

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

Eignung lyophilisierter Glucose-Oxidase-haltiger Liposomen  
zur Korrektur der NADPH-Oxidase-Defizienz bei  
Granulozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der  
Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von  
Oliver Hauschild  
aus Stuttgart  
2003

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter:

Professor Dr. L. Kanz

Meinen Eltern und meinem Bruder Carsten



**INHALTSVERZEICHNIS**

I

**I. ABKÜRZUNGEN**

V

**1. EINLEITUNG**

1

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.1   | Der neutrophile Granulozyt                            | 1  |
| 1.1.1 | Entstehung des Neutrophilen                           | 2  |
| 1.1.2 | Die Granula des Neutrophilen                          | 3  |
| 1.1.3 | Chemotaktische Fähigkeiten und Anreicherung im Gewebe | 5  |
| 1.1.4 | Phagozytose   | 6  |
| 1.1.5 | Der respiratorische Burst                             | 8  |
| 1.2   | Die NADPH-Oxidase                                     | 8  |
| 1.3.  | Die septische Granulomatose                           | 12 |
| 1.3.1 | Klinische Symptomatik                                 | 13 |
| 1.3.2 | Diagnostik und Therapie                               | 14 |
| 1.4   | Anwendung von Liposomen                               | 16 |
| 1.5   | Die Lyophilisation von Liposomen                      | 19 |
| 1.5.1 | Prinzip der Lyophilisation von Liposomen              | 21 |
| 1.6   | Das Konzept der Glucose-Oxidase-Liposomen (GOL)       | 22 |
| 1.7   | Charakterisierung der Glucose-Oxidase                 | 24 |
| 1.8   | Zielsetzung der Arbeit                                | 25 |

**2. MATERIAL UND METHODEN**

26

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1   | Material  | 26 |
| 2.1.1 | Chemikalien   | 26 |
| 2.1.2 | Verwendete Lösungen   | 28 |
| 2.1.3 | Geräte  | 31 |
| 2.2   | Methoden  | 32 |
| 2.2.1 | Zellzahlbestimmung und – differenzierung<br>mit dem Advia 120 | 32 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.2     | Isolation von Granulozyten und mononukleären Zellen aus heparinisiertem Vollblut  | 33        |
| 2.2.3     | Herstellung Glucose-Oxidase-haltiger und Rhodamin B-PE-gelabelter Liposomen   | 35        |
| 2.2.4     | Lyophilisation von Liposomen  | 36        |
| 2.2.5     | Vorinkubation der Granulozyten mit Liposomen  | 36        |
| 2.2.6     | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay  | 37        |
| 2.2.7     | Durchflusszytometrische Bestimmung des Aufnahme- verhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Leukozyten                       | 39        |
| 2.2.8     | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung  |           |
| 2.2.9     | des Aufnahmeverhaltens Rhodamin-B-PE-gelabelter Liposomen durch Granulozyten  | 43        |
| 2.2.10    | Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von Liposomen in Granulozyten  | 44        |
| 2.2.11    | Bestimmung der HOCl-Produktion durch Granulozyten unter Einfluss von GOL  | 45        |
| 2.2.12    | Luminol-verstärkte Chemilumineszenz   | 46        |
| 2.2.13    | Chemotaxis-Assay  | 49        |
| 2.2.14    | Degranulation von Granulozyten  | 51        |
| 2.2.15    | Lipidperoxidations-Assay  | 53        |
| 2.2.16    | Untersuchungen zur Stabilität der Glucose-Oxidase   | 54        |
| 2.2.17    | Auswertung der Ergebnisse   | 57        |
| <b>3.</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>58</b> |
| 3.1       | Darstellung isolierter Granulozyten am Advia 120  | 58        |
| 3.2       | Durchflusszytometrische Bestimmung des Aufnahme- verhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Leukozyten                       | 59        |
| 3.3       | Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Aufnahmeverhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Granulozyten | 61        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 3.4       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay   | 63         |
| 3.4.1     | Inhibitionsversuche mit Glucose-Oxidase-Antikörpern  | 63         |
| 3.4       | Bestimmung der HOCl-Bildung durch Granulozyten<br>unter Einfluss von GOL   | 64         |
| 3.6       | Luminol-verstärkte Chemilumineszenz  | 68         |
| 3.7       | Einfluss von GOL auf die chemotaktischen Eigenschaften<br>von Granulozyten   | 71         |
| 3.8       | Einfluss von Liposomen auf die Degranulation von Granulo-<br>zyten   | 75         |
| 3.9       | Killing Assay mit <i>Staphylococcus aureus</i>   | 77         |
| 3.10      | Untersuchungen zur Lipidperoxidation   | 77         |
| 3.11      | Stabilität der Glucose-Oxidase   | 79         |
| 3.11.1    | GO-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten   | 80         |
| 3.11.2    | GO-Aktivität in Anwesenheit von Myeloperoxidase  | 82         |
| 3.11.3    | GO-Aktivität in Anwesenheit granulozytärer Bestand-<br>teile   | 88         |
| <b>4.</b> | <b>DISKUSSION</b>  | <b>89</b>  |
| 4.1       | Glucose-Oxidase-haltige Liposomen als neuer Therapie-<br>ansatz der NADPH-Oxidase-Defizienz: Vergleich zwischen<br>konventionell hergestellten und lyophilisierten Liposomen | 85         |
| 4.1.1     | Aufnahme lyophilisierter Liposomen   | 85         |
| 4.1.2     | Funktion lyophilisierter Liposomen   | 96         |
| 4.1.3     | Unerwünschte Wirkungen lyophilisierter Liposomen   | 99         |
| 4.2       | Untersuchungen zur Stabilität der Glucose-Oxidase:<br>Simulation degradativer Einflüsse nach zellulärer Aufnahme<br>von Glucose-Oxidase-haltigen Liposomen                   | 101        |
| <b>5.</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>109</b> |
| <b>6.</b> | <b>LITERATUR</b>   | <b>112</b> |

|           |                      |            |
|-----------|----------------------|------------|
| <b>7.</b> | <b>DANKSAGUNG</b>    | <b>117</b> |
| <b>8.</b> | <b>PUBLIKATIONEN</b> | <b>118</b> |

## I. ABKÜRZUNGEN

|           |  |
|-----------|--|
| (N-) fMLP | (N-) formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin                      |
| 4-HNE     | 4-Hydroxy-2 (E)-Nonenal  |
| 6-PG      | 6-Phosphogluconat  |
| AIDS      | <i>Acquired immuno deficiency syndrome</i>                     |
| ATCC      | <i>American type culture collection</i>                        |
| ATP       | Adenosintriphosphat  |
| BCIP      | 5-Bromo-, 4-Chloro, 3-indolylphosphat                          |
| BODIPY    | <i>Boron dipyrromethane</i>                                    |
| CGD       | <i>Chronic granulomatous disease</i> (Septische Granulomatose) |
| Chol      | Cholesterin  |
| CPA       | <i>Cryoprotective agents</i> (Kryoprotektoren)                 |
| DHR       | 1,2,3-Dihydroxyrhodamin  |
| DIC       | <i>Digital interference contrast</i>                           |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid   |
| DNA       | <i>Desoxy ribonucleic acid</i>                                 |
| DTNB      | 5,5'-dithiobis (2-Nitrobenzoesäure)                            |
| ELISA     | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>                       |
| EPC       | Ei-Phosphatidyl-Cholin   |
| EPG       | Ei-Phosphatidyl-Glycerol                                       |
| FACS      | <i>Fluorescence activated cell sorter</i>                      |
| FAD       | Flavin-Adenin-dinucleotid                                      |
| f.c.      | <i>Final concentration</i>                                     |
| FITC      | Fluoresceinisothiocyanat                                       |
| FSC       | <i>Forward scatter</i>   |
| G-6-P     | Glucose-6-Phosphat   |
| G-6-P-DH  | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase                               |
| G-CSF     | <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>                   |
| GDP       | Guanosindiphosphat   |
| GM-CSF    | <i>Granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>          |
| GO        | Glucose-Oxidase  |

|                  |  |
|------------------|--|
| GOL              | Glucose-Oxidase-haltige Liposomen                                      |
| GTP              | Guanosintriphosphat  |
| HBSS             | <i>Hank's balanced salt solution</i>                                   |
| HEPES            | N- (2-Hydroxyethyl) piperazin-N'- (2-ethansulfonsäure)                 |
| HK               | Hexokinase   |
| HLA              | <i>Human leukocyte antigen</i>   |
| Ig               | Immunglobulin  |
| IL               | Interleukin  |
| LDL              | <i>Low density lipoprotein</i>   |
| LTB <sub>4</sub> | Leukotrien B <sub>4</sub>  |
| MDA              | Malondialdehyd   |
| MPO              | Myeloperoxidase  |
| MW               | Mittelwert   |
| n                | Anzahl unabhängiger Experimente  |
| NADPH            | Nicotinamid-dinucleotid-phosphat                                       |
| NBT              | Nitroblau Tetrazolium  |
| PBS              | <i>Phosphate buffered saline</i>                                       |
| PE               | Phycoerythrin  |
| PEG              | Polyethylenglykol  |
| PerCP            | Peridinin Chlorophyll Protein  |
| Phox             | <i>Phagocyte oxidase</i>   |
| PMA              | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat  |
| PUFAs            | <i>Poly-unsaturated fatty acids</i> (Mehrfach ungesättigte Fettsäuren) |
| RES              | Retikulo-endotheliales System  |
| RLU              | <i>Relative light unit</i>   |
| ROS              | <i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffverbindungen)       |
| SD               | <i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)                         |
| SOD              | Superoxiddismutase   |
| SSC              | <i>Side scatter</i>  |
| SUV              | <i>Small unilamellar vesicle</i>                                       |

|     |                              |
|-----|------------------------------|
| TCA | Trichloressigsäure           |
| TNB | 5-thio- (2-Nitrobenzoesäure) |
| U   | <i>Unit</i>                  |



# 1. EINLEITUNG

Neutrophile Granulozyten stellen die erste zelluläre Barriere des Immunsystems bei der Abwehr potentiell pathogener Keime, insbesondere von Bakterien und Pilzen dar. Die mikrobizide Wirkung beruht dabei zum Teil auf der Freisetzung in Granula gespeicherter lytischer Enzyme (Degranulation). Größere Bedeutung hat allerdings die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen ('reactive oxygen species', ROS). Die Entstehung der ROS vollzieht sich beim neutrophilen Granulozyten im so genannten 'oxidativen' oder 'respiratorischen burst', der in erster Linie durch das Zusammenspiel zweier Enzyme, der NADPH-(Nicotinamiddinucleotid-phosphat-) Oxidase und der Myeloperoxidase (MPO), zustande kommt.

Für jedes dieser Enzyme sind angeborene Defekte bekannt, die zur Defizienz an dem betreffenden Enzym führen. Während allerdings die Myeloperoxidase-Defizienz in der Regel klinisch inapparent bleibt (*Kitahara et al., 1981*), verursacht die NADPH-Defizienz das schwere Krankheitsbild der septischen Granulomatose ('chronic granulomatous disease', CGD).

## 1.1 **Der neutrophile Granulozyt**

Neutrophile Granulozyten stellen den größten Anteil an leukozytären Zellen. Es handelt sich bei ihnen um professionell phagozytierende Zellen, die einen großen Beitrag zur Abwehr invadierender Mikroorganismen leisten. Es sind im wesentlichen drei funktionelle Schritte notwendig, um sicherzustellen, dass neutrophile Granulozyten ihre mikrobizide Wirkung am gewünschten Ort (Entzündungsgewebe, infizierte Gewebeareale) entfalten können. Zunächst müssen die Granulozyten an Endothelzellen post-kapillärer Venulen adhären ('Adhäsion'), um dann durch interzelluläre Spalten den Blutstrom zu verlassen ('Extravasion', 'Diapedese'). Anschließend müssen sie sich zielgerichtet einen Weg durch das Gewebe bahnen ('Migration'), wobei sie schließlich am Zielort akkumulieren (*Hellewell & Williams., 1994*). Dort werden pathogene Erreger phagozytiert und im respiratorischen burst im Zusammenspiel mit lytischen

Enzymen zerstört. Im folgenden soll auf Ablauf von Adhäsion, Diapedese, Migration und Akkumulation sowie Phagozytose und respiratorischem burst genauer eingegangen werden. Dem ist eine kurze Ausführung über die Entstehung des neutrophilen Granulozyten und seiner funktionell wichtigsten Bestandteile vorangestellt.

### **1.1.1 *Entstehung des Neutrophilen***

Neutrophile Granulozyten unterliegen im menschlichen Organismus einer sehr hohen Umsatzrate, die sich aus der äußerst geringen Halbwertszeit ( $t_{1/2} = 6 - 7$  Stunden) der Zellen im Blut erklärt. Täglich werden bei einem Erwachsenen (70 kg) durchschnittlich bis zu  $10^{11}$  Zellen neu gebildet. Eine Bildungsrate diesen Ausmaßes kann nur durch einen sich ständig replizierenden Pool an Vorläuferzellen, deren Teilungsrate regulierenden Wachstumsmediatoren unterworfen ist, gewährleistet und kontrolliert werden. Die wichtigste Rolle spielen dabei der so genannte 'Granulocyte-Colony Stimulating Factor' (G-CSF) sowie der 'Granulocyte-Macrophage-Colony- Stimulating Factor' (GM-CSF), aber auch das Intereukin IL-3. Die Neutrophilen entwickeln sich innerhalb des myeloischen Astes der Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle. In verschiedenen Differenzierungsstadien reifen die Zellen dann über das Stadium des Myeloblasten und Promyelozyten zum Myelozyten, aus dem schließlich jugendliche Formen des Neutrophilen hervorgehen. Die Reifung zum adulten Neutrophilen geht mit einer zunehmenden Segmentierung des Zellkerns einher (vom Stab- zum Segmentkernigen). Alle Differenzierungsschritte bedingen morphologische und funktionelle Veränderungen der Zelle. Die Kern-Plasma-Relation verschiebt sich zugunsten des Plasmas, in dem zusätzlich verschieden differenzierte Granula unterschiedlichster Inhaltsstoffe entstehen (vgl. Tabelle 1.1), wobei die zunehmende Segmentierung des Zellkerns den Abschluss des Reifungsprozesses darstellt.

### **1.1.2 Die Granula des Neutrophilen**

Die Granula des Neutrophilen werden entsprechend ihres Entstehungszeitpunktes im Differenzierungs- und Reifungsprozess in primäre, sekundäre und tertiäre Granula eingeteilt (Coffey., 1992). Die primären Granula enthalten zum Einen eine Reihe von sauren und neutralen Hydrolasen, deren Bedeutung teilweise mikrobizider Natur ist, die insbesondere aber auch durch Degradation von Matrixproteinen (Glucosaminen, Glucuronsäuren) die Migration im Gewebe erleichtern. Ihr wichtigster Inhaltsstoff – sowohl funktionell als auch mengenmäßig – ist aber das Enzym Myeloperoxidase, das im Rahmen des respiratorischen Bursts von entscheidender Bedeutung ist (siehe 1.1.5). Die sekundären Granula, die sekretorischen Charakter haben, beinhalten den größten Anteil des vor allem auf gram-positive Keime bakterizid wirksamen Lysozyms, aber auch verschiedene Membranrezeptoren und die membranständigen Komponenten der in Kapitel 1.2. beschriebenen NADPH-Oxidase (Cytochrom  $b_{558}$ ). Die Funktion tertiärer Granula, deren Hauptinhaltsstoff das Enzym Gelatinase darstellt, ist derzeit noch Gegenstand aktueller Forschung. Eine Übersicht über die wichtigsten Inhaltsstoffe der jeweiligen Granula gibt Tabelle 1.1.

---

**Tabelle 1.1: Übersicht über eine Auswahl der wichtigsten Inhaltsstoffe der Granula des Neutrophilen Granulozyten**

---

| Granula     | Inhaltsstoff  |
|-------------|---|
| 1. Primär   | Saure Hydrolasen<br>Cathepsin B und D<br>β- und N-Acetyl-<br>Glucuronidase<br>β-Glucosaminidase<br>Neutrale Proteinasen<br>Cathepsin G<br>Elastase<br>Myeloperoxidase |
| 2. Sekundär | Lysozym<br>Collagenase<br>Lactoferrin<br>Cytochrom b <sub>558</sub><br>Membran-Rezeptoren<br>fMLP-Rezeptor<br>Laminin-Rezeptor<br>C3b1-Rezeptor                       |
| 3. Tertiär  | Gelatinase  |

---

Modifiziert nach *Coffey, 1992*.

---

### **1.1.3 Chemotaktische Fähigkeiten und Anreicherung im Gewebe**

Um seine Funktion bei der Abwehr pathogener Keime, aber auch beim Abtragen zellulären Debris im Rahmen von entzündlichen bzw. nekrotisierenden Prozessen zu gewährleisten, ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Neutrophile Granulozyt an Endothelzellen adhären und den Blutstrom verlassen ('Extravasion') kann. Anschließend kann er das Gewebe durchdringen ('Migration') und in Entzündungsgebieten akkumulieren. Die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten spielt sich an den Endothelzellen der postkapillären Venulen ab. Dort werden die Leukozyten durch Scherkräfte an die Wand gedrängt, während Erythrozyten eher zentral im Gefäß fließen. Aktiviert durch chemotaktische Reize (siehe unten) sind die Granulozyten in der Lage über Selektine mit den Endothelzellen in Verbindung zu treten und an ihnen entlang zu rollen ('Rolling'). Anschließend werden über Integrine und andere Adhäsionsmoleküle stärkere Bindungen mit den Endothelzellen eingegangen, die schließlich in der Diapedese des Granulozyten durch interzelluläre Spalten münden (*Hellewell & Williams, 1994*).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang weiterhin, dass Adhäsion und Extravasion sowie Migration und Akkumulation zielgerichtet stattfinden, insbesondere vor dem Hintergrund der gewebeschädigenden Potenz aktivierter Neutrophiler (*Coffey, 1992*). Die zielgerichtete Migration von Neutrophilen wird durch Konzentrationsgradienten so genannter 'Chemotaxine' erreicht. Wichtige Chemotaxine sind von prokaryoten Zellen im Rahmen der Proteinbiosynthese in großer Menge gebildete N-formyl-Peptide (z.B. N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, NfMLP) sowie Entzündungsmediatoren wie das Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) aus dem Arachidonsäurestoffwechsel. Es wird vermutet, dass Neutrophile Konzentrationsunterschiede bei Chemoattraktantien dadurch erkennen, dass Chemotaxin-Rezeptoren (z.B. fMLP-Rezeptor) auf der Außenseite der Zellmembran unterschiedlich stark besetzt sind. Die Rezeptoren der Membranabschnitte in der Richtung, in der die höchste Konzentration an dem jeweiligen Chemotaxin herrscht, sind notwendigerweise am stärksten

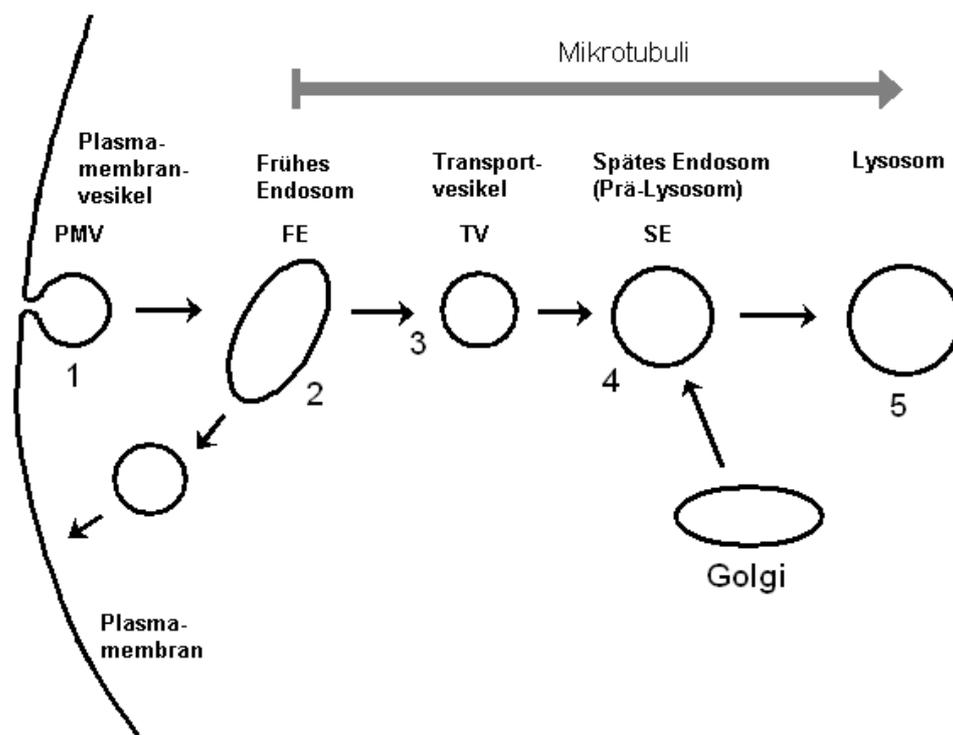
gesättigt, die der gegenüberliegenden Seite am geringsten. Dadurch wird dem Neutrophilen eine Richtung vorgegeben, in die er sich aktiv bewegt (*Niedel et al., 1979*).

#### **1.1.4 Phagozytose**

Die Fähigkeit zur Endozytose ist eine wichtige zelluläre Funktion zur Kommunikation und Interaktion mit der Umwelt sowie zur Aufnahme von Energieträgern und essentiellen Stoffen, zu der jede eukaryote Zelle in unterschiedlicher Ausprägung fähig ist (*Peschka-Süss & Schubert, 2001*). Während frühere Konzepte im Verständnis endozytotischer Prozesse zwei Arten differenzierten, – Phagozytose als Aufnahme von Festkörpern und Pinozytose als Aufnahme von Flüssigkeiten –, definiert man heute entsprechend des ersten Aufnahmeschrittes drei unterschiedliche Aufnahmewege. Zum einen spricht man von Phagozytose als Aufnahme opsonisierter Partikel über Rezeptor-Bindung (z.B. Immunglobulin-Rezeptor) und Umschließung durch Pseudopodien. Weiterhin unterscheidet man die Clathrin-abhängige von der Clathrin-unabhängigen Endozytose. Die Clathrin-abhängige Aufnahme erfolgt an bestimmten Stellen der Membran, den ‘coated pits’. Dabei handelt es sich um Membraneinsenkungen, die auf der cytoplasmatischen Seite der Membran mit Clathrin beschichtet sind. Die coated pits stülpen sich bei endozytotischen Prozessen weiter ins Zellinnere, bis es zur Abschnürung eines Vesikels kommt. Das Clathrin befindet sich dann auf der Außenseite des Vesikels und unterstützt die Fusion der Membranenden. Die Clathrin-unabhängige Endozytose kann prinzipiell an allen anderen Orten der Zellmembran stattfinden. Die Abschnürung der Vesikel vollzieht sich dabei ohne Clathrin. Diese Art der Endozytose wird beispielsweise bei Makrophagen, dendritischen Zellen und Fibroblasten beobachtet und dort aufgrund der Größe des gebildeten Vesikels als Makropinozytose bezeichnet.

Neutrophile Granulozyten sind indes als professionell phagozytäre Zellen zu verstehen. Es bildet sich nach der Umschließung des Partikels durch Pseudopodien das Plasmamembranvesikel (Plasmamembranvesikel, PMV,

siehe Abbildung 1.1, Schritt 1). Dieser fusioniert schnell mit dem 'Frühen Endosom' (FE, siehe Abbildung 1.1, Schritt 2). Das FE kann als 'Sortierstation' verstanden werden, wo sehr schnell das Schicksal der aufgenommenen Inhalte und Membranbestandteile bestimmt wird. Internalisierte Rezeptoren oder auch Clathrin werden wieder zur Zellmembran rezykliert, wohingegen die zur Phagozytose bestimmten Strukturen in Transportvesikeln (TV, siehe Abbildung 1.1, Schritt 3) dem 'Späten Endosom' (SE, siehe Abbildung 1.1, Schritt 4) zugeführt werden. Dieser Transport wird über Mikrotubuli vermittelt. Im SE befinden sich bereits Hydrolasen aus dem Golgi-Apparat, die die degradativen Prozesse einleiten, die schließlich im Lysosom vollendet werden (Abbildung 1.1, Schritt 5). (Peschka-Süss & Schubert, 2001).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Schicksals phagozytierter Partikel.**

Modifiziert nach Peschka-Süss & Schubert, 2001.

### **1.1.5 Der respiratorische Burst**

Nach Aktivierung des neutrophilen Granulozyten (z.B. durch phagozytische Liganden wie  $F_c$ -Untereinheiten von Immunglobulinen und Komplementfaktoren, Chemotaxine, Cytokine oder bakterielle Bestandteile und Produkte) kommt es in einer Verkettung chemischer Reaktionen zu einer massenhaften Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen, wobei Superoxidanion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und hypochloriger Säure (HOCl) die größte Bedeutung zukommt. Dieses Ereignis wird als respiratorischer Burst ('respiratory burst') bezeichnet und hat entscheidende Bedeutung für die mikrobizide Fähigkeit aber auch das gewebeschädigende Potenzial des Neutrophilen. In den Prozess des respiratorischen Bursts sind eine Reihe von Enzymen involviert. Wichtig sind in diesem Zusammenhang die NADPH-Oxidase sowie die Superoxiddismutase (SOD) und die Myeloperoxidase (MPO) (Coffey, 1992). Auf diese wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen.

### **1.2 Die NADPH-Oxidase**

Die NADPH-Oxidase [E.C 1.6.88.6] besteht aus vier Unterheiten, zwei membranständigen Proteinen von 22 bzw 91 kDa Größe ( $gp91^{phox}$  und  $p22^{phox}$ ,  $phox = \text{'phagocyte oxidase'}$ ) und zwei cytosolischen Bausteinen ( $p47^{phox}$  und  $p67^{phox}$ ). Im inaktiven Zustand liegt der cytosolische Komplex des Enzyms getrennt vom membranständigen vor. Im Cytosol lagern sich die Proteine  $p47^{phox}$  und  $p67^{phox}$  mit einem weiteren cytosolischen Protein, dem  $p40^{phox}$  zusammen. Der membranständige Komplex besteht aus den Enzymuntereinheiten  $gp91^{phox}$  und  $p22^{phox}$ , sowie einem für den transmembranösen Elektronentransport wichtigen Flavocytochrom. Die Gesamtheit der membranständigen Komponenten wird auch als Cytochrom  $b_{558}$  bezeichnet. Erst nach Aktivierung durch physiologische Stimuli, beispielsweise Phagozytose von Fremdkörpern oder chemotaktisch wirkende Substanzen (N-formyl-Peptide, Leukotrien  $B_4$ , Komplementfaktor C5a, und Interleukin 8), aber

auch durch Stimulation *in vitro*, beispielsweise durch opsonisiertes Zymosan oder Phorbolester wie Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), werden die einzelnen Komponenten in die aktive Form der NADPH-Oxidase überführt (Abbildung 1.2). Dabei kommt es zunächst zu einer Phosphorylierung der cytosolischen Einheit, die dann auf nicht vollständig geklärte Weise zur membranständigen Einheit translokalisiert und dort über die p47<sup>phox</sup>-Untereinheit an hydrophile Teile des Flavocytochroms binden kann. Weiterhin ist für die Funktion des Enzyms die Bindung des kleinen G-Proteins *rac* notwendig, das im inaktiven Zustand an den Inhibitionsfaktor rhoGDI gebunden ist. Dieser verhindert den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintri-phosphat (GTP) und ist somit entscheidend an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt.

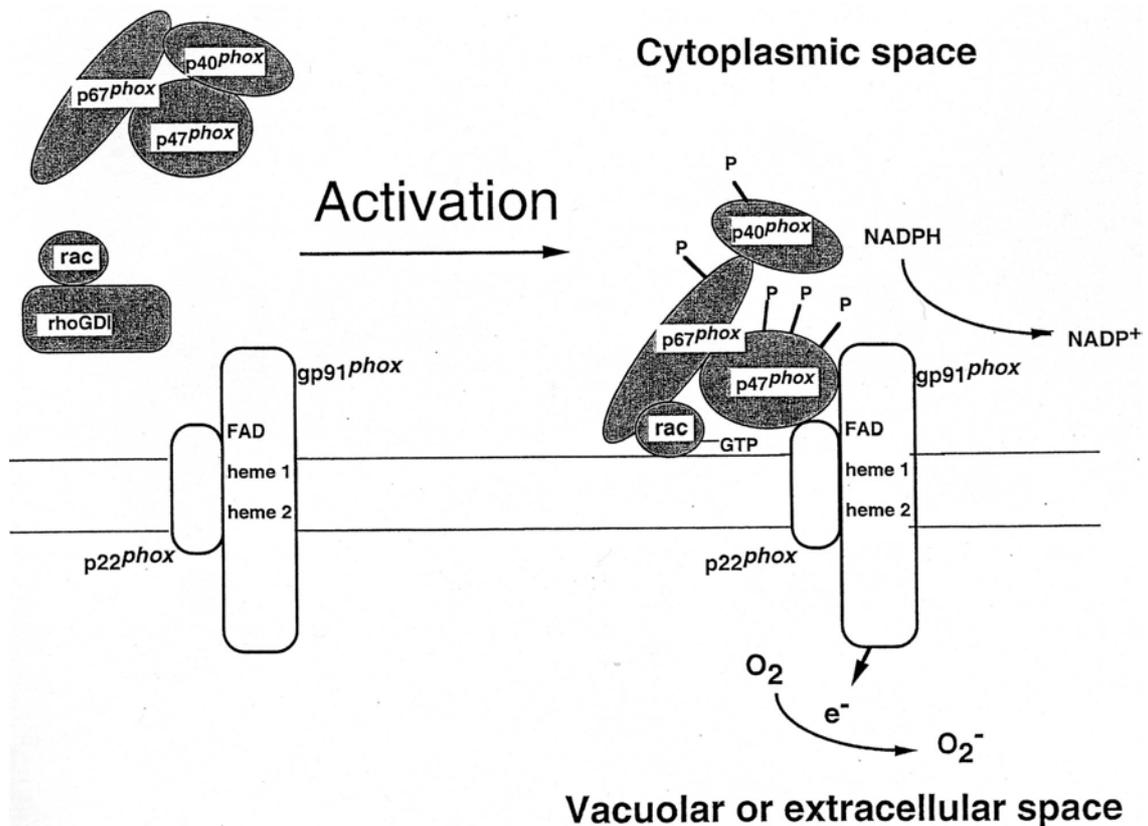


Abbildung 1.2: Assembly der NADPH-Oxidase aus cytoplasmatischen und membranständigen Komponenten nach deren Aktivierung.

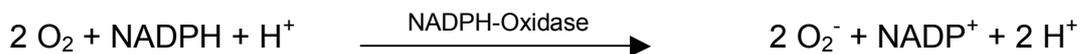
Aus Segal et al., 2000.

Die Aktivierung des Enzyms erfolgt, wie oben erwähnt, meist über Phosphorylierung an verschiedenen Stellen des cytosolischen Komplexes. Dieser geht ein über Phospholipase C und den 'second messenger' Inositol-1,2,5-triphosphat getriggert intrazelluläre Calcium-Freisetzung voraus. Diese kann neben der Aktivierung von Proteinkinase C auch direkt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen.

Das Enzym katalysiert in gesunden neutrophilen Granulozyten die Bildung von Superoxidanion aus Sauerstoff, wobei NADPH aus dem Hexosemonophosphatweg als Elektronendonator dient (Reaktion I). Das

Elektron wird dabei entlang eines Reduktionspotentialgradienten über FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) und zwei unterschiedliche Häm-Gruppen transmembranös von cytosolischem NADPH entweder an ein Sauerstoffmolekül im Extrazellulärraum oder im Phagosom weitergeleitet (Abbildung 1.2). Das in der Reaktion I gebildete Superoxidanion wird durch Superoxiddismutase (SOD) oder spontan rasch in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführt (Reaktion II). Dort kann das  $\text{H}_2\text{O}_2$  in mehrere verschiedene Stoffwechselwege einmünden (vgl. Abb. 1.4). Von entscheidender Bedeutung für die mikrobizide Funktion des Granulozyten ist allerdings die Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in hypochlorige Säure (HOCl) in der Myeloperoxidase- (MPO-) Reaktion (Reaktion III).

