



# **Cluster-Neoglykolipide: moderne Liganden für das aktive Targeting von Liposomen an humanen Makrophagen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch–naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle - Wittenberg

von Herrn Diplom-Pharmazeut Ali Al-Arifi  
geb. am 29.08.1967 in Bani Arif/Jemen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter Nuhn (Halle)
2. Prof. Dr. Alfred Fahr (Jena)
3. Prof. Dr. Gerd Bendas (Bonn)

Halle/Saale, verteidigt am 26.09.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000006207**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006207>]

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Makrophagen als Teil des Immunsystems</b>	<b>3</b>
2.1.1	Entwicklung der Makrophagen	3
2.1.2	Hauptfunktion der Makrophagen	4
2.1.2.1	Phagozytose	4
2.1.2.2	Pinozytose	6
2.1.2.3	Mikrobizidie durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Killingmechanismen	7
2.1.2.4	Die sekretorische Funktion der Phagozytose	10
2.1.3	Funktionelle Beziehungen der Makrophagen zu den Lymphozyten	11
2.1.4	Aktivierung der Makrophagen als entscheidender Beitrag zu Effektormechanismen der zellulären Immunität	12
<b>2.2</b>	<b>Lektine als rekognitive Strukturelemente im Targetingkontext</b>	<b>14</b>
2.2.1	Pflanzen-Lektine	15
2.2.2	Makrophagen-Lektine	17
2.2.3	Erkennungsvielfalt der Säugetier-Lektine und der Cluster-Glykosid-Effekt	21
<b>2.3</b>	<b>Liposomen als moderne, kolloidale Arzneistoffträgersysteme</b>	<b>24</b>
2.3.1	Generelle Aspekte der Anwendung und Herstellung	24
2.3.2	Probleme des passiven Targeting	27
2.3.3	Glykoliposomen als potentielle Vehikel für das makrophagen-spezifische Drug Targeting	28
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Medien, Puffer und Lösungen</b>	<b>33</b>
3.1.1	Kulturmedien	33
3.1.2	Puffer	33

3.1.3	Lösungen	34
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
3.2.1	Allgemeine Handhabung von Zellen	34
3.2.1.1	Isolierung und Kultivierung humaner Monozyten aus dem Blut	34
3.2.1.2	Makrophagenzählung	35
3.2.1.3	Lebendmakrophagenzahlbestimmung	36
3.2.1.4	Gewinnung von Perikard-Makrophagen	36
3.2.2	Präparation und Charakterisierung von Glykoliposomen zur systemischen Applikation	36
3.2.2.1	Asymmetrische Lokalisierung der Glykolipide auf der Außenmonolayer von Phospholiposomen	36
3.2.2.2	Bestimmung der Vesikelgröße mit PCS	37
3.2.2.3	Stabilitätsuntersuchungen	39
3.2.3	Durchflusszytometrische Untersuchung der MR-Glykoliposomen- Wechselwirkung	39
3.2.3.1	Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie	39
3.2.3.2	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	40
3.2.3.3	Nachweis der MR-Expression auf kultivierten humanen Monozyten	41
3.2.3.4	Präparierung vom Serum aus einzelnen Spenden zur Charakterisierung serumabhängiger GL-Aufnahme	42
3.2.3.5	FITC-Markierung von rt-PA und AGPC	42
3.2.3.6	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte der Cluster-Neoglykolipide	42
3.2.3.7	Bestimmung der Aufnahme-assoziierten Fluoreszenz mit Hilfe der Dithionit-Technik	43
3.2.3.8	Etablierung eines neuen Assays zur Untersuchung des Schicksals liposomaler Inhalte in intrazellulären Azid-Kompartimenten	45
3.2.3.9	XTT-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität von GL	45
3.2.4	Detektierung des MR in eventuellen Mikrodomänstrukturen	46
3.2.4.1	Isolierung von Membranfraktionen auf der Basis von Triton X-100 bei 4°C	46
3.2.4.2	Proteinbestimmung mit dem BCA Reagenz	47
3.2.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48

3.2.4.4	Westernblot	48
3.2.4.5	Antikörperinkubation und Rezeptor-Detektion	49
3.2.5	In vitro vereinfachtes Modell zur GL-Lektin-Interaktion	49
3.2.5.1	Etablierung eines neuen Messsystems zur lektininduzierten Agglutination	49
3.2.5.2	Separierung der Glykolipid-Mizellen aus den Glykoliposomen	49
3.2.5.3	Phosphatidylcholin-Bestimmung	50
3.2.6	Bestimmung der Galactose Oxidase-Aktivität für Galactolipide	51
3.2.7	Synthetische Glykolipide	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>54</b>
<b>4.1.</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse der biologischen Aktivität liposomaler Neoglykolipide</b>	<b>54</b>
4.1.1	Evaluierung der Bindungsaffinitäten an MR in Abhängigkeit von der Anzahl der Zuckerreste (Epitope) und der Länge des Abstandhalters (Spacer)	54
4.1.1.1	Inhibitionsstudie mittels $\alpha$ 1-AGPC-Fraktion für Cluster-Neoglykolipide vom Typ I	54
4.1.1.2	Inhibitionsstudie mittels t-PA für Cluster-Neoglykolipide vom Typ II	55
4.1.2	Untersuchungen zu Endozytose-Charakteristika an humanen Perikard-Makrophagen	60
4.1.2.1	Einfluss von Mannoserezeptor modulierenden Substanzen auf die MR-vermittelte Liganden-Aufnahme	60
4.1.2.2	Vergleichende Studien zur t-PA Bindung, Internalisierung und zum intrazellulären Abbau durch humane Monozyten/Makrophagen	61
4.1.2.3	Aufklärung des Mechanismus der Ligandenaufnahme	62
4.1.2.4	Verbleib liposomaler Inhalte in intrazellulären Kompartimenten	66
<b>4.2</b>	<b>Auswirkung des Serums und MBP auf die rezeptor-spezifische Aufnahme von Glykoliposomen</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>RCA120-induzierte Agglutination von galactosylierten Liposomen in vitro</b>	<b>68</b>
4.3.1	Einfluss der Oberflächenzuckerdichte auf das Ausmaß der Agglutination	68

4.3.2	Einfluss amphiphiler Additiva biologischer Relevanz auf das Ausmaß der Agglutination	70
4.3.3	Einfluss separater Faktoren auf die lektininduzierte Agglutination in Phospholipid-SAP/Glykolipid-Gemischen	72
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung der GOD-Aktivität in mizellarer Lösungen von Galacto-Monoacylglykolipiden</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Anhang</b>	

## **Bibliographische Beschreibung und Kurzreferat**

„Cluster-Neoglykolipide: moderne Liganden für das aktive Targeting von Liposomen an humanen Makrophagen“

Auf der Grundlage der Interaktion des Mannose-Rezeptors (MR) von Makrophagen mit artifiziellen Glykostrukturen wurde in der vorliegende Arbeit das spezifische Targeting von Liposomen an humane Makrophagen untersucht. Als Erkennungselemente dienten dabei die im Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie synthetisierten Glykolipide mit variabler Spacerlänge und unterschiedlichem Mannosylierungsgrad (minicluster Glykoside).

Aus durchflusszytometrischen Untersuchungen der Interaktion von MR-haltigen Makrophagen und in Liposomen inkorporierten Glykolipiden lassen sich eine Vielzahl interessanter drug targeting Ergebnissen ableiten. Dadurch können neuartige Wege zur systemischen Makrophagenaktivierung und Immunstimulierung beschritten werden. So zeichnen sich mehrfach glykosylierte Lipide im Vergleich zu monoglykosylierten MR-Liganden durch eine höhere Affinität und Rezeptorselektivität sowie bessere Zellaufnahme aus.

Der Hinweis auf eine Aufnahme durch coated pits-Vesikel konnte durch den gleichzeitigen Nachweis des Fehlens von MR in monozytären Membranmikrodomänen/Rafts unterstützt werden. Allerdings müssten zukünftige Arbeiten zeigen, ob durch eine Ligandenbindung der MR nicht doch in Rafts gelangen kann.

In einem 2. Komplex meiner Versuche wurde in vereinfachenden in vitro Modellen das Glykolipid-vermittelte Targeting der Liposomen mit Hilfe von kommerziell erhältlichen komplementären Lektinen und Enzymen analysiert und mit verschiedenen physikochemischen Aspekten der Liposomen korreliert.

Insbesondere war ein positiver Einfluss der Kopfgruppengröße von Nichtbilayer-Lipiden (hexagonalbildende Strukturen,  $H_{II}$ ), wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidsäure, auf die Bindungsaffinität von Galactoliposomen mit kurzer Spacerlänge zum komplementären Lektin, RCA120, zu beobachten.

100 Seiten, 21 Abb., 10 Gl., 6 Tab. und 305 Literaturzitate.

Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Technische Fakultät  
Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2003

## Abkürzungsverzeichnis

6-CF	6-Carboxyfluorescein
Ag	Antigen
Agg	Agglutination
AGP	Glykoprotein
Ak	Antikörper
ANS	Ammonium 8-Anilino-1-naphthalensulfonat
APC	antigen presenting cells
BRM	biological response modifiers
BSA	Rinderserumalbumin
CGD	chronic granulomatous disease
CGRP	Calcitonin Gen Related Peptid
Chol	Cholesterol
CMC	Critical micellbildungconcentration
cNOS	exprimierte NO-Synthase
Con A	Concanavalin A
CRD	carbohydrate recognition domain
DEX	Dexamethason
DOPA	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidsäure
DOPC	1,2- Dioleoyl -sn-glycero-3-phosphatidylcholin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-glycerol
DOPS	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-Serin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
EF	excreted factor
FACS	fluorescence activating cell sorter
FV	fused vesicle
Gal	$\beta$ -D-Galactopyranosid
Gal-NAc	N-Acetyl-galactosamin
GL	Glykoliposomen
GOD	Galaktose Oxidase
gp	Glykoprotein
H <sub>II</sub>	Hexagonale Phase
IFN	Interferon
IL	Interleukin

iNOS	induzierbaren NO-Synthase
$k_{cat}$	katalytische Aktivität
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
Lit.	Literatur
LPS	Lipopolysaccharid
LUV	large unilamellar vesicles
$L_\alpha$	flüssigkristalline Phase
$L_\beta$	Gel Phase
Man	$\alpha$ -D-Mannopyranosid
MDP	Makrophagen desaktivierender Faktor
MHC	major histocompatibility complex
MLV	multilamellar vesicles
MPO	Myeloperoxidase
MR	Mannoserezeptor
MS 1a	O-Hexadecyl- O', O'', O'''-tris ( $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl) pentaerythritol
MS 1b	O-Hexadecyl- O', O''-bis ( $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl) pentaerythritol
MS 1c	O-Hexadecyl- O'- $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl-pentaerythritol
MS 2a	O-Hexadecyl- O', O'', O'''-tris ( $\alpha$ -D-galactopyranosidoyl) pentaerythritol
MS 2b	O-Hexadecyl- O', O''-bis ( $\alpha$ -D-galactopyranosidoyl) pentaerythritol
MS 2c	O-Hexadecyl- O'- $\alpha$ -D-galactopyranosidoyl-pentaerythritol
MS 4a	O-Hexadecyl-O',O''-bis( $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl)-O'''-[8-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoxyloxy)-3,6-dioxaoctyl] pentaerythritol
MS 4b	O-Hexadecyl-O'-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl)-O''-[8-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoxyloxy)-3,6-dioxaoctyl] pentaerythritol
MS 4c	O-Hexadecyl-O'-[8-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoxyloxy)-3,6-dioxaoctyl] pentaerythritol
MS 5a	O-Hexadecyl-O',O''-bis( $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl)-O'''-[5-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoxyloxy)-3-oxapentyl] pentaerythritol
MS 5b	O-Hexadecyl-O'-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoyl)-O''-[5-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoxyloxy)-3-oxapentyl] pentaerythritol
MS 5c	O-Hexadecyl-O'-[5-( $\alpha$ -D-mannopyranosidoxyloxy)-3-oxapentyl] pentaerythritol
PCS	photon correlation spectroscopy
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
r. E.	relative Einheit
$r^2$	Korrelationskoeffizient



RCA <sub>120</sub>	Ricinus Communis Agglutinin <sub>120</sub>
RNI	reactive nitrogen intermediates
RT	Raumtemperatur
SUV	small unilamellar vesicles
TCA	Trichloracetic acid
TGF	Transforming growth factor
T <sub>m</sub>	transition temperature
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett
v <sub>0</sub>	Initialgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
V <sub>max</sub>	maximale Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion

## 1. Einleitung

Mononukleäre Makrophagen sind ein zentraler Bestandteil des hochentwickelten Immunsystems der Vertebraten. Je nach dem Gewebe, in dem sie sich ansiedeln, können sie unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Neben der Präsentation von Antigenen eingedrungener Fremdstoffe und somit der Auslösung einer Immunantwort fungieren sie ebenfalls bei der unspezifischen Immunabwehr zusammen mit den polymorphkernigen Leukozyten als so genannte Fresszellen, die durch Phagozytose Bakterien, Zellreste und Antigene aufnehmen und zerstören können. Makrophagen werden durch Zytokine, Bakterientoxine und Komplement aktiviert. Über die unspezifische Abwehrfunktion hinausgehend können die Makrophagen aber auch über spezifische Rezeptorerkennungen zur Immunabwehr beitragen. Die interzelluläre Kommunikation zwischen Makrophagen und anderen Zellen sowie die Wechselwirkung zwischen Makrophagen und pathogenen Krankheitserregern erfolgt dabei zumeist über Kohlenhydrat-bindende Proteine (Lektine) an der Oberfläche der Makrophagen. Durch die Erkennung und Bindung verschiedener artifizieller Glykostrukturen wurden in den letzten Jahren in vielfältigen Experimenten Makrophagen targetiert und damit in ihrer Funktion moduliert. Eine besondere Rolle spielten dabei Liposomen, die durch inkorporierte Glykolipide als rekognitive Strukturelemente für Lektine ein Makrophagen-spezifisches Drug Targeting erreichen, da sich Liposomen durch ihre vielfältige pharmakokinetische Modulierbarkeit und die Fähigkeit zur Arzneistoffbeladung auszeichnen. Dabei diente der aus der Oberfläche der Makrophagen herausragende Mannose-Fucose-N-Acetylglucosamin-Rezeptor als Visitenkarte für die Erkennung, Bindung und nachfolgende Internalisierung dieser Target-Vehikel. Grenzen des Makrophagen-spezifischen Targeting mit diesen, auch Glykoliposomen genannten kolloidalen Arzneistoffträgern waren jedoch durch die spezifischen Bindungseigenschaften der Lektine gegeben. Diese Rezeptor-Moleküle sind vorwiegend in multimeren Untereinheiten assoziiert. Ihre für die Zuckererkennung verantwortlichen Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen sind in multiplen und repetitiven Strukturen angeordnet. Diese auch als Clustering bezeichnete Anordnung macht die Bindung mehrerer Glykosyl-Endgruppen eines polyantennären Glykokonjugates erforderlich und somit die exponentielle Zunahme der Affinität verständlich. Ein derartiger Cluster-Glykosid-Effekt ist daher besonders ausgeprägt, wenn das zu erkennende Lektin mehr geclusterte Zuckerbindungsstellen bzw. höhere Assoziate der monomeren Untereinheiten aufweist und der multivalente Ligand seine Zuckerbündelungen mit entsprechender Orientierung und flexiblem Spacing präsentiert.

Für ein effektives Targeting von Makrophagen durch Liposomen muss dieses Multimerisierungsprinzip ebenfalls berücksichtigt werden. Dies kann einerseits durch eine ausreichend hohe Konzentration von monomeren Glykoliganden in Liposomen oder durch die Präsentation von multiantennären Liganden realisiert werden. Da hohe Konzentrationen von monomeren Glykoliganden oftmals die strukturelle Integrität der verwendeten Vesikel stören, können zur Erhöhung der Bindungsaffinität entweder kleinere Mengen chemisch definierter Cluster-Glykolipide in die Liposomen eingebaut werden, oder durch die Wahl geeigneter Phospholipidmatrices eine Clusterung durch laterale Phasen-Separation innerhalb der Membran induziert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden beide Prinzipien verfolgt, indem einerseits die am Institut für Pharmazeutische Chemie synthetisierten multimeren Glykolipide mit unterschiedlichen terminalen Epitopen und unterschiedlichen Spacerlängen in Liposomen auf ihre Targetierungsfähigkeit an Makrophagen in verschiedenen in vitro-Systemen untersucht wurden. Aufbauend auf den Zellbindungs-(Rezeptorverdrängungs)-Studien wurden dann andererseits die Aufnahmecharakteristika der humanen Makrophagen unter dem Einsatz von metabolischen Inhibitoren sowie das intrazelluläre Verhalten ausgesuchter glykolipidhaltiger Liposomen charakterisiert. Des Weiteren wurden an monomeren Glykolipiden in Liposomen der Matrixeinfluss sowie die Rolle ausgewählter amphiphiler Additiva biologischer Relevanz auf die Lektinbindung in Abhängigkeit von der Spacerlänge der Glykolipide untersucht. Dem Einfluss der mittleren Spacer (Abstandshalter zwischen dem Zuckerdeterminanten und dem Lipidanker) folgend, sollten zusätzlich die Mizellbildungskonzentrationen (CMC) verwendeter Glykolipide mit bis zu 20 Ethylenoxid-Einheiten als Spacer determiniert sowie mittels enzymatischer Analyse in wässrigem Milieu kinetische Parameter bestimmt werden.

## **2 Theoretischer Teil**

### **2.1 Makrophagen als Teil des Immunsystems**

#### **2.1.1 Entwicklung der Makrophagen**

Bereits 1893 wurde von Metchnikoff der Term „Makrophage“ geprägt [1]. Dieser Sammelbegriff vereinte einst die großen mononukleären Zellen sowohl im Blut als auch in der Lymphflüssigkeit, die sich durch die spezielle Fähigkeit auszeichnen, fremdes Material und Zelltrümmer zu internalisieren. Kurze Zeit später, 1924, wurden die Makrophagen dann gemeinsam mit den Monozyten in ein übergeordnetes System eingefügt, das Retikuloendotheliale System (RES). Zu den Zellen dieses Netzwerkes gehören neben den vorgenannten Zelltypen auch dendritische Zellen, Retikulumzellen und vaskuläre Endothelzellen [2].

Im Verlaufe der Studien über die Funktion und Entwicklung dieser Zelltypen entstand 1970 eine neue Klassifizierung der Makrophagen und Monozyten, das Mononukleäre Phagozyten System (MPS) [3]. In diesem System befinden sich sowohl die unterschiedlichen Subpopulationen der Gewebsmakrophagen – zugehörig zur Gruppe der Phagozyten - als auch deren Vorläufer im Knochenmark und peripheren Blut. Die Gewebsmakrophagen sind - nach Roitt et al.1987 [4] - in vielen Organen zu finden:

- Alveolarmakrophagen in der Lunge
- Kupffer-Sternzellen in der Leber
- Lymphknotenmakrophagen
- Milz-Sinus-Makrophagen
- Mikrogliazellen im Gehirn
- Intraglomeruläre Mesangiumzellen in der Leber
- Serosamakrophagen

Enzymhistochemischen Untersuchungen zufolge soll der überwiegende Anteil der mononukleären Phagozyten aus dem Knochenmark stammen, wo sie von Promyelozyten zu Monozyten heranreifen [5 - 10]. Im Knochenmark dauert die Entwicklungszeit vom Promyelozyten zum reifen Monozyten durchschnittlich 6 d [6, 8, 11 - 12]. Nach der Ausreifung verlässt der Monozyt nach ca. eintägigem Aufenthalt das Knochenmark und gelangt in die Blutbahn, in der die mononukleäre Zelle eine Halbwertszeit von 3 d hat [7, 13]. Zufällig oder verstärkt durch einen lokalen inflammatorischen Stimulus wandert ein Teil der Monozyten aus der Blutbahn in das Gewebe ein (Lunge, Bauchfell und

Peritonealraum, Haut, Milz und Leber), wo sie dann als typische Gewebsmakrophagen ihre volle Funktionsfähigkeit erlangen [14 - 15].

## **2.1.2 Hauptfunktion der Makrophagen**

Die Abwehr der unterschiedlichsten Fremdstoffe und Erreger durch die Aufnahme in diese Zellen, die sogenannte Endozytose, ist wohl die bekannteste interzelluläre Aktion der Makrophagen. Die Endozytose kann durch zwei verschiedene Mechanismen, die Phagozytose oder die Pinozytose, erfolgen.

### **2.1.2.1 Phagozytose**

Bei der Phagozytose werden neben der Aufnahme und intrazellulären Verdauung zahlreicher Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren oder Protozoen [16 - 18] auch veränderte und geschädigte Zellen oder Zelldebris sowie Antigen-Antikörper-Komplexe beseitigt [19 - 22]. Darüber hinaus sind aktivierte Makrophagen daneben auch zur extrazellulären Lyse von kernhaltigen Zellen befähigt [23 - 29]. Im Gegensatz zur Pinozytose können hierbei größere Partikel aufgenommen werden (1  $\mu\text{m}$  und mehr im Durchschnitt). Die Phagozytose von Fremdstoffen wird im allgemeinen durch deren Anlagerung an den Phagozyten eingeleitet. Diese Anheftung kann durch unspezifische Bindungskräfte oder unter Beteiligung von Rezeptormolekülen stattfinden, die sich auf der Plasmamembran befinden. Zu den spezifischen Rezeptoren gehören u.a. das CD14 als Teil des LPS-bindenden Rezeptoren, die Rezeptoren für Immunglobulin G, sowie die Rezeptoren für die dritte Komplementkomponente (C3b), Fibronectin-Rezeptoren und die Rezeptoren für das C-reaktive Protein [30 - 32]. Weiterhin kommen auch Kohlenhydrate oder kohlenhydratbindende Proteine (Lektine) auf die Phagozyten-Oberfläche vor. Insbesondere sind neben CD11b/CD18 als Komplement-Rezeptoren für C3b auch das verwandte Molekül LFA-1 (leucozyte functional antigen-1), der Makrophagen-Mannoserezeptor, die Galektine und galactosebindende Proteine der Sternschen Kupferzellen sowie zahlreiche weitere Scavenger Rezeptoren beschrieben. Nach der Bindung eines Oberflächenantigens eines bestimmten Partikels (Bakterium) an einen Rezeptor der phagozytierenden Zelle folgt eine Einstülpung (Invagination) des betroffenen Plasmabereiches [4]; die Membran umschließt kontinuierlich das Partikel, bis es völlig umhüllt ist. Das Partikel befindet sich jetzt in einer von der Zellmembran umschlossenen

Phagozytosevakuole, dem Phagosom. Nach Ablösung des Phagosoms von der Zellperipherie und seiner Einwärtswanderung ins Zellinnere trifft es dort auf Vesikel, die vom Golgi-Apparat der Zelle abgeschnürt wurden. In neutrophilen Granulozyten werden diese Vesikel Granula, bei Makrophagen Lysosomen genannt.

Die Membranen von Phagosom, Lysosomen und Granula fusionieren. Dabei entsteht eine Öffnung, durch die der Inhalt (Enzyme) der Lysosomen bzw. Granula in das Phagosom überführt wird. Diese neue, größere Vakuole wird als phagozytisches Lysosom oder auch als Phagolysosom oder Heterolysosom bezeichnet. Bei diesen Lysosomen handelt es sich um bläschenartige Gebilde von sehr unterschiedlicher Erscheinungsform und relativ kleiner Größe. Sie sind von einer Lipoproteinmembran begrenzt und besitzen einen hohen Gehalt an zahlreichen hydrolytischen Enzymen mit saurem Wirkungsoptimum [33 - 35]. Die hydrolytischen Enzyme werden in drei Klassen eingeteilt:

1. Lysosomale Hydrolasen [36];
2. neutrale Proteasen (Kollagenase, Gelatinase, Elastase, Plasminogenaktivator) [37];
3. Lysozym [38].

Während die neutralen Proteasen ausschließlich von aktivierten Zellen sezerniert werden, werden das Lysozym und die lysosomalen Hydrolasen von residenten und nicht-inflammatorischen Makrophagen produziert. Ein Teil der Lysosomenenzyme ist an die Membran gebunden, ein Teil ist löslich. Gesteigert wird die phagozytotische Aktivität unter Mitwirkung von spezifischen Opsoninen, wie IgG und C3b, als auch durch unspezifische Opsonine, wie  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Fibronektin.

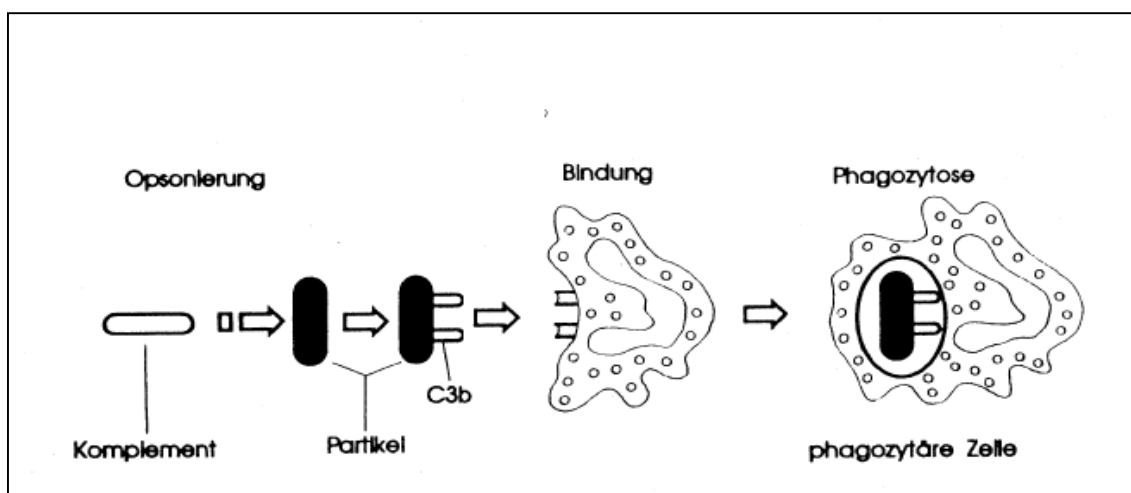


Abb. 1: Opsonierung und Phagozytose (nach Roit et al.1987)

Diese von Almroth Wright entdeckte und durch G. B. Shaw in seinem Buch „The Doctor's Dilemma“ berühmt gewordene Opsonisierung stellt wahrscheinlich den wichtigsten Prozess dar, durch den Antikörper bei der Bekämpfung vorwiegend bakterieller Infektionen mitwirken. Die einzelnen Schritte der Phagozytose können sowohl durch genetische Defekte gestört sein oder vollständig fehlen, als auch aktiv durch bestimmte Mikroorganismen gehemmt werden. In jedem dieser Fälle kommt es zur mangelhaften Eliminierung von Mikroorganismen oder von Fremdmaterial, was zu chronischen Infektionen oder chronischen Entzündungen führt.

### **2.1.2.2 Pinozytose**

Bei der Pinozytose unterscheidet man die nur bei Amöben vorkommende Makropinozytose (Aufnahme großer Vesikel, die lichtmikroskopisch noch sichtbar sind) von der in Darmepithelzellen sehr häufigen Mikropinozytose, bei der die gebildeten Endozytosevesikel nur noch elektronen-mikroskopisch erkennbar sind (Durchmesser 50 - 400; meist um 100 nm). Die Mikropinozytose ermöglicht molekular oder kolloidal gelösten Stoffen, für die die Zellmembran oft keine Transportproteine besitzt, in Form von Vesikeln ins Zellinnere zu gelangen.

Als unspezifische Mikropinozytose bezeichnet man die nicht rezeptorvermittelte Aufnahme von kleinen Mengen extrazellulärer Flüssigkeit mitsamt allen darin gelösten Stoffen. Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus ist noch unbekannt. Bei dieser Aufnahmeart können Einstülpungen der Plasmamembran stattfinden und zu Vesikeln abgeschnürt werden. In diesen Einstülpungen sammelt sich das die Zelle umgebende Medium und wird auf diese Weise in Form kleiner Vakuolen (Pinosomen) in das Innere der Zelle aufgenommen.

Die für viele Stoffe schon nachgewiesene spezifische (rezeptorvermittelte) Endozytose oder spezifische Pinozytose wird durch die Anheftung eines Partikels oder Moleküls (Ligand) an einen spezifischen Rezeptor auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran hervorgerufen. Diese spezifische Pinozytose findet an speziellen Regionen der Plasmamembran statt. Diese Regionen werden als beschichtete Gruben (coated pits) bezeichnet, da sie auf der Außenseite der Plasmamembran mit einer Proteinbeschichtung bedeckt sind (Hauptbestandteil ist das Protein Clathrin). Die Proteine

haben eine körbchenförmige Struktur, in die die aufzunehmenden Moleküle eingelagert werden. Haben sich in den coated pits-Arealen genügend Moleküle angesammelt, so werden diese Membranbereiche in das Zellinnere eingeschnürt und als Vesikel (coated vesicle) aufgenommen [39].

Die Vesikel wandern je nach der spezifischen Substanz im Sinne eines vesicle sorting durch das Zytoplasma zum Golgi-Apparat, RER, Lysosomen oder durch die Zelle hindurch zur gegenüberliegenden Zellmembran im Sinne eines transzellulären Transportes (Transzytose; häufig in Endothelzellen zu finden).

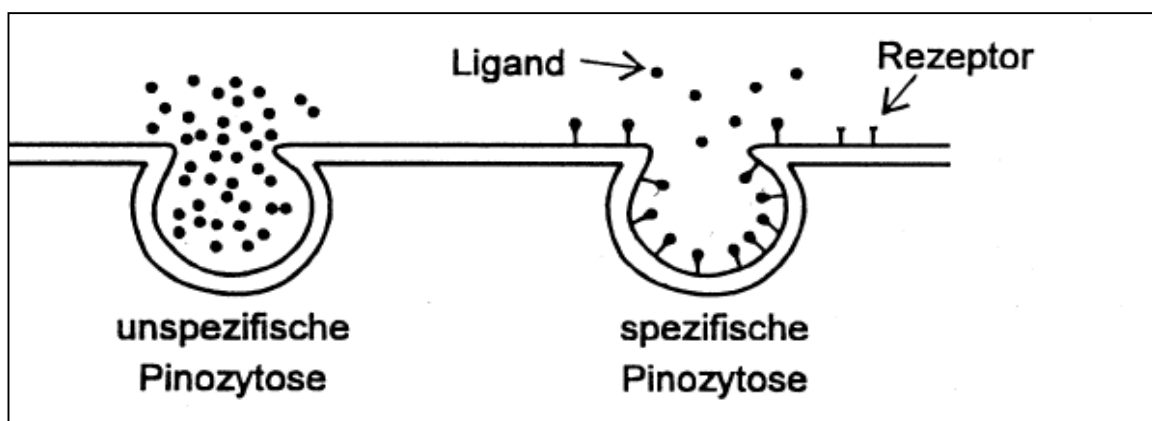


Abb. 2: Unspezifische und spezifische Pinozytose (nach Klein 1991)

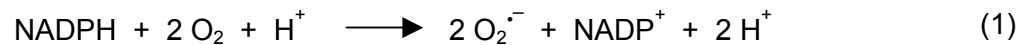
Die Clathrin-Vesikel haben Durchmesser von 50 - 100 nm und werden von einem Gerüst aus meistens 12 Penta- und 8 Hexagons aus insgesamt 36 Dreifachskelerten von Clathrin überzogen. Dieses fibröse Protein besteht aus einer schweren Kette (180.000 Dalton) und einer leichten Kette (35.000 - 40.000 Da). Schon bald nach dem Verlassen der Zellmembran löst sich der Clathrin-Mantel um die Vesikel wieder ab, wodurch die Clathrin-Moleküle wieder frei werden.

### 2.1.2.3 Mikrobizide Wirkung durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Metaboliten

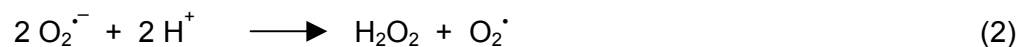
Neben der Aufnahme von Fremdstoffen und deren anschließende intralysosomale Degradation kommt es nach dem Kontakt eines Fremdkörpers mit der Plasmamembran einer phagozytierenden Zelle zu einer deutlichen Steigerung des nicht auf die Mitochondrien entfallenden Sauerstoffverbrauches [40]; dieser ist Zyanid-unempfindlich. Sein Zweck ist nicht die Anlieferung des für Phagozytose erforderlichen ATP (hierfür sorgt



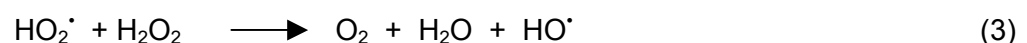
die mitochondriale Atmung), sondern die Einleitung sauerstoffabhängiger, zytotoxisch wirkender Angriffsmechanismen auf das aufgenommene Bakterium. Diese zusätzliche Sauerstoffaufnahme kommt durch Aktivierung eines FAD-abhängigen Flavinenzyms der Phagozytenmembran zustande, das eine Oxidation von NADPH bewirkt, welches seinerseits vorrangig durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasereaktion entsteht. Dies zeigt, dass Sauerstoff für die zelltötende Aktivität der Phagozyten erforderlich ist. Die Oxidation der reduzierten Pyridinnukleotide durch das genannte Flavinenzym führt zur Bildung hochreaktiver Sauerstoffabkömmlinge, zu denen das Superoxidationion (Superoxidradikal)  $O_2^{\bullet-}$ , das Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  und das Hydroxylradikal  $HO^{\bullet}$  gehören:



Das Superoxidationion ist das initiale toxische Produkt der nichtmitochondrialen Atmungssteigerung. Es wird spontan oder enzymatisch durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid reduziert:



Das Superoxidradikal bzw. seine protonierte Form, das Perhydroxylradikal  $HO_2^{\bullet}$ , kann auch mit bereits gebildetem Wasserstoffperoxid hochreaktive Hydroxylradikale bilden, die wahrscheinlich die wirksamsten Sauerstoffderivate in der zytotoxischen Aktivität der Phagozyten sind:



Diese stark reaktionsfähigen Sauerstoffabkömmlinge verursachen die Peroxidation der Membranlipide der aufgenommenen und sich im Phagosom befindlichen Fremdzellen. Dies führt zur Zerstörung ihrer Zellmembran und zur Freisetzung ihres Zellinhaltes, der durch die im Phagosom enthaltenen, aus den Granula der phagozytierenden Zelle stammenden hydrolytischen Enzyme abgebaut wird. Dieser nach der Phagosomenbildung erfolgende Vorgang bedarf jedoch nicht der Fusion mit den Lysosomen, sondern ist ein spontaner Reaktionsschritt. Pathobiochemische Störungen in den Phagozytose- und Sekretionsfunktionen führen dabei zu schweren Infektionen, Organabzessen, Pneumonie, Osteomyelitis und Dermatitis, die schon im frühen Kindesalter zum Tode führen können.

Von größter Bedeutung ist dabei die angeborene septische Granulomatose (CGD). Die Fremdzellen werden zwar phagozytiert, nicht aber oxidativ zerstört. Es existiert ein Defekt an dem Enzymsystem, das für die nichtmitochondriale Atmung der Phagozyten verantwortlich ist (FAD-abhängige NADPH-Oxidase). Für klinische Studien erhalten die Patienten in einem solchen Fall autologe Knochenmarktransplantate mit gentechnologisch reparierter NADPH-Oxidase (somatische Gentherapie). Geeignete Stimuli zur Aktivierung von NADPH-Oxidase sind neben der Phagozytose auch der Kontakt mit Mikroorganismen (Zyosan, Paramyxoviren, Mykoplasmen), die Quervernetzung von Oberflächenmolekülen (Fc-Rezeptoren), Lektine sowie Calcium-Ionophore.

Eine besondere Rolle in der zytotoxischen Bewaffnung der Phagozyten gewinnt auch eine Peroxidase, die als Myeloperoxidase (MPO) bezeichnet wird, da man sie zuerst in den Granulozyten nachgewiesen hat. Unter bestimmten Bedingungen kann aber nach einer Lysosomen-Fusion auch der Eintritt einer Katalase aus den Peroxisomen in die Phagosomen gelingen. Die Myeloperoxidase oxidiert Cl<sup>-</sup>-Ionen und liefert dabei zytotoxische Produkte, die die aufgenommene Zelle auf verschiedene Weise angreifen können. Darüber hinaus vermag das Myeloperoxidasesystem die Prostaglandine und Leukotriene zu oxidieren. Diese sind für das Entzündungsgeschehen von besonderer Bedeutung, so dass sich hier gegenseitige Beziehungen ergeben. Bei einem Enzymdefekt, der Myeloperoxidase-Defizienz, kommt es zu einer Störung der bakteriziden Funktion, seine Auswirkungen sind aber wesentlich milder als die des NADPH-Oxidase-Defektes, da Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid gebildet werden, die in Verbindung mit den anderen Bestandteilen des antimikrobiellen Systems eine Abtötung der Fremdzellen bewirken können.

Für Patienten mit CGD, die also keine reaktive Sauerstoffintermediate bilden können, oder die unter Myeloperoxidase-Defizienz leiden, werden die intrazellulären Killing Mechanismen anders gesteuert. Hierbei sind sowohl aerobe Mechanismen durch das Stickoxid (NO) als auch anaerobe Mechanismen vorprogrammiert. Die anaerobe Wirkung wird zumeist durch kationische Proteine mit Antibiotika-ähnlichen Eigenschaften vermittelt. Diese bekannten Moleküle unter dem Namen Defensine sind Zystein- und Arginin-reiche kationische Peptide von 30 bis 33 Aminosäuren. Sie bilden ionenpermeable Kanäle im Lipid-Bilayer. Ihre Wirkung (am effektivsten bei pH 7.0) richtet sich häufig gegen *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Cryptococcus neoformans* sowie das ummantelte Virus Herpes Simplex. Weitere nennenswerte intrazellulär vorkommende kationische Proteine mit unterschiedlichen pH-

Optima sind Cathepsin G sowie Azurocidin. Die aerobe Wirkung, wie oben erwähnt, erfolgt dagegen über reaktive Stickstoffintermediate (RNI: reactive nitrogen intermediates). Insbesondere spielt die Produktion von Stickoxid im Rahmen der intrazellulär gesteuerten Immunabwehr eine wichtige Rolle.

Je nach dem Funktionszustand existieren zwei enzymatische Wege zur Gewinnung von NO aus Arginin. Im Falle der Blutdruckkontrolle und Neurotransmission wird eine konstitutiv exprimierte NO-Synthase (cNOS) in Calcium-abhängiger Weise aktiviert. Das Enzym kombiniert Sauerstoff mit dem Guanidino-Stickstoff des L-Arginins und so die Bildung des für Bakterien und Tumor-Zellen toxischen Stickoxids. Tetrahydrobiopterin fungiert dabei als Co-Faktor. Dieses Faktor existiert paradoxerweise nicht in den humanen Makrophagen, sondern den Neutrophilen und anderen Zelltypen, so dass dies als Eigenverteidigungsweg nicht-immunologischer Zellgewebe gegenwärtig diskutiert wird.

Im Falle der Mikrobizidie aktivierter Makrophagen wird bei der Zellaktivierung die Neusynthese der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) veranlasst: iNOS ist permanent aktiv und kann dadurch große Mengen NO über längere Zeit synthetisieren. In biologischen Systemen ist NO hochreaktiv; es reagiert mit vielen Partnern, z.B. O<sub>2</sub>, aber auch Eisen (mit Häm von Hämoglobin und anderen Enzymen). Die Reaktion mit O<sub>2</sub>•- führt zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), welches Proteine nitriert und damit verändern kann.

Experimentelle Untersuchungen mit genetisch NOS-defizienten Tieren zeigten, dass NO an der Mikrobizidie gegen eine breite Palette von Erregern ursächlich beteiligt ist. Für einige ist die Evidenz sehr gut, für andere Erreger sind die Daten noch etwas widersprüchlich.

#### **2.1.2.4 Die sekretorische Funktion der Phagozyten**

Phagozytierende Zellen haben auch die Fähigkeit, zelltoxische Substanzen zu sezernieren. Dies geschieht insbesondere an den Orten der Infektion und leistet einen Beitrag zum Entzündungsgeschehen. Von besonderer Bedeutung sind neben den Makrophagen auch die neutrophilen Granulozyten. Die sezernierten Stoffe stammen aus den intrazellulären Granula, die mit der Plasmamembran fusionieren und danach ihren Inhalt nach außen ergießen. Angeregt wird dieser Prozess durch chemotaktische

Faktoren, die vor allem aus dem Komplementsystem stammen sowie durch Phagozytosepartikel, bakterielle Toxine, opsonisierte Partikel, hochungesättigte Fettsäuren,  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen und andere Faktoren.

Dem Inhalt der Granula entsprechend gelangen durch diese Art von zellulärer Sekretion folgende Enzyme und biologische Wirkstoffe nach außen in die Umgebung des Phagozyten: saure Phosphatase, saure  $\beta$ -Glucuronidase, Peroxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Myeloperoxidase u.a. Enzyme und Vitamin  $\text{B}_{12}$ -bindendes Protein, Leukotriene,  $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Fibronectin,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Sauerstoffradikale sowie sezernierbare neutrale Protease, Plasminogenaktivator, Komplement-faktoren, Prostaglandine, Lysozym, und Kollagenase. Der Sekretionsvorgang ist im allgemeinen mit der Phagozytose verbunden, nicht aber von ihr abhängig. Obwohl die Sekretion dieser Substanzen aus den Phagozyten einen Beitrag zur Zerstörung der fremden Zellen leistet, liegt ihre Hauptbedeutung in einer Verstärkung des akuten Entzündungsgeschehens. Entzündungshemmende Substanzen wie Steroide der Nebennierenrinde sind in der Lage, diesen Vorgang zu hemmen.

### **2.1.3 Funktionelle Beziehung der Makrophagen zu den Lymphozyten**

Die den Körper durchstreifenden Makrophagen, die neben B-Zellen und dendritischen Zellen auch als Antigen-präsentierende Zellen (APC) bekannt sind, verschlingen gefundene Antigene und zerlegen sie in antigene Peptide. Diese kleinen Fragmente des Proteins werden an Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) verbunden und auf der Zelloberfläche präsentiert. Auf der Zelloberfläche wird dieser spezifische MHC-Antigen-Komplex von T-Lymphozyten erkannt [41 - 42]. Durch die Bindung an den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex wird die T-Zelle aktiviert [43] und reagiert ihrerseits mit der Ausschüttung zahlreicher Substanzen, die das Immungeschehen massiv beeinflussen wie  $\text{IFN}_\gamma$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF und das Nichtzytokine Transferrin [44]. Die T-Lymphozyten teilen sich in zwei Untergruppen, die nach ihren Oberflächenmarkern als CD4- und CD8-Zellen oder nach ihrer Funktion als Helfer- und Killerzellen bezeichnet werden. Helfer-Zellen erkennen Antigene, die von Makrophagen und anderen entsprechend spezialisierten Zellen aufgenommen worden waren. Killer-Zellen reagieren hingegen auf Proben von Proteinen, die aus dem Zellinneren der präsentierenden Zelle stammen; bei einer infizierten Zelle können das virale, bei einer Krebszelle mutierte Eiweißstoffe sein. Jede Sorte von T-Zellen nimmt nur von solchen Peptiden Notiz, die auf

den richtigen Zellen präsentiert dargeboten werden. Für Helfer T-Zellen ist dies ein MHC-Molekül der Klasse II, für Killer-Zellen der Klasse I.

Wenn CD4-Zellen das richtige Signal erhalten, produzieren sie große Mengen von Lymphokinen, welche die Teilung anderer T-Zellen beschleunigen und die Entzündungsreaktion fördern. Einige CD4-Zellen spezialisieren sich auf die Unterstützung von B-Zellen, andere auf das Hervorrufen dieser Entzündungsreaktion. Aktivierte CD8-Zellen hingegen produzieren viel geringere Mengen an Lymphokinen, können dafür aber quasi Löcher in ihre Zielzelle bohren und Stoffe abgeben, die infizierte Zellen abtöten. Daher stammt auch ihre Bezeichnung Killer- oder zytotoxische T-Zellen. Mit der Ausschüttung der hormonartigen Lymphokine werden auch andere Elemente des Immunsystems mobilisiert, darunter die B-Lymphozyten. Werden diese zur Aktivität erweckt, teilen sie sich mehrfach und differenzieren sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen aus. Antikörper sind frei abgegebene lösliche Formen der B-Zell-Rezeptoren. Treffen sie auf das entsprechende Antigen, lagern sie sich an. Dadurch können sie es neutralisieren oder seinen Abbau durch Komplement beziehungsweise durch Fresszellen beschleunigen. Neu aufgebaut wird auch ein ausgedehntes Kanalsystem für Verpackung und Ausfuhr der Moleküle. Eine einzelne B-Zelle kann dann mehr als 10 Millionen Antikörpermoleküle pro Stunde aus sich herauspumpen, die spezifisch gegen die eingedrungenen Antigene wirken. In einem Lymphozyten wird also jeweils nur die genetische Information für einen bestimmten Immunglobulintyp phänotypisch realisiert, während die Gene für andere Immunglobuline unterdrückt werden.

#### **2.1.4 Aktivierung der Makrophagen als entscheidender Beitrag zu Effektormechanismen der zellulären Immunität**

Im Rahmen von Entzündungsprozessen und zellvermittelten Immunreaktionen wandern ruhende Makrophagen als Reaktion auf die chemotaktische Faktoren aus dem normalen Gewebe zum Ort des entzündlichen Geschehens [45 - 47]. Die dabei anfallenden, unspezifisch wirkenden Lymphokine [48 - 50] führen aber nicht nur zur aktiven, auf den Ort des Reizes gerichteten Bewegung und zur Immobilisierung der mononukleären Phagozyten am Ort des Reizes, sondern vor allem auch zu einer Steigerung der funktionellen Aktivität der Makrophagen [51 - 56].

Der Aktivierungsvorgang kann sich je nach Ausmaß in stark gesteigerter Fähigkeit zur Phagozytose, zum intrazellulären Abtöten von Mikroorganismen oder zur extrazellulären Lyse von kernhaltigen Zellen, der sog. zytotoxischen Reaktion äußern. Dank dieser Aktivierung zeigen Makrophagen auch eine zunehmende Stoffwechselaktivität, eine erhöhte Sekretion von Enzymen (Hydrolasen, Kollagenase, Elastase und Plasminogenaktivator [57]) und eine verstärkte bakterizide Wirkung. Des Weiteren können aktivierte oder stimulierte Makrophagen spezifisch und unspezifisch Tumorzellen zerstören [58] und sind auch als wichtige Zellen an der Abwehr viraler Erreger maßgeblich beteiligt. Aktiviert werden die Makrophagen auch durch die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide (LPS), wodurch sie zur Expressierung von Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen und proinflammatorischer Moleküle induziert werden. Die LPS-medierte Makrophagenaktivierung erfolgt über das LPS-bindende Protein (LBP) im Serum, das seinerseits die Erkennung von LPS durch das Glykosyphosphatidylinositol-verankerte Zelloberflächenprotein CD14 vermittelt. CD14 kann seinerseits auch Lipoarabinomannane von *Mycobacterium tuberculosis* direkt erkennen und durch dessen Bindung die Sezernierung von Interleukin-8 aus dem Inneren der Makrophagen induzieren.

Der Prozess der Aktivierung mit Hilfe von Lymphokinen zeigt sich in vielfältigen Experimenten als ein sehr komplexes Phänomen und setzt kooperatives (synergistisches) Zusammenspiel für wirkungsvolle Effektorfunktion voraus.  $\text{IFN-}\gamma$  allein versetzt zwar die humanen Makrophagen in die Lage, *Legionella* zu killen, jedoch führt es zu einer Beschleunigung des Wachstums von *Mycobacterium tuberculosis*. Des Weiteren aktiviert  $\text{IFN-}\gamma$  zwar die Wege zur Bildung von Stickstoffoxiden, jedoch nur gemeinsam mit  $\text{TNF-}\alpha$  kommt es erst zur Stickstoffoxid-Freisetzung. Die optimale Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$  aus den Makrophagen bedarf wiederum der Aktivierung durch  $\text{IFN-}\gamma$  und durch mikrobielle Komponenten wie das Endotoxin (LPS), welche in der Lage sind, Zytokine zu induzieren.  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-12 bewirken außerdem synergistisch die Freisetzung von  $\text{IFN-}\gamma$  aus natürlichen Killer-(NK)-Zellen.

Zusätzliche Aktivierung der Makrophagen durch  $\text{IFN-}\gamma$  erfolgt dadurch, dass diese Zellen zur Expressierung eines Enzyms, der so genannten 1-Hydroxylase, induziert werden. Dieses konvertiert seinerseits das inaktiv zirkulierende 25-Hydroxycholecalciferol zu dem aktiven Metaboliten, 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol). Makrophagen besitzen Rezeptoren für dieses Derivat, was ein Beispiel für einen autokrinen feedback-Loop darstellt. Gemeint damit ist die assoziierte Aktivierung von Makrophagen und die

Reduzierung der  $T_H1$ -Aktivität. Durch die Aktivierung der Makrophagen kommt es neben den obenerwähnten Effekten auch zur vermehrten Expression von MHC Klasse I und II Molekülen, von Fc-Rezeptoren und co-stimulatorischen Molekülen, wie B7-1 und B7-2, CD11a/b/c und ICAM-1. In diesem Zusammenhang existieren andere Faktoren, welche aber mit einer desaktivierenden Wirkung auf die Makrophagen einhergehen. Dazu zählen vor allem das IL-4, vermutlich auch das Prostaglandin E, und das aus dem Überstand von Tumor-Zellen neu isolierte Molekül, Makrophagen desaktivierender Faktor (MDP), sowie das Calcitonin Gen Related Peptid (CGRP) und das Zytokin, Transforming growth factor (TGF) $_{\beta}$ . Auch das NO kann mit der Entstehung von ROS-Produkten interferieren, die IL-1-Produktion durch die Makrophagen inhibieren und damit die T-Zellproliferation herabregulieren.

## 2.2 Lektine als rekognitive Strukturelemente im Targetingkontext

Die Bezeichnung Lektin (legere = auswählen) wurde erstmals 1954 vom Amerikaner W. C. Boy vorgeschlagen. Er bezeichnete damit alle Kohlenhydrat-bindenden Proteine endogener (tierische Lektine) als auch exogener (pflanzliche Lektine) Herkunft, die selbst keine Antikörper sind und die keine enzymatische Aktivität aufweisen. Diese spezifischen Kohlenhydrat-Rezeptoren kommen auch in Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen, sowie in Invertebraten und Vertebraten vor. Der gemeinsame Nenner dieser komplexen Multidomänproteine ist trotz unterschiedlicher Funktionen deren spezifische Affinität zu bestimmten Zuckerstrukturen. Ihre Bindung erfolgt zumeist an terminale oder interne Seiten von komplex an membranständigen Proteinen, Peptiden oder Lipiden N- oder O-glykosidisch gebundenen Glykokonjugaten.

Nach dem heutigen Stand der Forschung spielen Lektine vor allem bei den Interaktionen zwischen Zellen und ihrer Umgebung, insbesondere während des Wachstums und der Differenzierung, Zellerkennung und Adhäsionsvorgängen (gerade bei der Migration) eine große Rolle. Manche Lektine stimulieren bestimmte, meist ausdifferenzierte Zellen zu spezifischen physiologischen Reaktionen. Concanavalin A bewirkt insulinähnliche Effekte bei Fettgewebszellen. Lektine sind aber auch bei der Signaltransduktion durch Membranen, bei Proliferations- und Induktionsvorgängen, in der Immunabwehr und bei Apoptose maßgeblich beteiligt. Diese Mannigfaltigkeit in den Wirkungen der Lektine auf Säugetierzellen sind Ursache dafür, dass sie umfangreiche Anwendungen bei der experimentellen Erforschung der Signalwandlung in biologischen Membranen und deren Bedeutung für die Prozesse der Wachstumskontrolle, der Zellteilung, der

Zelldifferenzierung und der Morphogenese sowie der Embryonalentwicklung, der Zell-Zell-Wechselwirkungen, der histochemischen Diagnostik und der Strukturänderungen auf Zelloberflächen sowie des Drug targeting an humanen lektinaufweisenden Zellen wie Makrophagen und Hepatozyten gefunden haben.

### 2.2.1 Pflanzen-Lektine

Schon vor etwa 100 Jahren kannte man die Pflanzenlektine und nannte sie ursprünglich Phytohämagglutinine wegen ihrer Fähigkeit, rote Blutkörperchen (Erythrozyten) zusammenzuklumpen und sie zu agglutinieren [59]. Auf diese Spur kam man durch die außergewöhnliche Giftigkeit von Rizinussamen, deren wässriger Extrakt das von seinem Entdecker Hermann Stillmark (1888) als Ricin bezeichnete toxische Prinzip enthält [60]. Später stellte sich heraus, dass das Protein Ricin nicht mit dem agglutinierenden, kohlenhydratbindenden Protein identisch, sondern mit diesem assoziiert ist und auch große strukturelle Ähnlichkeit mit ihm hat. Im Laufe der Jahrzehnte fand man bei fast allen Pflanzenfamilien Agglutinine, besonders häufig aber bei Leguminosen. Die Hauptquelle sind dabei die Pflanzensamen mit zum Teil sehr hohen Konzentrationen an einem spezifischen Lektin. Die Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) enthält in ihren Samen bis zu 3 % des Gesamtgewichtes das Agglutinin Concanavalin A (Con A). Dieses am meisten untersuchte Lektin, welches in allen Teilgebieten der medizinischen und naturwissenschaftlichen Disziplinen Anwendung gefunden hat, wurde bereits 1919 von Sumner kristallisiert und gemeinsam mit Howell 1936 publiziert [61]. Über die molekulare Struktur von Con A wurde in den siebziger Jahren [62 - 66] berichtet. Es besteht aus vier identischen Untereinheiten von 237 Aminosäuren-Resten mit einem Molekulargewicht von je 26.000 und keinerlei kovalent gebundenen Kohlenhydraten oder prosthetischen Gruppen. Olson et al. [67] und Edmondson et al. [68] berichteten, dass es keine Zystinreste enthält. Nach McKenzie et al. [69] existiert ConA bei pH 4.5 - 5.6 ( $I = 0.1$ ) als ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 53,000. Über pH 7 ist Con A hauptsächlich Tetramer. Optimale Aktivität erlangt es in der Nähe von pH 7. Con A bindet zwei Metallionen pro Monomer ein Übergangsmetall meist  $Mn^{2+}$  an S1 and  $Ca^{2+}$  an S2. Beide Kationen müssen für die Saccharid-Bindung anwesend sein [70 - 77]. Die S1 des Übergangsmetalls wurde durch Sherry et al. [78] bekannt.

Con A reagiert mit nichtreduzierenden Zucker-Derivaten der D-Glucose und D-Mannose. Basierend auf einfachen Zucker-Inhibierungsstudien mit  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid berichtete Goldstein et al. [75], dass unmodifizierte OH-Gruppen an C-3, C-4 and C-6 für



die Bindung sehr essentiell sind. Durch diese spezifische Bindung vermag Con A auch kohlenhydratenthaltende Zell-Rezeptoren zu erkennen. Es agglutiniert rote Blutzellen und komplexiert mit Blutgruppen-Substanzen [79], Immunoglobulinglykopeptiden [80] und carcinoembryonalen Antigenen [81 - 83]. Es ist auch beobachtet worden, dass dieses Agglutinin eine Interaktion mit humanem Plasma low density lipoprotein eingeht [84].

Neben den oben erwähnten Funktionen dieses weltweit eingesetzten Lektins, bindet ConA auch an Lymphozyten und löst bei ihnen Mitose aus; es wirkt demzufolge mitogen [85 - 87], aggregiert embryonale Zellen [88] und maligne Zellen [89 - 93] bevorzugt zu normalen Zellen. Darüber hinaus vermag Con A die Endoreduplikation in Säuger-Zellen zu induzieren [94]. Seine Reaktion mit Mikroorganismen wie *E. coli* [95], *Dictyostelium discoideum* [96] und *B. subtilis* [97] sind auch schon seit längerer Zeit bekannt. Brunson und Watson [98] berichteten auch von einer Aktivität gegenüber den Lipopolysacchariden.

Neben diesem Schwertbohnen-Lektin gehören auch die Lektine aus Weizenkeimlingen und Sojabohnen, die im Unterschied zum Con A selbst Glykoproteine sind, zu den bekanntesten Lektinen. Das Sojabohnenlektin bindet an N-Acetylgalactosamin und das Weizenkeimlektin an N-Acetyl-glucosaminhaltige Grundkonjugate. Aufgrund seiner hochrangigen Bedeutung für Forschungszwecke an Säugetierzellen wurde hierbei ausführlich über das Con A berichtet. Die übrigen Pflanzen-Lektine, deren Vorkommen, ihre molekulare Struktur und Spezifität sind in der Tabelle (Tab. 2.1) nur in einer kurzen Zusammenfassung dargestellt. Die meisten Lektine pflanzlicher Herkunft agglutinieren Erythrozyten aller Blutgruppen. Manche von Ihnen weisen jedoch eine bemerkenswert hohe Spezifität gegen bestimmte Blutgruppen des ABO-Systems auf. Daher lassen sich bestimmte Lektine auch zur Blutgruppenbestimmung verwenden. Con A vermag auch synthetische Glykolipide in Liposomen zu aggregieren [99].

Immobilisierte spezifische Lektine dienen neben der Funktion als Targetmoleküle für Makrophagen und Hepatozyten schon seit längerer Zeit auch als Aufreinigungsproteine ([100 - 102] und zur Eliminierung von Kontaminationen [103] in der Chromatographie.

Tab. 1: Biochemische Eigenschaften wichtiger pflanzlicher Lektine (nach J.C. Brown und R.C. Hunt, 1978). M<sub>r</sub>: Molekulargewicht, UE: Untereinheiten.

Herkunft (Pflanzenart)	Lektin (Bezeichnung)	M <sub>r</sub> in Dalton	UE	Glyko- protein	Liganden
Arachis hypogaea (Erdnuss)	Peanut Agglutinin (PNA)	110 000	4	-	β -D-Galactose
Canavalia ensiformis (Schwertbohne)	Concanavalin A (Con A)	102 000	4	-	α-D-Glucose, α-D-Mannose
Dolichus biflorus	Dolichus biflorus-Agglutinin (DBA)	111 000	2 + 2	+	N-Acetyl-α-D- Galactosamin
Glycine max (Sojabohne)	Sojabohnen-Agglutinin (SBA)	110 000	4	+	N-Acetyl-α-D- Galactosamin, β- D-Galactose
Lens culinaris (Linse)	Lens culinaris-Agglutinin	48 000	2	+	α-D-Glucose, α- D-Mannose
Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)	Phaseolus-Agglutinin I (PHA-i)	118 000	4	+	N-Acetyl-α-D- Galactosamin
Pisum sativum (Erbse)	Pealectin-I (PSA)	49 000	2 + 2	+	α-D-Glucose, α-D-Mannose
Ricinus communis (Rizinus)	Ricinus communis Agglutinin RCA 120 RCA 60	120 000 60 000	2 + 2 1 + 1	+	β-D-Galactose, N-Acetyl-α-D- Galactosamin
Triticum vulgare (Weizen)	Wheat germ Agglutinin (WGA)	34 000	2		N-Acetyl-β(1,4)- D-Glucosamin, Chitin, Chitotriose
Ulex europaeus (Stechginster)	Ulex europaeus- Agglutinin (UEA)	170 000			α-L-Fucose

### 2.2.2 Makrophagen-Lektine

Die diverse Rolle der Makrophagen in Verteidigungsstrategien (Phagozytose und intrazelluläre Killing-Mechanismen) und bei der Gewebehomöostase wird im besonderem Maße durch die Variabilität der auf deren Oberflächen existierenden Lektine reflektiert. Allein gegen mit Galactose terminierten Oligosaccharidstrukturen der Makrophagen existieren drei spezifische Rezeptoren: Kupffer Zellrezeptor, auch bekannt als der hepatische Fucose-Rezeptor ([104]; und dort zitierte Referenzen), der Galactose Partikel-

Rezeptor sowie das Galectin-3. Das Kalzium-abhängige Lektin der Kupffer-Stern-Zellen, spezialisierte Makrophagen der Leber, bindet mit hoher Affinität an terminale Gal- und GalNAc-Reste und mit geringer Affinität an Fucose-Reste. Seine Affinität gegenüber partikulären Liganden ist viel größer als die zu löslichen; 3000fach höher für die Bindung an 15-nm-Partikel verglichen zu 5-nm-Partikel [105], was auf eine enge Beziehung zur rezeptorvermittelten Aufnahme von Mikroben hinweist. Die physiologische Funktion dieses Lektins besteht in der Clearance von apoptotischen Zellen. Das erstmals auf peritonealen Makrophagen identifizierte [106] und später auf Tumorzellen sowie einigen reifen Makrophagen entdeckte 42-kDa Galactose-Lektin bindet jedoch mit gleicher Affinität an Gal- und GalNAc-terminierte Oligo-saccharide.

Auf eine wesentliche Rolle dieses Rezeptors bei der Aufnahme von Mikroben wie *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes durch peritoneale Makrophagen kann aus der Verbesserung der Aufnahmekapazität durch Desialylierung der Parasiten und aus der Inhibierungsfähigkeit durch den Einsatz von Gal und GalNAc-bindenden Lektinen sowie galactosylierten Oligosaccharid-Liganden geschlossen werden [107]. Interessanterweise bindet aber das große Homologie zu diesem Lektin aufweisende Ratten hepatische Lektin Asialoglykoprotein mit hoher Affinität an terminale GalNAc-Reste und mit schwacher Affinität an Galactose-Reste. Dieses Lektin fungiert u.a. auch als Dockingrezeptor bei unterschiedlichen Viren, einschließlich Sendai Virus [108]. Darüber hinaus vermag dieses Lektin durch seine Interaktion mit einem terminalen Gal ( $\beta$ -1 - 4) GlcNAc auf Lipopolysacchariden auch *Neisseria gonorrhoeae* zu internalisieren [109].

Das Makrophagen Galectin-3 ist ein 30-kDa Galactose-spezifischer calciumunabhängiger Rezeptor vom S-typ, der auch als Mac-2, CBP-35, und IgE-BP bekannt ist [110]. Durch seine Interaktion mit verschiedenen galactosylierten Oligosacchariden spielt es eine besondere Rolle in der Zellrekrutierung und Aktivierung. In diesem Zusammenhang gehören zu den Lektinen auch die  $\beta$ -Glucan Rezeptoren. Die  $\beta$ -Glucane (langkettige  $\beta$ -gebundene Glucose-Oligosaccharide) entfalten zahlreiche Effekte, wie die Aktivierung von Makrophagen und von natürlichen Killer- und neutrophilen Zellen in vitro sowie die Bildung von Resistenz gegen bestimmte Infektionen und Tumoren in vivo [111]. Der bestcharakterisierte Rezeptor der  $\beta$ -Glucane ist das Integrin CD11b/CD18, bekannt unter dem Namen Komplement Rezeptor 3 (CR3), der neben seinen lektinbindenden Eigenschaften auch die Phagozytose durch die Bindung an die Komplement-Komponente iC3b auf der Zelloberfläche einleitet [112]. Darüber hinaus bindet dieser Rezeptor neben den Glucanen auch die hauptsächlich aus Mannoseeinheiten bestehenden Zymosan-

Polysacchride der Hefe Zellen, was mit Hilfe von Monosacchariden wie  $\beta$ -Methylmannosid, N-Acetyl-D-Glucosamin und  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Methylglycosid blockiert werden kann [113].

Spezifische Bindungsaktivitäten gegen das chemisch definierte, lösliche  $\beta$ -(1,3)-Glucan wurden auch auf der monozytären Zelllinie U937 und der Makrophagen-Zelllinie J774A.1 [114] detektiert. Mikroskopische und kinetische Analysen der Bindungseigenschaften dieser Substanz machen den von Czop und Kay [115] bei diesen Zelllinien identifizierten  $\beta$ -Glucanrezeptor für die Bindung verantwortlich. Bindungsstellen für das lösliche  $\beta$ -(1,3)-Glucan sind auch bei humanen neutrophilen Granulozyten gefunden worden. Lactosylceramid als Hauptglykosphingolipid dieses Zelltypus, wurde als das spezifische Bindungsglied dieser Substanzklasse identifiziert [116].

Im zellbiologischen und immunologischen Kontext wurde in den letzten Jahren vor allem dem Mannoserezeptor auf Makrophagen besondere Aufmerksamkeit beigemessen. Dieser der C-Typ-Lektin-Familie angehörende Mannose/Fucose N-Acetylglucosamin-Rezeptor wird auf Alveolar-Milz- und Peritoneal-Makrophagen exprimiert [117 - 119]. Er ist ein 175 kDa großes transmembranes Protein vom Typ I [120]. Er besteht aus einer N-terminalen Cystein-reichen Domäne, einer Fibronectin-Domäne vom Typ II, acht Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen, einer transmembranären Domäne und einem C-terminalen zytoplasmatischen Teil [121]. Seine hohe Affinität zu Polymannose Liganden und seine schwache Affinität zu Monosacchariden [122] liegt vermutlich in der Anzahl seiner CRD's [123 - 124]. Er vermittelt die Endozytose von Glykoproteinen mit hochmannosylierten Oligosacchariden, wie lysosomale Enzyme [125] und Gewebs-Plasminogen-Aktivator [126] sowie die Phagozytose von Pathogenen mit Polymannose-Strukturen auf deren Membranoberflächen [127]. Der Bindung an einen Liganden folgt die intrazelluläre Internalisierung des gebildeten Ligand-Rezeptor-Komplexes. Im sauren Milieu von Endosomen dissoziiert der Ligand aus dem Komplex und wird in den Lysosomen degradiert, während der Rezeptor zu der ursprünglichen Lage auf der Zellmembran zurückkehrt [128 - 129].

Andere Zelltypen wie sinusoidale endotheliale Zellen der Leber und der Milz [130 - 131], Spermazellen [132], Lymphozyten und Langerhans-Zellen [133] binden zwar Mannoserezeptor spezifische Liganden, jedoch exprimieren diese Zellen auch andere Mannose-bindende Proteine oder mit dem Mannoserezeptor verwandte Proteine [134 - 138]. Das Spektrum der Ligandenspezifität für den Mannoserezeptor erstreckt sich von

Enzymen über Glykoproteinen bis zu Organismen und sogar ganzen Zellen, so dass er als Erkennungsmolekül im Konzept des Drug Targeting eine besondere Rolle spielt.

Tab. 2: Spezifische Liganden für den Mannoserezeptor der Makrophagen

Enzyme	Glykoproteine	Organismen	Sonstige Liganden
Gewebetyp Plasminogen-Aktivator (t-PA) <sup>139</sup>	B-zellmodifiziertes $\alpha_2$ -Makroglobulin <sup>154</sup>	Klebsella pneumoniae <sup>157</sup>	Rizin <sup>161</sup>
$\beta$ -Glucuronidase <sup>140,141</sup>	C-terminales Propeptid Typ I Prokollagen <sup>155</sup>	Escherichia coli <sup>157</sup>	Bienengift Phospholipase A <sup>162</sup>
N-Acetyl- $\beta$ -Glucuronidase <sup>142</sup>	Uteroferrin <sup>156</sup>	Mycobacterium avium <sup>157</sup>	Photorezeptor äußerer Segmente <sup>163</sup>
$\alpha$ -Mannosidase <sup>142</sup>		Mycobacterium tuberculosis <sup>157,158</sup>	Apoptotische Lymphozyten/ Apoptotische Körperchen <sup>164,165</sup>
$\beta$ -Galactosidase <sup>143,144</sup>		Pseudomonas aeruginosa <sup>157</sup>	
Glykosylasparaginase <sup>145</sup>		Aspergillus fumigatus <sup>157</sup>	
Hyaluronidase <sup>146</sup>		Candida albicans <sup>157</sup>	
Arylsulfatase A <sup>144</sup>		Candida crusei <sup>157</sup>	
Speichel Amylase <sup>147</sup>		Cryptococcus neoformans <sup>157</sup>	
Myeloperoxidase <sup>148</sup>		Saccharomyces cerevisiae <sup>159</sup>	
Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase <sup>149</sup>		Pneumozytis carinii <sup>157</sup>	
Acetylcholinesterase <sup>150</sup>		Trypanosoma cruzi amastigotes <sup>160</sup>	
Gewebekallikrein <sup>151</sup>		Leishmania donovani <sup>157</sup>	
Renin (Subtyp B) <sup>152,153</sup>		HIV-I (gp 120) <sup>166</sup>	

### 2.2.3 Erkennungsvielfalt der Säugetier-Lektine und der Cluster-Glykosid-Effekt

Nach der ersten Entdeckung des hepatischen Endozytose-einleitenden Lektins, des Asialoglycoproteinrezeptors (ASGP-R), durch Ashwell und Morell vor etwa 30 Jahren erhöhte sich die Anzahl und die Typen von tierischen Lektinen dramatisch. Die Haupt-Säugetier-Lektine wurden im Laufe der Zeit in C-Typ-, Galektine (S-Typ) und Siglecs-( I-Typ ) [167], R-Typ, P-Typ, und L-Typ-Lektine sowie Calnexin und Calretikulin eingeteilt. Obwohl die Klassifizierung der Lektine einst auf der Basis deren Bindungscharakteristika beruhte, erfolgt gegenwärtig deren Einteilung nach der in jeder Lektingruppe vorhandenen Polypeptidkette. Diese für die Bindung von Kohlenhydrat-Liganden erforderliche minimale Polypeptid-Struktur (ca. 135 Aminosäuren für C-Typ-Lektine und ca. 130 Aminosäuren für Galektine) wird als so genannte Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) bezeichnet [168]. In der Natur kann die CRD sowohl individuell als auch repetitiv in Tandem-Form mit anderen CRD sowie mit anderen Protein-Domänen, wie Kollagen-Domäne, transmembranärer Domäne sowie der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Domäne existieren. Die globulären CRD sind auch als C-Typ-Lektin-ähnliche Domänen bekannt [169]. Die C-Typ CRD der Lektine benötigen für ihre Aktivität  $Ca^{2+}$ - Ionen, daher stammt auch deren Name C-Typ-Lektine ab. C-Typ CRD-Lektine werden in fünf Gruppen [170] unterteilt:

- Gruppe I repräsentiert die Adhäsionsmoleküle ( wie Selektine )
- Gruppe II repräsentiert die endozytotischen Rezeptoren mit einer Typ II-transmembranen Orientierung ( wie das Asialoglykoprotein )
- Gruppe III repräsentiert die endozytotischen Rezeptoren mit einer Typ 1-Transmembranen Orientierung ( wie der Makrophagen-Mannoserezeptor )
- Gruppe IV repräsentiert die in der humoralen Immunität involvierten löslichen Lektine (wie das mannosebindende Protein aus dem Serum , MBP)
- Gruppe V repräsentiert auch die löslichen Lektine, jedoch nur die mit Proteoglykan-Funktionen (wie Aggrecan).

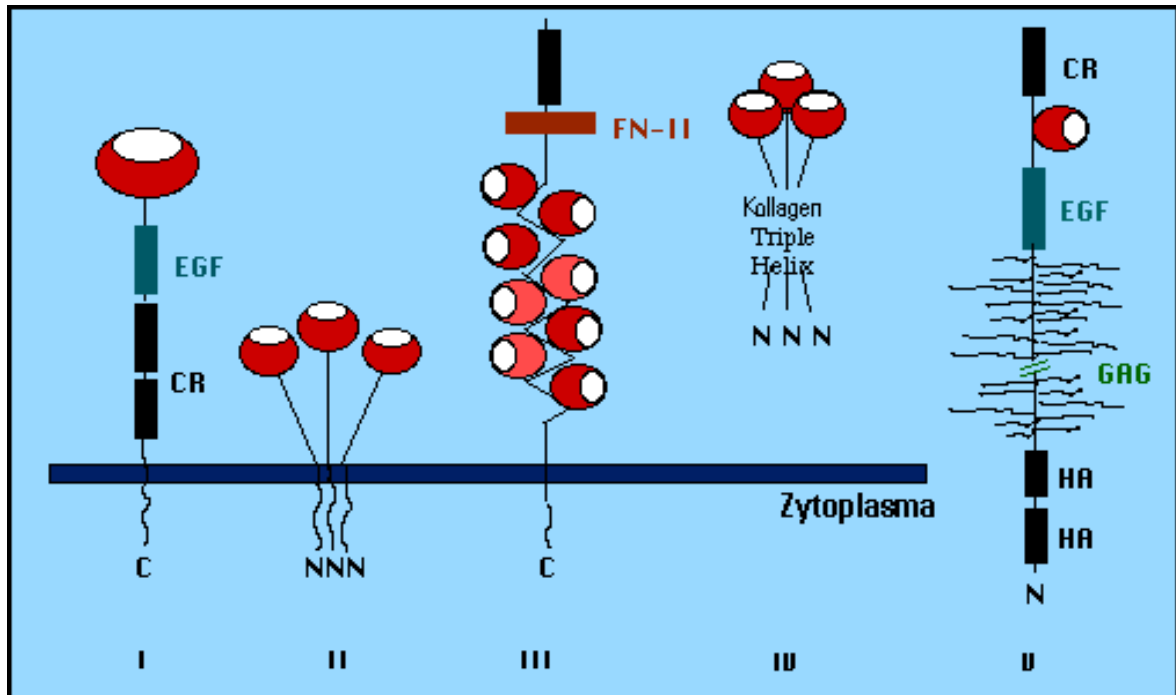


Abb. 3: Substrukturen immunologisch bedeutsamer Lektine vom C-Typ nach Drickamer (1993). Die ausgehöhlten roten Sphären sind carbohydrate-recognition domains (CRDs). Weitere Domänen sind epidermal growth factor-like domain (EGF), consensus-repeat sequences (CR), fibronectin typ II repeats (FN-II), glycosaminoglycan attachment sites (GAG) und hyaluronic acid-binding domains (HA).

Äquatorial platzierte C3- und C4-OH-Gruppen der Hexosen (Mannose, N-Acetylglucosamin, und Glucose) werden für die Bindung der C-Typ-Lektine verantwortlich gemacht [171]. Im Gegensatz zu den Galektinen weist die C-Typ-CRD der Endozytose-einleitenden Rezeptoren interessanterweise grundlegend unterschiedliche Monosaccharid-Spezifitäten auf. Säugetier-hepatische Lektine sind spezifisch gegen Gal/GalNAc [172], das hepatische Lektin vom Huhn ist spezifisch gegen GlcNAc [173] und das Alligator-hepatische Lektin ist spezifisch für Man/L-Fucose [174]. Die zu erkennende Zuckerstruktur bei den Galektinen ist dagegen ein strukturell gleiches Disaccharid und ist entweder Lactose oder N-Acetyl-Lactosamin. Charakteristisch für die meisten C-Typ-Lektine ist weiterhin, neben dem breiten Zuckerspektrum auch deren Tendenz zu multimeren Untereinheiten zu assoziieren bzw. ihre CRD in repetitiven Tandem-Formen zu konstituieren. Die Detergenz-solubilisierete und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte Säugetier-hepatische Lektine liegen als Hexamere mit scheinbar zwei Bindungsstellen pro Untereinheit vor [175]. Assoziieren sich diese Hexamere aber weiter zu gruppenbildenden Aggregaten (Oligomere), so wird das Ausmaß der exponentiellen Verstärkung der Affinität nochmals weiter vergrößert [176].

Kollagendomänen-gekoppelte C-Typ-Lektine (Kollektine), zu denen neben dem Surfactant Protein A aus der Lunge (SP-A) auch das Mannosebindende Protein (MBP) aus der extrazellulären Flüssigkeit angehört, weisen jedoch eine geringere Assoziation ihrer CRD auf als die Typ II transmembranären hepatischen Lektine auf. Die trimeren Assoziate von CRD des in der Leber synthetisierten MBP-Monomers assoziieren sich im nativen Serum weiter und bilden aber nur ein hexamerer Gebilde, das wie ein Blumenstrauß aussieht, als höchste Anordnung der trimeren CRD's. Trotz unterschiedlicher Topologie der C-Typ-Lektine hinsichtlich der Clusterung ihrer CRD's ist ihnen allen gemeinsam, dass sie schwache Bindungsaffinität zu den individuellen Monosaccharid-Einheiten haben. Physikochemische Studien und Inhibitionsassays zeigten, dass Lektine eine Affinität zu ihren Liganden mit einem  $K_d$ -Wert von 0.1 mM - 1.0 mM aufweisen [177]. Gemeinsam ist allen Tierlektinen weiterhin auch, dass sie Cluster-Glykoside viel stärker binden können als es der arithmetischen Summe der einzelnen Glykosylreste im Liganden entsprechen würde. So zeigen mit Zucker derivatisierte Neoglykoproteine [178] aus Rinderserumalbumin einen logarithmischen Anstieg der Bindungsaffinität, wenn sich die Zuckeranteile am Protein linear erhöhen [179]. Diese Strategie führte in den letzten Jahren zu der generellen Definition des Cluster-Glykosid-Effekts als eine Affinitätserhöhung der Zuckerdeterminanten in einem multivalenten Ligand, die weit über das zu erwartende Maß hinausgeht [180]. Obwohl ähnliche Verhältnisse auch bei einigen Pflanzenlektinen zu beobachten sind, zeigt sich der Cluster Effekt dort nicht so dramatisch wie bei den Tierlektinen [181].

In natürlichen Glykokonjugaten trifft man die Cluster Glykoside häufig in der Form von hochverzweigten Oligosaccharid-Strukturen an [182], die wahrscheinlich u.a. auch zur Stabilität und Unverletzlichkeit der Zellmembranen mechanisch beanspruchter Zellen dienen und gleichzeitig mitunter den hydrophilen Kontakt mit dem wässrigen Medium verbessern sollen. Als hydrophile Substanzen müssen sie kovalent mit lipophilen Komponenten der Membran verknüpft sein, also mit Lipiden oder auch mit Proteinen, deren lipophile Segmente in die Membran eintauchen oder wie im Falle mancher Glykoproteine bis zur Zytoplasma-Seite durchdringen und damit Teil der Membranstruktur sind.

Die distalen Abschnitte der Kohlenhydratkomponenten verschiedener Glykokonjugate sind sehr variabel, da die biologische Spezifität eine Strukturverschiedenheit zur Grundlage haben muss. Für Forschungszwecke lassen sich jedoch Cluster-Glykoside einfacher Art mit definierter Zusammensetzung, variabler Spacerlänge und gewünschter



Anzahl der Zuckerstrukturen sowie optimaler Distanz der Zuckerreste untereinander vollständig präparativ herstellen. Einige dieser Glykoside haben sich seit vielen Jahren als hochpotente Liganden für Tierlektine erwiesen [183].

## **2.3 Liposomen als moderne, kolloidale Arzneistoffträgersysteme**

### **2.3.1 Generelle Aspekte der Anwendung und Herstellung**

Ein systemisch applizierter Arzneistoff verteilt sich im allgemeinen entsprechend seines Verteilungskoeffizienten in verschiedenen Kompartimenten des Organismus. Wünschenswert wäre jedoch die Wirkung eines idealen Pharmakons nur gegen die Krankheit und ihre Ursachen an einem bestimmten, begrenzten Bereich oder einem Organ zu entfalten, ohne dabei die gesunden Gewebe, Zellen, oder Organe zu schädigen (zielgerichtetes Lenken von Arzneistoffen). Zur Annäherung an dieses Ideal und damit zur Verringerung der Gesamtbelastung des Organismus durch den Wirkstoff bieten sich seit geraumerer Zeiten kolloidale Arzneistoffträgersysteme als aussichtsreichste Kandidaten moderner Darreichungsformen an. Dadurch lässt sich insbesondere bei parenteraler Applikation zum einen eine kontrollierte Freigabe des Arzneistoffes aus dem Träger über einen längeren Zeitraum (Controlled Drug Delivery) zum anderen eine gezielte Anreicherung des Arzneistoffes an einen Wirkort (Drug Targeting) erreichen. Insgesamt lassen sich drei verschiedene Kategorien eines Drug-Targeting definieren:

- Organ oder Kompartimentspezifität, wie z.B. Knochenmark, Leber und Blut;
- Zellspezifität im Organ, wie z.B. Hepatozyten, Makrophagen und Lymphozyten;
- Zellorganellen, Zellkompartimente wie z. B. DNA im Zellkern.

Häufigen Gebrauch als moderne Träger von Arzneimitteln unter den Carriern finden liposomale Formulierungen neben deren Anwendung als Modellmembranen in verschiedenen biologischen Disziplinen.

Liposomen sind geschlossene, vesikuläre Doppelschichtstrukturen, in denen konzentrische Lipiddoppelschichten wässrige Kompartimente voneinander abgrenzen. Liposomen werden gebildet, wenn man Phospholipide und andere amphiphile Verbindungen mit etwa gleichem Durchmesser von hydrophober und hydrophiler Komponente hydratisiert. Die thermodynamische Triebkraft dieser spontanen Aggregatbildung sind hydrophobe Wechselwirkungen der langen Kohlenwasserstoffketten untereinander und Wechselwirkungen der hydrophilen Kopfgruppe mit

Wasser. Das Gleichgewicht dieser gegensätzlichen Wechselwirkungen führte zum Konzept des optimalen Oberflächenareals bei minimaler freier Energie pro Lipidmolekül [184]. Theorien der Vesikelbildung verbinden freie Wechselwirkungsenergie, molekulare Geometrie und Entropie [185-189]. In Abhängigkeit des Größenverhältnisses von Kopfgruppe zu hydrophoben Areal treten beim Kontakt mit wässrigen Systemen auch andere geordnete flüssig-kristalline Aggregate auf, wie Mizellen und hexagonale  $H_{II}$  – Strukturen.

Das besondere Interesse an Liposomen erklärt sich aus Eigenschaften, die in ihrer Summe diese Vesikel von anderen Carriern wie Nanopartikeln, synthetischen und biologischen Polymeren bzw. Mikrosphären, abheben. Liposomen sind wenig oder gar nicht immunogen. Sie sind biokompatibel und werden aus dem Organismus problemlos eliminiert. Durch wässrige Verkapselung und lipophile Anlagerung bieten Liposomen als universell variierbare, metabolisch abbaubare und daher relativ untoxische Vehikel für eine Reihe von Substanzen Vorteile gegenüber der freien Substanz; geringere Toxizität für Cis-Platin, L-Asparaginase und Doxorubicin, Überwindung einer transportbedingten Resistenz bei Methotrexat, eine protrahierte Freigabe in den Blutstrom und Schutz vor metabolischem Abbau und damit längere Kontaktmöglichkeiten zur Zielzelle (Zytarabin) sowie Veränderung pharmakokinetischer Parameter wie Clearanceraten und Gewebsverteilung und die Verminderung der äquieffektiven Dosis. All diese Eigenschaften haben Liposomen zu einem bevorzugten Forschungsgegenstand in der Biologie und Medizin werden lassen. Nachteile der Liposomen besteht in deren Erkennung durch Zellen des RES und die schnelle Endozytose.

Zur Bezeichnung der verschiedenen Liposomentypen haben sich die informellen Empfehlungen eines Meetings „Liposomes and their uses in biology and medicine“ weitgehend durchgesetzt [190]. Danach werden multischichtige Liposomen als MLV (multilamellar vesicles), kleine, einschichtige Liposomen als SUV (small unilamellar vesicles) und große, einschichtige Liposomen als LUV (large unilamellar vesicles) bezeichnet. Die thermodynamisch stabilste Zustandsform des Systems Phospholipid/Wasser bzw. Puffer sind die MLV-Liposomen. Sie bilden sich daher spontan, wenn Phospholipide oder andere geeignete Amphiphile nach weitgehender Entfernung des eingesetzten organischen Lösungsmittels oberhalb deren Übergangstemperatur  $T_m$  hydratisiert werden. Ein Nachteil der MLV ist die unterschiedliche Partikelgröße der Vesikel, sie liegt zwischen 0,4 – 3,5  $\mu\text{m}$ . Durch Verwendung geladener Lipide bzw. kurze Beschallung oder Anwendung der French Press-Methode bei niedrigen Drücken [191]

können MLV kleineren Durchmessers und geringerer Größenunterschiede präpariert werden. Wegen ihrer Größe und der schonenden Art ihrer Darstellung eignen sich MLV besonders für den Einschluss von Enzymen, Proteinen, Membranproteinen und Nukleinsäuren. Die Desintegration von MLV mittels Ultraschall ( $\sim 20$  kHz) repräsentiert die vorherrschende Methode zur Gewinnung von kleinen, einschichtigen Liposomen. Der Durchmesser der so gewonnenen Vesikel liegt bei 25 - 60 nm. Das Einschlussvolumen von wässriger Phase in SUV ist mit 0,2 – 1,5 l/Mol Lipid sehr gering. Dementsprechend klein ist die Einschlusskapazität für ausschließlich wasserlösliche Substanzen. Wegen ihrer im Verhältnis zu anderen Liposomentypen längeren Halbwertzeiten *in vivo* hat man trotz ihrer geringen Einschlusskapazität eine große Zahl biologisch aktiver Substanzen in SUV eingeschlossen. Große, einschichtige Liposomen (LUV) enger Größenverteilung werden durch die Extrusionsmethode durch Membranen, die Poren bekannten Querschnitts enthalten, präpariert. Wegen ihrer Größe (0,2 - 1,0  $\mu\text{m}$ ) lassen sich in LUV auch sehr große Mengen von Makromolekülen (RNA, Antikörpern) einschließen.

Generelle Vesikeleigenschaften, wie Größe, Ladung, Fusionsbereitschaft und Stabilität können durch die Auswahl unterschiedlicher Lipide stark variiert werden, da diese verschiedene polymorphe Phasen bilden. Die in derartigen polymorphen Phasen vorliegende Phospholipide gehen bei einer Temperaturerhöhung aus dem kristallinen Zustand (Gelzustand, fester Zustand) nicht direkt in die flüssige Phase über, die mit einer Zerstörung der Aggregation verbunden wäre, sondern zunächst in einen flüssigkristallinen Zustand (fluiden Zustand). Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  (transition temperature) ist eine Funktion der Länge der Kohlenwasserstoffkette, des Grades der Ungesättigtheit der Fettsäure, der Natur der Kopfgruppe und des Wassergehaltes des Systems [192 - 194]. Änderungen in den Phasenübergangstemperaturen  $T_m$  von den in Wasser schwerlöslichen amphiphilen Verbindungen, insbesondere wenn sich diese im Membranverband befinden, werden weiterhin auch durch Zugabe von Cholesterol erreicht. Dieses Sterol-Derivat reguliert den Phasenzustand von Phospholipiden und hat dadurch Rückwirkungen auf die Permeabilität von Phospholipiddoppelschichten. Bei Temperaturen unterhalb  $T_m$  hat der Cholesterolzusatz einen verflüssigenden Effekt auf die Phospholipide bei gleichzeitiger Erhöhung der passiven Permeabilität, sein Zusatz bei Temperaturen oberhalb  $T_m$  wirkt es verfestigend bei reduzierter Permeabilität der Membran [195]. Die Ursachen der Wirkung von Cholesterol als Fluiditätspuffer sind noch nicht vollständig erkannt, als gesichert gilt eine anisotrope Einlagerung des Cholesterols in die Phospholipide, parallel zu den Fettsäureketten, wobei das Sterol die freie Beweglichkeit der Fettsäureketten reduziert und seine  $3\beta$ -OH-Gruppe sich in der Nähe des

Glycerolgrundgerüsten der Phospholipide befindet [196]. Zusatz äquimolarer Mengen Cholesterol ermöglicht sogar Vesikelbildung aus Lysophosphatiden, die sonst durch ihre fusogene Wirkung die Ausbildung geordneter lamellarer Strukturen stören [197].

### 2.3.2 Probleme des passiven Targeting

Ein großes Problem bei der parenteralen Applikationsform der Träger (intravenös, intraperitoneal, intramuskulär und subkutan) ist die immunologische Erkennung durch das RES und die schnelle Phagozytose [198 - 202]. Abhängig von der Art der Applikation werden die Partikel mit unterschiedlichen Makrophagenpopulationen konfrontiert. Bei einer intravenösen Gabe werden innerhalb der ersten 5 min bis zu 90 % der applizierten Dosis bei der Leberpassage durch Kupfferzellen aufgenommen und 2 – 5 % von den Makrophagen der Milz eliminiert. Aber auch bei einer intraperitonealen Applikation werden viele Partikel durch die dort ebenfalls vorhandenen Makrophagen eliminiert.

Um intravenös injizierte Arzneistoffe gezielt an Wirkorte außer Leber und Milz zu bringen, muss vermieden werden, dass die kolloidalen Arzneistoffträger von den Zellen des RES erkannt und phagozytiert werden. Wie die Arzneistoffverteilung im Organismus stattfindet, ist abhängig von den Oberflächeneigenschaften der Carrier und deren Wechselwirkungen mit Serumproteinen nach intravenöser Applikation [203]. Das RES, als größter Hindernisfaktor bei der gezielten Wirkstoffanreicherung an einen bestimmten Wirkort (Drug Targeting), kann durch Reduzierung der Partikel-Größe auf weniger als 100 nm, durch Verwendung rigider Phospholipidkomponenten (gesättigte, hydrierte Phosphatidylcholine) im Gemisch mit 30 - 50 mol % Cholesterol [204 - 206] und durch Vorsättigung mit leeren Liposomen [207 - 208] sowie durch den Einbau von polymeren hydrophilen Verbindungen, d.h. nicht opsonisierbaren Oberflächen (Polyethylenglykole, PEG) [209 - 211] umgangen und somit die Verweildauer im Blut erhöht werden. Dies wird bei den sog. Stealth-Liposomen versucht [212].

Sehr kleine Liposomen werden schneller in die Hepatozyten als in die Kupfferzellen der Leber aufgenommen, da sie klein genug sind, durch die Fenestrae der Sinusoide und damit ins Leberparenchym zu gelangen. Sehr große Liposomen (5 – 8 µm) dagegen sind vorwiegend in der Lunge anzutreffen [213]. Dicht gepackte Bilayerschichten mit einem hohen Ordnungsgrad und maximalen Wechselwirkungen innerhalb der Bilayer sind gegenüber hydrophoben, dipolaren und van der Waals-Kräften der Blut- bzw. Serumkomponenten weitaus stabiler als Vesikel mit lockerer Membranstruktur. Der

Einbau von Lipiden mit einer hydrophilen Kopfgruppe bewirkt eine stärkere räumliche Trennung und vergrößert die Abstoßungskräfte zwischen den potentiellen Reaktionspartnern. Dadurch werden Adsorption und Adhäsion bedeutend reduziert. Die PEG-Ketten sind mit Wasser mischbar, sehr flexibel und daher ständig in der Lage, ihre Konformation zu ändern, so dass es dem Immunsystem nicht möglich ist, diese Struktur als Fremdkörper zu erkennen. Alle diese Modifizierungsmöglichkeiten erlauben einen selektiveren Arzneistofftransport zum Wirkort. Damit kann der therapeutische Effekt gesteigert werden, und die Nebenwirkungen lassen sich signifikant erniedrigen. Der Arzneistoff erhält dadurch einen deutlich verbesserten Therapeutischen Index [214].

### **2.3.3 Glykoliposomen als potentielle Vehikel für das Makrophagen-spezifische Drug Targeting**

Bei der Anwendung von Liposomen für medizinische Probleme haben vor allem diejenigen Fragestellungen Erfolgssaussichten, die das natürliche Target (RES bzw. MPS) für therapeutische oder diagnostische Zwecke nutzen. So stellen Liposomen für die Stimulierung von Makrophagen zur maximalen Blut Clearance geeignete Vehikel zum Einschleusen der entsprechenden biological response modifiers (BRM) in diese Zielzellen dar. Diese Zellen zeigen in nichtspezifischen Verteidigungsmechanismen nach entsprechender Aktivierung zytotoxische Eigenschaften gegen Mikroorganismen sowie viral infizierte und Tumor-Zellen [215]. Die Aktivierung von Makrophagen wurde auch als Lösungsansatz für die sonst gegen konventionelle Therapie resistenten metastatischen Tumorzellen [216 - 217] in Betracht gezogen. Zu diesen aktivierenden Immunmodulatoren bzw. BRM gehören vor allem das rekombinante Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [218], das Muramyldipeptid (MDP) [219], und das bakterielle Endotoxin = Lipopolysaccharid [220] sowie der Makrophagenaktivierende Faktor (MAF), und das C-reaktive Protein [221 - 222]. Die Einkapselung derartiger Komponenten in Liposomen soll deren Halbwertszeiten in vivo erhöhen, deren Nebenwirkungen reduzieren und vor allem deren rasches Gelangen zu intrazellulären Kompartimenten der Makrophagen garantieren. Auch als Adjuvanzien zur Immunisierung [223] wurde das spezifische Liposomen-Targeting an Makrophagen vorgeschlagen, da diese Zellen in die humorale Immunantwort, in Prozessierung und Antigenpräsentation eingebunden sind. Ein weiterer Grund des spezifischen Makrophagentargeting besteht in der Behandlung parasitärer (Malaria, Leishmaniasis) oder anderer durch fakultative intrazelluläre Bakterien hervorgerufene Infektionskrankheiten (Brucella, Listeria, Mykobakterien und Salmonellosis), bei denen sich die Krankheitserreger in Strukturen des MPS ansiedeln. Diese Mikroorganismen

(Bakterien, Parasiten und Viren wie HIV) [224] entwickeln Eigenstrategien, mit denen sie das hochmolekulare Arsenal phagozytotischer Kompartimente und sekundärer Lysosomen unbehelligt überleben, sich dort reproduzieren und auf Kosten des Wirts weiterleben können.

Auch für immunologische Studien zur Erforschung der Rolle von Makrophagen mit Hilfe des makrophageneliminierenden in freier Form nichtzellpenetrierenden Clodronat (Dichloromethylbisphosphonat oder Cl<sub>2</sub>MBP) wurden die Liposomen dieser Art erfolgreich getestet [225]. Einsatzgebiete wie die Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten, des respiratorischen Atemnotsyndroms bei Neugeborenen, der Arthritis, bestimmter Formen des Diabetes mellitus und des Transfers vom genetischen Material mittels Liposomen werden derzeit auch als realistisch angesehen.

Bezogen auf eine Fülle von Beobachtungen und experimentellen Befunden in den letzten Jahren stehen grundsätzlich verschiedene Wege zur Erhöhung der Liposomenaufnahme gegenüber diesen Zellen zur Verfügung. Neben steigender Hydrophobie und erhöhter Oberflächenladung der Liposomen können die Vesikel auch mit Oponinen - Immunglobulinen, Fibronektinen, Tuftsin, Transferrin - oder Low density Lipoproteinen sowie Komplementkomponenten oder Kohlenhydrat-bindenden Proteinen (Lektine) überzogen werden. Attraktivere Möglichkeiten ergaben sich im letzten Jahrzehnt anfangs durch den Einbau natürlich gewonnener und später durch die Inkorporierung chemisch definierter Glykolipide (Neoglykolipide) in die dafür vorgesehenen präformierten Liposomen. Dabei dienten diese lipophilisierten Mannose-Strukturen als rekognitive Adressmoleküle für den Makrophagen Oberflächen-Mannose/Fucose/N-Acetylglucosaminrezeptor. Da auch viele Problem mikroorganismen durch diesen Makrophagenoberflächenrezeptor erkannt und ins Zellinnere transportiert werden, [226 - 228], könnten diese durch eine Liposomeninternalisierung therapeutisch wirksam bekämpft werden.

Der einfachste Weg zur Präparation von glykolipidhaltigen Liposomen (Glykoliposomen) mit Mannoseresten an der Oberfläche besteht in der Verwendung von bakteriellen Zellwandlipiden. So inkorporierten Szoka und Mayhew [229] Dimannosylglycerid (DMG) aus *Micrococcus luteus* in die SUV aus DPPC/DPPG/Cholesterol. Barratt et al. [230] präparierte solche Liposomen aus einem aus der Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis* isolierten Mannose-enthaltenden Phospholipid. Dessen Struktur wurde später

von Lee und Ballou [231 - 232] als ein Phosphatidyl-myo-Inositol mit bis zu sechs Mannoseeinheiten identifiziert.

Mit chemisch definierten Liganden zur Herstellung von Glykoliposomen beschäftigten sich zuerst eine Gruppe von Merck, Sharp und Dohme Laboratories (Rahway). Diese koppelten verschiedene Zuckerstrukturen, wie Mannose, und 6-Amino-6-desoxymannose zu Cholesterol [233]. Umezawa und Eto [234] funktionalisierten die Oberfläche von ultraschallbehandelten Lecithin/Chol-Vesikeln mit dem p-Aminophenylmannosid durch eine unspezifische Methode. Als alternativere Variante zur Präparierung von Glykoliposomen erwies sich die Kopplung von Zuckern über einen Lipidanker mit einer reaktiven Kopfgruppe, wie Phosphatidylethanolamin. So synthetisierten Ghosh und Bachhawat [235 - 237] p-Aminophenyl Derivate von  $\beta$ -D-Galactose,  $\alpha$ -D-Mannose und N-Acetyl-  $\beta$ -D-Glucosamin und koppelten diese über Glutaraldehyd. Weissig et al. [238] koppelten über das wasserlösliche Carbodiimid p-Aminophenyl- $\alpha$ -D-mannoside zu den präformierten N-Glutaryl-phosphatidylethanolamin-enthaltenden Vesikeln (N-Glut-PE containing vesicles).

Schuber und seine Mitarbeiter [239] entwickelten weitere synthetische Strategien für die Kopplung von Mannosylresten an präformierte Liposomen über Maleimido-Gruppen als Anker unter Berücksichtigung der Spacerlänge und der Art der Glykosylierung (O-glykosidische als auch Thioether-Bindung). Neuerlich wurden Mannoside über die Reaktion von Chlorameisensäure-cholesterylester mit N-(4-Aminobutyl) Carbamidsäure tert-butyl ester in Trifluoressigsäure und nachfolgendem Zusatz von 2-Imino-2-methoxyethyl-1-thiomannosid synthetisiert [240]. Zahlreiche Forscher targetierten derartige Mannose-modifizierte Liposomen, die mit Genen, Antigenen und Immunmodulatoren beladen waren, an die Makrophagen und demonstrierten deren Aufnahme über das spezifische Mannose Rezeptor [241 - 243].

Zur Reduzierung der Tumorzytotoxizität inkorporierten Barratt et al. [244] lipophile Derivate von MDP und MDP-L-Alanyl-Cholesterol in bakterielle mannosylierte Liposomen und bestätigten deren exzellente Fähigkeiten im Vergleich mit liposomenfreien MDP und MDP-L-Alanyl-Cholesterol und konventionellen PC/PS-Liposomen, Ratten Alveolar Makrophagen für zytotoxische Aktivitäten gegen Tumor Targetzellen in Anwesenheit suboptimaler Mengen von LPS zu aktivieren. Dumont et al. [245] kapselten LPS als makrophagenaktivierendes Agens in mannosylierten als auch nichtmannosylierten Liposomen ein und fanden heraus, dass nur mannosylierte Liposomen in der Lage waren,

die in sieben Tagen zu Makrophagen kultivierten Human-Monozyten zytotoxisch aktiv gegen U 937 Target Zelllinie werden zu lassen. Frisch isolierte Monozyten dagegen, welchen der Mannose Rezeptor fehlt, waren durch keine der genannten Liposomentypen aktivierbar, was auf eine Mannose-spezifische vermittelte Reaktion zurückzuführen sei. Auch zur Therapie der septischen Granulomatose (CGD - chronic granulomatous disease) werden zur Zeit selektive Liposomen entwickelt, die durch i.v.-Injektion an Abwehrzellen im Blut (Granulozyten und Monozyten) und in verschiedene Organe (Makrophagen) gelangen. Bei dieser Erkrankung können nach einer Infektion die Abwehrzellen durch einen Enzymdefekt eingedrungene Keime nicht mehr beseitigen, wodurch bei den Patienten, meist Kindern, die Infektionen sehr schwer verlaufen. Der fehlende Abwehrstoff,  $H_2O_2$ , wird mit einem liposomal verkapselten Enzym (Glucoseoxidase) produziert und in den Abwehrzellen wirksam. Darüber hinaus erwiesen sich mannosylierte  $Cl_2MBP$ -Liposomen als geeignet, klinische Symptomatik in experimentellen allergische Enzephalomyelitis (als Model für Multiple Sklerose) zu supprimieren. Im Gegensatz dazu zeigten leere mannosylierte Liposomen und nichtmannosylierte  $Cl_2MBP$ -Liposomen keinen derartigen Effekt [246].

Heutigen Überlegungen zufolge wird sogar der Einsatz von liposomalen  $Ca^{2+}$ -Antagonisten bei der Behandlung von Amastigotes der *Leishmania donovani* angestrebt. Diese Parasiten überleben Makrophagen-bedingte Zerstörung durch Sezernierung einer Kohlenhydrat-enthaltenden Substanz, excreted factor (EF), welche neben einer anti- $\beta$ -Galactosidase Aktivität auch  $Ca^{2+}$ -Ionen zu binden vermag. Die innerhalb der Phagolysosomen, an EF gebundenen, erhöhten  $Ca^{2+}$ -Ionen werden für die erhöhte Stabilität der Amastigotes Membran [247] und die daraus resultierende Regulierbarkeit der Amastigotes Proliferation verantwortlich gemacht [248].

Der Einsatz glykolipidhaltiger Liposomen bleibt jedoch, trotz vielversprechender Targetierungsversuche auf diesem Terrain limitiert, weil der Mannoserezeptor aufgrund der Anordnung seiner Kohlenhydratdomänen (Multivalency & Clustering) viel stärker Cluster-Mannoside und Glykoside zu binden vermag als individuelle Monosaccharideinheiten. Dadurch wird zum einen eine pharmakodynamisch erwünschte Affinitätserhöhung und zum anderen eine Vermeidung der Vesikeldeformierung erreicht. Aus diesem Grunde wurde diese Arbeit dem Ziel gewidmet, neusynthetisierte minicluster Glykolipide (Neoglykolipide) auf ihre Affinität zum Makrophagen-Mannoserezeptoren zu untersuchen. Die Liganden wurden in Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzungen inseriert und auf ihre biologische Aktivität (Bindung, Internalisierung und intralysosomale Abbaubarkeit) durchflusszytometrisch analysiert. Des



Weiteren wurden an monomeren Glykolipiden in Liposomen der Matrixeinfluss sowie die Rolle ausgewählter amphiphiler Additiva (Hexagonal  $H_{II}$  bildende Strukturen) auf die Lektin-Bindung in Abhängigkeit von der Spacerlänge der Glykolipide untersucht.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Medien, Puffer und Lösungen**

##### **3.1.1 Medien**

Die folgenden Grundmedien wurden verwendet:

- Eagle's Minimum Essential Medium mit Earl's Salzlösung (E-MEM)
- Eagle's Minimum Essential Medium mit Spinner Salzlösung (S-MEM)
- Dulbecco's Minimum Essential Medium (D-MEM)

Die Grundmedien wurden bei Bedarf mit folgenden Zusätzen supplementiert:

- 2 % L-Glutamin Stocklösung (200mM)
- 1 % Penicillin-Streptomycin Stocklösung (10.000 E/ml)
- 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren

Bei Bedarf wurden folgende Seren zugesetzt:

- fötales Kälberserum
- Pferdeserum
- Humanserum, Pool aus mindestens fünf Spendern

Zur Charakterisierung des Einflusses vom Serum und den darin enthaltenen Mannose-spezifischen Proteinen wurden in einigen Versuchen alle Seren 45 min bei 56 °C inaktiviert.

Die supplementierten Medien wurden steril filtriert (0,22µm Filter).

##### **3.1.2 Puffer**

- Tris-gepufferte Salzlösung: 1 l Tris-gepufferte Salzlösung enthielt:  
100 mM NaCl, 50 mM Tris. Der pH-Wert wurde mit 4 N Salzsäure auf 7.3 eingestellt.
- Phosphat-gepufferte Salzlösung: 1 l isotonische Phosphat-gepufferten Salzlösung (HPBS) enthielt: 2,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 g NaCl. Der pH-Wert der Lösung betrug 7.2.

- Con A-Puffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Der pH-Wert wurde auf 7.4 eingestellt.
- RCA<sub>120</sub>-Puffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl. Der pH-Wert wurde auf 7.4 eingestellt.
- MNE-Puffer: 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM MES. Der pH-Wert wurde auf 6.5 eingestellt.

### 3.1.3 Lösungen

- Propidiumiodid-Lösung: Zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen wurden die Zellen mit folgender Lösung versetzt: 0,5 µg/ml Propidiumiodidlösung in PBS. Das Propidiumiodid ist ein DNS/RNS-Farbstoff mit relativ geringer Membranpermeabilität. Das Emissionsmaximum liegt bei 639 nm.
- Trypanblau-Lösung: Zur Lebendzellzahl-Bestimmung wurde auch die folgende Lösung verwendet: 0,2 % Trypanblau in deionisiertem Wasser. Vor Gebrauch 1 : 4 mit PBS verdünnen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Handhabung von Zellen

#### 3.2.1.1 Isolierung und Kultivierung humaner Monozyten aus dem Blut

Die Monozyten wurden im Institut für Medizinische Immunologie aus dem peripheren Blut (buffy coats) von Einzelspendern (Transfusionsmedizin Bergmannstrost, Martin Luther-Universität) isoliert. Hierzu wurden zwei Gradienten benutzt: 1. Ficoll, ein Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, zur Isolierung der mononukleären Zellen [249 - 250], 2. Percoll, ein kolloidales Silikat mit einer Polyvinylpyrrolidon Beschichtung, zur Trennung der Lymphozyten und Monozyten [251].

Material: Ficoll-Lösung (Dichte =  $1,077 \pm 0,001$  g/ml) (Ficoll Paque, Pharmacia, Freiburg)

Percoll-Lösung:

45 % (v/v) Percoll (Dichte =  $1,130 \pm 0,005$  g/ml) (Pharmacia)

5 % (v/v) 10-fach konzentrierte Earles Salzlösung

50 % (v/v) S-MEM

In einem 50 ml Spitzbodenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) wurden 20 ml der Ficoll-Lösung vorgelegt und auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) vorgewärmt. Diese Lösung wurde anschließend mit 30 ml Blut, 1 : 2 mit PBS verdünnt, überschichtet und bei 20 °C, 550 x g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet bestand überwiegend aus Erythrozyten und Granulozyten, während sich die mononukleären Zellen an der Obergrenze der Ficoll-Lösung befanden. Das überstehende Plasma wurde abgesaugt. Die Bande mit den mononukleären Zellen wurde abgehoben und zweimal in S-MEM gewaschen. Zur Trennung der mononukleären Zellen in Lymphozyten und Monozyten wurden die Zellen auf einen präformierten Percollgradienten gegeben. Der präformierte Gradient wurde durch Zentrifugation der Percoll-Lösung bei 20 °C, 17.400 x g für 12 min in einem SS-34-Rotor aufgebaut. Die Zellen wurden nach dem Auszählen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 3 ml vorsichtig auf den präformierten Percoll Gradienten gegeben. Der Gradient wurde für 40 min bei 20 °C mit 650 x g zentrifugiert. Als Ergebnis erhält man zwei Banden, von denen die obere Bande die monozytären und die untere Bande die lymphozytären Zellen darstellt. Die monozytäre Bande wurde abgenommen und zur weitestgehenden Entfernung der Thrombozyten und des Percolls dreimal mit S-MEM gewaschen. Die Reinheit der Monozyten betrug etwa 85 %. Die Zellen wurden ausgezählt und in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Monozyten-Medium suspendiert. Diese Suspension wurde in UV-sterilisierte Teflonsäckchen eingeschweißt und anschließend bei 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub> kultiviert [252]. Abschließend wurden die Teflonsäckchen für 30 - 60 min auf Eis gelegt und durch leichtes Klopfen die Monozyten auf die Unterseite abgelöst. Die Säckchen wurden aufgeschnitten und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und die Lebendzellzahl durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden für mich freundlicherweise im Institut für Medizinische Immunologie ausgeführt.

### **3.2.1.2 Makrophagenzählung**

Die Zellsuspension wurde 1 : 100 mit Türck-Lösung verdünnt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die blaugefärbten Zellen lichtmikroskopisch gezählt und anschließend die Gesamtzahl berechnet.

### **3.2.1.3 Lebendmakrophagenzahlbestimmung**

Die Zellsuspension wurde 1 : 100 in der Trypanblau-Lösung verdünnt. Nach 1 min wurden die nicht gefärbten Zellen in einer Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt.

### **3.2.1.4 Gewinnung von Perikard-Makrophagen**

Die Quellen verfügbarer humaner Makrophagen sind rar. Für uns ergab sich die Möglichkeit, mit humaner Perikardflüssigkeit zu arbeiten, die uns freundlicherweise aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie überlassen wurde. Monozyten/Makrophagen der Perikard-Flüssigkeit von Patienten mit offener Herzoperation wurden zuerst 3 x mit HPBS-Puffer gewaschen. Mittels Anfärbung mit CD14-Antikörpern konnte der Makrophagengehalt der Flüssigkeit evaluiert werden. Anfärbung mit einem Phycoerythrin-markierten Antikörper gegen den Mannoserezeptor half uns bei der Bestimmung des Anteils Mannoserezeptor-positiver Makrophagen. Das Gating auf Makrophagen mit dem FACS-Gerät in der durchflusszytometrischen Analyse wurde in der dot blot:forward gegen side scatter vorgenommen.

## **3.2.2 Präparation und Charakterisierung von Glykoliposomen zur systemischen Applikation**

### **3.2.2.1 Asymmetrische Lokalisierung der Glykolipide auf der Außenmonolayer von Phospholiposomen**

Vorbereitend wurde eine Chloroformlösung mit einem Gesamtlipidgehalt von 14  $\mu\text{mol/ml}$  (DPPC/Chol [7 : 3 mol %]) in einen 10 ml-Rundkolben überführt. Zur Ausbildung des Lipidfilms wurde das Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer bei 35 °C entfernt. Anschließend wurden 0,3 ml der HBPS bzw. TBS Puffer zugesetzt. Es folgte eine Dispergierung der Lipide mit Hilfe von Glasperlen bei 65 °C durch manuelles Schütteln über einen Zeitraum von 10 min. Danach wurde die Dispersion 16 h mechanisch geschüttelt (100 Bewegungen/min). Anschließend wurde die Liposomendispersion oberhalb  $T_m$  sechsmal durch eine Polycarbonatmembran (Nucleopor, Porengröße 400 bzw. 200 nm) extrudiert. Nach der Einengung der im organischen Lösungsmittel gelösten Neoglykolipide und deren unmittelbar nachfolgende Aufnahme in Methanol (3 % des Vesikel-Suspensionsvolumens) wurden die so präformierten Vesikel der methanolischen

Glykolipidlösung zugesetzt und nach 7 sec schonenden Schütteln 20 min bei Raumtemperatur vor der biologischen Analyse inkubiert, soweit nicht anderes vorgesehen war.

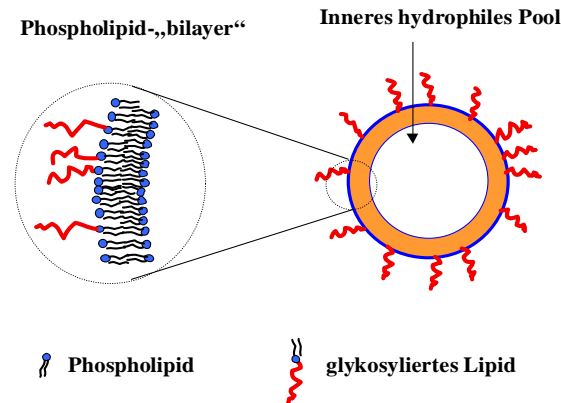


Abb. 4: Schematische Darstellung der asymmetrischen Lokalisierung von Glykolipiden in Phospholiposomen

Das zugrundeliegende Prinzip dieser Ethanol-Injektions-Prozedur wird unter 3.2.3.4 beschrieben. Die asymmetrische Verteilung von Glykolipiden außer und innerhalb der Vesikel wurde durch enzymatische Analyse bestimmt. Dazu wurden (aufgrund mangelnder Substanzverfügbarkeit) galactosylierte Vesikel statt mannosylierte der Testung unterzogen. Diese Vesikel wurden mit dem spezifischen Enzym Galaktose-Oxidase inkubiert und die gebildeten Endphenolfarbstoffe (Chinonimine) spektrophotometrisch, wie unter 3.2.6 beschrieben, erfasst. Die Messung der erhaltenen Farbstoffe wurde vor und nach der kompletten Zerstörung der Liposomenstruktur mittels Ultraschallbehandlung für 10 min bei 60 °C vorgenommen und so der prozentuale Anteil an Glykolipiden in der äußeren Schicht der Liposomen ermittelt. Etwa 80 % der Galactolipide waren an der Außenmonolayer lokalisiert.

### 3.2.2.2 Bestimmung der Vesikelgröße mit PCS (photon correlation spectroscopy)

Zur Bestimmung der Partikelgröße und des Polydispersitätsindex (PI) kolloidaler Arzneistoffträger wurde im Rahmen dieser Arbeit das sogenannte PCS-Verfahren verwendet. PCS ist ein Laserstreulichtverfahren zur Messung von Partikelgrößenverteilungen in einem Messbereich von 5 nm bis 3 µm und wurde am Malvern-Autosizer IIc durchgeführt. Das Prinzip besteht darin, dass die Probe von Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt wird und die Intensität des Streulichtes mit Hilfe eines Photonenmultipliers gemessen wird. Dieser misst die Streulichtintensität, indem er für

jedes registrierte Photon ein elektrisches Signal an den Korrelator gibt. Die pro Zeiteinheit registrierten Photonen werden im Korrelator verarbeitet, als Ergebnis wird eine exponentiell abfallende Korrelationsfunktion erhalten:

$$g(\tau) = 1 + e^{-2D^2 \tau} \quad (4)$$

mit:  $\tau$       Verzögerungszeit  
       $D$       Diffusionskoeffizienten der Partikel  
       $K$       Betrag des Streulichtvektors

Aus dem Diffusionskoeffizienten der Partikel kann dann der Partikeldurchmesser mit Hilfe der Einstein-Beziehung berechnet werden.

$$d = \frac{kT}{3\pi} \quad (5)$$

mit:  $k$       Boltzmannkonstante  
       $\eta$       Viskositätskonstante  
       $T$       absolute Temperatur

Der PI ist ein Maß für die relative Breite der Größenverteilung. Ein PI von 0 steht für eine monodisperse Partikelpopulation. Latexsuspensionen mit einem PI zwischen 0,03 und 0,06 werden als monodispers bezeichnet. Bei Werten von 0,1 bis 0,2 liegt eine relativ enge Größenverteilung vor. Ein PI über 0,5 weist auf eine breite Verteilung ohne bestimmte Form hin.

Zur Durchführung der Messung wurden 2 ml des partikelfreien, gefilterten PBS (Sterilfilter der Firma Sartorius, 0,22  $\mu\text{m}$ ) und 25  $\mu\text{l}$  Vesikeldispersion in spezielle Küvetten gegeben und durch Erfassung der Massenverteilung vermessen. Es wurden 5 Einzelmessungen der Proben durchgeführt, wobei jede Einzelmessung eine Dauer von 200 sec hat. Die Messparameter wurden den unterschiedlichen Proben angepasst, um optimale Autokorrelationsfunktion zu erhalten.

### 3.2.2.3 Stabilitätsuntersuchungen

Zur Ermittlung der Stabilität der glykolipidhaltigen Liposomen unter den Bedingungen der Zellversuche wurden die mit 6 CF inkorporierten Vesikel über mehrere Stunden in serumfreiem Medium bei 37 °C inkubiert. Parallel hierzu erfolgte eine Inkubation in TBS bei derselben Temperatur. Es wurden 55 µl Liposomendispersion/ml Medium bzw. TBS verwendet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 250 µl entnommen, mit 10 ml TBS bzw. Triton X-100 verdünnt und bei 520 nm vermessen. Die Berechnung der Einschussrate erfolgte analog:

$$\frac{c_{\text{Triton}} - c_{\text{TBS}}}{0,1 \times V} \times 100 \% = E \% \quad (6)$$

$c_{\text{Triton}}$  = Konzentration von 6-CF nach der Vesikel-Lysis

$c_{\text{TBS}}$  = Konzentration von freiem 6-CF

$V$  = Verdünnungsverhältnis (10 µl + 10,25 ml =  $9,756 \times 10^{-4}$ )

$E \%$  = Einschuss von 6-CF in % bezogen auf 0,1 M Lösung = 100 %

Zur Verbesserung der Stabilität wurden 33 Mol% Cholesterol in die Vesikel eingearbeitet.

### 3.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der MR-Glykoliposomen-Wechselwirkung

#### 3.2.3.1 Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein effektives Verfahren, bei dem die Bestimmung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften in einer Einzelzellsuspension ermöglicht wird. Das Grundprinzip eines Durchflusszytometers geht auf Untersuchungen der sechziger Jahre zurück und soll im folgenden kurz dargestellt werden: Eine Zelle wird durch verschiedene Methoden mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Dieser Farbstoff kann durch Kopplung an einen Antikörper oder ein anderes spezifisches Reagenz, z. B. Phalloidin, mit der Zelle verbunden werden. Es lassen sich somit verschiedene Eigenschaften einer Zelle auch quantitativ bestimmen, hierzu gehören membranständige und intrazelluläre Antigene, die intrazellulären  $[Ca^{2+}]$ -,  $[O^2]$ - und  $[H_2O_2]$ -Konzentrationen, der F-Actin- und der Tubulin-Gehalt, die Phagozytoseeigenschaften und die Vitalität einer Zelle. Für alle diese Messungen gilt die Proportionalität zwischen dem Fluorochromgehalt und der Zelleigenschaft. Nach der Beladung mit einem Fluorochrom wird die Zelle in



einem fokussierten Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Innerhalb dieser Arbeit wurde ausschließlich mit einem Durchflusszytometer mit nur einem Argonlaser gearbeitet (Emissionslinie bei 488 nm). Das setzte voraus, dass alle verwendeten Farbstoffe in diesem Bereich anregbar sind. Im 90°-Winkel zum einfallenden Laserstrahl wird das emittierte Fluoreszenzlicht detektiert. Hierzu wird das Licht über einen Kollektor gesammelt und über verschiedene optische Systeme auf Fotomultiplier geleitet. Je nach der Ausrüstung des Systems lassen sich somit verschiedene Wellenlängenbereiche separat detektieren, was die parallele Anwendung verschiedener Fluorochrome erlaubt. Parallel zu der Messung des Fluoreszenzlichtes erlauben die meisten Geräte eine Aufnahme des Streulichtes. Das Vorwärtsstreulicht in der Achsenrichtung des Laserlichtes wird in erster Linie durch Beugung des Lichtes an der Zelloberfläche erzeugt und dient als relatives Maß für die Zellgröße. Das im 90° Winkel zum einfallenden Laserstrahl aufgefangene Seitwärtsstreulicht wird durch Streuung des Lichtes an unterschiedlich dichten Zellbestandteilen erzeugt, hierzu gehören Zellorganellen und Zelleinsschlüsse. Das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht diente einer groben Unterteilung der zu analysierenden Zellpopulation. Die aufgenommenen Signale werden elektronisch verstärkt und an einen Computer zur weiteren Datenverarbeitung weitergegeben. Innerhalb dieser Arbeit wurde mit einem FACScan-Analysegerät (Becton Dickinson, Heidelberg) am Institut für Medizinische Immunologie gearbeitet. Der FACScan verfügt über Möglichkeiten zur Detektion des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes, sowie über drei festeingestellte Filtersets:

FL1: 530/50 nm BP für Fluorescein

FL2: 585/50 nm BP für Phycoerythrin, Propidiumiodid

FL3: 650 nm LP für Propidiumiodid

Die Auswertung erfolgte beim FACScan über die LYSYS-II-Software. Die LYSIS-II-Software ist ein kommerzielles Programmpaket zur Aufnahme und Auswertung der Daten vom FACScan Durchflusszytometer (Becton-Dickinson, USA). Es kann fünf Parameter parallel aufnehmen und ermöglicht eine beliebige Zusammenstellung von 1- oder 2-Parameter-Bildern.

### **3.2.3.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten**

Zur Auswertung durchflusszytometrischer Daten werden zuerst Zellen ohne intakte Zellmembran mit Hilfe eines DNS/RNS Farbstoffs mit nur sehr geringer

Membranpermeabilität (Propidiumiodid) ausgegrenzt. In einer 2-Parameter-Darstellung des Vorwärtsstreulichtes gegen die rote Fluoreszenz lassen sich die Zellen mit einer intakten Plasmamembran gut erkennen. Da die vorhandenen Lymphozyten etwas kleiner und eine geringere Autofluoreszenz besitzen, findet man diese Zellpopulation teilweise getrennt von den Monozyten wieder. Durch das Eingrenzen der intakten monozytären Population wurden nur die Zellen innerhalb dieser Grenzen zur Datenaufnahme berücksichtigt. Nach der Datenaufnahme wurden die berücksichtigten Werte erneut in einer 2-Parameter-Darstellung aufgezeichnet. Durch die Auftragung des Vorwärtsstreulichtes gegen das Seitwärtsstreulicht erhält man eine gute Auftrennung in Monozyten und die restlichen Lymphozyten. Durch erneutes Eingrenzen der größeren und granulären Population wurden nur diese Zellen zur Analyse berücksichtigt.

Die zur Analyse berücksichtigten Zellen wurden als Histogramm (Intensität der Fluoreszenz gegen Anzahl der Zellen) dargestellt. Zur Berechnung wurde ein Histogramm eines isotypischen Kontrollantikörpers mit dem Histogramm des zu bestimmenden mAk überlagert. Die Kurven wurden anschließend geglättet und voneinander subtrahiert. Zur Berechnung wurden die Zellen mit einer höheren Intensität als das Maximum des Kontrollantikörpers berücksichtigt. Als Ergebnis erhielt man die Anzahl der positiven Zellen und den geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität (Mean). Die Anzahl der positiven Zellen, bezogen auf die bei der Analyse berücksichtigten Zellen, ergaben den Prozentanteil von positiven Zellen.

### **3.2.3.3 Nachweis der MR-Expression auf kultivierten humanen Monozyten**

Das Verfahren der Durchflusszytometrie erlaubt ein rasches Messen der Zelloberflächenexpression eines Antigens. Monozyten des Blutes tragen keinen Mannoserezeptor. Sie lassen sich in Kultur jedoch in Makrophagen-ähnliche Zellen differenzieren. Ein Antikörper gegen den MR sollte auf der Zelloberfläche von humanen Blutmonozyten des 6. und 7. Kulturtages binden. Zum Nachweis der Antikörperbindung auf der Zelloberfläche diente die direkte Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper clone 3.29 B1.10 (Coulter), da der eingesetzte Anti-MR-Antikörper selbst mit einem Fluorochrom, dem Phycoerythrin, markiert war. Der Versuch wurde bei 2 - 4°C durchgeführt.

### **3.2.3.4 Präparierung vom Serum aus einzelnen Spendern zur Charakterisierung serumabhängiger GL-Aufnahme**

Serum aus dem Blut einzelner gesunder Spender wurde durch die Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C erhalten. Das Serum wurde dann bei -20 °C gefroren, bis er zur Anwendung kam. MBP-freies Serum wurde durch zweimalige Affinitätschromatographie (1 Tropfen/25s, D- Mannose, immobilisiert an 4 % Agarose-beads), mit loading buffer (1.25 M NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, und 20 mM Imidazol-HCl) equilibriert, präpariert. Anschließend wurde die Säule mit dem Elutionspuffer (20 mM Imidazol-HCl, pH 7.8, 1.25 M NaCl, und 2 mM EDTA) gewaschen. Die Liposomen wurden vor einigen wenigen Endozytose-Versuchen mit Serum bei 37 °C für 10 min inkubiert

### **3.2.3.5 FITC-Markierung von rt-PA und AGP<sub>C</sub>**

Bei den auf der Durchflusszytometrie basierenden kompetitiven Studien mit den Glykoliposomen wurden die beiden als Liganden verwendeten Glykoproteine mit Fluoresceinisothiocyanat Isomer I (FITC-I) entsprechend der in [253] beschriebene Prozedur markiert. 200 µg rt-PA bzw. AGP<sub>C</sub> wurden mit 500 µg FITC in 50 mM Borat-Puffer (pH 9.5), welches 200 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, und 100 mM Mannose enthielt, für 18 h bei 4 °C inkubiert. Die Separation von gebundenem und freiem Farbstoff wurde durch Gelchromatografie erreicht. Die Endreinigung erfolgte durch Dialyse gegen Wasser bei 4 °C über Nacht.

### **3.2.3.6 Bestimmung der IC<sub>50</sub> –Werte der Cluster-Neoglykolipide**

Das inhibitorische Potential der liposomalen Neoglykolipide, die sich durch systematisch variierte terminale Epitope und Spacerlängen auszeichnen, wurde durch einen in vitro etablierten Kompetitionsassay durchgeführt. Dazu wurden zwei mit FITC-markierte, literaturbekannte Liganden, das  $\alpha_1$ -AGP<sub>C</sub> und das rt-PA, verwendet. Die Cluster-Neoglykolipide wurden in Typ I (spacerlos) und Typ II (spacergekoppelt) eingeteilt. Cluster-Neoglykolipide vom Typ I wurden als kompetitive Inhibitoren gegen die Bindung der  $\alpha_1$ -AGP<sub>C</sub>-Fraktion an den MR von humanen Makrophagen aus Perikardial-Flüssigkeit eingesetzt. Hinsichtlich vergleichender Untersuchungen zur Bindungsaffinität zwischen MR und Cluster-Neoglykolipiden vom Typ I wurde die AGP C-Fraktion aus dem kommerziell erhältlichen AGP entsprechend der Vorschrift von Bayard [254] isoliert. Die Cluster-Neoglykolipide vom Typ II wurden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegen

die Bindung von rt-PA an den MR von aus buffy coats isolierten 5 - 7 d mit IL-4 kultivierten Monozyten untersucht.

Zur Durchführung des Wettbewerbsassays wurden der rt-PA bzw. das AGP<sub>C</sub> mit den entsprechenden Makrophagen ohne (Kontrolle) sowie mit Glykoliposomen bei 4 °C für 2 h inkubiert, danach zweimal mit HBPS-Puffer gewaschen und für 6 - 8 min bei 1600 U/min zentrifugiert, in Messpuffer resuspendiert und anschließend die Fluoreszenz am FACS-Gerät gemessen. Die spezifische Bindung des FITC-AGP<sub>C</sub> bzw. FITC-rt-PA ergab sich aus der Differenz zwischen totaler und nichtspezifischer Bindung. Die nichtspezifische Bindung wurde mit Hilfe des MR-spezifischen Inhibitors Mannan (2 mM) bestimmt und vom gemessenen Fluoreszenzsignal subtrahiert. Die spezifische Bindung der Liganden an den Mannoserezeptor der Makrophagen in Abwesenheit von Glykoliposomen diente dabei als Kontrolle. Das in Abwesenheit der Glykoliposomen erhaltene Fluoreszenzsignal wurde als Bezugswert (100 %) herangezogen. Bei Zugabe der Glykoliposomen verringerte sich die gemessene relative Fluoreszenz aufgrund der Konkurrenz zwischen dem jeweiligen Liganden und den Glykoliposomen um den Mannoserezeptor. Die Fluoreszenzintensitäten wurden in Prozent des Bezugswertes gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen und mittels nichtlinearer Regression an Gleichung 4 angepasst:

$$y = 100/(1 + \exp(x - m)/w) \quad (7)$$

Hierbei gibt  $x$  die variierte Inhibitorkonzentration wieder. Der Parameter  $m$  steht für diejenige Inhibitorkonzentration, bei der die gemessene relative Fluoreszenzintensität die Hälfte des Bezugswertes (100 %) ist ( $IC_{50}$ -Wert). Die gegebene Gleichung wurde in Ermangelung eines konkreten Modells gewählt, um die Affinität der Inhibitoren grob abzuschätzen.

### **3.2.3.7 Bestimmung der Aufnahme-assoziierten Fluoreszenz mit Hilfe der Dithionit- Technik**

Der chemische Grundgedanke dieser Messmethode beruht auf der Löschung der Fluoreszenz von 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl-phosphatidylethanolamin (NBD-PE) durch Dithionit-Einsatz.

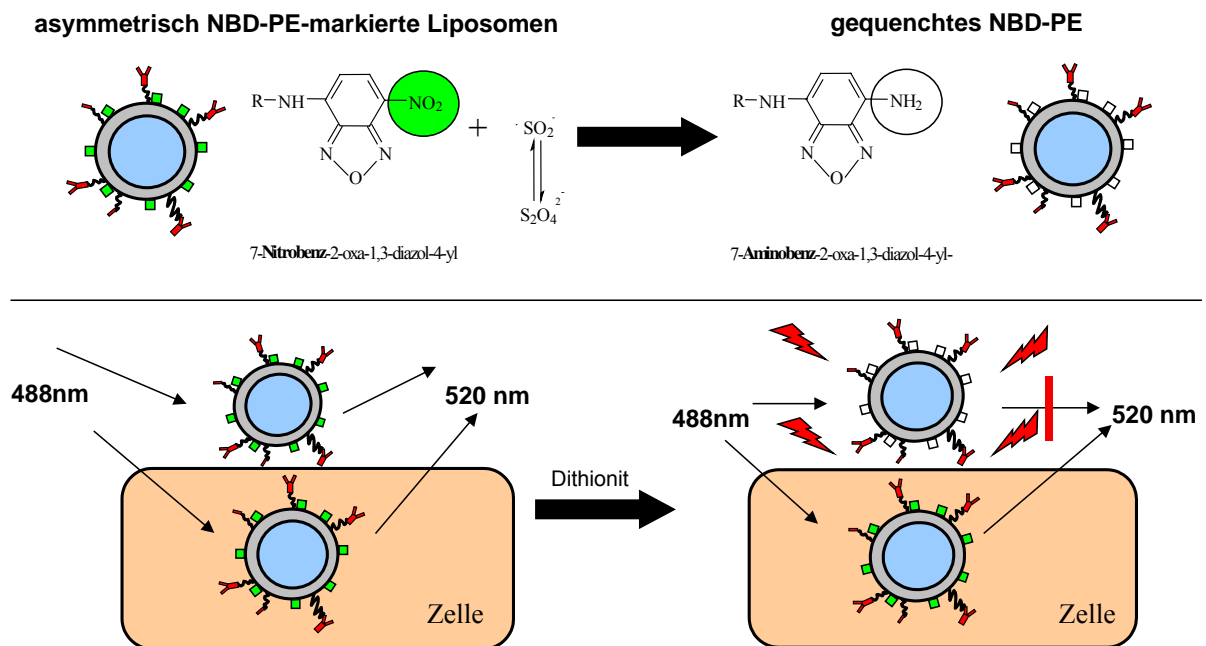


Abb. 5: Reduktion von 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl-phosphatidylethanolamin (NBD-PE) zum 7-Amino-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl-Lipid durch Dithionit

Das stark fluoreszierende NBD-PE wird durch Dithionit (gelöst in 1 M Tris, pH 10, NBD/Dithionit 1/25.000) zur entsprechenden Amino-Verbindung (nichtfluoreszent) reduziert [255]. Eine Anwendung dieses Markers als Parameter für den internalisierten Liposomenanteil wird erst dadurch möglich, wenn dieser lipidverankerte Farbstoff während der Präparationsprozedur in der äußeren Monolayer der Vesikel lokalisiert wird. Hierbei kam es zur Anwendung der Ethanol-Injektionsmethode [256]. NBD-PE wird vom Chloroform am Rotationsverdampfer befreit und anschließend erneut mit Ethanol aufgenommen. Dabei ist eine Endkonzentration von Ethanol innerhalb der präformierten Liposomen von maximal 3 Vol% einzuhalten. Die ethanolische NBD-PE-Menge wurde nun mit einer Mikroliterspritze zu den fertigen Liposomen gegeben. Dabei kommt es zur spontanen Verteilung des Markers in der äußeren Monolayer. Zur Durchführung dieses Versuches zur Bestimmung der zellulären Aufnahme wurden 50 µl einer 1.0 M Dithionit-Lösung in 1.0 M TRIS (pH 10) verwendet. Vor Zugabe von Dithionitreagenz wurde die Grundfluoreszenz der Zellen nach erfolgter Liposomeninkubation mit NBD-haltigen Vesikeln gemessen (Bindung und Internalisierung). Die zu untersuchenden Zellen wurden anschließend für 3 min mit Dithionit behandelt und die Fluoreszenz erneut bestimmt.

### **3.2.3.8 Etablierung eines neuen Assays zur Untersuchung des Verbleibs liposomaler Inhalte in interzellulären Azid-Kompartimenten**

Neben Bindung und Internalisierung ist die Untersuchung des Verbleibs der zu verkapselten Inhalte in Glykoliposomen (GL) von Interesse. Auf der Suche nach einem geeigneten Parameter wurden die Eigenschaften der FITC-Fluoreszenzmarker in Betracht gezogen. Dieser Fluorophor hat die Eigenschaft, seine Quantenausbeute im sauren Milieu zu quenchen. Durch die Verwendung von Ionophoren wie Monensin wird das Zellinnere und -äußere neutralisiert und somit der gequenchten Anteil an Fluoreszenzmarker wiedererhalten. Zur Durchführung des Assays wurden zunächst FITC-BSA (170 µg/ml)-haltige PC/PS/Man (60 : 30 : 10)-Liposomen (800 nm) mit  $10^6$  Makrophagen/ml für 17 h bei 37 °C inkubiert, danach drei mal gewaschen und anschließend mit Triton X-100 (gelöst in 0,1 M Boratpuffer/pH 8,3) lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert, das BSA aus dem Überstand durch Zugabe von 10 % Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und die Säure-lösliche Fraktion abgetrennt. Das Säure-unlösliche Präzipitat wurde in Boratpuffer solubilisiert. Schließlich wurden beide Fraktionen mit festem Natriumcarbonat auf pH 8,3 eingestellt, separat einer proteolytischen Fragmentierung mittels 200 µg/ml Pronase (37 °C für 1 h) unterzogen und spektrofluorimetrisch vermessen.

### **3.2.3.9 XTT-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität von Glykoliposomen**

Um GL als kolloidale Arzneistoffträger zur parenteralen Applikation einzusetzen, ist es wichtig, deren toxikologische Unbedenklichkeit abzuklären. In dieser Arbeit wurde der Test auf Viabilität mit dem Tetrazoliumsalz XTT (3-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzylsulfonsäure Natriumsalz durchgeführt. Das gelb gefärbte Tetrazoliumsalz XTT wird in den Mitochondrien lebender Zellen durch Reduktasen der Atmungskette zum orangefarbenen wasserlöslichen Formazan metabolisiert, welches durch ein Spektrophotometer (ELISA-reader) direkt erfassbar ist. Um eine optimale Messung der Zellviabilität vor und nach der Inkubation mit GL zu erreichen, wurde die Anzahl der Zellmenge pro Probe bei beiden Tests auf  $10^6$  gleich gehalten. Die Makrophagen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten mit den Proben und der XTT-Lösung (Endkonzentration 0,3 mg/ml) für 24 h inkubiert und anschließend spektrophotometrisch bei 490 nm vermessen. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise am Institut für Medizinische Immunologie für mich durchgeführt.

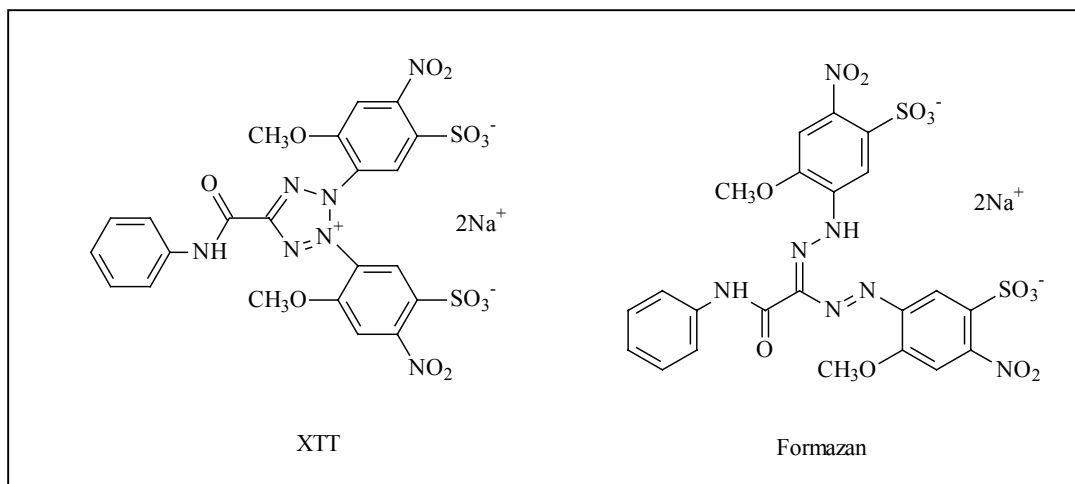


Abb. 6: Reduktion des gelb gefärbten Tetrazoliumsalzes XTT zum orangenen Formazan unter Spaltung des Tetrazoliumringes

### 3.2.4 Detektierung des MR in eventuellen Mikrodomänenstrukturen

Die dynamische Clusterung (Rafts) von Glykosphingolipiden und Cholesterol in Biomembranen führt zur Bildung von speziellen Mikrodomänen innerhalb der Bilayer. Diese sind mit Proteinen und weiteren Lipiden assoziiert, die in spezifischen Funktionen, wie Endozytose durch non coated pits, Membrantrafficking und Signaltransduktion, involviert sind. Die Aufnahme über Raft-Strukturen unterscheidet sich wesentlich von der Aufnahme über coated pits. Raft-assoziierte Proteine lassen sich durch ihre Triton-Unlöslichkeit bei 4 °C darstellen [303]. Meist wird mit einem diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten gearbeitet. Zum Nachweis, ob der Mannoserezeptor in Rafts organisiert ist, werden Zellmembranen zuerst mit einem Detergens lysiert, danach mit Zuckergradienten fraktioniert und anschließend durch western blot analysiert. Diese sämtlichen Arbeiten wurden für mich freundlicherweise von Herrn Dr. Navarrete Santos am Institut für Medizinische Immunologie durchgeführt.

#### 3.2.4.1 Isolierung von Membranfraktionen auf der Basis von Triton X-100 bei 4 °C

Das Prinzip dieser Prozedur besteht darin, dass sich durch nichtionische, milde Detergenzien wie Triton X-100 viele hydrophobe Membranproteine in Lösung bringen lassen. Dabei bindet Triton X-100 mit seinem hydrophoben Teil membrandurchdringende

Segmente von Proteinen. Es entstehen sowohl ein H<sub>2</sub>O-löslicher Protein/Lipid/Detergenz-Komplex als auch lösliche gemischte Lipid/Detergenz-Mizellen. Mittels eines Dichtegradienten aus Saccharose (5 – 40 %) können Membranfraktionen von lysierten Zellen isoliert werden. Die leichten Mizell-reichen Protein/Fett-Fraktionen befinden sich in den niedrigen Dichten des Gradienten. Dagegen sind in den höheren Dichten nicht fetthaltige schwere Membranproteine, die durch Triton X-100 herausgelöst wurden. Raft-assoziierte Proteine sind resistent gegen Triton X-100 bei 4 °C. Dagegen sind alle Membranproteine bei 37 °C löslich.

Zur Durchführung der Isolierung wurden humane kultivierte Monozyten des 6. Tages ( $2,5 \times 10^7$ ) einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml 1 %igem Triton X-100/MNE-Puffer (enthält 20 µl Protease-Inhibitor-Mix) für 20 min auf Eis lysiert und mittels Einwegspritze homogenisiert. Das Zellysate musste während der ganzen Arbeitszeit kalt (Eis) gelagert werden. Um den Gradienten aufzubauen, wurde 1 ml 80 % Saccharose/MNE-Puffer mit 1 ml der lysierten Zellen vermischt, so dass eine 40 % Suspension entstand. Danach wurden vorsichtig 2 ml 30 %iger Saccharose/ MNE-Puffer und anschließend 1 ml 5 %iger Saccharose/MNE-Puffer überschichtet. Die nachgeschaltete Ultrazentrifugation wurde bei 200.000 x g und 4 °C mit einem SW55 Rotor (Beckmann Instruments) für 15 h vorgenommen. Daraufhin wurden vorsichtig 5 Fraktionen (je 400 µl), beginnend mit der geringsten Dichte, abgenommen. Die Fraktionen wurden mit einem Volumenteil 20 %iger Trichloressigsäure für 30 min auf Eis gefällt und die in einer Zentrifugation (30 min) bei 10.000 x g und 4 °C gewonnenen Pellets in 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung resuspendiert. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Membranfraktionen auf MR-Anwesenheit mit Western Blot analysiert. Mannoserezeptor hat ein Molekulargewicht von 175 kDa.

#### **3.2.4.2 Proteinbestimmung mit dem BCA Reagenz**

Die Protein-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, Bonn). Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Reaktion nach Biuret. Als Standardreihe diente eine Verdünnungsreihe von bekannten BSA-Konzentrationen (0,005 - 0,75 µg/µl). 25 µl jeder BSA-Verdünnung und Verdünnungen von 1 : 25 der zu messenden Proteinproben wurden mit 500 µl BCA Protein Assay Reagenz B : A = 1 : 50 versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 60 °C wurde die Extinktion der Proben bei 562 nm am Ultraspec III (Pharmacia, Freiburg) gemessen und mit der Software Microsoft EXCEL durch lineare Regression ausgewertet.



### 3.2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden verschiedene Gele benutzt. Für denaturierende Gele wurden NuPage 3 - 8 % Tris-Acetat (TA)-SDS-Gradientengele, 7 % TA-SDS-Gele (beide Arten von Invitrogen, Groningen) sowie selbstgegossene 6 % Gele verwendet. Für native Gele wurden 4 % Tris-Glycin-Gele (Invitrogen, Groningen) benutzt. Die entsprechenden Probenpuffer und Laufpuffer stammten auch von Invitrogen.

#### Probenvorbereitung für denaturierende Gele

Protein	30 - 70 µg
DTT (0,5M)	1/10 vom Endvolumen
Probenpuffer	¼ vom Endvolumen
H <sub>2</sub> O	ad maximal 60 µl

#### für native Gele

Protein	30 - 70 µg
Probenpuffer	½ von V <sub>end</sub>
H <sub>2</sub> O	ad max. 60 µl

⇒ Denaturierung der Proben bei 70 °C für 12 min

⇒ keine Hitzebehandlung

Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden 5 µl des Proteingrößenmarkers MultiMark Multi-Colored Standard (Novex, Groningen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für 90 min in den entsprechenden Laufpuffern.

### 3.2.4.4 Westernblot

Es wurde das Prinzip des Semi-Dry-Blot-Verfahrens angewendet: Tränken von je 3 Lagen Blotting-papier (Biometra, Göttingen) in Anodenlösung I + II und Kathodenpuffer, Tränken der Nitrocellulosemembran (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham, Freiburg) in Anodenlösung II, Schließen der Blotkammer NovaBlot Electrophoretic Transfer Kit (Pharmacia, Freiburg) und Blotten mit 0,8 A/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1 h, nach Blot ⇒ Anfärben der Membran mit Ponceau S-Lösung (SERVA, Heidelberg), um die Qualität des Blots zu überprüfen und zu zeigen, dass alle Proben gleichmäßig aufgetragen wurden ⇒ Entfärbung mit H<sub>2</sub>O oder 5 %iger Trockenmilch/TBST-Puffer. (Die Trockenmilch stammte von Sucofin aus dem Supermarkt EDEKA.) Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 7 °C in 5 %iger Trockenmilch/TBST-Puffer geblockt.

### **3.2.4.5 Antikörperinkubation und Rezeptor-Detektion**

Die Membran wurde dann mit dem monoklonalen Anti-Mannoserezeptor-Antikörper mAb clone 3.29 B1.10 (Coulter) in 5 %iger Trockenmilch/TBST für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligen Waschen der Membran mit TBST und einmaligem Waschen mit TBS folgte eine Inkubation für 1 min in einem 1 : 1-Gemisch von ECL Reagenz 1 und 2 (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham, Freiburg). Die Detektion erfolgte mittels ECL High performance chemiluminiscence film (Amersham, Freiburg).

### **3.2.5 In vitro vereinfachtes Modell zur GL/Lektin-Interaktion**

#### **3.2.5.1 Etablierung eines neuen Messsystems zur Lektin-induzierten Agglutination**

Liposomale Glykolipide werden durch die Inkubation mit komplementären Lektinen, wie Con A oder RCA<sub>120</sub>, agglutiniert. Die Bestimmung des Ausmaßes der Agglutination fokusierte sich meistens auf die turbidimetrisch erfassbare initiale Rate der Agglutination in  $\text{k}/\text{min}^{-1}$ . Da aber die Turbidimetrie selbst durch die Wahl der Lipidzusammensetzung und die damit hervorgerufene Veränderungen der Vesikelgröße beeinflussbar ist, wurde hierbei ein simples und reproduzierbar quantitatives Assay auf der Basis der Sedimentierung agglutiniertes Vesikel durch low-speed Zentrifugation entwickelt.

Zur Durchführung des Standard-Assays wurden Lipidvesikel (12  $\mu\text{mol}$  total Lipid), bestehend aus DOPC, Galactolipiden sowie weitere Phospholipidkomponenten und ein Fluorophor-Lipid [<sup>FITC</sup>]-PE, 0,75 mol % eingesetzt. Die Menge an inkorporierten Gal-C16 mit 3 bzw. 9 Spacer betrug 7 Mol% der totalen Lipidkonzentration. SUV-Vesikel wurden in 0.154 M NaCl/50 mM Tris.HCl (pH 7.3) durch Extrusion mit Hilfe von Unipor Filter der 0.2 and 0.1  $\mu\text{m}$  Porengröße präpariert. Nach 55 min Inkubationszeit wurde die Mischung bei 5.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der gesamten Inkubationsmischung sowie die des nach der Zentrifugation erhaltenen Überstandes ermittelt. In einigen Experimenten wurde die Agglutination durch die kontinuierliche Registrierung der Turbidität nichtmarkierter Vesikel bei 450 nm bestimmt.

#### **3.2.5.2 Separierung der Glykolipid-Mizellen aus den Glykoliposomen**

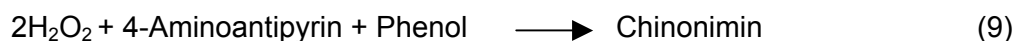
Um den Anteil an Vesikel-assoziierten Glykolipiden in Mizell-Vesikel-Mischungen und damit den Einfluss zugesetzter Zweitphospholipidkomponente auf die Lektinbindung



Von den zu bestimmenden Proben werden entsprechende Ansätze hergestellt. Alle Proben werden mit einem Vortex-Mixer 15 s geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 2700 rpm (Heraeus Biofuge 15 R, Rotor HSA 4100) zentrifugiert. Im Photometer wird die optische Dichte der unteren Chloroformphase bei 485 nm gegen den Chloroformblindwert gemessen und die Konzentration der Proben anhand der Eichkurve aus den Standards ermittelt.

### 3.2.6 Bestimmung der Galactose-Oxidase-Aktivität für Galactolipide

Die Oxidationsreaktion von Galactose-Resten in Galactolipiden durch die Katalyse mit Galactose-Oxidase wurde entsprechend [257] spektrophotometrisch erfasst. Die bei der Oxidation gebildeten Wasserstoffperoxide wurden durch die Reaktion mit 1 % 4-Aminoantipyrin und 5 %iger Phenol-Lösung sowie 1,5 mg/ml horseradish Peroxidase (HRP) reduziert und die Erhöhung der Extinktion aufgrund entstandener Chinonimine bei 500 nm für 5 min bei 25 °C gemessen.



Ein Unit Galactose Oxidase führt zur Bildung von 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  pro min bei 25 °C. Für die Errechnung der Substratkonzentration aus der Extinktion wurde der molare Extinktionskoeffizient,  $\varepsilon = 1.200 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ , benutzt. Unter Verwendung von Hanes-Woolf-Plot (Gleichung 2) wurden die katalytischen Parameter wie  $K_m$ ,  $k_{cat}$  sowie  $k_{cat}/k_m$  für die unterschiedlich gespacerten Galactolipide im HEPES Puffer (10 mM, pH 7.0) bei 25 °C ermittelt:

$$[S]/v = (1/V_{max}) [S] + K_m/V_{max} \quad (10)$$

[S] ist hier die Substratkonzentration,  $V_{max}$  die maximale Geschwindigkeit und  $K_m$  die Michaelis-Konstante ist. Die Auftragung von  $[S]/v$  gegen [S] liefert eine Gerade, bei der der Anstieg  $1/V_{max}$  ist, der Schnittpunkt mit der y-Achse  $K_m/V_{max}$  darstellt und der Schnittpunkt mit der x-Achse die  $K_m$  repräsentiert. Die experimentellen Untersuchungen der im Institut synthetisierten Galactolipide wurden in Zusammenarbeit mit der Toyama Universität, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Japan, durchgeführt.

Um die Bestimmung der GOD-Aktivität sowohl über die CMC als auch unter der CMC vorzunehmen, wurden zuvor die CMC der betreffenden Galactolipide durch die Nouy's-

Oberflächenspannungsmethode in HEPES Puffer (10 mM, pH 7.0) bestimmt. Zusätzlich dazu wurde die CMC auch mit Hilfe des Fluorophors [8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure-Ammoniumsalz (ANS), 1 $\mu$ M] bei 25 °C fluorimetrisch ermittelt. Die Versuche zur GOD-Aktivität wurden in Abhängigkeit von der Spacerlänge der verwendeten Amphiphile durchgeführt und die erhaltenen katalytischen Para-metern ( $K_m$ ,  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/K_m$ ) in beiden Fällen miteinander verglichen.

### 3.2.7 Synthetische Glykolipide

Entsprechend der Aufgabenstellung wurden im Rahmen angefertigter Promotionsarbeiten im Institut für Pharm.Chemie zwei Typen von Glykolipiden synthetisiert:

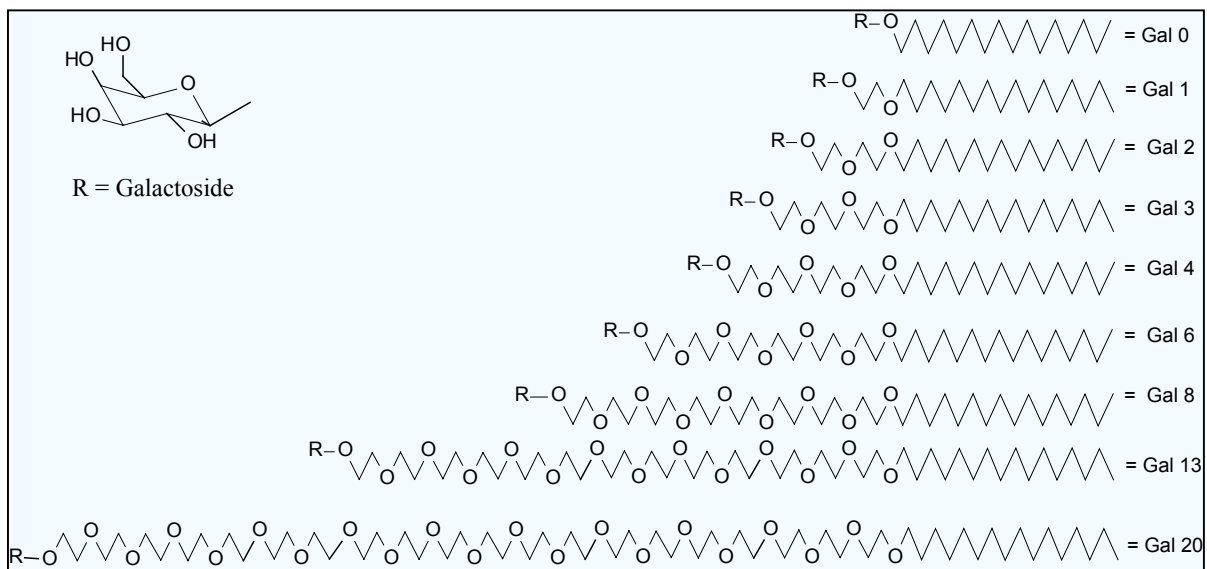


Abb. 7: I. Ethoxyspacer-assoziierte Monoacylgalactoside.

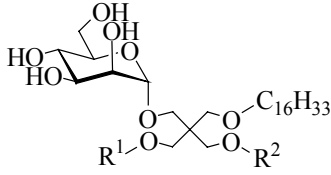
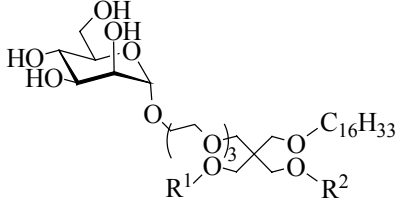
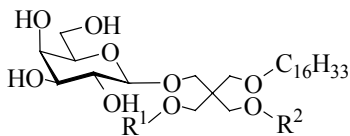
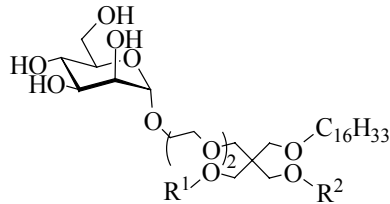
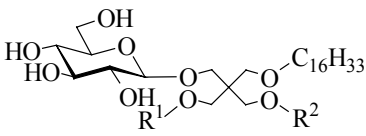
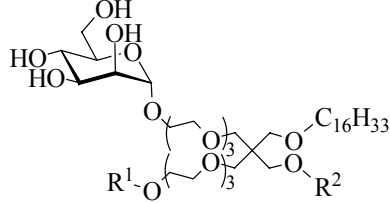
Typ I	Typ II
 <p> <b>MS 1a:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=Man  <b>MS 1b:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=H  <b>MS 1c:</b> R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H         </p>	 <p> <b>MS 4a:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=Man  <b>MS 4b:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=H  <b>MS 4c:</b> R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H         </p>
 <p> <b>MS 2a:</b> R<sup>1</sup>=Gal, R<sup>2</sup>=Gal  <b>MS 2b:</b> R<sup>1</sup>=Gal, R<sup>2</sup>=H  <b>MS 3b:</b> R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H         </p>	 <p> <b>MS 5a:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=Man  <b>MS 5b:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=H  <b>MS 5c:</b> R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H         </p>
 <p> <b>MS 3a:</b> R<sup>1</sup>=Glc, R<sup>2</sup>=Glc  <b>MS 3b:</b> R<sup>1</sup>=Glc, R<sup>2</sup>=H  <b>MS 3c:</b> R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H         </p>	 <p> <b>MS 6a:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=Man  <b>MS 6b:</b> R<sup>1</sup>=Man, R<sup>2</sup>=H  <b>MS 6c:</b> R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H         </p>

Abb. 8: II. Pentaerythritol-basierende Cluster-Neoglykolipide, welche wiederum in Typ I und Typ II eingeteilt worden sind.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1 Durchflusszytometrische Analyse der biologischen Aktivität liposomaler Neoglykolipide**

#### **4.1.1 Evaluierung der Bindungsaffinitäten an MR in Abhängigkeit von der Anzahl der Zuckerreste (Epitope) und der Länge des Abstandhalters (Spacer)**

##### **4.1.1.1 Inhibitionsstudie mittels $\alpha_1$ -AGPc-Fraktion für Cluster-Neoglykolipide vom Typ I**

Zur Evaluierung der Bindungsaffinitäten in Abhängigkeit von der Anzahl der Mannose-Reste (Miniclustern-Glykosid-Effekt) von Vesikel-assoziierten Glykolipiden, wurde eine Kompetitionsstudie mit  $\alpha_1$ -AGP durchgeführt. Dieses humane  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein (AGP) ist ein Akut-Phasen-Glykoprotein. Es enthält 43 % Kohlenhydrate, welche auf 5 N-gebundene Glykanketten pro Molekül [258] als bi-, tri- und tetraverzweigte Glykanstrukturen verteilt sind [259]. Dieses Glykoprotein kann in nichtreaktive (AGP A), schwach reaktive (AGP B) und reaktive (AGP C) Fraktionen mittels Con A-Sepharose chromatographisch separiert werden [254]. Der AGP A-Fraktion fehlt ein biantennäres Glykan. AGP B dagegen enthält eine und AGP C zwei disialylierte biantennäre Glykanstrukturen [260], was die unterschiedlichen Reaktivitäten gegenüber Glykokonjugaten erklären soll. Die Ergebnisse der Kompetitionsstudie (Abb. 9) demonstrieren, dass die Affinität der synthetisierten spacerfreien Glykolipide deutlich von deren Glykosylierungsgrad abhängt. Je höher dieser ist, desto größer ist die Affinität der Verbindung zum Mannoserezeptor, was sich in einer mit dem Glykosylierungsgrad zunehmenden Potenz zur Verdrängung von AGP<sub>C</sub> am Rezeptor ausdrückt.

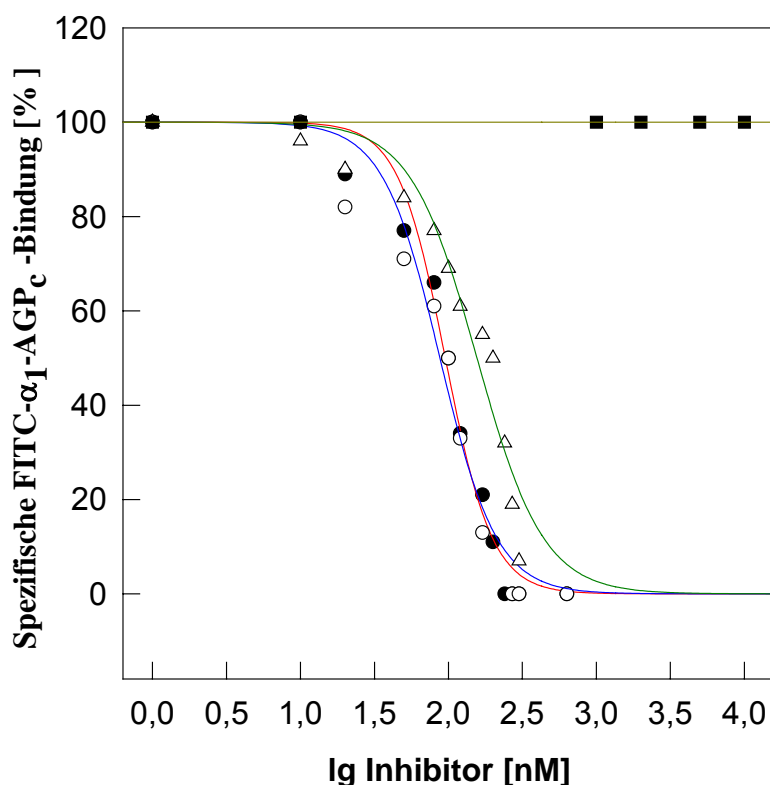


Abb. 9: Halblogarithmische Auftragung der Kompetitionsstudie der Bindung von  $\alpha_1$ -AGPc zum Makrophagen-Mannoserezeptor durch die Cluster-Neoglykolipide vom Typ I. ■ MS 1c;  $\Delta$  unmarkiertes  $\alpha_1$ -AGP c; ● MS 1b; ○ MS 1a. Die Konzentration von  $\alpha_1$ -AGP c beträgt 12,4 nM.

Während die monoglykosylierte Verbindung (MS 1c) mit einem scheinbaren  $IC_{50}$ -Wert von  $5.13 \times 10^{-4}$  M bindet, weisen die bis- und trisglykosylierten Inhibitoren viel kleinere, jedoch einander sehr ähnliche  $IC_{50}$ -Werte auf (MS 1b:  $1.54 \times 10^{-7}$  M, MS 1a:  $9.5 \times 10^{-8}$  M). Der  $IC_{50}$ -Wert für AGPc selbst liegt bei  $8.7 \times 10^{-8}$  M. Die Interpretation dieser Resultate erfolgt im Zusammenhang mit den zur Bindung und Verdrängung von t-PA erhaltenen Ergebnissen.

#### 4.1.1.2 Inhibitionsstudie mittels t-PA für Cluster Glykolipide vom Typ II

Zur Evaluierung der Bindungsaffinitäten von mannosylierten Lipiden in Vesikeln in Abhängigkeit der Anzahl der Mannose-Reste sowie der Länge der Spacer (erweitertes Motiv des Miniclusterglykosid-Effekts), wurde eine Kompetitionsstudie mit dem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) durchgeführt. Dieses t-PA ist eine körpereigene Serin-Protease mit einer molaren Masse von 70 kDa [261], die am Ende der Blutgerinnungskaskade, bei der Auflösung von Blutgerinnseln, eine wichtige Rolle spielt.



Als thrombolytisch wirksamer Arzneistoff findet sie beispielsweise nach einem myokardialen Infarkt ihre Anwendung [262]. Durch die Inhibierung ihrer MR-vermittelten schnellen Clearance aus dem Plasma durch entsprechende MR-Liganden könnte ihre Effizienz in der thrombolytischen Therapie erhöht werden [263].

Die Ergebnisse (Abb. 10, 11, 12) zeigen, dass die Inhibierung der t-PA-spezifischen Bindung und die Aufnahme durch den Makrophagenzielrezeptor mit der Anzahl terminaler Zuckerreste sowie der Länge des eingefügten Spacers korreliert. Der Vergleich der Affinitäten eingesetzter Glykoside gleichen Glykosylierungsgrades, aber unterschiedlicher Spacerlänge zeigte, dass Glykoside mit drei Spacern besser binden als Glykoside mit zwei Spacern. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass der Einfluss der Spacerlänge auf die Affinität umso ausgeprägter ist, je geringer der Glykosylierungsgrad ist, wie es  $F_A = IC_{50-2Sp} / IC_{50-3Sp}$  deutlich widerspiegelt (Tab. 3).

Tab. 3: Zunahme des kompetitiven Potentials der Inhibitoren in Abhängigkeit der 3 : 2 Spacerlänge (3sp/2sp).  $IC_{50}$ -Wert ist diejenige Konzentration, bei der die halbmaximale Inhibierung erreicht wurde; [M] Molarität

Inhibitoren	Ethoxy-Spacer	Zucker-Reste	FITC-Ligand	$IC_{50}$ -Wert/ [M]
MS 5c	2	1	r-tPA	$2,8 \times 10^{-3}$
MS 5b	2	2	r-tPA	$6,6 \times 10^{-5}$
MS 5a	2	3	r-tPA	$4,1 \times 10^{-6}$
MS 4c	3	1	r-tPA	$4,6 \times 10^{-4}$
MS 4b	3	2	r-tPA	$1,2 \times 10^{-5}$
MS 4a	3	3	r-tPA	$1,4 \times 10^{-6}$

Der  $F_A = IC_{50-2Sp} / IC_{50-3Sp}$  ist der zur Ausprägung der Affinitätsabhängigkeit von der Spacerlänge bei gleichem Glykosylierungsgrad errechnete Faktor.

Der  $F_A = IC_{50-2Sp} / IC_{50-3Sp}$  von MS 4a/MS 5a erreichte einen höheren Wert (3) im Vergleich zu dem  $F_A = IC_{50-2Sp} / IC_{50-3Sp}$  von MS 4b/MS 5b (5,5) und  $F_A = IC_{50-2Sp} / IC_{50-3Sp}$  von MS 4c/MS 5c (6,1).

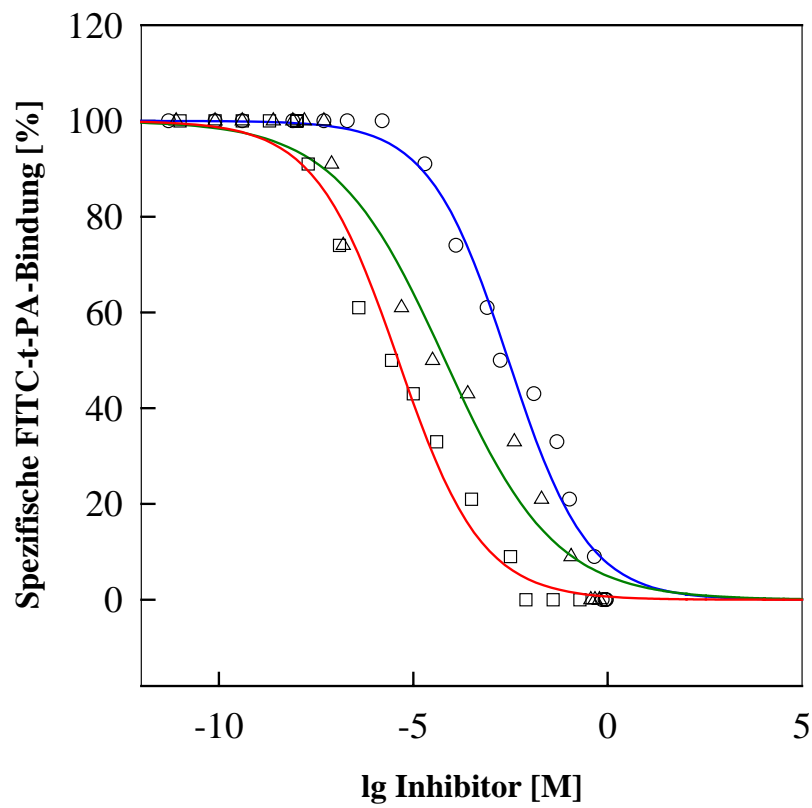


Abb. 10: Halblogarithmische Auftragung der Kompetitionsstudie der Bindung von t-PA zum Makrophagen-Mannoserezeptoren durch die Cluster-Neoglykolipide vom Typ IIa,  $\square$  MS 5a;  $\Delta$  MS 5b;  $\circ$  MS 5c. Die Konzentration von t-PA beträgt 3,2 nM.

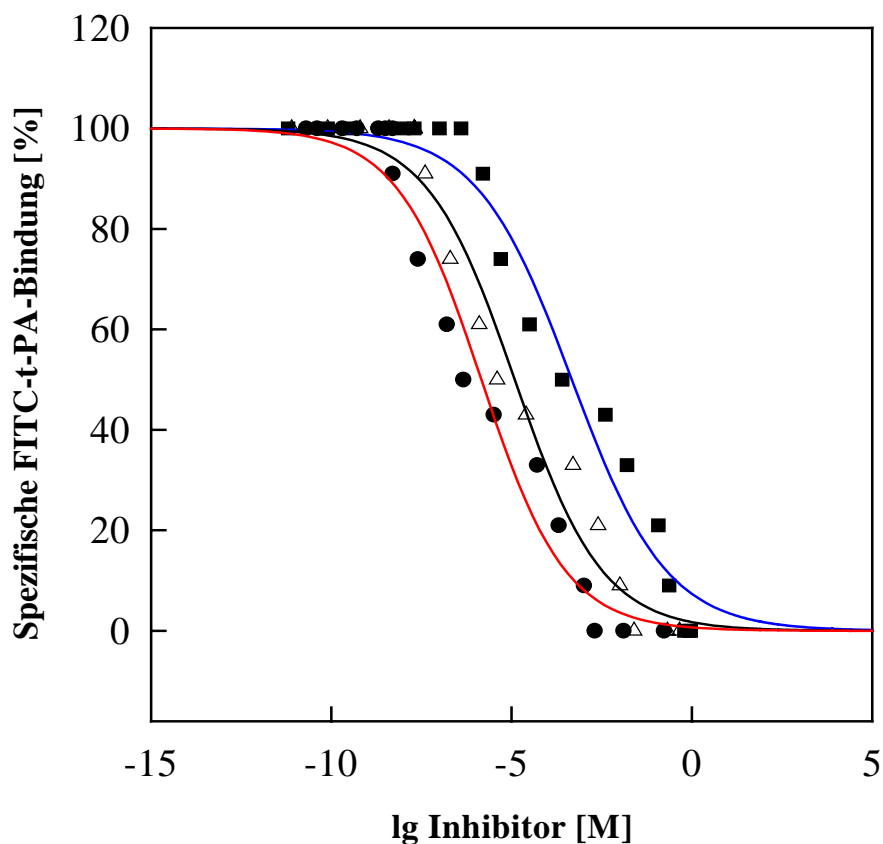


Abb. 11: Halblogarithmische Auftragung der Kompetitionsstudie der Bindung von t-PA zum Makrophagen-Mannoserezeptoren durch die Cluster-Neoglykolipide vom Typ IIb, ■ MS 4c; Δ MS 4b; ● MS 4a. Die Konzentration von t-PA beträgt 3,2 nM.

Für ähnliche Untersuchungen synthetisierten Biessen et al. [264] Cluster Mannoside auf Lysinbasis mit bis zu sechs Mannose-Resten und untersuchten deren Bindungsaffinitäten zum MR. Dabei wurde t-PA als Ligand eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass die Mannoside mit sechs Mannose-Einheiten ein Inhibierungspotential im nanomolaren (nM) Bereich hatten, während alle anderen Mannoside eine Inhibierung in mikromolaren ( $\mu\text{M}$ ) Bereich erzielten. Die Mannose als Vergleichsubstanz erreichte dagegen eine Inhibierung im millimolaren (mM) Bereich. Verantwortlich für die unterschiedlichen Affinitäten gegenüber den MR wird im allgemeinen die Topologie der acht Kohlenhydrat-enthaltenden Domänen (CRD) gemacht. Unter Verwendung von mutanten Mannoserezeptoren versuchte man die höhere Bindungsaffinität von Mannan ( $K_i$  in nM) zu klären. Man fand heraus, dass die CRD 4, 5 und 7 für diese essentielle Bindung verantwortlich

sind, da bei Fehlen von ein oder zwei dieser Domänen in den mutanten MR Mannan eine niedrige Affinität ( $K_i$  in  $\mu\text{M}$  bis zu  $\text{mM}$ ) [265] zeigte.

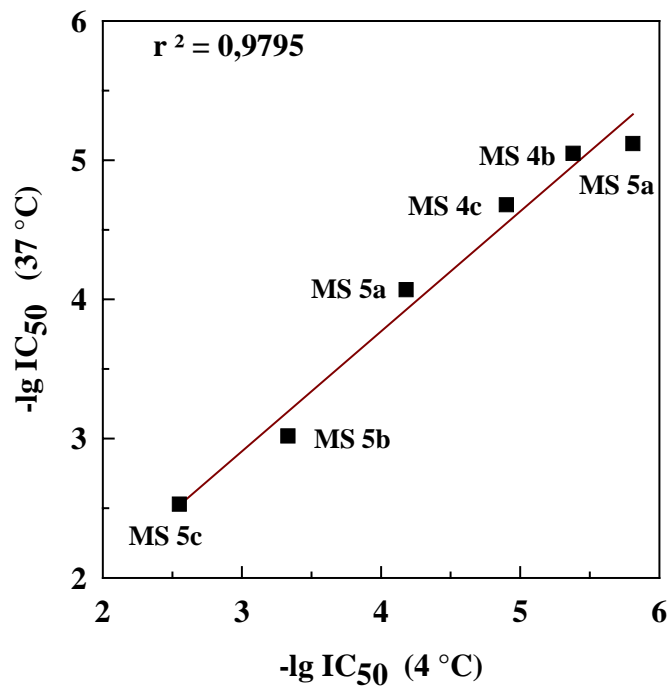


Abb. 12: Korrelation zwischen der spezifischen Bindung und der spezifischen Endozytose durch die Makrophagen-Mannoserezeptoren

Die Affinität der Monosaccharide für den MR ist sehr schwach ( $\text{mM}$ ) und ist in der Reihenfolge geordnet: D-Mannose = L-Fucose > N-Acetylglucosamin > D-Glukose > D-Galaktose > N-Acetylgalaktosamin [266]. Die Affinität der Polysaccharide für den Mannoserezeptor ist dagegen höher. Synthetische Liganden wie Mannose<sub>48</sub>-Albumin (48 Mannosemoleküle pro Albuminmolekül) und Mannose<sub>104</sub>-Polylysin zeigen ihre Affinitäten im  $\text{nM}$ -Bereich [267], während synthetische Liganden mit weniger Mannose-Resten wie Mannose<sub>5</sub>-Albumin und Polylysine mit zwei bis vier Mannose-Resten [268] niedrigere Affinitäten erreichen ( $\mu\text{M}$ ).

Isolierte Glykopeptide mit triantennären Oligosacchariden, die einen hohen Mannoseanteil aufweisen, haben Affinitäten in  $\mu\text{M}$ -Bereich. Bei Glykopeptiden mit diantennären Oligosacchariden gleichen Mannoseanteils kann nicht mal die Endozytose nachgewiesen werden [269]. Ferner wurde die Rolle der Spacerlänge bei gleichbleibendem

Glykosylierungsgrad untersucht. Triantennäre Oligosaccharide mit langen Antennen waren in der Lage, die Antigenpräsentation durch die Makrophagen in nM zu inhibieren während triantennäre Oligosaccharide mit kürzeren Antennen ihre Affinitäten nur in  $\mu\text{M}$  zeigten [270].

#### **4.1.2 Untersuchungen zu Endozytose-Charakteristika an humanen Perikard-Makrophagen**

##### **4.1.2.1 Einfluss von Mannoserezeptor modulierenden Substanzen auf die MR-vermittelte Liganden-Aufnahme**

Verschiedene Substanzen führen entweder zur Steigerung oder Erniedrigung der MR-Expression, welche hierbei zur Determinierung der spezifischen Wechselwirkung der GL mit dem Ziel-Rezeptor Anwendung finden können. Downregulierend wirken vor allem IL-4 [271], IL-13 [272], Prostaglandin E2 [273] und Dexamethason [274]. Bacillus Calmette Guerin [275], Lipopolysaccharide, [276], Oxidanzien [277], Interferon- $\gamma$  [278] und eine Kombination von IL-1 und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  [279] dagegen upregulieren die Expression vom MR.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss folgender Substanzen auf die spezifische Rezeptor-vermittelte Ligandeninternalisierung untersucht: der Immunsuppressor Dexamethason (DEX) und Immunaktivatoren wie Lipopolysaccharid (LPS) und IL-4. Humane Perikard-Makrophagen wurden für 5 – 7 d ohne (Kontrolle) und mit 0.4  $\mu\text{g/ml}$  DEX bzw. 0.4  $\mu\text{g/ml}$  LPS kultiviert, anschließend mit „only outside“ FITC-gelabelten DPPC/Chol/Man (7,5 Mol%) – Liposomen (200 nm) für 90 min. bei 37 °C in An- und Abwesenheit des spezifischen, polymannosylierten Inhibitors (Mannan) inkubiert und zweimal gewaschen. Durch einen FITC-Quencher (Firma Oregon) wurde der an den Zelloberflächen adsorptiv gebundene, nichtinternalisierte Anteil, welcher falsch-positive Messwerte vortäuschen würde, in die Ergebnisse nicht mit einbezogen. Das Säurebedingte Quenchen der Quantenausbeute der FITC-gelabelten Vesikel in intrazellulären Kompartimenten wurde durch die Postinkubation bei 4 °C für 30 min. mit einem Ionophor (50  $\mu\text{M}$  Monensin) wiedererhalten. Der gleiche Versuch wurde auch mit der NBD-Dithionit/Technik ohne Einsatz des Ionophors durchgeführt.

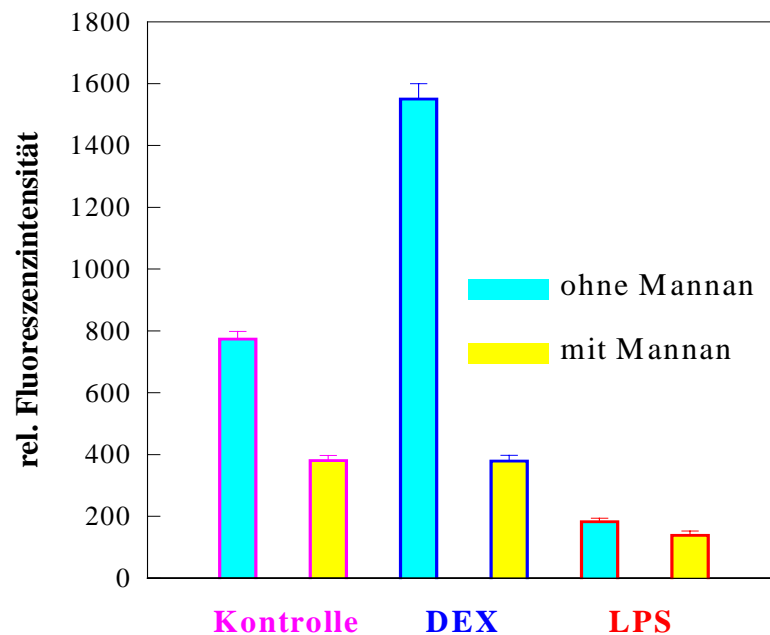


Abb. 13: Effekt von Dexamethason (DEX) und Lipopolysaccharid (LPS) auf die MR-vermittelte Aufnahme durch die Makrophagen. Die Kontrolle wurde ohne die Zusätze beider Agenzien durchgeführt.

Die beiden verwendeten Substanzen (Abb. 13) zeigen dabei einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Internalisierung. Während die totale Ligandenaufnahme (ohne Mannan) durch DEX auf das Zweifache heraufreguliert wurde, zeichnete sich eine Vierfache Herunterregulierung der Aufnahme mit LPS ab. Ferner nahm die Mannan-inhibierbare Aufnahme mit LPS um das 2,5fache ab, wogegen die Mannan-inhibierbare Aufnahme mit DEX unbeeinflusst blieb. Diese Phänomene bringen nachhaltig zum Ausdruck, welchen Einfluss die Regulierung der Rezeptorexpression mit Hilfe exogener Agenzien auf die rezeptorspezifische Liganden-Aufnahme durch die Makrophagen haben, denn die unspezifische Aufnahme blieb in beiden Fällen unberührt.

#### 4.1.2.2 Vergleichende Studien zur t-PA Bindung, Internalisierung und zum intrazellulären Abbau durch humane Monozyten/Makrophagen

Hierfür sollte der Einfluss der in vitro stattfindenden Differenzierung MR-negativer, aus buffy coats isolierter Monozyten zu den Rezeptor-exprimierenden Makrophagen auf die

drei oben erwähnten Prozesse im Rahmen der t-PA-Zielrezeptor-Spezifitätsstudie untersucht werden.

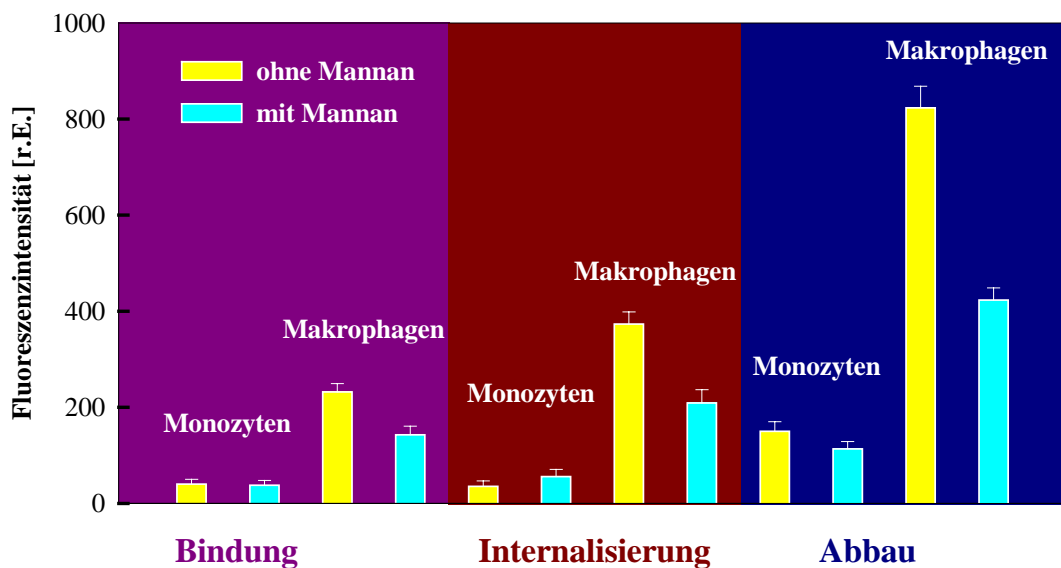


Abb. 14: Vergleichende Darstellung von t-PA-Bindung, Internalisierung und Abbau durch in Kultur zu Makrophagen differenzierte Blut-Monozyten. Die Kultivierung der Monozyten für einen Tag diente ausschließlich als Kontrolle zur MR-Expression.

Die Zellen wurden einen Tag bzw. fünf Tage kultiviert und unmittelbar mit bzw. ohne Mannan-Vorinkubation für 2 h bei 4 °C (Bindung) oder 6 bzw. 17 h bei 37 °C (Aufnahme und Abbau) mit dem FITC-t-PA inkubiert, danach 2 x gewaschen und anschließend am FACS-Gerät vermessen. Die Bestimmung des Abbaus erfolgte entsprechend der TCA-Präzipitationsmethode. Durchschnittlich nahmen die in der Hierarchie aufeinanderfolgenden Prozesse (Bindung, Aufnahme und Abbau) (Abb. 14) mit der Kultivierungszeit zu. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Bindung, Internalisierung und der Abbau der für einen Tag kultivierten Monozyten im Gegensatz zu den differenzierten Zellen durch den Rezeptor-spezifischen Liganden (Mannan) nicht inhibiert werden kann, womit letztendlich die spezifische Wechselwirkung mit dem Zielrezeptor belegt wurde.

#### 4.1.2.3 Aufklärung des Mechanismus der Ligandenaufnahme

Zur Aufklärung des Mechanismus der Liganden-Internalisierung wurde der Einfluss des energetischen Potentials der Zellen (Zellmetabolismus) sowie der an der Phagozytose beteiligten intakten Actin-Filamente des Zytosklettes der Zelle auf die Liposomen-Zelle/Interaktion untersucht. Dazu wurden Makrophagen mit den Agenzien 2-Desoxyglucose, Natriumazid, Dinitrophenol (DNP) und Cytochalasin B für 15 min

präinkubiert und danach den Liposomen zugesetzt. 2-Desoxyglucose, ist ein kompetitiver Antagonist der Glucose. Es kann zwar von Zellen aufgenommen werden, ist aber in den Zellen kein ATP-Bildner. Natriumazid inhibiert die Funktion der Cytochrom-Oxidase in der innermitochondrialen Membran, wodurch eine Blockade der oxidativen Phosphorylierung hervorgerufen wird und damit konsequenterweise die chemische Energie in Form von ATP verloren geht. Beide Substanzen wirken als Endozytose-Inhibitoren [280]. Cytochalasin B ist ein fungizider Metabolit, welcher an das Plus-Ende eines Actin-Stranges bindet und damit so dessen weiteres Wachstums verhindert. Es kann daher als Actin-Inhibitor verwendet werden [281], der die Phagozytose und Pinozytose, jedoch nicht die rezeptorvermittelte Endozytose blockiert.

Zur Evaluierung des Effekts von metabolischen Inhibitoren auf das Ausmaß der Internalisierung wurden drei Typen von Liposomen eingesetzt: Kontroll-Liposomen (nicht-glykosylierte), unspezifische Liposomen (galactosylierte) sowie rezeptorspezifische Liposomen (mannosylierte). Die unterschiedlichen Typen von Liposomen, welche ausschließlich an der äußeren Monolayer mit dem NBD-PE markiert waren, wurden nach deren Target-Bindung und der darauf folgenden Behandlung mit dem NBD-Quencher Dithionit durchflusszytometrisch analysiert. Die verbliebene NBD Fluoreszenz repräsentierte die eigentliche Internalisierungsrate. Die Fluoreszenz von unbehandelten Zellen nach der Inkubation mit mannosylierten Liposomen diente als 100-%-Bezugswert.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Präinkubation der in Kultur zu Makrophagen differenzierten Blut-Monozyten mit 2-Desoxyglucose und Natriumazid eine substantielle Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenz der mannosylierten Liposomen (Abb. 15) im Verhältnis zu den unbehandelten Vesikeln (Kontroll-Liposomen) zur Folge hatte, was auf einen energieabhängigen Prozess zurückzuführen ist. Die Präinkubation der Zellen mit Zytochalasin B führt nur zu einer sehr geringfügigen Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenz mannosylierter Vesikel.



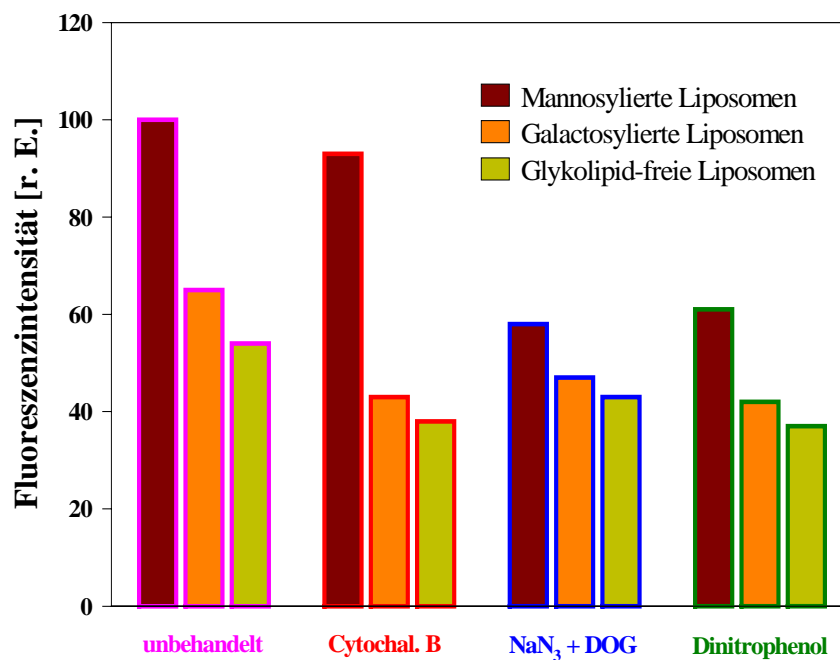


Abb. 15: Effekt von metabolischen Inhibitoren auf die zelluläre Aufnahme von Liposomen durch in Kultur zu Makrophagen differenzierte Blut-Monozyten. Symbole: NaN<sub>3</sub> Natriumazid; DOG Desoxy-Glukose; Cytochal. B Cytochalasin B. Der Glykolipid-Anteil von MS 2b und MS 1b beträgt 7 Mol%. Die totale Liposomen-Konzentration beträgt 12µmol/ml.

Die Resultate demonstrieren auch, dass die Aufnahme von allen Liposomentypen durch die Supprimierung der ATP-Bildung nicht total inhibierbar ist. Spontane, nichtenergieabhängige Prozesse, wie Membran-Fusionen der Liposomen und Zell-Membranen könnten daher eine bedeutende Rolle bei der Ligandenaufnahme gespielt haben. Die Beteiligung unspezifischer Mechanismen an der Aufnahme Mannose-tragender Liganden zeigen auch die Bindungs- und Verdrängungsstudien an FITC-markierten MS-A/I-Liposomen. Die gebundenen Vesikel konnten nur in geringem Maße und erst durch einen erheblichen Überschuss an nichtmarkierten Vesikeln des gleichen Typus verdrängt werden. Unmannosylierte Vesikel wurden dagegen relativ gut verdrängt, was darauf hinweist, dass neben spezifischen auch unspezifische Prozesse beteiligt sind.

Um zu analysieren, ob Rafts oder coated pits an der Aufnahme verwendeter Liposomen beteiligt sind, untersuchten wir, ob der MR an der Membranoberfläche in Rafts existiert.

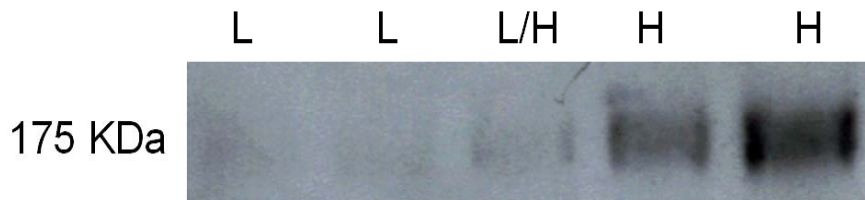


Abb. 16: Immunoblotting vom Mannose-Rezeptor der Monozyten/Makrophagen. Proben von Membran-proteinen (10 µg) wurden elektrophoretisch separiert und geblottet. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit dem Anti-Mannose-Rezeptor mAb detektiert. (L) low density fraction; (H) high density fraction.

Dazu wurden Zellen zuerst mit einem Detergens lysiert, danach die Membranfraktionen mit Zuckergradienten isoliert und anschließend durch Western Blot analysiert. Die leichten Mizellen-reichen Protein/Fett-Fraktionen befinden sich in den niedrigen Dichten des Gradienten. Dagegen sind in den höheren Dichten nicht fetthaltige schwere Membranproteine, die durch Triton X-100 herausgelöst wurden. Raftproteine sind resistent gegen Triton X-100 bei 4 °C. Wie aus Abb. 16 ersichtlich ist, befindet sich der MR nicht in solchen Mikrodomänstrukturen, da er in den tritonlöslichen hohen Zuckerdichte-Fraktionen detektiert wurde. Unsere Ergebnisse sprechen also gegen eine Raft-assoziierte Endozytose des Mannoserezeptors.

#### 4.1.2.4 Verbleib liposomaler Inhalte in interzellulären Kompartimenten

Das Schicksal des in PC/PS/Man-Liposomen verkapselten FITC-BSA nach der Bindung und Internalisierung durch die MR-positiven Makrophagen wurde mit Hilfe der TCA-Präzipitationsmethode spektro-fluorimetrisch verfolgt. Die beachtliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Abb. 17) der Säure-unlöslichen Fraktion nach der Proteasebehandlung bedeutet, dass diese Fraktion nicht abgebautes bzw. nur partiell abgebautes, höhermolekulares Material enthält. Keine Signalveränderung in der Säure-löslichen Fraktion deutet dagegen auf eine zumeist aus kleinen Fluoreszein-gelabelten Peptidfragmenten bestehende Fraktion hin. Demzufolge wurden die Liposomen von den Makrophagen receptorspezifisch endozytiert und als Folge des Leakage ihr Inhalt in die Lysosomen abgegeben.

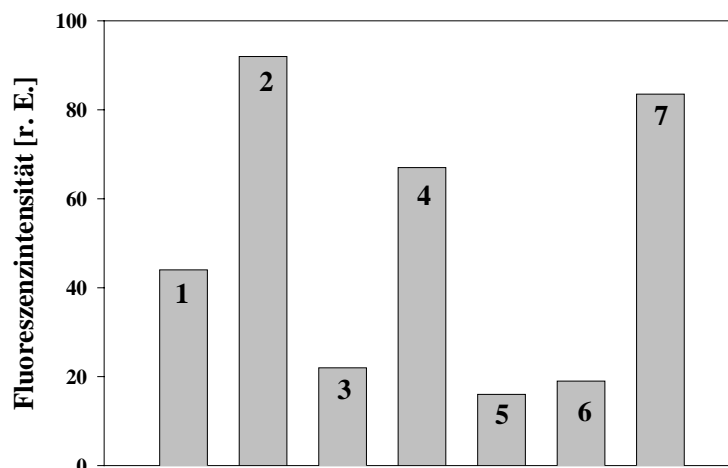


Abb. 17: Analyse der Zell-Fluoreszenz der Komponente durch TCA-Präzipitation der Zellysate.

1. Zellysate
2. Zellysate + Pronase
3. Säure-unlösliche Fraktion
4. Säure-unlösliche Fraktion + Pronase
5. Säure-lösliche Fraktion
6. Säure-lösliche Fraktion + Pronase
7. 0,37µg/ml FITC-markiertes Albumin + Pronase als vergleichende Kontrolle

## 4.2 Auswirkung des Serums und MBP auf die rezeptor-spezifische Aufnahme von Glykoliposomen

Der erstbestimmende Schritt der Liposomenaufnahme durch die jeweiligen Zellen ist deren Interaktionen (Opsonisierung) mit den sich im Serum befindlichen Proteinen. Je nach den Erkennungsstrukturen auf der Vesikeloberfläche wird abhängen, ob und mit welchen Protein-Typen die Liposomen bevorzugt interagieren und damit ihr Schicksal bestimmt wird.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir sowohl den Effekt der Serum-Konzentration als auch, ob und in welchem Ausmaß sich die Vesikel-Aufnahme vom Serum-Mannose-bindenden Protein (S-MBP) beeinflussen lässt. MBP ist ein 65.000 Dalton C-Typ Lektin, das Mannose und N-Acetylglukosamine [282] zahlreicher Mikroorganismen erkennt und deren Phagozytose einleitet sowie die HIV-Infektion durch die Bindung an das hochmannosylierte Oberflächen-Oligosaccharid gp 120 zu inhibieren vermag [283].

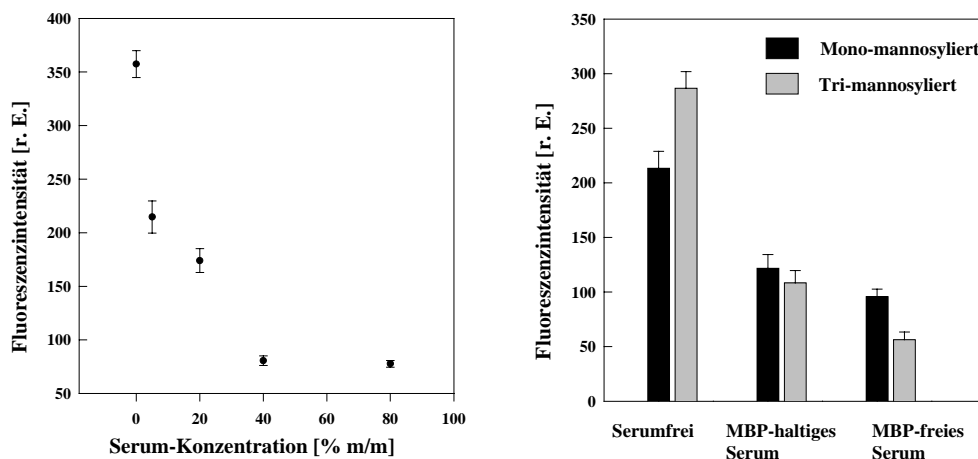


Abb. 18: Links: Effekt der Präinkubation von triamannosylierten Glykolipiden (MS 4a) in Liposomen mit verschiedenen Konzentrationen von Serum auf die zelluläre Aufnahme durch perikardiale Makrophagen.

Rechts: Effekt vom MBP-freien und MBP-haltigen Serum auf die zelluläre Aufnahme von mono- und tri-mannosylierten Glykolipiden (MS 4c und MS 4a) in Liposomen durch Makrophagen der perikardialen Flüssigkeit. 7 Mol% MS-4/B-haltige Liposomen (14  $\mu$ mol/ml) wurden für 10 min bei 37 °C mit dem Serum vorinkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle mannosylierten Liposomen (Abb. 18) ein signifikanter Rückgang der Aufnahme durch die Makrophagen mit zunehmender Serumkonzentration zeigen und dass der S-MBP einen großen Einfluss darauf hat. Eine drastische Abnahme der Aufnahme war vor allem bei den mit MBP-freiem Serum präinkubierten MS 4a-haltigen Vesikeln deutlich erkennbar, was auf eine extensive Involvierung der in Form

eines Blumenstraußes geclusterten CRD des S-MBP bei der Aufnahme hochmannosylierter Glykolipide durch die Makrophagen deutet.

### 4.3 RCA120-induzierte Agglutination von galactosylierten Liposomen in vitro

#### 4.3.1 Einfluss der Oberflächen-Zuckerdichte auf das Ausmaß der Agglutination

Die äußere Oberfläche der Zellen ist mit diversen Kohlenhydrat-Strukturen ummantelt, die kovalent an membranständigen Lipiden gebunden sind, so genannte Glykolipide, welche durch ihre Wechselwirkung mit Kohlehydrat-bindenden Proteinen (Lektine) eine wesentliche Rolle bei Zell/Zell-Erkennungsprozessen spielen. Zur Erkennung der Zuckerreste sind neben der Zugänglichkeit der Zuckerkopfguppen im Membranmantel wahrscheinlich Cluster, also lokale Entmischungen entlang der äußeren Monolayer der Doppelschichten durch laterale Phasen-Separation erforderlich. Eine Erhöhung der Oberflächendichte der Glykolipide ist daher für die Mischbarkeit, für die Wechselwirkung zwischen den Kopfgruppen der Phospholipide und Zuckerresten, für die Wechselwirkung zwischen den Zuckerresten und für die Hydratation entscheidend. Um dieses Phänomen auf die Lektin-Glykolipid/Wechselwirkung übertragen zu können, wurde am Modell Gal 1/9 in /DOPC die Glykolipid-Konzentration im Vesikel-Gemisch steigend variiert und die **AC<sub>50</sub>**\* ermittelt.

---

\* **AC<sub>50</sub>** ist diejenige Lektin-Konzentration, die erforderlich ist, um eine halbmaximale Agglutination der Vesikel (50 %) zu induzieren.

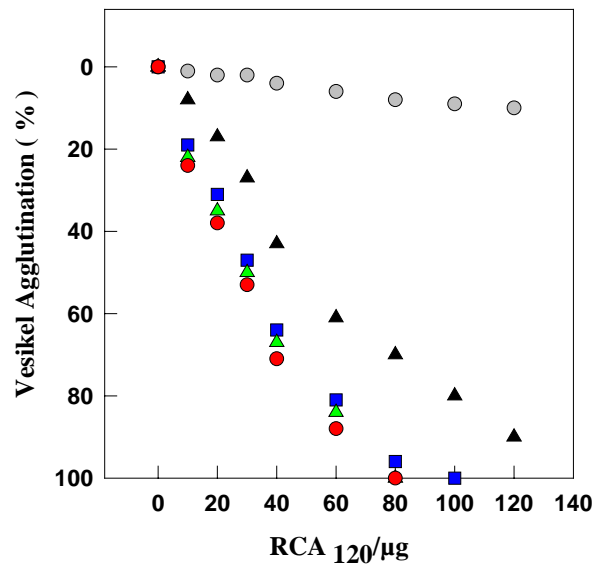


Abb. 19: Effekt der Oberflächen-Dichte des Glykolipids (Gal 1/9) in PC-Vesikeln auf die Agglutination durch das RCA<sub>120</sub>; ○ 7, ▲ 14, ▲ 20, ■ 25, ● 35 Mol%

Wie aus Abb. 19 hervorgeht, führte die Erhöhung der Galactolipid-Oberflächendichte in PC-Vesikeln zu deren extensiver Agglutination durch das spezifische Lektin RCA<sub>120</sub>. Die Vesikel wurden je nach Mol% Galactosid in Vesikeln unterschiedlich agglutiniert. Mit steigender Galactosid-Dichte in PC-Vesikeln wurde die zur halbmaximalen Agglutination der Vesikel benötigte RCA<sub>120</sub>-Konzentration immer geringer, was auf eine wahrscheinliche Anreicherung der Galactoside (Clusterung) in Galactosid-reichen Arealen innerhalb der äußeren Monolayer der Galactosid-PC/Doppelschichten deutet. Diese Art von Konzentrations-induzierten Clusterung von Glykolipiden innerhalb des Grundmatrix könnte jedoch u. a. zur Desintegrität der Vesikel führen und haben somit als Erkennungsstrukturen im Drug Targetingskontext für moderne Arzneiformen keine Bedeutung.

#### 4.3.2 Einfluss amphiphiler Additiva biologischer Relevanz auf das Ausmaß der Agglutination

Wasserzugängliche Schichten der biologischen Membranen werden in ihren Eigenschaften ganz entscheidend durch Wechselwirkungen der Kopfgruppen der Phospholipide mit Lipiden beeinflusst, die Hydroxygruppen enthalten. Wasserstoffbrücken zwischen den

Hydroxygruppen und Kopfgruppen der Phospholipide beeinflussen vor allem die Menge des gebundenen Wassers. Da Glykolipid/Lektin-Interaktionen insbesondere wasserabhängige Reaktionen sind, könnte für die Kohlenhydrat-Erkennung ferner neben der Oberflächendichte der Glykolipide, der Anzahl der Zuckerreste und der Länge des Spacers auch die effektive Größe der Kopfgruppe der die Glykolipide umgebenden Phospholipide und damit die Hydratisierbarkeit von essentieller Bedeutung sein. Neben PC ist PE das am meisten verbreitete natürlich vorkommende Lipid. Beide Lipid-Typen differieren in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Phasenübergangstemperaturen und der Fähigkeit, in Wasser lamellare Strukturen zu bilden [284]. Das PE hat die große Neigung, unter physiologischen Bedingungen  $H_{II}$ -Phasen zu bilden [285]. Weiterhin herrschen extensive Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen vom PE und den Phosphatgruppen des benachbarten PE. Als Folge dessen kommt es zur Reduzierung der Kopfgruppen-Größe und somit zur signifikanten Abnahme der Hydratisierbarkeit. Diese Differenzen könnten daher eine interessante Rolle bei der Glykolipid-Lektin Wechselwirkung in Vesikel-Gemischen spielen. Zu diesem Zweck wurden die Experimente in Abhängigkeit der Spacerlänge der zu untersuchenden Galactoside durchgeführt. Dazu kommen Gal 1/9 und Gal 1/3 zum Einsatz.

Das Galactosid (Gal 1/3) wurde wie beim Galactosid (Gal 1/9) in PC-Vesikel in einer Konzentration von 7 Mol% inseriert, bei der nur eine anfängliche Agglutination der Vesikel (kritischer Konzentrations-Effekt) erfolgte. Während bei Gal 1/9 (Tab. 4) durch PE-Zusatz als Zweitphospholipidkomponente keine weitere Induzierung einer effektiven Agglutination der Vesikel hervorgerufen werden konnte, zeigt sich mit Gal 1/3 (Abb. 20) eine signifikante Zunahme der Agglutination.

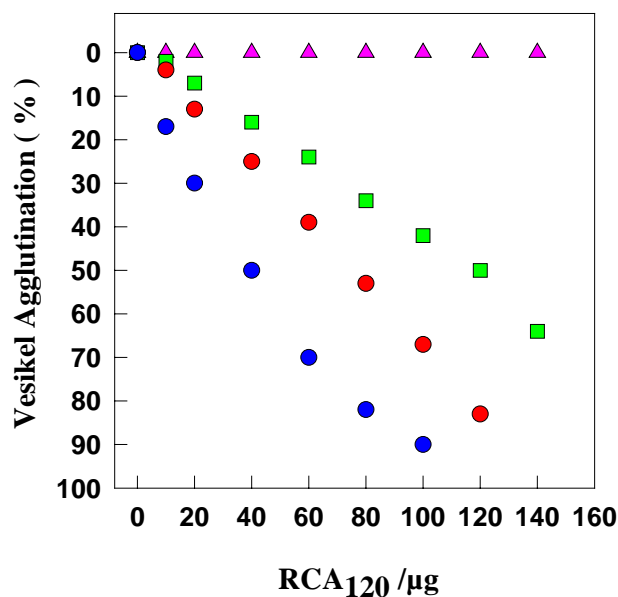


Abb. 20: RCA<sub>120</sub>-induzierte Agglutination zwitterionischer Lipidvesikel, welche unterschiedliche Anteile an Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) enthalten. Die Vesikel enthalten 7 Mol% an Gal 1/3 als spezifisches Glykolipid; ▲ PC; ■ PC:PE (70:23), ● PC:PE (60:33); ● PC:PE (46,5:46,5).

Tab. 4.: Agglutination des Galactolipids (Gal 1/9) in Phospholipid-Vesikel durch das Ricinus communis Agglutinin<sub>120</sub>. Fehlende Sensitivität der Lektin-Bindung zu den umgebenden Phospholipid-Kopfgruppen-Strukturen. Die Vesikel enthalten 7 Mol% an Gal 1/9 als das spezifische Glykolipid.

Phospholipid-Zusammensetzung	RCA <sub>120</sub> , AC <sub>50</sub> [µg/ml]
DOPC	32 ± 3
DOPC : PE (1:1)	33 ± 2
DOPC : DOPS (1:1)	35 ± 4
DOPC : DOPG (1:1)	31 ± 2
DOPC : DOPI (1:1)	30 ± 3
DOPC : DOPA (1:1)	31 ± 2

Diese Resultate (Tab. 4) bringen zum Ausdruck, dass Galactoside mit längerem Spacer-Arm (Gal 1/9) aus der Membranebene herausragen und somit nicht direkt mit den PL-Kopfgruppen interagieren, wodurch die Lektinbindung unsensitiv durch umgebende Phospholipid-Komponente blieb. Im Gegensatz dazu wurde bei Gal 1/3 (Abb. 20) eine deutliche Erhöhung der Agglutination als Maß der Sensitivität der Lektinbindung an Glyko-



lipide mit kürzerem Spacerarm von den umgebenden Zweitphospholipidkomponenten indiziert. Dies bedeutet, dass diese Galactoside direkt mit den Kopfgruppen der Phospholipide wechselwirken.

Phospholipid-Kopfgruppen von PC und PE weisen einen unterschiedlichen Grad an effektiver Größe und effektivem Hydratisierungsvermögen auf.

Rand und Mitarbeiter [286] haben die Abstoßungskraft bestimmt, welche sich zwischen Phospholipidschichten entwickelt, wenn diese einander nähern. Sie ordneten den steilen Anstieg der Abstoßungskraft bei einer Entfernung der Doppelschichten von 15 – 30 Å dem Hydratationswasser zu. Die Hydratationshülle mit einer diffusen Außengrenze wurde als 10 – 20 Å dicke für PC und als 6 – 8 Å für PE Doppelschichten gefunden [287]. Diese starkhydratisierten PC würden daher erwartungsgemäß die Lektinbindung stören. Auch die Substitution des Oleoyl-PC durch das etwas rigidere DMPC erbrachte keine anderen Resultate. Eine Alternative zur obigen Erklärung könnte darin bestehen, dass PE-Lipide zur Induzierung von Clusterungen in PE-reichen und PE-armen Regionen befähigt sind [288]. Glykolipide mit den kürzeren Spacerlängen könnten daher durch H<sub>2</sub>-Brückenbindungen mit PE-Molekülen eine intensivere Wechselwirkung aufweisen als mit PC-Lipiden und das könnte der Grund sein, weshalb die Affinität der Gal 1/3 zum RCA<sub>120</sub> in Anwesenheit von PE-Lipiden höher geworden ist. Zum Nachweis einer möglichen lokalen Entmischung innerhalb des Bilayers wurde die Rastkraftelektronen-Mikroskopie angewandt (Anhang A 3).

#### **4.3.3 Einfluss separater Faktoren auf die Lektin-induzierte Agglutination in Phospholipid-SAP/Glykolipid-Gemischen**

Geladene Lipide (SAP) stoßen sich in der Regel elektrostatisch ab, so dass sie in den Liposomen relativ homogen verteilt sind. Zusatz von divalenten Kationen insbesondere Ca<sup>2+</sup> und polyvalenten Elektrolyten können die Clusterung der geladenen Lipidspezies durch Phasen-Separationen innerhalb der Bilayer hervorrufen [289]. Das meist physikochemisch untersuchte SAP ist das PS in Mischungen mit neutralem Lipid (PC) und nach Zusatz von Ca<sup>2+</sup>. Es handelt es sich um eine Phasen-Separation, wobei „Domänen“ der Gel-PS- Ca<sup>2+</sup>-Komplexe neben fluiden Domänen des PC gebildet werden. Die Existenz derartiger und anderer Domänen in Bilayer-Membranen hat besondere Konsequenzen für die Protein-Liposom/ Interaktion, für Arzneistoff-Permeation durch die Membran sowie die generelle Stabilität der Lipid-Vesikel. Glykolipid-Lektin-

Wechselwirkung in Vesikel-Systemen, in denen der PC-Grundmatrix saure, anionische Lipide (SAP), wie PS, PG, PI sowie PA zugesetzt sind, könnten daher durch den Zusatz von zweiwertigen-Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und pH-Verschiebungen sehr beeinflussbar sein.

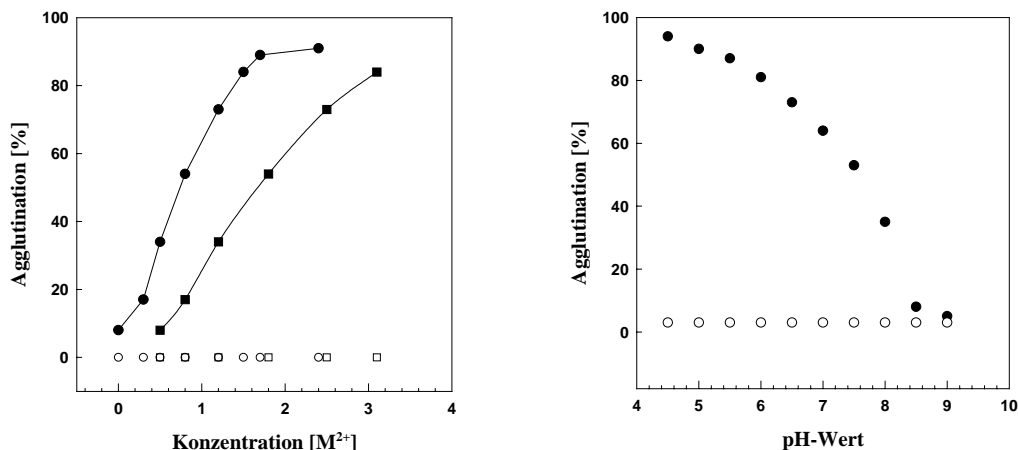


Abb. 21: Links: Effekt von zweiwertigen Kationen auf die Lektin-induzierte Agglutination von Gal 1/3 (7 Mol%) in PA : PC (1 : 1)-Vesikeln. [■  $\text{Mg}^{2+}$ ; ●  $\text{Ca}^{2+}$  mit  $\text{RCA}_{120}$  (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); ○  $\text{Ca}^{2+}$  und □  $\text{Mg}^{2+}$  ohne  $\text{RCA}_{120}$ ]. Die Konzentration der beiden zweiwertigen Kationen ist in Millimolar angegeben.

Rechts: Effekt der pH-Verschiebung auf die Lektin-induzierte Agglutination von Gal 1/3 (7 Mol%) in PA : PC (1 : 1)-Vesikeln. [● mit  $\text{RCA}_{120}$  (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); ○ ohne  $\text{RCA}_{120}$ ].

Die Ergebnisse (Abb. 21) zeigen, dass im Falle von (Gal 1/3) sowohl durch den Zusatz von zweiwertigen Kationen als auch durch die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich eine deutliche Zunahme der Agglutination erfolgt. Dagegen zeigt sich in Tabelle 4, dass auch mit Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$  und pH-Verschiebungen bei den Gal 1/9-enthaltenden SAP-Vesikeln keinerlei nennenswerte Änderungen in der Agglutination erreicht werden konnte. Darüber hinaus war die Zunahme durch  $\text{Ca}^{2+}$  höher als die durch  $\text{Mg}^{2+}$ , was die physikochemisch behauptete Clusterung von SAP durch  $\text{Ca}^{2+}$  reflektiert.

Die Agglutination (Abb. 21) nahm mit abnehmendem pH-Wert zu. Das ist vermutlich auf das chemische Verhalten von Phosphatidsäure zurückzuführen. Phosphatidate unterliegen bekannterweise einer Protolyse mit einem scheinbaren pKa in der Nähe des neutralen pH-Wertes [290]. Unterhalb des pKa-Wertes (in der monovalenten Form) weist Phosphatidsäure einen höheren  $T_m$ -Wert auf als bei oder oberhalb des pK-Wertes [291]. Einer der Gründe hierfür liegt darin, dass eine einfach geladene Kopfgruppe weniger hydratisiert ist (und damit weniger voluminös) als die doppelt geladenen Phosphatgruppen. Die gezeigten Ergebnisse sind also in Übereinstimmung mit der Reduzierung der Kopfgruppengröße durch Protonierung.

Die erhaltenen Resultate haben auch Parallelitäten zum biologischen System: z.B. wird die Con A-induzierte Sezernierung aus den Mastzellen durch Phosphatidylserin (PS) verbessert [292] und kann hierbei mit der PS-verbesserten Agglutination der mannosylierten Vesikel durch Con A bzw. der galactosylierten Vesikeln durch RCA<sub>120</sub> gleichgesetzt werden. Zahlreiche Hormone und Toxine, wie Thyrotropin [293], Abrin und Ricin sowie Cholera toxin [294] und Diphtheriatoxin [295] binden alle an membranäre Kohlenhydratstrukturen. Diese spezifische Bindung ist auch durch negativ geladene Lipide [296] und durch Ca<sup>2+</sup> abhängig [297].

#### 4.4 Bestimmung der GOD-Aktivität in mizellarer Lösungen von Galacto-Monoacylglykolipiden

Galactose-Oxidase (GOD) oxidiert primäre Hydroxygruppen von nichtreduzierenden, terminalen Galactose- und N-Acetyl-Galactosamin-Resten zu Aldehyden [298]. Die Zugänglichkeit des Enzyms zu den Glykolipiden variiert je nach der Glykolipid-Architektur [299-302]. Um den Einfluss der Spacer auf die enzymatische Erkennung zu evaluieren, wurden zuvor die CMC der Galactolipide bestimmt und danach die kinetischen Parameter in mizellarer sowie nichtmizellarer Lösungen bestimmt. Graphische Darstellungen nach Hanes-Woolf-plot werden in der Anlage 1 gezeigt.

Die CMC (Tab. 5) nahm mit verlängerter Spacerlänge zu und erreichte eine 50fache Erhöhung bei einem 20gliedrigen Spacer. Eine Korrelation mit der fluoremetrischen Bestimmung konnte dabei festgestellt werden. Graphische Darstellungen der CMC-Bestimmungen mit der Oberflächenspannungsmethode werden in der Anlage 2 gezeigt.

Tab. 5: Bestimmung der CMC-Werte unterschiedlich gespacerter Galactolipide durch die Oberflächen-spannungsmethode, a = fluorimetrisch erhaltene CMC's.

Spacer	1	2	3	6	9	13	20
CMC (µM)	42	92	148	490	1103	1580	2280
	54 <sup>a</sup>	107 <sup>a</sup>	166 <sup>a</sup>				

Tab. 6: Katalytische Parameter der GOD für synthetische Monoacyl-Galactolipide.

<b>I. Oberhalb der CMC</b>				
<b>Spacer</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>20</b>
<b><math>K_m</math> (mM)</b>	0,064	0,19	0,4	2,0
<b><math>k_{cat}</math> (mM.mL/min.unit)</b>	0,007	0,029	0,065	0,088
<b><math>10^2 k_{cat}/K_m</math> (mL/min.unit)</b>	11	15	16	4,3

<b>II. Unterhalb der CMC</b>				
<b>Spacer</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>20</b>
<b><math>K_m</math> (mM)</b>	0,12	0,3	0,41	2,00
<b><math>k_{cat}</math> (mM.mL/min.unit)</b>	0,032	0,032	0,074	0,091
<b><math>10^2 k_{cat}/K_m</math> (mL/min.unit)</b>	25	11	18	4,6

Die Affinität (ermittelt durch  $1/K_m$ ) der GOD für die Galactolipide unterhalb der CMC war relativ höher für diejenigen Galactolipide mit der kürzeren Spacerlänge. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die höhere Affinität sowohl durch die Hydrophobizität als auch durch den dehydratisierenden Effekt hervorgerufen werden könnte [304]. Oberhalb der CMC (Tab. 6) waren die  $K_m$ -Werte relativ gesehen kleiner als unter der CMC. Hierbei könnte die Mizell-Bildung zur Induktion von Galactose-reichen Phasen (Galactose-Cluster) geführt haben, welche eine Affinitäts-erhöhung der GOD für die Amphiphile bewirkt. Andererseits trat für die  $K_m$ -Werte der Amphiphile mit Spacer 13 und 20 keine Veränderung auf. Diese könnte der mögliche Beweis für die oben genannten Diskussion sein, da Oberflächenspannungsmessungen zeigten, dass die Amphiphile mit Spacer 13 und 20 keine rigiden Mizellen bilden können.

## 5. Zusammenfassung

Mononukleäre Makrophagen sind die dominierenden phagozytischen Zellen gesunder Gewebe und stellen neben dem alternativen Weg des Komplementsystems ein Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr dar.

Die Fähigkeit zur Phagozytose und Erregererkennung werden zumeist durch Oberflächenrezeptoren, insbesondere Lektine, vermittelt. Eines dieser Lektine ist der 175 kDa große, transmembrane Mannose/Fucose N-Acetylglucosamin-Rezeptor (MR). Er vermittelt die Endozytose von Glykoproteinen mit hochmannosylierten Oligosacchariden, wie z. B. lysosomale Enzyme und Gewebs-Plasminogen-Aktivator, sowie die Phagozytose von Pathogenen mit Polymannose-Strukturen auf der Membranoberfläche. MR zeichnet sich proteinchemisch insbesondere durch seine außerordentliche Multivalenz bezüglich seiner Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRD) aus.

In der Literatur existieren zahlreiche Arbeiten, die eine Targetierung von glykolipidhaltigen Liposomen (Glykoliposomen) über diesen humanen MR beschreiben. Bisher gelang es aber noch nicht, eine der Anordnung der CRD entsprechend effektive Targetingstrategie zu entwickeln.

Im Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie wurde sich deshalb dieser Problematik zugewendet. Es gelang die Neusynthese von Glykolipiden mit variabler Spacerlänge und unterschiedlichem Glykosylierungsgrad (minicluster Glykoside).

Für meine Arbeit wurden Mannose-haltige Glykolipide in konventionellen Phospholipid/Cholesterol-Liposomen inkorporiert und auf die gewünschte Vesikel-Größe für die biologischen Analysen extrudiert. Als Methode der Affinitätsmessung der Liposomen verwendete ich ein Kompetitions-Assay mit den bekannten MR-Liganden Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) und das  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein C-Fraktion ( $\alpha_1$ -AGP<sub>c</sub>). Statt radioaktiver Markierung der Liganden erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung und Messung der fluoreszierenden monozytären Zellen im Durchflusszytometer.

Während frisch isolierte Blutmonozyten negativ für MR sind, tragen die in einer 5-7 tägigen *in vitro*-Kultur differenzierten Zellen diesen Rezeptor. Auch frisch isolierte Perikardmakrophagen tragen den Mannoserezeptor und wurden für unsere

Untersuchungen verwendet. MR-negative Blutmonozyten dienten als Kontrolle einer unspezifischen monozytären Liposomenaufnahme.

Aus einer Auswahl von 6 Glykolipiden Typ II (1, 2 und 3 Mannosereste; 1, 2 und 3 Spacer) zeigte ein Glykolipid mit 3 Mannoseresten und 3 Spacern die beste Verdrängung von t-PA, d.h. je höher der Glykosylierungsgrad der Glykolipid-haltigen Liposomen, desto besser ist ihre Bindung an den MR. Die optimale Spacerlänge von 3 Ethoxy-Einheiten wies gleichzeitig auf einen für eine Bindung optimalen Mindestabstand hin. Für den MR-Ligand  $\alpha_1$ -AGP<sub>c</sub> war aus einer Auswahl von 3 spacerlosen Lipiden Typ I ebenfalls das Glykolipid mit 3 Mannoseresten am besten geeignet.

Die Internalisierung eines Modell-Liposoms mit einem Glykolipid mit 2 Spacer-Einheiten und 2 Mannoseresten in Makrophagen wurde in Anwesenheit verschiedener Modulatoren der Rezeptorexpression (Interleukin-4, Dexamethason) und metabolischen Inhibitoren (z.B. Natriumazid, 2-Desoxyglucose) untersucht. Der erwartete Effekt einer erhöhten Internalisierung durch Heraufregulation der MR-Rezeptorexpression konnte, genau wie die Internalisierungshemmung durch metabolische Inhibitoren, bestätigt werden.

Des Weiteren wurde die Auswirkung der Serum-Konzentration auf die Aufnahme mannosylierter Liposomen untersucht. Wichtig war und zu erfahren, ob und in welchem Ausmaß sich die MR-vermittelte Aufnahme der Glykoliposomen vom Mannose-bindenden Protein des Serums (S-MBP) beeinflussen lässt. Bei allen mannosylierten Liposomen zeichnet sich ein deutlicher Rückgang der Aufnahme durch die Makrophagen mit zunehmender Serumkonzentration ab. Eine drastische Verringerung der Aufnahme war vor allem bei den mit MBP-freiem Serum präinkubierten Vesikeln (trimannosyliert) erkennbar. Das könnte auf eine starke Beteiligung der in Form von einem Blumenstrauß geclusterten CRD des S-MBP zurückzuführen sein.

Zum Nachweis des Verbleibs der internalisierten Liposomen wurde Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Rinderserumalbumin (FITC-BSA) in Liposomen verpackt und nach Internalisierung mittels Trichloressigsäure- (TCA)-Methode spektrofluorometrisch verfolgt. Ein wahrscheinlich durch lysosomale Hydrolasen erfolgter Abbau konnte nachgewiesen werden. Dieser Hinweis auf eine Aufnahme durch coated pits-Vesikel konnte durch den gleichzeitigen Nachweis des Fehlens von MR in monozytären Membranmikrodomänen (Rafts) unterstützt werden. Allerdings müssten

zukünftige Arbeiten zeigen, ob nach Ligandenbindung an den MR dieser nicht auch teilweise in Rafts gelangen kann.

In einem 2. Komplex meiner Versuche gelang es mit Hilfe neusynthetisierter Galactolipide unterschiedlicher Spacerlänge den Einfluss der Kopfgruppengröße von Nicht-Bilayer-Lipiden (hexagonalbildende Strukturen,  $H_{II}$ ), wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidsäure (PA) auf die Bindungsaffinität der Galactoliposomen zum komplementären Lektin,  $RCA_{120}$ , zu untersuchen. Als Grundmatrix diente dabei das Phosphatidylcholin (PC).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung von Nichtbilayer-Lipiden innerhalb der PC-Vesikel zu einer höheren Bindungsaffinität des 3-armigen Galactolipids (Gal 1/3) zum  $RCA_{120}$  führt. Die Bindungsaffinität des 9-armigen Galactolipid (Gal 1/9) blieb jedoch unberührt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine laterale Phasenseparierung von Nichtbilayer-Strukturen in  $H_{II}$  reiche und  $H_{II}$  arme Regionen innerhalb der Grundmatrix. In  $H_{II}$  reichen Regionen könnten die Galactoside mit kürzerer Spacerlänge aufgrund direkter Wechselwirkungen mit den Oberflächen-Regionen umgebender Phospholipid-Komponenten durch  $H_2$ -Brückenbindungen lokalisiert sein.

Gal 1/9 weist im Gegensatz zu Gal 1/3 eine genügend große Zugänglichkeit der Zuckerreste aus der Membranebene auf. Aus diesem Grunde sollte es keine Wechselwirkungen mit den Oberflächen-regionen umgebender Phospholipid-Komponenten eingehen und somit erwartungsgemäß keine Änderung seiner Lektin-Affinität erfolgen.

Durch die Einbeziehung von  $H_{II}$ -Strukturen und deren Einfluss auf die Bindung von  $RCA_{120}$  zu den liposomalen Galactolipiden könnte somit ein Einblick in die molekularen Erkennungsmechanismen gewonnen werden, der perspektivisch zur therapeutisch nutzbarer Targetierung ausgenutzt werden kann.

## 6 Literatur

1. Metchnikoff, E.: Lectures in Comparative Pathology of Inflammation. Kegan, Paul, Trench, Trubner: London. (1893) 161
2. Ashoff, L.: Das reticulo-endotheliale System. *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkunde* 26 (1924) 1-118
3. Van Furth, R., Diesselhoff-Den Dulk, M.M.C.: The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 132 (1970) 813-828
4. Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K.: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag 1987
5. Handwerker B.S., Koren H.S.: The nature of the effector cell in antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity. The cytotoxic activity of murine tumor cells and peritoneal macrophages. *Clin. Immunol. Immunopath.* 5 (1976) 272-281
6. Johnston, R.B.: Current concepts: Immunology. Monocytes and Macrophages. *New Engl. J. Med.* 318 (1988) 747-752
7. Leder, L.D.: The origin of blood monocytes and macrophages. A review. *Blut* 16 (1967) 86-98
8. Meuret, G., Bammert J., Hoffmann G.: Kinetics of human monocytopoiesis. *Blood* 44 (1974) 801-816
9. Van Furth, R.: Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* (1982) 178-185
10. Van Furth, R., Cohn, Z.A.: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128 (1968) 415-433
11. Thomas, E.D., Ramberg, R.E., Sale, G.E., Golde, D.W.: Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* 192 (1976) 1016-1018
12. Gale, R.P., Sparkes, R.S., Golde D.W.: Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 201 (1978) 937-938
13. Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L.: The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull WHO* 46. (1972) 845-852
14. Whitelaw, D.M.: Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet.* 5 (1972) 311-317
15. Cohn, Z.A.: The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 9 (1968) 163-214
16. Edelson, M.: Intracellular parasites and phagocytic cells: Cell biology and pathophysiology. *Rev. Infect. Dis.* 4 (1982) 124-135



17. Leijh, P.C.J., Van den Barselaar, M.T., Van Furth, R.: Kinetics of phagocytosis of staphylo-coccus aureus and E. Coli by human monocytes. *Scand. J. Immunol.* 13 (1981) 159-174
18. Mackaness, G.B.: The phagocytosis and inactivation of Staphylococci by macrophages of normal rabbits. *J. Exp. Med.* 112 (1960) 25-53
19. Kurlander, R.J., Haney, A.F., Gartell, J.: Human peritoneal macrophages possess two population of IgG Fc receptors. *Cell Immunol*86. (1984) 479-490
20. Mantovani, B., Rabinovitch, M., Nussenzweig, V.: Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of macrophage receptor sites for complement (C3) and immunoglobulin (IgG). *J. Exp. Med*135. (1972) 780-792
21. Silverstein, S.C., Loike, J.D.: Phagocytosis. In: Van Furth, R. (ed.): *Mononuclear phagocytes*. Martinus Nyhoff Publishers, the Hague, the Netherlands. (1980) 895-917
22. Walker, W.S.: Functional heterogeneity of macrophages: Subclasses of peritoneal macro-phages with different antigen-binding activities and immune complex receptors. *Immunology.* 26 (1974) 1025-1037
23. Cron, J.: Phagocytic activity of leucocytes in tumors. *Clinical studies Neoplasma* 22 (1975) 211-223
24. DeTitto, E.H., Catterall, J.R., Remington, J.S.: Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzii*. *J. Immunol.* 137 (1986) 1842-1845
25. Haney, A.F., Muscato, J.J., Weinberg, J.B.: Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril.* 35 (1981) 696-698
26. LoBuglio, A.F., Contran, R.S., Jandl, J.H.: Red cells coated with immunoglobulin G: Binding and sphering by mononuclear cells in man. *Science.* 158 (1967) 1582-1585
27. Nathan, C.F., Brukner, L.H., Kaplan, G., Unkeless, J., Cohn, Z.A.: Role of activated macrophages in antibody-dependent lysis of tumor cells. *J. Exp. Med.* 152 (1980) 183-208
28. Nathan, C.F., Brukner, L.H., Silverstein, S.C., Cohn, Z.A.: Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. *J.Exp. Med.* 149 (1979) 84-99
29. Peterson, P.K., Keane, W.F., Miller, W., Freiberg, M., Staub, D.: Human peritoneal macrophage cytotoxicity mediated by cytophilic IgG. *J. Infect. Dis.* 148 (1983) 1040-1048

30. Huber, H., Polley, M.L., Lenscotti, W.D., Fudenberg, H.H., Müller-Eberhard, H.J.: Human monocytes: Distinct receptor sites for the third component of complement and for IgG. *Science* 162 (1968) 1281
31. Reynolds, H.Y., Atkinson, J.P., Newball, H.H., Frank, M.M.: Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 114 (1975) 1813-1819
32. Zeller, J.M., Kubak, B.M., Gewurz, H.: Binding sites for C-reactive protein on human mono-cytes are distinct from IgG Fc receptors. *Immunology.* 67 (1989) 51-55
33. Pesanti, E.L., Axline, S.G.: Phagolysosome formation in normal and colchicin-treated macro-phages. *J. Exp. Med.* 142 (1975) 903-913
34. Cohn, Z.A., Fedorko, M.E.: The formation and fate of lysosomes. In: *Lysosomes in Biology and Pathology.* J.J. Dingle & H.B. Fell (eds.), North-Holland, Amsterdam. (1969) 43-63
35. Cohn, Z.A. Endocytosis and intracellular digestion. In: *Mononuclear phagocytes.* R. van Furth (ed.), Blackwell, Oxford. (1970) 121-128
36. Schnyder, J., Baggiolini, M.: Secretion of lysosomale hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 148 (1978) 435-450
37. Baggiolini, M.: Proteinases and acid hydrolases of neutrophils and macrophages and the mechanisms of their release. In: *Advances in Inflammation Research, Vol. 3: Rheumatoid Arthritis.* S. Gorini (ed.); Raven Press, New York (1982), S.313-327
38. Gordon, S., Todd, J., Cohn, Z.A.: In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 139 (1974) 1228-1248
39. Klein J.: *Immunologie.* Weinheim, New York, Cambridge VCH. (1991)
40. Hofmann, E.: *Zellbiochemie. Dynamische Biochemie, Teil IV,* Akademie-Verlag Berlin. (1981)
41. Schwartz, R.H.: T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* 3 (1985) 237
42. Chain, B.M., Kaye, P.M., Shaw M.-E.: The biochemistry and cell biology of antigen processing. *Immunol. Rev.* 106 (1988) 33-58
43. Linch, D.C., Wallace, D.L., O'Flynn, K.: Signal transduction in human T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 95 (1987) 137-159
44. Crabtree, G.R.: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 243 (1989) 355-361
45. Adams D.O., Hamilton T.A.: The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2 (1984) 283-318

46. Crapper, R.M., Vairo, G., Hamilton, J.A., Clark-Lewis, I., Schrader, J.W.: Stimulation of bone marrow-derived and peritoneal macrophages by a T-lymphocyte-derived hemopoietic growth factor, Persisting cell-stimulating factor. *Blood* 6 (1985) 859-866
47. Murray, H.W., Juangbhanich, C.W., Nathan, C.F., Cohn, Z.A.: Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 150 (1979) 950-964
48. Black, C.M., Catterall, J.R., Remington, J.S.: In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon- $\gamma$ . *J. Immunol.* 138 (1987) 491-495
49. Dinarello, C.A.: An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J. Clin. Immunol.* 5 (1985) 287-297
50. Nakamura, M., Manser, T., Pearson, G.D.N., Daley, M. J., Geffer, M.L.: Effect of IFN- $\gamma$  on the immune response in vivo and on gene expression in vitro. *Nature.* 307 (1984) 381-382
51. North, R.J.: The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.* 121 (1978) 806-809
52. Murray, H.W., Spitalny, G.L., Nathan, C.F.: Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-  $\gamma$ . *J. Immunol.* 134 (1985) 1619-1622
53. Horwitz, M.A.: Demonstration of cell-mediated immunity in Legionnaires disease. *Clin. Res.* 30 (1982) 369
54. Mackaness, G.B.: The monocyte and cellular immunity. *Semin. Hematol.* 7 (1970) 172-184
55. Nathan C.F., Karnovsky M.L., David J.R.: Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.* 133 (1971) 1356-1376
56. Weiser, W.Y., Van Niel, A., Clark, S.C., David, J.R., Remold, H.G.: Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1436-1446
57. Bianco, C., Griffin, F.M., Silverstein, S.C.: Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp.* 141 (1975) 1278-1290
58. Alexander, P., Eccles, S.A., Gauci, C.L.L.: The significance of macrophages in human and experimental tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 276 (1976) 124-133
59. Goldstein, I.J.; Hayes, C.E.: The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem.* 35. (1978) 127-340
60. Gabius, H.-J.; Rüdiger, H.; Uhlenbruck, G.: *Spektrum der Wissenschaften.* (1988) 50

61. Sumner, J., Howell, S.: The Identification of the Hemagglutinin of the Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32 (1936) 227
62. Becker, J., Reeke, G., Cunningham, B., Edelman, G.: New Evidence on the Location of a Saccharide-Binding Site of Concanavalin A. *Nature* 259 (1976) 406
63. Becker, J., Reeke, G., Wang, J., Cunningham, B., Edelman, G.: The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. III. Structure of the Monomer and its Interaction with Metals and Saccharides. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1513
64. Cunningham, B., Wang, J., Waxdal, M., Edelman, G.: The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. II. Amino Acid Sequence of Cyanogen Bromide Fragment F3. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1503
65. Reeke, G., Becker, J., Edelman, G.: The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. IV. Atomic Coordinates, Hydrogen Bonding, and Quaternary Structure. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1525
66. Wang, J., Cunningham, B., Waxdal, M., Edelman, G.: The Covalent and Three Dimensional Structure of Concanavalin A. I. Amino Acid Sequence of Cyanogen Bromide Fragments F1 and F2. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1490
67. Olson, M., Liener, I.: Some Physical and Chemical Properties of Concanavalin A, the Phytohemagglutinin of the Jack Bean. *Biochem.* 6 (1967) 105
68. Edmundson, A., Ely, K., Sly, D., Westholm, F., Powers, D., Liener, I.: Isolation and Characterization of Concanavalin A Polypeptide Chains. *Biochem.* 10 (1971) 3554
69. McKenzie, G., Sawyer, W., Nichol, L.: The Molecular Weight and Stability of Concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta.* 263 (1972) 283
70. Grimaldi, J., Sykes, B.: Concanavalin A: a Stopped Flow Nuclear Magnetic Resonance Study of Conformational Changes Induced by  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $\alpha$ -methyl-D-mannoside. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 1618
71. Jack, A., Weinzierl, J., Kalb, A.: An X-Ray Crystallographic Study of Demetallized Concanavalin A. *J. Mol. Biol.* 58 (1971) 389
72. Poretz, R., Goldstein, I.: An examination of the Topography of the Saccharide Binding Sites of Concanavalin A and the Forces Involved in Complexation. *Biochem.* 9 (1970) 2890
73. Greer, J., Kaufman, H., Kalb, A.: An X-Ray Crystallographic Study on Concanavalin A. *J. Mol. Biol.* 48 (1970) 365
74. Agrawal, B., Goldstein, I., Hassing, G., So., L.: Protein-Carbohydrate Interaction. 18. The Preparation and Properties of acetylated Concanavalin A, the Hemagglutinin of the Jack Bean. *Biochem.* 7 (1968) 4211

75. Goldstein, I., Hollerman, C., Smith, E.: Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides. *Biochem.* 4 (1965) 876
76. Barber, B., Carver, J.: Magnetic Resonance of Concanavalin A: Conformational Changes Induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and alpha-methyl-D-mannopyranoside. *Can. J. Biochem.* 53 (1975) 371
77. Barber, B., Fuhr, B., Carver, J.: A Magnetic Resonance Study of Concanavalin A. Identification of a Lanthanide Binding Site. *Biochem.* 14 (1975) 4075
78. Sherry, A., Newman, A., Gutz, C.: The Activation of Concanavalin A by Lanthanide Ions. *Biochem.* 14 (1975) 2191
79. Clark, A., Denborough, M.: The Interaction of Concanavalin A with Blood-Group-Substance Glycoproteins from Human Secretions. *Biochem. J.* 121 (1971) 811
80. Kornfeld, R., Ferris, C.: Interaction of Immunoglobulin Glycopeptides with Concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 2614
81. Brattain, M., Jones, C., Pittman, J., Pretlow, T.: The Purification of Carcinoembryonic Antigen by Glutaraldehyde Cross-Linked Concanavalin A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 65 (1975) 63
82. Boenisch, T., Norgaard-Pedersen, B.: Carcinoembryonic Antigen (CEA) of Human Tissue Extracts: Partial Characterization of Two Variants Separated by Affinity Chromatography on Concanavalin A. *Clin. Chim. Acta.* 60 (1975) 25
83. Pitlick, F.: Concanavalin A Inhibits Tissue Factor Coagulant Activity. *J. Clin. Invest.* 55 (1975) 175
84. Harmony, J., Cordes, E.: Interaction of Human Plasma Low Density Lipoprotein with Concanavalin A and with Ricin. *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 8614
85. Ruscetti, F., Chervenick, P.: Regulation of the Release of Colony-Stimulating Activity from Mitogen-Stimulated Lymphocytes. *J. Immunol.* 114 (1975) 1513
86. Novogrodsky, A., Katchalski, E.: Lymphocyte Transformation Induced by Concanavalin A and its Reversion by methyl-alpha-mannopyranoside. *Biochim. Biophys. Acta.* 228 (1971) 579
87. Perlmann, P., Nilsson, H., Leon, M.: Inhibition of Cytotoxicity of Lymphocytes by Concanavalin A in Vitro. *Science.* 168 (1970) 1112
88. Moscona, A.: Embryonic and Neoplastic Cell Surfaces: Availability of Receptors for Concanavalin A and Wheat Germ Agglutinin. *Science.* 171 (1971) 905
89. Shoham, J., Inbar, M., Sachs, L.: Differential Toxicity on Normal and Transformed Cells in Vitro and Inhibition of Tumour Development in Vivo by Concanavalin A. *Nature.* 227 (1970) 1244

90. Inbar, M., Sachs, L.: Structural Difference in Sites on the Surface Membrane of Normal and Transformed Cells. *Nature* 223 (1969a) 710
91. Inbar, M., Sachs, L.: Interaction of the Carbohydrate-Binding Protein Concanavalin A with Normal and Transformed Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 63 (1969b) 1418
92. Ben-Bassat, H., Goldblum, N.: Concanavalin A Receptors on the Surface Membrane of Lymphocytes from Patients with Hodgkin's Disease and Other Malignant Lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 (1975) 1046
93. Kolata, G.: Microvilli. A Major Difference Between Normal and Cancer Cells? *Science* 188 (1975) 819
94. Sutou, S., Shindo, H.: Concanavalin A Induced Endoreduplication in Cultured Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 67 (1975) 79
95. Picken, R., Beachman, I.: The Interaction of Concanavalin A with Mutant and Wild-Type Strain of *Escherichia coli* K12. *Biochem. Soc. Trans.* 3 (1975) 387
96. Weeks, G.: Studies of the Cell Surface of *Dictyostelium discoideum* During Differentiation. The Binding of <sup>125</sup>I-Concanavalin A to the Cell Surface. *J. Biol. Chem.* (1975); 250: 6706
97. Birdsell, D., Doyle, R.: Modification of Bacteriophage f25 Adsorption to *Bacillus subtilis* by Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 113 (1973) 198
98. Brunson, K., Watson, D.: Concanavalin A Preparations with Activities Related to bacterial Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 115 (1975) 599
99. Orr, G., Rando, R., Bangerter, F.: Synthetic Glycolipids and the Lectin-Mediated Aggregation of Liposomes. *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 4721
100. Avrameas, S., Guilbert, B.: Biologically Active Water-Insoluble Protein Polymers. Their Use for the Isolation of Specifically Interacting Proteins. *Biochem.* 53 (1971) 603
101. Allan, D., Auger, J., Crumpton, M.: Purification of Concanavalin A Receptor From Pig Lymphocyte Plasma Membrane. *Biochem. J.* 126 (1972) 6
102. Anderson, J., Lee-Own, V.: The Use of Concanavalin A in the Fractionation of Tendon Proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 2 (1974) 623
103. Edelman, M.: Purification of DNA by Affinity Chromatography: Removal of Polysaccharide Contaminants. *Anal. Biochem.* 65 (1975) 293
104. Lehrmann, M.A., Hill, R.: The binding of fucose-containing glycoproteins by hepatic lectins. Purification of a fucose-binding lectin from rat liver. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7419-7425

105. Biessen, A.L., Bakkeren, H.F., Beuting, D.M., Kuiper, J., Van Berkel, T.J.C.: Ligand size is a major determinant of high-affinity binding of fucose- and galactose-exposing (lipo) proteins by the hepatic fucose receptor. *Biochem. J.* 299 (1994) 291-296
106. Kelm, S., Schauer, R.: The galactose-recognizing system of rat peritoneal macrophages; identification and characterization of the receptor molecule. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369 (1988) 693-704
107. Araújo-Jorge, T.A., De Souza, W.: Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Tropica* (1988); 45: 127-136
108. Markwell, M.A.K., Portner, A., Schwartz, A.L.: An alternative route of infection for viruses: entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking its attachment protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 978-982
109. Porat, N., Apicella, M.A., Blake, M.S.: *Neisseria gonorrhoeae* utilizes and enhances the bio-synthesis of the asialoglycoprotein receptor expressed on the surface of the hepatic HepG2 cell line. *Infect. Immun.* 6 (1995) 1498-1506
110. Cherayil, B.J., Weiner, S.J., Pillai, S.: The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J. Exp. Med.* 17 (1989) 1959-1972
111. Kokoshis, P.L., Williams, D. L., Cook, J.A., DiLuzio, N.R.: Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement of serum lysozyme activity by glucan. *Science.* 199 (1978) 1340-1342
112. Ross, G.D., Cain, J.A., Lachmann P.J.: Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J. Immunol.* 134 (1985) 3307-3315
113. Thornton, B.P., Vetvicka, V., Piman, M., Goldman, R.C., Ross G.D.: Analysis of the sugar specificity and molecular location of the  $\beta$ -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD 11b/ CD 18). *J. Immunol.* 156 (1996) 1235-1246
114. Muller, A., Rice, P.J., Ensley, H.E., Coogan, P.S., Kalbfleisch, J.H., Kelley, J.L., Love, E.J., Portera, C.A., Ha, T., Browder, I.W., Williams, D.L.: Receptor binding and internalization of a water-soluble (1-3)- $\beta$ -D-glucan biologic response modifier in two monocyte/ macrophage cell lines. *J. Immunol.* 156 (1996) 3418-3425
115. Czop, J.K., Kay, J.: Isolation and characterization of  $\beta$ -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 173 (1991) 1511-1520
116. Zimmermann, J.W., Lindermuth, J., Fish, P.A., Palace, G.P., Stevenson, T.T., Demong, D.E.: A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a  $\beta$ -(1-

- 3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan and lactosylceramide of human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22014-22020
117. Stephenson, J.D, Shepherd, V.L.: Purification of the human alveolar macrophage mannose receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148.(1987) 883-889
118. Stahl, P., Gardon S.: Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. *J. Cell Biol.* 93 (1982) 49-56
119. Dijkstra, G.D., Hardonk, M.J.: Glycosyl receptors in macrophage subpopulations of rat spleen and lymph node. A comparative study using neoglycoproteins and monoclonal antibodies ED1, ED2 ED3. *Cell Tissue Res.* 262 (1990) 35-40
120. Drickamer, K., Taylor, M.E.: Biology of animal lectins. *Ann Rev Cell Biol.* (1993); 9: 237-264
121. Taylor, M.E., Conary, J.T., Lennartz, M.R., Stahl, P.D., Drickamer, K.: Primary Structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2156-2162
122. Kery, V., Krepinsky, J.J.F., Warren, C.D., Capek, P., Stahl, P.D.: Ligand recognition by purified human mannose receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 298 (1992) 49-55
123. Taylor, M.E., Bezouska, K., Drickamer, K.: Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 1719-1726
124. Taylor, M.E., Drickamer, K.: Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 268 (1993);399-404
125. Stahl, P.D., Somsel, N., Rodman, J., Miller, M.J., Schlesinger, P.H.: Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1399-1403
126. Rijken, D.C., Otter, M., Kuiper ,J., van Berkel Th.J.C.: Receptor-mediated endocytosis of tissue-type plasminogen activator (t-PA) by liver cells. *Thromb Res.* (1990); suppl X: 63-71
127. Ofec, I., Goldshar, J., Keisari, Y., Sharon, N.: Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 239-276
128. Stahl, P., Schlesinger, P.H., Sigardson, E., Rodman, J.S., Lee, Y.C.: Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell* 19 (1980) 207-215
129. Wileman. T., Boshans, R.L., Schlesinger, P., Stahl, P.: Monensin inhibits recycling of macrophage mannose glycoprotein receptors and ligand delivery to lysosomes. *Biochem. J.* 220 (1984) 665-675



130. Maynard, Y., Baenzinger, J.U.: Oligosaccharide specific endocytosis by isolated rat hepatic reticuloendothelial cells. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 8063-8068
131. Weston, S.A., Parish, C.R.: Evidence that mannose recognition by splenic sinusoidal cells plays a role in the splenic entry of lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 1975-1981
132. Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G.W., Mandel, F.S., Hershlag, A., Scholl, G.M., Rosenfeld, D.M.: Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Human Repr.* 8 (1993) 2155-2166
133. Reis, E., Sousa, C., Stahl, P.D., Austin, J.M.: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178 (1993) 509-519
134. Childs, R.A., Feizi, T.: Differential recognition of core and terminal portions of Oligosaccharide ligands by carbohydrate-recognition domains of two mannose-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 20770-20777
135. Mori, K., Kawasaki, T.: Subcellular distribution of the mannan-binding protein and its endogenous inhibitors in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 264 (1988) 647-656
136. Brock, J., Schulze, H.A.: Detection of mannose-binding proteins on mouse lymphocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 54 (1999) 90-94
137. Jiang, W., Swiggard, W.J.: The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epi-thelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375 (1995) 151-154
138. Ishizaki, J., Hanasaki, K.: Molecular cloning of pancreatic group1 phospholipase A2 receptor. *J. Biol. Chem.* 8 (1994) 5897-5904
139. Otter, M., Barrett-Bergshoeff, M.M., Rijken, D.C.: Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13931-13935
140. Stahl, P.D., Somsel-Rodman, J., Miller, M.J., Schlesinger, P.H.: Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1399-1403
141. Shepherd, V.L., Lee, Y.C., Schlesinger, P.H., Stahl, P.D.: L-fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1019-1022
142. Ullrich, K., Gieselmann, V., Mersmann, G., von Figura, K.: Endocytosis of lysosomal enzymes by non-parenchymal rat liver cells. *Biochem. J.* 182 (1979) 329-335
143. Steer, C.J., Kusiak, J.W., Brady, R.O., Jones, E.A.: Selective hepatic uptake of human  $\beta$ -hexosaminidase A by a specific glycoprotein recognition system on sinusoidal cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2774-2778

144. Koster, A., van Figura, K., Pohlmann, R.: Mistargeting of lysosomal enzymes in Mr 46000 mannose-6-phosphate receptor-deficient mice is compensated by carbohydrate-specific endocytotic receptors. *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 685-689
145. Smedsrød, B., Tollersrud, O.K.: Sinusoidal liver endothelial cells recruit lysosomal enzymes from the circulation by mannose-receptor mediated endocytosis. In: Wisse E, Knook D.L., Wake, K. (eds.) *Cells of the hepatic sinusoid*. Leiden: The Kupffer Cell Foundation 1995. Vol. 5, 180-183
146. Earnshaw, J.S., Curtis, C.G., Powell, G.M., Dodgson, K.S., Olavesen, A.H., Gacesa, P.: The fate of intravenously administered highly purified bovine testicular hyaluronidase (hyalo-sidase) in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 2199-2203
147. Niesen, T.E., Alpers, D.H., Stahl, P.D., Rosenblum, J.L.: Metabolism of glycosylated human salivary amylase: in vivo plasma clearance by rat hepatic endothelial cells and in vitro receptor mediated pinocytosis by rat macrophages. *J. Leuk. Biol.* 36 (1984) 307-320
148. Shepherd, V.L., Hoidal, J.R.: Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1990) 335-340
149. Munoz, A., Serrano, C., Garcia-Estan, J., Quesada, T., Miras, M.T.: Effect of diabetic hyper-glycemia and other sugars on plasma dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity. *Diabetes* 33 (1984) 1127-1132
150. Klegeris, A., Budd, T.C., Greenfield, S.A.: Acetylcholinesterase-induced respiratory burst in macrophages: evidence for the involvement of the macrophage mannose-fucose receptor. *Biochim Biophys Acta.* (1996) 159-168
151. Kouyoumdjian, M., Birges, D.R., Prado, E.S., Prado, J.L.: Identification of receptors in the liver that mediate endocytosis of circulating tissue kallikreins. *Biochim. Biophys. Acta.* (1989) 299-304
152. Kim, S., Hiruma, M., Ikemoto, F., Yamamoto, K.: Importance of glycosylation for hepatic clearance of renal renin. *Am. J. Physiol.* 255 (1988) E642-E651
153. Marks, D.I., Kost, L.J., Kuntz, S.M., Romero, J.C., La Russo, N.F.: Hepatic processing of recombinant human renin: mechanisms of uptake and degradation. *Am. J. Physiol.* 261 (1991) G349-G358
154. Murai, M., Aramaki, Y., Tsuchiya, S.: Identification of the serum factor required for liposome-primed activation of mouse peritoneal macrophages. Modified  $\alpha$ 2-macroglobulin enhances  $Fc\gamma$  receptor-mediated phagocytosis of opsonized sheep red blood cells. *Immunology.* 86 (1995) 64-70

155. Smedsrød, B., Melkko, J., Risteli, L., Risteli, J.: Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem. J.* 271 (1990) 345-350
156. Saunders, P.T.K., Renegar, R.H., Raub, T.J., Baumbach, G.A., Atkinson, P.H., Bazer, F.W., Roberts, R.M.: The carbohydrate structure of porcine uteroferrin and the role of the high mannose chains in promoting uptake by the reticuloendothelial cells of the fetal liver. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3658-3665
157. Ofec, I., Goldhar, J., Keisari, Y., Sharon, N.: Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 239-276
158. Schlesinger, L.S.: Role of mononuclear phagocytes in *M. Tuberculosis* pathogenesis. *J. Invest. Med.* 44 (1996) 312-323
159. Giaimis, J., Lombard, Y., Fonteneau, P., Muller, C.D., Levy, R., Makaya-Kumba, M., Lazdins, J., Poindron, P.: Both mannose and  $\beta$ -glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces Cerevisiae* by murine macrophages. *J. Leuk. Biol.* 54 (1993) 564-571
160. Kahn, S., Wlekinsky, M., Aruffo, A., Farr, A., Coder, D., Kahn, M.: *Trypanosoma Cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1243-1258
161. Magnussen, S., Kjekken, R., Berg, T.: Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 205 (1993) 118-125
162. Mukhopadhyay, A., Stahl, P.: Bee venom phospholipase A2 is recognized by the macrophage mannose receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 324 (1995) 78-84
163. Boyle, D., Tien, L., Coeper, N.G.F., Shepherd, V., McLaughlin B.J.: A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis. *Invest Ophtalmol. Vis. Sci.* 32 (1991) 1464-1470
164. Dini, L, Ruzittu, M.T., Vergine, M.C., Sozzo, A, Montinari, M.R., Falasca, L.: Role of the carbohydrate-specific receptor of liver in the recognition of apoptotic cells: An electron microscopic study on in situ rat livers and isolated endothelial and Kupffer cells. In: Wisse E, Knook D L, Wake K (eds.) *Cells of the hepatic sinusoid. The Kupffer Cell Foundation*, Leiden 1995, 85-87
165. Falasca, L., Bergamini, A., Serafino, A., Balabaud, C., Dini, L.: Human Kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 224 (1996) 152-162
166. Larkin M., Childs R.A., Matthews T.J., Thiel S., Mizuochi T., Lawson A.M., Savill, J.S., Haslett, C., Diaz, R., Reizi, T.: Oligosaccharide-mediated interactions of the

- envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS* 3 (1989) 793-798
167. Lis, H., Sharon, N.: Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98 (1998) 637 – 674
168. Drickamer, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 9557-9560
169. Drickamer, K.: C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 585 – 590
170. Drickamer, K.:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993) 393 – 400
171. Iobst, S.T., Drickamer, K.: Binding of sugar ligands to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent animal lectins. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15512 – 15519
172. Hudgin, R., Ricer, W. : The isolation and properties of a rabbit liver binding proteins specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 5536
173. Lunney, J., Ashwell, G.: A hepatic receptor of avian origin capable of binding specifically modified glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 341 – 343
174. Lee, R.T., Yang, G.C., Kiang, J., Bingham, J.B., Golgher, D., Lee, Y.C.: Major lectin of alligator liver is specific for mannose/L-fucose. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19617 – 19625
175. Lee, R.T., Lee, Y.C.: Rabbit and rat hepatic lectins have two sugar-combining sites per mono-meric unit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1 (988) 1444 – 1451
176. Hardy, M.R., Townsend, R.R., Parkhurst, S.M., Lee, Y.C.: Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N-acetylgalactosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry.* 24 (1985) 22 – 28
177. Lee, Y.C.: *Neoglycoconjugates, Preparation and Applications.* Academic Press, San Diego 1994, 3 – 21
178. Stowell, C.P., Lee, Y.C.: Neoglycoproteins: the preparation and application of synthetic glyco-proteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37 (1980) 225 – 81
179. Lee, Y.C., Lee R.T.: *The Glycoconjugates* (M. Horowitz, ed.). Academic Press, New York 1982, 57
180. Lee, Y.C., Lee, R.T.: Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts Chem. Res.* 28 (1995) 321 – 327
181. Crowley, J.F., Goldstein, I.L., Arnarp, J., Lonngren, J.: Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 231 (1984) 524 – 533

182. Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lönngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M., Lonn, H.: Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 199 – 202
183. Lee, R.T., Lin, P., Lee, Y.C.: New synthetic cluster ligands for galactose/N-acetyl-galac-tosamine-specific lectin of mammalian liver. *Biochem.* 23 (1984) 4255 – 4261
184. Tanford, C.: The hydrophobic effect. John Wiley Sons, New York 1973
185. Helfrich, W.: Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch.* 28c (1973) 693-703
186. Evans, E.A.: Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys. J.* 14 (1974) 923-931
187. Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans II.* 72 (1976) 1525 – 1568
188. Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W.: Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 470 (1977) 185-201
189. Carnie, S., Israelachvili, J.N., Pailthorpe B.A.: Lipid packing and transbilayer asymmetries of mixed lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 554 (1979) 340-357
190. Papahadjopoulos, D.: Liposomes and their use in biology and medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 308 (1978) 1-462
191. Hamilton Jr., R.L., Goerke, J., Guo, L.S.S., Williams, M.C., Havel, R.J.: Unilamellar lipo-somes made with the French pressure cell: A simple preparative and semiquantitative technique. *J. Lipid. Res.* 21 (1980) 981-992
192. Chapman, D.: Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quart. Rev. Biophys.* 8 (1975) 185-223
193. Lee, A.G.: Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions. II: Mixtures involving lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 472 (1975) 237-281 und 285-334
194. Melchior, D.L., Steim. J.M.: Thermotropic transitions in biomembranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 5 (1976) 205-238
195. Demel, R.A., De Kruijff, B.: The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457 (1976) 109-132
196. Jain, M.K., Ramirez, F., McCaffrey, T.M., Ionnou, P.V., Maracek, J.F., Jeunissen-Bijvelt J.: Phosphatidylcholesterol bilayers. A model for phospholipid-cholesterol interaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 600 (1980) 678-688
197. Kitagawa, T., Inoue, K. Nojima, S.: Properties of liposomal membranes composed of short-chain lecithins; Properties of liposome membranes composed of short-chain lecithin. *J. Biochem.* 79 (1976) 1123-1133 und 1147-1155

198. Senior, J.H.: Fate and behaviour of liposomes in vivo: A review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 3 (1987) 123
199. Gregoriadis, G., (ed.): *Liposomes as Drug Carriers. Recent Trends Progress.* Winchester, Wiley 1988
200. Gregoriadis, G., (ed.): *Liposome Technology. Vol. 1-3.* Boca Raton CRC Press(1993)
201. Lasic, D.D.: *Liposomes: From Physics to Applications.* Elsevier, New York 1993
202. Storm, G., Oussoren, C., Peeters, P.A.M., Barenholz, Y.: Tolerability of liposomes in vivo. In: *Liposome Technology.* Gregoriadis, G. (ed). CRC Press, Boca Raton 1993, 345
203. Blunk, T., Hochstrasser, D.F., Müller, R.H.: Plasma component adsorption patterns on colloidal drug carriers. Determination by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 38 (1992) 32
204. Kirby, C., Clark, J., Gregoriadis, G. Effect of cholesterol content of small unilamellar lipo-somes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 186 (1980) 591
205. Hwang, K.J.: *Liposomes from Biophysics to Therapeutics.* New York, Marcel Dekker 1987, 109
206. Beaumier, P.L., Hwang, K.J., Slattery, J.T.: Effect of liposome dose on the elimination of small unilamellar sphingomyelin-cholesterol vesicles from the circulation. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 39 (1983) 227
207. Mauk, R.M., Gamble, R.C.: Stability of lipid vesicles in tissues of the mouse. A gamma-ray perturbed angular correlation study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 765-769
208. Abra, R.M., Hunt, C.A.: Liposome disposition in vivo. III. Dose and vesicle-size effects. *Biochim. Biophys. Acta* 666 (1981) 493
209. Woodle, M.C.: Surface-modified liposomes: Assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation. *Chem. Phys. Lipids* 64 (1993) 249
210. Huang, L.: Forum: Covalently attached polymers and glycans to alter the biodistribution of liposomes. *J. Liposome Res.* 2 (1992) 289
211. Gabizon, A.A.: Forum: Liposomes as carriers of anthracyclines. *J. Liposome Res.* 4 (1994) 445
212. Woodle, M., Storm, G., Newman, M.S., Collins, L.R., Szoka, F., Martin, F.J.: Prolonged delivery of Vasopressin by long circulating liposomes. *Proceed. Intern. Symp. Control. Re. Bioact. Mater.* 18 (1991) 103-104

213. New, R.R.C., Black, D. D.V., Parker, R.J., Puri, A., Scherphof, G.L.: Liposomes - a practical approach. New, R.R.C. (ed.). Oxford, IRL Press 1990, 221-231
214. Rubas, W., Schreier, H.: Liposomes: advances in production-technology and therapy. *Pharmazie uns.Zeit* 20 (1991) 255-270
215. Macrophage activation. 11. Forum d'Immunologie. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* (1986) 191
216. Fidler, I.J.: Macrophages and metastasis. A biological approach to cancer therapy. *Cancer Res.* 45 (1985) 4714
217. Fidler, I.J.: Therapy of spontaneous metastases by intravenous injection of liposomes containing lymphokines. *Science* 208 (1980) 1469-1471
218. Schreiber, R.D., Celada, A., Buchmeier, N.: The role of interferon-gamma in the induction of activated macrophages. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* (1986) 203
219. Juy, D., Chedid, L.: Comparison between macrophage activation and enhancement of non-specific resistance to tumours by mycobacterial immunoadjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (1975) 4105
220. Sone, S., Fidler, I.J.: Tumor cytotoxicity of rat alveolar macrophages activated in vitro by endotoxin. *J. Reticuloendothel. Soc.* 27 (1980) 269
221. Barna, B.P., Deodhar, S.D., Gautam, S., Yen-Lieberman, B., Roberts, D.: Macrophage activation and generation of tumoricidal activity by liposome-associated human C-reactive protein. *Cancer Res.* 44 (1984a) 305-310
222. Barna, B., Roberts, D., Jacobs, B., Deodhar, S., Clements, M., Edinger, M., James, K.: Enhancement of human monocyte activity by human C-reactive protein. *Fed. Proc.* 43 (1984b) 781
223. Gregoriadis, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* 11 (1990) 89
224. Meltzer, M.S., Skillman, D.R., Hoover, D.L., Hanson, B.D., Turpin, J.A., Kalter, C., Gendelman, H.E.: Macrophages and the human immunodeficiency virus. *Immunol. Today* 11 (1990) 217
225. van Rooijen, N.: The liposome-mediated macrophage „suicide“ technique. *J. Immunol. Methods.* 124 (1989) 1
226. Ofek, I., Sharon, N.: Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* 56 (1988) 539
227. Blackwell, J.M., Ezekowitz, R.A.B., Roberts, M.B., Channon, J.Y., Sim, R.B., Gordon, S.: Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 162 (1985) 324

228. Handman, E., Goding, J.W.: The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J.* 4 (1985) 329
229. Szoka, F.C., Mayhew, E.: Alteration of liposome disposition in vivo by bilayer situated carbohydrates. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 110 (1983) 140
230. Barratt, G.M., Tenu, J.-P., Yapo, A., Petit, J.-F.: Preparation and characterisation of liposomes containing mannosylated phospholipids capable of targeting drugs to macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 862 (1986) 153
231. Lee, Y.C., Ballou, C.E.: Structural studies on the myo-inositol mannosides from the glyco-lipids of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 1316
232. Lee, Y.C., Ballou, C.E.: Complete structures of the glycopospholipids of *Mycobacteria*. *Biochemistry* 4 (1965) 1395
233. Ponpipom, M.M., Bugianesi, R.L., Shen, T.Y. Cell surface carbohydrates for targeting studies. *Can. J. Chem.* 58 (1980) 214
234. Umezawa, F., Eto, Y.: Liposome targeting to mouse brain: Mannose as a recognition marker. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 153 (1988) 1038
235. Ghosh, P., Bachhawat, B.K.: Grafting of different glycosides on the surface of liposomes and its effect on the tissue distribution of <sup>125</sup>I-labelled  $\gamma$ -globulin encapsulated in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 632 (1980) 562
236. Ghosh, P., Das, P.K., Bachhawat, B.K.: Targeting of liposomes towards different cell types of rat liver through the involvement of liposome surface glycosides. *Arch. Biochem. Biophys.* 213 (1982) 266
237. Latif, N., Bachhawat, B.K.: The effect of surface sugar on liposomes in immunopotentialiation. *Immunol. Lett.* 8 (1984) 75
238. Weissig, V., Lasch, J., Gregoriadis, G.: Covalent coupling of sugars to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1003 (1989) 54
239. Muller, C.D., Schuber, F.: Neo-mannosylated liposomes: Synthesis and interaction with mouse Kupffer cells and resident peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 986 (1989) 97
240. Opanasopit, P., Higuchi, Y., Kawakami, S.: Involvement of serum mannan binding proteins and mannose receptors in uptake of mannosylated liposomes by macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (2001) 134-145
241. Toda, S., Ishii, N., Okada, E., Kusakabe, K.-I., Arai, H., Hamajima, K., Gorai, I., Nishioka, K., Okuda, K.: HIV-1-Specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody. *Immunol.* 92 (1997) 111-117



242. Fukasawa, M., Shimizu, Y., Shikata, K., Nakata, M., Sakakibar, R., Yamamoto, N., Hatanaka, M., Mizuochi, T.: Liposome oligomannose-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *FEBS Lett.* 441 (1998) 353 – 356
243. Kawakami, S., Sato, A., Nishikawa, M., Yamashita, F., Hashida, M.: Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther.* 7 (2000) 292-299
244. Barrett, G.M., Nolibé, D., Yapo, A., Petit, J.-F., Tenu, J.-P.: Use of mannosylated liposomes for in vivo targeting of a macrophage activator and control of artificial pulmonary metastases. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* 138 (1987) 437
245. Dumont, S., Muller, C.D., Schuber, F., Bartholeyns, J.: Antitumoral properties and reduced toxicity of LPS targeted to macrophages via normal or mannosylated liposomes. *Anticancer Res.* 10 (1990) 155
246. Huitinga, I., van Rooijen, N., De Groot, C.J.A., Uitdehaag, B.M.J. Dijkstra, C.D.: Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J. Exp. Med.* 172 (1990) 1025-1033
247. Carafoli, E., Crompton, M.: The regulation of intracellular calcium. In: *Current Topics in Membranes Transport*. Bronner F., Kleinzeller, A. (eds.). New York, Academic Press 1978, 151-216
248. Rebhun, L.I.: Cyclic nucleotides, calcium and cell division. *Internat. Rev. Cytol.* 49 (1977) 1-54
249. Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human bloods. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (1968) Suppl. 97, 77-89
250. Boyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 5 (1976) Suppl. 5, 9-15
251. Feige, U., Overwien, B., Sorg, C.: Purification of human blood monocytes by hypotonic density gradient centrifugation in Percoll. *J. Immunol. Methods* 54 (1982) 309-315
252. Neumann, C., Sorg, C.: Sequential expression of functions during macrophage differentiation in murine bone marrow liquid cultures. *Eur. J. Immunol.* 10 (1980) 834-840
253. Roche, A.C., Barzilay, M. Midoux, P., Junqua, S., Sharon, N., Monsigny, M.: Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by Lewis lung carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 22 (1983) 131-140

254. Bayard, B., Kerckaert, J.P.: Evidence for uniformity of the carbohydrate chains in individual glycoprotein molecular variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 777-784
255. McIntyre, J.C., Sleight, R.G.: Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochem.* 30 (1991) 11819-11827
256. Kremer, J.M.H., Esker, M.W.J., Pathmamanohan, K., Wiersema, P.H.: Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochem.* 16 (1977) 3932-3935
257. Cooper, J.A.D., Smith, W., Bacila, M., Medina, H.: Galactose Oxidase from *Polyporus circinatus*. *Fr. J. Biol. Chem.* 234 (1959) 445-448
258. Schmid, K., Nimberg, R.B., Kimura, A., Yamaguchi, H., Binette, D.B.: The carbohydrate units of human plasma alpha1-acid glycoprotein by 360-MHZ <sup>1</sup>H NMR spectroscopy permethyl-ation analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 492 (1977) 291-302
259. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegenthart, J.F.G., Binette, J.P., Schmid, K.: Determination of the primary structures of 16 asialo-carbohydrate units derived from human plasma alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem.* 17 (1978) 5206-5214
260. Bierhuizen, M.F.A., De Wit, M., Govers, C., Ferwerda, W., Koeleman, C., Pos. O., van Dijk, W.: Glycosylation of three molecular forms of human alpha1-acid glycoprotein having different interactions with concanavalin A. Variations in the occurrence of di-, tri-, tetra-antennary glycans and the degree of sialylation. *Eur. J. Biochem.* 175 (1988) 387-394
261. Emeis, J.J., Verheijen, J.H., Runday, H.K., de Maat, M.P.M., Brakman, P.: Progress in clinical fibrinolysis. *Fibrinolysis & Proteolysis* 11 (1997) 67-84
262. Collen, D.: Fibrin-selective thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 93 (1996) 857-865
263. Biessen, E.A.L., van Teijlingen, M., Vietsch, H., Barrett-Bergshoeff, M.M., Bijsterbosch, M.K., Rijken, D.C., van Berkel, Th.J.C., Kulper, J.: Antagonists of the mannose receptor and the LDL-receptor-related protein dramatically delay the clearance of tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 95 (1997) 46-52
264. Noorman, F., Barrett-Bergshoeff, M.M., Biessen, E.A.L., van de Bilt, E., van Berkel, Th.J.C., Rijken, D.C.: Cluster mannosides can inhibit mannose receptor-mediated tissue-type plasminogen activator degradation by both rat and human cells. *Hepatology* 26 (1997) 1303-1310

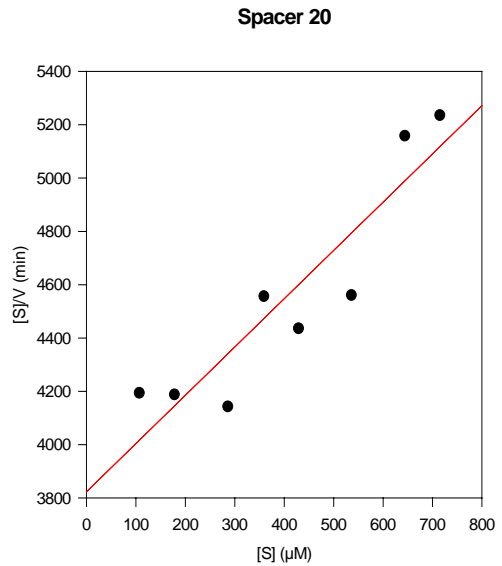
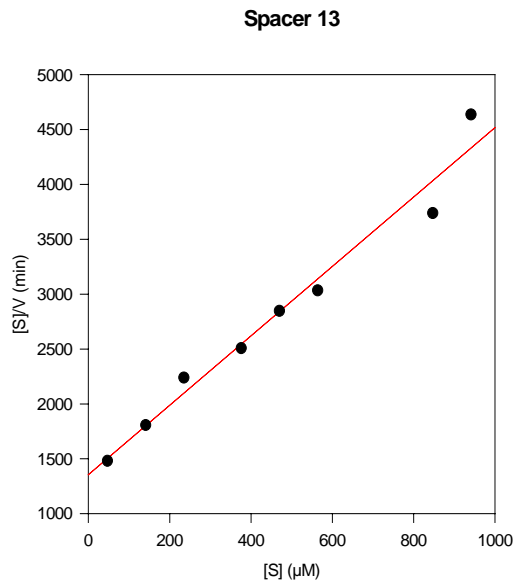
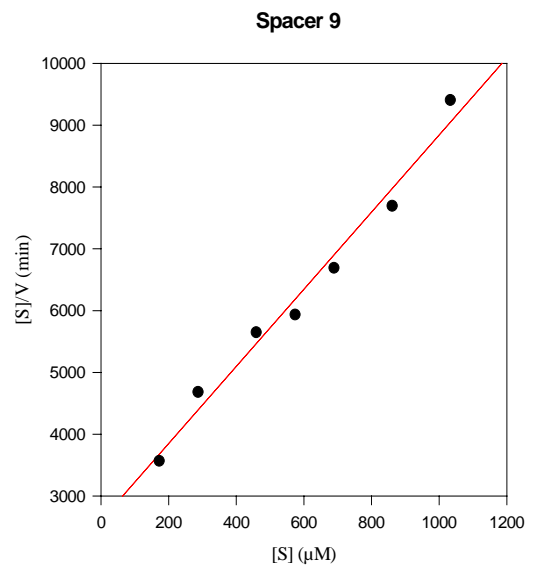
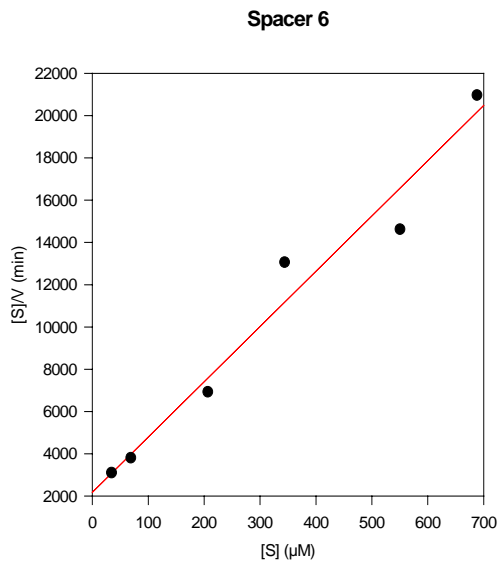
265. Taylor, M.E., Bezouska, K., Drickamer, K.: Contribution to ligand binding by multiple carbo-hydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 51719-51726
266. Haltiwanger, R.S., Hill, R.L.: The ligand binding specificity and tissue localization of a rat alveolar macrophage lectin. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15696-15702
267. Ohsumi, Y., Hoppe, C.A., Ogawa, T., Lee, Y.C.: Enhancement of macromolecular ligand binding by rabbit alveolar macrophages by mannose oligosaccharides and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (1988) 241-249
268. Robbins, J.C., Lam, M.H., Tripp, C.S., Bugianesi, R.L., Ponpipom, M.M., Shen, T.Y.: Synthetic glycopeptide substrates for receptor-mediated endocytosis by macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78 (1981) 7294-7298
269. Maynard, Y., Baenziger, J.U.: Oligosaccharide specific endocytosis by isolated rat hepatic reticuloendothelial cells. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 8063-8068
270. Muchmore, A.V., Sathyamoorthy, N., Decker, J., Sherblom, A.P.: Evidence that specific high-mannose oligosaccharides can directly inhibit antigen-driven T-cell responses. *J. Leukocyt. Biol.* 48 (1990) 457-464
271. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S.: Interleukin-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176 (1992) 287-292
272. Doyle, A.G., Herbein, G., Montaner, L.J., Minty, A.J., Caput, D., Ferrera, P., Gordon, S.: Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 1441-1445
273. Schreiber, S., Perkins, S.L., Teitelbaum, S.L., Chappel, J., Stahl, P.D., Blum, J.S.: Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 151 (1993) 4973-4981
274. Shepherd, V.L., Konish, M.G., Stahl, P.: Dexamethasone increases expression of mannose receptor and decreases extracellular lysosomal enzyme accumulation in macrophages. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 160-164
275. Imber, M.J., Pizzo, S.V., Johnson, J., Adams, D.O.: Selective diminution of the binding of mannose by murine macrophages in the late stages of activation. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5129-5135
276. Shepherd, V.L., Abdorasulnia, R., Garrett, M., Cowan, H.B.: Down-regulation of mannose receptor activity in macrophages after treatment with lipopolysaccharide and phorbol esters. *J. Immunol.* 145 (1990) 1530-1536

277. Bozeman, P.M., Hoidal, J.R., Shepherd, V.L.: Oxidant-mediated inhibition of ligand uptake by the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1240-1247
278. Shepherd, V.L., Abdorasulnia, R., Stephenson, J., Crenshaw, C.: Modulation of mannose receptor activity by proteolysis. *Biochem. J.* 270 (1990) 771-776
279. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A.: 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 (1995) 389-400
280. Haugland, R.P.: *Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* 5. Ed. 1992
281. Fraley, R., Straubinger, R., Rule, G.: Liposome-mediated delivery of DNA to cells: enhanced efficiency of delivery by changes in lipid composition and incubation conditions. *Biochem.* 20 (1981) 6978-6987
282. Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I.: Mannan-binding protein and conglutinin in bovine serum. *J. Biochem.* 98 (1985) 1309-1320
283. Larkin, M., Childs, R.A., Matthews, T.J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A.M., Savill, J.S., Haslett, C., Diaz, R., Feizi, T.: Oligosaccharid-mediated interactions of the envelope glyco-protein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS* 3 (1989) 793
284. Cullis, P.R. De Kruijff, B.: Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559 (1979) 399-420
285. Gruner, S.M., Cullis, P.R., Hope, M.J., Tilcock, C.P.S.: Lipid polymorphism : the molecular basis of nonbilayer phases. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 14 (1985) 211-238
286. Rand, R.P.: Interacting phospholipid bilayers: measured forces and induced structural changes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10 (1981) 277-314
287. Lis, L.J., McAlister, M., Fuller, N., Rand, R.P., Parsegian, V.A.: Interaction between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys. J.* 37 (1982) 657-665
288. Bryant, G., Pope, J.M., Wolfe, J.: Low hydration phase properties of phospholipid mixtures. Evidence for dehydration-induced fluid-fluid separations. *Eur. Biophys. J.* 21 (1992) 223-232
289. Hinderliter, A.K., Huang, J., Feigenson, G.W.: Detection of Phase Separation in Fluid Phosphatidylserine/Phosphatidylcholine Mixtures. *Biophys J.* 67 (1994) 1906-1911
290. Trauble, H. Eibl, H.: In: *Functional Linkage in Biomolecular Systems.* Schmitt, F.O., Schneider, D.M. Grothers, D.M. (eds.); Plenum Press, New York 1975; 509-550

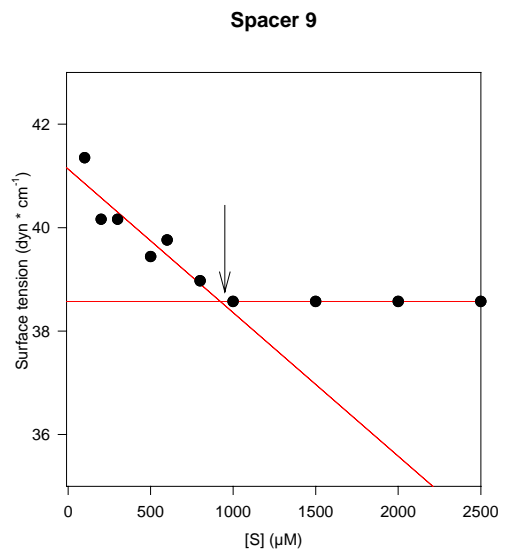
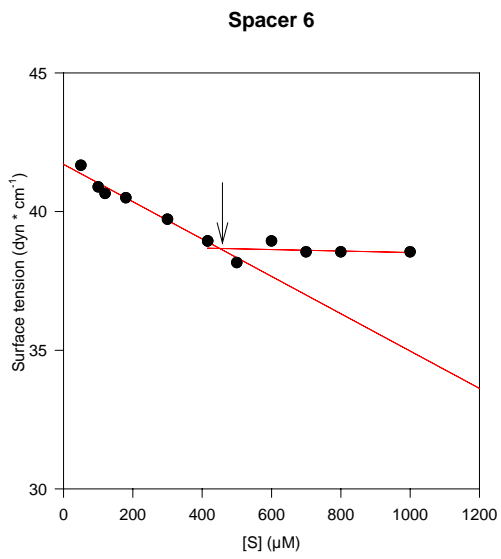
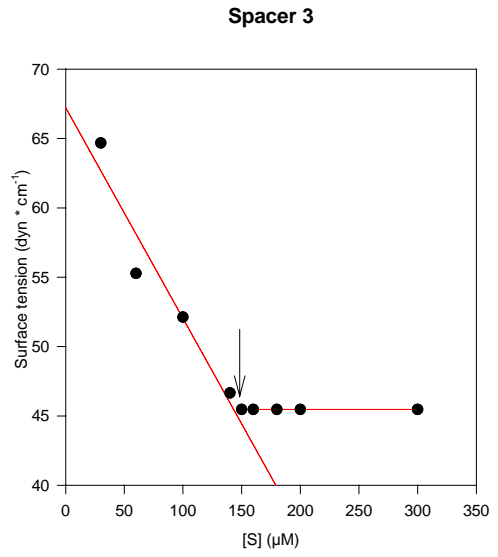
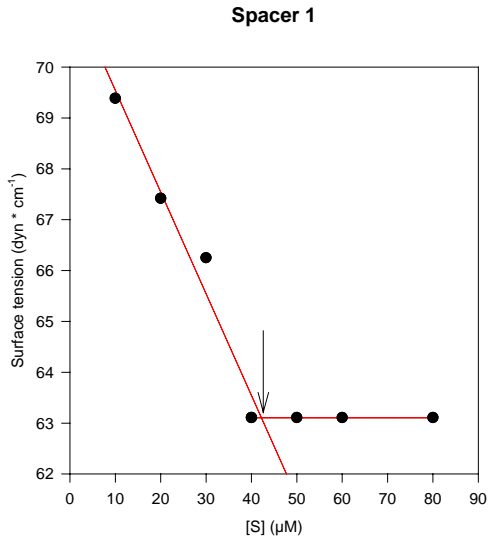
291. Eibl, H., Blume, A.: The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 553 (1979) 476-488
292. Martin, T.W., Lagunoff, D.: Interaction of phosphatidylserine with mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 4997-5000
293. Fishman, P.H., Brady, R.O.: Biosynthesis and function of gangliosides. *Science*. 194 (1976) 906-15
294. Olsnes, S., Refsnes, K., Pihl, A.: Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* 249 (1974) 627-631
295. Draper, R.K., Chin, D., Simon, M.I.: Diphtheria toxin has the properties of a lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 261-265
296. Omedeo-Sale, F., Brady, R.O., Fishman, P.H.: Effect of thyroid phospholipids on the inter-action of thyrotropin with thyroid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 5301-5305
297. Chang, T., Neville, D.M.: Demonstration of diphtheria toxin receptors on surface membranes from both toxin-sensitive and toxin-resistant species. *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6866-6871
298. Suzuki, Y., Suzuki, K.: Specific Radioactive Labeling of Terminal N-Acetylgalactosamine of Glycosphingolipids by the Galactose Oxidase-Sodium Borohydride Method. *J. Lipid Res.* 13 (1972) 687-690
299. Stewart, R.J., Boggs, J.M.: Exposure of Galactosylceramide to Galactose Oxidase in Lipo-somes: Dependence of Lipid Environment and Ceramide Composition. *Biochem.* 32 (1993) 5605-5614
300. Lampio, A., Rauvala, H., Gahmberg, C.G.: Exposure of Major Neutral Glycolipids in Red Cells to Galactose Oxidase: Effect of Neuraminidase. *Eur. J. Biochem.* 157 (1986) 611-616
301. Lampio, A., Siissalo, I., Gehmberg, C.G.: Oxidation of Glycolipids in Liposomes by Galactose Oxidase. *Eur. J. Biochem.* 178 (1988) 87-91
302. Masserini, M., Sonnino, S., Ghidoni, R., Chigormo, V.: Galactose Oxidase Action on G<sub>M1</sub> Ganglioside in Micellar and Vesicular Dispersions. *Biochim. Biophys. Acta* 688 (1982) 333-334
303. Kabouridis, P., Ley, S.: S-acylation of LCK protein tyrosin kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBOJ* 16 (1997) 4983-98
304. Kitano, H., Al-arifi, A.: Catalytic effects of galactose oxidase on micelle-forming galactolipids. *J. Colloid. Interface* 255 (2002) 260-264
305. Stewart, J. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1980; 104:10-14

## 6 Anhang

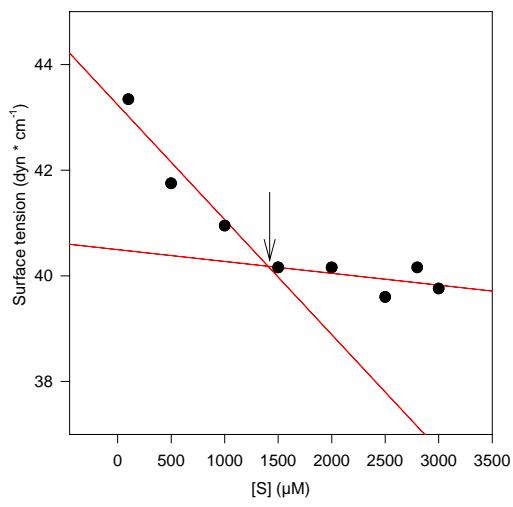
### A 1 Kinetische Parameter ( $K_m$ -Werte)



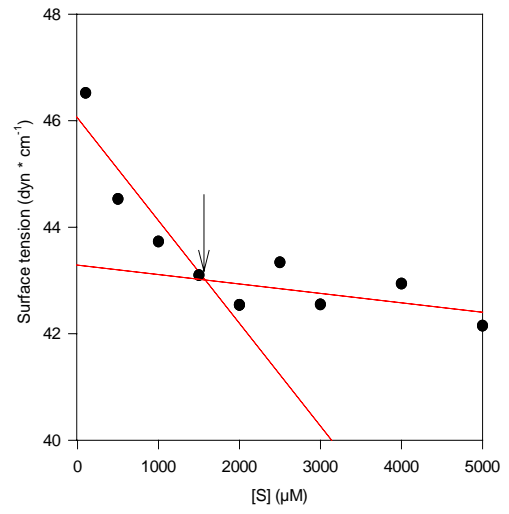
**A 2 CMC-Bestimmung**



Spacer 13

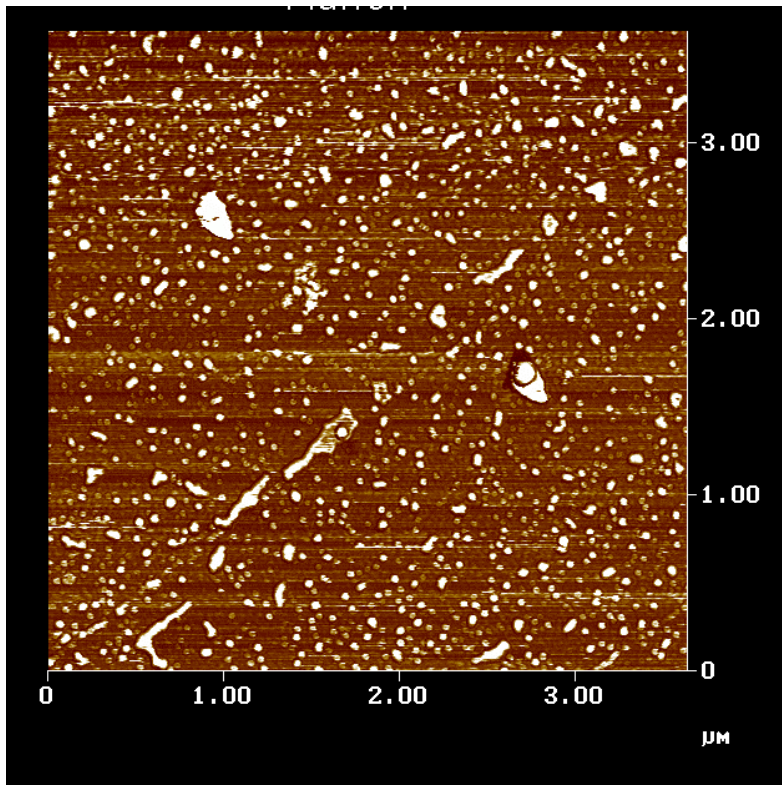


Spacer 20

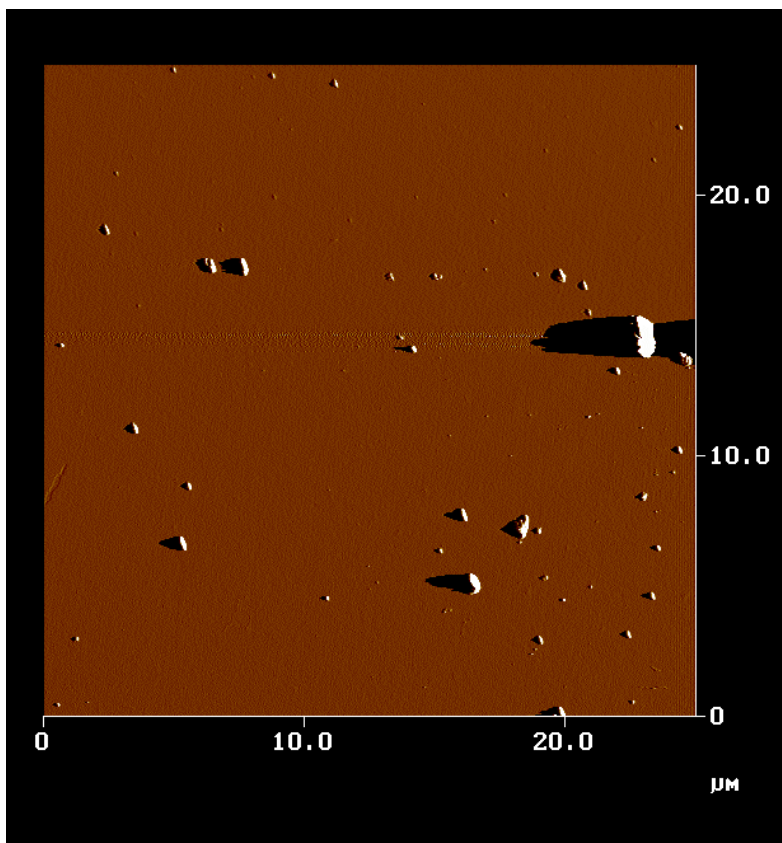




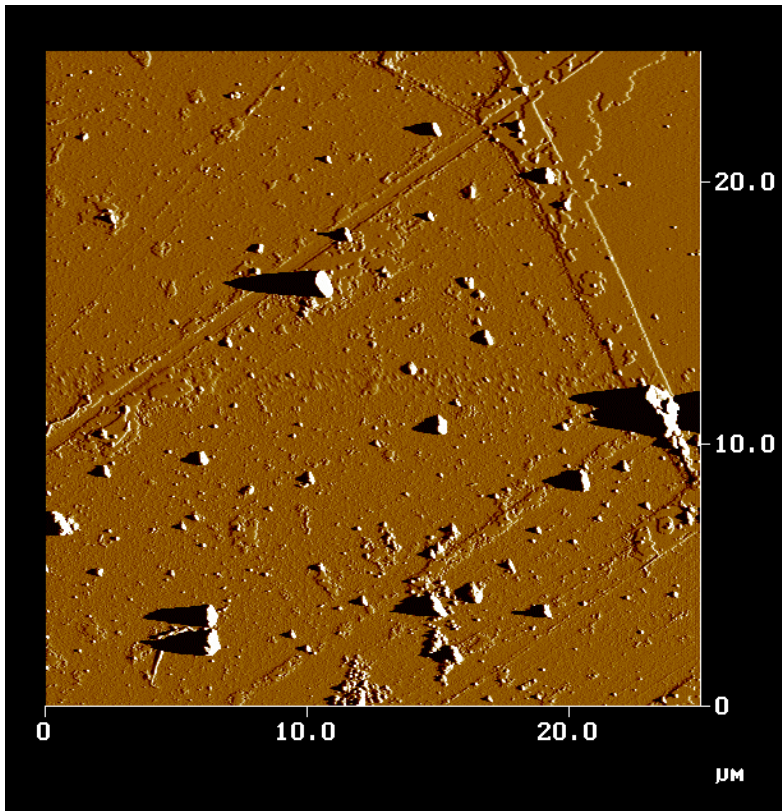
**A 3 AFM-Images**



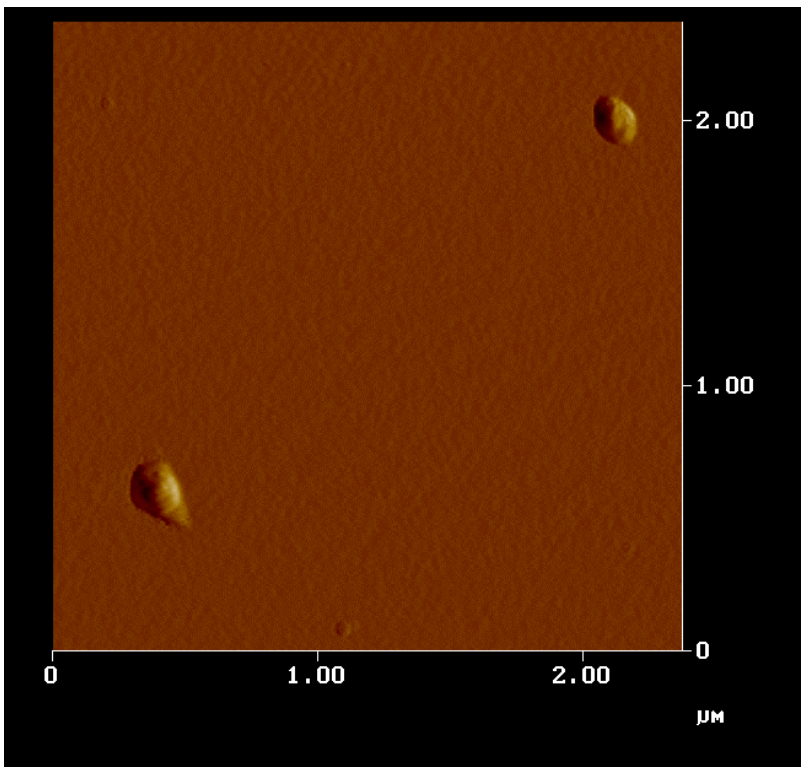
**7 Mol-% Gal (1/3) in  
DOPC:DOPE (1:1)-Vesikel  
(pH 7, 3)**



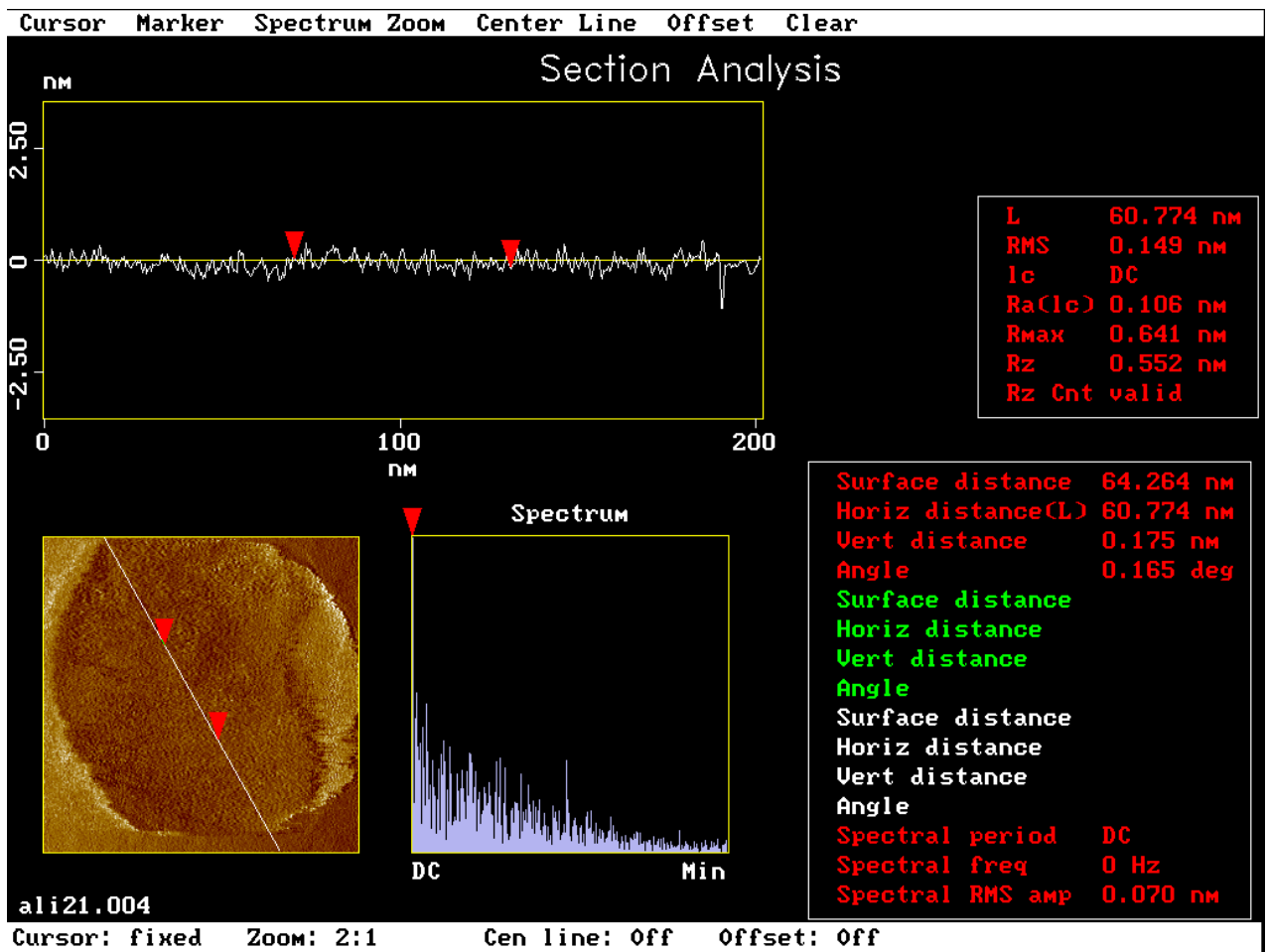
**7 Mol-% Gal (1/9) in  
DOPC:DOPE (1:1)-Vesikel  
(pH 7, 3)**



**7 Mol-% Gal (1/3) in  
DOPC:DOPA (1:1)-Vesikel  
(pH 4, 5)**



**7 Mol-% Gal (1/9) in  
DOPC:DOPA (1:1)-Vesikel  
(pH 4, 5)**



Rasterkraftelektronenmikroskopische Analyse der Oberflächen-Beschaffenheiten galactosylierter Vesikel.

## **Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die hier vorliegende, von mir eingereichte Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ali Al-arifi

Halle/Saale, 2003

## Lebenslauf

Name: Ali Al-Arifi

Geburtsdatum: 29.08.1967

Geburtsort: Bani Arif (Jemen)

Familienstand: verheiratet

1973 - 1979 Grundschole in Bani Arif (Jemen)

1979 - 1985 Mittel- und Sekundarschole mit Abitur in Al-Hodeidah (Jemen)

1985 - 1986 Wehrdienst

1986 - 1987 Sprachkurs für Deutsch, Herder-Institut, Radebeul, Deutschland

1987 - 1993 Pharmazie-Studium an der Sektion Pharmazie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg mit dem Erhalt des höchsten Karl-Marx-Leistungsstipendiums, Hochschulabschluss als Diplom-Pharmakologe, Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen zum Thiol-Gehalt im Rattenserum bei der Entzündung"

1994 - 1995 Praktikum in der „Neuen Apotheke“ sowie in der PKH, Halle

1996 Ablegung des III. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung

1997 - 2002 Promovend in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Nuhn am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von 1997 bis 2002 in der Arbeitsgruppe Glykolipid-Lektin-Wechselwirkungen in Modellmembranen des Instituts für Pharmazeutische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. habil. Peter Nuhn, für die Überlassung des interessanten Themas und die über den gesamten Zeitraum gewährte Betreuung. Sein stets förderndes Interesse hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Dagmar Rieman, Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle, möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Zellkultivierung, der Bereitstellung von Zellen sowie der durchflusszytometrischen Analysen und der dazu benötigten Software danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, für die zahlreichen Diskussionen und die Förderung meiner Arbeit auf dem Gebiet der Liposomen am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle.

Für die Bereitstellung der Testsubstanzen möchte ich Herrn Prof. B. Dobner, Herrn Dr. M. Schmidt sowie Herrn Dr. H. Altman danken, die mir auch bei vielen Fragen behilflich waren.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Hiromi Kitano, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Toyama University, Japan für die kooperative Zusammenarbeit auf dem Gebiet der enzymatischen Bestimmung galactosylierter Lipide.

Mein Dank gilt allen Fachbereichsangehörigen, die am Zustandekommen der Arbeit Anteil hatten.