

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie,
Hämatologie und Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung
verschiedener Liposomenformulierungen auf das
humane und murine Komplementsystem

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Daniela Bauer, geb. Fieder

aus Stuttgart

2012

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

Berichterstatter:

Professor Dr. R. Wahl

Meinen Eltern mit großem Dank gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABKÜRZUNGEN I

1. EINLEITUNG..... 1

1.1. Septische Granulomatose (Chronic Granulomatous Disease, CGD) 1

 1.1.1. Pathogenese der CGD..... 1

 1.1.2. Das Krankheitsbild der CGD 1

 1.1.3. Therapie der CGD..... 3

1.2. Liposomen..... 4

1.3. Glucose-Oxidase-Liposomen als Therapieansatz für die CGD 5

1.4. Interaktion von Liposomen mit dem Komplementsystem..... 6

1.5. Das Komplementsystem 9

 1.5.1. Bestandteile des Komplementsystems und seine
 Wirkungsweise 9

 1.5.2. Die Aktivierung des Komplementsystems..... 10

 1.5.2.1. Der klassische Weg 11

 1.5.2.2. Der Lektin Weg 12

 1.5.2.3. Der alternative Weg 13

 1.5.2.4. C3(c) und C4 als zentrale Komplementproteine bei der
 Aktivierung über den klassischen und alternativen Weg 14

 1.5.3. Membrane attack complex – Terminaler Weg der
 Komplementkaskade..... 15

 1.5.4. Regulation der Komplementaktivierung 16

1.6. Cluster of Differentiation (CD) 20

1.7. Toll-like Rezeptoren 22

 1.7.1. TLR 4 24

 1.7.2. TLR 2 25

1.8. Aufgabenstellungen und Zielsetzung der Arbeit..... 25

2.	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1.	Material.....	27
2.1.1.	Chemikalien	27
2.1.2.	Antikörper.....	28
2.1.2.1.	Antikörper für die Färbungen im humanen System	28
2.1.2.2.	Antikörper für die Färbungen im murinen System	29
2.1.3.	Leerliposomen.....	29
2.1.4.	Puffer und Lösungen.....	30
2.1.5.	Biologische Materialien	31
2.1.6.	Geräte	31
2.1.7.	Verbrauchsmaterial.....	32
2.1.8.	Software	33
2.2.	Methoden	34
2.2.1.	Blutentnahme	34
2.2.2.	Erythrozytenisolierung aus Vollblut.....	34
2.2.3.	Liposomenherstellung und Charakterisierung	35
2.2.4.	Inkubation von Vollblut mit Liposomen	36
2.2.5.	Untersuchung von Komplement-Rezeptoren von Maus und Mensch mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS)	37
2.2.5.1.	Murines System	40
2.2.5.1.1.	Messung der Komplementrezeptorexpression auf Leukozyten.....	41
2.2.5.2.	Humanes System.....	42
2.2.5.2.1.	Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Komplement-Rezeptoren, Integrine, CD55 und CD14 von humanen Leukozyten	42
2.2.5.2.2.	Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Toll-like Rezeptoren	46

2.2.6.	Bestimmung der Komplementkonzentration des Maus-Komplements	47
2.2.7.	Inkubation von Mauskomplement mit Liposomen	49
2.2.8.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements	50
2.2.8.1.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System mittels einer Elisa Komplement Aktivitätsanalyse, dem complement hemolytic 50%-Assay (CH ₅₀ -Assay)	50
2.2.8.1.1.	Bestimmung der optimalen Antikörper- und Komplementkonzentrationen zur Etablierung des CH ₅₀ Assay für die <i>in-vivo</i> -Messungen im murinen System	51
2.2.8.1.2.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System <i>in vitro</i>	54
2.2.8.1.3.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System <i>in vivo</i>	55
2.2.8.2.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im humanen System	59
2.2.9.	Quantitative Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4 im humanen System	61
2.2.10.	Statistische Auswertung	62
3.	ERGEBNISSE	63
3.1.	Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen auf das murine Komplementsystem	63
3.1.1.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System mit dem CH ₅₀ Assay	63
3.1.1.1.	Etablierung eines CH ₅₀ Assay für die <i>in-vivo</i> -Messungen im murinen System	63

3.1.1.2.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System <i>in vitro</i>	64
3.1.1.2.1.	Einfluss von EPC-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements	65
3.1.1.2.2.	Einfluss von EPG-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements	68
3.1.1.2.3.	Einfluss von PEG-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements	70
3.1.1.3.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System <i>in vivo</i>	71
3.1.1.3.1.	Vorversuche mit Infektionen und Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase).....	73
3.1.1.3.1.1.	Vorversuche mit Infektionen und einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)	73
3.1.1.3.1.2.	Vorversuche mit Infektionen und dreimaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)	74
3.1.1.3.2.	Versuch mit einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase) bei Wildtyp-Mäusen unter zeitlichem Verlauf.....	75
3.1.1.3.3.	Versuch mit Infektion mit Staphylococcus aureus und einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase).....	77
3.1.1.3.4.	Versuch mit Infektion mit Staphylococcus aureus und dreimaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase).....	78
3.1.2.	Untersuchung des Einflusses von Liposomen auf das murine Komplementsystem mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS).....	79

3.1.2.1.	Messung der Komplementrezeptorexpression auf murinen Leukozyten.....	79
3.1.2.1.1.	Beeinflussung der Expression der Komplementrezeptoren durch einmalige GOL-Gabe.....	80
3.1.2.1.1.1.	Expression von CD 11b und CD18	80
3.1.2.1.1.2.	Expression von CD 21/35	83
3.1.2.1.2.	Beeinflussung der Expression der Komplementrezeptoren durch dreimalige GOL-Gabe	85
3.1.2.1.2.1.	Expression von CD 11b und CD18	85
3.1.2.1.2.2.	Expression von CD 21/35	88
3.2.	Einfluss von Leerliposomen mit verschiedenen Formulierungen auf das humane Komplementsystem	91
3.2.1.	Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im humanen System mit dem CH ₅₀ -Assay	91
3.2.2.	Quantitative Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4 im humanen System unter dem Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen	93
3.2.3.	Durchflusszytometrische Untersuchung von Komplement-Rezeptoren des Menschen.....	95
3.2.3.1.	Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Komplement-Rezeptoren, Integrine, CD55 und CD14 humaner Leukozyten	95
3.2.3.1.1.	Einfluss von EPC-Liposomen	95
3.2.3.1.2.	Einfluss von EPG-Liposomen	98
3.2.3.1.3.	Einfluss von PEG-Liposomen	100
3.2.3.2.	Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Toll-like Rezeptoren	101
3.2.3.2.1.	Einfluss von Leerliposomen auf TLR2	102
3.2.3.2.2.	Einfluss von Leerliposomen auf TLR4	104

4.	DISKUSSION	106
4.1.	Aktivierung des Komplementsystems durch Liposomen.....	106
4.1.1.	Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen auf die Aktivität des murinen Gesamtkomplements <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	106
4.1.1.1.	Beeinflussung des murinen Komplementsystems <i>in vitro</i> durch verschiedene Leerliposomen (EPC-, EPG- und PEG-Liposomen).....	107
4.1.1.2.	Beeinflussung des murinen Komplementsystems <i>in vivo</i> durch Infektionserreger und Glucose-Oxidase-Liposomen	108
4.1.2.	Einfluss von Liposomen auf murine Komplementrezeptoren <i>in vivo</i>	111
4.1.3.	Einfluss von Leerliposomen mit verschiedenen Formulierungen auf die Aktivität des humanen Gesamtkomplements	115
4.1.4.	Einfluss von Leerliposomen auf humane Komplementrezeptoren.....	117
4.2.	Unterschiede zwischen den verschiedenen Liposomen-Formulierungen	124
4.3.	Vergleich von murinem und humanem System.....	125
4.4.	Ausblick	127
5.	ZUSAMMENFASSUNG	128
6.	LITERATUR	131
7.	ANHANG.....	150

I. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
aqua. dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninic acid (<i>Bicinchoninsäure</i>)
BSA	Bovine Serum Albumin (<i>Rinderserum Albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C1-INH	C1-Esteraseinhibitor
C4BP	C4b-bindendes Protein
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCP	complement control protein (<i>Komplementregulations protein</i>)
CD	Cluster of Differentiation
CGD	Chronic Granulomatous Disease (<i>septische Granulomatose</i>)
CH ₅₀	complement hemolytic 50% (<i>Elisa Komplement Aktivitätsanalyse</i>)
Chol.	Cholesterin
CPN	Carboxypeptidase N
CR	Komplementrezeptor
CRP	C-reaktives Protein
Cu ¹⁺	einwertiges Kupferionen
Cu ²⁺	zweiwertige Kupferionen
Cy-Chrome	kombinierte R-phycoerythrin und Cyanin Farbe (<i>PE-Cy5</i>)
d	Tag
DAF	Decay-accelerating factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>)

ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
EPC	Eiphosphatidylcholin
EPG	Eiphosphatidylglycerol
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter (<i>Durchflußzytometer</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
f. c.	final concentration
FH	Faktor H
FHL-1	Faktor H ähnliches Protein
FI	Faktor I
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward angle light scatter (<i>Vorwärtsstreulicht</i>)
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GO	Glucose-Oxidase
GOL	Glucose-Oxidase Liposomen
GVB	Gelatine-veronal-buffer
GVB ⁺⁺	Gelatine-veronal-buffer + CaCl ₂ + MgCl ₂
GVBE	Gelatine-veronal-buffer + EDTA
H	high (<i>hoch</i>)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, (4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-1-ethansulfonsäure)
HLA	Human Leukocyte Antigen, (humanes Leukozytenantigen = Name des humanen Haupthistokompatibilitätskomplex)
HOCl	Hypochlorous acid (<i>hypochlorige Säure</i>)
HRF	homologous restriction factor (<i>homologer Restriktionsfaktor</i>)

Ig	Immunglobulin
INA	Inactivator
INH	Inhibitor
kDa	Kilodalton
L	low (niedrig)
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	medium (mittel)
MAC	membrane attack complex (<i>Membranangriffskomplex</i>)
MASP	MBL assoziierte Serinprotease
MBL	Mannan-Bindendes-Lektin
MCP	Membran-Kofaktor-Protein
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MLV	multilamellare Liposomen (multilamellar vesicle)
mM	Millimolar
MPS	mononukleäres Phagozytose System
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau tetrazolium
nm	Nanometer
Nod2	Nucleotid Oligodimerisation Domain 2 (Nukleotid-oligodimerisations-Domäne 2)
OH ⁻	Hydroxidion

PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (pathogen-assoziierte molekulare Strukturen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline, Phosphatpuffer)
PCS	Photonen-Korrelations-Spektroskopie
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PRR	Pattern Recognition Receptor (Struktur-Erkennungs-Rezeptor)
rbEA	mit Antikörpern sensibilisierte Erythrozyten
RES	retikuloendotheliales System
SD	Standardabweichung
SSC	Side-scattered-light (<i>Seitwärtsstreulicht</i>)
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
SUV	Small unilamellar vesicle
t	Zeit
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VB	Vollblut
v.a.	vor allem
V _{max}	maximalen Reaktionsgeschwindigkeit
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celcius
μ l	Mikroliter
λ	Lambda (Wellenlänge)

1. EINLEITUNG

1.1. Septische Granulomatose (Chronic Granulomatous Disease, CGD)

Kinder mit septischer Granulomatose werden klinisch mit schweren Infektionen durch Bakterien und Pilze auffällig. Verantwortlich hierfür sind verschiedene molekulare Defekte, was dazu führt, dass diese Mikroorganismen intrazellulär nicht abgetötet werden können (Wahn und Seger, 1998).

1.1.1. Pathogenese der CGD

Die CGD ist eine seltene Erbkrankheit des Phagozytensystems, welche autosomal rezessiv oder x-chromosomal vererbt wird (Roos et al., 1996).

Betroffen ist die Dysfunktion des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) -Oxidase-Komplexes, wodurch die Zellen nicht mehr in der Lage sind, die mikrobiziden reaktiven Oxidantien Superoxidanion und seine Metaboliten Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale und mit Hilfe der Myeloperoxidase Hyperchlorige Säure zu bilden. Als Folge des NADPH-Oxidase Defizits kommt es zu rezidivierenden, oft lebensbedrohlichen bakteriellen und mykotischen Infektionen (Segal et al., 2000).

1.1.2. Das Krankheitsbild der CGD

Die Inzidenz der CGD liegt zwischen 1 : 1 000 000 und 1 : 250 000 (Dinauer, 1993). Krankheitsbeginn ist meist vor dem 3. Lebensjahr (Forrest et al., 1988), es wurden aber auch Fälle mit einem späteren Krankheitsbeginn beschrieben (Lun et al., 2002).

Neben rezidivierenden Infektionen ist die CGD durch abnorme, „überschiessende“ inflammatorische Reaktionen charakterisiert. Es kommt zu Granulombildungen in Leber, Lunge, Niere und Lymphknoten mit nachfolgenden Komplikationen, wie z.B. granulomatöse Enteritis und urogenitale

Obstruktionen. Des Weiteren kommt es zu einer Verschlechterung der Wundheilung und Dehiszenzen (Segal et al., 2000).

In unbehandelten Patienten kommt es zu Gedeihstörungen und Minderwuchs (Wahn und Seger, 1998).

Die häufigsten krankheitsverursachenden Erreger sind die katalasepositiven Bakterien *Staphylococcus aureus* (Staph. aureus), *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Norkadia* spp. sowie Pilze der *Aspergillus*-Familie. Katalase-negative Pathogene bergen kein erhöhtes Infektionsrisiko für CGD-Patienten (Segal et al., 2000). Sowohl Katalase-positive, als auch Katalase-negative Bakterien bilden H_2O_2 . Die Katalase-negativen Erreger liefern der granulozytären Myeloperoxidase ein Substrat, wohingegen die Katalase-positiven Erreger das eigene, endogen erzeugte H_2O_2 durch das Enzym Katalase direkt wieder abbauen (Klebanoff, 1974; McRipley und Sbarra, 1967). Die Hypothese einer Katalase-abhängigen Virulenz der Erreger in CGD ist umstritten, da nur ein Teil der Katalase-positiven Erreger in CGD anzutreffen sind. *Pseudomonas aeruginosa* z.B. ist ein Katalase-positives Bakterium, welches nur selten bei CGD Patienten vorkommt (Segal et al., 2000).

Die Prognose der CGD ist meist schlecht. Ein Drittel der Patienten versterben vor Erreichen des 7. Lebensjahres (Renz-Polster und Braun, 2001). Mit Hilfe eines konsequenten Einsatzes aller aktuell verfügbaren Therapiemaßnahmen (siehe 1.1.3.) können einige Patienten allerdings das Erwachsenenalter erreichen (Koletzko, 2004).

Diagnostiziert wurde die CGD früher meist über den sogenannten Nitroblau Tetrazolium Test (NBT)-Test (diagnostische Methode zur präoperativen Einschätzung des Infektionsrisikos in Patienten) (Koletzko, 2004). Da er in einigen Fällen keine zuverlässige Diagnose liefert, empfiehlt sich die quantitative Messung des oxidativen Stoffwechsels der Granulozyten.

1.1.3. Therapie der CGD

Oft zeigen CGD Patienten keine typischen Symptome einer Infektion. Selbst bei lebensbedrohlichen Infektionen können die Patienten asymptomatisch sein oder nur leichte unspezifische Symptome aufweisen (Segal et al., 2000).

Zur Behandlung und Vorbeugung von Infektionen in diesen Patienten gehören eine lebenslängliche Antibiotika und Antimykotika Einnahme, sowie in schweren Fällen eine Transfusion von allogenen Granulozyten, um die Patienten mit funktionierenden Phagozyten zu versorgen (Fischer et al., 1993).

Bewährt hat sich eine Langzeitprophylaxe aus einer Kombination mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol), zweier Antibiotika, welche sich in Granulozyten anreichern und dort Bakterien abtöten (Koletzko, 2004). Bei Pilzinfektionen kommen systemisch wirksame Antimykotika wie z.B. Itraconazol zur Anwendung (Gallin et al., 2003).

Bei Leberabszessen, meist durch Staph. aureus verursacht, ist in den allermeisten Fällen eine chirurgische Sanierung notwendig (Segal et al., 2000).

Ergänzend sollte, zumindest bei älteren Kindern, z.B. bei Aufflammen von Infekten trotz korrekter Antibiotikaprophylaxe, regelmäßig Interferon- γ , ein Makrophagen-aktivierender Faktor, subkutan verabreicht werden (Wahn und Seger, 1998; (Badaro et al., 1990; Dorman und Holland, 1998; Cooper et al., 1993; Murray et al., 1985).

Wie bereits gezeigt werden konnte, reduziert rekombinantes humanes Interferon- γ die Häufigkeit und den Schweregrad von Infektionen bei Patienten mit CGD (Jackson et al., 2001; Ma et al. 2003).

Eine Stammzelltransplantation von humanem Leukozytenantigen (Human Leukocyte Antigen, HLA) geno-identischer Geschwister war in der Vergangenheit in Einzelfällen erfolgreich (Koletzko, 2004). Wegen der hohen Mortalität von etwa 10% eignet sich die Stammzelltransplantation als routinemäßige Behandlung bei CGD jedoch nicht (Segal et al., 2000).

Vielversprechend sind unter anderen gentherapeutische Ansätze. Erste *in-vivo*-Anwendungen wurden bereits unternommen (Roesler et al., 2002; Koletzko, 2004; Kang et al., 2010). Kürzlich zeigten Kang und Malech (2012) den

lebensrettenden Effekt einer Gentherapie in zwei CGD-Patienten, welche auf eine konventionelle Therapie nicht ansprachen.

1.2. Liposomen

Liposomen sind aus einer oder mehreren Moleküldoppelschichten bestehende kugelförmige Vesikel, welche aus amphiphilen Molekülen gebildet werden (siehe Abbildung (Abb.) 1).

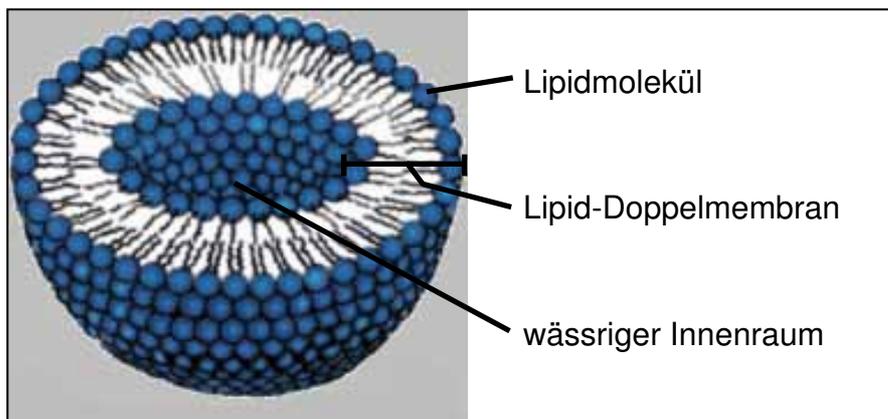


Abb. 1: Querschnitt durch einen Liposomen (schematisch)

(modifiziert nach <http://www.livonlabs.com/cgi-bin/htmllos.cgi/4013.1.419671294273777089/-lypo-spheric/liposomal-encapsulation.html>, Mai 2011)

Im Jahre 1964 beobachteten Bengham und Horne unter dem Elektronenmikroskop, dass Phospholipide nach Dispergierung (technisches Verfahren zur Herstellung von Suspensionen) in wässriger Lösung spontan geschlossene, vesikuläre „zwiebelschalen-ähnliche“ Körper ausbilden (Rubas und Schreier, 1991). 1968 erhielten diese den Namen Liposomen (Sessa und Weismann, 1968).

Sie werden bereits seit mehreren Jahren als Trägersysteme für Arzneimittel verwendet. Die Generika Doxil[®] und DaunoXome[®] sind Beispiele für Liposomenzubereitungen, welche intravenös verabreicht werden. Die Verwendung von Liposomen als Arzneimittelträger bringt einige Vorteile:

Durch Verkapselung von (medikamentösen) Stoffen in Liposomen können diese vor Abbauprozessen wie z.B. Hydrolyse geschützt und gezielt an den Wirkort transportiert werden (Rubas und Schreier, 1991). Letzteres bezeichnet man als "Drug Targeting". Drug Targeting war die treibende Kraft in der Entwicklung von Liposomen als Arzneistoffträger, da der selektive Transport zum Wirkort sowohl eine signifikante Erniedrigung von Nebenwirkungen als auch eine Verstärkung des therapeutischen Effekts und damit einen signifikant verbesserten „therapeutischen Index“ eines Arzneistoffes zur Folge hat (Rubas und Schreier, 1991). Zudem können Liposomen durch Schutz des Stoffes vor enzymatischem oder hydrolytischem Abbau auch eine Darreichungsform für empfindliche Arzneistoffe wie z.B. Enzyme darstellen.

1.3. Glucose-Oxidase-Liposomen als Therapieansatz für die CGD

Eine weitere, alternative Therapiemöglichkeit der CGD zur Vermeidung von Leukozytentransfusionen ist die intravenöse Verabreichung von Glucose-Oxidase Liposomen (GOL). Diese untersuchen wir seit einigen Jahren in Zusammenarbeit mit Prof. Schubert, Inhaber des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie der Universität Freiburg.

Die Glucose-Oxidase (GO) ist ein gut wasserlösliches Flavoprotein. Es besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit je einem Molekül des Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Cofaktor und besitzt eine Molekülmasse von 160 Kilodalton (kDa) (Tsuge et al., 1975). Das aufgereinigte Enzym kann mehrere Jahre stabil gelagert werden, ebenso wie das lyophilisierte Enzym (Kimpfler, 2003).

Das Produkt von der GO katalysierten Reaktion ist Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welches den Granulozyten in CGD-Patienten durch den Ausfall der NADPH-Oxidase für den „oxidativen Burst“ und damit zur Abtötung der phagozytierten Erreger fehlt:



Es gibt bereits therapeutische Ansätze mit liposomal verkapselter GO zur Behandlung von soliden Tumoren und von bestimmten Formen des Plasmozytoms, da die H_2O_2 -Bildung durch GOL eine antiproliferative Wirkung zeigt (Ben-Yoseph und Ross, 1994; Samoszuk et al., 1996).

Verschiedene Serumkomponenten lagern sich an die Lipidmembran der Liposomen an, wodurch es zur Interaktion und zur Aufnahme dieser in die Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) kommt (Woodle und Lasic, 1992).

Die schnelle Aufnahme der Liposomen durch Granulozyten und Makrophagen bedeutet bei vielen Erkrankungen eine Einschränkung der Therapiewirksamkeit. Bei der CGD kommt es dahingegen ohne zusätzliche Verbesserung zu einer gerichteten Aufnahme der GOL durch die Zielzellen.

Wird den CGD-Zellen H_2O_2 zur Verfügung gestellt, sind sie aufgrund ihrer intakten Myeloperoxidase in der Lage, HOCl zu bilden (Gerber et al., 2001).

1.4. Interaktion von Liposomen mit dem Komplementsystem

Die Interaktion von Liposomen mit Zellen der unspezifischen Immunität, z.B. Makrophagen des RES ist bekannt und dato bereits ausgiebig erforscht. Der humoralen unspezifischen Immunantwort auf Liposomen, welche sich durch Aktivierung des Komplementsystems manifestiert, wurde bisher deutlich weniger Aufmerksamkeit zuteil als der Interaktion von Liposomen mit Phagozyten (Gregoriadis, 2007).

Die ersten Analysen der liposomalen Komplementaktivierung wurden von Kinsky und seinen Mitarbeitern beschrieben, welche Liposomen als ein Model-System zur Erforschung der Mechanismen der Membranzerstörung durch den Membranangriffskomplex (membrane attack complex, MAC) benutzten (Alving et al., 1969; Haxby et al., 1969).

Intravenös verabreichte Liposomen werden nach einiger Zeit aus dem Blutkreislauf eliminiert (Bradley und Devine, 1998 a).

Durch Opsonisierung (Anlagerung von Plasmaproteinen an die Lipiddoppelschicht der Liposomen) werden die Liposomen als Fremdkörper kenntlich

gemacht und können so durch die Zellen des RES sowie Makrophagen und Granulozyten eliminiert werden (Woodle und Lasic, 1992; Bradley und Devine, 1998 a; Szebeni und Alving 1999).

Es gibt große Unterschiede im Ausmaß der Komplementaktivierung durch verschiedene Liposomen. Neutrale, kleine, unilamellare Liposomen, so genannte SUVs (Small Unilamellar Liposomes) und negativ geladene, multilamellare Liposomen, so genannte MLVs (Multilamellar Vesicles) mit hohem Cholesterol-Anteil, stellen die das Komplementsystem am wenigsten bzw. die das Komplementsystem am meisten aktivierenden Liposomen dar. (Szebeni et al., 2000)

Eine wichtige Rolle bei diesem Prozess spielen die physiochemischen Eigenschaften der Liposomen (Yan et al., 2005).

Ein Faktor für die Aktivierung des Komplementsystems durch Liposomen und die darauf folgende Elimination durch das RES ist die durchschnittliche Größe. Größere Liposomen (>200nm) aktivieren das Komplementsystem stärker als kleinere Liposomen unter 200nm (Harashima et al., 1995; Massing und Fuxius, 2000).

Liposomen haben dieselbe Größe wie die meisten Pathogene, z.B. haben kleine SUVs eine den Viren entsprechende Größe, wohingegen große MLVs größenmäßig Bakterien und Hefezellen entsprechen. Fehlen nun Komplementkontrollproteine auf der Liposomenoberfläche, welche die Komplementaktivierung unterdrücken (z.B. Komplementrezeptoren CR1, CR2, CR3, Decay accelerating factor, etc.), ist eine Erkennung von Liposomen und eine weitere Aktivierung des Komplementsystems als seine physiologische Funktion die Folge.

Wie oben bereits erwähnt, spielt auch die Ladung der Liposomen eine Rolle. Positiv aber auch insbesondere negativ geladene Glykolipide oder Phospholipide der Liposomen können eine Komplementaktivierung auslösen (Devine et al., 1994; Bradley et al., 1999; Szebeni et al., 2000). Neutrale Liposomen aktivieren dahingegen das Komplementsystem nur leicht (Szebeni et al., 2000).

Des Weiteren spielen noch die pH-Empfindlichkeit (Carmo et al., 2008), als auch die Lipidzusammensetzung (Ishida et al., 2001) der Liposomen eine Rolle bei der Komplementaktivierung.

Eine Reduktion der oft nicht erwünschten Clearance der Liposomen kann durch eine Oberflächenmodifikation dieser erreicht werden. Dadurch werden die Liposomen „getarnt“, man spricht von „Tarnkappenliposomen“ (engl.: Stealth-Liposomen).

Erreicht wird dies z. B. durch den Einbau von Polyethylenglykolketten (PEG) in die Phospholipiddoppelschicht, wodurch eine Anreicherung von Opsoninen erschwert wird. Bei einmaliger Injektion kommt es zu einer verlängerten Plasmahalbwertszeit. (Lasic et al., 1991; Allen und Hansen, 1991; Laverman et al., 2001 a).

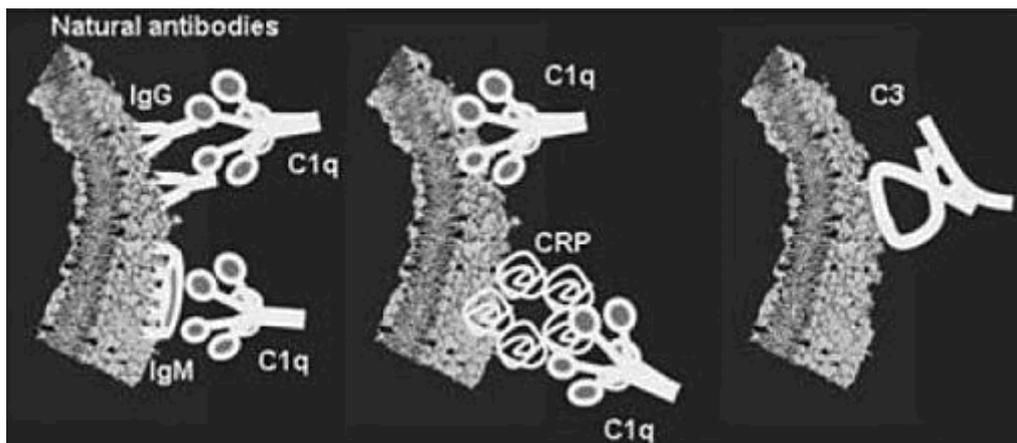


Abb. 2: Mechanismen der liposomen-induzierten Komplementaktivierung.

Das Schema illustriert die verschiedenen Trigger-Mechanismen der liposomen-induzierten Komplementaktivierung. Diese beinhalten den klassischen Weg, ausgelöst durch die Bindung der Immunglobuline (Ig) G, IgM, C1q oder C-reaktives Protein (CRP) an die Membran. Die Wirkung der Immunglobuline und CRP wird durch C1q mediiert. Die Aktivierung des alternativen Wegs wird durch direkte Bindung von C3 an die Membran, oder Bindung von C3 an das Fab Ende von membrangebundenen Antikörpern getriggert. Die Aktivierung der terminalen Kaskade (C5b, C6, C7, C8 und C9), welche zur Bildung des Membran Attack Complexes führt, ist für alle Liposomen identisch. (Gregoriadis, 2007).

1.5. Das Komplementsystem¹

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr und hilft beim Schutz vor viralen oder bakteriellen Infektionen (Sekine et al., 2001).

Es besteht aus mehr als 30 Plasma- und Membran-Glykoproteinen (Walport, 2001), welche vor allem in der Leber synthetisiert werden (Carroll, 2004).

Die Mehrzahl dieser Proteine sind Vorstufen von Enzymen, die erst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (Vollmar et al., 2005).

1.5.1. Bestandteile des Komplementsystems und seine Wirkungsweise²

Das Komplementsystem besteht aus an der Zahl ständig wachsenden Proteinen, welche auf Plasma und Zellmembranen (Blutzellen und andere) verteilt sind (Müller-Eberhard, H.J. 1998).

Nach einer Erkennung von Bakterien oder anderen Pathogenen bilden Komplementproteine Fragmente oder Proteinkomplexe, welche eine akute Entzündungsreaktion, eine Beseitigung von Fremdzellen oder –Molekülen und eine Abtötung pathogener Mikroorganismen herbeiführen. Die meisten dieser Aktivitäten werden durch Rekrutierung und/oder Aktivierung von Phagozyten, Thrombozyten, Mastzellen und Endothelzellen vermittelt.

Die Zellaktivierung erfolgt entweder durch Bindung von Komplementproteinen oder Proteinfragmenten an spezifische Rezeptoren oder durch Einfügung von Proteinkomplexen in die Zellmembran. Letzterer Mechanismus wird auch zur Abtötung von Bakterien oder verdächtiger Zellen genutzt. Ferner ist bewiesen, dass Produkte der Komplementaktivierung eine erhebliche Rolle in der Regulation der adaptiven Immunantwort spielen (z.B. benötigt eine optimale Antikörperproduktion auf T-Zell-abhängige Antigene Signale, welche unter Einbindung von Komplementrezeptoren auf B-Zellen initiiert werden) (Volanakis und Frank, 1998). Die Erkenntnis, dass einige der Komplementproteine ebenso

¹ Nomenklatur des Komplementsystems siehe Anhang

² Einteilung der Komplementproteine siehe Anhang

in der adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen, führte zur Ansicht, dass das Komplementsystem das angeborene und das adaptive Immunsystem verbindet (Fearon und Carter 1995).

Komplementproteine können nach Funktion (am Aktivierungsablauf beteiligte Proteine, solche, die die Aktivierung und die Aktivitäten im System regulieren und Proteine, die als Zellrezeptoren für Komplementproteine oder ihre Fragmente fungieren) eingeteilt werden.

Proteine, die bei der Komplementaktivierung mitwirken, fungieren als proteolytische Enzyme, Enzym-Co-Faktoren oder Enzymsubstrate. Einige davon sind Vorstufen biologisch aktiver Teile. Während der Aktivierung wird das Spaltprodukt C3b auf Pathogenoberflächen, also den Aktivator-Oberflächen abgelagert. Dieser Vorgang wird als Opsonisierung bezeichnet (Taylor, 1983). Der Vorgang der Opsonisierung muss genau geregelt sein, um Immunopathologie zu vermeiden (Sjöberg et al., 2009).

Die regulatorischen Mechanismen sind, mit dem Fokus der Aktivierung des Komplements auf eindringende Mikroorganismen einerseits und Verhinderung von Komplementablagerung auf normalen Zellen und Gewebezellen andererseits, fein aufeinander abgestimmt (Walport, 2001).

Eine genauere Beschreibung der Regulation der Komplementaktivierung folgt in Kapitel 1.5.4.

1.5.2. Die Aktivierung des Komplementsystems

Ebenso wie die erst später identifizierten Toll-like-Rezeptoren kann das Komplementsystem auch über fest verankerte Strukturerkennungs-Rezeptoren, welche sich zur Erkennung von pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs) entwickelt haben, aktiviert werden (Janeway und Medzhitov, 1999; Barton und Medzhitov, 2002). Die meisten Erkennungsstrukturen, welche an der Komplementaktivierung beteiligt sind, sind Serumproteine, welche zusätzlich zu spezifischen Antikörpern, Strukturerkennungs-Rezeptoren, wie Mannan-Bindendes Lectin (Epstein et al., 1996), Ficolin (Matsushita und Fujita, 2002), CRP (Szalai et al., 1997), C1q (Korb und Ahearn, 1997; Taylor et al.,

2000) und das natürliche Immunglobulin M (Reid et al., 1997; Boes et al., 1998; Baumgarth et al., 2000) beinhalten.

Komplement wird über drei verschiedene Signalwege aktiviert. Den klassischen Weg, den Lektin-Weg und den alternativen Weg.

Alle drei Wege bestehen aus einer Kaskade proteolytischer Spaltungen und führen zu den entscheidenden Enzymkomplexen (C3 und C5) zur Opsonisierung des Angriffsziels mit C3b/iC3b (Zulassen von Phagozytose), zur Freisetzung der pro-inflammatorischen Anaphylatoxine (C5a, C3a) welche Lymphozyten anlocken und letztendlich der Bildung des terminalen MAC, der zur Porenbildung auf der Pathogenoberfläche führt (Sjöberg et al., 2009).

1.5.2.1. Der klassische Weg³

Die Komplementaktivierung über den klassischen Weg ist Antikörper-abhängig (IgG und IgM) und erfolgt über die Bindung von Immunkomplexen.

Der Komplementfaktor C1 ist das erste Komplementprotein des klassischen Wegs. Der gesamte C1-Komplex besteht aus C1q und einem Tetramer aus je 2 Molekülen der Proenzyme C1s und C1r (Loos et al., 1980).

C1r und C1s sind für die Initiierung des klassischen Wegs verantwortlich. (Gál et al., 2009).

C1q besitzt mehrere Liganden, welche eine Komplementaktivierung herbeiführen können (z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und Mucopolysaccharide).

Bindet C1q an Antikörper-Antigen-Komplexe oder Bakterienoberflächen, werden die Serin-Proteasen C1r und C1s aktiviert (Phillips et al., 2009).

Nach ihrer Aktivierung katalysiert die Serinprotease C1s die beiden Startreaktionen des klassischen Wegs. C2 wird in C2a und C2b, C4 in C4a und C4b gespalten. C2a und C4b lagern sich zum C4bC2a-Komplex, der sogenannten C3-Konvertase zusammen (Janeway et al., 2002).

³ Komponenten des klassischen Wegs siehe Anhang

Die C3-Konvertase spaltet C3-Moleküle. Das hierbei entstehende C3b bindet entweder direkt an Mikroorganismen oder an den Fc-Bereich des Antikörpers. Durch Bindung eines weiteren C3b-Moleküls an C4bC2a entsteht die sogenannte C5-Konvertase (C4bC2aC3b), welche die späten Schritte der Komplementaktivierung vermittelt (Vollmar et al., 2005).

Inhibitorisch und damit regulatorisch wirken innerhalb des klassischen Wegs der Komplementaktivierung der C1-Esteraseinhibitor (C1-INH) und das C4b-bindende Protein (C4BP).

1.5.2.2. Der Lektin Weg⁴

Dieser Weg der Komplementaktivierung, der sowohl Antikörper- als auch C1q-unabhängig ist, wird auf Ebene des C4-Moleküls eingeleitet.

Das Mannan-Bindende-Lektin (MBL) und Ficoline (L-Ficolin und H-Ficolin) initiieren den Lektin Weg durch Bindung an mikrobielle Kohlenhydrate (Schwaeble et al., 2002; Phillips et al., 2009). Das MBL ist C1q sehr ähnlich und gehört ebenfalls zur Gruppe der Kollektine (Janeway et al., 2002).

Die Aktivierung erfolgt durch die MBL assoziierten Serinproteasen (MASP) MASP-1, MASP-2 und MASP-3. Diese weisen identische Teil-Strukturen auf, die ebenfalls denen von C1r und C1s stark homolog sind (Schwaeble et al., 2002).

Der an die Zellmembran gebundene MBL-MASP-Komplex aktiviert die Komplementkaskade analog des klassischen Wegs durch die Spaltung von C2 und C4, wobei durch die Bindung von C2b und C4b die C3-Konvertase entsteht.

⁴ Komponenten des Lektin Wegs siehe Anhang

1.5.2.3. Der alternative Weg⁵

Der alternative Weg kann an den Oberflächen zahlreicher Mikroorganismen ablaufen, ohne dass ein spezifischer Antikörper vorhanden sein muss. (Janeway et al., 2002). Die Aktivierung wird in der flüssigen Phase durch die spontane Hydrolyse von C3 initiiert (Pangburn et al., 1981). Dieser Prozess wird auch als „tickover“-Mechanismus bezeichnet.

Durch spontane Hydrolyse der Thioesterbindung im C3-Molekül entsteht C3(H₂O), so dass das Plasmaprotein B andocken kann, wodurch es dem Plasmaprotease Faktor D ermöglicht wird, Faktor B in seine Spaltprodukte Ba und Bb zu trennen. Bb bleibt hierbei an C3(H₂O) gebunden. Es entsteht der C3(H₂O)Bb-Komplex. Eine sogenannte C3-Konvertase der flüssigen Phase (Janeway et al., 2002). Diese spaltet C3 in C3a (ein Anaphylatoxin) und C3b, welches an Zelloberflächen bindet. Das so gebundene C3b kann erneut eine Bindung mit Faktor B eingehen, um anschließend wieder von Faktor D gespalten zu werden. Es entsteht die C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBb), welche instabil ist. Für sie ist Properdin ein Stabilisator (Smith et al., 1984). Durch erneute Anlagerung eines C3b Moleküls an die C3-Konvertase C3bBb entsteht die C5-Konvertase (C3bBbC3b), welche die folgenden Schritte der Komplementaktivierung kontrolliert (Walport, 2001).

Wird C3b an Körperzellen gebunden, verhindern komplementregulatorische Proteine im Plasma und auf Membranen der Körperzellen (z.B. der Komplementrezeptor CR1 oder der Decay-accelerating factor (DAF, bzw. Cluster of Differentiation (CD) 55)) ein Fortschreiten der Komplementaktivierung (Janeway et al., 2002).

⁵ Komponenten des alternativen Wegs siehe Anhang

1.5.2.4. C3(c) und C4 als zentrale Komplementproteine bei der Aktivierung über den klassischen und alternativen Weg

In dieser Arbeit wurde neben der kinetischen Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements und der durchflusszytometrischen Untersuchung von Komplement- und Toll-like Rezeptoren im humanen System noch eine quantitative Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4 unter dem Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen durchgeführt.

Eine quantitative Bestimmung der Serumproteine C3 und C4 liefert wichtige Hinweise zur Diagnose und zur Beurteilung von Krankheitsverläufen. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Liposomen auf die Menge der vorliegenden Serumproteine genutzt.

C4:

Das Komplementprotein C4 kommt im Plasma in einer Konzentration von 200 bis 600 mg/dl vor (Rother et al., 1998).

Als nicht-enzymatische Komponente der C3- und C5-Konvertase ist C4 für die Aktivierung des klassischen Wegs essenziell. Seine kovalente Bindung zu Immunglobulinen und Immunkomplexen verstärkt zudem die Löslichkeit von Immunaggregaten und die Eliminierung von Immunkomplexen über den Komplementrezeptor 1 auf Erythrozyten (Blanchong et al., 2001).

C3:

C3 kommt im Plasma in einer Konzentration von etwa 1,0 g/l vor, da es aber zu den Akute-Phase-Proteinen gehört, können die Plasmakonzentrationen bei Infektionen und Entzündungen erheblich schwanken (Kushner et al., 1972). Hauptsächlich wird es in der Leber produziert (Alper et al., 1969; Morris et al., 1982). Es wird aber auch von einigen extrahepatischen Zellen produziert. Zu diesen gehören Leukozyten, vor allem Monozyten und Makrophagen (Einstein et al., 1977; Whaley, 1980; Cole et al., 1983). Aber auch Lymphozyten und polymorphkernige Neutrophile (Botto et al., 1992), Fibroblasten (Whitehead et al., 1981; Katz und Strunk, 1988), Keratinozyten (Basset-Séguin et al., 1990),

Endothelzellen (Ueki et al., 1987; Warren et al., 1987) und verschiedene Epithelzellen sezernieren C3.

Natives C3 und sein physiologisches Zerfallsprodukt C3c stellen zentrale Proteine des Komplementsystems dar (Janssen und Gros, 2007).

Auf der Ebene von C3 laufen die Wege der Komplementaktivierung zusammen. Nach mehreren proteolytischen Spaltungen wird es in seine Spaltprodukte (C3a, C3b, iC3b, C3c, C3dg) geteilt, welche vielfältige Wirkungen besitzen (Villiers et al., 1999).