Reaktion I:

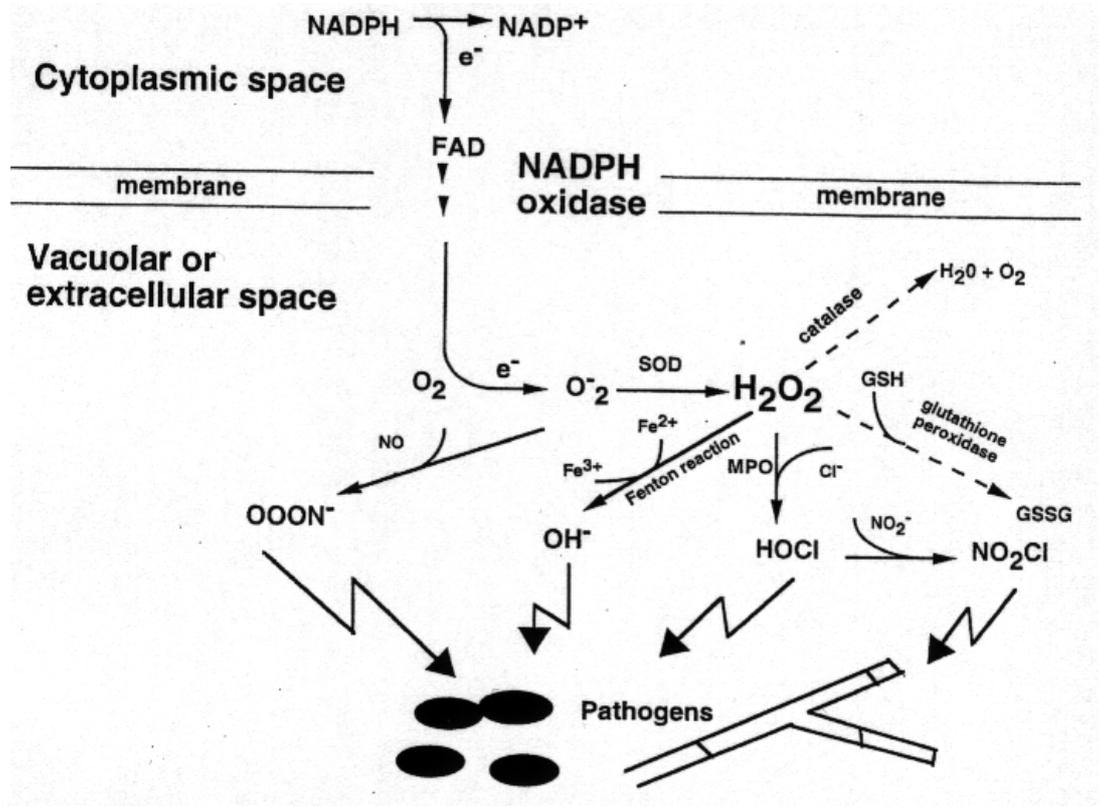


Reaktion II:



Reaktion III:





**Abbildung 1.4: NADPH-Oxidase-Reaktion und mögliche Schicksale des dabei gebildeten Superoxidationsions.**

Über ein FAD-(Flavin-Adenin-Dinucleotid-) Molekül wird transmembranös ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül übertragen. Das entstandene Superoxidation wird durch Superoxiddismutase (SOD) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführt. Das  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann durch Catalase oder Glutathion-Peroxidase abgebaut werden, oder aber in der Fenton- oder der Myeloperoxidase- (MPO) Reaktion in Hydroxylradikal bzw. hypochlorige Säure umgewandelt werden.  $\text{OOON}^-$  = Peroxynitritanion. Aus Segal et al., 2000.

### 1.3 Die septische Granulomatose

Bei der septischen Granulomatose handelt es sich um eine seltene (Inzidenz ca. 1 : 200 000) angeborene Immunschwäche, die auf einem genetischen Defekt der NADPH-Oxidase beruht und mit rezidivierenden lebensbedrohlichen mykotischen und bakteriellen Infekten einher geht (Segal et al., 2000).

Es sind genetische Defekte in jeder dieser Untereinheiten beschrieben, wobei jede für sich alleine ausreicht, um das Krankheitsbild der septischen Granulomatose auszulösen. Die Mehrzahl der Mutationen (70%) liegen dabei im Gen für das gp91<sup>phox</sup>, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist (*Winkelstein et al., 2000*). Mutationen in Genen der anderen Untereinheiten folgen autosomal-rezessivem Erbgang. Unter diesen Mutationen stellen die im Gen von p47<sup>phox</sup> mit 56 % den größten Anteil.

### 1.3.1 **Klinische Symptomatik**

CGD-Patienten erkranken gehäuft an schweren rezidivierenden bakteriellen und mykotischen Infekten. In erster Linie sind die Atemwege betroffen, aber auch Lymphadenitiden und Hautmanifestationen sind nicht selten (*Winkelstein et al., 2000*). Eine schwere, nicht seltene Komplikation stellen abszedierende Krankheitsverläufe dar. Am häufigsten handelt es sich dabei um subkutane Abszesse, gefolgt von Abszessen der Lunge und der Leber, aber auch Perirektal- und Hirnabszesse können vorkommen.

Unter den bakteriellen Krankheitserregern spielen Catalase-positive Keime die bei weitem größte Rolle für CGD-Patienten (*Segal et al., 2000*). Im Vordergrund stehen dabei *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* und *Pseudomonas cepacia*. Infektionen mit Streptokokken und anderen Catalase-negativen Keimen haben hingegen für CGD-Patienten geringere Bedeutung. Begründet wird dies mit der endogenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch Bakterien. Dadurch steht bei Phagozytose Catalase-negativer Keime durch CGD-Granulozyten ausreichend Substrat für die Myeloperoxidase-Reaktion zu Verfügung. Catalase-positive Keime sind hingegen in der Lage endogenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abzubauen (Reaktion IV).

Reaktion IV:



Es muss allerdings gesagt werden, dass dieses Paradigma nicht generell anwendbar ist, da CGD-Patienten beispielsweise kaum erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa*, einem Catalase-positiven Erreger, zeigen. Unter den Pilzen nimmt die Gattung *Aspergillus* die wichtigste Stellung als spezifisches Pathogen für CGD-Patienten ein.

Neben den rezidivierenden Infektionen leidet ein Teil der Patienten aus nicht geklärter Ursache an chronischen granulomatösen Entzündungsreaktionen (Name!). Vermutet wird ein Zusammenhang mit nicht ausgeheilten Infektionen. Je nach Lokalisation der granulomatösen Manifestation kommt es zu unterschiedlichen organspezifischen Symptomen. Granulome werden oft in viszeralen und urogenitalen Hohlorganen gefunden und können dort das Lumen obstruieren. Auch in Lunge und Leber finden sich Granulome nicht selten. Dort kann die Organfunktion durch die Granulome mitunter stark beeinträchtigt sein.

### **1.3.2 Diagnostik und Therapie**

Der Verdacht auf Vorliegen einer septischen Granulomatose ergibt sich meist auf dem Boden häufig rezidivierender bzw. ungewöhnlich schwer verlaufender bakterieller oder mykotischer Infektionen.

Die diagnostischen Methoden bei Verdacht auf Vorliegen einer CGD beinhalten Tests, die auf dem Nachweis von  $H_2O_2$  bzw. HOCl beruhen. Ein einfacher Test ist die NBT-Methode, bei der Nitroblau Tetrazolium von gesunden Granulozyten intrazellulär zu einem blauen Formazan reduziert wird und präzipitiert. CGD-Granulozyten sind dazu nicht in der Lage. Methodisch unterschiedlich ist der Nachweis von HOCl mittels Luminol-abhängiger Chemilumineszenz, bei der Granulozyten z.B. durch Zugabe opsonisierten Zymosans aktiviert werden und deren HOCl-Bildung als Luminol-abhängiges Chemilumineszenzsignal registriert werden kann. Weiterhin möglich ist die Diagnosestellung anhand eines durchflusszytometrischen Tests, des 1,2,3-Dihydroxyrhodamin- (DHR-) Assays, bei dem DHR durch  $H_2O_2$  und dessen Folgeprodukte (z.B. HOCl) nach Umsetzung durch Peroxidasen in 1,2,3-Rhodamin überführt wird (*Henderson & Chappell, 1993*).

Genetische Analysen ermöglichen die Subspezifizierung als Defekt einer der 4 Untereinheiten der NADPH-Oxidase (*Segal et al., 2000*).

Im Vordergrund therapeutischer Bemühungen stehen derzeit die konsequente intravenöse antibiotische bzw. antimykotische Therapie nach vorheriger Bestimmung der Resistenzlage des Erregers mittels mikrobiologischer Tests sowie dauerhafte prophylaktische Antibiotikatherapie im Intervall (z.B. mit einem Trimethoprim-Sulfomethoxazol-Kombinationspräparat, Co-Trimoxazol). Abszesse erfordern in den meisten Fällen eine zusätzliche chirurgische Sanierung des Herdes. Zusätzlich zur antibiotischen Therapie wird in einigen Fällen subkutan appliziertes Interferon  $\gamma$  eingesetzt. Die Bedeutung des Interferons für den Therapieerfolg sind jedoch genauso wie seine Wirkungsweise nicht vollständig geklärt und Gegenstand der derzeitigen Diskussion. Ähnliches gilt für allogene Granulozytentransfusionen. Ein klinischer Nutzen konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Der zur Zeit einzige kurative Ansatz zur CGD-Therapie ist mit der allogenen Stammzelltransplantation gegeben. Die allogene Stammzelltransplantation wurde von verschiedenen Autoren als erfolgreich beschrieben (z.B. *Calvino et al., 1996*; *Di Bartolomeo et al., 1989*). Die Therapie wurde dabei stets bei Patienten mit vorangehenden schweren Infektionen mit Stammzellen eines HLA-identen Spenders durchgeführt. In einem Fall war die Transplantation sogar unter einer floriden, therapierefraktären Infektion mit *Aspergillus nidulans* erfolgreich (*Ozsahin et al., 1998*). Ebenfalls erfolgreich beschrieben wurde die Stammzelltransplantation ohne vorangehende myeloablative Präkonditionierung des Empfängers bei HLA-identem Donor, wenn sich eine Infusion von Donorlymphozyten anschloss (*Nagler et al., 1999*).

Gentherapeutische Ansätze zur Korrektur von Defekten sowohl der p47<sup>phox</sup>- (*Mardiney et al., 1997*) als auch der gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit (*Dinauer et al., 1999*) der NADPH-Oxidase sind beschrieben, konnten jedoch bis zum heutigen Tag Anforderungen an klinische Anwendungen nicht erfüllen.

Granulomatöse Komplikationen der CGD werden durch eine immunmodulierende medikamentöse Therapie angegangen. Hier kommen in

erster Linie Glukokortikosteroide zum Einsatz, die in vielen Fällen zur Besserung der Symptomatik führen.

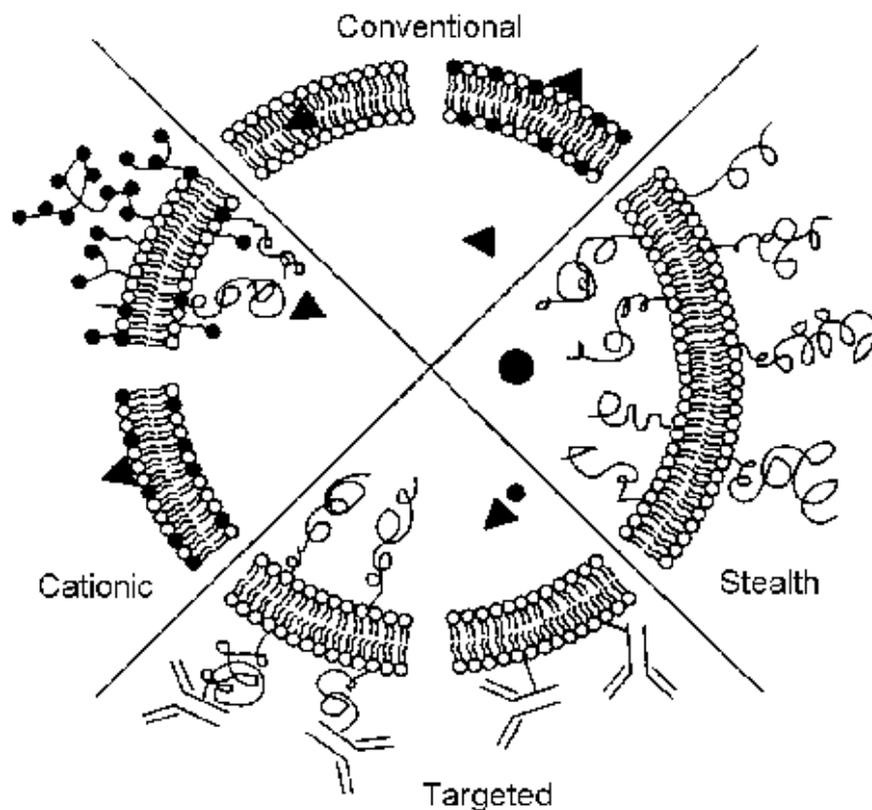
#### **1.4 Anwendung von Liposomen**

Als Liposomen werden Mikrovesikel mit lipoidaler Membran bezeichnet. In den letzten 20 Jahren haben Liposomen zunehmende Aufmerksamkeit als potentielle Transportsysteme für in der klinischen Routine eingesetzte Medikamente erlangt (*Storm & Crommelin, 1998*). Vorteile für die klinische Anwendung können liposomal verpackte Präparate in mehrerlei Hinsicht bieten. Einerseits möglich ist eine gezieltere Einschleusung des Wirkstoffes in gewünschte Zellen bzw. Gewebe oder Organe, aber ebenso das Fernhalten des Wirkstoffes von Körperarealen, die besonders durch den Wirkstoff geschädigt werden. Außerdem vermögen Liposomen, Wirkstoffe in ihrem Inneren vor äußeren wirkungshemmenden Einflüssen zu schützen. Nicht zuletzt ermöglichen sie einen Übertritt von Wirkstoffen in Zellen, die unverkapselt nicht ins Zellinnere penetrieren könnten.

Konventionelle Liposomen sind aus einer oder mehreren Lamellen von Phospholipid-Bilayer-Membranen aufgebaut, die wässrige Kompartimente umrahmen. Es ist seit längerem bekannt, dass konventionelle Liposomen eine relativ kurze Zeit im Blut zirkulieren und recht rasch von phagozytären Zellen (Makrophagen, Granulozyten) eliminiert werden (*Gregoriadis, 1991*). Diese Zellen sind daher Hauptziele konventioneller Liposomen. Um das Anwendungsspektrum der Liposomen zu erweitern, sind verschiedene Modifikationen entwickelt worden (siehe Abbildung 1.3). Eine große Bedeutung kommt dabei so genannten lang-zirkulierenden Liposomen zu. Diese werden meist durch kovalente Bindung von Polyethylenglykol- (PEG-) Ketten an die Membran konventioneller Liposomen hergestellt. Solche Liposomen sind dann in der Lage, über einen längeren Zeitraum im Blut zu zirkulieren.

Eine weitere Modifikation stellen die Immunoliposomen (‘antibody targeted liposomes’) dar. Bei diesen sind Antikörper (meist aus der IgG oder IgM-Klasse, aber auch einzelne F<sub>ab</sub>-Fragmente) an der Oberfläche der liposomalen

Membran verankert bzw. über PEG-Reste an ihr befestigt. Dadurch können Anwendungen spezifisch bestimmten Geweben zugeführt werden, die über Rezeptoren für den entsprechenden Antikörper verfügen ('drug targeting'). Neueste Entwicklungen beinhalten Liposomen mit membranständigen positiven Ladungen (Kationische Liposomen). Diese finden vor allem als Vektoren von DNA-Plasmiden Anwendung, da sie in der Lage sind, die negativen DNA-Anteile zu neutralisieren und so die DNA zu kondensieren.

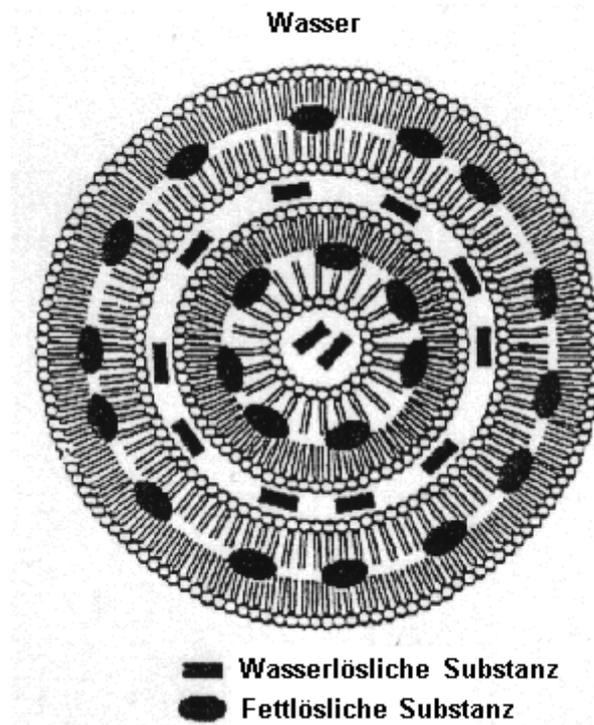


**Abb. 1.3: Die wichtigsten Liposomen-Typen im schematischen Überblick.**

Dargestellt ist im oberen Quadranten ein Ausschnitt aus einem konventionellen Liposom. Sterisch stabilisierte Liposomen ('stealth liposomes') tragen Polymerketten (Polyethylenglykol-(PEG-) Reste). Immunoliposomen sind antikörpermarkiert ('targeted'). Die Antikörper können dabei direkt in der liposomalen Membran verankert oder aber über PEG-Reste gekoppelt sein. Schließlich sind auch Möglichkeiten gegeben, Liposomen mit positiven Ladungen zu versehen ('cationic liposomes'). Aus Storm *et al.*, 1998.

Derzeit sind nur wenige liposomale Aufarbeitungen von Medikamenten für die klinische Anwendung zugelassen, wobei dem systemischen Antimykotikum Amphotericin B ('Ambisome®', NeXstar) und den Anthrazyklinen Dauno- ('DaunoXome®', NeXstar) und Doxorubicin ('Doxil®', Sequus), derzeit die größte klinische Bedeutung zukommt. Während liposomales Amphotericin B bei der gleichen Indikationsstellung wie konventionelles zur Anwendung kommt, sind DaunoXome® und Doxil® zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich zur Therapie des Kaposi-Sarkoms, einer AIDS- ('Acquired Immuno Deficiency Sndrome'-) definierenden malignen Erkrankung, zugelassen. Eine Vielzahl anderer Anwendungen befinden sich jedoch in verschiedenen Stadien klinischer Forschung oder sind bereits in ausgewählten Ländern zugelassen (Lasic, 1998). Bei den genannten Medikamenten liegt der Vorteil in der Möglichkeit der Dosiserhöhung, da die Toxizität (Nephrotoxizität des Amphotericin B, Cardiotoxizität der Anthrazykline) liposomaler Aufarbeitung geringer ist als die der nicht-verkapselten. Bei all diesen liposomalen Präparationen handelt es sich um lang-zirkulierende Liposomen. Erreicht wird dies im Falle des Doxil® durch Verwendung von PEGylierten Liposomen. Bei Ambisome® und DaunoXome® handelt es sich um kleine Liposomen, so genannte SUVs ('Small Unilamellar Liposomes', < 100 nm), die der schnellen Elimination durch Makrophagen des retikulo-endothelialen Systems (RES) entgehen können.

Entscheidend für den Aufbau einer liposomalen Aufarbeitung eines Wirkstoffes ist dessen Charakter hinsichtlich Lipo- bzw. Hydrophilität (siehe Abbildung 1.4). Während lipophile Stoffe – wie das Amphotericin B - bei der Verkapselung in die liposomale Membran integriert werden, finden sich hydrophile Stoffe – wie die Anthrazykline – in den wässrigen interlamellaren Räumen.



**Abbildung 1.4: Anordnung hydro- bzw. lipophiler Substanzen innerhalb multilamellarer Liposomen.**

Wasserlösliche Substanzen (hier rechteckig dargestellt) werden in den interlamellaren Räumen und im Binnenraum des Liposoms eingelagert, während fettlösliche Substanzen (hier ellipsoid dargestellt) in die Bilayermembran der jeweiligen Lamelle integriert werden. Modifiziert nach *Hiemenez & Walsh, 1996*.

## **1.5 Die Lyophilisation von Liposomen**

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung von Medikamenten in der klinischen Routine stellt deren Lagerungsfähigkeit ('shelf life') über längeren Zeitraum dar. Dies gilt insbesondere für Medikamente, die selten appliziert werden, sei es aufgrund enger Indikationsstellung oder aufgrund niedriger Inzidenz der Krankheit geringen Patientengutes. Selbstverständlich gilt diese Anforderung auch für liposomale Formulierungen von Medikamenten. Begrenzt wird das 'shelf life' liposomaler Formulierungen einerseits durch die Instabilität

der Liposomen in wässriger Lösung, andererseits durch die Aktivität des verkapselten Wirkstoffes selbst. Besonders wichtig ist letzteres, wenn der verkapselte Wirkstoff enzymatische Aktivität hat, die in wässriger Lösung meist innerhalb kurzer Zeiträume abnimmt. Bezug nehmend auf die liposomale Instabilität unterscheidet man physikalische von chemischer Instabilität. Physikalische Instabilität bezeichnet das Austreten von Inhaltsstoffen ins Außenmedium bzw. liposomale Fusion. Unter chemischer Instabilität versteht man dagegen die Hydrolyse der Fettsäureester sowie die Oxidation ungesättigter Fettsäurereste. Außerdem wird eine mit der Zeit zunehmende Fusion mehrerer liposomaler Vesikel mit Bildung von großen Liposomen beobachtet. Entscheidend für die Geschwindigkeit dieser 'shelf life'-limitierenden Prozesse sind in erster Linie pH-Wert, verwendeter Puffer und Lagerungstemperatur (*Ausborn & Nuhn, 1990*). Es wurde versucht, die Stabilität durch Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenstärke des Puffers, sowie der Lagerungstemperatur zu optimieren. Außerdem gab es Ansätze, in denen oxidative Effekte durch Zugabe antioxidativ wirksamer Substanzen wie  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) abgefangen wurden. Die Stabilität der Liposomen konnte durch Einfügen von Cholesterolemolekülen als Stabilisatoren in die Bilayerstruktur auch deutlich verbessern werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass das 'shelf life' damit nicht grundlegend verändert werden konnte, und man schnell an natürliche Grenzen stieß (*Rubas & Schreier, 1991*).

Interessanterweise kamen neue Impulse zur Lösung der Lagerungsproblematik aus der zoologischen Forschung. Crowe und Mitarbeiter konnten nämlich zeigen, dass bestimmte Wurmarten in einen Trockenzustand übergehen können, und so lange Zeit ohne Wasser überleben können (Anhydrobiosis). Dieser Übergang korrelierte mit einer starken Produktion des Disaccharids Trehalose (*Rubas & Schreier, 1991*).

Diese Erkenntnisse waren Ausgangspunkt weitergehender Untersuchungen zur Entwicklung eines neuen Konzeptes für die Stabilisierung liposomaler Vesikel, der Gefriertrocknung ('Lyophilisation'). Die Lyophilisation bezeichnet ein weitverbreitetes Konservierungserfahren, bei dem Probenmaterial im gefrorenen Zustand durch Anlegen eines Vakuums Wasser vollständig

entzogen wird (*Bendas, 1994*). Die Lyophilisation von Liposomen ist insbesondere auch für die Verlängerung des shelf life liposomal verkapselter Enzyme interessant, da damit gleichzeitig das Problem des Aktivitätsverlustes in wässriger Lösung behoben werden könnte.

### **1.5.1 Prinzip der Lyophilisation von Liposomen**

Man hatte angenommen, dass die Hydratisierung der Phospholipide essentielle Bedingung zur Aufrechterhaltung aller liposomaler Strukturen sei. Begründet wird dies dadurch, dass das Hydratationswasser den Abstand zwischen zwei Lamellen von multilamellaren Liposomen, aber auch zwischen zwei verschiedenen Liposomen erhöht und so deren Fusion verhindert. Außerdem wird die Membranfluidität durch den erhöhten Platzbedarf der hydratisierten Form der Lipide erhöht. In der Tat werden Liposomensuspensionen bei Entzug von Wasser 'fusogen' (*Ausborn & Nuhn, 1990*). Zurückgreifend auf die Ergebnisse von *Crowe et al.* (siehe 1.5), wurde versucht mittels verschiedener so genannter Kryoprotektoren ('Cryoprotective Agents', CPA,) diese Effekte zu unterbinden und somit die Zerstörung der liposomalen Struktur mit der Folge des Austritts verkapselten Inhaltes zu verhindern oder zumindest zu minimieren. Verbreitete CPA sind Mono- oder Disaccharide, sowie Aminosäuren wie Prolin, aber auch Polyole wie Glycerol und Mannitol (*Ausborn & Nuhn, 1990*). Auszugsweise sind einige der gängigsten Kryoprotektoren in Abbildung 1.6 dargestellt. Die Wirkungsweise der CPA geht dabei auf verschiedene Mechanismen zurück, die unter anderem von deren Hydrophililität abhängen (*Anchordoguy et al. 1987*). Entscheidend ist dabei einerseits eine Platzhalterfunktion für das im Rahmen der Lyophilisation entzogene Wasser, um eine Fusion der Liposomen zu unterbinden. Dies wird durch Vergrößerung des Platzbedarfs des einzelnen Phospholipidmoleküls erreicht (vgl. 1.5). Andererseits gilt es, die Bildung intraliposomaler Kristalle zu verhindern. *Anchordoguy et al.* zufolge bewirken Zucker aufgrund ihres hydrophilen Charakters, indem sie kovalent an polare Kopfgruppen der Phospholipide binden, eine 'Pseudohydratisierung' der Liposomen. Hydrophobe CPA wie die

Aminosäure Prolin führen hingegen über hydrophobe Wechselwirkungen zur Bildung eines anti-fusogenen Mantels um die Liposomen, die allerdings von geringerer Effektivität sei, als die durch Zuckermoleküle erreichbare Kryoprotektivität. Glycerol kann liposomale Membranen permeieren und verhindert intrazellulär die Bildung von Eiskristallen (*Ausborn & Nuhn, 1990*).

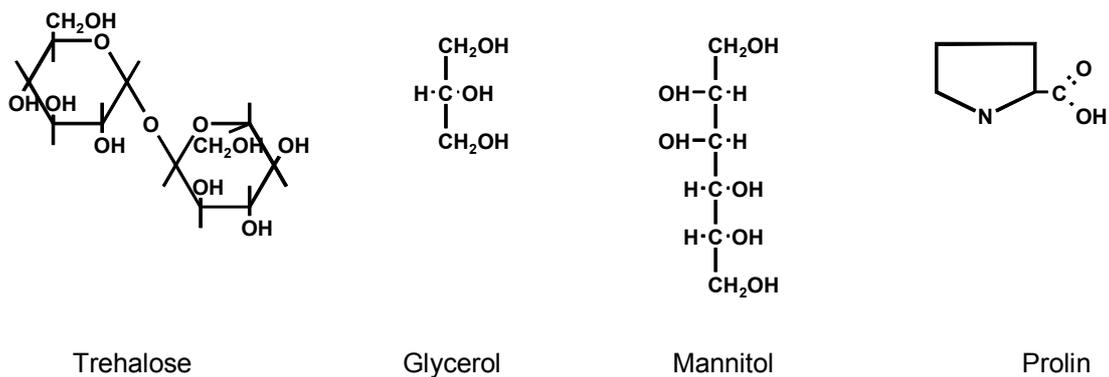
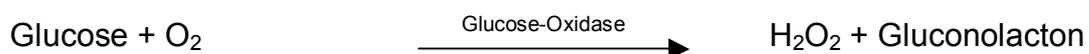


Abbildung 1.6: Einige wichtige Kryoprotektoren.

## 1.6 Das Konzept der Glucose-Oxidase-Liposomen

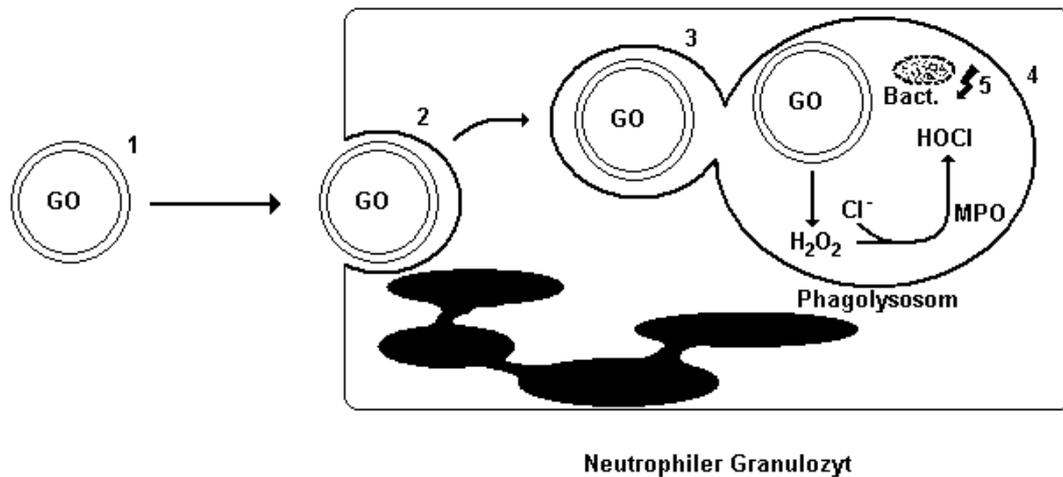
Bereits 1979 beschrieb *Ismail et al.* einen damals neuartigen therapeutischen Ansatz zur Korrektur der NADPH-Oxidase-Defizienz, das sich die Erkenntnis zunutze machte, dass die MPO-Aktivität in CGD-Zellen normal ist (*Pegram et al., 1978*). Er verkapselte das Enzym Glucose-Oxidase [GO, E.C. 1.1.3.4], das die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus Glucose und Sauerstoff katalysiert (Reaktion I) in IgG-gelabelten Liposomen.

Reaktion I:



Seine Studien beruhten auf älteren Untersuchungen, die zeigten, dass Latex-Partikel, auf denen Glucose-Oxidase aufgebracht worden waren, nach deren Phagozytose in der Lage waren, die bakterizide Wirkung von CGD-Granulozyten auf *Staphylococcus aureus in vitro* zu verbessern (*Johnston et al., 1970*). Das Enzym Glucose-Oxidase war zwar vielversprechend, Latex-Partikel waren hingegen für eine Anwendung *in vivo* aus verschiedenen Gründen (immunologische Reaktion, Embolie) ausgeschlossen. Eine Möglichkeit der Weiterführung des GO-Konzepts boten die Ergebnisse von *Weissman et al. (1975)*. Er hatte in Experimenten mit Phagozyten von Katzenhaien einen neuen Ansatz zur Therapie lysosomaler Enzymdefizienzen aufgezeigt. Darin konnte er nach Inkubation von Katzenhaiphagozyten, die natürlicherweise Peroxidase-defizient sind, mit liposomal verkapselter Meerrettich-Peroxidase, diese histochemisch intrazellulär nachweisen. *Ismail et al.* stellte eine liposomale Formulierung der GO her und konnte damit die Rekonstitution der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch CGD-Phagozyten nach Aufnahme der Liposomen zeigen. Weiterhin beschrieb er eine Verbesserung des Killings von *Staphylococcus aureus in vitro*. Das Konzept geriet allerdings aufgrund der damals unzureichenden Kenntnisse auf dem Gebiet der Liposomentechnologie in Vergessenheit. 1995 wurden sterisch stabilisierte GO-Liposomen (GOL) von *Samoszuk et al.* zur Therapie von Mäusen, die an Plasmocytomen erkrankt waren, verwendet.

Erst 1999 wurde die Idee von *Ismail et al.* wieder aufgenommen (*Gerber, 1999*), wobei neue Kenntnisse auf dem Gebiet der pharmazeutischen Liposomenherstellung genutzt werden konnten und genauere Charakterisierungen der Wirkmechanismen der GOL möglich wurden. Eine schematische Darstellung des Prinzips zeigt Abbildung 1.5.



**Abb.1.5: Schematische Darstellung des Wirkprinzips der Glucose-Oxidase-Liposomen.**

Liposomal verkapselte Glucose-Oxidase (1) wird vom neutrophilen Granulozyten aktiv phagozytiert (2). Phagozytierte Glucose-Oxidase-Liposomen (GOL) werden intrazellulär in Endosomen transportiert und verschmelzen mit einem Phagolysosom, in dem sich bereits endozytierte Bakterien (Bact.) befinden (3). Im Phagolysosom entsteht aus Glucose und Sauerstoff  $H_2O_2$ , welches von Myeloperoxidase (MPO) in hypochlorige Säure (HOCl) überführt wird. Dieses hat eine starke mikrobizide Wirkung und bewirkt schließlich die Abtötung des zuvor phagozytierten Keims (5).

## 1.7 Charakterisierung der Glucose-Oxidase

Bei der Glucose-Oxidase [E.C. 1.1.3.4] handelt es sich um ein saures Flavoprotein, das die Oxidation von  $\beta$ -D-Glucose durch molekularen Sauerstoff zu  $\delta$ -Gluconolacton katalysiert. Das  $\delta$ -Gluconolacton hydrolysiert spontan zu  $H_2O_2$  und Gluconsäure. Glucose-Oxidase (GO) kann aus bestimmten Pilzspezies wie *Aspergillus niger* isoliert werden. Die aus *Aspergillus niger* isolierte GO, die auch im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fand, besteht aus zwei ungleichen Untereinheiten ('Heterodimer'), die nicht-kovalent mit zwei FAD-Molekülen verbunden sind. Diese wirken als Kofaktoren und begründen somit die Redox-Eigenschaften des Enzyms (Ahmad et al., 2001).

