

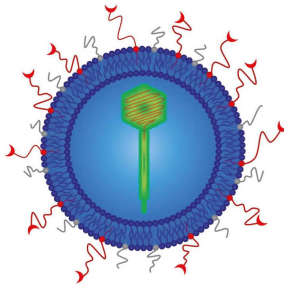


Manuel Weis (Autor)

# Methoden und Analytik zum liposomalen Einschuss von D29-Mykobakteriophagen zur Tuberkulo-getherapie

Manuel Weis

Methoden und Analytik  
zum liposomalen Einschuss  
von D29-Mykobakteriophagen  
zur Tuberkulosegetherapie



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6623>

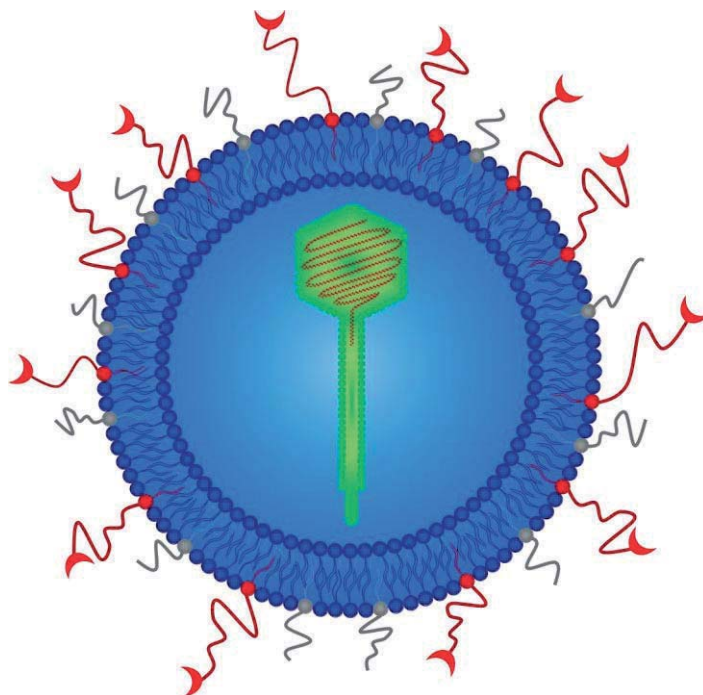
Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# 1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine geeignete Methode zur Liposomenherstellung zu entwickeln, die es ermöglicht, gezielt D29-Mykobakteriophagen einzuschließen (Abbildung 1-1). Zum einen soll eine geeignete Lipidkomposition gefunden, zum anderen eine Analytik etabliert werden, die den Einschluss von D29-Mykobakteriophagen in den Vesikeln verifiziert.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung eines liposomal eingeschlossenen Bakteriophagen**

grün: Mykobakteriophage mit ds-DNA im Kapsid

blau: Liposom (Doppellipidmembran mit polaren Kopfgruppen und lipophilen Seitenketten)

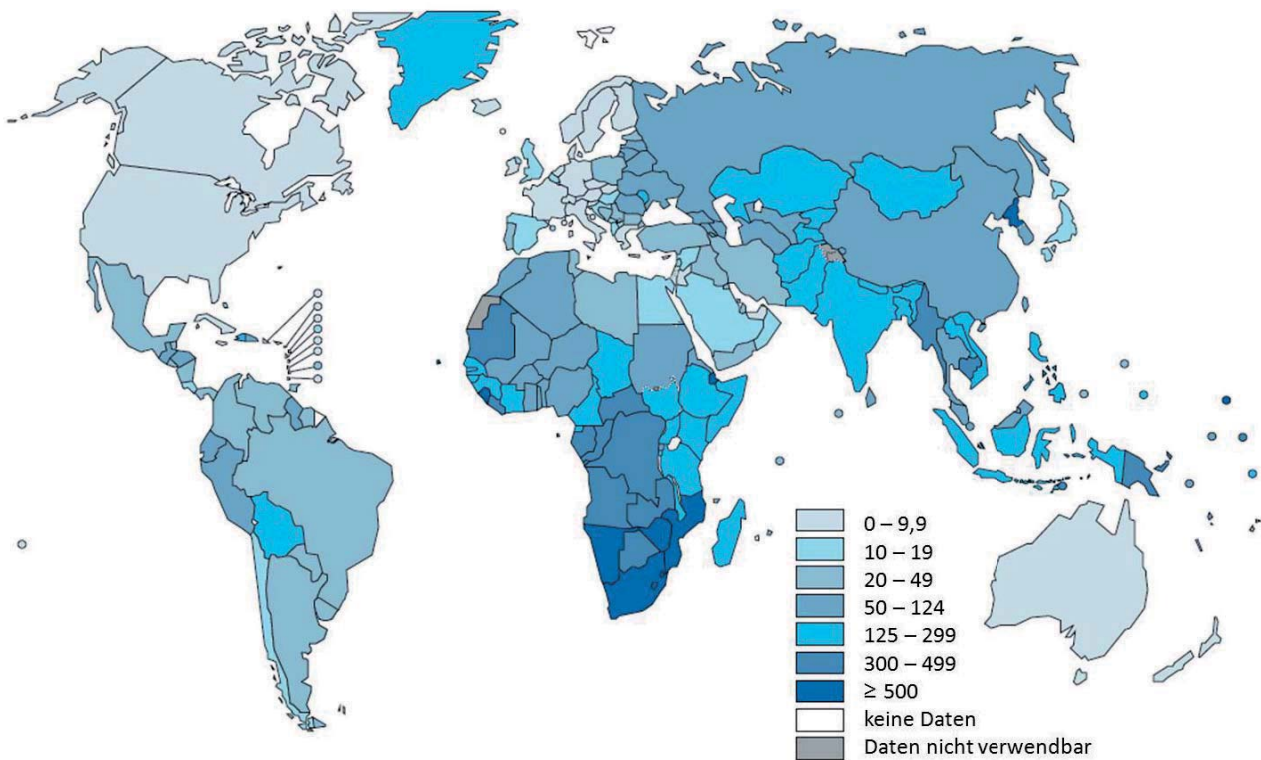
rot: Lipoarabinomannan (LAM)

grau: mPEG<sub>2000</sub>-DSPE

## 1.1 Tuberkulose

### 1.1.1 Definition und Pathogenese

Tuberkulose (TB) stellt ein globales Gesundheitsproblem dar. Sie ist die zweithäufigste tödliche Infektionskrankheit nach AIDS und vor Malaria. Allein 2012 traten weltweit ca. 8,6 Millionen Neuerkrankungen an Tuberkulose auf. 1,3 Millionen Menschen starben an dieser Krankheit (einschließlich 0,32 Millionen HIV-positiver Menschen) (*WHO 2013*). Im Jahr 2011 erkrankten in Deutschland 4.317 Menschen an Tuberkulose. Mit durchschnittlich 5,3 gemeldeten Fällen pro 100.000 Einwohner gehört Deutschland zu den Niedriginzidenzländern für Tuberkulose (*Epidemiologische Bulletin, RKI 2013*) (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Geschätzte Inzidenzraten für TB-Neuerkrankungen, 2012**  
 [*WHO Global tuberculosis report 2013*]

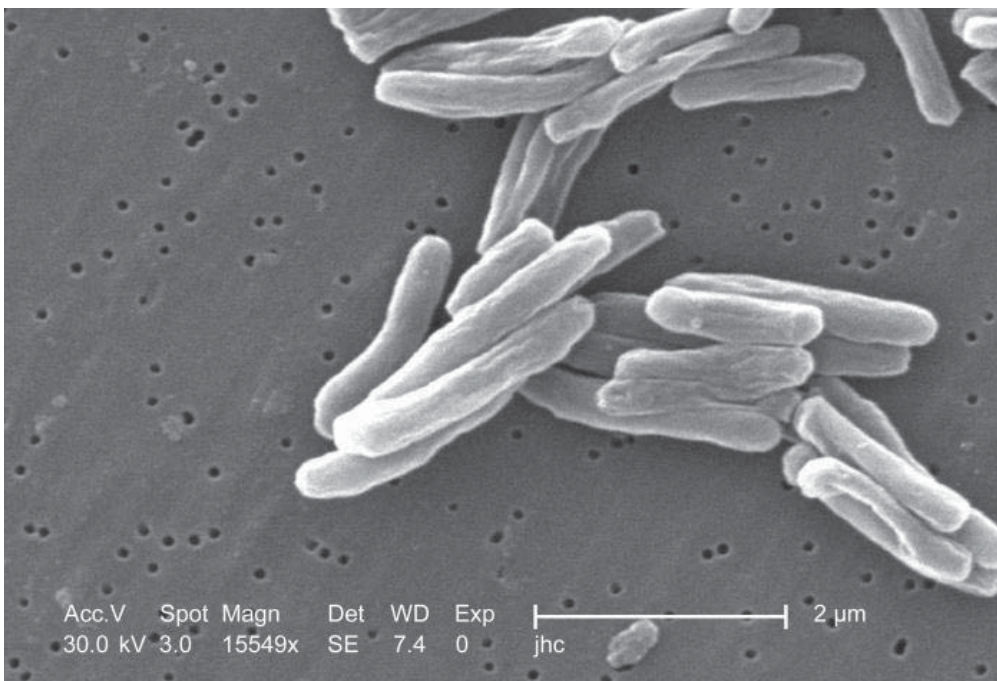
TB wird durch Tröpfcheninfektion grampositiver Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*; 1.1.2) übertragen. Die Inkubationszeit beträgt 4 bis 12 Wochen. Man unterscheidet zwei Formen der TB: die Erstinfektion resultiert in der **Primärtuberkulose**, die vorwiegend in den Lungenspitzen lokalisiert ist.



In über 90 % der Fälle heilen diese primären Infektionsherde klinisch stumm ab. Bei 10 % der Infizierten geht die Primärtuberkulose nach wenigen Monaten oder nach Jahren in die **Sekundärtuberkulose** (Organtuberkulose) über, die durch ausgedehnte Gewebnekrosen charakterisiert ist (Kayser et al. 2001).

### 1.1.2 Mykobakterien

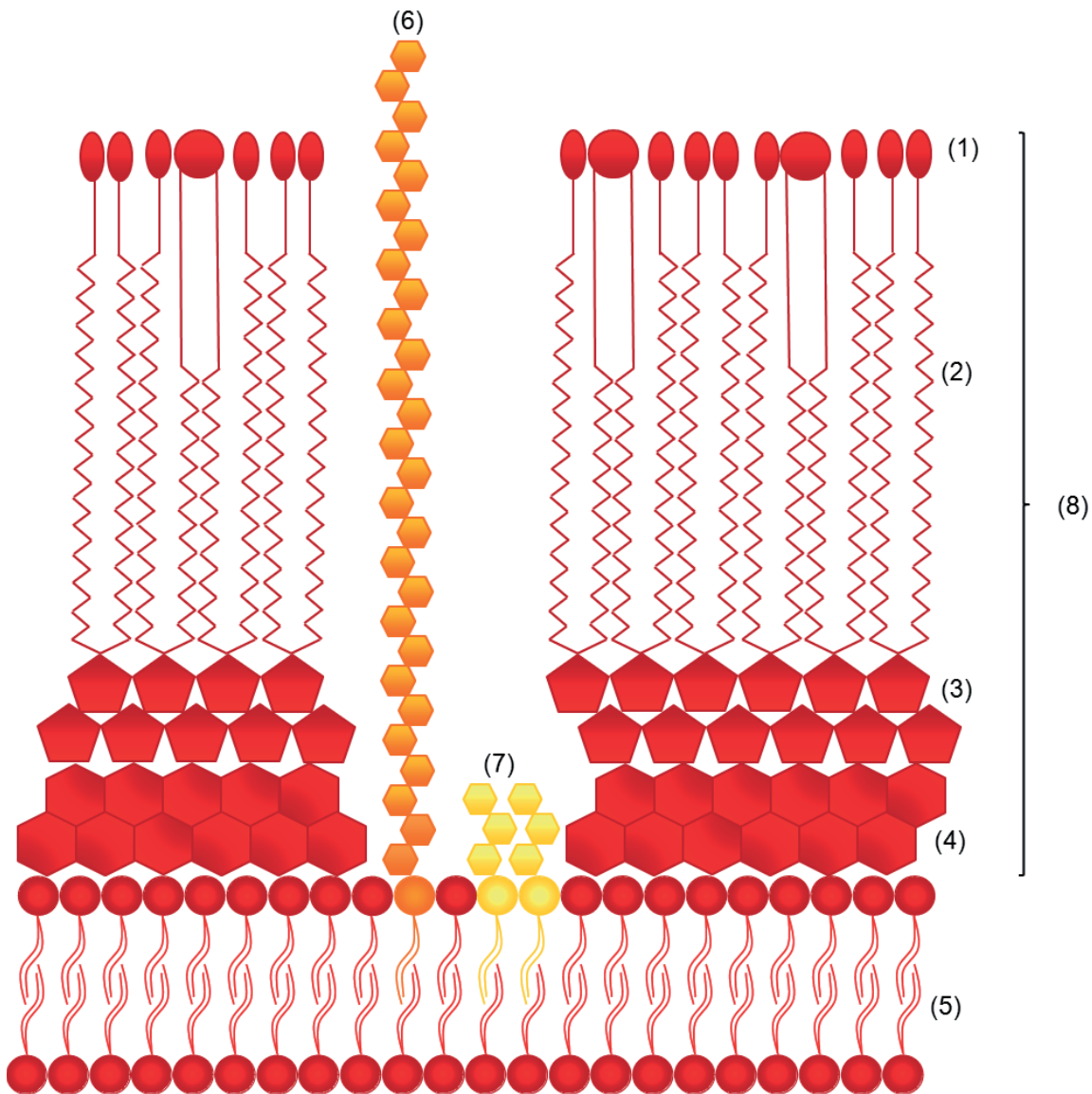
Bei *Mycobacterium tuberculosis* (Abbildung 1-3) handelt es sich um 0,4 µm breite und 3 bis 4 µm lange, grampositive, aerobe, säurefeste Stäbchen, die keine Sporen bilden und unbeweglich sind. Die Generationszeit dauert mit 12 bis 20 h sehr lange, daher zählt man *M. tuberculosis* auch zu den sogenannten *slow growers* (Stahl & Urbance 1990). *M. tuberculosis* zeichnet sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen die meisten Antibiotika sowie Säuren und Laugen aus, die sich nicht allein durch das langsame Wachstum, sondern auch durch den Aufbau der Zellwand begründet (Jarlier & Nikaido 1994; Lee et al. 1996; Hartmanns et al. 2006).



**Abbildung 1-3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Mycobacterium tuberculosis***  
 [Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL),  
 identification number #8438, <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>]

Die Zellwand besteht aus einer Mureinschicht (= Peptidoglycan), die einen hohen Lipidgehalt aufweist (Abbildung 1-4). Die hohe Säurefestigkeit kommt durch die langkettigen Mykolsäuren zustande.

An jeder zehnten N-Acetylmuraminsäure, die zum Rückgrat des Peptidoglycans gehört, ist ein Arabinogalaktankomplex gebunden. Dieser besteht aus einem linearen Galaktosestrang und ist mit Arabinoseketten verzweigt. An diese Komplexe sind Mykolsäuren gebunden, an die wiederum eine Phthiocerollipidschicht nicht kovalent geheftet ist, die sich aus Phthioceroldimycocerosat (DIM) und Phthioceroldiphthioceranat (DIP) zusammensetzt (Brennan & Nikaido 1995). Die Zellwand von *M. tuberculosis* weist somit im Vergleich zu anderen Bakterien eine zweite äußere Doppelschicht auf.



**Abbildung 1-4: Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis* [nach Basso 2005]**

- (1) äußere Lipidschicht, (2) Mykolsäuren, (3) Polysaccharide (Arabinogalactan),
- (4) Peptidoglycan, (5) Plasmamembran, (6) Lipoarabinomannan (LAM),
- (7) Phosphatidylinositolmannosid, (8) Zellwandgerüst



Außerdem enthält die äußere Schicht Lipoarabinomannan (LAM), ein Lipoglycan, das immun- und antiinflammatorische Effekte ausübt. LAM besteht aus 3 Einheiten: einem Polysaccharid-Rückgrat, einem Mannosylphosphatidylinositol-Anker (MPI-Anker) und den sogenannten *Capping Motifs* (Nigou et al. 2003). LAM unterdrückt die Reifung des Lysosomes zum Phagolysosom, die Apoptose und den Signalweg des Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) in Makrophagen sowie die Interleukin-12-Freisetzung dendritischer Zellen. All diese Prozesse sind bedeutsam, um eine ausreichende Immunabwehr in Gang zu setzen (Strohmeier & Fenton 1999). Dies geschieht über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten. LAM aktiviert Makrophagen und leitet die Chemotaxis von T-Zellen ein (Schlesinger 1993; Schlesinger et al. 1994). Aus diesem Grund kann das Glycolipid als spezifische Targetingstruktur zur Internalisierung von modifizierten Liposomen genutzt werden.

In den Alveolen trifft der Tuberkelbazillus auf die erste immunologische Verteidigungslinie, die Alveolarmakrophagen. Ihre Aufgabe ist es, den Erreger zu phagozytieren, über verschiedene Effektormechanismen zu eliminieren und prozessierte Antigene spezifischen T-Zellen zu präsentieren. Die Phagozytose der Mykobakterien wird über eine Vielzahl an Rezeptoren initiiert. Beteiligt an der Aufnahme sind der Mannoserezeptor (MR), der Komplementrezeptor 3, der Scavenger-Rezeptor A und CD14 (Ernst 1998). Durch die Interaktion des Rezeptors mit dem Erreger kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und zur Aufnahme des Pathogens. Bei diesem neu gebildeten endozytischen Vesikel handelt es sich um ein frühes Phagosom, das einen pH-Wert von 6,0 bis 6,5 aufweist (Vergne et al. 2004). Es durchläuft verschiedene Reifungsstadien, bis es durch die Fusion mit einem Lysosom zum Phagolysosom wird. Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme (Nukleasen, Lipasen, Proteasen und vATPasen), die Protonen in die Vesikel pumpen, wodurch der pH-Wert auf 4,5 bis 5,5 sinkt. Dieses saure Milieu ist bakteriostatisch und wichtig für die Aktivierung der hydrolytischen Enzyme, die für den Abbau des phagozytierten Mykobakteriums verantwortlich sind (Bruns 2010).

Das mykobakterielle Phagosom ist durch einen erhöhten pH-Wert von 6,2 bis 6,3 als Folge der fehlenden Rekrutierung der H<sup>+</sup>-Protonenpumpe vATPase charakterisiert (Sturgillkoszycki et al. 1994). Dies spiegelt sich auch im Fehlen einer Reihe lysosomaler und endosomaler Marker wider. Pathogene Mykobakterien verhindern die Ansäuerung, indem sie nach der Phagozytose die Biogenese zum Phagolysosom inhibieren (Vergne et al. 2004). Hierfür haben Mykobakterien verschiedene Strategien entwickelt. Da Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) ein wichtiges Molekül für die Vesikelfusion ist, greift *M. tuberculosis* dieses Molekül auf zwei Wegen an. Die Phosphatidylanaloga Lipoarabinomannan (LAM) und Phosphatidylinositolmannosid (PIM) blockieren die Bildung von PI3P durch Inhibition der PI3P-Kinase. Zusätzlich wird eine Phosphatase sekretiert, die die Konzentration von PI3P auf den Vesikeln erniedrigt (Russell 2001).

Die Modulation der Phagosomenreifung durch *M. tuberculosis* ist der entscheidende Faktor für das intrazelluläre Überleben. Durch die Unterbindung der Reifung werden bakterizide Mechanismen gehemmt. Es findet keine Degradation statt und die Antigenpräsentation wird supprimiert (Bruns 2010).

### 1.1.3 Bakteriophagen

Bakteriophagen (von griechisch *βακτήριον* *baktérion* „Stäbchen“ und *φαγεῖν* *phageín* „fressen“, auch kurz als Phagen bezeichnet) sind Viren, die an einen spezifischen Bakterienstamm gebunden sind, diesen befallen und lysieren (*Lysotypie*). Bakteriophagen wurden 1917 von Félix d’Hérelle und George Eliava erstmals beschrieben (d’Hérelle 1917, Shasha et al. 2004).

Die Vermehrung eines Bakteriophagen läuft in mehreren Schritten ab, wobei das Auffinden einer potenziellen Wirtszelle (Bakterium) immer am Anfang steht (Abbildung 1-5).

Während der Adsorptionsphase lagert sich der Phage an die Oberfläche des Bakteriums an. In der nun folgenden Injektionsphase wird das Phagengenom in das Bakterium über den Schwanzteil übertragen.

In der länger andauernden Latenzphase finden die Transkription, Translation und Replikation der viralen Nukleinsäuren durch das Wirtsbakterium statt.

In der Reifungsphase werden schließlich neue Hüllen aus Proteinen aufgebaut und gleichzeitig Lysozym gebildet, das für die Lyse der Bakterienzellwand verantwortlich ist. Letztendlich mündet der Zyklus in einer Lyse der Bakterienzellwand und dem Freisetzen der Phagen, die nun erneut weitere Bakterienzellen infizieren können.

Die Vermehrung verläuft jedoch nicht immer nach dem oben beschriebenen lytischen Zyklus ab. Bei temperenten Phagen wird zwischen einem lysogenen und einem lytischen Vermehrungszyklus unterschieden. Beim lysogenen Zyklus wird das Genom in das Chromosom des Bakteriums integriert, dadurch entsteht ein sogenannter Prophage. Bei jeder Zellteilung werden die Gene des Phagen und die des Bakteriums gemeinsam verdoppelt und weitergegeben. Dieser Zyklus kann später im lytischen Zyklus münden (Abbildung 1-5).