1.5.3. Membrane attack complex – Terminaler Weg der Komplementkaskade⁶

Die späten Schritte der Komplementkaskade sind an der zytolytischen Phase der immunvermittelten Lyse von Zielzellen beteiligt. Nach ihrer Aktivierung lagern sich diese Proteine zu einem transmembranen Kanal, als Membrane attack complex bezeichnet, zusammen. Dieser beschädigt die funktionelle Integrität von Phospholipid-Membranen (Rother et al., 1998).

Der initiale Schritt, welcher die Ausbildung des MAC auslöst, ist die proteolytische Spaltung von C5 durch die C5-Konvertase (DiScipio et al., 1983). In den nächsten Phasen leitet C5b das Zusammenlagern der späteren Komplementkomponenten und ihren Einbau in die Zellmembran ein. C5b bindet an C6, anschließend lagert sich C7 an diesen Komplex an. Dies führt zu einer Konformationsänderung der beteiligten Moleküle, so dass ein hydrophober Bereich auf C7 zugänglich wird. Dieser schiebt sich in die Lipiddoppelschicht.

Nach der Einbettung des C5b-C7-Komplexes und der Assoziation mit C8 wird die Phospholipidmembran durchbohrt und es entsteht eine erste transmembrane Pore (Stolfi, 1968), mit einem Durchmesser von 15-30 Å (Zalman und Müller-Eberhard, 1990). Obwohl sich der C5b-C8-Komplex auch in der flüssigen Phase bildet, ist er nur aktiv wenn er membrangebunden ist und sich dadurch C9 anlagern kann. Es kommt zu einer Polymerisierung von 10-16 C9-

⁶ Terminale Komplementkomponenten siehe Anhang

Molekülen. Es bildet sich der Membranangriffs-Komplex C5b-C8C9₁₆ mit einem Durchmesser von etwa 100 Å (Janeway et al., 2002). Als Konsequenz kommt es zur Zellyse.

1.5.4. Regulation der Komplementaktivierung

Die Abstimmung von Ausmaß der Komplementaktivierung über die Menge und Dauer der Anwesenheit von Komplementaktivatoren erfolgt über eine Hemmung von Enzymen durch regulatorische Proteine (Volanakis und Frank, 1998). Dadurch wird zudem ein unnötiger Verbrauch von Komplementfaktoren verhindert. Im Gegensatz zur Existenz vielzähliger inhibitorischer Plasmaproteine des Komplementsystems ist Properdin der einzige bekannte physiologische positive Regulator der Komplementkaskade (Schwaeble und Reid, 1999). Properdin, auch Faktor P genannt, bindet bei zahlreichen Mikroorganismen an die Oberfläche und stabilisiert die Konvertase (Janeway et al., 2002).

Einen Überblick über die Aktivierung und Funktionen des Komplementsystems mit den Wirkorten der regulatorischen Proteine zeigt Abbildung 3.

Die Wirkweise der inhibitorischen Kontrollproteine sind in Tabelle 1 dargestellt.

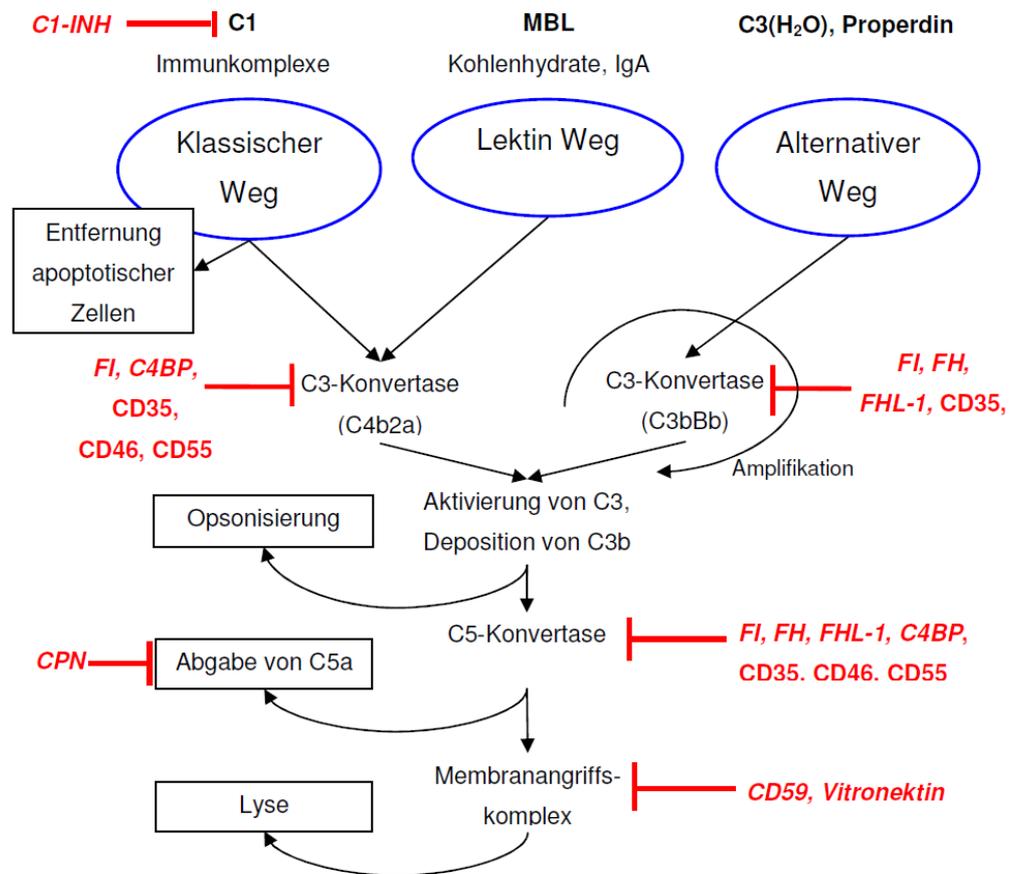


Abb. 3: Überblick über die Aktivierung, Funktionen und Regulationen des Komplementsystems.

Die drei Wege des humanen Komplementsystems und ihre physiologische Wirkung. Sie werden von Molekülen wie C1, MBL, Properdin und an aktiven Thioester gebundenes C3 (C3(H₂O)) aktiviert. In den quadratischen Kästen sind die Hauptfunktionen des Komplements dargestellt: Entfernung apoptotischer Zellen, Oponisierung von Pathogenen und Immunkomplexen zur Phagozytose, Abgabe von Anaphylatoxin und Lyse. Des Weiteren sind die regulatorischen Proteine an ihrem Wirkort eingezeichnet (im Plasma gelöste Proteine sind in kursiv geschrieben, membrangebundene Proteine sind in normaler Schrift bezeichnet). Lösliche Proteine: C1-Esteraseinhibitor (C1-INH), Faktor I (FI), C4b-bindendes Protein (C4BP), Faktor H (FH), Faktor H ähnliches Protein (FHL-1), Carboxypeptidase N (CPN) und Vitronektin. Membran gebundene inhibitorische Proteine: CD35, CD46, CD55, CD59. (Modifiziert nach Sjöberg et al., 2009).

Tabelle 1: Wirkweise der Inhibitorischen Kontrollproteine des Komplementsystems

Name (Symbol)	Rolle bei der Regulierung der Komplementaktivierung
C1-Inhibitor (C1INH)	Bindet an aktiviertes C1r, C1s und trennt es von C1q, so wird die Zeit während der das aktive C1s C4 und C2 spalten kann, begrenzt, ebenso wird die spontane Aktivierung von C1 im Plasma durch C1INH eingeschränkt.
C4-bindendes Protein (C4BP)	Wichtiger Regulator des klassischen Weges in der Flüssigen Phase. Bindet C4b, unterbindet dadurch die Bildung der C3-Konvertase, beschleunigt ihren Zerfall und dient als Kofaktor für FI. Beeinflusst ebenfalls den alternativen Weg über die Bindung von C3b wenn auch weniger als FH (Bloom et al., 2003).
Komplementrezeptor 1 (CR1), CD35	Bindet an C4b und ersetzt dabei C2b oder bindet an C3b und ersetzt Bb; Kofaktor für FI.
Faktor H (FH) und Faktor H-ähnliches Protein (FHL-1)	FH ist der wichtigste Inhibitor der flüssigen Phase des alternativen Weges (Alexander und Quigg, 2007). FH unterscheidet Körperzellen-gebundenes C3b von Pathogen-gebundenem C3b anhand des Kohlenhydratgehaltes der Zellmembranen, geringere Affinität zu Pathogen-gebundenem C3b (Janeway et al., 2002). FH und FHL-1 beschleunigen den Abbau der alternativen C3-Konvertase, binden an C3b und ersetzen Bb; Kofaktoren für FI.

Faktor I (FI)	Serinprotease, die – unterstützt von FH, MCP, C4BP oder CR1 – C3b zu iC3b dann weiter zu C3dg spaltet (Verminderung der Aktivierung des alternativen Weges) und C4b zu C4c und C4d spaltet (Verminderung der Aktivierung über den klassischen Weg und den Lektin Weg). Durch die Abschwächung aller Komplementaktivierungswege hat FI eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Komplementaktivierung (Sim et al., 1993).
Decay-accelerating factor (DAF)	Membranprotein, das Bb von C3b und C4b verdrängt.
Membran-Kofaktor-Protein (MCP, CD46)	Membranprotein, das die Inaktivierung von C3b und C4b durch FI stimuliert.
Protectin (CD59)	Verhindert Bildung des MAC auf autologen oder allogenen Zellen durch Hemmung der Bindung von C9 an den C5b,6,7,8-Komplex; in Membranen weit verbreitet.
Carboxypeptidase N (CPN)	Hemmt die Anaphylatoxine C5a und C3a durch Entfernung ihrer C-terminalen Arginin-Reste (Sjöberg et al., 2009).
Vitronektin	Das "S-Protein", welches sich später als identisch mit Vitronektin herausstellte, wurde als inhibierende Komponente der terminalen Phase der Komplementreaktion entdeckt (Kolb und Müller-Eberhard, 1975; Podack und Müller-Eberhard, 1975). Hemmt den Aufbau des MAC.

1.6. Cluster of Differentiation (CD)

Ende der 1970er Jahre gelang es César Milstein und Georges Köhler monoklonale Antikörper herzustellen. Rasch wurden hunderte verschiedener Klone mit teils unterschiedlichen, teils überschneidenden Spezifitäten generiert. Die genetische und molekulare Identität des Antigens war meist noch unbekannt. Um die Vielfalt der Moleküle überschaubar zu machen, wurden 1981 Zelloberflächenmoleküle, die von bestimmten monoklonalen Antikörpern erkannt wurden, in Gruppen, den Cluster of Differentiation, zusammengefasst.

Jeder „Differenzierungscluster“ erhielt eine Kennnummer (beispielsweise CD4), die lediglich die Reihenfolge der Entdeckung ausdrückte. Jeder Differenzierungscluster ist im Allgemeinen mit mindestens einer Funktion verknüpft, die man aufgrund der Effekte der Antikörper auf die Funktion von Zellen oder Gewebe ermittelte (Janeway et al., 2002).

Einige CDs haben Rezeptor- oder Signalfunktion, bei anderen wurde enzymatische Aktivität nachgewiesen. Zudem wird einigen Clustermolekülen eine zentrale Rolle bei der interzellulären Kommunikation zugeschrieben.

Anhand dieser immunologisch unterscheidbaren Zelloberflächenmolekülen können nun verschiedene Populationen, Subpopulationen und Differenzierungsstadien von Zellen unterschieden werden. Zusätzlich können Aussagen über eine Veränderung der Zelloberfläche anhand einer Zu- oder Abnahme der Rezeptorexpression auf einen bestimmten Stimulus gemacht werden.

Ursprünglich bezog sich die CD Nomenklatur auf den Menschen, jedoch werden den orthologen Proteinen, vor allem in der Maus (aber auch anderen Organismen), die entsprechenden Cluster zugewiesen.

Nach der letzten Humanen-Leukozyten-Differenzierungs-Antigen-Konferenz im Jahr 2004 umfasste die CD Nomenklatur über 300 Cluster, die teilweise noch weiter unterteilt werden.

In Tabelle 2 sind die CD Antigene zusammengefasst, welche für die vorliegende Arbeit relevant sind.

Tabelle 2: Für die Arbeit relevante CD-Antigene

Rezeptor (Molekül- masse kDa)	Exprimierende Zellen	Funktionen	Verwandtschafts- beziehungen / Besonderheiten
CD11b (170)	Myeloide Zellen und natürliche Killerzellen	α M-Untereinheit des Integrins CR3 (assoziiert mit CD18); bindet an CD54, die Komplementkompo- nente iC3b sowie extrazelluläre Matrixmoleküle	Integrin- α Untereinheit von Leukozyten-Integrin Andere Bezeich- nung: MAC-1
CD14 (53-55)	Myelomono- zytische Zellen	Rezeptor für den Komplex aus Lipopoly- saccharid und lipopoly- saccharid-bindendem Protein (LBP)	
CD18 (95)	Leukozyten	β_2 -Untereinheit der Integrine; bindet an CD11a, b, c und d	Integrin- β
CD21 (145)	Reife B-Zellen, follikuläre den- dritische Zellen	Rezeptor für Komple- mentkomponente C3d und Epstein-Barr-Virus; bildet zusammen mit CD19, CD21, CD81 einen Ko-Rezeptor für B-Zellen	Komplementregula- tionsprotein (CCP) Entspricht dem Komplementrezeptor CR2

CD35 (250)	Erythrozyten, B-Zellen, Mono- zyten, neutro- phile und eosi- nophile Zellen, follikuläre den- dritische Zellen	Komplementrezeptor 1, bindet C3b und C4b; vermittelt Phagozytose	Komplementregula- tionsprotein Entspricht dem Komplementrezeptor CR1
CD55 (60-70)	Hämatopoeti- sche und nicht- hämatopoeti- sche Zellen	Decay-accelerating factor (DAF); bindet C3b; zerlegt die C3/C5-Konvertase	Komplementregula- tionsprotein DAF
CD88 (43)	Polymorphker- nige Leuko- zyten, Mastzellen, Makrophagen	Rezeptor für die Komplementkom- ponente C5a	G-Protein-ge- koppelter Rezeptor Andere Bezeich- nung: C5aR

Aus Janeway et al., 2002, S 708-713.

1.7. Toll-like Rezeptoren

Im Gegensatz zum spezifischen Immunsystem besitzt das unspezifische eine begrenzte Zahl an Rezeptoren, welche pathogene Strukturen, die sogenannten „Pathogen Associated Molecular Receptors“ (PAMPs) erkennen können. Zu diesen Rezeptoren, den „Pattern Recognition Patterns“ (PRRs) gehören auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Sie erkennen Pathogene und sind an der Einleitung der Immunantwort beteiligt (Medzhitov und Janeway, 2000; Kopp und Medzhitov 2003). Abb. 4 zeigt die Erkennung mikrobieller Bestandteile durch TLR-Rezeptoren.

Der Toll-Rezeptor wurde 1984 in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Er gehörte zu einer Reihe an Entdeckungen, wofür Frau Christiane Nüsslein-Volhard 1995 den Nobelpreis für Medizin erhielt (Hansson und Edfeldt, 2005).

Eine auffällige Ähnlichkeit der intrazellulären Domäne des TLR und des Interleukin-1 Rezeptors der Säugetiere wurde beschrieben (Gay und Keith, 1991). Durch diese Ähnlichkeit mit den Toll-Rezeptoren, erhielten die Toll-like Rezeptoren ihren Namen.

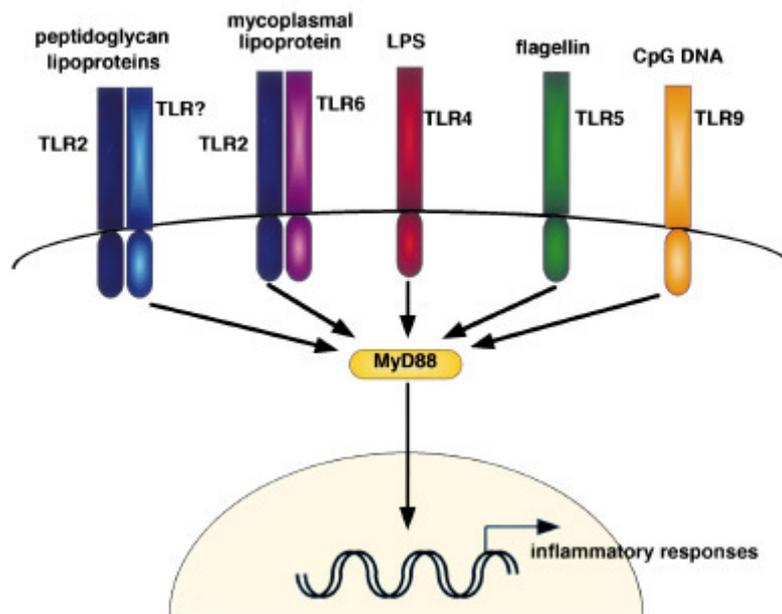


Abb. 4: Erkennung mikrobieller Bestandteile durch TLR-Rezeptoren.

Toll-like Rezeptoren erkennen ein spezifisches Muster von mikrobiellen Bestandteilen. Unter den 10 bekannten TLR Mitgliedern der Säugetiere sind TLR 2, 4, 5, 6 und 9 an der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen beteiligt. TLR 2 ist für die Erkennung von Peptidoglycan und Lipoprotein verantwortlich, dahingegen erkennt TLR 4 LPS, TLR 9 ist ein Rezeptor für CpG DNA, TLR 5 für Flagellin. TLR 6 ist funktionell mit TLR 2 assoziiert und unterscheidet zwischen TLR 2-Liganden. Folglich unterscheiden die Mitglieder der TLR-Rezeptoren zwischen spezifischen Mustern von bakteriellen Bestandteilen. Aus Takeda und Akira, 2001.

In der vorliegenden Arbeit sind die im Folgenden beschriebenen Toll-like Rezeptoren TLR 4 und TLR 2 von Bedeutung.

1.7.1. TLR 4

Lipopolysaccharide sind ein Hauptbestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, die zum Auslösen eines septischen Schocks führen können. Dieser ist ein Ergebnis einer provozierten übermäßigen Freisetzung von Zytokinen, besonders Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), häufig durch eine Bakterieninfektion. Er ist damit eine unerwünschte Folge derselben Aktivität von TNF- α welche auch zur Eindämmung von lokalen Infektionen von Bedeutung ist (Janeway et al., 2002).

Zwei Mausstämme sind dafür bekannt, auf LPS vermindert ansprechbar zu sein (Takeda und Akira, 2001). Zwei unabhängige Arbeitsgruppen analysierten die Gene, welche für das verminderte Ansprechen auf LPS verantwortlich sind und fanden Mutationen im TLR 4 Gen dieser Stämme (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

Mäuse, welchen durch Genmodifikation TLR 4 fehlt, zeigen ebenfalls ein vermindertes Ansprechen gegenüber LPS, was bestätigt, dass TLR 4 der lang gesuchte Rezeptor ist, welcher für das Erkennen von LPS verantwortlich ist (Hoshino et al., 1999).

LPS bindet an im Plasma vorkommendes LPS-bindendes Protein, wobei ein Komplex entsteht. Dieser LPS-LBP-Komplex bindet an CD14, das entweder frei im Plasma oder über einen Phosphoinosit-Glykolipid-Schwanz an die Zelloberfläche gebunden vorkommt.

TLR 4 bindet an den CD14-LBP-LPS-Komplex über eine Leucin-reiche Region in der extrazellulären Domäne von CD14. Dadurch übermittelt TLR 4 ein Signal an den Zellkern, das den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert.

Mäusen, denen die TLR-4-Funktion fehlt sind zwar resistent gegenüber einem septischen Schock, zeigen jedoch eine hohe Anfälligkeit gegenüber LPS-tragenden Pathogenen, wie beispielsweise *Salmonella typhimurium* (Janeway et al., 2002).

1.7.2. TLR 2

TLR 2 ist für die Ausbreitung einer inflammatorischen Immunantwort bei Kontakt mit Bestandteilen grampositiver Organismen, Hefen und Mykobakterien wichtig (Lien et al., 1999; Underhill et al., 1999; Jones et al., 2001).

Zusätzlich wird TLR 2 durch bakterielle Peptidoglykane, bakterielle Lipoproteine und Lipopeptide sowie von Zellwandstrukturen, welche auf nahezu allen relevanten grampositiven und gramnegativen Pathogenen vorkommen, aktiviert (Brightbill et al., 1999).

TLR 2 ist möglicherweise auch in die LPS-induzierte Zell-Aktivierung involviert, da TLR-2-Antikörper zum Teil die Interleukin 12 Produktion humaner dendritischer Zellen inhibieren (Thoma-Uszynski et al., 2000).

Eine Stimulation mit TLR 2 Agonisten scheint mit einer schnellen Abgabe von Interleukin 10 assoziiert (Re und Strominger, 2004).

1.8. Aufgabenstellungen und Zielsetzung der Arbeit

Liposomen sind kugelförmige, aus amphiphilen Molekülen gebildete Vesikel, welche aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften in der pharmazeutischen Industrie bereits als Arzneimittelträger eingesetzt werden. Es stellt sich daher die Frage, ob sich Liposomen somit potenziell auch für eine effektive und nebenwirkungsarme Therapie der septischen Granulomatose eignen. Eine Hypothese ist, dass der bei der angeborenen CGD vorliegende Mangel des intakten Enzyms NADPH-Oxidase, durch spezifische Aufnahme von mit dem Enzym Glucoseoxidase-beladenen Liposomen, durch die Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems (MPS) ausgeglichen werden kann. Durch Interaktion von Liposomen mit dem Komplementsystem kommt es allerdings zur Destabilisierung der Liposomen, was zu einer Herabsetzung der Bluthalbwertszeit führt und einer effektiven Therapie im Wege steht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollen daher zunächst zugrundeliegende Vorgänge, welche bei der Aktivierung des Komplementsystems durch Liposomen eine Rolle spielen, näher charakterisiert werden. Hierbei wurden vor

allem Unterschiede verschiedener Liposomenformulierungen auf die Komplementaktivität untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten sowohl in mehreren, teilweise in dieser Arbeit etablierten, *in-vitro*-Modellen als auch *in vivo* in einem Mausmodell für CGD, z.T. nach Infektion mit verschiedenen krankheitstypischen Erregern.

Da das endgültige Ziel ist, Liposomen bei der Therapie der septischen Granulomatose in Patienten einzusetzen, widmet sich der zweite Teil der Arbeit der Frage, ob diese Maus-Modelle mit dem humanen System vergleichbar sind oder ob, in der Schlussfolgerung, mit wesentlichen Unterschieden im Menschen zu rechnen ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Aqua bidest (Ampuwa)	Fresenius
BCA Protein Assay Reagent (Bicinchoninsäure-Kit)	Pierce
FACS Lysing Solution (10x)	Becton Dickinson
FACS-Flow (Laufpuffer FACS)	Becton Dickinson
Heparin, Canusal (100units/ml)	CP Pharmaceuticals Ltd. Wrexham Uk
Isotonische Natriumchlorid Lösung	B/Braun
Komplement-Reagenzien-Testkit (OWZD 11) (mit Erythrozyten- und Ambozeptor- Reagenzien)	Dade Behring Marburg GmbH
LPS 1 (Lipopolysaccharid von Escherichia coli1)	Alexis
LPS 2 (Lipopolysaccharid von Salmonella minnesota)	Alexis
LPS 3 (Lipopolysaccharid von Escherichia coli2)	Alexis
Maus Komplement	Chemical Credential, ICN Biomedicals, Inc.
N/T Proteinkontrolle SL high	Dade Behring Marburg GmbH
N/T Proteinkontrolle SL low	Dade Behring Marburg GmbH

N/T Proteinkontrolle SL medium	Dade Behring Marburg GmbH
Standard-Human-Plasma (ORKL)	Dade Behring Marburg GmbH
Turbiquant [®] C3c	Dade Behring Marburg GmbH
Turbiquant [®] C4	Dade Behring Marburg GmbH

2.1.2. Antikörper

2.1.2.1. Antikörper für die Färbungen im humanen System

<i>Antikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD11b/MAC1PE	BD Bioscience, Heidelberg
CD14FITC	BD Bioscience, Heidelberg
CD14PE	BD Bioscience, Heidelberg
CD18FITC	BD Bioscience, Heidelberg
CD35PE	BD Bioscience, Heidelberg
CD55Cy-Chrome	BD Bioscience, Heidelberg
CD88PE	BD Bioscience, Heidelberg
Maus IgG2aCy-Chrome	BD Bioscience, Heidelberg
TLR2PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
TLR4PE	eBioscience, San Diego, CA, USA
γ1γ2 (IgG1FITC / IgG2aPE)	BD Bioscience, Heidelberg

PE = Phycoerythrin; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat;

Cy-Chrome = kombinierte R-phycoerythrin und Cyanin Farbe (PE-Cy-5)

2.1.2.2. Antikörper für die Färbungen im murinen System

<i>Antikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD11bPE, Rat anti mouse (ram)	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA
CD18FITC (ram)	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA
CD21/35FITC (ram)	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA
Rat IgG _{2b} FITC	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA
Rat IgG _{2b} PE	Pharmingen (BD), San Diego, CA, USA

2.1.3. Leerliposomen

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
EPC (Eiphosphatidylcholin + Cholesterin (Chol.) (70:30 mol%))	A. Kimpfler, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
EPG (Eiphosphatidylglycerol + EPC + Cholesterin (30 : 40 : 30 mol%))	A. Kimpfler, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
PEG (Polyethylenglykol + EPC + EPG + Cholesterin (7,5 : 37,5 : 27,5 : 27,5 mol%))	A. Kimpfler, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

2.1.4. Puffer und Lösungen

Substanz	Bezugsquelle
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}), ohne Natrium Bicarbonat	Biochrom, Berlin
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , ohne Phenolrot	Biochrom, Berlin
<i>Gelatine-Veronal-buffer + Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA) (GVBE-Puffer), Stock 5x: Universitätsapotheke Tübingen</i>	
83,0 g Natriumchlorid (NaCl) 10,19 g Natrium (Na)-5,5'diethylbarbiturat 10 g Gelatine 2,0 l Aqua dest. (Millipore) pH 7,35 sterilfiltriert + 35,82 g Na_3 -EDTA	
<i>Gelatine-veronal-buffer (GVB-Puffer), (Sock 5x): Universitätsapotheke Tübingen</i>	
83,0 g NaCl 10,19 g Na-5,5'diethylbarbiturat 10 g Gelatine 1,5 l H_2O pH 7,35 sterilfiltriert	
<i>Gelatine-Veronal-buffer + Kalziumchlorid (CaCl_2) + Magnesiumchlorid (MgCl_2) (GVB⁺⁺-Puffer), (Stock 5x):</i>	
75 ml (GVB Stock 5x) + 0,1 ml CaCl_2 (0,3M) + 0,1 ml MgCl_2 (2,0M) + 25 ml Aqua dest. (Millipore)	

2.1.5. Biologische Materialien

Materialien	Bezugsquelle
heparinisiertes Mausvollblut	Iris Schwantzer, C.E.Gerber, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
heparinisierte Blutproben von gesunden Personen	freiwillige, gesunde Spender
Kaninchen Erythrozyten	Charles River, Kisslegg
Maus-Serum	C.E. Gerber, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
gp91 ^{phox^{-/-}} -B6 129S6 Cybb ^{tm1din} (CGD-Mäuse)	Dr. M. Grez (GSH, FB 16), Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer- Haus Frankfurt, Dr. F. von Loewenich, Prof. C. Bogdan, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Mikrobiologie, Freiburg, dann Eigenzucht durch C.E. Gerber und Iris Schwantzer Eberhard-Karls-Universität Tübingen
C57Bl6/J (Wildtyp)	Charles River, Sulzfeld / Eigenzucht Kinderklinik, Universität Tübingen

2.1.6. Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Cobas Micros	Roche Hematology, Basel, Schweiz
ELISA-Reader, Milena Kinetic Analyzer	DPC-Biermann, Bad Nauheim

FACScan (Fluorescence Activated Cell Sorter)	BD Bioscience, Heidelberg
Gefrierschrank -20 °C	Kirsch GmbH, Offenburg
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Spectrophotometer, <i>Ultrospec 3000</i>	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Abimed, Langenfeld
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), <i>Pipetman</i>	Gilson, Bad Camberg
Plattenschüttler	Heidolph, Kelheim
Sterile Werkbank, <i>HeraSafe</i>	Heraeus, Osterode
Turbitimer	Dade Behring, Marburg
Vortex, <i>Reax top</i>	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Memmet, Schwabach
Wasserdestillationssystem zur Herstellung von Aqua bidest., <i>Milli-Q biocel</i>	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge für Eppendorf-Gefäße, <i>Mikro 22R</i>	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, <i>Rotixa 50 RS</i>	Hettich, Tuttlingen

2.1.7. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
96-Well-Platte	Nunc, Wiesbaden
Butterfly	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten aus Kunststoff	Sarstedt, Nümbrecht
Single use syringe filter, <i>Minisart</i>	Sartorius, Göttingen

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen 10 μ l	Biozym, Hess
Pippettenspitzen 200 μ l und 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße für FACS (15 ml)	BD Falcon (BD Biosciences), Heidelberg
Röhrchen 15 ml mit Deckel	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml, Cellstar PP Test-Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritzen aus Kunststoff	BRAUN, Melsungen
Stripette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated Costar, NY, USA
Latexhandschuhe, Safe Skin Satin Plus	Hakle-Kimberly, Mainz

2.1.8. Software

Software	Bezugsquelle
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Microsoft Office 2003 Windows XP Professional	Microsoft, München
GraphPad Prism- Software Version 5.0®	GraphPad Software La Jolla, USA
Soft Max Pro	Molecular Devices Downigtown, PA, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme

Mit einer heparinhaltigen Spritze wurde gemäß Ethikantrag (Projektnummer 16/2002V) freiwilligen, gesunden Spendern, welche keine Medikamente einnahmen, Blut abgenommen. Dabei wurde 0,5 ml Heparin [50 Units] auf 10 ml Vollblut verwendet. Vor Beginn der Verarbeitung der Proben wurde von jedem Spender ein Blutbild mit Hilfe des Cobas Micros erstellt, um das Blut auf Pathologien zu prüfen.

2.2.2. Erythrozytenisolierung aus Vollblut

Zur Isolierung der Erythrozyten wurde das Vollblut bei 1250 x g für 10 Minuten bei 10 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die verbliebenen Erythrozyten sorgfältig in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde mindestens dreimal wiederholt oder bis der Überstand frei von Hämolyseprodukten war. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Erythrozyten in Gelatine-veronal-Puffer (GVBE + EDTA) aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Verwendung von Erythrozytensuspensionen musste zunächst die Zellzahl ermittelt werden. Das Hämatologie-Gerät Cobas Micros OT ist ein vollautomatisches Analysesystem für die Ermittlung des Blutbildes einschließlich der Thrombozytenparameter und einer Leukozyten-differenzierung. Das Probenvolumen beträgt 12 µl.

Das Messverfahren für die Bestimmung der Erythrozyten beruht auf der Änderung des Widerstandes beim Durchtritt der Zellen durch eine Messkapillare. Nachdem die Probe mit einer elektrolytischen Lösung (stromleitend), deren Leitfähigkeit stark von der Leitfähigkeit der Zellen abweicht, verdünnt wurde, wird die Lösung durch eine Kapillare angesaugt. Auf beiden Seiten der Kapillare befinden sich zwei Elektroden, zwischen denen ein konstanter Strom fließt.

Beim Durchtritt der Zelle durch die Kapillare erhöht sich der elektrische Widerstand zwischen den beiden Elektroden. Die Widerstandsänderung bewirkt eine Veränderung des Spannungspotentials, welche proportional zum Zellvolumen ist.

Durch einen Verstärkerstromkreis erfolgt eine Verstärkung der geringen Spannungswerte der durch die Zellen ausgelösten Impulse.

2.2.3. Liposomenherstellung und Charakterisierung

Alle Leerliposomen, die in den *in-vitro*-Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Frau Andrea Kimpfler, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Technologie Universität Freiburg, hergestellt und für die Versuche zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einer Konzentration von 40 millimolar geliefert.

Die Liposomenherstellung erfolgte nach der Extrusionsmethode.

Vorbereitend wurden multilamellare Vesikel nach der Filmmethode hergestellt. Die verschiedenen Lipidmengen (siehe unten) wurden in einem Rundkolben mit Ethanol oder Methanol gelöst. Das Lösungsmittel wurde durch Verdunstung und Nachtrocknen durch ein Hochvakuum entfernt. Die getrockneten Lipidfilme wurden durch den Zusatz der entsprechenden Menge Phosphatpuffer von den Wänden abgelöst.

Anschliessend folgte der eigentliche Extrusionsvorgang. Dazu wurden die MLVs milliliterweise mittels eines LiposoFast®-Extruders durch Polycarbonatmembranen extrudiert. Es wurde eine Membran mit einer Porengröße von 200 nm gewählt, durch die die Präparation 21x bis zur Größenkonstanz gepresst wurde. Die Liposomengrößen wurden mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie-Messung (PCS) kontrolliert.

Es wurden folgende Lipidmischungen verwendet:

Eiphosphatidylcholin : Cholesterin im Verhältnis (mol%) 70 : 30 (EPC), Eiphosphatidylglycerol : EPC : Cholesterin im Verhältnis (mol%) 30 : 40 : 30 (EPG), sowie Polyethylenglykol : EPC : EPG : Cholesterin im Verhältnis (mol%) 7,5 : 37,5 : 27,5 : 27,5 (PEG).

2.2.4. Inkubation von Vollblut mit Liposomen

Zunächst wurden aus dem heparinisierten Vollblut einzelner Spender und den jeweiligen Liposomenformulierungen folgende Probenansätze für 2.2.8.2. und 2.2.9. hergestellt.

Tabelle 3: Schema für die Liposomen-Inkubation mit Vollblut

	Vollblut	Liposomen 2 mM	Liposomen 10 mM	GVB⁺⁺
Neg. Kontrolle	500 µl	-	-	500 µl
EPC 1 mM f.c.	500 µl	500 µl EPC	-	-
EPC 5 mM f.c.	500 µl	-	500 µl EPC	-
EPG 1 mM f.c.	500 µl	500 µl EPG	-	-
EPG 5 mM f.c.	500 µl	-	500 µl EPG	-
PEG 1 mM f.c.	500 µl	500 µl PEG	-	-
PEG 5 mM f.c.	500 µl	-	500 µl PEG	-

GVB⁺⁺ (Gelatine-veronal-buffer + CaCl₂ + MgCl₂), f.c. (final concentration)

Die Probenansätze wurden jeweils für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend zweimal für 5 Minuten bei 4 °C und 2835 x g zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand (Plasma) abgenommen. Die Probenansätze wurden schließlich aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Um vergleichbare Bedingungen zu erreichen, wurde die Negativkontrolle bei der Inkubation jeweils parallel mitgeführt.

2.2.5. Untersuchung von Komplement-Rezeptoren von Maus und Mensch mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS)

Prinzip der Methode:

Die FACS-Analyse beruht auf dem Prinzip der Einzelzell-Durchflußzytometrie. Bei der durchflußzytometrischen Messung lassen sich mit Hilfe monochromatischen Lichts, das durch einen Laser erzeugt wird, sowohl Streulicht- als auch Fluoreszenzsignale einzelner Zellen detektieren, wodurch sich einzelne Leukozytenpopulationen aufgrund ihrer Morphologie und Eigenfluoreszenz differenzieren lassen.

Im Rahmen dieses Versuches erfolgte die Messung mit dem FACScan von Becton-Dickinson, dessen Strahlengang in Abb. 5 vereinfacht dargestellt wurde. Durch die Messung des größtenteils ungebrochenen Vorwärtsstreulicht (forward angle light scatter, FSC) lassen sich Aussagen über die Größe der Zellen treffen.

Das beim Durchtritt durch die Zelle um ungefähr 90° gebrochene Licht wird vom sogenannten ‚Side-scattered-light‘- (SSC-) Detektor wahrgenommen. Die SSC-Komponente gibt Auskunft über die Granularität der Zellen.

Die Detektion von zellulärer Fluoreszenz beruht auf der Anregung von Fluorochromen durch einen Laser, die dann bei der Rückkehr in ihren Ausgangszustand, Photonen spezifischer Wellenlängenbereiche, die den entsprechenden Fluorochromen zugeordnet werden können, aussenden.

Die Verwendung Fluorochrom-gekoppelter spezifischer Antikörper ermöglicht zudem die Quantifizierung von Oberflächenantigenen (z.B. CD18).

Abb. 6 gibt einen Überblick über die Fluoreszenzspektren der am häufigsten verwendeten Fluorochrome.

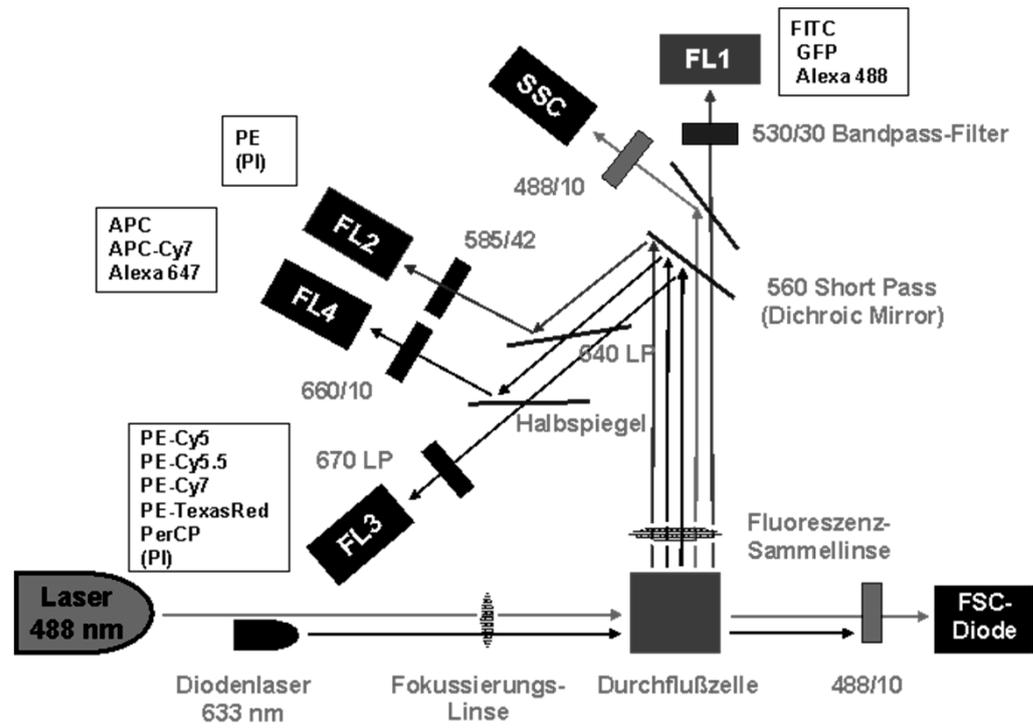


Abb. 5: Schematische Darstellung des Strahlenganges eines FACScan-Gerätes

vgl: <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>, [Stand: 12.05.2006]

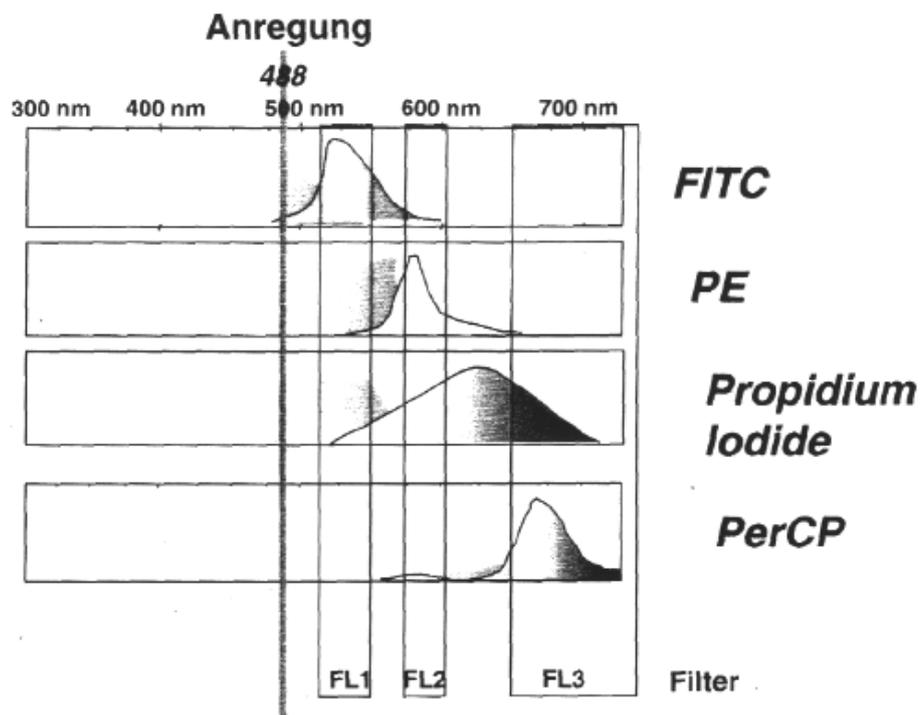


Abb. 6: Fluoreszenzspektren der für die FACS-Analyse wichtigsten Fluorochrome.

Es werden die Anregungsspektren sowie die Detektionsbereiche der verschiedenen Filter des FACSCalibur (FL1-3) dargestellt. FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; PE = Phycoerythrin; PerCP = Peridinin Chlorophyll Protein. Aus Immunozytometrische Systeme, Becton-Dickinson.

2.2.5.1. Murines System

Für diesen Versuch wurde heparinisiertes Mausvollblut aus folgenden *in-vivo*-Versuchen verwendet (Tabellen 4 und 5). Alle Proben wurden freundlicherweise von Frau Dr. Claudia Gerber und Iris Schwantzer, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Zu beachten ist, dass in den *in-vivo*-Versuchen anstelle der Leerliposomen, Liposomen mit Glucose-Oxidase verwendet wurden.

