

LIPOPEPTIDMODIFIZIERTE LIPOSOMEN
UND IHRE EFFEKTE AUF DENDRITISCHE ZELLEN

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von

Benjamin Wessinger

aus Stuttgart

vorgelegt im Mai 2010

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rainer H. Müller

Disputation am 23.07.2010

meiner Frau Sarah und meinen Kindern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung und Zielstellung	1
I.1 Liposomen	2
I.1.1 Liposomen zur Tumorstimmulierung	6
I.1.2 Eigenschaften von Liposomen	7
I.1.3 Cholesterin in Liposomen	9
I.1.4 Einteilung von Liposomen	10
I.1.5 Herstellung von Liposomen	11
I.1.5.1 Scaling-up	12
I.1.5.2 Weitere Herstellungsverfahren	13
I.2 Antigen-präsentierende Zellen	15
I.2.1 Makrophagen	15
I.2.2 Dendritische Zellen	16
I.2.3 Antigenpräsentation über MHC-I	18
I.2.4 Antigenpräsentation über MHC-II	18
I.2.5 Cross-Presentation und Cross-Priming	20
I.2.6 Tumorstherapie mit DC	21
I.2.7 Toll-like Rezeptoren	22
I.2.7.1 TLR3	23
I.2.7.2 TLR7, 8 und 9	23

Inhaltsverzeichnis

I.2.7.3 TLR4	25
I.2.7.4 TLR1, 2 und 6	25
I.2.7.5 Stimulierung mehrerer TLR	26
I.2.8 Lipopeptide	27
I.2.8.1 FSL-1 und FSL-2	28
I.2.8.2 Triacylierte synthetische Lipopeptide	29
I.2.9 Monocyte-derived dendritic cells	30
I.2.10 THP-1-Makrophagen	30
I.3 Partikuläre Antigen-Trägersysteme für APC	32
I.3.1 Liposomen als Antigen-Trägersysteme	32
I.3.2 TLR-Liganden in Liposomen	34
I.3.3 Fazit	35
I.4 Zielstellung	37
II Materialien und Methoden	39
II.1 Liposomen	39
II.1.1 Liposomen-Herstellung	39
II.1.1.1 Filmbilde-Methode	39
II.1.1.2 Hydratation-Rehydratation-Methoden	40
II.1.2 Charakterisierung der Liposomen	41
II.1.2.1 Teilchengröße und Größenverteilung	41

II.1.2.2 Oberflächenladung	41
II.2 Kopplung von Stearylamin an FITC	42
II.3 Lipopeptide	44
II.3.1 Lipopeptid-Gehaltsbestimmung	44
II.4 Zellkultur	46
II.4.1 Kultivierungsbedingungen für THP-1	46
II.4.2 Endozytose-Assay	46
II.4.3 MTT-Test	48
II.4.4 TNF- α -Assay	49
II.4.4.1 Bestimmung der TNF- α -Konzentration	49
II.5 Versuche an moDC	51
III Ergebnisse und Diskussion	55
III.1 Liposomen ohne Lipopeptide	55
III.1.1 Cholesterolkonzentration in Liposomen	55
III.1.2 Extrusion der Liposomen	58
III.1.2.1 Einfluss auf die Teilchengröße	58
III.1.2.2 Einfluss auf das Zetapotenzial	59
III.1.2.3 Einfluss auf die Endozytose durch THP-1	61
III.1.2.4 Anzahl der Extrusionen	62
III.1.3 Oberflächenladung der Liposomen	63

Inhaltsverzeichnis

III.1.4 Standard-Formulierung	69
III.1.5 Stabilität der Liposomen	70
III.1.6 Endocytose von Liposomen durch THP-1	72
III.1.7 Einfluss von Liposomen auf moDC	75
III.1.7.1 Zytotoxizität	78
III.1.7.2 Nachreifung der moDC	79
III.1.7.3 Fazit	81
III.2. Quantifizierung der Lipopeptide	83
III.3 Herstellung lipopeptidbeladener Liposomen	87
III.3.1 Nachträgliche Beladung fertiger Liposomen	87
III.3.1.1 Freeze and Thaw-Methode	87
III.3.2. Lipopeptid-Einbau während der Liposomenbildung	93
III.3.2.1 Filmbildemethode	93
III.3.2.2 Hydration-Rehydration-Methode	93
III.3.2.3 Beurteilung der Herstellungsmethoden	94
III.4 Effekte von Lipopeptid-Liposomen auf APC	96
III.4.1 Untersuchungen an THP-1	96
III.4.1.1 TNF- α -Produktion	96
III.4.1.2 Zytotoxizität (MTT)	101
III.4.1.3 Fazit	101

III.4.2 Untersuchungen an moDC_____	102
III.4.2.1 Lokalisation von TLR2 bei DC_____	102
III.4.2.2 Aufnahme der Liposomen in DC_____	105
III.4.2.3 Zellvitalität_____	108
III.4.2.4 Auswirkung von FSL-1-Liposomen auf den DC-Phänotyp_____	110
III.4.2.5 Fazit_____	115
IV Zusammenfassung_____	117
V Summary_____	119
VI Literatur_____	121
VII Abkürzungen_____	135
VIII Publikationen_____	139
VIII.1 Zeitschriftenbeiträge_____	139
VIII.2 Vorträge_____	139
VIII.3 Poster_____	139
IX Lebenslauf_____	141
IX.1 Persönliche Angaben_____	141
IX.2 Ausbildung und Werdegang_____	141
X Danksagungen_____	143

I Einleitung und Zielstellung

Das Immunsystem des Menschen bekämpft nicht nur in den Körper eingedrungene Erreger und Parasiten, sondern es ist auch in der Lage, entartete Körperzellen zu vernichten. Dabei spielen, wie bei der Infektabwehr auch, die dendritischen Zellen (DC) eine Schlüsselrolle. Diese professionellen Antigen-präsentierenden Zellen sind in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und steuern so das erworbene, spezifische Immunsystem.

Deshalb gibt es seit vielen Jahren große Bemühungen, Krebstherapien zu entwickeln, die eine antitumorale Immunantwort auslösen und/oder unterstützen. Ein vielversprechender Ansatz ist dabei die sogenannte DC-Therapie, bei der DC von Patienten *ex vivo* mit Tumorantigenen beladen, zur Reifung gebracht und dem Patienten dann reinfundiert werden. Die klinischen Erfolge solcher experimenteller Immuntherapien sind bisher jedoch – trotz einzelner ermutigender Beispiele – oft enttäuschend.

Die Bekämpfung entarteter Zellen bzw. Tumoren durch das Immunsystem wird dadurch erschwert, dass die zu bekämpfenden Zellen aus körpereigenen Zellen hervorgegangen sind und oft nur schwach immunogene Antigene besitzen. In vielen Fällen exprimieren Tumorzellen gar keine Tumor-spezifischen Antigene (Antigene, die ausschließlich auf Tumorzellen vorkommen), sondern sogenannte Tumor-assoziierte Antigene. Das sind physiologisch vorkommende Oberflächenantigene, die auf den Tumorzellen überexprimiert werden.

Ein weiteres Problem ist, dass viele Tumoren über sogenannte Tumor-Escape-Mechanismen das Immunsystem beeinflussen und zu ihren Gunsten regulieren. Einer dieser Mechanismen ist eine unvollständige oder ausbleibende Reifung von DC.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines lipopeptidbeladenen liposomalen Trägersystems und dessen Effekte auf Antigen-präsentierende Zellen, v. a. DC. Diese synthetischen Lipopeptide sind Analoga bakterieller Lipoproteine, die über den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) das Immunsystem aktivieren. Unter anderem

I Einleitung und Zielstellung

kann eine Aktivierung des TLR2 auf DC zu einer Reifung dieser Zellen führen, welche dann effektiv eine T-Zell-Antwort induzieren.

In solche Lipopeptid-Liposomen könnten in weiteren Arbeiten zusätzlich (amphiphile) Antigene inkorporiert werden. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, (Tumor-) Antigene zusammen mit einem Reifungsstimulans in einem partikulären Trägersystem zu applizieren, um dadurch DC *ex vivo* effektiver zu stimulieren.

I.1 Liposomen

Liposomen sind sphärische, abgeschlossene Strukturen, die von einer oder mehreren konzentrischen Lipid-Doppelschichten (Bilayer) gebildet werden und eine wässrige Phase im Inneren und zwischen den Bilayern besitzen (Torchilin 2005). Dabei sind die einzelnen Lipid-Moleküle in der Doppelschicht so angeordnet, dass die hydrophilen polaren Kopfgruppen nach außen, zum (wässrigen) Suspensionsmedium, bzw. nach innen zum wässrigen Kern des Liposoms orientiert sind. Die lipophilen Domänen der Lipide, vor allem die Fettsäuren der Phospholipide, zeigen in das Innere der Doppelmembran und bilden eine lipophile Phase. Dieser Aufbau ähnelt stark dem biologischer Zellmembranen.

Liposomen bestehen meist aus einer Mischung von verschiedenen Phospholipiden und Cholesterol, wobei die Phospholipide synthetisch, halbsynthetisch oder natürlichen Ursprungs sein können. Am weitesten verbreitet sind Mischungen natürlicher Phosphatidylcholine (Lecithin), die aus Soja oder Hühnerei isoliert werden. Es werden aber auch eine ganze Reihe weiterer Phospholipide oder auch anderer Lipide eingesetzt, um spezielle Eigenschaften der Membran zu erreichen. Phospholipide sind biologisch abbaubar und nicht toxisch, sie finden weiten Einsatz in der Lebensmittelindustrie, in Arzneimitteln und Kosmetika.

Die Größe von Liposomen reicht von unter 50 nm bis zu einigen Mikrometern und lässt sich durch die Lipidmischung und v. a. den Herstellungsprozess gut steuern.

Auch andere physikalisch-chemische Parameter wie die Oberflächenladung lassen sich anpassen.

Werden Phospholipide im Wässrigen dispergiert, entstehen spontan Liposomen, da sich die amphiphilen Lecithine so anordnen, dass die hydrophilen Kopfgruppen mit dem wässrigen Dispersionsmedium wechselwirken, während sich die lipophilen Fettsäurereste zueinander orientieren. Dadurch entstehen Vesikel, die zumeist multilamellar sind, das heißt, sie bestehen aus mehreren konzentrischen Doppelmembranen. Diese Eigenschaften von Phospholipidmembranen wurde 1964/65 von Bangham entdeckt, als er in Wasser dispergierte Lecithine und Lecithin-Cholesterol-Gemische elektronenmikroskopisch untersuchte (Bangham und Horne 1964; Bangham et al. 1965). Er entdeckte dabei sowohl die Bilayer-Struktur, die er als „bimolecular leaflet arrangement“ (Bangham und Horne 1964), also als bimolekulare Faltblatt-Anordnung, bezeichnete, als auch die sphärische Form der konzentrisch angeordneten Membranen. Diese Anordnung wird heute als LMV (*Large Multilamellar Vesicles*) bezeichnet.

In den Anfangsjahren wurden Liposomen als Modelle für Zellmembranen verwendet. So wurde an ihnen der Transport von chemischen Verbindungen, Ionen und auch Arzneistoffen durch Membranen bzw. der Einfluss verschiedener Stoffe auf diese Membranen untersucht (Bangham et al. 1965, Sessa und Weissmann 1968, Kinsky et al. 1968). Doch bereits wenig später wurde die Eignung von Liposomen als Trägersystem für Arzneistoffe und Enzyme erkannt und untersucht: 1970 wurde Lysozym in Liposomen verkapselt um ein Modell für Lysosomen zu erhalten (Sessa und Weissmann 1970), bereits 1971 wurde der erste Versuch unternommen, ein Enzym, Amyloglucosidase, zur Substitution bei genetischen Enzymmangelkrankheiten liposomal zu verkapseln (Gregoriadis et al. 1971). 1972 wurden zum ersten Mal Antikörper, IgG gegen das Coxsackie-Virus, liposomal verpackt und ihre antivirale Wirkung an Zellen getestet (Magee und Miller 1972). Zwei Jahre später wurde vorgeschlagen, Liposomen mit zytostatischen Arzneistoffen für die Krebstherapie zu beladen. Damals wurden erstmals Liposomen in Menschen injiziert und ihr Verbleib in Blutbahn bzw. Gewebe untersucht (Gregoriadis et al. 1974). 1975

I Einleitung und Zielstellung

erschienen erste Berichte über den Einbau von Actinomycin D und 5-Fluoruracil in Liposomen und ihre Injektion in Mäuse (Segal et al. 1975). Ebenfalls bereits 1974 schlugen Allison und Gregoriadis vor, Liposomen als Trägersysteme für Antigene zu verwenden, weil sie zeigen konnten, dass Mäuse deutlich mehr Antikörper gegen Diphtherie-Toxoid bildeten, wenn ihnen das Antigen liposomal verkapselt appliziert wurde, als wenn sie es als freies Antigen injiziert bekamen (Allison und Gregoriadis 1974).

Dank ihrer Struktur eignen sich Liposomen als Trägersysteme für hydrophile sowie lipophile Substanzen, für niedermolekulare Verbindungen, Nukleinsäuren und Proteine. Hydrophile Stoffe können im wässrigen Kern eingeschlossen werden, lipophile Substanzen können in die Lipidphase eingelagert werden.

Etliche liposomale Arzneimittel sind zugelassen bzw. befinden sich in klinischen Studien (siehe Tab. I.1). Bei den meisten handelt es sich um Zytostatika bzw. Chemotherapeutika, die durch die liposomale Verkapselung besser in das Tumorgewebe transportiert werden. Dadurch steigt ihre Wirksamkeit, was wiederum niedrigere Dosen ermöglicht und damit zu einer Verringerung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen führt. Auch Antimykotika und eine Morphin-Formulierung sind in liposomaler Form auf dem Markt.

Dass Liposomen in Tumorgewebe akkumulieren, wird als *Enhanced Permeation and Retention Effect* (EPR; verstärkte Permeation und Retention) bezeichnet. Dieser Effekt ist vor allem für Liposomen, die mit einem Polymer wie Polyethylenglykol (PEG) beschichtet sind, beschrieben. Solche PEG-Liposomen zirkulieren länger in der Blutbahn als nicht-modifizierte Liposomen, da sie nicht von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) eliminiert werden. Dadurch gelangen sie in Kapillaren, die Tumoren versorgen. Diese Kapillaren zeichnen sich u. a. durch ein fenestriertes Endothel aus, so dass die Liposomen dort die Blutbahn verlassen und in Tumorgewebe eindringen können (Maeda et al. 2000).

Tab. I.1: Liposomale Arzneimittel im Handel bzw. in klinischer Prüfung.
Stand April 2010 (Schubert 2010, Torchilin 2005)

Arzneistoff (INN)	Produktname	Indikation	Status
Amphotericin B	AmBisome [®]	systemische Mykosen	a.M.
Cytarabin	Depocyte [®]	akute lymphatische Leukämie	a.M.
Daunorubicin	DaunoXome [®]	Kaposi-Sarkom	a.M.
Doxorubicin	Myocet [®]	metastasierendes Mammakarzinom	a.M.
Doxorubicin in PEG-Liposomen	Doxil [®] /Caelyx [®]	Kaposi-Sarkom, metastasierendes Mammakarzinom, Ovarialkarzinom	a.M.
Morphinsulfat	DepoDur [®]	postoperative Schmerzen	a.M.
Annamycin	n. n.	akute lymphatische/myeloide Leukämie	Ph. II
Aroplatin	n. n.	Colorektalkarzinom	Ph. I
Irinotecan	PEP02	metastasierendes Pankreaskarzinom	Ph. II
Lurtotecan	OSI-211	Ovarialkarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom	Ph. II
pDNA für HLA-B7 u. β 2-Microglobulin	Allovectin-7 [®]	metastasierendes Melanom	Ph. III
Tretinoin	Atragen [®]	Hodgkin-Lymphom, Nierenzellkarzinom	Ph. II
Vincristin	Marqibo [®]	akute lymphatische Leukämie	Ph. I

a.M.: am Markt; Ph. I: in klinischer Phase I-Studie; Ph. II: in klinischer Phase II-Studie; Ph. III: in klinischer Phase III-Studie; pDNA: Plasmid-DNA

I Einleitung und Zielstellung

I.1.1 Liposomen zur Tumorstimmung

Zur Immuntherapie maligner Erkrankungen sind derzeit zwei sogenannte Tumorstimmung mit liposomalen Formulierungen in fortgeschrittenen Stadien der klinischen Erprobung bzw. in einzelnen Ländern auf dem Markt.

Oncophage[®] ist eine liposomale Zubereitung von HSPPC-96 (*Heat shock protein-peptide-complex* '96; INN: Vitespen), welche individuell aus Tumorzellen des jeweiligen Patienten hergestellt wird. Oncophage soll nach operativer Entfernung von Nierenzellkarzinomen ein Rezidiv verhindern. Laut Angaben des Herstellers Antigenics Pharmaceuticals (Lexington, MA, USA) ist Oncophage[®] seit April 2008 in Russland zugelassen (Goldman und DeFrancesco 2009). Die EMEA (heute EMA) hat am 19. November 2009 die Zulassung für die EU abgelehnt, unter anderem da der Hersteller den Wirkmechanismus nicht detailliert darlegen konnte („There was also not enough information to clarify the way Oncophage works in renal cell carcinoma and to determine the appropriate dose of the medicine.“ EMEA 2009).

Stimuvax[®] (INN: L-BLP25) ist eine Vakzine gegen Tumoren, die das Oberflächenprotein MUC-1 überexprimieren. Dabei wird das überexprimierte Protein nur unvollständig glykosyliert. L-BLP25 besteht aus dem Antigen, einem synthetischen Lipopeptid, das einen Teil von MUC-1 darstellt und das mit einer Palmitoyle Säure gekoppelt ist, und dem Adjuvans Monophosphoryl-Lipid A in einer liposomalen Formulierung (Sangha und Butts 2007). Monophosphoryl-Lipid A ist ein halbsynthetisches Analogon des Lipid A aus *E. coli*-LPS und ein potenter TLR4-Agonist (Raetz und Whitfield 2002). Nach Aussagen des Herstellers Merck KGaA, Darmstadt, befindet sich Stimuvax seit 2007 in klinischen Studien der Phase III bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) des Stadiums III (START-Studie) und seit 2009 an Patienten mit nicht-resezierbarem Brustkrebs (STRIDE-Studie) (Merck KGaA 2009).

Darüber hinaus ist in 34 Ländern, darunter Deutschland, die liposomale Influenza-Vakzine Inflexal[®] V (Hersteller in Deutschland: Baxter GmbH, Unterschleißheim) auf dem Markt. Sie enthält Antigene dreier Influenzastämme in einer liposomalen

Formulierung. Da die viralen Antigene Neuraminidase und Hämagglutinin wie bei einem Viruspartikel in die Liposomenmembran integriert sind, spricht man auch von Virosomen (Herzog et al. 2009).

Bei allen diesen Ansätzen macht man sich zunutze, dass durch Liposomen exogene Antigene, die eigentlich einer Präsentation auf MHC-II vorbehalten sind, von den Antigen-präsentierenden Zellen auch auf MHC-I präsentiert werden können. Diese Tatsache wird auch als *Cross-presentation* (Kreuzpräsentation) bezeichnet (siehe Kapitel I.2.5).

I.1.2 Eigenschaften von Liposomen

In den allermeisten Fällen bestehen Liposomen aus Phospholipiden, oft im Gemisch mit Cholesterol (Jesorka und Orwar 2008). Bei den Phospholipiden spielt Phosphatidylcholin eine herausragende Rolle (siehe Abb. I.1). Dieses besteht aus einem Glycerol-Rückgrat, das in den Positionen 2 und 3 mit je einer Fettsäure verestert ist. Position 1 ist aber, anders als bei Triacylglyceriden, nicht mit einer Fettsäure, sondern mit Phosphorsäure verestert (Phosphatidylsäure). Diese Phosphatgruppe wiederum ist mit Cholin verestert. Die Phospholipide (auch Phosphorylglyceride genannt) unterscheiden sich in der Verbindung, mit der die

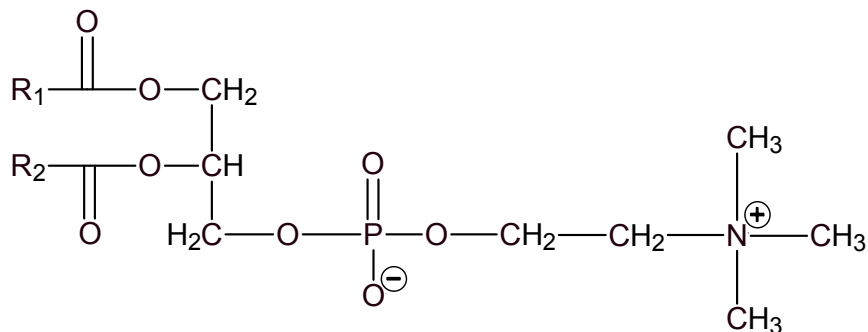


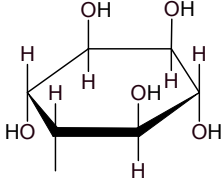
Abb. I.1: Strukturformel von Phosphatidylcholin.

R₁ und R₂: verschiedene Alkylgruppen (s. Tab. I.2)

I Einleitung und Zielstellung

Phosphorsäuregruppe verestert ist (siehe Tab. I.2). Darüber hinaus können die Fettsäuren am C-2 und C-3 unterschiedliche Längen und Sättigungsgrade besitzen. Die typische Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylcholin aus Eigelb bzw. Soja ist in Tab. I.3 zusammengefasst.

Tab. I.2: Häufig in Phospholipiden als Kopfgruppe vorkommende Alkoholreste (Vemuri und Rhodes 1995)

Phospholipid	-R (Alkohol)
Phosphatidylcholin	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Phosphatidylserin	$-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$
Phosphatidylethanolamin	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$
Phosphatidylglycerol	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$
Phosphatidylinositol	

Von der Kopfgruppe der Phospholipide hängt u. a. die Oberflächenladung der aus ihnen bestehenden Liposomen ab. Die Phosphatgruppe ist bei physiologischem pH-Wert einfach deprotoniert und daher negativ geladen. Da Ethanolamin bei physiologischem pH-Wert und Cholin permanent positiv geladen sind, zeigen die mit ihnen veresterten Phospholipide keine Nettoladung. Dagegen sind die anderen hier vorgestellten Phospholipide insgesamt negativ geladen, da sie ungeladene Kopfgruppen besitzen.

Die Eigenschaften der Liposomenmembran hängen neben der Ladung auch von der Länge und dem Sättigungsgrad der verwendeten Lipide ab. Grundsätzlich sinkt die

Fluidität der Liposomenmembran mit steigender Kettenlänge und steigendem Sättigungsgrad der Fettsäuren in den Lipiden (Singer 1981).

Tab. I.3.: Typische Zusammensetzung von Phosphatidylcholin aus Eigelb und Soja. Angaben in % (m/m) (Vemuri und Rhodes 1995)

Fettsäure		Phosphatidylcholin aus	
		Eigelb	Soja
Palmitinsäure	(16:0)	32	12
Palmitoleinsäure	(16:1)	1,5	< 0,2
Stearinsäure	(18:0)	16	2,3
Oleinsäure	(18:1)	26	10
Linolsäure	(18:2)	13	68
Linolensäure	(18:3)	< 0,3	5
Arachidonsäure	(20:4)	4,8	< 0,1
Docosapentaensäure	(22:5)	4,0	< 0,1

I.1.3 Cholesterol in Liposomen

Häufig wird der Liposomenformulierung Cholesterol beigelegt. Cholesterol (Abb. I.2) ist ein natürlicher Bestandteil von tierischen Zellmembranen und kommt dort in unterschiedlichen Gehalten vor.

Cholesterol senkt in biologischen Membranen das sogenannte *Cation leakage*, also die Diffusion von Kationen durch die Membran. Dadurch ist Cholesterol essenziell für die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials (Haines 2001). Auch in Liposomenbilagern reduziert Cholesterol die Membranpermeabilität für in den Kern eingeschlossene Stoffe (*Drug leakage*) (Szoka und Papahadjopoulos 1980). So konnte

I Einleitung und Zielstellung

gezeigt werden, dass das Leakage von eingeschlossenem Carboxyfluorescein durch Zugabe von Cholesterol zur Liposomenformulierung drastisch gesenkt wurde (Crommelin und Van Bommel 1984). Die Cholesterolmoleküle lagern sich in der entstehenden Membran so ein, dass ihre hydrophilen Hydroxylgruppen zu den polaren Kopfgruppen der Phospholipide zeigen, während die lipophilen Ringsysteme nach innen in die lipophile Phase des Bilayers ragen. Durch den Einbau von Cholesterol in die Membran können „Störungen“ in der Struktur, die durch Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren hervorgerufen werden ausgeglichen werden, wodurch die Fluidität sinkt und die Membran rigider wird (Guyer und Bloch 1983).

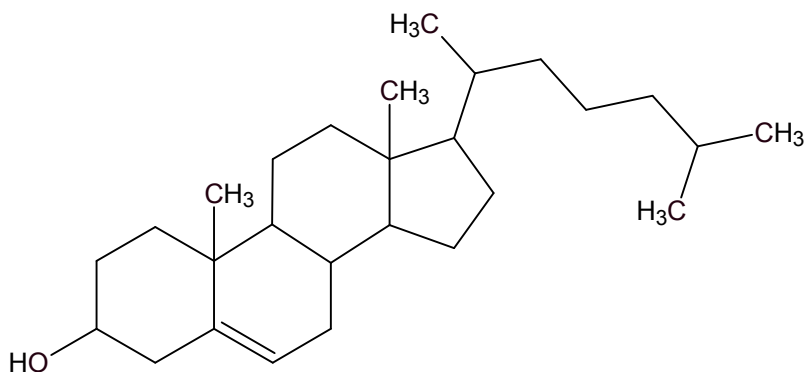


Abb. I.2: Strukturformel von Cholesterol

I.1.4 Einteilung von Liposomen

Neben der Einteilung der Liposomen nach ihren Bestandteilen lassen sich Liposomen auch nach ihrer Oberflächenladung in positiv (sogenannte kationische), negativ (sogenannte anionische) und nicht geladene (sogenannte neutrale) Liposomen einteilen. Am gebräuchlichsten ist die Klassifizierung nach der Größe und der Lamellarität (Anzahl der konzentrischen Bilayer pro Vesikel). Eine kurze Zusammenfassung gibt die Tabelle I.4.

Tab. I.4: Klassifizierung von Liposomen

(Szoka und Papahadjopoulos 1980, Vemuri und Rhodes 1995)

Einteilung nach	Klassifizierung	
Lamellarität	MLV	mehrere konzentrische Bilayer (multilamellar)
	ULV	ein Bilayer (unilamellar)
Größe	SUV	< 50-100 nm Durchmesser
	LUV	> 100 nm
	GMV	> 1000 nm

SUV: *Small unilamellar vesicles*, kleine unilamellare Vesikel; LUV: *Large unilamellar vesicles*, große unilamellare Vesikel; GMV: *Giant multilamellar vesicles*, riesige multilamellare Vesikel; MLV: multilamellare Vesikel; ULV: unilamellare Vesikel

I.1.5 Herstellung von Liposomen

Wie bereits erwähnt, bilden sich Liposomen spontan, wenn (Phospho-) Lipide im Wässrigen dispergiert werden. Dabei entstehen meist undefinierte Mischungen aus uni- und multilamellaren Vesikeln verschiedenster Größe. Durch definierte Herstellungsbedingungen und kontrollierte Verkleinerungsprozesse lassen sich Liposomendispersionen mit gewünschter Partikelgröße, enger Teilchengrößenverteilung und einer definierten Lamellarität herstellen. Durch die Wahl der richtigen Lipide bzw. durch Zusatz weiterer Stoffe lassen sich weitere Charakteristika wie die Oberflächenladung beeinflussen.

Die älteste Herstellungsmethode – und bis heute die im Labormaßstab am häufigsten verwendete – ist die Filmbildemethode (Bangham et al. 1965). Dabei werden die

I Einleitung und Zielstellung

Lipide in organischem Lösungsmittel gelöst, welches dann z. B. unter verringertem Druck verdampft (Rotationsverdampfer) oder durch einen Stickstoff-Strom entfernt wird. Dabei bildet sich ein dünner Lipidfilm an der Gefäßwand. Dieser wird anschließend im wässrigen Milieu dispergiert. Daher auch die englische Bezeichnung *Thin film hydration*. Anschließend lassen sich die entstandenen MLV durch Ultraschallbehandlung und/oder Extrusion in SUV der gewünschten Größe verwandeln.

Für die Ultraschallbehandlung werden meist Ultraschallstäbe verwendet, da hier der Energieeintrag größer ist als bei einem Ultraschallbad. Allerdings wird bei der Verwendung eines Ultraschallstabes zum Einen die Liposomendispersion lokal sehr stark erhitzt, was bei thermolabilen Inhaltsstoffen problematisch ist. Zum Anderen findet man in der Dispersion nach der Behandlung feinsten Abrieb der Titanspitze des Stabes, der durch Zentrifugation entfernt werden muss. Bei der Behandlung im Ultraschallbad wird im Allgemeinen weniger Energie eingetragen, deshalb ist diese Behandlung weniger effektiv als die mit dem Stab. Dafür kann man durch eine Temperierung des Wassers die Erwärmung der Dispersion vermeiden und es findet kein exogener Stoffeintrag in die Dispersion statt. Damit ist diese Methode z. B. auch für sterile Zubereitungen geeignet (Vemuri und Rhodes 1995).

Bei der Extrusion wird die Liposomendispersion mehrmals durch Kunststoffmembranen, meist aus Polycarbonat, gepresst. Dabei kann man durch die Wahl des Durchmessers der Poren in der Membran direkt die Größe der entstehenden Partikel beeinflussen.

I.1.5.1 Scaling-up

Die Filmbildemethode mit anschließender Partikelgrößeneinstellung ist im Labormaßstab eine einfache und robuste Methode, die sehr kleine Probenvolumina (unter 1 ml) ermöglicht, was bei teuren und seltenen Ausgangsstoffen vorteilhaft ist. Allerdings ist ein Scaling-up auf Produktionsmaßstäbe nicht möglich.

Für diese Zwecke hat sich heute die sogenannte Ethanol-Injektionsmethode durchgesetzt. Dabei werden die in Ethanol gelösten Lipide als definierte Tropfen in die wässrige Phase injiziert, wobei direkt unilamellare Vesikel entstehen (Batzri und Korn 1973). Die Teilchengröße lässt sich durch das injizierte Volumen bzw. durch einen Homogenisator steuern. Diese Herstellungsmethode erfordert einen deutlich größeren Optimierungsaufwand als die Filmbildemethode, lässt sich aber für nahezu jedes Produktionsvolumen einsetzen, da sie ein kontinuierlicher Prozess ist (Naeff 1996). Ein Nachteil der Methode ist die begrenzte Lipidkonzentration in der entstehenden Liposomendispersion. Da die meisten Lipide in Ethanol nicht gut löslich sind, ist eine Erhöhung der Lipidkonzentration nur durch eine Erhöhung des injizierten Volumens möglich. Dadurch steigt aber auch der Ethanolgehalt des Dispersionsmediums an. Bei zu hohen Ethanolkonzentrationen wird die Liposomenbildung gestört und letztlich unmöglich.

I.1.5.2 Weitere Herstellungsverfahren

Neben diesen beiden, sehr weit verbreiteten Methoden gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Verfahren zur Liposomenherstellung. Einige davon sind in der Tabelle I.5 kurz zusammengefasst.

Auch wenn sich die Euphorie, mit denen Liposomen in den 1980er und '90er Jahren betrachtet wurden, mittlerweile etwas gelegt hat, so haben sie sich doch in einigen Gebieten etablieren können. Es sind diverse Kosmetika, einige Arzneimittel und auch Vakzine mit liposomaler Formulierung auf dem Markt. Die Vorteile dieser Arzneiform liegen in der Möglichkeit, hydrophile wie lipophile – und auch amphiphile – Stoffe zu inkorporieren. Auch schwer lösliche Stoffe, wie es viele der neuen Arzneistoffkandidaten (NCE, *new chemical entities*) sind, lassen sich oft in liposomalen Formulierungen lösen.

I Einleitung und Zielstellung

Tab. I.5: Übersicht über verschiedene Liposomen-Herstellungsverfahren und die zugrundeliegenden Prinzipien der Liposomenbildung

Methoden	Prinzip	Bemerkungen	Ref.
Hochdruck-homogenisatoren, Microfluidizer, Hochdruck-Molekularpresse (French-Zellpresse)	mechanische Dispersion	Scaling-Up möglich, unilamellare Vesikel	1) 2) 1)
Reverse-Phase-Evaporation, Ether-Injektionsmethode	Ersetzen des organischen Lösemittels durch wässriges Medium	uni- und multilamellare Vesikel möglich	3) 4)
Detergent-Removal	Misch-Mizellen aus Lipid und Detergenz. Detergenz durch Dialyse entfernen	unilamellare Vesikel	5)
Hydratation-Rehydratation	Hydratisierte Lipide werden getrocknet und erneut hydratisiert	multilamellare Vesikel, breite Größenverteilung	6), 7)
Freeze-Thaw-Methode	Rohdispersion wird mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut	Verfahren zur Protein-Beladung	8)

1) Hamilton et al. 1980; 2) Vemuri et al. 1990; 3) Szoka und Papahadjopoulos 1978; 4) Deamer und Bangham 1976; 5) Milsmann et al. 1978, 6) Hope et al. 1986; 7) Shew und Deamer 1985; 8) Kasahara und Hinkle 1977

I.2 Antigen-präsentierende Zellen

T-Zellen können – im Gegensatz zu Antikörpern und B-Zellen – keine ganzen Antigene erkennen, sondern nur Oligopeptide mit einer Länge von 9 bis 30 Aminosäuren. Sie sind deshalb darauf angewiesen, dass ihnen spezialisierte Zellen die Antigene präsentieren. Diese Antigen-präsentierenden Zellen (APC; *Antigen-presenting cells*), die den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-II; *Major histocompatibility complex Type II*) exprimieren, sind Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen (DC). MHC-II ist dafür verantwortlich, dass exogene Antigene, also Proteine, die die APC aufgenommen haben, prozessiert und dann auf der Oberfläche präsentiert werden. Demgegenüber präsentiert MHC-I, der auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt, endogene Proteine. Deshalb ist MHC-I essenziell für die Selbst-/Nichtselbst-Diskriminierung des Immunsystems. Darüber hinaus werden über MHC-I aber auch Pathogen-Antigene präsentiert, z. B. von Zellen, die mit Viren oder intrazellulären Bakterien befallen sind oder von entarteten Zellen.

I.2.1 Makrophagen

Makrophagen differenzieren aus Monozyten und kommen im Organismus in großer Zahl im Verdauungstrakt, in der Milz und als sogenannte Alveolarmakrophagen in der Lunge vor. Sie nehmen Pathogene hauptsächlich über Phagozytose auf, die phagozytierten Pathogene werden dabei im Phagolysosom abgetötet und abgebaut. Darüber hinaus haben Makrophagen die Aufgabe, durch die Sekretion von Zytokinen die frühe, induzierte Abwehrreaktion der erworbenen Immunantwort zu stimulieren. Zu diesem Zweck produzieren aktivierte Makrophagen u. a. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie die Interleukine (IL) IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12. Durch diese Zytokine und eine Reihe weiterer Mediatoren lösen die Makrophagen im infizierten Gewebe eine inflammatorische Reaktion aus. Für diese Aktivierung der Zytokinproduktion ist aber nicht die Phagozytose, sondern die Aktivierung über Toll-like Rezeptoren (TLR; siehe Kapitel I.2.7) verantwortlich (Zhang et al. 1999, Brightbill et al. 1999).

I Einleitung und Zielstellung

Neben der Phagozytose bedienen sich Makrophagen zur Antigen-Aufnahme auch der Makropinozytose, v. a. nach einer Aktivierung durch *Danger signals*. Diese *Danger signals* können neben Zytokinen auch Bestandteile eines Erregers sein (siehe auch Kapitel I.2.2) (Sallusto et al. 1995).

I.2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die einzigen APC, die naive T-Zellen aktivieren und primen können. DC kommen hauptsächlich in endothelialen Geweben, der Haut (Langerhans-Zellen) und den sekundären lymphatischen Geweben vor. In kleiner Zahl findet man DC aber in fast allen Geweben des Körpers (Mellman und Steinman 2001).