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei Thematiken betrachtet. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Frage, ob lyophilisierte Glucose-Oxidase-Liposomen (GOL) mit konventionell hergestellten vergleichbare *in vitro* Wirkungen auf CGD-Granulozyten haben. Gezielt wurde dabei auf die zelluläre Aufnahme der Liposomen, die Rekonstitution des respiratorischen bursts und mikrobizide Eigenschaften eingegangen. Weiterhin wurden potentiell unerwünschte Effekte der Liposomen wie Beeinträchtigung der chemotaktischen Fähigkeiten des Granulozyten und Bildung von Lipidperoxidationsprodukten betrachtet. Die Beurteilung der Möglichkeiten, die Haltbarkeit der GOL zu verbessern, ist im Hinblick auf eine Umsetzung des Konzeptes *in vivo* von großer Bedeutung. Der zweite Teil der Arbeit widmet sich Untersuchungen zur Stabilität der Glucose-Oxidase. Untersucht wurde dabei das Verhalten der Glucose-Oxidase in potentiell aktivitätsmindernden Milieus, die jenen nachempfunden waren, denen das Enzym nach Aufnahme durch Granulozyten unterworfen ist. Insbesondere wurde dabei der Effekt von in der MPO-Reaktion gebildetem HOCl, unterschiedlichen pH-Werten und granulozytären Bestandteilen auf die Enzymaktivität betrachtet.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

| Substanz                              | Bezugsquelle     |
|---------------------------------------|------------------|
| 2-Mercaptoethanol                     | Serva            |
| 5,5'-dithiobis (2-Nitrobenzoesäure)   | Sigma            |
| Agarose                               | Merck            |
| Ammoniumchlorid                       | Sigma            |
| Catalase                              | Sigma            |
| Cytochalasin B                        | Sigma            |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)               | Merck            |
| Eisen(II-)Sulfat                      | Serva            |
| FACS-Lysing-Solution                  | Becton-Dickinson |
| Formaldehyd                           | Sigma            |
| Gelatine                              | Merck            |
| Glucose                               | Serva            |
| Glucose-Oxidase                       | Sigma            |
| Glucose-Oxidase-Antikörper (mouse Ig) | Biermann         |
| Glutaraldehyd [25 %(v/v)]             | Sigma            |
| Glycerol                              | Merck            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | Sigma            |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)  | Biochrom         |
| HBSS 10 x                             | Biochrom         |
| Heparin                               | Elkins-Sinn-Inc. |
| HEPES-Puffer                          | Biochrom         |
| Histopaque 1077                       | Sigma            |
| Histopaque 1119                       | Sigma            |

| Substanz                                       | Bezugsquelle                                      |
|--|---|
| Kaliumisocyanat                                | Sigma   |
| Komplexon III                                  | Apotheke Universitäts-<br>klinikum Tübingen       |
| Leukotrien B <sub>4</sub>                      | Sigma   |
| L-Glutamin                                     | Sigma   |
| Lucigenin                                      | Sigma   |
| Luminol  | Sigma   |
| Mannitol                                       | Sigma   |
| May-Grünwald-Giemsa-Färbelösung                | Hämatologisches Labor,<br>Kinderklinik Tübingen   |
| Müller-Hinton-Boullion                         | Mikrobiologisches Labor,<br>Kinderklinik Tübingen |
| Myeloperoxidase                                | Sigma   |
| Natronlauge                                    | Merck   |
| N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (NfMLP) | Sigma   |
| PBS + Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>       | Biochrom  |
| PBS spezial                                    | Gibco   |
| Phorbol-12-Myristat-13-Acetat                  | Sigma   |
| Salzsäure                                      | Merck   |
| Staphylococcus aureus ATCC 25925               | Mikrobiologisches Labor,<br>Kinderklinik Tübingen |
| Staphylococcus aureus opsonizing reagent       | Molecular Probes                                  |
| Staphylococcus aureus-BODIPY                   | Molecular Probes                                  |
| Taurin   | Sigma   |
| Trichloressigsäure                             | Merck   |
| Trypcase-Soja-Agar                             | Bio Merieux                                       |
| Zymosan  | Sigma   |

## 2.1.2 **Verwendete Lösungen**

### I. Isolation der Granulozyten

#### Lyse-Lösung

0,829 % Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )  
0,1 % Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )  
0,0037 % Komplexon III  
ad 500 ml *aqua dest.*

### II. HOCl-Messung

#### Taurin-Lösung [37.5 mMol]

2,35 g Taurin wurden in 500 ml HBSS gelöst.

#### TNB-Stammlösung

39.63 mg 5,5'-dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) wurden in 100 ml PBS Dulbecco's mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gelöst und mit 4  $\mu\text{l}$  2-Mercaptoethanol versetzt. Die Lösung wurde mit  $\text{N}_2$  überschichtet und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

#### L-Methionin-Lösung [10 mM]

14,92 mg L-Methionin wurden in 10 ml HBSS gelöst.

### III. Luminolabhängige Chemilumineszenz

#### Luminollösung

17,5 mg 5-Amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dion (Luminol) wurden in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zu je 1000  $\mu$ l aliquotiert und bei  $-20^{\circ}$  C eingefroren. Vor Gebrauch wurde ein Aliquot der Stammlösung 1:50 (v/v) mit PBS Dulbecco's mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  verdünnt.

### IV. Agarose-Assay (Chemotaxis)

#### Agarose-Lösung

1,6 g Sea Plaque Agarose wurden in 50 ml aqua dest. aufgekocht und dann bei ca.  $50^{\circ}$ C warmgehalten. 10 ml HBSS 10 x wurden mit 2.5 ml 1 M HEPES-Puffer und 30 ml aqua dest. versetzt. Das Kulturmedium wurde dann mit 1 M Natronlauge am pH-Meter auf pH = 7.5 eingestellt und mit aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Nun wurde 1 g Gelatine zugegeben und bei  $60^{\circ}$ C gelöst. Das Kulturmedium wurde zum flüssigen Agarosegel gegeben und gemischt. Nicht benötigte Agaroselösung wurde bei  $-20^{\circ}$ C eingefroren.

#### Glutaraldehyd-Lösung [2,5 %]

20 ml Glutaraldehyd-Lösung [25 %] wurden unter der Abzugshaube 1:10 (v/v) mit HBSS verdünnt.

## V. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assay

Eisen(II-)Sulfat-Lösung (FeSO<sub>4</sub>) [10 mM]

26.8 mg FeSO<sub>4</sub> wurden in 10 ml Salzsäure [1 mM] gelöst. Die Lösung ist lichtgeschützt bei Zimmertemperatur ungefähr eine Woche haltbar.

Kaliumthiocyanat [2.5 M]

2,43 g KSCN wurden in 10 ml PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gelöst.

## VI. Stimulantien

N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (NfMLP)

5 mg NfMLP wurden in 1,14 ml DMSO gelöst, in Proben zu je 10 µl aliquotiert [10<sup>-2</sup> M] und bei -70°C eingefroren. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Aliquote 1:10 000 (v/v) mit HBSS verdünnt.

Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)

98 µg LTB<sub>4</sub> wurden in 259,8 µl Ethanol aufgenommen, mit N<sub>2</sub> überschichtet und als 5 µl Aliquote [10<sup>-4</sup> M] bei -20° C eingefroren.

Opsonisiertes Zymosan

250 mg Zymosan wurden steril in 25 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung gelöst und über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit Ultraschall drei Mal 30 Sekunden homogenisiert und anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad mit 25 ml Humanserum inkubiert. Die Suspension

wurde dann für 10 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert und das Pellet in 3,5 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert. Nun wurde nochmals 3 x 30 Sekunden mit Ultraschall homogenisiert. Schließlich wurden Aliquote zu je 100  $\mu\text{l}$  hergestellt [ $\sim 3.6 \times 10^7$  Partikel/ml].

### 2.1.3 Geräte

| Gerät   | Bezugsquelle                     |
|---|----------------------------------|
| Advia 120                                     | Bayer-Technicon                  |
| Brutschrank Hera Cell                         | Heraeus                          |
| ELISA-Reader Milenia Kinetic Analyzer         | DPC                              |
| FACScalibur                                   | Becton-Dickinson                 |
| FINN-AQUA Lyovac GT2                          | FINN-AQUA                        |
| Fluoreszenzmikroskop                          | Leica DM IRB E, Leica Microscopy |
| Kühlschränke                                  | Liebherr                         |
| Luminometer TR 717                            | Tropix                           |
| Magnetrührer MR 2002                          | Heidolph                         |
| Mikroliterpipetten                            | Eppendorf                        |
| Mikroskop                                     | Zeiss                            |
| pH-Meter pH 535 Multical® Plus                | WTW                              |
| Spektral-Photometer Ultrospc Plus 4054        | LKB Biochrom                     |
| Sterilbank                                    | Haeraus                          |
| Ultraschallgerät Sonifier B 12 Cell Disruptor | Gerhard Heinemann                |
| Vortex  | IKA Labortechnik                 |
| Waage MC1                                     | Sartorius                        |
| Wasserbad                                     | Memmert                          |
| Wippe Duomax 1030                             | Heidolph                         |
| Zentrifugen                                   | Eppendorf                        |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellzahlbestimmung und -differenzierung mit dem Advia 120

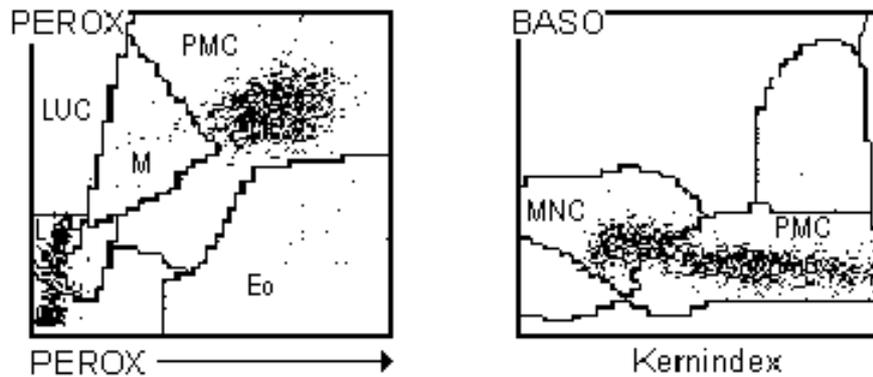
#### I. Zytochemischer Nachweis der intrazellulären Peroxidase-Aktivität (PEROX-Kanal)

Das Prinzip der Bestimmung der Peroxidase-Aktivität von Zellen durch den Advia 120 beruht auf der Oxidation von 4-Chlor-1-Naphthol durch intrazellulär vorhandene Peroxidase in Anwesenheit von  $H_2O_2$ . Dabei entsteht in der Zelle ein Farbstoff, dessen Intensität proportional mit Peroxidase-Aktivität zunimmt und vom Gerät photometrisch bestimmt werden kann. Die Reaktion läuft dabei in einer Acryl-Kammer ab, in der zunächst die Erythrozyten lysiert werden und in die anschließend  $H_2O_2$  und 4-Chlor-1-Naphthol injiziert werden. Die gefärbte Zellsuspension durchfließt dann eine Kapillare, in der sukzessive Streulichtverhalten und Farbintensität der Zelle bestimmt werden. Die Peroxidase-Aktivität der Zellen wird dann grafisch gegen das Streuverhalten der Zellen in einem so genannten 'Leukogramm' dargestellt. Dabei wird auf der Abszisse die Peroxidase-Aktivität einer Zelle, auf der Koordinate ihr Streulichtverhalten der Zellen eingetragen, wodurch jeder Zelle ein Punkt im Leukogramm zugeordnet wird (siehe Abb. 2.1).

#### II. Zytometrische Messung des Streulichtverhaltens leukozytärer Zellkerne (BASO-Kanal)

Um die Zellkerne der Zellen beurteilen zu können, wird ein Teil der Probe in eine zweite Reaktionskammer geleitet, in der die Zellen zunächst einem „cytoplasmatic stripping“, d.h. einer Auflösung der Zellmembran, unterzogen werden. Dies führt dazu, dass alle Zellen mit Ausnahme der basophilen Granulozyten als isolierter Kern ohne Zytoplasma vorliegen. Die Kerne werden

dann im Streulicht analysiert und grafisch drei Feldern (Segmentkern, Rundkern, Basophiler Kern mit Zytoplasma) zugeordnet (siehe Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1: PEROX- und BASO-Kanal-Schaubilder einer Blutbild-Analyse eines gesunden Probanden am Advia 120.**

Im PEROX-Kanal werden die Zellen anhand ihres Streuverhaltens (y-Achse) und ihres Myeloperoxidasegehaltes (x-Achse) den entsprechenden Feldern zugeordnet [LUC = 'large unstained cells' (z.B. blastäre Zellen); L = Lymphozyten; M = Monozyten; PMC = Polymorphkernige Granulozyten; Eo = Eosinophile Granulozyten]. Im BASO-Kanal kann zwischen rundkernigen (mononukleären Zellen, MNC) und polymorphkernigen Zellen (PMC) unterschieden werden.

## **2.2.2 Isolation von Granulozyten und mononukleären Zellen aus heparinisiertem Vollblut**

Unter der Sterilbank wurden 15 ml Histopaque 1119 in ein 50 ml Röhrchen gegeben und vorsichtig mit 15 ml Histopaque 1077 überschichtet. Schließlich wurden 20 ml periphervenös entnommenen Blutes, das zuvor durch Zugabe von 1 ml Heparin [100 I.U./ml] ungerinnbar gemacht wurde, darüber gegeben. Das Röhrchen wurde bei 630 x g für 25 Minuten bei 18°C zentrifugiert. Nach Absaugen der Plasmaphase konnte die Schicht der mononukleären Zellen abgenommen werden. Bei Versuchen, bei denen die mononukleären Zellen

keine Verwendung fanden, wurden diese verworfen. Nun wurde die Schicht der granulozytären Zellen vorsichtig abgetragen, ohne dabei den Erythrozytenkuchen aufzuwirbeln.

Die entnommenen Zellen wurden in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit PBS spezial gewaschen (460 x g für 15 Minuten bei 15°C). Das gewaschene Pellet wurde in 5 ml PBS spezial resuspendiert und mit Erythrozytenlysepuffer auf 50 ml aufgefüllt (Elimination kontaminierender Erythrozyten). Das Röhrchen wurde mit Aluminiumfolie lichtdicht umwickelt und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Nach Ablauf der Lyse wurde für 10 Minuten bei 4°C und 340 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS spezial resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung und Differenzierung erfolgte am Advia 120.

Anschließend wurde ein weiteres Mal mit 340 x g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet je nach durchgeführtem Experiment mit PBS spezial, PBS + Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> mit oder ohne Glucose, oder mit HBSS auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Auf den Lyseschritt wurde bei ausgewählten Versuchen verzichtet, wenn die Kontamination von Erythrozyten keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis hatte. Wurde so verfahren, so wird bei der Beschreibung der entsprechenden Methoden explizit darauf hingewiesen.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung des prinzipiellen Ablaufs der Isolierung von Granulozyten und mononukleären Zellen mittels Zweischicht-Dichtegradientenzentrifugation.

### 2.2.3 Herstellung Glucose-Oxidase-haltiger und Rhodamin-B-PE-gelabelter Liposomen

Alle Liposomen wurden freundlicherweise von Frau Andrea Kimpfler, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Technologie (Leitender Direktor: Prof. Dr. Rolf Schubert), Universität Freiburg, hergestellt und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Das Lipidgemisch bestand aus (Ei-) Phosphatidylglycerol (EPG), (Ei-) Phosphatidylcholin (EPC), sowie Cholesterin (Chol) im Verhältnis 30:40:30 mol% und wurde in Dichlormethan oder Methanol gelöst. Die Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Phospholipide ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Für die FACS-Analyse wurde Rhodamin B-PE [1 mol%] als lipophiler Fluoreszenzfarbstoff zugefügt. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum vollständig entfernt, wobei der Lipidfilm in isotonischem Phosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen wurde.

Für die Verkapselung der Glucose-Oxidase wurde dem Phosphatpuffer GO [f.c. 6 mg/ml] zugegeben. Die Dispersion wurde fünf Frier-Tau-Zyklen unterzogen, woran sich eine 21-fache Extrusion durch eine Polycarbonat-Membran

[Porengröße 0,2 µm] anschloss. Nicht verkapselte GO wurde über eine Sepharose 4B-CL-Gelchromatographie-Säule von liposomaler GO getrennt. Schließlich wurden die Liposomen durch Ultrazentrifugation mit 150 000 x g für 180 Minuten konzentriert [f.c. 20 mM].

**Tabelle 2.1: Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Phospholipide.**

| Fettsäure                     | Prozentualer Anteil [%] |
|-------------------------------|-------------------------|
| Palmitinsäure                 | 33                      |
| Palmitoleinsäure              | 1                       |
| Stearinsäure                  | 14                      |
| Ölsäure und Isomere           | 27                      |
| Linolsäure                    | 17                      |
| Arachidonsäure                | 4                       |
| Höher ungesättigte Fettsäuren | 3                       |

#### **2.2.4 Lyophilisation von Liposomen**

Die lyophilisierten Liposomen wurden entsprechend den nicht-lyophilisierten hergestellt. Für die Lyophilisation wurden als Kryoprotektoren eine Kombination von Mannitol und Glycerol verwendet. Das Mannitol wurde direkt dem Puffer, mit dem der Lipidfilm redispergiert wurde, in einer Konzentration von 145 mM zugesetzt (*Bendas, 1994*).

Das Glycerol wurde den Liposomen erst nach der Herstellung direkt vor der Gefriertrocknung in einer Konzentration von 270 mM zugesetzt.

Die Lyophilisation erfolgte mit einem FINN-AQUA Lyovac GT2 über Nacht in Form einer Kolbentrocknung. Dazu wurden kleine Mengen (500 µl – 1,0 ml) der Liposomendispersion in kleine Vials pipettiert, in denen bereits die entsprechende Menge Glycerol vorgelegt war. Die Vials wurden direkt in

Flüssigstickstoff eingefroren und dann unter Stickstoffatmosphäre zum Gefriertrockner transferiert, wo sie in 100 ml Rundkolben an das Gerät angehängt wurden.

Nach Ende der Trocknung wurden die Kolben mitsamt den Vials vom Gerät abgezogen und die Vials mittels Bördelverschlüssen verschlossen. Zum Redispersieren wurde die entsprechende Menge *aqua dest.* auf die Lyophilisate gegeben.

### **2.2.5 Vorinkubation der Granulozyten mit Liposomen**

Zunächst wurden die Zellen in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  auf die bei der jeweiligen Methode verwendeten Zelldichte eingestellt. Nun wurden folgende Inkubationsansätze hergestellt:

| Lipidkonzentration  | Lipidkonzentration  |
|---|---|
| 1 mM  | 5 mM  |
| 500 $\mu\text{l}$ Zellsuspension                          | 500 $\mu\text{l}$ Zellsuspension                          |
| 450 $\mu\text{l}$ PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ | 250 $\mu\text{l}$ PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ |
| 50 $\mu\text{l}$ Liposomen [20 mM]                        | 250 $\mu\text{l}$ Liposomen [20 mM]                       |

Die Ansätze wurden für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend zwei mal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen (340 x g; 5 Minuten). Um vergleichbare Bedingungen zu erreichen, wurden die nicht-vorinkubierten Ansätze parallel mitgeführt.

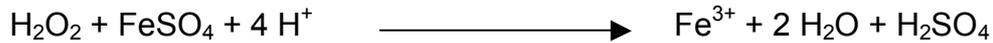
### **2.2.6 $\text{H}_2\text{O}_2$ -Assay**

#### *I. Prinzip*

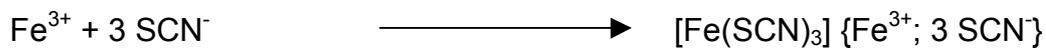
Bei der quantitativen Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach Thurman (*Thurman et al., 1974*) handelt es sich um einen photometrischen Nachweis, der auf der

Oxidation zweiwertigen Eisens beruht (Reaktion I). Das oxidierte Eisenkation bildet mit einer Diisocyanatverbindung einen rotbraunen Eisenrhodanitkomplex (Reaktion II), der bei  $\lambda = 490 \text{ nm}$  photometrisch detektiert werden kann.

Reaktion I:



Reaktion II:



## II. Durchführung

Es wurden drei Proben zu je 250  $\mu\text{l}$  pipettiert:

- I. Blank:  
225  $\mu\text{l}$  PBS +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$   
25  $\mu\text{l}$  GOL [10 mM]
- II. Frisch hergestellte Liposomen:  
225  $\mu\text{l}$  HBSS  
25  $\mu\text{l}$  GOL<sub>frisch hergestellt</sub> [10 mM]
- III. Lyophilisierte Liposomen:  
225  $\mu\text{l}$  HBSS  
25  $\mu\text{l}$  GOL<sub>lyophilisiert</sub> [10 mM]

Zur Beurteilung der Aktivität der Liposomen wurde eine Standardreihe mit Glucose-Oxidase-Reinenzym in 1:2-Verdünnungsschritten in Aktivitäten von 1 U/ml bis 0 U/ml angefertigt (ebenfalls 250  $\mu\text{l}$ -Ansätze). Als Blank diente hier ein Ansatz mit 225  $\mu\text{l}$  PBS +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  und 25  $\mu\text{l}$  GO [10 U/ml].

Alle Proben und die GO-Standards wurden für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurden dann umgehend durch Zugabe von 50 µl Trichloressigsäure [50 %(v/v)] gestoppt. Die Proben und die Standards wurden bei 15000 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden je 200 µl aus jedem Cup entnommen und mit je 50 µl FeSO<sub>4</sub> [10 mM] und 25 µl KSCN [2,5 M] versetzt. Aus jedem Ansatz wurden nach kurzem Vortexen der Cupinhalte zwei Mal 125 µl entnommen und in eine 96-well-Platte ('flat bottom') pipettiert.

### *III. Inhibitionsversuche mit Glucose-Oxidase-Antikörpern*

Mittels des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays wurde weiterhin untersucht, ob Glucose-Oxidase-Antikörper (Maus-Immunglobulin) dazu in der Lage sind, die Aktivität freier Glucose-Oxidase herabzusetzen. Hierzu wurden zur Glucose-Oxidase [0,1 U/ml] Antikörper in absteigender Konzentration [25 mg Protein/ml, 2,5 mg Protein/ml, 0,25 mg Protein/ml, 0,025 mg/ml, 0,0025 mg/ml] zugegeben. Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurden Parallelansätze, denen Albumin in gleichen Konzentrationen anstelle des Antikörpers zugegeben wurden, angefertigt.

### *IV. Auswertung*

Die Farbintensität in den wells wurde mit Hilfe eines ELISA- (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-)Readers bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 490$  nm photometrisch gemessen. Die GO-Aktivität der Proben wurden anhand der Standardkurve berechnet.

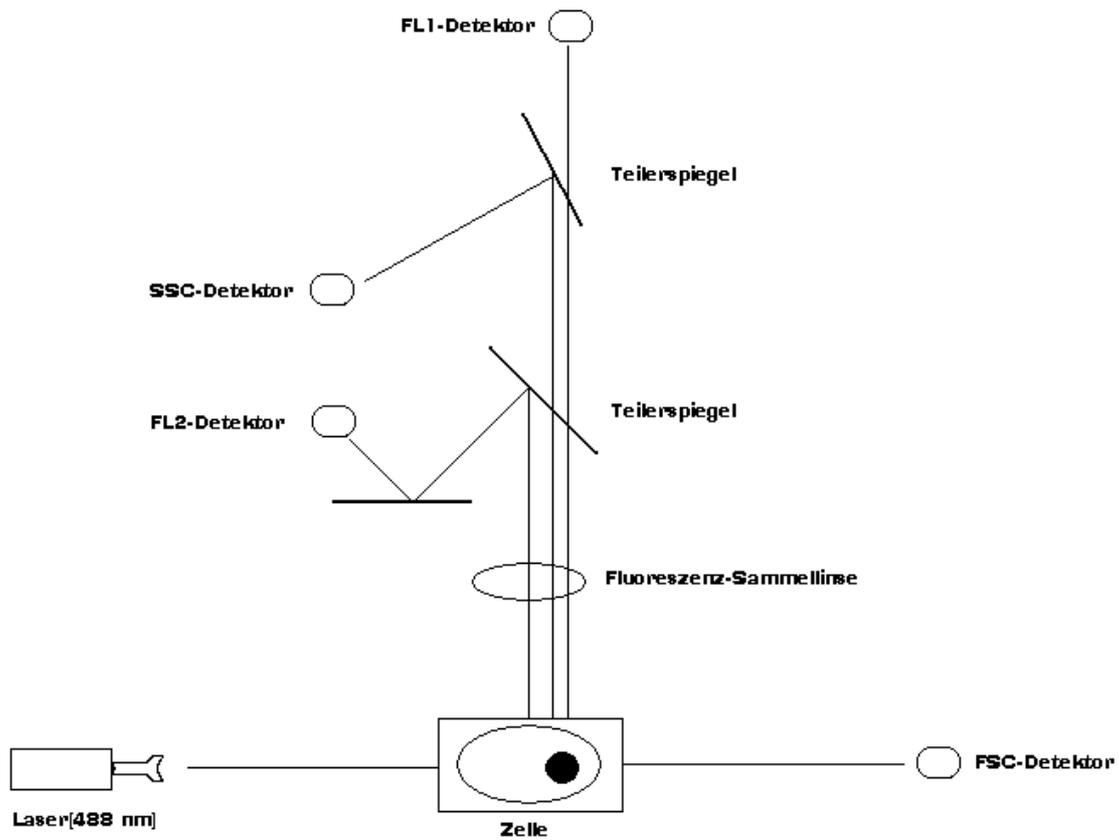
## **2.2.7 Durchflusszytometrische Bestimmung des Aufnahmeverhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Leukozyten**

### *I. Prinzip*

Eine FACS- (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter-) Analyse beruht auf dem Prinzip der Einzelzell-Durchflusszytometrie. Dabei werden die Zellen einerseits anhand ihres Streulichtverhaltens, andererseits anhand ihrer Fluoreszenz beurteilt. Die Messung des Streulichtverhaltens beinhaltet zum einen die zellgrößen- bzw. oberflächenabhängige Detektion des größtenteils ungebrochenen Lichts. Diese Fraktion wird als 'Forward-scattered-light' (FSC) bezeichnet. Zum anderen wird das beim Durchtritt durch die Zelle um ungefähr 90° gebrochene Licht vom sogenannten 'Side-scattered-light'-(SSC-) Detektor wahrgenommen. Die SSC-Komponente ist abhängig von der Granularität der Zelle.

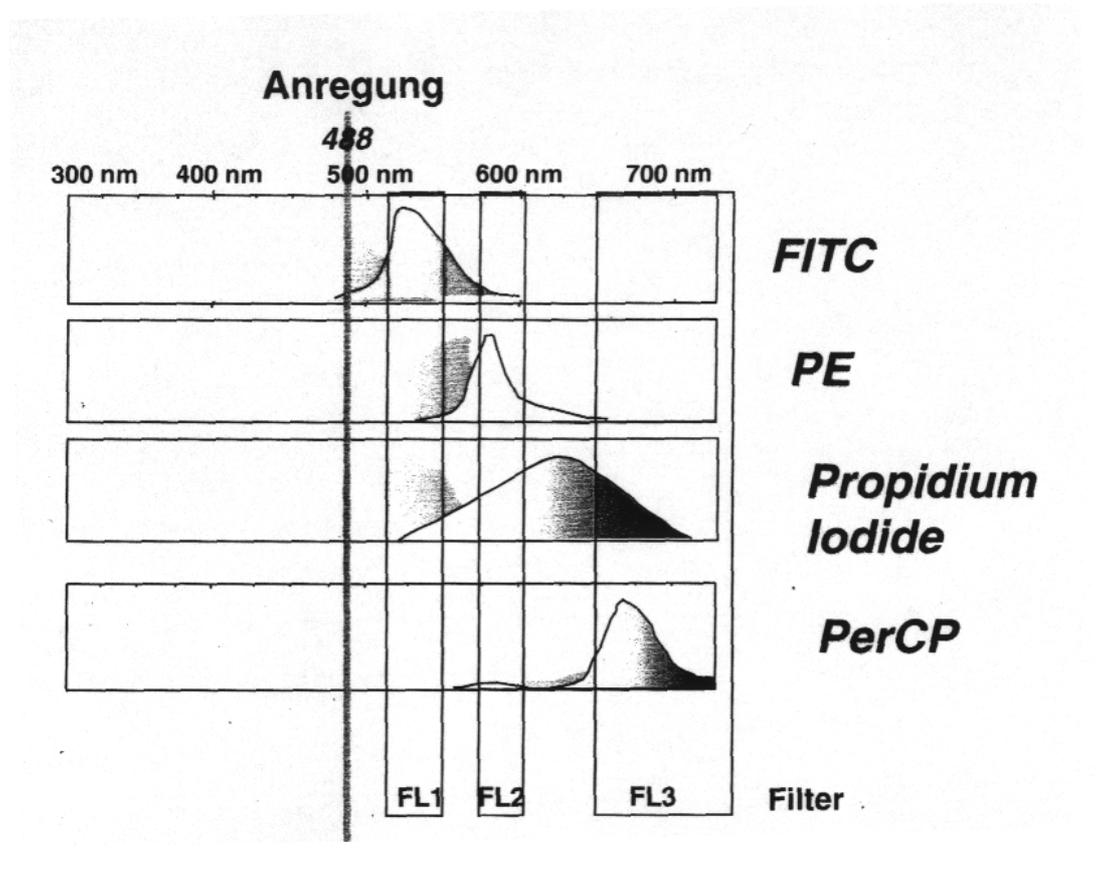
Im Rahmen dieses Versuches wurde für die Messung ein FACSCalibur von Becton-Dickinson verwendet, dessen Strahlengang in Abbildung 2.3 vereinfacht skizziert wurde. Der FACSCalibur besitzt neben FSC- und SSC-Detektoren auch verschiedene Detektoren für Fluoreszenzmessungen (FL1-4). Die Detektion von zellulärerer Fluoreszenz beruht auf der Anregung von Fluorochromen durch einen Laser, die dann beim Übergang in ihren Ausgangszustand Photonen bestimmter Wellenlängenbereiche, die den entsprechenden Fluorochromen zugeordnet werden können, aussenden. Einen Überblick über die Fluoreszenzspektren der am häufigsten verwendeten Fluorochrome gibt Abbildung 2.4.

Im Rahmen dieses Versuches wurden Liposomen verwendet, die mit Rhodamin-PE gelabelt waren (siehe 2.2.3) und den Zellen zur Phagozytose angeboten wurden.



**Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Strahlengangs des FACSCalibur von Becton-Dickinson (vereinfacht).**

Beispielhaft ist hier der Strahlengang für FL1 und FL2 dargestellt.



**Abbildung 2.4:** Fluoreszenzspektren der für die FACS-Analyse wichtigsten Fluorochrome.

Dargestellt sind die Erregungsspektren sowie die Detektionsbereiche der verschiedenen Filter des FACSCalibur® (FL1-3). FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; PE = Phycoerythrin; PerCP = Peridinin Chlorophyll Protein. Aus Immunozytometrische Systeme, Becton-Dickinson.

## II. Durchführung

Zunächst wurden Granulozyten und mononukleäre Zellen isoliert und in HBSS auf  $10 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 100  $\mu$ l der Zellsuspensionen wurden anschließend mit frisch hergestellten bzw. lyophilisierten Rhodamin-PE-gelabelten (1 mol%)-Liposomen [f.c. 1 mM] für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Leerliposomen [f.c. 1 mM] verwendet. Die Ansätze wurden anschließend mit FACS-Lysing-Solution [1:10 (v/v) in *aqua dest.*]

behandelt, wodurch Erythrozyten lysiert und die Zellen fixiert wurden. Danach wurden die Ansätze dreimal in PBS spezial gewaschen (Zentrifugation mit 340 x g für 5 Minuten bei 4°C). Gemessen wurde am FACSCalibur von Becton-Dickinson. Die Auswertung erfolgte mit CellQuest.

### **2.2.8 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Aufnahmeverhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Granulozyten**

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden von Frau Dr. Claudia Gerber, Kinderklinik Tübingen, Abt. Hämatologische Forschung, unter Anleitung von Herrn Prof. Bächli, Zentrum für Elektronenmikroskopie, Universität Zürich, in Zürich durchgeführt. Die Zellen wurden sowohl in Sequenzschnitten von oben bis unten (Schnittdicke 1,5 µm) als auch durch einen Zentralscan analysiert. Die Zellgrenzen wurden mittels Digitalem Interferenzkontrast dargestellt.

#### *I. Prinzip*

Die konfokale Lasermikroskopie ist ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren, das es erlaubt virtuelle Zellschnitte fluoreszenzmarkierter Zellen darzustellen. Dadurch können durch Anfertigen eines Laser-Sequenzscans ('gallery') Aussagen darüber getroffen werden, ob fluoreszenzmarkierte Partikel innerhalb oder außerhalb der Zelle liegen. Weiterhin erlaubt das Verfahren eine sehr genaue Distinktion zwischen fluoreszierenden Partikeln unterschiedlicher Spektren, wodurch Mehrfachfärbungen möglich werden.

Mittels Digitalem Interferenzkontrast (Digital Interference Contrast, DIC) lassen sich Zellgrenzen und zu einem gewissen Grad auch -innenstrukturen räumlich darstellen. Dies wird durch Zuordnung von Zellarealen zu bestimmten Graustufen möglich, was ein eigentlich planes Bild räumlich darstellbar macht.