Tabelle 4: Infektion mit Staphylococcus aureus und einmalige Gabe von EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase

Anzahl Tiere	Mausstamm CGD (<i>gp91phox</i> -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion = d0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Plasma- entnahme
2	wt	-	-	Tag 6
2	wt	0,24 x 10 ⁸ Staph. aureus	-	Tag 6
2	wt	0,24 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ , 40 mM, d5	Tag 6
2	CGD	-	-	Tag 6
2	CGD	-	+ , 40 mM, d5	Tag 6
4	CGD	0,24 x 10 ⁸ Staph. aureus	-	Tag 6
5	CGD	0,24 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ , 40 mM, d5	Tag 6

d (Tag), CGD (Chronic Granulomatous Disease), wt (Wildtyp), Staph. aureus (Staphylococcus aureus), mM (millimolar)

Tabelle 5: Infektion mit Staphylococcus aureus und dreimalige Gabe von EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase

Anzahl Tiere	Mausstamm CGD (<i>gp91phox</i> -/-) wt (<i>C57Bl6/J</i>)	Infektion = d0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Plasma- entnahme
2	wt	-	-	Tag 7
2	wt	0,18 x 10 ⁸ Staph. aureus	-	Tag 7
2	wt	0,18 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ , 40 mM, d4, d5, d6	Tag 7
2	CGD	-	-	Tag 7
2	CGD	-	+ , 40 mM, d4, d5, d6	Tag 7
5	CGD	0,18 x 10 ⁸ Staph. aureus	-	Tag 7
5	CGD	0,18 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ , 40 mM, d4, d5, d6	Tag 7

2.2.5.1.1. Messung der Komplementrezeptorexpression auf Leukozyten

Untersucht wurden die murinen Komplementrezeptoren CD11b, CD18, CD21 und CD35. Dieser Versuch diente der Untersuchung, ob es durch die *in-vivo*-Stimulierung der Leukozyten durch Liposomen zu einer Hochregulierung der Komplementrezeptoren kommt.

Durchführung:

30 µl Mausvollblut wurden nach dem unten aufgezeigten Schema (Tabelle 6) mit Antikörpern versetzt, wobei die PE-markierten Antikörper mit PBS 1:2 verdünnt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Tabelle 6: Probenansätze für die FACS-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Liposomen auf das murine Komplementsystem

<i>Probe</i>	<i>Rat IgG2b FITC</i>	<i>Rat IgG2b PE</i>	<i>CD11b PE</i>	<i>CD18 FITC</i>	<i>CD21/35 FITC</i>
Isotypen-Kontrolle	1 µl	1 µl			
CD11b/18			1 µl	1 µl	
CD21/35					1 µl

Zur Lyse der Erythrozyten wurde anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 ml Lysepuffer inkubiert und drei Mal mit PBS bei 350 x g und 10 °C gewaschen. Zur Messung wurden die Proben in 150 µl PBS aufgenommen.

Alle Proben wurden anschließend mittels FACS-Analyse ausgewertet.

2.2.5.2. Humanes System

2.2.5.2.1. Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Komplement-Rezeptoren, Integrine, CD55 und CD14 von humanen Leukozyten

Zur Bestimmung des Einflusses von Leerliposomen auf das Komplementsystem wurde folgendes mittels der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie untersucht:

- a. Komplement-Rezeptoren für C3b, C4b (CD35) und C5a (CD88),
- b. mit dem Komplementsystem assoziierte Proteine (CD11b/MAC-1, CD18, CD55 (decay-accelerating factor)),
- c. CD14, ein Rezeptor für Lipopolysaccharide und Lipopolysaccharid-bindendes Protein.

Durchführung:

Es wurden verschiedene Probenansätze laut dem folgenden Schema angesetzt: (Tabelle 7 und 8).

Tabelle 7: Isotypen- und Fluoreszenzkontrollen für die FACS-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Leerliposomen auf das humane Komplementsystem

Isotypen- und Fluoreszenzkontrollen:	Isotypenkontrolle: 10 µl Maus-IgG Cy-Chrom + 10 µl γ1γ2	Fluoreszenzkontrolle 1: 10 µl CD18FITC	Fluoreszenzkontrolle 2: 10 µl CD88PE	Fluoreszenzkontrolle 3: 10 µl CD55Cy-Chrome
Vollblut + HBSS	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

Tabelle 8: Probenansätze für die FACS-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Leerliposomen auf das humane Komplementsystem

Proben:	10 µl CD11b/MAC1PE + 10 µl CD18FITC	10 µl CD55Cy-Chrome + 10 µl CD88PE	10 µl CD35PE + 10 µl CD14FITC
VB + HBSS	Probe 5	Probe 12	Probe 19
VB + EPC 1 mM f.c.	Probe 6	Probe 13	Probe 20
VB + EPG 1 mM f.c.	Probe 7	Probe 14	Probe 21

VB + PEG 1 mM f.c.	Probe 8	Probe 15	Probe 22
VB + EPC 5 mM f.c.	Probe 9	Probe 16	Probe 23
VB + EPG 5 mM f.c.	Probe 10	Probe 17	Probe 24
VB + PEG 5 mM f.c.	Probe 11	Probe 18	Probe 25

VB (Vollblut) HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

Je 100 µl Vollblut wurden mit 100 µl des entsprechenden Reagenz (HBSS, EPC 1 mM, EPC 5 mM, EPG 1 mM, EPG 5 mM, PEG 1 mM, PEG 5 mM) nach gründlichem Resuspendieren in mit Parafilm verschlossenen Reaktionsgefäßen über 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden die Liposomen durch zweimaliges Waschen des Pellets mit jeweils 100 µl sterilem PBS und Zentrifugation bei 400 x g und 10 °C entfernt.

Die Ansätze wurden danach für 15 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe obiges Schema) bei 4 °C inkubiert.

Nach Zugabe von 2 ml FACS-Lysepuffer [1:10 v/v in aqua dest.] wurden die Proben für 8 Minuten im Dunkeln inkubiert, wobei Erythrozyten lysiert und die Zellen fixiert wurden.

Um den Überstand zu entfernen, wurden die Proben für 5 Minuten bei 400 x g und 10 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben resuspendiert, zwei Mal mit 3 ml PBS gewaschen und schließlich in 100 µl PBS aufgenommen.

Bis zur Messung wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Auswertung erfolgte durch das Detektieren von 10 000 Zellen.

Das verwendete Software-Programm *Cell Quest* (Becton Dickinson) erlaubt die Darstellung der Messergebnisse sowohl in Zweiparameter-Diagrammen (Dot Plot) als Histogramme (Abb. 7) als auch in Vierfeldertafeln (Abb. 8).

Bei der Darstellung in Zweiparameter-Diagrammen lässt sich sowohl die Anzahl der das Merkmal tragenden Zellen, als auch die Stärke der Expression eines Merkmals in jeder gemessenen Zelle bestimmen.

Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurden im Dot-Plot separat gegatet und die Prozentzahl der Fluoreszenz-positiven Zellen relativ an der Gesamtpopulation gemessen. Durch das Setzen eines Markers wurden die Bereiche für Fluoreszenz-positiv und Fluoreszenz-negativ Zellen festgelegt, wobei der Bereich für die negativen Zellen bis zur einer Fluoreszenzintensität von 10^1 reichte.

Bei Darstellung in einer Vierfeldertafel erfolgt die Angabe in Quadranten.

(Wie in Abb. 8 dargestellt: oben links – CD19 PE-positive Zellen, oben rechts – CD19 PE-/CD3 FITC-doppelt positive Zellen, unten links – negative Zellen, unten rechts – CD3 FITC-positive Zellen)

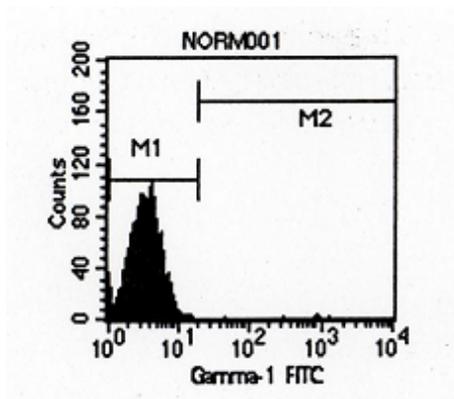


Abb.7: Charakteristische durchflusszytometrische Zweiparameter-Darstellung (Dot Plots),

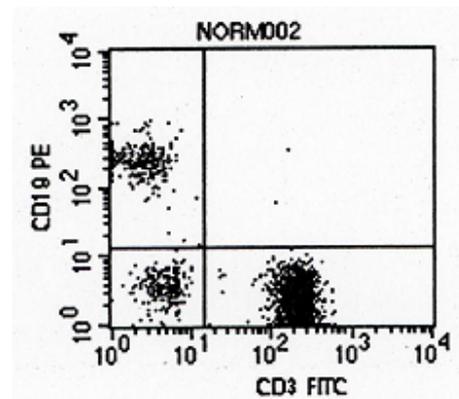


Abb. 8: Charakteristische Darstellung als Vierfeldertafel

2.2.5.2.2. Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Toll-like Rezeptoren

Zur Bestimmung des Einflusses von Leerliposomen auf Signalwege des Immunsystems wurden die Toll-like Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 mittels der Fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie untersucht.

Durchführung:

Für die FACS-Analyse im humanen System wurden Probenansätze laut dem folgenden Schema angesetzt:

Tabelle 9: Isotypen- und Fluoreszenzkontrollen für die FACS-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Leerliposomen auf Signalwege des Immunsystems im humanen System

<i>Isotypen- und Fluoreszenzkontrollen:</i>	<i>Isotypenkontrolle: 10 µl $\gamma 1\gamma 2$</i>	<i>Fluoreszenzkontrolle: 10 µl CD14PE</i>
VB + HBSS	Probe 1	Probe 2

Tabelle 10: Probenansätze für die FACS-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Leerliposomen auf Signalwege des Immunsystems im humanen System

<i>Proben:</i>	<i>10µl <u>TLR 2</u></i>	<i>10µl <u>TLR 4</u></i>
100 µl VB + 100 µl HBSS	P3	P13
100 µl VB + 100 µl LPS1 (f.c. = 20 ng/ml)	P4	P14
100 µl VB + 100 µl LPS2 (f.c. = 20 ng/ml)	P5	P15
100 µl VB + 100 µl LPS3 (f.c. = 20 ng/ml)	P6	P16

100 μl VB + 100 μl EPC 1mM f.c.	P7	P17
100 μl VB + 100 μl EPG 1mM f.c.	P8	P18
100 μl VB + 100 μl PEG 1mM f.c.	P9	P19
100 μl VB + 100 μl EPC 5mM f.c.	P10	P20
100 μl VB + 100 μl EPG 5mM f.c.	P11	P21
100 μl VB + 100 μl PEG 5mM f.c.	P12	P22

Die Inkubationszeiten, Verarbeitung und Auswertung der Versuchs-Ansätze erfolgten analog zu den Untersuchungen der Komplement-Rezeptoren, Integrine, CD55 und CD14 (siehe 2.2.5.2.1).

2.2.6. Bestimmung der Komplementkonzentration des Maus-Komplements

Die Bestimmung der Komplementkonzentration im Maus-Komplement erfolgte mittels des Bicinchoninsäure (BCA) Protein-Assay-Reagents.

Es besteht aus einem Basis Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Detektionsreagenz und Natriumtartrat in 0,2M Natriumhydroxid (NaOH)), einer 4%-igen Kupfersulfat Lösung (B) und Standard-Albumin (1 ml Glasampullen mit 2 mg/ml Lösungen aus gereinigtem Rinderserum-Albumin (BSA) in 0,9% Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid).

Untersuchungsmaterial: Mauskomplement der Firma Chemical Credential, ICN Biomedicals, Inc.

Prinzip der Methode:

Bicinchoninsäure ist als wasserlösliches Natriumsalz ein sensibles, stabiles und hoch spezifisches Reagenz für einwertige Kupferionen (Cu^{1+}). Protein reduziert in alkalischen Medien Kupfer (Cu^{2+}) zu Cu^{1+} (Biuret-Reaktion). Es werden Peptidbindungen und 4 Aminosäuren (Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin) verantwortlich gemacht.

Das BCA-Protein-Reagenz kombiniert die Biuretreaktion, mit der Eigenschaft des BCA mit Cu^{1+} , einen stabilen Komplex zu bilden. Das Reaktionsprodukt besitzt eine starke Absorption bei 562 nm, wodurch der Proteingehalt einer wässrigen Lösung mittels Spektrophotometer quantifiziert werden kann.

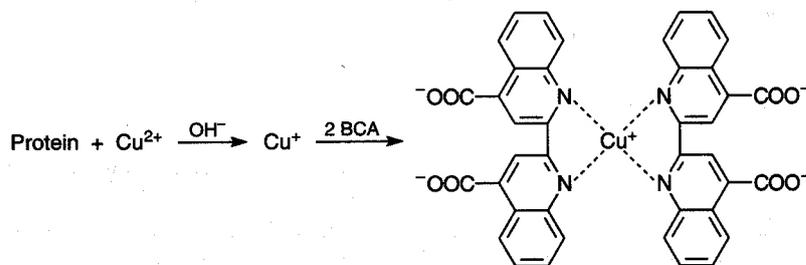


Abb. 9: Prinzip des BCA-Assays

Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Spektrum, Akad. Verlag GmbH Heidelberg – Berlin. S. 40.

Testdurchführung:

Zuerst wurden das Arbeitsreagenz (Reagenz B: Reagenz A 1 : 51), eine Verdünnungsreihe des Standardproteins (BSA) und eine Verdünnungsreihe des zu bestimmenden Proteins (Maus-Komplement) mit PBS hergestellt.

Jeweils 10 μl der zu bestimmenden Proben des jeweiligen Protein-Standards bzw. einer Leerprobe wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach Hinzufügen von 200 μl des Arbeitsreagenz wurden die Proben für 30 Sekunden auf einem Mikrotiterplattenrüttler gemischt, zugedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde dann eine photometrische Messung der Extinktion bei 570 nm mittels des Enzym Linked Immunosorbent Assay Readers (ELISA-Reader) durchgeführt.

Zur Auswertung wurde eine gegen den Leerwert korrigierte Standardkurve erstellt, anhand welcher die Proteinkonzentrationen der zu bestimmenden Proben ermittelt werden konnten.

2.2.7. Inkubation von Mausekomplement mit Liposomen

Bei der Inkubation von Mausekomplement mit Liposomen wurde das Probenmaterial für 2.2.8.1.2. vorbereitet.

In HBSS wurden Verdünnungen des Mausekomplements in den Konzentrationen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml hergestellt. Diese wurden jeweils mit verschiedenen Konzentrationen an Liposomen (1 mM und 5 mM) bzw. mit Puffer (HBSS) als Negativkontrolle (Puffer und Komplement, ohne Liposomen) versetzt, und anschließend 0, 15, 30, 60, 240 Minuten bzw. 24 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Proben wurden sofort nach der Inkubation bei – 20 °C eingefroren.

Tabelle 11: Schema für die Liposomen-Inkubation mit Mausekomplement

	HBSS	Komplement (53,8 mg/ml)	Liposomen (40mM) EPC / EPG / PEG
0,1 mg/ml Komplement, Negativkontrolle	490,7 µl	9,3 µl	-
1 mg/ml Komplement, Negativkontrolle	490,7 µl	9,3 µl	-
0,1 mg/ml Komplement, 1 mM EPC / EPG / PEG	478,2 µl	9,3 µl	12,5 µl
0,1 mg/ml Komplement 5 mM EPC / EPG / PEG	428,2 µl	9,3 µl	62,5 µl
1 mg/ml Komplement, 1 mM EPC / EPG / PEG	478,2 µl	9,3 µl	12,5 µl
1 mg/ml Komplement, 5 mM EPC / EPG / PEG	428,2 µl	9,3 µl	62,5 µl

2.2.8. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements

2.2.8.1. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System mittels einer Elisa Komplement Aktivitätsanalyse, dem complement hemolytic 50%-Assay (CH₅₀-Assay)

Zur Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System *in vivo* wurde für diese Arbeit eine Komplement-Aktivitätsanalyse mittels Elisa etabliert, ähnlich dem in der Literatur bereits häufig verwendeten CH₅₀-Assay für das humane System.

Prinzip der Methode:

Mit dem CH₅₀ Assay lässt sich bestimmen, ob eine Substanz die Fähigkeit besitzt, das Komplementsystem zu aktivieren. Er beruht auf der sequentiellen Aktivierung der Komponenten des klassischen Wegs (C1-C9), wodurch Erythrozyten lysiert werden. Durch die Lyse der Erythrozyten kommt es zu einem Abfall der optischen Dichte. Der Hämolysegrad einer vorgegebenen Menge an Erythrozyten wird zur Bestimmung der Komplement-Aktivität herangezogen. Mängel oder Erniedrigungen einzelner Komponenten (z.B. durch vorherige Aktivierung des Komplementsystems) führen zu einer Verminderung der Anzahl lysierter Erythrozyten und somit zu einem geringeren Hämolysegrad. Verkürzte Wege und damit ein erhöhter Hämolysegrad ergeben sich, wenn durch Reaktion auf entsprechende Auslöser die Komplementproteine erhöht sind.

Verwendet wurden bei diesem Versuch Kaninchenerythrozyten, welche zuvor mit Ziegen-Anti-Kaninchenerythrozyten-Antikörper sensibilisiert wurden, wobei Antigen-Antikörper Komplexe entstehen.

2.2.8.1.1. Bestimmung der optimalen Antikörper- und Komplementkonzentrationen zur Etablierung des CH₅₀ Assay für die *in-vivo*-Messungen im murinen System

Für eine optimale Opsonisierung der Kaninchen-Erythrozyten musste zum einen die Konzentration an Antikörpern und zum anderen die Menge des benötigten Komplements, welche in der Lage ist, die Kaninchen-Erythrozyten zu lysieren, bestimmt werden.

Durchführung:

Zuerst wurde das Komplement (ICN Biomedicals, Inc.) bzw. Mausserum aktiviert.

Hierzu wurden 400 µl Kaninchen-Erythrozyten für 10 Minuten bei 4 °C und 1250 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zu dem verbliebenen Pellet aus Erythrozyten wurden nun 400 µl der Komplementquelle zugegeben und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Absetzen der Erythrozyten wurde durch intermittierende Resuspension vermieden. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1250 x g wurde das Komplement durch Abpipettieren des Überstandes von den Erythrozyten getrennt.

Nach der Aktivierung des Komplements wurden Komplementverdünnungen mit Konzentrationen von 0,1 mg/ml, 1 mg/ml und 10 mg/ml hergestellt.

Zur Sensibilisierung der Kaninchen Erythrozyten wurden jeweils 300 µl der einzelnen Antikörper-Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600) mit 300 µl Kaninchen-Erythrozyten, bei einer Erythrozyten-Konzentration von 1×10^9 /ml, nach gründlichem Resuspendieren und Vortexen für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Aufgrund der Vergleichbarkeit wurden Negativ- und Positivkontrollen bei der Inkubation mitgeführt.

Nach der Inkubation wurden jeder Probe 300 µl GVB⁺⁺-Puffer hinzugegeben und gemischt.

Das „Setup“ wurde für jede der Komplement-Konzentrationen (0,1 mg/ml, 1 mg/ml und 10 mg/ml) separat angesetzt.

Tabelle 12: Pipettierschema für die Bestimmung der optimalen Antikörper- und Komplementkonzentrationen

<i>Röhrchen</i>	<i>Label</i>	<i>Komplement-Konzentration</i>	<i>Erythrozyten + Antikörper</i>	<i>Aqua dest. (Ampuwa)</i>	<i>GVB⁺⁺</i>
1 / 2	1:50	100 µl	100 µl 1:50	-	-
3 / 4	1:100	100 µl	100 µl 1:100	-	-
5 / 6	1:200	100 µl	100 µl 1:200	-	-
7 / 8	1:400	100 µl	100 µl 1:400	-	-
9 / 10	1:800	100 µl	100 µl 1:800	-	-
11 / 12	1:1600	100 µl	100 µl 1:1600	-	-
13 / 14	Hintergrund-Kontrolle (0% Lyse)	-	100 µl 1:50	-	100 µl
15 / 16	Antikörper-Kontrolle	100 µl	100 µl Ery + GVB ⁺⁺ -Puffer (ohne Antikörper)	-	-
17 / 18	Vollständige Lyse (100% Lyse)	-	100 µl 1:50	100 µl	-

Die Proben wurden jeweils für 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben für 5 Minuten bei 1250 x g und 4 °C zentrifugiert. Je 150 µl des Überstandes wurden in eine 96-Well-Platte überführt. Als Leerprobe wurde 150 µl GVB⁺⁺-Puffer verwendet. Das verbliebene Pellet wurde resuspendiert, mit 300 µl Aqua dest. (Ampuwa) versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur zur Zellyse inkubiert.

Nach erneuter Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 1250 x g und 4 °C wurden ebenfalls jeweils 150 µl in die 96-Well-Platte überführt. Als Leerprobe wurde hier 150 µl Aqua dest. (Ampuwa) verwendet.

Die Messung der Extinktion (Extinktionszunahme im Überstand durch bei der Erythrozytenlyse freiwerdendes Hämoglobin), entsprechend dem Grad der Hämolyse der Proben, erfolgte anschließend im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Auswertung:

Die prozentuale Lyse steigt für gewöhnlich entsprechend der Antikörperverdünnung, bis sie schließlich für einige Verdünnungsstufen ein Plateau erreicht, um danach wieder abzufallen. Die optimale Antikörperverdünnung entspricht der Hälfte der Verdünnung, bei welcher die Kurve abzufallen beginnt.

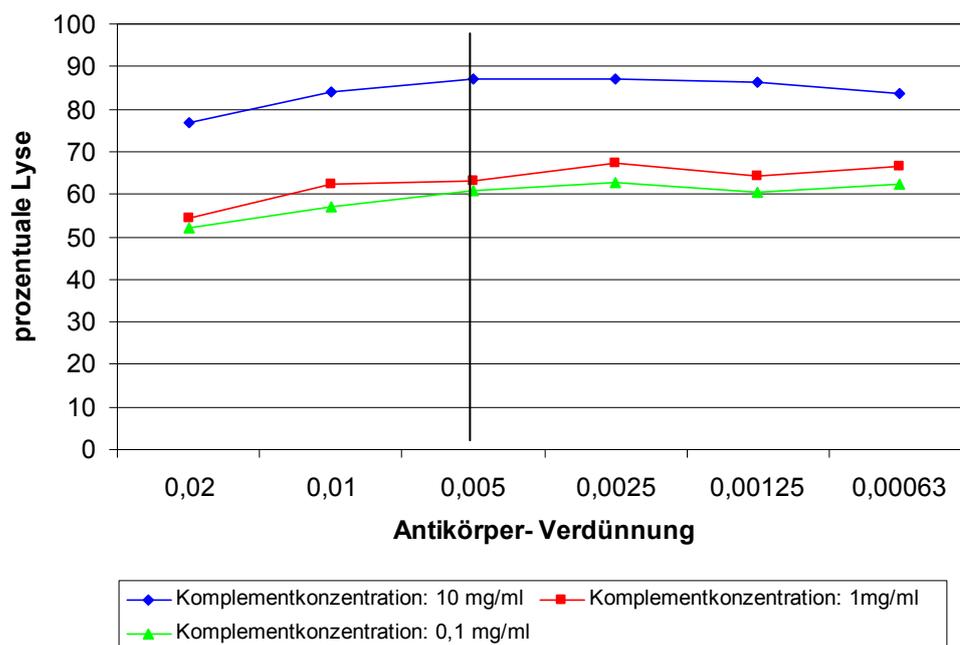


Abb. 10: Bestimmung der optimalen Antikörper Konzentration

2.2.8.1.2. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System *in vitro*

Für die kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System wurde für die *in-vitro*-Versuche kommerziell erhältliches Mausekomplement (Chemical Credential) verwendet.

Durchführung:

Nach Einstellen der Kaninchenerythrozyten in GVB⁺⁺ auf eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml und Verdünnung der Ziegen-Anti-Kaninchenerythrozyten-Antikörper mit GVB⁺⁺ auf eine Konzentration von 1:200, erfolgte die Herstellung eines Ansatzes 1:1, welcher zur Sensibilisierung der Kaninchenerythrozyten, für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurde.

Es wurden 3 verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:50, 1:250) der Komplementquellen aus (2.2.7.) in GVB⁺⁺ hergestellt.

Die Proben wurden wie folgt pipettiert:

I Proben:

150 µl der Komplementquelle

25 µl sensibilisierte Erythrozyten (rbEA)

II negativ Kontrolle (keine Lyse):

150 µl GVB⁺⁺

25µl rbEA

III positiv Kontrolle (vollständige Lyse):

150 µl Ampuwa

25µl rbEA

IV Hintergrund Kontrolle (Eigenextinktion der Komplementquelle)

150 µl der Komplementquelle

25 µl GVB⁺⁺

Die Proben wurden nun für 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, für 5 Minuten bei 4 °C und 1250 x g zentrifugiert und der Überstand in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde das verbliebene Pellet mit 1 ml GVBE aufgefüllt.

Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) vollständig verworfen.

Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 300 µl aqua dest. und 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1250 x g wurden je 150 µl des Überstandes in eine 96-Well-Platte pipettiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angefertigt.

Zur Auswertung wurde der Hämolysegrad mittels Extinktion im ELISA-Reader bestimmt und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm photometrisch gemessen.

2.2.8.1.3. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System *in vivo*

Der Versuchsaufbau und die Auswertung entsprechen dem Versuchsaufbau des *in-vitro*-Versuches aus 2.2.8.1.2.

Bei diesem Versuch wurde nun, anstatt des kommerziell erwerbbaaren Mauskomplements, Mausserum aus den unten folgend aufgeführten *in-vivo*-Tierversuchen verwendet (Tabelle 13 – Tabelle 19). Zu beachten ist, dass in den *in-vivo*-Versuchen anstelle der Leerliposomen, Liposomen mit Glucose-Oxidase verwendet wurden.

Tabelle 13: Vorversuche mit Infektion und Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase)

Anzahl Tiere	Mausstamm: CGD (gp91phox -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion = Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serum- ent- nahme
---------------------	--	--------------------------	--	--

1	wt	0.234 x 10 ⁸ Staph. aureus	-, Tag 5	Tag 6
1	wt	0.234 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ 40 mM, Tag 5	Tag 6
1	CGD	0.234 x 10 ⁸ Staph. aureus	-, Tag 5	Tag 6
1	wt	-	-, Tag 1	Tag 2
1	wt	0.285 x 10 ³ B.cepacia	-, Tag 1	Tag 2
1	wt	0.285 x 10 ³ B.cepacia	+ 40 mM, Tag 1	Tag 2
1	CGD	-	+ 40 mM, Tag 1	Tag 2
1	CGD	0.285 x 10 ³ B.cepacia	-, Tag 1	Tag 2
3	CGD	0.285 x 10 ³ B.cepacia	+ 40 mM, Tag 1	Tag 2
1	wt	-	+ 40 mM, Tag 0, 1, 2	Tag 3
1	wt	0.3 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7
1	CGD	-	-, Tag 4, 5, 6	Tag 7
1	CGD	-	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7
3	CGD	0.3 x 10 ⁸ Staph. aureus	-, Tag 4, 5, 6	Tag 7
3	CGD	0.3 x 10 ⁸ Staph. aureus	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7

B. cepacia (Budkholderia cepacia)

Tabelle 14: Versuch mit einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase) in Wildtyp-Mäusen

Anzahl Tiere	Mausstamm:		Infektion Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serum-entnahme
	CGD (gp91phox -/-)	wt (C57Bl6/J)			
1	wt		-	+ , 20 mM, Tag 0	Tag 14
1	wt		-	-, Tag 0	120 min.

1	wt	-	- , Tag 0	480 min.
1	wt	-	- , Tag 0	Tag 14
1	wt	-	- , Tag 0	0 min.
1	wt	-	- , Tag 0	120 min.

Tabelle 15: Versuch mit einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase) in Wildtyp-Mäusen (II)

Anzahl Tiere	Mausstamm: CGD (gp91phox -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serum- entnahme
1	wt	-	+ , 40 mM, Tag 0	120 min.
2	wt	-	+ , 40 mM, Tag 0	480 min.
1	wt	-	+ , 40 mM, Tag 0	Tag 14
2	wt	-	+ , 20 mM, Tag 0	120 min.
2	wt	-	+ , 20 mM, Tag 0	480 min.

Tabelle 16: Versuch mit Infektion durch Staph. aureus und einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase)

Anzahl Tiere	Mausstamm: CGD (gp91phox -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion = Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serum- ent- name
2	wt	-	- , Tag 5	Tag 6
2	wt	0.28 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	- , Tag 5	Tag 6
2	wt	0.28 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	+ 40 mM, Tag 5	Tag 6
2	CGD	-	- , Tag 5	Tag 6
2	CGD	-	+ 40 mM, Tag 5	Tag 6

4	CGD	0.28 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	- , Tag 5	Tag 6
5	CGD	0.28 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	+ 40 mM, Tag 5	Tag 6

Tabelle 17: Versuch mit Infektion durch Staph. aureus und einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase) (II)

Anzahl Tiere	Mausstamm: CGD (gp91phox -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion = Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serumentname
3	CGD	0.28 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	- , Tag 5	Tag 6
3	CGD	0.28 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	+ , 40 mM, Tag 5	Tag 6

Tabelle 18: Versuch mit Infektion durch Staph. aureus und dreimaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase)

Anzahl Tiere	Mausstamm: CGD (gp91phox -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion = Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serumentname
1	wt	-	- , Tag 4, 5, 6	Tag 7
2	wt	0.18 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	- , Tag 4, 5, 6	Tag 7
2	wt	0.18 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7
2	CGD	-	- , Tag 4, 5, 6	Tag 7
2	CGD	-	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7

5	CGD	0.18 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	- , Tag 4, 5, 6	Tag 7
5	CGD	0.18 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7

Tabelle 19: Versuch mit Infektion durch Staph. aureus und dreimaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol Liposomen mit Glucose-Oxidase) (II)

Anzahl Tiere	Mausstamm: CGD (gp91phox -/-) wt (C57Bl6/J)	Infektion = Tag 0	PBS (-) -Gabe GOL (+) -Gabe	Serumentnahme
3	CGD	0,3 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	- , Tag 4, 5, 6	Tag 7
3	CGD	0,3 x 10 ⁸ Staph. aureus Peritonitis	+ 40 mM, Tag 4, 5, 6	Tag 7

2.2.8.2. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im humanen System

Zur kinetischen Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements wurde das Komplement-Reagenzien Testkit (OWZD 11) der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, verwendet.

Darin enthalten sind Erythrozyten- (Erythrozyten vom Schaf in einer Stabilisatorlösung aus Natriumchlorid und 4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-1-ethansulfonsäure (HEPES)) und Ambozeptor-Reagenzien (Antikörper gegen Schaf-Erythrozyten vom Kaninchen, Natrium-, Calcium-, und Magnesiumchlorid, HEPES).

Zusätzlich benötigt wird Standard-Human-Plasma (ORKL, Firma Dade Behring Marburg GmbH).

Untersuchungsmaterial: Serum aus 2.2.4.

Prinzip der Methode:

Die Inkubation der Probe mit sensibilisierten Erythrozyten führt zu einer Aktivierung des klassischen Wegs des Komplements über C1q. Durch die C3-Konvertase gebildetes C3b wird sowohl Bestandteil der C5-Konvertase als auch Initiator der Amplifizierungsreaktion unter Beteiligung von Faktor B und Faktor D. Dabei wird auch die alternative C5-Konvertase gebildet. Aus C5 freigesetztes C5b initiiert die Lysereaktion unter Beteiligung der restlichen Faktoren C6 bis C9.

Durch die Lyse der Erythrozyten kommt es zu einem Abfall der optischen Dichte. Die Zeit für die Lyse einer vorgegebenen Menge an Erythrozyten wird zur Bestimmung der Komplement-Aktivität herangezogen. Mängel oder Erniedrigungen einzelner Komponenten (z.B. durch vorherige Aktivierung des Komplementsystems) führen zu einer Verlängerung der zur Lyse benötigten Zeit. Verkürzte Wege ergeben sich, wenn durch Reaktion auf entsprechende Auslöser die Komplementproteine erhöht sind.

Testdurchführung:

Die Erythrozyten wurden mit dem Ambozeptor-Reagenz (5ml Ambozeptor-Reagenz pro ml Erythrozyten) versetzt und anschließend, zur Reaktion, für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Es wurden 50 µl Serum (aus 2.2.4.) als Probe mit 1000 µl Reagenz versetzt. Bei 37 °C und einem Messintervall von 10 Sekunden wurde photometrisch über einen Zeitraum von 10 Minuten die Zeit bestimmt, in der die Extinktion bei 578 nm um 0,100 abnahm.

Auswertung:

Die semiquantitative Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve, die durch serielle Verdünnung (100%, 75%, 50%, 25%, 10%) des Standard-Human-Plasmas mit isotonischer Kochsalzlösung erstellt wurde, wobei die einzelnen Verdünnungen wie Proben behandelt wurden.

2.2.9. Quantitative Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4 im humanen System

Zur quantitativen Bestimmung von C3c und C4 im humanen System wurden die kommerziell erhältlichen Antiserum-haltigen Reagenzien, Turbiquant[®] C4 (OUSR 35) und Turbiquant[®] C3c (OUSR 35) zur quantitativen Bestimmung von Human-Serumproteinen mit dem Turbitimer der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, verwendet.

Zusätzlich benötigt wurden die Protein-Kontrollen N/T Protein-Kontrolle SL/L human (OQIN), N/T Protein-Kontrolle SL/M human (OQIO) und N/T Protein-Kontrolle SL/H human (OQIP), in den Konzentrationsbereichen L (niedrig), M (mittel) und H (hoch) der Firma Dade Behring Marburg GmbH, Marburg.

Prinzip der Methode:

Die im menschlichen Serum enthaltenen Proteine bilden in einer immunchemischen Reaktion mit spezifischen Antikörpern Immunkomplexe. Die nach Mischung einsetzende Trübung wird photometrisch gemessen. Die quantitative Erfassung der vorhandenen Konzentration erfolgt durch turbidimetrische Messung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (peak rate-Methode).

Testdurchführung:

In diesem Versuch wurden ebenfalls die Serumproben aus 2.2.4. verwendet.

Zuerst wurden die Turbiquant[®] C4- und Turbiquant[®] C3c-Reagenzien als auch die N/T Proteinkontrollen auf Raumtemperatur gebracht.

Sowohl Proben als auch die N/T Proteinkontrollen wurden nach gründlichem Resuspendieren 1:21 verdünnt. Für die Messung von C3c war ein Volumen der Probenverdünnung von 50 µl, bei der für C4 eines von 200 µl nötig. Das Reagenz volumen betrug für alle Bestimmungen 500 µl.

Nun wurden zuerst die N/T Proteinkontrollen gemessen, anschließend die einzelnen Proben.

Auswertung:

Das Resultat der Protein-Bestimmung wurde automatisiert durch den Turbitimer berechnet, wobei die Proteinkontrollen „Kontrolle low“, „Kontrolle medium“, „Kontrolle high“ der Berechnung der absoluten Konzentration an C4 bzw. C3c dienen.

Die Auswertung erfolgte über den Vergleich der beiden Reaktionspartner mit den für eine Referenz-Präparation erhaltenen Werten, die durch den Hersteller des Geräts (Dade Behring Marburg GmbH) ermittelt wurde. Dieses so genannte Eichfeld, das auch eine automatische Temperaturkompensation ermöglicht, ist chargenabhängig und ist jeder Packung in Form eines Barcodes beigelegt.

Bei einer Komplementaktivierung kommt es zu einem Absinken von C3c und C4. Bei einer starken klassischen Aktivierung sinken sowohl C3c als auch C4. Kommt es lediglich zu einer geringen Aktivierung des klassischen Wegs, sinkt C4, C3c bleibt aber normal. Dahingegen zieht eine Aktivierung des alternativen Wegs ein Absinken von C3c bei normalem C4 nach sich.

2.2.10. Statistische Auswertung

Ein statistischer Test in den einzelnen *in-vivo*- und *in-vitro*-Versuchen wurde ab einer Fallzahl von $n \geq 3$ in den zu vergleichenden Gruppen vorgenommen. Zur Datenanalyse wurde abhängig vom Versuchsaufbau des jeweiligen Experiments eine statistische Auswertung mittels einer einfaktoriellen Analyse (One-way ANOVA, post hoc Test Bonferroni) bzw. mittels eines Student-t-Tests vorgenommen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ angenommen. Die Auswertungen wurden mittels GraphPadPrism- Software Version 5.0® vorgenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen auf das murine Komplementsystem

3.1.1. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System mit dem CH₅₀ Assay

3.1.1.1. Etablierung eines CH₅₀ Assay für die *in-vivo*-Messungen im murinen System

Wie bereits im Kapitel 2.2.8.1.1. beschrieben, musste für eine optimale Opsonisierung der Kaninchen-Erythrozyten zunächst die entsprechende Konzentration an Antikörpern bestimmt werden. Zudem musste die Menge des benötigten Komplements, welches dann in der Lage ist, die Kaninchen-Erythrozyten zu lysieren, bestimmt werden.

In Abb. 11 ist die prozentuale Lyse in Abhängigkeit verschiedener Antikörperkonzentrationen (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) und verschiedener Komplementkonzentrationen (10mg/ml, 1mg/ml, 0,1mg/ml), dargestellt.

Zunächst stieg die prozentuale Lyse entsprechend der Antikörperverdünnung an. Ab einer Antikörperverdünnung von 1:400 (0,0025) fiel die prozentuale Lyse wieder ab.

Die optimale Antikörperverdünnung entspricht der Hälfte der Verdünnung, bei welcher die Kurve abzufallen beginnt. Deshalb wurde für alle Versuche nach der CH₅₀-Methode (3.1.1.2. und 3.1.1.3.) die Antikörper-Verdünnung auf 1:200 (0,005) festgelegt.

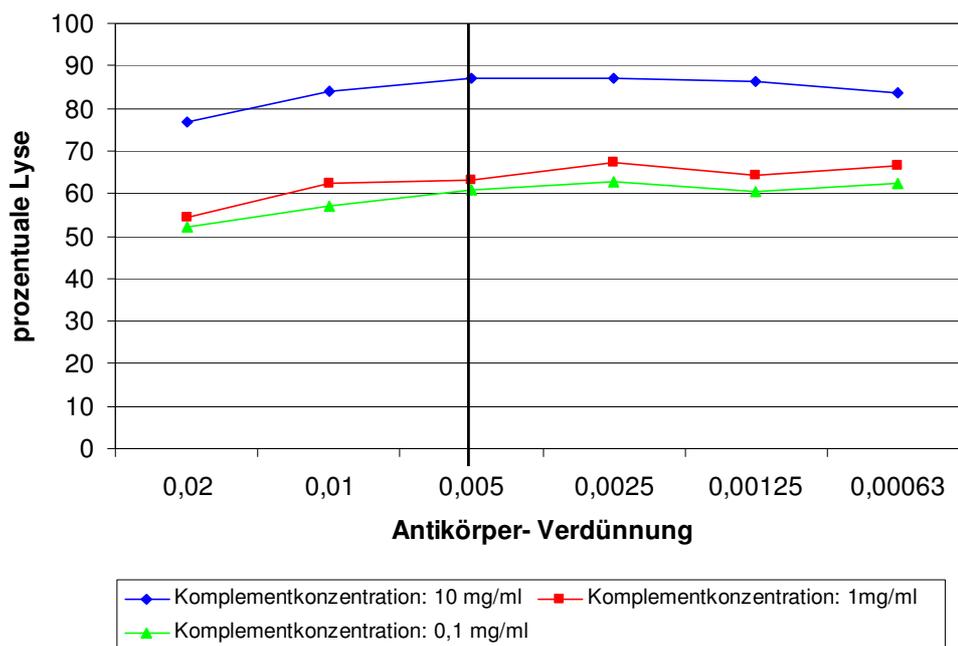


Abb. 11: Bestimmung der optimalen Antikörper- und Komplement-Konzentration für den CH_{50} -Assay (siehe auch Kapitel 2.2.8.1.1)

Bei einer Komplement-Konzentration von 10mg/ml war die Lyse der Erythrozyten bereits sehr hoch (zwischen 76 und 87%). Daher wurden für die weiteren Versuche mit Mauskomplement (3.1.1.2.) die Komplementkonzentrationen 1mg/ml und 0,1mg/ml verwendet, bei welchen die Erythrozytenlyse zw. 52 und 67 % lag. Damit erreichte man einen entsprechenden Detektions-Spielraum, der bei der hohen Komplementkonzentration nicht mehr gegeben wäre. Es wurden bei allen Proben zwei Versuchsansätze mit den jeweiligen Komplementkonzentrationen angesetzt und bearbeitet.

3.1.1.2. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System *in vitro*

Die Untersuchung der liposomalen Komplementaktivierung *in vitro* stellt eine wichtige Säule der Erforschung der immunologischen Grundlagen des Einflusses verschiedener Liposomenformulierungen auf das murine Komplement-System dar. Zudem bietet die *in-vitro*-Untersuchung viele gut durchführbare Einsatzmöglichkeiten unter Ausschluss unberechenbarer und ungewollter Interferenzen.

Untersucht wurden in diesem Versuch der zeitabhängige Einfluss von Leerliposomen (EPC-, EPG- und PEG-Liposomen) der Konzentration 1 mM und

5 mM auf das murine Komplementsystem. Die Komplementkonzentrationen betragen 0,1 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,004 mg/ml, 0,002 mg/ml und 0,0004 mg/ml.

Dargestellt sind in den folgenden Kapiteln die beiden höchsten und niedrigsten Konzentrationsstufen.

3.1.1.2.1. Einfluss von EPC-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements

Zuerst wurde als Negativkontrolle die zeitabhängige Gesamtaktivität von Mauskomplement ohne Zusatz von Liposomen getestet. Die Proben wurden analog der Proben mit Liposomenzusätzen behandelt, anstatt der Liposomen wurde PBS zugegeben (Abb. 12).

