

# Wechselwirkungen glykosylierter Liposomen mit humanen phagozytierenden Zellen



## 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 Andreas Engel  
geb. am 03.06.1964 in Eisenach

Gutachter:

1. P. Nuhn, Martin-Luther-Universität Halle FB Pharmazie, Inst. für Pharm. Chemie
2. R. Neubert, Martin-Luther-Universität Halle FB Pharmazie, Inst. für Pharm. Technologie
3. R. Schubert, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. Pharm. Inst., Lehrst. für Pharm. Technologie

Halle (Saale), den 20. 11. 1999

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>4</b>
<b>2 Theoretischer Teil.....</b>	<b>6</b>
2.1 Makrophagen.....	6
2.2 Rezeptoren und Phagozytose.....	7
2.2.1 Opsoninvermittelte Phagozytose.....	7
2.2.2 Opsoninunabhängige Phagozytose .....	9
2.2.2.1 Hydrophobe Wechselwirkungen .....	9
2.2.2.2 Opsoninunabhängige Erkennung .....	9
2.2.2.3 Membranlektine und Mannoserezeptor.....	11
2.3 Lektine und Liganden .....	18
2.4 Liposomentargeting .....	24
2.4.1 Natürliches Schicksal konventioneller Liposomen .....	24
2.4.2 Spezifisches Targeting .....	27
2.4.2.1 Sterische Stabilisierung .....	28
2.4.2.2 Rezeptorvermitteltes Targeting .....	30
2.4.2.3 Liganden und sterische Stabilisierung .....	36
<b>3 Materialien und Methoden.....</b>	<b>39</b>
3.1 Substanzen.....	39
3.2 Liposomen .....	39
3.2.1 Liposomenpräparation / Fluoreszenzmarkierung .....	39
3.2.1.1 Wässrige Fluoreszenzmarkierung.....	39
3.2.1.2 Lipophile Fluoreszenzmarkierung .....	40
3.2.2 Charakterisierung .....	40
3.2.2.1 Bestimmung der Einschlußrate .....	40
3.2.2.2 Stabilitätsuntersuchungen.....	40
3.2.2.3 Partikelgrößenbestimmung .....	41
3.2.2.4 Gehalt Glykolipid.....	41
3.3 Lektinbindung .....	41
3.3.1 Trübungsmessung.....	41
3.3.2 Fluoreszenzmessung .....	41

3.4 Liposomen-Zell-Wechselwirkungen .....	42
3.4.1 Zellmodelle .....	42
3.4.1.1 Zelllinien .....	42
3.4.1.2 Native Zellen .....	42
3.4.2 Quantifizierung der Liposomenaufnahme .....	44
3.4.2.1 Zelllinien .....	44
3.4.2.2 Native Zellen .....	45
3.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	46
3.6 Statistik / Darstellung der Ergebnisse .....	46
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1 Glykolipide .....	47
4.2 Stabilität der Liposomenpräparation .....	48
4.3 Lektinbindung .....	49
4.4 Liposomen-Zell-Wechselwirkungen .....	52
4.4.1 Zelllinien .....	52
4.4.1.1 Makrophagenmodell .....	52
4.4.1.2 Aufnahme reiner Grundlipidliposomen.....	53
4.4.1.3 Aufnahme mannosylierter Liposomen durch HL60-Zellen .....	54
4.4.1.4 Aufnahme glykosylierter Liposomen durch U937.....	57
4.4.2 Native Zellen .....	63
4.4.2.1 Zelltypcharakterisierung.....	63
4.4.2.2 Detektion des Mannoserezeptors .....	64
4.4.2.3 Aufnahme mannosylierter Liposomen durch Pericard- Monozyten/Makrophagen .....	69
4.4.2.3.1 Verdrängung der Liposomenaufnahme.....	70
4.4.2.3.2 Selektion rezeptorpositiver Zellen .....	73
4.4.2.4 Aufnahme mannosylierter Liposomen durch Peritoneal-Makrophagen.....	76
4.5 Rezeptorbindung und Liganden-Clusterung .....	80
4.5.1 Lektinbindung.....	80
4.5.2 Liposomen-Zell-Wechselwirkungen.....	86
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>101</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>103</b>

## Abkürzungsverzeichnis

6-CF	-	6-Carboxyfluoreszein
AS	-	Aminosäure
BSA	-	bovines Serumalbumin
Chol	-	Cholesterol
ConA	-	Concanavalin A
CRD	-	(carbohydrate recognition domain) Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne
CSF-1	-	koloniestimulierender Faktor-1
DCP	-	Dicetylphosphat
DLPC	-	Dilauroylphosphatidylcholin
DMPC	-	Dimyristoylphosphatidylcholin
DOPC	-	Dioleoylphosphatidylcholin
DPPC	-	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	-	Distearoylphosphatidylcholin
EPC	-	Ei-Phosphatidylcholin (Eilecithin)
EtO	-	Ethylenoxid
FITC	-	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	-	fötale Kälberserum
FSC	-	(forward scatter) Vorwärtsstreuung
Fuc	-	Fucose, Fucosyl-
Gal	-	Galaktose, Galaktosyl-
Glc	-	Glucose, Glucosyl-
GlcNAc	-	N-Acetyl-Glucosamin
GM-CSF	-	Granulozyten / Monozyten - koloniestimulierender Faktor
HDL	-	high density lipoprotein
HEPC	-	hydriertes Ei-Phosphatidylcholin
HPM	-	Pericard(Herzpunktat)-Monozyten/Makrophagen
HSA	-	humanes Serumalbumin
HSPC	-	hydriertes Soja-Phosphatidylcholin
HWZ	-	Halbwertszeit
KH	-	Kohlenhydrat
LPS	-	Lipopolysaccharid
LUV	-	large unilamellar vesicle
Man	-	Mannose, Mannosyl-
Man-BSA <sub>FITC</sub>	-	FITC-markiertes BSA
MeGal	-	Methylgalaktosid
MeGlc	-	Methylglucosid
MeMan	-	Methylmannosid
MLV	-	multilamellar vesicle
MPS	-	mononukleäres phagozytierendes System
MR	-	Mannoserezeptor
MR <sup>⊕</sup>	-	Mannoserezeptor-positiv
n	-	Anzahl der Versuche; bei nativen Zellen Anzahl der Patienten
NBD-PE	-	(7-Nitro-benz-2-oxa-1,3-diazo-4-yl)-DPPE
PBS	-	Phosphatpuffer
PE	-	Phosphatidylethanolamin
PEG-DPPE	-	N-Carbonyl-Poly-(ethylenglycolmethylether)-DPPE
PG	-	Phosphatidylglycerol
PhE	-	Phycoerythrin
PMA	-	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PS	-	Phosphatidylserin
PTM	-	Peritonealmakrophagen
RCA <sub>120</sub>	-	Ricinus communis Agglutinin-120
Rh-PE	-	(Lissamin Rhodamin B Sulfonyl)-PE (Ei)
SM	-	Sphingomyelin
SPC	-	Soja-Phosphatidylcholin (Sojalecithin)
SSC	-	(side scatter) Seitwärtsstreuung
SUV	-	small unilamellar vesicle
(r)t-PA	-	(recombinant) tissue-type plasminogen activator

## 1 Einleitung

Bei systemischer Gabe oder Verteilung eines Arzneistoffs ist dessen pharmakologischer Effekt neben der erwünschten Hauptwirkung auch häufig durch (unerwünschte) Nebenwirkungen gekennzeichnet. Durch die Verteilung des Arzneistoffs im gesamten Organismus werden auch Organe, Zellen, Rezeptorgruppen oder -subgruppen betroffen, die nicht Ziel der Therapie sind. Insbesondere bei Arzneistoffen, deren relative Spezifität gegenüber der Zielstruktur gering ist, oder bei ubiquitärem Vorkommen der Zielstruktur, ist mit starken Nebenwirkungen zu rechnen. Letztere können in ihrer Qualität wie auch im Ausmaß erheblich sein und Einsatz, Dosierung und letztlich den Therapieerfolg limitieren.

Eine möglichst hohe Spezifität des Arzneistoffs ist daher anzustreben, die durch chemische Veränderungen am Arzneistoffmolekül selbst vielfach gesteigert werden konnte. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, sich über galenische Lösungen - durch geeignete „Verpackung“ des Arzneistoffs - diesem Ziel zu nähern. Der Einschluß von Arzneistoffen in Liposomen kann dazu ein Weg sein.

Liposomen unterliegen aufgrund ihres körperfremden korpuskulären Charakters einem gewissen unspezifischen Targeting. Ihre schnelle Elimination durch Zellen des MPS führt zur Anreicherung besonders in Leber, Milz und Knochenmark. Durch Modifizierung der Liposomenoberfläche ist eine Steigerung der Targetspezifität möglich. Das betrifft einerseits die Unterdrückung der Aufnahme der Vesikel durch Maskierung der vom MPS als fremd erkannten Struktur. Andererseits kann durch das Anknüpfen geeigneter Liganden die Attraktivität der Liposomen gegenüber Zielzellen um ein Vielfaches gesteigert werden. Dabei werden Ligand-Zellrezeptor-Wechselwirkungen ausgenutzt. In der wissenschaftlichen Literatur finden hierzu insbesondere Antigen-Antikörper-Reaktionen und Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen Beachtung. Für eine Reihe von Zellen sind spezifische membranständige Kohlenhydrat-Rezeptoren beschrieben. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf solchen Zellen, die zur Phagozytose befähigt sind und intakte Vesikel ingestieren können. Durch die Kombination beider Mechanismen - Maskierung und Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung - eröffnen sich Möglichkeiten für ein spezifisches Targeting.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Aufnahme mannosetragender Liposomen durch phagozytierende Zellen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Wechselwirkung mit membranständigen Mannose-Rezeptoren von Makrophagen im Sinne eines Liposomen-Targeting. Aufgrund ihrer zentralen Rolle im Immunsystem stellen Makrophagen interessante Zielzellen für ein spezifisches Arzneistofftargeting dar. Sie sind neben der Beseitigung von Krankheitserregern und anderer fremd-partikulärer

Strukturen an der Aktivierung weiterer Zellen und Prozesse im komplexen System der Immunabwehr und entzündlicher Reaktionen beteiligt. Dementsprechend kann sowohl die Unterdrückung ihrer immunologischen Funktion als auch ihre Aktivierung von therapeutischem Interesse sein.