## II. Durchführung

Zunächst wurde BODIPY-fluoreszenzmarkierter *Staphylococcus aureus* [ $5 \times 10^6$  Zellen/ml] im Dunkeln mit Opsonierungsreagenz für 60 Minuten bei  $37^\circ \text{C}$  im Wasserbad opsonisiert und anschließend für weitere 15 Minuten mit Granulozyten [ $10^6$  Zellen/ml] in 500  $\mu\text{l}$  HBSS inkubiert (Zell-Bakterien-Verhältnis 1:10). Schließlich wurde der Ansatz nochmals für 20 Minuten mit GOL [f.c. 1 mM] inkubiert. Die Zellen wurden nun abzentrifugiert [300 x g; 5 Minuten] und mit Paraformaldehyd [2 % (v/v)] fixiert. Vor dem Auftragen der Suspension auf Lysin-beschichtete Objektträger wurde Trypanblau [f.c. 0,04 % (v/v)] zugegeben, um extrazelluläre Fluoreszenzsignale abzuschwächen.

### **2.2.9 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von Liposomen in Granulozyten**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden wie die konfokalen Lasermikroskopiebilder am Zentrum für Elektronenmikroskopie der Universität Zürich unter Anleitung von Herrn Prof. Bächli durch Frau Dr. Claudia Gerber, Kinderklinik Tübingen, Abt. Hämatologische Forschung, durchgeführt.

Hierfür wurden  $15 \times 10^6$  Granulozyten in 1 ml PBS für 60 Minuten bei  $37^\circ \text{C}$  im Wasserbad mit *Staphylococcus aureus* [ $15 \times 10^7$  Zellen/ml (Zell-Bakterien-Verhältnis 1:10)] und Ferritin-haltigen Liposomen [f.c. 3 mM] inkubiert. Fixiert wurden die Zellen mit Glutaraldehyd [f.c. 2,5 % (v/v)]. Die Zellen wurden dann nach elektronenmikroskopischen Standards aufgearbeitet und untersucht.

## 2.2.10 Bestimmung der HOCl-Bildung durch Granulozyten unter Einfluss von GOL

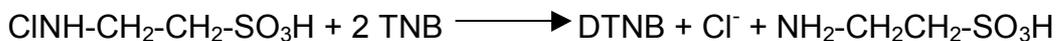
### I. Prinzip

Zellulär gebildetes Hypochlorid wurde mittels der Taurin-Chloramin-Methode nachgewiesen. Das Hypochlorid reagiert dabei mit Taurin zu Taurin-Chloramin (Reaktion I). Das Taurin-Chloramin ist in der Lage, Sulfhydrylgruppen der 5-thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB, gelb) zu oxidieren, wobei 5,5'-dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) (DTNB, farblos) entsteht (Reaktion II).

Reaktion I:



Reaktion II:



### II. Durchführung

Kontroll- und Probandengranulozyten wurden jeweils unstimuliert, unter Stimulation mit Zymosan [f.c.  $\sim 3,6 \times 10^6$  Partikel/ml] und in Anwesenheit frisch hergestellter bzw. lyophilisierter Liposomen angesetzt. Dabei wurde weiterhin zwischen direkter Zugabe der Liposomen zum Ansatz und Vorinkubation der Zellen mit GOL unterschieden. Zusätzlich wurde für jede Probe eine Negativkontrolle, der L-Methionin [f.c. 1 mM] als HOCl-„Scavenger“ (-Fänger) zugesetzt wurde, angesetzt.

Die Ansätze enthielten jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen. Die Taurinendkonzentration betrug 12.5 mM. Die Lipidkonzentration betrug bei direkter Zugabe der Liposomen und Vorinkubation der Zellen je 1mM. Bei Vorinkubation der Zellen mit lyophilisierten Liposomen wurde zusätzlich eine Lipidendkonzentration von

5 mM verwendet. Jeder Ansatz wurde mit HBSS auf ein Endvolumen von 1000  $\mu\text{l}$  gebracht und dann für genau 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Catalase [50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] gestoppt. Die Proben wurden danach zunächst bei 1500 x g für 5 Minuten bei 4°C, die Überstände dann nochmals bei 15000 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Jeweils 450  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden in 2 Halbmikroküvetten gegeben und 1:1 (v/v) mit TNB-Lösung [1:6 (v/v) mit HBSS vorverdünnt] gemischt. Die Ansätze wurden dann sofort bei  $\lambda=412$  nm am Spektralphotometer gemessen.

### III. *Berechnung der HOCl-Konzentration*

Die Berechnung erfolgte anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$E = c \times d \times \varepsilon$$

Dabei wurde der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon = 14\,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet (*Kettle & Winterbourn, 1994*).

$$C [\text{mmol}/\text{ml}] = (E_a - E_e) \times V / 28\,200$$

$E_a$  = Extinktion der Ausgangslösung

$E_e$  = Extinktion der Endlösung

V = Vorverdünnungsfaktor

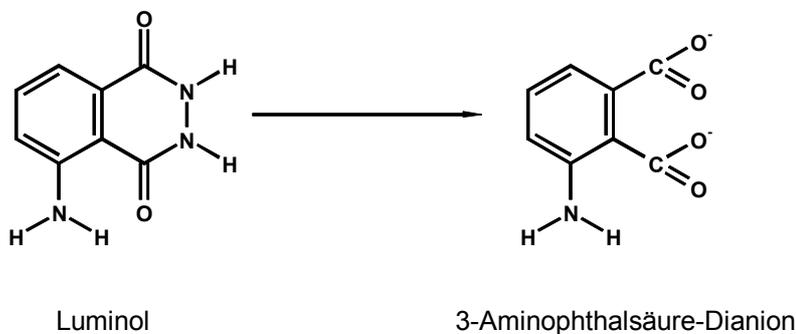
## 2.2.11 *Luminol-verstärkte Chemilumineszenz*

### I. *Prinzip*

Bereits seit 1972 ist bekannt, dass im Rahmen des 'respiratorischen bursts' von Granulozyten Energie in Form von Lichtquanten frei wird (*Bruchelt & Schmidt, 1984*). Dieses Phänomen wird als Chemilumineszenz bezeichnet. Dabei werden zelleigene Moleküle durch reaktive Sauerstoffverbindungen

(Superoxidanion,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hydroxylradikale, Singlet-Sauerstoff oder Hypochlorige Säure) in Dioxetanderivate überführt. Gehen diese Moleküle wieder in den Grundzustand über, so kommt es zu einer Lichtemission. Verstärkersubstanzen wie das Luminol ermöglichen die sehr empfindliche Detektion und Quantifizierung der Chemilumineszenz, indem sie die Lichtemission ungefähr tausendfach verstärken. Das Luminol wird dabei hauptsächlich durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{HOCl}$  in das Licht-emittierende 3-Aminophthalsäure-Dianion überführt (Reaktion I), wohingegen Superoxidanion und Singlet-Sauerstoff eine geringere Rolle spielen (Müller-Peddinghaus, 1984; Vilim & Wilhelm, 1988).

Reaktion I:



## II. Durchführung

Eine 96-well-Platte wurde nach folgendem Pipettierschema gefüllt:  
Jedes well enthielt 100  $\mu\text{l}$  einer Granulozytensuspension [ $10^6$  Zellen/ml, Proband bzw. Kontrolle]. Für einen Teil der Ansätze wurden mit GOL vorinkubierte Granulozyten ('vorink.') verwendet. Bei den restlichen Ansätzen wurden GOL direkt zugegeben ('dir.').

| Ansatz   | Puffer (HBSS) | spezifischer Zusatz                        |
|--|---------------|--|
| Unstimuliert                                   | 75 µl         | -  |
| + Zymosan                                      | 55 µl         | 20 µl Zymosan [ $3.6 \times 10^7$ P./ml]   |
| + GOL <sub>konventionell</sub> [1 mM], dir.    | 55 µl         | 20 µl GOL <sub>konventionell</sub> [10 mM] |
| + GOL <sub>lyophilisiert</sub> [1 mM], dir.    | 55 µl         | 20 µl GOL <sub>lyophilisiert</sub> [10 mM] |
| + GOL <sub>konventionell</sub> [1 mM], vorink. | 75 µl         | -  |
| + GOL <sub>lyophilisiert</sub> [1 mM], vorink. | 75 µl         | -  |
| + GOL <sub>lyophilisiert</sub> [5 mM], vorink. | 75 µl         | -  |

In jedes well wurde über den P-Injektor des TR 717 vor dem ersten Messzyklus 25 µl Luminol automatisch hinzugefügt. Die Zugabe des Zymosans bzw. der direkt zugeführten Liposomen erfolgte erst unmittelbar vor Beginn der Messung. Gemessen wurde mit dem TR 717 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C.

Je nach Verfügbarkeit von Zellmaterial wurden Dreifach- bzw Doppelansätze angefertigt.

### III. Inhibitionsversuche mit GO-Antikörpern

Um zu überprüfen, ob frei vorliegende Glucose-Oxidase durch Glucose-Oxidase-Antikörper (Maus-Immunglobulin) in ihrer Aktivität gehemmt werden kann, wurde zusätzlich zu den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Messungen (siehe 2.2.5.III) die luminol-abhängige Chemilumineszenz von Glucose-Oxidase [0,05 U/ml] in Anwesenheit von Myeloperoxidase [0,05 U/ml] und GO-Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen [25 mg Protein/ml, 2,5 mg Protein/ml, 0,25 mg Protein/ml, 0,025 mg Protein/ml] gemessen. Um unspezifische Effekte ausschließen zu können, wurde anstelle der Antikörper in Parallelansätzen Albumin in gleichen Konzentrationen zugegeben.

#### *IV. Auswertung*

Die Auswertung erfolgte mit Tropix Winglow und Microsoft Excel. Gemessen wurde das Integral unter der Signalkurve über 30 Minuten sowie die größte erreichte Signalintensität pro Sekunde ('peak') und der Zeitpunkt des peaks.

### **2.2.12 Chemotaxis-Assay**

#### *I. Prinzip*

Beim Agarose-Assay nach Wilkinson (*Wilkinson, 1998*) werden Objektträger zunächst mit Gelatine beschichtet. Auf dieser Schicht können die Granulozyten ohne größeren Widerstand wandern. Die Objektträger werden außerdem mit einem Agarosegel übergossen, in das kleine 'pits' gestanzt werden, die ein gezieltes Auftragen von Zellen, Chemotaktika und Puffer erlauben

#### *II. Vorbereiten der Objektträger*

##### *Ila. Reinigung der Objektträger:*

Zunächst wurden die Objektträger beschriftet und dann für 3 Minuten in einem Gemisch [1:1 (v/v)] aus HCl [3 M] und Ethanol [95%] entfettet. Die Objektträger wurden kurz in *aqua dest.* geschwenkt, dann 5 Minuten in eine 0.5%ige Gelatinelösung gestellt und anschließend an der Luft getrocknet.

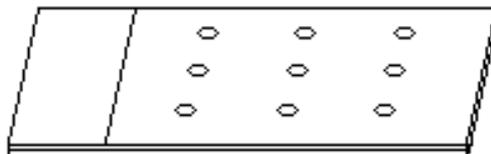
##### *Ilb. Gießen der Objektträger*

Auf jeden der Objektträger wurden vorsichtig je 4 ml der Agaroselösung geträufelt und gleichmäßig verteilt. Die Objektträger wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur ausgehärtet und dann in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C gelagert.

### III. Durchführung

Zunächst wurden anhand einer Schablone mit einer Hohlstanze [Durchmesser 0.4 mm] in jeden Objektträger neun Löcher vom Volumen 10  $\mu\text{l}$  gestanzt, ohne die Gelatineschicht zu verletzen. Es wurden dabei drei Reihen angelegt, der Abstand zwischen den Löchern betrug jeweils 3 mm (Abb. 2.5).

Die Löcher der unteren Reihe wurden bei allen Objektträgern mit HBSS gefüllt. In die Löcher der oberen Reihe wurde ein chemotaktisch wirksames Stimulans gegeben. Dies war bei der Hälfte der Objektträger NfMLP [f.c.  $10^{-6}$  M], bei der anderen Hälfte  $\text{LTB}_4$  [ $10^{-6}$  M]. Nun wurden die Objektträger für 10 Minuten stehen gelassen, um eine Diffusion der Lösungen auf der Gelatineschicht zu ermöglichen. Die Löcher der mittleren Reihe wurde anschließend mit je 9  $\mu\text{l}$  einer Granulozytensuspension [ $10^8$  Zellen/ml Suspension in HBSS] gefüllt. Für jedes Chemotaktikum wurde ein Objektträger mit unstimulierten Kontrollgranulozyten, je einer mit direkt zugegeben frisch hergestellten und lyophilisierten Liposomen [f.c. 1 mMol] sowie je ein Objektträger, bei dem die Granulozyten zunächst mit frisch hergestellten bzw. lyophilisierten Liposomen vorinkubiert worden waren, hergestellt. Die mittlerern Reihen der Objektträger wurden dann mit HBSS auf ein Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  gebracht. Parallel dazu wurden Objektträger mit Granulozyten des Probanden angefertigt.



---

**Abbildung 2.5: Anordnung der Stanzlöcher in der Agarose-Schicht.**

---

Die Objektträger wurden dann für 120 Minuten in einer feuchten Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger für

30 Minuten in einer Glutaraldehyd-Lösung [2,5 %(v/v)] fixiert, wobei die nicht gewanderten Granulozyten nach 15 Minuten mit einer 20 µl-Pipette aus den Löchern gespült wurden.

Nach vorsichtigem Ablösen des Agarosegels unter fließendem Wasser mit anschließender Lufttrocknung, wurden die Zellen schließlich nach Pappenheim gefärbt.

#### *IV. Auswertung*

Die Migrationsstrecken wurden unter 10-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Mikrometerokulars am Lichtmikroskop gemessen. Zur Berechnung der chemotaktisch induzierten Migrationskomponente wurde die Strecke der Spontanmigration in Richtung des Puffers von der Migration in Richtung des betreffenden Chemotaktikums abgezogen.

### **2.2.13 Degranulation von Granulozyten**

#### *I. Prinzip*

Granulozyten setzen bei Aktivierung den Inhalt ihrer Granula ins Außenmedium frei. Diese beinhalten neben proteolytisch wirksamen Enzymen auch Myeloperoxidase. Der Verlust von Myeloperoxidase kann mit Hilfe des Advia 120 detektiert und grafisch dargestellt werden. Die Granulozytenwolke verschiebt sich dabei von rechts (hohe intrazelluläre Myeloperoxidasekonzentration) nach links (niedrige intrazelluläre Myeloperoxidasekonzentration, vgl. Abb. 2.1). Untersucht wurden die Aktivierung isolierter Granulozyten durch die Inkubation mit Liposomen. Als Positivkontrolle hat sich in diesem Rahmen eine kombinierte Behandlung der Granulozyten mit Cytochalasin B und NfMLP bewährt (Zipfel, 1998). Diese führt zu einer deutlichen Verschiebung der Zellwolke nach links, was einer starken Degranulation der Zellen entspricht.

## *II. Durchführung*

Isolierte Granulozyten wurden in HBSS auf  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Dabei wurde im Rahmen der Zellisolation auf den Lyseschritt verzichtet, da die Lyse eine starke Belastung für die Zellen darstellt und dadurch Degranulationsergebnisse verfälscht werden können. Nun wurden drei Ansätze zu je 1000  $\mu$ l hergestellt [ $3,5 \times 10^6$  Zellen]

### *I. Positivkontrolle*

Dieser Ansatz wurde zunächst bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 20  $\mu$ l in DMSO gelöstem Cytochalasin B [f.c. 5  $\mu$ g/ml (w/v)] vorbehandelt. Anschließend wurde NfMLP [f.c.  $10^{-6}$  M] zugegeben.

### *II. Negativkontrolle*

Dieser Ansatz enthielt 20  $\mu$ l DMSO um unspezifische Effekte des Lösungsmittels für Cytochalasin B auszuschließen.

### *III. Probe*

Diesem Ansatz wurden Liposomen [f.c. 1 mM] zugegeben.

Alle Ansätze wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei jeweils nach 0, 10 und 20 Minuten eine Messung am Advia 120 erfolgte.

## *III. Auswertung*

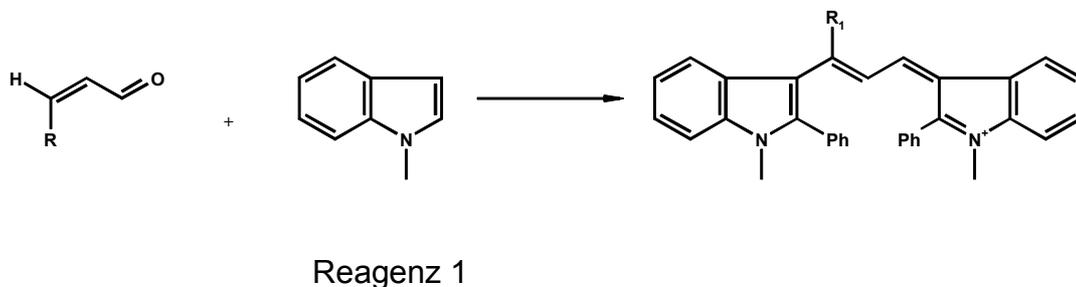
Die Verschiebung der Zellwolke wurde bei allen Messungen zusätzlich grafisch anhand eines y-Achsen-Histogramms des PEROX-Kanals dargestellt.

## 2.2.14 Lipidperoxidations-Assay

### I. Prinzip

Als Marker für die Lipidperoxidation wurden zwei Endprodukte der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, das Malondialdehyd (MDA) und das 4-Hydroxy-2 (E)-Nonenal (4-HNE) nachgewiesen. Der Test beruht auf der Bildung eines bei  $\lambda = 586 \text{ nm}$  nachweisbaren Indol-Farbstoffes (Reaktion I):

Reaktion I:



MDA:  $R = \text{OH}$

4-HNE:  $R = \text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

MDA:  $R_1 = \text{H}$

4-HNE:  $R_1 = (\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$

### II. Durchführung

Für die zellulären Ansätze wurden Granulozyten zunächst in HBSS auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Dann wurden Ansätze zu je 200  $\mu\text{l}$  hergestellt, die Stimulation erfolgte durch Zugabe von opsonisiertem Zymosan [f.c.  $\sim 3,6 \times 10^6$  Partikel/ml] bzw. PMA [f.c. 0,2 mg/ml]. GOL wurden in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Dies galt auch für die zellfreien Ansätze. Jeder der Ansätze wurde für 0 und 120 Minuten bei  $37^\circ \text{C}$  im Wasserbad inkubiert und danach sofort auf Eis gelagert. Nun wurde in Glasröhrchen zu je 650  $\mu\text{l}$  Reagenz  $R_1$  200  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Probe gegeben. Durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  HCl [12 M] wurde das entstandene 4-HNE hydrolysiert, um reine MDA-Messungen durchführen zu können. Anschließend wurden die Ansätze für

weitere 60 Minuten bei 45° C im Wasserbad inkubiert und auf Eis gelagert. Die Zellproben wurden für 10 Minuten bei 15 000 x g zentrifugiert. Gemessen wurde dann die Extinktion der jeweiligen Ansätze bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 586$  nm an einem Spektralphotometer.

### *III. Auswertung*

Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve, die mittels einer Verdünnungsreihe von reinem MDA erstellt wurde.

## **2.2.15 Untersuchungen zur Stabilität der Glucose-Oxidase**

### *I. Allgemeines*

Die Glucose-Oxidase-Liposomen sind nach zellulärer Phagozytose verschiedenen potentiell aktivitätsmindernden Einflüssen unterworfen, deren Effekte durch mehrere Versuchsansätze untersucht wurden.

### *II. Prinzip*

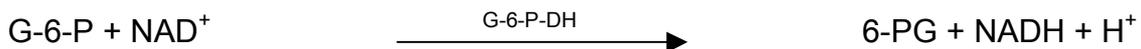
Zur Messung der Aktivität der Glucose-Oxidase wurde bei allen Versuchen aus Praktikabilitätsgründen die Abnahme der Glucose-Konzentration als Parameter gewählt. Verwendet wurde hierbei das Infinity<sup>TM</sup> Glucose Reagenz von Sigma. Der Test beruht auf der Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode. Dabei wird Glucose zunächst in einer durch Hexokinase (HK) katalysierten Reaktion von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) phosphoryliert (Reaktion I), wobei Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und Adenosin-5'-Diphosphat (ADP) entsteht. Das entstandene Glucose-6-Phosphat wird anschließend in der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH)-Reaktion unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zum 6-Phosphogluconat (6-PG) oxidiert (Reaktion II). Die Menge an gebildetem NADH kann photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda =$

340 nm als Extinktionsanstieg nachgewiesen werden und entspricht stöchiometrisch der Menge an Glucose im Ansatz.

Reaktion I:



Reaktion II:



### III. Durchführung

#### III a. Abhängigkeit der Glucose-Oxidase vom pH-Wert

Zunächst wurde der pH von HBSS mit einem pH-Meter bestimmt. Dann wurde die HBSS-Lösung durch Zugabe von HCl [2 M] auf einen pH 5,7 titriert.

Es wurden Ansätze zu je 250 µl hergestellt. Sowohl im sauren (pH = 5,7) als auch im leicht alkalischen Puffer (pH 7,4) wurde je ein Ansatz mit GO-Endkonzentrationen von 0 U/ml, 0,1 U/ml bzw. 2 U/ml hergestellt. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 250 µl PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ .

Alle Ansätze wurden dreifach hergestellt und dann für 0, 60 und 120 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde danach sofort mit 50%iger TCA

gestoppt. Dann wurde 5 min. bei 15 000 x g und 6° C zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden zur photometrischen Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet.

Vom restlichen Überstand wurden 10 µl abpipettiert und mit 1 ml Glucose-Reaktionslösung versetzt. Nun wurde erneut 3 min. bei 37° C inkubiert.

Schließlich wurden 900 µl des Reaktionsansatzes in einer Halbmikroküvette bei 340 nm photometrisch bestimmt.

### *III b. Aktivität der Glucose-Oxidase in Anwesenheit von Myeloperoxidase*

Es wurden Ansätze zu je 250 µl hergestellt. Jeweils ein Ansatz mit einer GO-Aktivität von 0 bzw 2 U/ml wurde einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit von MPO [f.c. 0,15 U/ml] für 0, 60 und 120 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Weiterhin wurde wie unter 2.2.15.II a beschrieben verfahren.

### *III c. Glucose-Oxidase-Aktivität unter Einwirkung granulozytärer Bestandteile*

Zunächst wurde ein Extrakt aus Granulozyten hergestellt. Dazu wurden Granulozyten isoliert und in HBSS auf  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde daraufhin drei Mal für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt, wodurch die Zellen zerstört wurden, und die Zellbestandteile frei im Puffer vorlagen. Ein Teil des Extraktes wurde bei  $1500 \times g$  für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nun wurden wiederum Ansätze zu je 250 µl hergestellt. Als Puffer diente einmal HBSS, einmal der Granulozytenextrakt in HBSS und einmal der Überstand des zentrifugierten Extraktes. In jeden dieser Puffer wurde entweder GO in Aktivitäten von 0 bzw. 2 U/ml, oder GOL [f.c. 2mM] gegeben und bei 37°C im Wasserbad für 0, 60 und 120 Minuten inkubiert. Weiterhin wurde wie unter 2.2.15.II a beschrieben verfahren.

In einem weiteren Ansatz wurden Granulozyten [ $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml] zunächst wie unter 2.2.13 beschrieben mittels einer Cytochalasin B/NfMLP-Behandlung degranuliert und anschließend für 10 Minuten bei 4 °C mit  $1500 \times g$  zentrifugiert. Je 225 µl des Überstandes bzw. HBSS wurden mit 25 µl GO [20 U/ml] vermengt und bei 37°C im Wasserbad für 0 bzw. 120 Minuten inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 250 µl PBS mit  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ . Die Messung der Glucosekonzentration erfolgte wie unter 2.2.15.III a beschrieben.

#### IV. *Berechnung der Glucose-Konzentration*

Die Berechnung der Glucose-Konzentration erfolgte anhand einer Standardkurve.

##### **2.2.16 *Auswertung der Ergebnisse***

Alle Experimente wurden je nach Verfügbarkeit von Untersuchungsmaterial jeweils ein, zwei oder drei Mal unabhängig durchgeführt. Die Anzahl der unabhängigen Experimente wurde dabei im Ergebnisteil bei den einzelnen Versuchen mit  $n$  angegeben, bzw. es wurde explizit darauf eingegangen. Betrug  $n \leq 2$ , so wurden die Ergebnisse nicht als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (*'standard deviation'*, SD), sondern einzeln dargestellt. Die Ergebnisse der jeweiligen unabhängigen Experimente stellen dann die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen  $\pm$  deren Standardabweichungen dar. An einer Stelle wird der Mittelwert sowie dessen Streuung als Spannbreite (*'range'*) angegeben. Es wird an den entsprechenden Stellen bei den Grafiken darauf hingewiesen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 *Charakterisierung des Probanden*

Bei dem Probanden handelt es sich um einen männlichen erwachsenen (Jahrgang 1969) CGD-Patienten. Eine genetische Charakterisierung des bei diesem Patienten der Erkrankung zugrunde liegenden Defekts wurde nicht durchgeführt. Anamnestisch erlitt der Patient bereits mehrere schwere Infektionen, u. A. Pneumonien sowie pneumonische und hepatische Abszesse. Als Kontrollprobanden (K) dienten gesunde Personen unterschiedlichen Alters und Geschlechts:

K<sub>1</sub>: Männlich, 26 Jahre

K<sub>2</sub>: Weiblich, 25 Jahre

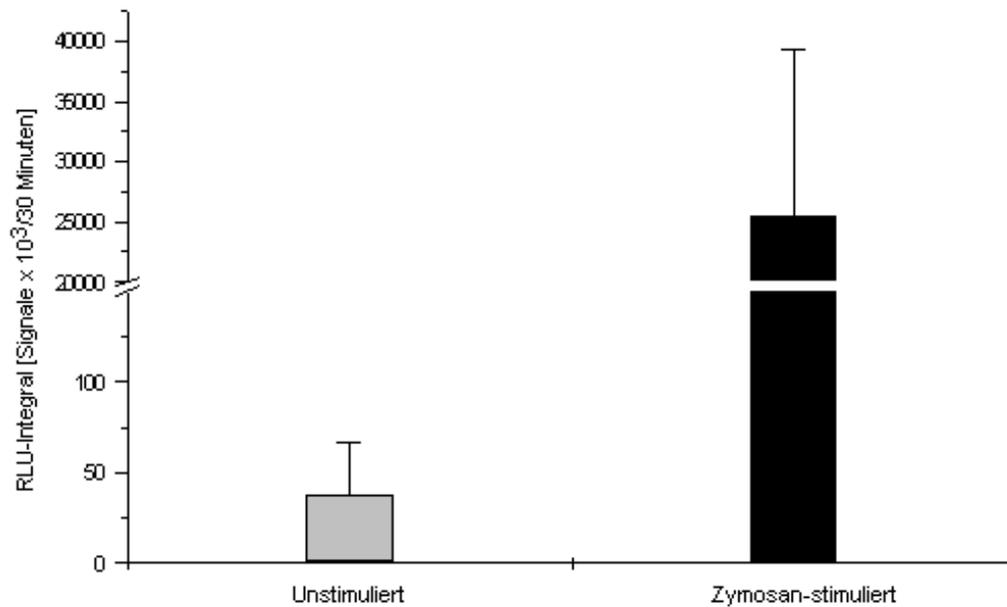
K<sub>3</sub>: Weiblich, 35 Jahre

Es zeigte sich bei den Blutzellen der Kontrollpersonen keine maßgeblichen Unterschiede in ihrer Funktion als Positivkontrollen. Exemplarisch sind die Chemilumineszenzsignale der drei Kontrollen zusammengefasst in Abbildung 3.1 dargestellt.

Der Unterschied zwischen CGD- und Kontrollgranulozyten lässt sich am anschaulichsten anhand des Verhaltens der Zellen bei der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz darstellen. Dieses Verfahren kommt auch in der klinischen Routine bei Verdacht auf Vorliegen eines NADPH-Oxidase-Defekts zum Einsatz.

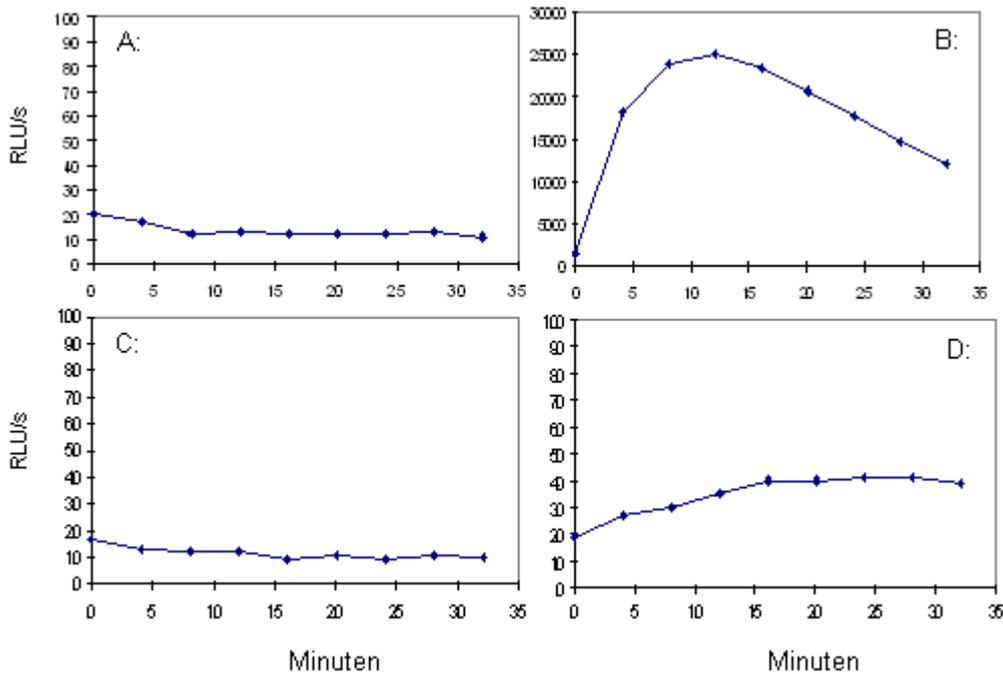
Abbildung 3.2 zeigt ein typisches Beispiel der Signalkurven von Kontroll- bzw. CGD-Granulozyten in unstimuliertem Zustand und nach Zugabe von opsonisiertem Zymosan [f.c.  $\sim 3,6 \times 10^6$  Partikel/ml]. Hier lässt sich erkennen, dass durch Zugabe von opsonisiertem Zymosan zu gesunden Granulozyten ein Anstieg der Signalintensität um den Faktor  $1 \times 10^3$  erreicht werden kann. Bei CGD-Granulozyten fehlt hingegen dieser Anstieg in der Signalintensität nahezu vollständig. Interessanterweise kann dennoch ein minimaler Anstieg der Signalintensität beobachtet werden, der andeutet, dass auch der CGD-

Granulozyt zur Bildung geringer Mengen an oxidativen Substanzen in der Lage ist (möglicherweise mitochondrial bedingt). Allein der Skalierungssprung im Vergleich zur Positivkontrolle verdeutlicht dennoch den massiven Unterschied zum oxidativen Burst (s. Abb. 3.2).



**Abb. 3.1: Zusammenfassende Darstellung der Chemilumineszenzsignale von Granulozyten der drei beobachteten Kontrollpersonen.**

MW aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD von K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> und K<sub>3</sub>.



**Abb. 3.2: Vergleich des Chemilumineszenzverhaltens von Kontroll bzw. CGD-Granulozyten vor und nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan.**

Signalintensitäten von  $10^5$  Granulozyten gemessen in Relativen Lichteinheiten / Sekunde ('relative light units per second', RLU/sec) über einen Zeitraum von  $t = 32$  Minuten. Zugunsten einer besseren Darstellung wurde bei Diagramm B eine andere Skala verwendet.