Innerhalb der ersten vier Stunden zeigten die unterschiedlichen Verdünnungsstufen ein eher inhomogenes Bild, mit Halbierung der Komplementaktivität in der höchsten Verdünnungsstufe (0,1 mg/ml) innerhalb der ersten 30 Minuten (*; $p < 0,05$, ANOVA).

Die Aktivität in den beiden Proben der niedrigsten Konzentrationen verdreifachte sich innerhalb der ersten 4 Stunden (0,002 mg/ml ⁺; $p < 0,05$ und 0,0004 mg/ml [#]; $p < 0,05$, ANOVA). Im weiteren Verlauf des Messzeitraums zeigten sich konstante Komplementaktivitäten in allen Proben mit nahezu gleichem Lyseanteil in allen Verdünnungsstufen.

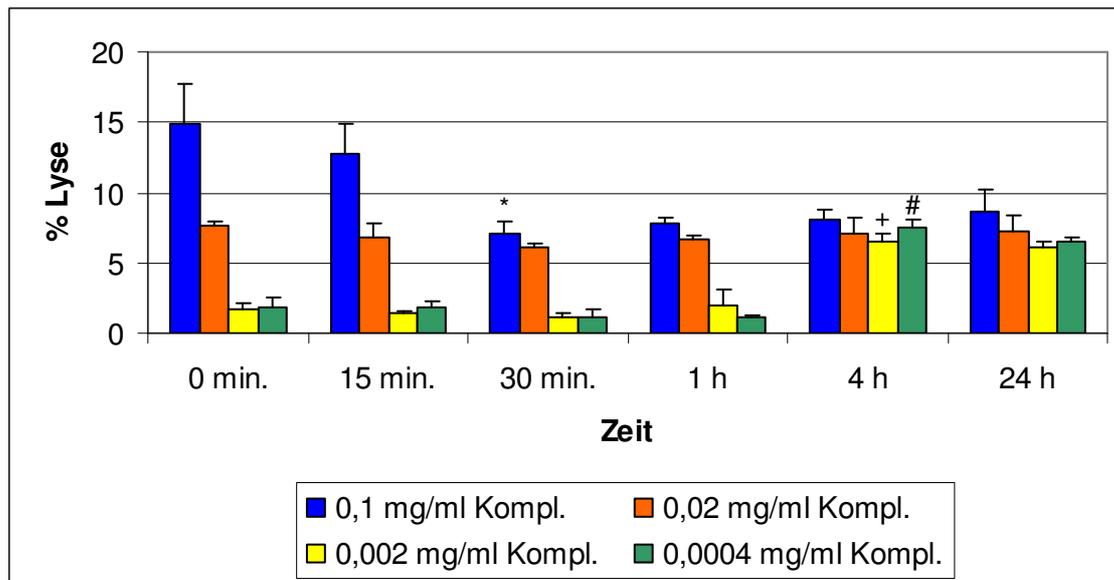


Abb. 12: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen, ohne Einfluss von Liposomen (Negativkontrollen).

150 µl Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit PBS, ohne Liposomen, inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Erfassung des Lyseanteils von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm$ Standardabweichung (SD). Signifikant zum vorangehenden Zeitpunkt: * $p < 0,05$ Komplementverdünnung 0,1; + $p < 0,05$ Komplementverdünnung 0,0002; # $p < 0,05$ Komplementverdünnung 0,0004 [ANOVA].

In den Abbildungen 13 und 14 sind die Gesamtaktivitäten des Komplements unter Einfluss von EPC-Liposomen dargestellt (Abb. 13: EPC 1 mM, Abb. 14: EPC 5 mM). Der Aktivitätsanstieg war abhängig von der zugegebenen Menge an Liposomen. Je höher die Liposomenkonzentration, desto höher die Aktivität des Komplements. Bei Zugabe von Liposomen der Konzentration 1mM zeigte sich ein eher inhomogenes Bild mit signifikanten Aktivitätszunahmen im Vgl. zur Negativkontrolle nur bei den beiden niedrigsten Komplementverdünnungsstufen bis zum Zeitpunkt 1 h (siehe Abb. 13; + $p < 0,05$ ANOVA). Zu den beiden späteren Zeitpunkten ist dieser Anstieg allerdings nicht mehr signifikant. Auffällig zeigte sich hingegen, dass nach Zugabe von EPC-Liposomen in der 5mM-Konzentration die Aktivität des Gesamtkomplements im Vgl. zur Negativkontrolle zu allen Zeitpunkten in allen Komplementverdünnungsstufen anstieg (siehe Abb. 14; * $p < 0,05$ ANOVA).

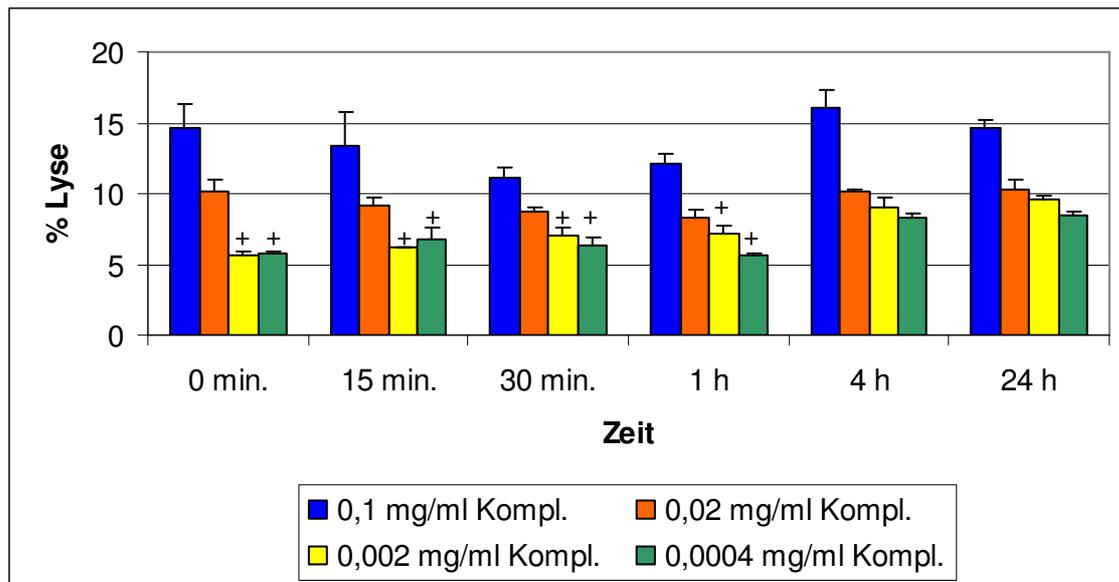


Abb. 13: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen unter Beeinflussung von EPC-Liposomen (1 mM.)

150 µl Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit EPC-Liposomen der Konzentration 1mM inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm SD$. Signifikanter Anstieg im Vgl. zur Negativkontrolle der entsprechenden Komplementverdünnungsstufe: * $p < 0,05$ [ANOVA].

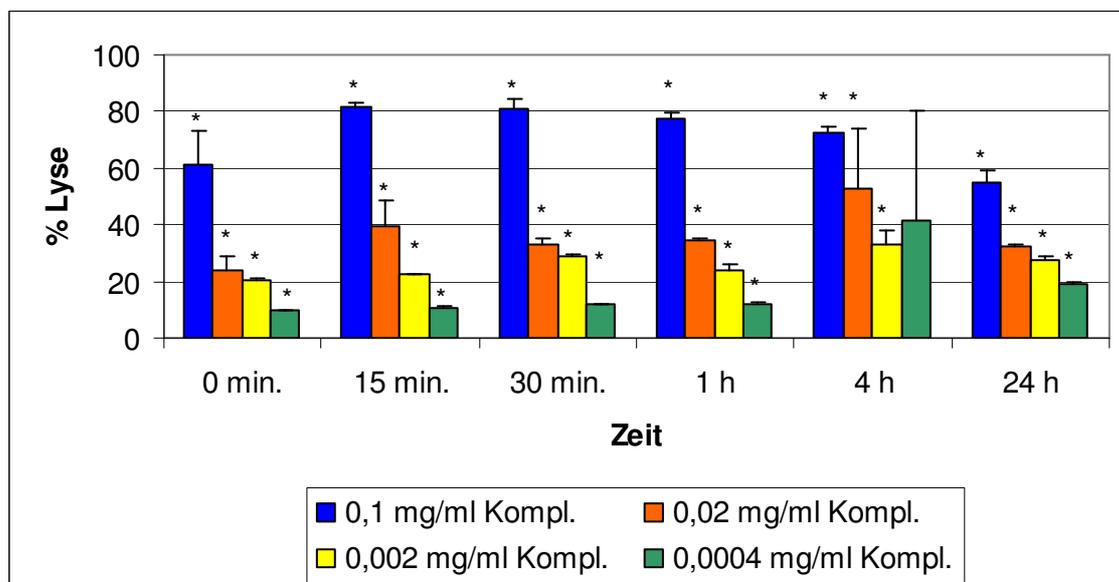


Abb. 14: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen unter Beeinflussung von EPC-Liposomen (5 mM.)

150 µl Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit EPC-Liposomen der Konzentration 5 mM inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm \text{SD}$. Signifikanter Anstieg im Vgl. zur Negativkontrolle (siehe Abb. 12) der entsprechenden Komplementverdünnungsstufe: * $p < 0,05$ [ANOVA].

3.1.1.2.2. Einfluss von EPG-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements

In den Abbildungen 15 und 16 wird der Einfluss von EPG-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements dargestellt.

Bei einer 1 millimolaren Liposomenkonzentration zeigte sich bei den beiden Proben mit den höchsten Komplementkonzentrationen eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Komplementaktivität mit einem Maximum der Aktivität nach 30 Minuten. Die nach 4 Stunden erreichte Lyseaktivität blieb im weiteren Verlauf (24h) stabil (siehe Abb. 15; * $p < 0,05$ ANOVA).

Bei einer Zugabe von EPG 5 mM zeigte sich ebenso in den beiden höchsten Komplementverdünnungsstufen bis zum Zeitpunkt von 1 h eine signifikant höhere Aktivität im Vgl. zur Negativkontrolle (siehe Abb. 16; * $p < 0,05$ ANOVA).

Bei den Proben mit den niedrigeren Komplementkonzentrationen konnte hingegen eine der Negativkontrolle vergleichbare Komplementaktivität nachgewiesen werden. Der Aktivitätsabfall nach 4 Stunden und 24 Stunden bei der 5 millimolaren EPG-Konzentration könnte durch eine Komplementaktivierung bereits beim Herstellen der Proben erklärt werden, eine abschliessende definitive Erklärung hierfür kann allerdings nicht gegeben werden.

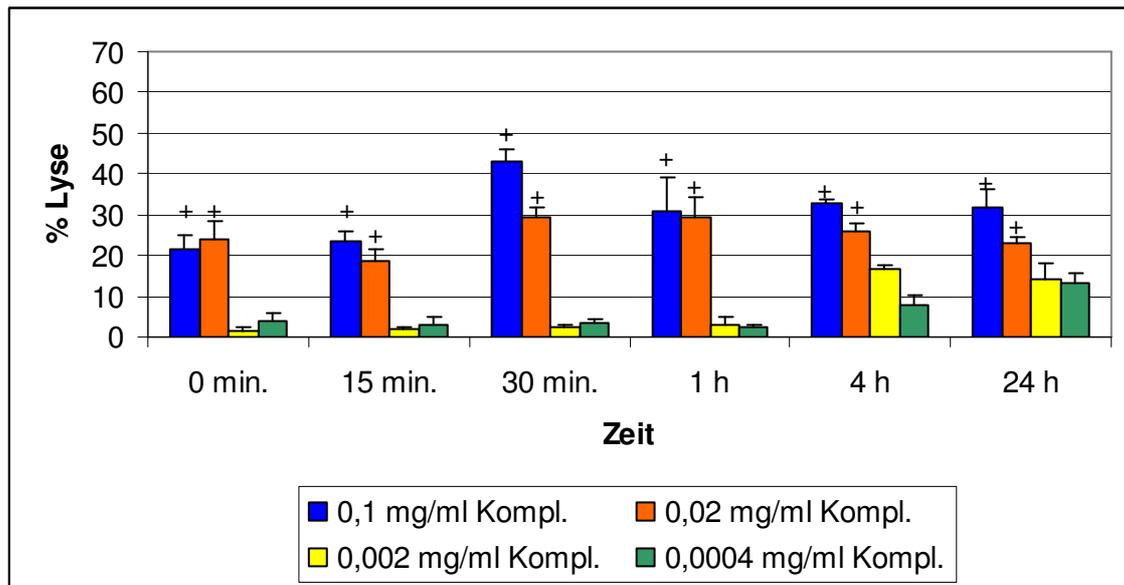


Abb. 15: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen unter Beeinflussung von EPG-Liposomen (1 mM.)

150 µl Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit EPG-Liposomen der Konzentration 1 mM inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm SD$. Anstieg im Vgl. zur Negativkontrolle (siehe Abb. 12) der entsprechenden Komplementverdünnungsstufe: * $p < 0,05$ [ANOVA].

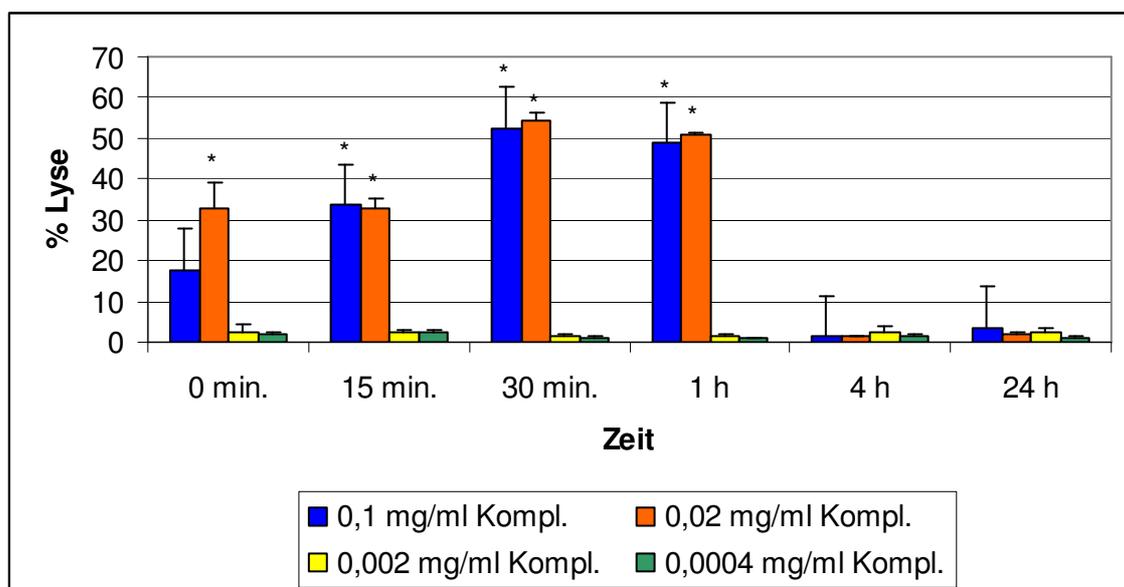


Abb. 16: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen unter Beeinflussung von EPG-Liposomen (5 mM.)

150 µl Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit EPG-Liposomen der Konzentration 5 mM inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm \text{SD}$. Anstieg im Vgl. zur Negativkontrolle (siehe Abb. 12) der entsprechenden Komplementverdünnungsstufe: * $p < 0,05$ [ANOVA].

3.1.1.2.3. Einfluss von PEG-Liposomen auf die Aktivität des Gesamtkomplements

Unter Einfluss von PEG-Liposomen zeigte sich ein eher inhomogenes Bild bei Zugabe der verschiedenen Liposomenkonzentrationen unabhängig von Zeitpunkt und/oder Komplementverdünnungsstufe (siehe Abb.17 und Abb. 18). Es zeigten sich vereinzelt signifikante Änderungen (Abnahmen sowie Anstiege) im Vgl. zur Negativkontrolle, allerdings ist weder eine klare Aussage zu treffen noch ein eindeutiger Trend abgrenzbar. Hierbei könnte es sich ebenso um Messartefakte bzw. -ungenauigkeiten handeln.

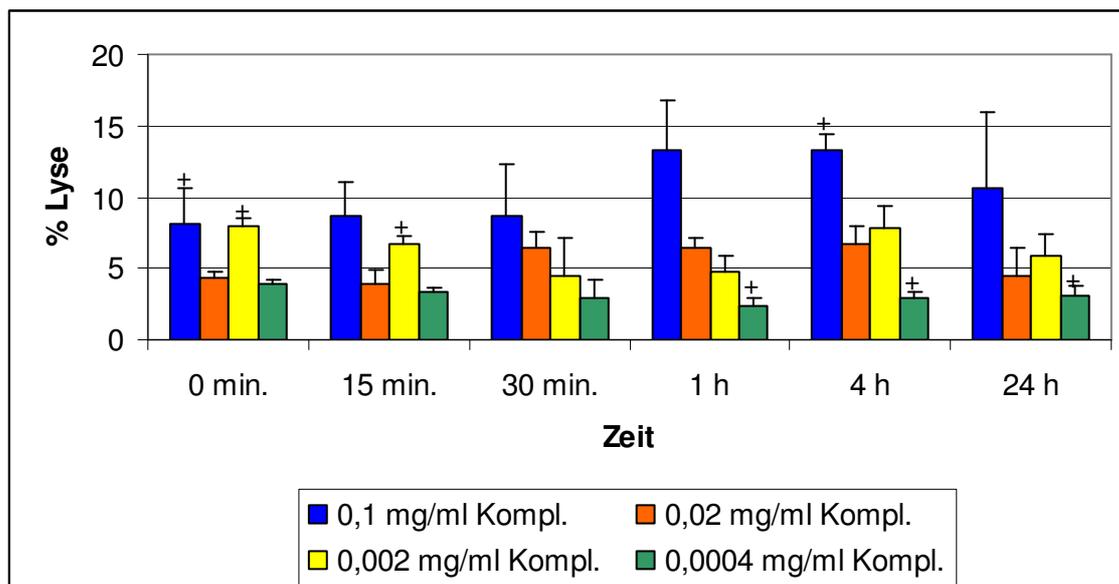


Abb. 17: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen unter Beeinflussung von PEG-Liposomen (1 mM.)

150 µl Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit PEG-Liposomen der Konzentration 1 mM inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm \text{SD}$. Änderungen

der Komplementaktivität im Vgl. zur Negativkontrolle der entsprechenden Komplementverdünnungsstufe: * $p < 0,05$ [ANOVA].

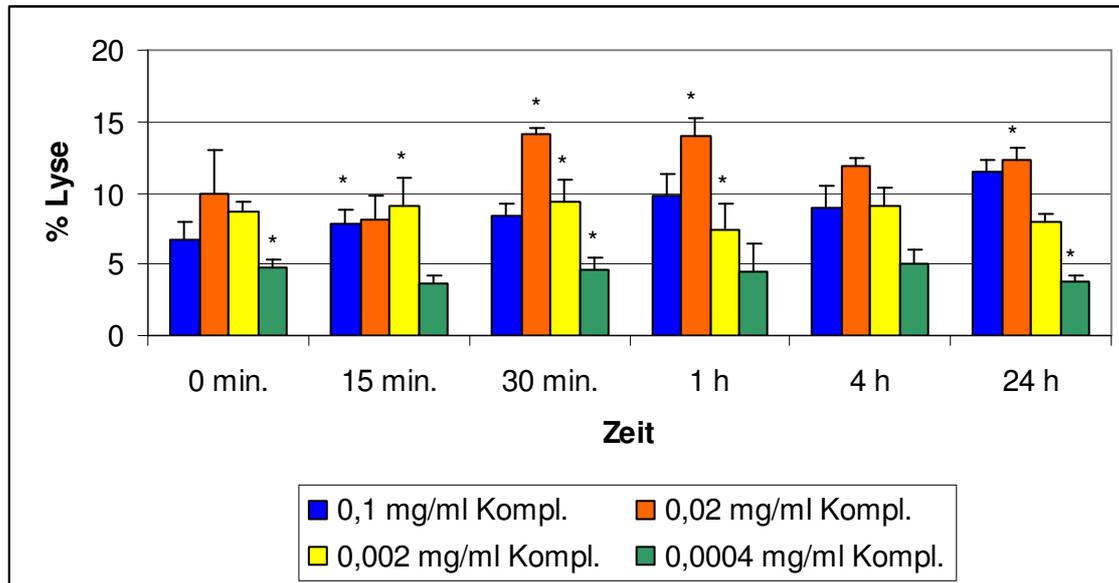


Abb. 18: Zeitabhängige Aktivität von Mauskomplement verschiedener Konzentrationen unter Beeinflussung von PEG-Liposomen (5 mM.)

150 μ l Mauskomplement der jeweiligen Konzentration wurde bei 37 °C mit PEG-Liposomen der Konzentration 5 mM inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3 \pm$ SD. Änderungen der Komplementaktivität im Vgl. zur Negativkontrolle (siehe Abb. 12) der entsprechenden Komplementverdünnungsstufe: * $p < 0,05$ [ANOVA].

3.1.1.3. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System *in vivo*

Wie oben bereits genannt, stellt die *in-vitro*-Untersuchung viele ‚günstige‘, da isolierte, Anwendungsmöglichkeiten bereit, allerdings werden die komplexen, biologischen Auswirkungen, welche eine stattfindende Immunreaktion beinhaltet, nicht berücksichtigt. Diese Information lässt sich nur durch *in-vivo*-Versuche erlangen.

Daher wurden in den folgenden *in-vivo*-Versuchen das Serum von Wildtyp- und CGD- Mäusen untersucht, die entweder

- 1) als Kontrolltiere völlig unbehandelt waren (weder Liposomen, noch Erreger erhielten),
- 2) nur mit Liposomen (GOL) behandelt waren,
- 3) nur infiziert waren, aber keine Liposomen erhalten haben oder
- 4) sowohl infiziert waren als auch Liposomen (GOL) erhalten haben.

Es zeigte sich, dass bei einer Verdünnung des Serums von 1:10, die Hämolyse, welche durch Aktivierung des Komplementsystems entstanden ist, durch die vorbestehende Eigenextinktion der oftmals hämolytischen Mausseren nicht genau bestimmt werden konnte, obwohl bei allen Proben diese vorbestehende Eigenextinktion abgezogen wurde.

Bei einer Verdünnung der Seren auf 1:250 war die Konzentration an noch enthaltenem Komplement in der einzelnen Probe sehr niedrig und reichte nicht aus, um genügend Erythrozyten zu lysieren, d. h. um zuverlässig zu erkennen, ob das Komplementsystem durch die Liposomen aktiviert wurde oder nicht.

Bewährt hat sich die Analyse der Daten, welche bei einer Serumverdünnung von 1:50 erhoben wurden, da hier ein gutes Gleichgewicht der beiden wichtigen Faktoren, der vorbestehenden Hämolyse des Mausserums und einer ausreichenden Konzentration an Komplement, erzielt werden konnte.

Daher sind bei allen folgenden Versuchen die Ergebnisse der Serumverdünnung 1:50 dargestellt.

Limitierend bleibt anzumerken, dass eine aussagekräftige statistische Auswertung vor allem der *in-vivo*-Versuche aufgrund der niedrigen Fallzahlen nur eingeschränkt vorzunehmen war. Einzelne der im Folgenden gezeigten Ergebnisse verbleiben daher rein deskriptiv. Ein statistischer Test wurde bei einzelnen *in-vivo*-Versuchen ab einer Fallzahl von $n \geq 3$ in den zu vergleichenden Gruppen vorgenommen.

3.1.1.3.1. Vorversuche mit Infektionen und Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)

3.1.1.3.1.1. Vorversuche mit Infektionen und einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)

Bei diesen Versuchen wurde deutlich, dass die Aktivität des Komplementsystems nicht nur durch eine Infektion mit verschiedenen Erregern, sondern auch durch eine Gabe von Liposomen beeinflusst wurde. Bei den nicht-infizierten Wildtyp-Tieren mit einfacher Gabe von GO-Liposomen sah man eine deutliche Abnahme der Erythrozytenlyse. Dies spricht für eine Komplement-Aktivierung *in vivo*, welche zu einem Verbrauch an Komplementfaktoren geführt hat. Diese standen nun bei der anschließenden Messung der Lyse sensibilisierter Erythrozyten nicht mehr zur Verfügung.

Bei den infizierten (Staph. aureus bzw. Burkholderia), nicht mit Liposomen behandelten Tieren (PBS), zeigte sich eine geringfügig niedrigere Lyse als bei den nichtinfizierten, nicht behandelten Tieren, welche durch eine geringe Aktivierung des Komplementsystems *in vivo* durch die Erreger erklärt wird. Innerhalb der Gruppe der infizierten Tiere zeigte sich eine deutliche Abnahme der lysierten Erythrozyten und damit deutliche Aktivierung des Komplementsystems durch eine Gabe von GOL (dargestellt in Abb. 19).

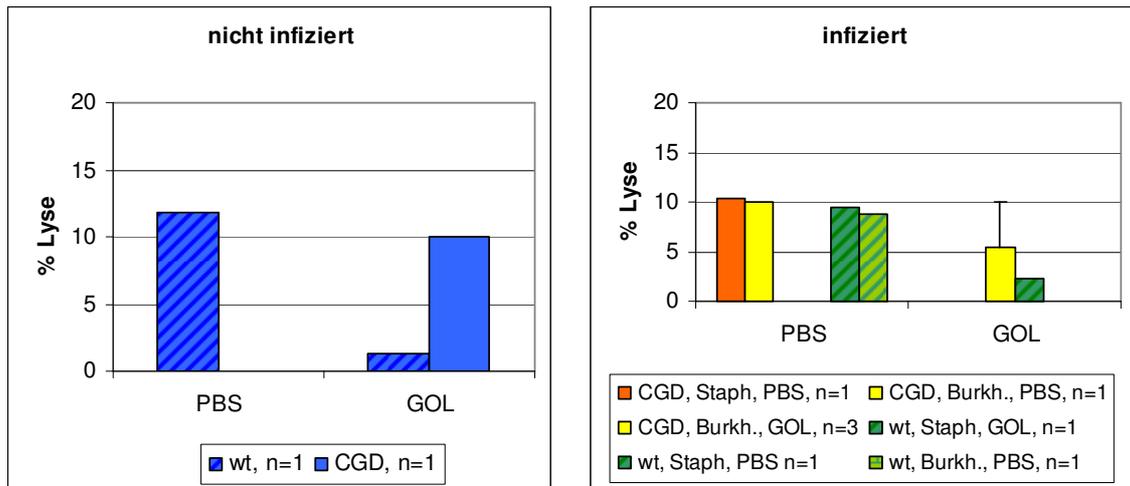


Abb 19: Aktivität von Mausserum unterschiedlich behandelter CGD- und Wildtyp Mäuse

150 µl verdünntes Mausserum wurde bei 37 °C mit sensibilisierten Erythrozyten inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse der Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = x \pm SD$.

3.1.1.3.1.2. Vorversuche mit Infektionen und dreimaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)

In dieser Gruppe nahm bei den nicht infizierten Tieren (CGD-Mäuse) die Anzahl der lysierten Erythrozyten durch eine GOL-Gabe geringfügig ab. Generell war die Lyse sensibilisierter Erythrozyten bei den nicht infizierten Tieren, welche dreimalig mit Liposomen behandelt wurden, niedriger als nach einmaliger Behandlung. Bei den mit GOL behandelten Wildtyptieren nahm die verbliebene Komplementaktivität durch eine zusätzliche Infektion (wie im oben gezeigten Versuch, 3.1.1.3.1.1.) ebenfalls nur geringfügig ab.

Innerhalb der Gruppe der mit Staphylococcus aureus infizierten CGD-Mäuse bestand nach wiederholter GOL-Gabe eine höhere Komplement-Rest-Aktivität, wodurch es bei der Messung zu einer grösseren Menge an lysierten Erythrozyten kam (Abb. 20, student t-Test * $p < 0,05$).

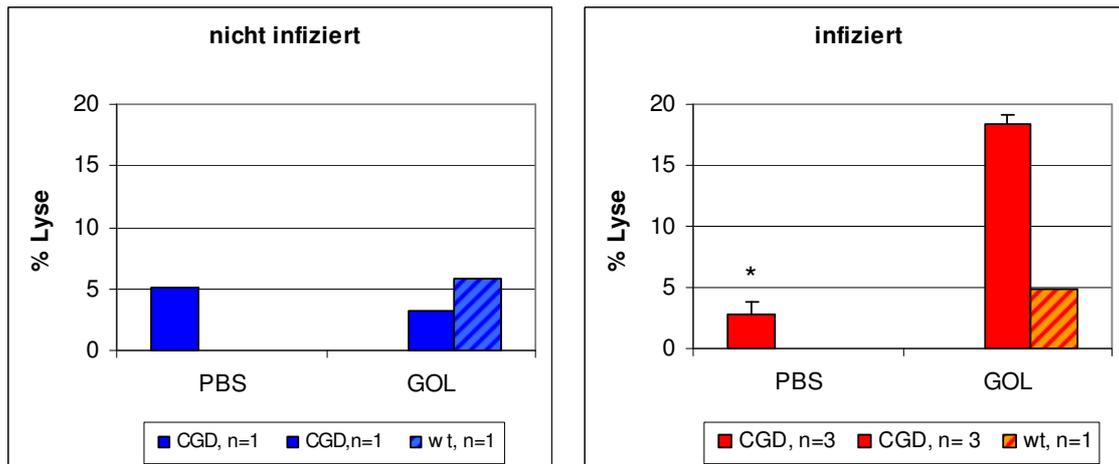


Abb 20: Aktivität von Mausserum unterschiedlich behandelter CGD- und Wildtyp Mäuse

150 µl verdünntes Mausserum wurde bei 37 °C mit sensibilisierten Erythrozyten inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse der Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = x \pm SD$. * $p < 0,05$; student-t-Test Komplementaktivität PBS-behandelte CGD-Mäuse vs. GOL-behandelte CGD-Mäuse.

3.1.1.3.2. Versuch mit einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase) bei Wildtyp-Mäusen unter zeitlichem Verlauf

Hier wurde der Einfluss von Glucose-Oxidase haltigen EPG-Liposomen auf die Aktivität des Komplementsystems bei gesunden Wildtyp-Mäusen im zeitlichen Verlauf untersucht.

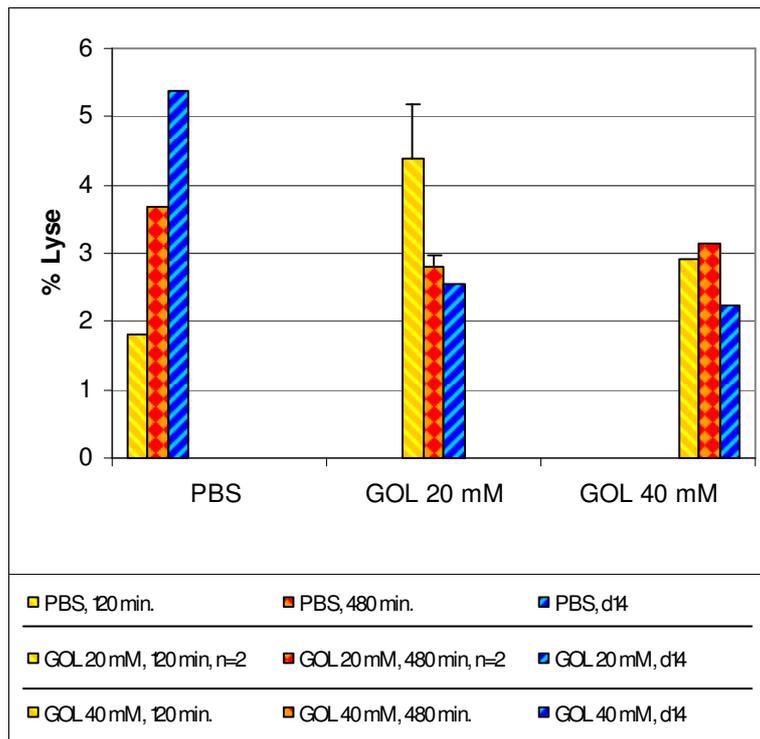


Abb 21: Aktivität von Mausserum unterschiedlich behandelter Wildtyp Mäuse

150 μ l verdünntes Mausserum wurde bei 37 °C mit sensibilisierten Erythrozyten inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse der Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = x \pm SD$.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigte sich bei den unbehandelten (PBS) Tieren nach Injektion ein im zeitlichen Verlauf abfallender Verbrauch von Komplement, d.h., dass nach Injektion von PBS reaktionsfähiges Komplement zuerst abnahm, also verbraucht wurde und daher weniger Erythrozyten lysiert wurden, nach einiger Zeit aber wieder anstieg und dadurch auch die Anzahl lysierter Erythrozyten wieder stieg.

Nach 2 Stunden war weniger aktives Komplement vorhanden, womit weniger Erythrozyten lysiert wurden als nach 8 Stunden. Auch im Verlauf von 2 Wochen nahm die Menge an verfügbarem Komplement weiter zu, allerdings langsamer als in den ersten Stunden.

Anders verhielt es sich bei Injektion von GO-Liposomen. Hier nahm die vorhandene Menge an funktionsfähigem Komplement im zeitlichen Verlauf ab.

Bei Tieren, welche mit 20 millimolaren GO-Liposomen behandelt wurden, wurden 8 Stunden nach Injektion nur noch halb so viele Erythrozyten lysiert als 2 Stunden nach Injektion. Im weiteren Verlauf blieb die Menge an vorhandenem Komplement und somit die Anzahl lysierter Erythrozyten stabil. Bei Injektion von 40 millimolaren GOL-Liposomen lagen nach 2 bzw. 8 Stunden eine ähnliche Menge an verfügbarem Komplement vor. Im weiteren zeitlichen Verlauf von 14 Tagen nahm die Menge an verfügbarem Komplement weiterhin leicht ab.

3.1.1.3.3. Versuch mit Infektion mit *Staphylococcus aureus* und einmaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)

In diesem Versuch sollte auf die Beobachtung aus den Vorversuchen (3.1.1.3.1.1.), dass das Komplementsystem auch durch Liposomen beeinflusst wurde, noch einmal eingegangen werden.

Es zeigte sich, dass bei den nicht infizierten CGD-Tieren die Komplementaktivität durch eine Liposomengabe nicht beeinflusst wurde. Man sah jedoch einen deutlichen Unterschied zwischen nicht-infizierten und infizierten CGD-Tieren, mit höherem Verbrauch der Komplementfaktoren der infizierten Tiere, welcher durch eine zusätzliche GOL-Gabe verstärkt wurde (Abb. 22, student-t-test; * $p < 0,05$).

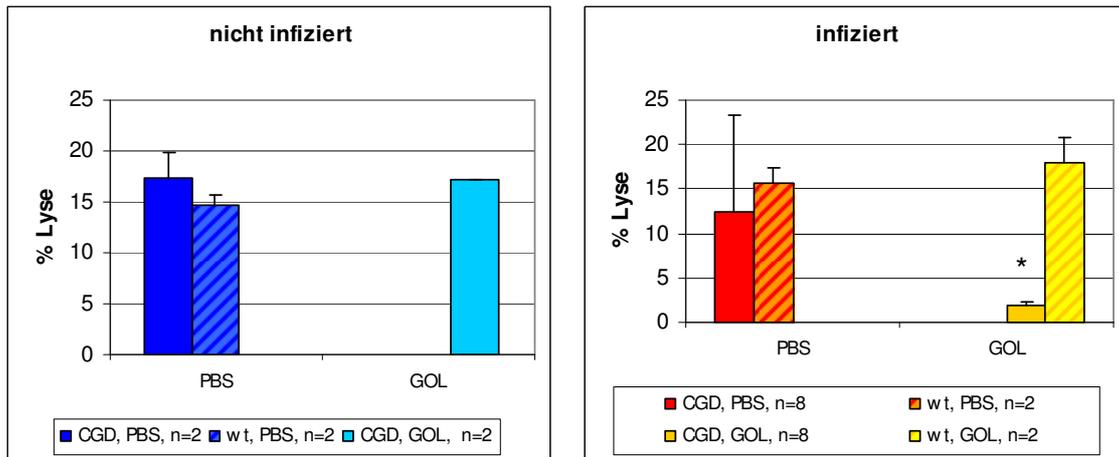


Abb 22: Aktivität von Mausserum unter dem Einfluss einer Infektion mit *Staph. aureus* und einer einmaligen Liposomengabe (GOL) bei CGD- und Wildtyp Mäusen

150 µl verdünntes Mausserum wurde bei 37 °C mit sensibilisierten Erythrozyten inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse der Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = x \pm SD$. * $p < 0,05$; student-t-Test Komplementaktivität infizierter CGD-Mäuse PBS-behandelt vs. GOL-behandelt.

3.1.1.3.4. Versuch mit Infektion mit *Staphylococcus aureus* und dreimaliger Liposomengabe (EPC : EPG : Chol.-Liposomen mit Glucose-Oxidase)

Wie bei den Vorversuchen (3.1.1.3.1.2.) war bei einer dreimaligen Injektion von GO-Liposomen / PBS die Aktivität des Komplementsystems bei den nicht-infizierten Mäusen schon sehr niedrig (2% lysierte Erythrozyten). Durch eine GOL-Gabe änderte sich die Rest-Aktivität des Komplements bei nicht-infizierten Tieren nicht. Bei den CGD-Tieren wurden bei der Infektion mit *Staph. aureus* zwei Gruppen mit unterschiedlicher Erregermenge ($0,1 \times 10^8$ und $0,3 \times 10^8$) behandelt. Unabhängig von der Erregermenge kam es bei infizierten CGD-Tieren zu keiner signifikanten Änderung der Komplementaktivität durch Liposomengabe (Abb. 23 student t-test; $p=0,36$). Es zeigte sich lediglich bei den infizierten Wildtyp-Tieren eine Zunahme der Komplementaktivität durch die GOL-Injektionen.

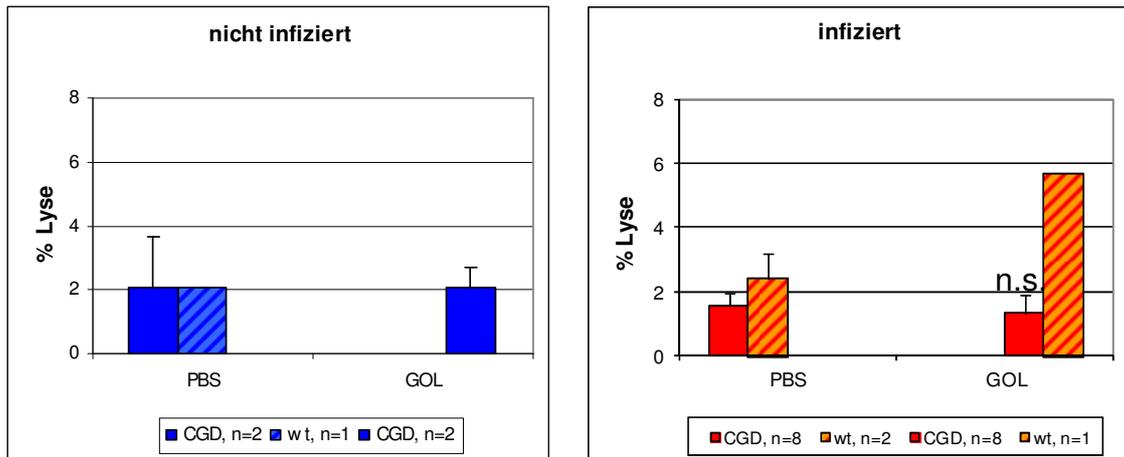


Abb 23: Aktivität von Mausserum unter dem Einfluss einer Infektion mit *Staph. aureus* und dreimaliger Liposomengabe (GOL) bei CGD- und Wildtyp Mäusen

150 µl verdünntes Mausserum wurde bei 37 °C mit sensibilisierten Erythrozyten inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Proben durch die Lyse der Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = x \pm \text{SD}$. Nicht signifikant (n.s.) student-t-Test Komplementaktivität infizierter CGD-Mäuse PBS-behandelt vs. GOL-behandelt.

3.1.2. Untersuchung des Einflusses von Liposomen auf das murine Komplementsystem mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS)

3.1.2.1. Messung der Komplementrezeptorexpression auf murinen Leukozyten

Im Hinblick auf die Komplementrezeptorexpression unter Einfluss von Liposomen (GOL) wurden im Rahmen der Tierversuche durchflusszytometrische Messungen durchgeführt (siehe 2.2.5.1.1).

Es wurde sowohl bei Wildtyp-Tieren (wt), als auch bei Knock-out-Mäusen (CGD) untersucht, ob sich zum einen die Häufigkeit der Expression verschiedener Komplementrezeptoren auf Leukozyten zwischen infizierten und nicht infizierten Mäusen unterscheidet. Zum anderen wurde deren Expression unter GOL- bzw. PBS-Behandlung bei infizierten und nicht infizierten Tieren verglichen.

3.1.2.1.1. Beeinflussung der Expression der Komplementrezeptoren durch einmalige GOL-Gabe

3.1.2.1.1.1. Expression von CD 11b und CD18

Bei der Auswertung wurde zwischen einfach positiven und doppelt positiven Zellen unterschieden. Es wurden bei keiner Population einfach CD11b positive Zellen gemessen.

Es wurden jeweils CD18 positive Zellen von Wildtyp- und CGD-Tieren mit und ohne Infektion mit Staph. aureus und mit und ohne GOL-Gabe, sowie CD11b/CD18 positive Zellen von Wildtyp- und CGD-Tieren mit und ohne Infektion mit Staph. aureus und mit und ohne GOL-Gabe miteinander verglichen.

Granulozyten:

Wie in Abb. 24 dargestellt, führte eine Infektion mit Staph. aureus bei Wildtyp-Mäusen zum Anstieg CD18 exprimierender Zellen (ca. 30%) und zum Abfall doppelt positiver Zellen (ca. 15%). Erhielten die infizierten Wildtyp-Mäuse zusätzlich GO-Liposomen, entsprach sowohl die Zahl CD18 exprimierender als auch die Zahl doppelt positiver Zellen derer gesunder Wildtyp-Tiere.