Für die Mannosylierung der Liposomen finden Alkylmannoside Anwendung, die durch schrittweise Vergrößerung des Abstandes zwischen Mannose-Kopfgruppe und Lipidanker Aussagen über eine Optimierung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zulassen sollen.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Makrophagen

Makrophagen sind über nahezu alle Organe des Körpers verteilt. Sie entwickeln sich aus pluripotenten Knochenmarkstammzellen und stehen am Ende der (myelo)monozytären Linie im komplexen System der Hämatopoese. Letztendlich differenzieren sie aus zirkulierenden Blutmonozyten, die ins Gewebe, in Körperhöhlen oder Lymphbahnen einwandern. In den verschiedenen Organen kommen Makrophagen unter unterschiedlichen Bezeichnungen vor: in der Lunge als Alveolarmakrophagen, in Lymphknoten als Sinusmakrophagen oder Uferzellen, im Gehirn als Mikrogliazellen, im Peritoneum als Serosa- oder Peritonealmakrophagen, in der Leber als Kupffersche Sternzellen usw. [1]. Zusammen mit den zirkulierenden Monozyten zeichnen sie sich insbesondere durch die Fähigkeit zur Erkennung und Aufnahme fremd-partikulärer Strukturen aus (Phagozytose) und werden unter dem Begriff mononukleäre Phagozyten oder mononukleäres phagozytierendes System (MPS) zusammengefaßt [2]. Diese Bezeichnung verweist auf die unterschiedliche Kernform gegenüber den ebenfalls zur Phagozytose befähigten polymorphkernigen Leukozyten (neutrophile Granulozyten).

Neben dieser herausragenden Eigenschaft, die als Sofortreaktion der Abwehr angesehen werden kann, sind Monozyten/Makrophagen an einer Vielzahl weiterer Prozesse im Immun- und Entzündungsgeschehen beteiligt. Nach bakterieller Infektion des Gewebes oder mechanischer Gewebszerstörung wandern Monozyten aus der Blutbahn aus und differenzieren zu Makrophagen. Dieser als Makrophagen-Aktivierung bezeichnete Prozeß erfolgt unter dem Einfluß verschiedener Signale, die von den Erregern selbst ausgehen (Lipopolysaccharid), zellvermittelt sind (Zytokine, TNF- $\alpha$ ) oder durch die Bindung von Immunkomplexen an Fc-Rezeptoren oder Komplement-Rezeptoren der Makrophagen (s. Kap. 2.2.1) induziert werden [1]. Nach Aktivierung, die mit einer Steigerung der Phagozytoseaktivität verbunden ist, sind Makrophagen ihrerseits durch eine verstärkte Expression von Oberflächen-Rezeptoren und Sezernierung von Signalsubstanzen an Aktivierungsprozessen beteiligt, wie z.B. an der Antigenpräsentation für CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, der Freisetzung von Entzündungsmediatoren sowie der Induktion der Ansammlung von Granulozyten an Infektionsherden. Für Letzteres spielen der von aktivierten Makrophagen produzierte TNF- $\alpha$  und bestimmte Interleukine eine wichtige Rolle, die die Expressierung bzw. Aktivierung von Adhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine) auf Endothelzellen und letztendlich die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut ins infizierte Gewebe vermitteln.

Daneben sind Makrophagen in der Lage, ebenfalls durch Freisetzung von TNF- $\alpha$  oder toxischen Stoffwechselprodukten (NO, Sauerstoffradikale), Tumorzellen abzutöten.

Weiterhin erfolgt die Sezernierung von Faktoren zur Aktivierung der Gewebsneubildung über Fibroblastenstimulation.

Eine anhaltende Makrophagenaktivierung (persistierende Mikroorganismen, nicht abbaubare Partikel, dauernde Antigenreize) führt zur Zerstörung differenzierter Gewebszellen und deren Ersatz durch Bindegewebe (Fibrosierung). Bei chronischer Stimulation finden morphologische Veränderungen der Makrophagen zu sog. Epitheloidzellen statt, die miteinander zu vielkernigen Riesenzellen verschmelzen und zusammen mit CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sog. Granulome bilden (charakteristisch für Tuberkulose, Sarkoidose, Schistosomen-Infektion).

Aufgrund dieser zentralen Rolle im Immungeschehen und ihrer vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Funktion sind sie als Targetzellen für eine zielgerichtete Arzneistoffverabreichung in mehrerer Hinsicht interessant: Die wachsende Zahl immundefizienter Patienten, die Ausweitung der Transplantationsmedizin und die Zunahme von Autoimmunerkrankungen erfordern therapeutische Möglichkeiten zur spezifischen Anhebung oder Suppression des Immunstatus. Dazu gehören auch die selektive Verabreichung antiinflammatorisch wirkender Steroide bei chronischen Asthma- oder rheumatoiden Erkrankungen, antiviraler Wirkstoffe zur HIV-Begleittherapie oder die Aktivierung von Makrophagen zur Bekämpfung der Metastasierung nach Tumorbehandlung [3].

Auch die Einführung von Antigenen zur Präsentation durch Makrophagen oder die effiziente Bekämpfung von in Makrophagen überlebenden bzw. sich vermehrenden Mikroorganismen, wie Listerien, Toxoplasmen, Mykobakterien, Leishmania-Arten und Bordetella pertussis, erfordert einen zielgerichteten Zugang [4].

## **2.2 Rezeptoren und Phagozytose**

### **2.2.1 Opsoninvermittelte Phagozytose**

Die Aufgabe, im Rahmen immunologischer Abwehr größere Partikel zu phagozytieren und im Zellinnern unschädlich zu machen bzw. abzubauen, wird von Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten wahrgenommen. An diesem Prozeß sind verschiedene membranständige Rezeptoren beteiligt, die zur Erkennung, Bindung und letztendlich Internalisierung der partikulären Zielstruktur (in aller Regel ein pathogener Mikroorganismus) beitragen. Dazu gehören Rezeptoren für den konstanten Teil (Fc-Teil) verschiedener Isotypen von Immunglobulinen und für Faktoren des Komplementsystems, die die Phagozytose vermitteln. Voraussetzung dafür ist die Bindung von Antikörpern

und/oder Komplement-Faktoren an das zu phagozytierende Material, die sog. Opsonisierung. Als wichtigste Opsonine sind IgG-Antikörper und die C3b-Komponente des Komplementsystems zu nennen. Erstere binden durch (unspezifische) Adsorption an hydrophoben Oberflächen nichtgekapselter Bakterien oder als spezifische Antikörper (IgG1, IgG3), die gegen Oberflächenstrukturen gekapselter Bakterien gerichtet sind (Proteine, Glykoproteine, Polysaccharide) [5]. Die Bindung des Komplementproteins C3b erfolgt entweder über den sog. Klassischen Weg der Komplementaktivierung an zuvor gebundene IgG- oder IgM-Antikörper oder direkt (über die Alternative Aktivierung der Komplementkaskade) an bakterielle Lipopolysaccharide (gramnegat. Bakterien). C3b- und Fc-Rezeptoren können sowohl kooperativ als auch unabhängig voneinander phagozytosevermittelnd wirken. [4] Darüberhinaus existiert ein Rezeptor für die Bindung inaktiver Fragmente von C3b, der eine direkte Phagozytosestimulierung auslöst. Es werden insgesamt 5 Typen von Komplementrezeptoren unterschieden, deren Rolle erst zum Teil geklärt ist [6].

Neben den genannten Immunglobulinen und Komplementkomponenten sind weitere Serumfaktoren bekannt, die als Opsonine wirksam sind. Dazu gehören beispielsweise Fibronectin, HS $\alpha_2$ -Glykoprotein, das durch die Steigerung der Oberflächenhydrophobizität fungiert, oder das Tetrapeptid Tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg), dessen positive Ladungen mit den negativ geladenen Membrankomponenten von Mikroorganismen und Zellen interagieren. [7]

Das von Makrophagen nach Bakterienkontakt sezernierte Interleukin-6 induziert in Hepatozyten die Synthese der sog. Proteine der akuten Phase. Zu diesen Serumkomponenten gehören das C-reaktive Protein (CRP) und das mannosebindende Protein (MBP). Das CRP bindet an Phosphocholinen der Membran von Mikroorganismen. MBP, ein C-Lektin (s. Kap. 2.3), bindet an Mannosereste bakterieller Erreger. Beide können als Opsonine wirken oder die klassische Komplementkaskade aktivieren [6]. Die Bindung des MBP am Makrophagenrezeptor für die C1q-Komponente der Komplementkaskade, dem es strukturell sehr ähnlich ist, ist wahrscheinlich [8]. Neben dem MBP sind weitere Lektine bekannt, die über die Bindung von Kohlenhydraten auf Bakterien, Hefen und Viren und am Cq1-Rezeptor auf zellulärer Seite als Opsonine fungieren. Sie bestehen aus, für C-Typ-Lektine charakteristischen, Kohlenhydrat(KH)-Erkennungsdomänen und Kollagen-Sektionen und werden unter der Bezeichnung Collektine zusammengefaßt [9]. Dazu gehören die Lungen-Surfactant-Proteine A und D (SpA, SpD) sowie die Plasma-Proteine Conglutinin, CL-43 und das MBP [10, 11].

Für Liposomen stellt die opsoninvermittelte Phagozytose den hauptsächlichen Eliminationsmechanismus dar. Plasmaproteine bzw. Opsonine können über geladene Gruppen, hydrophile und hydrophobe Molekülsegmente und

Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken und adsorbieren an oder ankern in der Liposomenmembran. Das Ausmaß der Opsonisierung bedingt die schnelle Entfernung konventioneller Liposomen aus dem Blutkreislauf (s. Kap. 2.4.1).

## **2.2.2 Opsoninunabhängige Phagozytose**

Neben der zweifellos großen Bedeutung der opsoninvermittelten Phagozytose, die die Mitwirkung von Serumkomponenten erfordert, wuchs in den letzten zwei Jahrzehnten die Kenntnis über opsoninunabhängige Phagozytosemechanismen.

### **2.2.2.1 Hydrophobe Wechselwirkungen**

Die Fähigkeit von Bakterien zur Bindung an Phagozyten (wie auch an die Membran anderer Zellen) korreliert mit dem Ausmaß ihrer Oberflächenhydrophobizität [12]. Hydrophobe Oberflächen bzw. experimentell gesteigerte Hydrophobizität von Mikroorganismen [13] verstärken die Bindung an Zelloberflächen und können die Phagozytose aktivieren. Apolare Oberflächenmoleküle, die die Adhäsion an Zellen befördern, werden auch unter dem Begriff Hydrophobine zusammengefaßt. Es liegen wenig experimentelle Ergebnisse vor, die die Bindungsvermittlung durch ein spezielles Hydrophobin zeigen konnten. Man geht aber davon aus, daß hydrophobe Wechselwirkungen durch Überwindung von Abstoßungskräften das Eintreten spezifischer opsoninunabhängiger Interaktionen zwischen Bakterien und Phagozyten befördern [14], weshalb sie an dieser Stelle erwähnt sein sollen.