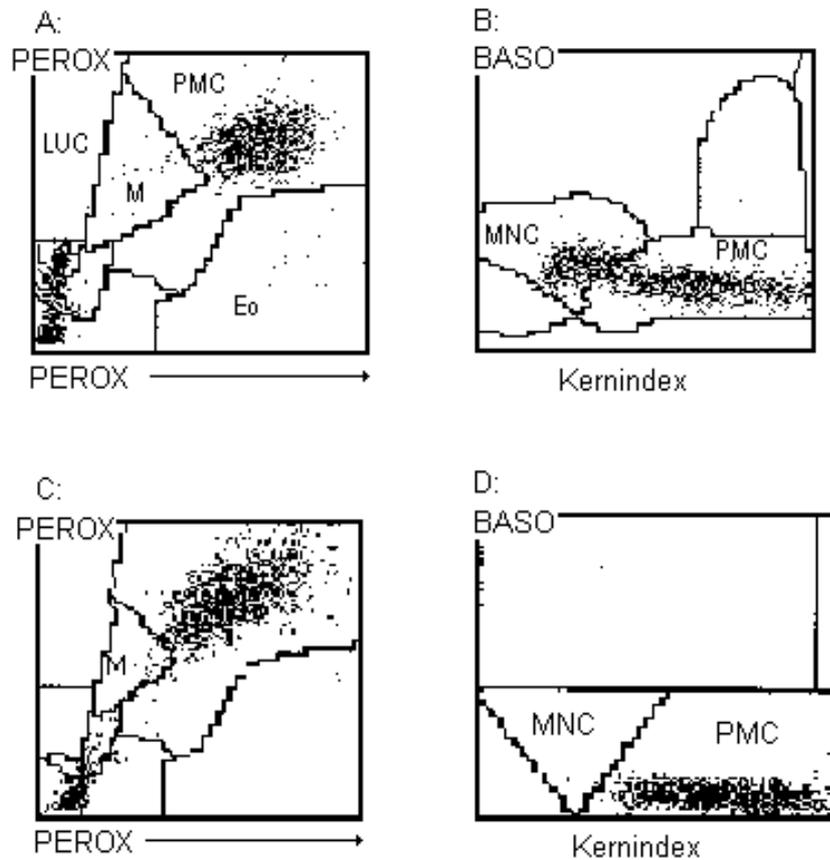
A bzw. B: Kontrollgranulozyten ohne bzw. mit Zusatz von opsonisiertem Zymosan [f.c.  $\sim 3,6 \times 10^6$  Partikel/ml]

C bzw. D: CGD-Granulozyten ohne bzw. mit Zusatz von opsoniertem Zymosan [f.c.  $\sim 3,6 \times 10^6$  Partikel/ml]

### 3.2 Darstellung isolierter Granulozyten am Advia 120

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Überprüfung der Isolationsreinheit wurden die Zellisolate mit dem Advia 120 gemessen. In Abb. 3.3 sind PEROX- und BASO-Kanal-Schaubilder einer Advia 120-Analyse eines Granulozytenisolats dargestellt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Schaubilder einer Vollblutprobe aus Abb. 2.1 aufgeführt. Erkennbar ist im PEROX-Kanal, dass die Granulozytenwolke des Isolats im Vergleich zur

Vollblutprobe „aufgelockert“ erscheint und nach links wandert, verbunden mit einer teilweisen Einwanderung in das monozytäre Zählfeld. Die Untersuchung im BASO-Kanal erlaubt jedoch die Zuordnung des überwiegenden Anteils der Zellen im Isolat in das Feld der Segmentkernigen (‘Polymorph Nuclear Cells’, PMC). Im Rundkernigen (‘Mono Nuclear Cells’, MNC) Zählfeld finden sich hingegen nur vereinzelt Zellen. Dadurch konnte eine Beurteilung der Reinheit der Isolate gewährleistet werden, die sich mikroskopisch bestätigen lässt.



**Abbildung 3.3: PEROX- und BASO-Kanal-Schaubilder einer Analyse isolierter Granulozyten (C, D) im Vergleich zu einer Vollblutprobe (A, B) am Advia 120.**

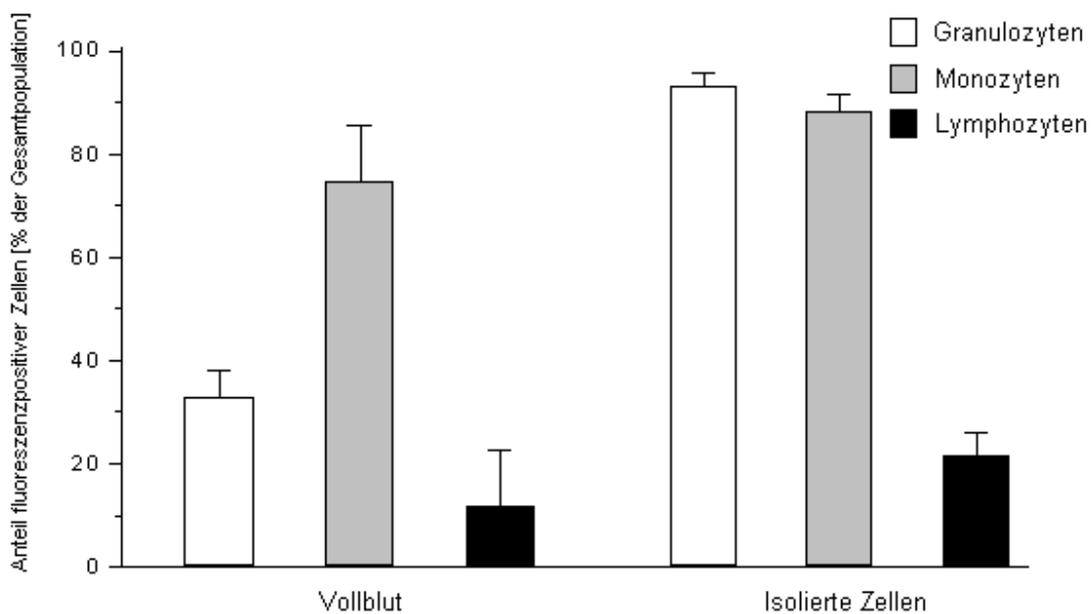
LUC = large unstained cells; L = Lymphozyten; M = Monozyten; PMC = Neutrophile Granulozyten; Eo = Eosinophile Granulozyten; MNC = mononukleäre Zellen.

### **3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung des Aufnahmeverhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Leukozyten**

Untersucht wurde die Aufnahme lyophilisierter Liposomen durch isolierte Leukozyten sowie durch Leukozyten in Vollblut. In der Arbeit von *Gerber* konnte 1999 gezeigt werden, dass die Aufnahme konventioneller Liposomen durch

Leukozyten zeitabhängig ist, jedoch bereits nach 20 bis 60 Minuten ein Plateau erreicht. Auf die Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurde daher im Rahmen dieser Versuche verzichtet und generell über 60 Minuten inkubiert.

Es zeigte sich, dass lyophilisierte fluoreszenz-markierte Liposomen, vergleichbar mit konventionell hergestellten Liposomen, selektiv bevorzugt durch phagozytäre Zellen aufgenommen wurden. In Vollblut war etwas weniger als die Hälfte der granulozytären Zellen fluoreszenzpositiv, im Isolat lag die Quote mehr als doppelt so hoch. Monozyten waren sowohl in Vollblut als auch im Isolat mononukleärer Zellen zu vergleichbaren Anteilen fluoreszenzpositiv (ca. 80%). Der Anteil fluoreszenzpositiver Lymphozyten war sowohl in Vollblut als auch bei isolierten Zellen mit ca. 10 – 20 % deutlich geringer.

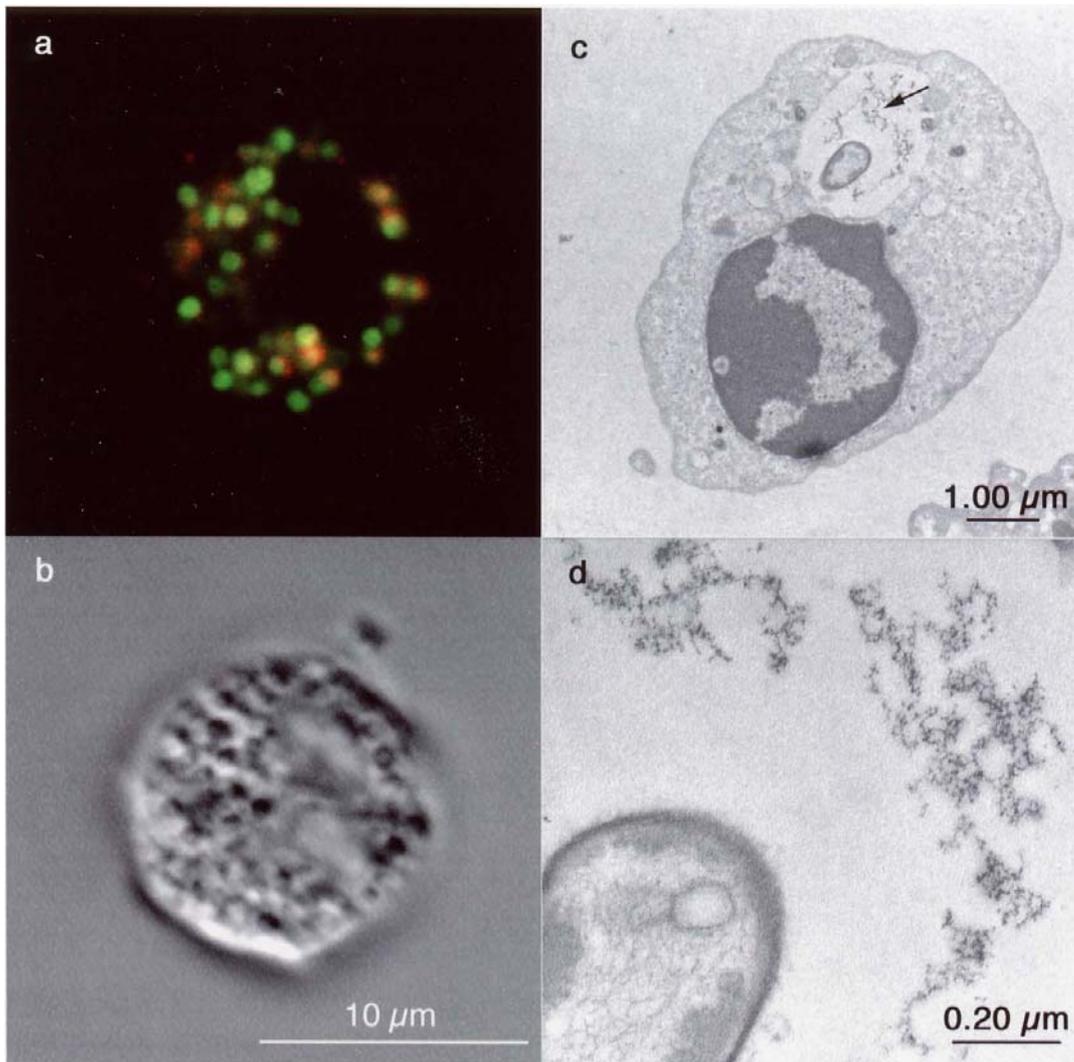


**Abbildung 3.4: Aufnahme lyophilisierter Liposomen durch Leukozyten in Vollblut sowie durch isolierte Leukozyten.**

Dargestellt ist der Anteil fluoreszenzpositiver Zellen relativ zur Gesamtpopulation (10000 Zellen) nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C mit Rhodamin-PE [1 mol%]-gelabelten Liposomen [1 mM]. MW ± SD, n = 3.

### **3.4 Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Aufnahmeverhaltens von Rhodamin-B-PE-gelabelten Liposomen durch Granulozyten**

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte die Aufnahme der Liposomen durch Leukozyten quantitativ beurteilt werden. Allerdings sind Aussagen bezüglich der Lokalisation der Liposomen innerhalb der Zelle nicht möglich. Um diesen Aspekt beurteilen zu können, wurde das Aufnahmeverhalten der Zellen mittels zweier bildgebender Verfahren, der Konfokalen Laser- und der Elektronenmikroskopie, untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.5 dargestellt. In der konfokalen Lasermikroskopie zeigte sich eine deutliche Anreicherung von BODIPY-markiertem *Staphylococcus aureus* (grün) innerhalb der Granulozyten. Gleichzeitig konnten intrazellulär Rhodamin-B-PE-gelabelte Liposomen (rot) nachgewiesen werden. Es gab keine Hinweise auf an der Außenseite der Zellmembran adhärierende liposomale Bestandteile. Ebenso wenig ergaben sich Hinweise auf Fusion liposomaler und zellulärer Membranabschnitte. Gelbe punktförmige Partikel zeigten eine Überlagerung von rot und grün gefärbten Arealen. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Aufnahmen. Liposomal verpacktes Ferritin konnte als elektronendichtes Material innerhalb des Phagosoms in unmittelbarer Nachbarschaft zu phagozytierten Staphylokokken detektiert werden. In Kontrollansätzen ohne Ferritin war diese Struktur nicht vorhanden. Durch den Verzicht auf die Bleikontrastierung konnte die elektronendichte Struktur als Ferritin identifiziert werden. Ferritin wurde nicht an der Außenseite der Zellmembran gefunden.



**Abbildung 3.5: Konfokale Lasermikroskopie- und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Granulozyten.**

Bild a: Mittels konfokaler Lasermikroskopie gewonnene Aufnahme eines Granulozyten: Erkennbar sind BODIPY-markierte *Staphylococci* (grün) und Rhodamin-B-PE-gelabelte Liposomen (rot). An Stellen, an denen Liposomen und Staphylokokken kolokalisiert vorliegen, kommt es zu einer Gelbfärbung.

Bild b: Darstellung der Morphologie des Granulozyten aus Bild a mit einer Digital-interference-contrast (DIC) -Aufnahme.

Bild c, d: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Granulozyten:

Man erkennt die Kolokalisation eines Staphylokokken mit Ferritin innerhalb eines Phagozytosoms. Ferritinpartikel sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (  $\longrightarrow$  ).

### 3.5 *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assay*

Die Fähigkeit der Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Glucose-Oxidase-Reaktion ist essentielle Voraussetzung für die Funktionalität der GOL in NADPH-Oxidase-defizienten Zellen. Untersucht wurde die Aktivität von konventionell hergestellten und lyophilisierten Liposomen in zwei verschiedenen Konzentrationen bezogen auf Aktivitäten des Reinenzyms. Es zeigte sich dabei, dass die lyophilisierten Liposomen im Vergleich zu konventionell hergestellten von höherer GO-Aktivität sind (Faktor ca. 2).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammenfassend dargestellt.

---

**Tabelle 3.1: GO-Aktivitäten von konventionellen und lyophilisierten GOL in Konzentrationen von 1 bzw. 2 mM.**

---

|         | Konventionelle Liposomen                                       | Lyophilisierte Liposomen   |
|---------|--|----------------------------|
| [1 mM]: | 0,093 ± 0,014 U/ml (n = 3)                                     | 0,168 ± 0,01 U/ml (n = 3)  |
| [2 mM]: | 0,153 [0,152 ; 0,154] (Exp. 1)<br>0,141 [0,139; 0,143](Exp. 2) | 0,398 ± 0,006 U/ml (n = 3) |

---

Gemessen wurde die gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge. Diese wurde anhand einer Standardkurve in Enzymaktivitäten übertragen. MW ± SD, n = 3. Vom 2 mM-Ansatz lagen bei konventionellen Liposomen lediglich 2 unabhängige Ergebnisse vor, weswegen dort die Ergebnisse der jeweiligen Doppelmessungen separat als MW mit [*range*] angegeben sind (Exp. 1 bzw 2).

---

#### 3.5.1 *Inhibitionsversuche mit Glucose-Oxidase-Antikörpern*

Freie Glucose-Oxidase ist im Hinblick auf potentielle Nebenwirkungen im Organismus beim Konzept der GOL-Therapie möglicherweise von Nachteil. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob spezifische Antikörper gegen die GO dazu in der Lage sind, die GO zu inhibieren, bzw. deren Aktivität herabzusetzen.

Einen Überblick über die Ergebnisse der Inhibitionsversuche gibt Tabelle 3.2. Es zeigte sich, dass durch Zugabe der Antikörper in allen verwendeten Konzentrationen keine Abnahme der GO-Aktivität erreicht werden konnte. Ebenso wenig verringerte sich die Aktivität bei Zugabe von Albumin. Interessanterweise war die gemessene GO-Aktivität in Anwesenheit von Albumin sogar höher als die Ausgangsaktivität. Mit abnehmender Konzentration des Albumins ging auch die gemessene GO-Aktivität wieder auf die Ausgangsaktivität zurück. Dieser Trend konnte in Anwesenheit des Antikörpers nicht beobachtet werden. Hier lagen die Werte mit Schwankungen von ca. 0,01 U/ml im Bereich der Messungengenauigkeit des Testsystems.

**Tabelle 3.2: Glucose-Oxidase-Aktivität in Anwesenheit von GO-Antikörpern und Albumin.**

| Proteinkonzentration [mg/ml] | Gemessene GO-Aktivität [U/ml] |               |
|------------------------------|-------------------------------|---------------|
|                              | Albumin                       | GO-Antikörper |
| 0                            | 0,1 ± 0,001                   | 0,097 ± 0,014 |
| 0,0025                       | 0,095 ± 0,014                 | 0,099 ± 0     |
| 0,025                        | 0,114 ± 0,003                 | 0,108 ± 0,001 |
| 0,25                         | 0,119 ± 0                     | 0,106 ± 0,001 |
| 2,5                          | 0,126 ± 0,002                 | 0,110 ± 0,001 |
| 25                           | 0,130 ± 0,002                 | 0,098 ± 0,014 |

Die GO-Ausgangsaktivität betrug in allen Ansätzen 0,1 U/ml. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen, die anhand einer Standardkurve in GO-Aktivitäten umgerechnet wurden. MW ± SD aus einer Mehrfachbestimmung, n = 1.

### **3.6 Bestimmung der HOCl-Bildung durch Granulozyten unter Einfluss von GOL**

Die Überführung von durch GOL gebildetem  $H_2O_2$  in hypochloriger Säure (Myeloperoxidase-Reaktion) ist eine für die Rekonstitution der Funktionalität von CGD-Granulozyten essentielle Bedingung. Daher wurde der Einfluss konventioneller und lyophilisierter Liposomen auf die HOCl-Produktion sowohl gesunder (Kontrolle) als auch von CGD-Granulozyten (Proband) mittels der TNB-Methode untersucht. Es wurde einerseits die direkte Zugabe, andererseits die Vorinkubation der Zellen mit den entsprechenden Liposomen betrachtet. Als Positivkontrolle diente die Stimulation der Zellen mit Zymosan. Unstimuliert war die HOCl-Produktion sowohl bei der Kontrolle als auch beim Probanden sehr gering und lag im Bereich der Meßungengenauigkeit der Methode. Belegt wird dies dadurch, dass die Messwerte der Ansätze, denen der HOCl-‘Scavenger’ zugesetzt wurde, in der gleichen Größenordnung lagen. Die Stimulation mit Zymosan [f.c.  $3,6 \times 10^6$  Partikel/ml] bewirkte bei Kontrollgranulozyten eine deutliche Steigerung der HOCl-Produktion. Dieser Effekt blieb beim Probanden erwartungsgemäß aus (Abb. 3.6 und 3.7).

Zu den folgenden Ansätzen wurde zusätzlich die Konzentrationsänderung  $[\Delta_{HOCl}]$  bezogen auf die jeweiligen unstimulierten Ansätze erhoben (vgl. Tabelle 3.3). Wurden den Granulozyten konventionell hergestellte GOL direkt zugegeben, so konnte eine deutlich höhere HOCl-Bildung gemessen werden als bei den unstimulierten Ansätzen. Direkt zugegebene lyophilisierte Liposomen führten sowohl bei Kontroll- als auch bei Probanden granulozyten im Vergleich zu konventionell hergestellten sogar zu einem noch stärkeren Anstieg der HOCl-Produktion, wobei auch dieser Anstieg stets geringer ausfiel als bei der Stimulation gesunder Zellen mit Zymosan (vgl. Abbildung 3.6). Nach Vorinkubation der Kontroll- bzw. Probanden granulozyten mit konventionell hergestellten Liposomen [1mM] konnte ebenfalls ein Anstieg der HOCl-Bildung beobachtet werden, wenn dieser auch deutlich geringer war, als bei direkter Zugabe. Interessanterweise lag die durch Vorinkubation erreichbare HOCl-Konzentration beim Probanden deutlich höher als bei der Kontrolle (Faktor 3).

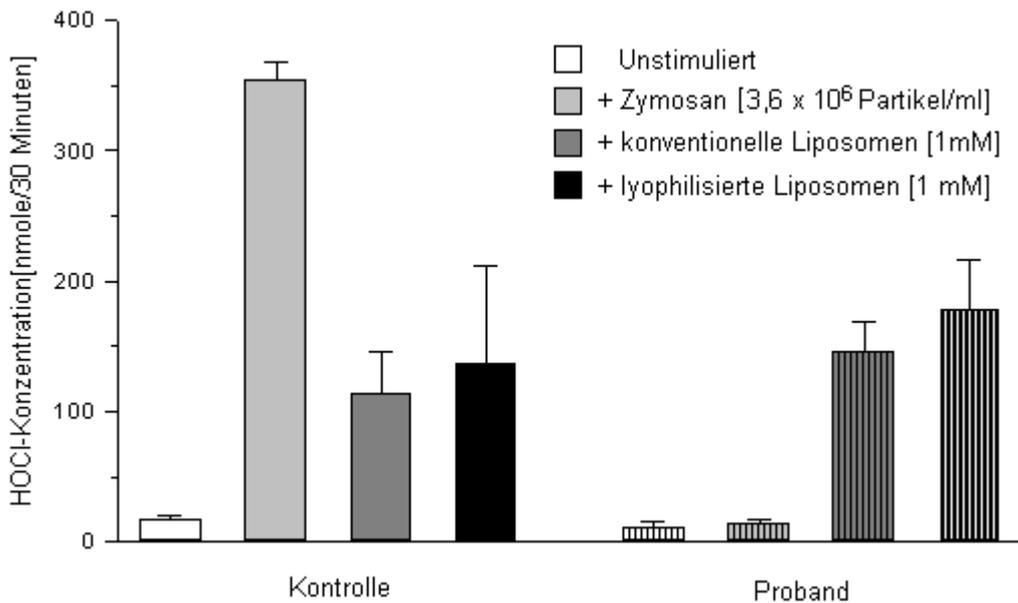
Auch die Vorinkubation der Zellen mit lyophilisierten Liposomen [1mM] führte zu einem Anstieg der HOCl-Konzentration, erreichte jedoch nicht die Größenordnung der konventionell hergestellte Liposomen. Hier verhielten sich Kontroll- und Probandengranulozyten ähnlich.

Durch Verwendung einer höheren Konzentration im Vorinkubationsansatz konnte allerdings eine Steigerung der HOCl-Produktion erzielt werden, die der durch konventionell hergestellte Liposomen erreichbaren entsprach bzw. diese sogar übertraf (vgl. Abbildung 3.7).

**Tabelle 3.3: HOCl-Konzentrationsänderung ( $\Delta_{\text{HOCl}}$ ) bezogen auf unstimulierte Granulozyten von Kontrolle bzw. Proband.**

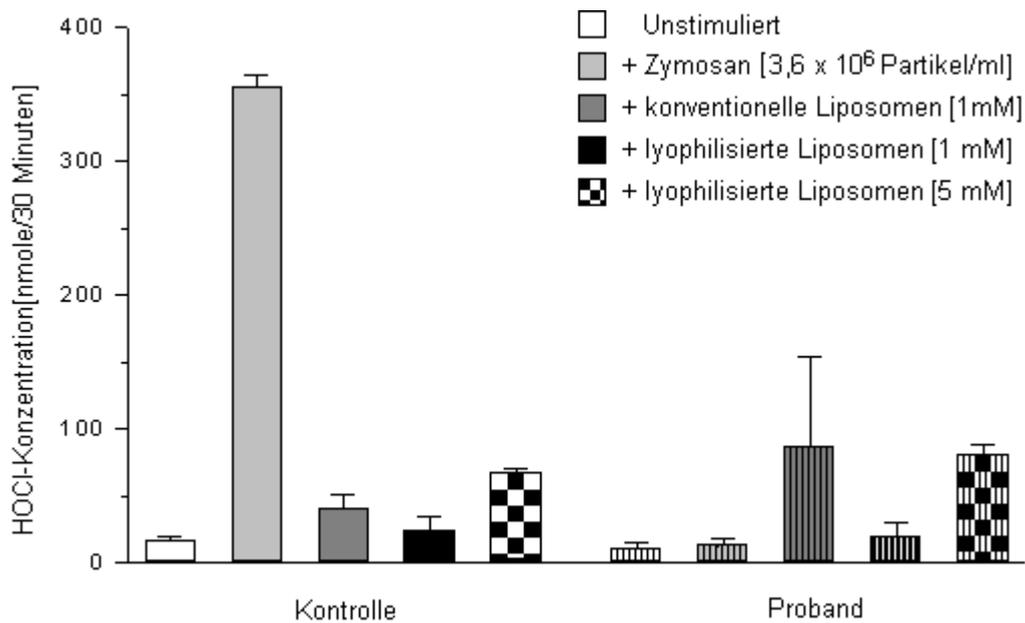
| Ansatz                                      | Kontrolle                             | Proband                               |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
|   | $\Delta_{\text{HOCl}}$ [nmole/30 min] | $\Delta_{\text{HOCl}}$ [nmole/30 min] |
| Unstimuliert                                | 0                                     | 0                                     |
| GOL <sub>konv.</sub> , direkt               | 74,14 ± 7,50                          | 148,07 ± 20,00                        |
|   | 125,36 ± 6,36                         | 121,50 ± 7,57                         |
| GOL <sub>lyoph.</sub> , direkt              | 67,50 ± 7,27                          | 192,00 ± 0,30                         |
|   | 175,29 ± 12,42                        | 143,79 ± 11,21                        |
| GOL <sub>konv.</sub> , vorinkubiert [1 mM]  | 17,36 ± 6,67                          | 120,85 ± 18,48                        |
|   | 36,65 ± 1,82                          | 30,64 ± 4,55                          |
| GOL <sub>lyoph.</sub> , vorinkubiert [1 mM] | 0,75 ± 1,06                           | 0,00 ± 0,00                           |
|   | 15,86 ± 3,94                          | 18,21 ± 2,12                          |
| GOL <sub>lyoph.</sub> , vorinkubiert [5 mM] | 53,79 ± 4,85                          | 71,79 ± 6,97                          |

MW ± SD aus Mehrfachbestimmungen von zwei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.6: Einfluss von GOL, die direkt dem Inkubationsansatz zugegeben wurden, auf die Fähigkeit zur HOCl-Bildung bei Kontroll- und Probandengranulozyten im Vergleich zur Stimulation mit opsonisiertem Zymosan.**

Dargestellt ist die HOCl-Produktion von jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen, nachgewiesen mit der TNB-Methode. Es handelt sich hier um die Darstellung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Bei beiden Experimenten wurde jede Bestimmung doppelt angesetzt und die entsprechenden Ansätze gemittelt, wobei die Abweichung zwischen zwei Parallelbestimmungen unter 20 nmol/ 30 Minuten lag. Die so gemittelten Werte des ersten Experiments wurden dann wiederum mit den entsprechenden des zweiten gemittelt.



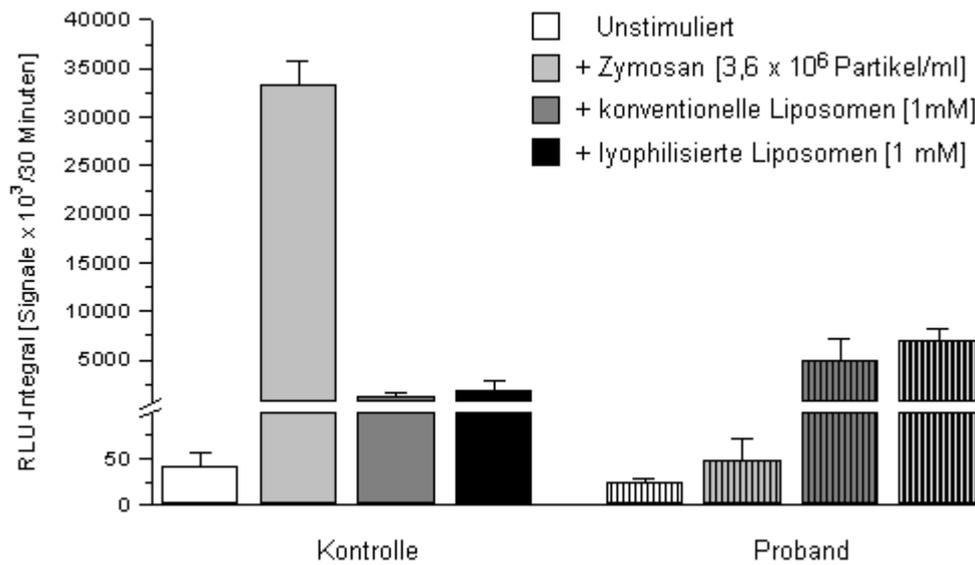
**Abbildung 3.7: HOCl-Bildung durch Granulozyten nach Vorinkubation mit konventionellen und lyophilisierten Liposomen in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Stimulation mit opsonisiertem Zymosan.**

Dargestellt ist die HOCl-Produktion von jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen nach 15-minütiger Vorinkubation mit lyophilisierten und konventionellen GOL [f.c. 1 mM], nachgewiesen mit der TNB-Methode. Es handelt sich hier um die Darstellung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Bei beiden Experimenten wurde jede Bestimmung doppelt angesetzt und die entsprechenden Ansätze gemittelt, wobei die Abweichung zwischen zwei Parallelbestimmungen für unter 20 nmol/ 30 Minuten lag. Die so gemittelten Werte des ersten Experiments wurden dann wiederum mit den entsprechenden des zweiten gemittelt.

### 3.3 *Luminol-verstärkte Chemilumineszenz*

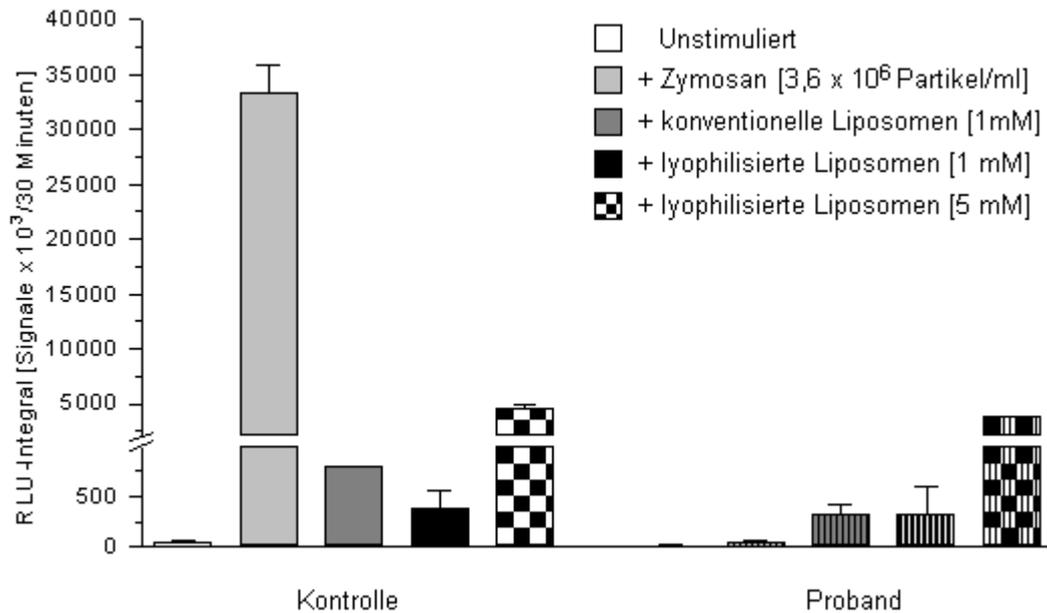
Die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz dient dem sehr sensitiven Nachweis von ROS, in erster Linie HOCl. Damit wurde ein zweiter, methodisch unterschiedlicher Ansatz zur HOCl-Bestimmung möglich, um den photometrischen Assay zu unterstützen. Die Ansätze wurden deshalb entsprechend denen des HOCl-Assays gewählt. Das Integral unter der Signalkurve der unstimulierten Ansätze für Kontroll- und

Probandengranulozyten lag im Bereich des Grundrauschens des Luminometers. Signale in der Größenordnung des Grundrauschens werden auch durch lediglich Puffer-gefüllte 'wells' erreicht. (Abb. 3.8 und 3.9). Zugabe des Stimulans Zymosan [f.c.  $\sim 3,6 \times 10^6$  Partikel/ml] bewirkte bei der Kontrolle einen erheblichen Signalanstieg (ca. Faktor 1000), wohingegen die Signale des entsprechenden Probandenansatzes immer noch im Bereich des Grundrauschens lagen. Die direkte Zugabe von konventionellen Liposomen führte bei der Kontrolle zu einer Signalanhebung, die ca. eine 10er Potenz unterhalb des mit Zymosan erreichbaren Wertes lag. Beim Probanden war das Signal etwas höher, lag jedoch in der selben Größenordnung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HOCl-Messung war der Signalanstieg bei direkter Zugabe lyophilisierter Liposomen zu Kontroll- als auch Probandengranulozyten sogar etwas stärker. (Abb. 3.8). Auch nach 15-minütiger Vorinkubation der Zellen mit konventionellen als auch mit lyophilisierten Liposomen [f.c. 1mM] konnte eine Signalverstärkung bei Kontrolle und Proband beobachtet werden, die jedoch geringer war als bei direkter Zugabe. Wurde die Lipidkonzentration im Vorinkubationsansatz mit lyophilisierten Liposomen auf 5 mM gesteigert, so stieg auch das Chemilumineszenzsignal an. Interessanterweise betrug der Signalanstieg dabei mehr als das Fünffache des 1 mM-Ansatzes (Faktor ca. 10).



**Abbildung 3.8: Chemilumineszenz von Kontroll- und Probandengranulozyten bei direkter Zugabe von konventionellen und lyophilisierten GOL im Vergleich zur Stimulation mit opsonisiertem Zymosan.**

Gemessen wurde das Integral der relativen Lichteinheit (Relative Light Unit, RLU) über einen Zeitraum von 30 Minuten ( $1 \times 10^5$  Granulozyten). Dargestellt sind  $MW \pm SD$ ,  $n = 5$ . Achsenbruch zwischen 100 und 1000.



