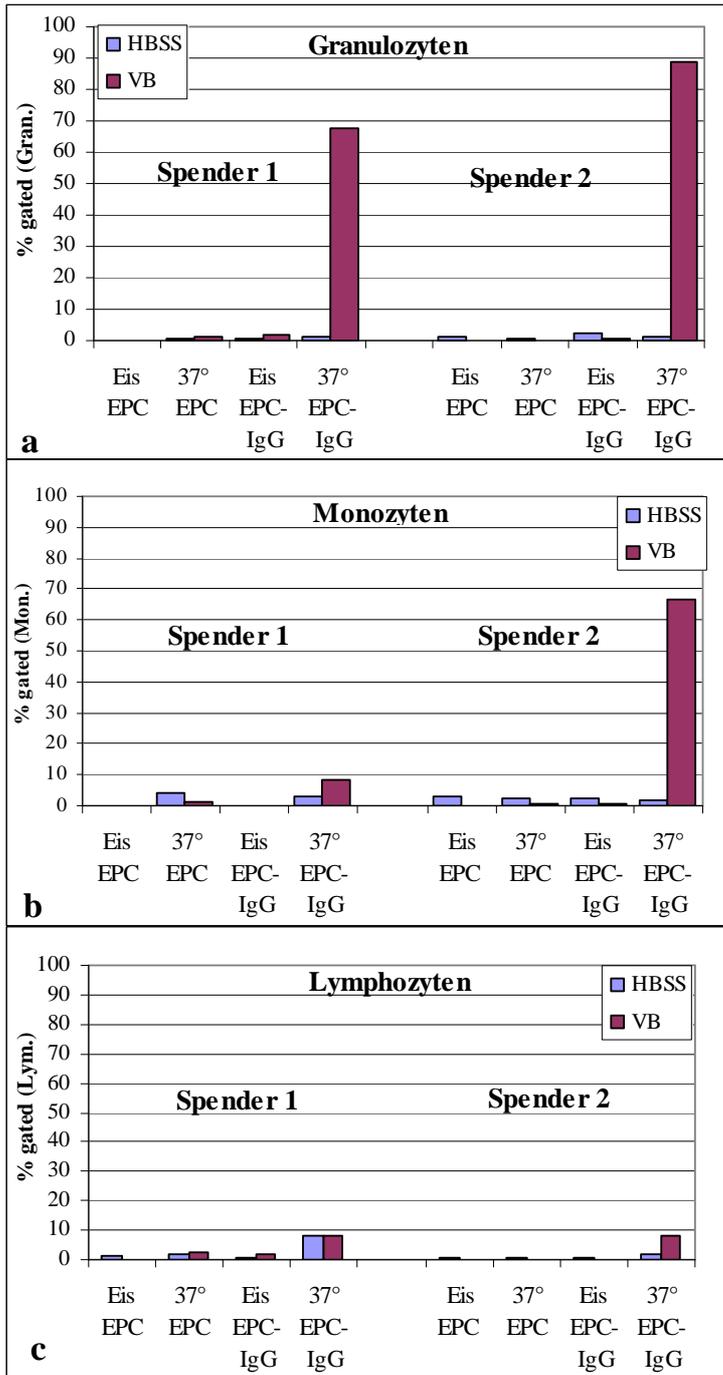


Abb. 64:
 Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate:
 a) Granulozyten,
 b) Monozyten,
 c) Lymphozyten
 nach 60 min Inkubation von Vollblut [VB] oder isolierten Granulozyten (Spender 1) bzw. PBMC (Spender 2) in HBSS mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-Liposomen mit und ohne Kopplung von humanem IgG. Die Aufnahme fand bei 37°C statt, als Negativkontrolle dienten Ansätze auf Eis. Die Aufnahme in Blut von Spender 1 fand einen, in Blut von Spender 2 zwei Tage nach Produktion der Liposomen statt.

4.9.2. Rolle des Serums/ Plasmas bei der Aufnahme von Liposomen

Es wurde überprüft, wie sich neben Puffer (HBSS) inaktiviertes und natives Serum und Plasma auf die Aufnahme von kleinen, gekoppelten Liposomen in mit Histopaque isolierte Granulozyten auswirkt (Abb. 65).

Dazu wurden IgG-gekoppelte und konventionelle Liposomen mit Vollblut sowie mit isolierten Granulozyten (in HBSS, nativem bzw. hitzedenaturiertem autologem Serum/ Heparinplasma resuspendiert) 60 Minuten lang inkubiert. Wie aus Abbildung 65 zu ersehen ist, erwies sich die Gegenwart von nativem Serum bzw. Heparinplasma als absolut notwendig für die effektive Aufnahme der IgG-gekoppelten Liposomen in Granulozyten. In hitzeinaktiviertem Serum fand keine Aufnahme statt. Die konventionellen Liposomen wurden in keinem Ansatz aufgenommen.

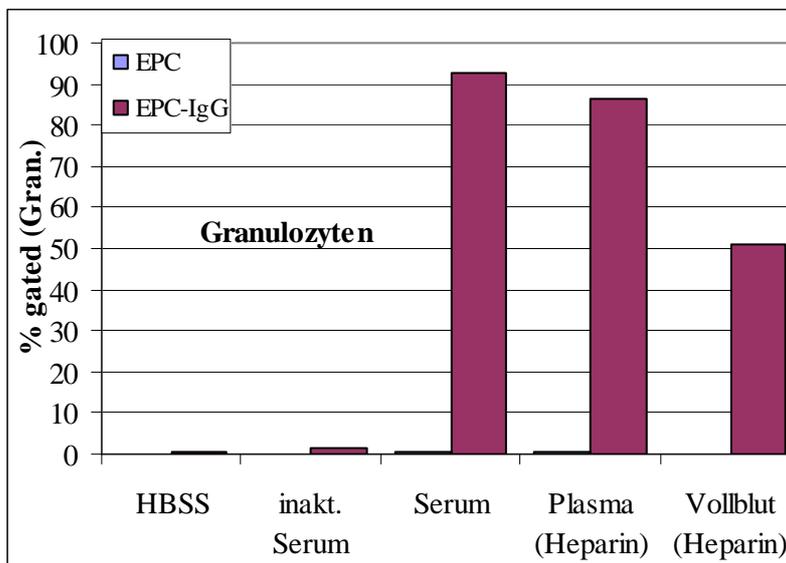


Abb. 65:

Anteil positiver Granulozyten nach 60 min Inkubation in HBSS, inaktiviertem Serum, Serum und Plasma sowie in Vollblut mit jeweils 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten, konventionellen EPC:Chol-Liposomen und EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem humanem IgG. Die Aufnahme fand in Vollblut bzw. isolierten Zellen der gleichen Person zwei Tage nach der Liposomenproduktion statt.

4.9.3. Vergleich der Aufnahme von IgG-gekoppelten mit BSA-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen in Vollblut und isolierte Granulozyten

Die Versuche mit IgG-gekoppelten Liposomen haben gezeigt, dass die Kopplung von IgG an die Liposomenoberfläche die Aufnahme in Leukozyten in Vollblut bzw. Serum oder Plasma um ein Vielfaches erhöht. Um zu überprüfen, ob dies spezifisch für eine IgG-Kopplung ist, wurde parallel dazu mit BSA-gekoppelten Liposomen gearbeitet. Wie aus Abbildung 66, insbesondere bei Betrachtung der Serum- und Plasma-Ansätze, zu entnehmen ist, wird durch die Kopplung von BSA an die EPC:Chol-Liposomen der gleiche Effekt wie durch Kopplung mit IgG erzielt. Die Aufnahme von kleinen

EPC:Chol-Liposomen ohne Kopplung war nicht nachweisbar, und wird daher im Folgenden nicht mehr dargestellt.

IgG-gekoppelte und BSA-gekoppelte Liposomen wurden von isolierten Granulozyten in PBS oder inaktiviertem Serum nicht aufgenommen. Bei isolierten Granulozyten in Plasma oder Serum war die Anzahl der positiven Zellen höher als im Vollblut.

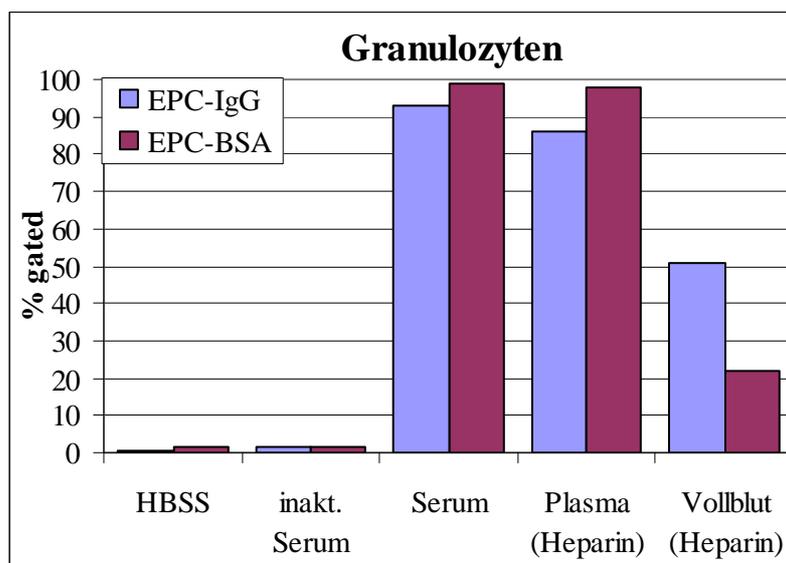


Abb. 66:

Anteil positiver Granulozyten nach 60 min Inkubation in HBSS, inaktiviertem Serum, Serum und Plasma sowie in Vollblut mit jeweils 1mM 0,5mol% Rhodamin-markierten EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem humanem IgG und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA.

Die Aufnahme fand in Vollblut bzw. isolierten Zellen der gleichen Person mit zwei Tage alten Liposomen statt.

4.9.4. Kinetik der Aufnahme verschiedener gekoppelter und ungekoppelter EPC-Chol-Liposomen in Vollblut

In dieser Versuchsserie wurden verschiedene Parameter variiert (Abb.67):

- Die Aufnahme der verschiedenen Liposomen in Vollblut wurde nach 5, 30 und 60-minütiger Inkubationszeit gemessen.
- Die Aufnahme folgender Liposomenpräparationen (siehe 3.1.2.4.) in die Zellen wurde verglichen:
 - große EPC:Chol-Liposomen
 - Ankerliposomen (siehe Glossar)
 - BSA-gekoppelte EPC:Chol-Liposomen
 - HSA-gekoppelte EPC:Chol-Liposomen
 - sowie IgG-gekoppelte EPC-Liposomen mit ähnlichen, aber unterschiedlichen IgG-Konzentrationen ($\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol Lipid}$).

Bei dieser Versuchsreihe wurden IgG-gekoppelte EPC:Chol-Liposomen mit unterschiedlichem IgG-Gehalt verwendet.

Als zusätzliches Vergleichsprotein wurde neben BSA hier auch humanes Serumalbumin (HSA) verwendet. Die Angabe der gekoppelten Proteinmenge ist als μg Protein pro μmol Lipid angegeben (*= μg Protein/ μmol Lipid).

Kinetik der Aufnahme der verschiedenen Liposomenpräparationen in Vollblutproben

Die Kinetik der Aufnahme der verschiedenen Liposomenpräparationen wurde an Vollblutproben mit 5 Tage alten Liposomen durchgeführt (Abb. 67).

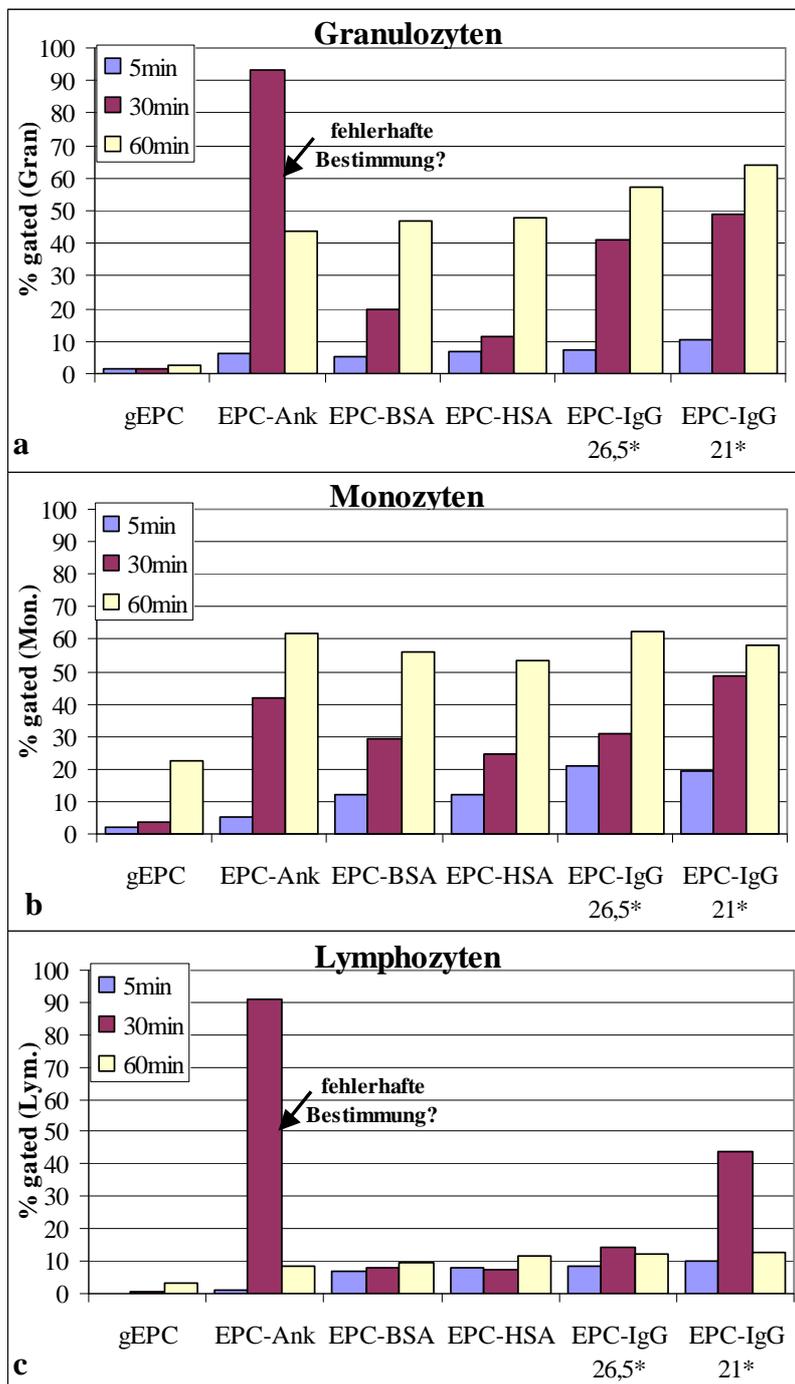


Abb. 67: Anteil positiver Granulozyten (a), Monozyten (b) und Lymphozyten (c) nach 5 min, 30 min und 60 min Inkubation in Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten großen konventionellen EPC:Chol-, Anker-, EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA bzw. HSA und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit 26,5 bzw. 21 μg humanem IgG/ μmol Lipid* (Vgl. Kap. 3.1.2.4.3.) Die konventionellen EPC:Chol-Liposomen wurden nicht aufgenommen und sind daher nicht dargestellt. Die Aufnahme fand in Vollblut an Tag 5 nach Produktion statt.

Bei den Granulozyten (Abb. 67a) ist, mit Ausnahme der Ankerliposomen, nach 30 Minuten für alle Liposomentypen eine Zeitabhängigkeit der Aufnahme zu erkennen. Bei den Monozyten ist die Zeitabhängigkeit für alle Liposomentypen deutlich (Abb. 67b). Bei den Lymphozyten (Abb. 67c) blieben die meisten Werte unter 10%. Auffällig hoch waren die Werte nach 30 min mit 91% bei den Anker- und mit 44% bei IgG 21*-Liposomen. Da es sich um eine einfache Bestimmung handelt, kann ein Fehler bei der Messung nicht ausgeschlossen werden.

4.9.5. Aufnahme von IgG- und HSA-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen unterschiedlichen Proteingehalts in Vollblutproben und isolierte Leukozyten

Bei dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss der an die Liposomen gekoppelten Proteinmenge und -art auf die Aufnahme in Blutzellen vertiefend untersucht werden. Die mit Proteinen gekoppelten Liposomen waren zum Zeitpunkt der Versuchsreihe 2 Tage alt. Die als Vergleich verwendeten großen konventionellen Liposomen (gEPC) waren 8 Tage alt. Die Versuche wurden jeweils als Doppelansatz in Vollblut und isolierten Zellen durchgeführt. Die isolierten Zellen wurden entweder in HBSS oder in inaktiviertes bzw. natives Serum aufgenommen.

Mit der gleichen Liposomencharge wurden vier Tage später nochmals Versuche gemacht, um den Einfluss der Alterung der Liposomen auf die Aufnahme zu untersuchen (siehe Kap. 4.9.6.).

Granulozyten (Abb. 68a): Bei Inkubation in HBSS und inaktiviertem Serum war bei keiner der Liposomenpräparationen ein positives Signal nachweisbar. Die Aufnahme von großen EPC:Chol-Liposomen war bei isolierten Granulozyten nicht und in Vollblut kaum nachweisbar. Ankerliposomen wurden mit 20% in isolierten Granulozyten in Serum und 30% in Vollblut recht deutlich aufgenommen. EPC:Chol-HSA 13,25-Liposomen wurden mit 30% in Serum und 40% in Vollblut besser aufgenommen. Die Vollblutwerte für EPC:Chol-HSA 26,5 und EPC:Chol-IgG 6,25 waren ebenfalls bei rund 40%, die Seruminkubation deutlich höher als die Vollblutwerte.

EPC:Chol-IgG 3,25-Liposomen wurden in Vollblut mit 50% am besten aufgenommen, in Serum unterschieden sie sich nicht wesentlich von EPC:Chol-HSA 26,5 und EPC:Chol-IgG 6,5.

Monozyten (Abb. 68b): Es fielen vor allem hohe, den gekoppelten Liposomen vergleichbare Werte bei den Ankerliposomen auf.

Lymphozyten (Abb. 68c): Eine Aufnahme von gEPC war nicht nachweisbar. Sonst lagen die Werte zwischen 5% und 15%.

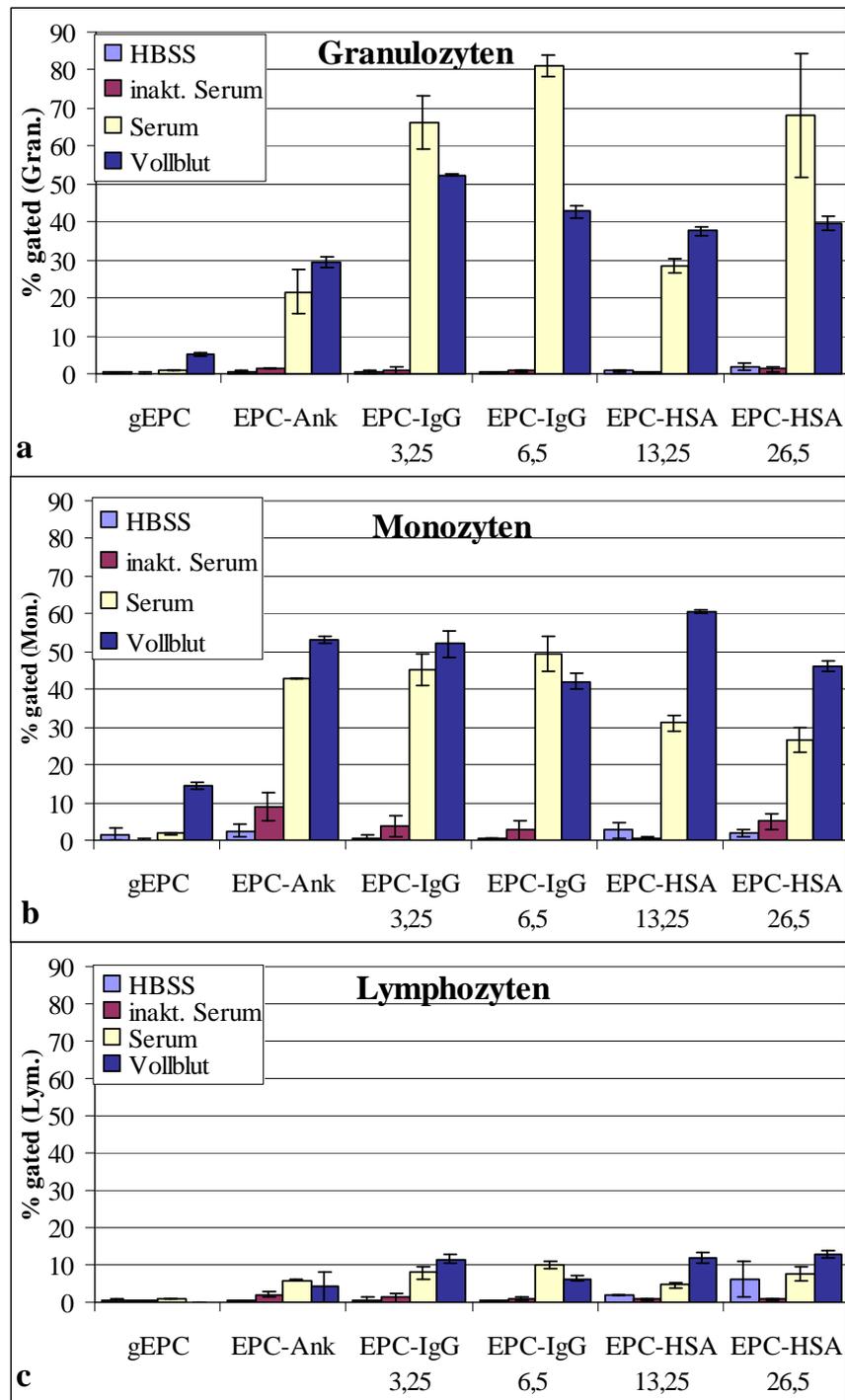


Abb. 68: Anteil positiver Granulozyten (a), Monozyten (b) und Lymphozyten (c) nach 60 min Inkubation bei 37°C in HBSS, inaktiviertem Serum, Serum und Vollblut mit jeweils 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten konventionellen EPC:Chol-Liposomen, Ankerliposomen, EPC:Chol-Liposomen mit 3,25 bzw. 13,25 µg/µmol humanem IgG und EPC:Chol-Liposomen mit 13,25 bzw. 26,5 µg/µmol HSA (vgl. Kap. 3.1.2.4.3.). n = 2, MW ± SD

4.9.6. Einfluss des Alters von gekoppelten Liposomen auf die Aufnahme

Konventionelle Liposomen sind nach ihrer Herstellung mindestens vier Wochen stabil. Die in Kap. 4.4 verwendeten Präparationen sind i. d. R. deutlich jünger. Lediglich die in Kap. 4.4.1.1. und 4. verwendeten Liposomen waren gut 4 Wochen bei 4° C gelagert worden. Dort fielen hohe Aufnahmen der EPC:EPC:Chol:PEG-Liposomen auf.

Bei gekoppelten Liposomen zeigen Daten von Markus Gantert ein Größenwachstum bis 72h nach der Produktion (persönliche Mitteilung). Frisch präparierte gekoppelte Liposomen (Alter ein Tag) standen nur für einen Versuch zur Verfügung (Kap.4.9.1). Die wesentlichen Unterschiede zur Aufnahme an Tag 2 ist in Abb. 69 verdeutlicht. Auffällig war vor allem das Fehlen der Aufnahme in Monozyten an Tag 1.

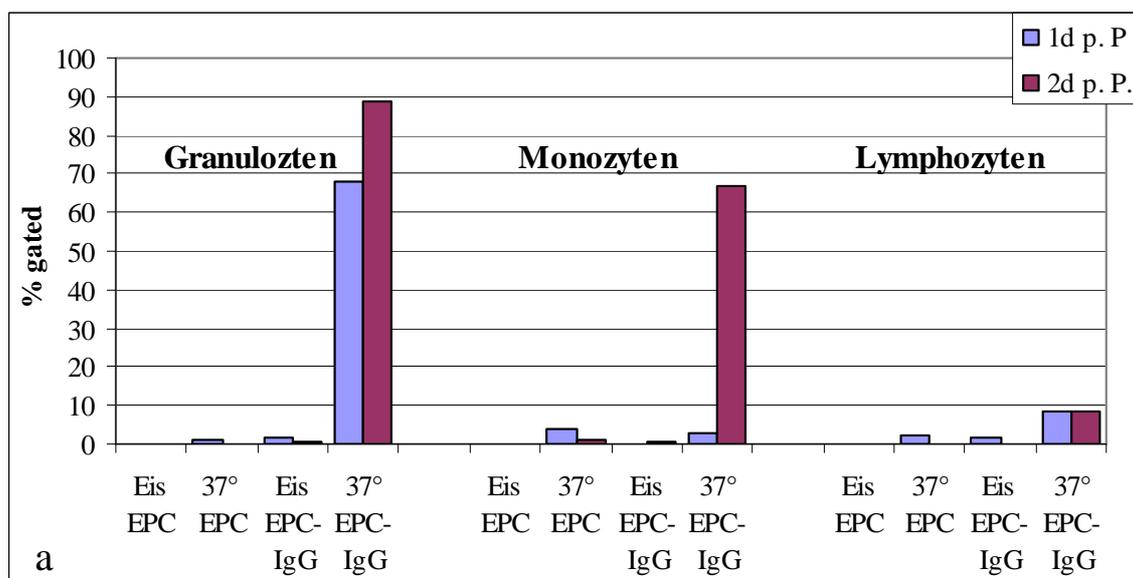


Abb. 69: Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate nach 60min Inkubation von heparinisiertem Vollblut mit 1mM 0,5mol% Rhodamin-markierten kleinen EPC:Chol-Liposomen mit und ohne Kopplung von humanem IgG. Die Aufnahme fand 1 bzw. 2 Tage post praeparationem (d. p. P.) der Liposomen statt. Die beiden Blutspenden stammten von der gleichen Person und wurden unmittelbar vor dem jeweiligen Versuch abgenommen.

Vergleich der Aufnahme von 2 und 6 Tage alten gekoppelten Liposomen zweier Chargen

Bei zwei Chargen wurden Aufnahmeversuche direkt nach der Ankunft der Liposomen (= d2) und vier Tage später (= d6) gemacht. Es werden die Vollblutinkubationen gegenübergestellt.

Die Aufnahmen an Tag 2 und 6 der Charge aus Kap. 4.9.3. ist in Abbildung 70 dargestellt. Verwendet wurden EPC:Chol-, IgG- und BSA-EPC:Chol-Liposomen. Bei den kleinen konventionellen EPC:Chol-Liposomen ohne Kopplung war keine Aufnahme nachweisbar.

Die Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter der Liposomen sind lediglich bei Monozyten sehr deutlich. Sechs Tage alte Liposomen wurden besser aufgenommen als zwei Tage alte.

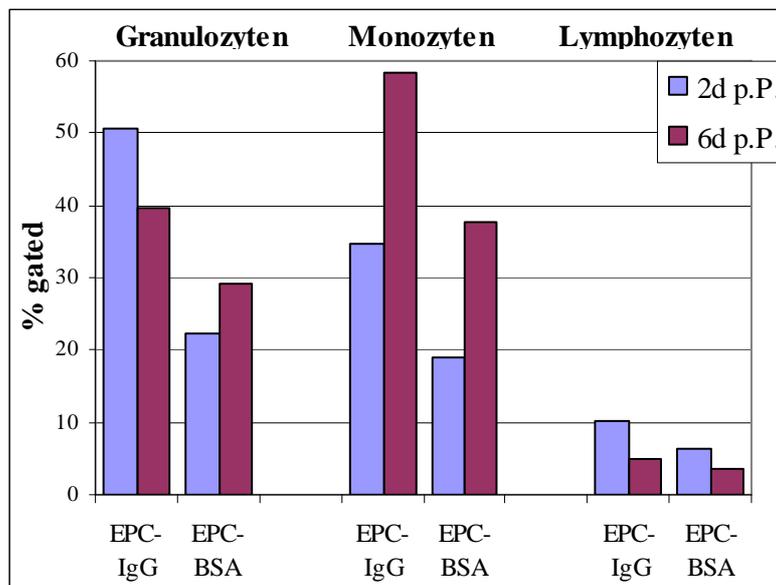


Abb. 70:

Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate nach 60 min Inkubation von Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten, EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem humanem IgG und EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA. Die Aufnahme fand unter Verwendung von zwei und sechs Tage alten Liposomen statt (p. P = post praeparationem). n = 1

In Abb. 71 sind die Vollblutinkubationen mit Liposomen aus Kap. 4.9.5. aufgeschlüsselt nach dem Alter der Liposomen dargestellt. Die Lagerdauer im überprüften Zeitraum hatte auf die Aufnahme in Granulozyten (Abb. 71a), Monozyten (Abb. 71b) und Lymphozyten (Abb. 71c) keinen Einfluss.