### **2.2.2.2 Opsoninunabhängige Erkennung**

Interaktionen von Bakterien und Phagozyten in serumfreien Medien in vitro ließen die Charakterisierung von Rezeptoren für Typen von Liganden zu, die eine unmittelbare Erkennung - ohne Mitwirkung von „Brückenmolekülen“ - ermöglichen [15]. Dabei handelt es sich einerseits um Protein-Protein- andererseits um Lektin-KH-Wechselwirkungen. Ligand und Rezeptor können sowohl auf Mikroorganismen und Phagozyten als auch umgekehrt verteilt vorliegen, d.h. für diese Wechselwirkungen spielen die Erkennung mikrobieller Liganden durch zelluläre Rezeptoren wie auch zellulärer Liganden durch mikrobielle Rezeptoren eine Rolle. Dementsprechend unterteilt man die opsoninunabhängigen Mechanismen in

- A ) Phagozytose durch Phagozyten-Integrine
- B ) Lektinophagozytose durch Phagozyten-Lektine
- C ) Lektinophagozytose durch bakterielle Lektine [14].

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf Wechselwirkungen aus Gruppe B, insbesondere auf den für Makrophagen spezifischen Mannose-Rezeptor näher eingegangen werden (Kap. 2.2.2.3).

Als Beispiele für die der Gruppe A zuzurechnenden Wechselwirkungen sei die Bindung der Arg-Gly-Asp-(RGD)Peptidsequenz von Mikroorganismen (darunter *Bordetella pertussis*) durch den CR3-Rezeptor von Makrophagen (Integrin CD11b/CD18) [16] oder die Bindung von *Mycobacterium avium/Mycobacterium intracellulare* über das Monozyten/Makrophagen-Integrin  $\alpha V\beta 3$  [17] genannt.

Aus den der Gruppe C zugehörigen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ist die gut charakterisierte Bindung des FimH-Lektins, einer mannosebindenden Untereinheit der sog. Typ 1(mannosesensitiven)-Fimbriae, von *Escherichia coli* zu nennen [18]. In-vitro-Untersuchungen lassen darauf schließen, daß diese Bindung eines Bakterien-Lektins an Kohlenhydrate zellulärer Oberflächen neben einer Besiedlung von Epithelzellen [14] die Adhäsion an Phagozyten vermittelt. Als Liganden wurden CD11-, CD18- und andere Glykoproteine identifiziert, deren Oligomannose- und N-Manno-Hybrid-Einheiten durch FimH gebunden werden [19, 20]. Einige *Actinomyces*-Arten exprimieren sog. Typ 2(mannoseresistente)-Fimbriae, Oberflächen-Lektine spezifisch für Galaktose-Reste von Gal $\beta$ 1-3GalNAc- und Laktose (Gal $\beta$ 1-4Glc)-Gruppen. Die Bindung an der Oberfläche von Granulozyten führt zur Aufnahme und Abtötung der Bakterien [21]. Es sind eine Reihe weiterer bakterieller Lektine bekannt, die an Liganden phagozytierender Zellen binden [14]. Die Expressierung solcher, Adhäsion wie Phagozytose und letztendlich Beseitigung des Erregers vermittelnder Strukturen mag zunächst suizidal erscheinen. Ihre physiologische Rolle wird bei Betrachtung der Komplexität in vivo und dem damit verbundenen Selektionsdruck deutlich. Neben den Lektin-positiven Organismen existieren auch immer Lektin-negative Vertreter, die der Phagozytose entgehen [18, 21]. Während die Lektin-negativen Erreger im Blut überleben, können sie in Phagozyten-arme Bereiche auswandern. Ihre Umwandlung in Lektin-positive Organismen ermöglicht dann die Besiedlung von Endothelzellen via Lektin-KH-Wechselwirkung und die Vermehrung des Erregers [22].

Zu den spezifischen Wechselwirkungen der einzelnen Mikroorganismen mit nativen Phagozyten und phagozytischen Zelllinien liegen eine Vielzahl von Arbeiten vor [rev. in 14]. Die Fülle der in-vitro- und in-vivo-Ergebnisse ist schwer überschaubar, der Anteil der jeweils untersuchten Wechselwirkungen am tatsächlichen physiologischen bzw. pathophysiologischen Geschehen kaum abzugrenzen [23]. Die o.g. Einteilung der Ligand-Rezeptor-Interaktionen dürfte überdies vor allem von didaktischem Wert sein, da in vivo

häufig von einer Überlagerung oder Gleichzeitigkeit mehrerer Mechanismen auszugehen ist. Diese Aussage sei an einigen Beispielen kurz erläutert:

Bei der Anheftung von Leishmania-Promastigoten an Makrophagen erfolgt die Bindung am Integrin CD11b/CD18 (CR3) sowohl über die LPS-Bindungsstelle als auch über die iC3b-Bindungsstelle. Letztere tritt mit GP63, einem Oberflächen-Glykoprotein vieler Leishmania-Arten, in Wechselwirkung. Außerdem führt die Blockierung des Mannose-Rezeptors zu verminderter Bindung und Aufnahme, was die Beteiligung mehrerer Rezeptoren nahelegt [24, 25]. Ebenso können Makrophagen-Integrine, die einerseits als Rezeptor LPS sowie RGD-Sequenzen binden, andererseits selbst als Glykoproteine durch bakterielle Lektine erkannt werden [14]. In diesen Fällen handelt es sich um die Verbindung verschiedener opsoninunabhängiger Mechanismen.

Darüberhinaus ist CD11b/CD18 neben der direkten Erkennung mikrobieller Liganden auch an der opsoninvermittelten Phagozytose über die Bindung von Komplementfragment iC3b beteiligt [26]. So kann es sich bei der Phagozytose von E. coli über die o.g. FimH-Bindung an CD11/CD18 um die Kopplung verschiedener Mechanismen handeln, von denen der eine die Adhäsion, der andere (opsoninvermittelt) die Phagozytose selbst befördert [15]. Ebenso wird die Involvierung von Fc-Rezeptoren für die eigentliche Vermittlung der Phagozytose nach dem initialen Schritt der FimH-Anheftung diskutiert [27]. Eine solche Verbindung von opsoninunabhängigen und opsoninvermittelten Mechanismen gilt als sehr wahrscheinlich [14]. Darüberhinaus spielen auch unspezifische Oberflächeneigenschaften (Hydrophobizität, Strukturierung) der Coli-Bakterien für die Phagozytose eine Rolle [22].

Die genannten Beispiele sollen die in vivo zu erwartende Komplexität der Wechselwirkungen andeuten, die auch für die Aufnahme von Liposomen von Bedeutung sein kann.

### **2.2.2.3 Membranlektine und Mannoserezeptor**

Über spezifische Wechselwirkungen zwischen zellulären Bindungsstellen und Saccharidstrukturen besteht seit langer Zeit Kenntnis [28]. Grundlegende Arbeiten dazu wurden bereits in den siebziger Jahren durchgeführt und kohlenhydratvermittelte Aufnahmewege beschrieben:

- Erkennung von Galaktosiden durch Hepatozyten [29],
- von Fucosiden durch Hepatozyten [30],
- von Mannosiden und Fucosiden durch Kupfferzellen und Gewebsmakrophagen [31, 32],
- von Phosphomannosiden lysosomaler Enzyme durch Fibroblasten [33].

Inzwischen wurden eine Vielzahl weiterer KH-Lektin-Wechselwirkungen untersucht, die für die Erkennung pathogener Strukturen oder für Zell-Zell-Interaktionen Bedeutung besitzen [34].

Mehr als andere Zelltypen sind Makrophagen in der Lage, spezifische Rezeptoren für strukturell ganz unterschiedliche KH-Determinanten auszubilden [35].

Dazu gehören Galaktose-Erkennungs-Systeme: eine Anzahl verschiedener Lektine, die Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin-Reste binden und über die einzelnen Spezies unterschiedlich verteilt sind. Aus Ratten- und Maus-Peritonealmakrophagen konnte ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Rezeptor isoliert werden. Beim Maus-Rezeptor handelt es sich um ein 77 kD Protein, das sowohl für Galaktose (Gal) als auch für Mannose (Man) spezifisch ist [36]. Der Rezeptor aus Rattenmakrophagen besteht aus einer Hauptkomponente von 42 kD und zwei Nebenkompenten von 60 und 65 kD, spezifisch für Gal und GalNAc [37].

Gut charakterisiert ist das Gal/GalNAc-spezifische Lektin aus Hepatozyten der Ratte. Dieser sog. Asialoglykoprotein-Rezeptor besteht aus einer Hauptkomponente (22,5 kD) und zwei Nebenkompenten (49 und 54 kD). Letztere erkennen  $\beta$ 1-4 gebundene Gal-Reste, während erstere an  $\alpha$ 1-6 und  $\alpha$ 1-3 gebundenen Gal-Resten der Oligosaccharideinheiten von Glykoproteinen bindet [38]. Neben der Phagozytose von Erregern mit entsprechenden Oberflächendeterminanten ist die Aufnahme von körpereigenem Material von Bedeutung. Alternde Erythrozyten weisen ein verändertes Kohlenhydratmuster auf [39]. In-vitro-Untersuchungen zeigen, daß alternde im Gegensatz zu frischen Erythrozyten sowie Sialidase-behandelte (desialylierte) Erythrozyten und Thrombozyten über die dann freiliegenden Gal-Reste erkannt und phagozytiert werden [40, 14]. Da Gal-spezifische Membranlektine auf Hepatozyten, Leber- und Peritonealmakrophagen beschränkt zu sein scheinen, dürfte ihre hauptsächliche physiologische Rolle neben der Phagozytose von Mikroorganismen in der Beseitigung alternder und toter Zellen bestehen [14].