**Abbildung 3.9: Chemilumineszenz von Kontroll- und Probandengranulozyten nach Vorinkubation mit konventionellen und lyophilisierten GOL im Vergleich zur Stimulation mit opsonisiertem Zymosan.**

Gemessen wurde das Integral der relativen Lichteinheit (Relative Light Unit, RLU) über einen Zeitraum von 30 Minuten ( $1 \times 10^5$  Granulozyten). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD, n = 5. Achsenbruch zwischen 1000 und 2000.

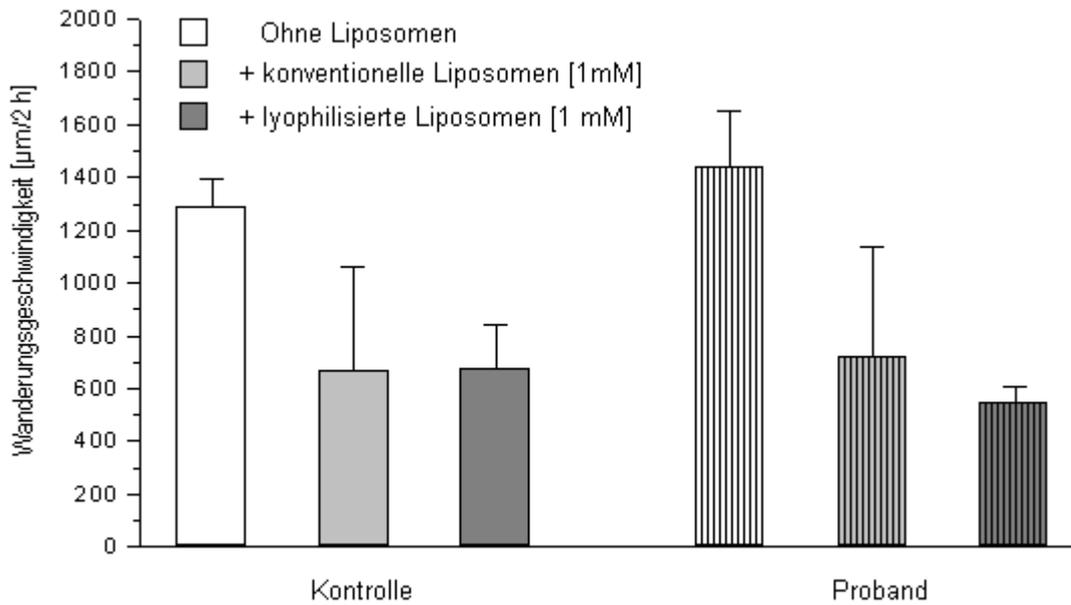
### 3.8 Einfluss von GOL auf die chemotaktischen Eigenschaften von Granulozyten

Die Fähigkeit zur Chemotaxis stellt eine für die Funktionalität phagozytärer Zellen äußerst wichtige Eigenschaft dar. Es war deshalb von entscheidender Bedeutung zu untersuchen, inwiefern GOL diese Fähigkeit beeinträchtigen. Gemessen wurde die chemotaktisch induzierte Migration von gesunden und CGD-Granulozyten unter Einfluss der Chemotaxine LTB<sub>4</sub> und NfMLP nach Vorinkubation mit konventionell hergestellten und lyophilisierten Liposomen. Als Kontrolle dienten Granulozyten, die nicht unter liposomalem Einfluss standen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 (LTB<sub>4</sub>) und 3.11 (NfMLP) grafisch dargestellt.

Sowohl LTB<sub>4</sub> als auch NfMLP bewirkten bei Granulozyten eine deutliche Steigerung der Migrationsstrecke bezogen auf die Spontanmigration. Diese Geschwindigkeitssteigerung war für Kontroll- und Probandengranulozyten vergleichbar. Die Vorinkubation mit konventionellen Liposomen führte zu einer Beeinträchtigung der chemotaktischen Wirkung des LTB<sub>4</sub>, die für Proband und Kontrolle vergleichbar stark war. Die Beeinträchtigung der durch LTB<sub>4</sub> induzierten Migration durch die Vorinkubation mit lyophilisierten Liposomen entsprach im wesentlichen der konventioneller Liposomen. Die Minderung der Migrationsgeschwindigkeit war jedoch sowohl für konventionelle als auch für lyophilisierte Liposomen nur partiell. Dies bedeutet, dass immer noch eine deutlich messbare chemotaktische Komponente verblieb, die ca. 50 % der in Abwesenheit von Liposomen gemessenen Komponente ausmachte.

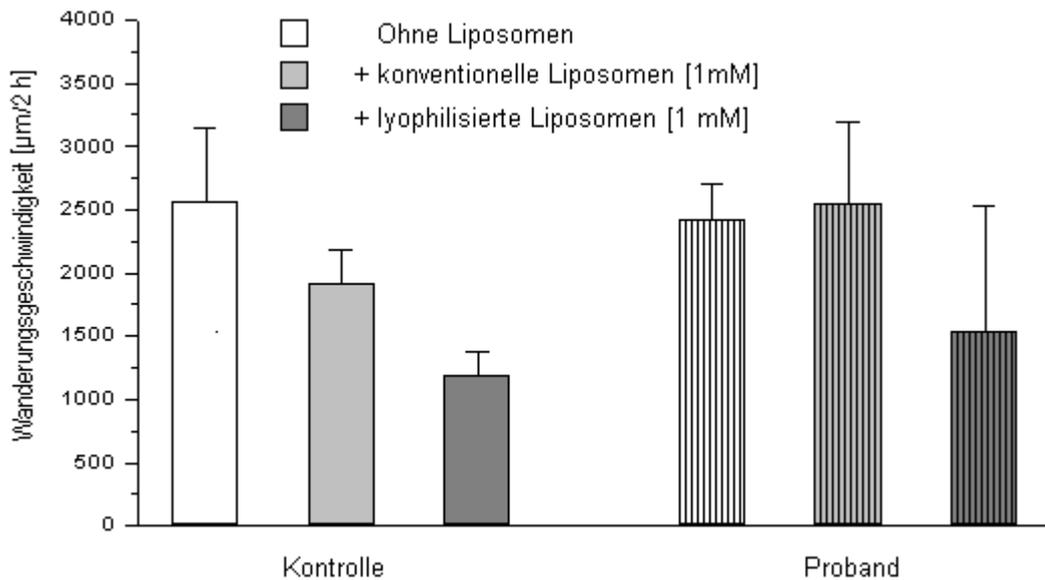
Die chemotaktische Potenz des NfMLP war stets höher als die des LTB<sub>4</sub> (Abb. 3.11). Die Vorinkubation mit konventionellen Liposomen führte bei Kontrollgranulozyten - vergleichbar mit den für das LTB<sub>4</sub> gefundenen Ergebnissen - zu einer Verminderung der Migrationsstrecke. Diese Verminderung konnte beim Probanden jedoch nicht beobachtet werden. Die Vorinkubation mit lyophilisierten Liposomen reduzierte die Migrationsstrecke – vergleichbar mit den LTB<sub>4</sub>-Ergebnissen – auf einen Wert von ca. 50 % bezogen auf die Migrationsstrecke in Abwesenheit von Liposomen.



**Abbildung 3.10: Einfluss der Vorinkubation mit konventionellen und lyophilisierten Liposomen auf die LTB<sub>4</sub>-induzierten chemotaktischen Eigenschaften gesunder und CGD-Granulozyten.**

Effektive chemotaktische Wanderungsstrecke nach zweistündiger Inkubation durch LTB<sub>4</sub> [ $10^{-6}$  M] abzüglich Spontanmigration von  $0,9 \times 10^6$  Granulozyten.

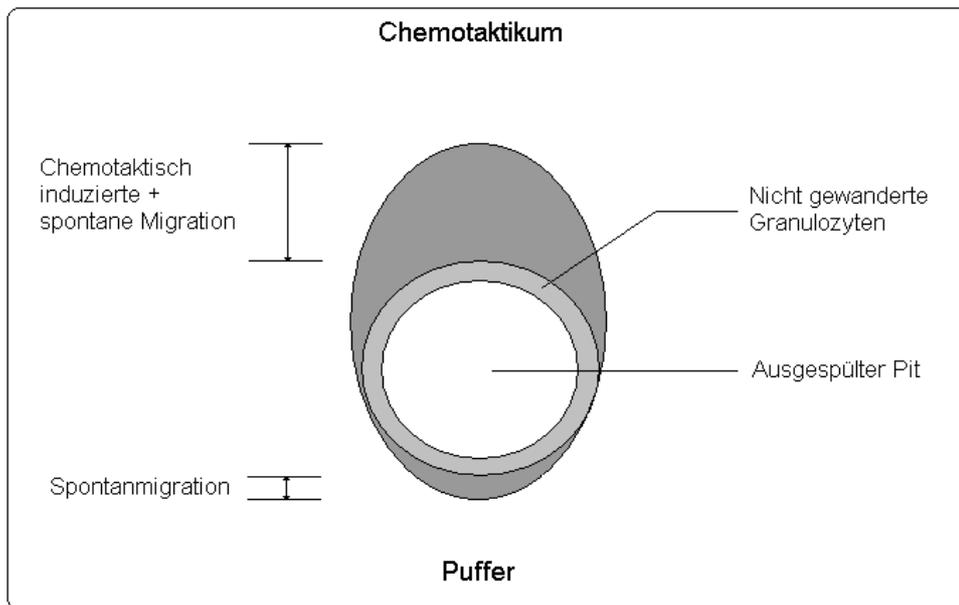
Es handelt sich hier um die Darstellung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Bei beiden Experimenten wurde auf jedem Objektträger drei 'pits' mit gleichem Ansatz belegt und die dabei gemessenen Migrationsstrecken gemittelt. Die so gemittelten Werte des ersten Experiments wurden dann wiederum mit den entsprechenden des zweiten gemittelt. Das dargestellte Streumaß entspricht den Standardabweichungen der Mehrfachbestimmungen.



**Abbildung 3.11: Einfluss der Vorinkubation mit konventionellen und lyophilisierten Liposomen auf die NfMLP-induzierten chemotaktischen Eigenschaften von gesunden und CGD-Granulozyten.**

Effektive chemotaktische Wanderungstrecke bei zweistündiger Inkubation durch NfMLP [ $10^{-6}$  M] abzüglich Spontanmigration von  $0,9 \times 10^6$  Granulozyten.

Es handelt sich hier um die Darstellung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Bei beiden Experimenten wurde auf jedem Objektträger drei 'pits' mit gleichem Ansatz belegt und die dabei gemessenen Migrationsstrecken gemittelt. Die so gemittelten Werte des ersten Experiments wurden dann wiederum mit den entsprechenden des zweiten gemittelt. Das dargestellte Streumaß entspricht den Standardabweichungen der Mehrfachbestimmungen.



**Abbildung 3.12: Schematische Darstellung eines Chemotaxis-Assays nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung bei Ansicht des Objektträgers unter der Lupe.**

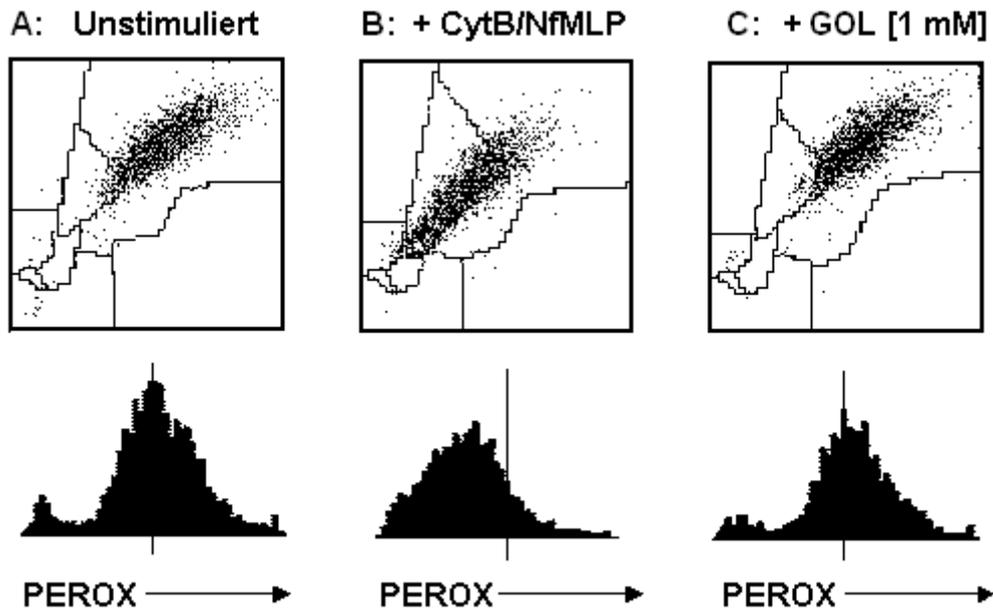
Die effektive chemotaktisch induzierte Migration erhält man nach Abzug der Spontanmigrationsstrecke in Richtung des Puffers (HBSS) von der maximalen Wanderungsstrecke in Richtung des Chemotaktikums (NfMLP bzw. LTB<sub>4</sub>).

### 3.9 Einfluss von Liposomen auf die Degranulation von Granulozyten

Im Rahmen der Untersuchung der Wirkungsweise der GOL *in vitro* war die Frage, ob die Liposomen zu einer Degranulation der Granulozyten führen und damit eine Freisetzung der in neutrophilen Granula vorhandenen Myeloperoxidase ins Außenmedium bewirken, von Interesse. In diesem Fall könnte die Myeloperoxidasereaktion *extrazellulär* ablaufen, ohne dass eine Aufnahme der Liposomen in die Zelle stattfinden müsste (Potentielle unerwünschte Wirkung der Liposomen).

Bei Vorbehandlung der Zellen mit Cytochalasin B [5 µg/ml] und NfMLP [ $10^{-6}$  M] konnte eine deutliche Verschiebung der Zellwolke nach links beobachtet

werden. Zur besseren grafischen Darstellung wurde ein Histogramm über die Peroxidase-Achse (y-Achse) des Advia-Diagramms angefertigt. Zunächst wurde dann untersucht, ob leere Liposomen selbst dazu in der Lage sind, eine vergleichbare Degranulation zu bewirken. Dies war nicht der Fall. Es zeigte sich in weiteren Versuchen, dass auch GOL nicht zu einer Degranulation isolierter Granulozyten führen. Die Advia-Diagramme und die zugehörigen Histogramme des PEROX-Kanals sind für unstimulierte Zellen, mit Cytochalasin B/NfMLP vorbehandelte Zellen und für Zellen, die GOL ausgesetzt waren, in Abbildung 3.13 dargestellt.



**Abbildung 3.13: Einfluss von GOL auf die Degranulation des Neutrophilen: Advia-Diagramme und zugehörige Histogramme der Peroxidase-Achse.**

A: Isolierte Granulozyten [ $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml] nach 20-minütiger Inkubation mit DMSO [2 % (v/v)] bei Raumtemperatur.

B: Isolierte Granulozyten [ $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml] nach 10-minütiger Vorbehandlung mit Cytochalasin B [f.c. 5  $\mu\text{g/ml}$ ] und anschließender Inkubation mit NfMLP [ $10^{-6}$  M] über weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur.

C: Isolierte Granulozyten [ $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml] nach 20-minütiger Inkubation mit GOL [1 mM] bei Raumtemperatur.

### 3.10 Killing-Assay mit *Staphylococcus aureus*

Beim Killing-Test mit *Staphylococcus aureus* (Gerber et al., 2001) wurden Bakterien zunächst in einer Müller-Hinton-Bouillion über Nacht kultiviert und anschließend geerntet. Die Bakterien wurden dann über einen Zeitraum von 2 Stunden mit Granulozyten, Liposomen oder Enzymen inkubiert und auf Trypcase-Soja-Agar verdünnt ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht konnten dann die gewachsenen Kolonien ausgezählt und mit einer Wachstumskontrolle

verglichen werden, wodurch die prozentuale Killing-Rate des Versuchsansatzes ermittelt wurde.

Bei der Durchführung des Killing-Assays ergaben sich einige technische Schwierigkeiten, die zur Folge hatten, dass sich mit diesem Test nur teilweise reproduzierbare und damit auswertbare Ergebnisse erzielen ließen. Deshalb können zur Wirkungsweise lyophilisierter Liposomen auf das Verhalten von CGD-Granulozyten gegenüber Catalase-positiven Keimen wie *Staphylococcus aureus in vitro* keine Aussagen getroffen werden.

Es konnten lediglich einige Killing-Versuche mit verschiedenen Enzymkombinationen im granulozytenfreien Medium unternommen werden. Unter anderem wurde das Verhalten von GO bzw. GO-Liposomen auf Bakterien in Anwesenheit von MPO in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Aufgrund der genannten methodischer Probleme konnten dabei keine definitiven Aussagen getroffen werden. Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass die Wirkung des in der GO-Reaktion gebildeten  $H_2O_2$  durch die Anwesenheit der MPO gesteigert werden konnte.

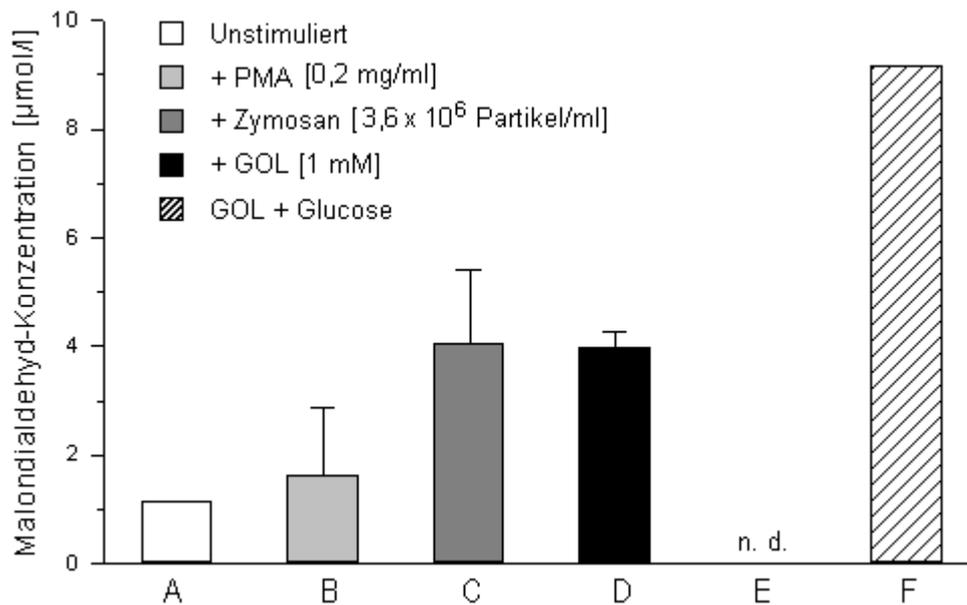
### **3.11 Untersuchungen zur Lipidperoxidation**

Der Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten wie Malondialdehyd (MDA) oder 4 Hydroxynonenal (4-HNE) ist eine etablierte Methode zur Beurteilung von Zellschädigungen auf der Basis oxidativen Stresses. Durch die Inkubation mit GOL werden Granulozyten oxidativem Stress ausgesetzt, einerseits durch das in der GO-Reaktion gebildete  $H_2O_2$ , andererseits durch dessen Überführung in HOCl in der Myeloperoxidase-Reaktion. Weiterhin interessant ist die Auswirkung des gebildeten  $H_2O_2$  auf die Liposomen selbst. Im Rahmen dieser Versuche wurde daher einerseits die Entstehung von MDA bei Inkubation von Granulozyten mit GOL, andererseits die MDA-Bildung von GOL im zellfreien Medium beurteilt. Die gesamten Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 grafisch dargestellt.

Bei Stimulation der Granulozyten [ $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml] mit PMA [0,2 mg/ml] bzw. Zymosan [ $3,6 \times 10^6$  Partikel/ml] ließ sich ein Anstieg der MDA-Konzentration

bezogen auf die unstimulierte Kontrolle beobachten. Die MDA-Konzentration betrug dabei ca. das doppelte (PMA) bzw. das Vierfache (Zymosan) des unstimulierten Ansatzes. In Anwesenheit von GOL [1 mM] kam es ebenfalls zu einem Anstieg der MDA-Konzentration, der im Bereich des Zymosan-stimulierten Ansatzes lag.

Im zellfreien Medium wurde die MDA-Konzentration einerseits nach Inkubation in Anwesenheit, andererseits in Abwesenheit von Glucose untersucht. In Abwesenheit von Glucose lag die MDA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Bei Zugabe von Glucose stieg die MDA-Konzentration ebenfalls an. Interessanterweise übertraf die gemessene MDA-Konzentration die des zellulären Ansatzes mit GOL deutlich (Faktor 2).



**Abbildung 3.14: Malondialdehyd-Bildung als Beispiel für die Entstehung von Lipidperoxidationsprodukten.**

MDA-Bildung durch Granulozyten [ $3 \times 10^6$  Zellen/ml] unstimuliert (A) und nach Zugabe von Stimulantien (B, C) bzw. GOL [1 mM] (D). Außerdem dargestellt ist die MDA-Konzentration nach Inkubation von GOL [1 mM] im zellfreien Glucose-Medium [5,6 mM] (F). Im zell- und glucosefreien Puffer (E) konnte keine MDA-Bildung nachgewiesen werden (nicht detektierbar, n. d.). MW aus einer Dreifachbestimmung  $\pm$  SD.

### 3.12 Stabilität der Glucose-Oxidase

Liposomal verkapselte Glucose-Oxidase ist nach der Internalisierung durch phagozytäre Zellen verschiedenen potentiell aktivitätsmindernden Einflüssen unterworfen. Die *in vitro*-Simulation dieser Einflüsse war Grundlage der folgenden Versuche. Als Glucose-Oxidase-Aktivitäten wurden eine sehr hohe (2 U/ml) und eine Konzentration in einer Zehnerpotenz darunter (0,2 U/ml) gewählt. In einigen Versuchen wurde anstelle der niedrigen Konzentration des Reinenzyms GOL eingesetzt. Dabei wurde eine Endkonzentration von 2 mM gewählt, da diese nach den Ergebnissen des  $H_2O_2$ -Assays zu urteilen ca. einer GO-Aktivität von 0,2 U/ml entspricht (vgl. Tab. 3.1).

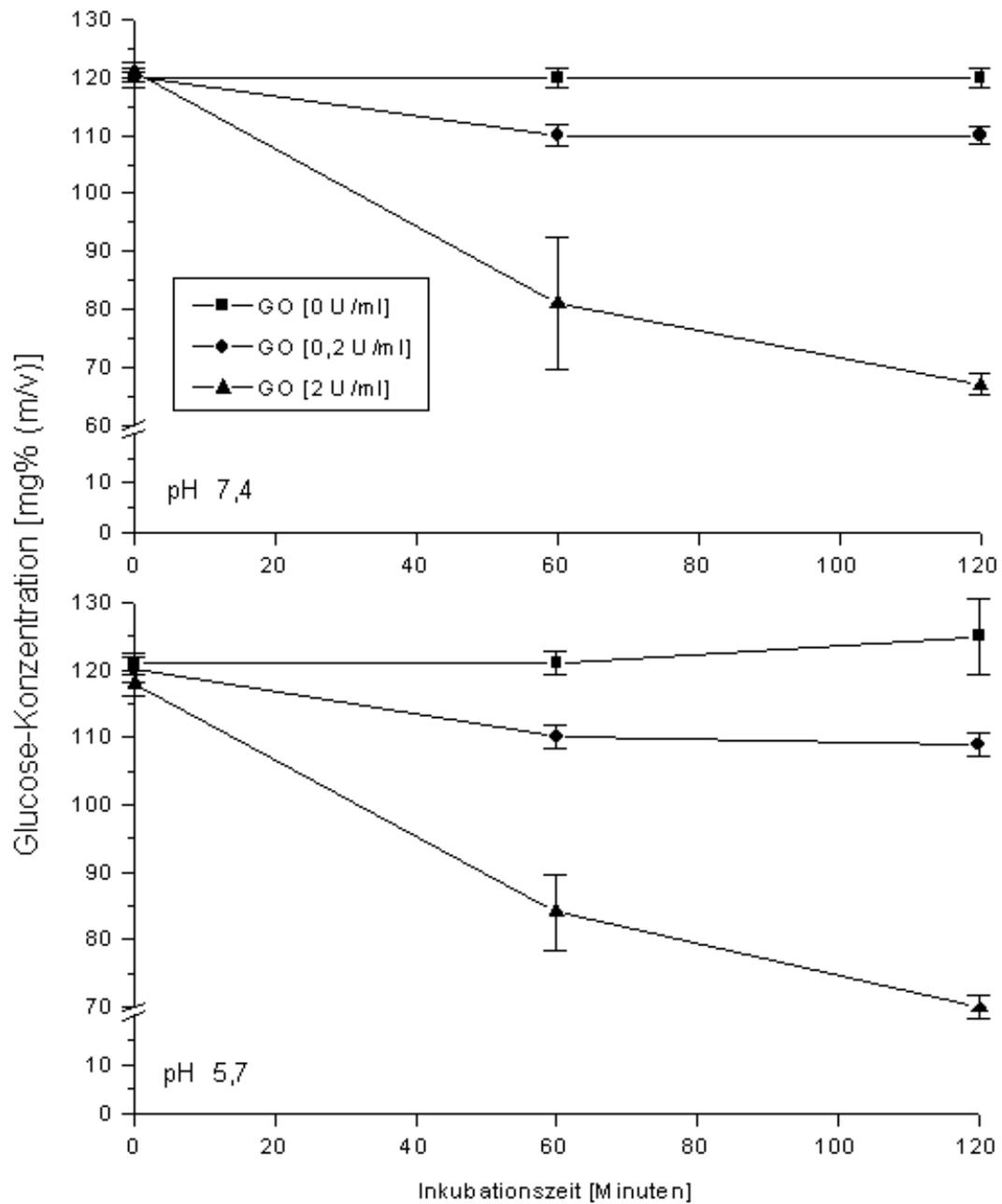
In Abwesenheit von Glucose-Oxidase (GO 0 U/ml) wurde Glucose nicht über andere Prozesse abgebaut. Dies war bei allen Stabilitätsversuchen der Fall, weswegen an anderer Stelle nicht mehr explizit darauf hingewiesen wird.

### 3.12.1 *GO-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten*

Die Aktivität der Glucose-Oxidase wurde im sauren (pH 5,7) und leicht alkalischen (pH 7,4) Milieu untersucht.

Im alkalischen Milieu nahm die Glucose-Konzentration bei Verwendung einer GO-Aktivität von 2 U/ml innerhalb von 2 Stunden kontinuierlich ab. Bei Verwendung einer Aktivität von 0,2 U/ml kam es nach einer Abnahme der Glucose-Konzentration in den ersten 60 Minuten nicht mehr zu einem weiteren Rückgang.

Bei einem pH-Wert von 5,7 war der Verlauf des Glucose-Abbaus für beide verwendeten GO-Konzentrationen nahezu identisch.



**Abbildung 3.15: GO-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.**

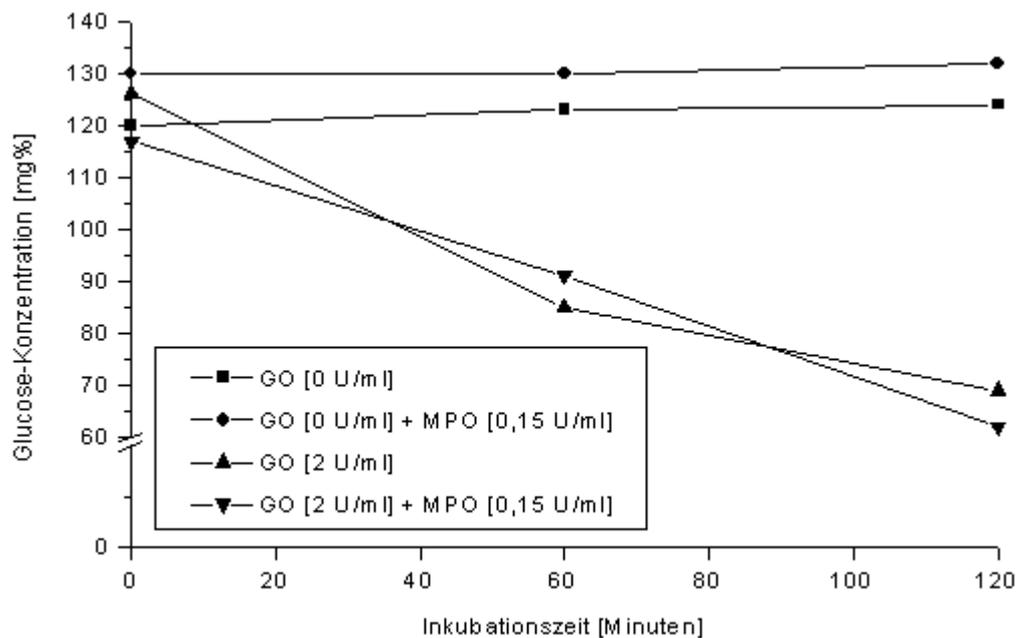
Dargestellt ist die Aktivität als zeitabhängige Abnahme der Glucose-Konzentration.

Oben: pH 7,4. Unten: pH 5,7, MW  $\pm$  SD, n = 3.

### 3.12.2 GO-Aktivität in Anwesenheit von Myeloperoxidase

Myeloperoxidase (MPO) kann in der durch GO katalysierten Reaktion entstandenes  $\text{H}_2\text{O}_2$  in hypochlorige Säure (HOCl) überführen. Dieses hat potentiell degradative Eigenschaften. Untersucht wurde deshalb der Einfluss von Myeloperoxidase auf die GO-Aktivität.

Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von MPO [0,15 U/ml] nicht zu einer Abnahme der GO-Aktivität [2 U/ml] führte (vgl. Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.16: GO-Aktivität in Anwesenheit von Myeloperoxidase.**

Dargestellt ist die GO-Aktivität als zeitabhängige Abnahme der Glucose-Konzentration. Einzelbestimmung.

### 3.12.3 *GO-Aktivität in Anwesenheit granulozytärer Bestandteile*

In den Versuchen zur Beurteilung des Einflusses granulozytärer Bestandteile auf die GO-Aktivität wurden zunächst granulozytäre Inhaltsstoffe nach der Zerstörung der Zellen mit GO inkubiert.

Bei Verwendung von GOL [2 mM] lag die Glucose-Abnahme nach einer bzw. zwei Stunden in Anwesenheit granulozytärer Bestandteile im Bereich des Kontrollansatzes (HBSS). Dies galt sowohl für die Inkubation mit dem Extrakt aus zerstörten Zellen (Gesamtextrakt), als auch für die Inkubation mit Überstand des Extraktes nach Abzentrifugation des zellulären Debris (Überstand).

Interessanterweise war die gemessene Glucose-Abnahme bei Verwendung einer GO-Aktivität von 2 U/ml größer als im Kontrollansatz. Dabei lag die Abnahme, die durch Inkubation mit dem Gesamtextrakt erreicht wurde, über der nach Inkubation mit dem Überstand gemessenen (siehe Tabelle 3.3).

Diese Beobachtungen setzten sich in Untersuchungen fort, in denen Granulozyten durch eine Behandlung mit Cytochalasin B [5 µg/ml] und NfMLP [ $10^{-6}$  M] (vgl. 3.9) degranuliert worden waren. Der Degranulationsüberstand wurde nach Abzentrifugation zellulärer Bestandteile mit GO [2 U/ml] über zwei Stunden inkubiert. Auch hier war – wie Tabelle 3.4 verdeutlicht – die Glucose-Abnahme nach Inkubation mit Degranulationsüberstand stärker als nach Inkubation im Puffer (HBSS).

**Tabelle 3.3: GO-Aktivität in Anwesenheit granulozytärer Bestandteile.**

| Medium    | GO-Konzentration | t = 0 Min | t = 60 Min | t = 120 Min |
|-----------|------------------|-----------|------------|-------------|
| HBSS      | GO [0 U/ml]      | 126 ± 1,7 | 118 ± 3,9  | 121 ± 6,9   |
|           | GOL [2 mM]       | 133 ± 1,6 | 105 ± 9,9  | 101 ± 10,4  |
|           | GO [2 U/ml]      | 127 ± 1,5 | 87 ± 1,8   | 66 ± 2,9    |
| Überstand | GO [0 U/ml]      | 125 ± 1,8 | 121 ± 1,3  | 122 ± 1,7   |
|           | GOL [2 mM]       | 125 ± 1,4 | 106 ± 9,2  | 105 ± 0,8   |
|           | GO [2 U/ml]      | 127 ± 0,8 | 76 ± 10,8  | 54 ± 7,5    |
| Extrakt   | GO [0 U/ml]      | 129 ± 1,6 | 117 ± 6,8  | 122 ± 2,9   |
|           | GOL [2 mM]       | 124 ± 5,7 | 101 ± 0,1  | 107 ± 0,1   |
|           | GO [2 U/ml]      | 125 ± 4,2 | 64 ± 1,9   | 49 ± 1,8    |

Dargestellt ist die GO-Aktivität als zeitabhängige Abnahme der Glucose-Konzentration [mg% (m/v)]. MW ± SD, n = 3. Der Granulozytenextrakt enthielt  $3,5 \times 10^6$  Zellen.