In Abwesenheit von entzündlichem Geschehen liegen die DC als unreife DC (iDC) vor. Sie „patrouillieren“ im Blut, in peripheren Geweben, in der Lymphe und in sekundären lymphatischen Geweben (Guermontprez et al. 2002). Dabei nehmen die Zellen ständig Selbst- und Nichtselbst-Antigene auf und prozessieren und präsentieren diese. Diese Antigen-Präsentation ist allerdings bei iDC nicht sehr stark ausgeprägt. Erst wenn ein zweiter Auslöser, ein sogenanntes *Danger signal* dazukommt, beginnt ein Prozess, der DC-Reifung (*DC maturation*) genannt wird.

DC können Antigene durch verschiedene Mechanismen aufnehmen: Über die Phagozytose werden hauptsächlich Viren, Bakterien und Mycobakterien, intrazelluläre Parasiten sowie Fragmente apoptotischer und nekrotischer Zellen aufgenommen. Durch die rezeptorvermittelte Endozytose über den C-Typ-Lektin-Rezeptor und die Fc γ -Rezeptoren Typ I und II werden vor allem opsonierte Partikel und Immunkomplexe aufgenommen. Darüber hinaus steht den Zellen noch die Makropinozytose zur Verfügung.

Unreife DC nehmen in peripheren Geweben über diese Mechanismen in großem Umfang Antigene auf. Allerdings werden diese nur zu einem sehr geringen Teil auch präsentiert, weshalb iDC nur in kleinem Maße MHC-Moleküle vom Typ II

exprimieren. Außerdem ist bei iDC die Expression von co-stimulatorischen Oberflächenmolekülen wie CD80 und CD86, welche für eine Aktivierung der T-Zellen notwendig sind, nur schwach ausgeprägt (Mellman und Steinman 2001).

Erst wenn iDC ein *Danger signal* erkennen, beginnen sie mit der Reifung. Diese *Danger signals* können zum einen Zytokine sein, meist pro-inflammatorische wie TNF- α und IL-1 β , zum anderen sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP; Pathogen-assoziierte molekulare Muster). Diese hochkonservierten Bestandteile von Erregern, wie Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien, bakterielle DNA oder virale RNA, binden an sogenannte *Pattern recognition receptors* (PRR; Mustererkennungsrezeptoren), welche unter anderem über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur DC-Reifung führen. Die wichtigste Gruppe dieser PRR stellen die Toll-like Rezeptoren (TLR) dar (siehe Kapitel I.2.7).

Wenn iDC sich zu reifen DC (mDC, *mature DC*) entwickeln, verändern sie sich morphologisch, exprimieren bestimmte Oberflächenmarker, prozessieren und präsentieren mit großer Effektivität Antigene und beginnen, zu den drainierenden Lymphknoten zu wandern. Mit Beginn der Reifung sinkt die Antigen-Aufnahme durch die DC drastisch, da Phagozytose und Makropinozytose stark nachlassen und die Expression der Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche herunterreguliert wird (Sallusto et al. 1995, Sallusto und Lanzavecchia 1994). Durch das Einstellen der Antigen-Aufnahme werden später den T-Zellen nur diejenigen Antigene präsentiert, die zusammen mit einem *Danger Signal* aufgenommen wurden, also von einem Pathogen stammen.

Gleichzeitig mit dem Sinken der Antigen-Aufnahme beginnen DC, verstärkt sogenannte Oberflächenmarker auf der Zellmembran zu exprimieren. Besonders hervorzuheben sind hier CD80 und CD86, da diese für das Priming der T-Zellen benötigt werden. Deshalb werden sie auch co-stimulatorische Moleküle genannt. Da ihre Hoch-Regulation die Reifung der DC anzeigt, werden sie oft auch als *Maturation marker* (Reifungsmarker) bezeichnet. Zu diesen wird auch das Oberflächenmolekül CD83 gezählt (Reis e Sousa 2006).

I Einleitung und Zielstellung

Während der Reifung wandern die DC zum nächstgelegenen Lymphknoten. Dabei modifizieren die Zellen ihr Zytoskelett, wodurch die charakteristischen Ausläufer entstehen, die an die Dendriten von Nervenzellen erinnern und den DC ihren Namen gaben. Diese Ausläufer dienen den mDC dazu, mit den T-Zellen in Kontakt zu treten.

I.2.3 Antigenpräsentation über MHC-I

Alle kernhaltigen Zellen präsentieren Bruchstücke von endogenen Proteinen über MHC-Moleküle vom Typ I (MHC-I). Die meisten stammen aus dem Abbau neu synthetisierter ubiquitylierter Proteine im Proteasom. Über einen spezialisierten Transporter, den *Transporter associated with antigen processing* (TAP), werden die Peptide in das endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht und dort an MHC-I-Moleküle gebunden. Der entstehende MHC-Peptid-Komplex wird anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Im Unterschied zu anderen Zellen besitzen APC ein sogenanntes Immunoproteasom, in dem Peptide für die MHC-I-Beladung bereitgestellt werden.

Neben der Präsentation von Selbst-Antigenen, die eine periphere Toleranz induzieren, werden über MHC-I auch Nichtselbst-Antigene, beispielsweise virale Proteine oder Tumorantigene, präsentiert. Durch die Bindung an MHC-I-Moleküle können APC diese Antigene naiven, ruhenden CD8⁺ T-Zellen präsentieren, wodurch diese zu zytotoxischen T-Zellen (CTL, *Cytotoxic T-lymphocytes*) differenzieren.

I.2.4 Antigenpräsentation über MHC-II

Auf völlig anderem Weg werden von APC exogene Proteine den T-Zellen präsentiert. Nachdem die APC die Antigene aufgenommen hat, werden diese in Endosomen lysosomal abgebaut. Diese Endolysosomen fusionieren mit anderen Vesikeln, die aus dem ER stammen und hohe Konzentrationen membrangebundener MHC-II-Moleküle beinhalten. Diese MHC-II-Trimere sind an der Peptidbindungsstelle durch die

sogenannte invariante Kette blockiert. Nachdem diese invariante Kette durch Kathepsine zum CLIP (*Class-II-associated invariant chain peptide*) gespalten wurde, kommt es zum Antigenaustausch gegen das exogene Peptid und der MHC-II-Peptid-Komplex wird zur Zellmembran transportiert.

Exogene Antigene werden von den APC über MHC-II den $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. Neben dem MHC-II-gebundenen Peptidfragment benötigen naive T-Zellen ein zweites Signal, um aktiviert zu werden. Dieses Signal liefern sogenannte co-stimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 auf der Oberfläche der APC. Durch den Kontakt mit dem MHC-II-Peptid-Komplex wird die naive $CD4^+$ T-Zelle zu einer sogenannten T_H0 -Zelle aktiviert. Diese kann – je nach Stimuli, denen sie ausgesetzt ist – in T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1) oder Typ 2 (T_H2) differenzieren. Diese Stimuli sind v. a. Zytokine, die die APC sezernieren. Werden hauptsächlich IL-12, IL-18 und $IFN-\gamma$ gebildet, kommt es zu verstärkter T_H1 -Bildung und damit zu einer zellulären Immunantwort (Gately et al. 1998). Werden dagegen IL-4 und IL-10 ausgeschüttet, differenzieren die T_H0 zu T_H2 , was zu einer humoralen, Antikörpervermittelten Immunantwort führt (Nelms et al. 1999). Eine starke Ausschüttung von IL-4 und IL-10 kann zu einer Hemmung der T_H1 -vermittelten zellulären Immunantwort führen.

Neben der Zytokinproduktion haben auch Art und Menge des durch die APC präsentierten Antigens Auswirkungen auf die T_H -Polarisierung. Antigene, deren Fragmente nur schwach an den T-Zellrezeptor (TCR) binden oder nur in geringer Menge von MHC-II präsentiert werden, dirigieren das Immunsystem eher in die humorale Richtung über T_H2 . Dagegen führen Antigenfragmente, die zahlreich präsentiert werden und stark an den TCR binden, eher zu einer T_H1 -Antwort.

Neben den genannten T_H1 und T_H2 können T_H0 auch in immunsupprimierende T_{reg} (regulatorische T-Zellen) differenzieren. Dies wird durch IL-2 und den *Transforming growth factor- β* (TGF- β) bewirkt (Létourneau et al. 2009; Chen et al. 2003) und führt zu peripherer Toleranz. Ob die bei Mäusen beobachteten T_H17 -Zellen, die mit starker, lang anhaltender Inflammation und Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht werden, im Menschen vorkommen, ist umstritten (Afzali et al. 2007).

I Einleitung und Zielstellung

I.2.5 Cross-Presentation und Cross-Priming

Wie oben beschrieben, werden endogene Proteine bzw. deren Fragmente über MHC-I präsentiert und primen CTL, während exogene Antigene über MHC-II-Präsentation zu einem Priming der verschiedenen T-Helferzellen führen.

Für professionelle APC ist allerdings beschrieben, dass auch zellassoziierte exogene Antigene zu einer zytotoxischen, CTL-vermittelten Immunantwort führen können. Das setzt voraus, dass auch diese Antigene über MHC-I naive CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Diese Eigenschaft wird als *Cross-presentation* (Kreuzpräsentation) bzw. *Cross-priming* bezeichnet (den Haan et al. 2000). Allem Anschein nach sind *in vivo* nur DC zur *Cross-presentation* befähigt (Rock und Shen 2005; Amigorena und Savina 2010), auch wenn *in vitro* auch Makrophagen und B-Zellen exogene Antigene über MHC-I präsentierten können (Kovacsovic-Bankowski et al. 1993; Heit et al. 2004; Tvinnereim et al. 2004).

Für DC sind zwei verschiedene Mechanismen beschrieben, wie die exogenen Proteine abgebaut und die Fragmente auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Der sogenannte zytosolische Pfad ähnelt dem klassischen Weg der MHC-I-Beladung mit endogenen Peptiden: Aufgenommene Proteine werden in das Zytosol der DC entlassen, dort vom (Immuno-) Proteasom abgebaut und unter TAP-Beteiligung an die MHC-I-Moleküle gebunden (Amigorena und Savina 2010). Dagegen gelangt beim sogenannten vakuolären Pfad das Protein offenbar nicht in das Zytosol, sondern wird – ähnlich wie bei der Beladung von MHC-II-Molekülen – in endozytischen Kompartimenten unter Kathepsin-S-Beteiligung an die MHC-I-Moleküle gebunden (Rock und Shen 2005).

Da die Präsentation über MHC-I die zytotoxische Immunantwort, also das Zerstören der Antigen-tragenden Zellen durch CTL, induziert, ist diese Immunreaktion besonders wichtig bei der Bekämpfung entarteter Zellen. Um die zytotoxische Reaktion auszulösen, müssen APC also entartete Zellen bzw. deren Proteine aufnehmen und über MHC-I kreuzpräsentieren.

Die *Cross-presentation* wird verstärkt, wenn die DC aktiviert bzw. zur Reifung stimuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von TLR-Liganden, die

DC zur Reifung aktivieren, auch deren Fähigkeit zur *Cross-presentation* bzw. zum *Cross-priming* von naiven CD8⁺ T-Zellen verstärken. Dazu gehören neben LPS (TLR4-Ligand) auch die Nukleinsäuren Poly(I:C) (TLR3-Ligand) und ISS-ODN (TLR9-Ligand) (Datta und Raz 2005). Auch für TLR2/6-Liganden konnte eine solche Wirkung gezeigt werden: Das synthetische pegylierte MALP-2-Analogon BPPcysMPEG verstärkte *Cross-presentation* und *Cross-priming* muriner DC (Prajeeth et al. 2010).

Es gibt starke Hinweise darauf, dass zellassozierte Antigene eine stärkere *Cross-presentation* auslösen als lösliche. Ähnliches gilt, wenn man das Antigen an einen partikulären Träger gebunden oder assoziiert den DC appliziert (Rock und Schen 2005).

I.2.6 Tumorthherapie mit DC

Für eine effektive Immunantwort gegen Tumoren ist eine Aktivierung von CTL über die *Cross-presentation* der Tumorantigene durch MHC-I und eine Polarisierung der T-Helferzellen zu einer Typ I-Antwort, das heißt hin zu einer zellulären Immunreaktion, mit einer erhöhten Ausschüttung von sogenannten Typ I-Zytokinen wie IL-12, IL-18 und IFN- γ , notwendig. Durch die Ausschüttung dieser proinflammatorischen Zytokine werden einerseits CTL, andererseits auch natürliche Killerzellen (NK) und Killer-T-Zellen (NKT) stimuliert, um den Tumor zu bekämpfen. Eine immunologische Tumorthherapie oder Tumorstoffimpfung sollte also T_H1 und CTL aktivieren (Ikeda et al. 2004).

Da diese Polarisierung der Immunantwort von den APC, und hier besonders von den DC, bewirkt wird, stellen sie das bevorzugte Ziel einer solchen Therapiestrategie dar. Die prinzipielle Eignung von *ex vivo* stimulierten autologen DC zur Tumorthherapie konnte in immunologischen und auch in einigen klinischen Studien gezeigt werden (Gilboa et al. 1998, Davis et al. 2003, Banchereau und Palucka 2005).

I Einleitung und Zielstellung

Ein großes Problem der Tumorstimmung mit DC stellt allerdings die Fähigkeit vieler Tumoren dar, das Immunsystem durch die Ausschüttung von Zytokinen (u. a. IL-10, IL-6, TGF- β und VEGF) und Prostaglandine (PGE₂ und PGE₆) zu beeinträchtigen (*Tumor escape*-Mechanismen). Dadurch werden DC in ihrer Reifung, der Expression co-stimulatorischer Moleküle und in ihrer Zytokinproduktion gestört (Kalinski et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass in Tumorstimmung häufig ungewöhnlich viele DC im unreifen Zustand verharren (Gabrilovich 2004). Eine Möglichkeit, diesen *Tumor escape* zu umgehen besteht darin, die DC *ex vivo* mit (Tumor-) Antigenen zu beladen und sie gezielt zur Reifung zu stimulieren. Anschließend können die reifen DC dem Patienten reinfundiert werden.

I.2.7 Toll-like Rezeptoren

Neben endogenen Zytokinen, die bei Entzündungen freigesetzt werden, stimulieren auch exogene Stoffe die Reifung von DC. Diese sind unter anderem hochkonservierte molekulare Muster von Pathogenen, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), die als Liganden an Mustererkennungsrezeptoren (PRR; *Pattern recognition receptors*) wirken. Immunologisch bedeutsame signalgebende PRR sind NLR (*Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing protein*, früher Nod-like Rezeptoren genannt), RIG-I-like Rezeptoren, C-Typ-Lektin Rezeptoren und vor allem die Toll-like Rezeptoren.

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) haben ihren Namen von ihrer Ähnlichkeit mit den in *Drosophila melanogaster* gefundenen Toll-Proteinen. Sie stellen die am besten erforschte Gruppe der PRR dar. Insgesamt sind in Säugetieren 15, beim Menschen bisher 10 TLR gefunden worden (Schreibelt et al. 2010).

TLR sind transmembranäre Glycoproteine vom Typ I mit einem Molekulargewicht zwischen 90 und 150 kDa. Die TLR-Ektodomäne, an die die Liganden binden, besteht aus 19-25 Wiederholungen eines Motives, das als *Leucine-rich repeat* (LRR, Leucinreiche Wiederholung) bekannt ist (Bell et al. 2003). Nach der Bindung eines Liganden wird durch die intrazelluläre Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR) eine Signalkaskade

ausgelöst und der Transkriptionsfaktor NF- κ B löst die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine aus (Akira und Takeda 2004).

TLR3, 7, 8 und 9, kommen hauptsächlich intrazellulär, die anderen hauptsächlich an der Zelloberfläche vor. Die verschiedenen TLR erkennen jeweils spezifische Liganden, wobei auffällt, dass einige ein sehr breites Spektrum unterschiedlichster Strukturen erkennen können. Die Tab. I.6 gibt einen Überblick über die verschiedenen TLR und ihre Liganden.

I.2.7.1 TLR3

Der TLR3 wird von humanen myeloiden DC intrazellulär exprimiert. Monozyten, Makrophagen und plasmazytoide DC exprimieren ihn dagegen nicht (Matsumoto et al. 2002, Muzio et al. 2000). Doppelsträngige virale RNA, welche von zahlreichen Viren während des Replikationszyklus produziert wird, induziert über TLR3-Aktivierung eine DC-Reifung, die auch mit einem synthetischen Analogon, der Polyinosin-Polycytidin-Säure (Poly(I:C)) erreicht werden kann (Takeda et al. 2003). Poly(I:C) führt *in vitro* bei moDC zu stabiler Reifung und einer T_H1-Ausprägung der T-Zellaktivierung (de Jong et al. 2002).

I.2.7.2 TLR7, 8 und 9

Neben TLR3 erkennen auch TLR7, 8 und 9 Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäure-Motive. Virale einzelsträngige RNA wirkt agonistisch auf TLR7 und 8, darüber hinaus gibt es synthetische Verbindungen wie die Imidazochinoline, die über diese Rezeptoren immunstimulierend bzw. -modulierend wirken (Takeda et al. 2003, Agrawal und Kandimala 2007). Mit Imiquimod (Aldara[®], Meda AB, Schweden) ist ein TLR7-Agonist zur topischen Behandlung von Basalzellkarzinomen, aktinischer Keratose und Feigwarzen zugelassen.

I Einleitung und Zielstellung

Tab. I.6: Übersicht über die humanen TLR, ihre Liganden und deren Herkunft
(Akira und Takeda 2004)

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Triacylierte Lipopeptide lösliche Faktoren	Bakterien, Mycobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide Peptidoglycan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine atypische Lipopolysaccharide Zymosan Heat-shock Protein 70	verschiedene Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze Host
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Fusionsprotein Envelope Protein Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Fibronectin Extra-Domäne A Hyaluronsäure-Oligosaccharide Polysaccharid-Fragmente von Heparansulfat Fibrinogen	Gram-negative Bakterien Pflanzen Respiratory-Syncytial-Virus Maus-Mammatumor-Virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Host Host Host Host Host Host
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacylierte Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	<i>Mycoplasma</i> spp. Gram-positive Bakterien Pilze
TLR7	Imidazochinoline, Loxoribin, Bropirimin einzelsträngige RNA	Synthetische Verbindungen Viren
TLR8	Imidazochinoline einzelsträngige RNA	Synthetische Verbindungen Viren
TLR9	CpG-haltige DNA	Bakterien, Viren
TLR10	nicht bekannt	nicht bekannt

Der TLR9 wird von unmethylierten Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Sequenzen, sogenannten CpG-Motiven, aktiviert. Diese sind spezifisch für Prokaryoten, da sie bei Eukaryoten immer methyliert vorliegen und ohnehin sehr selten sind (Takeda et al. 2003). Die Popularität der experimentellen Verwendung von CpG ist v. a. auf die weite Verbreitung des TLR9 in murinen Immunzellen, u. a. plasmazytoiden und myeloiden DC, Makrophagen, B-Zellen und Monozyten, zurückzuführen. Beim Menschen hingegen konnte in myeloiden DC und moDC weder TLR9-mRNA noch -Protein nachgewiesen werden. TLR9 wird im Menschen nur von plasmazytoiden DC und B-Zellen exprimiert (Ketloy et al., 2008, Krug et al. 2001). Deshalb ist eine Übertragung der Daten aus Mausmodellen auf humane moDC nicht möglich.

1.2.7.3 TLR4

TLR4, der erste Toll-like Rezeptor, der in Säugetieren nachgewiesen wurde, erkennt Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien. Für eine Stimulierung des TLR4 ist nicht das gesamte LPS-Makromolekül notwendig, sondern die Lipidkomponente, das sogenannte Lipid A, ist die essenzielle immunstimulierende Domäne des Endotoxins. Die Stimulierung der Zelle funktioniert nicht über den TLR allein, sondern der Rezeptor ist assoziiert mit dem Protein MD-2. Bei der LPS-Erkennung spielen weitere Proteine eine Rolle, beispielsweise das LPS-bindende Protein (LBP) und CD14. Darüber hinaus gibt es zytosolische LPS-erkennende Proteine, Nod1 und Nod2 (Alexander und Rietschel 2001, Takeda et al. 2003).

1.2.7.4 TLR1, 2 und 6

Die TLRs 1,2 und 6 erkennen unter anderem bakterielle Lipoproteine bzw. Lipopeptide und deren synthetische Derivate. Dabei bildet der TLR2 Heterodimere, entweder mit TLR1 oder mit TLR6. An das Dimer aus TLR2 und TLR1 binden triacylierte Lipopeptide aus Bakterien und Mycobakterien (Takeuchi et al. 2002). Dabei binden die zwei Fettsäuren, die am Glycerol verestert sind, in einer

I Einleitung und Zielstellung

Bindungstasche am TLR2, während ein hydrophober Tunnel des TLR1 die amidisch gebundene Fettsäure aufnimmt (Jin et al. 2007). Darüber hinaus binden zahlreiche Lipoproteine sowie andere amphiphile Substanzen wie Lipoteichonsäuren (gram-positive Bakterien), Lipoarabinomannan (Mycobakterien) und Glycolipide (aus *Treponema maltophilum*) an TLR2/1 (Takeda et al. 2003).

Diacylierte Lipopeptide werden von Heterodimeren aus TLR2 mit TLR6 erkannt (Okusawa et al. 2004). Solche Lipopeptide kommen in Mycobakterien vor, daneben existieren auch hier zahlreiche synthetische Verbindungen (siehe Kapitel I.2.8). Von den triacylierten unterscheiden sich die diacylierten Lipopeptide durch die fehlende Fettsäure am Cystein (Wiesmüller et al. 1983).

Wie bei allen TLR außer TLR3 ist auch bei TLR2 die Signalkaskade von MyD88 (*Myeloid differentiation primary response protein 88*) abhängig. Der TLR2 benötigt aber als weiteres Adapterprotein TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*) (Trinchieri und Sher 2007). Diesen beiden Adapterproteinen ist eine Kaskade von Kinasen, u. a. IRAK (*Interleukin-1 receptor associated kinase*), nachgeschaltet. Dadurch wird NF- κ B aktiviert, was wiederum zu einer Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und Typ I-Interferonen führt (Kawai und Akira 2006).

I.2.7.5 Stimulierung mehrerer TLR

Werden mehrere TLR zusammen aktiviert, so kann dies unterschiedliche Effekte auf die Immunantwort haben. Beispielsweise kann eine durch TLR3- oder TLR4-Aktivierung ausgelöste IL-12-Produktion durch nachträglich zugesetzte TLR2-Liganden gehemmt und eine Polarisierung des Zytokinmusters hin zur T_H2-Zellantwort bewirkt werden (Re und Strominger, 2004). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass moDC deutlich mehr IL-12 freisetzen, wenn sie vor der TLR4-Stimulation durch LPS mit Lipopeptiden (TLR2/1- bzw. TLR2/6-Liganden) behandelt wurden (Lorenzen 2009, persönliche Mitteilung). Somit könnte die Reihenfolge der TLR-Aktivierung für die Polarisierung der Immunantwort entscheidend sein. Vielversprechend ist auch eine gleichzeitige Aktivierung verschiedener TLR. So

konnte die für die Tumorabwehr gewünschte T_H1 -Antwort bei gleichzeitiger Stimulation von TLR3 oder TLR4 zusammen mit TLR7, 8 und 9 erzielt werden (Napolitani et al., 2005).

I.2.8 Lipopeptide

Anfang der 1990er Jahre wurde entdeckt, dass bakterielle Lipopeptide und ihre synthetischen Derivate als Immunoadjuvantien wirken. *In vivo* konnte mit ihrer Hilfe in Mäusen ein vergleichbarer Antikörpertiter wie mit Freund's Adjuvans (CFA, *Complete Freund's Adjuvant*, inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* in einer W/O-Emulsion) gegen verschiedene Antigene erreicht werden, jedoch ohne die teils heftigen unerwünschten Wirkungen von CFA (Bessler und Jung 1992). Die chemische Synthese dieser Lipopeptide wurde bereits 1983 beschrieben (Wiesmüller et al. 1983). Wie die natürlich vorkommenden bakteriellen Lipopeptide besitzen auch die synthetischen Analoga das Strukturelement N-Palmitoyl-(S)-(2,3-bis(palmitoyloxy))-(2 R,S)-propyl)-(R)-cystein (Pam₂Cys) am N-Terminus. Während die Lipopeptide Fettsäurereste unterschiedlicher Länge und Sättigungsgrade haben, finden sich bei den synthetischen Lipopeptiden fast ausschließlich Palmitinsäurereste.

Anfang des 21. Jahrhunderts konnte dann gezeigt werden, dass die bakteriellen Lipopeptide und ihre diacylierten synthetischen Analoga über ein Dimer von TLR2 mit TLR6 erkannt werden, während die triacylierten Lipopeptide aus Mycobakterien vom Dimer TLR2/TLR1 gebunden werden (Takeuchi et al. 2002, Okusawa et al. 2004). Eine Behandlung unreifer moDC mit Lipopeptiden induziert eine Reifung der DC, die mit einer Hochregulierung von MHC-II, CD83 sowie den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 einhergeht. Unreife moDC wurden mit dem synthetischen Lipopeptid Pam₃CysSerLys₄ sowie Lipopeptiden aus *Mycobacterium tuberculosis* und *Treponema pallidum* behandelt. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die DC tatsächlich von Lipopeptiden, nicht aber von der entsprechenden Peptidkette alleine aktiviert werden (Hertz et al. 2001). Neben der Hochregulierung der Expression von Reifungsmarkern bzw. co-stimulatorischen Molekülen konnte auch eine IL-12-Ausschüttung von moDC durch Lipopeptide gezeigt werden (Thoma-

I Einleitung und Zielstellung

Uszynski et al. 2000; Chua et al. 2008). Auch in Makrophagen lässt sich durch Lipopeptide, beispielsweise das 2 kDa große Lipopeptid MALP-2 (*Macrophage-activating lipopeptide*) aus *Mycoplasma fermentans*, eine Ausschüttung von TNF- α und IL-12 induzieren (Takeda et al. 2002, Okusawa et al. 2004).

I.2.8.1 FSL-1 und FSL-2

FSL-1 (Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1, Greis et al. 2007) ist ein synthetisches Lipopeptid mit der Struktur *S*-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)-Cys-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe oder Pam₂CGDPKHPKSF (siehe Abb. I.3). Es stellt die N-terminale Domäne eines 44 kDa großen Lipoproteins (LP-44) aus *Mycoplasma salivarium* dar (Shibata et al. 2000, Okusawa et al. 2004). FSL-1 induziert die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (u. a. TNF- α) in ähnlichem Ausmaß wie LP-44. Außerdem konnte gezeigt werden, dass FSL-1 die Phagozytose in makrophagenähnlichen THP-1-Zellen (siehe Kapitel I.2.10) erhöht (Mae et al. 2007).

FSL-2 unterscheidet sich von FSL-1 nur in der letzten Aminosäure der Peptidkette: Hier wurde das Phenylalanin von FSL-1 gegen ein Arginin ausgetauscht. Damit sollte der Einfluss einer positiven Ladung untersucht werden. Allerdings zeigte sich, dass FSL-2 den TLR2 weniger stark aktiviert als FSL-1 (Okusawa et al. 2004).

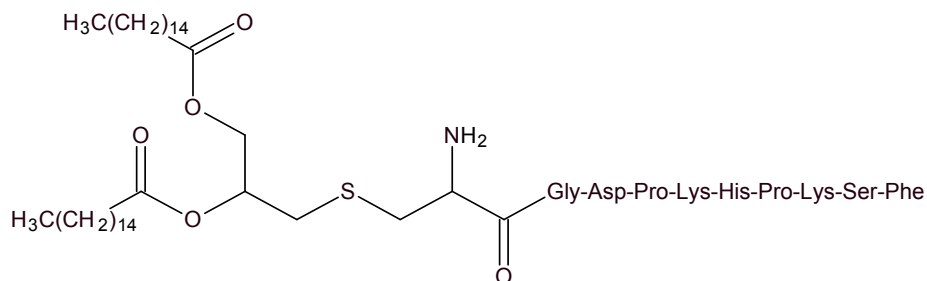


Abb. I.3: Struktur des synthetischen Lipopeptids FSL-1

I.2.8.2 Triacylierte synthetische Lipopeptide

OspA bezeichnet sowohl das natürlich vorkommende *Outer surface protein A* von *Borrelia burgdorferi* als auch das daraus abgeleitete synthetische Lipopeptid (siehe Abb. I.4). *B. burgdorferi* ist einer der Erreger der Lyme-Borreliose und exprimiert OspA in großer Menge. Deshalb war es als Antigen in LYMERix[®] enthalten, einem Borreliose-Impfstoff der in den USA auf dem Markt war. OspA bindet an das TLR2/TLR1-Dimer und induziert bei humanen Makrophagen eine TNF- α -Ausschüttung (Alexopoulou et al. 2002). Das synthetische Lipopeptid BAS (siehe Abb. I.5) ist ein Analogon eines Lipoproteins aus *Bacillus cereus*.

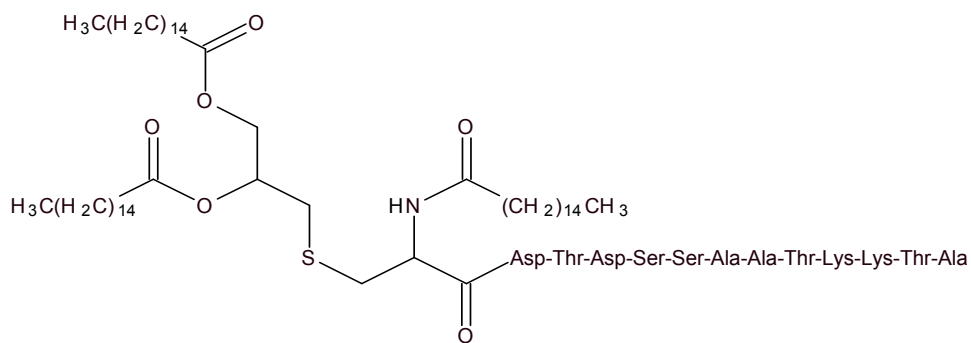


Abb. I.4: Struktur des synthetischen Lipopeptids OspA

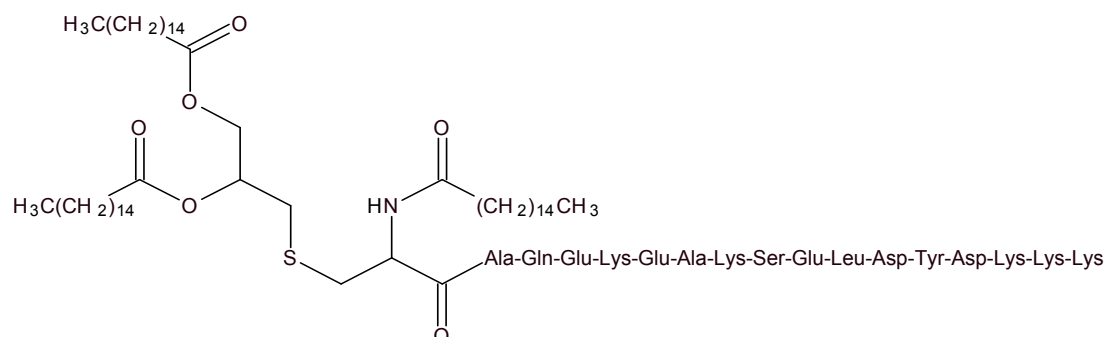


Abb. I.5: Struktur des synthetischen Lipopeptids BAS

I Einleitung und Zielstellung

I.2.9 Monocyte-derived dendritic cells

Für Untersuchungen an DC *in vitro* müssen diese isoliert und in Kultur genommen werden. Neben der sehr aufwendigen Isolierung von DC aus Blut gibt es seit Ende der 1990er Jahre die Möglichkeit, DC aus Vorläuferzellen zu differenzieren. Dafür werden aus menschlichem Blut CD14⁺ Monozyten isoliert und mit IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) zu sogenannten *monocyte-derived* DC (moDC) differenziert (Gieseler et al., 1998). Diese moDC ähneln phänotypisch den myeloiden DC, auch die Expression vieler Proteine wie der Toll-like Rezeptoren ist ähnlich. So exprimieren beide DC-Subsets alle TLR außer TLR7, 9 und 10. Die Differenzen in der Expression von TLR1, 2 und 6 sind vernachlässigbar (Schreibelt et al. 2010).

MoDC liegen zunächst als unreife, phagozytotisch aktive Zellen vor und lassen sich *in vitro* mit Antigenen beladen und durch Zytokine oder PAMP zu reifen DC ausdifferenzieren (Schuler et al., 2003). Dabei werden auf den moDC die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und der Reifungsmarker CD83 hochreguliert (Schreibelt et al. 2010).

I.2.10 THP-1-Makrophagen

THP-1 ist eine CD14⁺ Monozyten-Zelllinie. Die Zellen stammen von einem 1-jährigen Jungen, der an akuter monozytischer Leukämie erkrankt war und wurden 1980 in Kultur genommen (Tsuchiya et al. 1980). Durch die Behandlung mit Phorbolestern, beispielsweise Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), differenzieren THP-1 zu Zellen, die morphologisch und funktionell humanen Makrophagen stark ähneln. Es muss aber beachtet werden, dass es einige Unterschiede zu physiologischen humanen Makrophagen gibt, vor allem was die Proteinexpression betrifft (Tsuchiya et al. 1982, Kohro et al. 2004).

Mit PMA differenzierte THP-1-Makrophagen zeigen große phagozytotische Aktivität. Im Vergleich zu undifferenzierten Monozyten haben THP-1-Makrophagen eine

niedrigere TLR2-Expression, diese ähnelt aber dem von physiologischen Makrophagen (Daigneault et al. 2010). Auf eine Stimulation mit PAMP reagieren THP-1 unter anderem mit einer erhöhten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. So aktiviert FSL-1 die TNF- α -Produktion von THP-1-Makrophagen (Into et al. 2002, Okusawa et al. 2004). Außerdem erhöht FSL-1 die Expression der Scavenger-Rezeptoren MSR1 und CD36 sowie der C-Typ-Lektine DC-SIGN und Dectin-1 in THP-1 (Mae et al. 2007).

I.3 Partikuläre Antigen-Trägersysteme für APC

Für eine effektive anti-tumorale Immunantwort ist eine *Cross-presentation* von aufgenommenen Antigenen über MHC-I der APC essenziell. DC sind prinzipiell zu einer solchen *Cross-presentation* und dem anschließenden Priming von naiven CD8⁺ T-Zellen zu CTL fähig. Allerdings präsentieren DC die MHC-I-Peptid-Komplexe den naiven T-Zellen nur kurz – ein durchaus sinnvoller Mechanismus, um eine Immunantwort gegen die normalerweise über MHC-I präsentierten Selbstantigene zu verhindern. (Wang und Wang 2002, Ludewig et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass Antigene, die an Partikel assoziiert sind, nach ihrer Aufnahme durch DC deutlich besser und länger über MHC-I präsentiert werden als lösliche Antigene (Waeckerle-Men et al. 2006). Außerdem können – ja nach Art des partikulären Trägers – weitere Vorteile gegenüber löslichen Antigenen verwirklicht werden: Schutz vor extrazellulärem enzymatischem Abbau, eine verzögerte Antigen-Freisetzung und damit verlängerte Präsentation sowie die Kombination mit Reifungssignalen (Wischke et al. 2009).

Die immer wieder postulierte Induktion einer DC-Reifung durch partikuläre Systeme *per se*, z. B. PLGA-Mikropartikel (Yoshida und Babensee 2004 und 2006), konnte nicht bestätigt werden (Wischke et al. 2006).

I.3.1 Liposomen als Antigen-Trägersysteme

Liposomen sind ein geeignetes System für das Delivery amphiphiler Verbindungen, beispielsweise antigener Oberflächen- oder Membranproteine oder die DC-Reifung auslösender Lipopeptide. Solche Lipopeptide lassen sich mit ihren Fettsäureresten in der lipophilen Phase der Liposomenmembran verankern, während die polare Peptidkette in die wässrige Phase ragen kann. Schematisch ist dies in Abb. I.6 zu sehen.