Zu den Gal-erkennenden Membranproteinen ist auch das S-Lektin MAC-2 zu zählen, das aus Makrophagen-Populationen der Maus isoliert wurde. Die entsprechende DNA-Sequenz aus aktivierten humanen Monozyten konnte isoliert und ein humanes MAC-2-Protein geklont werden. Neben seiner Spezifität für Gal-Reste weist MAC-2 Bindungsaffinität zu IgE auf [41]. Da es in hohem Maße auf experimentell aktivierten Makrophagen exprimiert wird, wird ihm eine Rolle während der Makrophagenaktivierung und der Wanderung und Adhärenz in Entzündungsgebiete zugeschrieben [42]. Für die Phagozytosevermittlung scheint es keine Bedeutung zu besitzen.

Ebenso ohne Bedeutung für die Vermittlung der Phagozytose ist ein Makrophagen-Membranlektin spezifisch für Sialyl-Reste, das auch als Sheep Erythrocyte Receptor (SER) oder Sialoadhesin bezeichnet wird [43] und hier aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt sein soll. CROCKER et al. schließen aus Untersuchungen von Zell-Clustern aus dem

Knochenmark von Mäusen auf eine Rolle bei der Regulation der Thrombozytenentwicklung im Rahmen der Hämatopoese [44].

$\beta$ -Glucane, hauptsächliche Strukturkomponenten der Zellwand von Hefen und Pilzen, werden von Rezeptoren humaner Monozyten erkannt. Sie sind an der Vermittlung der Phagozytose und der Freisetzung von Leukotrienen beteiligt. Der Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten von 150 bzw. 170 kD und ist spezifisch für  $\beta$ -Glucane;  $\alpha$ -Glucane, Mannan oder Agarose (Gal-Reste) werden nicht gebunden [45, 46].

Ein auf Makrophagen für die Bindung sog. Advanced Glycosylation End Products (AGE) präsenster Rezeptor (AGE-R) ist beschrieben [47]. Als AGE werden Addukte bezeichnet, die durch nichtenzymatische kovalente Bindung aus Proteinen und einfachen Kohlenhydraten entstehen und ihrerseits an andere Protein- und Nukleinsäure-Strukturen binden. Der AGE-R aus Peritonealmakrophagen der Maus wurde als 90 kD-Protein charakterisiert und 100.000 Bindungsstellen pro Zelle identifiziert [48]. Für die Bindung AGE-modifizierter Proteine sowie von AGE-Strukturen auf Zellmembranen am Rezeptor sind sowohl die Zucker- als auch die Proteinkomponente der AGE notwendig. Physiologisch dürfte ihm bei Erkennung und Abbau schadhafter Proteine und alternder bzw. sterbender Zellen eine wichtige Funktion zukommen.

Für die Bindung von Liganden mit terminalem Mannose-6-Phosphat (Man-6-P) sind 2 Rezeptoren bekannt, die hauptsächlich am Transport lysosomaler Enzyme zu den Lysosomen beteiligt sind [49-52]: Ein Kationen( $\text{Ca}^{2+}$ )-unabhängiger Rezeptor von 270 kD wird von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten (und anderen Zellen) exprimiert. Ein weiterer, kationenabhängiger Rezeptor von 46 kD wurde auf Maus-Fibroblasten sowie auf humanen Monozyten gefunden. Die Phosphorylierung ist für die Erkennung lysosomaler Enzyme essentiell. Der erstgenannte Rezeptor bindet über eine weitere Bindungsstelle auch Insulin-like Growth Factor II und hat daher im Zusammenhang mit Wachstumsprozessen besondere Aufmerksamkeit erfahren. Auf der Plasmamembran vermitteln beide Rezeptoren die Endozytose der Man-6-P-tragenden Proteine, für die Phagozytose korpuskulärer Strukturen haben sie keine physiologische Bedeutung [53].

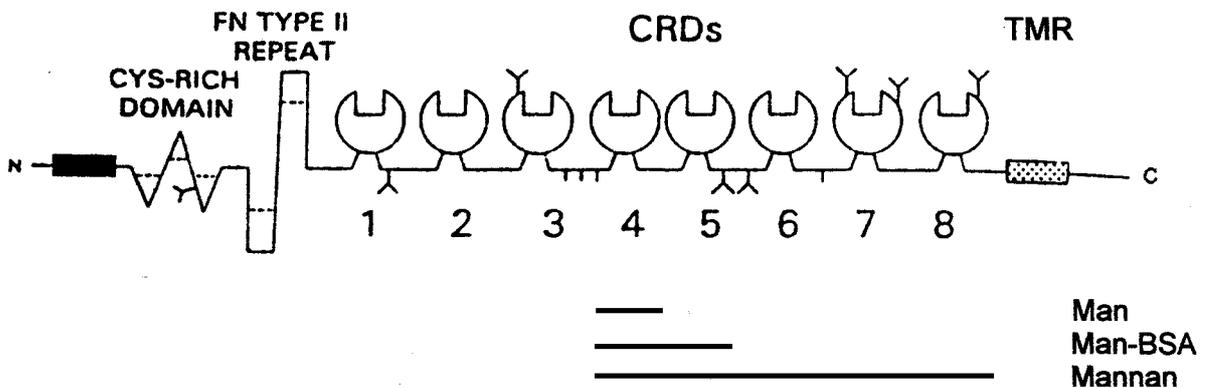
Tab. 1 gibt einen Überblick über die Membranlektine phagozytischer Zellen, deren Liganden und Vorkommen:

Rezeptor	Mw [kD]	Ligand	Zell-Typ (Spezies)	Funktion	Lit.
Gal-R	77	Gal, Man	Peritoneal-MA (Maus)	Phagozytose	35
	167	Gal, GalNAc	Peritoneal-MA (Ratte)	Phagozytose	35
	30	Gal	Makrophagen (human) Kupffer-Zellen (Ratte)	Phagozytose	51 52
(Asialoglyko- protein- R)	105,5	Gal $\beta$ 1-4 Gal $\alpha$ 1-6 / Gal $\alpha$ 1-3	Hepatozyten (Ratte)	Endo(Pino)zytose	14
MAC-2	32	Gal	Makrophagen (Maus, human)	??	35
SER	185	Sialyl-Reste	Makrophagen (Knochen- mark, Lymphknoten, Milz)	Thrombopoese	35
$\beta$ -Glucan-R	320	$\beta$ -Glucan-Reste	Peritoneal-MA Monozyten (human)	Phagozytose	52, 51
AGE-R	90	Glucose-modifizierte Proteine	Makrophagen (Maus, human), Kupffer-Zellen (Maus), Monozyten (human)	Phagozytose, Endo(Pino)zytose	35
Man-6-P-R	270	Man-6-P	Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten u.a. (Maus, Ratte, human)	Transport lyso- somalere Enzyme	52, 51
MR	175	Man $\alpha$ 1-6, GlcNAc $\beta$ 1-6	Makrophagen (Maus, Ratte, human)	Phagozytose, Endo(Pino)zytose	35, 52
	165-170	Man $\alpha$ 2-3, L-Rha $\alpha$ 2-3			

**Tab. 1:** membranständige Rezeptorlektine phagozytischer Zellen [Zusammenstellung aus 14, 35, 51, 52] (MA = Makrophagen)

Insbesondere der für Makrophagen charakteristische Mannose-Rezeptor (MR) spielt bei der direkten Erkennung einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen eine große Rolle. Während Glykoproteine von Säugetieren kaum oder keine terminalen Mannosereste aufweisen, tragen eine ganze Reihe niederer Lebewesen, wie Bakterien, Pilze und vielzellige Parasiten, relativ häufig Strukturen mit endständiger Mannose an ihrer Oberfläche. Dementsprechend kommt der Erkennung und Bindung terminaler Man-Reste vor allem eine Aufgabe im Rahmen der Abwehr körperfremder Strukturen zu. Offenbar sind im Organismus dafür zwei Teile eines Erkennungssystems vorhanden: eine humorale Komponente in Form des MBP im Serum (s. Kap. 2.2.1) und eine zelluläre Komponente in Form des MR [35]. Abb. 1 zeigt die schematische Struktur des MR. EZEKOWITZ [54] leitet aus der Struktur einige Eigenschaften des MR auch in Bezug auf das Serum-MBP ab: Die wiederkehrenden KH-Erkennungsdomänen (Carbohydrate Recognition Domain, CRD) bedingen die Fähigkeit, multivalente, komplexe Mannoseglykane mit hoher Affinität zu binden. Zum Vergleich der Bindungsspezifität der einzelnen Domänen wurden von den Arbeitsgruppen um STAHL, DRICKAMER und EZEKOWITZ [55, 56] deren AS-Sequenzen untersucht und eine Übereinstimmung von etwa 30% festgestellt. Die Domänen 4 und 5

zeigen die größte Übereinstimmung mit dem Serum-MBP. Die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen MR und MBP lassen auf gleichartige Liganden und die ähnliche physiologische Funktion schließen. Da zirkulierende Monozyten und Granulozyten keine MR exprimieren, dürfte dem MBP im Blutkreislauf die Aufgabe der Erkennung von Mannosidstrukturen zukommen, die außerhalb des Gefäßsystems Makrophagen via MR wahrnehmen.



**Abb. 1:** schematische Struktur des MR, bestehend aus Transmembran-Region (TMR), 8 CRD und 2 extrazellulären Domänen (Fibronectin Type II Repeat und cysteinreiche Domäne) unbekannter Funktion; waagerechte Striche markieren die notwendigen CRD für die Bindung von monomerer Man, Man-BSA und Mannan [aus 57]

**Charakterisierung** Der MR wird von allen bisher untersuchten Makrophagen von Maus, Ratte, Kaninchen und Mensch exprimiert. Er findet sich nicht auf Blutmonozyten, erscheint aber nach 1-3 Tagen in Zellkultur und erreicht ein Maximum nach 5-7 Tagen [58]. Im Gegenzug erfolgt während der Reifung eine Down-Regulation des von Blutmonozyten exprimierten Mannose-6-Phosphat-Rezeptors. Der MR gilt somit als früher Marker der Makrophagenreifung [59]. In-vitro-Untersuchungen mit Glykokonjugaten und inhibierenden Monosacchariden weisen eine Bindungsaffinität in der Rangordnung



aus [35, 32]. In der Literatur wird der MR deshalb auch als Mannose/Fucose-Rezeptor [58] oder Man/GlcNAc-spezifisches Lektin [14] bezeichnet. Es handelt sich um ein Typ-II-Transmembran-Glykoprotein, d.h. sein Carboxylende befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran. Im Gegensatz zu anderen Membranlektinen (s. oben) besteht der MR aus einer einzigen Untereinheit von 165-175 kD. Grundlegende Parameter wurden bereits 1980 durch STAHL et al. [60] in vitro an Alveolarmakrophagen der Ratte untersucht: Der Rezeptor ist äußerst Trypsin-empfindlich und wird bereits bei 4°C nahezu vollständig inaktiviert. Aus den erhaltenen Daten errechnen die Autoren eine Membran/intrazellulär-Verteilung des MR von näherungsweise 20/80%. Die Ligandenbindung am Rezeptor erreicht bei 4°C (Ausschluß von Endozytose der Liganden) eine Sättigung nach 60 min und stellt den limitierenden Schritt bei der Aufnahme von