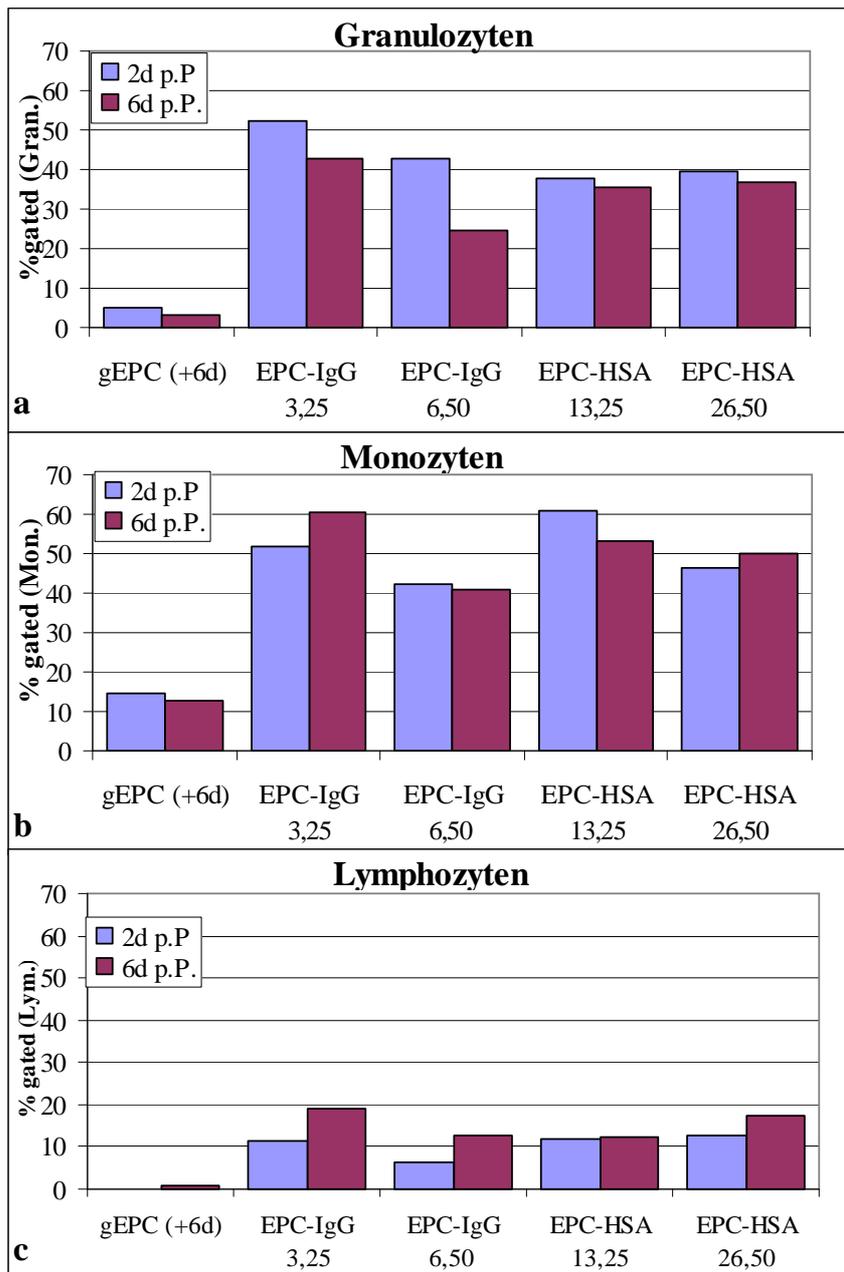


Abb. 71: Anteil positiver Granulozyten (a), Monozyten (b) und Lymphozyten (c) nach 60 min Inkubation in Vollblut mit jeweils 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten konventionellen EPC:Chol-Liposomen, EPC:Chol-Liposomen mit 3,25 bzw. 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ humanem IgG und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit 13,25 bzw. 26,5 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ HSA, 2 bzw. 6 Tage alte Liposomen (p. P.), 2 verschiedene Spender, n=1

Vergleich der Aufnahme von 4 und 5 Tage alten gekoppelten Liposomen

In Abb. 72 sind die Aufnahmedaten von bisher noch nicht dargestellten Liposomenchargen (vgl. Kap. 3.1.2.4) bei Verwendung von Vollblut im Hinblick auf das Alter der Liposomen zusammengestellt. Es fällt auf, dass EPC-IgG 26,5* an Tag 4 nach der Produktion den anderen Liposomentypen deutlich überlegen ist. An Tag 5 werden alle gekoppelten Liposomen etwa gleich gut aufgenommen.

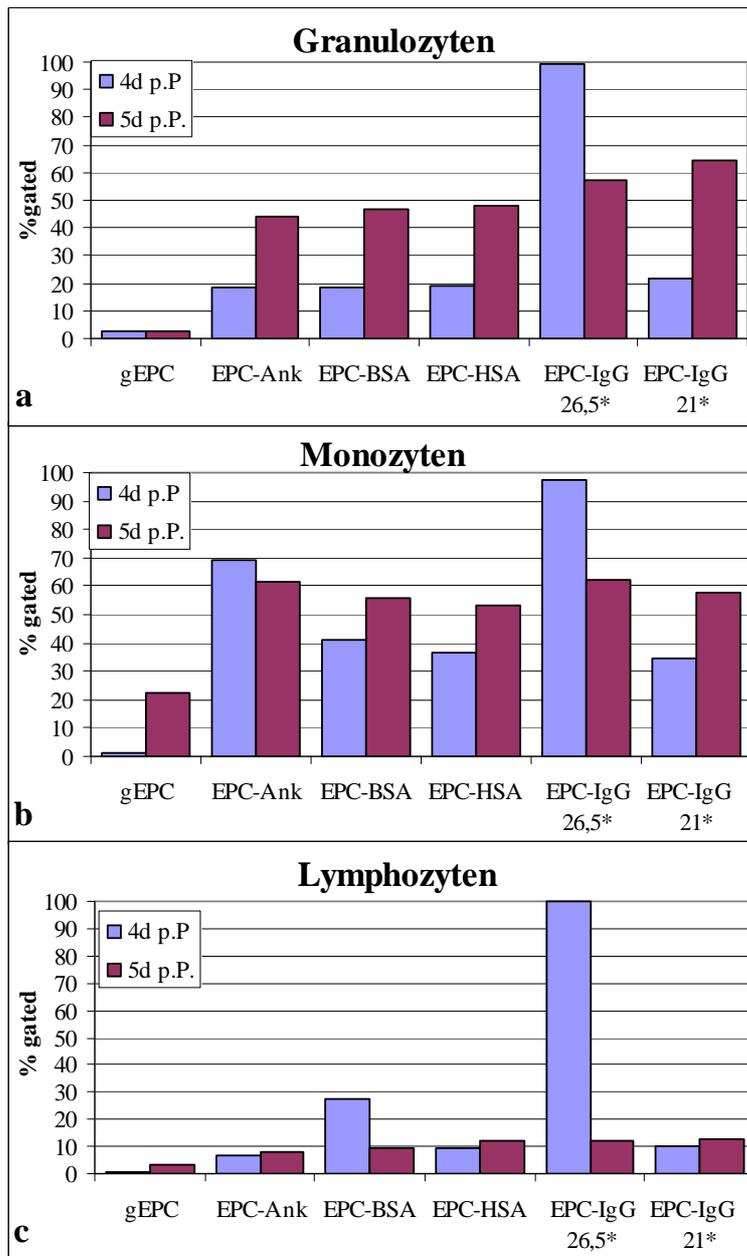


Abb. 72:

Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate unter Verwendung von 4 und 5 Tage alten Liposomen (p. P = post praeparationem).

- a) Granulozyten,
- b) Monozyten,
- c) Lymphozyten

nach 60 min Inkubation in Vollblut mit je 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten großen konventionellen EPC:Chol-Liposomen, Ankerliposomen, kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA bzw. HSA und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit 26,5 bzw. 21 μ g humanem IgG/ μ mol Lipid*. Die Aufnahme fand in Vollblut verschiedener Spender statt.

Aufnahme der Liposomen in Abhängigkeit von ihrem Alter bei CGD-Mäusen

Es wurden mit murinem IgG gekoppelte EPC:Chol-Liposomen verwendet, die drei bzw. acht Tage nach der Präparation für den Versuch zum Einsatz kamen (vgl. Kap. 4.9.8.). Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 37°C in Vollblut (Abb. 73).

Granulozyten: Die 3 Tage alten konventionellen EPC:Chol-Liposomen wurden kaum aufgenommen. Die 3 Tage alten gekoppelten Liposomen wurden gut aufgenommen, die EPC:Chol-IgG-Liposomen etwas besser als die EPC:Chol-BSA-Liposomen. Bei den 8 Tage alten Liposomen war zwischen den gekoppelten und den konventionellen großen EPC:Chol-Liposomen kaum ein Unterschied festzustellen.

Monozyten: An Tag 3 wurden konventionelle Liposomen kaum und EPC:Chol-IgG-Liposomen (40%) deutlich besser als die EPC:Chol-BSA-Liposomen (25%) aufgenommen. An Tag 8 hingegen lagen die Werte für die gekoppelten Liposomen nahe beieinander (30%).

Lymphozyten: Die Aufnahme der gekoppelten Liposomen ist an Tag 8 höher als an Tag 3.

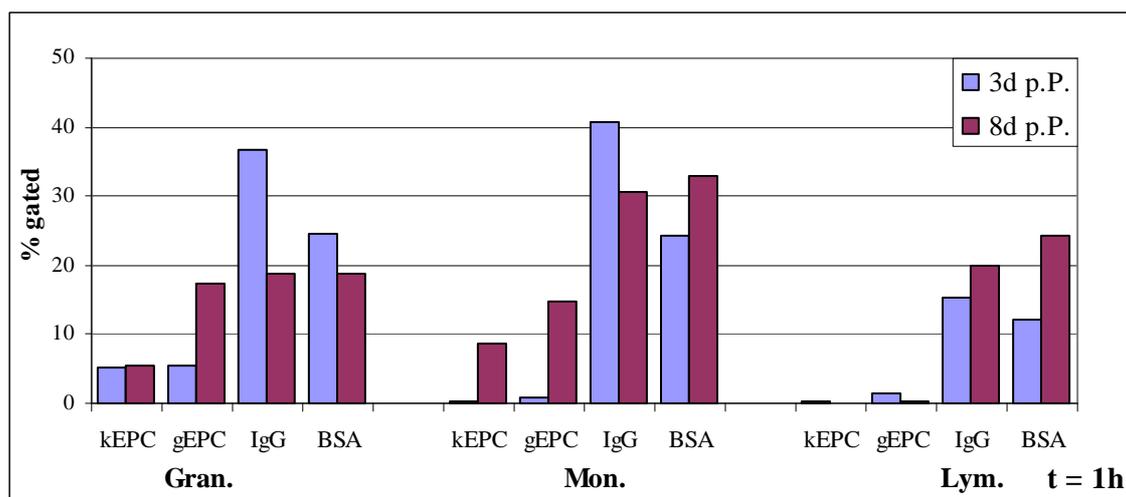


Abb. 73: Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate unter Verwendung von drei und acht Tage alten Liposomen (p. P.). Die Inkubation erfolgte über 60 min in murinem Vollblut mit 1 mM 0,5 mol% Rhodamin-markierten, kleinen EPC:Chol-Liposomen (kEPC), großen EPC:Chol-Liposomen (gEPC), kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem murinem IgG und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA. n = 1

4.9.7. Aufnahme von EPC:Chol-Liposomen mit und ohne verschiedene über PEG gekoppelte Proteine nach Vorinkubation von humanem Vollblut mit nativem und hitzeaggregiertem IgG

Derksen et al. (1986) beschrieb Aufnahmeversuche mit IgG-gekoppelten Liposomen in Kupferschen Sternzellen. Dabei wurde die Aufnahme durch hitzeaggregiertes IgG gehemmt, nicht jedoch durch gleiche Mengen BSA (vgl. Kap. 3.2.4.3.2.). Rezeptoren für das Fc-Stück von Antikörpern gibt es sowohl auf Monozyten als auch auf neutrophilen Granulozyten (Messner et al 1970). IgG-Antikörper können unterschiedlich gut an die zwei Zelltypen binden, wobei auch die Antikörperdichte eine Rolle spielt. In diesem Versuch soll überprüft werden, ob eine Fc-Rezeptor vermittelte Aufnahme stattfindet. Diese könnte durch hitzeaggregiertes bzw. massiv im Überschuss vorkommendes IgG hemmbar sein.

Im Unterschied zu den bisherigen Aufnahmeversuchen wurde das Vollblut durch die Vorinkubation mit nativer bzw. inaktivierter IgG-Lösung 1:2 verdünnt. Daher wurde auch das Vollblut der Kontrolle mit 0,9%iger NaCl-Lösung ebenfalls 1:2 verdünnt. Die Ergebnisse sind in Abb. 74 dargestellt.

Granulozyten: Die Aufnahme von HSA-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen wurde durch hitzeaggregiertes und natives IgG nicht beeinflusst. Die Aufnahme von IgG-gekoppelten EPC:Chol-Liposomen wurde durch natives IgG, und die Aufnahme von EPC:Chol-Liposomen wurde durch aggregiertes IgG etwas begünstigt.

Monozyten: Nach Vorinkubation mit nativem IgG sank die Aufnahme von EPC:Chol-HSA-Liposomen auf etwa die Hälfte und von EPC:Chol-IgG-Liposomen auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes. Die Vorinkubation mit hitzeaggregiertem IgG führte sogar zu noch etwas stärkeren Hemmeffekten.

Lymphozyten: Der Hemmeffekt bei Lymphozyten war sogar noch deutlicher als bei den Monozyten.

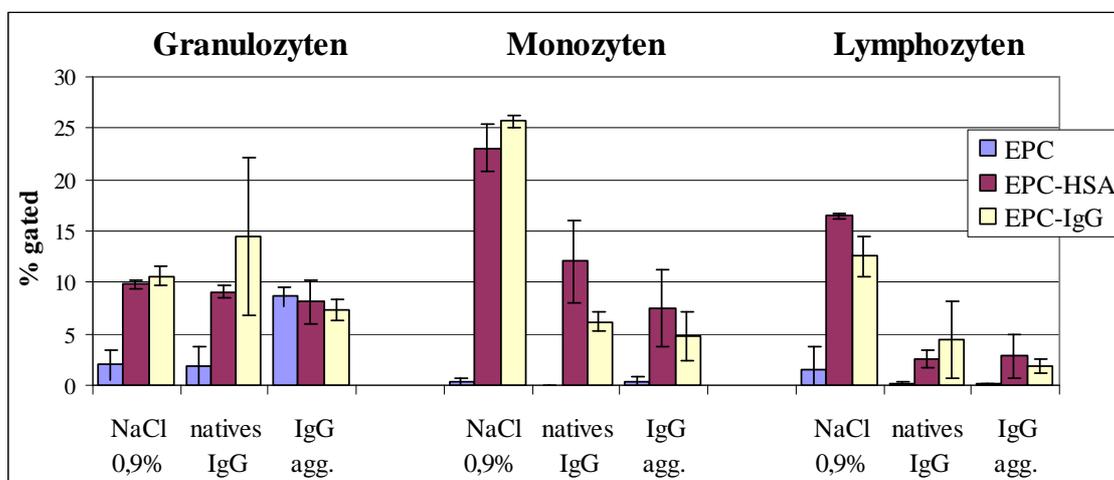


Abb. 77: Positiver Anteil am jeweiligen Gate nach 15-minütiger Vorinkubation von Vollblut mit NaCl 0,9%, nativem IgG und hitzeaggregiertem IgG (agg.) und anschließender einstündiger Inkubation mit EPC:Chol-, HSA- und IgG-EPC:Chol-Liposomen. Es wurde Vollblut von einem Spender im Dreifachansatz ($n=3$, $MW \pm SD$) verwendet.

4.9.8. Aufnahme verschiedener Liposomenpräparationen in Vollblutproben von CGD-Patienten und CGD-Mäusen

Für die folgenden Versuche wurde jeweils homologes IgG, also humanes IgG für die Aufnahmeversuche mit Blut des CGD-Patienten und murines IgG für die Aufnahmeversuche mit Blut von CGD-Mäusen, verwendet. Als Vergleichsprotein wurde BSA eingesetzt (Kap. 3.1.2.4.3.).

4.9.8.1. Aufnahme in Vollblut eines CGD-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Probanden

Die folgenden Inkubationen (Abb. 75) wurden über 1 h bei 37°C mit 1 mM Liposomenkonzentration in Vollblut eines gesunden Spenders (Abb. 75a) und eines CGD-Patienten (Abb. 75b) durchgeführt.

Zwischen dem gesunden Spender und dem CGD-Patienten sind praktisch keine Unterschiede festzustellen. Es kam weder bei Verwendung von kleinen noch von großen konventionellen EPC:Chol-Liposomen zu einer nennenswerten Aufnahme. Die gekoppelten Liposomen wurden sowohl von den normalen als auch von den NADPH-defizienten Granulozyten und Monozyten sehr gut aufgenommen.

Die Aufnahme von gekoppelten Liposomen in Lymphozyten ist gering.

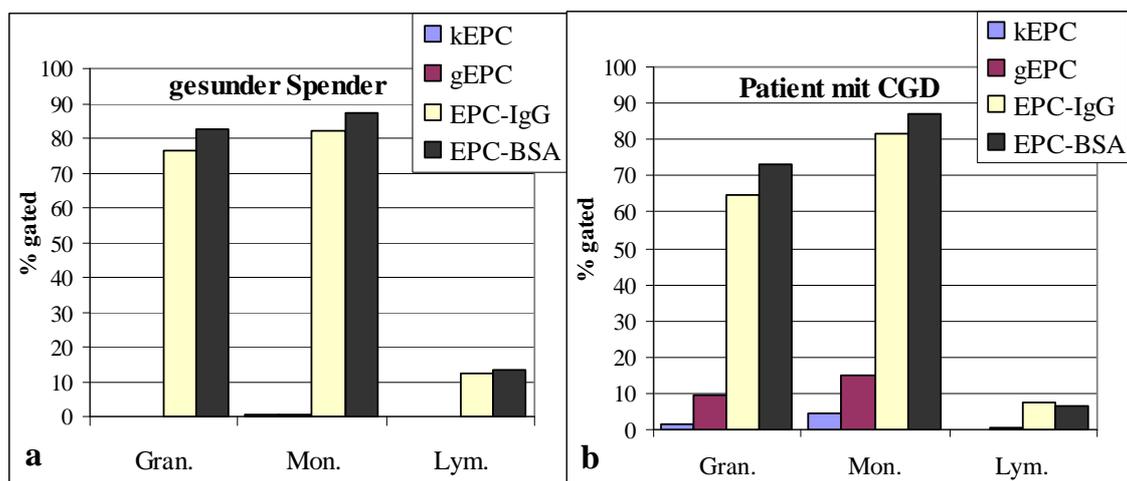


Abb. 75: Vergleich der Aufnahme verschiedener Liposomenpräparationen in Leukozyten eines gesunden Spenders (a) und eines Patienten mit CGD (b). Die Endkonzentration der 0,5 mol% Rhodamin-markierten kleinen (kEPC) sowie großen (gEPC) konventionellen EPC:Chol-Liposomen, kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem humanem IgG (EPC-IgG) und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA (EPC-BSA) betrug 1 mM. Die Versuche mit dem Blut des gesunden Spenders wurden mit 3 Tage alten, die des CGD-Patienten mit 4 Tage alten Liposomen derselben Charge durchgeführt. n = 1

4.9.8.2. Aufnahme der Liposomen in Vollblut von CGD-Mäusen im Vergleich zur Aufnahme in Vollblut eines CGD-Patienten

Um zu untersuchen, ob sich das Blut des Mausmodells trotz der bereits erwähnten Unterschiede im Blutbild (Kap. 4.3.2.) in Bezug auf die Zellpopulationen mit Menschenblut vergleichen lässt, wurde die Aufnahme von gekoppelten Liposomen in Vollblut einer CGD-Maus mit der Aufnahme in Vollblut eines CGD-Patienten verglichen. Die Liposomen waren beim Mausversuch 3 Tage, beim Menschen 4 Tage alt.

Die Aufnahmen erwiesen sich bei diesem Versuch bei der Maus als tendenziell meist geringer als beim Menschen. Im Mausblut wurden im Gegensatz zu den menschlichen Blutproben die IgG-EPC:Chol-Liposomen etwas besser als die BSA-EPC:Chol-Liposomen aufgenommen.

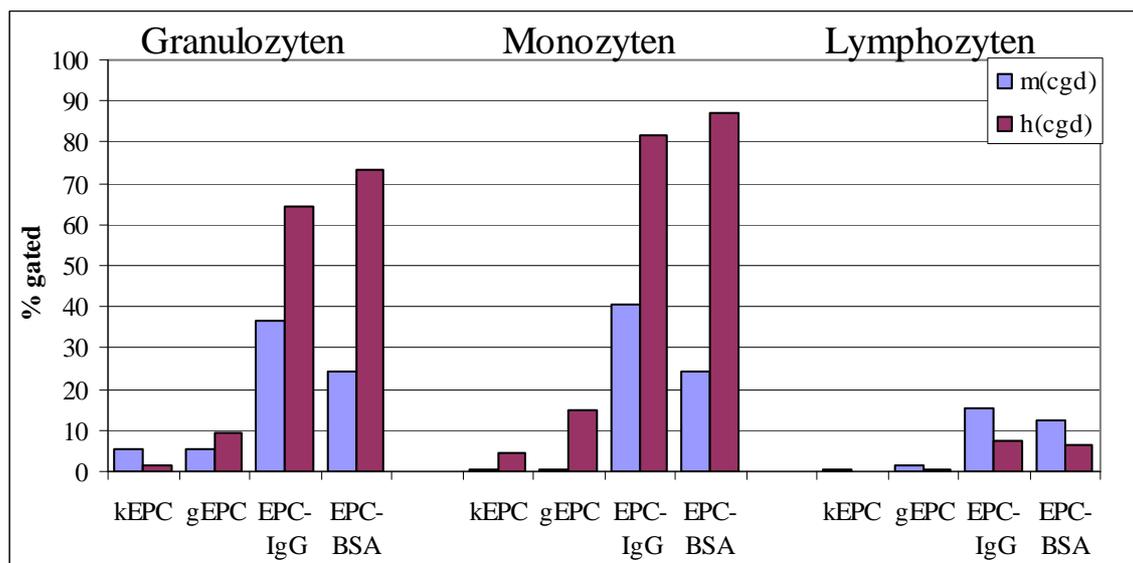


Abb. 76: Anteil positiver Zellen am jeweiligen Gate nach 60 min Inkubation von Vollblut einer CGD-Maus [m(cgd)] und eines CGD-Patienten [h(cgd)] mit 1 mM 0,5mol % Rhodamin-markierten kleinen (kEPC) sowie großen (gEPC) konventionellen EPC:Chol-Liposomen, kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem homologem IgG (IgG) und kleinen EPC:Chol-Liposomen mit gekoppeltem BSA (BSA).

4.10. Pharmakokinetik von GO-Anker- und GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach einmaliger i. v.-Gabe bei gesunden CGD-Mäusen

In der Literatur (Liu et al. 1992) sind sehr unterschiedliche Clearanceverhalten für Liposomen verschiedener Größe beschrieben. Es gibt zwar Versuche 80-100 nm großen EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen (Papahadjopoulos et al. 1991), allerdings wurden sie lediglich an Ratten durchgeführt. In diesem Versuch wird daher die Pharmakokinetik von Stealthliposomen mit vergleichbarer Größe im Mausmodell untersucht. Sie besitzen den gleichen Durchmesser und die gleiche Lipidzusammensetzung wie die angestrebten gekoppelten Liposomen. Die sogenannten Ankerliposomen wurden dem angestrebten Herstellungsprozess unterworfen, es wurde lediglich statt der Kopplung abhydrolysiert (vgl. Kap. 3.2.1.).

Probleme bei der Versuchsdurchführung

Die i.v.-Injektion verursacht Stress bei den Mäusen, ebenso die Blutentnahme für den GO-Nachweis. Um tödliche Schocks zu vermeiden, musste sich der Versuch daher auch am Zustand der Mäuse orientieren.

So kam es beispielsweise bei einem Tier bei der Applikation zu einem stressbedingten Atemstillstand. Nach einem gescheiterten Reanimationsversuch wurden Blut und Organe entnommen. Es konnten hohe Serum-GO-Werte sowie sehr geringe Organwerte nachgewiesen werden (vgl. Anhang).

Bei mehrfacher Blutabnahme am lebenden Tier konnten, um die Gesundheit nicht zu beeinträchtigen, nur geringe Blutmengen abgenommen werden. Die Plasmawerte konnten daher nur einmal bestimmt werden.

Es stand lediglich eine sehr knappe Menge Liposomen zur Verfügung. Daher konnte beim Verfehlen der Schwanzvene nicht noch ein weiteres Mal appliziert werden. Der Verlauf der Injektion ist ebenfalls im Anhang für jede Maus vermerkt.

Aus diesen Gründen konnten lediglich 5 CGD-Mäuse aus der Gruppe mit Ankerliposomen und 7 CGD-Mäuse aus der Gruppe mit EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen erfolgreich ausgewertet werden. Die Werte aller Tiere sind im Anhang aufgelistet.

Aufgrund der geringen Tierzahl und der genannten Schwierigkeiten sollten die einzelnen Werte nicht überbewertet werden. Es zeigt sich jedoch insgesamt ein erstes recht schlüssiges Bild über das Verteilungsverhalten der verwendeten Liposomen.

4.10.1. Organverteilung und GO-Gehalt des Serums nach i.v.-Gabe von GO-EPC:EPG:Chol:PEG- und GO-Anker-Liposomen bei CGD-Mäusen

Die einzelnen Werte können dem Anhang entnommen werden. Einige Werte wurden in den folgenden Graphiken veranschaulicht. Bei der Betrachtung muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine gewisse Liposomenmenge paravenös injiziert worden sein kann.

Um einen Überblick über die Verteilung kurz nach der i.v.-Gabe zu erhalten, wurden bereits nach 5 Minuten die ersten Tiere getötet. Im Folgenden werden von den getesteten Organen Leber, Milz, Niere und Knochenmark nur diejenigen dargestellt, in denen GO nachzuweisen war. Nicht dargestellte Organe enthielten keine GO.

In Abb. 77 ist die funktionelle GO-Konzentration und die GO-Proteinkonzentration im Serum und in den Organen von nach 5 Minuten getöteten Tieren dargestellt. In der Ankerliposomengruppe (Abb. 77a) konnte nur ein Tier ausgewertet werden. Für die PEG-Gruppe (Abb. 77b) sind die Mittelwerte zweier Tiere mit Standardabweichung dargestellt.

Im Serum dieser Tiere sind jeweils große Mengen funktionelles Enzym enthalten. In Leber, Milz und Niere waren jeweils geringe Mengen GO nachweisbar, im Knochenmark war keine GO nachzuweisen.

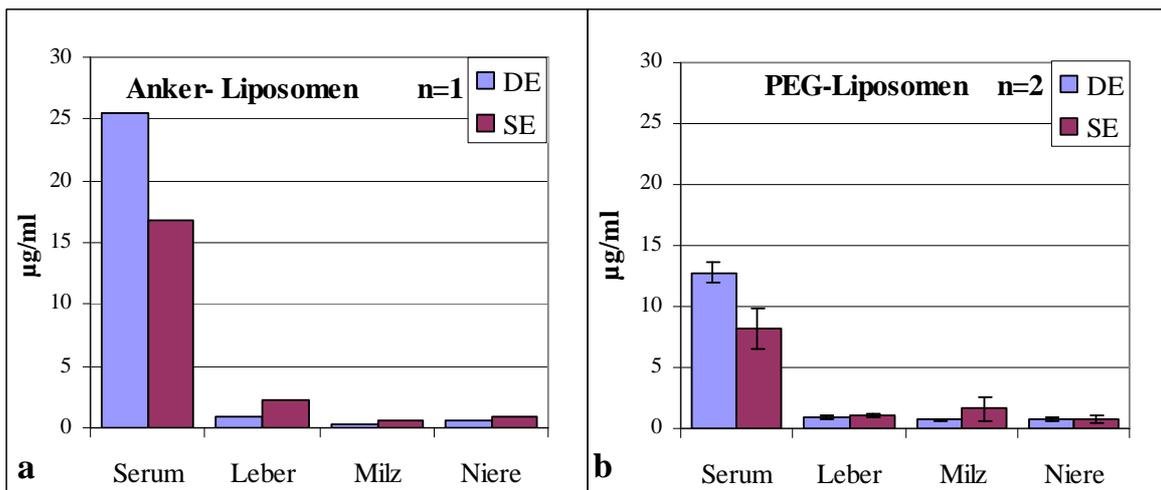


Abb. 77: GO-Konzentration in Serum, Leber, Milz und Niere 5 Minuten nach der i.v.-Gabe von 100 µl (a) Anker- und (b) EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen. Die Vene wurde bei einer Maus (a, n=1) sehr gut getroffen, bei den anderen beiden Mäusen (b, n=2 MW ± SD) wurde ca ¾ des geplanten Volumens erfolgreich intravenös appliziert. Die Bestimmung des funktionellen Enzyms wurde mit Hilfe eines direkten ELISAs (DE) und die der GO-Proteinkonzentration mit Hilfe des Sandwich-ELISA (SE) durchgeführt.