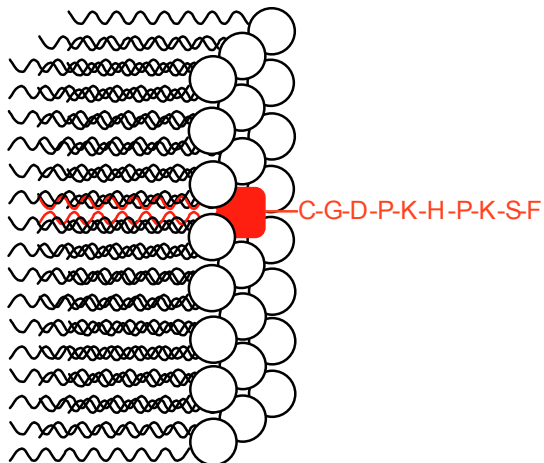


Abb. I.6: Schematische Darstellung des Einbaus eines Lipopeptids (rot) in eine Liposomenmembran. (Dargestellt ist nur eine Hälfte des Bilayers. Wellenlinien: Fettsäurereste, Kreise: Phospholipid-Kopfgruppen)

Damit lassen sich die oben beschriebenen Vorteile einer partikulären Applikation an APC mit einer Reifungsstimulation der DC durch Lipopeptide, die an TLR2 und TLR1 oder 6 agonistisch wirken, kombinieren.

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass Liposomen geeignete Systeme sind, um APC zu erreichen. Von Makrophagen ist lange bekannt, dass sie Liposomen mit großer Effektivität aufnehmen. Das geschieht beispielsweise bei der Entfernung von nicht-pegylierten Liposomen aus der Blutbahn (Gregoriadis und Ryman 1972). Auch *in vitro* werden Liposomen von Makrophagen aufgenommen (Alving 1992).

Verschiedene DC-Untergruppen, darunter auch moDC, nehmen Liposomen ebenfalls auf und präsentieren aufgenommene liposomale Antigene (Ignatius et al. 2000, Foged et al. 2004). Bei Vakzinierungsuntersuchungen an Mäusen zeigte sich, dass liposomale Antigene eine CTL-Antwort auslösen können, also von DC an CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentiert werden (Nair et al. 1993, Ludewig et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Liposomen nach der Aufnahme in die Zelle ihre Antigenladung an das Zytoplasma abgeben. Daraufhin wird das Antigen über den zytosolischen Weg an MHC-I gebunden und kreuzpräsentiert (Rao und Alving 2000).

I Einleitung und Zielstellung

Es gibt Hinweise, dass die Aufnahme von löslichen Antigenen in DC zumindest *in vitro* höher ist als die von liposomalen. Dabei induzierte das liposomale Antigen (FITC-markiertes Ovalbumin, FITC-OVA) eine deutlich stärkere DC-Reifung als das lösliche. Vor allem CD83- und CD86-Expression wurde von liposomalem FITC-OVA deutlich erhöht, bei der Expression von MHC-II und CD80 war der Unterschied nicht so stark ausgeprägt (Copland et al. 2003).

I.3.2 TLR-Liganden in Liposomen

Um die Reifung der DC nach der Aufnahme von Liposomen zu verstärken bzw. auszulösen, können die Liposomen mit Reifungsstimulanzen, z. B. TLR-Liganden beladen werden. Schon Nair et al. machten 1993 die Beobachtung, dass die Immunantwort gegen das liposomale Antigen stärker war, wenn das Antigen an eine Pam₃Cys-Domäne gekoppelt war (Nair et al. 1993). Heute ist bekannt, dass das die TLR2/1-aktivierende Struktur der Lipopeptide ist.

Dank ihrer Eigenschaft, sich in Liposomenmembranen einbauen zu lassen, wurden Lipopeptide als Anker-moleküle verwendet: di- und triacylierte Tripeptide, die als TLR-Agonisten wirksam sind, wurden mittels einer Maleinimidgruppe aktiviert und in Liposomen eingebaut. Dann wurde ein Peptid-Antigen über ein Cystein kovalent an das Anker-molekül gekoppelt (Roth et al. 2004). So entstanden Liposomen, die Antigene trugen und durch die Lipopeptide moDC zur Reifung stimulierten. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einbau der Lipopeptide in die Liposomenbilayer ihre Eigenschaft, TLR zu aktivieren, nicht herabsetzte. Allerdings schwächt die Kopplung der Maleinimidgruppe bzw. der Antigene an die Lipopeptide deren Fähigkeit, moDC zu reifen, deutlich ab (Espuelas et al. 2005). Trotzdem waren solche liposomalen Vakzine bei einem Erb2 (Her2/neu)-Rezeptor-exprimierenden murinen Tumormodell wirksam (Roth et al. 2005, Heurtault et al. 2006).

Auch andere TLR-Liganden als Lipopeptide wurden in liposomaler Form an APC untersucht. So wurden unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Oligodesoxynucleotide (CpG-ODN), die an TLR9 binden, in kationische Liposomen

verkapselt. In Mäusen wurden diese CpG-Liposomen von DC besser aufgenommen als lösliches CpG und induzierten eine größere IL-12-Ausschüttung. Trugen die CpG-Liposomen Ovalbumin (OVA) als Modellantigen, so induzierten sie in den Mäusen eine starke zytotoxische Immunantwort gegen OVA-exprimierende Tumorzellen (Suzuki et al. 2004). Wie oben bereits erwähnt ist eine Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen schwierig, da humane myeloide DC und moDC keinen TLR9 exprimieren.

Der TLR4-Ligand Monophosphoryl-Lipid A, ein halbsynthetisches Glycolipid das die immunogene Domäne des bakteriellen LPS nachbildet, wurde ebenfalls mehrfach in Liposomenmembranen eingebaut. So ist Monophosphoryl-Lipid A als Adjuvans in L-BLP25, einer liposomalen MUC1-Vakzine, enthalten (Sangha und Butts 2007). L-BLP25 befindet sich unter dem Namen Stimuvax[®] in Phase-III-Studien zur Behandlung verschiedener Tumoren (siehe Kapitel I.1.1).

Zusätzlich zu den Reifungsstimulanzien können Liposomen funktionalisiert werden, um ein Targeting an Zielzellen zu ermöglichen. So wurden Fragmente monoklonaler Antikörper gegen die DC-Oberflächenmoleküle CD11c und DEC-205 (CD205) an Liposomen gekoppelt. Die Aufnahme der Liposomen in murine DC stieg dadurch *in vitro* und *in vivo* deutlich an (van Broekhoven et al. 2004). Auch der Einbau von mannosylierten Lipiden in die Liposomenmembran führt zu einem DC-Targeting. Die Bindung der Mannosegruppen an ihren Rezeptor auf der DC-Oberfläche, das Lektin CD206, führt zu erhöhter Phagozytose der Liposomen durch die DC (Espuelas et al. 2008, Heurtault et al. 2009).

I.3.3 Fazit

Liposomen sind aus mehreren Gründen geeignete Trägersysteme, um in (Tumor-) Vakzinierungsexperimenten Antigene in APC zu transportieren: i) Amphiphile (Modell-) Antigene lassen sich gut in Liposomen einbauen oder an sie koppeln. ii) Liposomen werden sowohl von Makrophagen als auch von DC *in vitro* und *in vivo* effektiv aufgenommen. iii) Liposomal applizierte Antigene können über MHC-I

I Einleitung und Zielstellung

kreuzpräsentiert werden und können zytotoxische Immunreaktionen auslösen. iv) Liposomen lassen sich bei Bedarf mit DC-Reifungsstimuli, z. B. TLR-Liganden, beladen. v) Liposomen sind untoxisch, werden vollständig abgebaut und können steril hergestellt werden. Sie eignen sich sowohl für Zellexperimente als auch für eine parenterale Applikation.

I.4 Zielstellung

In vorhergehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass PLGA-Mikropartikel, die mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) beladen sind, die Reifung von moDC induzieren können (Wischke et al. 2006). Solche PLGA-Mikropartikel lassen sich jedoch nur sehr aufwendig und mit niedriger Effizienz mit amphiphilen Substanzen beladen. Solche amphiphilen Stoffe können sowohl Immunstimulanzien, z. B. bakterielle Lipopeptide, wie auch (Tumor-) Antigene, beispielsweise Oberflächenproteine, sein.

Deshalb sollte ein Trägersystem entwickelt werden, das amphiphile synthetische Lipopeptide, die den TLR2 aktivieren, enthält und das so eine Reifung dendritischer Zellen induziert. Für eine Beladung mit solchen amphiphilen Stoffen sind Liposomen aufgrund ihrer speziellen Struktur besonders geeignet.

Das Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen war die Herstellung und Optimierung einer Liposomenformulierung, die sich effektiv mit solchen Lipopeptiden beladen lässt und von moDC aufgenommen wird.

Die zu entwickelnden Liposomen sollten fluoreszenzmarkiert sein, um durchflusszytometrische, fluorimetrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zu ermöglichen. Es wurde eine Lagerungsstabilität von mindestens vier Wochen angestrebt, um ausreichend Zeit für Zellversuche zur Verfügung zu haben. Das Herstellungsverfahren sollte einfach und robust sein, um zu reproduzierbaren Ergebnissen kommen zu können. Ein Scaling-up auf Produktionsmaßstäbe war dabei nicht nötig, da solche Liposomen, wenn sie eines Tages zur Immuntherapie eingesetzt werden, stets individuell hergestellt werden müssten.

Die Liposomen sollten von Antigen-präsentierenden Zellen, vor allem von moDC, aufgenommen werden und diese aktivieren. Dabei war es wünschenswert, dass die DC von den lipopeptidhaltigen Liposomen zu einer vollständigen Reifung stimuliert werden, um eine effektive T_H1-Immunantwort auslösen zu können. Die Liposomen durften nicht zytotoxisch sein, um die Zellen nicht zu schädigen. Da Versuche an

I Einleitung und Zielstellung

humanen DC sehr aufwendig sind, war ein Ziel dieser Arbeit, die Effekte von Liposomen auf Antigen-präsentierende Zellen an einer geeigneten Zelllinie zu untersuchen. Da THP-1-Zellen – wie moDC – aus humanen Monozyten hervorgehen, sollten Untersuchungen an dieser makrophagenähnlichen Zelllinie in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

II Materialien und Methoden

II.1 Liposomen

II.1.1 Liposomen-Herstellung

Die Liposomen wurden aus Phospholipid und Cholesterol hergestellt. Das verwendete Phospholipid war Lipoid[®] S100, ein Soja-Phosphatidylcholin der Firma Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Deutschland), das Cholesterol war von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). Für Liposomen, die in Zellkulturversuchen verwendet wurden, wurde Cholesterol des Reinheitsgrades „cell culture tested“ von Sigma-Aldrich eingesetzt. Um die Liposomen zu markieren, wurde ihnen ein Kopplungsprodukt aus Fluoresceinisothiocyanat und Stearylamin (FITC-Stearylamin) als Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt. Dieses wurde selbst synthetisiert (siehe Kapitel II.2) und in einem Gemisch aus Methanol und Chloroform (9:1 V/V), beide von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst (0,1 % m/V).

Um Liposomen mit einer definierten Oberflächenladung herzustellen, wurde den Formulierungen Stearylamin (StA; 1-Aminooctadecan) für eine positive Ladung bzw. Dicetylphosphat (Dihexadecylphosphat) für eine negative Ladung zugesetzt. Beide waren von Sigma-Aldrich.

Zur Liposomenherstellung wurden verschiedene Methoden eingesetzt und miteinander verglichen.

II.1.1.1 Filmbilde-Methode

Das entsprechende Phospholipid und Cholesterol wurden jeweils in einer Konzentration von 10 mg/ml (1 % m/V) in Ethanol 96 % gelöst. Die gewünschten Volumina gelöstes Phospholipid und Cholesterol wurden in einem Glas-Rundkolben, bei Bedarf zusammen mit weiteren gelösten Bestandteilen, im Vakuum bei 40 °C mit

II Materialien und Methoden

einem Rotavapor (Büchi, Essen, Deutschland) einrotiert, bis das Lösemittel entfernt war. Enthielt die Formulierung in Chloroform gelöste Bestandteile, wurde der Rundkolben anschließend für 4 h bei 25 °C in den Vakuumschrank (Druck < 130 Pa) gestellt, um evtl. noch vorhandene Lösemittelspuren zu entfernen. Der entstandene Lipidfilm wurde anschließend im gewünschten Volumen eines wässrigen Puffers, meist PBS (Zusammensetzung siehe Abschnitt II.4.1) suspendiert. Dazu wurde der Kolben bei 40 °C für 5 bis 10 Minuten im Wasserbad rotiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 bis 10 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex RK100, Fa. Bandelin, Berlin, Deutschland) behandelt.

Wenn die Teilchengröße und die Größenverteilung eingestellt werden sollte, wurde die Liposomen-Suspension anschließend extrudiert. Dabei wurde ein LiposoFast-Extruder mit Polycarbonat-Membranen der Porengrößen 50, 100, 200, 400 oder 800 nm (Avestin, Mannheim, Deutschland) verwendet. Waren die Liposomen für die Zellkultur bestimmt, schloss sich an die Extrusion mit 200 nm Porengröße eine Filtration durch einen sterilen Einmalfilter mit einer Porengröße von max. 0,22 µm (Whatman, Dassel, Deutschland) in autoklavierte Reaktionsgefäße (Carl Roth) an.

II.1.1.2 Hydration-Rehydrations-Methoden

Die entsprechenden Mengen Phospholipid und Cholesterol wurden auf einer Feinwaage in (bei Bedarf hitzesterilisierte) Glasröhrchen eingewogen. Waren in der Formulierung weitere Bestandteile (z. B. FITC-Stearylamin, Lipopeptide) enthalten, so wurden diese eingewogen bzw. in gelöster Form zugesetzt. Anschließend wurde hochgereinigtes Wasser aus einer MilliQ-Anlage der Fa. Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland (MilliQ-Wasser) zugegeben, um die Lipide zu suspendieren. Nach kräftigem Mischen wurden die Suspensionen für 1 h bei 55 °C im Schüttelschrank mit einer Frequenz von 150 min⁻¹ geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht lyophilisiert (Christ Alpha 1-4, Fa. Martin Christ, Osterode, Deutschland). Das gefriergetrocknete Lipid-Gemisch wurde mit dem entsprechenden Volumen PBS rehydratisiert.

II.1.2 Charakterisierung der Liposomen

Alle hergestellten Liposomenformulierungen wurden hinsichtlich ihrer Teilchengröße, Teilchengrößenverteilung und der Oberflächenladung charakterisiert.

II.1.2.1 Teilchengröße und Größenverteilung

Die Teilchengröße wurde als intensitätsgewichteter Durchmesser (Z-ave), die Größenverteilung als Polydispersitätsindex (PI) mit der Photonenkorrelations-spektroskopie auf einem ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Dabei wurden die Proben in Polystyrol-UV-Küvetten (Carl-Roth) mit MilliQ-Wasser stark verdünnt. Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt, für jede Probe wurde der arithmetische Mittelwert aus 10 Messungen ermittelt.

II.1.2.2 Oberflächenladung

Die Oberflächenladung der Liposomen wurde als Zetapotenzial mit der Laser-Doppler-Anemometrie auf dem ZetaSizer Nano ZS von Malvern bestimmt. Dafür wurden gleiche Verdünnungen wie für die Teilchengrößenbestimmung verwendet. Diese wurde mit 0,9 %iger NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun, B. Braun Melsungen, Deutschland) auf eine elektrische Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt. Der pH-Wert der Proben wurde unmittelbar vor der Messung bestimmt und sofern er nicht zwischen 6,5 und 7,5 lag mit 0,01 N Salzsäure oder 0,01 N Natronlauge eingestellt. Die Messung wurde in Einmal-Messzellen (Malvern) durchgeführt, die mit verdünnter Probe gespült und mit 1 ml der verdünnten Probe befüllt wurden. Jede Probe wurde bei 25 °C dreimal gemessen, wobei die Anzahl der *runs* (einzelnen Messungen) von der Gerätesoftware festgelegt wurde.

II.2 Kopplung von Stearylamin an FITC

Um einen vielseitig einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung der Liposomen zu erhalten, wurde Stearylamin (*syn.*: Octadecylamin, 1-Aminooctadecan; Sigma-Aldrich) mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Sigma-Aldrich) gekoppelt (siehe Abb. II.1). Das erhaltene Kopplungsprodukt ließ sich stabil in Liposomen einbauen und erreichte schon bei Konzentrationen von 0,1 % (m/m) eine ausreichende Fluoreszenzintensität für die Fluoreszenzmikroskopie, die FACS-Analytik und den Endozytose-Assay. Wie auch Fluorescein hat FITC – und damit auch das Kopplungsprodukt – eine Anregungswellenlänge von 494 nm, welche sehr nahe an der Wellenlänge eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) liegt. Dazu kommt eine exzellente Quantenausbeute von 93 %. Problematisch sind beim FITC das starke Ausbleichen der Fluoreszenz unter Lichteinfluss (*Photobleaching*), die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz, welche bei pH-Werten unter 7 stark abnimmt und das breite Emissionsspektrum, das die Anwendung zusammen mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen erschwert (Haugland 2002).

Für die Kopplung wurden 138,5 mg (0,514 mmol) Stearylamin in 100 ml Aceton gelöst und zu 50 ml 20 mM Boratpuffer pH 9 gegeben. Zu dieser Mischung wurden 100 mg FITC gegeben und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Aceton bei 30 °C unter Vakuum entfernt und die verbliebene wässrige Lösung mit 3 M Salzsäure stark angesäuert und zweimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, zuerst mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und danach mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Ethylacetats im Vakuum wurden ca. 240 mg Rohprodukt gewonnen. Alle Herstellungsschritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um *Photobleaching* zu verhindern.

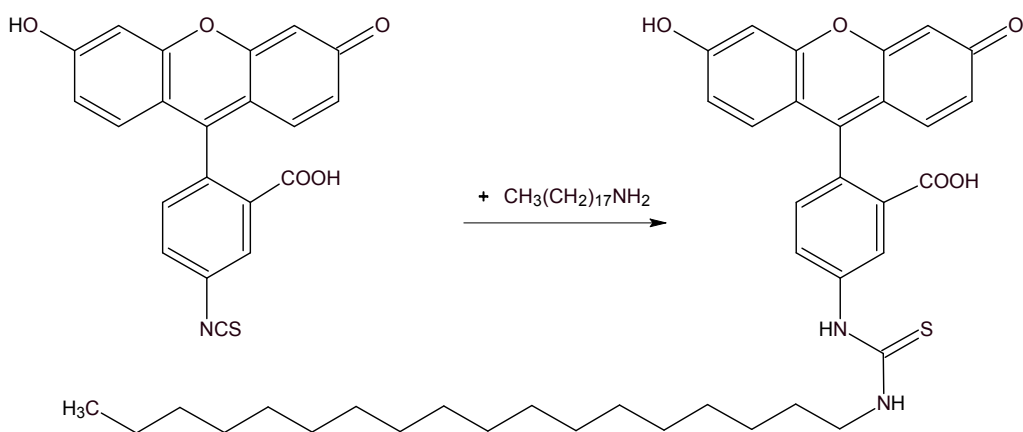


Abb. II.1: Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat an Stearylamin
($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2 = \text{Stearylamin}$)

Das Rohprodukt wurde mit der Säulenchromatographie an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 0,063-0,200 mm von Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt, Laufmittel war Hexan/Ethylacetat/Methanol im Verhältnis 5 : 5 : 1. Die Reinheit wurde mit einer Dünnschicht-Chromatographie (DC) bestätigt. Es wurden Kieselgelplatten (DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm von Merck) verwendet, das Laufmittel war dasselbe wie bei der Reinigung, der ermittelte Rf-Wert der Reinsubstanz betrug 0,39.

II.3 Lipopeptide

Alle eingesetzten synthetischen Lipopeptide – FSL-1, BAS, OspA sowie das Rhodamin-markierte FSL-1 (FSL-rho) und das biotinylierte FSL-1 (FSL-bio) – waren ein großzügiges Geschenk von Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller, EMC Microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland.

Die Lipopeptide waren lyophilisiert und wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO; cell culture grade; Carl Roth) in einer Konzentration von 1,0 mg/ml gelöst. Anschließend wurden Verdünnungen mit einer Konzentration von 100,0 µg/ml MilliQ-Wasser aliquotiert. Lyophilisierte Lipopeptide und DMSO-Stammlösung wurden bei +4 °C, die in Wasser gelösten Aliquots bei -40 °C gelagert.

II.3.1 Lipopeptid-Gehaltsbestimmung

Der Gehalt an Lipopeptid in den Liposomen wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) im Überstand nach Zentrifugation bestimmt.

Vor der eigentlichen Gehaltsbestimmung wurde die Liposomensuspension 60 min bei 26 500 x g mit einer Biofuge 22R von Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen PBS ersetzt und die Liposomen resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation mit gleichen Bedingungen wurde der Überstand erneut abgenommen und die Liposomen wurden im gleichen Volumen PBS resuspendiert. Beide Überstände wurden vor der Messung mit absolutem Ethanol (Carl Roth) 1 : 9 verdünnt. Aus den Lipopeptidgehalten in beiden Überständen wurde der Lipopeptidgehalt in den Liposomen errechnet.

Es wurde eine Merck Hitachi HPLC-Anlage mit UV/VIS-Detektor verwendet, die mit einer L 6200A-Pumpe, einem L 4500 UV/VIS Dioden-Array-Detektor, einem D 6000 Interface und einem AS 2000A Autosampler (alles von Merck-Hitachi, Darmstadt,

Deutschland) ausgestattet war. Die Säule war eine LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) von Merck, Darmstadt.

Die Trennung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Laufmittelgradienten vorgenommen: nach 3 min mit 5 % Wasser in Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure wurde über 25 min der Wassergehalt auf 1 % gesenkt, danach wurde er innerhalb von 2 min wieder auf 5 % erhöht (alle Prozentangaben sind Volumenprozent).

Alle eingesetzten organischen Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität, die Trifluoressigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hatte Analysenreinheit, es wurde MilliQ-Wasser verwendet. Alle Laufmittelgemische wurden mind. 60 min im Ultraschallbad entgast.

II.4 Zellkultur

II.4.1 Kultivierungsbedingungen für THP-1

Die Liposomen-Formulierungen wurden an Zellen der Linie THP-1 getestet. Dafür wurden die THP-1-Zellen mit Hilfe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) von Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert.

Die Kultivierung geschah bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI 1640-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 000 IE/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Streptomycin), alles von der Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland. Dieses komplette Medium wird im weiteren Kultur-Medium genannt.

PBS (*Phosphate buffered saline*, auch Dulbecco's-Salzlösung genannt) wurde ebenfalls von Biochrom bezogen. Es bestand aus 8000 mg NaCl, 200 mg KCl, 1150 mg Na₂HPO₄, 100 mg KH₂PO₄ pro Liter in MilliQ-Wasser. Das Ca²⁺/Mg²⁺-haltige PBS enthält zusätzlich 100 mg/l CaCl₂ und 100 mg/l MgCl₂ x 6 H₂O. PBS hat einen pH-Wert von 7,4 und ist isotonisch.

Die Zellkulturröhrchen, -platten und Mikrotiterplatten waren von wechselnden Anbietern und waren alle für die Zellkultur vorgesehen (*Tissue culture grade* bzw. *Cell culture grade*).

II.4.2 Endozytose-Assay

Um die Aufnahme der Liposomen in die Zellen zu untersuchen, wurden diese zusammen mit fluoreszenzmarkierten Liposomen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, die Zellen wurden lysiert und die Aufnahme der Liposomen anhand der Fluoreszenz des Zellinhalts gezeigt.

Es wurden 800 000 THP-1-Zellen pro Well in einer 48-Well-Zellkulturplatte für 48 h mit 400 µl Kultur-Medium, welches 5 ng/ml PMA enthielt, zu Makrophagen differenziert.

Nach 48 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit in PMA-haltigem Medium verdünnten Liposomen bzw. nur mit Medium (Kontrollen) versetzt und 24-48 h inkubiert (400 µl/Well). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit je 400 µl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gewaschen.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen mit einem SDS-haltigen Lysepuffer bei pH 11 behandelt, um Absorption und Streuung des Lichts bei der Fluoreszenzmessung zu verhindern. Der basische pH-Wert verstärkt die Fluoreszenz des FITC-Stearylamins. Der Lysepuffer bestand aus 300 g SDS; 5,3 g Na_2CO_3 ; 88 ml HCl 0,1 M pro Liter MilliQ-Wasser. Für die Lyse wurden 200 µl dieses Puffers zu den 400 µl Zellüberstand gegeben, so dass die Zellen mit 10 % SDS lysiert wurden. Nachdem der Lysepuffer für 20 min bei 37 °C einwirken konnte, wurde die Fluoreszenz mit einem Plattenfluorimeter (Cytofluor 2300, Millipore, Billerica, MA, USA) gemessen. Für die FITC-Stearylamin-markierten Liposomen betrug die Anregungswellenlänge 485 nm, die Emission wurde bei 530 nm gemessen, für die Liposomen mit Rhodamin-markiertem FSL-1 betrug die Anregungswellenlängen 530 und die Emissionswellenlänge 590 nm. Die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen (Kontrollen) wurde von den anderen Messergebnissen subtrahiert.

Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Liposomenchargen wurden rechnerisch ausgeglichen. Der Korrekturfaktor wurde für jede Charge durch dividieren der Fluoreszenzintensität der Standardformulierung durch die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe ermittelt. Diese Messungen wurden mit Liposomensuspension alleine, ohne Zellen, auf der jeweiligen Zellkulturplatte vorgenommen (Kontrollen).

II.4.3 MTT-Test

Zur Beurteilung der Zytotoxizität von Substanzen oder Formulierungen wurde die Viabilität von Zellen, die mit den entsprechenden Stoffen inkubiert wurden, mit dem MTT-Test bestimmt. Dabei wird das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von mitochondrialen Reduktasen zum violetten Formazan reduziert. Wird die Zelle geschädigt, nimmt die Menge des gebildeten Formazans ab (Mosmann1983).

Für den Test wurden die Zellen mit PMA-haltigem (5 ng/ml) Kulturmedium auf 800 000 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte für 48 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit je 100 µl Ca²⁺/Mg²⁺-haltigem PBS gewaschen, dann wurde mit 100 µl Testsubstanz für 48 h inkubiert. Die Testsubstanz war die jeweilige Liposomenformulierung, die mit FCS-freiem RPMI 1640-Medium zur gewünschten Konzentration verdünnt wurde. Als Kontrolle diente FCS-freies Medium. Nach der Inkubation wurde die Testsubstanz abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit FCS-freiem Medium gewaschen. Die Zellen wurden mit 100 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in RPMI 1640) 2 h inkubiert, danach wurde die Platte ausgeschlagen und das wasserunlösliche Formazan in 100 µl Isopropanol gelöst (10 min auf dem Plattenrüttler). Nach Zugabe von 50 µl SDS-Lösung (3 mg/ml Natriumdodecylsulfat in Wasser), was eine SDS-Konzentration von 0,1 % ergab, und weiteren 10 min auf dem Plattenrüttler, gefolgt von 20 min bei 37 °C, wurde die Farbtiefe des gebildeten Formazans mit einem LAB 300 AT-Plattenphotometer (SLT Labinstruments, Overath, Deutschland) bei 550 nm Messwellenlänge gegen 690 nm Referenzwellenlänge gemessen.

Zur Auswertung wurde die Absorption der Zellen, die ausschließlich mit RPMI-Medium inkubiert wurden (Kontroll-Zellen) als 100 % gesetzt und die Absorptionen der Zellen, die mit Testsubstanz inkubiert wurden, auf die Absorption der Kontroll-Zellen bezogen.

II.4.4 TNF- α -Assay

Werden Makrophagen durch immunstimulatorische Stoffe aktiviert, z. B. durch TLR-Liganden, so erhöht sich u. a. ihre Produktion von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Durch eine Bestimmung des TNF- α -Gehaltes in Zellüberständen lässt sich also die Aktivierung der THP1-Zellen durch ligandenbeladene Liposomen zeigen.

In einer 48-Well-Platte wurden je Well 400 μ l Zellsuspension (800 000 Zellen/ml in PMA-haltigem Kulturmedium) für 48 h inkubiert. Nach Absaugen und Zugabe der Proben in PMA-haltigem Medium wurde 2 h inkubiert, anschließend die Überstände abgesaugt und die Zellen dreimal mit Medium gewaschen. Nach 16 h wurden die Überstände über den Zellen abgenommen, bei ca. 500 x g für 5 min mit einer Eppendorf Centrifuge 5415C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, um eventuell enthaltene Zellen abzutrennen und mit einem ELISA auf den TNF- α -Gehalt untersucht. Bis zur TNF- α -Bestimmung wurden die Überstände bei -20 °C gelagert.

II.4.4.1 Bestimmung der TNF- α -Konzentration

Die Produktion von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) durch die THP1-Zellen wurde mittels eines klassischen Sandwich-ELISAs (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) aus dem Überstand über den Zellen bestimmt. Es wurde ein kommerziell erhältliches Test-Kit (BioSource Human TNF- α CytoSet) der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers eingesetzt.

Alle Lösungen wurden in BSA-haltigem PBST (PBS pH 7,4 mit 0,5 % [m/V] BSA Fraktion V und 0,1 % [V/V] Tween 20) hergestellt. Dieser Puffer wurde auch zum Blockieren (*blocking buffer*) eingesetzt. Der Waschpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 0,2 g KH_2PO_4 , 1,9 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 g EDTA, 0,5 ml Tween 20 in 1,0 l MilliQ-Wasser. Der pH-Wert war 7,4. Alle eingesetzten Reagenzien hatten Analysenreinheit.

II Materialien und Methoden

Eine 96-Well-Platte (Maxisorp, Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold, Deutschland) wurde über Nacht mit dem Fänger-Antikörper (anti-human TNF- α , 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{l}/\text{Well}$) beschichtet. Nach einmaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurden die freien Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit 200 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Blocking-Puffer (auf dem Plattenrüttler, 25 $^{\circ}\text{C}$, 1 h) blockiert. Anschließend wurde 2 h unter denselben Bedingungen mit 100 μl Analyse (Zell-Überstand) bzw. TNF- α -Standard und 50 μl biotinyliertem Detektions-Antikörper (0,32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit je 200 μl Waschpuffer wurden 100 μl Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (1:625 verdünnt) zugegeben und 30 min inkubiert. Danach wurden 100 μl der frisch hergestellten Enzymsubstrat-Lösung zugegeben. Die Substratlösung bestand aus 0,5 ml Lösung A (120 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [TMB] in 5,0 ml Aceton + 45,0 ml Ethanol 96 % + 100 μl H_2O_2 30 %ig) und 10,0 ml Lösung B (30 mM Trikaliumcitrat-Monohydrat in H_2O , mit KOH auf pH 4,1 eingestellt). Die Platte wurde auf dem Plattenrüttler 10 bis 30 min geschüttelt, bis bei der Standardreihe deutliche Farbunterschiede sichtbar waren. Dann wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 μl 2 M Schwefelsäure abgebrochen, wodurch sich das blaue Formazan gelb verfärbte. Die Farbtiefe wurde auf einem Plattenphotometer (SLT Spectra II; SLT Labinstrumente Austria, Wien, Österreich) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen und mit der Gerätesoftware ausgewertet.

Mit jedem Test wurde eine Standardreihe TNF- α in BSA-haltigem PBST bestimmt. Diese hatte folgende Konzentrationen: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml. Außerdem wurde der Blindwert gegen reines BSA-haltiges PBST bestimmt (0,0 pg/ml TNF- α).

Als Vergleich oder Positivkontrolle wurden verschiedene Lipopeptide (siehe oben) oder *Escherichia coli*-LPS (Sigma-Aldrich) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

II.5 Versuche an moDC

Die Versuche an den dendritischen Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Lorenzen am Institut für Tumortherapie, Duderstadt, durchgeführt. Dabei wurden sogenannte *monocyte-derived dendritic cells* (moDC) aus Monozyten differenziert. Da es sich dabei nicht um eine Zelllinie handelt, war eine statistische Auswertung der Mehrfachexperimente nicht möglich. Deshalb wurde bei den Untersuchungen an moDC jeweils ein repräsentatives Ergebnis ausgewählt.

Aus dem Blut gesunder Spender wurden die mononukleären Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) durch Leukapherese mit dem COBE spectra cell separator (Gambro BCT, Martinsried, Deutschland) nach dem Standardprotokoll des Herstellers isoliert.

Die PBMC wurden in Calcium- und Magnesium-freier HBSS (*Hank's basal salt solution*) suspendiert und die Monozyten durch zentrifugale Gegenstrom-Elutriation im ELUTRA cell separation system (Gambro BCT) gewonnen. Die Monozyten befanden sich in der letzten von fünf Fraktionen (rotor off fraction) bei einer Flussrate von 103,9 ml/min (Wischke et al. 2006).

Die Reinheit und Vitalität der so gewonnenen Monozyten wurde durchflusszytometrisch mit einem FACS Calibur (Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Der Gehalt an CD14⁺-Zellen wurde mit einem monoklonalen Maus-anti-Human Antikörper, der mit Phycoerythrin-Cyanin-Konjugat (Pc5) markiert war, bestimmt. CD14 ist ein Oberflächenprotein, das für myelomonozytäre Zellen charakteristisch ist. Es dient als Rezeptor für den Komplex aus LPS und LPS-bindendem Protein (LBP). Der Antikörper war von der Firma Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland. Die Monozyten wurden zur Lagerung in HBSS mit 5 % inaktiviertem autologem Serum und 10 % DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Versuche wurden 1×10^6 aufgetaute Monozyten/ml eingesetzt. Das Medium war CellGro DC (CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg i. Br.,

II Materialien und Methoden

Deutschland) mit Zusatz von 800 U/ml GM-CSF (Leukine[®], INN: Sagramostim, BayerSchering Healthcare, Berlin, Deutschland), dem ein Tag nach dem Auftauen 500 U/ml IL-4 (CellGenix Technologie Transfer GmbH) zugesetzt wurden, um die Monozyten zu iDC zu differenzieren. Am Tag 6 werden die nicht-adherierten (*floating*) iDC geerntet. Zur Weiterzucht wurden diese Zellen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ iDC/ml in frischem Medium aus CellGro DC (CellGenix Technologie Transfer GmbH), 800 U/ml GM-CSF (BayerSchering) und 500 U/ml IL-4 (CellGenix Technologie Transfer GmbH) in 25 cm^3 oder 75 cm^3 Zellkulturflaschen von Greiner Bio-One (Solingen, Deutschland) ausgesät.

Reife moDC wurden mit verschiedenen Reifungsstimulanzen hergestellt: Entweder mit einem modifizierten Zytokin-Prostaglandin-Cocktail nach Jonuleit (Jonuleit et al. 1997) aus 10 ng/ml rhTNF- α , 10 ng/ml rhIL-1 β , 100 U/ml rhIL-6 (alle von R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland), 1 $\mu\text{g/ml}$ PGE₂ (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und 500 U/ml rhIFN- γ (Imukin[®], Boehringer Ingelheim, Deutschland) oder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly(I:C) (Invivogen, San Diego, CA, USA) zusammen mit 500 U/ml IFN- α 2a (Roferon-A[®], Roche, Grenzach, Deutschland) und 500 U/ml rhIFN- γ .

Mit Lipopeptiden oder lipopeptidbeladenen Liposomen vorbehandelte moDC wurden 6 h nach dieser Behandlung mit einer Mischung aus 100 ng/ml LPS R60 und 500 U/ml rhIFN- γ zur Reifung stimuliert. Das LPS R60 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Freudenberg und Herrn Dr. Galanos vom MPI für Immunbiologie, Freiburg i. Br. zur Verfügung gestellt.

Die Ernte der DC und ihre Analyse mittels Durchflusszytometrie erfolgte 20-24 h nach der Stimulation. Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACS Calibur (Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Für Bestimmungen der Zellvitalität wurden tote Zellen mit Propidiumiodid (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) angefärbt. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. II.1 aufgeführt.

Bei den Untersuchungen zur Lokalisation des TLR2 wurden moDC mit FSL-bio inkubiert. Dieses wurde über eine Bindung von Streptavidin-Phycoerythrin (SAV-PE, Fa. Beckman-Coulter) detektiert.

Tab. II.1: Übersicht über die Maus-anti-Human Antikörper, die bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen an moDC verwendet wurden

Zell-antigen	Synonym	Fluoreszenz-marker	Isotyp	Klon	Hersteller
CD1a		Pc5	IgG1	BL6	Beckman Coulter
CD209	DC-SIGN	PE	IgG1	AZND1	Beckman Coulter
CD80	B7	PE	IgG1	L307.4	BD Biosciences
CD83		Pc5	IgG2b	HB15a	Immunotech
CD86	B70/B7-2	PE	IgG1	2331(FUN-1)	BD Biosciences
TLR2		PE	IgG2a	TL2.1	Imgenex ^{*)}

Pc5: Phycoerythrin-Cyanin 5-Konjugat; PE: Phycoerythrin. ^{*)} Imgenex Corp. (San Diego, CA, USA)

III Ergebnisse und Diskussion

III.1 Liposomen ohne Lipopeptide

Bevor Liposomen mit den teuren synthetischen Lipopeptiden beladen wurden, wurden die Herstellung und Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten Liposomen hinsichtlich Zusammensetzung, Größe und Oberflächenladung optimiert. Dafür wurden die Liposomen mit der klassischen Filmbildemethode hergestellt und durch Polycarbonatmembranen extrudiert, um sogenannte kleine unilamellare Vesikel (SUV, *small unilamellar vesicles*) zu erhalten.