**Tabelle 3.4: GO-Aktivität im Überstand nach Degranulation einer Granulozytensuspension [ $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml] mit Cytochalasin B [5µg/ml] /NfMLP [ $10^{-6}$  M].**

| Medium                  | t = 0 Minuten       | t = 120 Minuten    |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| HBSS                    | 125 ± 1,6 mg% (m/v) | 65 ± 7,0 mg% (m/v) |
| Degranulationsüberstand | 119 ± 0,1 mg% (m/v) | 35 ± 1,7 mg% (m/v) |

Dargestellt ist die GO-Aktivität (Ausgangsaktivität 2 U/ml) als zeitabhängige Abnahme der Glucose-Konzentration [mg% (m/v)]. MW ± SD, n = 3.

## 4. DISKUSSION

### **4.1 *Glucose-Oxidase-haltige Liposomen als neuer Therapieansatz für die NADPH-Oxidase-Defizienz: Vergleich zwischen konventionell hergestellten und lyophilisierten Liposomen***

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, in wieweit GOL nach deren Haltbarmachung durch Lyophilisation in der Lage sind, die Funktionalität NADPH-Oxidase defizienter Granulozyten wieder herzustellen. In Vorarbeiten von *Gerber et al. (2001)* konnte gezeigt werden, dass konventionell hergestellte GOL von Neutrophilen aufgenommen werden und zu einer Rekonstitution des respiratorischen bursts NADPH-defizienter Zellen führen. Im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung der GOL wurde die Beurteilung der Möglichkeiten der Verlängerung der Lagerungszeit der Liposomen nötig. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Funktionalität der lyophilisierten GOL als auch zu potentiellen unerwünschten Wirkungen der GOL durchgeführt. Die Ergebnisse werden hier zum Teil mit den Wirkungen konventionell hergestellter GOL verglichen, um zu einer Beurteilung der Praktikabilität der Lyophilisation in dieser Hinsicht zu gelangen.

#### **4.1.1 *Aufnahme lyophilisierter Liposomen***

Es ist seit langem bekannt, dass Liposomen nach parenteraler Applikation *in vivo* schnell durch phagozytäre Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES) aus dem Blutkreislauf eliminiert werden (*Gregoriadis et al., 1991*). Diese Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit schränkt den Einsatz liposomaler Anwendungen, deren Zielort nicht das RES ist, deutlich ein. Im Falle des Einsatzes von GOL zur Rekonstitution der Funktionalität NADPH-Oxidase-defizienter Granulozyten ist die rasche Aufnahme durch Phagozyten hingegen durchaus erwünscht.

## Aufnahmeuntersuchungen mittels FACS-Analyse

Untersuchungen von *Gerber et al. (2001)* zeigten in Übereinstimmung dazu, dass insbesondere negativ geladene Liposomen *in vitro* sehr selektiv von phagozytären Zellen aufgenommen werden. Lymphozyten waren dabei in FACS-Untersuchungen nur zu sehr geringen prozentualen Anteilen (~ 10 %) fluoreszenzpositiv. Man kann annehmen, dass dies weniger Resultat eines aktiven Aufnahmeprozesses, sondern vielmehr eine unspezifische Adhäsion der Liposomen an die lymphozytäre Zellmembran darstellt. Grund für diese Annahme ist die relativ geringe phagozytäre Aktivität der Lymphozytengesamtpopulation. Zwar gab es für die Adhäsion keine mikroskopischen Hinweise, *Scherphof & Kamps* gehen jedoch davon aus, dass die stabile Adsorption die quantitativ größte Rolle bei der Interaktion zwischen *nicht-phagozytären* Zellen und Liposomen spielt (*Scherphof & Kamps, 1998*). Eine vergleichende Darstellung zwischen den Ergebnissen zur Aufnahme lyophilisierter Liposomen und den von *Gerber 1999* erhobenen Daten zur Aufnahme konventioneller Liposomen zeigt Abbildung 4.1 (Vollblut sowie isolierte Leukozyten, Ergänzung zu Abbildung 3.2, Seite 60).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Aufnahme lyophilisierter Liposomen durch Leukozyten zeigen ebenfalls eine deutliche Selektivität zugunsten phagozytärer Zellen. Interessanterweise werden lyophilisierte Liposomen im Zellisolat im Vergleich zu den Ergebnissen für konventionell hergestellte Liposomen aus den Versuchen von *Gerber (1999)* deutlich besser von Granulozyten aufgenommen. Dieser Unterschied setzte sich jedoch nicht bei den Aufnahmeversuchen in Vollblut fort.

Eine mögliche Erklärung für die verbesserte Aufnahme durch Granulozyten im Isolat könnte die Annahme einer Fusion mehrerer Liposomen bei der Rekonstitution des Lyophilisats geben. Untersuchungen von *Harashima et al. (1999)* zeigten eine Abhängigkeit der granulozytären Aufnahme von der Größe der Liposomen, wobei größere Partikel bevorzugt aufgenommen wurden. Fusionierte Liposomen könnten demnach besser phagozytiert werden. Dass sich dies auch in der FACS-Analyse zeigt, liegt an der Verwendung des

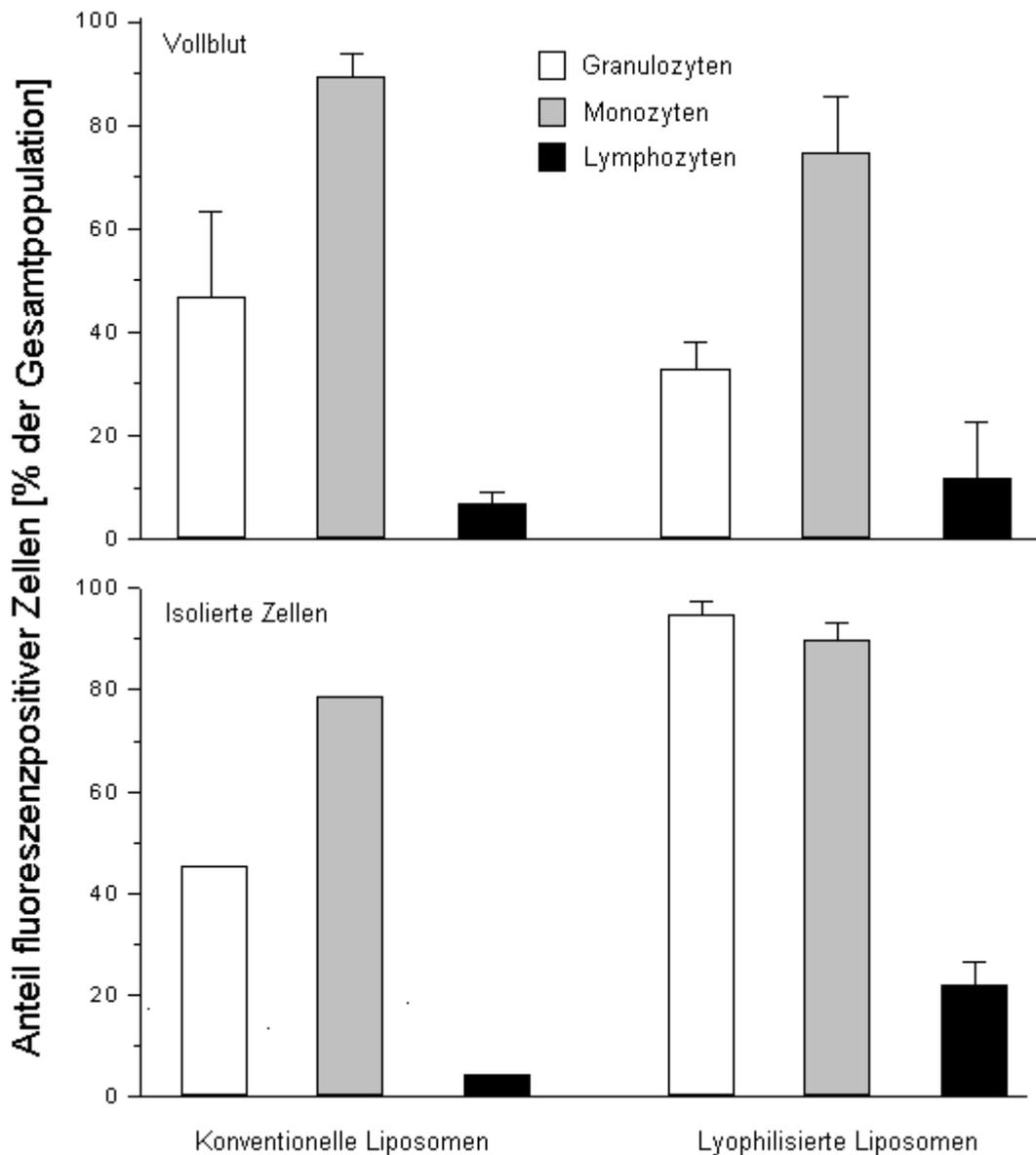
Fluorochroms Rhodamin-B-PE. Es handelt sich dabei um eine lipophile Substanz, die in die liposomale Membran integriert ist (*Falk, 1999*). Dadurch wird es auch bei der Fusion von Liposomen nicht ins Außenmedium freigesetzt, wie dies bei einem hydrophilen Fluorochrom der Fall wäre.

Eine Verbesserung der Aufnahme ungeladener Liposomen durch Anlagerung im Serum enthaltener Opsonine (Komplementfaktoren, Immunglobuline) ist seit einiger Zeit bekannt (*Patel, 1992*). In den Untersuchungen von *Gerber (1999)* zeigte sich, dass negativ geladene Liposomen ungeladenen im Aufnahmeverhalten durch isolierte Phagozyten überlegen sind. Der Zusatz von Serum negativ geladener Liposomen hemmte jedoch deren Aufnahme. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Untersuchungen von *Lee et al. (1992)* und *Scherphof & Kamps (1998)*. Erklärt wird dieses Phänomen durch die Annahme der Interaktion zwischen den polaren Kopfgruppen (namentlich von Phosphatidylserin-, aber auch Phosphatidylglycerol-Molekülen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden) negativ geladener Liposomen und so genannten 'Scavenger-Rezeptoren'. Es wird angenommen, dass Scavenger-Rezeptoren, die unter anderem auf Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES) exprimiert werden, für die Aufnahme von anionischen Molekülen, insbesondere Phosphatidylserin, von Bedeutung sind.

Phosphatidylserin ist bei Säugetier-Zellen normalerweise nur auf der cytoplasmatischen Seite in die zelluläre Bilayer-Membran integriert. Bei apoptotischen und seneszenten oder defekten Zellen (z.B. Sichelzell-Erythrozyten) findet es sich jedoch auch auf der Außenseite. Man nimmt an, dass dies bei der Erkennung und Elimination aus dem Blutstrom dieser Zellen durch Zellen des RES eine Rolle spielt (*Scherphof & Kamps, 1998*). Für Phosphatidylserin wurde bereits ein spezifischer Scavenger-Rezeptor kloniert, es existieren darüber hinaus eine Reihe von Rezeptoren, die auch Strukturanaloga des Phosphatidylserin erkennen und binden können (*Fadok et al., 2000*). Eine Erklärung für die Hemmung der Aufnahme negativ geladener Liposomen durch Zusatz von Serum kann die Annahme der kompetitiven Hemmung von Scavengerrezeptoren durch anionische Serumkomponenten liefern. Wahrscheinlicher ist nach *Scherphof & Kamps* jedoch die 'Maskierung'

der polaren Gruppen geladener Phosphatidylserin bzw. – glycerol-Bausteine durch Moleküle des Serums.

Lyophilisierte Liposomen wurden durch isolierte Granulozyten besser aufgenommen als konventionell hergestellte. Im Vollblut war dies jedoch nicht der Fall. Es ist anzunehmen, dass hierfür ebenfalls solche Mechanismen der Hemmung durch Serumkomponenten verantwortlich sind.



**Abbildung 4.1: Aufnahme konventionell hergestellter und lyophilisierter Liposomen durch isolierte Leukozyten und durch Leukozyten im Vollblut (Egänzung zu Abb. 3.2, Seite 60)**

0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen. 1%-Rhodamin-PE-gelabelte Liposomen (EPG : EPC : Cholesterin = 30:40:30 mol%) [f.c. 1 mM].

Oben: Leukozytäre Aufnahme der Liposomen in Vollblut. MW ± SD, n = 3. Unten: Aufnahme der Liposomen durch isolierte Leukozyten. Daten für lyophilisierte Liposomen als MW ± SD, n = 3, für konventionell hergestellte Liposomen als Einfachwerte. Alle Daten für konventionell hergestellte Liposomen sind übernommen aus der Arbeit von Gerber (1999).

## **Aufnahmeuntersuchungen mit mikroskopischen Verfahren**

Die Ergebnisse, die durch konfokale Laser- und Elektronenmikroskopie gewonnen wurden, zeigen eindeutig eine intrazelluläre Lokalisation der Liposomen. Allerdings geben sie keinen weiteren Aufschluss über das Aufnahmeverhalten phagozytärer Zellen gegenüber lyophilisierten Liposomen, da die Versuche lediglich mit konventionell hergestellten Liposomen durchgeführt wurden. Diese Aufnahmen können jedoch das allgemeine Schicksal der Liposomen beschreiben.

### **Konfokale Lasermikroskopie**

*Babcock* beschrieb die konfokale Lasermikroskopie als exzellente Methode zum Nachweis und anschließender quantitativer Analyse phagozytärer Prozesse (*Babcock, 1999*), insbesondere dann, wenn – wie im Rahmen dieser Arbeit - fluoreszierende Partikel verwendet werden. Dieses Verfahrens ermöglicht darüber hinaus eine eindeutige Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulären Partikeln. Nach den vorliegenden Ergebnissen der FACS-Analyse könnte postuliert werden, dass die Liposomen zwar an der Zellmembran adhären, nicht aber internalisiert werden. Für diese Annahme gab es jedoch, wie die Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie zeigten, keine Hinweise. Völlig auszuschließen ist eine Adhäsion der Liposomen indes nicht; sie spielt quantitativ bei phagozytären Zellen wohl aber eine vernachlässigbare Rolle.

### **Elektronenmikroskopie**

Ultrastrukturelle Untersuchungen hinsichtlich des Schicksals von Liposomen nach deren Internalisierung wurden in der Vergangenheit mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt. *Ho & Huang* publizierten bereits 1983 die Ergebnisse von Experimenten, in denen sie 5-Bromo-, 4-Chloro-, 3-indolylphosphat- (BCIP-) haltige Liposomen mit Zellen einer Hamsterzelllinie inkubiert hatten. BCIP ist ein Substrat saurer Phosphatasen, wie sie in

Lysosomen vorkommen. Diese setzen das BCIP in unlösliche blaue Präzipitate um. Sie konnten zeigen, dass diese Präzipitate in einer BCIP-Liposomen-Suspension, der saure Phosphatasen zugegeben werden, nur dann entstehen, wenn die liposomale Membran zerstört wird, d.h. dass BCIP ins Außenmedium freigesetzt wird.

In elektronenmikroskopischen liposomalen Aufnahmeuntersuchungen konnte blaues Präzipitat intrazellulär nachgewiesen und demnach als Beweis der phagolysosomal-liposomalen Fusion betrachtet werden.

Vorversuche mit BCIP-haltigen Liposomen wurden auch in unserer Arbeitsgruppe unternommen. Vielversprechender waren allerdings Untersuchungen mit Ferritin-haltigen Liposomen. Schon vor über 20 Jahren konnten *Hérmendez-Yago* und Mitarbeiter nachweisen, dass liposomal verkapseltes Ferritin nach Aufnahme durch Hela-Zellen im Cytoplasma und intralysosomal angereichert wird (*Hérmendez-Yago et al., 1980*). Cytochemische Untersuchungen von *Petty & McConnell* zeigten darüber hinaus, dass Ferritin-Liposomen nahezu ausschließlich mit lysosomalen Enzymen assoziiert waren, wohingegen Assoziationen mit Enzymen der Plasmamembran oder des Golgi-Apparates nur in äußerst geringem Maß nachweisbar waren. Diese Untersuchungen geben Hinweise auf eine subzelluläre Prozessierung internalisierter Liposomen in Phagolysosomen (*Petty & McConnell, 1983*). In Übereinstimmung mit den genannten Untersuchungen konnte Ferritin auch intraphagolysosomal nachgewiesen werden. Darüber hinaus war das Ferritin in unmittelbarer Nachbarschaft mit phagozytierten Bakterien lokalisiert. In Einklang mit den mittels konfokaler Lasermikroskopie gewonnenen Daten konnte auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kein Hinweis auf an die Plasma-Membran adhärierende Liposomen gefunden werden. Dies kann jedoch mitunter Folge der Dehydratationsprozedur (Ethanolreihe) mit subsequenter Lyse liposomaler Membranen sein, weswegen die Elektronenmikroskopie darüber keinen Aufschluss zu geben vermag (*Petty & McConnell, 1983*).

Die Kolokalisation von liposomalem Inhalt und phagozytiertem Keim stellt indes für die Funktion der GOL keine grundlegende Voraussetzung dar. Um dies zu

verdeutlichen soll zunächst näher auf potentielle Schicksale der Liposomen am Beispiel der GOL eingegangen werden. Diese sind in Abbildung 4.2 zusammenfassend dargestellt.

### **Schicksal der GOL**

Um die theoretisch denkbaren Schicksale der GO-Liposomen übersichtlich darzustellen, werden im folgenden Bezug nehmend auf Abbildung 4.2. die verschiedenen möglichen Prozessierungsschritte sukzessive abgehandelt:

- **Schritt I:** Nach vorherrschender Meinung (*Peschka-Süss & Schubert; 2001, Scherphof & Kamps, 1998*) werden Liposomen von phagozytären Zellen zunächst rezeptorvermittelt endozytiert. An dieser Stelle kann es bereits zu einer intracytoplasmatischen  $H_2O_2$ -Bildung kommen (Reaktion 1).
- **Schritt II:** An die rezeptorvermittelte Endozytose schließt sich über Frühes und Spätes Endosom die Verschmelzung des Liposoms mit dem Phagolysosom an. Hier kann die GO - immer noch liposomal verkapselt -  $H_2O_2$  generieren (Reaktion 2).
- **Schritt III:** Auch nach Lyse der liposomalen Hülle ist die Entstehung von  $H_2O_2$  durch nunmehr frei vorliegende GO möglich (Reaktion 3). Das im Phagolysosom gebildete  $H_2O_2$  kann in der Myeloperoxidase-Reaktion (Reaktion 4) rasch in HOCl überführt werden.
- **Schritt IV:** Denkbar ist hingegen auch, dass die Membran endozytierter GOL bereits im Cytoplasma lysiert wird. Dann könnte frei im Cytoplasma vorliegende GO  $H_2O_2$  generieren (Reaktion 5).
- **Schritt V:** Die GO würde ebenfalls frei im Cytoplasma vorliegen, wenn die Liposomen nicht rezeptorvermittelt endozytiert werden, sondern mit der zellulären Membran des Neutrophilen verschmelzen würden.

- **Schritt VI:** Es ist weiterhin nicht vollständig auszuschließen, dass die GO auch unverkapselt die Membran des Phagolysosoms penetrieren kann und dort zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beiträgt.

Zusätzlich zu den genannten Prozessierungsschritten und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generierenden Reaktionen sind noch andere Reaktionen in Betracht zu ziehen, die zum größten Teil auf der hohen Diffusibilität des  $\text{H}_2\text{O}_2$  beruhen:

1. Die bloße Adhärenz der GOL an die zelluläre Membran ohne Internalisierung ist denkbar, auch wenn es dafür keine mikroskopischen Hinweise gibt. In diesem Fall könnten die Liposomen zu einer extrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung führen (Reaktion 9). Dieses kann durch antioxidative Systeme des Serums, insbesondere durch Catalase, abgebaut werden (Reaktion 10). Auch eine Diffusion von innerhalb adhärerender GOL gebildetem  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkt ins Cytoplasma ist denkbar (Reaktion 6).
2. Aufgrund seines hohen Diffusionskoeffizienten ( $10^{-2}$  cm/s; *Mathai et al., 1994*) kann das  $\text{H}_2\text{O}_2$  Bilayermembranen ohne wesentliche Einschränkung passieren. Dadurch ist möglich, dass extrazellulär gebildetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Zelle diffundieren kann und umgekehrt (Reaktion 7).
3. Schließlich kann intracytoplasmatisches  $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls ins Phagolysosom diffundieren (Reaktion 8).

### **Abbauprozesse**

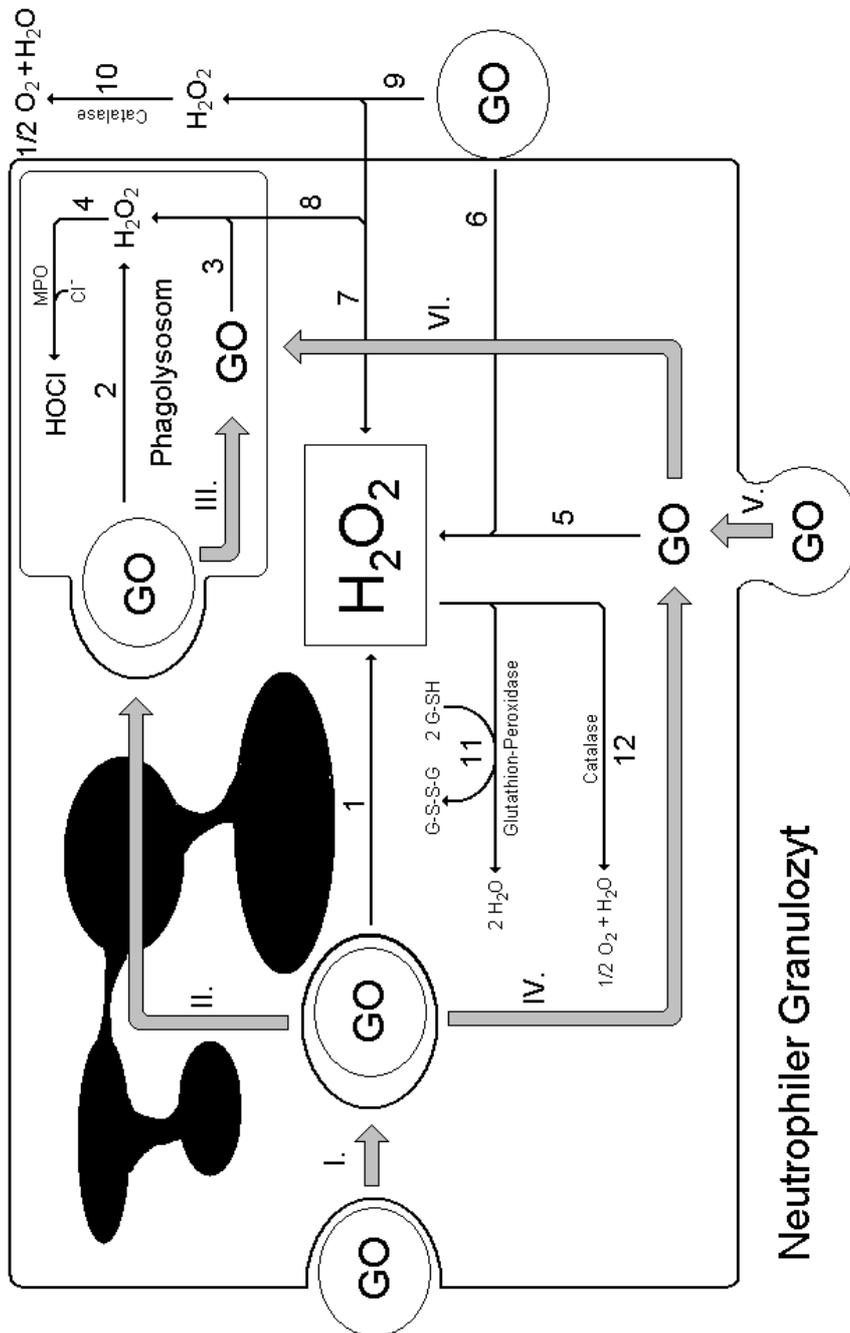
Innerhalb des Cytoplasmas ist das  $\text{H}_2\text{O}_2$  im wesentlichen zwei Abbauprozessen unterworfen (*Segal et al., 2000*). Einerseits kann es in der Glutathionperoxidase-Reaktion unter Oxidation von zwei Glutathionmolekülen in Wasser überführt werden (Reaktion 11).

Andererseits kann es durch Catalase zu molekularem Sauerstoff und Wasser disproportioniert werden (Reaktion 12).

Es wird deutlich, dass durchaus verschiedene theoretische Möglichkeiten der  $H_2O_2$ -Bildung bezogen auf Entstehungsort und Grad der Verkapselung (liposomale GO vs. freie GO) bestehen. Gemeinsam ist aufgrund der hohen Diffusibilität allen beschriebenen Varianten die potentielle Einmündung des  $H_2O_2$  in die Myeloperoxidase-Reaktion, wo es in HOCl überführt werden kann. Unterschiedlich ist jedoch, inwieweit das  $H_2O_2$ , aber auch die GO dem Einfluss abbauender Prozesse unterworfen ist. Während auf dem Weg über rezeptorvermittelten Endozytose über Frühes und Spätes Endosom mit Einmündung ins Phagolysosom das  $H_2O_2$  zu großen Teilen in HOCl überführt werden kann, wird bei intracytoplasmatischer oder gar extrazellulärer  $H_2O_2$ -Entstehung ein substantieller Teil vor Erreichen des Phagolysosoms eliminiert. Dies würde die therapeutische Potenz der GO für die CGD abschwächen.

Auch die GO ist degradativen Prozessen unterworfen. In diesem Zusammenhang sind vor allem proteolytische Enzyme, speziell innerhalb des Phagolysosoms von Bedeutung. Es ist anzunehmen, dass die liposomale Formulierung der GO gegen Einflüsse von Proteasen weit besser geschützt ist, als das bei frei vorliegendem Enzym der Fall ist (*Storm & Crommelin, 1998*). Nach *Peschka-Süss & Schubert (2001)* ist der klassische Phagozytoseweg auch für die Aufnahme von Liposomen gültig. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Ferritin-haltigen Liposomen sowohl im Rahmen dieser Arbeit, als auch aus den Untersuchungen von *Petty & McConnell, 1983*, sowie *Hernandez-Yago und Mitarbeitern, 1983*.

Festzuhalten bleibt also, dass dieser Weg für die Funktionalität der GO zwar nicht obligat, aber doch von entscheidendem Vorteil ist.



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des potentiellen Schicksals von GOL im Neutrophilen.**

Römische Ziffern: Prozessierung der Liposomen. Arabische Ziffern: Schicksal des Reaktionsproduktes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GO = Glucose-Oxidase. MPO = Myeloperoxidase. G-SH = Reduzierte Form des Glutathions. G-S-S-G = Oxidierte Form des Glutathions.

### 4.1.2 ***Funktion lyophilisierter Liposomen***

Zur Überprüfung der Funktionalität der lyophilisierter GOL wurde zunächst deren Eigenschaft als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produzent untersucht. Es zeigte sich dabei durchgehend, dass lyophilisierte Liposomen nach deren Rekonstitution eine höhere GO-Aktivität aufweisen als konventionell hergestellte. Dies wird durch Versuche zur Kinetik der GOL, die Frau Andrea Kimpfler an der Universität Freiburg, Abt. Pharmazeutische Technologie (Leitender Direktor: Prof. Dr. Schubert), durchführte, erklärbar. Sie fand heraus, dass liposomal verkapselte GO verglichen mit frei vorliegendem Enzym eine bis zu 80-fach verminderte Reaktionsgeschwindigkeit zeigt. Dabei ist die Glucose der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da sie durch liposomale Membranen erschwert diffundieren kann. Sowohl molekularer Sauerstoff als auch das Reaktionsprodukt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchdringen Bilayermembranen hingegen leicht (Diffusionskoeffizienten 0,5 bzw. 1 x 10<sup>-2</sup> cm /s, *Subczynski et al., 1989* bzw. *Mathai et al., 1994*), sodass Membranen für sie vernachlässigbare Hindernisse darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass dies auch für die Plasmamembran Neutrophiler, insbesondere für die von CGD-Zellen gilt (*Ohno & Gallin, 1985*). Legt man nun die Ergebnisse der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bestimmungen zugrunde, so muss davon ausgegangen werden, dass bei der Rekonstitution lyophilisierter Liposomen ein Teil der zuvor verkapselten GO ins Außenmedium freigesetzt wird. Dadurch ist ein besserer Zugang eines Teils der GO zur Glucose gegeben, wodurch die gemessene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion ansteigt.

#### **Liposomales Leaking**

Für das Verständnis des Austretens liposomal verkapselten Inhalts ins Außenmedium ('Liposomales Leaking') sind mehrere Faktoren zu beachten. Wichtig ist dabei erstens, dass es sich bei der GO um eine hydrophile Substanz handelt. Im Gegensatz zu lipophilen Substanzen (wie Amphotericin B) liegt die GO interlamellar vor und kann bei Fusion der Liposomen ins Außenmedium diffundieren. Lipophile Substanzen werden hingegen in die Bilayermembran der

Liposomen integriert und selbst bei der Fusion mehrerer Liposomen nur in sehr geringem Maß ins Außenmedium freigesetzt (*Adler-Moore & Profitt, 1993*).

Ein weiterer wichtiger Punkt liegt in der Verwendung der Kryoprotektoren Glycerol und Mannitol begründet. Es ist bekannt, dass Disaccharide und darunter insbesondere Trehalose die besten kryoprotektiven Eigenschaften aufweisen (*Anchordougy et al., 1987; Harrigan et al., 1990*). Bei der Lyophilisation liposomal verpackter GO können diese jedoch aufgrund der geringen Substratspezifität nicht verwendet werden. Untersuchungen die Andrea Kimpfler an der Universität Freiburg im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten nämlich, dass sowohl Trehalose, als auch Saccharose und Sucrose von der GO zu  $H_2O_2$  umgesetzt wurden. Daher wurden die Polyole Mannitol und Glycerol eingesetzt, die nicht bzw. kaum als Substrat der GO fungieren.

Die Annahme, dass GO bei der Rekonstitution der lyophilisierten Liposomen teilweise ins Außenmedium freigesetzt wird, wird auch durch die Versuche zur Rekonstitution der HOCl-Bildung NADPH-defizienter Zellen mittels Gabe konventionell hergestellter und lyophilisierter GOL unterstützt. Sowohl in Messungen der Chemilumineszenz als auch in Bestimmungen der HOCl-Produktion fanden sich bei direkter Zugabe lyophilisierter Liposomen zu den Granulozyten verglichen mit konventionellen Liposomen stets höhere Werte. Dies spricht wiederum für einen Anteil frei vorliegender GO, der zu einer stärkeren  $H_2O_2$ -Produktion im Ansatz führt. Dieses kann dann in die Zellen diffundieren und in der MPO-Reaktion in HOCl überführt werden.

Eine umgekehrte Tendenz zeigte sich für die Vorinkubation der Zellen mit lyophilisierten bzw. konventionell hergestellten Liposomen. Hier führten die konventionell hergestellten Liposomen stets zu höheren HOCl-Bildungsraten (bestimmt sowohl mittels Chemilumineszenz als auch mittels TNB-Methode). Hier wird nach der Vorinkubation der Zellen mit den jeweiligen GOL das Außenmedium abgesaugt, wodurch die frei vorliegende GO entfernt wird. Der Anteil der GO, der ins Außenmedium freigesetzt wird, fehlt freilich innerhalb der Zelle, wodurch die niedrigere HOCl-Produktion erklärbar wird.

Die Erhöhung der Lipidkonzentration der lyophilisierten Liposomen im Vorinkubationsansatz auf das Fünffache bewirkte eine Steigerung der HOCl-Bildung als auch der Intensität des Chemilumineszenz-Signals. Zwar kann dadurch der Anteil verkapselter GO nicht gesteigert werden. Die Erhöhung der absoluten Zahl intakter Liposomen scheint jedoch auszureichen, um die intrazelluläre GO-Konzentration nach den Waschprozessen zu erhöhen. Die durch diese mit der TNB-Methode ermittelte Steigerung der HOCl-Bildung lag unterhalb des Fünffachen Wertes der 1 mM Lipidkonzentration, was dafür spricht, dass ab einer gewissen Lipidkonzentration nicht mehr Liposomen phagozytiert werden können. In der Chemilumineszenz zeigte sich jedoch eine Erhöhung der Signalintensität auf das Zehnfache des 1 mM-Ansatzes. Diese überproportionale Steigerung kann indes nicht vollständig erklärt werden. Es wird jedoch in der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz nicht spezifisch HOCl, sondern auch andere reaktive Sauerstoffverbindungen, insbesondere auch  $H_2O_2$  selbst detektiert (*Vilim et al., 1989*). Möglich wäre also auch eine Detektion von  $H_2O_2$ , ohne dass dieses in der MPO-Reaktion in HOCl überführt wurde.

Alle bisher gefundenen Ergebnisse sprechen dafür, dass GOL während ihrer Inkubation mit Granulozyten phagozytiert werden und dann *intrazellulär*  $H_2O_2$  produzieren, welches in der MPO-Reaktion in HOCl überführt wird. Dennoch musste eine weitere Alternative untersucht werden, die zumindest einen Teil der funktionellen Ergebnisse ebenfalls erklärbar machen würden. Es kann nämlich postuliert werden, dass die Liposomen nicht zellulär aufgenommen werden, wohl aber zu einer Degranulation der Granulozyten führen. Dadurch würde die in primären Granula enthaltene MPO ins Außenmedium abgegeben. Die Liposomen würden mit Hilfe der Glucose des Mediums  $H_2O_2$  bilden, welches dann *extrazellulär* in HOCl überführt werden könnte. Dies würde bei *in vitro* Assays zu einer Steigerung der HOCl-Konzentration im Ansatz führen, wäre für die Übertragbarkeit des Konzeptes *in vivo* jedoch fatal. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Liposomen keine substantielle Degranulation der Granulozyten bewirken.

