Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Tuberkulose 2

1.1.1 Definition und Pathogenese 2

1.1.2 Mykobakterien 3

1.1.3 Bakteriophagen 6

1.1.4 Tuberkulosetherapie mit Bakteriophagen 8

1.2 Liposomen 9

1.3 Verfahren zur Herstellung von Liposomen 11

1.3.1 pH-sensitive Liposomen 12

1.3.2 Elektroformation 14

1.3.3 Lyophilisation 15

1.3.4 Ethanolinjektion 16

1.3.5 Duale Asymmetrische Zentrifugation 18

1.3.6 Aktives Targeting mit Lipoarabinomannan 20

1.4 Physikalische und chemische Trennmethoden 22

1.4.1 Physikalische Trennmethoden – Dichtegradientenzentrifugation 22

1.4.1.1 Zentrifugationsarten 22

1.4.1.2 Dichtegradienten 23

1.4.2 Inaktivierung freier Phagen 24

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

1.4.3 Solubilisierung 24

1.4.3.1 Triton X-100 25
1.4.3.2 Phospholipase A_2 25
1.4.3.3 Natriumcholat 26
1.4.3.4 Nonidet P40 26

1.5 Mikroskopische Analysenmethoden 27

1.5.1 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie 27

1.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 28

1.6 Durchflusszytometrische Analysenmethoden 29

1.7 Mikrobiologische Analysenmethoden 30

1.7.1 Plaque-Assay 30

1.7.2 Infektions-Assay 31

1.8 Zielsetzung 31

2 Material und Geräte 33

2.1 Verwendete Chemikalien 33

2.2 Verbrauchsmaterialien 40

2.3 Geräte 42

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

3 Methoden 47

3.1 Charakterisierung der Liposomenzubereitungen 47

3.1.1 Bestimmung der Phospholipidgesamtkonzentration 47

3.1.2 Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Polydispersitätsindexes 48

3.1.3 Bestimmung des Zetapotentials 49

3.2 Markieren von Liposomen und D29-Mykobakteriophagen 49

3.2.1 Markieren der Liposomen 51

3.2.2 Markieren der ds-DNA von D29-Mykobakteriophagen 51

3.2.3 Markieren der Hüllproteine von D29-Mykobakteriophagen 52

3.3 pH-sensitive Liposomen 52

3.3.1 Herstellung pH-sensitiver Liposomen 52

3.4 Elektroformation 53

3.4.1 Probenvorbereitung 53

3.4.2 Durchführung 53

3.5 Lyophilisation 55

3.5.1 Herstellung der Liposomengrundlage 55

3.6 Ethanolinjektion 57

3.6.1 Probenvorbereitung 57

3.6.2 Durchführung 58

3.7 Duale Asymmetrische Zentrifugation 59

3.7.1 Herstellung von Lipidaliquots 59

3.7.2 Herstellung nicht-beladener Liposomen 60

3.7.3 Herstellung beladener Liposomen 61

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

3.8 Dichtegradientenzentrifugation 61

3.8.1 Erzeugung eines Stufengradienten 61

3.8.2 Erzeugung eines Lineargradienten 63

3.8.3 Rotoren 65

3.8.3.1 Zentrifugation mit einem Festwinkelrotor 66

3.8.3.2 Zentrifugation mit einem Ausschwingrotor 66

3.8.4 Fraktionierung 67

3.9 Inaktivierung freier D29-Mykobakteriophagen 68

3.10 Solubilisierung von Liposomen 69

3.10.1 Phospholipase A_2 69

3.10.2 Natriumcholat 70

3.10.3 Nonidet P40 70

3.11 Mikroskopische Analysenmethoden 71

3.11.1 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie 71

3.11.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 71

3.12 Durchflusszytometrische Analysenmethoden 72

3.12.1 Durchflusszytometrische Analyse von D29-Mykobakteriophagen 72

3.12.2 Durchflusszytometrische Analyse von Liposomen-Zell-Interaktionen 73

3.12.3 Aktives Targeting mit Lipoarabinomannan 74

3.13 Mikrobiologische Analysenmethoden 75

3.13.1 Plaque-Assay 75

3.13.2 Infektions-Assay 77

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

4 Ergebnisse und Diskussion 79

4.1 Methodenentwicklung zum Einschluss von D29-Mykobakteriophagen 79

4.1.1 pH-sensitive Liposomen 79

4.1.2 Elektroformation 80

4.1.2.1 Einfluss und Auswahl geeigneter Lipide 80
4.1.2.2 Untersuchungen mit DOPC 82
4.1.2.3 Cryo-TEM-Bildanalyse 84

4.1.3 Lyophilisation mit Rehydratisierung 86

4.1.3.1 Einfluss der Puffer- und Lipidzusammensetzung auf die Liposomengröße (ohne D29-Mykobakteriophagen) 86
4.1.3.2 Einfluss der Puffer- und Lipidzusammensetzung auf die Liposomengröße (mit D29-Mykobakteriophagen) 91

4.1.4 Ethanolinjektion 95

4.1.4.1 Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit 95
4.1.4.2 Einfluss der Rührgeschwindigkeit 97
4.1.4.3 Einfluss des inneren Kanülendurchmessers 97
4.1.4.4 Einfluss der Lipidzusammensetzung 98
4.1.4.5 Cryo-TEM-Bildanalyse 103

4.1.5 Duale Asymmetrische Zentrifugation 104

4.1.5.1 Herstellung von Liposomen mittels Dualer Asymmetrischer Zentrifugation 104
4.1.5.2 Cryo-TEM-Bildanalyse 105

4.2 Abtrennung freier Phagen von liposomal assoziierten D29-Mykobakteriophagen 106

4.2.1 Dichtegradientenzentrifugation 106

4.2.1.1 Aufkonzentrierung von Bakteriophagen 106
4.2.1.2 Fraktionierung 106

4.2.2 Inaktivierung freier Phagen mit Ammoniumeisen(II)sulfat 118

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

4.2.3 Solubilisierung von Liposomen 119

4.2.3.1 Triton X-100 119
4.2.3.2 Phospholipase A_2 119
4.2.3.3 Natriumcholat 120
4.2.3.4 Nonidet P40 121

4.3 Methodenentwicklung zur Analytik des Einschlusses von D29-Mykobakteriophagen 122

4.3.1 Mikroskopische Analysenmethoden 122

4.3.1.1 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie 122
4.3.1.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 124

4.3.2 Durchflusszytometrische Analysenmethoden 126

4.3.3 Mikrobiologische Analysenmethoden 129

4.3.3.1 Plaque-Assay 129
4.3.3.2 Infektions-Assay 132

4.4 Liposomen-Zell-Interaktionen 134

4.4.1 Aktives Targeting mit Lipoarabinomannan 134

4.4.2 Phagozytoseuntersuchungen 136

5 Zusammenfassung und Ausblick 139

5.1 Herstellungsmethoden zum liposomalen Einschluss 139

5.2 Analysenmethoden zum Nachweis des Einschlusses 140

5.3 Liposomen-Zell-Interaktionen 142

5.4 Ausblick 143

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.