Um die verschiedenen Liposomenformulierungen zu charakterisieren, wurden Teilchengröße, Teilchengrößenverteilung und Zetapotenzial bestimmt. Zusätzlich wurden die Liposomen an makrophagenähnlichen THP-1-Zellen getestet, um Aufschluss über ihre Aufnahme in die Zellen und ihre Zytotoxizität zu erhalten.

III.1.1 Cholesterolkonzentration in Liposomen

Als erster Optimierungsschritt wurde die Zusammensetzung der Liposomen untersucht. Perry und Martin hatten bereits 1995 fluoreszenzmarkierte Liposomen hergestellt, die von Makrophagen aufgenommen wurden (Perry und Martin 1995). 1999 hatten sie solche Liposomen mit Zymosan, einem potenten TLR2-Agonisten, modifiziert, um den Mechanismus der Aufnahme in die Makrophagen aufzuklären (Perry et al. 1999). Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, TLR2-Agonisten – nämlich Lipopeptide – in Makrophagen und Dendritische Zellen zu transportieren, wurden die Liposomenformulierungen an die von Perry et al. angelehnt. Nach Perrys Angaben bestanden diese Liposomen aus 63 μmol Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), 18 μmol Dicetylphosphat bzw. Stearylamin und 9 μmol Cholesterol in 2 ml PBS. Dicetylphosphat und Stearylamin dienen dazu, die Liposomenoberfläche negativ bzw. positiv aufzuladen, Cholesterol stabilisiert die Liposomenmembran.

III Ergebnisse und Diskussion

Kommerziell erhältliche Phosphatidylcholone unterscheiden sich in ihrer genauen Zusammensetzung und Reinheit. In dieser Arbeit wurden Liposomen aus Lipoid[®] S100, einem gereinigten Phosphatidylcholin aus Soja, hergestellt. Dabei handelt es sich um eine Mischung von Phosphatidylcholinen, die verschiedene Fettsäurereste enthalten. Darüber hinaus enthielten die Formulierungen FITC-StA, das Kopplungsprodukt von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit Stearylamin, für eine Fluoreszenzmarkierung der Liposomen.

Da sich durch die Verwendung unterschiedlicher Inhaltsstoffe die Membraneigenschaften und Partikelcharakteristika verändern, musste die Formulierung optimiert werden. Dazu wurde zuerst der Anteil Cholesterol an der Lipidphase variiert und der Einfluss auf die Teilchencharakteristika mit der Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) untersucht. Mit dieser Methode kann der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser ($Z\text{-ave}$) von Teilchen ermittelt werden. Dieser Durchmesser, oft Teilchengröße genannt, wird intensitätsgewichtet ermittelt, das heißt, Teilchen die ein intensives Messsignal ergeben, werden stärker gewichtet als solche, die ein schwächeres Signal haben.

Neben der Teilchengröße wird bei der PCS auch der Polydispersitätsindex (PI) gemessen. Der PI ist ein Maß für die Verteilung der Teilchengrößen: je kleiner der PI, desto enger ist die Größenverteilung. Bei einem PI von $< 0,1$ geht man von einer sehr engen Teilchengrößenverteilung aus, bei Werten $< 0,06$ sogar von monodispersen Systemen; Werte zwischen 0,1 und 0,2 gelten als enge Verteilung und werden bei der Liposomenherstellung gemeinhin angestrebt. Da die Teilchengröße bei der PCS intensitätsgewichtet ermittelt wird und die Intensität der Messsignale von der Teilchengröße abhängt, kann man bei PI-Werten über 0,25 die ermittelten Durchmesser nur noch als relative Werte ansehen.

Es wurden Liposomen aus Lipoid[®] S100 mit 0, 10, 20, 30 und 40 % Cholesterol hergestellt. In der Abbildung III.1 ist zu sehen, dass nach Extrusion durch Membranen mit Porengrößen von 400 nm die Teilchendurchmesser mit steigenden Cholesterolkonzentrationen leicht ansteigen. Bei Cholesterolkonzentrationen $> 10\%$ steigt auch der PI, wobei nach Extrusion durch Membranen mit 400 nm

Porendurchmesser keine der verwendeten Formulierungen die Anforderung eines $PI < 0,2$ erfüllt. Da durch Cholesterol nicht nur die Stabilität erhöht wird, sondern auch das Austreten von eingebauten bzw. verkapselten Stoffen (*Drug leakage*) verringert wird, sollte in der Formulierung Cholesterol enthalten sein. Auf der anderen Seite sollte der PI aus den oben genannten Gründen $< 0,2$ sein. Als Konsequenz aus diesen beiden Überlegungen wurden die Liposomen aus Lipoid® S100 mit 10 % (m/m) Cholesterol für die weiteren Versuche, die Teilchengröße zu optimieren, ausgewählt.

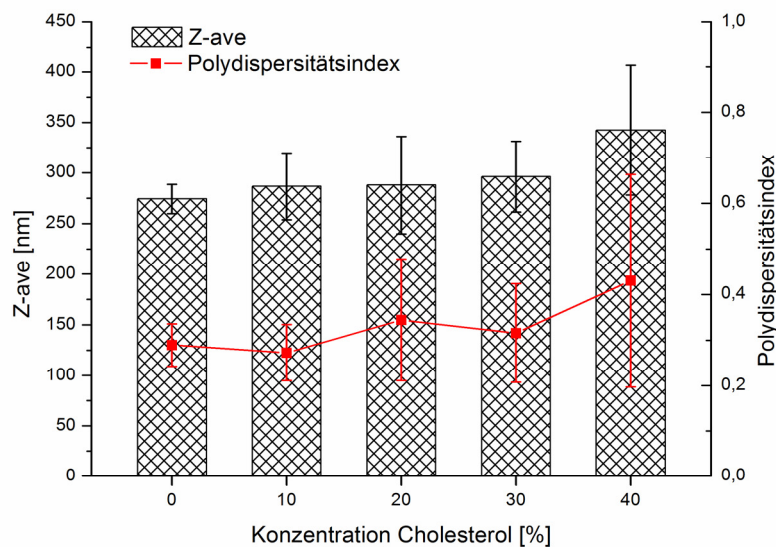


Abb. III.1: Einfluss verschiedener Konzentrationen an Cholesterol (% m/m) auf Durchmesser (Z-ave, linke Ordinate) und Teilchengrößenverteilung (Polydispersitätsindex PI, rechte Ordinate) von Liposomen (Extrusion: 400 nm Porengröße, $n = 7$, arithm. Mittel \pm Standardabweichung)

III.1.2 Extrusion der Liposomen

III.1.2.1 Einfluss auf die Teilchengröße

Liposomen lassen sich mit verschiedensten Teilchengrößen herstellen. Diese reichen von Durchmessern unter 50 nm bis zu sehr großen Vesikeln im Mikrometerbereich.

Die Teilchengröße lässt sich unter anderem durch Extrusion sehr einfach einstellen. Nach ihrer spontanen Bildung durch das Ablösen des Lipidfilms von der Kolbenwand durch den warmen wässrigen Puffer („Rohdispersion“), werden die Liposomen mithilfe von zwei Spritzen mehrmals durch eine Polycarbonatmembran mit definierten Porengrößen gedrückt. Dabei wird die Liposomenmembran durch die mechanische Belastung zerstört und bildet sich nach jedem Extrusionsvorgang neu. Durch Abreißen kleinerer Vesikel von den anfänglich vorliegenden großen multilamellaren Vesikeln verkleinern sich die Durchmesser der entstehenden Liposomen. Gleichzeitig verringert sich die Lamellarität der Liposomen, so dass am Ende des Extrusionsvorganges kleine unilamellare Vesikel (SUV, *Small unilamellar vesicles*) vorliegen (Winterhalter und Lasic 1993).

In der Literatur kann man finden, dass die entstehenden Liposomen nach der Extrusion einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser (Z-ave) haben, der etwas größer sei als die Porendurchmesser der Extrusionsmembran (Schubert 2010). Wie man in Abbildung III.2 sehen kann, trifft dies für die hier vorgestellten Liposomenformulierungen nur in einem Fall, bei Porengrößen von 50 nm, zu. In allen anderen Fällen bleiben die Teilchendurchmesser teilweise stark unter den Porendurchmessern.

Die mit der Filmbildemethode hergestellte Liposomen-Rohsuspension wurde standardmäßig 10mal mit einem Liposofast-Extruder durch Polycarbonatmembranen extrudiert. Dabei ergaben sich die in Abb. III.2 gezeigten durchschnittlichen Teilchendurchmesser.

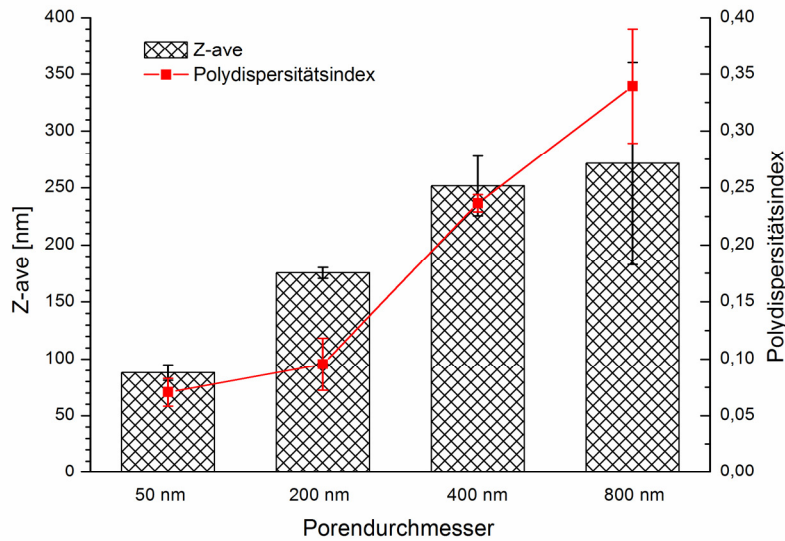


Abb. III.2: Einfluss der Porengröße bei der Extrusion auf Durchmesser (Z-ave, linke Ordinate) und Teilchengrößenverteilung (Polydispersitätsindex, rechte Ordinate) von Liposomen. (n = 5, arithm. Mittel ± Standardabweichung)

Die Abb. III.2 zeigt, dass die Teilchengrößen der Liposomenformulierungen bei steigender Porengröße der Membran zunehmen. Dabei steigt auch der PI an, wobei er bei Porendurchmessern von 50 nm mit einem Mittelwert von 0,07 eine sehr enge, bei 200 nm mit einem Mittelwert von annähernd 0,1 eine enge Größenverteilung anzeigt. Bei steigenden Porendurchmessern nimmt mit steigenden Z-ave-Werten auch der PI zu und liegt ab Porengrößen von 400 nm über 0,2.

III.1.2.2 Einfluss auf das Zetapotenzial

Die Oberflächenladung von Partikeln wird üblicherweise als Zetapotenzial (ZP) in mV angegeben. Das ZP dispergierter Teilchen ist definiert als die Potenzialdifferenz zwischen der Oberfläche der Hydrathülle an der Scherebene und dem umgebenden (wässrigen) Medium. Zur Messung des ZP wird die elektrophoretische

III Ergebnisse und Diskussion

Geschwindigkeit der Teilchen erfasst und mittels der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung in das Zetapotenzial umgerechnet.

Für O/W-Emulsionen gilt, dass ein Zetapotenzial von mind. -30 mV angestrebt werden soll, um eine physikalisch stabile Suspension zu erhalten. Da Liposomen nicht rein elektrostatisch stabilisiert sind, gilt für sie diese Forderung nicht (Müller 1996). Liegt das ZP von Liposomen nahe an Null, so spricht man von neutralen Liposomen, sogenannte kationische Liposomen haben ein deutlich positives ZP.

Abb. III.3 zeigt, dass die verwendete Standardformulierung aus Lipoid® S100 mit 10 % Cholesterol und 1 % FITC-Stearylamin zu neutralen Liposomen führt, die aber bei großen Durchmessern (800 nm Membran) deutlich negative ZP annehmen.

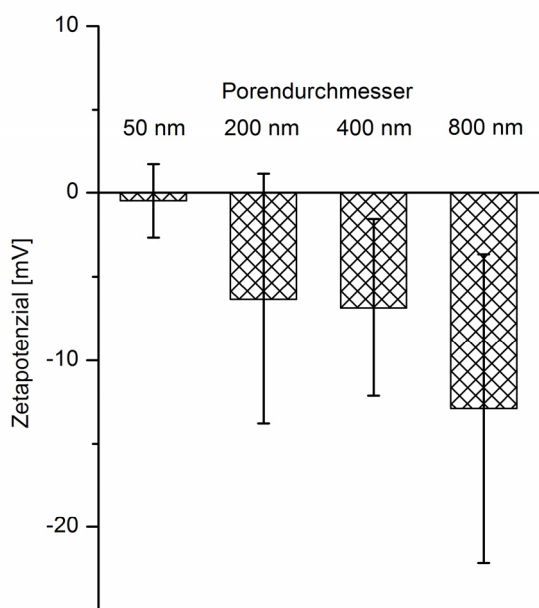


Abb. III.3: Einfluss der Porengröße bei der Extrusionen auf das Zetapotenzial der Liposomen (n = 5; arithm. Mittel ± Standardabweichung)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Extrusion der Liposomen-Rohdispersion durch Membranen mit 50 und mit 200 nm Porendurchmesser gute Teilchencharakteristika ergeben: die Größenverteilung ist sehr eng und die Liposomen haben eine neutrale Netto-Oberflächenladung.

III.1.2.3 Einfluss auf die Endozytose durch THP-1

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Teilchengröße auf die Aufnahme der Liposomen in Makrophagen hat, wurden THP-1-Zellen mit den verschiedenen Liposomenformulierungen inkubiert. Da sich zeigte, dass sich die Zellen bei Liposomenkonzentrationen über 200 $\mu\text{g/ml}$ vom Plattenboden ablösen, wurden die Untersuchungen mit Konzentrationen von 40 und 180 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. In Abb. III.4 ist zu sehen, dass bei der niedrigeren Konzentration kaum Unterschiede in

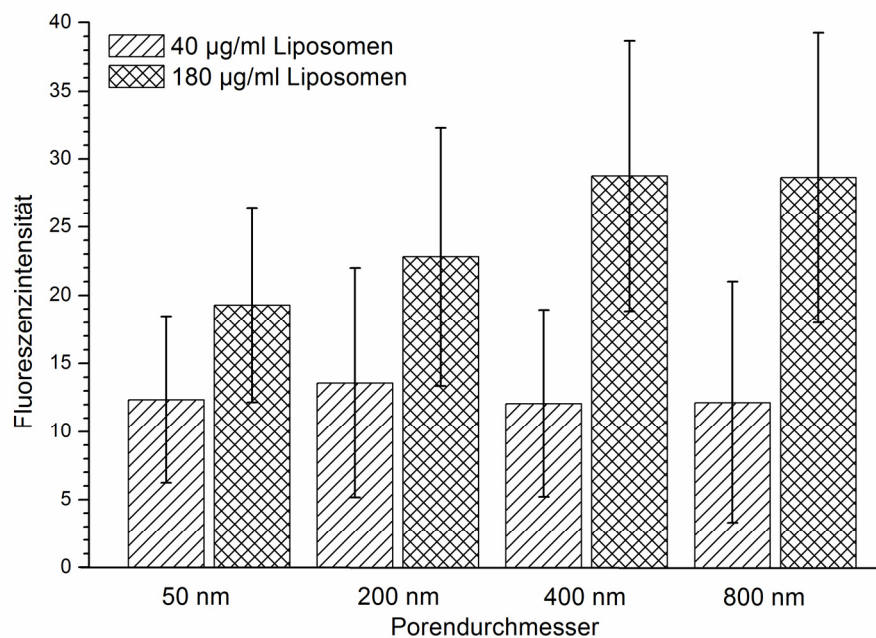


Abb. III.4: Einfluss der Porengröße bei der Extrusion auf die Aufnahme von Liposomen in THP-1-Makrophagen. (Inkubation mit jeweils 40 und 180 $\mu\text{g/ml}$ Liposomen; $n = 5$, arithm. Mittel \pm Standardabweichung)

III Ergebnisse und Diskussion

der Menge der aufgenommenen Liposomen erkennbar sind. Offensichtlich nehmen bei solch niedrigen Konzentrationen die Zellen unabhängig von der Größe der Teilchen nur sehr wenige Liposomen auf. Bei höheren Liposomenkonzentration in der Inkubationslösung steigt die Aufnahme in die Zellen mit zunehmender Größe an. Liposomen, die mit 800 nm Porendurchmesser extrudiert wurden, sind nur ca. 20 nm größer als die mit 400 nm extrudierten. Entsprechend gering fällt hier auch die Zunahme der Fluoreszenz aus. Da die verschiedenen Liposomenchargen – selbst bei gleicher Zusammensetzung – schon von sich aus unterschiedlich stark fluoreszierten, wurden die Fluoreszenzintensitäten der Liposomen durch einen Korrekturfaktor normiert (siehe Abschnitt II.4.2). Die Untersuchungen zur Endozytose unterschiedlich großer Liposomen legen den Schluss nahe, möglichst große Liposomen herzustellen, damit möglichst viele Liposomen in die Zellen aufgenommen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit vielen Untersuchungen zur Verweildauer von Liposomen in der Blutbahn. Dort konnte gezeigt werden, dass kleine Liposomen (100 nm und darunter) deutlich langsamer und in kleinerem Ausmaß von den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen und so aus der Blutbahn entfernt werden als größere.

Allerdings zeigten die oben vorgestellten Untersuchungen zur Teilchencharakteristik, dass Liposomen, die durch Poren > 200 nm extrudiert wurden, eine breite Größenverteilung aufweisen. Neben den schon erwähnten Problemen bei Messungen kann das auch zu physikalischen Instabilitäten führen. Sind die Größenunterschiede zwischen den Liposomen zu groß, werden Fusionen der Vesikel erleichtert.

Aus diesen Gründen wurden die weiteren Liposomenformulierungen, durch Polycarbonatmembranen mit 200 nm Porendurchmesser extrudiert.

III.1.2.4 Anzahl der Extrusionen

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben darüber, wie oft eine Liposomendispersion extrudiert werden muss, bis man einheitlich große Teilchen mit einer engen Größenverteilung erhält (Schubert 2010, Gruber 2004).

Eigene Untersuchungen ergaben, dass bei den verwendeten Formulierungen nach 10 Extrusionen eine homogene Größe erreicht wurde (Abb. III.5), die sich auch durch weitere Extrusionen nicht mehr verbesserte. Da sich diese Ergebnisse mit Angaben in der Literatur deckten (Gruber 2004), wurde auf weitere Wiederholungen verzichtet. Im Folgenden wurden alle Liposomenformulierungen 10mal extrudiert.

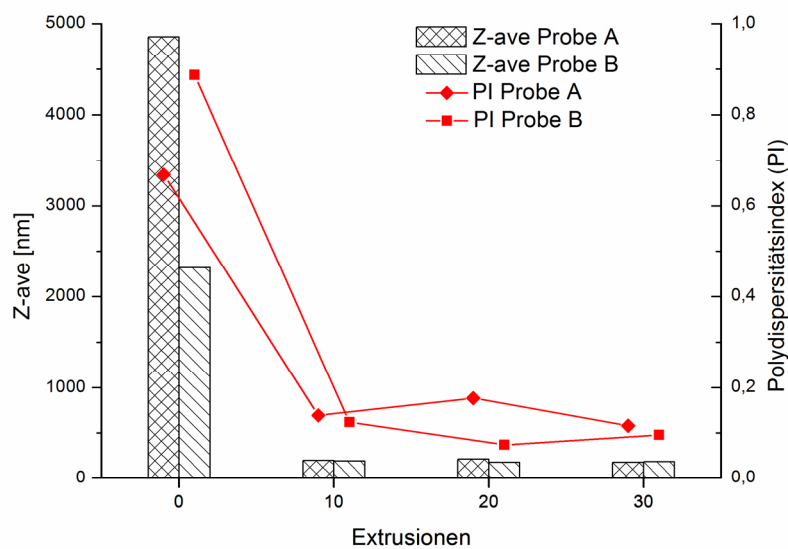


Abb. III.5: Einfluss der Anzahl der Extrusionen durch 200 nm-Poren auf Durchmesser (Z-ave, linke Ordinate) und Teilchengrößenverteilung (Polydispersitätsindex PI, rechte Ordinate) von Liposomen (Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 Versuchen)

III.1.3 Oberflächenladung der Liposomen

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise, dass Liposomen mit einer positiven Oberflächenladung (sogenannte kationische Liposomen) in größerem Ausmaß von Zellen aufgenommen werden als neutrale oder negativ geladene. Begründet wird dies

III Ergebnisse und Diskussion

meist mit eher unspezifischen, elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Liposomen und den negativ geladenen Zelloberflächen (Thurston et al. 1998, McDonald 1998 et al.). Dabei wird oft übersehen, dass sich die grundlegenden Arbeiten zu dieser Thematik mit der Aufnahme von kationischen Liposomen in angiogenetische Zellen beschäftigten. Da kationische Liposomen verstärkt in angiogenetisch aktive Endothelzellen, wie sie u. a. in Tumorgewebe vorkommen, nicht aber in „normale“, ruhende Endothelzellen aufgenommen wurden, schlugen die Autoren vor, kationische Liposomen speziell zum Delivery antiangiogenetischer Substanzen zu verwenden, da sie ein Targeting in angiogenetisch aktives Tumorgewebe ermöglichen.

Um zu überprüfen, ob positiv geladene Liposomen auch von den hier verwendeten APC verstärkt aufgenommen werden, wurden kationische Liposomen hergestellt. Prinzipiell lassen sich kationische Liposomen auf verschiedenen Wegen herstellen: Man kann sie – ganz oder teilweise – aus positiv geladenen, synthetischen Lipiden, beispielsweise DOTMA (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) oder DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat), herstellen, oder es werden der neutralen Phospholipidmischung amphiphile kationische Verbindungen zugesetzt.

Da die synthetischen kationischen Lipide sehr teuer sind, wurden für die ersten Versuche Liposomen durch Beimischung kationischer Verbindungen zur Lipidphase positiv aufgeladen. Bereits in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden dafür natürlich vorkommende Verbindungen verwendet: zuerst Stearylamin (1-Octadecylamin), später auch verschiedene Sphingosin-Derivate (Paukku et al. 1997).

Für Sphingosin wird eine anti-inflammatorische Wirkung beschrieben. Unter anderem inhibiert es eine Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolster (Gupta et al. 1988). Da die im Zuge dieser Arbeit verwendeten THP-1-Monozyten durch den Phorbolster PMA zu Makrophagen differenziert werden, wurde auf den Einsatz von Sphingosin-Derivaten verzichtet. Für erste Versuche mit kationischen Liposomen wurde deshalb der Lipidphase, welche weiterhin aus Lipoid[®] S100 und Cholesterol

sowie dem Fluoreszenzmarker bestand, Stearylamin (StA) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Wie in Abb. III.6 zu sehen ist, führt bereits die Zugabe von 1 % (m/m) StA im Gesamtlipid zu einer deutlichen positiven Aufladung der Liposomen (ZP fast + 10 mV). Bei 5 % StA steigt das ZP auf Werte von annähernd + 20 mV.

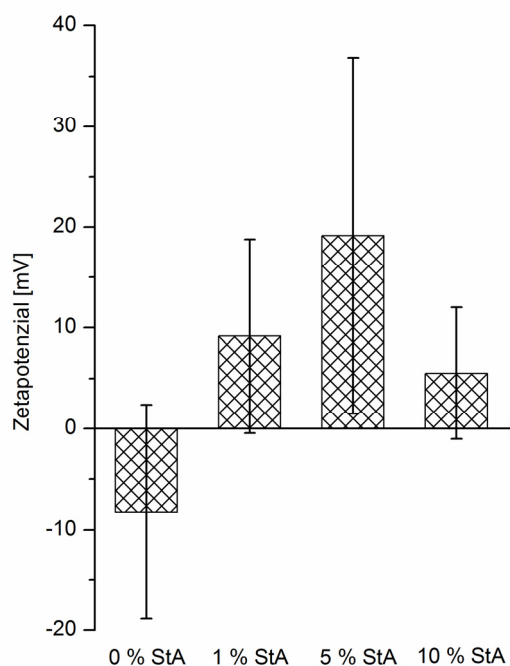


Abb. III.6: Einfluss von Stearylamin (StA) auf das Zetapotenzial von Liposomen (StA-Gehalt in % [m/m] am Gesamtlipid in der Formulierung; n = 5, arithm. Mittel \pm Standardabweichung)

Unerwarteterweise führte eine weitere Erhöhung der StA-Konzentration auf 10 % der Lipidphase nicht zu einer weiteren Erhöhung des ZP, sondern zu einem Absinken auf Werte, die noch unter denen von 1 % StA lagen.

III Ergebnisse und Diskussion

Eine Erklärung für die wieder absinkenden ZP-Werte könnte darin liegen, dass die kritische Mizell-Bildungskonzentration (CMC; *Critical micell concentration*) von StA überschritten wird. Dadurch könnte es zur Bildung von StA-Mizellen kommen, wodurch die Menge StA, die tatsächlich in den Bilayer eingebaut werden kann, herabgesetzt wäre. Allerdings sollte in diesem Fall der Polydispersitätsindex ansteigen, da Mizellen deutlich kleiner sind (ca. 10 nm) als die Liposomen. Das ist hier aber nicht der Fall (siehe Abb. III.7).

Auf die Teilchengröße der Liposomen hat der Einbau von StA in die Membran nur wenig Einfluss (Abb. III.7). Die Teilchengröße sinkt von 170 nm bei den neutralen Liposomen (0 % StA) auf Durchmesser von ca. 150 nm bei den beiden Formulierungen mit den höchsten StA-Gehalten von 10 %. Der Polydispersitätsindex schwankt nur leicht zwischen 0,135 und 0,150, die Teilchengrößen bleiben also bei allen Konzentrationen eng verteilt.

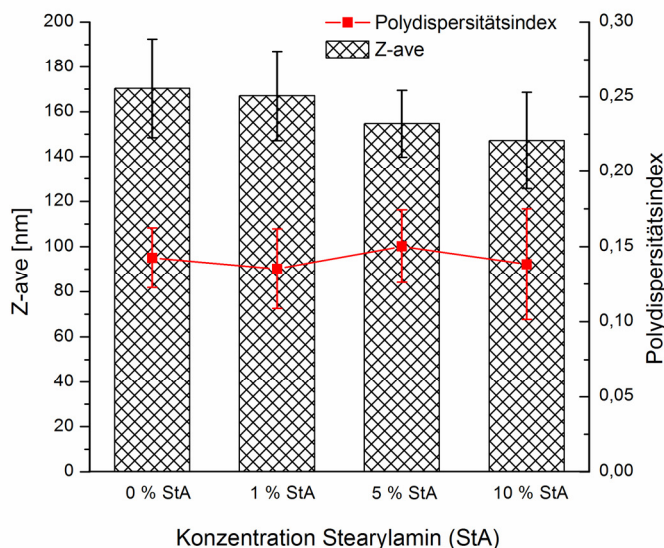


Abb. III.7: Einfluss von Stearylamin (StA) auf Durchmesser (Z-ave, linke Ordinate) und Teilchengößenverteilung (Polydispersitätsindex, rechte Ordinate) von Liposomen (StA-Gehalt in % [m/m] am Gesamtlipid in der Formulierung; n = 5, arithm. Mittel \pm Standardabweichung)

Durch Inkubation von makrophagenähnlichen THP-1-Zellen mit den kationischen Liposomen wurde untersucht, wie sich die Aufnahme in die Zellen durch den StA-Gehalt bzw. durch die positive Oberflächenladung ändert. Abb. III.8 zeigt, dass die Endozytose mit steigenden StA-Gehalten sinkt. Da die aufgenommene Liposomenmenge bei den Formulierungen mit 10 % StA etwas höher liegt als bei 5 %, kann man vermuten, dass die verminderte Aufnahme eher vom steigenden ZP (das bei 5 % StA seinen höchsten Wert von ca. +20 mV hat und bei 10 % StA auf +5,5 mV absinkt) als vom StA-Gehalt herrührt.

Andererseits ist Stearylamin als zytotoxische Substanz bekannt (Panzner und Jansons 1979), wobei liposomales StA deutlich weniger zellschädigend wirkt als gelöstes. Das

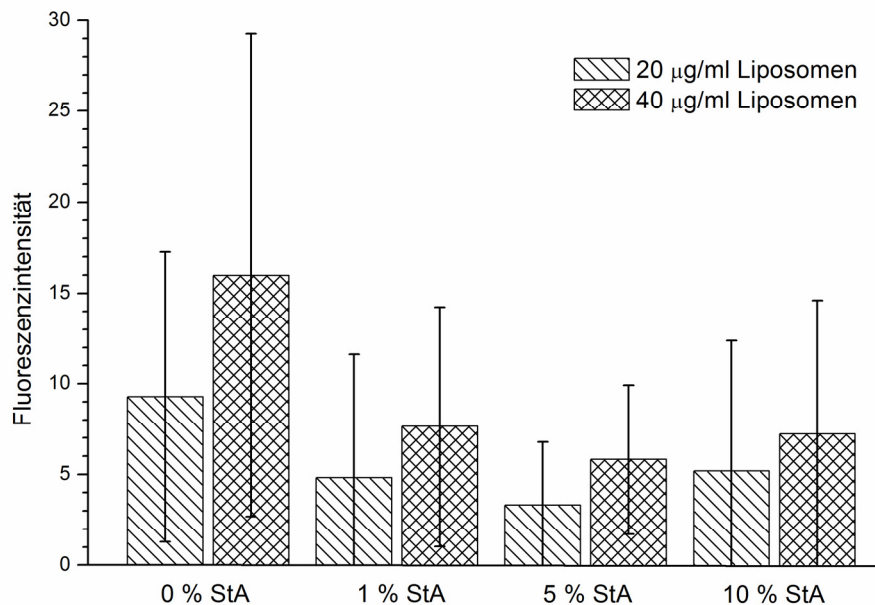


Abb. III.8: Aufnahme von Liposomen mit verschiedenen Gehalten Stearylamin (StA) in THP-1-Zellen (Gehalt StA in % [m/m] am Gesamtlipid; Inkubation der Zellen mit jeweils 20 und 40 µg/ml Liposomen; Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten der Liposomenformulierungen wurden korrigiert; n = 5, arithm. Mittel ± Standardabweichung)

III Ergebnisse und Diskussion

zeigte sich in den Zellversuchen zum einen durch ein deutlich sichtbares Ablösen der Zellen vom Plattenboden, zum anderen war die Zellviabilität im MTT-Test stark reduziert (Abb. III.9).

In der Abb. III.9 ist erkennbar, dass für alle Liposomenformulierungen die Konzentrationen von 20 und 40 $\mu\text{g/ml}$ als untoxisch für die Zellen gelten können (Viabilität $> 80\%$), während schon bei 120 $\mu\text{g/ml}$ die Liposomen mit 5 % StA

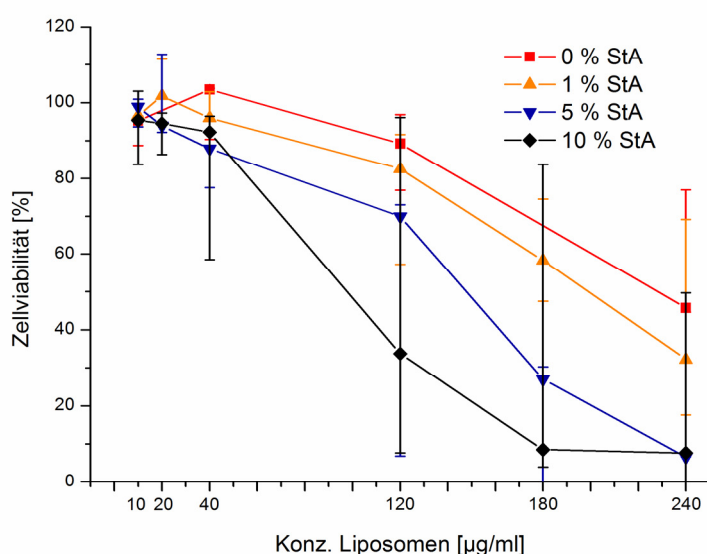


Abb. III.9: Zellviabilität von THP-1-Zellen nach 48 h Inkubation mit Liposomen mit verschiedenen Gehalten Stearylamin (StA), gemessen mit dem MTT-Test (StA-Gehalt in % [m/m] am Gesamtlipid in der Formulierung; $n = 3$, Median \pm Range)

Viabilitäten $< 80\%$, die mit 10 % StA sogar $< 40\%$ bewirkten. Deshalb wurden für die Messungen der Aufnahme kationischer Liposomen in THP-1 die Zellen nur mit 20 und 40 $\mu\text{g/ml}$ Liposomen inkubiert.

Es gibt Hinweise darauf, dass StA bzw. StA-haltige Liposomen ihre zytotoxische Wirkung durch Apoptose-Induktion entfalten (Aramaki et al. 2000; Takano et al.

2003; Yoshida et al. 2006). Takano et al. haben darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Größe von StA-haltigen Liposomen und ihrer Zytotoxizität auf Makrophagen festgestellt: je größer die Vesikel, desto mehr apoptotische Makrophagen. Da größere Liposomen besser aufgenommen werden (siehe oben), könnte der Grund hierfür sein, dass die Zellen dann mehr StA aufgenommen haben.

In den hier vorgestellten Untersuchungen ergab sich durch die positive Aufladung der Liposomenoberfläche kein Vorteil, weder was die technologischen Eigenschaften der Liposomen, noch was deren Aufnahme in Makrophagen betrifft. Im Gegenteil, durch eine ausgeprägte Zytotoxizität – die sowohl vom verwendeten StA als auch durch die positive Ladung *per se* verursacht worden sein könnte – war es nicht möglich, mit den sonst üblichen Konzentrationen an Liposomen zu inkubieren.

Da es auch im untoxischen Bereich von maximal 40 µg/ml keinerlei Hinweise auf eine verbesserte Aufnahme der kationischen Liposomen gab, wurde auf kostenintensive Versuche mit synthetischen kationischen Lipiden verzichtet.

III.1.4 Standard-Formulierung

Nach den hier vorgestellten Untersuchungen an „leeren“, nicht mit Lipopeptid beladenen fluoreszenzmarkierten Liposomen wurde beschlossen, alle weiteren Versuche mit folgender Formulierung durchzuführen:

Zusammensetzung: Lipoid[®] S100 (100 % Phosphatidylcholin aus Soja) mit 10 % (m/m) Cholesterol und 1 % FITC-Stearylamin.

Herstellung: Filmbildemethode, suspendieren in PBS, anschließend 10 x extrudieren durch Polycarbonat-Membranen mit 200 nm Porendurchmesser. Chargen, die in der Zellkultur getestet werden sollten, wurden abschließend sterilfiltriert.

III.1.5 Stabilität der Liposomen

Nach der Festlegung auf diese Formulierung wurde die Lagerungsstabilität untersucht. Da die Liposomen für die Untersuchungen an den Zellen jeweils frisch hergestellt wurden, wurde eine Lagerungsstabilität über vier Wochen als ausreichend angesehen. Durch die sehr kleinen Ansatzvolumina (in der Regel 1 ml Liposomensuspension) wurden die Liposomen innerhalb dieser Frist „verbraucht“.

Die Stabilität von Liposomenformulierungen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten beurteilt werden: Teilchengröße, Teilchengrößenverteilung, Oberflächenladung, Auflösen der Vesikel, Abbau der Lipide usw. Wenn Vesikel beispielsweise miteinander fusionieren, entstehen größere Teilchen. Durch physikalische Instabilitäten können aber auch kleinere Liposomen entstehen. In beiden Fällen steigt der PI an, da die Teilchengrößenverteilung breiter wird. Durch chemische Instabilität der verwendeten Lipide, z. B. durch Hydrolyse der Esterbindungen zwischen Glycerol und Fettsäuren (Bildung von Lysophosphatidylcholin), kann es zur Auflösung der Liposomen kommen. Darüber hinaus können bei den ungesättigten Fettsäuren der verwendeten Lipide die Doppelbindungen oxidiert werden, was zu veränderten Membraneigenschaften führt.