Glykoproteinen dar. Die Bindungsaffinität ist  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-abhängig und unter einem Optimum von pH 7,0 deutlich reduziert. Die Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes erfolgt durch den erniedrigten pH-Wert (3,5...6,0) in den Endosomen. Der Rezeptor selbst wird nicht abgebaut und über einen intrazellulären Rezeptor-Pool erneut auf der Zellmembran präsentiert (Rezeptor-Recycling). In einer Studie an humanen Alveolarmakrophagen sowie aus Monozytenkultur erhaltenen Makrophagen kommen SHEPHERD et al. [58] zu ähnlichen Ergebnissen. Nach MCWILLIAM et al. [35] wiederholt sich die Abfolge von Internalisierung, Passage eines endosomalen Kompartiments und (Re)Präsentation des MR auf der Zelloberfläche alle 6-8 Minuten. LENNARTZ et al. [61] nennen für den MR eine HWZ von 33 h, woraus sich eine Recyclingrate von mehreren hundert Mal für jedes Rezeptormolekül ergibt. Die Arbeitsgruppe um DRICKAMER und TAYLOR nahm detailliertere Untersuchungen der Bindungsregion des MR vor [62, 63]. Danach wird die oligomere Struktur der CRD anderer C-Typ-Lektine (s. Kap. 2.3) im MR alternativ durch die Aneinanderreihung der CRD-Monomere erreicht. Von den 8 CRD ist das CRD-4 für die Bindung von Monosacchariden ausreichend, komplexe Kohlenhydrate natürlicher Glykoproteine werden aber nur schwach gebunden. CRD-4 und -5 binden zusammen bereits komplexere Strukturen einiger Liganden mit hoher Affinität, für die volle Bindungsaktivität gegenüber dem Mannan aus Hefen sind aber 5 CRDs (4-8) essentiell (vgl. Abb. 1). MULLIN et al. [57] konnten an isolierten CRD-4 zeigen, daß die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  eine Konformationsänderung im Protein hervorruft, die die KH-Bindung ermöglicht. Aus der sehr weitgehenden Übereinstimmung von Primär- und Tertiärstruktur der CRD des MBP-A und der CRD-4 des MR schließen die Autoren, daß - ähnlich wie am MBP-A [64] - die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  an den äquatorialen Hydroxylgruppen 3 und 4 eines terminalen Mannoserests erfolgt. Dieselben Hydroxylgruppen bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu 2 Glutaminsäure- und 2 Asparaginsäure-Resten des CRD-4 aus, an denen das  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist. Wahrscheinlich sind zusätzlich van-der-Waals-Kräfte zwischen dem C4 der Mannose und dem  $\beta$ -C des Tyr<sup>729</sup> der CRD-4 an der Bindung beteiligt. Der erniedrigte pH in den Endosomen wirkt destabilisierend auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung, wodurch die KH-CRD-4-Bindung gelöst wird. Die Ergebnisse legen die Notwendigkeit von Konformationsänderungen weiterer CRD bei der Dissoziation komplexerer Liganden vom Rezeptor in den Endosomen nahe.

**Funktion** Der MR vermittelt nach Ligandenbindung sowohl Endozytose (bzw. Pinozytose) als auch die Phagozytose unmittelbar. Ersteres bezieht sich auf die Clearance mannosehaltiger endogener Proteine (wie z.B. Gewebs-Plasminogen-Aktivator und lysosomale Enzyme) aus Körperflüssigkeiten, die nach Bindung der Oligomannosid-Strukturen internalisiert und abgebaut werden [3]. Die Bindung von Man-Resten auf der

Oberfläche von Mikroorganismen vermittelt deren Phagozytose. Dazu gehören bestimmte Bakterien (z.B. *E. coli*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*), Pilze (z.B. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) und Protozoen (*Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*) [14]. Die Fähigkeit zur Endozytose bzw. Phagozytose ist mit dem Rezeptor auf andere Zellen übertragbar. Die Transfektion von nichtphagozytischen COS-Zellen mit MR-codierender cDNA führte zu Bindung und Aufnahme von Man-Glykokonjugaten, *Candida albicans* und *Pneumocystis carinii* [56, 65]. In nachfolgenden Untersuchungen fand EZEKOWITZ [54], daß mit CD64 (Fc-Rezeptor) transfizierte COS-Zellen opsonisierte Partikel binden, aber nicht aufnehmen können. Die Einführung von Rezeptor-Chimären in die COS-Zellmembran (bei denen selektiv Molekülteile des MR gegen Einheiten des CD64-Moleküls ausgetauscht wurden) zeigte, daß die Transmembran-Region und der zytoplasmatische Schwanz (45 AS) des MR für das Auslösen der Phagozytose essentiell sind. Der Autor schließt aus den Ergebnissen, daß die Phagozytose durch Wechselwirkung des zytoplasmatischen Schwanzes mit dem Zytoskelett initiiert wird. Im Gegensatz zur opsoninvermittelten Phagozytose, die häufig die Kooperation von mehr als einem Rezeptor erfordert (s. Kap. 2.2.1), befähigt der MR demzufolge allein zu phagozytischer Aktivität und wird als *professioneller* Phagozytose-Rezeptor bezeichnet. Darüberhinaus wird die Beteiligung an anderen phagozytosevermittelnden Mechanismen, wie der vermehrten Expression von Fc-Rezeptoren nach Bindung von Man-Liganden, diskutiert [66].

**Regulation** STAHL et al. [60] leiten aus Scatchard-Analysen für die untersuchten Alveolarmakrophagen der Ratte 75000 Rezeptormoleküle/Zelle ab, KATAOKA et al. [59] geben für humane Makrophagen aus Monozytenkultur  $4-5 \times 10^5$  Rezeptoren/Zelle an. Diese Zahl ist von einer Reihe von Einflußfaktoren abhängig und soll lediglich eine Vorstellung über die Größenordnung vermitteln. Die Bindungsaktivität (Anzahl der exprimierten Rezeptoren und deren Bindungsaffinität) ist neben Herkunft und Reifegrad durch den Aktivierungsstatus der Zelle beeinflusst. Stimulierende Faktoren der Makrophagenaktivität können selektiv den MR betreffen ohne die Expression anderer Membranrezeptoren zu beeinflussen. Ebenso spielen die Zeit in Zellkultur und die Zusammensetzung des Kulturmediums eine Rolle. Zu diesen Einflußfaktoren liegen eine Reihe älterer Untersuchungen vor [rev. in 23]. Dazu gehören auch der stimulierende Einfluß von Cytokinen auf die MR-Expression [67]. Neuere Ergebnisse [rev. in 3, 14] lassen zwei grundsätzliche Tendenzen der Beeinflussung erkennen: Cytokine und Faktoren, die eine Makrophagenaktivierung hervorrufen, führen zur Down-Regulierung des Rezeptors. Dazu gehören Interferon- $\gamma$ , LPS, aggregiertes IgG. Wiederholte Einwirkung mikrobieller Man-Liganden reduziert ebenfalls die Expression des MR [54]. Umgekehrt führen antientzündlich wirkende Cytokine und Faktoren, die eine verringerte Aktivität der

Makrophagen bedingen, zur verstärkten Expression des MR. Dazu gehören Interleukin-4, Interleukin-13 [68], Glucocorticoide, Prostaglandin E oder auch Vitamin D<sub>3</sub> [35]. CSF-1 und GM-CSF wirken im Sinne der Makrophagenreifung und rufen ebenfalls eine vermehrte Rezeptorexpression hervor. Die in der Literatur genannten Wirkungsmechanismen sind so vielfältig wie die beteiligten Faktoren und sollen hier nicht im einzelnen ausgeführt werden.

### 2.3 Lektine und Liganden

Lektine zeichnen sich durch ubiquitäres Vorkommen in der Natur aus, man findet sie in Bakterien, Pflanzen, Wirbellosen und Wirbeltieren. Einer verbreiteten Definition zufolge sind Lektine *kohlenhydratbindende Proteine nichtimmunen Ursprungs, die je nach Zuckerspezifität Zellen agglutinieren und/oder Glykokonjugate präzipitieren* [69]. Mit zunehmender Kenntnis der Verbreitung und Funktion wurden in Erweiterung dieses Begriffs Lektine als *kohlenhydratbindende Proteine, die nicht Antikörper oder Enzym sind*, neu definiert [70].

Nahezu alle lebenden Zellen präsentieren in großer Anzahl KH-Strukturen auf ihrer Oberfläche; viele lösliche Proteine (Enzyme, Plasmaproteine etc.) sind Glykoproteine [71, 72]. Die Kohlenhydrate enthalten Informationen über die sie präsentierende Struktur (Zelle, Protein). In weiterem Sinne fungieren Lektine als Decoder solcher Glykokonjugat-vermittelter Information [73]. Die Bindung stellt das Lesen bzw. Interpretieren dieser Information von einer präsentierenden Struktur dar. Die der Lektinbindung folgenden Vorgänge (z.B. die Phagozytose) sind eine Reaktion auf die erhaltene Information (z.B. das Vorhandensein terminaler Man). Das Potential zur Codierung von Informationen in KH-Strukturen ist immens. Während in Peptiden und Oligonukleotiden der Informationsgehalt nur durch die Anzahl der Monomere und ihre Sequenz bestimmt ist, sind in Kohlenhydraten darüberhinaus auch die anomere Konfiguration der Monosaccharide ( $\alpha$  oder  $\beta$ ), das Vorliegen von Verzweigungen und die Substitution durch Sulfat-, Phosphat- oder Acetylgruppen maßgeblich [74]. So können zwei Aminosäuren immer nur ein Dipeptid bilden, bei der Bindung zweier Monosaccharide können bis zu 11 verschiedene Disaccharide entstehen. Diese theoretische Vielfältigkeit wird in vivo aufgrund der begrenzten Möglichkeiten zur Bindungsknüpfung, die sich aus der Spezifität der beteiligten Glykosyltransferasen ergibt, nicht ausgeschöpft. Trotzdem ergibt sich aus der Multiplizität der begrenzten Bindungsknüpfung eine große Vielfalt von Oligosacchariden und damit Informationen, was wiederum die Vielfalt aber auch Spezifität der erkennenden Proteine bedingt [75].