Bei einigen Tieren wurde im Verlauf des Versuches Plasma an der Schwanzspitze gewonnen. Graphisch veranschaulicht sind die Plasma-, Serum- und Organ-Werte von drei Mäusen, die über 24 Stunden untersucht wurden. Für die Anker-Gruppe sind die Mittelwerte der beiden Mäuse mit Standardabweichung dargestellt (Abb.78). In der PEG-Gruppe (Abb.88) erfolgte beim zweiten Tier die Injektion nicht optimal, weswegen die Werte insgesamt niedriger (vgl. Anhang) sind. Es wurden daher nur die Werte eines Tieres dargestellt.

Auffällig bei der Ankerliposomengruppe sind die relativ hohen Organwerte zum Tötungszeitpunkt 24 Stunden nach der GO-Liposomengabe. Dabei lag die funktionelle Enzym-Konzentration sowohl für die Leber (6,36 $\mu\text{g/ml}$) als auch für die Milz (4,7 $\mu\text{g/ml}$) unter der Protein-Konzentration (Leber 8,3 $\mu\text{g/ml}$, Milz 8,15 $\mu\text{g/ml}$). Die Serumwerte hingegen lagen für funktionelles Enzym wie für Enzymkonzentration unter 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

In Gegensatz dazu liegt der GO-Gehalt der Organe bei der Maus aus der PEG-Gruppe im gleichen Bereich wie der des GO-Gehalt des Serums. Im Serum ist mehr funktionelles Enzym nachzuweisen, in den Organen etwas mehr GO-Protein. Die Einzelwerte können dem Anhang entnommen werden.

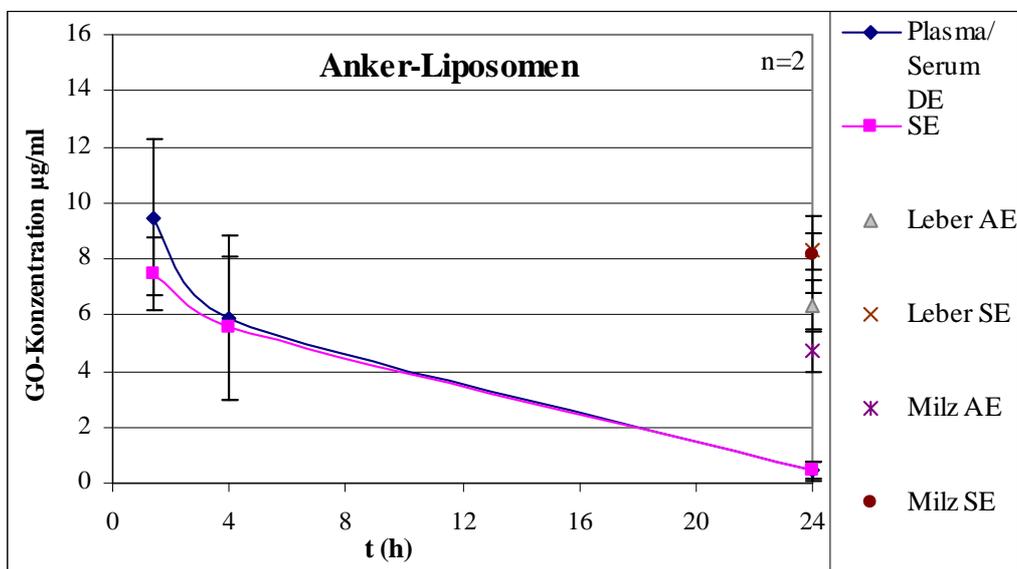


Abb. 78: GO-Konzentration in Plasma, Serum und Organen von zwei CGD-Mäusen nach GO-Ankerliposomengabe. Die Plasmaproben wurden 100 min und 4h nach der i. v.-Injektion genommen, die Organe und das Serum zum Tötungszeitpunkt 24 h p. inj.. Die Bestimmung des funktionellen Enzyms wurde mit Hilfe des direkten ELISAs (DE) und die der Protein-Konzentration mit Hilfe des Sandwich-ELISA (SE) durchgeführt. n=2 MW \pm SD

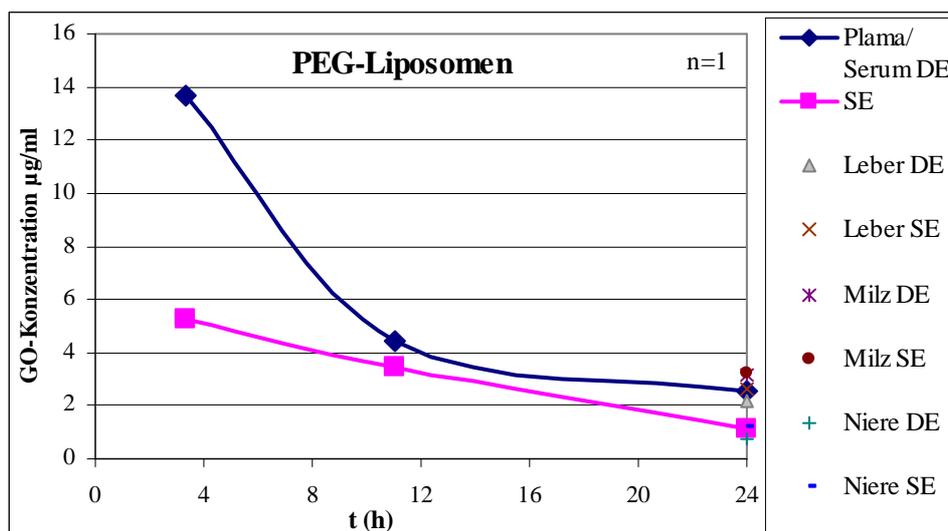


Abb. 79: GO-Konzentration in Plasma 210 und 660 min und in Serum und Organen einer CGD-Maus zum Zeitpunkt der Tötung 24 h nach der i. v.-Injektion von 100 µl GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen. Die Bestimmung des funktionellen Enzyms wurde mit Hilfe des direkten ELISAs (DE) und die der GO-Protein-Konzentration mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (SE) durchgeführt.

4.10.2. Quotient aus GO-Konzentration im Serum und der Leber

Es ist zu erwarten, dass die Verteilung und der Abbau der Liposomen auch bei etwas unterschiedlichen Injektionsdosen gleich verläuft. Um die Werte vergleichen zu können, wurde daher das Blutkompartiment im Verhältnis zur Leber als einem der entscheidenden Clearanceorgane gesetzt. Eine Besonderheit bei der Maus ist die große Leber. Ihr Gesamtgewicht lag bei den Mäusen im Versuch bei rund einem bis zwei Gramm. Man geht bei Mäusen von 1,5 – 2 ml Blutvolumen aus. Damit entspricht die Masse der Leber etwa der des Blutes und eine Gegenüberstellung der Werte bot sich an. Die GO-Gehalte der Milz waren insgesamt denen der Leber recht ähnlich. In der Niere war stets deutlich weniger und oftmals gar keine GO nachweisbar. Außerdem war bei der Sektion aufgefallen, dass je nach Verlauf des Ausblutens in den Nieren unterschiedlich viel Blut enthalten war.

Da unklar war, ob die GO innerhalb der Leber gleichmäßig verteilt ist, wurde im Folgenden ein Homogenisat der gesamten Leber verwendet. Nachdem für die Organwerte direkt 50 µg pro Organ als Aliquot entnommen worden waren, wurde der Rest des Organs homogenisiert und gemäß ELISA-Protokoll aufgearbeitet. Die Leberproben wurden mit den dazugehörigen Serumproben auf einer Platte erneut gemessen. Die Werte des Gesamtleberhomogenisats wichen kaum von den zuvor gemessenen Werten bei Verwendung eines Teilbereiches (50 µg) ab. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die GO in der Leber gleichmäßig verteilt vorliegt.

Aus den so ermittelten Werten wurde ein Quotient (Konzentration Serum/ Konzentration Leber) gebildet, der es ermöglichen sollte, die beiden Gruppen besser zu vergleichen und auch Mäuse zu werten, die geringere Mengen Liposomen erhalten hatten. Wenn die Tötungszeitpunkte es zuließen, wurden Mittelwerte gebildet. Bei Ausfällen oder zeitlichen Verschiebungen innerhalb einer Gruppe sind die Einzelwerte aufgetragen.

Wie aus Abb. 80 ersichtlich, ist die Standardabweichung für den 5-Minuten-Wert bei der Bestimmung der funktionellen Enzym-Konzentration sehr hoch, bei dem Protein-Gehalt jedoch sehr gering.

Im Sandwich-ELISA lag die Standardabweichung bei 5% für die EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen und bei 1% für die Ankerliposomen. Die anderen Standardabweichungen blieben alle unter 5,2%.

Der Serum-Leber Quotient war für die EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen stets höher als für die Ankerliposomen. Die EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen gelangten also langsamer aus dem Blut in die Leber als es bei den Ankerliposomen der Fall war.

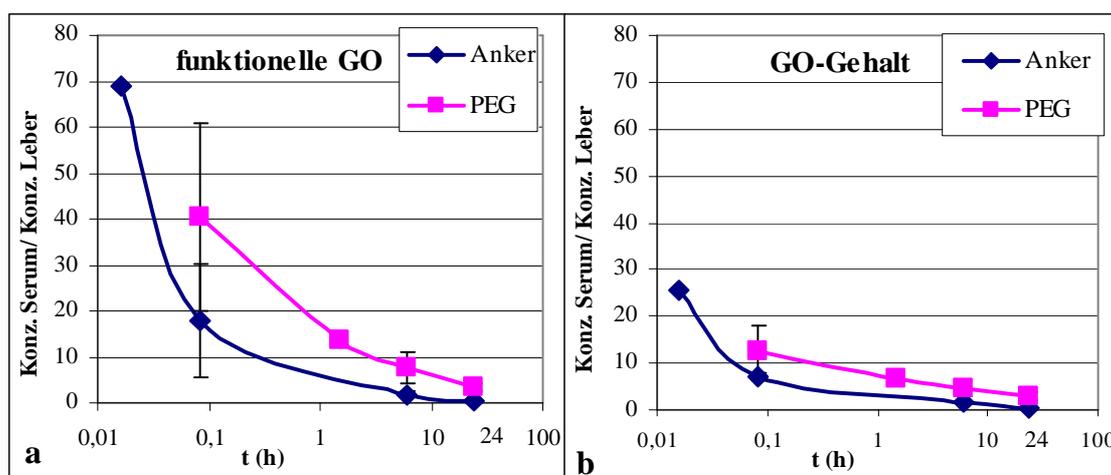


Abb. 80: Quotient aus (a) funktioneller GO-Konzentration bzw. (b) GO-Gehalt im Serum durch den Wert in der Leber nach Gabe von Anker- und EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen im Verlauf der Zeit. Der Wert bei 1 min und 90 min stammt von einer CGD-Maus, alle anderen sind Mittelwerte von 2 CGD-Mäusen. Die Zeit ist wegen der besseren Übersichtlichkeit logarithmisch aufgetragen.

Eine Halbwertszeit kann nicht angegeben werden, da es sich bei der Kinetik insbesondere in der ersten Stunde nach Applikation nicht um eine Funktion erster Ordnung handelt. Die Hälfte der Ankerliposomen war nach etwa 5 Stunden und die Hälfte der EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach etwa 8 Stunden aus dem Blut eliminiert.

4.10.3. Messung der intrazellulären H₂O₂-Produktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach der i. v.-Gabe von GO-Anker und GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen mit Hilfe des DHR-Assays

Der DHR-Assay mit dem bei Versuchsende gewonnenen Vollblut war, im Gegensatz zu den bisherigen Tierversuchen, bei einzelnen CGD-Mäusen positiv. In der Tabelle 14 sind die GO-Serumwerte als Anhaltspunkte angegeben. Allerdings lässt er keinen direkten Rückschluss auf den GO-Gehalt der Granulozyten zu. Auffällig ist, dass bei den Ankerliposomen hohe Serumwerte bei den frühen Bestimmungszeiten relativ gut mit positiven Ergebnissen im DHR-Assay korrelieren. Bei den späteren Bestimmungszeitpunkten kam es nicht mehr zu nachweisbar positiven Werten.

Aufgrund der niedrigeren GO-Serumwerte bei der 5-Minuten-Bestimmung der PEG-Gruppe kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die niedrigen Werte daran lagen, dass nicht genügend Liposomen in die Granulozyten aufgenommen wurden oder nicht genügend Mengen GOL zur Verfügung standen. Auffällig sind jedoch die positiven Werte bei den beiden 6 Stunden und einem 24 Stunden Tier. Zu dem anderen, nach 24 Stunden getöteten Tier, ist anzumerken, dass sowohl die Organwerte als auch die Plasmawerte an früheren Zeitpunkten unter denen des positiven Tieres lagen, der GO-Gehalt als Gesamtheit also den Eindruck während der Injektion bestätigt.

Tabelle 14: Rekonstitution des oxidativen Bursts anhand des DHR-Assays. Es ist der Tötungszeitpunkt und GO-Gehalt im Serum angegeben.

	Maus Nr.	Tötung nach [min]	Tag	DHR	PMA	%gated Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten	GO-Gehalt Serum
Positiv-	C57B16J		b	+	+	92,37	88,42	42,81	
Negativ-kontrolle	1		a	+	+	4,79	0,97	0,43	
		1440	b	+	+	4,74	0,72	0,25	0
	22	1440	c	+	+	4,28	0,11	0,60	0
Anker	2	5	a	+	+	12,57	5,03	0,74	16,85
	4	5	c	+	-	7,82	3,32	1,19	
			c	+	+	16,16	8,40	2,00	11,1
	5	45	c	+	+	3,72	0,09	0,49	10,1
	10	1440	b	+	-	1,00	1,05	0,97	
			b	+	+	3,77	0,47	0,39	0,65
11	1440	b	+	+	1,86	0,33	0,19	0,25	
PEG	12	5	c	+	-	1,27	0,67	0,21	
			c	+	+	4,02	0,39	0,36	9,3
	13	5	c	+	-	1,24	0	0,21	
			c	+	+	0,88	0,20	0,20	7
	15	90	c	+	-	0	0,10	0,39	
			c	+	+	4,23	0,12	0,82	5,1
	18	360	b	+	+	6,02	0,85	0,71	6
	19	360	b	+	+	11,60	0,42	0,28	4
	20	1440	b	+	+	11,23	3,16	2,08	1,15
21	1440	b	+	+	1,2	0,36	0,37	2,1	

Die Nummer wurde den CGD-Mäusen im Versuch zugeteilt. Maus 1 und 22 (Negativkontrolle):PBS

Maus 2, 4, 5, 10 und 11: 100 µl Ankerliposomen Maus 12, 13, 15, 18, 19 und 21:

100 µl PEG-Liposomen. Die Versuche wurden an drei Tagen (a, b, c) durchgeführt (a,b,c).

4.10.4. Untersuchung auf GO-Antikörper im Serum nach Anker- bzw. PEG-GOL-Gabe

Es waren mit Hilfe des Ak-ELISAs keine Anti-GO-Antikörper nachweisbar (Messung 24h nach Applikation der GO-Anker-bzw. EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde zunächst die Aufnahme verschiedener 200nm großer Liposomen in Leukozyten untersucht. Mit den am besten aufgenommenen Liposomen wurde die Wiederherstellung des oxidativen Bursts in Blutzellen von CGD-Patienten analysiert. Mit den so erprobten EPC:EPG:Chol-Liposomen wurden Tierversuche mit CGD-Mäusen sowohl im Hinblick auf die Verträglichkeit als auch im Hinblick auf die therapeutischen Eigenschaften gemacht. Aufgrund fehlender Therapieerfolge mit den konventionellen Liposomen im Mausmodell wurden targetisierte Liposomen entwickelt und *in vitro* getestet. Von den noch ungekoppelten Vorstufen wurde die Pharmakokinetik im Mausmodell bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sollen im Folgenden im Vergleich zur Literatur diskutiert werden.

5.1. Aufnahme von 200 nm großen, fluoreszenzmarkierten Liposomen in humane Leukozyten

Zunächst wurde mit fluoreszenzmarkierten Liposomen mittels FACS-Messung untersucht, ob und in welchem Ausmaße die Aufnahme von verschiedenen Liposomenpräparationen in die einzelnen Leukozytenpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) stattfindet.

5.1.1. Aufnahme von RhodaminB-PE- bzw. FITC- markierten Liposomen in humane Leukozyten.

5.1.1.1. Einfluss der Stabilität und Reinheit auf die Aufnahme

Die Stabilität konventioneller Liposomen stellt kein technisches Problem dar. Sie sind, abhängig von ihrer Zusammensetzung, ca. vier Wochen lang stabil (Falk, 1999).

Die in Kap. 4.4.1.1. und 4.4.1.4. verwendeten Liposomen waren auch noch nach über vier Wochen steril. Bei über vier Wochen gelagerten Liposomen fallen bei den EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen für diesen Liposomentyp relativ hohe Aufnahmen auf. Das entspricht nicht ihren normalerweise vorhandenen Stealth-Eigenschaften. Da nicht abzuschätzen ist, welche Eigenschaften sich noch verändern, sollte die Lagerung, insbesondere der Stealth-Liposomen, über vier Wochen deshalb vermieden werden.

Die konventionellen Liposomen für die Versuche zur Rekonstitution des oxidativen Bursts wurden nicht sterilfiltriert, um die Freisetzung von GO zu vermeiden. Mit ihnen wurden über einen Zeitraum von drei Wochen Versuche gemacht. Leerliposomen hatten

bei den ersten Versuchen keine Auswirkungen auf den oxidativen Burst. Die in einem der letzten Versuche nachweisbare Stimulation von Leukozyten gesunder Menschen und Wildtypmäusen durch Leerliposomen (Kap. 4.5.2.3.) könnte durch bakterielle Verunreinigungen zu Stande gekommen sein.

5.1.1.2. Optimierung des Versuchsaufbaus zur Unterscheidung von Aufnahme und Anlagerung der Liposomen

In den Vorarbeiten für diese Arbeit (Falk 1999, Gerber 1999, Kimpfler 2003), wurde mit 1 mol% RhodaminB-PE gelabelten sowie FITC-Dextran gelabelten EPC:Chol und EPC:EPG:Chol-Liposomen gearbeitet. Rhodamin wurde bei FACS-Messungen eingesetzt, FITC-Dextran wurde nur mittels konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesen.

Rhodamin kann aufgrund seines Gehaltes an dem neutralen Phospholipid Ethanolamin in die liposomale Membran eingelagert werden. Konzentrationen bis zu 1 mol% interferieren laut Lee et al. (1992) nicht mit anderen Phospholipiden.

In den Versuchen zur Konzentration des Labels erwies sich eine Konzentration von 0,5 mol% zur Beurteilung der Aufnahme anhand des Parameters %gated (Anteil der positiven an den ausgewählten Zellen) als ausreichend und am besten geeignet. Bei einer Konzentration von 0,1 mol% waren bei niedrigen Werten die Unterschiede schlecht zu erkennen, bei 2,5 mol% wurden die Unterschiede bei hohen Werten undeutlich. Hierbei wird die experimentelle Schwierigkeit offensichtlich, dass die Menge des aufgenommenen Labels darüber entscheidet, ob eine Zelle im FACS als positiv erkannt wird oder nicht.

Die FACS-Messung unterscheidet primär nicht zwischen Anlagerung und Aufnahme der Liposomen. Gerber et al. (2001) haben für 200 nm große EPC:EPG:Chol-Liposomen mittels konfokaler Laserelektronenmikroskopie die Aufnahme in Phagosomen nachgewiesen. Sogar eine Kolokalisation mit markierten *Staph. aureus* war nachweisbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Liposomen grundsätzlich aufgenommen werden.

Higashi et al. (1995) haben die Aufnahme von polyethylenmodifizierten Liposomen in Lymphoblastoid-Zellen untersucht. Kühlung (4°C) und Cytochalasin B, das Aktin depolarisiert, hemmten die Aufnahme vollständig. Granulozyten phagozytieren wesentlich stärker als lymphoblastoide Zellen. Da Cytochalasin D die Phagozytose

effektiver hemmt als Cytochalasin B (Miyake und Kim, 1978), wurde Cytochalasin D eingesetzt.

Trotz dieser Hilfsmittel war es bei den ersten Versuchen nicht einfach zu entscheiden, ob ein positives Signal auf einer Aufnahme durch die Phagozytose basiert oder durch eine reine Anlagerung an die Zellmembran verursacht wurde.

Die Lösung dieses Problems brachte die Optimierung des Versuchsablaufs, insbesondere die Verwendung von FACSLysepuffer unmittelbar nach der Inkubation. Die zunächst unbefriedigenden Negativkontrollen waren somit auf Aufnahmen von Liposomen während der Waschschriffe und aufgrund von Lücken in der Kühlkette zurückzuführen.

Die Rhodamin-gelabelten Liposomen haben in Granulozyten und Monozyten einen deutlichen Anteil positiver Zellen hervorgerufen. Bei den Lymphozyten waren lediglich rund 10% positiv (Kap. 4.4.1.2.).

5.1.1.3. Eignung von FITC-Dextran als Label

Die Liposomen mit verkapseltem FITC-Dextran haben nur bei den Lymphozyten mit rund 10% ein dem Rhodamin vergleichbares Signal ergeben (Kap. 4.4.1.3.). Bei den Monozyten waren positive Zellen zu messen, ihr Anteil war jedoch meist um ein Vielfaches geringer als bei Verwendung des Rhodaminlabels. Bei den Granulozyten kam es bei der Inkubation mit liposomal verkapseltem FITC zu keiner erkennbaren Färbung der Zellen. Interessant sind Unterschiede im Hinblick auf die einzelnen Zelltypen.

Das Fehlen eines Unterschiedes zwischen dem Rhodamin- und dem sonst ineffizienten FITC-Label bei den Lymphozyten lässt vermuten, dass hier eher eine Bindung der Liposomen an die Zellen als eine Phagozytose eine Rolle spielt. Membranübergänge werden von Scherphof und Crommelin (1996) für Rhodamin-PE beschrieben. Sie können aufgrund der vergleichbaren Werte beim Verwenden des verkapselten FITC-Dextrans als Label als Ursache für den positiven Anteil bei den Lymphozyten ausgeschlossen werden.

Insgesamt erwies sich die FITC-Markierung weniger effektiv und wurde daher nicht weiter verfolgt.

5.1.2. Unterschiede bei der Aufnahme der verschiedenen Liposomentypen in Vollblut und isolierte Zellen

Da sowohl bei Vollblut als auch bei isolierten Zellen ohne Serumzusatz deutliche Aufnahmen in Granulozyten und Monozyten zu beobachten waren, ist die Aufnahme der 200 nm großen Liposomen offensichtlich von Serumkomponenten unabhängig.

EPC:EPG:Chol-PEG-Liposomen wurden insgesamt kaum aufgenommen. Die neutralen EPC:Chol-Liposomen wurden etwas besser aufgenommen. Mit Abstand am besten aufgenommen wurden die negativ geladenen EPC:EPG:Chol-Liposomen. Diese sollen daher weiter untersucht werden.

Bereits in der vorausgegangenen Arbeit (Falk, 1999) konnte gezeigt werden, dass einfache, nicht modifizierte Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzungen direkt von den Phagozyten aufgenommen wurden. Bei einer Inkubation isolierter Zellen mit Liposomen wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, deutlich höhere Aufnahmewerte mit negativ geladenen Liposomen erreicht. Die Nivellierung dieser Unterschiede bei Inkubation der Liposomen im Vollblut wurde allerdings bei den eigenen Arbeiten nicht festgestellt.

Die Grundidee des Projektes war, sich die für die meisten Therapieansätze unerwünschte schnelle Blutclearance der Liposomen durch Aufnahme in Granulozyten und Makrophagen zu Nutze zu machen und auf diesem Weg das Enzym GO als neuen H₂O₂-Donor in die NADPH-Oxidase-defizienten Zellen einzuschleusen. Hierzu erscheinen die EPC:EPG:Chol-Liposomen geeignet.

Patel et al. (1992) haben gezeigt, dass *in vivo* negativ geladene Liposomen stärker als andere Liposomentypen von Zellen des RES in Leber und Milz aufgenommen werden. Ob sie dort den von uns gewünschten Zweck erfüllen, wird später (Kap. 5.3.) diskutiert. Bei den anderen untersuchten Liposomentypen war die relativ starke Aufnahme von EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen in Monozyten auffällig, was im Hinblick auf die Koppelungsversuche (Kap. 4.5.) und die Pharmakokinetik kleiner PEGylierter GO-Liposomen (Kap. 4.6.) von Bedeutung ist.

Aus diesem Grund soll vor dem Einsatz gekoppelter Liposomen *in vivo* überprüft werden, wie lange PEGylierte Ausgangsliposomen tatsächlich im Blut zirkulieren (vgl. Kap. 5.5.).

5.2. Rekonstitution des oxidativen Bursts durch GOL *in vitro*

Nachdem eine gute Aufnahme von EPC:EPG:Chol-Liposomen in Phagozyten sichergestellt war, wurde nun überprüft, ob darin verkapselte GO in der Lage ist, den oxidativen Burst *in vitro* zu rekonstituieren.

5.2.1. DHR-Assay

In Kap. 4.5.1. wurde mit Hilfe des DHR-Assays die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in mit GOL inkubierten Zellen überprüft.

Die Granulozyten der C57Bl6/J-Maus (= Wildtyp) haben auf eine Stimulation mit PMA wesentlich stärker reagiert als die Granulozyten des gesunden humanen Spenders. Es konnte bei 80% der murinen und bei 40% der humanen stimulierten Granulozyten die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen werden (positive Kontrolle).

Die murinen und humanen NADPH-defizienten Granulozyten und Monozyten waren erwartungsgemäß auch unter Stimulation mit PMA nicht zum oxidativen Burst fähig (negative Kontrolle).

Die Rekonstitution des oxidativen Bursts mit Hilfe von GO-Liposomen gelang sowohl bei murinen als auch bei humanen NADPH-Oxidase-defizienten Granulozyten. Jedoch waren bei der CGD-Maus nur ein Viertel der Zellen positiv, beim CGD-Patienten hingegen fast alle.

Monozyten leisten physiologischer Weise keinen großen Beitrag zum oxidativen Burst, sie verhindern aber durch die Phagozytose apoptotischer Granulozyten den Austritt von schädigenden Stoffen in unbeteiligtes Gewebe (Tizard 2004).

Monozyten und Lymphozyten waren mit PMA nicht stimulierbar, auch die Inkubation mit GOLs zeigte keinen Effekt. Vereinzelt positive Werte bei Mäusen sind wahrscheinlich auf Probleme beim Gaten der Leukozytenpopulationen zurückzuführen.

5.2.2. Chemilumineszenz

In Kap. 4.5.2. wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit Hilfe der Chemilumineszenz überprüft. Dabei wird im Gegensatz zu der "Momentaufnahme" des DHR-Assays der oxidative Burst kontinuierlich eine halbe Stunde lang gemessen. Es wurden Gesamtleukozyten nach Erythrozytenlyse verwendet und somit nicht im Hinblick auf die einzelnen Zellen differenziert. Das spielt aber kaum eine Rolle, da die Granulozyten den Hauptbeitrag leisten.

Als Schwierigkeit stellte sich der unterschiedliche Einfluss von murinem und humanem Plasma auf die GOL-Liposomen dar. Humanes Plasma ließ die Werte gegenüber Kontrollen mit Puffer um etwa ein Viertel sinken, murines Plasma hingegen führte zu einer Erhöhung um eine Zehnerpotenz. Als Ursache kommen tierartspezifische Serumproteine und eventuell die höhere Glucosekonzentration im Plasma von Mäusen (ca. 150 mg/dl) in Frage. Beim Mensch liegt der Blutglucosewert in der Regel bei 65-100 mg/dl (Pschyrembel, 1993).

Wenn man konventionelle Liposomen mit Serum inkubiert, kommt es rasch zu einer Integration von Serumproteinen. Dabei wird eine gewisse Menge des Liposomeninhaltes freigesetzt (Kalie 2006). Der Cholesterolgehalt der in dieser Arbeit verwendeten Liposomen wurde zur Minimierung der Interaktion mit Serumproteinen mit 30mol% gewählt. Kalie (2006) hat gezeigt, dass aus EPC:Chol und aus EPC:EPG:Chol-Liposomen in humanem Serum mit 30mol% Cholesterin weniger als 5% des Inhaltes freigesetzt werden. Ob dies auch für murines Serum zutrifft, müsste überprüft werden. Eine stärkere Integration von Serumproteinen hätte die Freisetzung größerer Mengen GO aus den Liposomen zur Folge, die rasch die zur Verfügung stehende Glucose umsetzen könnte.

Um das murine und humane System einigermaßen vergleichen zu können, musste bei der Chemilumineszenzmessung auf Plasma verzichtet werden. Dazu wurden Erythrozyten des Vollbluts lysiert und die verbliebenen Leukozyten in Puffer aufgenommen. Damit war allerdings der Einsatz von gekoppelten Liposomen, die nur in Anwesenheit von Serum aufgenommen werden, für diese Methode nicht möglich.

Wie bei den DHR-Versuchen (Kap. 5.2.1.) zeigte die Stimulation mit PMA bei den Leukozyten der CGD-Mäuse und des CGD-Patienten keinen Effekt. Wildtyp- und Spenderleukozyten waren stimulierbar.