Allgemein gelten stabil bleibende Teilchengrößen und Polydispersitätsindices als gute Indikatoren für eine stabile Formulierung (du Plessis et al. 1996). Ergänzend kann man das ZP über die Zeit verfolgen. Die Abb. III.10 zeigt, dass die gewählte Formulierung über vier Wochen bei Lagerung im Kühlschrank (4-8 °C) stabil ist: Die Durchmesser steigen in der ersten Woche leicht an, bleiben dann aber bis zum Tag 28 unverändert. Auch der PI, welcher bei den für diese Untersuchungen verwendeten Chargen von Anfang an nur knapp unter 0,2 lag, steigt ein wenig an, um dann fast unverändert zu bleiben. Auch die Oberflächenladung der Liposomen ändert sich über 28 Tage kaum und bleibt immer in einem Bereich, in dem man von neutralen Liposomen sprechen kann (Abb. III.11).

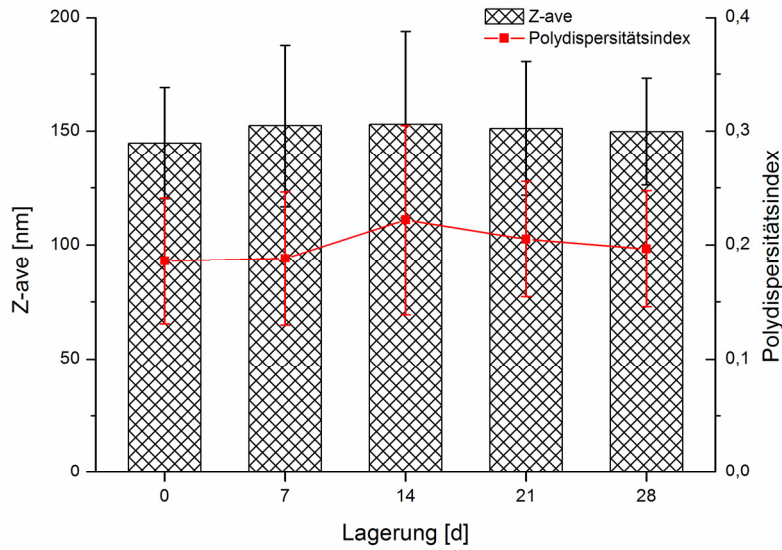


Abb. III.10: Einfluss der Lagerung bei 4-8 °C auf Durchmesser (Z-ave, linke Ordinate) und Teilchengrößenverteilung (Polydispersitätsindex, rechte Ordinate) von Liposomen (n = 10, arithm. Mittel ± Standardabweichung)

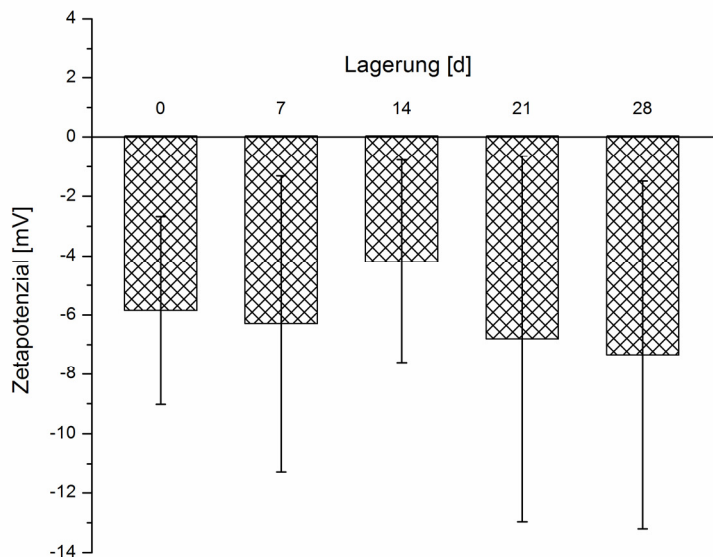


Abb. III.11: Einfluss der Lagerung bei 4-8 °C auf das Zetapotenzial von Liposomen (n = 10, arithm. Mittel ± Standardabweichung)

III Ergebnisse und Diskussion

Da bekannt ist, dass sich die Teilchengrößen von Liposomen durch Einfrieren und Auftauen verändern – eine Tatsache, die man sich bei der Liposomenherstellung durch das sogenannte Freeze-and-Thaw-Verfahren zunutze macht – wurde auf eine Untersuchung der Lagerungsstabilität bei -20 °C verzichtet. Bei der Lagerung bei Raumtemperatur ($20\text{-}25\text{ °C}$) war bereits nach 7 Tagen ein deutlich ranziger Geruch wahrzunehmen, woraufhin diese Untersuchung abgebrochen und auf eine Untersuchung bei erhöhten Temperaturen („Stress-Test“) verzichtet wurde.

Die verwendeten Liposomen waren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC-StA) markiert, um die Aufnahme in die Zellen über die gesteigerte Fluoreszenzintensität des Zellinhaltes zu bestimmen. Bei Fluorescein ist das Ausbleichen (*Photobleaching*) sehr ausgeprägt. Unter *Photobleaching* versteht man ein Nachlassen der Fluoreszenzintensität, v. a. bei Kontakt mit UV-Strahlung. Deshalb wurde auch die Fluoreszenz der Liposomen über eine Lagerungsdauer von vier Wochen untersucht. Dafür wurden die Liposomen im Dunkeln bei $4\text{-}8\text{ °C}$ gelagert. Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Liposomen in einer Konzentration von $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ im selben Lysepuffer, der auch für die Untersuchungen der Endocytose verwendet wurde, gelöst und dann die Fluoreszenz gemessen. Wie in Abb. III.12 zu sehen ist, sinkt die Intensität nach 7 Tagen etwas, bleibt bis zum Tag 21 stabil um dann nochmals zu sinken. Die Fluoreszenzintensität ist aber auch nach 28 Tagen noch ausreichend stark, um die Aufnahme der Liposomen in Zellen zu bestimmen.

III.1.6 Endocytose von Liposomen durch THP-1

Abschließend wurde die ausgewählte Liposomenformulierung an humanen makrophagenähnlichen Zellen (Zell-Linie THP-1) getestet. Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenz der Zellen mit der Konzentration an Liposomen in der Inkubationslösung anstieg (Abb. III.13). Auch im Fluoreszenzmikroskop war die von FITC-StA hervorgerufene Fluoreszenz der Zellen deutlich sichtbar.

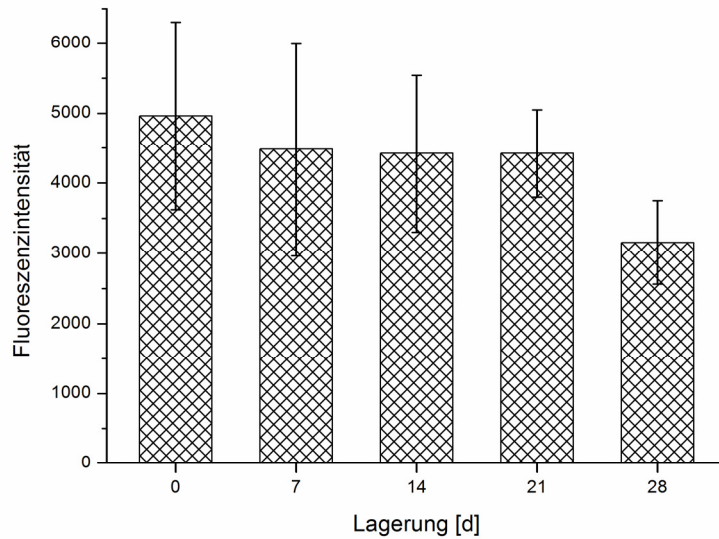


Abb. III.12: Einfluss der Lagerung bei 4-8 °C auf die Fluoreszenz von Liposomen (n = 10; arithm. Mittel ± Standardabweichung. Die Liposomen wurden in einer Konzentration von 50 µg/ml mit Lysepuffer gelöst)

Um auszuschließen, dass die gesteigerte Fluoreszenz durch angelagerte Liposomen an der Zelloberfläche bewirkt wurde, wurden THP-1-Zellen mit den Liposomen inkubiert, danach wurde dem Medium Trypanblau zugegeben, das die Fluoreszenz von Fluorescein löscht. Da Trypanblau nicht in intakte Zellen eindringt, löscht es nur die Fluoreszenz von extrazellulär vorkommendem Fluorescein. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war eindeutig eine intrazelluläre Fluoreszenz bei extrazellulärer Trypanblau-Löschung zu sehen. Bei dieser Methode lässt sich die Fluoreszenzintensität nicht messen, da bei der Zell-Lyse das Trypanblau auch die Fluoreszenz der intrazellulären Liposomen löschen würde. Deshalb lässt sich nicht ausschließen, dass ein Teil der gemessenen Fluoreszenz auf extrazelluläre, an die Zellen adsorbierte Liposomen zurückzuführen ist. Da aber nach Trypanblau-Zugabe weiterhin eine deutliche Fluoreszenz gesehen wurde, konnte gezeigt werden, dass tatsächlich Liposomen in die Zellen aufgenommen wurden.

III Ergebnisse und Diskussion

Die Abb. III.13 zeigt auch, dass die THP-1-Zellen die Liposomen nicht nur aufnehmen, sondern auch, dass die verwendeten Liposomen nicht zytotoxisch waren. Zwar sank die Zellviabilität nach der Inkubation mit 180 und 240 $\mu\text{g/ml}$ Liposomen leicht ab, sie blieb aber durchgehend deutlich über 80 % der unbehandelten Kontrolle.

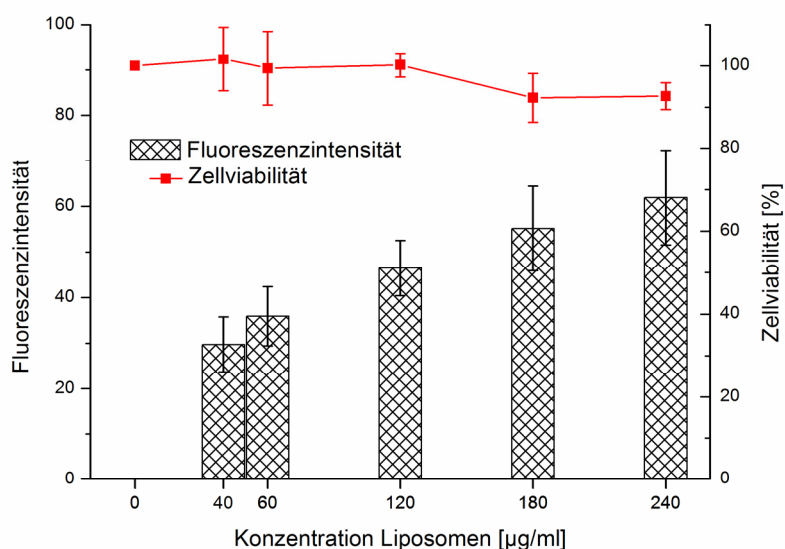


Abb. III.13: Aufnahme von Liposomen in THP-1-Zellen (Fluoreszenzintensität, linke Ordinate) und daraus resultierende Zellviabilitäten (rechte Ordinate) Die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen (0 $\mu\text{g/ml}$) wurde = 0 gesetzt, die Viabilität der unbehandelten Zellen wurde = 100 % gesetzt; unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten der Liposomenchargen wurden korrigiert (n = 6, arithm. Mittel \pm Standardabweichung)

Höhere Liposomenkonzentrationen führten zu einem Ablösen der Zellen vom Plattenboden. Das muss nicht auf eine zytotoxische Wirkung der Liposomen zurückzuführen sein, da die verbliebenen Zellen mikroskopisch unauffällig waren. Allerdings war weder eine Quantifizierung der abgelösten Zellen noch deren Beurteilung – tot, beschädigt, intakt – möglich, da sie nach dem Waschen abgesaugt

wurden. Deshalb wurde eine Liposomenkonzentration von 180 µg/ml als ideale Konzentration beurteilt, wobei bei vielen Versuchen, wenn es der Platz zuließ, Konzentrationen von 240 µg/ml mit untersucht wurden, um sicherzugehen, tatsächlich die höchstmögliche Konzentration eingesetzt zu haben.

III.1.7 Einfluss von Liposomen auf moDC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die hergestellten Liposomen von THP-1-Zellen aufgenommen werden und nicht zytotoxisch sind, wurden sie an humanen DC, die aus Monozyten gesunder Spender differenziert wurden (moDC) getestet. Dabei wurden Kontroll-Liposomen ohne Fluoreszenzmarkierung mit FITC-markierten neutralen und positiv geladenen Liposomen, welche 5 % StA enthielten, verglichen. Als Positivkontrolle diente ein Reifungscocktail aus Zytokinen (jeweils 10 ng/ml TNF- α und IL-1 β , 100 U/ml IL-6) und 1 µg/ml PGE₂ (Jonuleit et al. 1997), der zuverlässig moDC zur Reifung induziert.

Die Liposomen wurden mit den unreifen moDC inkubiert, anschließend wurden die entsprechenden Antikörper zugegeben und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

An der gestiegenen Fluoreszenz in Zeile A der Abb. III.14 kann man sehen, dass die Liposomen in die moDC aufgenommen wurden. In den Dotplots ist die Fluoreszenz des FITC gegen die eines Antikörpers gegen CD209 dargestellt. CD209 wird auch als *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) bezeichnet und ist essenziell für den Kontakt der DC mit T-Zellen (Geijtenbeek et al. 2000). Da es nur auf DC und einigen spezialisierten Makrophagen der Lunge und Plazenta vorkommt (Khoo et al. 2008), dient es hier als Marker, dass die untersuchten Zellen tatsächlich DC waren.

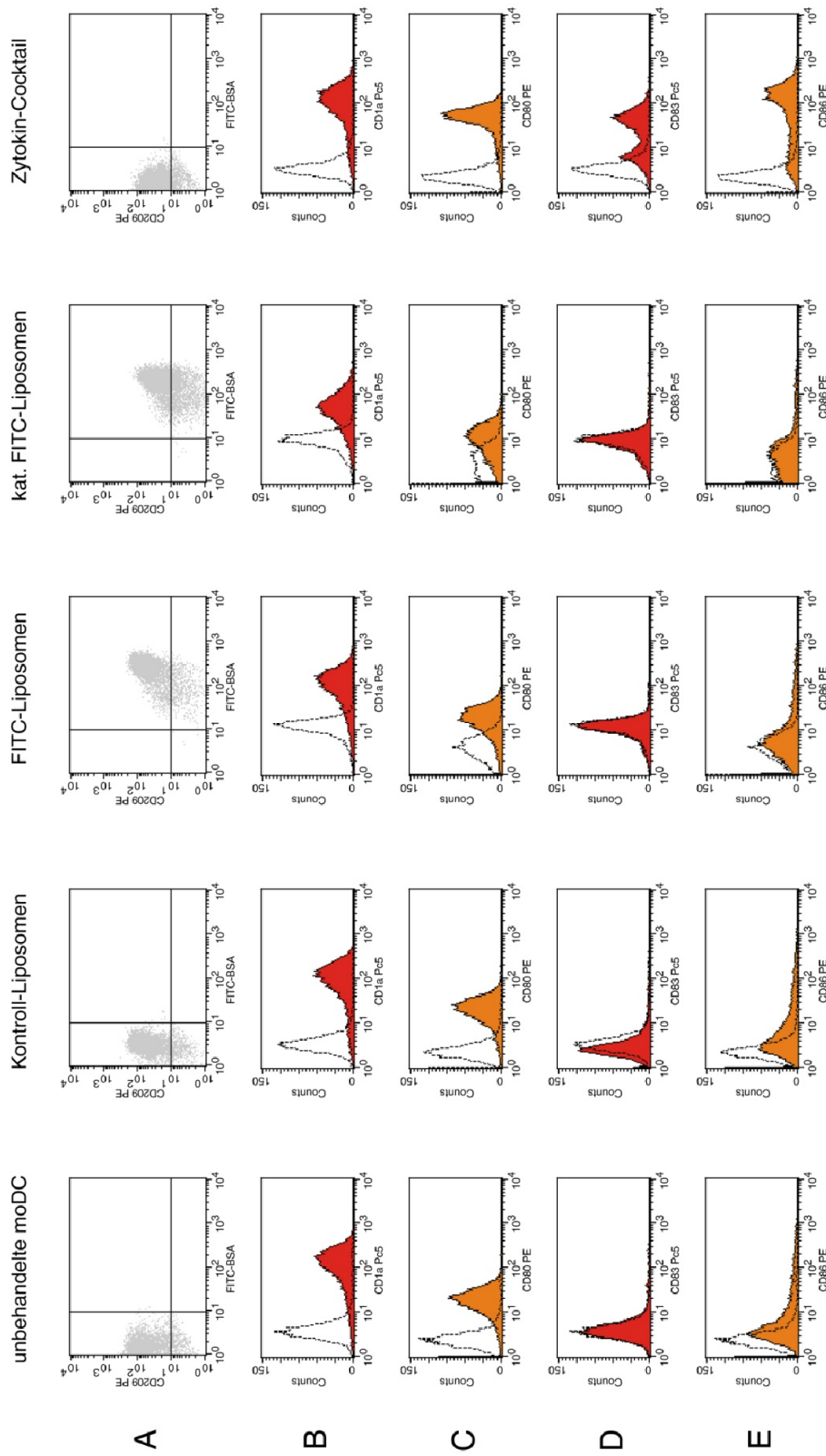


Abb. III.14: Aufnahme von Liposomen und Effekt auf moDC. A: FITC-Fluoreszenz durch aufgenommene FITC-markierte Liposomen; B: CD11a-Expression; C: CD80 (B7.1)-Expression; D: CD 83 (HB15)-Expression; E: CD86 (B7.2)-Expression

Die Kontroll-Liposomen bewirkten keinen Anstieg der Fluoreszenz, da sie keinen Fluoreszenzfarbstoff enthielten. Da die beiden anderen Liposomen-Chargen aufgenommen wurden kann man aber von einer Aufnahme auch der unmarkierten Kontroll-Liposomen in die moDC ausgehen.

In Zeile B der Abb. III.14 ist zu sehen, dass unbehandelte iDC und mDC das Oberflächenmolekül CD1a exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass CD1a⁺ DC besonders viel IL-12 ausschütten können und so eine T_H1-Antwort induzieren (Cernadas et al. 2009). Die Inkubation mit Liposomen führte in keinem Fall zu einer deutlichen Herunterregulierung der CD1a-Expression.

Die Oberflächenmoleküle CD80 (Abb. III.14, Zeile C) und CD86 (Abb. III.14, Zeile E) werden von unreifen moDC nur wenig (CD80) oder gar nicht (CD86) exprimiert. Sie sind für ein Priming von naiven CD4⁺ T-Zellen essenziell und werden bei der DC-Reifung hochreguliert.

Auch CD83 (Abb. III.14, Zeile D) wird während der DC-Reifung hochreguliert, es ist nur auf mDC, nicht auf iDC zu finden. Deshalb wird es als DC *Maturation marker* bezeichnet. Seine genaue Funktion ist bisher ungeklärt (Breloer und Fleischer 2008).

Die Behandlung mit Liposomen, die kein Reifungsstimulans trugen, führte in keinem Fall zu einer Reifung der moDC. Dabei spielte weder der Fluoreszenzmarker FITC-StA noch eine positive Oberflächenladung, die durch StA hervorgerufen wurde, eine Rolle. Dabei waren die untersuchten moDC durchaus in der Lage zu reifen, wie durch die Behandlung mit dem Zytokin-Cocktail gezeigt werden konnte: Hier waren alle drei untersuchten Reifungssignale deutlich erhöht.

Die Behandlung mit Liposomen führt auch sonst zu keiner nennenswerten Veränderung der Proteinexpression: Weder CD209 (DC-SIGN) noch CD1a werden durch die untersuchten Liposomen hoch- oder herunterreguliert.

III Ergebnisse und Diskussion

III.1.7.1 Zytotoxizität

Bei der Bestimmung des Anteils lebender Zellen an der Gesamtzellzahl (Abb. III.15) sieht man deutlich, dass die Kontroll-Liposomen und die FITC-markierten neutralen Liposomen keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Diese bleibt immer deutlich über 80 % und liegt meist sogar über der Viabilität der unbehandelten moDC (unreife DC) sowie der mit Zytokin-Cocktail gereiften mDC. Dagegen sinkt die Viabilität der positiv geladenen, StA-haltigen Liposomen schon bei 25 $\mu\text{g/ml}$ deutlich und erreicht bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Werte von nur noch etwa 50 %.

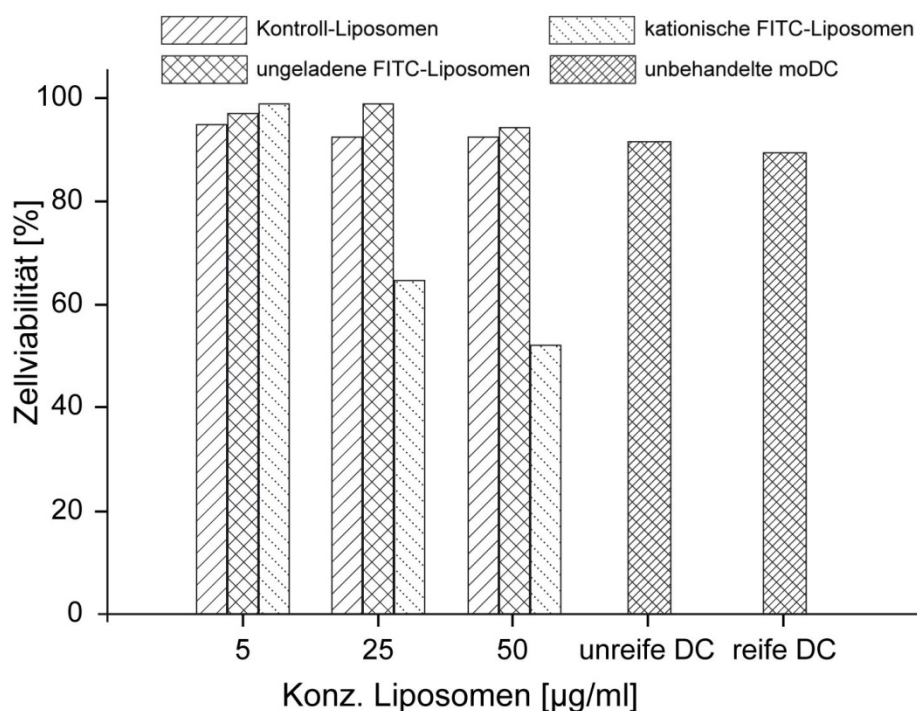


Abb. III.15: Zellviabilität von moDC nach Inkubation mit unterschiedlichen Liposomen. Reife unbehandelte moDC wurden mit Zytokinen behandelt. (Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl in der Durchflusszytometrie)

III.1.7.2 Nachreifung der moDC

Liposomen alleine führen nicht zu einer Reifung von moDC. Um auszuschließen, dass Liposomen die Reifung inhibieren, wurden die mit Liposomen behandelten moDC anschließend mit Reifungsstimulanzen behandelt. Die vorinkubierten moDC wurden entweder mit bakteriellem Endotoxin (LPS mit Zusatz von IFN- γ) oder dem oben erwähnten Zytokin-Cocktail inkubiert.

Die Abb. III.16 zeigt, dass von den mit Liposomen vorbehandelten moDC knapp unter 80 % CD1a⁺/CD209⁺ (DC-Marker) waren, es sich also um DC handelte, während bei den nicht-vorbehandelten Kontrollen (unbehandelte moDC) zwischen 80

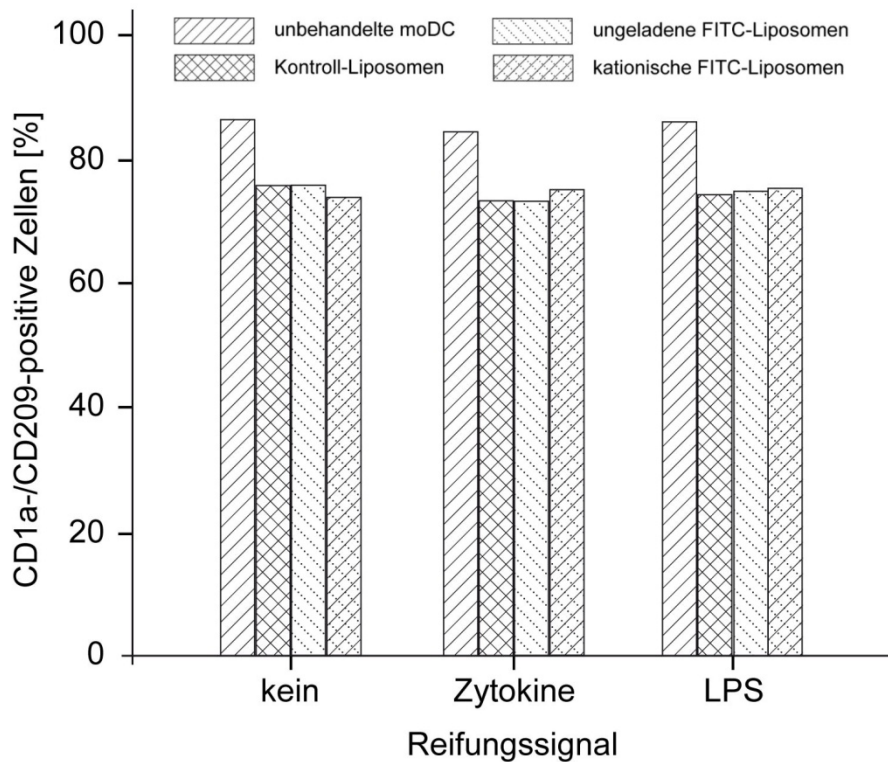


Abb. III.16: CD1a-/CD209- (DC-Marker) doppelt positive Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Liposomen und anschließender Reifung mit LPS/IFN- γ (LPS), Zytokin-Cocktail oder ohne Reifungsstimulanz (Liposomenkonzentration: 50 μ g/ml)

III Ergebnisse und Diskussion

und 90 % der Zellen DC waren. Dabei spielte die Art der Liposomen keine Rolle. Da die Zellviabilität durch die Liposomenbehandlung nicht sinkt (siehe oben), scheint es durch die Liposomen doch zu einer geringfügigen Rückdifferenzierung der moDC zu kommen. Der Anteil der DC an der Gesamtzellzahl ändert sich durch eine Nachreifung nicht.

Mit Liposomen vorbehandelte moDC exprimieren nach Inkubation mit dem Zytokin-Cocktail wie mit LPS das co-stimulatorische Molekül CD86 und den Reifungsmarker CD83 in vergleichbarem Ausmaß wie nicht vorbehandelte, unreife DC (Abb. III.17). Dabei fällt auf, dass nach einer Vor-Inkubation mit Liposomen der Zytokin-Cocktail nicht so viele CD86⁺/CD83⁺ moDC induziert wie ohne Liposomen-Behandlung. Die Reifung durch LPS ist dagegen kaum beeinträchtigt.

Bei beiden Reifungsstimulanzen ist zu sehen, dass nach einer Vor-Inkubation mit positiv geladenen, StA-haltigen Liposomen nicht mehr so viele DC reifen wie nach Behandlung mit neutralen Liposomen. Da nach der Inkubation mit positiven Liposomen die Zellviabilität stark zurückgegangen war (siehe Abb. III.15), lässt sich dieses Ergebnis mit einer Zellschädigung der DC erklären. Allerdings sind diese Zellen wohl noch lebendig, nur ihre Fähigkeit zu reifen scheint gestört zu sein. Wie in Abb. III.18 zu sehen ist, unterscheiden sich die Anteile viabler Zellen in den verschiedenen Ansätzen kaum, er liegt durchgehend über 80 %.

Diese Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellviabilität und zur Expression der Reifungsmarker deuten darauf hin, dass durch kationische Liposomen (oder durch StA) die Fähigkeit der DC, von Zytokinen zur Reifung gebracht zu werden, gestört wird. Da DC-Reifung, Antigen-Präsentation, Cross-presentation und Priming der T-Zellen stark von verschiedenen Zytokinen beeinflusst und gesteuert werden, wurde auf weitere Untersuchungen von positiv geladenen Liposomen an moDC verzichtet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reifung von mit Liposomen vorbehandelten moDC zeigen, dass Liposomen alleine die Reifung zu mDC nicht beeinträchtigen. Allerdings beeinflussen positiv geladene, StA-haltige Liposomen die Fähigkeit der moDC, von Zytokinen zur Reifung induziert zu werden.

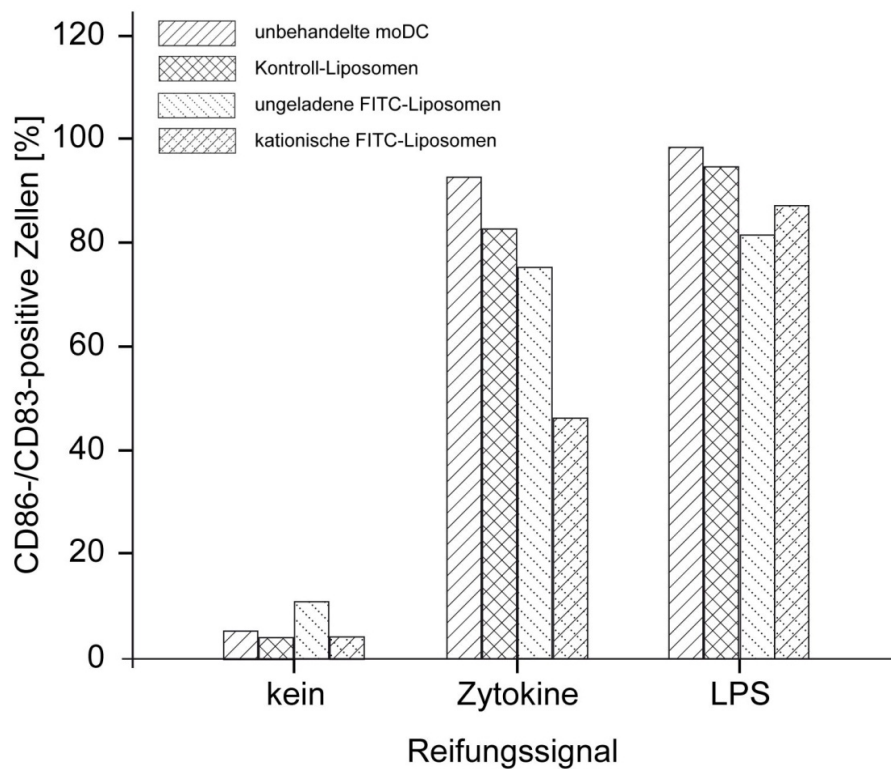


Abb. III.17: CD86-/CD83- (Reifungsmarker) doppelt positive Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Liposomen und anschließender Reifung mit LPS/IFN- γ (LPS), Zytokin-Cocktail oder ohne Reifungsstimulanz (Liposomenkonzentration: 50 $\mu\text{g/ml}$)

III.1.7.3 Fazit

Liposomen sind prinzipiell dazu geeignet, als Trägersystem Stoffe in DC zu transportieren. Sie werden von moDC aufgenommen und wirken nicht zytotoxisch auf sie. Liposomen induzieren *per se*, also ohne zusätzliche Reifungsstimulanzen, keine Reifung von moDC oder andere Veränderungen im Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen. Damit erscheint es zumindest unwahrscheinlich, dass Effekte

III Ergebnisse und Diskussion

von den Stoffen, mit denen die Liposomen beladen werden – beispielsweise Rezeptorliganden und/oder Antigen – von den Liposomen inhibiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Liposomen ohne ausgeprägte Oberflächenladung (neutrale Liposomen) die Fähigkeit von moDC zur Reifung nicht beeinträchtigen.

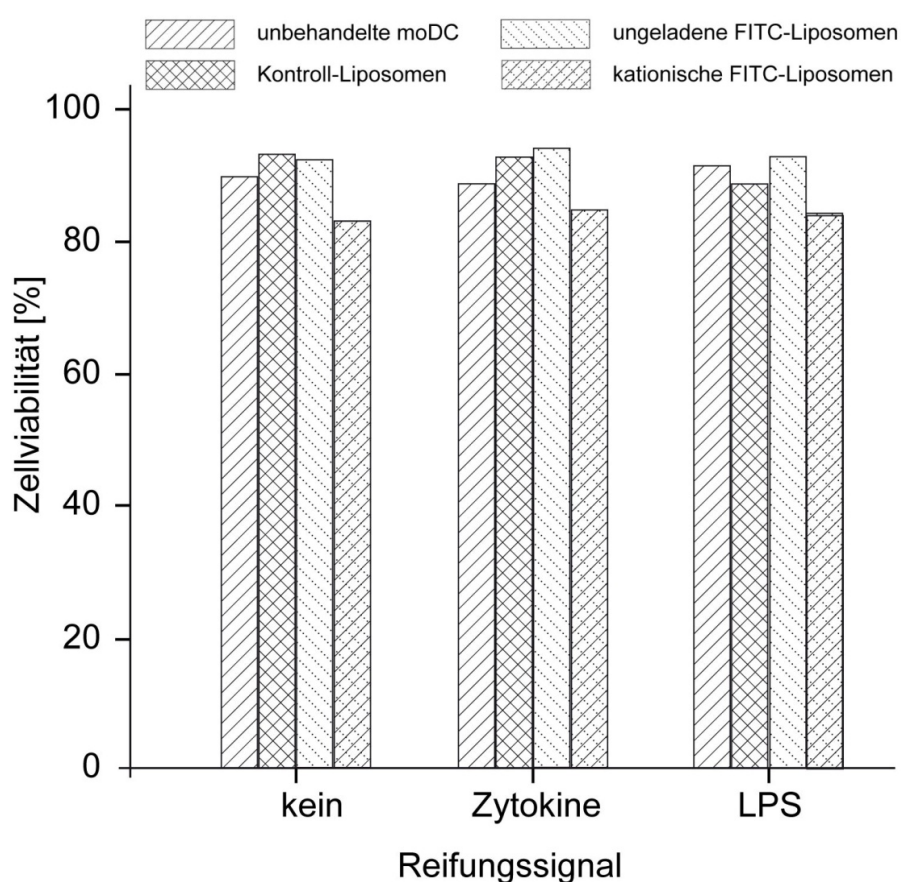


Abb. III.18: Lebende Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Liposomen und anschließender Reifung mit LPS/IFN- γ (LPS), Zytokin-Cocktail oder ohne Reifungsstimulanz (Liposomenkonzentration: 50 μ g/ml; Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl in der Durchflusszytometrie)

III.2. Quantifizierung der Lipopeptide

Um eine erfolgreiche Beladung der Liposomen mit künstlichen Lipopeptiden zeigen zu können, musste eine Quantifizierungsmethode für diese Lipopeptide entwickelt werden. Lutsiak et al. hatten 2002 eine Methode zur Bestimmung des Peptid- und Lipopeptidgehaltes in Liposomen veröffentlicht. Die Liposomen wurden mit 98 %igem Ethanol lysiert, wobei die inkorporierten Peptide in Lösung gingen. Nach Zentrifugieren, um evtl. ungelöste Liposomenbestandteile abzutrennen, wurde der Überstand mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) untersucht. Lutsiak et al. verwendeten dazu eine RP-18 Umkehrphasensäule, als Laufmittel Acetonitril-Wasser-Gemische in verschiedenen Anteilen mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und detektierten die Peptidbindungen mit einem UV-Detektor bei 210 nm. Allerdings konnte mit dieser Methode von dem inkorporierten Lipopeptid maximal 25 % wieder extrahiert werden (Lutsiak et al. 2002). Trotzdem diente die Methode als Ausgangspunkt für die quantitative Bestimmung der hier verwendeten Lipopeptide.