Eine Infektion führte bei CGD-Tieren zu einer deutlichen Abnahme der CD18 Expression (ca. 30%), welche durch eine Gabe von GOL zusätzlich verstärkt wurde (ca. 30%).

Bei CD11b/CD18 positiven Zellen führte eine Infektion bei unbehandelten (PBS) CGD-Tieren zu einer Zunahme der Zellen (ca. 15%).

Der Einfluss von GO-Liposomen auf doppelt positive Zellen war davon abhängig ob eine Infektion vorlag oder nicht.

Bei nicht infizierten CGD-Tieren kam es durch eine GOL-Gabe zu einem Anstieg doppelt positiver Granulozyten (ca. 25%), lag zusätzlich eine Infektion mit Staph. aureus vor, kam es durch die GOL-Gabe zu einem Abfall doppelt positiver Granulozyten. Zu beachten ist hierbei, dass sich bei infizierten CGD-

Mäusen die Zahl doppelt positiver Granulozyten derer nicht infizierter CGD-Tiere näherte.

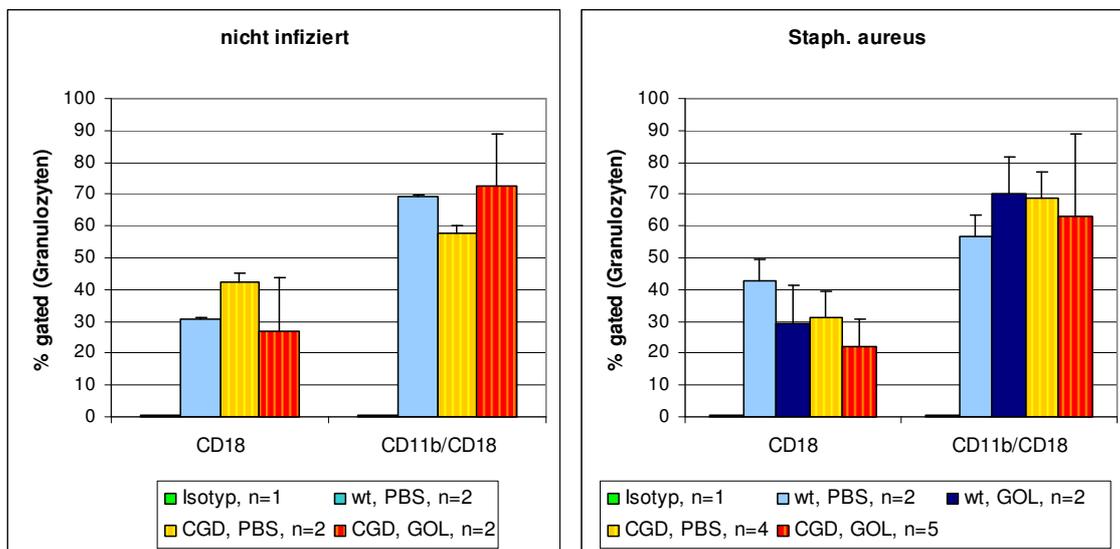


Abb. 24: Expression von CD11b und CD18 auf Granulozyten von nicht infizierten und mit *Staph. aureus* infizierten Mäusen nach Behandlung mit PBS und GOL. (MW±SD).

Monozyten:

Bei Monozyten konnte weder durch eine Infektion mit *Staph. aureus* noch durch eine Behandlung mit GO-Liposomen eine deutliche Änderung der Rezeptoren-Präsentation festgestellt werden.

Lymphozyten:

Auf den Lymphozyten nahm CD18 durch Infektion mit *Staph. aureus* sowohl bei unbehandelten (PBS) wt-Tieren als auch bei unbehandelten (PBS) CGD-Tieren um ca. 15% ab. (Dargestellt in Abb. 25).

Bei infizierten Wildtyp-Tieren kam es durch eine GOL-Gabe zu keiner wesentlichen Änderung der Zahl CD18 präsentierender Zellen.

Bei den CGD-Tieren konnte, sowohl bei den nicht-infizierten als auch bei den infizierten Tieren, eine durch Liposomen-Gabe induzierte Abnahme CD18 präsentierender Lymphozyten gesehen werden (etwa 27% bei den nicht-infizierten und etwa 12% bei den infizierten Tieren).

Die doppelt positiven Lymphozyten nahmen durch eine Infektion sowohl bei unbehandelten (PBS) wt-Tieren als auch bei unbehandelten (PBS) CGD-Tieren um etwa 15% zu.

Analog CD18 positiver Zellen änderte sich bei infizierten Wildtyp-Tieren die Zahl der doppelt positiven Zellen durch eine GOL-Gabe ebenfalls nicht wesentlich.

Bei den doppelt positiven Zellen nahm die Expression der Oberflächenrezeptoren bei nicht infizierten CGD-Tieren durch die Gabe von GOL um ca. 10% zu. Bei infizierten CGD-Tieren kam es durch die GOL-Gabe zu einer leichten Abnahme der doppelt positiven Zellen.

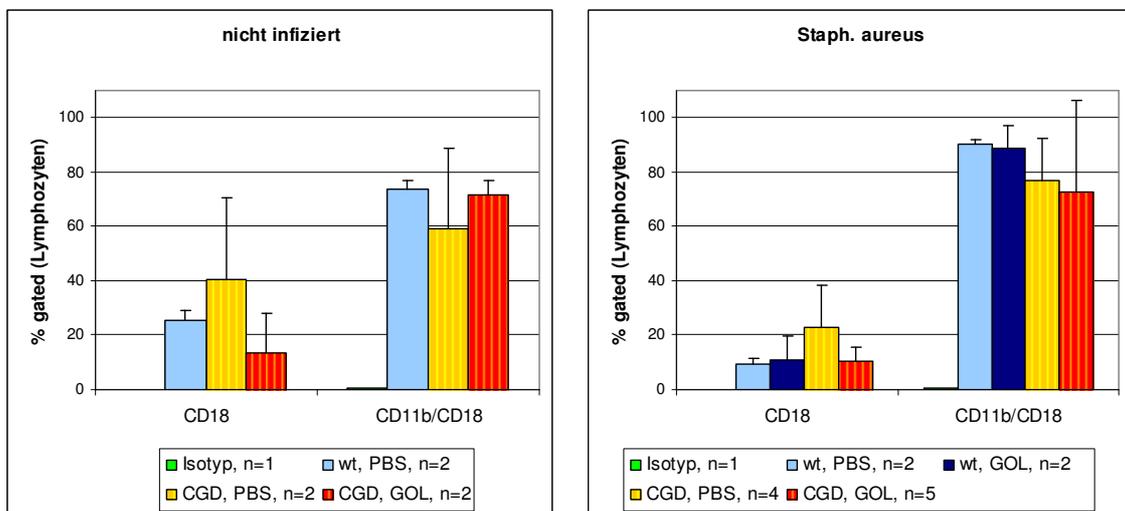


Abb. 25: Expression von CD11b und CD18 auf Lymphozyten von nicht infizierten und mit Staph. aureus infizierten Mäusen nach Behandlung mit PBS und GOL. (MW±SD).

3.1.2.1.1.2. Expression von CD 21/35

Granulozyten:

Wie in den Abbildungen 26 bis 28 dargestellt wurde die CD 21/35-Expression der Granulozyten bei unbehandelten Wildtyp-Tieren durch eine Infektion deutlich supprimiert (Abnahme um ca 50%). Bei CGD-Tieren wurde die Expression von CD21/35 durch eine Infektion nicht beeinflusst. Durch eine GOL-Gabe kam es innerhalb der Gruppe infizierter Tiere sowohl bei Wildtyp- als auch bei CGD-Tieren lediglich zu einer sehr geringfügigen Abnahme von CD21/35 (um jeweils ca. 2%).

Monozyten:

Bei den Monozyten waren bei den gesunden Tieren zwischen 50 und 60% der Zellen positiv für CD 21/35, bei den infizierten Tieren zwischen 40 und 50%.

Eine Abnahme der CD 21/35 positiven Zellen durch eine GOL-Gabe ließ sich sowohl bei infizierten Wildtyp-Tieren als auch bei nicht infizierten und infizierten CGD-Mäusen nachweisen.

Lymphozyten:

Bei den Lymphozyten kam es durch eine Infektion mit Staph. aureus sowohl bei Wildtyp- als auch bei CGD-Tieren zu einer Downregulation von CD21/25 (73% bei Wildtyp-Tieren und 25% bei CGD-Tieren). Durch eine GOL-Gabe kam es bei infizierten Wildtyp-Tieren zu einer Hochregulation um 15%. Bei nicht infizierten CGD-Tieren kam es zu einer Downregulation von CD21/35 um 30%. Auf die infizierten CGD-Tiere hatte eine GOL-Gabe keinen Einfluss auf die CD21/35 Expression.

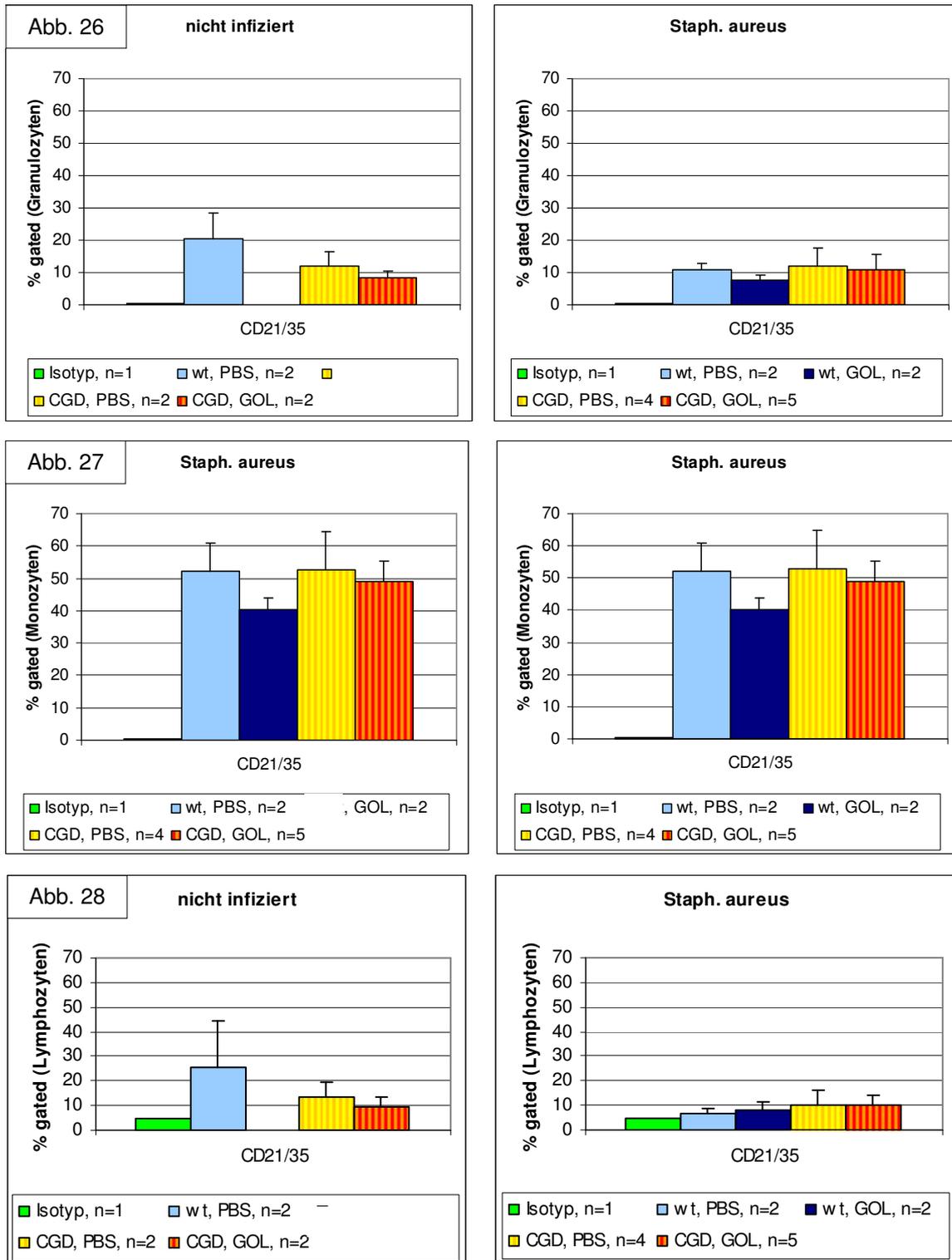


Abb. 26 – 28: Expression von CD 21/35 auf Granulozyten (Abb. 26), Monozyten (Abb. 27) und Lymphozyten (Abb. 28) von gesunden und mit Staph. aureus infizierten Mäusen nach Behandlung mit PBS und GOL, (MW \pm SD).

3.1.2.1.2. Beeinflussung der Expression der Komplementrezeptoren durch dreimalige GOL-Gabe

3.1.2.1.2.1. Expression von CD 11b und CD18

Wie bereits unter 3.1.2.1.1.1. beschrieben wurde auch hier bei der Auswertung zwischen einfach positiven und doppelt positiven Zellen unterschieden. Es wurden ebenfalls bei keiner Population einfach CD11b positive Zellen gemessen.

Granulozyten:

Wie Abbildung 29 zu entnehmen, zeigte sich, dass bei unbehandelten (PBS) wt-Tieren CD18 durch Infektion mit Staph. aureus um ca. 3,7mal häufiger exprimiert wurde als bei den nicht-infizierten wt-Tieren.

Im Gegensatz zu 3.1.2.1.1.1. nahm bei den unbehandelten (ohne GOL) CGD-Tieren die Expression des Komplement-Rezeptors CD18 durch eine Infektion mit Staph. aureus zu (ca 70%).

Bei zusätzlicher GOL-Gabe fiel die Zahl CD18 exprimierender Zellen bei infizierten wt-Mäusen wieder ab und näherte sich derer gesunder Wildtyp-Tiere. Durch die Gabe von GOL stieg die Zahl CD18 exprimierender Zellen bei nicht-infizierten CGD-Tieren auf die etwa 4,5-fache Menge an. Eine dreimalige GOL-Gabe bei infizierten CGD-Tieren führte im Vergleich zu nicht-infizierten, nicht-behandelten CGD-Tieren, zu einem Anstieg der CD18-Expression um 47%.

Bei den doppelt positiven Zellen der wt-Tiere sank die Anzahl der detektierten Zellen durch eine Infektion wie auch bei einmaliger Injektion (3.1.2.1.1.1.) ebenfalls ab (hier um ca 20%).

Die doppelt positiven Zellen nahmen bei den unbehandelten CGD-Tieren durch eine Infektion mit Staph. aureus um etwa 10% ab.

Bei infizierten wt-Mäusen stieg die Zahl doppelt positiver Zellen durch eine Liposomen-Gabe und entsprach bei infizierten und mit GOL behandelten Wildtyp-Tieren derer gesunder Wildtyp-Tiere.

Durch die Gabe von GOL nahm die Expression der doppelt positiven Zellen bei nicht infizierten GGD-Tieren um ca. 30% ab. Bei infizierten CGD-Tieren kam es durch die GOL-Gabe zu einer Zunahme der doppelt positiven Zellen um ca. 43%.

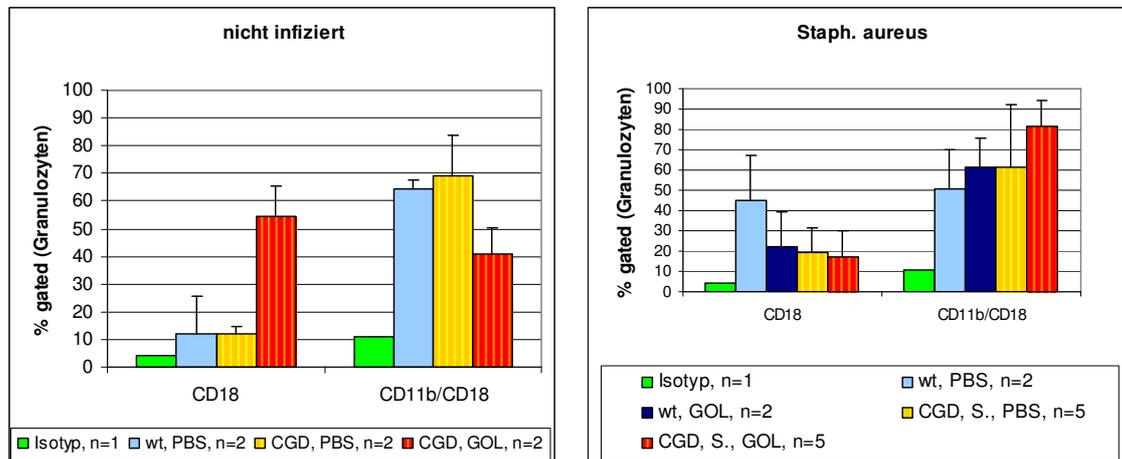


Abb. 29: Expression von CD11b und CD18 auf Granulozyten von nicht infizierten und mit Staph. aureus infizierten Mäusen nach Behandlung mit PBS bzw. GOL. (MW±SD).

Monozyten:

Auch bei dreimaliger Injektion ließ sich analog des Versuchs 3.1.2.1.1. auf Monozyten weder durch eine Infektion mit Staph. aureus noch durch eine Liposomenbehandlung eine deutliche Änderung der Rezeptoren-Präsentation feststellen.

Lymphozyten:

In diesem Versuch waren insgesamt nur wenig CD18 präsentierende Zellen nachzuweisen. Diese fielen bei unbehandelten Wildtyp-Tieren durch eine Infektion mit Staph. aureus ab, es waren noch 56% der zuvor gemessenen Lymphozyten nachweisbar.

Bei CGD-Tieren führte eine Infektion zu einem Anstieg CD18 positiver Zellen um mehr als die doppelte Anzahl im Vergleich zu nicht infizierten CGD-Tieren (ca. 120%).

Bei zusätzlicher, dreimaliger GOL-Applikation bei infizierten Wildtyptieren, fiel die CD18-Anzahl etwas weniger stark ab als bei alleiniger Infektion (es verblieben etwa 48%).

Eine dreimalige GOL-Gabe führte sowohl bei nicht infizierten als auch bei infizierten CGD-Tieren zu einem Anstieg CD18 präsentierender Zellen (um ca. 77% der initial gemessenen Zellen bei nicht infizierten CGD-Tieren und um ca. 20% der initial gemessenen Zellen bei infizierten CGD-Tieren).

Die doppelt positiven Zellen nahmen durch eine Infektion bei der nicht behandelten Wildtyp Gruppe um etwa 10% zu, bei der CGD-Gruppe um etwa 20% ab.

Eine dreimalige GOL-Gabe führte weder bei infizierten Wildtyp-Tieren noch bei nicht infizierten CGD-Tieren zu einer wesentlichen Änderung der Zahl doppelt positiver Zellen, lediglich bei infizierten CGD-Tieren kam es zu einer Liposomen-induzierten Zunahme der doppelt positiven Zellen (um etwa 18% der initial gemessenen Zellezahl).

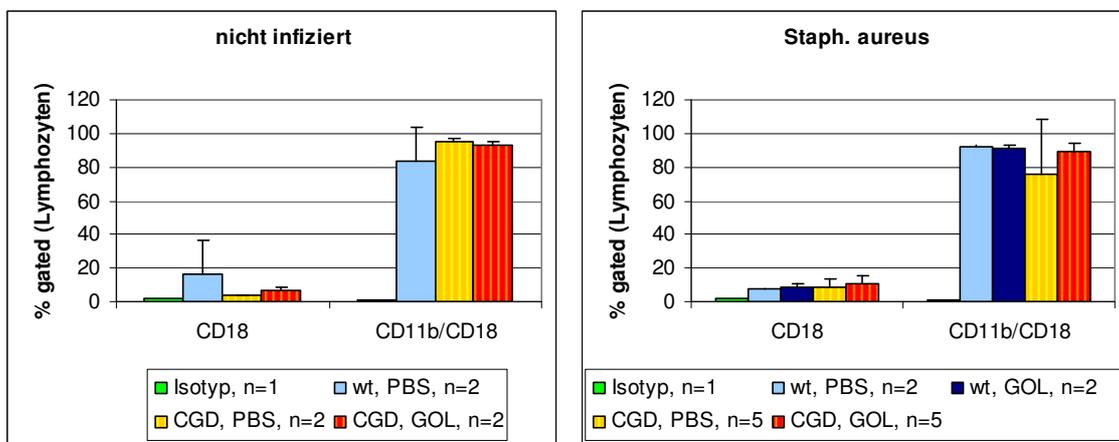


Abb. 30: Expression von CD11b und CD18 auf Lymphozyten von nicht infizierten und mit Staph. aureus infizierten Mäusen nach Behandlung mit PBS bzw. GOL. (MW±SD).

3.1.2.1.2.2. Expression von CD 21/35

In den Abbildungen 31 – 33 ist die Expression der Oberflächerezeptoren CD 21/35 auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten von nicht infizierten und mit Staph. aureus infizierten Mäusen nach Behandlung mit PBS bzw. GOL. (MW±SD) dargestellt.

Durch eine Infektion mit Staph. aureus stieg die Expression von CD21/35 auf Granulozyten bei nicht-behandelten (PBS) Wildtyp-Tieren auf die dreifache Anzahl an. Bei den CGD-Mäusen war die Expression von CD21/35 mehr als dreimal so häufig wie bei Wildtyp-Mäusen und nahm aber durch eine Infektion mit Staph. aureus um 23% ab.

Wurden die infizierten Wildtyp-Tiere zusätzlich mit GOL behandelt, stieg die Expression nur auf die doppelte Anzahl im Vergleich zu nicht-behandelten, nicht-infizierten Wildtyp-Tieren, d.h. bei infizierten wt-Mäusen hatte GOL eine herunterregulierende Wirkung auf die CD21/35 Expression.

Eine Behandlung mit GO-Liposomen führte bei nicht-infizierten CGD-Mäusen ebenfalls zu einer Abnahme der CD21/35-Expression (um 25%).

Innerhalb der Gruppe infizierter CGD-Mäuse führt eine GOL-Gabe zu einer Abnahme um etwa 50 %.

Die Expression von CD21/35 auf Monozyten stieg durch eine Infektion mit Staph. aureus bei Wildtyp-Tieren um 68%. Bei den CGD-Mäusen, bei welchen CD21/35 doppelt so häufig exprimiert wurde wie bei Wildtyp-Mäusen, nahm die Expression von CD21/35 durch eine Infektion mit Staph. aureus um 33% ab.

Wurden die infizierten Wildtyp-Tiere zusätzlich mit GOL behandelt, stieg die Expression um mehr als 100% im Vergleich zu nicht-behandelten, nicht-infizierten Wildtyp-Tieren. Hier zeigte sich bei infizierten Wildtyp-Tieren also eine Hochregulation von CD21/35 durch GOL.

Eine Behandlung mit GO-Liposomen führte bei nicht-infizierten CGD-Mäusen, wie bei den Granulozyten zu einer Abnahme der CD21/35-Expression (hier um 27%).

Innerhalb der Gruppe infizierter CGD-Mäuse hatte eine GOL-Gabe keinen Einfluss auf die Expression von CD21/35.

Auf Lymphozyten von nicht behandelten Wildtyp-Tieren stieg die Expression von CD21/35 durch eine Infektion mit *Staph. aureus* um 63%.

Bei nicht infizierten, nicht behandelten CGD-Tieren wurde CD21/35 um 26% weniger häufig exprimiert als bei nicht infizierten, nicht behandelten Wildtyp-Tieren. Hier verdoppelte sich die Expression von CD21/35 durch eine Infektion mit *Staph. aureus*.

Bei den infizierten Wildtyp-Mäusen hatte eine zusätzlich Behandlung mit GO-Liposomen keinen Einfluss auf die Anzahl CD21/35 exprimierender Lymphozyten.

Eine Behandlung mit GO-Liposomen führte bei nicht-infizierten CGD-Mäusen, analog der Granulozyten und Monozyten, zu einer Abnahme der CD21/35-Expression auf Lymphozyten (hier um 26%).

Innerhalb der Gruppe infizierter CGD-Mäuse nahm die Expression von CD21/35 durch eine Gabe von GOL um 23% ab.

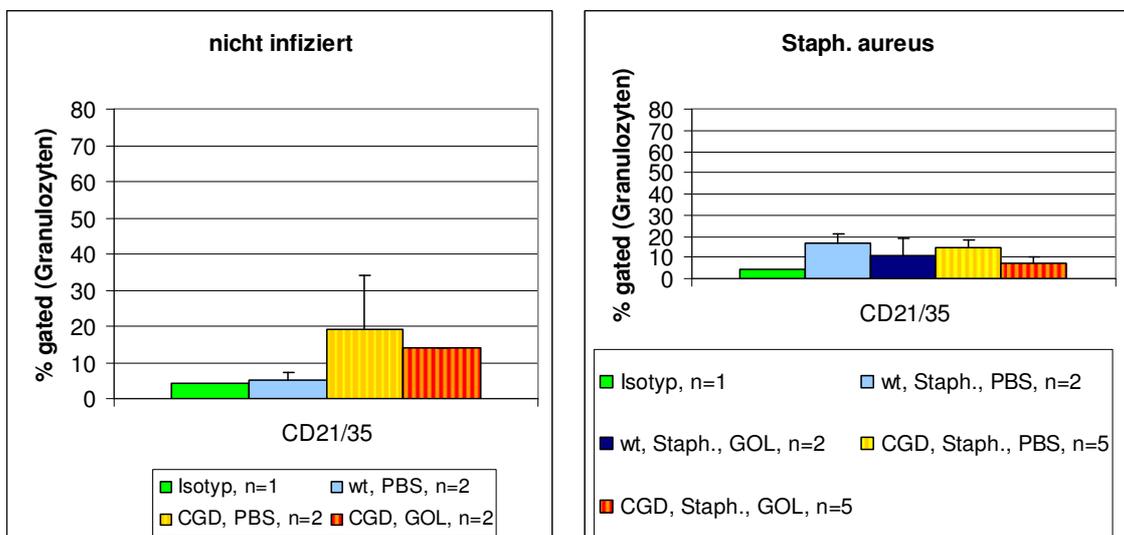


Abb. 31: Expression von CD 21/35 auf Granulozyten.

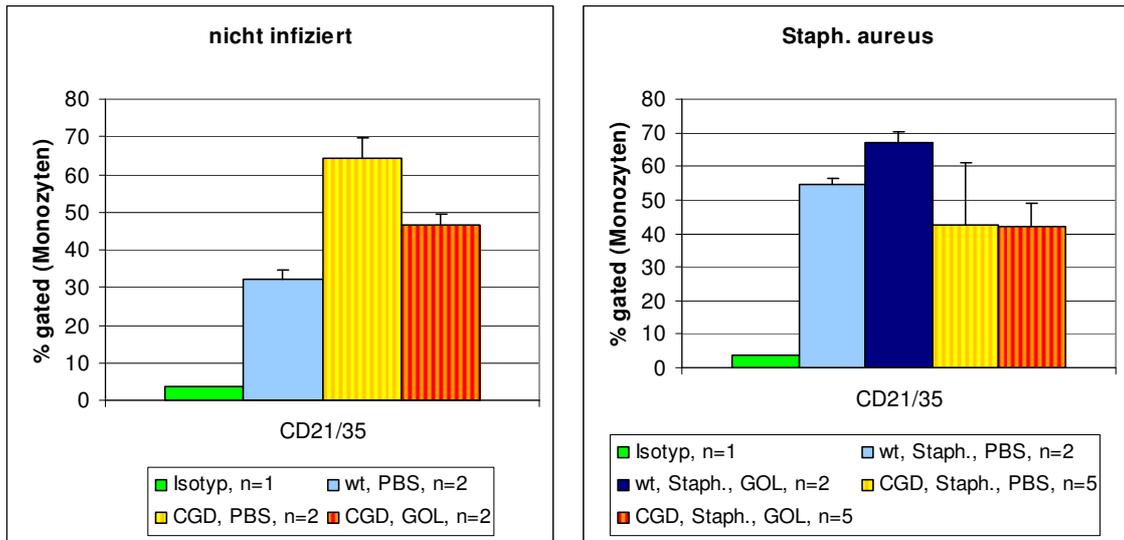


Abb. 32: Expression von CD 21/35 auf Monozyten.

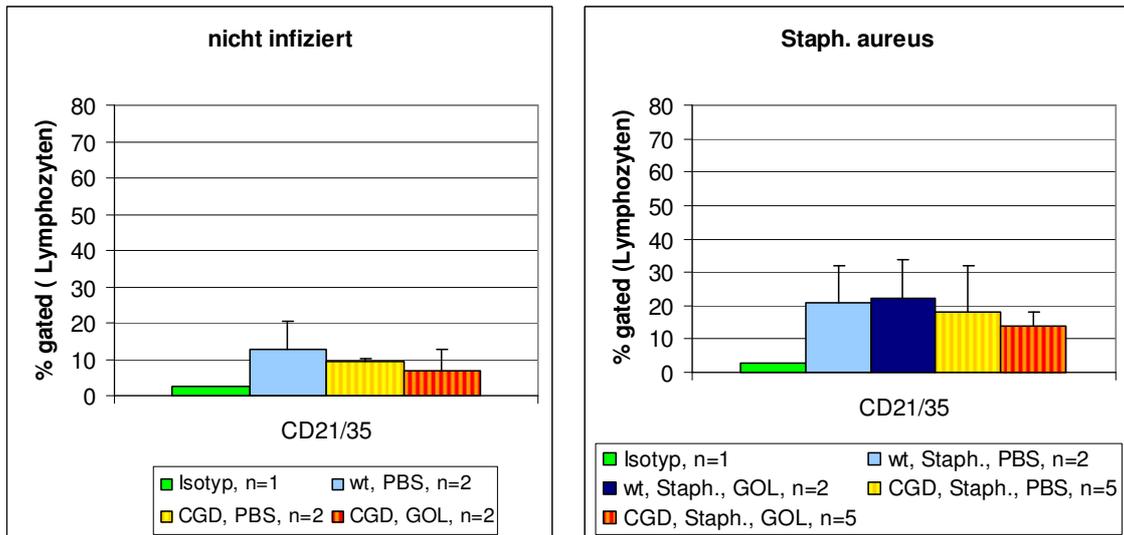


Abb. 33: Expression von CD 21/35 auf Lymphozyten.

3.2. Einfluss von Leerliposomen mit verschiedenen Formulierungen auf das humane Komplementsystem

3.2.1. Kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im humanen System mit dem CH₅₀-Assay

Um herauszufinden, ob Liposomen das humane Komplementsystem aktivieren und um das murine System mit dem humanen System vergleichen zu können, wurde auch im humanen System eine kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements unter dem Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen durchgeführt.

Die Inkubation von humanem Serum mit sensibilisierten Schaf-Erythrozyten führt zu einer Aktivierung des klassischen Wegs des Komplementsystems. Dabei kommt es zur Lyse der Erythrozyten.

Wurde das Komplement bei vorherigen Reaktionen (wie beispielsweise in diesem Versuch durch Inkubation des Serums mit Liposomen) bereits aktiviert, kam es durch den Verbrauch der Komplementproteine zur Erniedrigung einzelner Komponenten. Dies führte später bei der Messung der Aktivität des Gesamtkomplements zu einer erniedrigten Aktivität.

Umgekehrt kann darauf geschlossen werden, dass bei einer hohen Aktivität des Gesamtkomplements die Komplementproteine noch in ausreichender Menge vorhanden waren, also bei vorherigen Inkubationen nicht aktiviert und somit nicht verbraucht wurden.

In Abb. 34 ist die Komplementaktivität von humanem Serum unter dem Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen (Leerliposomen) im Vergleich zur Komplement-Aktivität von nicht-behandeltem Serum dargestellt.

Die Serumproben, welche unter dem Einfluss von EPC [1 mM] und EPG [5 mM] standen, zeigten eine vergleichbare Komplementaktivität wie die nicht-behandelten Seren (Negativ-Kontrolle). Allerdings änderte sich tendenziell die Komplementaktivität unter dem Einfluss anderer Konzentrationen dieser Liposomen. Sowohl mit EPC [5 mM], als auch mit EPG [1 mM] nahm die

Komplementaktivität ab. Interessanterweise verhielt sich die konzentrationsbezogene Reaktion der EPC- und EPG-Liposomen gegenläufig zueinander.

Wurden PEG-Liposomen verwendet, zeigte sich die Aktivität des Komplements im Vergleich zur Negativkontrolle um ca. 25% erhöht.

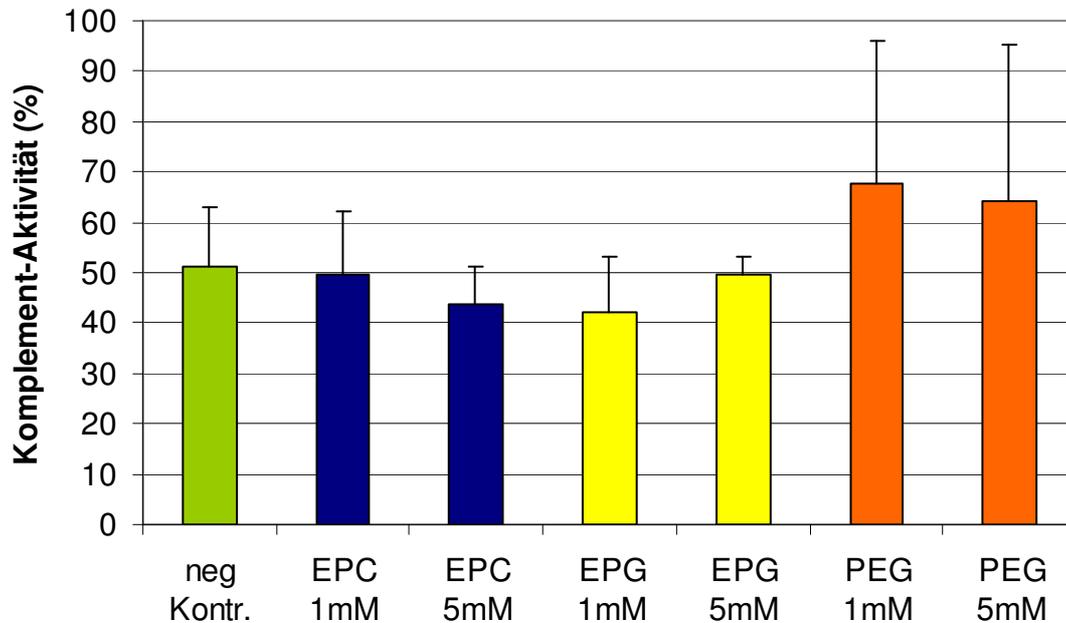


Abb. 34: Komplement-Aktivität unter Beeinflussung von verschiedenen Liposomenformulierungen

50 µl Serum wurden bei 37 °C ohne bzw. mit Liposomen inkubiert. Gemessen wurde die Komplement-Aktivität der Seren durch die Lyse von sensibilisierten Erythrozyten. Gezeigt sind Mittelwerte aus $n = 3$, \pm SD.

Besonders bei den PEG-Liposomen zeigten sich allerdings starke interindividuelle Unterschiede. Bei einem Probanden zeigte sich eine der Negativ-Kontrolle entsprechende Reaktion, bei einem anderen Probanden nahm die Komplementaktivität im Vergleich zum unbehandelten Serum ab und bei einem weiteren Probanden nahm die Komplementaktivität im Vergleich zum unbehandelten Serum stark zu. Diese unterschiedliche Reaktion der einzelnen Probanden auf PEG-Liposomen war konzentrationsunabhängig.

Limitierend muss angemerkt werden, dass bei hohen Standardabweichungen aufgrund interindividueller Unterschiede und kleinen Fallzahlen eine statistische Auswertung nicht sinnvoll erscheint.

3.2.2. Quantitative Bestimmung der Komplementfaktoren C3c und C4 im humanen System unter dem Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen

Natives C3 und sein physiologisches Zerfallsprodukt C3c stellen zentrale Proteine des Komplementsystems dar und sind sowohl am klassischen als auch am alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems beteiligt. C4 spielt bei der Aktivierung des klassischen Wegs eine Rolle.

Mit dieser Methode wurde nun untersucht, ob die verschiedenen Liposomenformulierungen (Leerliposomen) die Quantität von C3c und C4 und somit die Aktivierung des Komplementsystems beeinflussen.

Wie Abb. 35 zu entnehmen ist, kann man durch die verschiedenen Liposomenformulierungen im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikanten Konzentrationsänderungen von C3c sehen.

Ebenso zeigten sich auch bei der Messung von C4 lediglich kleinere Schwankungen ohne signifikante Konzentrationsänderung durch die verschiedenen Liposomenformulierungen (Abb. 36).

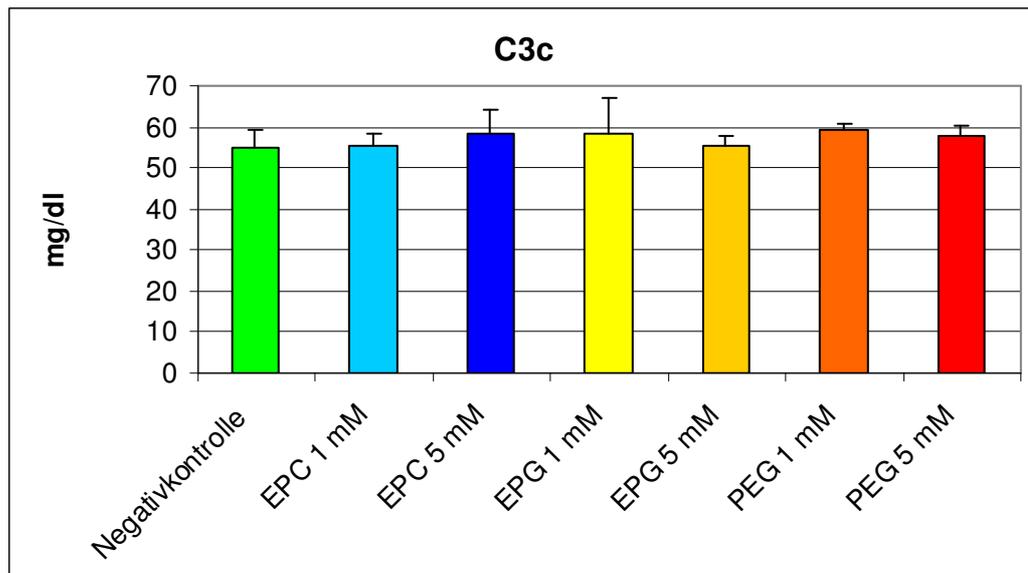


Abb. 35: Konzentration an C3c in mg/dl im humanen Serum unter Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 3 + SD$.

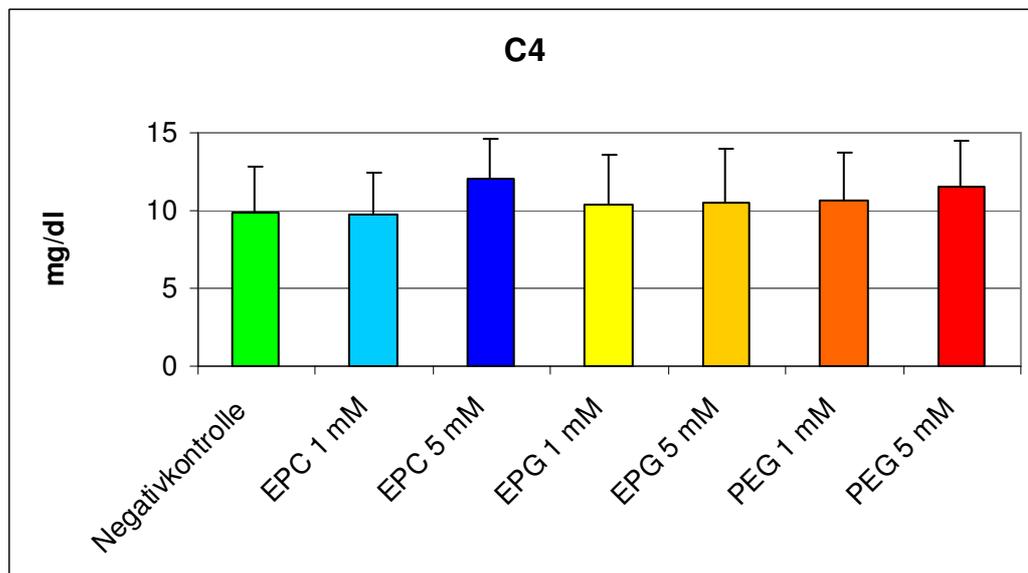


Abb. 36: Konzentration an C4 in mg/dl im humanen Serum unter Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 3. \pm SD$.

3.2.3. Durchflusszytometrische Untersuchung von Komplement-Rezeptoren des Menschen

Die Untersuchungen wurden mit humanem Vollblut und den verschiedenen Liposomenformulierungen EPC, EPG und PEG durchgeführt.

3.2.3.1. Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Komplement-Rezeptoren, Integrine, CD55 und CD14 humaner Leukozyten

Zur Bestimmung der einzelnen Rezeptoren wurden Maus-Anti-Human-Antikörper (CD35, CD88, CD11b/MAC-1, CD18, CD55 (decay-accelerating factor) und CD14) verwendet, welche mit FITC, Cy-Chrome oder PE markiert waren.

Der Komplement-Rezeptor für C5a (CD88), sowie die mit dem Komplementsystem assoziierten Proteine (CD11b/MAC-1, CD18) zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle unter Liposomeneinfluss, unabhängig von der Liposomenzusammensetzung, keine Veränderung in ihrer Expressionsdichte.

Folgend sind daher die Wirkung der einzelnen Liposomen auf die Komplement-Rezeptoren für C3b, C4b (CD35), den decay-accelerating factor (CD55) sowie den Rezeptor für Lipopolysaccharide und Lipopolysaccharid-bindendes Protein (CD14) dargestellt (Abb.: 37a-c – Abb.: 39a-c).