Die Inkubation mit Leerliposomen (d.h. ohne Einschluss von GO) führte bei den Wildtypmäusen (C57Bl6/J) in der Regel zu keiner gesteigerten Chemilumineszenz-Antwort.

Bei einem späteren Versuch fiel eine hohe Chemilumineszenz nach Inkubation mit Leerliposomen bei normalen humanen Leukozyten auf, ähnlich wie nach der Inkubation mit Zymosan. Der Effekt der Phagozytose hätte auch bei dem ersten Versuch nachweisbar sein müssen. Eine bakterielle Verunreinigung der Liposomen, möglicherweise mit LPS-Bildung als Folge, kann nicht ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 5.1.1.1.). Die Säule, die zur Abtrennung von unverkapselter GO benötigt wird, wurde als kritischer Punkt ausfindig gemacht. Es wurden *E. coli* und *Enterokokken* nachgewiesen. Die Säule wurde danach vor jeder Benutzung entkeimt.

Die Inkubation der Leukozyten mit GOLs sowohl bei den Ansätzen mit C57Bl6/J als auch bei den humanen CGD-Leukozyten führten zu einer Steigerung der Chemilumineszenzsignale.

Die Direktinkubation von murinen Leukozyten mit Leerliposomen führt zu keiner, die mit GO-Liposomen hingegen zu einer massiven Chemilumineszenz.

Wurde allerdings Vollblut mit GOLs inkubiert und anschließend die Erythrozyten lysiert (Vorinkubation), war sowohl bei Verwendung von Leer- als auch bei Verwendung von GO-Liposomen bei den Maus-Leukozyten nur eine geringe Chemilumineszenz messbar.

Im Gegensatz dazu führte bei humanen Leukozyten sowohl die Vorinkubation mit Leerliposomen als auch die Vorinkubation mit GO-Liposomen zu einer messbaren Erhöhung der Chemilumineszenz im Vergleich zu gleich behandelten Leukozyten ohne Liposomenzugabe.

Die Aufnahme der Liposomen über Phagozytose zusammen mit dem Stress durch die Waschschriffe hat vermutlich zu einer Aktivierung der sehr empfindlichen Granulozyten geführt. Das Problem ist auch bei der Verwendung von isolierten Granulozyten zu erwarten.

Die vergleichenden Versuche zur Rekonstitution des oxidativen Bursts in humanen und murinen NADPH-defizienten Zellen mit Hilfe von GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen (Kap. 4.5.2.3.) wurden aufgrund der beschriebenen Ergebnisse als Direktinkubation mit Leukozyten nach Erythrozytenlyse in HBSS durchgeführt. Dadurch wurden die Zellen geschont und der hohe Glucosegehalt des murinen Plasmas (ca. 150mg/dl) wurde

aufgrund der Waschschriffe umgangen. Die Messung erfolgte entweder ohne Zusätze, oder unter Stimulation mit PMA oder Zymosan bzw. in Anwesenheit von 1mM f.c. EPG-Leerliposomen bzw. GO-EPC:EPG:Chol-Liposomen.

Dabei wurde sowohl die Stimulierbarkeit normaler humaner und muriner Leukozyten als auch die Rekonstitution des oxidativen Bursts nachgewiesen.

5.2.3. Vergleichbarkeit des oxidativen Bursts von humanen und murinen Leukozyten *in vitro*

Sowohl mit Hilfe des DHR-Assays als auch mit Hilfe der Chemilumineszenz-Messung war ROS-Bildung im NADPH- defizienten Maus- und Menschenblut bei Inkubation mit GO-Liposomen nachzuweisen. *In vitro* erscheint das Mausmodell also für die Fragestellung der Arbeit geeignet.

5.3. Überprüfung der Eignung von GOL im Tierversuch

Die CGD-Mäuse wurden als Modell für die septische Granulomatose entwickelt. Es gibt außer den zwei Mausmodellen gp91 bzw. 47^{-/-} (Pollok 1995) kein Knock-out-Modell für die Septische Granulomatose. Es wurden beispielsweise Getherapieversuche mit Knochenmarkstransplantationen an ihnen vorgenommen (Dinauer, 2001).

Dinauer et al. (2001) haben gezeigt, dass bei 30% funktionellen Granulozyten im Mausmodell sowohl bei Infektionen mit *Staph. aureus* als auch bei Infektionen mit *Burk. cepacia* die Abwehr vollständig wiederhergestellt ist.

In *in vitro* Versuchen mit Mausblut von CGD-Mäusen konnte der oxidative Burst mit Hilfe von GOL wieder hergestellt werden (vgl. Kap. 5.2). Daher schien das Modell trotz seiner Schwierigkeiten zur Überprüfung der Wirksamkeit von GOL geeignet.

Auf das Blutbild der Maus und die Granulozyteneigenschaften soll in Kap. 5.7.1. näher eingegangen werden.

5.3.1. Verträglichkeit und Verteilung von GOL

Bekannte Nebenwirkungen der Gabe von hoher Dosen GO sind Hypoglykämie und Methämoglobinämie (Samoszuk et al. 1993).

Sowohl die Dreifachgabe von in PBS gelöster GO als auch in EPC:EPG:Chol-Liposomen verkapselte GO wurde von den CGD-Mäusen gut vertragen.

Nach den toxikologischen Untersuchungen für gelöste und liposomal verkapselte GO von Gerber (2001) waren bei der in dieser Arbeit gewählten Dosierung keine erkennbaren Nebenwirkungen zu erwarten. Geringe Methämoglobinkonzentrationen waren erst bei der etwa vierfachen Dosierung messbar.

Die Toxizitätsstudien von Samoszuk (1993) zeigen für gelöste GO Nebenwirkungen wie Ohrspitzennekrosen und gesträubtes Fell sowie Gewichtsabnahme ebenfalls erst bei deutlich höherer Dosierung.

5.3.1.1. Auswirkungen der GOL-Gabe auf den Blutglucosespiegel

Bei den eigenen Versuchen waren bei den gesunden Tieren im Vergleich zu Menschen relativ hohe Blutglucosespiegel (etwa 150 mg/dl) auffällig. Während Infektionen war der Blutglucosespiegel etwa um 1/3 erniedrigt.

Unter der Infektion mit *Staph. aureus* waren leichte Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe lediglich innerhalb der ersten Stunde festzustellen. Nach PBS-Gabe war ein leichter Anstieg, nach GOL-Gabe ein leichter Abfall des Blutzuckerspiegels zu beobachten. Das deutet auf die zu erwartende Glucoseumsetzung durch die GO hin (Vgl. Kap. 1.3.). Danach war allerdings auch in der mit PBS behandelten Kontrollgruppe ein leichter Abfall, der nach 24 h wieder ausgeglichen war, festzustellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Versuchsablauf mit mehrmaliger Blutentnahme für die Tiere eine Belastung darstellt.

Aufgrund der starken Schwankungen der Einzelwerte sind diese Tendenzen nicht überzubewerten. Einzelne sehr niedrige Werte im Infektionsversuch schienen mit schlechtem Allgemeinbefinden der jeweiligen Maus zu korrelieren. Einzelne hohe Glucose-Werte korrelierten oft mit Problemen beim Einfangen. Stresssituationen können eine Hyperglykämie zur Folge haben (Kraft und Dürr 1997).

Der Stress durch das ‚Handling‘ könnte auch nach den GOL-Gaben bei der Langzeituntersuchung (Kap. 4.6.) den Glucoseverbrauch durch die GO überdeckt haben.

5.3.1.2. GO-Gehalt in Organen und Serum

Mit Hilfe zweier im Labor etablierter ELISAs wurden Organ- und Serumproben untersucht. Mit dem SandwichELISA wurde der GO-Gehalt in Organen und Serum bestimmt. Mittels eines direkten ELISAs wurde nachgewiesen, ob das Enzym im funktionellen Zustand vorliegt, also H₂O₂ produziert. In der Regel war die

nachgewiesene GO auch funktionell. Lediglich wenn kaum noch quantitativ GO nachweisbar war, konnte vereinzelt keine GO-Aktivität nachgewiesen werden.

Dies war vor allem bei der Langzeituntersuchung der Fall, wo aufgrund des späten Tötungszeitpunktes im Serum kein und in den Organen sehr wenig bis gar keine GO nachweisbar war. Der GO-Gehalt in den Organen Leber und Milz (Tag 11) lag bei diesen Tieren nahe der Nachweisgrenze des Testsystems und ist daher schwer zu beurteilen. Um eine klare Aussage über die Abbaugeschwindigkeit von liposomal verkapselter gegenüber gelöster GO zu erhalten müsste ein Versuch mit höheren Tierzahlen und früherem Tötungszeitpunkt gemacht werden. Der Langzeitversuch hingegen diente in erster Linie der Überprüfung der Verträglichkeit der EPC:EPG:Chol-Liposomen unter angestrebten Therapiebedingungen.

Der GO-Gehalt in den Organen und im Serum bei den Infektionsversuchen mit *Staph. aureus* wurde 24 h nach der i.v.-Gabe der GOL bestimmt (Kap. 4.7.4.).

Die GO-Proteinkonzentration in der Leber war insgesamt höher als in der Milz. Im Mittel war in den Organen der infizierten Tiere weniger GO nachweisbar als in nicht infizierten Mäusen, wo der GO-Gehalt in der Milz doppelt und in der Leber dreimal so hoch war. Die hohen Standardabweichungen machen jedoch erneut auf die Problematik der intravenösen Applikation aufmerksam. Auch unter Infektion mit *Burk. cepacia* wurde die GO schneller abgebaut als bei nicht infizierten aber gleich behandelten Kontrolltieren.

Als mögliche Ursachen kommen ein erhöhter Stoffwechsel bei den infizierten Tieren oder die bessere Abbaubarkeit der GO in verbrauchten Phagozyten in Frage.

Die Milz leistete bei diesen Versuchen offenbar einen größeren Beitrag zur Elimination der GOL als bei den Versuchen von Kimpfler (2003). Sie spielt also wahrscheinlich bei der Eliminierung nach über 8 Stunden, die von Kimpfler nicht untersucht wurde, eine größere Rolle. Es ist jedoch auch denkbar, dass Eigenschaften der GO von Bedeutung sind, da zuvor mit der Modellsubstanz Dextran gearbeitet wurde.

Kimpfler (2003) hat mit radioaktiv gelabelten Liposomen eine Halbwertszeit der Liposomen von 70 min und eine Anreicherung in Leber und Milz festgestellt. Dabei waren nach einer Stunde 50% des Liposomeninhaltes in der Leber und 7,5% des Liposomeninhaltes in der Milz zu finden. Im Verlauf der nächsten 7 h kam es weder zu einer weiteren Anreicherung, noch zu einem erkennbaren Abbau.

5.3.1.3. Antikörpertiter gegen GO

Eine Beeinträchtigung der Wirksamkeit könnte von der Bildung von Antikörpern gegen das Enzym ausgehen. Das Enzym wird zwar rekombinant hergestellt, stammt aber aus dem Pilz *Aspergillus niger*.

Es gibt bisher keine Untersuchung über das Ausmaß der Antikörperbildung nach der Gabe von GO. Für uns von besonderem Interesse ist, wie sich die liposomale Verkapselung auf die Antikörperbildung auswirkt. Die möglichen Auswirkungen sind in Kap. 3.2.7.3. beschrieben.

Mit Hilfe des etablierten GO-AK-ELISAs (Kap. 3.2.8.1.1) wurde der Antikörpertiter im Serum der Tiere bestimmt. Beim Langzeitversuch (Kap. 4.6.) lag bei den Tieren, die GO in gelöster Form erhalten hatten, der Antikörpertiter zwischen 1:128 und 1:256. Bei den beiden Tieren, die GOLs in einer Dreifachgabe i.v. bekamen, waren die Titer sehr hoch ($\geq 1:1024$). EPC:EPG:Chol-Liposomen scheinen die Immunantwort auf GO zu verstärken.

Gregoriadis et al. (2002) haben Liposomen für DNA-Vaccine verwendet, um die Aufnahme von DNA, die für das Oberflächenantigen von Hepatitis B kodiert, in antigenpräsentierende Zellen zu gewährleisten. Die verkapselte DNA hat zu einer wesentlich stärkeren Bildung von IgG-Antikörpern geführt als die nackte DNA.

Besonders kritisch ist in diesem Zusammenhang die *in vitro* nachgewiesene starke Aufnahme von EPC:EPG:Chol-Liposomen in Makrophagen (vgl. Kap. 4.4.) zu sehen. Wenn Makrophagen fremde Molekülmuster, in diesem Fall GO, erkennen, bilden sie MHC-Klasse-II-Moleküle. Die in Endosomen aufgenommenen Fremdmoleküle werden zu Peptiden abgebaut und dann von den MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert, woraufhin vermehrt Antikörper gebildet werden. (Janeway, 2002, 5. Aufl., 2002).

5.3.1.4. Expression von Komplementrezeptoren 24h nach GOL-Gabe

Bei der Expression von Komplementrezeptoren bestand zwischen den behandelten (GOL) und den unbehandelten (PBS) Tieren kein prinzipieller Unterschied.

Zen et al. (2003) haben beschrieben, dass CD11b unter Entzündungsbedingungen hochreguliert wird, wodurch die Granulozytenadhäsion zunimmt, was mit einer Hochregulation des Leukozytenintegrins Mac1 mit Gewebszerstörung als mögliche Folge (Witko-Sarsat et al., 2000; Schmidt, 2002) verknüpft sein könnte.

Bei den durchgeführten Infektionsversuchen mit *Staph. aureus* nahm der Anteil einfach CD18 positiver Granulozyten unter der Infektion ab und der doppelt positive Anteil zu.

Die GOL beeinflussten die Komplementrezeptorenexpression von CD 11b/ 18 auf Granulozyten bei der CGD-Maus nicht. Bei Monozyten und Lymphozyten war ebenfalls kein Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe zu sehen. Eine Aktivierung des Komplementsystems durch die GOLs fand somit nicht statt.

5.3.1.5. Schlussfolgerungen über die Verträglichkeit der GOL

Insgesamt wurde die Behandlung mit EPC:EPG:Chol:GOL gut vertragen. Das Komplementsystem wurde nicht aktiviert. Es waren weder deutliche Auswirkungen auf den Blutglucosegehalt noch auf das Verhalten oder das Gewicht der Tiere festzustellen. Nach 24h war GO in Leber und Milz, jedoch in keinem anderen untersuchten Organ nachweisbar. Mit Hilfe eines im Labor etablierten SandwichELISAs konnten große Enzymmengen nachgewiesen werden. Mittels eines direkten ELISAs wurde nachgewiesen, dass das Enzym im funktionellen Zustand vorliegt, also H₂O₂ produziert. Die Auswirkung der liposomalen Verkapselung auf die Antikörperbildung wurde mit Hilfe eines neu etablierten ELISAs untersucht. Sie führt zu höheren Antikörpertitern als die Verwendung gelöster GO. Bei der Verwendung von Liposomen als Arzneimittelcarrier ist also die Verwendung eines autologen und somit nicht immunogenen Enzyms anzustreben.

5.3.2. Wirksamkeit von GOL im Tierversuch

In den Tierversuchen wurde die Rekonstitution des oxidativen Bursts als Grundlage der GOL-Wirkung mit Hilfe des DHR-Assays überprüft. Die therapeutische Wirkung an sich wurde durch die Behandlung der *Staph.-aureus*-Peritonitis und der Burkholderia-Sepsis überprüft.

5.3.2.1. Rekonstitution des oxidativen Bursts

Eine Rekonstitution des oxidativen Bursts war mit Hilfe DHR-Assays weder eine Stunde nach der GO-Gabe (freie GO und GOLs, Langzeitversuch) noch 24h nach der GOL-Gabe (*Staph. aureus*-Infektion) in entnommenem Vollblut möglich. Die Positivkontrolle, Vollblut einer Wildtypmaus stimuliert mit PMA, war deutlich positiv. Die Proben der behandelten CGD-Mäuse hingegen waren stets negativ. Dennoch wurden Therapieversuche an infizierten Tieren gemacht.

5.3.2.2. Therapieversuch nach *Staph. aureus*- Infektion

Staph. aureus wurde gewählt, weil er einer der häufigsten krankheitsverursachenden Erreger bei CGD-Patienten ist (Segal et al., 2000).

Staph. aureus besitzt eine Resistenz gegen positiv geladene antimikrobielle Peptide des angeborenen Immunsystems (z.B. Defensine) (Fedtke et al., 2004).

CGD-Patienten sind beispielsweise nicht anfällig für *Pseudomonas aeruginosa*. Dieser Keim ist zwar ebenfalls Katalase-positiv, jedoch sehr empfindlich gegenüber Defensinen (Smiley et al., 2007).

Es gab bereits ein Infektionsprotokoll für den verwendeten Bakterienstamm bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Mausstamm (Dinauer, 2001). Dabei wurde allerdings lediglich die Eliminierung der Abszesse aus der Bauchhöhle als Parameter verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, weitere Parameter für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs und somit des Therapieerfolges zu finden.

Die mittlere Anzahl der Abszesse in der Leber war aufgrund der hohen Standardabweichung, sowie aufgrund der sehr verschiedenen Ausprägung der Entzündungen zwischen den einzelnen Mäusen, nicht als Parameter zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes geeignet. Die Anzahl der Keime (KbE) in der Peritoneallavage hing in erster Linie mit der Lokalisation der Abszesse zusammen. Wurde beim Eröffnen der Bauchhöhle ein Abszess getroffen oder waren Abszesse aufgrund von Verklebungen gerissen, wurden in der Peritoneallavage extrem hohe Keimzahlen gezählt. Bei unbeschädigten Abszessen war die Peritoneallavage unabhängig von deren Anzahl und Größe steril. Zwischen mit GOL behandelte und unbehandelte Gruppe war kein Unterschied nachzuweisen.

Subletale Infektionsdosen von *Staph. aureus* werden bei CGD-Mäusen langsamer aus der Bauchhöhle eliminiert als bei Wildtypmäusen (Pollock, 1995). Bei den Versuchen von Pollock entwickelten 7 von 11 CGD-Mäusen Abszesse. Es waren jedoch bei Beendigung des Versuchs auch bei einer der neun Wildtypmäuse Abszesse in der Bauchhöhle zu beobachten.

Bei den Versuchen von Dinauer 2001 zeigten weder CGD-Chimären mit 5- 20% funktionalen Granulozyten noch Knochenmark-transplantierte CGD-Mäuse mit 20% funktionalen Granulozyten reduzierte Abszessformation (Dinauer, 2001). Im Gegensatz dazu sind weibliche Merkmalsträger beim Menschen bereits bei 5% funktionalen Granulozyten unauffällig (Winkelstein et al., 2000).

Insgesamt stellt sich nach diesem Versuch die Frage, ob die *Staph. aureus* Peritonitis ein optimales Infektionsmodell darstellt. Von den untersuchten Parametern war keiner geeignet, Unterschiede im Infektionsverlauf zwischen der mit GOL behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe nachzuweisen.

5.3.2.3. Therapieversuch nach *Burk. cepacia*- Infektion

Burk. cepacia verursacht bei normal immunkompetenten Menschen bzw. Mäusen keine Infektion. In den Versuchen von Dinauer et al. (2001) waren Mäuse mit 30% normalen Granulozyten geschützt und überlebten im Gegensatz zu den Tieren mit geringerem Anteil normaler Granulozyten.

Die im Rahmen der Tierversuche erhobenen Parameter (Kap. 4.8) waren gut zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes geeignet. Für die Blutkultur würde sich vermutlich ein engeres Zeitraster (12h) anbieten, um rasche Krankheitsverläufe besser einschätzen zu können.

Die Anzahl der Keime (KbE) in der Peritoneallavage und der Leber korrelierte gut mit der Schwere der Erkrankung.

Die starke Segmentierung und deutliche Granulierung machten es schwierig, Granulozyten und Monozyten mikroskopisch zu differenzieren (Kap. 4.3.1.). Veränderungen wie Vakuolisierung und toxische Granulation werden in der Literatur als Veränderung beschrieben, die bei Sepsis sehr häufig beobachtet wird (Seebach et al., 1997). Eine sichere Differenzierung ist nach Auskünften des VetMedLab dann nicht möglich.

In der Hoffnung auf eine gute lokale Wirkung wurden im **Therapieversuch 1** die GOL intraperitoneal gegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Überlebensdauer der Tiere ist die Aufnahme und der Abbau der GO schwer zu beurteilen. Es fällt jedoch auf, dass bei einem Tier noch an Tag 7 *p. inf.*, bei anderen Tieren jedoch nicht einmal an Tag 3-6 GO in Leber und Milz nachzuweisen war. Eine Applikation ins Darmlumen kann nicht ganz ausgeschlossen werden.

Es gab im Krankheitsverlauf keine nennenswerten Unterschiede zwischen GOL-behandelter und unbehandelter Gruppe.

Um einen Therapieeffekt zu erreichen, wurden im **Therapieversuch 2** die Bedingungen intensiviert. Zunächst erfolgte eine *ex vivo* Inkubation von defizientem murinen Vollblut mit GOL, das anschließend i.p. gegeben wurde. Drei Stunden später erfolgte eine i.v. und weitere 3 Stunden später erfolgte eine i.p. Gabe GOL. Die Inkubation von

Vollblut mit GOL hatte *in vitro* zu einer guten Aufnahme geführt, das vorinkubierte Mausblut sollte am Ort der Infektion seine Wirkung entfalten.

Die intravenöse GOL-Gabe hatte zum Ziel, eventuell doch bereits systemisch gewordene Infektion zu bekämpfen. Schließlich wurden GOL noch lokal gegeben.

Die *ex vivo* Vorinkubation von Vollblut, die eventuelle Aufnahme Probleme *in vivo* und die rasche Clearance durch das RES in Leber und Milz umgehen sollte, blieb therapeutisch ebenfalls erfolglos.

Im Gegensatz zur Einfachgabe in Versuch 1 waren bei vergleichbaren Tötungszeitpunkten Antikörpertiter nachweisbar. Dennoch wurde die Behandlung mit GOL grundsätzlich sehr gut vertragen.

Es stellt sich die Frage, ob das Therapieversagen mit der Liposomenformulierung oder mit dem gewählten, suboptimalen Tiermodell zusammenhängt. Es konnte bei keinem der Versuche mit EPC:EPG:Chol-Liposomen eine Rekonstitution des oxidativen Bursts *in vivo* erreicht werden.

Die Ergebnisse mit Stealth-Liposomen *in vivo* werden in Kap. 5.5. diskutiert.

5.3.2.4. Elimination der GOL durch das RES

Da mit Hilfe der EPC:EPG:Chol:GOL *in vivo* weder die Rekonstitution des oxidativen Bursts noch ein therapeutischer Effekt bei Infektionen erreicht wurde, stellte sich die Frage nach den Gründen.

Als mögliche Ursache kommt die rasche Elimination von Liposomen im RES (Gregoriadis, 1995; Woodle und Lasic, 1991) in Frage.

Bei Hunden, Labornagern und Menschen werden Bakterien und andere Partikel überwiegend in der Leber entfernt (Tizard 2004). Früher hat man dafür ausschließlich die Kupferschen Sternzellen, Makrophagen, die an den Sinusoiden sitzen, verantwortlich gemacht. Heute stellt sich die Situation komplexer dar. Die Partikel werden von den Makrophagen zunächst nur gebunden. Bakterienprodukte interagieren mit den Toll-like Rezeptoren, wodurch es zu Sekretion von TNF- α und IL-1 kommt. Diese Mediatoren locken Neutrophile an, die an die Oberflächenintegrine der Kupferschen Sternzellen binden. Die Granulozyten nehmen die Partikel auf und verdauen sie. Im Anschluss daran folgt die Apoptose. Die apoptotischen Neutrophilen werden wiederum von den Kupferschen Sternzellen verdaut, wodurch die Freisetzung von Toxinen und Proteasen verhindert wird.

Für den Menschen ist bekannt, dass Lebermakrophagen überwiegend Komplementrezeptoren (CD35) besitzen und Milzmakrophagen mehr Antikörper-Rezeptoren (CD 64) (Tizard 2004). Wie es sich bei der Maus verhält, ist in der Literatur nicht vermerkt. Die hohen GO-Gehalte in der Milz auch nach Einfachgabe von Liposomen lassen jedoch vermuten, dass in der Milz von Mäusen auch antikörperunabhängig größere Mengen Liposomen eliminiert werden.

Für neu zu konzipierende Liposomenformulierung für den Einsatz *in vivo* könnte die Umgehung der Adhäsion an Makrophagen des RES angestrebt werden, was mit PEGylierten Liposomen erreicht werden kann (Kap.5.5.).

5.4. Entwicklung targetisierter Liposomen

Um die Aufnahme von besser sterilfiltrierbaren, kleinen Liposomen in Phagozyten zu ermöglichen, wurde die Oberfläche mit Hilfe von PEGylierten Sojasterolen funktionalisiert. An deren terminales Ende wurde IgG gekoppelt, um als Ziel (Target) den Fc-Rezeptor anzusteuern und somit die Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose zu nutzen. Albumin diente als Vergleichsprotein.

5.4.1. Einfluss des Alters der Liposomen auf die Aufnahme

Insgesamt waren die Ergebnisse uneinheitlich. Die proteingekoppelten Liposomen waren herstellungstechnisch noch nicht ausgereift. Leider war auch die Sterilität der Liposomenpräparationen nicht gewährleistet, nähere Untersuchungen an sterilen, gut charakterisierten Liposomen sind anzustreben.

Als Kontrolle diente unter anderem eine Vorstufe für die gekoppelten Liposomen, die sogenannten Ankerliposomen (vgl. Glossar). Sie sollten eigentlich in ihren Eigenschaften PEG-Liposomen entsprechen. Einigen Chargen (Kap. 4.9.4-5.) wurden jedoch gut aufgenommen.

Die Auswirkung der Lagerungsdauer wurde in dieser Arbeit untersucht. Frisch präparierte Liposomen (Alter unter 24h) standen nur für einen Versuch zur Verfügung (Kap. 4.9.1.). Auffällig war vor allem das Fehlen der Aufnahme in Monozyten bei guter Aufnahme in Granulozyten. Der Versuch fand vermutlich vor Abschluss des bei der Lagerung der Liposomen auftretenden Größenwachstums statt. Zwei Tage nach der Produktion lag der Anteil der Monozyten, die Immunliposomen aufgenommen hatten, bei über 60%. Die Eigenschaften der Liposomen haben sich also offensichtlich mit Zunahme der Lagerdauer verändert.

Bei frisch hergestellten Liposomen, Verhinderung des Größenwachstums oder kleinerer Ausgangsgröße wäre eventuell die Umgehung der Kupferschen Sternzellen der Leber möglich. Das wäre insbesondere im Hinblick auf die Antikörperbildung (vgl. Kap. 5.3.2.), aber auch im Hinblick auf die Verfügbarkeit für Granulozyten sehr wünschenswert.

Eine Lagerdauer von 2-6 Tagen scheint die Eigenschaften von gekoppelten Liposomen nicht weiter zu beeinträchtigen. Bei einer Lagerdauer von 8 Tagen hatten die gekoppelten Liposomen ihre Überlegenheit gegenüber konventionellen Liposomen verloren (Kap. 4.9.6.).

Das Größenwachstum in den ersten Tagen, die kurze Haltbarkeit (unter einer Woche) und das Fehlen einer Methode zur Aufkonzentration sind bei den gekoppelten Liposomen problematisch.

5.4.2. Aufnahme der Liposomen *in vitro* in Abhängigkeit von Liposomeneigenschaften und Inkubationsbedingungen

5.4.2.1. Einfluss des Serums auf die Aufnahme

Alle verwendeten Liposomentypen enthielten 30mol% Cholesterol, wodurch die Serumstabilität relativ hoch ist, da die Wechselwirkung mit HDL verhindert wird (Gregoriadis und Davis, 1979). Bei den gekoppelten Liposomen ist aufgrund der gleichen Mechanismen wie bei den PEG-Liposomen (vgl. Kap. 1.3.2.1.) davon auszugehen, dass auch die Interaktion der Liposomenmembran mit LDL verhindert wird.

Im Gegensatz zum Vollblut fand bei isolierten Leukozyten in Puffer (HBSS) keine Aufnahme gekoppelter Liposomen statt. Daraufhin wurde der Einfluss von Serum, hitzeinaktiviertem Serum und Heparinplasma näher überprüft.

Für die Aufnahme von mit Albumin oder IgG- gekoppelten Liposomen in Granulozyten und Monozyten war das Vorhandensein von nativem Serum bzw. Plasma Voraussetzung (vgl. Kap. 4.9.).

Daher kommen prinzipiell zwei Aufnahmewege in Frage (Tizard 2004).

1) Die **Antikörper-Rezeptor vermittelte Phagozytose** wird auch als Typ I Phagozytose bezeichnet. Sie wird vom spezifischen Ak-Rezeptor (CD32) der neutrophilen Granulozyten vermittelt. Aufgrund des Liganden wird er auch als Fc-Rezeptor bezeichnet. Physiologisch bindet er beispielsweise an mit Antikörpern

besetzte Bakterien an. Die Polymerisation von F-Aktin wird getriggert und F-Aktin haltige Fortsätze, auch als Lamellipodia bezeichnet, umschließen die Partikel.

Dieser Mechanismus sollte durch die gekoppelten Antikörper eigentlich direkt angesprochen werden. Da jedoch Albumin die gleichen Effekte erzielt, spielt vermutlich die körpereigene Opsonisierung eine Rolle. Möglicherweise sind bei der gewählten Koppelungsmethode auch nicht genügend IgG in der richtigen Orientierung gekoppelt.