### **4.1.3 Unerwünschte Wirkungen der lyophilisierten Liposomen**

Neben der erwünschten Rekonstitution der Funktionalität von CGD-Granulozyten sind eine Reihe unerwünschter Effekte der GOL denkbar. Man kann dabei zwischen Wirkungen der Bestandteile der liposomalen Membran, des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (bzw. dessen Folgeprodukte) auf Zellen sowie Wirkungen des Enzyms GO selbst unterscheiden.

#### **Chemotaxis**

Untersuchungen von *Hatipoglu* und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass einige Phospholipide die Reaktion von Neutrophilen auf chemotaktische Stimuli abschwächen. In der Arbeit von *Gerber et al.* (2001) konnte gezeigt werden, dass diese Abschwächung auch bei konventionell hergestellten GOL beobachtbar war. Diese Ergebnisse konnten in eigenen Versuchen zur Chemotaxis bestätigt werden. Es bleibt jedoch, sowohl bei Vorinkubation der Granulozyten mit konventionell hergestellten, als auch bei lyophilisierten Liposomen eine substantielle chemotaktische Fähigkeit erhalten.

#### **Lipidperoxidation**

In Untersuchungen zur Lipidperoxidation wurde die Wirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen einerseits auf die liposomale Membran selbst, andererseits auf die Zellmembran beobachtet. Gemessen wurde die Lipidperoxidation als Konzentration von Malondialdehyd (MDA), dem bei weitem bedeutendsten Lipidperoxidationsprodukt. Es ist bekannt, dass MDA bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ('polyunsaturated fatty acids', PUFAs) entsteht. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von mindestens 2 Doppelbindungen in der Fettsäure (*Esterbauer et al.*, 1990). Besonders gut untersucht ist die Bildung von MDA aus PUFAs bei der Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL), dem eine atherogene Wirkung

zugesprochen wird. Dabei entsteht das MDA hauptsächlich aus dem Eicosanoid Arachidonsäure (20:4) (*Esterbauer et al., 1990*). Arachidonsäure ist in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Liposomen nur zu einem geringen Anteil enthalten (ca. 4 % der Fettsäuren, s. Tabelle 2.1, Seite 36). Andere PUFAs, z.B. Linoleat (18:2), stellen jedoch einen substantiellen Teil der Lipidzusammensetzung dieser Liposomen. Phospholipidliposomen wurden schon in einer ganzen Reihe von Arbeiten als Modell für den Nachweis der Entstehung von MDA durch Oxidation verwendet (z.B. *Montfoort et al., 1987*, *Winterbourn und Carr, 1993*). *Panasenko et al.* verwendeten 1997 für die Oxidation von Liposomen durch Hypochlorit Ei-Phosphatidylcholin, vergleichbar dem, das auch Grundlage der Liposomen dieser Arbeit war.

Bei den Versuchen zur Lipidperoxidation zeigte sich, dass es durch die Anwesenheit lyophilisierter GOL durchaus zu einer erheblichen Bildung von Lipidperoxidationsprodukten bei Neutrophilen kommt. Diese liegt in der Größenordnung derer, die durch künstliche Aktivierung gesunder Neutrophiler erreicht wird.

Bei lyophilisierten GOL alleine konnten nach der Redisperion ohne Zusatz von Glucose keine Lipidperoxidationsprodukte nachgewiesen werden, sodass vermutet werden kann, dass sie als Lyophilisat relativ geschützt sind gegen oxidative Einflüsse. In Anwesenheit von Glucose konnte hingegen ein massiver Anstieg der Lipidperoxidationsprodukte in liposomalen Membranen beobachtet werden, der deutlich über dem lag, was in zellulären Ansätzen gemessen wurde. Dies liegt möglicherweise an im Neutrophilen vorhandenen antioxidativen Systemen, wie Catalase oder Glutathion-Peroxidase, die dazu in der Lage sind, einen Teil des gebildeten  $H_2O_2$  abzubauen und die in Liposomen nicht vorhanden sind.

### **Inaktivierung freier GO durch monoklonale Antikörper**

Im Hinblick auf die Anwendung der lyophilisierten GOL *in vivo* wurden Versuche zur Inaktivierung frei vorliegender GO unternommen. Wie oben diskutiert, scheint bei der Redisperion der lyophilisierten GOL ein Teil des vorher

verkapselten Enzyms ins Außenmedium zu entweichen. Diese würde – beispielsweise bei intravenöser Applikation – Blutglucose in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführen. Diese Effekte sind unerwünscht und eine Inaktivierung frei vorliegender GO durch spezifische Antikörper wäre daher von Vorteil. Der hier verwendete GO-Antikörper führte jedoch nicht zu einer Abnahme der Aktivität. Es kann also vermutet werden, dass die Antikörper zwar binden, dadurch jedoch keine aktivitätsmindernde Konformationsänderung des Enzyms bewirkt wird. *Ahmad* und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die GO unter Einwirkung monovalenter Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ), wie sie in dem im Rahmen dieses Versuchs verwendeten Puffer vorhanden waren, zu einer Konformationsänderung der GO führen, die sie gegenüber inaktivierenden Einflüssen erstaunlich stabil macht (*Ahmad et al.*, 2001). Dies mag zumindest teilweise auch für die fehlende Inaktivierung durch Antikörperbindung verantwortlich sein.

Es konnte darüber hinaus in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen (*Renner et al.*, 2001; *Gerber et al.*, 2001) gezeigt werden, dass die anti-oxidative Kapazität des Blutes bzw. humaner Erythrozyten selbst bei hohen GO-Konzentrationen ausreicht, um gebildetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum größten Teil abzubauen.

In Versuchen an Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass erst äußerst hohe Dosen (1 U/ g KG (!)) von intravenös applizierter GO zu schwerwiegenden Nebenwirkungen bis hin zum Exitus letalis der Tiere führen (*Samoszuk et al.*, 1993).

#### **4.2 Untersuchungen zur Stabilität der Glucose-Oxidase: Simulation degradativer Einflüsse nach zellulärer Aufnahme von Glucose-Oxidase-haltigen Liposomen**

In Kapitel 4.1 wurde die Funktionalität Glucose-Oxidase-haltiger Liposomen und deren Lyophilisate dargelegt. An dieser Stelle wurde auch auf die potentiellen Schicksale der Liposomen nach deren Aufnahme in phagozytäre Zellen eingegangen. Ein wichtiger Aspekt ist in diesem Zusammenhang allerdings noch nicht näher betrachtet worden: Das Schicksal des liposomal verpackten Inhaltes, d.h. der Glucose-Oxidase.

Die Glucose-Oxidase unterliegt entsprechend der intrazellulären Prozessierung der Liposomen unterschiedlichen Milieus und potentiell degradativen Einflüssen. Rekapitulierend kann festgehalten werden, dass die GO nach der zellulären Internalisierung zunächst dem Milieu des Cytosols (pH ~ 7) ausgesetzt ist (vgl. Abb. 4.2). Den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge scheint sich daran eine Verschmelzung der Liposomen mit dem Phagolysosom anzuschließen, wodurch die GO in das saure Milieu (pH ~ 5) des Phagolysosoms freigegeben wird. Innerhalb dieses Kompartiments ist das Enzym außerdem den potentiell degradativen Einflüssen lysosomaler Proteasen (z.B. Saure Hydrolasen) unterworfen. Schließlich wird das in der GO-Reaktion freigesetzte  $H_2O_2$  bzw. nach dessen Halogenierung durch lysosomale MPO entstandenes HOCl oxidativen Stress auf das Enzym selbst ausüben können.

Zusammenfassend können die wichtigsten potentiell aktivitätsmodulierenden Einflüsse also folgendermaßen beschrieben werden:

1. Änderungen der Protonenkonzentration (insbesondere Azidifizierung)
2. Degradation der GO durch proteolytische Enzyme
3. Oxidation durch  $H_2O_2$  bzw. dessen Produkte

Auf jeden dieser Punkte soll im folgenden eingegangen werden.

### **Einfluss von Änderungen der Protonenkonzentration auf die Aktivität der GO**

In der Literatur wird das pH-Optimum für native GO mit 5,6 angegeben (*Ahmad et al. 2001*). Ahmad und Mitarbeiter führten außerdem Versuche durch, bei denen die GO mit verschiedenen monovalenten Kationen inkubiert wurde. Hier zeigte sich ein deutlicher Verlust der Aktivität bei stark sauren und alkalischen pH-Werten verglichen mit nativem Enzym. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Versuche in Abwesenheit von Ionen verzichtet, da diese Situation der *in vivo* nicht entspricht. In humanen Zellen enthält die intrazelluläre Flüssigkeit sowohl  $Na^+$ , als auch  $K^+$ -Ionen [ca. 10 bzw. 150 mM]. Im Blutplasma liegen diese

Ionen mit 140 bzw. 4 mM in nahezu umgekehrtem Konzentrationsverhältnis vor. Nach *Ahmad* und Mitarbeitern sind die aktivitätsmindernden Einflüsse dieser Kationen bereits ab einer Konzentration von 20 mM beobachtbar. Im Rahmen eigener Versuche konnte kein Unterschied in der enzymatischen Aktivität der GO bei pH-Werten von 5,7 und 7,4 festgestellt werden, die das Milieu der verschiedenen für die Prozessierung der GOL relevanten Kompartimente (Cytosol, Phagolysosom, siehe oben) imitieren sollten. *Uppor & Neibergall* konnten 1996 in der Tat einen vom pH-Wert abhängigen Verlust der GO-Aktivität beobachten. Allerdings lag deren Beobachtungszeitraum auch im Bereich mehrerer Tage bis mehrerer Wochen, wohingegen bei eigenen Versuchen lediglich der für das Konzept der GOL entscheidende Zeitraum von 2 Stunden betrachtet wurde.

### **Degradation der GO durch proteolytische Enzyme**

Es ist davon auszugehen, dass liposomal verpackte GO - als hydrophiles Molekül im Innern des Liposoms eingelagert – solange gegen degradative Einflüsse proteolytischer Enzyme geschützt ist wie die Integrität des Liposoms aufrecht erhalten bleibt. Oxidation der liposomalen Membranbestandteile durch enzymatisch generiertes  $H_2O_2$  scheint auf die Integrität des Liposoms keinen Einfluss zu haben (*Anzai et al., 1999*). Eine Degradation der liposomalen Hülle findet vor diesem Hintergrund wahrscheinlich weniger im Cytosol als vielmehr innerhalb des Phagolysosoms durch enzymatisch vermittelte Prozesse statt. Hier ist auch die GO enzymatischen Abbauprozessen durch saure Hydrolasen unterworfen. Versuche von *Ahmad* und Mitarbeitern, die die GO mit der Protease Subtilisin inkubierten, zeigten, dass die Inkubation mit monovalenten Kationen das Enzym gegen proteolytische Prozesse sehr gut zu schützen scheint, wohingegen das Enzym in Abwesenheit dieser Ionen durch die Protease denaturiert werden konnte.

Diese Beobachtung konnte durch eigene Versuche bestätigt werden. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit (durch Zerstörung bzw. Degranulation von Granulozyten gewonnener) granulozytärer Bestandteile und Inhaltsstoffe kein

Verlust enzymatischer Aktivität beobachtet werden konnte. Auch hier waren im Inkubationsansatz monovalente Kationen in physiologischen Konzentrationen vorhanden.

### **Einfluss von oxidativem Stress auf die Aktivität der GO**

In den Versuchen zur Lipidperoxidation konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus der GO-Reaktion zur Bildung von Malondialdehydmolekülen als Beispiel für Lipidperoxidationsprodukte führt. Theoretisch denkbar ist auch eine Oxidation des Enzyms selbst durch das  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die zu einem Verlust enzymatischer Aktivität führen könnte. *Valdes & Moussy* konnten dies in der Tat 2000 in Versuchen, die sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* durchgeführt wurden, belegen. Wiederum handelte es sich bei den Versuchen aber um Langzeitbeobachtungen, die sich auf einen Zeitraum von 4 Wochen bezogen. In den Versuchen dieser Arbeit wurde die Aktivität in Anwesenheit von MPO untersucht, um auch oxidative Effekte des reaktiveren HOCl als Folgeprodukt des  $\text{H}_2\text{O}_2$  einzuschließen. Es zeigte sich, dass in dem beobachteten Zeitraum von 2 Stunden keine Abnahme der Enzymaktivität erfolgte. Es scheint also, als sei das Enzym gegen oxidativen Stress relativ gut geschützt. Dies ist auch nicht unbedingt verwunderlich, wenn man bedenkt, dass ein Produkt der GO-Reaktion das Oxidans  $\text{H}_2\text{O}_2$  darstellt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Der angeborene Defekt der NADPH-Oxidase phagozytärer Zellen führt zum schweren Krankheitsbild der Septischen Granulomatose (CGD). Durch die Aufnahme Glucose-Oxidase-haltiger Liposomen (GOL) kann die Funktionalität NADPH-Oxidase-defizienter neutrophiler Granulozyten *in vitro* rekonstituiert werden.

Konventionell hergestellte GOL sind in wässriger Lösung nur in begrenztem Maße haltbar. Ein potentieller Ansatz für die Verlängerung der Haltbarkeit der GOL, die von großer Bedeutung für die Anwendbarkeit des Konzeptes *in vivo* ist, stellt die Lyophilisation der Liposomen dar. Zielsetzung der Arbeit war einerseits zu beurteilen, ob die Lyophilisation der GOL in ihrer Anwendbarkeit *in vitro* mit konventionellen GOL vergleichbar ist. Andererseits war von Interesse, wie stabil die Glucose-Oxidase (GO) nach der Internalisierung der GOL durch Granulozyten gegenüber intrazellulären Einflüssen ist.

### Lyophilisierte Liposomen

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Vergleich lyophilisierter mit konventionell hergestellten GOL. Hier konnte zunächst belegt werden, dass lyophilisierte Liposomen – in vergleichbarem Maße wie konventionell hergestellte – selektiv durch phagozytäre Zellen aufgenommen werden, was als Hinweis für einen aktiven Aufnahmeprozess gewertet werden kann. Anhand verschiedener funktioneller Assays konnte anschließend gezeigt werden, dass die *in vitro*-Wirkungen lyophilisierter GOL auf CGD-Granulozyten mit den durch konventionelle Liposomen erreichten Effekten vergleichbar sind. Dabei wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch die GOL, sowie die Chemilumineszenz und HOCl-Bildung durch Granulozyten unter Einfluss von GOL betrachtet. Aus den Daten der funktionellen Assays ließ sich schließen, dass bei der Rekonstitution des Lyophilisats ein Teil der zuvor verkapselten GO ins Außenmedium überging. Trotzdem übertraf das Ausmaß unerwünschter Effekte lyophilisierter GOL auf Neutrophile *in vitro* das Ausmaß konventioneller GOL nicht. Untersucht wurden

hierbei Einflüsse auf das chemotaktische Verhalten der Granulozyten, die Entstehung von Lipidperoxidationsprodukten und liposomal induzierter Degranulation der Zellen. Es zeigte sich, dass die chemotaktischen Fähigkeiten der Granulozyten durch GOL zwar gehemmt, nicht aber aufgehoben wurden. Die Bildung von Malondialdehydmolekülen als Beispiel für Lipidperoxidationsprodukte lag bei Zugabe von GOL in der Größenordnung, die durch Aktivierung der Neutrophilen durch Zymosan erreicht wird. GOL führten nicht zu einer Freisetzung von Granulainhalten.

In elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte das Schicksal konventioneller Liposomen nach deren Internalisierung durch Neutrophile zudem dezidiert beurteilt werden. Es konnte eine intrazelluläre Lokalisation der Liposomen nachgewiesen werden. Zudem waren liposomale Inhalte im Phagolysosom mit phagozytierten *Staphylococcus aureus* kolokalisiert.

### **Stabilität der Glucose-Oxidase**

Liposomal verpackte Glucose-Oxidase ist nach ihrer Internalisierung durch Granulozyten und im Zuge der intrazellulären Verarbeitung verschiedenen potentiell aktivitätsmindernden Prozessen unterworfen. Wichtig sind in diesem Zusammenhang vor allem die unterschiedlichen pH-Werte von Cytoplasma (ca. 7) und Phagosom (ca. 5), die degradative Wirkung lysosomaler saurer Hydrolasen, aber auch oxidativer Stress durch enzymatisch generiertes  $H_2O_2$  und dessen Folgeprodukt HOCl aus der Myeloperoxidase-Reaktion.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Stabilität der GO gegenüber Veränderungen des pH-Wertes (pH 5,7 bzw. pH 7,4, entsprechend den pH-Werten der intrazellulären Kompartimente), oxidativen Prozessen und granulozytären Bestandteilen und Inhaltsstoffen (Degranulationsinhalt und granulozytärer Extrakt) untersucht. Bei der Beurteilung der oxidativen Effekte wurde die Auswirkung von in der GO-Reaktion generiertem  $H_2O_2$  selbst, als auch – durch Zugabe von MPO – dessen Folgeprodukt HOCl auf das Enzym untersucht.

Es zeigte sich, dass es in einem Zeitraum von zwei Stunden unter keiner der Untersuchungssituationen zu einer Abnahme der enzymatischen Aktivität kam. Es ist daher anzunehmen, dass die GO intrazellulär zumindest in den ersten 2 Stunden ohne nennenswerten Aktivitätsverlust  $\text{H}_2\text{O}_2$  generiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Lyophilisation der GOL durchaus einen Ansatz zur Verlängerung der Haltbarkeit der Liposomen darstellt und für eine Anwendbarkeit *in vivo* in Betracht gezogen werden kann. Die GO scheint gegenüber aktivitätsmindernden Einflüssen relativ stabil zu sein und ist damit für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung im aggressiven Milieu des Phagolysosoms sehr gut geeignet.

## 6. LITERATUR

Adler-Moore, J.P., Profitt, R.T. (1993). Development, Characterization, Efficacy and Mode of Action of Ambisome, a Unilamellar Liposomal Formulation of Amphotericin B. *J. Lip. Res.* **3**: 429-450

Ahmad, A., Akhtar, M.S., Bhakuni, V. (2001). Monovalent Cation-Induced Conformational Change in Glucose-Oxidase Leading to Stabilization of the Enzyme. *Biochemistry.* **40**: 1945-1955

Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H. (1987). Modes of Cryoprotectants with Membrane Phospholipids during Freezing. *Cryobiology.* **24**: 324-331

Anzai, K., Ogawa, K. Goto, Y., Senzaki, Y., Ozawa, T., Yamamoto, H. (1999). Oxidation-Dependent Changes in the Stability and Permeability of Lipid Bilayers. *Antioxid. Redox. Signal.* **1**: 339-347

Ausborn, M., Nuhn, P. (1990). Möglichkeiten und Probleme der Stabilisierung von Liposomen durch Frier- und Lyophilisationsverfahren. *Pharm. Ztg. Wiss.* **5**: 183-188

Babcock, G.F. (1999). Quantitation of Phagocytosis by Confocal Microscopy. *Meth. Enzymol.* **307**: 319-328

Bendas, G. (1994). Lyophilisierte Liposomen. Dissertation, Halle

Bruchelt, G., Schmidt, K.H. (1984). Comparative Studies on the Oxidative Process During Phagocytosis Measured by Luminol-Dependent Chemiluminescence. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **22**: 1-13

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

Coffey, R.G. (1992). Granulocyte Responses to Cytokines. Lehrbuch, Marcel Dekker, Inc New York, NY USA

Crowe, L.M., Crowe, J.H. (1992). Anhydrobiosis: a Strategy for Survival. *Adv. Space Res.* **12**: 239-247

Di Bartolomeo, P., Di Girolamo, G., Angrilli, F., Schettini, F., De Mattia, D., Manzionna, M.M., Dragani, A., Iacone, A., Torolanto, G. (1989). Reconstitution of Normal Neutrophil Function in Chronic Granulomatous Disease by Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **4**: 695-700

- Dinauer, M.C., Li, L.L., Björgvinsdóttir, H., Ding, C., Pech, N. (1999). Long-Term Correction of Phagocyte NADPH Oxidase Activity by Retroviral-Mediated Gene Transfer in Murine X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *Blood*. **94**: 914-922
- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl, G., Jürgens, G. (1990). Biochemical, Structural and Functional Properties of Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* **3**: 77-92
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A. Ezekewitz, R.A.B., Henson, P.M. (2000). A Receptor for Phosphatidylserine-Specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature*. **405**: 85-90
- Gerber, C.E. (1995). Der oxidative Stoffwechsel aktivierter Granulozyten von gesunden Personen im Vergleich zu Personen mit einem Myeloperoxidasemangel. Diplomarbeit, Tübingen.
- Gerber, C.E. (1999). Enzymdefiziente Granulozyten: Kompensation der Myeloperoxidase-Defizienz und in vitro-Behandlung des NADPH-Oxidase-Defektes mit Glucose-Oxidase-haltigen Liposomen. Dissertation, Tübingen.
- Gerber, C.E., Bruchelt, G., Falk, U.B., Kimpfler, A., Hauschild, O., Kuçi, S., Bächli, T., Niethammer, D., Schubert, R. (2001). Reconstitution of Bactericidal Activity in Chronic Granulomatous Disease Cells by Glucose-Oxidase-Containing Liposomes. *Blood*. **98**: 3097-3105
- Gregoriadis, G. (1991), Overview of Liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**: 39-48
- Harashima, H., Sakata, K., Funato, K. Kiwada, H. (1994). Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharm. Res.* **11**: 402-406
- Harrigan, P.R., Madden, T.D., Cullis, P.R. (1990). Protection of Liposomes During Dehydration or Freezing. *Chem. Phys. Lipids*. **52**: 139-149
- Hatipoglu, U., Gao, X., Verral, S., Sejourne, F., Pitrak, D., Alkan-Onyuksel, M., Rubinstein I. (1998). Sterically Stabilized Phospholipids Attenuate Human Neutrophil Chemotaxis in Vitro. *Life Sci.* **63**: 693-699
- Henderson, L.M., Chapell, J.B. (1993). Dihydrorhodamine 123: a Fluorescent Probe for Superoxide Generation? *Eur. J. Biochem.* **217**: 973-980
- Hernández-Yago, J., Knecht, E., Martínez-Ramón, A., Grisolia, S. (1980) Autophagy of Ferritin Incorporated into the Cytosol of Hela Cells by Liposomes. *Cell. Tissue Res.* **205**: 303-309

Hellewell, P.G., Williams, T.J. (1994). Immunopharmacology of Neutrophils. Lehrbuch, Academic Press, Ltd. San Diego, CA USA.

Hiemenez, J.W., Walsh, T.J. (1996). Lipid Formulations of Amphotericin B: Recent Progress and Future Directions. *CID*. **22**: 133-144

Ho, S.-C., Huang, L. (1983). A Novel Cytochemical Marker for Liposome Decomposition in Lysosomes. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 404-410

Ismail, G., Boxer, L.A., Baehner, R.L. (1979). Utilization of Liposomes for Correction of the Metabolic and Bactericidal Deficiencies in Chronic Granulomatous Disease. *Pediat. Res.* **13**: 769-773

Johnston Jr., R.B., Baehner, R.L. (1979). Improvement of Leukocyte Bactericidal Activity in Chronic Granulomatous Disease. *Blood*. **35**: 350-355

Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1994). Assays for the Chlorination Activity of Myeloperoxidase. *Meth. Enzymol.* **233**: 502-512

Kitahara, M., Eyre, H.J., Simonian, Y., Atkin, C.L., Hasstedt, S.J. (1981). Hereditary Myeloperoxidase Deficiency. *Blood* **57**: 888-893

Lasic, D.D. (1998). Novel Applications of Liposomes. *Trend. Biotechnol.* **16**: 307-321

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 Density. *Biochim. Biophys. Acta.* **1103**: 185-197

Mardiney, M., Jackson, S.H., Spratt, S.K., Li, F., Holland, S.M., Malech, H.L. (1997). Enhanced Host Defense After Gene Transfer in the Murine p47<sup>phox</sup>-Deficient Model of Chronic Granulomatous Disease. *Blood*. **89**: 2268-2275

Mathai, J.C., Sitaramam, V. (1994). Stretch Sensitivity of Transmembrane Mobility of Hydrogen Peroxide through Voids in the Bilayer. *J. Biol. Chem.* **269**: 17784-17793

Montfoort, A., Bezstarosti, K., Grph, M.M.J., Metsäkatelä, T.J.A. (1987). The Influence of the Lipid Composition on the Degree of Lipid Peroxidation of Liposomes. *Biochem. Int.* **15**: 525-543

Müller-Peddinghaus, R. (1984). In Vitro Determination of Phagocyte Activity by Luminol- and Lucigenin-Amplified Chemiluminescence. *Int. J. Immunopharmac.* **6**: 455-466

Nagler, A., Ackerstein, A., Kapelushnik, J., Or, R., Naparstek, E., Slavin, S. (1999). Donor Lymphocyte Infusion Post Non-Myeloablative Allogeneic

Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Chronic Granulomatous Disease. *Bone Marrow Transplant.* **24**: 339-342

Niedel, J., Kahane, I., Cuatrecasas, P. (1979). Receptor-Mediated Internalization of Fluorescent Chemotactic Peptide by Human Neutrophils. *Science.* **205**: 1412-1414

Ohno, Y., Gallin, J.I. (1985). Diffusion of Extracellular Hydrogen Peroxide into Intracellular Compartments of Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **260**: 8438-8446

Ozsahin, H., von Planta, M., Muller, I., Steinert, H.C., Nadal, D., Lauener, R., Tuchschnid, P., Willi, U.V., Ozsahin, M., Crompton, N.E., Seger, R.A. (1998). Successful Treatment of Invasive Aspergillosis in Chronic Granulomatous Disease by Bone Marrow Transplantation, Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Granulocytes, and Liposomal Amphotericin-B. *Blood.* **92**: 2719-2724

Panasenko, O.M., Arnhold, J., Vladimirov, Y.A., Arnhold, K., Sergienko, V.I. (1997). Hypochlorite-Induced Peroxidation of Egg Yolk Phosphatidylcholine is Mediated by Hydroperoxides. *Free Rad. Res.* **27**: 1-12

Patel, H.M. (1992). Influence of Lipid Composition on Opsonophagocytosis of Liposomes. *Res. Immunol.* **143**: 242-244

Pegram Jr., P.S., DeChatelet, L.R., McCall, C.E. (1978). Comparison of Myeloperoxidase-Activity in Leukocytes from Normal Subjects and Patients with Chronic Granulomatous Disease. *J. Infect. Dis.* **138**: 699-702

Peschka-Süss, R., Schubert, R. (2001). pH-Sensitive Liposomes (eingereicht zur Veröffentlichung).

Petty, H.R., McConnel, H.M. (1983). Cytochemical Study of Liposome and Lipid Vesicle Phagocytosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **735**: 77-85

Renner, S., Prohaska, V., Gerber, C., Niethammer, D., Bruchelt, G. (2001). Analysis of Metabolites of Glucose Pathways in Human Erythrocytes by Analytical Isotachopheresis. *J. Chromatogr. A* **916**: 247-253

Rubas, W., Schreier, H. (1991). Liposomen: Fortschritte in Herstellungstechnologie und Therapie. *Pharm. Unserer Zeit.* **6**: 255- 270

Samoszuk, M., Ehrlich, D., Ramzi, E. (1993). Preclinical Safety Studies of Glucose Oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**: 1643-1648

Samoszuk, M.K., Wimely, W.C., Nguyen, V. (1996). Eradication of Interleukin 5-Transfected J558L Plasmocytomas in Mice by Hydrogen Peroxide-Generating Stealth Liposomes. *Cancer Res.* **56**: 87-90

Scherphof, G.L., Kamps, J.A.A.M. (1998). Receptor versus Non-Receptor Mediated Clearance of Liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **32**: 81-97

Segal, B.H., Leto, L.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M. (2000). Genetic, Biochemical, and Clinical Features of Chronic Granulomatous Disease. *Medicine*. **79**: 170-200

Storm, G., Crommelin, D.J.A. (1998). Liposomes: Quo Vadis? *PSST*. **1**: 19-31

Subczynski WK, Hyde JS, Kusumi A. (1989). Oxygen Permeability of Phosphatidylcholine-Cholesterol Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 4474-4478

Thurman, R.G., Ley, H.G., Scholz, R. (1974). Hepatic Microsomal Ethanol Oxidation. *Eur. J. Biochem*. **25**: 420-430

Uppoor, R., Niebergall, P.J. (1996). Beta-D(+) Glucose-Glucose Oxidase-Catalase for Use as an Antioxidant System. *Pharm. Dev. Technol*. **1**: 127-134

Valdes, T.I., Moussy, F. (2000). In Vitro and in Vivo Degradation of Glucose oxidase Enzyme Used for an Implantable Glucose Biosensor. *Diabetes Technol. Ther*. **2**: 367-376

Vilim, V., Wilhelm, J. (1989). What Do We Measure by a Luminol-Dependent Chemiluminescence of Phagocytes?. *Free Rad. Biol. Med*. **6**: 623-629

Weissman, G., Bloomgarden, D., Kaplan, R., Cohen, C., Hoffstein, S., Collins, T., Gotlieb, A., Nagle, D. (1975). A General Method for the Introduction of Enzymes, by Means of Immunoglobulin-Coated by Liposomes into Lysosomes of Deficient Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **72**: 88-93

Wilkinson, P.C. (1998). Assays of Leukocyte Locomotion and Chemotaxis. *J. Immunol. Meth*. **216**: 139-153

Winkelstein, J.A., Marino, M.C., Johnston Jr., R.B., Boyle, J., Curnute, J., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M., Ochs, H., Quie, P., Buckley, R.H., Foster, C.B., Chancock, S.J., Dickler, H. (2000). Chronic Granulomatous Disease: Report on a National Registry of 368 Patients. *Medicine*. **79**: 155-169

Winterbourn, C.C., Carr, A.C. (1993). Myeloperoxidase-Dependent Loss of Malondialdehyde: A Limitation for Detecting Neutrophil-Mediated Lipid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*. **302**: 461-467

Zipfel, M. (1998). Ausschüttung und Aktivierung der Myeloperoxidase neutrophiler Granulozyten. Dissertation, Tübingen

## 7. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Abteilung Hämatologie und Onkologie (Leitung: Prof. Dr. D. Niethammer) unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt

Frau Dr. Claudia Gerber für ihre engagierte fachliche und emotionale Unterstützung, ihre konstruktiven Anregungen und das Korrekturlesen.

Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt für die herausragende Betreuung, sein Engagement, seine Anregungen und theoretischen Hilfestellungen.

Herrn Prof. Dr. D. Niethammer für die Stellung des Arbeitsplatzes.

meinem Probanden für die Bereitschaft, sein Blut zur Verfügung zu stellen.

allen Kooperationspartnern, die diese Arbeit erst ermöglicht haben: besonders Frau Andrea Kimpfler und Herrn Prof. Dr. R. Schubert, Freiburg; Prof. Dr. T. Bächli, Zürich.

allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, sowie der Forschungs- und Routinelabors für ihre Hilfsbereitschaft und das kollegiale Arbeitsklima.

meinem Mitbewohner M. Ley für das Teilen des Leids.

dem *fortune*-Programm des Universitätsklinikums Tübingen für die finanzielle Unterstützung.

## 8. PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Gerber, C.E., Bruchelt, G., Falk, U., Kimpfler, A., Hauschild, O., Kuçi, S., Bächli, 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., Hauschild, O., Prohaska, V., Kimpfler, A., Schubert, R., Niethammer, D., Bruchelt, G. (2001). Glucose-Oxidase-haltige Liposomen als Therapiekonzept während schwerer Infektionen bei septischer Granulomatose. *fortune-/AKF-Kolloquium (Vortragspreis)*.

Gerber, C.E., Prohaska, V., Dringen, R., Hauschild, O., Kimpfler, A., Schubert, R., Niethammer, D., Bruchelt, G. (2001). Potential Side Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Producing Glucose-Oxidase-Containing Liposomes. *Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, Halle (Vortrag)*.

Gerber, C.E., Hauschild, O., Kimpfler, A., Schubert, R., Niethammer, D., Bruchelt, G. (2002) Stability and Activity of Glucose Oxidase in Cellular Surroundings. *15<sup>th</sup> Liposome Workshop, Oberjoch (Vortrag)*.



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name Oliver Hauschild  
Geburtstag 09.09.1975  
Geburtsort Stuttgart

## Schulbildung

1982-1986 Grünlandschule Freiberg/N.  
1986-1995 Oscar-Paret-Schule Freiberg/N.  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

1995-1996 Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz Ludwigsburg

## Hochschulbildung

1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1998 Ärztliche Vorprüfung  
1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2002-2003 Medizinisches Praktisches Jahr  
25.11.2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000-2002 Anfertigung der Dissertation an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen, Abteilung Hämatologie und Onkologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt mit dem Thema „**Eignung lyophilisierter Glucose-Oxidase-haltiger Liposomen zur Korrektur der NADPH-Oxidase-Defizienz bei Granulozyten**“