Da die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Lipopeptide unpolarer als das von Lutsiak et al. beschriebene war, mussten die Laufmittelmischungen und der Gradient angepasst werden. Bei einem Wasseranteil von 5 % und 0,1 % TFA (Vol./Vol.) in Acetonitril hatten alle untersuchten Lipopeptide Retentionszeiten zwischen 1,8 und 2,5 min und zeigten ausreichend scharfe Peaks. Um die deutlich unpolaren Liposomenbestandteile wie das Phosphatidylcholin zu eluieren, wurde anschließend der Wasseranteil im Laufmittel sukzessive auf 1 % (Vol./Vol.) gesenkt. Die anderen Liposomenbestandteile ließen sich mit dem zur Verfügung stehenden UV-Detektor nicht detektieren, eine Laufzeit von 30 min wurde aber als ausreichend angesehen, um alle Lipide vollständig von der Säule zu entfernen. Auch bei sehr vielen Läufen nacheinander konnte nie eine Beeinträchtigung der Lipopeptidbestimmung durch eine Verschmutzung der Säule festgestellt werden.

Die ersten Versuche wurden mit dem synthetischen Lipopeptid FSL-1, das die immunogene Domäne eines Membranproteins von *Mycoplasma salivarium*

III Ergebnisse und Diskussion

nachbildet, durchgeführt. Die Abb. III.19 zeigt die Ergebnisse dieser HPLC-Bestimmung von FSL-1 in Konzentrationen von 0,01 bis 0,20 µg/ml.

Die entwickelte Methode eignete sich auch für die Quantifizierung der anderen synthetischen Lipopeptide. Wie in den Abb. III.20, III.21 und III.22 zu sehen ist, zeigten sowohl die Gehaltsbestimmungen der diacylierten Lipopeptide FSL-1 und FSL-rho wie der triacylierten OspA und BAS durchgehend Korrelationskoeffizienten R^2 von $> 0,998$.

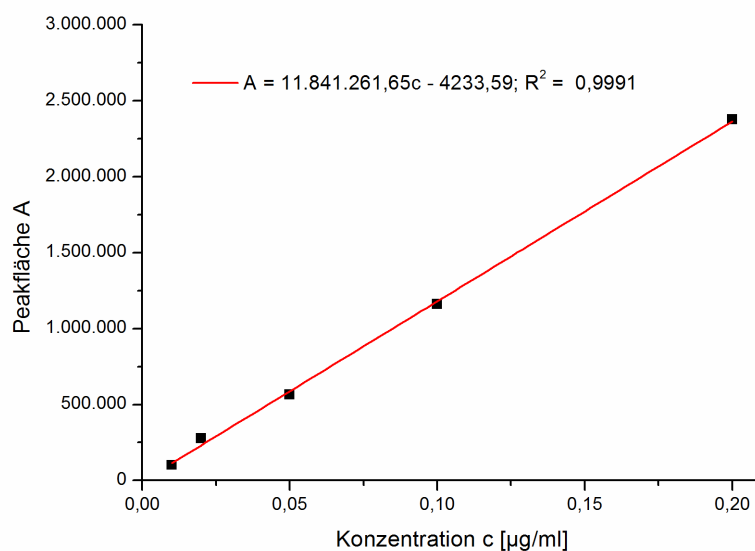


Abb. III.19: Gehaltsbestimmung von FSL-1 mit der Ausgleichsgerade, der Geradengleichung und dem Bestimmtheitsmaß R^2 (Doppelbestimmungen)

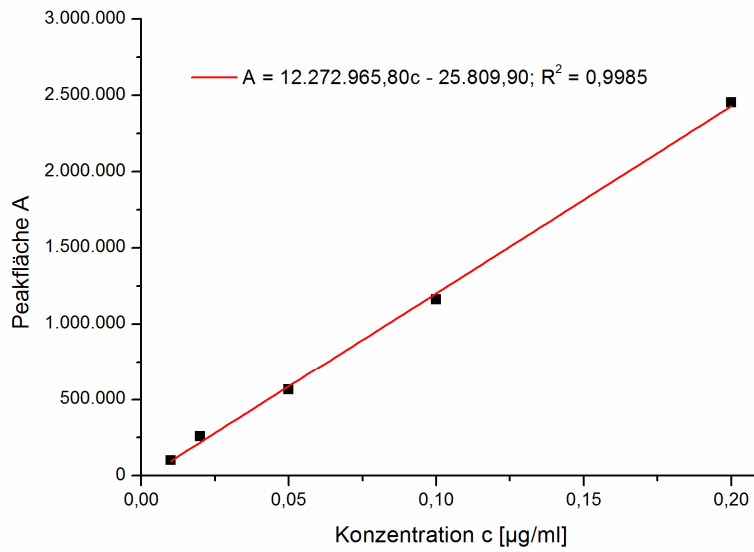


Abb. III.20: Gehaltsbestimmung von Rhodamin-markiertem FSL-1 (FSL-rho) mit der Ausgleichsgerade, der Geradengleichung und dem Bestimmtheitsmaß R^2 (Dreifachbestimmungen)

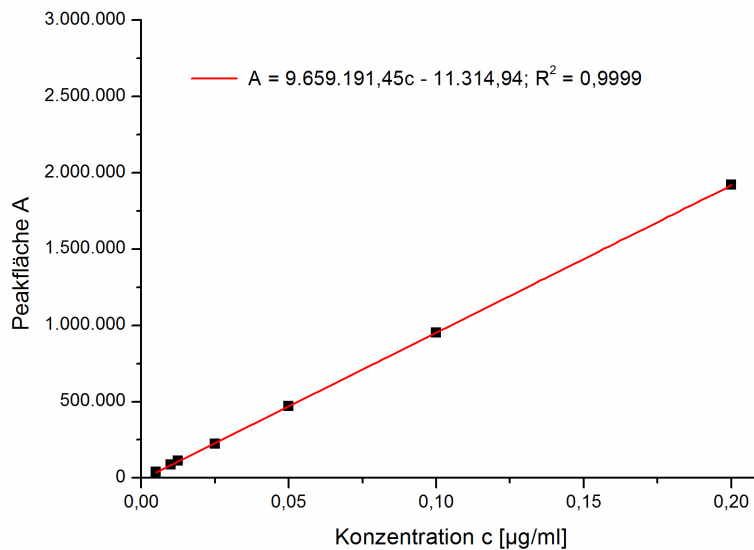


Abb III.21: Gehaltsbestimmung von OspA mit der Ausgleichsgeraden, der Geradengleichung und dem Bestimmtheitsmaß R^2 (Vierfachbestimmungen)

III Ergebnisse und Diskussion

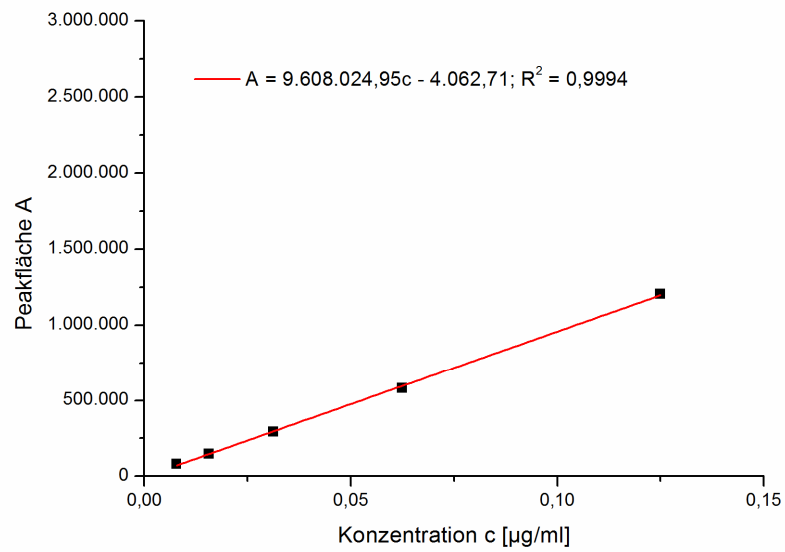


Abb. III.22: Gehaltsbestimmung von BAS mit der Ausgleichsgeraden, der Geradengleichung und dem Bestimmtheitsmaß R^2 (Doppelbestimmungen)

III.3 Herstellung lipopeptidbeladener Liposomen

Um lipopeptidhaltige Liposomen herzustellen, gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Wege: Entweder werden bereits vorhandene Liposomen nachträglich mit Lipopeptiden beladen oder die Lipopeptide werden während der Liposomenbildung in die Membran eingebaut.

III.3.1 Nachträgliche Beladung fertiger Liposomen

Bei der nachträglichen Beladung vorher hergestellter Liposomen (*preformed liposomes*) werden die Lipopeptide zu der Liposomensuspension gegeben. Ohne weitere Maßnahmen, um die Lipopeptide in die Membran zu inkorporieren, werden sie aber höchstens an die Liposomenoberfläche adsorbieren.

III.3.1.1 Freeze and Thaw-Methode

Für die Beladung von Liposomen mit Proteinen ist beschrieben, dass wiederholtes Frieren und Auftauen der Liposomen in der Proteinlösung (*Freeze and Thaw-Cycling*) zu hohen Verkapselungseffizienzen führt (Kasahara und Hinkle 1977, Chapman et al. 1991, Zhou et al. 1991). Dabei wird die Liposomensuspension zusammen mit dem zu verkapselnden Stoff (Protein bzw. hier Lipopeptid) mehrmals schnell tiefgefroren (meist in flüssigem Stickstoff oder in stark gekühlten organischen Lösemitteln, z. B. -80 °C kaltem Isopropanol) und anschließend in einem warmen Wasserbad für mehrere Minuten aufgetaut.

Um die Anzahl der nötigen Frier-Tau-Zyklen zu ermitteln und zu überprüfen, ob eine Auftautemperatur unterhalb oder oberhalb der Filmbildetemperatur von Phosphatidylcholin (ca. 40 °C) vorteilhaft ist, wurden Liposomen zusammen mit FSL-1 mehreren Frier-Tau-Zyklen unterzogen. Dabei wurden vor dem ersten Einfrieren in -80 °C kaltem Isopropanol und nach dem 3., 5. und 10. Auftauen bei

III Ergebnisse und Diskussion

entweder 30 °C oder 50 °C der Lipopeptidgehalt sowie der Z-ave und der PI bestimmt.

Vor dem ersten Einfrieren war überhaupt kein FSL-1 in den Liposomen nachweisbar, obwohl bei diesem Versuch das Lipopeptid nicht erst nach der Liposomenbildung zugesetzt worden war, sondern bereits im Suspensionspuffer in einer Konzentration von 10 µg/ml enthalten war. Der Gehalt an FSL-1 steigt dann mit zunehmender Anzahl an Frier-Tau-Zyklen an und erreicht nach 5 Zyklen seinen maximalen Wert: Bei den Liposomen, die mit 30 °C aufgetaut wurden, konnten maximal 6,24 %, bei den mit 50 °C aufgetauten Liposomen maximal 5,62 % des eingesetzten Lipopeptids eingebaut werden (Abb. III.23).

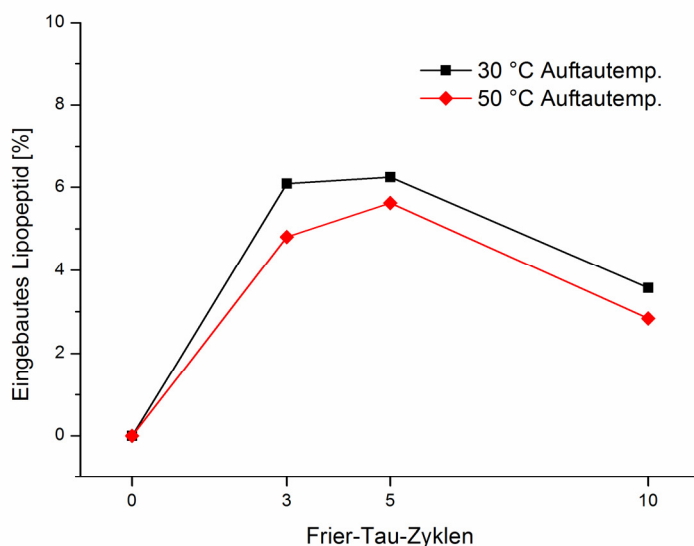


Abb. III.23: Anteil des in Liposomen eingebauten FSL-1 (in % des eingesetzten FSL-1) nach 0, 3, 5 und 10 Zyklen mit 30 und 50 °C Auftautemperatur (n = 1)

Nach 10 Zyklen sank der Lipopeptidgehalt auf 3,58 % (30 °C) bzw. 2,84 % (50 °C). Die Teilchengrößen der Liposomen sanken kontinuierlich von 2300 nm vor dem ersten Zyklus auf 440 nm (30 °C Auftautemperatur) bzw. 583 nm (50 °C Auftautemperatur). Die Teilchengrößenverteilung dagegen zeigte die kleinsten PI-Werte nach 5 Zyklen (siehe Tab. III.1 und die Abb. III.24 und III.25). Auffallend ist, dass die Liposomen mit dem höchsten FSL-1-Gehalt die kleinsten PI-Werte zeigen. Da die Lipopeptide amphiphile Substanzen sind, kann hier eine Tensidwirkung angenommen werden, welche sich auf die Membraneigenschaften der Liposomen auswirkt.

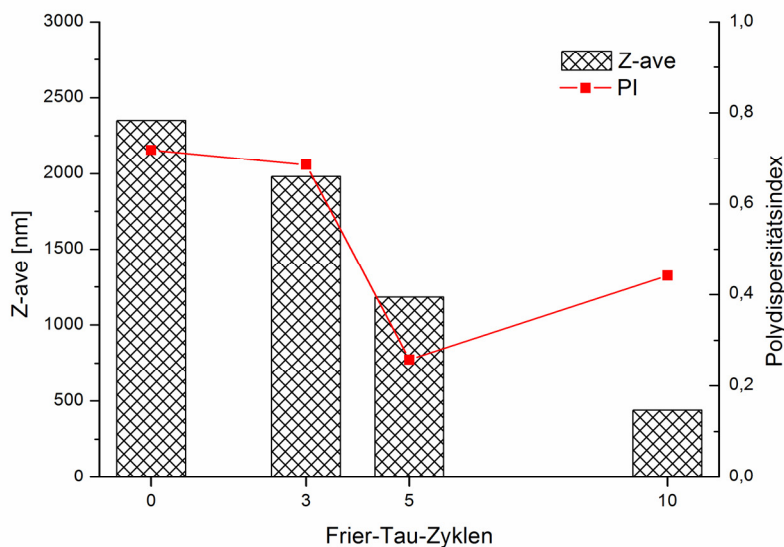


Abb. III.24 Durchmesser (Z-ave) und Größenverteilung (Polydispersitätsindex PI) von Liposomen nach 0, 3, 5 und 10 Zyklen mit 30 °C Auftautemperatur (n = 1)

III Ergebnisse und Diskussion

Tab. III.1: Teilchengrößen (Z-ave) und Größenverteilung (Polydispersitätsindex) von FSL-1-Liposomen nach Frier-Tau-Zyklen mit unterschiedlicher Auftau-Temperatur

Anzahl FAT-Zyklen	0	3	5	10			
Auftau-Temperatur [°C]	-	30	50	30	50	30	50
Durchmesser (Z-ave) [nm]	2350,7	1979,1	2015,1	1183,3	1330,7	439,7	583,0
Polydispersitätsindex (PI)	0,719	0,686	0,734	0,258	0,500	0,441	0,727

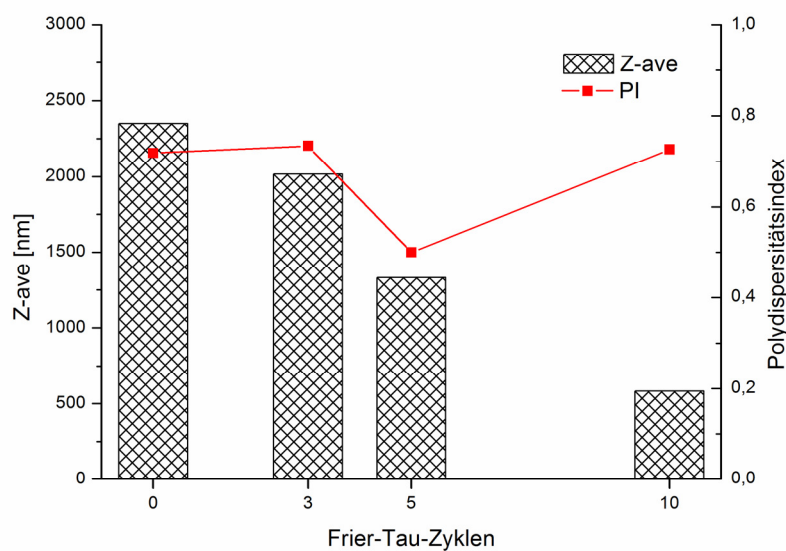


Abb. III.25: Durchmesser (Z-ave,) und Größenverteilung (Polydispersitätsindex PI) von Liposomen nach 0,3,5 und 10 Zyklen mit 50 °C Auftemperatur (n = 1)

Einbau von BAS

Triacylierte Lipopeptide sind lipophiler als diacylierte, könnten also leichter vom wässrigen Puffer in die lipophile Phase der Liposomen gelangen. Darüber hinaus steht ihnen eine weitere Fettsäure als „Anker“ in der Liposomenmembran zur Verfügung. Dieser Einfluss der Anzahl an Fettsäuren im Lipopeptid wurde mit dem triacylierten BAS-Lipopeptid untersucht. Dafür wurden Liposomen nach der Methode, die das beste Ergebnis mit FSL-1 erzielte (30 °C Auftautemperatur, 5 Zyklen), mit dem triacylierten BAS-Lipopeptid beladen. Tatsächlich wurden von dem triacylierten Lipopeptid deutlich größere Anteile, nämlich 12,4 %, 16,7 % und 18,0 % in den Liposomen gefunden.

Einfluss der Oberflächenladung der Liposomen

Die verwendeten synthetischen Lipopeptide lassen nach ihrer Aminosäuresequenz keine ausgeprägte Nettoladung erwarten, auch in der Literatur ist dies nicht beschrieben. Trotzdem könnten die Lipopeptide an Liposomen mit einer Oberflächenladung – positiv wie negativ – stärker adsorbieren, was wiederum die Beladungseffektivität steigern könnte. Aus diesem Grund wurden Liposomen mit einer eindeutig negativ geladenen Oberfläche durch den Zusatz von 5 % Dicetylphosphat hergestellt. Zum Vergleich wurden neutrale und positiv geladene Liposomen mit 5 % Stearylamin herangezogen. Die Liposomen wurden nach der oben beschriebenen Methode mit 5 Zyklen und 30 °C Auftautemperatur mit dem triacylierten Lipopeptid OspA beladen. Die Tab. III.2 zeigt, dass geladene Liposomen eine etwas höhere Beladung mit OspA zeigen als ungeladene, die Werte aber durchgehend sehr niedrig sind.

Auffallend ist, dass sich Liposomen nur mit sehr wenig OspA beladen ließen, obwohl es ebenso wie BAS triacyliert ist. Offensichtlich ist die vergleichsweise hohe Einbaueffektivität von BAS nicht oder nicht ausschließlich auf die Anzahl der Fettsäuren zurückzuführen. Eventuell müssen Zyklenzahl und Auftautemperatur auch für jedes Lipopeptid neu optimiert werden.

III Ergebnisse und Diskussion

Tab III.2: Einfluss der Oberflächenladung von Liposomen auf ihren Lipopeptidgehalt nach 5 Frier-Tau-Zyklen mit 30 °C Auftemperatur

	negative Ladung (5 % Dicetylphosphat)	neutral	positive Ladung (5 % Stearylamin)
Zetapotenzial vor Beladung	- 41,3 mV	- 1,2 mV	+ 42,4 mV
eingebautes OspA	1,12 %	0,64 %	0,99 %

Weitere Optimierungsschritte

Die mit der Frier-Tau-Methode erreichten niedrigen Einbaueffektivitäten sind für die teuren synthetischen Lipopeptide bei weitem nicht ausreichend und nicht reproduzierbar. Der Lipopeptidgehalt schwankt sehr stark, sowohl von Lipopeptid zu Lipopeptid als auch zwischen einzelnen Chargen des selben Lipopeptids. Versuche, die Beladung dadurch zu steigern, dass Puffer mit höherer Lipopeptidkonzentration für das *Freeze-Thawing* eingesetzt wurden, scheiterten. So führte beispielsweise eine Erhöhung der FSL-1-Konzentration im Puffer von den oben eingesetzten 10 µg/ml auf 75 µg/ml zu einer Auflösung der Liposomen. Nach der Zentrifugation wurde nicht wie sonst ein Liposomenpellett gefunden, sondern eine Phasentrennung in wässrigen Puffer unten und Lipid-Phase oben. Dies wurde auf eine Tensid-ähnliche Wirkung der amphiphilen Lipopeptide zurückgeführt. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Optimierung der Prozessparameter zugunsten anderer Herstellungsmethoden verzichtet.

III.3.2. Lipopeptid-Einbau während der Liposomenbildung

III.3.2.1 Filmbildemethode

Um amphiphile Substanzen wie Lipopeptide stabil in die Membran von Liposomen einzubauen, kann man sie bereits vor der eigentlichen Bildung der Liposomen der Lipidphase zusetzen und die Liposomen mit den üblichen Methoden herstellen.

Um lipopeptidhaltige Liposomen mit der Filmbildemethode herzustellen, kann man die in wässriger Lösung befindlichen Lipopeptide zu den gelösten Lipiden geben. Phosphatidylcholin und Cholesterol waren in Ethanol gelöst, das FITC-Stearylamin in einem Methanol-Chloroform-Gemisch, so dass sich die Lösungen problemlos mischen ließen. Anschließend wurde das Lösemittelgemisch bei 40 °C und erniedrigtem Druck entfernt. Durch das kleine Volumen, es wurden 0,1 % Lipopeptid (in einer Konzentration von 100 µg/ml in wässriger Lösung) eingesetzt, ließ sich das Wasser problemlos mit den organischen Lösemitteln zusammen entfernen.

Nach dem Suspendieren des Lipidfilms im warmen PBS wurde auf eine Extrusion verzichtet, damit es nicht zu einer Adsorption der Lipopeptide an den Membranen kommen kann.

Bei der Herstellung von Liposomen, die BAS oder Rhodamin-markiertes FSL-1 (FSL-rho) enthielten, konnte praktisch das gesamte Lipopeptid in die Liposomen eingebaut werden. In den Überständen wurde nach Zentrifugation kein Lipopeptid mehr detektiert (siehe Tab. III.3). Das Lipopeptid wurde auch durch Waschen der Liposomen mit PBS nicht von bzw. aus den Liposomen abgelöst.

III.3.2.2 Hydratation-Rehydratation-Methode

Auch bei dieser Methode werden die Lipopeptide der Lipidphase zugesetzt, bevor sich die Liposomen bilden. Anders als bei der Filmbildemethode werden die Lipide hydratisiert, das heißt in Wasser suspendiert, und bei erhöhter Temperatur (55 °C) quellen gelassen (Hydratisieren). Dann wird die Suspension lyophilisiert, um das

III Ergebnisse und Diskussion

Wasser zu entfernen, und anschließend im entsprechenden Puffer (PBS) rehydratisiert.

Auch mit dieser Methode konnte der praktisch vollständige Einbau der Lipopeptide erreicht werden. Zwar wurde bei dieser Methode teilweise noch eine kleine Menge Lipopeptid im Überstand gefunden, doch wurden durchgehend über 97 % des eingesetzten Lipopeptids in die Liposomen eingebaut (siehe Tab. III.3).

Tab. III.3: Anteil eingebauten Lipopeptids bei verschiedenen Methoden zur Liposomenherstellung (% des eingesetzten Lipopeptides; n = 3; Spannweite)

	Freeze and Thaw	Filmbildemethode	Hydration/Rehydration
FSL-rho	0,00 – 31,35	99,91 – 99,91 *	99,42 – 99,89
BAS	12,43 – 18,01	99,99 – 99,99 *	99,42 – 99,89

*Im Überstand war kein Lipopeptid nachweisbar. An 100 % fehlendes Lipopeptid ist auf die Berechnung zurückzuführen

III.3.2.3 Beurteilung der Herstellungsmethoden

Die Beladung vorgefertigter Liposomen mit Lipopeptiden zeigte auch nach Modifikationen keine befriedigenden Ergebnisse. Die höchste Beladungseffizienz, die erreicht werden konnte, betrug 18 %, meist lag sie deutlich darunter. Für OspA lag sie sogar unter 5 %. Für die sehr teuren Lipopeptide ist eine solche Ausbeute nicht akzeptabel, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass es alternative Methoden mit sehr hoher Effizienz gibt.

Beide hier vorgestellten Herstellungsmethoden, bei denen die Lipopeptide bereits vor der eigentlichen Liposomenbildung der Lipidphase zugesetzt werden – die Filmbildemethode wie die Hydratation-Rehydratation-Methode – führen zum praktisch vollständigen Einbau

der Lipopeptide. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Lipopeptide zwei oder drei Fettsäurereste hatten. Die Tabelle III.3 zeigt noch einmal im direkten Vergleich den Lipopeptideinbau eines diacylierten (FSL-rho) und eines triacylierten (BAS) Lipopeptids in Liposomen, die mit den verschiedenen Methoden hergestellt wurden.

Die Hydration-Rehydration-Methode hat gegenüber der Filmbildemethode den Vorteil, dass das Lyophilisat aus den Lipiden und dem Lipopeptid über längere Zeiträume gelagert werden kann, während bei der Filmbildemethode eine Liposomensuspension entsteht, die nur sehr begrenzt stabil ist (siehe Kap. III.1.5).

III.4 Effekte von Lipopeptid-Liposomen auf APC

Für die Untersuchungen der Effekte von lipopeptidmodifizierten Liposomen auf Antigen-präsentierende Zellen, das heißt auf makrophagenähnliche THP-1 und auf moDC, wurden die Liposomen mit der Hydratation-Rehydratation-Methode hergestellt. Alle Liposomen waren fluoreszenzmarkiert: Entweder wurde der Lipidphase FITC-Stearylamin in Konzentrationen von 0,025 % (für FACS-Untersuchungen an moDC), 0,1 % (für Untersuchungen der Endozytose in THP-1) und 1,0 % (für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen) zugesetzt oder das Lipopeptid war selbst markiert (Modifizierung mit Rhodamin-gelabeltem FSL-1; FSL-rho). Es wurden Liposomen mit den oben genannten künstlichen Lipopeptiden FSL-1, FSL-2, FSL-rho, OspA und BAS an den Zellen getestet.

III.4.1 Untersuchungen an THP-1

III.4.1.1 TNF- α -Produktion

Makrophagen, die mit immunstimulatorischen pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMP) in Kontakt kommen, steigern unter anderem ihre Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α . Auch für bakterielle Lipopeptide und ihre synthetischen Analoga ist diese Wirkung auf Makrophagen bekannt (Okusawa et al. 2004, Mae et al. 2007).

Um zu untersuchen, ob auch lipopeptidhaltige Liposomen die TNF- α -Produktion erhöhen, wurden THP-1-Makrophagen mit ihnen inkubiert. Anschließend wurde den Zellen Zeit gegeben, TNF- α zu produzieren und dann dessen Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Die Abb. III.26 zeigt, dass durch Liposomen, die mit FSL-1 oder FSL-rho modifiziert waren, die Produktion von TNF- α konzentrationsabhängig ansteigt. Der leichte Rückgang der Zytokinkonzentration bei einer Liposomenkonzentration von 300 μ g/ml

ist, wie bereits im Abschnitt III.1 erwähnt, auf ein Ablösen der Zellen vom Plattenboden zurückzuführen, welches unter dem Mikroskop deutlich sichtbar war.

Bei allen untersuchten Konzentrationen stimulierte FSL-rho die TNF- α -Produktion etwas stärker als das unmarkierte FSL-1. Leere Liposomen ohne Lipopeptid (FITC-Liposomen) senkten überraschenderweise die TNF- α -Produktion.

Bei dem in Abb. III.26 gezeigten Experiment wurden die beiden Lipopeptide FSL-1 und FSL-rho auch in nicht-liposomaler, löslicher Form sowie als Positivkontrolle LPS in der Konzentration 100 ng/ml eingesetzt. Dies ist die vom Hersteller empfohlene Arbeitskonzentration der Lipopeptide für eine TLR-Stimulierung. Wie die Tab. III.4 zeigt, induzieren die Lipopeptide in ihrer gelösten Form eine deutlich stärkere TNF- α -Produktion als die liposomalen Lipopeptide.

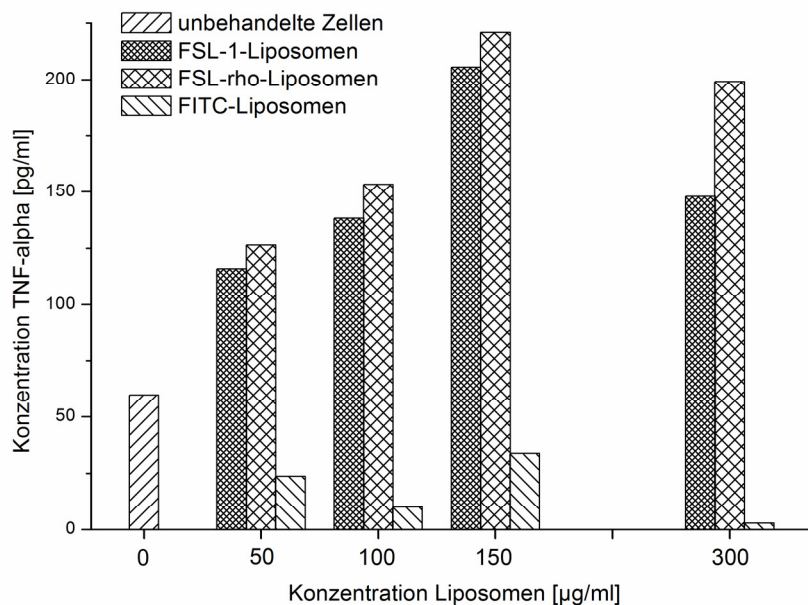


Abb. III.26: TNF- α -Konzentrationen im Zellüberstand nach Inkubation von THP-1-Zellen mit FSL-1-modifizierten Liposomen (1 repräsentatives Experiment)

III Ergebnisse und Diskussion

Tab. III.4: TNF- α -Produktion von THP-1-Zellen nach Inkubation mit FSL-1-modifizierten Liposomen und gelöstem FSL-1, FSL-rho und LPS (1 Experiment)

	FSL-1-Liposomen	gelöstes FSL-1	FSL-rho-Liposomen	gelöstes FSL-rho	LPS
Konzentration Ligand	entspricht 100 ng/ml	100 ng/ml	entspricht 100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
Konzentration TNF- α [pg/ml]	138,27	465,83	153,27	460,56	96,11

Um die Effekte von liposomalen triacylierten Lipopeptiden zu untersuchen, wurden die differenzierten THP-1-Zellen mit BAS-modifizierten Liposomen behandelt. Auch hier dienten das lösliche Lipopeptid und LPS als Kontrollen. Allerdings wurde hier das lösliche BAS in der Konzentration 10 ng/ml eingesetzt, da in vorausgegangenen Experimenten mit gelösten Lipopeptiden die TNF- α -Produktion durch 100 ng/ml BAS so hoch war, dass sie außerhalb des Nachweisbereichs des Tests lag.

Erstaunlicherweise zeigte sich in diesem Versuch kein Unterschied in der TNF- α -Produktion zwischen den untersuchten BAS-Liposomen (zwei Chargen mit je 0,1 % BAS) und den Kontroll-Liposomen (FITC-Liposomen). Nur bei der höchsten Liposomenkonzentration (300 μ g/ml) produzieren mit BAS-Liposomen behandelte THP-1-Makrophagen mehr TNF- α (siehe Abb. III.27). Dieses Ergebnis könnte aber auch bedeuten, dass sich mehr der mit FITC-Liposomen behandelten Zellen vom Plattenboden gelöst haben.

Auch hier zeigte sich, dass das gelöste Lipopeptid deutlich effektiver die TNF- α -Ausschüttung anregt als liposomales. Wie in der Tabelle III.5 zu sehen ist, bewirkten 10 ng/ml freies BAS fast die gleiche TNF- α -Ausschüttung wie die zehnfache Konzentration des liposomalen Lipopeptids. Allerdings erreichte auch freies BAS nicht die Zytokinausschüttung von LPS, welche nochmal um fast den Faktor drei höher lag.

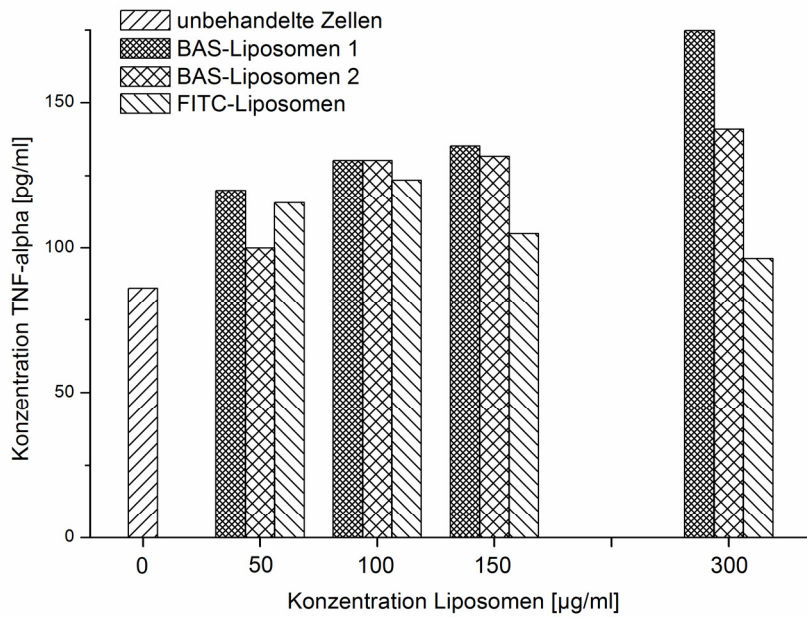


Abb. III.27: TNF- α -Konzentrationen im Zellüberstand nach Inkubation von THP-1-Zellen mit BAS-modifizierten Liposomen (1 Experiment)

Tab. III.5: TNF- α -Produktion von THP-1-Zellen nach Inkubation mit BAS-modifizierten Liposomen und gelöstem BAS und LPS

	BAS-Liposomen 1	BAS-Liposomen 2	gelöstes BAS	LPS
Konzentration Ligand	entspricht 100 ng/ml	entspricht 100 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml
Konzentration TNF- α [pg/ml]	130,21	130,21	104,14	306,64

III Ergebnisse und Diskussion

Auch OspA-modifizierte Liposomen wurden auf ihr Makrophagen-aktivierendes Potenzial getestet. Abb. III.28 zeigt, dass auch hier kein nennenswerter Unterschied zwischen den Kontroll-Liposomen ohne OspA und den Lipopeptid-Liposomen besteht. Das Absinken der TNF- α -Konzentration bei 150 $\mu\text{g/ml}$ Liposomen erscheint unlogisch. Da dieses Phänomen bei den Kontroll- und den OspA-Liposomen auftritt und diese weder auf der Zellkulturplatte noch während des ELISA auf der Multititerplatte in unmittelbarer Nachbarschaft lagen, lässt es sich wohl nicht mit Fehlern beim Pipettieren, Absaugen o. ä. erklären. Wiederholungen des Versuches ergaben ähnlich unplausible Ergebnisse.

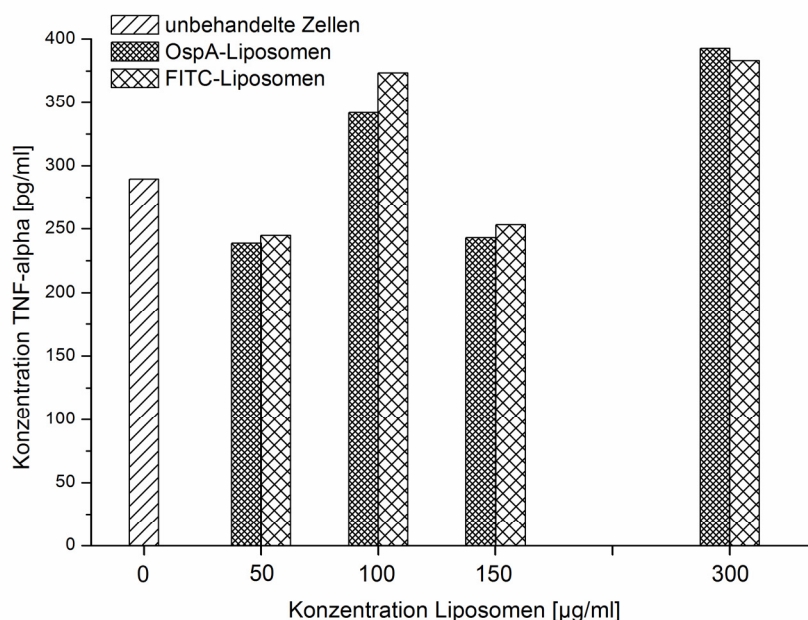


Abb. III.28: TNF- α -Konzentrationen im Zellüberstand nach Inkubation von THP-1-Zellen mit OspA-modifizierten Liposomen (1 Experiment)

Die Tab. III.6 zeigt, dass die verwendeten Zellen auf die Inkubation mit gelöstem OspA mit einer TNF- α -Ausschüttung reagieren, die sogar höher ist als die nach LPS-Stimulation. Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass OspA in liposomaler Form THP-1-Makrophagen nicht stimuliert, wohl aber nicht-liposomales OspA.