2) Damit kommt auch die **Komplement-vermittelte Phagozytose** (Typ II) in Betracht. Dabei wird der Partikel ohne Lamellipodiabildung umschlossen. Der Rezeptor für C3b, als CD35 oder CR1 bezeichnet, kommt neben Granulozyten auch auf Monozyten, B-Zellen und anderen Zellen vor. Die Bindung von C3b-gecoateten Partikeln muss aber nicht zur Aufnahme führen. Allerdings führen Mechanismen wie das „Trapping“ in der Regel zu einer Oberflächenphagozytose.

Da die Opsonisierung entscheidend für die Aufnahme ist, kann ausgeschlossen werden, dass die Bildung von Liposomenaggregaten die Aufnahme verursacht. Es wäre sofort die kritische Größe von 200 nm (Harashima et al., 1995) überschritten, die Partikel würden serumunabhängig aufgenommen.

Die Aufnahme in isolierte Zellen, resuspendiert in Serum oder Plasma und in Vollblut, schwankte aufgrund des Stresses für die Zellen beim Isolieren sehr stark. Daher sind die einzelnen Ansätze schwer zu vergleichen.

Da in hitzeinaktiviertem Serum resuspendierte Zellen keinerlei Aufnahmen zeigten, ist eine hitzeempfindliche Komponente für den Aufnahmeprozess von entscheidender Bedeutung. Liu et al. (1995) halten es für sehr wahrscheinlich, dass der Komplementfaktor C3 eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Liposomen durch Kupfersche Sternzellen des Menschen spielt. Bei Mäusen hingegen spielen Serumopsonine für die Liposomenaufnahme durch die Leber keine Rolle.

5.4.2.2. Einfluss der gekoppelten Proteine auf die Aufnahme

Durch die Koppelung von IgG an PEGylierte Sojasterole wurde eine Targetisierung der Liposomen auf Phagozyten angestrebt (vgl. Glossar und Kap. 3.2.1.).

Die terminale Koppelung von IgG an PEGylierte Sojasterole gelang.

Die Koppelungseffizienz durchlief ein Maximum bei einer Proteinkonzentration von 2mg/ml und einem Anker/Proteinverhältnis von 225:1 (Gantert 2006, unveröffentlichte Daten). Der Liposomendurchmesser nahm mit der Proteinkonzentration zu. Es kam

nach der Extrusion zu einem Größenwachstum der Liposomen. Nach 72h wurde keine Zunahme des Durchmessers mehr beobachtet.

Laut Weissmann et al. (1974) ist IgG₂ im Gegensatz zu anderen Untergruppen der IgG-Fraktion gegenüber Liposomen und vermutlich auch gegenüber Zellmembranen inert und das Fc-Fragment ist so aktiv wie bei IgG₁, der aktivsten IgG-Untergruppe. Daher bietet sich für weitere Koppelungsversuche IgG₂ an.

Mit dem gekoppelten IgG sollte direkt der Fc-Rezeptor der Granulozyten angesprochen werden. Die durch die Koppelungsform gewährte freie Präsentation und die flexible PEG-Kette erlauben eine gute Interaktion von Ligand und Zielstruktur. In der Literatur sind lange Zirkulationszeiten für diesen Liposomentyp beschrieben, wobei ein Zusammenhang zwischen Zirkulationszeit und Ligandenlast besteht (Allen et al., 1995; Maruyama et al., 1995; Huwyler et al., 1997). Gerade die konkrete Ligandenlast entsprach bei der Herstellung bisher oft nicht den Erwartungen.

Zwischen Serumalbuminen und Immunglobulinen schien, was den Erfolg der Targetisierung auf Phagozyten betrifft, kein wesentlicher Unterschied zu bestehen.

Die IgG-vermittelte Phagozytose fand serumunabhängig statt. Daher haben die IgG-gekoppelten Liposomen nicht direkt den Fc-Rezeptor angesprochen, ohne Oponisierung (isolierte Zellen in hitzeinaktiviertem Serum) fand keine Aufnahme statt. Wahrscheinlich werden die gekoppelten Liposomen durch Serumantikörper opsonisiert und damit unabhängig vom (immunogenen) Protein der Erkennung durch den Fc-Rezeptor zugänglich.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse nach Vorinkubation mit IgG interessant (Kap. 4.9.7.). Natives IgG förderte die Aufnahme von gekoppelten Liposomen in **Granulozyten**, hitzedenaturiertes IgG hingegen nicht. Das spricht dafür, dass die nativen IgG die Liposomen opsonisieren und diese dann leichter aufgenommen werden können.

Vollkommen anders verhielt es sich bei den Monozyten. Hier hemmte sowohl natives als auch hitzeinaktiviertes IgG die Aufnahme von gekoppelten Liposomen. Ähnliche Effekte bei Kupferschen Sternzellen von Ratten wurden von Derksen et al. (1987) auf eine Hemmung des Fc-Rezeptors zurückgeführt. Dabei hemmten gleichermaßen niedrige Mengen BSA die Aufnahme nicht, große Mengen hingegen schon. Es scheinen also auch nicht Fc-Rezeptor vermittelte Aufnahmen eine Rolle zu spielen.

Es stellt sich die Frage, welche Aufnahmeform bei den Granulozyten durch die nativen Antikörper gefördert wird. Möglicherweise führt die Opsonisierung durch Antikörper zu einer leichteren Aufnahme durch Fc (CD32)–Rezeptor vermittelte Phagozytose.

Die Hemmung bei den **Monozyten** könnte durch CD 64 ausgelöst sein. Es kommt auf Monozyten konstitutiv, auf Granulozyten nur induziert vor. Bei Bindung von Fc-Stücken an CD 64 kommt es im Gegensatz zu den anderen Fc-Rezeptoren zu einer direkten Auslösung des oxidativen Bursts (Janeway, 2001). Fc-Rezeptoren binden an antikörperbeschichtete Partikel mit höherer Avidität als an IgG-Monomere. Allerdings kommt eine verbesserte Bindung generell durch Aggregation oder Multimerisierung zustande. Zu dieser kommt es auch durch die Bildung von Immunkomplexen, was bei der Vorinkubation mit nativem IgG die Erklärung sein könnte. Die bei der Hitzedeaktivierung entstandenen Aggregate könnten eventuell ebenfalls binden.

Wird so über CD 64 durch die Vorinkubation mit IgG bereits vor der Zugabe der Liposomen der oxidative Burst ausgelöst, kann das eine herabgesetzte Aufnahme der Liposomen im Anschluss verursachen.

Bei den **Lymphozyten** wird der positive Anteil durch die Vorinkubation mit IgG ebenfalls deutlich gehemmt. Offensichtlich wurden hier die Fc-Rezeptoren blockiert. Das spricht dafür, dass eine Bindung der gekoppelten Liposomen an Fc-Rezeptoren für die teilweise sehr hohen Werte bei der Inkubation mit Lymphozyten verantwortlich sein könnte.

Es gibt Hinweise darauf, dass das verwendete Vergleichsprotein Albumin, ebenso wie IgG, im Blut als Opsonin fungiert (Hernandez-Caselles et al., 1993). Als Mechanismus kommt nach den vorliegenden Ergebnissen nicht nur die Fc-vermittelte Phagozytose, sondern die komplementvermittelte Phagozytose (Typ II) in Frage. Daher sollte ein Kontrollprotein gewählt werden, das weder mit dem Komplement, noch mit Immunglobulinen in Wechselwirkung tritt.

Über den Einfluss der Proteinmenge ($\mu\text{mol/mg Lipid}$) auf die Aufnahme kann aufgrund der lückenhaften Datenlage keine Aussage getroffen werden.

Die Koppelung von Proteinen verbessert auch im Mausmodell die Aufnahme von Liposomen. Gerade aufgrund der geringen Granulozytenzahl im Mausblut könnte eine gezielte Targetisierung auf Granulozyten eine entscheidende Verbesserung des Modells bringen.

Trotz aller Schwierigkeiten wurden die proteingekoppelten Liposomen in Vollblut wesentlich besser aufgenommen als die bis dahin verwendeten EPC:EPG:Chol-Liposomen.

Die gute Aufnahme frisch präparierter Liposomen in Granulozyten und das Fehlen der Aufnahme in Monozyten (Kap. 4.9.1.) lässt hoffen, dass bei optimaler Kombination von Größe und Koppelung eine Targetisierung auf Granulozyten möglich ist.

5.5. Pharmakokinetik kleiner GO-EPC:EPG:Chol-PEG- und Anker-Liposomen im Mausmodell

Da eine Aufkonzentration der gekoppelten Liposomen mit der bisher eingesetzten Ultrazentrifugation noch nicht möglich war, wurde mit den Vorstufen für gekoppelte Liposomen (Ankerliposomen, PEGylierte Sojasterole abhydrolisiert) und den vergleichbaren, ohne für die Koppelung notwendigen Zwischenschritten hergestellten EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt.

Huwyler et al. (1997) hat pharmakokinetische Untersuchungen an Ratten mit 85nm großen konventionellen sowie PEG-Liposomen mit und ohne terminale Koppelung von Antikörpern gemacht. Die Organgehalte waren für Lunge, Herz und Niere für alle Liposomentypen gering. Die konventionellen Liposomen wurden in großem Umfang von Leber und Milz aufgenommen. Dies war für PEG-Liposomen nicht der Fall, sie umgehen also das RES.

Bei den IgG_{2a}-gekoppelten Liposomen waren die Stealth-Eigenschaften nur teilweise aufgehoben. Huwyler hat bei langer Verweildauer im Blut in allen untersuchten Organen geringe Liposomengehalte festgestellt, jedoch weder für Milz noch für Leber in einem erhöhten Ausmaß. Aufgrund der Ergebnisse von Huwyler kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass IgG-gekoppelte Liposomen eine für unseren Therapieansatz geeignete Pharmakokinetik haben.

Die bei Huwyler gefundenen Eigenschaften machen die IgG_{2a}-gekoppelten Liposomen für unsere Anwendung attraktiv. Gewisse Liposomengehalte in allen Geweben bei langer Halbwertszeit im Blut wären für unsere Anwendung wünschenswert.

Für die in dieser Arbeit verwendete Verkapselungs- und Koppelungsmethode muss erst noch eine Technik zur Aufkonzentration entwickelt werden, bevor gekoppelte Liposomen im Tierversuch eingesetzt werden können. Da wir allerdings mit einem anderen Tiermodell arbeiten, galt es zunächst, die Organverteilung für die Ankerliposomen als Vorstufe für die Immunliposomen zu überprüfen.

Parallel dazu wurden PEG-Liposomen untersucht. Im Optimalfall sollten sie sich in ihren Eigenschaften nicht von den Ankerliposomen unterscheiden.

Es wurde mit Liposomen gearbeitet, in denen GO verkapselt war. Der Nachweis der GO in Organen und Serum mit Hilfe der beiden ELISAs ist auch bei kleinen Probenmengen möglich und so kann auch direkt die Rekonstitution des oxidativen Bursts *in vivo* überprüft werden.

Beim Nachweis der GO fallen hohe Serumwerte und niedrige Organwerte auf, für die PEG-Liposomen etwas ausgeprägter als für die Ankerliposomen. Beide Liposomenpräparationen scheinen also Stealth-Eigenschaften zu besitzen.

Eine Halbwertszeit kann nicht angegeben werden, da es sich bei der Kinetik, insbesondere in der ersten Stunde nach Applikation, nicht um eine Funktion erster Ordnung handelt.

Die Hälfte der Ankerliposomen war nach etwa 5 Stunden und die Hälfte der EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach etwa 8 Stunden aus dem Blut eliminiert. Um Daten verschiedener Mäuse unabhängig von der tatsächlich applizierten Liposomenmenge vergleichen zu können, wurde der Serum-Leber-Quotient berechnet (Kap. 4.10.2). Die etwas stärkere Elimination der Ankerliposomen durch die Leber zeigt, dass es bei der Qualität der Liposomen noch Abweichungen gibt.

Kimpfler (2003) hat beobachtet, dass die EPC:EPG:Chol-Liposomen nach einer schnell eliminierenden Anfangsphase bei hohen Lipidkonzentrationen ein bestimmtes Level hielten oder bei niedrigeren Lipidkonzentrationen nach 8 Stunden ganz eliminiert wurden. Der Effekt wurde mit einer Absättigung des RES (=mononukleäres Phagozytensystem/ MPS) erklärt.

Aufgrund des weitaus langsameren Abbaus der in unserem Fall verwendeten Stealth-Liposomen ist von einer langsamen Absättigung des MPS auszugehen. Die schnellere Elimination der Liposomen aus dem Blut in der Anfangsphase kommt wahrscheinlich durch die Aufnahme in Zellen des MPS zustande.

PEG-Liposomen werden schließlich auch durch Zellen des MPS eliminiert (Huang et al., 1992; Koning et al., 2003). Bei niedrigen Dosen ist die Elimination dosisabhängig (Utkhede und Tilcock 1994). Laverman (2000) hat gezeigt, dass bei niedriger Lipiddosis PEG-Liposomen schnell von Zellen des MPS aus der Blutzirkulation eliminiert werden. In hohen Dosen beträgt die Halbwertszeit dosisunabhängig bei Ratten 24h und bei Menschen 50h.

Leider wurden die beschriebenen Ergebnisse nicht an Mäusen ermittelt. Es ist jedoch bekannt, dass das RES von Mäusen mit 1 mg Lipid / Maus abgesättigt ist (Mauk und Gamble, 1979). Diese Menge wurde in unseren Versuchen bei allen Liposomenapplikationen überschritten.

5.5.1. Rekonstitution des oxidativen Bursts durch GO-EPC:EPG:Chol-PEG- und Anker-Liposomen

Die Rekonstitution des oxidativen Bursts in den defizienten Granulozyten wurde mit Hilfe des DHR-Assays nachgewiesen. Der Versuch war so angelegt, dass das Vollblut zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation zur Verfügung stand.

In der Ankerliposomengruppe korrelieren hohe GO-Serumwerte nach 5 min. mit positiven Ergebnissen im DHR-Assay. Danach kam es nicht mehr zu nachweisbar positiven Werten.

Aufgrund niedriger GO-Serumwerte bei Tieren der PEG-Gruppe ist das Ergebnis des DHR-Assays schwierig zu bewerten. Eine Rekonstitution des oxidativen Bursts war bei nach 6 Stunden (2 Tiere) und nach 24 Stunden (ein Tier) getöteten Mäusen nachweisbar. Zu dem zweiten nach 24 Stunden getöteten Tier ist anzumerken, dass die GO-Organ- und Serumgehalte unter denen des positiven Tieres lagen. Es wurde also nur ein Teil der Liposomen intravenös appliziert.

Es waren in allen Fällen lediglich 6- 16% der Granulozyten positiv. Im Mausmodell ist gemäß Dinauer (2001) dadurch im Gegensatz zum Menschen keine verbesserte Abwehr von Krankheitserregern zu erwarten.

Trotz der Schwierigkeiten gelang es in diesem Versuch erstmalig, mit Hilfe von GOL *in vivo* den oxidativen Burst zumindest teilweise zu rekonstituieren. Das war unerwartet, da es sich bei den EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen um sogenannte Stealth-Liposomen handelt.

In der Literatur wird diskutiert, dass die PEG-Liposomen zwar mit einer geringeren Rate, aber nicht in einem geringeren Ausmaß von den Zellen des MPS aufgenommen werden (Oussoren 1998).

Problematisch ist das in der Literatur diskutierte „accelerated blood clearance“ Phänomen (Dams et al., 2000; Laverman et al., 2001; Ishida et al., 2002b; Bendas et al., 2003; Ishida et al., 2003a; Ishida et al., 2003b; Ishida et al., 2004). Bei wiederholter Injektion in Maus, Ratte und Rhesusaffe kommt es zu rascher Elimination der Liposomen durch die Leber, ohne dass diese pathologische Veränderungen zeigt. Der

gleiche Effekt zeigt sich auch bei konventionellen Liposomen und kann durch die PEGylierung der Liposomen nicht unterbunden, wohl aber abgeschwächt werden. Trotz PEGylierung ist die mehrfache Applikation von Liposomen also nicht unproblematisch. Papahadjopoulos (1991) hat eine Anreicherung von PEG-Liposomen in Tumoren festgestellt. Das wird auf eine erhöhte Permeabilität des Gefäßendothels zurückgeführt. Diese ist auch bei Entzündungsherden gegeben, welche bei CGD-Patienten bekämpft werden sollen.

Es müsste untersucht werden, was mit den PEG-Liposomen im Gewebe geschieht. Die Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten im Blut ist bei diesem Liposomentyp offensichtlich zwar doch in einem gewissen Maße vorhanden, aber sicher nicht ausreichend. Aber auch die lokale Freisetzung der GO kann positive Effekte zur Folge haben. H_2O_2 kann in die Granulozyten diffundieren und dort von der intakten Myeloperoxidase in HOCl umgesetzt werden. Auch wenn die physiologische bakterizide Bedeutung dieses Prozesses gerade angezweifelt wird (Segal et al., 2002), ist eine pharmakologische Wirkung auf alle Fälle zu erwarten (Roos et al., 2002).

Verstärkt werden könnte dieser Effekt durch einen von Brinkmann et al. (2004) entdeckten Mechanismus. Granulozyten sind in der Lage, Mikroorganismen ohne vorausgegangene Phagozytose zu zerstören. Dazu werden verschiedene Komponenten (DNS, Histone, lysosomale Enzyme wie Myeloperoxidase) nach außen abgegeben. Sie bilden auf der Oberfläche der Granulozyten ein Netzwerk, in dem die Mikroorganismen eingefangen und abgetötet werden. Daher könnten lokal vorliegende GOLs durch Bereitstellung von H_2O_2 ein wirkungsvolles Verstärkersystem bei der Abtötung der Bakterien sein.

Der limitierende Faktor wird jedoch die Sauerstoff- und Glucosekonzentration im entzündeten Gewebe sein. Auf eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Problematik durch die Verwendung eines generell anderen Ansatzes, die ex-vivo Inkubation von Vollblut mit geeigneten Liposomen, soll in Kap. 5.7.3. eingegangen werden.

Die Effizienz der Liposomen könnte mittels Targetisierung auf Granulozyten durch geeignete Koppelung mit Proteinen vermutlich gesteigert werden. Huwyler et al. (1997) hat an Ratten nachgewiesen, dass Immunoliposomen eine lange Verweildauer im Blut aufweisen. Aufgrund der guten Aufnahmeergebnisse in Phagozyten des Vollbluts *in vitro* (vgl. Kap. 5.5.1.) ist von einer kontinuierlichen Aufnahme der IgG-gekoppelten Liposomen auszugehen. Im humanen Blut stellen die Granulozyten mit rund 70% die

größte Fraktion. Eine nennenswerte Aufnahme in Lymphozyten ist nicht zu erwarten. Granulozyten haben im Blut eine Verweildauer von etwa 8 Stunden und wandern bei Entzündungsprozessen ins betroffene Gewebe. Die im Blutstrom aufgenommene GO kann dann die ROS zur Keimabtötung zur Verfügung stellen.

Die untersuchten Ankerliposomen sind als Ausgangsliposomen für die Koppelung geeignet.

Für weitere Versuche bieten sich Terminalversuche an narkotisierten Tieren mit Jugulariskatheter an. Dieses Vorgehen war jedoch mit dem gestellten Tierversuchsantrag nicht durchzuführen, sollte aber bei einer Weiterführung der Arbeit angestrebt werden. Das ist für die Tiere schonender, die Ungenauigkeit der intravenösen Injektion wäre behoben und die häufige Entnahme kleiner Blutmengen wäre unproblematischer.

5.6. Eignung der Glucoseoxidase

Samoszuk et al. (1993) hat für freie Glucoseoxidase, die nicht pyrogen ist (Uppoor et al. 2001), in vorklinischen Studien bei Mäusen eine gut kalkulierbare Toxizität festgestellt und hält das Enzym für den Einsatz beim Menschen für geeignet. Die problematischsten Nebenwirkungen waren Methämoglobinämie und Hypoglycämie. Die Methämoglobinämie und Hypoglycämie blieb aber bei der verkapselten Form der GO (EPC:EPG:Chol-Liposomen) aus (Gerber et al. 2001).

Muzykantov (1989) hat gezeigt, dass in Gewebe injizierte, an Kollagenantikörper gebundene GO zu Hyperämie und Schwellung führt. Nach einer Woche kommt es zu Nekrosen. Aufgrund der hohen lokalen Konzentration wirkt das gebildete H_2O_2 proinflammatorisch. An Isotypantikörper gekoppelte GO blieb nicht am Injektionsort und hatte bei gleicher Applikation keinerlei Wirkung.

GO ist laut Muzykantov (1989) bei geeigneter Konjugation geeignet, lokal Entzündungsreaktionen zu modulieren. Um eine gute lokale Wirkung zu erzielen, soll in unserem Fall die GO in den Phagozyten an den Entzündungsort gelangen.

5.6.1. Auswirkung der liposomalen Verkapselung von GO auf die Antikörperbildung

Es gibt keine Literaturdaten über das Ausmaß der Bildung von Antikörpern gegen die rekombinant hergestellte GO aus *Aspergillus niger*. Da es sich um ein Fremdprotein handelt, ist jedoch von einer gewissen Ak-Bildung auszugehen. Uppoor et al (2001)

haben nach Injektion von GO und Peroxidase bei Kaninchen semiquantitativ Antikörper nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit gelang die quantitative Bestimmung von Antikörpern. Dazu wurde ein ELISA etabliert. Die liposomale Verkapselung in EPC:EPG:Chol-Liposomen führte bei Mehrfachgabe zu deutlich höheren Serumtitern als die Gabe gelöster GO (Kap. 4.6.5.). Ob dieser Effekt durch gute Targetisierung von Immunoliposomen auf Granulozyten zu umgehen ist, bleibt zu überprüfen.

Zur Vermeidung dieser Effekte sollte ein ROS-bildendes, humanes und daher nicht immunogenes Enzym verwendet werden. Darauf soll in Kapitel 5.7.3 näher eingegangen werden.

5.7. Die liposomale Verkapselung ROS-bildender Enzyme unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse in der Granulozytenforschung und aktueller Entwicklungen in der Therapie der CGD

Die Konzeption dieser Arbeit bei ihrem Beginn ging von folgenden Voraussetzungen aus:

Neutrophile Granulozyten von Patienten mit septischer Granulomatose können kein Superoxidanion, und daher in weiterer Folge auch kein H_2O_2 bilden. Als eigentlich zytotoxische Hauptsubstanz wurde HOCl angesehen, das aus H_2O_2 und Chlorid in der MPO-Reaktion gebildet wird. CGD-Granulozyten weisen normale MPO-Aktivitäten auf, weshalb ein H_2O_2 generierendes System den defekten Granulozyten zugeführt werden sollte. Es war bekannt, dass Phagozyten sehr schnell Liposomen aufnehmen können. Das hat in den meisten Fällen ihre unerwünschte Elimination zur Folge. Für unsere Fragestellung boten sich diese Arzneimittelträger für das Vorhaben jedoch geradezu an. Durch die verkapselte GO sollte nach der Phagozytose mit Hilfe der ubiquitär vorkommenden Substrate Glucose und Sauerstoff das Produkt H_2O_2 entstehen. Mit Hilfe der MPO wird es zur hochtoxischen HOCl umgesetzt werden. *In vitro* Untersuchungen an isolierten Granulozyten von CGD Patienten bestätigten die grundsätzliche Machbarkeit. Nachdem auch Vorversuche an der CGD-Maus, die in Indianapolis im Labor von Mary Dinauer durchgeführt wurden, erfolgreich verliefen, wurde ein DFG-Projekt konzipiert und genehmigt. Es hatte die Umsetzbarkeit dieses experimentellen Ansatzes *in vitro* und am Mausmodell *in vivo* zum Ziel.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass insbesondere das Mausmodell problematisch ist. Nach den gemachten Erfahrungen, und in Anbetracht geradezu revolutionärer neuer Erkenntnisse bezüglich der tatsächlichen toxischen Wirkungsweise der Granulozyten, ergibt sich nun ein etwas klareres Bild, warum der gewählte Ansatz seine Schwierigkeiten hatte. Es wird aber auch ersichtlich, welche Richtungen man in der Zukunft, auch auf der Basis der hier gemachten Erfahrungen, bei der Behandlung der CGD besser einschlagen sollte. Darüber zu reflektieren, ist Gegenstand dieser nun abschließenden Anmerkungen.

5.7.1. Problematik des Tiermodells CGD-Maus

Zunächst soll auf die Problematik des Tiermodells CGD-Maus eingegangen werden.

Wildtyp-Chimären und getherapierte Tiere mit bis zu 20% funktionsfähigen Granulozyten sind genau so infektionsanfällig wie die komplett NADPH-Oxidase-defizienten CGD-Mäuse (Dinauer 2001). Eine geringere Infektanfälligkeit ist also auch mit der mit Hilfe von GO-Anker und kleinen GO-EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen erreichten Rekonstitution des oxidativen Bursts bei 6-16% der Granulozyten nicht zu erwarten.

Wichtig für die Interpretation sämtlicher Tierversuchsergebnisse ist das Blutbild der Mäuse.

Es gibt bei Tieren verschiedene Grundmuster der Blutbilder. So ist das Blutbild von Mäusen, Rindern und Schweinen im Gegensatz zu dem des Menschen lymphozytär, das heißt, von Lymphozyten geprägt. Neutrophile Blutbilder besitzen neben dem Menschen beispielsweise Hunde.

CGD-Mäuse (Kap. 4.3.1. und Kap. 4.3.2.2.2.) haben ein dem Wildtyp C57Bl6/J entsprechendes Blutbild. Bei Dinauer et al. (2001) ist für sechs Mäuse mit $10\% \pm 6\%$ Granulozyten ein Wert angegeben, der sich mit den eigenen Ergebnissen deckt. Das Blutbild ist also lymphozytär (90 % Lymphozyten).

Der geringe Anteil an Granulozyten ist natürlich für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen prinzipiell von Nachteil. Die Messung im Peroxidasekanal des ADVIA 120 hat darüber hinaus gezeigt, dass Granulozyten der verwendeten CGD-Mäuse und des Wildtyps C57Bl6/J einen sehr niedrigen Myeloperoxidasegehalt haben (Kap. 4.3.2.). Der niedrige Myeloperoxidasegehalt der Granulozyten spielt für den gewählten pharmakologischen Ansatz eine besonders große Rolle, da im Vergleich zum Menschen

von einer stark reduzierten Bildung der bakteriziden hypochlorigen Säure auszugehen ist.

Das Mausmodell als einzigem vorhandenen Knock-out-Modell für die NADPH-Oxidase-Defizienz erwies sich deshalb für die Fragestellung dieser Doktorarbeit als nur bedingt geeignet.

Hunde mit ihrem dem Menschen sehr ähnlichen Blutbild (60-80% Granulozyten) kämen als alternatives Modelltier in Frage. Allerdings wären nur toxikologische und pharmakokinetische Untersuchungen möglich, da es außer den zwei Mausmodellen kein Knock-out für die NADPH-Oxidase gibt.

5.7.2. Ablauf des oxidativen Bursts in den Granulozyten im Hinblick auf die Bedeutung der verschiedenen ROS

Im Laufe der letzten Jahre haben sich die Vorstellungen von den Abläufen in den Granulozyten stark verändert. Die physiologische Bedeutung von H_2O_2 und HOCl bei der Abtötung von Mikroorganismen wird durch die Arbeit von Reeves et al. (2002) stark in Frage gestellt. Die Relevanz des oxidativen Bursts bis zur Bildung des Superoxids ist weiterhin unumstritten. Die intensive Bildung des negativ geladenen O_2^- im Inneren des Phagosoms muss durch positive Ladungsträger neutralisiert werden. Der Ladungsausgleich innerhalb des Phagolysosoms findet jedoch nicht, wie bisher angenommen, hauptsächlich durch Protonen, die zur Entstehung von H_2O_2 führen ($\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HO}_2^-$; $2\text{HO}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$), sondern durch eingeströmte K^+ -Ionen statt (siehe Abb. 2).

Diese K^+ -Ionen verdrängen positiv geladene Proteasen, unter anderem Elastase, von ihren Bindungsstellen, den sulfatierten Glykoproteinen an der Innenseite der Membran des Lysosoms. Die Enzyme werden dadurch aktiviert und katalysieren dann den Abbau der phagozytierten Stoffe.

Klebanoff (1968) hat die bakterizide Wirksamkeit von HOCl , das aus H_2O_2 und Chlorid mit Hilfe der Myeloperoxidase entsteht, *in vitro* belegt. Er ging davon aus, dass es sich dabei um den physiologisch bedeutsamsten Weg handelt.

Aufgrund der Einführung des ADVIA zur Blutbildbestimmung wurde das häufige Vorkommen der Myeloperoxidasedefizienz (1:4000) bekannt. Dabei sind die Betroffenen klinisch meist vollkommen unauffällig.

Physiologisch spielen H_2O_2 und HOCl somit bei der Abtötung der Mikroorganismen nicht die bedeutende Rolle, die man ihnen bisher zugeschrieben hat. Ihre stark bakterizide Wirkung macht sie jedoch im Hinblick auf einen pharmakologischen Einsatz weiterhin attraktiv.