3.2.3.1.1. Einfluss von EPC-Liposomen

Granulozyten:

Auf Granulozyten führte eine EPC-Gabe zu einer Steigerung der Rezeptordichte CD55 positiver Zellen (siehe Abb 37a; student-t-Test $p < 0,05$). Auf CD35 positive Granulozyten hatte eine EPC-Gabe keinen Einfluss. CD14 positive Granulozyten waren unabhängig einer EPC-Gabe nicht nachweisbar.

Die Fluoreszenz-positiven Zellen erhöhten sich durch eine 1 millimolare EPC-Gabe bei CD55 um etwa 50%, durch eine 5 millimolare EPC-Gabe um 75% im Vergleich zur Negativkontrolle (HBSS).

Monozyten:

Die CD55-Rezeptordichte stieg bei den Monozyten bei einer Zugabe einer 1mM Lösung an, nahm bei einer 5mM Lösung allerdings ab.

Einen herunterregulierenden Einfluss durch EPC zeigte sich auf CD14 präsentierende Monozyten (ca. 42%), wobei dieser Effekt unabhängig von der Liposomenkonzentration war (Abb. 37b, student-t-Test $p < 0,05$).

Auf CD35 präsentierende Monozyten hatte eine EPC-Gabe eine stark steigernde Wirkung. Die prozentuale Menge an Fluoreszenz-positiven Zellen stieg bei einer 1mM EPC-Zugabe auf nahezu 300%, bei einer 5mM EPC-Zugabe sogar auf 330% des Ausgangswertes.

Die Zahl der doppelt-positiven Zellen (CD35/CD14) zeigte sich unverändert nach Gabe von 1 und 5 nM EPC unverändert.

Lymphozyten:

Auf die Rezeptordichte der Lymphozyten hatte eine EPC-Gabe einen weniger starken Einfluss.

CD55 nahm durch eine EPC-Behandlung leicht (statistisch nicht signifikant) ab (die Zahl CD55 positiver Lymphozyten sank sowohl nach 1millimolarer als auch nach 5 millimolarer EPC-Gabe um jeweils ca. 10% der in der Negativkontrolle gemessenen Zellzahl).

Auf CD35 hatte eine EPC-Gabe einen minimal hochregulierenden Einfluss (statistisch nicht signifikant), die Zellzahl stieg um 12% bei Behandlung mit 1mM EPC, um 23% bei Behandlung mit 5mM EPC.

Sowohl CD 14 als auch die doppelt positiven Zellen CD35/CD14 waren bei Lymphozyten schon in der Negativkontrolle nicht nachweisbar. Dies änderte sich auch durch eine EPC-Gabe nicht.

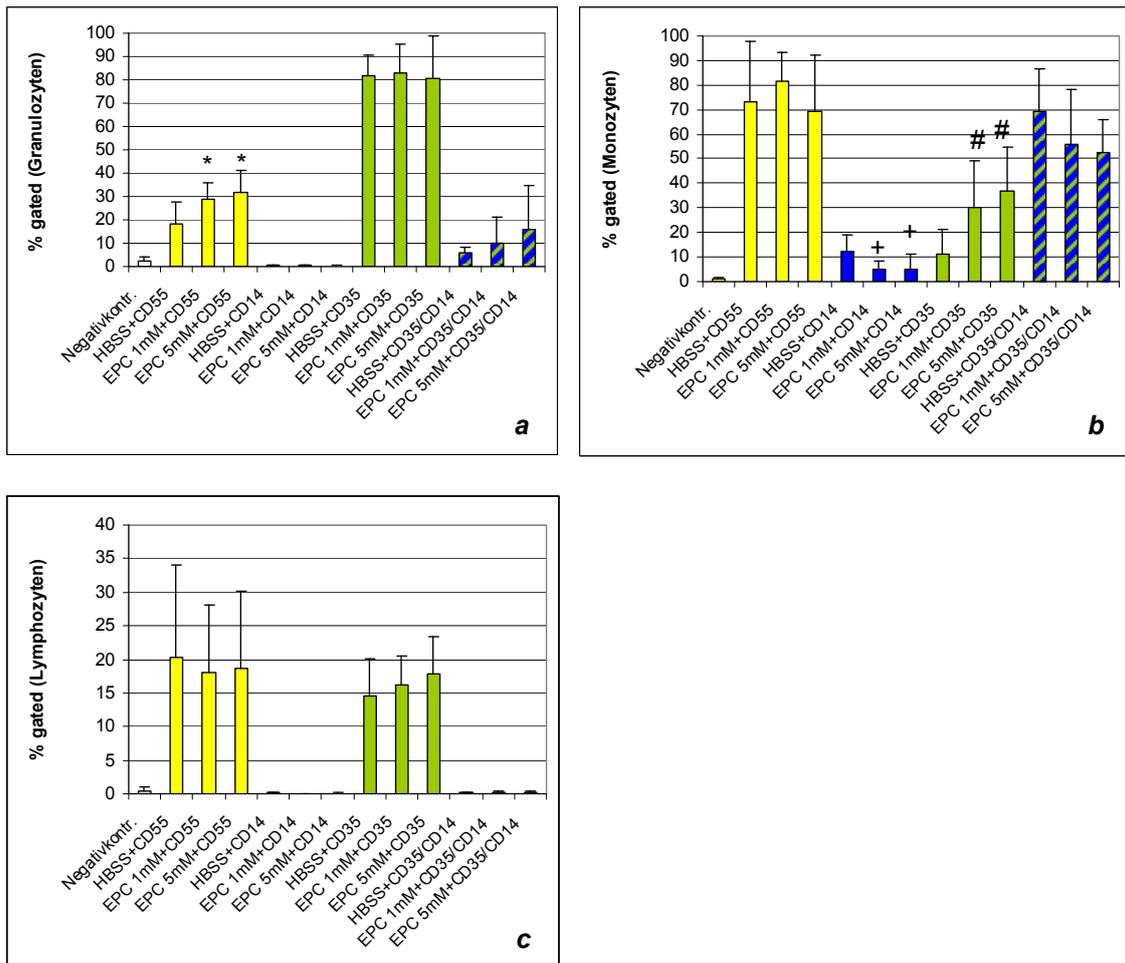


Abb. 37a-c: Expressionsdichte verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten (a), Monozyten (b) und Lymphozyten (c) unter Einfluss von EPC-Liposomen

100 μ l heparinisiertes Vollblut wurden mit 100 μ l HBSS, EPC 1mM oder EPC 5mM, über 60 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C, anschließend für 15 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz-positiven Zellen relativ zur Gesamtpopulation (10.000 Zellen), Mittelwerte \pm SD, n = 3. Student-t-Test: * p<0,05; EPC-CD55 vs. HBSS-CD55 auf Granulozyten; + p<0,05 EPC-CD14 vs. HBSS-CD14 und # p<0,05 HBSS-CD35 vs. EPC-CD35 auf Monozyten.

3.2.3.1.2. Einfluss von EPG-Liposomen

Im Allgemeinen hatten EPG-Liposomen einen weniger starken Einfluss auf die Rezeptorendichte als EPC-Liposomen.

Granulozyten:

Bei den Granulozyten nahm CD55 nur minimal zu (um 8% bei 1mM EPG und 30% bei 5 mM, student-t-Test nicht signifikant), CD35 nahm um ca. 5% ab (student-t-Test nicht signifikant). Sowohl CD14 als auch CD35/CD14 wurden auf Granulozyten nicht exprimiert, es ergab sich keine Änderung durch eine Liposomenzugabe.

Monozyten:

Bei den Monozyten zeigte sich bei CD55, CD35 und CD14/CD35 positiven Zellen kaum eine Änderung durch eine EPG-Gabe. Die Zahl CD55 positiver Zellen sank um ca. 7% sowohl bei 1mM als auch bei 5mM EPG-Gabe. Bei CD35 war keine einheitliche Reaktionstendenz auf die Rezeptorenpräsentation durch EPG erkennbar. Die doppelt positiven Zellen stiegen bei 1 und 5 millimolarer EPG-Gabe jeweils um etwa 5%. Lediglich die CD14 positiven Zellen sanken bei 1mM EPG-Gabe um 45%, bei 5mM EPG-Gabe allerdings nur um 30% (student-t-Test nicht signifikant).

Lymphozyten:

Auf Lymphozyten nahmen sowohl CD55 als auch CD35 nur minimal ab (student-t-Test nicht signifikant). CD55 sank durch eine EPG-Gabe (sowohl bei 1 millimolarer als auch bei 5 millimolarer Konzentration) um etwa 17%. CD35 sank nach 1mM EPG um 6%, nach 5mM EPG um 17%. CD 14 und die doppelt positiven Zellen waren unabhängig von einer Liposomen-Gabe nicht nachweisbar.

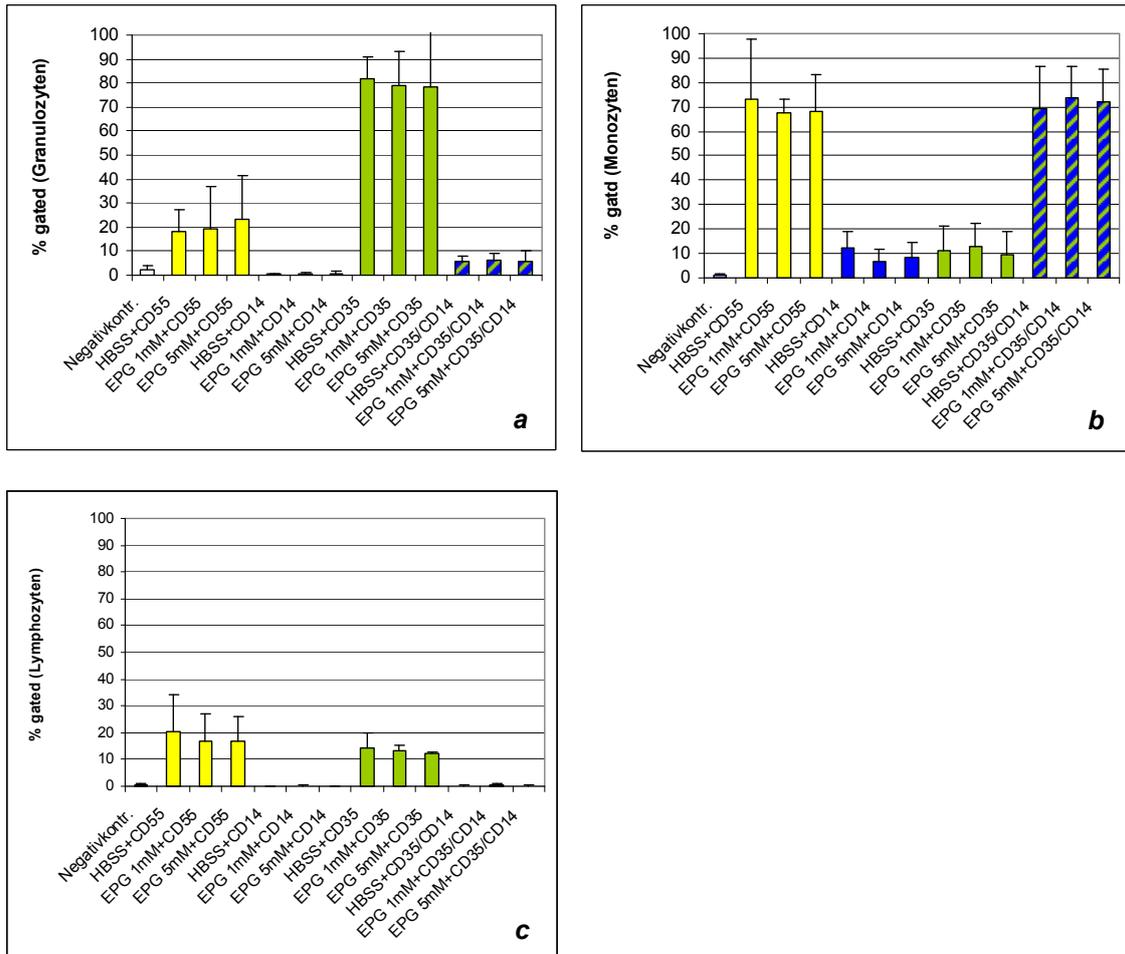


Abb. 38a-c: Expressionsdichte verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten (a), Monozyten (b) und Lymphozyten (c) unter Einfluss von EPG-Liposomen

100 μ l heparinisiertes Vollblut wurden mit 100 μ l HBSS, EPG 1mM oder EPG 5mM, über 60 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C, anschließend für 15 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz-positiven Zellen relativ zur Gesamtpopulation (10.000 Zellen), Mittelwerte \pm SD, n = 3.

3.2.3.1.3. Einfluss von PEG-Liposomen

Granulozyten:

Die Menge an exprimierten CD55 sank im Vergleich zur Negativkontrolle konzentrationsunabhängig um etwa 50% (student-t-Test nicht signifikant). Die Zahl der doppelt positiven Zellen (CD35/CD14) änderte sich nach 1 und 5 millimolarer PEG-Gabe nicht signifikant. Bei CD35 und CD14 einzeln positiven Granulozyten gab es keine Änderung durch eine Liposomen-Gabe.

Monozyten:

Bei den Monozyten ergab sich eine eher inhomogene Reaktion auf die PEG-Zugabe. CD55 nahm im Vergleich zur Negativkontrolle bei einer 1mM PEG-Zugabe um etwa 50%, bei einer 5mM PEG-Zugabe um etwa 25% ab. CD14 nahm bei einer niedrigen Liposomenzugabe leicht zu, bei einer höheren PEG-Konzentration fiel die Zahl an Rezeptoren im Vergleich zur Negativkontrolle jedoch um über 50% ab.

Bei CD 35 zeigte sich ein deutlicher Trend mit einer Zunahme um 9% bei 1mM und 63% bei 5mM PEG-Konzentration, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Die Anzahl der doppelt positiven Zellen sank unter einer 1mM PEG-Zugabe um 10% ab, bei einer höheren Liposomenkonzentration wurde die gleiche Menge an doppelt positiven Zellen wie bei der Negativkontrolle bestimmt (student-t-Test nicht signifikant).

Lymphozyten:

Auf den Lymphozyten nahm CD55 konzentrationsabhängig nur minimal ab (15% bei 1mM PEG und 24% bei 5mM PEG). Bei CD35 zeigte sich keine einheitliche Reaktionstendenz, nach 1millimolarer PEG-Applikation nahm CD35 um etwa 28% ab, bei 5 millimolarer PEG-Applikation allerdings um 15% zu. CD14 und CD35/CD14 doppelt positive Zellen waren auf Lymphozyten nicht nachweisbar, dies änderte sich auch durch eine PEG-Gabe nicht.

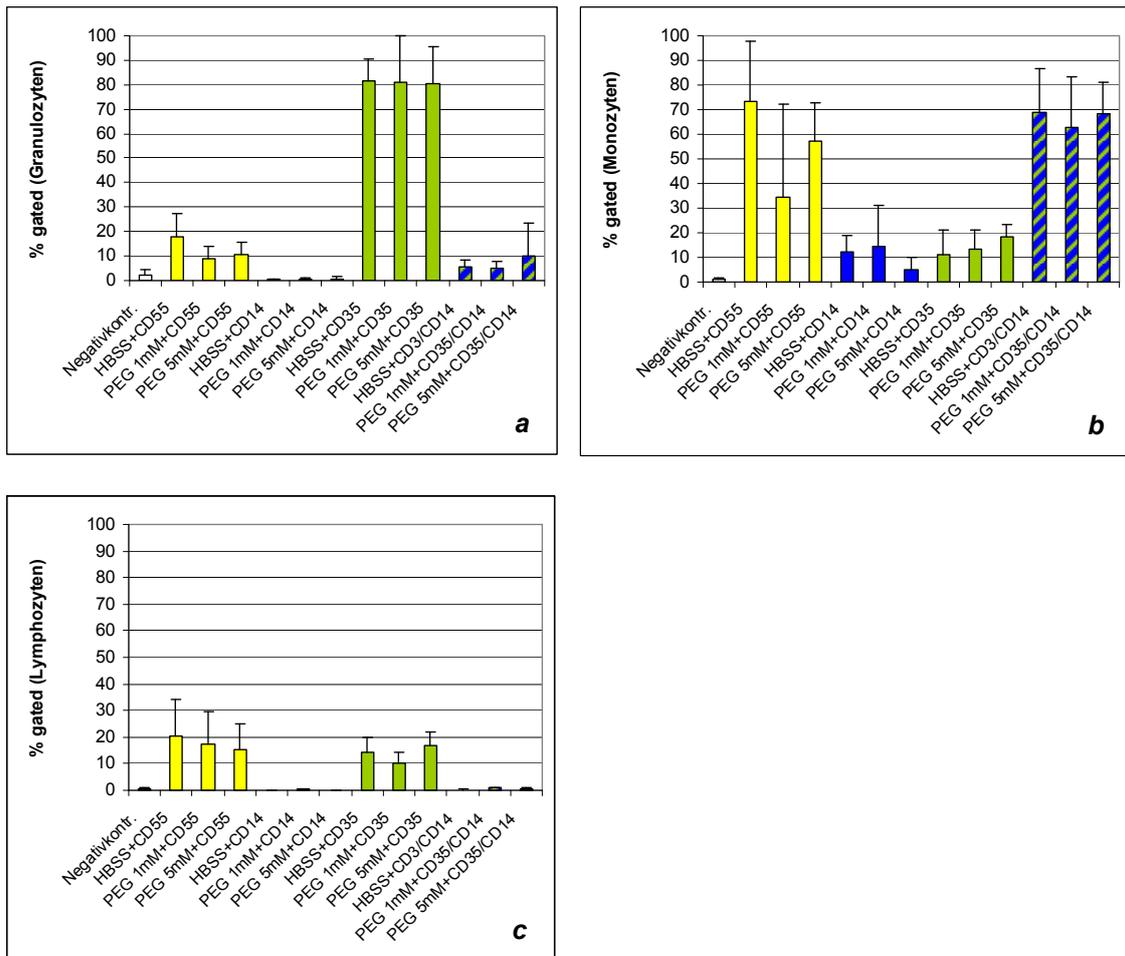


Abb. 39a-c: Expressionsdichte verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Granulozyten (a), Monozyten (b) und Lymphozyten (c) unter Einfluss von PEG-Liposomen

100 μ l heparinisiertes Vollblut wurden mit 100 μ l HBSS, PEG 1mM oder PEG 5mM, über 60 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C, anschließend für 15 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz-positiven Zellen relativ zur Gesamtpopulation (10.000 Zellen), Mittelwerte \pm SD, n = 3.

3.2.3.2. Einfluss von Leerliposomen unterschiedlicher Konzentration auf Toll-like Rezeptoren

Die Erkennung von mikrobiellen Bestandteilen durch TLRs führt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems, wodurch es zu inflammatorischen Reaktionen und schließlich der Ausbildung einer adaptierten Immunantwort kommt.

Da die TLRs an der Immunantwort beteiligt sind, war von Interesse, inwiefern diese auch durch Liposomen aktiviert werden können.

Die Oberflächenexpression von TLR2 und TLR4 lag bei den folgenden Versuchen jeweils unter 1% der „gegateten“ Lymphozyten. Daher wird bei 3.2.3.2.1. und 3.2.3.2.2. jeweils nur auf Granulozyten und Monozyten eingegangen.

3.2.3.2.1. Einfluss von Leerliposomen auf TLR2

Bezüglich der Expression von TLR2 sind Unterschiede in Mensch und Maus zu verzeichnen. Humanes TLR2-Protein wird hauptsächlich auf peripheren Blutleukozyten exprimiert und kommt in Geweben wie Milz und Lunge vor. In der Maus dagegen wird TLR2 in Lunge, Milz, Thymus und Gehirn exprimiert, nicht oder nur gering aber im Blut. Diese Untersuchungen wurden daher nur in humanem Blut durchgeführt (Abb. 40).

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich bei Inkubation mit LPS eine Hochregulation von TLR2 durch Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 1 (LPS 1), wobei die Anzahl der Fluoreszenz-positiven Granulozyten um ca. 40%, die der Monozyten um ca. 50% zunahm. Durch eine Inkubation mit Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota* (LPS 2) nahmen die Granulozyten um ca. 25% zu, bei den Monozyten kam es zu keiner Veränderung. Durch eine Inkubation mit Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 2 (LPS 3) kam es weder auf Granulozyten noch auf Monozyten zu einer Änderung der TLR2-Präsentation (Abb. 40, student-t Test $p < 0,05$).

EPC führte lediglich in einer Dosierung von 5mM zu einer minimalen Hochregulation der Granulozyten um ca. 20% (student-t-Test statistisch nicht signifikant).

Durch EPG-Liposomen der Konzentration 1mM kam es zu einer Zunahme der TLR2-Expression der Granulozyten um ca. 60%, bei den Monozyten kam es im Vergleich zur Negativkontrolle dahingegen zu einer Reduktion von TLR2 um 65% (Abb. 40, student-t-Test $p < 0,05$). Bei 5 millimolarer EPG-Konzentration

stieg die TLR2-Expression der Granulozyten nur leicht um ca. 30% (statistisch nicht signifikant), auf den Monozyten gab es keine Veränderung.

Eine Inkubation mit PEG-Liposomen führte zu einer deutlichen Herunterregulation von TLR2, sowohl auf Granulozyten als auch auf Monozyten, welche bei steigender Liposomenkonzentration zunahm (Abb. 40, student-t-Test $p < 0,05$). Die Fluoreszenz positiven Granulozyten nahmen durch Inkubation mit 1 millimolaren PEG-Liposomen um ca. 50% ab, durch Inkubation mit 5 millimolaren PEG-Liposomen um ca. 75%. Bei den Monozyten kam es durch die Inkubation mit 1 millimolaren PEG-Liposomen zu einer Reduktion der TLR2 Expression um ca. 15% (statistisch nicht signifikant), nach Inkubation mit 5 millimolaren PEG-Liposomen um ca. 55% (Abb. 40, student-t-Test $p < 0,05$).

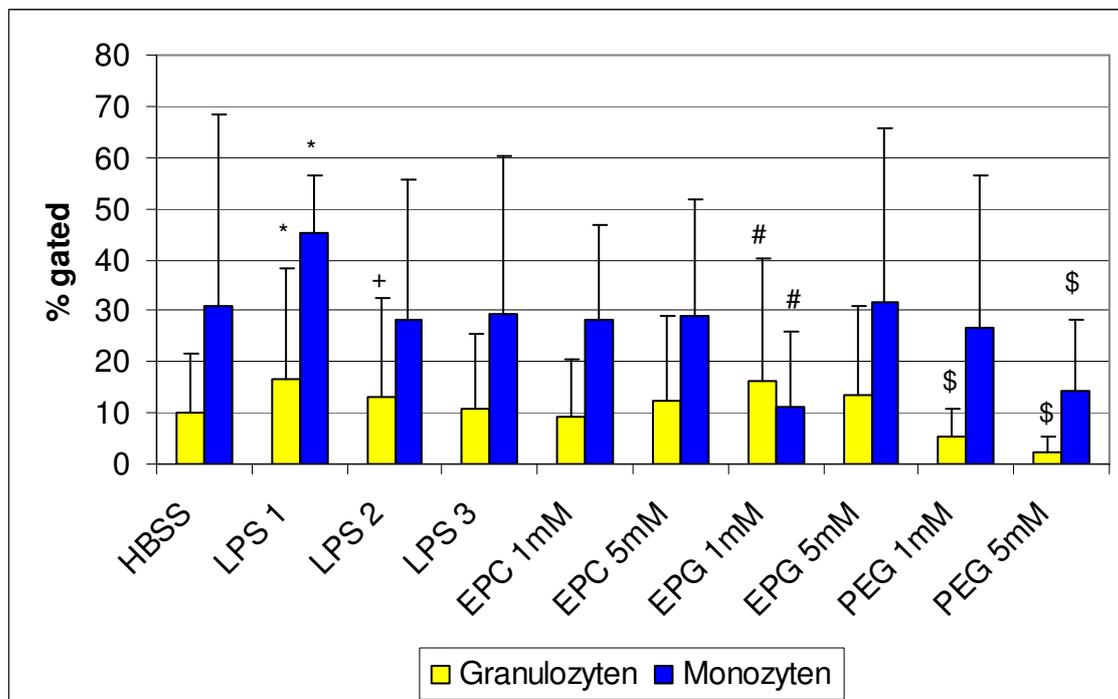


Abb. 40: Einfluss von Leerliposomen auf TLR2

100 μ l heparinisieretes Vollblut wurden mit 100 μ l HBSS, LPS 1 (Lipopolysaccharid von *Escherichia coli*1), LPS 2 (Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota*), LPS 3 (Lipopolysaccharid von *Escherichia coli*2) oder Liposomen (EPC, EPG, PEG 1 und 5 mM) über 60 Minuten bei 37 $^{\circ}$ C, anschließend für 15 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz-positiven Zellen relativ zur Gesamtpopulation (10.000 Zellen), Mittelwerte \pm SD, n = 3. Student-t-Test * $p < 0,05$ LPS1 vs. HBSS; + $p < 0,05$ LPS2 vs. HBSS; # $p < 0,05$ EPG 1mM vs. HBSS; \$ $p < 0,05$ PEG vs. HBSS.

3.2.3.2.2. Einfluss von Leerliposomen auf TLR4

Im Menschen wie in der Maus wird TLR4 hauptsächlich auf myeloischen Zellen exprimiert. Im Menschen wird TLR4 neben myeloischen Zellen noch auf Endothelzellen und B-Zellen exprimiert und ist vorwiegend im peripheren Blut vorhanden.

Wie in Abbildung 41 dargestellt, änderte sich die Expression von TLR4 auf Granulozyten und Monozyten durch Inkubation mit Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 1 (LPS 1) und *Salmonella minnesota* (LPS 2) im Vergleich zur Negativkontrolle nicht.

Eine Inkubation mit Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 2 (LPS 3) führte dahingegen zu einer Herunterregulation von TLR4 auf Granulozyten (ca. 60%) und auf Monozyten (ca. 55%) (Abb. 41, student-t-Test $p < 0,05$).

Durch EPC-Liposomen scheint es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme TLR4 positiver Granulozyten (um ca. 50% bei 1 millimolarer Konzentration und ca. 200% bei 5 millimolarer Konzentration) zu kommen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen in unserem Versuchsaufbau zeigte sich dies allerdings statistisch nicht signifikant. Auf Monozyten kam es durch eine Inkubation mit EPC 1mM zu einer signifikanten Abnahme der TLR4 exprimierenden Zellen um ca. 80%, mit EPC 5mM allerdings nur um ca. 40% (Abb. 41 student-t-Test $p < 0,05$).

Eine Inkubation mit EPG-Liposomen führte bei 1 millimolarer Konzentration lediglich zu einer Reduktion der TLR4 positiven Granulozyten um ca. 40%, eine 5 millimolare EPG-Konzentration hatte keinen Einfluss auf TLR4 positive Granulozyten. Auf Monozyten kam es durch EPG-Liposomen in 1 millimolarer Konzentration zu einer minimalen Herunterregulation um ca. 40% analog der Granulozyten. In einer 5 millimolaren Konzentration hatte EPG auf Monozyten analog der Granulozyten keinen Einfluss auf die TLR4-Expression.

Auf Granulozyten und Monozyten kam es nur zu einer signifikanten Herunterregulation von TLR4 bei Einsatz von 5mM PEG, ca. 38% auf Granulozyten und ca. 75 % auf Monozyten (siehe Abb.41, student-t-Test $p < 0,05$).

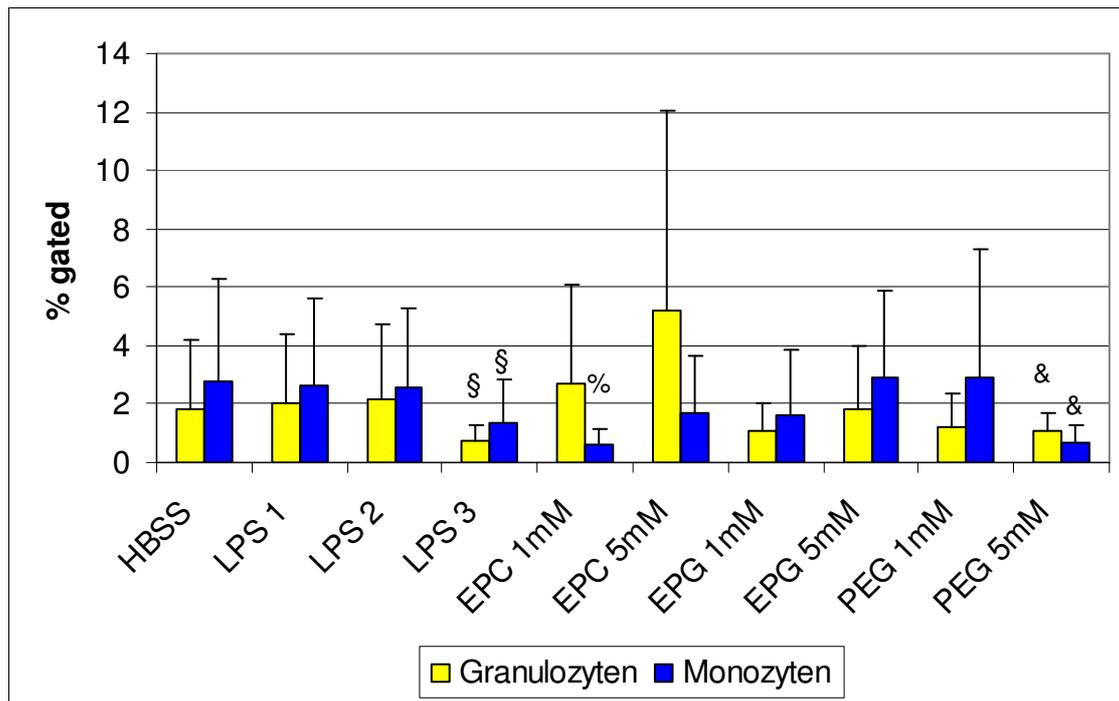


Abb. 41: Einfluss von Leerliposomen auf TLR4

100 µl heparinisieretes Vollblut wurden mit 100 µl HBSS, LPS 1 (Lipopolysaccharid von *Escherichia coli*1), LPS 2 (Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota*), LPS 3 (Lipopolysaccharid von *Escherichia coli*2) oder Liposomen (EPC, EPG, PEG 1 und 5 mM) über 60 Minuten bei 37 °C, anschließend für 15 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei 4 °C inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz-positiven Zellen relativ zur Gesamtpopulation (10.000 Zellen), Mittelwerte ± SD, n = 3. Student-t-Test § p<0,05 LPS3 vs. HBSS; % p<0,05 EPC 1 mM vs. HBSS; & p<0,05 PEG 5mM vs. HBSS.

4. DISKUSSION

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse zum Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen auf die Komplementaktivität im murinen und humanen System diskutiert.

Am Ende des Kapitels werden die einzelnen Liposomenformulierungen bezüglich ihrer Komplementaktivität miteinander verglichen. Mit dem Ziel, Liposomen als Arzneimittelträger auch zur Therapie der septischen Granulomatose in Patienten einzusetzen, wird abschließend die Frage diskutiert, ob die Maus-Modelle mit dem humanen System vergleichbar sind.

4.1. Aktivierung des Komplementsystems durch Liposomen

Wie in der Einleitung unter 1.4. beschrieben, ist eine Interaktion von Liposomen mit dem Komplementsystem bekannt. In den folgenden Kapiteln wird nun speziell auf die Interaktion der von uns verwendeten Liposomenformulierungen mit den von uns untersuchten Komplementkomponenten eingegangen.

4.1.1. Einfluss verschiedener Liposomenformulierungen auf die Aktivität des murinen Gesamtkomplements *in vitro* und *in vivo*

Zusammenfassend zeigte sich im murinen System bei den *in-vitro*-Versuchen eine Steigerung der Aktivität des Gesamtkomplements durch EPC- und EPG-Liposomen, und, allerdings in geringerem Maße, auch durch PEG-Liposomen. Ebenso zeigte sich bei den *in-vivo*-Versuchen unter der Verwendung von Glucose-Oxidase-Liposomen (d.h. also im aktivierten Zustand (\Rightarrow H_2O_2)), da *in vivo* Glucose vorhanden ist, eine gesteigerte Aktivität des Gesamtkomplements. Allerdings konnten in den *in-vivo*-Versuchen keine gesteigerte Expression der untersuchten Komplementrezeptoren gesehen werden. Diese Ergebnisse werden nun in den folgenden Unterkapiteln genauer erörtert.

4.1.1.1. Beeinflussung des murinen Komplementsystems *in vitro* durch verschiedene Leerliposomen (EPC-, EPG- und PEG-Liposomen)

Bei unseren *in-vitro*-Versuchen im murinen System zeigte sich eine Aktivierung des Komplementsystems durch alle Liposomenformulierungen, welche sich allerdings in der Aktivierungsintensität unterschieden.

Nach Zugabe von EPC-Liposomen stieg die Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System deutlich an, was im Wesentlichen von der Konzentration der zugegeben Liposomen abhing, da sich bei höherer Konzentration eine erhöhte Gesamtaktivität zeigte.

Auch beim Einsatz von EPG-Liposomen konnte eine Aktivitätssteigerung des Komplements festgestellt werden, welche allerdings von einer gewissen Ausgangskonzentration der Komplementfaktoren abhing.

Nach Zugabe von PEG-Liposomen kam es im Vergleich zur Negativkontrolle nur zu inhomogenen Alterationen der Komplementaktivierung völlig unabhängig von Liposomen-oder Komplementmengen. Hier ist es durchaus möglich, dass diese Effekte sehr gering sind und letztlich z.T. auch auf Messartefakten unseres *in-vitro*-Versuchs beruhen. Dies könnte bedeuten, dass PEG-Liposomen weniger komplementaktiv sind als v.a. EPC-, und auch EPG-Liposomen. Verantwortlich hierfür könnte der im Vergleich zu EPC- bzw. EPG-Liposomen höhere Cholesterinanteil der PEG-Liposomen sein.

Wie bereits von Ishida et al. (2001) beschrieben wurde, ist bekannt, dass sich die Aktivierung des Komplementsystems via dem klassischen oder dem alternativem Weg bei der Ratte, je nach Anteil des Cholesteringehaltes der Liposomen, unterscheidet. Liposomen mit niedrigerem Cholesteringehalt aktivieren das Komplementsystem über den klassischen, solche mit höherem Cholesteringehalt bevorzugt über den alternativen Weg. Zu beachten ist hierbei zudem, dass insbesondere beim Mausekomplement der klassische Weg bekanntermaßen sehr instabil ist (Lachmann, 2010).

Polyethylenglycol-Lipide, im Allgemeinen als „Stealth Lipide“ bezeichnet (Srinath und Diwan, 1994), sind Liposomen, welche länger im Blutkreislauf zirkulieren und damit der Erkennung des RES ausweichen. „Stealth“ ist ein

geschützter Begriff der Liposome Technology Inc, Menlo Park, CA, USA (Blume und Cevc, 1990). Dies erklärt die geringere Komplementaktivität der von uns verwendeten PEG-Liposomen. Somit sind unsere Ergebnisse bezüglich der von uns verwendeten Liposomen vereinbar mit den in der Literatur bereits beschriebenen Eigenschaften von Liposomen.

4.1.1.2. Beeinflussung des murinen Komplementsystems *in vivo* durch Infektionserreger und Glucose-Oxidase-Liposomen

Wie in einer Untersuchung von Gerber et al. (Blood 2001) gezeigt wurde, konnten NADPH-Oxidase-defiziente Phagozyten nach Aufnahme Glucose-Oxidase-haltiger Liposomen HOCl-Mengen produzieren, welche denen normaler Phagozyten entsprachen. Des Weiteren konnten sie nach GOL-Behandlung *Staphylococcus aureus* genauso effizient abtöten wie normale Granulozyten. Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchten wir auch Glucose-Oxidase-haltige Liposomen.

Die *in-vivo*-Versuche müssen im Vergleich zu den *in-vitro*-Versuchen aufgrund der im Folgenden erläuterten Gründe unterschiedlich bewertet werden.

Zum Einen korreliert die Anzahl lysierter Erythrozyten bei den *in-vitro*-Versuchen direkt mit der Aktivität des Komplements, d.h. eine hohe Anzahl lysierter Erythrozyten entspricht einer hohen Komplement-Aktivierung.

Bei den *in-vivo*-Versuchen kommt es dahingegen durch eine Aktivierung des Komplementsystems in der Maus zu einem Verbrauch an Komplementfaktoren, somit ist bei einer späteren Untersuchung des Serums eine niedrigere Menge an Restkomplement vorhanden, wodurch die Lyse geringer ausfällt. Eine niedrige Anzahl lysierter Erythrozyten entspricht daher einer hohen Aktivierung des Komplementsystems.

Zum Anderen wurden bei den *in-vivo*-Versuchen EPC:EPG:Chol.-Liposomen mit GO verwendet, da diese Liposomen für eine eventuelle Anwendung *in vivo* vorgesehen sind.

Einfluss von Infektionserregern auf das Komplementsystem

Wie sich in den Vorversuchen zeigte, wurde das Komplementsystem auch allein durch eine Infektion mit verschiedenen Erregern aktiviert.

Insgesamt ist *Staphylococcus aureus* der häufigste Infektionserreger bei CGD-Patienten, welcher typischerweise mit Haut-, Lymphknoten-, Leber-, oder Knochenabszessen assoziiert ist (Dinauer, 1998; Winkelstein et al., 2000). Ein weiterer häufiger Erreger ist *Burkholderia cepacia*, welcher oft Bakteriämien oder Sepsen verursacht, oft auch im Rahmen von Lungenentzündungen (Zelazny et al., 2009; Lynch et al., 2010).

Obwohl wir in unseren *in-vivo*-Versuchen zur Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System auf *Staphylococcus aureus* als Infektionserreger fokussierten, wurde in einem Vorversuch auch *Burkholderia cepacia* verwendet.

In einer Arbeit von Dinauer et al. (2001) zeigte sich, dass, um eine ausreichende Immunantwort nach Infektion mit *Staph. aureus* oder *Burkholderia cepacia* zu erreichen, eine wesentlich höhere Anzahl an Nitroblau Tetrazolium (NBT)-positiven Phagozyten (Granulozyten) notwendig ist als nach Infektion mit *Aspergillus fumigatus*. Allerdings wurde dort auf eine quantitative Unterscheidung zwischen den beiden verschiedenen bakteriellen Erregern ebenfalls nicht näher eingegangen. Unterschiede zwischen verschiedenen Erregern werden aber auch von Zelazny et al. (2009) beschrieben.

Einfluss von GO-Liposomen auf das Komplementsystem

Ein weiteres Ergebnis unserer *in-vivo*-Vorversuche war, dass das Komplementsystem auch durch eine alleinige Gabe von Glucose-Oxidase-Liposomen aktiviert wurde. Dies lässt sich daraus schließen, dass es sowohl in nicht infizierten Wildtyp-Mäusen als auch in CGD-Mäusen nach einmaliger GOL-Gabe zu einer Abnahme der Erythrozytenlyse, d.h. zu einer Aktivierung mit Verbrauch des Komplements *in vivo* kam.

Wurden nun infizierte Tiere mit GOL behandelt, kam es bei verschiedenen Infektionserregern zu einer unterschiedlichen Reaktion auf Glucose-Oxidase-haltige Liposomen.

Bei mit *Burkholderia cepacia* infizierten CGD-Mäusen kam es nach einmaliger GOL-Gabe ebenfalls zu einer Aktivierung des Komplementsystems.

Im Gegensatz hierzu fiel die Komplementaktivierung bei mit *Staphylococcus aureus* infizierten CGD-Mäusen, welche dreimalig GO-Liposomen erhielten, geringer aus.

Somit zeigt sich bei CGD Tieren mit *Staphylococcus aureus* Infektion eine deutlich geringere Komplementaktivierung durch eine GOL-Gabe als bei einer Infektion mit *Burkholderia cepacia*.

Dies könnte zum einen daran liegen, dass es durch eine mehrmalige GOL-Gabe zu einer effektiveren Immunreaktion mit geringerem Komplementverbrauch kam, zum anderen könnten aber die unterschiedliche Komplementaktivität auch durch die verschiedenen Erreger bedingt sein.

Ein klärender Vergleich der Komplement-Reaktionen nach GOL-Behandlung zwischen den mit *Staphylococcus aureus* und *Burkholderia cepacia* infizierten CGD-Mäusen war im Rahmen der Vorversuche leider nicht möglich, da nicht genug Serum zur vollständigen Durchführung der notwendigen Messungen zur Verfügung stand. Auf die Reaktionen nach mehrfacher Liposomen-Gabe wird im nachfolgenden Kapitel noch weiter eingegangen.

Zusammenfassend ergaben sich in den Vorversuchen somit Hinweise darauf, dass das Komplementsystem sowohl durch Infektionserreger als auch durch eine Gabe Glucose-Oxidase-haltiger Liposomen aktiviert wurde.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden weitere Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde die Wirkung Glucose-Oxidase haltiger EPG-Liposomen im zeitlichen Verlauf in gesunden Wildtyp-Mäusen untersucht.

Hier zeigte sich, dass es durch Gabe von GOL zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit daraus folgendem Verbrauch von Komplementfaktoren kommt. Diese ist in Bezug auf die zeitliche Entwicklung dosisabhängig, d.h. bei höherer GOL-Dosis kommt es zu einer rascheren Aktivierung. Im zeitlichen Verlauf gleicht sich die Aktivität von verbrauchtem und neu gebildetem Komplement bei beiden GOL-Dosen nahezu aus, so dass es zu

einem nur geringfügigen Mehrverbrauch an Komplement bei höherer Dosis kommt.

In weiteren Infektionsversuchen blieb eine GOL-Gabe in mit *Staph. aureus* infizierten Wildtyp-Mäusen und nicht-infizierten CGD-Mäusen ohne großen Einfluss auf die Komplementaktivität. Dahingegen kam es in mit *Staph. aureus* infizierten CGD-Mäusen nach GOL-Gabe im Vergleich zu nicht behandelten, aber infizierten Mäusen, zu einem deutlichen Abfall lysierter Erythrozyten, was auf einen ausgeprägten Verbrauch an Komplementfaktoren hindeutet.