Tab. III.6: TNF- α -Produktion von THP-1-Zellen nach Inkubation mit BAS-modifizierten Liposomen und gelöstem BAS und LPS

	OspA-Liposomen	gelöstes OspA	LPS
Konzentration Ligand	entspricht 100 ng/ml	entspricht 10 ng/ml	10 ng/ml
Konzentration TNF- α [pg/ml]	373,59	1291,53	638,88

III.4.1.2 Zytotoxizität (MTT)

Die Abb. III.29 zeigt, dass die FSL-1- und FSL-rho-Liposomen, die die TNF- α -Produktion der THP-1 anregen, keine zytotoxischen Wirkungen auf die Makrophagen haben. Die Viabilität der Zellen liegt bei allen getesteten Liposomen in allen Konzentrationen über 85 %.

III.4.1.3 Fazit

Die Inkubation von THP-1-Makrophagen mit FSL-1- und FSL-rho-haltigen Liposomen induziert eine deutliche TNF- α -Ausschüttung, die mit der Liposomenkonzentration ansteigt. Dabei sind die Liposomen nicht zytotoxisch. Allerdings ist die TNF- α -Produktion der Zellen noch höher, wenn sie mit der gleichen Konzentration von freiem FSL-1 stimuliert werden. Es muss aber berücksichtigt werden, dass nicht alles liposomale Lipopeptid für eine Rezeptorbindung zur Verfügung steht. So ist beispielsweise ein Teil des Lipopeptids in der inneren Hälfte des Liposomen-Bilayers verankert und ragt in den wässrigen Liposomenkern und nicht nach außen.

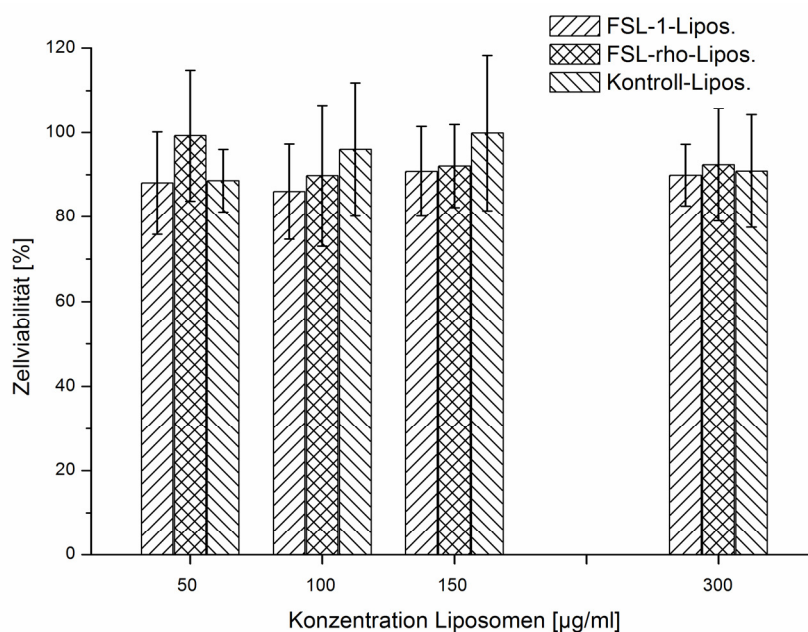


Abb. III.29: Zellviabilität von THP-1 nach Inkubation mit FSL-1-Liposomen, FSL-rho-Liposomen und Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, bestimmt mit dem MTT-Test, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (n = 4, arithm. Mittel \pm Standardabweichung)

III.4.2 Untersuchungen an moDC

III.4.2.1 Lokalisation von TLR2 bei DC

Eine neuere Studie gab Hinweise darauf, dass es während der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (moDC) zu einer Down-Regulation des TLR2 auf der Zelloberfläche kommt. Gleichzeitig beginnt die Zelle, den Rezeptor intrazellulär zu exprimieren. Dabei ist bisher unklar, in welchen Zellkompartimenten der TLR2 intrazellulär exprimiert wird (Chua 2008). Allerdings ist schon länger bekannt, dass sowohl TLR2 als auch TLR6 bei Makrophagen phagosomal vorkommen können (Underhill et al. 1999; Ozinsky et al. 2000).

Die Abb. III.30 zeigt, dass die Expression von TLR2 auf der Zelloberfläche durch die Reifung von Monozyten zu unreifen moDC stark zurückgeht. In der oberen Reihe ist der Side Scatter (SSC) gegen die Fluoreszenz eines CD14-Antikörpers aufgetragen.

Man sieht an der steigenden SSC und dem Absinken der CD14-Expression die Differenzierung der Monozyten (links) zu DC (mitte). Mit dieser Differenzierung geht eine sinkende Bindung des TLR2-Antikörpers an die Zellen, also eine sinkende Expression des TLR2, einher (untere Reihe), wie an der sinkenden Fluoreszenz durch den Phycoerythrin-markierten Antikörper zu sehen ist.

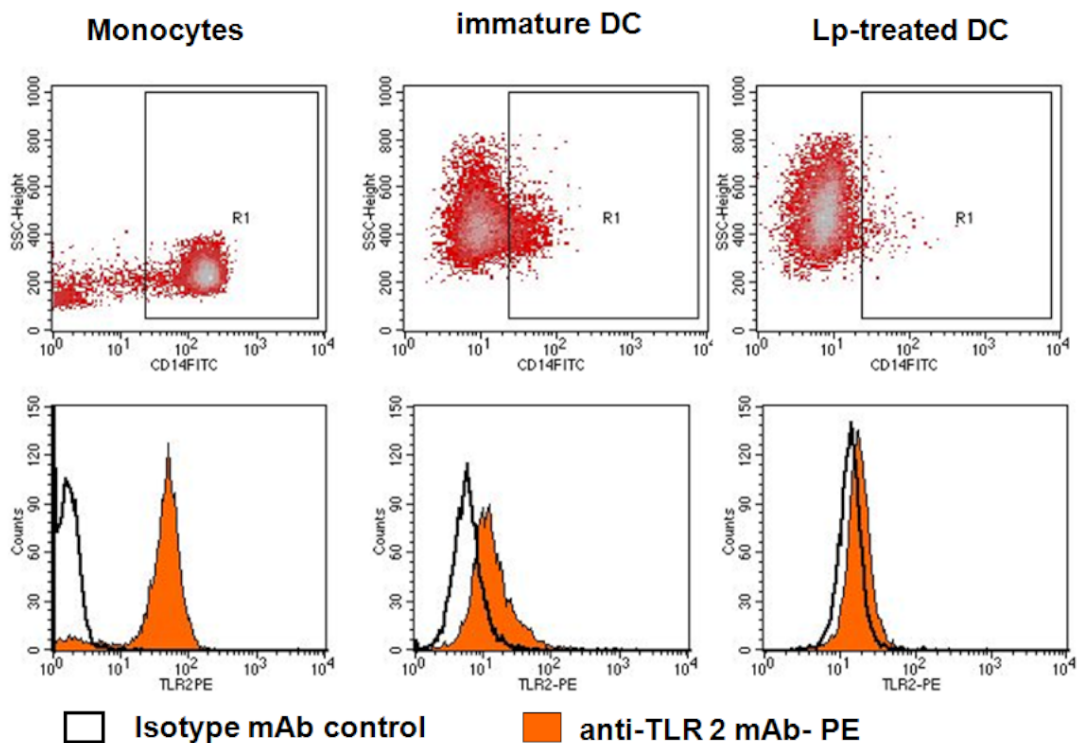


Abb. III.30: Bindung eines Antikörpers gegen TLR2 (anti-TLR2 mAb-PE) auf Monozyten, unreifen DC (immature DC) und mit FSL-1 behandelten DC (Lp-treated DC). Dotplots (oben): Side Scatter (SSC) gegen CD14-FITC. Histogramme (unten): anti-TLR2-Bindung (TLR2-PE) und Isotypen-Kontrolle. Erläuterungen im Text

III Ergebnisse und Diskussion

Gleichzeitig bindet der biotinylierte TLR2-Ligand FSL-bio in fixierten iDC, die eine permeabilisierte Zellmembran haben, deutlich stärker als an native, nicht permeabilisierte iDC (Abb. III.31). Das spricht dafür, dass in ausdifferenzierten unreifen moDC der TLR2 tatsächlich intrazellulär lokalisiert ist und deshalb FSL-bio nur an seinen Rezeptor binden kann, wenn die Zellmembran durchlässig ist.

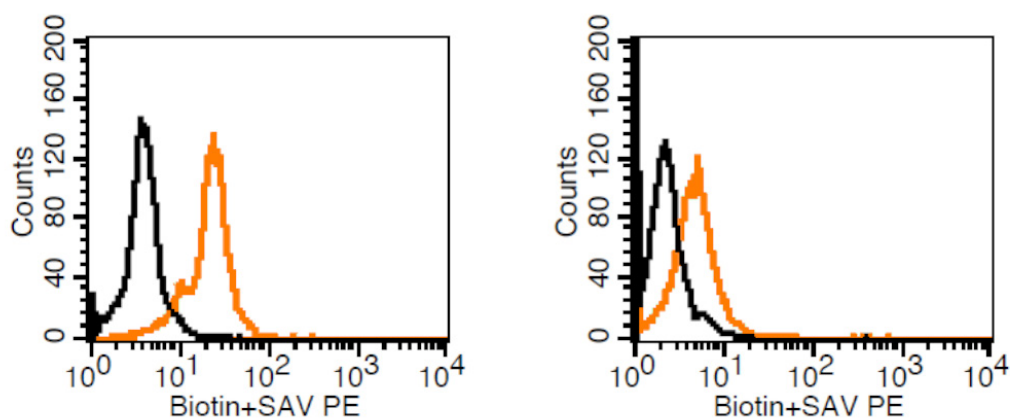


Abb. III.31: Bindung von FSL-bio an fixierte (permeabilisierte) iDC (links) und native iDC (rechts). Detektion von FSL-bio über Bindung eines Phycoerythrin-markierten Streptavidins (SAV PE)

Das biotinylierte Lipopeptid FSL-bio wurde über die Bindung eines Phycoerythrin-markierten Streptavidins (SAV-PE) durchflusszytometrisch detektiert. Um sicherzugehen, dass dabei tatsächlich das Rezeptor-gebundene FSL-bio erfasst wurde und es nicht zu unspezifischen Bindungen entweder des FSL-bio oder des SAV-PE kam, wurde gezeigt, dass FSL-bio – und damit auch das SAV-PE-Signal – von einem Überschuss des TLR2-Liganden FSL1 verdrängt wurde. In der Abb. III.32 ist deutlich erkennbar, dass sich die Bindung von FSL-bio in fixierten iDC (links, not blocked) durch Zugabe eines Überschusses des unmarkierten Liganden FSL-1 vollständig aufheben ließ (rechts, blocked by excess „cold“ FSL-1). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind starke Hinweise darauf, dass der TLR2 tatsächlich

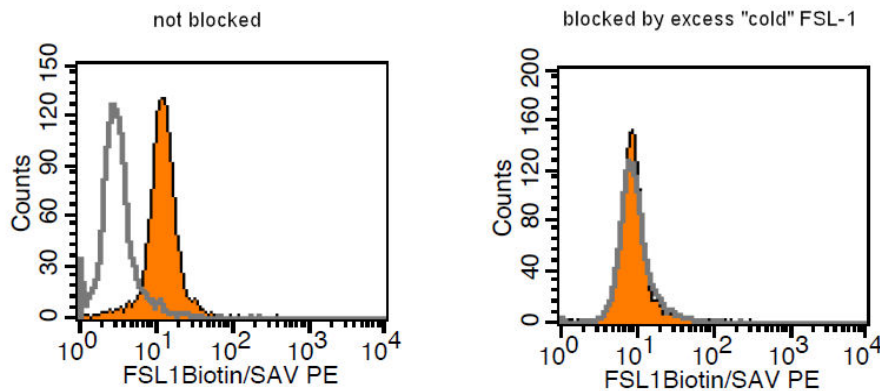


Abb. III.32: Aufhebung der FSL-bio-Bindung an den TLR2 mit einem Überschuss unmarkierten FSL-1. Offene graue Linie: Kontrolle, SAV-PE alleine; orange gefüllte Linie: FSL-bio + SAV-PE

während der Ausdifferenzierung von Monozyten zu moDC auf der Zelloberfläche herunterreguliert und verstärkt intrazellulär exprimiert wird. Obwohl sie noch keinen endgültigen Beweis für die intrazelluläre Lokalisation von TLR2 in moDC darstellen, stützen diese Ergebnisse die Aussage von Chua et al.

Eine intrazelluläre Lokalisation des TLR2 hat zur Konsequenz, dass die Lipopeptide erst nach einer Aufnahme in die Zelle ihren Rezeptor stimulieren können. Dies macht noch einmal deutlich, dass eine gemeinsame Applikation eines Reifungsstimulanzes mit einem potenziellen Antigen in einem Trägersystem wünschenswert ist. Damit würden Antigen und Lipopeptid gemeinsam in die Zelle – ihren Zielort – transportiert.

III.4.2.2 Aufnahme der Liposomen in DC

Die Untersuchungen der Effekte von Lipopeptid-Liposomen an THP-1 zeigten, dass nur die Liposomen mit FSL-1 bzw. dem Rhodamin-markierten FSL-rho die Zellen deutlich stimulierten, was sich in einer erhöhten TNF- α -Ausschüttung zeigte. Deshalb

III Ergebnisse und Diskussion

wurden die zeit- und kostenaufwendigen Untersuchungen an DC mit diesen Liposomen durchgeführt. Wie schon bei den Versuchen mit den unmodifizierten Liposomen (siehe oben) handelte es sich um humane DC, die aus Monozyten gesunder Spender gewonnen wurden (moDC).

Wie man in der Abb. III.33 sehen kann, werden FSL-1-modifizierte Liposomen (FSL-1-Lipos.) von unreifen moDC im gleichen Umfang aufgenommen wie unmodifizierte Liposomen (Kontroll-Lipos.). Durch die Aufnahme der FITC-StA-markierten Liposomen steigt die gemessene Intensität der FITC-Fluoreszenz (FL1) deutlich an.

Die Dotplots der Zellen, die mit FSL-rho-haltigen Liposomen (FSL-rho-Lipos.) behandelt wurden, zeigen keine Zunahme der Fluoreszenz. Allerdings waren diese Liposomen auch nicht mit FITC-StA markiert, sondern mit Rhodamin, dessen Fluoreszenz bei diesem Versuch nicht gemessen werden konnte. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die FSL-rho-Liposomen im gleichen Umfang von den moDC aufgenommen wurden wie die anderen Liposomen.

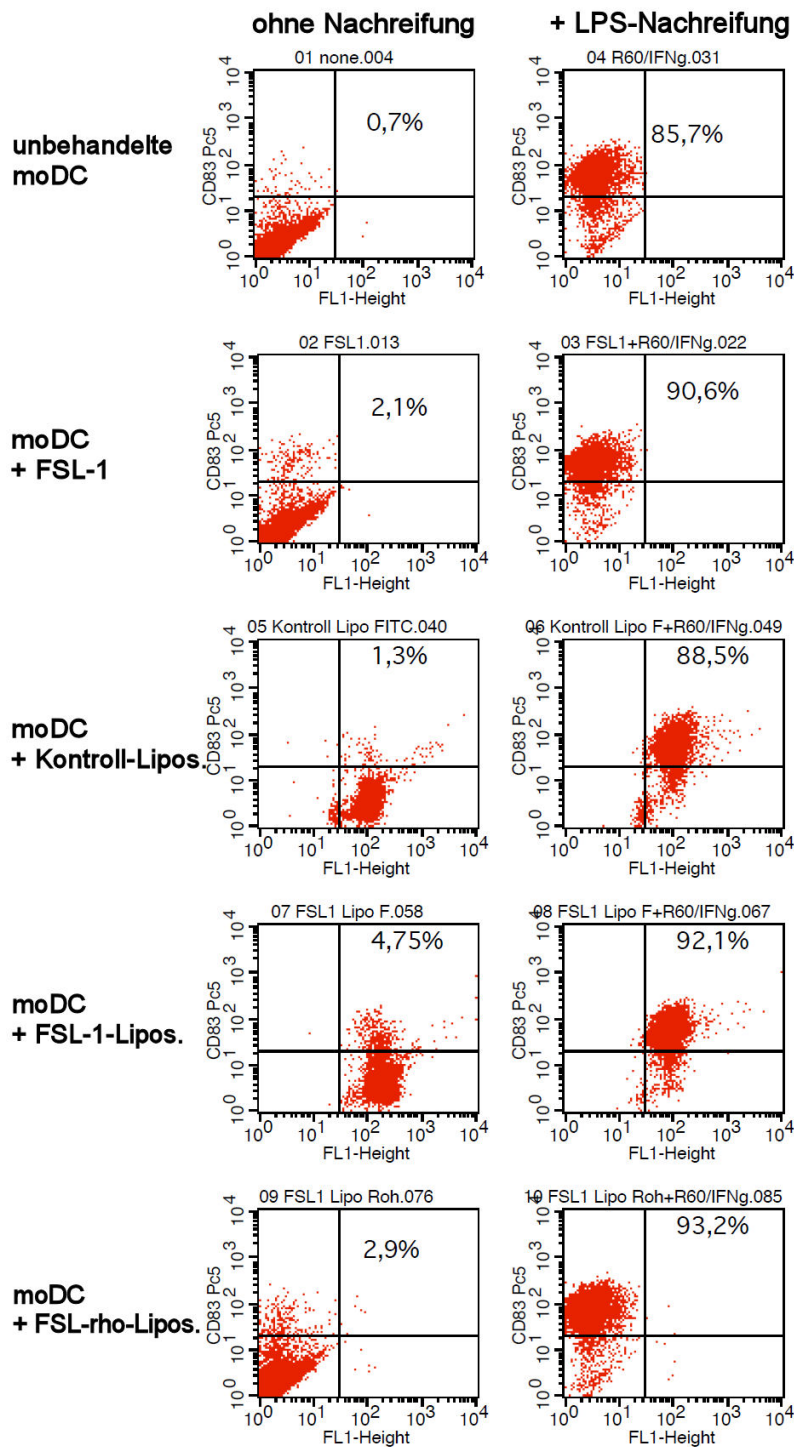


Abb. III.33: CD83-Expression (CD83 Pc5) und FITC-Fluoreszenz (FL1) von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung (links) und nach LPS/IFN- γ -Behandlung (rechts)

III Ergebnisse und Diskussion

III.4.2.3 Zellvitalität

Um zu untersuchen, ob FSL-1-haltige Liposomen die moDC schädigen, wurde die Zellvitalität vor (unbehandelte moDC) und nach Inkubation mit FSL-1-Liposomen gemessen. Dabei wurden geschädigte Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und durchflusszytometrisch erfasst. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert, wobei sich die Emissionswellenlänge von 590 nm nach 617 nm verschiebt. Da Propidiumiodid die Zellmembran nicht permeiert, werden nur geschädigte (tote) Zellen angefärbt.

Die Abb. III.34 zeigt, dass der Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl durch die Inkubation mit FSL-1-haltigen oder FSL-rho-haltigen Liposomen nur leicht – und nicht stärker als durch die nicht-modifizierten Kontroll-Liposomen – sinkt.

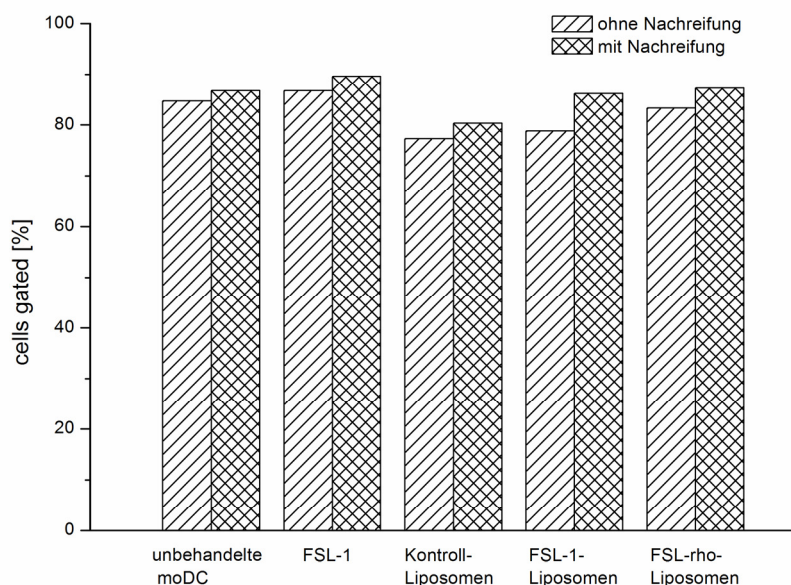


Abb. III.34: Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung und nach LPS/IFN- γ -Behandlung

Auch die Messung der Cell Recovery, also der Zahl lebender moDC bezogen auf die Zahl der eingesäten Zellen, zeigt deutlich, dass weder Kontroll- noch FSL-1- oder FSL-rho-Liposomen die Zellen schädigen (Abb. III.35). Auch nicht-liposomales, freies FSL-1 schädigt die moDC nicht, weder was Vitalität noch was die Cell Recovery betrifft.

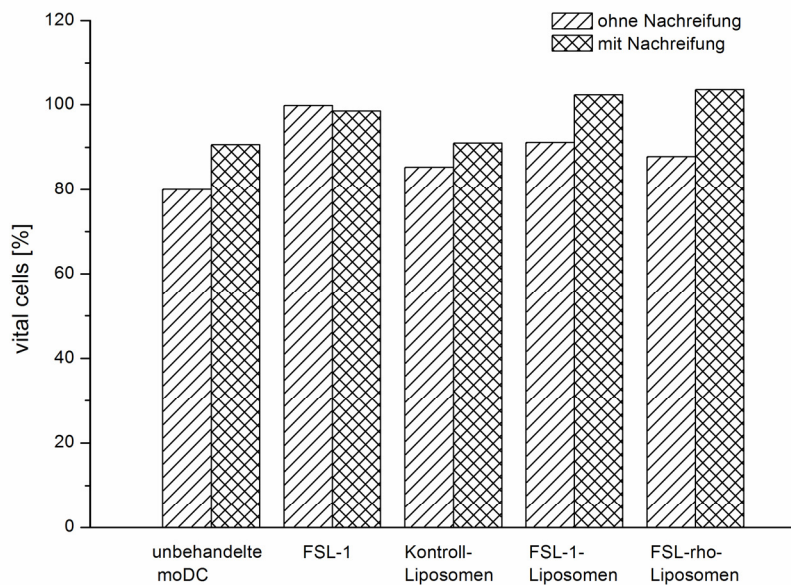


Abb. III.35: Prozentualer Anteil lebender Zellen (vital cells) bezogen auf die eingesäten Zellen (Recovery) nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung und nach LPS/IFN- γ -Behandlung

Eine Nachreifung der moDC durch LPS und IFN- γ (siehe unten) 6 h nach der Inkubation mit den Liposomen hatte keinen schädigenden Einfluss auf die Zellen, in fast allen Fällen waren Vitalität bzw. Cell Recovery sogar etwas höher als bei den unreifen moDC.

III.4.2.4 Auswirkung von FSL-1-Liposomen auf den DC-Phänotyp

Um den Einfluss der FSL-1-Liposomen auf den Phänotyp von (unreifen) moDC zu untersuchen, wurden umfangreiche durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die moDC jeweils unbehandelt (als Negativ-Kontrolle) sowie nach Inkubation mit freiem FSL-1, mit Kontroll-Liposomen ohne FSL-1, mit FSL-1-Liposomen und mit FSL-rho-Liposomen mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde im Durchflusszytometer der Anteil der Zellen, an die der entsprechende Antikörper gebunden hat (positive Zellen) bestimmt (gated). In den Fällen, in denen sich der Anteil der positiven Zellen (% gated cells) kaum unterschied, die gemessene Fluoreszenzintensität aber stark unterschiedlich war, wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität angegeben.

Das Oberflächenmolekül CD209 (DC-SIGN) wird – bis auf einige wenige Ausnahmen – ausschließlich von DC exprimiert und dient damit als Marker für diese Zellen. Abb. III.36 zeigt, dass CD209 von den mit Liposomen behandelten moDC in gleichem Ausmaß wie von nicht behandelten Zellen exprimiert wird. Dabei spielt es auch keine Rolle, ob die Zellen anschließend mit einem Reifungscocktail (LPS R60 + IFN- γ) zur Reifung aktiviert wurden oder nicht.

Auch der Anteil der moDC, der CD1a exprimiert, wird durch eine Inkubation mit Liposomen, ob es nun FSL-1-, FSL-rho- oder Kontroll-Liposomen sind, nicht beeinträchtigt. Allerdings sinkt der Anteil der CD1a⁺ DC durch den Reifungscocktail (Abb. III.37). Es wurde beschrieben, dass CD1a⁺ DC mehr IL-12 ausschütten als CD1a⁻ DC.

Weder die Behandlung mit Liposomen noch die Inkubation mit dem Reifungscocktail führen also zu einer grundlegenden Veränderung der Zellen, beispielsweise einer Rückdifferenzierung zu Monozyten.

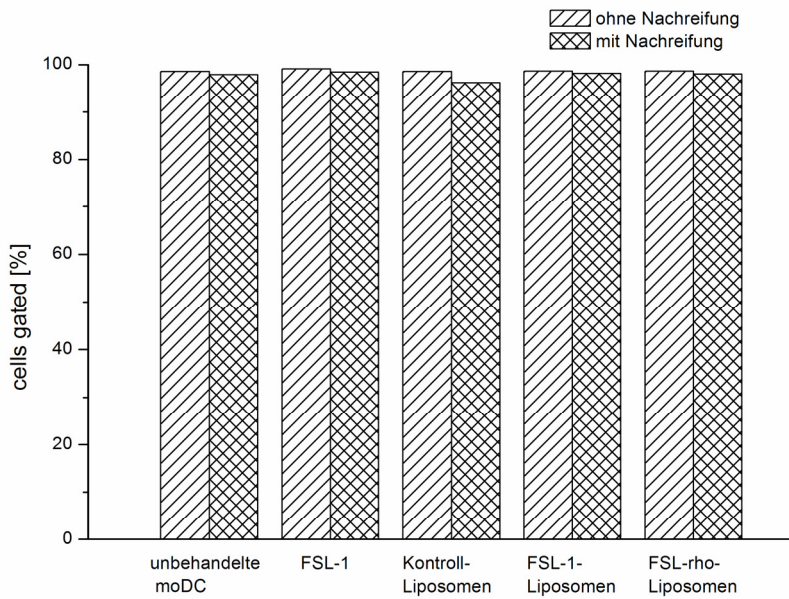


Abb. III.36: CD209-Expression von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung und nach LPS/IFN- γ -Behandlung

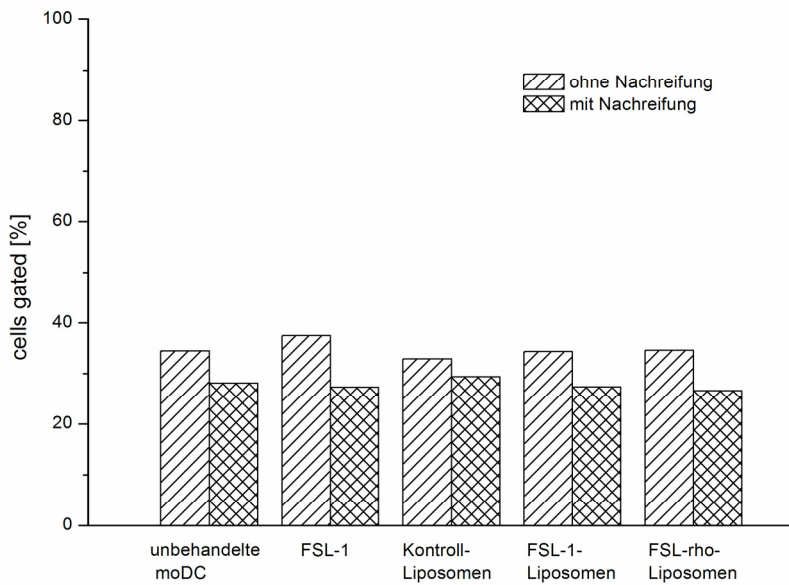


Abb. III.37: CD1a-Expression von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung und nach LPS/IFN- γ -Behandlung

III Ergebnisse und Diskussion

Reifungsmarker

Eine Reifung von moDC geht mit einer erhöhten Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86 einher, welche deshalb auch als DC-Reifungsmarker bezeichnet werden. Dabei sind CD80 und CD86 sogenannte co-stimulatorische Moleküle, die für den Kontakt der DC mit T-Zellen essenziell sind.

In Abb. III.33 ist deutlich zu sehen, dass die moDC weder von den Kontroll-Liposomen noch von den lipopeptidhaltigen Liposomen zu einer vermehrten CD83-Expression stimuliert werden. Durch die Nachreifung mit LPS/IFN- γ konnte gezeigt werden, dass die Liposomen eine solche Hochregulierung aber nicht *per se* inhibieren.

Auch der Anteil CD86⁺ Zellen steigt durch eine Inkubation mit Liposomen nicht an. Wie bei der CD83-Expression ist eine Hochregulierung auch hier nicht inhibiert, wie Abb. III.38 zeigt. Auch hier wird die Expression des Oberflächenmoleküls durch den Reifungscocktail stark gesteigert.

Auffallend ist hier, dass die Hochregulierung von CD86 durch die Nachreifung nach der Inkubation mit FSL-1-Liposomen und freiem FSL-1 höher ist als ohne Vorinkubation (unbehandelte moDC) oder nach einer Vorinkubation mit Kontroll-Liposomen. In Abb. III.39 ist dieser Unterschied deutlich zu sehen. Hier ist nicht der Anteil der CD86⁺ Zellen dargestellt (gated cells), sondern die Fluoreszenzintensität durch den markierten Antikörper. Dadurch wird nicht nur die Anzahl der Zellen, die das Molekül exprimieren, sondern auch die Menge des exprimierten CD86 gezeigt.

Der Anteil an CD80⁺ Zellen lag bei allen untersuchten Ansätzen bei 95 % oder darüber. Betrachtet man allerdings die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten, so zeigen sich klare Unterschiede (Abb. III.40): FSL-1 und etwas stärker FSL-1-Liposomen erhöhen die Fluoreszenz durch den markierten CD80-Antikörper. Das heißt, praktisch alle untersuchten moDC exprimierten CD80, allerdings nur in relativ kleinem Ausmaß. Durch Inkubation mit FSL-1 bzw. FSL-1-Liposomen wurde die Anzahl der CD80-Moleküle auf der Zelloberfläche erhöht. Durch den Zusatz der LPS/IFN- γ -Mischung erhöht sich die Fluoreszenz in allen Ansätzen, was auf eine höhere Anzahl von CD80-Molekülen hinweist. Auch hier zeigen die moDC, die mit

FSL-1 oder FSL-1-Liposomen behandelt wurden, höhere Fluoreszenzintensitäten als die unbehandelten oder mit Kontroll-Liposomen inkubierten Zellen.

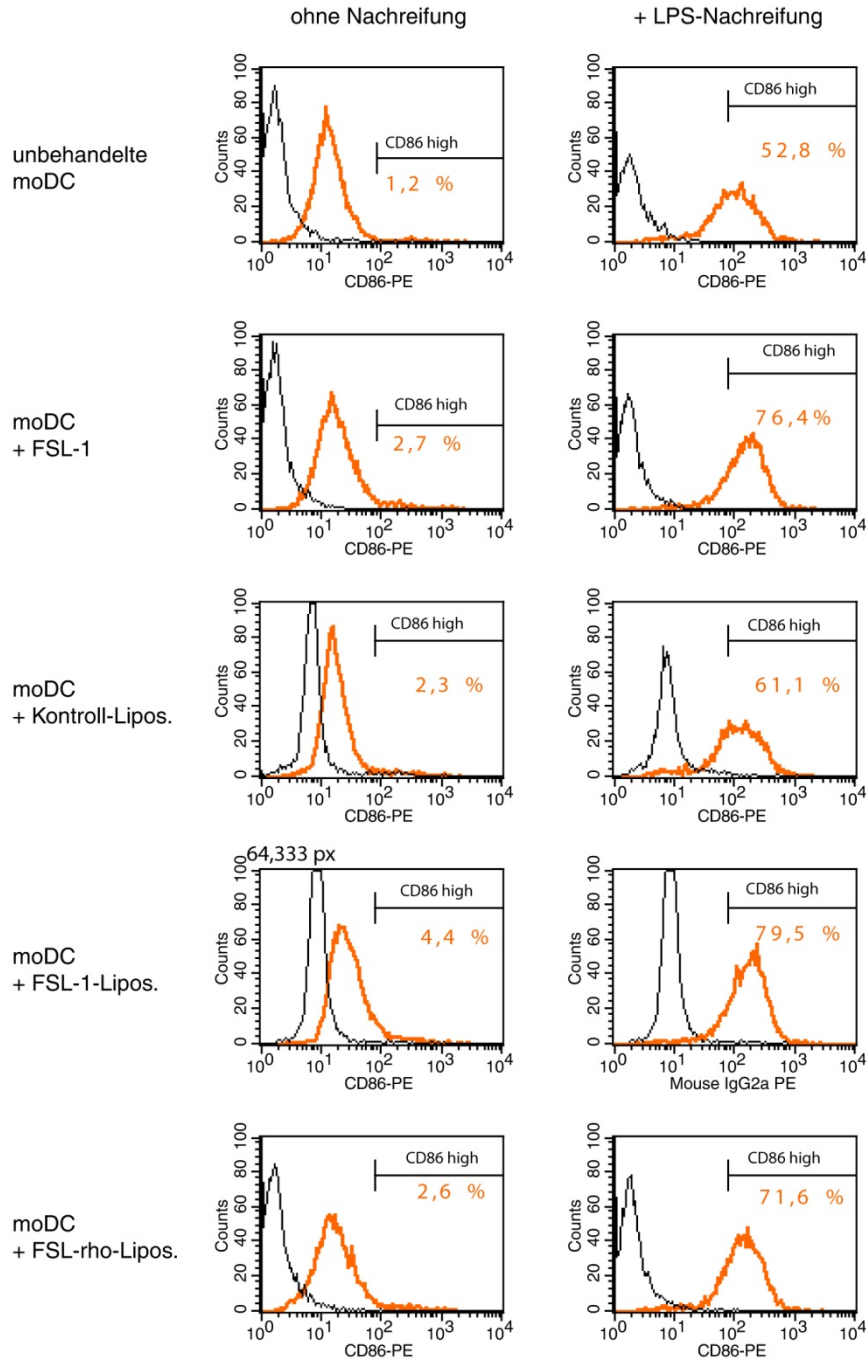


Abb. III.38: CD86-Expression (CD86 PE) von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung (links) und nach einer LPS/IFN- γ -Behandlung (rechts, + LPS-Nachreifung)

III Ergebnisse und Diskussion

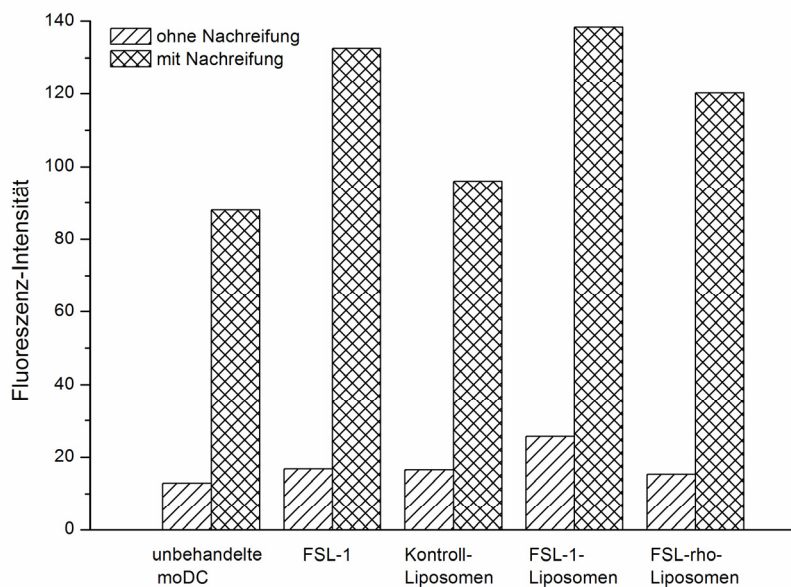


Abb. III.39: CD86-Expression von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung und nach LPS/IFN- γ -Behandlung

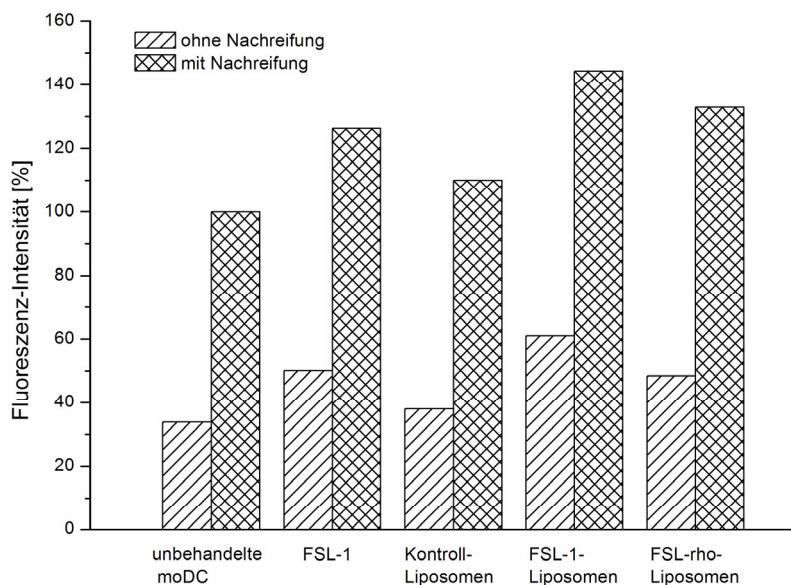


Abb. III.40: CD80-Expression von moDC nach Inkubation mit gelöstem FSL-1, Kontroll-Liposomen ohne Lipopeptid, FSL-1-Liposomen und FSL-rho-Liposomen jeweils ohne Nachreifung und nach LPS/IFN- γ -Behandlung

III.4.2.5 Fazit

Die hier untersuchten FSL-1- und FSL-rho-Liposomen aktivierten moDC offensichtlich nicht zu Reifung, wie an der ausbleibenden Hochregulierung von CD83- und CD80-Expression sichtbar wurde. Allerdings induzierte auch freies, nicht in Liposomen eingebautetes FSL-1 in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 10 nM keine Reifung. Da sowohl die untersuchten Lipopeptid-Liposomen als auch das freie Lipopeptid Makrophagen zur TNF- α -Produktion stimulierten, war erwartet worden, dass auch moDC stimuliert würden.