HOCl ist toxisch und kann auch von den Granulozyten von CGD-Patienten durch die vorhandene Myeloperoxidase aus H_2O_2 gebildet werden (Gerber et al., 2001).

Zu diesem Zweck sollte die Glucoseoxidase, die mit Hilfe von Glucose H_2O_2 bildet, zum Einsatz kommen. Enzyme unterliegen jedoch im Körper rasch einem Abbau. Um die GO zu schützen und an ihren Wirkort in den Phagozyten zu bringen sind Liposomen geeignete ‚Drug-Carrier‘ (vgl. Kap. 1.4.2.). Sie verzögern die Bildung von H_2O_2 im Blut, da die Glucose erst langsam in die Liposomen eindringt.

Darüber hinaus wurde uns erst im Laufe der Arbeit ein Aspekt klar, der die Verwendung von GO prinzipiell in Frage stellt.

Neutrophile Granulozyten bestreiten ihren Energiestoffwechsel praktisch ausschließlich über die Glykolyse (Sbarra und Karnovsky, 1959), d.h. die für die Phagozytose benötigte Energie wird vor allem durch die vermehrte Bildung von Laktat gewonnen (Levin, 1973).

Der Granulozyt lagert dafür während seiner Reifung im Knochenmark in großen Mengen Glycogen ein. Das ist sehr sinnvoll, da Granulozyten ihre Aufgaben nach dem Austritt aus der Blutbahn in, meist sauerstoff- und nährstoffarmen, Gewebereichen erfüllen. Es ist also auch kaum Glucose vorhanden.

Der Energiehaushalt, und somit auch die Phagozytose und Chemotaxis ist somit bei NADPH-Oxidase defizienten Granulozyten nicht beeinträchtigt (Bridges, et al. 1959, Klebanoff und Clark, 1978).

Der vorhandene Sauerstoff wird von den gesunden Granulozyten also nicht für die oxidative Phosphorylierung, sondern für die Superoxidanionproduktion eingesetzt. Die dafür benötigte Glucose wird entweder aus der Umgebung aufgenommen oder aus Glykogen gewonnen (Borregaard und Herlin 1982).

Das Problem liegt nun darin, dass Glykogen bei seinem Abbau zu Glucose-1-Phosphat metabolisiert wird, und von dort aus direkt weiter zu Glucose-6-Phosphat (Löffler 2000). Daher entsteht beim Abbau von Glycogen gar keine freie Glucose, die für die H_2O_2 Bildung über die GO-Reaktion benötigt wird.

5.7.3. Alternativen zur GO: Der Einsatz von Xanthin-Oxidase

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt erwähnten Probleme mit dem Enzym GO und seinem Substrat, der Glucose, und der Ergebnisse von Reeves (2002) wäre es vermutlich wirkungsvoller, ein Superoxidanion generierendes System in Liposomen zu verkapseln.

Außerdem wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass liposomal verkapselte GO eine verstärkte Antikörperbildung auslöst. Es sollte also unbedingt ein humanes Enzym zum Einsatz kommen. Da die NADPH-Oxidase auf Grund ihrer komplexen Struktur und Aktivierung nicht geeignet ist, käme z.B. die Xanthin-Oxidase in Frage, die bei Angebot von Xanthin und Sauerstoff Superoxidanion und Harnsäure bildet. Allerdings können nicht wie bei der GO mit Glucose und Sauerstoff ausschließlich ubiquitär vorkommende Substrate genutzt werden, weshalb hier ein neues Therapiekonzept vorgeschlagen wird.

Blut vom Patienten, möglicherweise nach vorausgegangener Applikation von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) zur Erhöhung des Granulozytenanteils im Blut, wird gewonnen und *ex vivo* mit XO-Liposomen und Xanthin 15 – 30 min inkubiert. Xanthin ist eine Vorstufe der Harnsäure und stellt ein körpereigenes Abbauprodukt der Purinnukleotide dar, sollte also bei Rücktransfusion des Blutes gut vertragen werden. Auf diese Weise könnte die fehlende Superoxidanionproduktion in den Patienten-Granulozyten ersetzt werden.

Durch die *ex-vivo* Inkubation ließe sich ein optimiertes Einbaukonzept erarbeiten, mit dem es möglich sein sollte, bei wiederholten Gaben eine effektive Bekämpfung akuter bakterieller Infektionen zu erreichen.

Durch die veränderte Applikationsform wird der Einsatz dieses Enzyms erst ermöglicht und zusätzlich bei geeigneter Liposomenformulierung die Aufnahme in die Granulozyten sichergestellt.

5.7.4. Aktuelle Entwicklungen in der Therapie der CGD

Es kommen verschiedene Konzeptionen zur Bekämpfung der septischen Granulomatose in Frage. Dabei wird zum einen die permanente Heilung angestrebt (1,2), zum anderen die Bekämpfung akuter Probleme und die Vorbereitung auf kurative Eingriffe (3,4).

1. Gentherapie
2. Knochenmark /Stammzelltransplantation
3. Gabe von gesunden Granulozyten
4. *ex vivo* Vorbehandlung von autologem Vollblut mit XO-enthaltenden Liposomen

Die beiden ersten Ansätze stellen wichtige Konzeptionen mit bereits erfolgten klinischen Anwendungen dar, und es ist möglich, dass die eine oder andere Methode einmal die Methode der Wahl bei der Bekämpfung der septischen Granulomatose werden wird.

Es hat mittlerweile eine zumindest zunächst erfolgreiche Gentherapie bei zwei an CGD (gp91-defizient) erkrankten Männern stattgefunden (Ott et al., 2006). Allerdings ist einer der beiden Patienten an einer für die Ausgangserkrankung typischen Sepsis nach gut zwei Jahren verstorben (Zeit online 2006).

Luigi Naldini (2006) sieht hohe Risiken in der Verwendung des retroviralen Vektors, der auch noch für den guten Therapieerfolg verantwortlich zu sein scheint. Bestimmte Zellklone hatten wider Erwarten einen Wachstumsfaktor. Im Beobachtungszeitraum kam es zu keiner Entartung, das Risiko ist jedoch nicht zu leugnen. Es stellt sich die Frage, ob man diesen therapeutischen Ansatz bei diesem Risiko weiter verfolgen soll.

Die Knochenmarkstransplantation kommt nur für Patienten in Frage, die einen Spender mit passendem HLA (human leukocyte antigen) finden. Von 24 transplantierten Patienten waren 20 im Beobachtungszeitraum von ein bis sieben Jahren gesund und am Leben (Del Giudice et al., 2003). Leider kommt aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes der Betroffenen die Transplantation oftmals gar nicht in Frage. Sie setzt eine Chemotherapie voraus, die sehr lungentoxisch ist. Aber gerade die Lunge ist bei den CGD-Patienten durch Aspergillosen und ständig wiederkehrende bakterielle Infekte oft in einem sehr schlechten Zustand.

Die regelmäßige Gabe von isolierten gesunden Granulozyten, z.B. von einem Elternteil, stellt eine weitere Möglichkeit dar, insbesondere in Krisenzeiten die Krankheit vorübergehend in den Griff zu bekommen und die Ausbreitung und Manifestierung von Infektionen einzuschränken. Dazu müssten gegenwärtige Methoden zur Granulozytenisolierung und Aufarbeitung verbessert werden, um eine optimale und effektive Gewinnung dieser fragilen Zellen zu gewährleisten. Der wiederholte Einsatz dieser Methode ist möglich und aufgrund der kurzen Lebensdauer von Granulozyten auch notwendig.

5.7.5. Zukünftige Einsatzgebiete der Therapie mit ROS-produzierenden Liposomen

Zukunftsweisend sind sicherlich die kurativen Therapieansätze (1 und 2), allerdings setzen beide eine zeitweise Immunsupprimierung voraus.

Es wäre also anzustreben, vor einer Transplantation oder Gentherapie bestehende Krankheitsherde zu eliminieren und den Organen die Möglichkeit zu geben, sich zu erholen. Im Anschluss daran wären dann die Erfolgsaussichten deutlich verbessert.

Zur Vorbereitung kurativer Therapien oder bei schweren akuten Infektionen sollen IgG- oder HSA- targetisierte ROS-produzierende Liposomen mit guter Granulozytenspezifität eingesetzt werden.

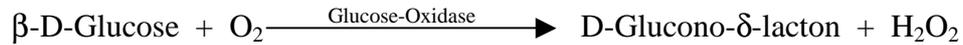
Als mögliche zukünftige Therapieform wird von uns die Inkubation der Liposomen in Vollblut *ex vivo* mit XO und Xanthin vorgeschlagen, allerdings wären hierzu pharmakokinetische und toxikologische Studien nötig.

Als Modell hierfür kämen Hunde in Frage. Auch ohne Knock-out-Stamm könnte die Verträglichkeit (Nebenwirkungen, AK-Bildung) und die Pharmakokinetik untersucht werden.

Geeignete Liposomenformulierungen können ihren Platz in der Intensivmedizin und in der Vorbereitungsphase zur Knochenmarkstransplantation oder Gentherapie finden.

6. Zusammenfassung

Bei der septischen Granulomatose (chronic granulomatous disease, CGD) handelt es sich um einen NADPH-Oxidase-Defekt in Phagozyten. Ziel dieser Arbeit war es, durch das Einbringen von Glucoseoxidase-Liposomen (GOL) den oxidativen Burst zu rekonstituieren.



Fluoreszenz-Marker wurden zur Überprüfung der Aufnahme von verschiedenen Liposomenpräparationen in Phagozyten mittels FACS-Messung eingesetzt. Am besten geeignet war die Markierung mit 0,5 Mol% Rhodamin-PE. Es zeigte sich, dass die 200nm großen, negativ geladenen EPC:EPG:Chol-Liposomen am besten aufgenommen wurden.

Es wurde überprüft, ob EPC:EPG:Chol-GOL in der Lage sind, den oxidativen Burst *in vitro* zu rekonstituieren. Sowohl mit Hilfe des DHR-Assays als auch mit Hilfe der Chemilumineszenz-Messung war ROS-Bildung im NADPH-defizienten Maus- und Menschenblut bei Inkubation mit GO-Liposomen nachzuweisen.

Die EPC:EPG:Chol-Liposomen wurden im Tiermodell eingesetzt. Verwendet wurden CGD-Mäuse, bei denen das Glycoprotein (gp) 91 der NADPH-Oxidase ausgeknockt war.

Die Behandlung mit EPC:EPG:Chol:GOL wurde gut vertragen. Es kam weder zu einer Hochregulierung von Komplementrezeptoren, noch zu deutlichen Auswirkungen auf den Blutglucosegehalt, das Verhalten oder das Gewicht der Tiere. Nach 24h war GO in Leber und Milz, jedoch in keinem anderen untersuchten Organ nachweisbar. Mit Hilfe eines im Labor etablierten SandwichELISAs konnten große Enzymmengen nachgewiesen werden. Mittels eines direkten ELISAs wurde nachgewiesen, dass das Enzym im funktionellen Zustand vorliegt, also H₂O₂ produziert. Die Auswirkung der liposomalen Verkapselung auf die Antikörperbildung wurde mit Hilfe eines neu etablierten ELISAs untersucht. Sie führt zu höheren Antikörpertitern als die Verwendung gelöster GO. Bei der Verwendung von Liposomen als Arzneimittelcarrier ist also die Verwendung eines autologen und somit nicht immunogenen Enzyms anzustreben.

Im Tierversuch mit EPC:EPG:Chol:GOL konnte keine Rekonstitution des oxidativen Bursts (DHR-Assay) nachgewiesen werden und bei den Infektionsversuchen mit *Staph.*

aureus und *Burk. cepacia* war kein Unterschied im Krankheitsverlauf zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe nachweisbar.

Um die Aufnahme von besser sterilfiltrierbaren, kleinen Liposomen in Phagozyten zu ermöglichen, wurde die Oberfläche durch PEGylierte Sojasterole funktionalisiert. Mit der Koppelung von IgG wurde die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose angestrebt. Albumin diente als Vergleichsprotein. Die proteingekoppelten Liposomen wurden in Vollblut wesentlich besser aufgenommen als die bisher verwendeten EPC:EPG:Chol-Liposomen. Zwischen den beiden gekoppelten Proteinen (IgG, Albumin) gab es keine nennenswerten Unterschiede im Aufnahmeverhalten. In isolierte Zellen, resuspendiert in Puffer oder inaktiviertem Serum, fand keine Aufnahme statt. Vermutlich spielt die Opsonisierung der Liposomen durch C3b oder IgG bei der Aufnahme eine große Rolle. Der Fc-Teil der gekoppelten Antikörper scheint nicht ausreichend in einer dem Fc-Rezeptor zugänglichen Form vorzuliegen.

Da eine Aufkonzentration der gekoppelten Liposomen mit der bisher eingesetzten Ultrazentrifugation noch nicht möglich war, wurden mit den Vorstufen für gekoppelte Liposomen (Ankerliposomen) und den vergleichbaren, ohne für die Koppelung notwendigen Zwischenschritte hergestellten EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt. Bei CGD-Mäusen waren Ankerliposomen nach etwa 5 h, EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen nach etwa 8 h zur Hälfte aus dem Blut eliminiert. Damit erfolgt ihre Elimination um ein vielfaches langsamer als die der bisher eingesetzten Liposomen (EPC:EPG:Chol-Liposomen 70 min).

Die Elimination der Liposomen verlief biphasisch mit stärkerem Abfall innerhalb der ersten Stunde, wobei der Organgehalt gering blieb. Bei einigen Versuchstieren war der oxidative Burst teilweise rekonstituiert, es wurden also trotz der Stealth-Eigenschaften EPC:EPG:Chol:PEG-Liposomen aufgenommen und ROS gebildet.

Bei den Ergebnissen der Tierversuche sind Besonderheiten im Blutbild der Maus zu beachten. Sowohl in der ADVIA 120-Messung als auch in der Handdifferenzierung war die niedrige Granulozytenzahl (unter 10% der Leukozyten) auffällig. Dabei decken sich die ermittelten lymphozytären Differentialblutbilder der CGD-Mäuse mit den Literaturdaten für den Wildstamm. Die Messung im Peroxidasekanal des ADVIA 120 hat darüber hinaus gezeigt, dass Granulozyten der verwendeten CGD-Mäuse und des Wildtyps C57Bl6 einen sehr niedrigen Myeloperoxidasegehalt haben. Der niedrige Myeloperoxidasegehalt der Granulozyten spielt für den gewählten pharmakologischen

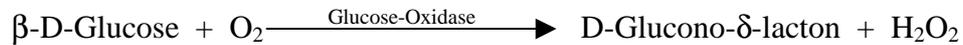
Ansatz eine besonders große Rolle, da im Vergleich zum Menschen von einer stark reduzierten Bildung der bakteriziden hypochlorigen Säure auszugehen ist. Das Mausmodell als einziges vorhandenes Knock-out-Modell für die NADPH-Oxidase-Defizienz erwies sich deshalb für die Fragestellung dieser Doktorarbeit als nur bedingt geeignet.

Aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen und neueren Erkenntnissen aus der Literatur schlagen wir eine andere Therapieform für CGD-Patienten vor: Die *ex vivo* Inkubation von autologem Vollblut mit IgG- oder HSA- targetisierten Superoxid-bildenden Liposomen mit guter Granulozytenspezifität.

Als körpereigenes und somit nicht immunogenes Enzym kommt die Xanthinoxidase in Frage. Die Rekonstitution des oxidativen Bursts mittels enzymhaltiger Liposomen könnte ihren Platz in der Intensivmedizin und in der Vorbereitungsphase der kurativen aber sehr belastenden Therapien, wie Knochenmarkstransplantation oder Gentherapie finden.

7. Summary

Chronic granulomatous disease, (CGD) is a defect in the NADPH-oxidase of phagocytes. We wanted to reconstitute the oxidative burst using glucose oxidase liposomes (GOL).



Fluorescence labels were used to check the uptake of different preparations of liposomes. Rhodamin was easy to detect with FACS-measurement at a concentration of 0,5 mol%, and the negatively charged EPC:EPG:Chol-liposomes with a diameter of 200nm were taken up best.

They also reconstitute the respiratory burst in deficient human and murine blood *in vitro*, which was shown by DHR-Assays and Chemiluminescence.

EPC:EPG:Chol-liposomes were tested using gp91-phox^{-/-}-mice. The treatment was tolerated well. The animals showed neither an upregulation of complement receptors nor changes in blood glucose levels or behaviour. After 24h Glucose oxidase was found only in liver and spleen. A sandwich ELISA showed large quantities of glucose oxidase and a direct ELISA showed the production of H₂O₂. An ELISA was established to examine the influence of liposomal entrapment on immunogenicity. The liposomal entrapped GO caused higher antibody titres than pure GO. A human, non-immunogenic enzyme should be used.

In vivo EPC:EPG:Chol:GOL did not reconstitute the oxidative burst. Infections caused by *Staphylococcus aureus* or *Burkholderia cepacia* did not show any response to the treatment.

Small liposomes are easier to sterilize by filtration. But the uptake in phagocytes needs to be triggered by targeting the surface. Proteins were coupled to tresylated soja sterols. IgG was used to induce IgG mediated phagocytosis, albumin served as control.

In blood samples protein-coupled liposomes were taken up much better than EPC:EPG:Chol- liposomes. There was no difference between the coupled proteins. Isolated leucocytes in buffer or inactivated serum did not show any uptake. Probably opsonisation by c3b or IgG is important. The coupling might not present the Fc-part of the antibodies effectively to the Fc-receptor.

Pharmacokinetic studies were performed using preliminary stages of coupled liposomes (anchor-liposomes). As control EPC:EPG:Chol:PEG-liposomes were prepared without the steps necessary for coupling and should be identical to the anchor liposomes. In cgd-

mice half of the anchor-liposomes were eliminated approximately within 5 h and the control within 8h. Elimination was several times slower than in conventional liposomes (EPC:EPG:Chol-liposomes 70 min) and was biphasic with a stronger decrease within the first hour. The content in the organs was very low. In some animals the oxidative burst was partially restored. In spite of stealth qualities anchor- and EPC:EPG:Chol:PEG-liposomes were taken up and ROS were produced.

For the interpretation of the results of the animal experiments the haemogram of mice is important. Cell counts using ADVIA 120 and microscope showed a low granulocyte count (less than 10% of leucocytes). The measured very high lymphocyte counts of cgd-mice were identical with data for the wild type c57bl6. Results of the perox channel of the ADVIA 120 showed a very low myeloperoxidase content of granulocytes in NADPH-deficient and wild type mice. The lower production of bactericidal HOCl will probably make the treatment with GOL less effective.

For these reasons, mice as only existing knockout for NADPH-Oxidase turned out not to be a completely suitable model.

Because of the experiences of this work and latest findings in literature we suggest a different treatment. Autolog blood should be incubated *ex vivo* with IgG- or HSA-targeted superoxide-generating liposomes with good specificity for granulocytes. As endogenous and therefore not immunogenic enzyme xanthin oxidase can be used. The reconstitution of the oxidative burst using enzyme-containing liposomes might be useful in critical care medicine and during preparation for curative but straining therapies such as bone marrow transplantation or gene therapy.

8. Literaturverzeichnis

- Albrecht, S., Brandel, H. (1992). Angewandte Chemilumineszenz. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40: 547-561.
- Allen, T. M. und Cleland, L. G. (1980). Serum-induced leakage of liposome contents. *Biochim. Biophys. Acta* 597: 418-426.
- Allen, T. M., Chonn, A. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* 223: 42-46.
- Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., Yau-Young, A. (1991). Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1066: 29-36.
- Allen, T. M., Hansen, C., Rutledge, J. (1989). Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 981: 27-35.
- Allen, T. M., Brandeis, E., Hansen C. B., Kao, G. Y., Zalipsky, S. (1995). A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1237: 99-108.
- Alving, C. R. (1984). Natural antibodies against phospholipids and liposomes in humans. *Biochem. Soc. Trans.* 12: 342-344.
- Alving, C. R., Urban, K. A., Richards, R. L. (1980). Influence of temperature on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 600: 117-125.
- Arnao, M. B., Casas, J. L., del Rio, J. A., Acosta, M., Garcia-Canovas, F. (1990). An enzymatic colorimetric method for measuring naringin using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) in the presence of peroxidase. *Anal Biochem.* 185: 335-338.
- Assari, T. (2006). Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med. Immunol.* 5: 4-10.
- Barlett, G. R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 466-468.
- Bendas, G., Rothe, U., Scherphof, G. L., Kamps, J. A. (2003). The influence of repeated injections on the pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1609: 63-70.
- Ben-Yoseph, O., Ross, B. D. (1994). Oxidation therapy: The use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment. *Br. J. Cancer* 70:1131-1135.
- Bjorgvinsdottir H., Zhen L., Dinauer M. C. (1996). Cloning of murine gp91phox cDNA and functional expression in a human X-linked chronic granulomatous disease cell line. *Blood* 87: 2005-2010.
- Blume, G., Cevc, G. (1990). Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1029: 91-97.
- Borregaard, N., Herlin, T. (1982). Energy metabolism of human neutrophils during phagozytosis. *J. Clin. Invest.* 70: 550-557
- Brenner, S., Whiting-Theobald, N. L., Linton, G. F., Holmes, K. L., Anderson-Cohen M., Kelly, P. F., Vanin, E. F., Pilon, A. M., Bodine, D. M., Horwitz, M. E., Malech, H. L. (2003). Concentrated RD114-pseudotyped MFGS-gp91phox vector achieves high levels of functional correction of the chronic granulomatous disease oxidase defect in NOD/SCID/beta -microglobulin-/- repopulating mobilized human peripheral blood CD34+ cells. *Blood* 102: 2789-2797.

- Bresseleers, G. J., Goderis, H. L., Tobback, P. P. (1984). Measurement of the glucose permeation rate across phospholipid bilayers using small unilamellar vesicles. Effect of membrane composition and temperature. *Biochim. Biophys. Acta.*772: 374-382.
- Bridges, R. A., Berendes, H., Good, R. A. (1959). A fatal granulomatous disease of childhood. The clinical, pathological and laboratory features of a new syndrome. *J. Dis. Child.* 97: 387-408.
- Bright, H. J., Porter, D. J. T. (1975). In *The Enzymes*. Boyer, P. D. (ed.) 421-505.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
- Bureeva, S., Andia-Pravidvy, J., Kaplun, A. (2005). Drug design using the example of the complement system inhibitors development. *Drug Discovery Today* 10: 1535-1542.
- Calvino, M. C., Maldonado, M. S., Otheo, E., Munoz, A., Couselo J. M., Burgaleta, C. (1996). Bone marrow transplantation in chronic granulomatous disease. *Eur. J. Pediatr.* 155: 877-879.
- Caroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5: 981-985.
- Charles, C. T. (ed.) (1975). *Mice as laboratory animals*. Thomas Books: 110-111.
- Dams, E. T., Laverman, P., Oyen, W. J., Storm G., Scherphof, G. L., van Der Meer, J. W., Corstens, F. H., Boerman, O. C. (2000). Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 1071-1079.
- Del Giudice, I., Iori, A. P., Mengarelli, A., Testi, A. M., Romano, A., Cerretti, R., Macri, F., Iacobini, M., Arcese, W. (2003). Allogeneic stem cell transplant from HLA-identical sibling for chronic granulomatous disease and review of the literature. *Ann. Hematol.* 82: 189-192.
- Derksen, J. T., Morselt, H. W., Kalicharan, D., Hulstaert, C. E., Scherphof, G. L. (1987). Interaction of immunoglobulin-coupled liposomes with rat liver macrophages in vitro. *Exp. Cell. Res.* 168: 105-115.
- Dinauer, M. C., Gifford, M. A., Pech, N., Li, L. L., Emshwiller, P. (2001). Variable correction of host defense following gene transfer and bone marrow transplantation in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 97: 3738-3745.
- Emmendorffer, A., Hecht, M., Lohmann-Matthes, M. L., Roesler, J. (1990). A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Methods* 131: 269-275.
- Falk, U. B. (1999). *Glucose-Oxidase-haltige Liposomen zur Therapie der septischen Granulomatose*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- Fedtke, I., Gotz, F., Peschel, A. (2004). Bacterial evasion of innate host defenses--the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 189-194.
- Fujita, T., Endo, Y., Nonaka, M. (2004). Primitive complement system-recognition and activation. *Mol. Immunol.* 41: 103-111.
- Funato, K., Ritsuko, Y., Kiwada, H. (1992). Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholin in rat fresh plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1103: 198-204.
- Gallin, J. I., Alling, D. W., Malech, H. L., Wesley, R., Koziol, D., Marciano, B., Eisenstein, E. M., Turner, M. L., DeCarlo, E. S., Starling, J. M., Holland, S. M. (2003). Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* 348: 2416-2422.

- Gallin, J. I., Buescher, E. S., Seligmann, B. E., Nath, J., Gaither, T., Katz, P. (1983). NIH conference. Recent advances in chronic granulomatous disease. *Ann. Intern. Med.* 99: 657-674. Review.
- Gerber, C. E., Bruchelt, G., Falk, U. B., Kimpfler, A., Hauschild, O., Kuci, S., Bachi, T., Niethammer, D., Schubert, R. (2001). Reconstitution of bactericidal activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes. *Blood* 98: 3097-3105.
- Gerber, C.E. (1999). Enzymdefiziente Granulozyten: Kompensation der Myeloperoxidase-Defizienz und in vitro-Behandlung des NADPH-Oxidase-Defektes mit Glucose-Oxidase-haltigen Liposomen. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Gibson, Q. H., Swoboda, B. E., Massey, V. (1964). Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* 239: 3927-3934.
- Gregoriadis, G., Bacon, A., Caparros-Wanderley, W., McCormack, B. (2002). A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* 20 Suppl. 5: B1-9. Review.
- Gregoriadis, G., Davisch, L. (1979). Stability of liposomes in vivo and in vitro of blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 1287-1293.
- GÜthlein F. (2001). Darstellung und Prüfung von vesikulären Phospholipidgelen (VPG) zur Therapie solider Tumoren. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Haas, K. M., Hasegawa, M., Steeber, D. A., Poe, J. C., Zabel, M. D., Bock, C. B., Karp, D. R., Briles, D. E., Weis, J. H., Tedder, T. F. (2002). Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity* 17: 713-23.
- Halliwell B. (1995). Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 670-677. Review.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017. Review.
- Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., Kiwada, H. (1995). Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm. Res.* 11: 402-406.
- Hernandez-Caselles, T., Villalain, J., Gomez-Fernandez, J. C. (1993). Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 120: 119-126.
- Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Noack, D., Cross, A. R. (1997). Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease--an update. *Blood Cells Mol. Dis.* 23: 443-450.
- Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Rae, J., Noack, D., Roos, D., van Koppen, E., Cross, A. R. (2001). Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol. Dis.* 27: 16-26.
- Higashi N., Sunamoto J. (1995). Endocytosis of poly(ethylene oxide)-modified liposome by human lymphoblastoid cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1243: 386-392.
- Hsu, M., Juliano, R. L. (1982). Interaction of liposomes with reticuloendothelial system. II: non-specific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 720: 411-419.
- Huang, S. K., Lee, K. D., Hong, K., Friend, D. S., Papahadjopoulos, D. (1992). Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res.* 52: 5135-5143.

- Huong, T. M., Ishida, T., Harashima, H., Kiwada, H. (2001). The complement system enhances the clearance of phosphatidylserin (PS)-liposomes in rat and guinea pigs. *Int. J. Pharm.* 215: 197-205.
- Huwyler, J., Yang, J., Pardridge, W. M. (1997). Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 1541-1546.
- Ishida, O., Maruyama, K., Yanagie, H., Eriguchi, M., Iwatsuru, M. (2000). Targeting chemotherapy to solid tumors with long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Jpn. J. Cancer. Res.* 91: 118-126.
- Ishida, O., Maruyama, K., Tanahashi, H., Iwatsuru, M., Sasaki, K., Eriguchi, M., Yanagie H. (2001). Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm. Res.* 18: 1042-1048.
- Ishida, T., Funato, K., Kojima, S., Yoda, R., Kiwada, H. (1997). Enhancing effect of cholesterol on the elimination of liposomes from circulation is mediated by complement activation. *Int. J. Pharm.* 156: 27-37.
- Ishida, T., Harashima, H., Kiwada, H. (2002). Liposome clearance. *Biosci. Rep.* 22: 197-224.
- Ishida, T., Masuda, K., Ichikawa, T., Ichihara, M., Irimura, K., Kiwada, H. (2003). Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int. J. Pharm.* 255: 167-174.
- Ishida, T., Maeda, R., Ichihara, M., Irimura, K., Kiwada H. (2003). Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J. Control. Release* 88: 35-42.
- Ishida, T., Maeda, R., Ichihara, M., Mukai, Y., Motoki, Y., Manabe, Y., Irimura, K., Kiwada, H. (2002). The accelerated clearance on repeated injection of pegylated liposomes in rats: laboratory and histopathological study. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 286.
- Ishida, T., Ichikawa, T., Ichihara, M., Sadzuka, Y., Kiwada H. (2004). Effect of the physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice. *J. Control. Release* 95: 403-412.
- Ismail, G., Boxer, L. A., Baehner, R. L. (1979). Utilization of liposomes for correction of the metabolic and bactericidal deficiencies in chronic granulomatous disease. *Pediatr. Res.* 13: 769-773.
- Jackson, S. H., Miller, G. F., Segal, B. H., Mardiney, M., Domachowske, J. B., Gallin, J. I., Holland, S. M. (2001). IFN-gamma is effective in reducing infections in the mouse model of chronic granulomatous disease (CGD). *J. Interferon Cytokine Res.* 21: 567-573.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002) *Immunologie*. 5. Auflage: 46-67, 177-180.
- Jax®Mice data sheet, C57BL/6J, B6.129S6-Cybb^{tm1Din}, The Jackson Laboratory 2006. www.jaxmice.jax.org
- Kenny, K., Herzberg, M. (1967). Early antibody response in mice to either infection or immunisation with salmonella typhimurium, *Journ. bacteriol.* 93: 773-778.
- Kimelberg, H. K. (1976). Differential distribution of liposome-entrapped [3H]methotrexate and labelled lipids after intravenous injection in a primate. *Biochim. Biophys. Acta* 448: 531-550.
- Kimpfler A. (2003). Glucose-Oxidase-Liposomen zur Therapie der Septischen Granulomatose: In vitro Funktionalität, Granulozyten-Targeting und Wirkung im Organismus, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

- Kinoshita, T., Inoue, K., Okada, M., Akiyama, Y. (1977). Release of phospholipids from liposomal model membrane damaged by antibody and complement. *J. Immunol.* 119: 73-76.
- Kinsky, S. C., Haxby, J. A., Zopf, D. A., Alving, C. R., Kinsky, C. B. (1969). Complement-dependent damage to liposomes prepared from pure lipids and Forssman hapten. *Biochem.* 8: 4149-4158.
- Klebanoff, S. J. (1968). Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* 95: 2131-2138.
- Klebanoff, S. J. (1974). Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* 249: 3724-3728.
- Klebanoff, S. J., Clark, R. A. (1978). *The neutrophil: function and clinical disorders.* North Holland Publishing Company, Amsterdam: 656-657.
- Koning, G. A., Morselt, H. W., Gorter, A., Allen, T. M., Zalipsky, S., Scherphof, G. L., Kamps, J. A. (2003). Interaction of differently designed immunoliposomes with colon cancer cells and Kupffer cells. An in vitro comparison. *Pharm. Res.* 20: 1249-1257.
- Kraft, Dürr, *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 4. Aufl. 1997: 216-217.
- Kume, A., Dinauer, M. C. (2000). Gene therapy for chronic granulomatous disease. *J. Lab. Clin. Med.* 135: 122-128. Review.
- Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Hunag, S. K., Papahadjopoulos, D. (1991). Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta* 1070: 187-192.
- Laverman, P., Brouwers, A. H., Dams, E. T., Oyen, W. J., Storm, G., van Rooijen, N., Corstens, F. H., Boerman, O. C. (2000). Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 996-1001.
- Laverman, P., Carstens, M. G., Boerman, O. C., Dams, E. T., Oyen, W. J., van Rooijen, N., Corstens, F. H., Storm, G. (2001). Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 607-612.
- Lee, K. D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1992). Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge. *Biochem. Biophys. Acta* 1193: 185-197.
- Levin, K. (1973). A modified flow microcalorimeter adapted for the study of human leukocyte phagocytosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 32: 67-73.
- Liese, J. G., Jendrossek, V., Jansson, A., Petropoulou, T., Kloos, S., Gahr, M., Belohradsky, B. H. (1996). Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet.* 347: 220-223.
- Liu, D., Hu, Q., Song, Y. K. (1995). Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1240:277-284.
- Liu, D., Mori, A., Huang, L. (1992) Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1104: 95-101.
- Löffler, G. (2000). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie: Aufbau, Biosynthese und Funktion von Immunglobulinen.* Springer Verlag. 4. Auflage: 117-121, 551-559.
- Lun, A., Roesler, J., Renz, H. (2002). Unusual late onset of X-linked chronic granulomatous disease in an adult woman after unsuspecting childhood. *Clin. Chem.* 48: 780-781.
- Ma, H. R., Mu, S. C., Yang, Y. H., Chen, C. M., Chiang, B. L. (2003). Therapeutic effect of interferon-gamma for prevention of severe infection in X-linked chronic granulomatous disease. *J. Formos. Med. Assoc.* 102: 189-192.

- Malech, H. L., Maples, P. B., Whiting-Theobald, N., Linton, G. F., Sekhsaria, S., Vowells, S. J., Li, F., Miller, J. A., DeCarlo, E., Holland, S. M., Leitman, S. F., Carter, C. S., Butz, R. E., Read, E. J., Fleisher, T. A., Schneiderman, R. D., Van Epps, D. E., Spratt, S. K., Maack, C. A., Rokovich, J. A., Cohen, L. K., Gallin, J. I. (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12133-12138.
- Margolis, D. M., Melnick, D. A., Alling, D. W., Gallin, J. I. (1990). Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J. Infect. Dis.* 162: 723-726.
- Maruyama, K., T., Takizawa, T., Yuda, S. J., Kennel, L., Huang, M., Iwatsuru, M. (1995). Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethyleneglycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1234: 74-80.
- Mauk, M. R., Gamble, R. (1979). Stability of lipid vesicles in tissues of the mouse: a gamma-ray perturbed angular correlation study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 765-769.
- Messner, R. P., Jelinek, J. (1970). Receptors for human gamma G globulin on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 49: 2165-2171.
- Miyake, Y., Kim, J., Okada, Y. (1978). Effects of cytochalasin D on fusion of cells by HVJ (Sendai virus). *Exp. Cell. Res.* 116: 167-178.
- Moghimi, S. M., Patel, H. M. (2002). Modulation of murine liver macrophage clearance of liposomes by diethylstilbestrol. The effect of vesicle surface charge and a role for the complement receptor Mac-1 (CD11b/CD18) of newly recruited macrophages in liposome recognition. *J. Control. Release* 78: 55-65.
- Moog, R., (1998). Einschluß von Gemcitabin (dFdC) in vesikuläre Phospholipidgele: in vivo und in vitro - Untersuchungen zur Stabilität, Pharmakokinetik und antitumoralen Wirksamkeit. Dissertation ALU Freiburg
- Mutschler, E., Geisslinger, G. Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001). *Arzneimittelwirkungen* (8. Auflage). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Muzykantov, V. R., Peclo, M. M., Printseva, O. Y. (1989). Local tissue injury induced by glucose oxidase conjugated with anti-collagen antibody. *J. Immunol. Methods.* 119: 65-73.
- Nakamura, S., Ogura, Y. (1968). Action mechanism of glucose oxidase of *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* 63: 308-316.
- Nakarua, T., Ogura, Y., (1962). Kinetic studies on the action of glucose oxidase. *J. Biochem.* 52: 214-220.
- Naldini, L. (2006). Inserting optimism into gene therapy. *Nat. Med.* 12: 386-388.
- Needham, D., McIntosh, T. J., Lasic D. D. (1992). Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1108: 40-48.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Luthi, U., Hassan, M., Thrasher, A. J., Hoelzer, D., von Kalle, C., Seger, R., Grez, M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 12: 401-409.

- Oussoren. C., Velinova, M., Scherphof, G., van der Want, J. J., van Rooijen, N., Storm, G. (1998). Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes. *Biochim. Biophys. Acta* 1370: 259-272.
- Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11460-11464.
- Papisov, M. I. (1998). Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: Molecular mechanics and chemistry of liposome interactions. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32: 119-138.
- Patel, H. M. (1992). Influence of lipid composition on opsonophagocytosis of liposomes. *Res. Immunol.* 143: 242-244.
- Pollock, J. D., Williams, D. A., Gifford, M. A., Li, L. L., Du, X., Fisherman, J., Orkin, S. H., Doerschuk, C. M., Dinauer, M. C. (1995). Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* 9: 202-9.
- Pschyrembel (1993). *Klinisches Wörterbuch.* 257 Aufl.: 569, 837.
- Reeves, E. P., Lu, H., Jacobs, H. L., Messina, C. G. M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E. O., Warley, A., Roes, J., Segal, A. W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ flux. *Nature*, 416: 291-297
- Reid, K. B., Turner, M. W. (1994). Mammalian lectins in activation and clearance mechanisms involving the complement system. *Springer Semin. Immunopathol.* 15: 307-326. Review.
- Rex, J. H., Bennett, J. E., Gallin, J. I., Malech, H. L., Melnick, D. A. (1990). Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J. Infect. Dis.* 162: 523-528.
- Roche-Lexikon (2003). *Roche Lexikon Medizin* 5. Auflage. Urban und Fischer Verlag.
- Roos, D., de Boer, M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R. S., Segal, A. W., Ahlin, A., Nemet, K., Hossle, J. P., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Middleton-Price, H. (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 87: 1663-1681. Review.
- Roos, D., Winterbourn, C. C. (2002). Immunology. Lethal weapons. *Science* 296: 669-671.
- Roos D. (1996). X-CGDBase: a database of X-CGD-causing mutations. *Immunol. Today.* 17: 517-521.
- Rossi, J. D., Wallace, B. A. (1983). Binding of fibronectin to phospholipids vesicles. *J. Biol. Chem.* 258: 3327-3331.
- Samoszuk, M., Ehrlich, D., Ramzi, E. (1993). Preclinical safety studies of glucose oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 1643-1648.
- Samoszuk, M. K., Wimley, W. C., Nguyen, V. (1996). Eradication of interleukin 5-transfected J558L plasmacytomas in mice by hydrogen peroxide-generating Stealth liposomes. *Cancer Res.* 56: 87-90.
- Saulnier, S. O., Steinhoff, D., Dinauer, M. C., Zufferey, R., Trono, D., Seger, R. A., Hossle J. P. (2000). Lentivirus-mediated gene transfer of gp91phox corrects chronic granulomatous disease (CGD) phenotype in human X-CGD cells. *J. Gene Med.* 2: 317-325.
- Sbarra, A. J., Karnovsky, M. L. (1959). The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphnuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234: 1355-1362.

- Scherphof, G. L., Roerdink, F., Waite, M., Parks, J. (1978). Desintegration of phosphatidylcholin liposomes in plasma as a result of interactions with high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 542: 296-303.
- Scieszka, J. F., Maggiora, L. L., Wright, S. D., Cho, M. J. (1991). Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharm. Res.* 8: 65-69.
- Seebach, J. D., Morant, R., Ruegg, R., Seifert, B., Fehr, J. (1997). The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammatory and infectious disease. *Am. J. Clin Pathol.* 107: 582-591.
- Segal, B. H., Leto, T. L., Gallin, J. I., Malech, H. L., Holland, S. M. (2000). Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine* 79: 170-200.
- Seger, R. A., Ezekowitz, R. A. (1994). Treatment of chronic granulomatous disease. *Immunodeficiency* 5: 113-130.
- Smiley, A. K., Gardner, J., Klingenberg, J. M., Neely, A. N., Supp D. M. (2007). Expression of human beta defensin 4 in genetically modified keratinocytes enhances antimicrobial activity. *J. Burn Care Res.* 28: 127-132.
- Steenpass, T., Lung, A., Schubert, R. (2006). Tressylated PEG-sterols for coupling of proteins to preformed plain or PEGylated liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 20-28.
- Subczynski, W. K., Hyde, J. S., Kusumi, A. (1989). Oxygen permeability of phosphatidylcholine--cholesterol membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4474-4478.
- Szebeni, J. (2001) Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 18: 567-606.
- Szebeni, J. (1998). The interaction of liposomes with complement system. *Critical Reviews in Ther. Drug Carrier Sys.* 15: 57-88.
- Szebeni, J., Baranyi, L., Savay, S., Bodo, M., Morse, D. S., Basta, M., Stahl, G. L., Bunger, R., Alving, C. R. (2000). Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H1319-H1328.
- Takegawa, K., Fujiwara, K., Iwahara, S., Yamamoto, K., Tochikura, T. (1989). Effect of deglycosylation of N-linked sugar chains on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem. Cell Biol.* 67: 460-464.
- Taylor, M. A., Jones, M. N., Vadgama, P. M., Higson, S. P. (1995). The characterization of liposomal glucose oxidase electrodes for the measurement of glucose. *Biosens. Bioelectron.* 10: 251-260.
- Tilcock, C., Yap, M., Szucs, M., Utkhede, D. (1994). PEG-coated lipid vesicles with encapsulated technetium-99m as blood pool agents for nuclear medicine. *Nucl. Med. Biol.* 21: 165-170.
- Tizard, I. R. (2004). *Veterinary Immunologie An Introduction*, 7. Auflage, Kap 3.-4. 24-49.
- Torchilin, V. P., Omelyanenko, V. G., Papisov, M. I., Bogdanov, A. A., Trubetskoy, V. S., Herron, J. N., Gentry, C. A. (1994). Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim. Biophys. Acta* 1195: 11-20.
- Tsuge, H., Natsuaki, O., Ohashi, K. (1975). Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem.* 78: 835-843.

- Uppoor, R., Niebergall, P. J., James, E. R. (2001). The antioxidant system beta-D(+) glucose-glucose oxidase-catalase: tests for pyrogenicity and antigenicity. *Pharm. Dev. Technol.* 6: 31-38.
- Uppoor, R., Niebergall, P. J. (1996). Beta-D(+) glucose-glucose oxidase-catalase for use as an antioxidant system. *Pharm. Dev. Technol.* 1: 127-134.
- Van Etten, E. W. M., Kate, M. T., Snijders, S. V., Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. (1998). Administration of liposomal agents and blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1677-1681.
- Vollmar, A., Dingermann, T., Zündorf, I., Rickl, V. (2005). *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Wahn, V., Seger, R. (1998). Septische Granulomatose. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 10: 995-1004.
- Wassef, N. M., Johnson, S. H., Graeber, G. M., Swartz, G. M. Jr., Schultz, C. L., Hailey, J. R., Johnson, A. J., Taylor, D. G., Ridgway, R. L. und Alving, C. R. (1989). Anaphylactoid reactions mediated by autoantibodies to cholesterol in miniature pigs. *J. Immunol.* 143: 2990-2995.
- Watanabe, C., Yajima, S., Taguchi, T., Toya, K., Fujii, Y., Hongo, T., Ohzeki, T. (2001). Successful unrelated bone marrow transplantation for a patient with chronic granulomatous disease and associated resistant pneumonitis and Aspergillus osteomyelitis. *Bone Marrow Transplant.* 28: 83-87.
- Weening, R. S., Kabel, P., Pijman, P., Roos, D. (1983). Continuous therapy with sulfamethoxazole-trimethoprim in patients with chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.* 103: 127-130.
- Weissman, G., Bloomgarden, D., Kaplan, R., Cohen, C., Hoffstein, S., Collins, T., Gottlieb, A., Nagle, D. (1975). A general method for the introduction of enzymes, by means of immunoglobulin-coated liposomes, into lysosomes of deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 88-92.
- Weissmann, G., Brand, A., Franklin, E. C. (1974). Interaction of immunoglobulins with liposomes. *J. Clin. Invest.* 53: 536-543.
- Whaley, K., Schwaeble, W. (1997). Complement and complement deficiencies. *Semin. Liver Dis.* 17: 297-310. Review.
- Winkelstein, J. A., Marino, M. C., Johnston, R. B., Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J. I., Malech, H. L., Holland, S. M., Ochs, H., Quie, P., Buckley, R. H., Foster, C. B., Chanock, S. J., Dickler, H. (2000). Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore).* 79: 155-169.
- Woodle, M. C., Lasic, D. D. (1992). Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 171-199.
- Woodle, M. C., Newman, M. S., Cohen, J. A. (1994). Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. *J. Drug. Target* 2: 397-403.
- Woodman, R. C., Newburger, P. E., Anklesaria, P., Erickson, R. W., Rae, J., Cohen, M. S., Curnutte, J. T. (1995). A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells. *Blood* 85: 231-241.
- Yan, X., Scherphof, G. L., Kamps, J. A. A. M. (2005). Liposome opsonization. *J. Liposome Res.* 15: 109-139.
- Zakarova, T. S., Ivanov, A. S., Echkalov, A. P., Beriozov, A. T., Kalilov, E. M., Archakov, A. I. (1993). Interaction of cholesterol containing liposomes with blood serum lipoproteins. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31: 315-324.
- Zeit online, Tod nach Heilung, 2006

9. Anhang

Tierversuchsprotokoll

EPC:EPG:Chol-Liposomen mit Glucose-Oxidase (GO in PBS, PBS) Dreifachgabe

i.v. Inj. 14.06. (d0)

14.06.04 - 25.06.04

gp91phox -/- Mäuse

1. Boost 15.06.

Langzeituntersuchung

Blutglucose d-1

2. Boost 16.06.

Nr.	3-fach Gabe	Geschl.	Gewicht[g]					Blutglucose d-1		Organe		GO		GO		Serum GO (µg/ml)					
			d-1 d7	d0 d8	d1 d9	d2 d10	d4 d11(+)	d2 1h d4	8h d11(+)	Leber Gew. Nr. [g]	direkter/ Sandwich ELISA	Milz Gew. Nr. [g]	direkter/ Sandwich ELISA								
1	PBS	W.	21	20,1	20,9	21,3	20,9	129		sofortige Fixierung in Formalin						0					
			20,9	21,1	21,1	21,4	21,3	190	183						0						
								141	123												
								145	145												
2	PBS	W.	20,5	21	21	21	21	112		6	0,975	0	7	0,118	0	0					
			21,9	22,2	21,6	21,8	21,7	185	167								0	0			
								141	126												
								148	169												
3	GO in PBS	M.	26,4	26,9	26,9	26,4	26,2	175		sofortige Fixierung in Formalin						0					
			26,8	27,1	26,9	27	27	135	113						0						
								77	136												
								40	119												
4	GO in PBS	W.	20,5	21,5	20,7	20,7	20,8	147		21	1,354	0,64	22	0,113	3	0					
			21,2	21,3	21,2	21,7	21,7	154	141								1,1	2,6	0		
								119	120												
								140	164												
					180	112															

Alter: CGD-Tiere *30.03.2004 zu Versuchsbeginn 11 Wochen alt

Organe		DHR-		Serum	Beobachtungen
Lunge	Gehirn	Assay	Gran.		
Niere	Muskel	Mon.	Lym.	Anti-	GO Stammlsg. (5mg/ml) in PBS: 12,7 µl in 87,3 µl
Herz	Knochenmark	Lym.	% gated	körper-	
Darm Gew.	Thymus			titer	
Maus Nr.	Nr. [g]			gegen	
				GO	
1	sofortige Fixation in Formalin		3,21 0,54 0,82	keiner	Unauffällig
2	8 0,373	12 0,48	0,88	keiner	Unauffällig
	9 0,397	13 0,165	0,53		
	10 0,137	14 0,095	1,29		
	11 0,143	15 0,076			
3	sofortige Fixation in Formalin		0,68 1,07 2,96	1:256	d0 Verletzung Schwanz, d1 leichte Krümmung Schwanz, matt p. Inj., d2 beginnende Nekrose, bei Inj. Austritt von GO-Lsg. an Wunde, gesträubtes Fell d4 Nekrose schreitet fort aber AB gebessert, d7 Schwanz abgestorben aber AB gut d8 Schwanz trocken, d11 Fell matt
4	23 0,237	27 0,524	1	1:128	d7 rechtes Auge leichte Linsentrübung bemerkt, wahrscheinlich alt, Katarakt bei Bl 6 Mäusen (Ausgangsstamm) häufig d11 unverändert
	24 0,436	28 0,245	0		
	25 0,107	29 0,093	0,22		
	26 0,249	30 0,083			

Langzeituntersuchung

Blutglucose d-1

Nr.	3-fach Gabe	Ge- schl.	Gewicht[g]					Blutglucose d-1		Organe		GO		GO		Serum GO (µg/ml)	
			d-1 d7	d0 d8	d1 d9	d2 d10	d4 d11(+)	d0 1h d1 1h d2 1h d4	8h 8h 8h d11(+)	Nr.	Gew. [g]	µg/ml direkter/ Sandwich ELISA	Organhomogenisat Milz Gew. [g]	Nr.	Gew. [g]		µg/ml direkter/ Sandwich ELISA
5	GO in PBS	M.	27,6	27,4	28,2	28,3	27,5	154		31	1,99	0,64	32	0,164	0,64	0	
			27,8	28,1	28,5	29,3	28,4	156	107						1,1	1,1	0
								213	147								
								145	199								
								265	350								
6	GOL	W.	20,8	21,3	21,3	21,1	21,3	127		sofortige Fixierung in Formalin						0	
			21,9	21,7	21,9	22,3	22	185	115							0	
								138	108								
								122	123								
								164	119								
7	GOL	M.	27,6	27,1	26,6	26,1	25,8	144		46	2,032	0	47	0,144	0	0	
			27	27,8	27,8	27,7	28,1	227	172						0	0	0
								119	156								
								127	191								
								194	125								
8	GOL	W.	20	20,4	20,3	19,7	19,9	144		56	1,351	0	57	0,151	0	0	
			20,1	20	20,3	20,3	20,2	139	140						0,7	0,7	0
								157	130								
								114	127								
								158	102								

Maus	Lunge		Gehirn		Assay	Serum	12,7 µl in 87,3 µl	Beobachtungen
	Nr.	Gew. [g]	Nr.	[g]				
					Gran.	Anti-		
					Mon.	körper-		
					Lym.	titer		
					% gated	gegen		
						GO		
5	33	0,238	37	0,502	0,79	1:128	d2 minimale Verletzung, sehr schlechte Heilung, d7 blaue Flächen und Schwellung, entzündet, d8 dito, d10 etwas gebessert	
	34	0,488	38	0,278	3,28		d11 Entzündung vor allem an Inj.stelle unauffällig	
	35	0,17	39	0,115	0,94			
	36	0,219	40	0,053				
6	sofortige Fixation in Formalin				1,79	1:1024		
					3,15			
					0,86			
7	48	0,24	52	0,452	0,98	1:128	d1 Verletzung Schwanz, d2 dort teilweise Austritt GO, d7 leichte Krümmung Schwanz, d8 Schwellung, d10 deutlich entzündet, d11 Schwanzansatz blauschwarz verfärbt	sehr schlecht getroffen nehmen
	49	0,524	53	0,314	2,52			
	50	0,156	54	0,075	0,31			
	51	0,214	55	0,098				
8	58	0,267	62	0,552	0,4	> 1:2048	unauffällig	
	59	0,325	63	0,267	0			
	60	0,124	64	0,135	0,11			
	61	0,154	65	0,085				

Balb C Maus VB · 91,99

nur Positivkontrolle FACS

Nr.	Fix.	Inf. d0	GOL d5	Geschl., Alter	do d0	d5 t=0	Organhomogenisat				Infek- tions- dosis				
					d1	1h	GO		µg/ml			GO			
					d2	2h	direkter		direkter						
					d5	4h	Leber	Sandwich	Milz	Gewicht	Sandwich	Serum			
					d6	d6 bei	Nr.	[g]	ELISA	Nr.	[g]	ELISA	GO(µg/ml)		
					Tötung										
4c	F.	-	+	W, 14w	17,8	106	93	keine Organe, unklare Todesursache						0	
					n.g.										
					n.g.										
					15,9										
					verstorben bei Injektion										
5c	H.	-	+	W, 14w	21,5	161	183	32	1,144	127,5	33	0,112	64	0	0
										167,7		237,8	0		
					21,5		178								
					21,2	183	153								
6c	H.	-	+	W, 14w	20,7	125	196	keine Organe, unklare Todesursache						0	
					n.g.								0		
					n.g.										
					20,5										
					verstorben bei Injektion			keine Organe, unklare Todesursache							
3cW	H.	-	+	M, 13w	27,4	127	144	Proben tierärztl. Dienst (kein Ergebnis BU)						0	
					27,3		74						0		
					27,4		238								
							183								
							130								
4cW	F.	-	+	W, 15w	22,8	122	149	21	1,295	8,94	22	0,101	13,48	0	0
					21,5		131			13,2		63,2	0		
					21,9		130								
							106								
							135								
							131								

Versuch 1a-d 04		April/Mai 2004			Gewicht Blutglucose					µg/ml											
Nr.	Fix.	Inf. d0	GOL d5	Geschl., Alter	do	d0	d5 t=0	Organhomogenisat		µg/ml		Infek- tions- dosis									
					d1	d2	d5	d6	d6 bei Tötung	direkter	Gewicht		direkter	Serum							
								Leber Nr.	[g]	Sandwich ELISA Nr.	Milz Nr.	[g]	Sandwich ELISA	GO(µg/ml)							
1a	F.	+	-	W, 13w	22,1	169	143	Formalin						0	1,7E+09						
					22,2		121							0							
					22,4		120														
					22,9		142														
					22,3	159	124														
2a	H.	+	-	M 13w	27,6	153	136	6	1,7	0	7	0,16	0	0	1,7E+09						
					26,4		216													0	0
					27,2		143														
					28,4		239														
					27,7	199	170														
3a	H.	+	-	M, 13w	30	203	69	17	1,359	0	18	0,17	0	0	1,7E+09						
					29,2		54													0	0
					29,1		46														
					23,3		48														
					22,6	102	71														
1b	F.	+	-	M*12.02.C	23,5	125	97	Formalin							1,5E+07						
					24		68														
					n.g.		61														
					23,3		74														
					25,8	145	164														

Maus Nr.	Lunge		Gehirn		Facs			CD 11b/18 LR			UR			Sektion Abszesse	Anzucht Staph. aus PL (MW, n=3) [KBE] d7 d8
	Nr.	Gew. [g]	Nr.	[g]	CD 21/35 LR		CD 11b/18 LR		UR		Sektion	Abszesse			
					Granulozyten	Monozyten	Granulozyten	Monozyten	Granulozyten	Monozyten					
					%gated	mean	%gated	mean	%gated	mean					
					x	y	x	y	x	y					
1a	keine Organgewichte da sofortige Fixation				29,3	33,1	1,28	47,5	77,9	1,3	51,4	362	2045	keine	0
					25,9	21,4	1,03	79,2	46	1,18	20,3	167	393		0
					22,1	19,2	1,01	96,7	22,8	1,13	1,63	80,1	103		
2a	8	0,2	12	0,445	15	33,6	1,3	24,9	129	859	74,7	284	859	1 kleiner	0
	9	0,478	13	0,14	17,6	25,5	1,02	72,8	56,8	1,17	27,2	194	247	Leber	1403
	10	0,17	14	0,3	78,1	15,5	1,01	96,7	21,3	1,11	1,52	76,8	74,4		
	11	0,183	15	0,083											
3a	19	0,199	23	0,471	7,09	35,4	1,34	2,97	150	1,79	96,9	239	730	multiple kl. A.	0
	20	0,556	24	0,31	43,4	23,6	1,02	67,7	56,7	1,13	32,3	206	175	in Leber (ca.5),	0
	21	0,172	25	0,189	78,2	13	1,01	98,4	23,7	1,07	1,22	81,4	111	caud. an li. Niere	
	22	0,198	26	0,055										ein sehr gr. und mehrere kl. A.	
1b	keine Organgewichte da sofortige Fixation				25,3	39,6	5,9	7,84	606	5,84	91,7	870	1637	ein kl. A. caud.	107
					14,2	73,5	2,55	76,2	218	2,99	21,2	447	242	Leberrand,	
					68,6	34,5	2,06	92,7	57,8	2,68	4,03	124	41,1	Milz multiple kl. A	
														Verwachsungen/ Eiter im Gekröse	

Versuch 1a-d 04			April/Mai 2004			[g]	do (G.)d0	d5 t=0	µg/ml	Organhomogenisat	µg/ml					
Nr.	Fix.	Inf. d0	GOL d5	Geschl., Alter	d6	d6	8h	Leber Nr.	[g]	Sandwich ELISA	Milz Nr.	Gewicht [g]	Sandwich ELISA	Serum GO(µg/ml)	Infek- tions- dosis	
2b	H.	+	-	M, 13w	24,6	142	174	6	1,38	0	7	0,246	0	0	1,5E+07	
					23		112						0	0	0	
					n.g.		174									
					23,9		143									
					23,9	140	123									
3b	H.	+	-	W, 14w	29,3	126	137	17	1,422	0	18	0,202	0	0	1,5E+07	
					26,4		145						0	0	0	
					n.g.		94									
					25,7		152									
					25,9	130	129									
1d	F.	+	-	M, 13w.	25,4	169	232	Formalin							5,8E+08	
					d2 25,1		220									
					d4 25,2		215									
					24,8		126									
					26,5	155	142									
2d	H.	+	-	W, 13w	20,6	156	141	6	1,46	0	7	0,22	0	0	5,8E+08	
					d2 19,7		169						0	0	0	
					d4 20,5		139									
					20,6		167									
					21,6	156	135									
3d	H.	+	-	W, 10w	18,5	148	76	17	1,085	0	18	0,205	0	0	5,8E+08	
					d2 15,2		144						0	0	0	
					d4 14		167									
					14,1		84									
					13,9	99	85									

Versuch 1a-d 04 April/Mai 2004					[g]	d0 (G.)	d0 d5 t=0		GO		GO		Infek-	
Nr.	Fix.	Inf.	d0 GOL	d5 Geschl., Alter	d1	d2	d5	Leber	direkter	Sandwich	direkter	Sandwich	Infek-	
					d6	d6 bei+	d6 bei+	Nr.	[g]	[µg/ml]	Nr.	[g]	dosis	
6b	H.	+	+	M, 14w	31,3	204	90	42	1,641	47,06	43	0,238	28,5	0 1,5E+07
					30		63			28,55			9,35	0
							51							
					26,00		36							
					25,8	132	21							
4d	F.	+	+	M, 10w	23,8	281	197	Formalin						5,8E+08
					22,8		122							
					24,1		202							
					23,3		136							
					23,7	211	147							
5d	H.	+	+	W, 13w	20,8	134	159	32	1,463	71,2	33	0,252	10,76	0 5,8E+08
					20,6		168			12,1			50,1	0
					20,4		140							
					20		154							
					20,7	157	139							
6d	H	+	+	W, 13w	22,1	129	197	42	1,107	102,3	43	0,21	87	0 5,8E+08
					20,6		144			37,3			18	0
					22,2		122							
					21,4		122							
nicht getroffen					21,6	180	149							
6a	H.	+	+	M, 13 w	29,1	210	86	42	1,699	0	43	0,195	0	0 5,2E+08
					26,3		63			0			0	0
					26,3		63			nicht getroffen				
					24,4		42							
					23,9	23	38							

Bezeich der Ma Versuchl	Lunge		Gehirn		Facs									Sektion Abszesse gr. Abszess	aus PL (MW, n=3) [KBE] d7 d8	
	Niere		Muskel		CD 21/35 LR			CD 11b/18 LR			UR					
	Herz	Knochenmark	Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten	%gated	mean	Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten	%gated	mean	Granulozyten			Monozyten
Darm	Gewicht	Thymus	Nr.	[g]	Nr.	[g]	x	y	x	y	x	y	x	y		
6b	44	0,267	48	0,449	21,91	41,79	5,69	7,93	238,81	4,15	92,02	855,82	1383,9	gr. A. re. mittelgr.	unz.viele	
	45	0,513	49	0,26	25,32	47,13	2,95	48,16	121,43	2,9	51,84	527,81	298	A. craniale Leber	unz.viele	
	46	0,162	50	0,113	82,75	30,5	2,08	95,21	52,49	2,53	4,62	200,24	132,35	Verklebung mit Zwerchfell,		
	47	0,098	51	0,085												
4d	keine Organgewichte da sofortige Fixation				28,6	48,6	6,28	48,6	187	5,52	55,4	687	1078	0,3cm gr. A.	0	
					34,9	30	2,58	84,9	57,7	3,28	14,8	295	213	li. ventr. an	0	
					76,6	26,8	2,27	95,3	41,9	2,78	3,77	139	124	Leber, Verwachsung Darm/ Einstich		
5d	34	0,29	44	0,229	23	42,3	9,32	23,5	248	6,82	76,3	769	1207	0,3cm gr. A.	1	
	35	0,358	45	0,477	19,6	58,9	8,29	82,8	69,8	3,31	17,2	302	191	cran. , dort	unz.viele	
	36	0,118	46	0,147	75,6	27,7	2,31	94,8	43,8	2,81	4,76	118	50,5	Verwachsung mit Zwerchfell		
	37	0,163	47	0,144												
6d	38	0,48	48	0,515	23	42,3	9,32	46,1	305	6,8	53,9	626	598	unauffällig	0	
	39	0,21	49	0,196	35,7	29,1	2,61	90,4	107	3,56	9,46	295	93,7		unz.viele	
	40	0,21	50	0,196	63,3	25,1	2,28	94,1	56,4	2,98	5,3	159	29,6			
	41	0,093	51	0,065												
6a	44	0,3	48	0,534	7,12	28,92	1,29	5,38	213,17	1,63	94,57	257,37	637,4	gr. A. Einstich	0,33	
	45	0,563	49	0,333	28,31	18,12	1,04	58,68	84,52	1,17	41,32	203,61	177,41	gr. A. ventr.l,	0	
	46	0,157	50	0,275	72	11,22	1,01	98,42	23,35	1,05	1,16	87,43	48,74	kl.cran. an Leber		
	47	0,173	51	0,058										multiple A. cran. an li. Niere		

Tierversuchsprotokoll

EPC:EPG:Chol-Liposomen mit Glucose-Oxidase

Oktober/November 2004 Tübingen GOL 1 x

Burkholderia cepacia Sepsis

gp91phox -/
alle*22.08.04

Nr.	Fixierung	d0	d0	Geschl.	Gewicht	Infektionsdosis	Burkholderia-Anzucht			Organe	µg/ml Organhomogenisat								
							Vollblut	PL	Leber		Gew.	direkter/ Sandwich ELISA	Milz Gew.	direkter/ Sandwich ELISA	Niere	Gew.	KM	Gew.	
		0min	1h		do	KBE/100µl i.p.			Leber Nr.										
1	H.	-	-	w	27,7 27,2 27,3	0	0	0	0	1	1,15	0 0	2 0,1	0 0	3 0	0,51	4	0,34	
2	H.	-	+	w	21,5 21,5 21,1	0	0	0	0	5	1,171	23,6 14,53	6 0,11	0,11	27,24 17,71	7	0,39	8	0,35
5	H.	+	-	w	18,6 19,8 19,2	419	0	0	0	17	1,033	0 0	18 0,13	0,13	0 0	19	0,44	20	0,17
6	H.	+	-	w	19,6 19,4 19,8	419	0	0	0	21	1,089	0 0	22 0,09	0,09	0 0	23	0,35	24	0,29
7	H.	+	+	m	25,5 26 26,5	419	0	0	0	25	1,474	5,2 2,2	26 0,09	0,09	13,67 9,69	27	0,5	28	0,29
nicht getroffen/ Kontrolle																			
3	H.	-	+	m	20 19,6 20,1	0	0	0	0	9	1,006	0 0	10 0,09	0,09	0 0	11	0,39	12	0,29
4	H.	+	+	m	27	419	0	0	0	13	1,293	0 0	14 0,09	0,09	0 0	15	0,48	16	0,37
Positivkontrolle PL, Tötung nach ca. 5h (mit 1-3)																			
8	H.	+	+	w	21,8 21,3 21,7	419	0	0	0	29	1,229	0 0	30 0,12	0,12	0 0	31	0,44	32	0,31

Tierversuchsprotokoll nur Infektion

Burk. cepacia Sepsis

gp91phox -/- alle * 12.09.04

November/Dezember 2004

Nr.	Fix.	d0 Infek- tions- dosis	Geschlecht	[g] Gewicht		Ende	Allgemeinbefinden (d0,1, 2 bei allen gut) Patho	Burkholderia-Anzucht				
				do	d4			KBE /Inf.	aus 10µl VB (d1=0) d2	aus PL (bei +) d3	aus Leber (bei +) d4	
1	H	10 ³	w.	21,4	19,3	d5	d3 gut	Leber hell marmoriert	1070	0	2272	1,05E+06
				22,3	18,9		d4 Fell etwas stumpf, leicht aufgekrümmt			0		
				21,9			d5 schlecht			2		
				20,9						6		
2	H	10 ⁴	w.	20,7		d3	d3 vollkommen	Herz dilatiert; Leber vergrößert, schwammig, hell marmoriert;	10700	20	2316	5,05E+06
				19,4			apathisch, aufgekrümmte Haltung und stumpfes Fell			1458		
				18,7								
				16,8								
3	H	10 ⁵	m.	26,3		d3	d3 matt, aufgekrümmte Haltung und etwas stumpfes Fell	Leber und Milz kaum verändert	107000	2	0	2,00E+01
				26,3						0		
				26,1								
				25,4								
4	H	10 ⁵	w.	22,6		d3	d3 apathisch, aufgekrümmte Haltung und stumpfes Fell	Leber hell marmoriert; Milz knotig	107000	44	7336	1,62E+05
				20						262		
				20,7								
				18,5								
5	H	10 ⁵	w.	19,8		d3	d3 sehr apathisch, aufgekrümmte Haltung und stumpfes Fell	Leber hell marmoriert	107000	29	unzählbar	1,44E+07
				18,5						1616	viele	
				17,4								
				16,2								

Tierversuchsprotokoll**Infektion:** 100 µl = 8,8*10⁴ Keime/Maus (soll 10hoch5)

Einmalgabe i.p.				1h post inf.		Burk.		Allgemeinbefinden		Sektion Allgemeinbefinden	
Dezember 2004 Tübingen						Anzucht				(d) vor Tötung	
Burkholderia cepacia Sepsis				Gewicht		aus Vollblut					
Nr.	Fix.	Inf.	Ge- schl.	1h p. inf.	d0 [g]	d1 d5	d2 d4	d3 d5	d4 d6	d5 d6	d6 d6
1	H.	-	+ m.		25,7	25,6	immer negativ				
					25,6	25,9	immer				
					25,4	25,8	ohne besonderen				
					25,7		Befund				
2	H.	+	- w.		20,3	18	0	49		o.b.B.	d5/6 über Nacht gestorben
					19,6	17,8	0	-	o.b.B.	vollkommen apathisch	keine Proben
					18,9	16,2	0		etwas mager aber	und kachektisch	
					18,4		9		Allgemeinbefinden gut		
3	H.	+	- w.		21,1	18,4	0	>3000		leicht apathisch und kachektisch	d5 leicht apathisch
					20,8	17	0		o.b.B.	- (verendet)	und kachektisch
					19,6	-	0		etwas mager aber		
					19,1		23		Allgemeinbefinden gut		
4	H.	+	- w.		18,9	16	0	-		-	d4 vollk. apathisch
					19,4	-	0		o.b.B.		und kachektisch
					18,5	-	5		etwas mager aber	Allgemeinbefinden gut	
					17,4		>3000		vollkommen apathisch und kachektisch		
5	H.	+	- m.		26,6	23,7	0	12		o.b.B.	d6 etwas apathisch
					25,2	23,1	0	>3000	o.b.B.	etwas apathisch	und kachektisch
					24,9	21,8	0		o.b.B.	und kachektisch	
					24,7		0		etwas mager aber	Allgemeinbefinden gut	
6	H.	+	- m.		24,1	-	39	-			d2 apathisch
					21,8	-	143		apathisch, stumpfes Fell, aufgekrümmter Rücken, Augenausfluss		
					20,9	-	>3000				
					-		-				

Einmalgabe i.p. Dezember 2004 Tübingen				1h post inf.	Burk.	Infektion: 100 µl = 8,8*10 ⁴ Keime/Maus				Sektion Allgemeinbefinden	
Burkholderia cepacia Sepsis				Gewicht	Anzucht	Allgemeinbefinden				(d) vor Tötung	
Nr.	Fix.	Inf.	Ge- schl.	1h p. inf. [g]d0	d1	d5 d1	d4	d2	d5		
				d2	d6 d2	d5	d3	d3	d6		
				d3	d3	d6	d4		d6		
7	H.	+	w.	21,5	-	6	-				d3 apathisch und kachektisch
				19,3	-	0		etwas matt, stumpfes Fell			
				17,3	-	>3000		apathisch und kachektisch			
				16,4		-					
8	H.	+	w.	19,9	17,3	0	130			matt, stumpfes Fell und kachektisch	d5 matt, stumpfes Fell und kachektisch
				19,1	17,2	0		o.b.B.		-	
				18,6	-	0		o.b.B.			
				18,1		2		etwas mager aber Allgemeinbefinden gut			
9	H.	+	w.	21,2	20,2	1	12			mager und etwas matt	d6 leicht apathisch und kachektisch
				20,4	19,6	1238	>3000	o.b.B.		etwas apathisch	
				20,3	18	1		o.b.B.		und kachektisch	
				20,7		6		etwas mager aber Allgemeinbefinden gut			
10	H.	+	m.	26,3	-	10	-				d2 leicht apathisch, aufgekrümmter Rücken, Augenausfluss
				23,8	-	1		siehe Tag der Sektion			
				22	-	-					
				-							
11	H.	+	m.	22	18,8	0	-			-	d4 etwas apathisch und kachektisch
				21,8	-	0		o.b.B.			
				21,3	-	13		o.b.B.			
				20,4		1348		etwas apathisch und kachektisch			
12	H.	+	m.	22,5	20,4	0	-			mager aber munter	d5 frisch verstorben (Leichenstarre nur cranial, d.h. unter 1h)
				22,6	18,8	0		o.b.B.		-	
				22,6	-	2		o.b.B.			
				21,7		40		o.b.B.			

Tierversuchsprotokoll

Burk. cepacia Sepsis

Einmalgabe i.p.

GO-Nachweis für Niere, Knochenmark und Serum war stets negativ

Nr.	Überlebensdauer (Tage)	Organe		Gewicht [g]	Pathologie	Milz		Niere		Gew. [g]	KM	Burkh.-Anzucht				
		Leber Nr.	GO [µg/ml]			Nr.	GO [µg/ml]	Nr.	10µl VB (d1=0)			PL (bei +)	Leber (bei +)			
7	4	25	1,38	mäßig marmoriert	0,76 0,7	26	0,175	vergrößert und etwas körnig	2 1	27	0,403	28	0,225	6 143 >3000	6,0E+07	6,8E+04
8	6	29	1,6	1mm gr. Abszess caud. Rand, marmoriert mit Blutungen	0 0	30	0,26	vergrößert und etwas körnig	0 0	31	0,436	32	0,355	0 0 0 2 130	2,6E+04	1,4E+02
9	7	33	1,89	?	0 0	34	0,264	vergrößert	0 0	35	0,45	36	0,345	1 0 1 6 12	2,8E+05	1,1E+03
10	3	37	1,43	mäßig marmoriert	0 0	38	0,137	etwas körnig	0 0	39	0,581	40	0,5	10 1238 -	5,6E+06	2,1E+04
11	5	41	1,6	hell marmoriert	0 0	42	0,2	unauffällig	0 0	43	0,4	44	0,25	0 1 13 1348	4,1E+06	2,2E+04
12	6	45	1,69	marmoriert mit multiplen miliaren Abszessen, v.a. caudaler Rand	0 0	46	0,23	vergrößert und gekörnt	0 0	47	0,426	48	0,39	0 0 2 40	keine Proben	
Mittelwert behandelt		5,17												keine Proben	MW behandelt	1,4E+07 2,2E+04

Tierversuchsprotokoll **gp91phox -/- Mäuse** alle * 04.10.04 weiblich

Dezember/Januar 2004/05 Tübingen

Alter: 12 Wochen

alle Organe bei -20°C

außer ca. 50g Leber zur Keimzahlbestimmung

Burkholderia cepacia Sepsis

Infektionsdosis: 100 µl = 1,901*10⁵ Keime/Maus

3-fach-Gabe GOL

1h: 100µl VBh + 100 µl GOL/ PBS i.p.

4h: 100µl GOL/PBS i.v.

7h: 100µl GOL/ PBS i.p. **Gewicht**

Nr.	Inf.	GOL	[g]				Burk. Anzucht aus Vollblut [KBE/10µl]		Allgemeinbefinden (kein Eintrag = gut) Tag Zustand	Überlebensdauer (Tage)	Niere		Blutbild (Au: Phago Lym-zyten* pho-% %)				
			d0	1, 4, 7h	d0	d1	d2	d3			d1	d4	KM Nr.	Ge-wicht [g]	Phago %	Lym-zyten* %	
1	-	+	20	20	20	20	0	0	immer gut	7	3	0,411	20	80			
			20	19	20		0	0							(Versuchsende)	4	0,234
							0	0									
2	+	-	19	19	19	18	0	0	d6 etwas mager, etwas matt	7	7	0,386	77	23			
			19	18	18		0	0							8	0,176	
							0	1									
3	+	-	19	19	18	18	0	0	d6 sehr mager und matt, Augen verklebt	7	11	0,364	89	9			
			17	17	15		0	16							12	0,24	
							0	558									
4	+	-	22	21	19	18	0	-	d3 matt, schwankt, Augenausfluss	4	15	0,466	-	-			
			-	-	-		1	-							16	0,236	
							56										
5	+	-	22	21	19	18	0	0	d6 matt, Augenausfluss, schwankt	7	19	0,541	88	12			
			19	21	20		0	11							20	0,153	
							0	764									
Überlebensdauer unbehandelt									6,3			84,7	14,7				

GO-Nachweis für Niere, Knochenmark und Serum stets negativ

**Tierversuchsprotokoll
3-fach-Gabe GOL**
Burk. cepacia
Gewicht
**Burk.
Anzucht**
Allgemeinbefinden

 GO-Nachweis für Niere, Knochen-
mark und Serum stets negativ

Sepsis

 d1 d2 d3
d4 d5 d6

 [KBE/10µl]
d1 d4
d2 d5
d3 d6

 (kein Eintrag = gut)
Tag Zustand

**Über-
lebens-
dauer**
(Tage)

Niere
KM

 Ge-
wicht
[g]

Blutbild (Ausstrich)

 Phago Lym-
zyten* pho-
% %

 Nr. Inf. GOL
d0 1, 4, 7h

Nr.	Inf.	GOL	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	[KBE/10µl]	Tag	Zustand	Überlebensdauer (Tage)	Niere KM Nr.	Ge- wicht [g]	Phago zyten* %	Lym- zyten %
6	+	+	19	19	19	18				0	0	d4 etwas mager,	6	23	-	-	-
			17	17	-			0	70	AB gut	24	-					
								0	-	d5 etwas mager, etwas matt d6 tot aufgefunden							
7	+	+	19	18	17	17				0	2	d4 etwas mager,	6	27	-	-	-
			17	17	-			0	428	AB gut	28	-					
								0	-	d5 etwas mager, etwas matt d6 tot aufgefunden							
8	+	+	20	19	19	17				0	0	d3 etwas mager,	7	31	0,371	85	15
			17	17	16			0	0	Rücken leicht gekrümmt	32	0,331					
								0	6	d4 etwas mager, AB gut d5 etwas mager, AB gut d6 etwas mager, etwas matt							
9	+	+	21	20	17,1?	19				0	0	d4 etwas mager, AB gut	7	35	0,483	90	10
			18	19	17			0	0	d5 etwas mager, AB gut	36	0,331					
								0	100	d6 etwas mager, etwas matt							
													Überlebensdauer behandelt	6,5	87,5 12,5		

 * Differenzierung Makrophagen/ Granulozyten wegen
Beschädigung der Zellen nicht möglich

10 unbehandelter Blutspender Auswertung Blut nur humaner Advia

Monozyten = etwa murinen Granulozyten: 8,8

Tierversuchsprotokoll 3-fach-Gabe GOL
Burk. cepacia Sepsis

Nr.	Organe		Pathologie	GO		Pathologie	Burk.-Anzucht		aus PL (bei +) [KBE/ml]	aus Leber (bei +) [KBE/mg]	
	Leber Nr.	Ge- wicht [g]		direkter/ Sandwich ELISA	Milz Nr.		Ge- wicht [g]	direkter/ Sandwich ELISA			aus Vollblut [KBE/10µl]
6	21	-	keine Sektion und keine Proben	-	22	-	-	0	0	-	-
7	25	-	keine Sektion und keine Proben	-	26	-	-	0	2	-	-
8	29	1,390	vergrößert, marmoriert u. Abszesse am Rand	0,84 0,9	30	0,2	vergrößert und grobkörnig	0,0 0 0	0 0 6	33600	800
9	33	1,730	vergrößert, marmoriert u. Abszesse am Rand	1,16 1,2	34	0,3	vergrößert und grobkörnig	0,84 0,8 0	0 0 100	21200	22200
								MW		27400	11500
								StAbw		8768	15132

Tierversuchsprotokoll**Anker- und PEG-Liposomen mit Glucose-Oxidase, Einfachgabe**

gp91phox +/- Mäuse		*9.,10 u.14.03.05		direkter ELISA		ELISA		Quotient	Geschl.				
Maus	Organ	S= Serum	L=Leber	M= Milz	Sandwich	Serum	Leber						
Nr.	Zeit	(µg/ml Serum bzw. Organhomogenisat)											
	1	5	30	45	90	100	4h	11h					
1	alles negativ, Tötung nach 1440 min									M.			
Ankerliposomen								14,1					
2	S	25,6							0,55	M.			
		16,9							25,6				
	L	1,2	Ni 5 m	0,6									
		3,0		0,9									
	M	0,4											
		0,6											
4	S	20,7							n.a.	M.			
		14,1											
	L	2,0	Ni 1min	0,88									
		1,8		1,3									
	M	0,0											
		1,4											
5	S	54,8	S	n.a.	S	11,9	cave 30 min		8,25	W.			
		12,2		n.a.		10,1	weniger Plasma,n.a.		2,6				
					L	2,0			3,17				
						1,8							
					M	1,8							
						1,4							
10						S	7,5	S	4	S	0,6	0,45	M.
							6,6		4		0,7	0,85	
										L	5,7	0,53	
											7,8		
										M	4,2		
											8,7		
11						S	11,4	S	8	S	0,2	0,25	W.
							8,4		7		0,3	1,65	
										L	7,0	0,15	
											8,8		
										M	0,7		
											6,8		

Tierversuchsprotokoll**Mai 2005 Tübingen**

Organe zur Homogenisierung bei -20°C

Gewicht		Niere		Gew.	Töt- ung	DHR- Assay	%gated					
Leber	Milz	Nr.	Nr.				DHR	PMA	Grar	Mon.	Lym.	
Nr.	Gew. [g]	Nr.	Gew. [g]	KM Gew. [g]	nach [min]	Tag	-	-	0	0	0	
						a	+	-	1,3	0,48	0,34	
1	1,67	2	0,12	3	0,48	1440	a	+	4,8	0,97	0,43	
				4	0,15		b	+	4,7	0,72	0,25	
5	1,44	6	0,08	7	0,47	5	a	+	13	5,03	0,74	positiv sehr gut getroffen
				8	0,14							
13	0,23	14	0,05	15	0,35	1	c	+	7,8	3,32	1,19	(p)
				16	0,19		c	+	16	8,4	2	positiv gut getroffen
17	1,46	18	0,14	19	0,35	45	c	+	3,7	0,09	0,49	negativ gut getroffen
				20	0,16							
37	1,32	38	0,09	39	0,4	1440	b	+	1	1,05	0,97	
				40	0,17		b	+	3,8	0,47	0,39	negativ gut getroffen
41	0,97	42	0,06	43	0,28	1440	b	+	1,9	0,33	0,19	negativ gut getroffen
				44	0,08							

Tierversuchsprotokoll**Mai 2005 Tübingen****Anker- und PEG-Liposomen mit Glucose-Oxidase, Einfachgabe****gp91phox -/- Mäuse**

Maus Nr.	Zeit	Organ	GO (µg/ml)	S= Serum	L=Leber	M= Milz	ELISA		Quotient	Geschl.	
							direkter ELISA	Sandwich			
12	1	S	5	30	45	90	100	120			
			12,2							9 M.	
			9,3							0,6	
			L	1,0 Ni	5min	0,9					16
			1,2			1					
13	1	S	5	30	45	90	100	120			
			13,4							6,7 W.	
			9,3							0,8	
			L	0,8 Ni	5min	0,7					8,9
			0,9			0,6					
15	1	M	5	30	45	90	100	120			
			0,8								
			0,9								
			S	14,3							6 W.
			7,1							0,9	
	1	S	5	30	45	90	100	120			
			9,9								
			5,1								
			L	1,2 Ni							1,2 6,7
			1,7								1,3
	1	M	5	30	45	90	100	120			
			1,6								
			5	30	45	90	100	120			
			2,1								

Tierversuchsprotokoll**Mai 2005 Tübingen****Anker- und PEG-Liposomen mit Glucose-Oxidase, Einfachgabe**

Maus Nr.	Gewicht		Niere Nr.	Gew. [g]	Töt-ung [min]	DHR-Tag	DHR-Assay						
	Leber [g]	Milz [g]					KM Gew. [g]	Gew. nach [g]	DHR	PM/Gran.	Mon.	Lym.	
12	45	1,9	46	0,12	47	0,48	5	c	+	-	1,29	0,48	0,3
				48	0,23	c	+	+	4,02	0,39	0,4	grenz- mäßig getroffen wertig	
				51	0,42	5	c	+	-	1,24	0	0,2	
13	49	1,5	50	0,13	51	0,15	5	c	+	+	0,88	0,2	0,2
				52	0,15	c	+	+	0,88	0,2	0,2	negativ mäßig getroffen	
15	57	1,2	58	0,12	59	0,27	90	c	+	-	0	0,1	0,4
				60	0,14	c	+	+	4,23	0,12	0,8	grenz- gut getroffen wertig	

Tierversuchsprotokoll Mai 2005 Tübingen
Anker- und PEG-Liposomen mit Glucose-Oxidase, Einfachgabe
gp91phox -/- Mäuse

Maus Nr.	Zeit	Organ GO (µg/ml)	direkter ELISA Sandwich				ELISA Serum Leber			Quotient	Geschl.	
			S= Serum	L=Leber	M= Milz		6h	11h	24h			
18	1	S 21,4 8,87	30	45	120	210	4h	6h	11h	24h	4,3 M. 1,3 3,4	I
19	1	S 5,35 4	30	45	120	210	4h	6h	11h	24h	2,1 W. 0,4 5,9	I
20	1		30	45	120	210	4h	6h	11h	24h	2,5 1,2 M. 1,2 0,4 2,2 3,4 2,6 3,2 3,2	I
21	1	S 7 4	30	45	120	210	4h	6h	11h	24h	1,7 1,1 M. 2,1 0,5 2,1 2,3 2,1 3 W. 1,5	I
22												

22 alle negativ , Tötung nach 1440min
 PBS

Tierversuchsprotokoll

Mai 2005 Tübingen

Anker- und PEG-Liposomen mit Glucose-Oxidase, Einfachgabe

nl.	Gewicht		Niere Nr.	Gew. [g]	Töt- ung nach [min]	DHR-Assay Tag	%gated						
	Maus Nr.	Gew. [g]					Leber Nr.	Gew. [g]	KM Nr.	Gew. [g]	DHR		PMA
						a	-	-	0	0	0		
	18	69	70	0,1	0,45	360	b	+	+	6,02	0,85	0,71	positiv sehr gut getroffen
				72	0,2								
	19	73	74	0,1	0,21	360	b	+	+	11,6	0,42	0,28	positiv gut getroffen, aber zu wenig Plasma
				75	0,19								
				76									
	20	77	78	0,1	0,39	1440	b	+	+	11,2	3,16	2,08	positiv sehr gut getroffen
				79	0,19								
				80									
	21	81	82	0,1	0,43	1440	b	+	+	1,2	0,36	0,37	negativ mäßig getroffen
				83	0,2								
				84									
	22	P185	86	0,1	0,43		c	-	-	0,02	0	0,01	
				87	0,17		c	+	-	1,32	0,13	0,49	
				88			c	+	+	4,28	0,11	0,6	entscheidende Negativkontrolle

Tierversuchsprotokoll

Mai 2005 Tübingen

Anker- und PEG-Liposomen mit Glucose-Oxidase, Einfachgabe
schlecht bzw. gar nicht getroffen

	0	5	30	45	90	120	135	150	155	6h	Serum Leber Quotient	
Maus Nr.	Organ GO	S= Serum L=Leber M= Milz				direkter ELISA Sandwich					Ge.	
Ankerliposomen												
3	S	4,7									3,9 W.	
		5,25									0,6	
	L	0									6,5	
		0										
	M	0										
		0										
6			S	0 ?					S	1,2	0,9 M.	
				0 ?						1,3	0,1	
									L	0,0	9	
										0,0		
									M	0,0		
										0,0		
7			S	3,0					S	1,2	0,4 W.	
				2,4						1,3	0,6	
									L	0,6	0,7	
										0,7		
									M	0,7		
										0,7		
8	S	1,1			S	0,9				S	0,7	0,4 M.
		1				1,0					0,9	0,3
										L	1,1	1,6
											2	
										M	1,2	
											3	
9	S	2,54			S	3,7				S	3,3	1,9 W.
		2,1				3,1					3,1	1,1
										L	4,4	1,7
											5,6	
										M	2,9	
											5,4	
PEG-Liposomen												
14	S	1,32	S	2	S	2,2						M.
						2,1						1,9
				L		0,0						0,2
						0,0						9,3
				M		0,0						
						0,0						
16				S		1,9		S	2,4			1,7 M.
						1,8			1,5			0,2
								L	0			11
									0			
								M	0			

10. Danksagung

Der DFG gilt mein Dank für die Finanzierung des Projektes.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. G. Bruchelt für die Möglichkeiten und Freiheiten im Labor und die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Prof. Dr. E. Petzinger möchte ich für die Vertretung des Themas am Fachbereich und seine Anregungen zur Versuchsplanung danken.

Für die Idee für das Thema, die gute Einführung in die Laborarbeit und die fachliche Unterstützung möchte ich mich bei Dr. Claudia Gerber bedanken.

Für die Liposomen gilt mein Dank dem Kooperationspartner, der pharmazeutischen Technologie der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Für die fachlichen Anregungen Prof. R. Schubert und für die Herstellung und Charakterisierung der Liposomen M. Gantert.

Bei den zahlreichen hilfsbereiten Laborkollegen in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik möchte ich mich für die Erklärung so mancher Methode, der Hilfe bei der Fehlersuche und eine gute Zeit bedanken. Besonderer Dank gilt der Unterstützung durch Nadine Kemmler und Henrik Grabner, die mir im Labor in schwierigen Zeiten beigestanden haben.

Dr. P. Pick gilt mein Dank für sein Verständnis für die Belange der Doktorarbeit und das Aufzeigen von Alternativen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich in der Absicht zu promovieren unterstützt haben.

Meinem Verlobten möchte ich für seine Geduld und die aufbauenden Worte insbesondere während des Zusammenschreibens danken.