Dementsprechend finden Lektine (besonders pflanzlicher Herkunft) verbreitete Anwendung zu präparativen (Affinitätschromatographie) sowie zu diagnostischen Zwecken in der Analytik zellulärer Kohlenhydrate während Zellteilung, -differenzierung und maligner Vorgänge. (In den letzten Jahren haben sich eine eigenständige „Tumorlektinologie“ und auf dem Gebiet der HIV-Blockierung besonders durch mannosebindende Lektine intensive Forschung etabliert.)

Für die durch vorliegende Arbeit berührten Fragestellungen sind vor allem Ricinus communis Agglutinin-120 (RCA<sub>120</sub>) (spezifisch bes. für terminale Gal-Reste) und Concanavalin A (ConA) (spezifisch bes. für terminale Man-Reste) zur Charakterisierung gebundener Glykokonjugate oder als lösliches oder gebundenes Rezeptormodell von Bedeutung.

Lektine tierischer Herkunft lassen sich nach der Klassifikation von DRICKAMER [76] in zwei Hauptgruppen, einen S-Typ (Thiol-abhängig) und einen C-Typ (Ca<sup>2+</sup>-abhängig) unterscheiden. S-Typ-Lektine, die aus verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies isoliert wurden (darunter Muskel, Lunge, Hirn), sind häufig lösliche Proteine von 14-16 KD, die im Zytosol, mit der Zellmembran assoziiert oder auch extrazellulär vorliegen [76, 77]. Sie binden spezifisch  $\beta$ -Galaktoside und sind durch das Vorhandensein freier Thiolgruppen des Cystein gekennzeichnet, die für ihre Bindungsaktivität essentiell sind. Im Gegensatz zum C-Typ erfolgt die Bindung unabhängig von divalenten Kationen. Viele der S-Typ-Lektine sind in der Lage, multivalente Oligomere zu formen und so komplexere Gal enthaltende Oligosaccharide zu binden. Aufgrund ihrer  $\beta$ -Gal-Spezifität werden sie auch als Galaptine [78], in der jüngeren Literatur meist als Galektine bezeichnet [79].

Im Unterschied zum S-Typ sind in C-Typ-Lektinen Disulfid-Brücken zwischen Cystein-Resten der CRD ausgebildet, die KH-Bindung erfolgt Ca<sup>2+</sup>-abhängig. Sie sind durch das Vorhandensein von CRD von etwa 120 AS mit 14 invariablen und 18 relativ übereinstimmenden AS charakterisiert [34]. Zum C-Typ gehören Lektine unterschiedlicher Bindungsspezifität: der Asialoglykoprotein-Rezeptor, die Selektine, das Serum-MBP wie auch der MR.

Im MR liegen, wie in anderen C-Typ-Lektinen, CRD in Clustern vor, was eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Oligosacchariden ermöglicht [34]. CRD-Clustering in C-Typ-Lektinen, wie dem MBP [80] oder dem Asialoglykoprotein-Rezeptor [81], wird gewöhnlich durch Assoziation mehrerer Polypeptid-Ketten, die jeweils ein CRD enthalten, erreicht. Im Falle des MBP-A der Ratte werden Oligomere durch Formung von CRD-Dimeren oder -Trimeren gebildet [82]. CRD-Cluster im MR entstehen durch den für diese Rezeptorfamilie unüblichen Aufbau über wiederkehrende CRD (vgl. Abb. 1) [54]. Zu detaillierteren Untersuchungen der CRD des MR s. Kap. 2.2.2.3.

Weitere KH-bindende Proteine, wie der Man-6-P-Rezeptor, virale Haemagglutinine und einige andere, sind keiner dieser beiden Gruppen zuzuordnen [76].

Die Bindungsspezifität eines Lektins wird häufig durch die Verdrängung bzw. Blockierung der Bindung komplexer Strukturen (wie Glykoproteine, Erythrozyten) durch Monosaccharide charakterisiert. Obwohl Lektine gewöhnlich eine relativ breite Bindungsspezifität (für eine Reihe von Monosacchariden oder terminaler Liganden mit abnehmender Affinität) aufweisen, ist bekannt, daß beim Vorliegen komplexerer Liganden nicht nur der terminale Rest für die Affinität von Bedeutung ist, d.h. darüberhinaus feinere Unterscheidungen der Bindungsspezifität zu verzeichnen sind. Die Fraktionierung von Glykopeptiden bzw. Oligosacchariden durch Affinitätschromatographie mittels immobilisierter Lektine nutzt diese Unterscheidung in der Spezifität [83]. Das betrifft einerseits Sequenz und Stellung der Bindung zwischen den Monosacchariden, andererseits die räumliche Anordnung bei Vorliegen weiter verzweigter Oligosaccharidketten (antennärer Strukturen). Für ConA (und einige andere Lektine) ist die Spezifität auch gegenüber komplexeren Liganden sehr genau untersucht [84]. Die Bindungsaffinität von RCA<sub>120</sub> gegenüber komplexen bi-, tri- und tetraantennären Asialo(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-)-Typ-Oligosacchariden nimmt in der genannten Reihenfolge, d.h. mit Zunahme der präsentierten terminalen Gal-Reste (erwartungsgemäß) zu, die kinetischen Parameter (Bindungs- wie auch Dissoziationskonstante) hingegen ab [85]. Für die Bindungsaffinität von ConA ist bekannt, daß die Lektinbindung an Oligosacchariden entweder an terminalen Man-Resten oder an  $\alpha$ -(1-2)-gebundenen Man-Einheiten innerhalb des Oligosaccharids erfolgt [86]. Dementsprechend werden biantennäre Asialo-Typ-Oligosaccharide aufgrund der an den Verzweigungsstellen vorliegenden Man-Reste mit freien Hydroxylgruppen am C3, 4 und 6 erkannt, tri- und tetraantennäre hingegen nicht. In den tri- und tetraantennären Strukturen sind diese Positionen durch die weiteren Verzweigungen besetzt [85, 87]. IMBERTY et al. zeigten, daß darüberhinaus die Flexibilität der Konformation in Oligosacchariden (Flexibilität der Bindungen zwischen den Monosaccharideinheiten) während der Wechselwirkung mit der Lektinbindungsstelle für die Affinität von Bedeutung sein kann [88].

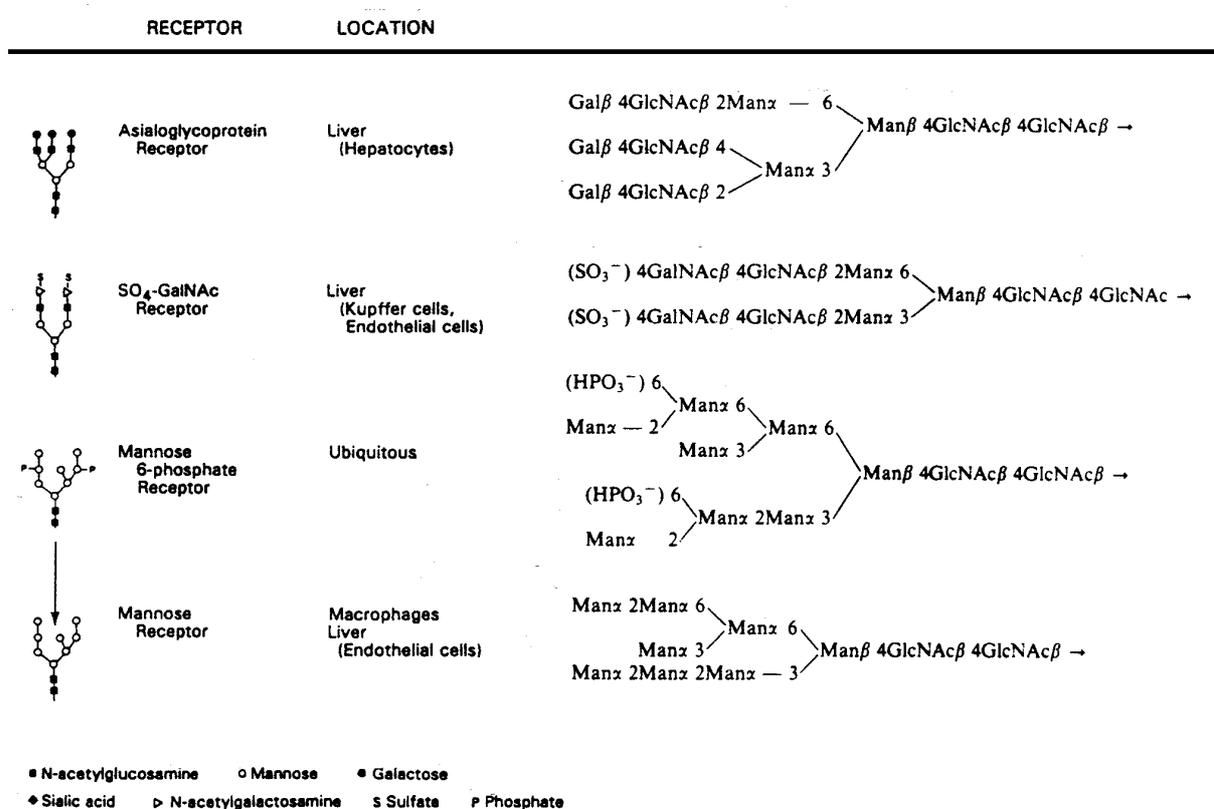
Ungeachtet dieser aus Kristalluntersuchungen und Molecular Modelling zum Teil sehr genauen Kenntnis der molekularen Mechanismen bei Wechselwirkung von Mono- und Oligosacchariden mit (löslichen) Lektinen pflanzlicher Herkunft, ist die Ligandenspezifität bei tierischen (insbesondere membranständigen) Lektinen nicht in dieser Detailliertheit geklärt. Gabius verweist darauf, daß (bei der histochemischen Detektion) für die Lektin-Bindung interessante Sequenzen häufig Teil komplexer KH-Ketten, d.h. effiziente Liganden natürlich vorkommende Glykopeptide sind. Cluster von KH-Resten können so durch

mehrere Bindungsstellen auf Tumorzellen oder Makrophagen erkannt werden [89]. Die Bindungsaffinität gegenüber dem Rezeptor(-Lektin) ändert sich mit Zunahme der Komplexität der Oligosaccharidstruktur mitunter erheblich. Bei den o.g. bi-, tri- und tetraantennären (Asialo-Typ-)Strukturen unterscheidet sich die Zunahme der Affinität gegenüber dem Asialoglykoprotein-Rezeptor um Größenordnungen [52]. Gegenüber dem MR zeigen nach Untersuchungen von KERY et al. verzweigte Man-Oligosaccharide, mannosyliertes BSA oder Mannan eine höhere Affinität als lineare Ketten [90]. Eine relativ hohe Oberflächendichte von Zuckergruppen kann allerdings die Bindungsspezifität beeinträchtigen [91]. MONSIGNY et. al nennen etwa 20 Fuc-Reste als optimal für die Rezeptorbindung von glykosyliertem Albumin an Maus-L1210-Zellen [92]. DRICKAMER zufolge sind multiple Bindungsmöglichkeiten physiologisch von größerer Bedeutung als eine hohe Affinität der einzelnen KH-Rezeptor-Bindung [93]. Grundsätzlich ist sicher anzuerkennen, daß eine „geeignete“ geometrische Anordnung höhere Affinität genießt, als isolierte KH-Reste [52], was im Einzelfall genauer Untersuchung der Wechselwirkung bedarf.

Welcher der oben genannten Definitionen man auch folgt, sie sagt (im Gegensatz zu Enzymen, Antikörpern, Wachstumsfaktoren usw.) nichts über die physiologische Funktion der Lektine aus. Mit dem aus der Erkenntnis über die Beteiligung an Zell-Zell-Erkennungsprozessen [94] in den letzten 2 Jahrzehnten neu erwachten Interesse an dieser Substanzklasse wurden eine Vielzahl neuer Lektine mit ganz unterschiedlichen funktionalen Aspekten gefunden. Neben ihrer Bedeutung für Abwehrmechanismen des Körpers durch Vermittlung der Phagozytose (Kap. 2.2.2.3) oder der im letzten Jahrzehnt gut untersuchten und verstandenen Rolle der Selektine bei der Auswanderung von Leukozyten in Entzündungsgebiete, wächst die Kenntnis über weitere physiologische Vorgänge, an denen Lektine beteiligt sind. Eine ganze Reihe experimenteller Ergebnisse sprechen dabei für die zusätzliche Beteiligung von Peptid-Peptid-Wechselwirkungen an der Funktion bestimmter tierischer Lektine. Dazu gehören Befunde über die Targeting-Funktion von Lektinen zur korrekten Platzierung von Enzymen am Substrat sowie interaktive Funktionen der KH-Bindungsstelle zur Modulation der Aktivität der Protein-Bindungsstelle. Durch den Vergleich von AS-Sequenzen in Lektinen aufgefundene charakteristische Domänen, die auch von Proteinen anderer Substanzklassen (Komplementrezeptoren, Enzyme, Wachstumsfaktoren usw.) bekannt sind, werfen dahingehend neue Fragen auf. Die Funktion solcher Domänen in Lektin-Molekülen ist vielfach noch ungeklärt [rev. in 95], wozu auch das Fibronectin-Type-II-repeat-Segment des MR gehört. Die eingangs genannte Definition der Lektine schließt die Relevanz anderer (als KH-) Wechselwirkungen für ihre physiologische Funktion nicht aus; Gabius weist in diesem Zusammenhang ausdrücklich auf die begrenzte Übertragbarkeit von KH-Bindungsstudien auf die physiologische

Situation hin [95]. Für das Design von Systemen zum rezeptorvermittelten Targeting von Arzneistoffen kann diese Komplexität von Bedeutung sein.

Im Gegensatz zu den angesprochenen Protein-Liganden sind die KH-Liganden der Lektine in vielen Fällen detailliert untersucht. Bei den Strukturen natürlichen Ursprungs handelt es sich in den allermeisten Fällen um Oligosaccharide komplexer Natur. Abb. 2 zeigt eine Übersicht von Liganden, die mit hoher Affinität an endo- bzw. phagozytosevermittelnde Lektine binden.



**Abb. 2:** Oligosaccharid-Liganden für Zellmembran-Rezeptoren [verändert aus 93, 52]

Die meisten Serum-Proteine enthalten eine oder mehrere O-(Serin, Threonin)-verknüpfte oder N-(Asparagin)-gebundene Oligosaccharidketten (zur physiologischen Funktion der aufgeführten Rezeptoren s. Kap. 2.2.2.3). Die endogene Entstehung von in Abb. 2 gezeigten mannosereichen Liganden wird der Einwirkung von Phosphatasen auf Man-6-P-Oligosaccharide zugeschrieben. Neben seiner Funktion bei der Erkennung mannosereicher

Strukturen von Mikroorganismen kommt dem MR möglicherweise eine Rolle bei der Endozytose solcher dephosphorylierten Glykoproteine zu [93].

Die sehr häufig vorkommenden N-Glykane von Serumproteinen können vereinfachend auf folgende Struktur zusammengefaßt werden:

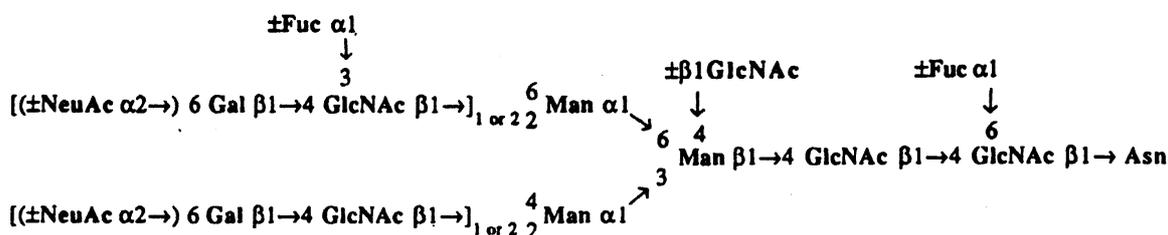


Abb. 3: N-Glykan-Struktur von Serumproteinen [aus 96]

Die Heterogenität der Glykane ergibt sich hauptsächlich aus der Anzahl der Verzweigungen an den peripheren Man-Resten (bi-, tri- oder tetraantennäre Strukturen) und der möglichen Substitution durch GlcNAc am zentralen Man-Rest. Weitere Variierung ist durch Fuc- und NeuAc-Reste möglich. Anzahl und Variabilität solcher Glykan-Strukturen bedingen die Vielfalt der Glykoform eines Proteins. Diese Variabilität ist wiederum abhängig von der Aktivität der glykosylierenden Enzyme, die von Typ und physiologischem Status der Zelle bestimmt ist [97].

Die Glykosylierung kann einerseits durch die Beteiligung an einer bestimmten Konformationsausbildung oder -änderung des Proteins dessen Aktivität beeinflussen [98]. Andererseits fungiert die Glykosylierung als Signal für die Protein-Clearance aus dem Kreislauf, die Serum-HWZ der Proteine wird somit über das Glykosylierungsmuster bestimmt und kontrolliert. Da nahezu alle Serum-Glykoproteine mit terminalen Sialylsäureresten sezerniert werden, ist für ihre Clearance das Wirksamwerden von Neuraminidasen notwendig. DRICKAMER schließt aus der Abhängigkeit der Clearance von Serumproteinen von deren Glykosylierung auf die Existenz kurz- und langlebiger Vertreter des gleichen Proteins. [93]

Homologe Serumproteine verschiedener Spezies weisen häufig Glykane ähnlicher Struktur auf [99].

Es wurde bereits gesagt, daß sich für die Detektion von Lektinen, also für die Bindung, häufig komplexere Saccharidsequenzen (aus Glykoproteinen natürlicher Herkunft) eignen. Dessenungeachtet binden auch einfachere Strukturen, allerdings mit geringerer Affinität [52]. Dementsprechend erfolgreich waren Versuche der Nutzung sog. Neoglykoproteine (s.Kap. 2.4.2.2), chemisch mit den gewünschten Zuckern modifizierte Proteine, die so die geometrische Organisation der KH-Gruppen von natürlich vorkommenden Glykoproteinen nachahmen. Den physiologischen Liganden adäquat weisen sie eine natürliche Clusterung

der bindenden KH-Einheiten auf. Solche Neoglykoproteine haben allerdings den Nachteil, daß sie natürlicher Variabilität unterliegen und ihre Gewinnung in ausreichender Menge sehr aufwendig ist. Deshalb erscheint die Suche nach geeigneten, chemisch definierten Glykokonjugaten erforderlich. Die in dieser Arbeit untersuchten Glykolipide sollen einen solchen Ansatz vermitteln. Der Einsatz möglichst einfacher Strukturen mit systematischer Veränderung der Spacer-Region sollte es zulassen, grundsätzliche Fragen zur Eignung zu klären und Grundlage für weitere Synthesearbeiten sein.

## **2.4 Liposomentargeting**

### **2.4.1 Natürliches Schicksal konventioneller Liposomen**

Das Schicksal von Liposomen im Körper ist zunächst beeinflusst von der Art bzw. dem Ort der Applikation und einer möglichen Verteilung: die für Liposomen am weitesten verbreitete ist die parenterale Applikation (insbesondere die intravenöse, intramuskuläre, subcutane, intraperitoneale), bei der die Liposomen mit Körperflüssigkeiten (Blut, Lymphe, extrazelluläre Flüssigkeit) in Berührung kommen. Andere parenterale Applikationswege, wie intraartikulär oder intracerebral sind eher von untergeordneter Bedeutung. Bei lokaler Injektion (s.c., i.m.) verbleiben vor allem große Liposomen (MLV, LUV) überwiegend am Injektionsort, während kleine Vesikel (SUV) über die Lymphbahnen ausgespült und von Makrophagen in regionalen Lymphknoten aufgenommen werden, nur ein geringer Teil erreicht den Blutkreislauf [100].

Neben der parenteralen hat die pulmonale Applikation in Form von Aerosolen eine gewisse Beachtung erlangt [101]. Die Liposomen werden in der Lunge entweder von Alveolarmakrophagen aufgenommen oder verschmelzen mit dem Surfactant-Film der Alveolen. Die Verweildauer der Membrankomponenten sowie eingeschlossener Arzneistoffe in der Lunge wird von der Lipidzusammensetzung der Vesikel bestimmt und variiert von 1,4 bis 20 h [102].

Einer oralen Anwendung steht die mangelnde Stabilität der Liposomen bei niedrigem pH, bei Anwesenheit von Verdauungsenzymen und Gallensalzen entgegen; die Resorption intakter Vesikel aus dem Gastrointestinaltrakt ist bislang nicht belegt [100].