Durch andere TLR-Liganden (LPS) bzw. einen Zytokin-PGE₂-Cocktail wurden die moDC dagegen zur Reifung stimuliert. Das zeigt, dass die Zellen *per se* durchaus in der Lage sind, zu reifen DC auszudifferenzieren. Diese Fähigkeit wird auch von den Liposomen, ob lipopeptidhaltig oder nicht, nicht beeinträchtigt.

Für das Ausbleiben einer Reifung der moDC nach Behandlung mit FSL-1-Liposomen sowie dem freien FSL-1 sind verschiedene Gründe denkbar.

Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass FSL-1 prinzipiell moDC nicht zur Reifung stimulieren kann. Trotz intensiver Suche wurden keine Berichte über *in vitro*-Untersuchungen der Wirkung von FSL-1 auf humane moDC gefunden. Allerdings erscheint diese Erklärung sehr unwahrscheinlich. Zum Einen konnte die Expression des entscheidenden Rezeptors TLR2 gezeigt werden, zum Anderen stimulieren andere, teilweise sehr ähnliche Lipopeptide eine moDC-Reifung (Thoma-Uszynski et al. 2000, Hertz et al. 2001, Chua et al. 2008). Darüber hinaus stimulierte FSL-1 Monozyten zur Leukotrien-Produktion (Lindner et al. 2009), Makrophagen zur TNF- α -Ausschüttung (Into et al. 2002, Okusawa et al. 2004) und aus Knochenmarkszellen generierte DC (BMDC, *Bone marrow-derived DC*) zur Reifung (Kiura et al. 2007). Zumindest die Makrophagen-Aktivierung konnte auch für das in dieser Arbeit verwendete FSL-1 und auch für die FSL-1-Liposomen gezeigt werden.

Ein anderer möglicher Erklärungsansatz dafür, dass das Lipopeptid FSL-1 in den hier vorgestellten Experimenten keine DC-Reifung induzierte, könnten die Kultivierungs- und Differenzierungsbedingungen der moDC sein. So wurde die Differenzierung von

III Ergebnisse und Diskussion

Monozyten zu moDC bei den hier vorgestellten Untersuchungen in serumfreiem CellGro DC-Medium durchgeführt. Die Arbeiten, die eine Aktivierung von moDC durch (synthetische) Lipopeptide zeigen konnten (Thoma-Uszynski et al. 2000, Hertz et al. 2001, Chua et al. 2008) differenzierten die moDC in einem anderen Medium (RPMI 1640) und verwendeten 10 % Kälber- (FCS) oder humanes Serum.

Beachtenswert erscheint die vermehrte CD80- und CD86-Expression der moDC, wenn diese vor der Reifung mit LPS und IFN- γ mit FSL-1 bzw. FSL-1-Liposomen behandelt wurden. Offensichtlich beeinflussen FSL-1-Liposomen also die DC-Reifung, auch wenn sie sie nicht direkt auslösen. Dieses Phänomen bedarf weiterer Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

Die hier vorgestellten fluoreszenzmarkierten Liposomen eignen sich als Trägersystem für ein *ex vivo*-Delivery von (synthetischen) Lipopeptiden an Antigen-präsentierende Zellen. Die Liposomen können einfach hergestellt werden, sind ausreichend lagerungsstabil und können durch ihre FITC-Markierung (fluoreszenz-) mikroskopisch und durchflusszytometrisch detektiert werden. Sie wurden sowohl von Makrophagen als auch von moDC aufgenommen und schädigten die Zellen dabei nicht. Die nicht mit Lipopeptiden modifizierten Liposomen aktivierten dabei weder die Makrophagen (keine TNF- α -Ausschüttung) noch die moDC (keine Veränderungen der entscheidenden Oberflächenmarker).

Di- wie triacylierte Lipopeptide lassen sich sehr effektiv in die Liposomen inkorporieren. Auch in Liposomen eingebaute Lipopeptide können Zellen aktivieren, wie an den THP-1-Makrophagen gezeigt werden konnte. Die lipopeptidhaltigen Liposomen wurden von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen. Sie zeigten dabei in den untersuchten Konzentrationen keine Zytotoxizität.

Allerdings induzierten die hier vorgestellten FSL-1-Liposomen, welche die stärkste THP-1-Aktivierung bewirkten, keine Reifung humaner moDC. Sie bewirkten aber eine höhere Expression der co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86, wenn die moDC anschließend mit LPS und IFN- γ zur Reifung stimuliert wurden.

IV Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Liposomenformulierung für synthetische Lipopeptide entwickelt. Die Effekte dieser Lipopeptid-Liposomen auf zwei Arten von Antigen-präsentierenden Zellen – Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) – wurden untersucht. Bakterielle Lipopeptide und ihre synthetischen Derivate sind Agonisten am Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und stimulieren als Pathogen-assoziierte molekulare Muster Makrophagen und DC.

Die Liposomen wurden aus Lipoid® S100, einem Soja-Phosphatidylcholin, hergestellt. Es zeigte sich, dass Liposomen, die 10 % (m/m) Cholesterol enthielten, die beste Teilchengrößenverteilung erzielten. Die Liposomen wurden mit einem selbst synthetisierten amphiphilen Fluoreszenzfarbstoff, FITC-gekoppeltem Stearylamin, fluoreszenzmarkiert. So konnten die Liposomen und die mit ihnen behandelten Zellen fluorimetrisch, durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

Bei Untersuchungen zur Aufnahme von Liposomen in Makrophagen der Zell-Linie THP-1 zeigte sich, dass eine positive Oberflächenladung der Liposomen keine höhere Endozytose bewirkte. Darüber hinaus zeigten die kationischen Liposomen, die das bei neutralem pH-Wert positiv geladene Stearylamin enthielten, eine ausgeprägte Zytotoxizität. Liposomenformulierungen ohne das Stearylamin dagegen waren nicht zytotoxisch, allerdings lösten sich bei Liposomenkonzentrationen über 200 µg/ml verstärkt Zellen vom Plattenboden ab.

Die fluoreszenzmarkierten Liposomen wurden mit den synthetischen Lipopeptiden FSL-1, FSL-rho, OspA und BAS modifiziert. FSL-1 ist ein diacyliertes Lipopeptid, das die immunogene N-terminale Domäne des 44 kDa großen Lipoproteins LP 44 aus *Mycoplasma salivarium* darstellt. FSL-rho ist ein mit Rhodamin fluoreszenzmarkiertes Derivat von FSL-1. OspA und BAS sind triacylierte Lipopeptide, die an der Aminogruppe des Cysteins eine weitere Palmitinsäure tragen. OspA ist ein Analogon eines Oberflächenproteins von *Borrelia burgdorferi*, BAS von *Bacillus cereus*.

IV Zusammenfassung

Eine Beladung der Liposomen mit den Lipopeptiden durch ein Hydratisieren der getrockneten Lipide mit lipopeptidhaltigem Puffer stellte sich als ineffektiv heraus. Dagegen wurden alle untersuchten Lipopeptide praktisch vollständig in Liposomen inkorporiert, wenn die Lipopeptid-Lösung der Lipid-Mischung vor der Entfernung der Lösungsmittel zugegeben wurde. Das galt sowohl für die klassische Filmbildemethode nach Bangham als auch für Methoden, bei denen die Lipide in Wasser hydratisiert, dann lyophilisiert und anschließend im Puffer erneut hydratisiert wurden (Hydration-Rehydration-Methode).

Die lipopeptidhaltigen Liposomen wurden an THP-1 auf ihr Makrophagen-stimulierendes Potenzial getestet. Dabei bewirkten nur die FSL-1-Liposomen eine deutlich gesteigerte TNF- α -Produktion. Diese FSL-1-Liposomen wurden daraufhin an DC getestet, die aus Monozyten gesunder Spender erzeugt wurden (sogenannte moDC). Die Liposomen waren auch an moDC untoxisch und bewirkten keine Veränderung der Expression der DC-spezifischen Oberflächenmoleküle CD209 (DC-SIGN) und CD1a. Allerdings wurde von den FSL-1-Liposomen auch keine Reifung der moDC induziert. Unerwarteterweise wurden die in dieser Arbeit untersuchten moDC auch von gelöstem FSL-1 nicht zur Reifung stimuliert.

Wurden die moDC 6 h nach der Behandlung mit FSL-1-Liposomen mit einer Mischung aus LPS und IFN- γ zur Reifung stimuliert, so exprimierten sie deutlich mehr CD80 und CD86 als nicht mit Liposomen vorbehandelte Zellen. FSL-1-Liposomen induzieren also selbst keine moDC-Reifung, führen aber bei LPS/IFN- γ -gereiften moDC zur Hoch-Regulation der Expression von co-stimulatorischen Molekülen, die zum Priming naiver T-Zellen essenziell sind.

V Summary

In the study presented here, a liposomal formulation of synthetic lipopeptides was developed. The effects of these lipopeptide-containing liposomes were tested on two types of antigen-presenting cells, i.e. macrophages and dendritic cells (DC). Bacterial lipopeptides and their synthetic derivatives activate the Toll-like receptor 2 (TLR2) and act as pathogen-associated molecular patterns (PAMP) by stimulating macrophages and DC.

The liposomes were made from Lipoid[®] S100, a soy phosphatidylcholine. The best particle size distribution could be achieved by liposomes containing 10 % (m/m) cholesterol. For fluorescence-labeling, a FITC-coupled stearyl amine was synthesized and incorporated into liposomes. Fluorescence-labeling allowed detecting and studying of liposomes as well as liposome-treated cells by fluorimetry, flow cytometry and fluorescence microscopy.

Cellular uptake of liposomes was studied on THP-1 macrophages. Positive surface charge of liposomes did not result in an increased uptake by the macrophages. Additionally, the cationic liposomes which contained stearyl amine to apply the positive charge, showed a pronounced cytotoxicity. In contrast, liposome formulations without stearyl amine were not cytotoxic. Nevertheless, the tolerated liposome concentration was limited to 200 µg/ml. When higher concentrations were applied, cells were detached from the plate bottom.

Fluorescence-labeled liposomes were modified with the synthetic lipopeptides FSL-1, FSL-rho, OspA and BAS. FSL-1 is a diacylated lipopeptide representing the immunogenic N-terminal domain of the 44 kDa lipopeptide LP 44 from *Mycoplasma salivarium*. FSL-rho is a rhodamine-labeled derivative of FSL-1. OspA is an analogue of the Outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi*, BAS an analogue of a *Bacillus cereus* lipoprotein. Both are triacylated with a palmitic acid coupled to the cysteine's amino group.

V Summary

Loading of liposomes with lipopeptides by hydrating the dried lipids with a lipopeptide-containing buffer proved to be inefficient. In contrast, lipopeptides were completely incorporated into liposomes when they were added to the lipid mixture before solvent removal. This was true for both the Thin film hydration method according to Bangham and for Hydration-rehydration methods, where the lipids are hydrated in water, then lyophilized and finally rehydrated in the respective buffer.

Lipopeptide-containing liposomes were tested for their macrophage-stimulating potential on THP-1 cells. From the tested liposomal lipopeptides, only FSL-1 induced a distinct increase in TNF- α production. Therefore, FSL-1 liposomes were tested on monocyte-derived dendritic cells (moDC) of healthy donors. Liposomes were not cytotoxic to moDC and induced no alterations in the expression of DC-specific surface molecules CD209 (DC-SIGN) and CD1a. Admittedly, FSL-1 liposomes did also not induce DC maturation, nor did the soluble FSL-1.

MoDC that were matured with LPS and IFN- γ 6 h after incubation with FSL-1 liposomes, expressed distinctively more CD80 and CD86 than moDC not pre-treated with liposomes. It seems that FSL-1 liposomes themselves do not induce moDC maturation, but lead to an up-regulation of these co-stimulatory molecules essential for the priming of naive T-cells.

VI Literatur

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol.* 148: 32-46.

Agrawal S, Kandimalla ER. 2007. Synthetic agonists of Toll-like receptors 7, 8 and 9, *Biochem Soc Trans.* 35: 1461–1467.

Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4: 499-511.

Alexander C, Rietschel ET. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 7: 167-202.

Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA. 2002. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med.* 8: 878-884.

Allison AG, Gregoriadis G. 1974. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 252: 252.

Alving CR. 1992. Immunologic aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. *Biochim Biophys Acta.* 1113: 307-322.

Amigorena S, Savina A. 2010. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 22: 109-117.

Aramaki Y, Takano S, Arima H, Tsuchiya S. 2000. Induction of apoptosis in WEHI 231 cells by cationic liposomes. *Pharm Res.* 17: 515-520.

Banchereau J, Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 5: 296-306.

Bangham AD, Horne RW. 1964. Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol.* 8: 660-668.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 13: 238-252.

Batzri S, Korn ED. 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta*. 298: 1015-1019.

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*. 24: 528-533.

Bessler WG, Jung G. 1992. Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res Immunol*. 143: 548-553.

Breloer M, Fleischer B. 2008. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol*. 29: 186-194.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 285: 732-736.

Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. 2009. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 155: 523-533.

Chapman CJ, Erdahl WE, Taylor RW, Pfeiffer DR. 1991. Effects of solute concentration on the entrapment of solutes in phospholipid vesicles prepared by freeze-thaw extrusion. *Chem Phys Lipids*. 60: 201-208.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *J Exp Med*. 198: 1875-1886.

Chua BY, Eriksson EM, Brown LE, Zeng W, Gowans EJ, Torresi J, Jackson DC. 2008. A self-adjuvanting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine* 26: 4866-4875.

Copland MJ, Baird MA, Rades T, McKenzie JL, Becker B, Reck F, Tyler PC, Davies NM. 2003. Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine* 21: 883-890.

Crommelin DJA, Van Bommel EMG. 1984. Stability of liposomes on storage: freeze-dried, frozen or as an aqueous dispersion. *Pharm. Res*. 1: 159-164.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 5: e8668.

Datta SK, Raz E. 2005. Induction of antigen cross-presentation by Toll-like receptors. *Springer Semin Immunopathol*. 26: 247-255.

Davis ID, Jefford M, Parente P, Cebon J. 2003. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 73: 3–29.

Deamer D, Bangham AD. 1976. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta*. 443: 629-634.

de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JHN, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J Immunol*. 168: 1704-1709.

den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*. 192: 1685-1696.

Du Plessis J, Ramachandran C, Weiner N, Müller DG. 1996. The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. *Int J Pharm*. 127: 273-278.

EMA 2009: European Medicines Agency. Questions and answers on the recommendation for the refusal of the marketing authorisation for Oncophage. London, 19. November 2009, Doc. Ref.: EMA/CHMP/729781/2009.

Espuelas S, Roth A, Thumann C, Frisch B, Schuber F. 2005. Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells. *Mol Immunol*. 42: 721-729.

Espuelas S, Thumann C, Heurtault B, Schuber F, Frisch B. 2008. Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes. *Bioconjug Chem*. 19: 2385-2393.

Foged C, Arigita C, Sundblad A, Jiskoot W, Storm G, Frokjaer S. 2004. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine*. 22: 1903-1913.

Gabrilovich D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 4: 941-452.

Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16: 495-521.

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell.* 100: 575-585.

Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH. 1998. In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes. *Developm. Immunol.* 6: 25-39.

Gilboa E, Nair SK, Lysterly HK. 1998. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 46: 82-87.

Goldman B, DeFrancesco L. 2009. The cancer vaccine roller coaster. *Nat Biotechnol.* 27: 129-139.

Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. 1971. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* 14: 95-99

Gregoriadis G, Ryman BE. 1972. Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Eur J Biochem.* 24: 485-491.

Gregoriadis G, Wills EJ, Swain CP, Tavill AS. 1974. Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* 303: 1313-6.

Greis A, Murgott J, Rafalzik S, Gerstberger R, Hübschle T, Roth J. 2007. Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293: R152-R161.

Gruber F. 2004. Untersuchungen zur Enkapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 20: 621-667.

Gupta AK, Fisher GJ, Elder JT, Nickoloff BJ, Voorhees JJ. 1988. Sphingosine inhibits phorbol ester-induced inflammation, ornithine decarboxylase activity, and activation of protein kinase C in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 91: 486-491.

Guyer W, Bloch K. 1983. Phosphatidylcholine and cholesterol interactions in model membranes. *Chem Phys Lipids.* 33: 313-322.

Haines TH. 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40: 299–324.

Hamilton RL Jr, Goerke J, Guo LS, Williams MC, Havel RJ. 1980. Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *J Lipid Res.* 21: 981-992.

Haugland J. 2002. Introduction to Fluorescence Techniques. In: Haugland J. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.* Eugene: Molecular Probes. 1-6.

Heit A, Huster KM, Schmitz F, Schiemann M, Busch DH, Wagner H. 2004. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol.* 172: 1501-1507.

Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 166: 2444-2450.

Herzog C, Hartmann K, Künzi V, Kürsteiner O, Mischler R, Lazar H, Glück R. 2009. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine* 27: 4381-4387.

Heurtault B, Thomann JS, Jedrzejewska J, Wels WS, Schuber F, Frisch B. 2006. Liposome-based systems for anti-tumor vaccination: influence of lipopeptide adjuvants. *J Liposome Res.* 16: 205-213.

Heurtault B, Gentine P, Thomann JS, Baehr C, Frisch B, Pons F. 2009. Design of a liposomal candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity. *Pharm Res.* 26: 276-285.

Hope MJ, Bally MB, Mayer LD, Janoff AS, Cullis PR. 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem Phys Lipids.* 40: 89-107

Ignatius R, Mahnke K, Rivera M, Hong K, Isdell F, Steinman RM, Pope M, Stamatatos L. 2000. Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood* 96: 3505-3513.

Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, Suzuki Y, Wakita D, Takeshima T, Nishimura T. 2004. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* 95: 697-703.

Into T, Fujita M, Okusawa T, Hasebe A, Morita M, Shibata K. 2002. Synergic effects of mycoplasmal lipopeptides and extracellular ATP on activation of macrophages. *Infect Immun.* 70: 3586-3591.

Jesorka A, Orwar O. 2008. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu Rev Anal Chem.* 1: 801-832.

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 130: 1071-1082.

Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 27: 3135-3142.

Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. 2009. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future Oncol.* 5: 379-390.

Kasahara M, Hinkle PC. 1977. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem.* 252: 7384-7390.

Kawai T, Akira S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13: 816-825.

Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K. 2008. Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol.* 125: 18-30.

Khoo US, Chan KY, Chan VS, Lin CL. 2008. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *J Mol Med.* 86: 861-874.

Kinsky SC, Haxby J, Kinsky CB, Demel RA, van Deenen LL. 1968. Effect of cholesterol incorporation on the sensitivity liposomes to the polyene antibiotic, filipin. *Biochim Biophys Acta*. 152: 174-185.

Kiura K, Kataoka H, Nakata T, Into T, Yasuda M, Akira S, Inoue N, Shibata K. 2006. The synthetic analogue of mycoplasmal lipoprotein FSL-1 induces dendritic cell maturation through Toll-like receptor 2. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 46: 78-84.

Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. 2004. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*. 11: 88-97.

Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 4942-4946.

Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*. 31: 3026-3037.

Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 123: 758-762.

Lindner SC, Köhl U, Maier TJ, Steinhilber D, Sorg BL. 2009. TLR2 ligands augment cPLA2 α activity and lead to enhanced leukotriene release in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 86: 389-399.

Ludewig B, Barchiesi F, Pericin M, Zinkernagel RM, Hengartner H, Schwendener RA. 2000. In vivo antigen loading and activation of dendritic cells via a liposomal peptide vaccine mediates protective antiviral and anti-tumour immunity. *Vaccine* 19: 23-32.

Ludewig B, McCoy K, Pericin M, Ochsenbein AF, Dumrese T, Odermatt B, Toes RE, Melief CJ, Hengartner H, Zinkernagel RM. 2001. Rapid turnover and inefficient presentation of exogenous antigen critically limit the activation of self-reactive CTL by dendritic cells. *J Immunol*. 166: 3678-3687.

Lutsiak MEC, Kwon GS, Samuel J. 2002. Analysis of Peptide and Lipopeptide Content in Liposomes. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 5: 279-284.

Mae M, Iyori M, Yasuda M, Shamsul HM, Kataoka H, Kiura K, Hasebe A, Totsuka Y, Shibata K. 2007. The diacylated lipopeptide FSL-1 enhances phagocytosis of bacteria by macrophages through a Toll-like receptor 2-mediated signalling pathway. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49: 398-409.

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release.* 65: 271-284.

Magee WE, Miller OV. 1972. Liposomes containing antiviral antibody can protect cells from virus infection. *Nature* 235: 339-341.

Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 239: 1364–1369.

McDonald DM, McLean J, Thurston G, Baluk P. 1998. Cationic lipid compositions targeting angiogenic endothelial cells. US Patent, Application Nr. 820,337. Patent Nr. 5,837,283.

Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* 106: 255–258.

Merck KGaA. 2009. Merck Initiates Phase III Study of Stimuvax in Breast Cancer. Pressemitteilung der Merck KGaA, Darmstadt. 22.06.2009.

Milsmann MH, Schwendener RA, Weder HG. 1978. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim Biophys Acta.* 512: 147-155.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63.

Müller R.H. 1996. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. 2000. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *J Immunol.* 164: 5998-6004.

Naeff R. 1996. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Adv Drug Delivery Rev.* 18: 343-347.

Nair S, Babu JS, Dunham RG, Kanda P, Burke RL, Rouse BT. 1993. Induction of primary, antiviral cytotoxic, and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells. *J Virol.* 67: 4062-4069.

Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallustro F, Lanzavecchia, A. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunol.* 6: 769-776.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.* 17: 701-738.

Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K. 2004. Relationship between Structures and Biological Activities of Mycoplasmal Diacylated Lipopeptides and Their Recognition by Toll-Like Receptors 2 and 6. *Infect Immun.* 72: 1657-1665.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 13766-13771.

Panzner EA, Jansons VK. 1979. Control of in vitro cytotoxicity of positively charged liposomes. *J Cancer Res Clin Oncol.* 95: 29-37.

Paukku T, Lauraeus S, Huhtaniemi I, Kinnunen PKJ. 1997. Novel cationic liposomes for DNA-transfection with high efficiency and low toxicity. *Chem Phys Lipids.* 87: 23-29.

Perry DG, Martin WJ. 1995. Fluorescent liposomes as quantitative markers of phagocytosis by alveolar macrophages. *Journal of Immunological Methods* 181: 269-285.

Perry DG, Daugherty GL, Martin WJ 2nd. 1999. Clathrin-coated pit-associated proteins are required for alveolar macrophage phagocytosis. *J Immunol.* 162: 380-386.

Prajeeth CK, Jirmo AC, Krishnaswamy JK, Ebensen T, Guzman CA, Weiss S, Constabel H, Schmidt RE, Behrens GM. 2010. The synthetic TLR2 agonist BPPcysMPEG leads to efficient cross-priming against co-administered and linked antigens. *Eur J Immunol.* (Online-Vorabveröffentlichung 8. März 2010)

Raetz C, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 71: 635–700.

Rao M, Alving CR. 2000. Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 41: 171-188.

Re F, Strominger JL. 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.

Reis e Sousa C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 6: 476-483.

Rock KL, Shen L. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev.* 207: 166-183.

Roth A, Espuelas S, Thumann C, Frisch B, Schuber F. 2004. Synthesis of thiol-reactive lipopeptide adjuvants. Incorporation into liposomes and study of their mitogenic effect on mouse splenocytes. *Bioconjug Chem.* 15: 541-553.

Roth A, Rohrbach F, Weth R, Frisch B, Schuber F, Wels WS. 2005. Induction of effective and antigen-specific antitumour immunity by a liposomal ErbB2/HER2 peptide-based vaccination construct. *Br J Cancer.* 92: 1421-1429.

Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179: 1109-1118.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 182: 389-400.

Sangha R, Butts C. 2007. L-BLP25: a peptide vaccine strategy in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 13: 4652–4654.

Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. 2010. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* (Online-Vorabveröffentlichung 5. März 2010).

Schubert R. 2010. Liposomen. In: Mäder K, Weidenauer U. *Innovative Arzneiformen.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 149-163.

Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinmann RM. 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 15: 138-147.

Segal AW, Gregoriadis G, Black CD. 1975. Liposomes as vehicles for the local release of drugs. *Clin Sci Mol Med.* 49: 99-106.

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

Sessa G, Weissmann G. 1970. Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *J Biol Chem.* 245: 3295-3301.

Shew RL, Deamer DW. 1985. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 816: 1-8.

Shibata K, Hasebe A, Into T, Yamada M, Watanabe T. 2000. The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol.* 165: 6538-6544.

Singer M. 1981. Permeability of bilayers composed of mixtures of saturated phospholipids. *Chem Phys Lipids.* 31:145-159.

Suzuki Y, Wakita D, Chamoto K, Narita Y, Tsuji T, Takeshima T, Gyobu H, Kawarada Y, Kondo S, Akira S, Katoh H, Ikeda H, Nishimura T. 2004. Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. *Cancer Res.* 64: 8754-8760.

Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75: 4194-4198.

Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng*. 9: 467-508.

Takano S, Aramaki Y, Tsuchiya S. 2003. Physicochemical Properties of Liposomes Affecting Apoptosis Induced by Cationic Liposomes in Macrophages. *Pharm Res*. 20: 962-968.

Takeda K, Takeuchi O, Akira S. 2002. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 8: 459-463.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 21: 335-376.

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 169: 10-14.

Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Godowski PJ, Roth MD, Modlin RL. 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.

Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM. 1998. Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest*. 101: 1401-1413.

Torchilin VP. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 4: 145-160.

Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 7:179-190.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 26: 171-176.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 1982 Apr;42(4):1530-6.

Tvinnereim AR, Hamilton SE, Harty JT. 2004. Neutrophil involvement in cross-priming CD8⁺ T cell responses to bacterial antigens. *J Immunol.* 173: 1994-2002.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401: 811-815.

van Broekhoven CL, Parish CR, Demangel C, Britton WJ, Altin JG. 2004. Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res.* 64: 4357-4365.

Vemuri S, Yu C, Wangsatorntanakun V, Roosdorp N. 1990. Large-scale production of liposomes by Microfluidizer. *Drug Dev Ind Pharm:* 2243-2256.

Vemuri S, Rhodes CT. 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* 70: 95-111.

Waeckerle-Men Y, Allmen EU, Gander B, Scandella E, Schlosser E, Schmidtke G, Merkle HP, Groettrup M. 2006. Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine.* 24: 1847-1857.

Wang RF, Wang HY. 2002. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol.* 20: 149-154.

Wiesmüller KH, Bessler W, Jung G. 1983. Synthesis of the mitogenic S-[2,3-bis(palmitoyloxy)propyl]-N-palmitoylpentapeptide from *Escherichia coli* lipoprotein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 364: 593-606.

Winterhalter M, Lasic DD. 1993. Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem Phys Lipids.* 64: 35-43.

Wischke C, Borchert HH, Zimmermann J, Siebenbrodt I, Lorenzen DR. 2006. Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *J Control Release.* 114: 359-368.

Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH, Nesselhut T, Lorenzen DR. 2009. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm.* 365: 61-68.

Yoshida M, Babensee JE. 2004. Poly(lactic-co-glycolic acid) enhances maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 71A: 45–54.

Yoshida M, Babensee JE. 2006. Differential effects of agarose and poly(lactic-coglycolic acid) on dendritic cell maturation. *J. Biomed.Mater. Res.* 79A: 393–408.

Yoshida T, Oide N, Sakamoto T, Yotsumoto S, Negishi Y, Tsuchiya S, Aramaki Y. 2006. Induction of cancer cell-specific apoptosis by folate-labeled cationic liposomes. *J Control Release.* 111: 325–332.

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M. 1999. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 274: 7611-7614.

Zhou F, Rouse BT, Huang L. 1991. An improved method of loading pH-sensitive liposomes with soluble proteins for class I restricted antigen presentation. *J Immunol Methods.* 145: 143-152.

VII Abkürzungen

APC	Antigenpräsentierende Zellen (Antigen-Presenting Cells)
BAS	Synthetisches Analogon eines Lipopeptids aus <i>Bacillus cereus</i> (<i>Bacillus anthracis strain</i>)
CD	Differenzierungscluster (<i>Cluster of differentiation</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>)
DC	Dendritische Zellen
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-StA	FITC-gekoppeltes Stearylamin
FSL-1	Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1. Synthetisches Analogon eines Lipopeptids aus <i>Mycoplasma salivarium</i>
FSL-2	synthetisches FSL-1-Derivat
FSL-rho	Rhodamin-markiertes FSL-1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
iDC	unreife dendritische Zellen (<i>immature dendritic cells</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
mDC	reife dendritische Zellen (<i>mature dendritic cells</i>)

VII Abkürzungen

MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (<i>Major histocompatibility complex class I</i>)
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (<i>Major histocompatibility complex class II</i>)
moDC	Aus Monozyten gewonnene dendritische Zellen (<i>monocyte-derived dendritic cells</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
OspA	Oberflächenprotein (<i>Outer Surface Protein A</i>) von <i>Borrelia burgdorferi</i> . Bezeichnet auch das synthetische Analogon
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	isotonischer Phosphatpuffer (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie (<i>Photone correlation spectroscopy</i>)
PI	Polydispersitätsindex
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
StA	Stearylamin (1-Aminooctadecan)
T _H 1	Typ1-T-Helferzelle
T _H 2	Typ2-T-Helferzelle
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
THP-1	humane Monozyten-Zelllinie. Kann zu Makrophagen differenziert werden

TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Z-ave	mittlerer intensitätsgewichteter Teilchendurchmesser
ZP	Zetapotenzial

VIII Publikationen

VIII.1 Zeitschriftenbeiträge

Wessinger B, Schendler A, Wischke C, Lorenzen DR, Borchert H.-H. Effects of Lipopeptide-modified Liposomes on Human Antigen-presenting Cells. In Vorbereitung.

Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert H-H, Peters JH, Nesselhut T, Lorenzen DR. 2009. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm.* 365: 61-68.

VIII.2 Vorträge

Wessinger B, Schendler A, Borchert H-H. 2009. Lipopeptide-modified Liposomes for the Activation of Antigen-presenting Cells. DPhG-Jahrestagung. 28.9.-1.10.2009 Jena.

Wessinger B, Schendler A, Borchert H-H. 2009. Liposomes and Microparticles for Dendritic Cell Targeting. Lipopeptide-Workshop der Universität Tübingen, 08.-11.02.2009 Oberjoch.

VIII.3 Poster

Wessinger B, Schendler A, Lorenzen DR, Borchert H-H. 2010. Liposomes as Carriers for Lipopeptides to Activate Human Antigen-Presenting Cells. 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. 8.-11.03.2010, Valletta, Malta.

VIII Publikationen

Wessinger B, Schendler A, Borchert H-H. 2009. Liposomes as Lipopeptide Delivery Systems: Influence of Liposome Preparation Techniques on Loading Efficiency. Internationale Doktorandentagung der DPhG. 18.-21.11.2009, Pichlarn, Österreich.

Schendler A, Wessinger B, Borchert H-H. Lipopeptide-modified PLGA Microparticles Induce Production of Tumor Necrosis Factor alpha in Human Monocytoid Cells. Internationale Doktorandentagung der DPhG. 18.-21.11.2009, Pichlarn, Österreich.

Schendler A, Wessinger B, Borchert H-H. 2009. Synthetic Lipopeptides as Immunoadjuvants: Production of Tumor Necrosis Factor in Human Monocytoid Cells. DPhG-Jahrestagung. 28.9.-1.10.2009 Jena.

Wessinger B und Borchert H-H. 2008. Endocytosis of fluorescence-labelled liposomes by antigen presenting cells. DPhG-Jahrestagung. 08.-10.10.2008 Bonn.

Lorenzen DR, Schendler A, Wischke C, Wessinger B, Zimmermann J, Peters JH, Borchert H-H, Nesselhut T. 2008. Poly(I:C)-coated Microparticles as Bifunctional Carrier for Vaccines in Dendritic Cell-based cell therapies. 10th International Symposium on Dendritic Cells. 01.-05.10.2008 Kobe, Japan.

IX Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

X Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Borchert angefertigt. Mein besonderer Dank gilt ihm für das Ermöglichen dieser Dissertation, seine Unterstützung und das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich sehr für die Begutachtung dieser Arbeit und für die umfangreiche Gerätenutzung in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Brosig danke ich für die Synthese des FITC-Stearylamins und das Vermitteln diverser Arbeitstechniken. Besonders danke ich ihm für viele Aufmunterungen, intensive Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Bei Frau Fuhrmann-Selter bedanke ich mich für die kenntnisreiche und umfassende Einführung in die Zellkultur und für unzählige Messungen, Passagen und MTT-Tests.

Herrn Schendler danke ich sehr für die enge Zusammenarbeit und die fruchtbaren und anregenden Diskussionen.

Herrn Dr. Lorenzen vom Institut für Tumorthherapie in Duderstadt danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und sein großes Engagement.

Bei Herrn Dr. Wischke bedanke ich mich für die Betreuung in der ersten Zeit und seine wertvollen Ratschläge und Ideen, bei Herrn Dr. Siebenbrodt für sein stets offenes Ohr und anregende Diskussionen und bei Herrn Dr. Herrmann für seine Geduld bei der Lösung meiner Computerprobleme.

Meinen Mitdoktoranden Frau Dr. Großkopf, Herrn Gallego-Llerena, Herrn Dr. Baspinar und Herrn Dr. Büch danke ich für das tolle Arbeitsklima und ihre Kollegialität.

Ganz herzlich danke ich meiner Frau dafür, dass sie mich immer unterstützt und mir „den Rücken freigehalten hat“ – und für die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit.