

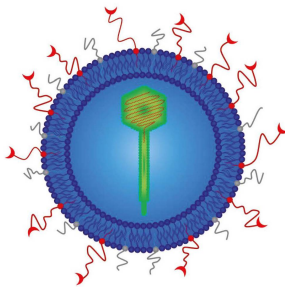


Manuel Weis (Autor)

# Methoden und Analytik zum liposomalen Einschluss von D29-Mykobakteriophagen zur Tuberkulosetherapie

Manuel Weis

Methoden und Analytik  
zum liposomalen Einschluss  
von D29-Mykobakteriophagen  
zur Tuberkulosetherapie



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

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

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Tuberkulose</b>	<b>2</b>
1.1.1	Definition und Pathogenese	2
1.1.2	Mykobakterien	3
1.1.3	Bakteriophagen	6
1.1.4	Tuberkulosetherapie mit Bakteriophagen	8
<b>1.2</b>	<b>Liposomen</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Verfahren zur Herstellung von Liposomen</b>	<b>11</b>
1.3.1	pH-sensitive Liposomen	12
1.3.2	Elektroformation	14
1.3.3	Lyophilisation	15
1.3.4	Ethanolinjektion	16
1.3.5	Duale Asymmetrische Zentrifugation	18
1.3.6	Aktives Targeting mit Lipoarabinomannan	20
<b>1.4</b>	<b>Physikalische und chemische Trennmethode</b>	<b>22</b>
1.4.1	Physikalische Trennmethode – Dichtegradientenzentrifugation	22
1.4.1.1	Zentrifugationsarten	22
1.4.1.2	Dichtegradienten	23
1.4.2	Inaktivierung freier Phagen	24



1.4.3	Solubilisierung	24
1.4.3.1	Triton X-100	25
1.4.3.2	Phospholipase A <sub>2</sub>	25
1.4.3.3	Natriumcholat	26
1.4.3.4	Nonidet P40	26
<b>1.5</b>	<b>Mikroskopische Analysenmethoden</b>	<b>27</b>
1.5.1	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie	27
1.5.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	28
<b>1.6</b>	<b>Durchflusszytometrische Analysenmethoden</b>	<b>29</b>
<b>1.7</b>	<b>Mikrobiologische Analysenmethoden</b>	<b>30</b>
1.7.1	Plaque-Assay	30
1.7.2	Infektions-Assay	31
<b>1.8</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>Material und Geräte</b>	<b>33</b>
2.1	Verwendete Chemikalien	33
2.2	Verbrauchsmaterialien	40
2.3	Geräte	42



<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Liposomenzubereitungen</b>	<b>47</b>
3.1.1	Bestimmung der Phospholipidgesamtkonzentration	47
3.1.2	Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und des Polydispersitätsindex	48
3.1.3	Bestimmung des Zetapotentials	49
<b>3.2</b>	<b>Markieren von Liposomen und D29-Mykobakteriophagen</b>	<b>49</b>
3.2.1	Markieren der Liposomen	51
3.2.2	Markieren der ds-DNA von D29-Mykobakteriophagen	51
3.2.3	Markieren der Hüllproteine von D29-Mykobakteriophagen	52
<b>3.3</b>	<b>pH-sensitive Liposomen</b>	<b>52</b>
3.3.1	Herstellung pH-sensitiver Liposomen	52
<b>3.4</b>	<b>Elektroformation</b>	<b>53</b>
3.4.1	Probenvorbereitung	53
3.4.2	Durchführung	53
<b>3.5</b>	<b>Lyophilisation</b>	<b>55</b>
3.5.1	Herstellung der Liposomengrundlage	55
<b>3.6</b>	<b>Ethanolinjektion</b>	<b>57</b>
3.6.1	Probenvorbereitung	57
3.6.2	Durchführung	58
<b>3.7</b>	<b>Duale Asymmetrische Zentrifugation</b>	<b>59</b>
3.7.1	Herstellung von Lipidaliquots	59
3.7.2	Herstellung nicht-beladener Liposomen	60
3.7.3	Herstellung beladener Liposomen	61



<b>3.8 Dichtegradientenzentrifugation</b>	<b>61</b>
3.8.1 Erzeugung eines Stufengradienten	61
3.8.2 Erzeugung eines Lineargradienten	63
3.8.3 Rotoren	65
3.8.3.1 Zentrifugation mit einem Festwinkelrotor	66
3.8.3.2 Zentrifugation mit einem Ausschwingrotor	66
3.8.4 Fraktionierung	67
<b>3.9 Inaktivierung freier D29-Mykobakteriophagen</b>	<b>68</b>
<b>3.10 Solubilisierung von Liposomen</b>	<b>69</b>
3.10.1 Phospholipase A <sub>2</sub>	69
3.10.2 Natriumcholat	70
3.10.3 Nonidet P40	70
<b>3.11 Mikroskopische Analysenmethoden</b>	<b>71</b>
3.11.1 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie	71
3.11.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	71
<b>3.12 Durchflusszytometrische Analysenmethoden</b>	<b>72</b>
3.12.1 Durchflusszytometrische Analyse von D29-Mykobakteriophagen	72
3.12.2 Durchflusszytometrische Analyse von Liposomen-Zell-Interaktionen	73
3.12.3 Aktives Targeting mit Lipoarabinomannan	74
<b>3.13 Mikrobiologische Analysenmethoden</b>	<b>75</b>
3.13.1 Plaque-Assay	75
3.13.2 Infektions-Assay	77



<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodenentwicklung zum Einschluss von D29-Mykobakteriophagen</b>	<b>79</b>
4.1.1	pH-sensitive Liposomen	79
4.1.2	Elektroformation	80
4.1.2.1	Einfluss und Auswahl geeigneter Lipide	80
4.1.2.2	Untersuchungen mit DOPC	82
4.1.2.3	Cryo-TEM-Bildanalyse	84
4.1.3	Lyophilisation mit Rehydratisierung	86
4.1.3.1	Einfluss der Puffer- und Lipidzusammensetzung auf die Liposomengröße (ohne D29-Mykobakteriophagen)	86
4.1.3.2	Einfluss der Puffer- und Lipidzusammensetzung auf die Liposomengröße (mit D29-Mykobakteriophagen)	91
4.1.4	Ethanolinjektion	95
4.1.4.1	Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit	95
4.1.4.2	Einfluss der Rührgeschwindigkeit	97
4.1.4.3	Einfluss des inneren Kanüldurchmessers	97
4.1.4.4	Einfluss der Lipidzusammensetzung	98
4.1.4.5	Cryo-TEM-Bildanalyse	103
4.1.5	Duale Asymmetrische Zentrifugation	104
4.1.5.1	Herstellung von Liposomen mittels Dualer Asymmetrischer Zentrifugation	104
4.1.5.2	Cryo-TEM-Bildanalyse	105
<b>4.2</b>	<b>Abtrennung freier Phagen von liposomal assoziierten D29-Mykobakteriophagen</b>	<b>106</b>
4.2.1	Dichtegradientenzentrifugation	106
4.2.1.1	Aufkonzentrierung von Bakteriophagen	106
4.2.1.2	Fraktionierung	106
4.2.2	Inaktivierung freier Phagen mit Ammoniumeisen(II)sulfat	118



4.2.3	Solubilisierung von Liposomen	119
4.2.3.1	Triton X-100	119
4.2.3.2	Phospholipase A <sub>2</sub>	119
4.2.3.3	Natriumcholat	120
4.2.3.4	Nonidet P40	121
<b>4.3</b>	<b>Methodenentwicklung zur Analytik des Einschlusses von D29-Mykobakteriophagen</b>	<b>122</b>
4.3.1	Mikroskopische Analysenmethoden	122
4.3.1.1	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie	122
4.3.1.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	124
4.3.2	Durchflusszytometrische Analysenmethoden	126
4.3.3	Mikrobiologische Analysenmethoden	129
4.3.3.1	Plaque-Assay	129
4.3.3.2	Infektions-Assay	132
<b>4.4</b>	<b>Liposomen-Zell-Interaktionen</b>	<b>134</b>
4.4.1	Aktives Targeting mit Lipoarabinomannan	134
4.4.2	Phagozytoseuntersuchungen	136
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>139</b>
5.1	Herstellungsmethoden zum liposomalen Einschluss	139
5.2	Analysenmethoden zum Nachweis des Einschlusses	140
5.3	Liposomen-Zell-Interaktionen	142
5.4	Ausblick	143