Der hier gesehene gesteigerte Einfluss von GOL auf infizierte CGD-Mäuse im Vergleich zu den Referenzgruppen lässt auf eine Potenzierung der Effekte durch die Kombination von Infektion und GOL-Gabe in CGD-Mäusen schließen.

Nach dreimaliger GOL-Gabe zeigte sich bei nicht infizierten Tieren (sowohl Wildtyp als auch CGD) eine sehr niedrige Erythrozytenlyse. Lediglich bei infizierten Wildtyp-Tieren kam es durch eine GOL-Gabe zu einer Abnahme der Komplementaktivität. Da sich das Komplementsystem aus einer Vielzahl von interagierenden Serumproteinen zusammensetzt, welche einer ständigen Synthese und folgendem Katabolismus unterliegen, resultiert ein rascher Metabolismus *in vivo* (Oppermann et al., 1992). Es kann also nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es möglicherweise bereits vor dem Tiefkühlen zu einer Komplementaktivierung kam.

Insgesamt konnte aber die bei den *in-vitro*-Versuchen durch die verschiedenen Liposomenformulierungen induzierte Komplementaktivierung, in den *in-vivo*-Versuchen auch durch eine Gabe GOL-haltiger Liposomen, bestätigt werden.

4.1.2. Einfluss von Liposomen auf murine Komplementrezeptoren *in vivo*

Mit Hilfe von FACS-Messungen wurde der Einfluss von EPC-EPG-Chol.-Liposomen mit Glucose Oxidase auf einzelne Komplementrezeptoren untersucht.

CD11b und CD18

CD11b und CD18 sind Untereinheiten des Integrins CR3, (Mac-1). Diese Subfamillie der Integrine besteht aus einer gemeinsamen β_2 -Kette (CD18-

Antigen) und einer der drei entsprechenden, unterschiedlichen α -Untereinheiten CD11a / CD11b / CD11c (Inghirami et al., 1988; Springer, 1990; Mochizuki et al., 2010). Die β_2 -Integrine sind wichtige Mediatoren der Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel (Springer, 1994). CD18 kommt nur auf Leukozyten vor. CD11b kommt auf aktivierten Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und einem Teil der natürlichen Killerzellen) vor und bildet mit CD18 den CD11b/CD18-Komplex. Eine entzündungsbedingte Aktivierung neutrophiler Granulozyten führt zu einer raschen Expression von CD11b/CD18 (Kishimoto et al., 1989; Borjesson et al., 2002).

In unseren Versuchen mit *Staph. aureus* nahm in Wildtyp-Mäusen die Zahl CD18-exprimierender Granulozyten nach Infektion zu, wohingegen die Zahl doppelt positiver Zellen abfiel. Im Gegensatz hierzu, aber im Einklang mit den Ergebnissen von Borjesson et al., (2002), zeigte sich in infizierten CGD-Mäusen eine Abnahme CD18-exprimierender Granulozyten, bei einer Zunahme CD11b/CD18 doppelt positiver Zellen.

Die unterschiedliche Reaktion bei Wildtyp- und CGD-Mäusen auf eine Infektion könnte durch unterschiedliche Aktivierungskinetiken in gesunden und kranken Tieren erklärt werden. Bereits Borjesson et al. beschrieben 2002 eine unterschiedliche Expressionskinetik von CD11b/CD18 in Wildtyp-Mäusen und den in ihren Versuchen verwendeten Interferon-gamma-defizienten Mäusen.

Durch eine Gabe von GO-Liposomen kam es sowohl bei Granulozyten als auch bei Lymphozyten zu einem Liposomen-induzierten Abfall CD18 exprimierender Zellen.

Nicht eindeutig lässt sich dahingegen der liposomale Einfluss auf doppelt positive Zellen darlegen, da die Reaktion bei zusätzlicher Infektion unterschiedlich ausfällt. Bei fehlender Infektion kam es durch eine GOL-Gabe zu einer Hochregulation von CD11b/CD18, lag aber eine Infektion mit *Staph. aureus* vor, kam es zu einer Herunterregulation an CD11b/CD18 positiven Zellen. Dies könnte daran liegen, dass es im Falle der Infektion zu vermehrtem Anstieg an anderen Integrin-Heterodimeren kam. CD11b/CD18 kommt auf Eosinophilen in einem konformativen Stadium vor, welches wesentlich weniger aktiv ist als andere Integrine, z.B. CD49d/29 (Barthel et al., 2008). Ebenso

beschrieben Ishida et al. (2002) eine unter bestimmten pathologischen Bedingungen geänderte Clearance-Rate der Liposomen, wie auch eine Änderung des Ortes der Clearance durch Aktivitätsänderungen von Oponinen und Phagozytose.

Durch mehrmalige GOL-Gaben an aufeinanderfolgenden Tagen konnten die Ergebnisse der Versuche mit nur einmaliger Gabe insgesamt nicht bestätigt werden. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Zum Einen wurden in der Literatur bereits ebenfalls unterschiedliche Reaktionen auf mehrfache Liposomengaben dargestellt. Dams et al. (2000) beschrieben eine signifikante Veränderung der Pharmakokinetik bei repetitiver Liposomen-Gabe (PEGylierte Liposomen), abhängig von der Applikationszeit und -häufigkeit. 4 Stunden nach der zweiten Applikation war der Serumgehalt deutlich erniedrigt. Dieses Phänomen wurde bislang sowohl in Ratten als auch in Rhesusaffen gezeigt. Lavermann et al. (2001 b) beschrieben denselben Effekt auf eine Gabe PEGylierter Liposomen, auch wenn die Liposomen der initialen Injektion kein PEG enthielten. Als ursächlich wird hierfür ein löslicher Serumfaktor, mutmaßlich eines der Oponine, welches bei der ersten Liposomengabe induziert wurde, angenommen. Eine unterschiedliche Reaktion auf eine repetitive Liposomen-Gabe zeigte sich bereits ebenfalls in den oben beschriebenen Versuchen zur „Beeinflussung des murinen Komplementsystems *in vivo* durch Infektionserreger und Glucose-Oxidase-Liposomen“.

Zum Anderen wurde das Blut aufgrund der mehrfach Applikationen später im Verlauf entnommen als bei einmaliger Gabe. Da das Komplementsystem mit seinen einzelnen Komponenten insgesamt instabil ist und schnell reagiert, könnte dies für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein.

CD21/CD35

Die Gene, welche für die Komplementrezeptoren CD21 und CD35 kodieren, sind ungleich dem humanen System nicht unabhängig, sondern entstehen in der Maus durch Splicen des mRNA transkribierten Cr2-Genes (Kurtz et al., 1990). In der Maus werden CD21 und CD35 auf der Mehrheit von peripheren B-Lymphozyten, den ortsständigen peritonealen Makrophagen und folliculären

dentritischen Zellen exprimiert (Kinoshita et al., 1988; Yoshida et al., 1993). CD21 ist eine Liganden-bindende Komponente des CD19/CD21/CD81 Signalvermittlungs-Komplexes, welcher mit Antigen-Rezeptoren auf B-Lymphozyten assoziiert ist (Tedder et al., 2005; Zabel et al., 2007).

Die Expression des Komplementrezeptors CD21/35 begünstigt eine optimale Antikörper-Reaktion auf T-Zell-unabhängige Typ 2-Antigene (Ochsenbein et al., 1999; Haas et al., 2002; Pozdnyakova et al., 2003; Szomolanyi-Tsuda et al., 2006). Haas et al. (2002) beschrieben zudem einen C3-unabhängigen Mechanismus, mittels welchem unter anderem CD21/35 die humorale Immunantwort gegenüber starken T-Zell unabhängigen Typ 2 Antigenen reguliert. Die CD21/35 Expression wird unter anderem durch den B-Zell-aktivierenden Faktor der Tumornekrosefaktor-Familie reguliert (Gorelik et al., 2004).

In unseren Infektionsversuchen mit *Staph. aureus* kam es durch eine GOL-Gabe zu keiner Aktivierung von CD21/35.

Analog dem bereits dargestellten CD11b/CD18-Antikörper konnten durch mehrmalige GOL-Gaben an aufeinanderfolgenden Tagen die Ergebnisse der Versuche mit nur einmaliger Gabe nicht sicher bestätigt werden. Mögliche Gründe wurden bereits oben erörtert.

Jacobson et al. (2007) zeigten aber, dass CD21/35-defiziente Mäuse zwar weniger *Borrelia burgdorferi* Antigene erkennen können, aber dennoch *Borrelia burgdorferi*-spezifische Antikörper bilden. Im Krankheitsverlauf zeigte sich kein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen, somit scheinen die produzierten Antikörper auszureichen, um den Krankheitsverlauf zu kontrollieren. Daher kann die fehlende Hochregulation von CD21/35 durch eine Infektion, wie in dieser Arbeit beobachtet, am ehesten durch eine kompensatorische Rolle der Antikörper zum Schutz gegen bakterielle Infekte erklärt werden. IgG 3 ist das in der Maus hauptsächlich produzierte IgG als Immunantwort auf T-Zell-unabhängige Typ 2 Antigene, wie beispielsweise Pneumokokken-Polysaccharide. Dahingegen werden Staphylokokken auch durch TLR2 (Fournier und Philpott, 2005) und Nucleotid Oligodimerisation Domain 2 (Nod2) erkannt (Müller-Anstett et al., 2010). Komplementproteine spielen möglicherweise eine wichtigere Rolle bei

der Immunantwort gegenüber anderen Erregern, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* (Jacobson et al., 2007).

Die Versuche zur Wirkung von Liposomen auf murine Komplementrezeptoren stehen möglicherweise auch unter dem Einfluss der Glucose-Oxidase, die in den Liposomen verkapselt war. Da davon ausgegangen werden kann, dass keine GO in der Membran der Liposomen vorhanden war und auch das gebildete H_2O_2 sofort abgebaut wird (siehe Gerber et al., 2001) wird der Einfluss der GO als vernachlässigbar angesehen.

4.1.3. Einfluss von Leerliposomen mit verschiedenen Formulierungen auf die Aktivität des humanen Gesamtkomplements

In unseren Versuchen zur Aktivität des humanen Gesamtkomplements zeigte sich bei Verwendung von EPC-Liposomen erst bei Verwendung einer höheren Konzentration [5 mM] eine Aktivierung des Komplementsystems.

Umgekehrt verlief die Reaktion nach Zugabe von EPG-Liposomen. Hier wurde das Komplementsystem nur bei Zugabe einer niedrigen [1 mM] Liposomenkonzentration aktiviert.

Bei Verwendung von PEG-Liposomen bestätigten sich die Ergebnisse, welche sich im murinen System ergaben: PEG-Liposomen sind weniger komplementaktiv als EPC- und EPG-Liposomen. Szebeni et al. (1997) untersuchten die Aktivierung des humanen Komplementsystems durch Liposomen und Liposomen-verkapseltes Hämoglobin durch Messung verschiedener Marker, unter anderem mittels des complement hemolytic 50%-Assay. Sie fanden signifikante Änderungen in einem oder mehreren Komponenten des Komplementsystems. Diesen Effekt schrieben sie in erster Linie den Phospholipid-Trägermolekülen zu, wobei kleine unilamellare, homodisperse Vesikel die stärkste Komplementaktivierung nach sich zogen. In die Reaktion kann sowohl der klassische als auch der alternative Weg des Komplementsystems involviert sein (Szebeni und Alving, 1999).

Somit bestätigte sich in unseren Versuchen die von Szebeni bereits beschriebene Aktivierung des Komplementsystems durch Liposomen.

Die Aktivierung der Komplementkomponente C3 ist ein zentraler Schritt der drei Aktivierungswege des Komplementsystems und führt zu Entzündungsreaktionen und zur Elimination von körpereigenen und –fremden Angriffszielen. C3c ist das bedeutendste proteolytische Fragment von C3 (Janssen et al., 2005). Darüber hinaus gibt es zunehmend Hinweise auf die Beteiligung der Komplementkomponente C3 bei der Etablierung der erworbenen Immunität, welche eine komplexe Rolle spielt und auf verschiedenen Ebenen agiert (Villiers et al., 2008).

Das Komplement Protein C4 ist eine nicht-enzymatische Komponente der C3- und C5 Konvertasen und damit wesentlich für die Übertragung des klassischen Wegs des Komplementsystems. Die kovalente Bindung von C4 an Immunglobuline und Immunkomplexe verstärkt ebenfalls die Opsonierung von Immunaggregaten und die Clearance der Immunkomplexe über den Komplementrezeptor CR1 auf Erythrozyten. Humanes C4 ist das polymorphste Protein des Komplementsystems (Blanchong et al., 2001).

In unseren *in-vitro*-Versuchen im humanen System konnte in Bezug auf den Verbrauch der Komplementfaktoren C3c oder C4 keine Aktivierung des Komplementsystems durch die verwendeten Liposomenformulierungen nachgewiesen werden. Aufgrund der bislang erzielten Ergebnisse, welche eine Aktivierung des Komplementsystems durch die Liposomen zeigen, hätten wir hier ebenfalls eine Aktivierung des Komplementsystems durch die verwendeten Liposomen erwartet. Zudem wurde dies bereits in der Literatur so beschrieben.

Ishida et al. (2000) zeigten in einer Untersuchung in Ratten über die örtliche Verteilung von Liposomen mit zwei verschiedenen Phospholipiden (hydrogeniertes Ei-Phosphatidylcholin und Ei-Phosphatidylcholin) und Cholesterol, dass der Cholesterol-Gehalt für die Eliminierung der Liposomen verantwortlich war und dass die Menge an gebundenen C3-Fragmenten dem Cholesterolgehalt der Liposomen direkt proportional war. Daher gingen sie von einer Eliminierung der Liposomen durch das Komplementsystem, vor allem durch Opsonisierung durch C3-Fragmente, aus. Durch Ersetzen von Cholesterol durch Cholesteryl-Methyl-Ether verringerte sich die Bindung von C3-Fragmenten. Des Weiteren berichteten Huong et al. (2001) über eine

verstärkte Clearance von Phosphatidylserin-haltigen Liposomen durch C3-Fragmente in Meerschweinchen und Ratten durch die Aktivität des Phosphatidylserins.

Insgesamt sind die von uns erzielten Ergebnisse in diesem Versuch weder passend zum Gesamtbild der bislang erzielten Ergebnisse noch im Einklang mit der Literatur. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Konzentrationsunterschiede zu gering waren, um sie mit dem verwendeten Testsystem zu erfassen, es möglicherweise durch das Einfrieren und Auftauen bei der Probenvorbereitung zu einer Reaktion kam oder die Zeitdauer zwischen der Probenbearbeitung und der Messung während der eigentlichen Versuchsdurchführung zu lange gedauert hat.

4.1.4. Einfluss von Leerliposomen auf humane Komplementrezeptoren

Mit Hilfe von FACS-Messungen wurde der Einfluss von Liposomen auf einzelne Komplementrezeptoren des humanen Systems untersucht.

CD11b/CD18

Wie bereits im murinen System beschrieben, bilden CD11b/Mac-1 und CD18 den CD11b/CD18-Komplex. CD11b/Mac-1 kommt auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und einem Teil der natürlichen Killerzellen vor. CD18 wird auf allen Blutzellen exprimiert. Die Bindung bestimmter Pathogene, welche mit humanen Komplementproteinen (z.B. iC3b) opsonisiert sind, an Komplementrezeptoren (CD11b oder C3) von peritonealen Ratten-Makrophagen ist bekannt (Sohn et al., 2003). Es ist ebenso bekannt, dass humanes Serum via CD11b(Mac-1)-Rezeptor die Erkennung von Dipalmitoylphosphatidylcholin enthaltende Liposomen durch Makrophagen stimulieren kann (Moghimi et al., 2006).

Takahashi et al. (2011) zeigten des Weiteren, dass eine Phagozytose liposomaler Partikel durch CD11b/c-positive Klasse II unreife Monozyten von Ratten, diese vorübergehend stark immunsupprimierte, aber die systemische Immunantwort unbeeinträchtigt ließ.

Die in unseren Versuchen verwendeten Liposomen (EPC, EPG und PEG) zeigten keinen Einfluss auf die Expression von CD11b und CD18.

Ähnlich wie im murinen System bereits vermutet wurde, dass es infektionsbedingt zu einem vermehrten Anstieg an anderen Integrin-Heterodimeren kam, könnte im humanen System eine fehlende Reaktion von CD11b/CD18 positiven Zellen durch eine Liposomen-Gabe ebenfalls mit einem eventuellen Anstieg anderer Integrin-Heterodimere zusammenhängen.

Gereinigte menschliche eosinophile Granulozyten exprimieren sieben Integrin-Heterodimere: $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/29), $\alpha 6\beta 1$ (CD49f/29), $\alpha M\beta 2$ (CD11b/18), $\alpha L\beta 2$ (CD11a/18), $\alpha X\beta 2$ (CD11c/18), $\alpha D\beta 2$ (CD11d/18), und $\alpha 4\beta 7$ (CD49d/ $\beta 7$), (Georas et al., 1993; Grayson et al., 1998; Tachimoto und Bochner, 2000).

Jedes Heterodimer interagiert mit einer spezifischen Gruppe an Bindungspartnern der extrazellulären Matrix oder einem Rezeptor auf anderen Zellen. Da jedes Integrin in mehreren verschiedenen Konformationen, unterschiedlichen Mengen und Clustern in der Plasmamembran präsentiert werden kann, ist das Verständnis der Funktion dieser Komplementintegrine schwierig (Humphries, 2004; Xiao et al., 2004).

CD14

Der verwendete CD14 Antikörper reagiert mit dem 53-55 kDa Glycylphosphatidylinositol-Einzelketten Glykoprotein, welches stark auf Monozyten exprimiert wird. CD14 spielt eine wichtige Rolle bei der Clearance apoptotischer Zellen (Devitt et al., 2003) und hat eine hohe Affinität gegenüber LPS und LBP. Eine Überstimulation von CD14 durch LPS kann zum oftmals fatalen toxischen Schocksyndrom führen (Devitt et al., 1998).

In unseren Versuchen zeigte sich eine verminderte Expression von CD14 auf Monozyten durch die von uns verwendeten Liposomenformulierungen, insbesondere nach Zugabe von EPC-Liposomen. Dies ist mit den Ergebnissen von Gille et al. (2007) vereinbar, in welchen er über eine verminderte Expression von CD14 auf Makrophagen berichtete, nachdem diese mit Surfactant (einem Phosphatidylglycerol der Glycerophospholipide) bzw. mit Dipalmitoylphosphatidylcholin und Palmitoyl-Myristoyl-Phosphatidylcholin in

Kontakt gebracht wurden. Dahingegen hatte ubiquitäres Phosphatidylcholin (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin) keinen Einfluss auf CD14. Sowohl unsere Ergebnisse, als auch die von Gille et al. sind daher mit der bekannten Fähigkeit von CD14 mit verschiedenen Phospholipiden zu interagieren, vereinbar (Yu et al., 1997; Wang et al., 1998; Wang und Munford, 1999; Sugiyama und Wright, 2001).

Allerdings lässt sich durch unsere Ergebnisse nicht darauf schließen, dass es durch Zugabe der von uns verwendeten Liposomenformulierung zu einer generellen Verringerung der Immunantwort kommt. Denn Moore et al. (2000) beschrieben, dass eine verminderte Expression von CD14 zwar zu einer verminderten Immunantwort gegenüber freiem LPS führt, wohingegen andere Rezeptoren, z.B. CD11b/CD18, in der Immunantwort gegenüber ganzen Bakterien aber eine verminderte CD14 Expression kompensieren können.

Des Weiteren ist auch eine gesteigerte Expression von CD14, CD54 und CD11b durch Inkubation der humanen Monozyten Zelllinie THP-1 mit 1,25(OH)₂D₃ alleine, oder mit einer zusätzlichen niedrigen Dosis an Surfactant Lipiden, ebenfalls bekannt (Kremlev und Phelps, 1997), diese konnte durch eine gleichzeitige Gabe von Lipiden blockiert werden.

CD35

CD35 wird auf Granulozyten, Monozyten, B-Zellen, einigen natürlichen Killerzellen und Erythrozyten exprimiert. Er ist ein Rezeptor für C3b und C4b und vermittelt dadurch die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Monozyten. Die Phagozytosekapazitäten der Granulozyten kann durch diesen Antikörper nicht eingeschränkt werden. Er reguliert die Aktivierung der Komplementkaskade durch Verhinderung der Bildung der Konvertasen des klassischen und des alternativen Wegs. Zudem ist er ein Co-Faktor für die Faktor-I-vermittelte Spaltung von C3b zu iC3b (Rochowiak und Niemir, 2010).

In unseren Versuchen zeigte sich eine verminderte Komplementaktivierung (durch Steigerung des inhibitorischen Kontrollproteins) durch EPC-Liposomen. Hierdurch bestätigte sich erneut eine Aktivierung des Komplementsystems durch Liposomen. Da es sich bei CD35 um ein „negatives“, also ein

inhibitorisches Kontrollprotein handelt, lässt sich auf eine generelle Aktivierung der Komplementbestandteile durch Liposomen schließen. In der Literatur wurden diesbezüglich noch keine Untersuchungen beschrieben.

CD35/CD14 doppelt positive Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten auf die verschiedenen Liposomen wie die CD35 positiven Zellen. Insgesamt ist die Interpretation bezüglich der CD35/CD14 doppelt positiven Zellen schwierig, da CD35, wie gerade beschrieben, zu den inhibitorischen Kontrollproteinen gehört und CD14, wie weiter oben bereits beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Clearance apoptotischer Zellen spielt, also immunaktivierend wirkt. Da dies bislang auch in der Literatur nicht beschrieben wurde, bleibt die genaue Konsequenz der Reaktion doppelt positiver Zellen bislang unklar.

CD55

CD55 (DAF) kommt auf hämatopoetischen und vielen nicht-hämatopoetischen Zellen vor. DAF spielt eine Rolle beim Schutz der Zellen gegenüber autologem Komplement und verhindert die weiterführenden Schritte der Komplementkaskade, indem er mit den C3- und C5 Konvertasen interferiert. (Kinoshita et al., 1985; Mold et al. 1990).

Aus den Ergebnissen unserer Versuche lässt sich schließen, dass CD55 im Vergleich zu PEG-Liposomen v.a. durch EPC und teilweise auch durch EPG-Liposomen hochreguliert wird, was zu einer stärkeren Hemmung des Komplementsystems führt.

Es ist bekannt, dass DAF, ein schwacher Regulator des alternativen Wegs des Komplementsystems bezüglich LPS-haltigen Liposomen, die Aktivierung des alternativen Wegs bezüglich phosphatidylethanolaminhaltiger Liposomen effektiv reguliert (Kraus et al., 1998). Diese Liposomen wurden bereits zuvor als Aktivatoren des alternativen Wegs des Komplementsystems beschrieben (Mold, 1989).

Ebenso kam DAF bei nicht aktivierenden Phosphatidylcholin-Membranen seiner Aufgabe, eine Komplementaktivierung durch Oberflächen zu verhindern, mit gleicher Effektivität nach (Kraus et al., 1998). Unsere Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebenen Resultate.

CD88

CD88 wird auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert. CD88 bindet C5a, die α -Kette des Komplementkomponents C5. C5a wird während der Komplementaktivierung von C5 abgespalten. Die Bindung von C5a an den C5a-Rezeptor (C5aR, CD88) auf Granulozyten hat eine Selektinausschüttung, eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemotaxis und Aktivierung der NADPH-Oxidase zur Folge (Morgan et al., 1993; Morelli et al., 1996).

Durch die in unseren Versuchen verwendeten EPC-, EPG-, und PEG-Liposomen wurde keine Änderung der Expressionsdichte von CD88 nachgewiesen.

Nach den bisherigen Ergebnissen hätten wir auch hier eine Hochregulation des Rezeptors und damit eine Aktivierung des Komplementsystems erwartet.

In der Literatur wurde mehrfach eine vermehrte Ausschüttung des Anaphylatoxins C5a durch Liposomen und andere lipidhaltige Nanopartikel beschrieben (Andersen et al., 2009; Szebeni et al., 2007). Allerdings wurde die Wirkung von Liposomen auf den Komplement-Rezeptor C5aR (CD88) selbst bislang nicht untersucht. Somit schließen wir aufgrund unserer Ergebnisse, dass die von uns untersuchten Liposomenformulierungen bezüglich des C5a-Rezeptors keine aktivierende Wirkung haben.

Szebeni beschrieb 1998 interessanterweise signifikante interindividuelle Unterschiede, Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies, als auch Unterschiede aufgrund der liposomalen Eigenschaften bezüglich einer Liposomen-induzierten Komplementaktivierung und der daraus resultierenden biologischen Konsequenzen.

Insgesamt war auch bei unserem Versuch problematisch, dass sich häufig eine große Standardabweichung zeigte, eben möglicherweise durch interindividuelle Unterschiede in der Reaktion des Immunsystems bedingt. Daher ist eine Aussage über die Wirkung der verschiedenen Liposomen nur in dem hier beschriebenen Rahmen möglich. Um eine bestätigende Aussage treffen zu können, sollte in weiterführenden Untersuchungen der Versuch in einem deutlich größeren Probandenkollektiv wiederholt werden.

TLR-Rezeptoren

TLR2 und TLR4 sind Strukturerkennungs-Rezeptoren und an der Signalübertragung nach Erkennung bakterieller Lipoproteine beteiligt (Lien et al., 1999). Sie sind Teil der angeborenen Immunität und an Entzündungsreaktionen beteiligt.

Für Gentransfer-Versuche werden häufig Liposomen-DNA-Komplexe verwendet. Es ist bekannt, dass die Liposomen-DNA-Komplexe wegen der enthaltenen DNA durch Toll-Like-Rezeptoren (TLR9) erkannt werden und eine große Menge an proinflammatorischen Zytokinen induzieren (Yasuda et al., 2010). Mit dem Ziel, Liposomen als Trägermoleküle zur Therapie der septischen Granulomatose zu nutzen, ist es von Interesse, ob auch Leerliposomen zu einer Änderung der TLR-Expression führen. Daher haben wir im humanen System, neben den oben bereits beschriebenen Rezeptoren, ergänzend die Expressionsmuster der Rezeptoren TLR2 und TLR4 unter dem Einfluss der verschiedenen Liposomenformulierungen (EPC, EPG, PEG) untersucht.

Von den in unseren Versuchen verwendeten Lipopolysacchariden führte das LPS von *Escherichia coli* 1 und in geringerer Ausprägung auch das von *Salmonella minnesota* zu einer verstärkten Expression von TLR2. Zum Vergleich wurden dann erneut die verschiedenen Liposomenformulierungen getestet. Insgesamt zeigten in diesem Versuch die EPG-Liposomen eine immunaktivierende Wirkung, wohingegen EPC- und PEG-Liposomen über TLR2-Rezeptoren keine immunaktivierende Wirkung hatten.

Wie von Flo et al. (2000) bereits beschrieben, kommen TLR2 auf peripheren Blutmonozyten vor und sind für die Unterscheidung verschiedener Pathogene verantwortlich. Des Weiteren beschrieben Shimazu et al. (1999), im Einklang mit unseren Ergebnissen, Unterschiede in der Erkennung der Lipopolysaccharide verschiedener Erreger durch Toll-like Rezeptoren.

TLR4 kommt ebenfalls auf peripheren Monozyten vor. Die meisten TLRs, besonders TLR1 und TLR4, kommen in niedriger Zahl auf Monozyten und in noch geringerer Zahl auf anderen Zelltypen wie z.B. Granulozyten und unreifen dendritischen Zellen vor.

Bezüglich der TLR4 Rezeptoren zeigten sich die Ergebnisse eher inhomogen. In unseren Versuchen kam es tendentiell durch alle Liposomenformulierungen zu einer Herunterregulierung der TLR4 Rezeptoren und somit zu einer Aktivierung des Immunsystems. Nach Inkubation mit PEG-Liposomen zeigte sich dieser Effekt am stärksten ausgeprägt. Auch wurde in der Literatur bereits ein relativ hohes Maß an Variabilität der TLR-Expression unter gesunden Blutzellspendern beschrieben. TLR4 bildet mit dem sog. MD-2-Molekül einen Komplex, welcher zusammen mit CD14 für die Erkennung und Übertragung von LPS verantwortlich ist (Shimazu et al., 1999; Akashi et al., 2000).

Wie bei den oben bereits beschriebenen Komplementrezeptoren zeigte sich auch bei den TLR-Rezeptoren die Problematik großer Standardabweichungen, vermutlich durch große interindividuelle Unterschiede, so dass auch diese Versuche möglicherweise nur eingeschränkt beurteilbar sind. Auch hier wären weitere Untersuchungen in einem größeren Probandenkollektiv nötig, um bestätigende Aussagen zu erhalten.

Insgesamt zeigte sich im humanen System somit eine geringere Aktivierung des Gesamtkomplements durch PEG-Liposomen als durch EPC- und EPG-Liposomen, wobei sich im Rahmen der Messungen von C3c und C4 der Aktivierungsweg nicht nachvollziehen ließ.

In den durchflusszytometrischen Messungen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, da sich auch bei der Messung diverser Komplementproteine im humanen System bei einigen der untersuchten Rezeptoren (v.a. TLR2 und TLR4) eine Aktivierung durch die verschiedenen Liposomen ergab. Hierbei waren EPC- und EPG-Liposomen ebenfalls deutlich komplementaktivierender als PEG-Liposomen. Allerdings wurden auch inhibitorische Kontrollproteine (CD35 und CD55) nach Kontakt der Zellen mit einigen der Liposomen verstärkt exprimiert, diese vor allem durch EPC-Liposomen, am wenigsten wurden die Komplementrezeptoren erneut durch PEG-Liposomen beeinflusst.

Dies bestätigt die Ergebnisse von Szebeni et al. (1997).

4.2. Unterschiede zwischen den verschiedenen Liposomen-Formulierungen

Unterschiede in der Aktivierung des Komplementsystems durch verschiedene Phospholipide beschrieb bereits Mold 1989. Liposomen, welche nur Phosphatidylcholin enthielten, waren weniger komplementaktiv als Liposomen mit Phosphatidylethanolamin. Des Weiteren werden Unterschiede zwischen den verschiedenen polaren Gruppen von Phosphatidylethanolamin beschrieben.

Ferner untersuchten Devine et al. (1994) die Liposomen-Komplement-Interaktionen in Rattenserum. Hier zeigte sich, dass Cholesterol die Komplementaktivierung dosisabhängig beeinflusste, dass das Einsetzen von nicht-saturierten Acylgruppen die Komplementaktivierung reduzierte und dass größere Vesikel bei gleichem Lipidgehalt das Komplementsystem stärker aktivierten als kleinere.

Dahingegen erwiesen sich nicht-gesättigte Lipide in humanem Serum als stärkere Komplement-Aktivatoren als gesättigte Lipide (Chonn et al., 1991).

Im murinen System zeigte sich in unseren *in-vitro*-Versuchen eine unterschiedliche Wirkung der einzelnen Liposomenformulierungen auf das Gesamtkomplement. Insbesondere EPC-Liposomen in höherer Konzentration und teilweise EPG-Liposomen aktivierten das Komplementsystem. PEG-Liposomen zeigten sich insgesamt weniger komplementaktivierend.

EPC- und EPG-Liposomen zeigten sich bei der Bestimmung der Aktivität des humanen Gesamtkomplements wie im murinen System komplementaktiver als PEG-Liposomen, welche hier sogar zu einer Erhaltung der Komplementfaktoren führte. Allerdings konnte bei der quantitativen Bestimmung von C3c und C4 im humanen System durch alle verwendeten Liposomenformulierungen kein Aktivitätsanstieg gemessen werden.

Auch bei den gemessenen Oberflächenmolekülen ergaben sich Differenzen. PEG führte im Gegensatz zu EPC- und EPG-Liposomen zu einer verminderten Expression von CD55 und beeinflusste das Komplementsystem daher weniger als die anderen beiden Liposomenformulierungen. Auf CD35 wirkten EPC-Lipo-

somen aktivierend auf die Expression, insbesondere auf Monozyten und tendentiell auch auf Lymphozyten. EPG und PEG nahmen keinen Einfluss auf die CD35 Expression. Zu beachten ist hierbei, dass es sich bei CD55 und CD35 um negative Kontrollproteine des Komplementsystems handelt.

Keine der Liposomenformulierungen zeigte einen signifikanten Effekt auf die Expression CD14/CD35 positiver Zellen.

Anders verhielten sich die einzelnen Liposomenformulierungen bezüglich ihrer Wirkung auf Toll-like Rezeptoren, wo EPG-Liposomen eine stärkere immunaktivierende Wirkung auf TLR2 zeigte als EPC- und PEG-Liposomen, bei welchen keine aktivierende Wirkung auf TLR2 nachgewiesen werden konnte. Bezüglich der Expression von TLR4 Rezeptoren zeigten keine der Liposomenformulierungen eine relevante aktivierende Wirkung.

Somit wirkten PEG-Liposomen im murinen System weniger komplementaktivierend als EPC- und EPG-Liposomen.

Im humanen System zeigten die verschiedenen Liposomenformulierungen einen unterschiedlich starken Einfluss auf die verschiedenen Komponenten des Komplementsystems. Insgesamt schienen EPC-Liposomen komplementaktiver als EPG-Liposomen und diese schienen wiederum komplementaktiver als PEG-Liposomen zu sein. Dies könnte durch die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der einzelnen Liposomenformulierungen erklärt werden. Polyethylenglykol war in der Lipidzusammensetzung von EPC- und EPG-Liposomen nicht vertreten, so dass man im Rahmen der erhaltenen Ergebnisse davon ausgehen kann, dass Polyethylenglykol der entscheidende Bestandteil für die insgesamt niedrigere Komplementaktivierung war.

Somit bestätigte sich in unseren Versuchen die in der Literatur bereits mehrfach postulierte „Tarnung“ der Liposomen durch PEG.

4.3. Vergleich von murinem und humanem System

Bei Untersuchungen von humanem und tierischem Komplementsystem wurden in der Literatur bereits mehrfach Ähnlichkeiten beschrieben, welche im Folgenden dargestellt werden.

Kleine, unilamellare, neutrale, nicht PEGylierte Liposomen, aktivierten das Komplementsystem weder von Menschen noch von Schweinen (Szebeni et al., 2002). Dahingegen wurden sowohl humanes als auch tierisches Komplement durch Anreicherung nicht-PEGylierter Liposomen mit Dicetylphosphat oder anderer anionischer Phospholipide, unabhängig ihrer Kopfgruppen-Struktur, aktiviert (Chonn et al., 1991; Devine et al., 1994; Bradley et al., 1998 b; Szebeni et al., 2000; Moghimi und Hunter, 2001; Moghimi und Szebeni, 2003).

Szebeni und Alving (1999) beschrieben eine Aktivierung des Komplementsystems durch liposomal verkapseltes Hämoglobin in Ratten, Schweinen und Menschen.

Bei Untersuchungen des MAC-regulierenden Rezeptors CD59 zeigten Harris et al. (2003) die gleiche Wirksamkeit von CD59a und CD59b in menschlichem Komplement und Komplement von Nagetieren (Mäuse).

Ebenso demonstrierten Cheng et al. (2005) eine Vergleichbarkeit der Schlüssel-funktionen wie die Komplementregulierung von Faktor H in Mäusen und Menschen.

Bislang gibt es in der Literatur keinen direkten Vergleich zwischen murinem und humanem System bezüglich der von uns untersuchten Komplement Bestandteile, was die Interpretation unserer Ergebnisse erschwerte.

Um zu klären, ob das murine System und das humane System bezüglich der verschiedenen, von uns untersuchten, Liposomenformulierungen vergleichbar sind, wurde in beiden Systemen die kinetische Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements unter Einfluss von EPC-, EPG-, und PEG-Liposomen *in vitro* untersucht.

Im murinen System zeigte sich eine unterschiedliche Wirkung der einzelnen Liposomenformulierungen. Vor allem EPC- und EPG-Liposomen aktivierten das Komplementsystem. PEG-Liposomen zeigten sich insgesamt als weniger komplementaktivierend.

Im humanen System zeigten sich EPC- und EPG-Liposomen wie im murinen System komplementaktiver als PEG-Liposomen, welche im humanen System sogar zu einer Erhaltung der Komplementfaktoren führte.

Aus unseren Untersuchungen kann insgesamt geschlossen werden, dass die einzelnen Liposomenformulierungen zumindest auf die Aktivität des Gesamtkomplements ähnliche Wirk Tendenzen im murinen und im humanen System haben, was allerdings bezüglich des Komplementrezeptors CD11b/CD18 nicht der Fall war. Allerdings lassen sich derartige Schlüsse nur bedingt ziehen, da in den Versuchen zu murinen Rezeptoren GO-Liposomen des EPG-Typs verwendet wurden.

Als Quintessenz lässt sich somit festhalten, dass sowohl im murinen als auch im humanen System EPC- und EPG-Liposomen das Komplementsystem stärker aktivieren als PEG-Liposomen. Dies ist im Einklang mit vorherigen Arbeiten, unter anderem mit den Ergebnissen von Liu et al. (1995), in welchen sie eine reduzierte Komplementaktivierung von PEG-Liposomen sowohl in Mäusen, Ratten, Rindern als auch in humanem Serum zeigten. Möglicherweise kann dies durch eine verlängerte Blut-Zirkulationszeit von PEG-Liposomen in Menschen bedingt sein (Woodle und Lasic 1992).

4.4. Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind gut etabliert. Auch der neu etablierte CH₅₀ Assay zur Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System funktioniert, so dass sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und Methoden als Grundlage für weitere Forschungsarbeiten eignen.

Da sich Ähnlichkeiten im murinen und im humanen Komplementsystem bezüglich einer Reaktion auf die verschiedenen Liposomenformulierungen zeigten, kann das Mausmodell unter bestimmten Fragestellungen auch in künftigen Untersuchungen verwendet werden (z.B. CH₅₀ Assay).

Insgesamt waren PEG-Liposomen weniger komplementaktiv als EPC- und EPG-Liposomen, so dass PEG-Liposomen geeigneter wären, um in einem eventuellen therapeutischen Ansatz Verwendung zu finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der autosomal rezessiv oder x-chromosomal vererbte Defekt der NADPH-Oxidase phagozytärer Zellen hat die Septische Granulomatose (Chronic Granulomatous Disease, CGD), ein schweres Krankheitsbild mit rezidivierenden Infektionen und meist schlechter Prognose, zur Folge.

Liposomen sind Vesikel aus Phospholipid-Doppelschichten. Sie werden als vielseitige Medikamenten-Träger seit einiger Zeit ausgiebig untersucht.

Eine Hypothese ist, dass der vorliegende Mangel des intakten Enzyms NADPH-Oxidase durch spezifische Aufnahme von Glucose-Oxidase-haltigen Liposomen (GOL) durch die Zellen des Phagozytose Systems ausgeglichen werden kann, womit eine alternative Therapiemöglichkeit der CGD durch intravenöse Verabreichung von GOL bestünde.

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr. Durch Komplement-Markierung eingedrungener, körperfremder Partikel, vor allem durch aktivierte C3-Fragmente, können diese von phagozytierenden Zellen durch Rezeptor-medierte Erkennung entfernt werden. Zudem kann es durch die Bildung des membrane attack complex (Membranangriffskomplex, MAC) zur Zellyse oder zur Freisetzung der liposomalen Inhaltsstoffe kommen.

Durch Interaktion von Liposomen mit dem Komplementsystem kommt es durch eine Destabilisierung der Liposomen zu einer Herabsetzung der Bluthalbwertszeit, des Weiteren könnte es zu einer autoimmunen Reaktion durch Liposomenenthaltende Zellen kommen, was einer effektiven Therapie im Wege steht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung des murinen und humanen Komplementsystems durch verschiedene Liposomenformulierungen (EPC-, EPG- und PEG-Liposomen, im murinen System auch durch Glucose-Oxidasehaltige Liposomen) mittels diverser *in-vitro*-Modelle als auch *in vivo* in einem Mausmodell für CGD, z.T. nach Infektion mit verschiedenen krankheitstypischen Erregern untersucht.

Da das endgültige Ziel ist, Liposomen bei der Therapie der septischen Granulomatose in Patienten einzusetzen, widmet sich der zweite Teil der Arbeit der Frage, ob die murinen Modelle mit dem humanen System vergleichbar sind oder ob mit wesentlichen Unterschieden im Menschen zu rechnen ist.

Im murinen System zeigte sich mittels der kinetischen Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements (CH₅₀ Assay) *in vitro* eine Aktivierung des Komplementsystems durch alle verwendeten Liposomenformulierungen. Ebenso zeigte sich *in vivo* bei der kinetischen Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements eine Aktivierung des Komplementsystems durch Glucose-Oxidase haltige EPG-Liposomen sowohl in nicht-infizierten Wildtyp- und CGD-Mäusen, als auch in infizierten CGD-Mäusen. Der gesehene gesteigerte Einfluss von GOL auf infizierte CGD-Mäuse im Vergleich zu den Vergleichsgruppen lässt auf eine Potenzierung der Effekte durch die Kombination von Infektion und GOL-Gabe in CGD-Mäusen schließen.

Durchflusszytometrisch zeigte sich ein GOL-induzierter Abfall CD18 exprimierender Granulozyten und Lymphozyten. Nicht eindeutig lässt sich dahingegen der liposomale Einfluss auf doppelt positive Zellen darlegen, da die Reaktion bei zusätzlicher Infektion unterschiedlich ausfällt.

CD21/35 exprimierende Zellen wurden durch eine Gabe GO-haltiger EPG-Liposomen nicht aktiviert.

Der GO-Einfluss wird als gering eingestuft, da GO nicht in der Liposomenmembran verankert ist und das gebildete H₂O₂ sehr schnell abgebaut wird.

Auch im humanen System kam es bei der kinetischen Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements zu einer Aktivierung durch Liposomen. Des Weiteren ergab sich in den durchflusszytometrischen Untersuchungen, bei allerdings deutlichen interindividuellen Unterschieden, eine Liposomen-induzierte Expressionszunahme CD35- und CD55-positiver Zellen sowie des TLR2-Rezeptors. Somit zeigte sich in unseren Versuchen insgesamt eine Aktivierung des Komplementsystems durch die verschiedenen Liposomenformulierungen.

Sowohl im murinen als auch im humanen System gab es bei einzelnen Liposomenformulierungen eine unterschiedlich starke Auswirkung auf die ver-

schiedenen untersuchten Komponenten des Komplementsystems. Insgesamt zeigte sich im murinen und im humanen System eine geringere Aktivierung des Komplements durch PEG-Liposomen als durch EPC- und EPG-Liposomen, was durch die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der einzelnen Liposomenformulierungen erklärt werden kann. Polyethylenglykol war in der Lipidzusammensetzung von EPC- und EPG-Liposomen nicht vertreten, so dass man im Rahmen der erhaltenen Ergebnisse davon ausgehen kann, dass Polyethylenglykol der entscheidende Bestandteil für die insgesamt niedrigere Komplementaktivierung war. Hierdurch konnte die in der Literatur postulierte „Tarnung“ der Liposomen durch PEG sowohl im murinen als auch im humanen System bestätigt werden.

Fazit:



Da die verwendeten Methoden gut etabliert sind und auch der von uns neu etablierte CH_{50} Assay zur Bestimmung der Aktivität des Gesamtkomplements im murinen System funktioniert, eignen sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und Methoden als Grundlage für weitere Forschungsarbeiten.

Ebenso kann das Mausmodell in künftigen Untersuchungen dienen, da sich ähnliche Reaktionen auf die verschiedenen Liposomenformulierungen im murinen und im humanen Komplementsystem ergaben.

Aufgrund der geringeren Komplement-Induktion durch PEG-Liposomen wären diese von den untersuchten Liposomenformulierungen die Geeignesten, um in einem eventuellen therapeutischen Ansatz Verwendung zu finden.

6. LITERATUR

Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M., Miyake, K. (2000). Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. *Biochem Biophys Res Commun* 268:172-177.

Alexander, J.J., Quigg, R.J. (2007). The simple design of complement factor H: looks can be deceiving. *Mol Immunol* 44:123-132.

Allen, T.M., Hansen, C. (1991). Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta* 1068:133-141.

Alper, C.A., Johnson, A.M., Birtch, A.G., Moore, F.S. (1969). Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* 163:286-288.

Alving, C.R., Kinsky, S.C., Haxby, J.A., Kinsky, C.B. (1969). Antibody binding and complement fixation by a liposomal model membrane. *Biochemistry* 8:1582-1587.

Andersen, A.J., Hashemi, S.H., Andresen, T.L., Hunter, A.C., Moghimi, S.M. (2009). Complement: alive and kicking nanomedicines. *J Biomed Nanotechnol* 5:364-372.

Badaro, R., Falcoff, E., Badaro, F.S., Carvalho, E.M., Pedral-Sampaio, D., Barral, A., Carvalho, J.S., Barral-Netto, M., Brandley, M., Silva, L. et al. (1990). Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 322:16-21.

Barthel, S.R., Johansson, M.W., McNamee, D.M., Mosher D.F. (2008). Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol* 83:1-12.

Barton, G.M. und Medzhitov, R. (2002). Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immuno.* 270:81-92.

Basset-Séguin, N., Caughman, S.W., Yancey, K.B. (1990). A-431 cells and human keratinocytes synthesize and secrete the third component of complement. *J invest Dermatol* 95:621-625.

Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L.E., Herzenberg, L.A., Chen, J. (2000). B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med* 192:271-280.

Ben-Yoseph, O., Ross, B.D. (1994). Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment. *Br J Cancer* 70:1131-1135.

Blanchong, C.A., Chung, E.K., Rupert, K.L., Yang, Y., Yang, Z., Zhou, B., Moulds, J.M., Yu, C.Y. (2001). Genetic, structural and functional diversities of human complement components C4A and C4B and their mouse homologues, Slp and C4. *Int Immunopharmacol* 1:365-392.

Bloom, A.M., Kask, L., Dahlbäck, B. (2003). CCP1-4 of the C4b-binding protein α -chain are required for Factor I mediated cleavage of C3b. *Mol Immunol* 39:547-556.

Blume, G., Cevc, G. (1990). Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1029:91-97.

Boes, M., Prodeus, A., Schmidt, T., Carroll, M.C., Chen, J. (1998). A critical role of natural IgM in immediate response against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 188:2381-2386.

Borjesson, D.L., Simon, S.I., Hodzic, E., Ballantyne, C.M., Barthold, S.W. (2002). Kinetics of CD11b/CD18 up-regulation during infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis in mice. *Lab Invest* 82:303-311.

Botto, M., Lissandrini, D., Sorio, C., Walport, M.J., (1992). Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 149:1348-1355.

Bradley, A.J., Devine, D.V. (1998 a). The complement system in liposome clearance: Can complement deposition be inhibited? *Adv Drug Deliv Rev* 32:19-29.

Bradley, A.J., Devine, D.V., Ansell, S.M., Janzen, J., Brooks, D.E. (1998 b). Inhibition of liposome induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol) lipids. *Arch Biochem Biophys* 357:185-194.

Bradley, A.J., Brooks, D.E., Norris-Jones, R., Devine, D.V. (1999). C1q binding to liposomes is surface charge dependent and is inhibited by peptides consisting of residues 14-26 of the human C1qA chain in sequence independent manner. *Biochim Biophys Acta* 1418:19-30.

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J., Modlin, R.L. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-Like receptors. *Science* 285:732-736.

Carmo, V.A., De Oliveira, M.C., Reis, E.C., Guimarães, T.M., Vilela, J.M., Andrade, M.S., Michalick, M.S., Cardoso, V.N. (2008). Physicochemical characterization and study of in vitro interactions of pH-sensitive liposomes with the complement system. *J Liposome Res* 18:59-70.

Carroll, M.C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5:981-986.

Cheng, Z.Z., Hellwage, J., Seeberger, H., Zipfel, P.F., Meri, S., Jokiranta, T.S. (2005). Comparison of surface recognition and C3b binding properties of mouse and human complement factor H. *Mol Immunol* 43:972-979.

Chonn, A., Cullis, P.R., Devine, D.V. (1991). The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 146:4234-4241.

Cole, F.S., Mettews, W.J., Rossing, T.H., Gash, D.J., Lichtenberg, N.A., Pennington, J.E. (1983). Complement biosynthesis by human bronchoalveolar macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 27:153-159.

Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., Orme, I.M. (1993). Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178:2234-2247.

Dahl, M.R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A.C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J.C. (2001). MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15:127-135.

Dams, E.T., Laverman, P., Oyen, W.J., Storm, G., Scherphof, G.L., van Der Meer, J.W., Corstens, F.H., Boerman, O.C. (2000). Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J Pharmacol Exp Ther* 292:1071-1079.

Devine, D.V., Wong, K., Serrano, K., Chonn, A., Cullis, P.R. (1994). Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim Biophys Acta* 1191:43-51.

Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392:505-509.

Devitt, A., Pierce, S., Oldreive, C., Shingler, W.H., Gregory, C.D. (2003). CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ* 10:371-382.

Dinauer, M.C. (1993). Leucocyte function and nonmalignant leukocyte disorders. *Curr Opin Pediatr* 5:80-87.

Dinauer, M. (1998). The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. In Nathan, D., Orkin, S., eds. *Hematology of Infancy and Childhood*. Vol 1. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1998:889-967.

Dinauer, M.C., Gifford, M.A., Pech, N., Li, L.L., Emshwiller, P. (2001). Variable correction of host defense following gene transfer and bone marrow transplantation in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 97:3738-3745.

DiScipio, R.G., Smith, C.A., Muller-Eberhard, H.J., Hugli, T.E. (1983). The activation of human complement component C5 by a fluid phase C5 convertase. *J Biol Chem* 258:10629-10636.

Dorman, S.E., Holland, S.M. (1998). Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycomacterial infection. *J Clin Invest* 101:2364-2369.

Einstein, L.P., Hansen, P.J., Ballow, M., Davis, J.S., Alper, C.A., Rosen, F.S., Colten, H.R. (1977). Biosynthesis of the third component of complement (C3) in vitro by monocytes from both normal and homozygous C3-deficient humans. *J Clin Invest* 60:963-969.

Epstein, J., Eichbaum, Q.E., Sheriff, S., Ezekowitz, R.A.B. (1996). The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8:29-35.

Fearon, D.T., Carter, R.H. (1995). The CD19/CR2/TAPA-1 Complex of B lymphocytes: linking natural to aquired immunity. *Annu Rev Immunol* 13:127-149.

Fischer, A., Segal, A.W., Seger, R., Weening, R.S. (1993). The management of chronic granulomatous disease. *Eur J Pediatr* 152:896-899.

Flo, T.H., Halaas, O., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D.T., Sundan, A., Espevik, T. (2000). Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* 164:2064-2069.

Forrest, C.B., Forehand, J.R., Axtell, R.A., Roberts, R.L., Johnston, R.B. (1988). Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2:253-266.

Fournier, B., Philpott, D.J. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 18:521-540.

Gál, P., Dobó, J., Závodszy, P., Sim, R.B. (2009). Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol Immunol* 46:2745-2752.

Gallin, J.I., Alling, D.W., Malech, H.L., Wesley, R., Koziol, D., Marciano, B., Eisenstein, E.M., Turner, M.L., DeCarlo, E.S., Starling, J.M. and Holland, S.M. (2003). Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 348:2416-2422.

Gay, N.J., Keith, F.J. (1991). *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356.

Georas, S.N., McIntyre, B.W., Ebisawa, M., Bednarczyk, J.L., Sterbinsky, S.A., Schleimer, R.P., Bochner, B.S. (1993). Expression of a functional laminin receptor (alpha 6 beta 1, very late activation antigen-6) on human eosinophils. *Blood* 82:2872-2879.

Gerber, C.E., Bruchelt, G., Falk, U.B., Kimpfler, A., Hauschild, O., Kuci, S., Bachi, T., Niethammer, D. and Schubert, R. (2001). Reconstitution of bactericidal activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes. *Blood* 98:3097-3105.

Gille, C., Spring, B., Bernhard, W., Gebhard, C., Basile, D., Lauber, K., Poets, C.F., Orlikowsky, T.W. (2007). Differential effect of surfactant and its saturated phosphatidylcholines on human blood macrophages. *J Lipid Res* 48:307-317.

Gorelik, L., Cutler, A.H., Thill, G., Miklasz, S.D., Shea, D.E., Ambrose, C., Bixler, S.A., Su, L., Scott, M.L., Kalled, S.L. (2004). Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. *J Immunol* 172:762-766.

Grayson, M.H., Van der Vieren, M., Sterbinsky, S.A., Michael Gallatin, W., Hoffman, P.A., Staunton, D.E., Bochner, B.S. (1998). Alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* 188:2187-2191.

Gregoriadis, G. (2007). Liposome Technology third edition, Volume III Interactions of Liposomes with the Biological Milieu. Informa Healthcare Inc., USA.

Haas, K.M., Hasegawa, M., Steeber, D.A., Poe, J.C., Zabel, M.D., Bock, C.B., Karp, D.R., Briles, D.E., Weis, J.H., Tedder, T.F. (2002). Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity* 17:713-723.

Hansson, G.K., Edfeldt, K. (2005). Toll To Be Paid at the Gateway to the Vessel Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1085-1087.

Harashima, H., Hiraiwa, T., Ochi, Y., Kiwada, H. (1995). Size dependent liposome degradation in blood: in vivo/in vitro correlation by kinetic modeling. *J Drug Target* 3:253-261.

Harris, C.L., Hanna, S.M., Mizuno, M., Holt, D.S., Marchbank, K.J., Morgan, B.P. (2003). Characterization of the mouse analogues of CD59 using novel monoclonal antibodies: tissue distribution and functional comparison. *Immunology* 109:117-126.

Haxby, J.A., Gotze, O., Muller-Eberhard, H.J., Kinsky, S.C. (1969). Release of trapped marker from liposomes by the action of purified complement components. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:290-295.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752.

Humphries, M.J. (2004). Monoclonal antibodies as probes of integrin priming and activation. *Biochem Soc Trans* 32:407-411.

Huong, T.M., Ishida, T., Harashima, H., Kiwada, H. (2001). The complement system enhances the clearance of phosphatidylserine (PS)-liposomes in rat and guinea pig. *Int J Pharm* 215:197-205.

Inghirami, G., Wieczorek, R., Zhu, B.Y., Silber, R., Dalla-Favera, R., Knowles, D.M. (1988). Differential expression of LFA-1 molecules in non-Hodgkin's lymphoma and lymphoid leukemia. *Blood* 72:1431-1434.

Ishida, T., Kojima, H., Harashima, H., Kiwada, H. (2000). Biodistribution of liposomes and C3 fragments associated with liposomes: evaluation of their relationship. *Int J Pharm* 205:183-193.

Ishida, T., Yasukawa, K., Kojima, H., Harashima, H. und Kiwada, H. (2001). Effect of cholesterol content in activation of the classical versus the alternative pathway of rat complement system induced by hydrogenated egg phosphatidylcholine-based liposomes. *Int Pharm* 224:69-79.

Ishida, T., Harashima, H., Kiwada, H. (2002). Liposome clearance. *Biosci Rep* 22:197-224.

Jackson, S.H., Miller, G.F., Segal, B.H., Mardiney, M. 3rd, Domachowske, J.B., Gallin, J.I. and Holland, S.M. (2001). IFN-gamma is effective in reducing infections in the mouse model of chronic granulomatous disease (CGD). *J Interferon Cytokine Res* 21: 567-573.

Jacobson, A.C., Ma, Y., Zachary, J.F., Weis, J.J., Weis, J.H. (2007). Mice lacking CD21 and CD35 proteins mount effective immune responses against *Borrelia burgdorferi* infection. *Infect Immun* 75:2075–2078.

Janeway, C.A. Jr., Medzhitov, R. (1999). Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Biol* 9:879-882.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. Shlomchik, M. (2002). Immunologie, 5. Auflage. Spektrum, Akad. Verlag GmbH Heidelberg - Berlin.

Janssen, B.J., Huizinga, E.G., Raaijmakers, H.C., Roos, A., Daha, M.R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., Gros, P. (2005). Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 437:505-511.

Janssen, B.J., Gros, P. (2007). Structural insights into the central complement component C3. *Mol Immunol* 44:3-10.

Jones, B.W., Means, T.K., Heldwein, K.A., Keen, M.A., Hill, P.J., Belisle, J.T., Fenton, M.J. (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 69:1036–1044.

Kang, E.M., Choi, U., Theobald, N., Linton, G., Long Priel, D.A., Kuhns, D., Malech, H.L. (2010). Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. *Blood* 115:783-791.

Kang, E.M., Malech, H.L. (2012). Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Methods Enzymol* 507:125-154.

Katz, Y., Strunk, R.C., (1988). Synovial fibroblast-like cells synthesize seven proteins of the complement system. *Arthritis Rheum* 31:1365-1370.

Kimpfler, A. (2003). Glucose-Oxidase-Liposomen zur Therapie der Septischen Granulomatose: In vitro Funktionalität, Granulozyten-Targeting und Wirkung im Organismus. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.

Kinoshita, T., Medof, M.E., Silber, R., Nussenzweig, V. (1985). Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 162:75-92.

Kinoshita, T., Takeda, J., Hong, K., Kozono, H., Sakai, H., Inoue, K. (1988). Monoclonal antibodies to mouse complement receptor type 1 (CR1). Their use in a distribution study showing that mouse erythrocytes and platelets are CR1-negative. *J Immunol* 140:3066-3072.

Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., Butcher, E.C. (1989). Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245:1238-1241.

Klebanoff, S.J. (1974). Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J Biol Chem* 249:3724-3728.

Kolb, W.P., Muller-Eberhard, H.J. (1975). The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex. *J Exp Med* 141:724-735.

Koletzko, B. (2004). Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 12. Auflage. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg. S.280.

Kopp, E., Medzhitov, R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:396-401.

Korb, L.C. und Ahearn, J.M. (1997). C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic keratinocytes. *J Immunol* 158:4225-4528.

Kraus, D., Medof, M.E., Mold, C. (1998). Complementary recognition of alternative pathway activators by decay-accelerating factor and factor H. *Infect Immun* 66:399-405.

Kremlev, S.G., Phelps, D.S. (1997). Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol* 272:L1070-1077.

Kurtz, C.B., O'Toole, E., Christensen, S.M., Weis, J.H. (1990). The murine complement receptor gene family. IV. Alternative splicing of Cr2 gene transcripts predicts two distinct gene products that share homologous domains with both human CR2 and CR1. *J Immunol* 144:3581-3591.

Kushner, I., Edington, T.S., Trimble, C., Liem, H.H., Müller-Eberhard, U. (1972). Plasma hemopexin during acute phase response. *J Lab Clin Med* 80:18-25.

Lachmann, P.J. (2010). Preparing serum for functional complement assays. *J Immunol Methods* 352:195-197.

Lasic, D.D., Martin, F.J., Gabizon, A., Huang, S.K., Papahadjopoulos, D. (1991). Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim Biophys Acta* 1070:187-192.

Laverman, P., Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., Corstens, F.H.M., Storm, G. (2001 a). In vivo applications of PEG liposomes: unexpected observations. *Therapeutic Drug Carrier Systems* 18:551-566.

Laverman, P., Carstens, M.G., Boerman, O.C., Dams, E.T., Oyen, W.J., van Rooijen, N., Corstens, F.H., Storm, G. (2001 b). Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *J Pharmacol Exp Ther* 298:607-612.

Lien, E., Sellati, T.J., Yoshimura, A., Flo, T.H., Rawadi, G., Finberg, R.W., Carroll, J.D., Espevik, T., Ingalls, R.R., Radolf, J.D., Golenbock, D.T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274:33419-33425.

Liu, D., Hu, Q.G., Song, Y.K. (1995). Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 124:277–284.

Loos, M., Laurell, A.B., Sjöholm, A.G., Martensson, U., Berkel, A.I. (1980). Immunochemical and functional analysis of a complete C1q deficiency in man: evidence that C1r and C1s are in the native form, and that they reassociate with purified C1q to form macromolecular C1. *J Immunol* 124:59-63.

Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Spektrum, Akad. Verlag GmbH Heidelberg – Berlin. S. 40.

Lun, A., Roesler, J., Renz, H. (2002). Unusual late onset of X-linked chronic granulomatous disease in an adult woman after unsuspecting childhood. *Clin Chem* 48:780-781.

Lynch, K.H., Seed, K.D., Stothard, P., Dennis, J.J. (2010). Inactivation of Burkholderia cepacia complex phage KS9 gp41 identifies the phage repressor and generates lytic virions. *J Virol* 84:1276–1288.

Ma, H.R., Mu, S.C., Yang, Y.H., Chen, C.M. and Chiang, B.L. (2003). Therapeutic effect of interferon-gamma for prevention of severe infection in X-linked chronic granulomatous disease. *J Formos Med Assoc* 102:189-192.

Massing, U., Fuxius, S. (2000). Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness. *Drug Resist Updat* 3:171-177.

Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I., Fujita, T. (2000). Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 165:2637-2642.

Matsushita, M. und Fujita, T. (2002). The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiol* 205:490-497.

McRipley, R.J., Sbarra, A.J. (1967). Role of the phagocyte in host-parasite interactions XII. Hydrogen peroxide-myeloperoxidase bactericidal system in the phagocyte. *J Bacteriol* 94:1425–1430.

Medzhitov, R., Janeway, C.E. Jr. (2000). Innate immunity. *New Engl J Med* 343:338-344.

Mochizuki, K., Shimada, M., Tanaka, Y., Fukaya, N., Goda, T. (2010). Reduced expression of β 2 integrin genes in rat peripheral leukocytes by inhibiting postprandial hyperglycemia. *Biosc. Biotechnol Biochem* 74:2470-2474.

Moghimi, S.M., Hunter, A.C. (2001). Recognition by macrophages and liver cells of opsonized phospholipid vesicles and phospholipid headgroups. *Pharm Res* 18:1-8.

Moghimi, S.M., Szebeni, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 42:463-478.

Moghimi, S.M., Hamad, I., Andresen, T.L., Jørgensen, K., Szebeni, J. (2006). Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. *FASEB J* 20:2591-2593.

Mold C. (1989). Effect of membrane phospholipids on activation of the alternative complement pathway. *J Immunol* 143:1663-1668.

Mold, C., Walter, E.I., Medof, M.E. (1990). The influence of membrane components on regulation of alternative pathway activation by decay-accelerating factor. *J Immunol* 145:3836-3341.

Moore, K.J., Andersson, L.P., Ingalls, R.R., Monks, B.G., Li, R., Arnaout, M.A., Golenbock, D.T., Freeman, M.W. (2000). Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol* 165:4272-4280.

Morelli, A., Larregina, A., Chuluyán, I., Kolkowski, E., Fainboim, L. (1996). Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. *Immunology* 89:126-134.

Morgan, E.L., Ember, J.A., Sanderson, S.D., Scholz, W., Buchner, R., Ye, R.D., Hugli, T.E. (1993). Anti-C5a receptor antibodies. Characterization of neutralizing antibodies specific for a peptide, C5aR-(9-29), derived from the predicted amino-terminal sequence of the human C5a receptor. *J Immunol* 151:377-388.

Morris, K.M., Aden, D.P., Knowles, B.B., Colten, H.R., (1982). Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line Hep G2. *J Clinical Invest* 70:906-913.

Müller-Anstett, M.A., Müller, P., Albrecht, T., Nega, M., Wagener, J., Gao, Q., Kaesler, S., Schaller, M., Biedermann, T., Götz, F. (2010). Staphylococcal peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes. *PLoS One* 5:e13153.

Müller-Eberhard, H.J. (1998). Molecular organisation and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57:321-347.

Murray, H.W., Spitalny, G.L., Nathan, C.F. (1985). Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 134:1619-1622.

Ochsenbein, A.F., Pinschewer, D.D., Odermatt, B., Carroll, M.C., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1999). Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J Exp Med* 190:1165-1174.

Oppermann, M., Höpken, U., Götze, O. (1992). Assessment of complement activation in vivo. *Immunopharmacology* 24:119-134.

Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., Müller-Eberhard, H.J. (1981). Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 154:856-867.

Phillips, A.E., Toth, J., Dodds, A.W., Girija, U.V., Furze, C.M., Pala, E., Sim, R.B., Reid, K.B., Schwaeble, W.J., Schmid, R., Keeble, A.H., Wallis, R. (2009). Analogous interactions in initiating complexes of the classical and lectin pathways of complement. *J Immunol* 182:7708-7717.

Podack, E.R., Müller-Eberhard, H.J. (1975). Binding of desoxycholate, phosphatidylcholine vesicles, lipoprotein and of the S-protein to complexes of terminal complement components. *J Immunol* 121:1025-1030.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.

Pozdnyakova, O., Guttormsen, H.K., Lalani, F., Carroll, M.C., Kasper, D.L. (2003). Impaired antibody response to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3- and complement receptor 2-deficient mice. *J Immunol* 170:84-90.

Qureshi, S.T., Larivière, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615-625.

Re, F., Strominger, J.L. (2004). IL-10 Released by Concomitant TLR2 Stimulation Blocks the Induction of a Subset of Th1 Cytokines That Are Specifically Induced by TLR4 or TLR3 in Human Dendritic Cells. *J Immunol* 173:7548–7555.

Reid, R.R., Prodeus, A.P., Khan, W., Hsu, T., Rosen, F.S., Carroll, M.C. (1997). Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. *J Immunol* 159:970-975.

Renz-Polster, H., Braun, J. (2001). *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München – Jena. S. 361.

Rochowiak, A., Niemir, Z.I. (2010). The structure and role of CR1 complement receptor in physiology. *Pol Merkur Lekarski* 28:79-83.

Roesler, J., Brenner, S., Bukovsky, A.A., Whiting-Theobald, N., Dull, T., Kelly, M., Civin, C.I., Malech, H.L. (2002). Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 100:4381-4390.

Roos, D., de Boer, M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R.S., Segal, A.W., Ahlin, A., Nemet, K., Hossle, J.P., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Middleton-Price, H. (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 87:1663-1681.

Rother, K., Till, G.O., Hänsch, G.M. (Eds.) (1998). *The complement system*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1998.

Rubas, W., Schreier, H. (1991). Liposomen: Fortschritte in Herstellungstechnologie und Therapie. *Pharm unserer Zeit* 20:255-270.

Samoszuk, M.K., Wimley, W.C. and Nguyen, V. (1996). Eradication of interleukin 5-transfected J558L plasmacytomas in mice by hydrogen peroxide-generating Stealth liposomes. *Cancer Res* 56:87-90.

Schwaeble, W., Dahl, M.R., Thiel, S., Stover, C., Jensenius, J.C. (2002). The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP1: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology* 205:455-466.

Schwaeble, W.J., Reid, K.B. (1999). Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? *Immunol Today* 20:17-21.

Segal, B.H., Leto, T.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M. (2000). Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 79:170-200.

Sekine, H., Reilly, C.M., Molano, I.D., Garnier, G., Circolo, A., Ruiz, P., Holers, V.M., Boackle, S.A., Gilkeson, G.S. (2001). Complement component C3 is not required for full expression of immune complex glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol* 166:6444-6451.

Sessa, G., Weismann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* 9:310-318.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782.

Sim, R.B., Day, A.J., Moffatt, B.E., Fontaine, M. (1993). Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods Enzymol* 223:13-35.

Sjöberg, A.P., Trouw, L.A., Blom, A.M. (2009). Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* 30:83-90.

Smith, C.A., Pangburn, M.K., Vogel, C.W., Müller-Eberhard, H.J. (1984). Molecular architecture of human properdin, a positive regulator of the alternative pathway of complement. *J Biol Chem* 259:4582-4588.

Sohn, J.H., Bora, P.S., Suk, H.J., Molina, H., Kaplan, H.J., Bora, N.S. (2003). Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med* 9:206-212.

Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434.

Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.

Srinath, P., Diwan, P.V. (1994). Stealth Liposomes – An Overview. *Indian Journal of Pharmacology* 26:179-184.

Stolfi, R.L. (1968). Immune lytic transformation: a state of irreversible damage generated as a result of the reaction of the eighth component in the guinea pig complement system. *J Immunol* 100:46-54.

Sugiyama, T., Wright, S.D. (2001). Soluble CD14 mediates efflux of phospholipids from cells. *J Immunol* 166:826–831.

Szalai, A.J., Areawa, A., Greenhough, T.J., Volanakis, J.E. (1997). C-reactive protein: structural biology, gen expression, and host defense. *Immunol Res* 16:127-136.

Szebeni, J., Wassef, N.M., Hartman, K.R., Rudolph, A.S., Alving, C.R. (1997). Complement activation in vitro by the red cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: mechanism of activation and inhibition by soluble complement receptor type 1. *Transfusion* 37:150-159.

Szebeni, J. The interaction of liposomes with the complement system. (1998). *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 15:57-88.

Szebeni, J., Alving, C.R. (1999). Complement-mediated acute effects of liposome-encapsulated hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 27:23-41.

Szebeni, J., Baranyi, B., Savay, S., Bodo, M., Morse, D.S., Basta, M., Stahl, G.L., Bünger, R., Alving, C.R. (2000). Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1319–H1328.

Szebeni, J., Baranyi, L., Savay, S., Milosevits, J., Bunge, R., Laverman, P., Metselaar, J.M., Storm, G., Chanan-Khan, A., Liebes, L., Muggia, F.M., Cohen, R., Barenholz, Y. Alving, C.R. (2002). Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic PEG liposomes: experimental and clinical studies. *J Liposome Res* 12:165–172.

Szebeni, J., Alving, C.R., Rosivall, L., Bünger, R., Baranyi, L., Bedöcs, P., Tóth, M., Barenholz, Y. (2007). Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. *J Liposome Res* 17:107-117.

Szomolanyi-Tsuda, E., Seedhom, M.O., Carroll, M.C., Garcea, R.L. (2006). T cell-independent and T cell-dependent immunoglobulin G responses to polyomavirus infection are impaired in complement receptor 2-deficient mice. *Virology* 352:52-60.

Tachimoto, H., Bochner, B.S. (2000). The surface phenotype of human eosinophils. *Chem Immunol* 76:45–62.

Takahashi, D., Azuma, H., Sakai, H., Sou, K., Wakita, D., Abe, H., Fujihara, N., Horinouchi, H., Nishimura, T., Kobayashi, K., Ikeda, H. (2011). Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive. *J Pharmacol Exp Ther* 337:42-49.

Takeda, K., Akira S. (2001). Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells* 6:733-742.

Taylor, P.R., Carugati, A., Fadok, V.A., Cook, H.T., Andrews, M., Carroll, M.C., Savill, J.S., Henson, P.M., Botto, M., Walport, M.J. (2000). A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med* 192:359-66.

Taylor, P.W. (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 47:46-83.

Tedder, T.F., Poe, J.C., Haas, K.M. (2005). CD22: a multifunctional receptor that regulates B lymphocyte survival and signal transduction. *Adv Immunol* 88:1-50.

Thoma-Uszynski, S., Kiertscher, S.M., Ochoa, M.T., Bouis, D.A., Norgard, M.V., Miyake, K., Godowski, P.J., Roth, M.D., Modlin, R.L. (2000). Activation of Toll-Like Receptor 2 on Human Dendritic Cells Triggers Induction of IL-12, but Not IL-10. *J Immunol* 165:3804–3810.

Tsuge H, Natsuaki O, Ohashi K. (1975). Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biochem* 78:835-843.

Ueki, A., Sai, T., Oka, H., Tabata, M., Hosokawa, K., Mochizuki, Y. (1987). Biosynthesis and secretion of the third component of complement by human endothelial cells in vitro. *Immunology* 61:11-14.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811–815.

Villiers, C.L., Villiers, M.-B., Marche, P.N. (1999). Rôle de la protéine C3 du système complémentaire dans le contrôle de la réponse immunitaire spécifique. *Annales de Biologie Clinique* 57:127-135.

Villiers, C.L., Cretin, F., Lefebvre, N., Marche, P.N., Villiers, M.B. (2008). A new role for complement C3: regulation of antigen processing through an inhibitory activity. *Mol Immunol* 45:3509-3516.

Volanakis, J. E., Frank, M. M. (1998). The human complement system in health and disease. Informa Healthcare Inc., USA.

Vollmar, A., Dingermann, T., Zündorf, I. und Rickl, V. (2005). Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Wahn, V., Seger., R. (1998). Septische Granulomatose. *Monatsschr Kinderheilkd* 146:995-1004.

Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344:1058-1066.

Wang, P.Y., Kitchens, R.L., Munford, R.S. (1998). Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 273:24309–24313.

Wang, P.Y., Munford, R.S. (1999). CD14-dependent internalization and metabolism of extracellular phosphatidylinositol by monocytes. *J Biol Chem* 274:23235–23241.

Warren, H.B., Pantazis, P., Davis, P.F., (1987). The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 129:9-13.

Whaley, K. (1980). Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 151:501-516.

Whitehead, A.S., Sim, R.B., Bodmer, W.F. (1981). A monoclonal antibody against human complement component C3: the production of C3 by human cells in vitro. *Eur J Immunol* 11:140-146.

Winkelstein, J.A., Marino, M.C., Johnston, R.B. Jr, Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M., Ochs, H., Quie, P., Buckley, R.H., Foster, C.B., Chanock, S.J., Dickler, H. (2000). Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79:155-169.

Woodle, M.C., Lasic, D.D. (1992). Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1113:171-199.

Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.H., Springer, T.A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432:59–67.

Yan, X., Scherphof, G.L., Kamps, J.A. (2005). Liposome opsonization. *J. Liposome Res* 15:109-139.

Yasuda, S., Yoshida, H., Nishikawa, M., Takakura, Y. (2010). Comparison of the type of liposome involving cytokine production induced by non-CpG Lipoplex in macrophages. *Mol Pharm* 7:533-542.

Yoshida, K., van den Berg, T.K., Dijkstra, C.D. (1993). Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 80:34-39.

Yu, B., Hailman, E., Wright, S.D. (1997). Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest* 99:315–324.

Zabel, M.D., Heikenwalder, M., Prinz, M., Arrighi, I., Schwarz, P., Kranich, J., von Teichman, A., Haas, K.M., Zeller, N., Tedder, T.F., Weis, J.H., Aguzzi, A. (2007). Stromal complement receptor CD21/35 facilitates lymphoid prion colonization and pathogenesis. *J Immunol* 179:6144-6152.

Zalman, L.S., Müller-Eberhard, H.J. (1990). Comparison of channels formed by poly C9, C5b-8 and the membrane attack complex of complement. *Mol Immunol* 27:533-537.

Zelazny, A.M., Ding, L., Elloumi, H.Z., Brinster, L.R., Benedetti, F., Czapiga, M., Ulrich, R.L., Ballentine, S.J., Goldberg, J.B., Sampaio, E.P., Holland, S.M. (2009). Virulence and cellular interactions of *Burkholderia multivorans* in chronic granulomatous disease. *Infect Immun* 77:4337-4344.

Sonstige Quellen:

Introduction to Flow Cytometrie, S. 31-32, BD Biosciences, April 2000.

<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>, 12.05.2006.

<http://www.livonlabs.com/cgi-bin/html0s.cgi/4013.1.419671294273777089/lypospheric/liposomal-encapsulation.html>, Mai 2011.

7. ANHANG

Nomenklatur des Komplementsystems

Die Nomenklatur für Proteine, welche an der Komplementaktivierung beteiligt sind, folgen zwei Konventionen der World Health Organization.

Elf Proteine, welche ursprünglich als Komponenten des klassischen Wegs beschrieben wurden, werden mit einem „C“ und einer Nummer von 1-9 bezeichnet. C1 ist ein Kalzium abhängiger Komplex mit drei verschiedenen Proteinen, als C1q, C1r und C1s benannt.

Zwei Proteine, welche an der Aktivierung über den alternativen Weg beteiligt sind, werden Faktoren genannt und werden durch Grossbuchstaben symbolisiert (z.B. Faktor B und Faktor D).

Proteine des Lektin-Wegs werden durch Abkürzungen ihrer Namen dargestellt (z.B. MBL für Mannan-Bindendes-Lektin). Wird ein Strich über das Proteinsymbol gelegt, spricht man von der aktiven Form. Proteolytische Spaltprodukte werden mit Kleinbuchstaben versehen (z.B. C2a und C2b) und inaktive Proteine oder Proteinfragmente werden durch ein „i“ gekennzeichnet (z.B. C3i, C2ai).

Einige der regulatorischen Proteine, welche initial dem alternativen Weg zugeschrieben wurden, bezeichnet man als Faktoren und markiert sie mit einem Grosbuchstaben (z.B. Faktor H und Faktor I). Andere regulatorische Proteine werden durch die Abkürzung ihrer Namen dargestellt (z.B. DAF für *Decay-Accelerating-Faktor*).

Membran-gebundene Proteine wurden einer CD (Cluster of Differentiation) Nummer zugeteilt (siehe 1.6. Cluster of Differentiation).

Vier der Komplementrezeptoren werden mit CR (für complement receptor) und den Nummern von 1-4 bezeichnet. Die restlichen Rezeptoren werden mit dem Symbol für das Protein / Proteinfragment, welches sie binden, und einem „R“ bezeichnet. (z.B. C1qR, C5aR). Den meisten Komplementrezeptoren wurde eine CD-Nummer zugeschrieben.

Polypeptidketten von nativem Komplement werden, mit Ausnahme von C1q, welche mit den Großbuchstaben A, B, C benannt werden, mit griechischen Kleinbuchstaben markiert (z.B. α , β) (Volanakis und Frank 1998).

Tabelle I: Einteilung der Komplementproteine

Native Form	Funktionelle Gruppe		
	Am Aktivierungs-Ablauf beteiligt	Regulatoren	Zellrezeptoren
Im Serum gelöst	C1q, MBL, C1r, C1s, MASP, D, C2, B, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9	C1INH, C4bp, H, I, P, C3a/C5a INA, S Protein, SP 40/40	
Membran gebunden		CR1, DAF, MCP, HRF, CD59	C1qR, C3aR, C5aR, CR1, CR2, CR3, CR4

Abk.: INH = **I**nhibitor, C4bp = C4-**b**indendes **p**rotein, INA = **I**nactivator, R = **R**ezeptor (z.B. CR1: complementrezeptor 1), MBL = **M**annose-**B**indendes-**L**ekting, MASP: **M**BL-assozierte **s**erine **p**rotease, DAF: **d**ecay-**a**cceleratin **f**actor, MCP: **m**embran **c**ofactor **p**rotein, HRF: **h**omologous **r**estriction **f**actor.

CD der membrangebundenen Proteine: CR1, CD35, CR2, CD21, CR3, CD18/CD11b, CR4, CD18/CD11c, C5aR, CD88, DAF, MCP, CD46

(aus Volanakis und Frank 1998).

Tabelle II: Komponenten des Klassischen Wegs

<i>Nativ-Komponenten</i>	<i>Aktive Komponenten</i>	<i>Funktionen</i>
C1 (q,r,s)	C1q	Bindet an Antigenbeladene Antikörper, aktiviert C1r
	C1r	Spaltet C1s um die Protease-Funktion zu aktivieren
	C1s	Spaltet C2 und C4.
C2	C2a	Stellt das katalytische Zentrum für die Konvertase-Komplexe bereit.
	C2b	Aktives Enzym des klassischen Wegs, spaltet C3 und C5.
C3	C3a	Vermittelt Entzündung, Anaphylatoxin
	C3b	Bindet C5 zur Spaltung durch C2b. Bindet an Zelloberflächen zur Opsonisierung und Aktivierung des Alternativen Wegs.
C4	C4a	Vermittelt Entzündung
	C4b	Bindet C2 zur Spaltung durch C1s. Bindet an Zelloberflächen zur Opsonisierung.

Tabelle III: Komponenten des Lektin Wegs

<i>Proteine</i>	<i>Funktion</i>
MBL	Bindet an Aktivatoren und initiiert den Lektin Weg
MASP-1	Serin-Protease, bildet mit MBL einen Komplex. Aktiviert C2, spaltet C3 (Matsushita et al., 2000)
MASP-2	Serin-Protease, bildet mit MBL einen Komplex. Aktiviert C4 und C2 um die C3-Konvertase zu generieren (Schwaeble et al., 2002)
MASP-3	Reguliert die C4- und C2-spaltende Aktivität von MASP-2 herunter (Dahl et al., 2001)

Tabelle IV: Komponenten des Alternativen Wegs

<i>Nativ-Komponenten</i>	<i>Aktive Komponenten</i>	<i>Funktionen</i>
C3	C3a	Vermittelt Entzündung, Anaphylatoxin
	C3b	Bindet an Zelloberflächen zur Opsonisierung und Aktivierung des Alternativen Wegs. Bindet Faktor B für dessen Spaltung durch Faktor D. Ist Bestandteil der C3-/C5-Konvertase
Faktor B	B	Bindet Membrangebundenes C3b, wird durch Faktor D gespalten.
	Ba	Unbekannt

	Bb	Aktives Enzym der C3-/C5-Konvertase
Faktor D	D	Spaltet an C3b gebundenen Faktor B.
Properdin (Faktor P)	P	Bindet und stabilisiert membrangebundene C3-Konvertase

Tabelle V: Terminale Komplementkomponenten

<i>Natives Protein</i>	<i>Aktive Komponente</i>	<i>Funktion</i>
C5	C5a	Hochwirksamer Entzündungsmediator
	C5b	Regt die Bildung des MAC an.
C6	C6	Bindet an C5b, Anlagerungsstelle für C7.
C7	C7	Bindet an C5bC6, amphiphiler Komplex integriert in Lipiddoppelschicht.
C8	C8	Bindet an C5b-C7, löst Polymerisierung von C9 aus.
C9	C9	Polimerisiert an C5b-C8, bildet dadurch eine Pore, löst Zelllyse aus.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. G. Bruchelt für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe, für seine Anregungen und für das große Interesse, welches er der Arbeit entgegenbrachte;
- Frau Dr. Claudia Gerber dafür, dass sie mich stets mit großem Engagement, ihrer fachlichen Kompetenz und konstruktiven Anregungen unterstützt hat, für das Bereitstellen der Proben für die in-vivo-Versuche sowie für das Korrekturlesen;
- Herrn Prof. Dr. R. Wahl für die Erstellung des Zweitgutachtens;
- meinen Probanden, welche Blut für diese Arbeit spendeten;
- allen Kooperationspartnern, die diese Arbeit ermöglicht haben,
- besonders Frau Andrea Kimpfler für die Herstellung und Charakterisierung der Liposomen;
- Herrn Prof. Dr. M. Kirschfink, Heidelberg, für die theoretische Unterstützung beim Etablieren des CH₅₀ im Mausmodell;
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie der Forschungs- und
- Routinelabors für das kollegiale, freundliche Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche in der einen oder anderen Kaffeepause;
- meiner Freundin Christine für ihre unerlässliche Hilfe im Kampf mit Word;
- meinen Freunden, die nicht namentlich genannt sind, für die moralische Unterstützung und das immer wieder Aufbauen und Motivieren;
- ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für das Ermöglichen meiner Ausbildung, für ihr immerwährendes Verständnis und ihre Unterstützung;
- der letzte Dank gebührt meinem Mann Ralf für all seine Unterstützung, das Korrekturlesen und dass er immer für mich da ist.

LEBENS LAUF

Name, Vorname: Bauer, Daniela, geb. Fieder

Geburtsdatum: 16.04.1976

Geburtsort: Stuttgart

Berufsausbildung

Seit 2010	Neurologische Klinik, Klinikum Ludwigshafen am Rhein
2009	Neurologische Klinik, Diakoniekrankenhaus Mannheim
2008 – 2009	Neurologie und Neurologie Rehabilitation, Hôpitaux Universitaires de Genève, Schweiz.

Schulbildung und Hochschulbildung

2007 – 2012	Dissertation an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Tübingen.
2000 – 2007	Ärztliche Prüfung, Eberhard-Karls-Universität Tübingen 2002 Ärztliche Vorprüfung 2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2005 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1997	Isolde-Kurz-Gymnasium, Reutlingen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife. High School Diploma, St. Mary's Academy, Portland, USA.