In den letzten Jahren fanden topische Formulierungen vor allem zu kosmetischen Zwecken weite Verbreitung, die hier nicht näher behandelt werden sollen. Für eine Diffusion intakter (konventioneller) Liposomen durch die Hornhaut gibt es bisher keine eindeutigen Beweise [102]. Lediglich erwähnt seien spezielle topische Formulierungen, sog. Transfersomen, die aufgrund extremer Flexibilität und Verformbarkeit der Membran tiefere Hautschichten und Blutgefäße als intakte Vesikel erreichen können [103].

Bei der überwiegend genutzten systemischen (i.v.) Gabe sind die Liposomen der Einwirkung von Lipoproteinen und Opsoninen ausgesetzt. Der Kontakt mit Lipoproteinen (insbesondere HDL) kann Lipidaustausch und Desintegration der Vesikel zur Folge haben. Adsorbierte Opsonine fungieren als Markerproteine für die Clearance durch die Zellen des MPS (s.Kap. 2.2.1). Die Plasma-HWZ von MLV liegt in der Größenordnung von Minuten. Die höchste Clearance-Rate weisen die Kupffer-Zellen der Leber (80% der injizierten Dosis), gefolgt von Makrophagen in Milz (5%) und Knochenmark (2%), auf. Bei intaktem MPS finden sich keine nennenswerten Mengen von Liposomen in Zellen außerhalb des MPS. [100] In Abhängigkeit von Größe und Zusammensetzung der Membran sind dennoch einige Modifizierungen dieser grundsätzlichen Vorgänge möglich.

**Größe** Entsprechend ihrer Durchlässigkeit stellen die Kapillarwände eine Barriere für Liposomen verschiedener Größe dar [102]: geschlossene Kapillaren (Skelett-, Herz-, glatte Muskulatur) sind auch für sehr kleine Vesikel nicht passierbar; die Fenestrae der Lebersinusoide sind mit einer Größe von bis zu 80 nm für SUV durchlässig und ermöglichen deren Aufnahme durch Leber-Parenchymzellen; Kapillaren in entzündetem Gewebe weisen interzelluläre Lücken auf, die Vesikel kleiner 100 nm passieren können; größere Lücken der Kapillarwände, wie in Tumoren, lassen den Gefäßaustritt und eine Ansammlung auch größerer Liposomen im Gewebe zu.

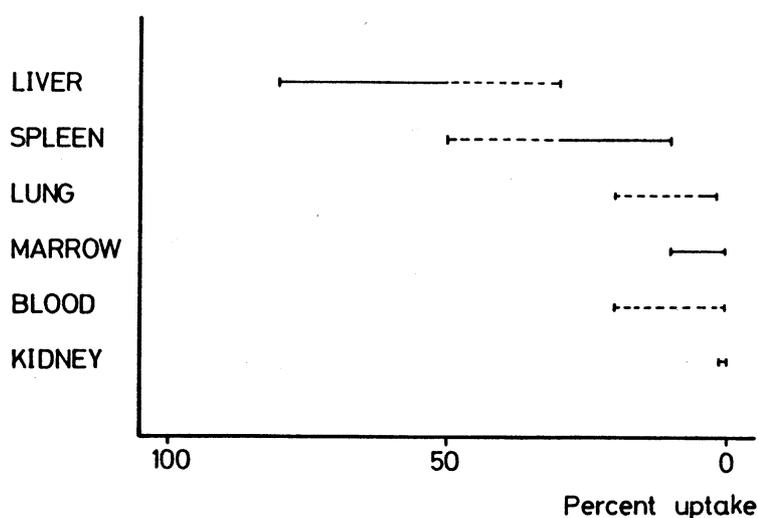
Grundsätzlich werden größere Liposomen (MLV, LUV) schneller aus dem Blutkreislauf entfernt als kleinere: die Plasma-HWZ von SUV kann mehrere Stunden betragen, sie kumulieren weniger in Makrophagen der Leber (56% der injizierten Dosis) und Milz (3%), dafür vermehrt in Knochenmark (14%), Haut (9%) und Darmgewebe (10%) [100]. Sehr große Liposomen (7-10 µm) unterliegen einer Ansammlung in feinen Kapillaren aufgrund einfacher Filtration, zumeist im Kapillarbett der Lunge [102].

**Ladung** Negativ geladene SUV erfahren schnellere Clearance als neutrale oder positiv geladene, was hauptsächlich auf verstärkte Opsonisierung zurückzuführen ist. In Milz, Knochenmark und Hirn zeigt sich eine vermehrte Aufnahme positiv geladener SUV, während in der Lunge vor allem negativ geladene SUV akkumuliert werden. MLV werden durch Milz, Knochenmark und Monozyten bevorzugt in der Reihenfolge negativ geladen > neutral > positiv geladen aufgenommen, die Clearance-Rate durch die Leber folgt dem Schema neutral > negativ = positiv. Bevorzugte Aufnahme durch die Lunge gilt für negative und positive MLV [100].

**Lipidzusammensetzung** GREGORIADIS und SENIOR fanden in Abhängigkeit vom verwendeten Membranlipid eine Verlängerung der Plasma-HWZ in der Reihenfolge DLPC - DOPC - DSPC - EPC - DMPC - SM (mit Ausnahme von DSPC 50% Cholesterol) [104]. Der Einbau von Cholesterol verringert die Clearance-Rate konzentrationsabhängig, wobei sich die Verteilung mit steigendem Cholesterolgehalt von Kupffer-Zellen der Leber zu

Makrophagen der Milz verschiebt. MOGHIMI und PATEL schreiben letzteres der Adsorption unterschiedlicher Opsonine zu, die für Makrophagen der Leber und Milz verschieden spezifisch sind [105]. Ähnlich wie Cholesterol verzögern Cardiolipin und Sphingomyelin die Leber-Clearance [100]. Negativ geladene, PS enthaltende Vesikel unterliegen einer erhöhten Clearance gegenüber solchen, die PA oder PE enthalten, wofür ein PS-Rezeptormechanismus (von Bedeutung für die Erkennung alternder Erythrozyten) [106] oder PS-spezifische Opsonisierung durch Komplementkomponenten [107] verantwortlich gemacht werden. Grundsätzlich weisen rigidere bzw. stabilere, d.h. in der Packung der Lipidmembran dichte, Vesikel eine längere Plasma-HWZ als fluide auf [102].

Ungeachtet einiger Ausnahmen ist das Ausmaß der Opsonisierung und die Art der beteiligten Plasmaproteine bzw. Opsonine der entscheidende Faktor für die Clearance-Rate, was von der Packung der Lipide (Rigidität bzw. Sättigung der Lipide, erhöhte Packungsdichte durch Einbau von Cholesterol usw.), dem Vorhandensein von Ladungen und z.T. auch über die Größe (Kurvatur) und damit vorhandenen Störstellen bzw. größenspezifischer Opsonisierung [108] bestimmt ist. NEW et al. [106] fassen die Fülle der Daten zur Liposomen-Clearance vereinfachend in einer Graphik zusammen ( Abb. 4), die die mögliche Gestaltungsbreite für eine Steuerung in bestimmte Organe oder Gewebe darstellt.



**Abb. 4:** Lokalisierung von Liposomen 24h nach i.v.-Injektion [aus 106]

Die gestrichelten Anteile repräsentieren bereits spezifische Oberflächenmodifizierungen, wie die Präsentation von Saccharid-Liganden oder den Einbau von Gangliosiden, die nicht mehr dem Begriff *konventionelle Liposomen* zuzurechnen sind. Dessenungeachtet verdeutlicht die Darstellung, daß konventionelle Liposomen mit gewissen Verschiebungen immer den gleichen oder ähnlichen Eliminationsmechanismen ausgesetzt sind.

## 2.4.2 Spezifisches Targeting

Die physiko-chemischen Eigenschaften, die die Wirkung eines Arzneistoffs ausmachen, diktieren auch das Verteilungsverhalten im Körper. Beim Arzneistoff-Targeting kommt es somit darauf an, das pharmakokinetische Verhalten von der Pharmakodynamik zu entkoppeln [51]. Hierzu stellen arzneistofftragende Liposomen eine Möglichkeit dar. Wie in Kap. 2.4.1 beschrieben, unterliegen Liposomen aufgrund ihrer korpuskulären Struktur bereits einem passiven Targeting, das durch Veränderungen in Größe, Ladung, Lipidzusammensetzung etc. beeinflusst werden kann. Trotz dieser (relativ beschränkten) Möglichkeiten der Einflußnahme, limitiert das natürliche Schicksal von Liposomen ihren Einsatz als therapeutisch nutzbares System erheblich.

Um der schnellen Beseitigung der Vesikel entgegenzuwirken, ist eine Vorsättigung des MPS mit Leerliposomen oder die Verabreichung sehr hoher Liposomendosen prinzipiell möglich. Eine solche mehr oder weniger vollständige Absättigung der Phagozytose-Kapazität des MPS stellt in vivo zwangsläufig auch die Blockierung anderer Phagozytoseaufgaben der Abwehr (Erreger, Tumorzellen) dar und kann ernste Komplikationen provozieren oder zumindest befördern. Mit der Gabe hoher Liposomendosen wächst zudem die Gefahr der Blockierung von Kapillaren, besonders der Lunge, Wechselwirkungen mit Blutzellen und Plasmaproteinen können die Zusammensetzung des Blutes verändern oder deren Funktion (vor allem durch Adsorption und Lipidaustausch) beeinträchtigen, weshalb eine humanmedizinische Anwendung weitgehend ausscheidet.

Darüberhinaus modifizieren Veränderungen der Zusammensetzung der Liposomenmembran die Stabilität der Vesikel. Das gilt insbesondere für die Situation in vivo unter dem Einfluß von Serumproteinen, Enzymen und der Körpertemperatur, was mit einer drastischen Abnahme der Stabilität und dem Verlust vor allem wässrigen Vesikelinhalts verbunden sein kann. Möglichkeiten der Modifizierung der Liposomenoberfläche ohne eine Veränderung der Barriereigenschaften der Membran sind deshalb Bedingung für eine breitere therapeutische Nutzung. Das betrifft einerseits die Affinität der Liposomen gegenüber der Zielzelle, andererseits (als Voraussetzung dafür) die Verhinderung der schnellen Clearance aus dem Blutkreislauf. Zur Steigerung der Affinität bietet sich die Nutzung Zellrezeptor-vermittelter Mechanismen, von denen im nachfolgenden Wechselwirkungen via KH-Rezeptoren Beachtung finden sollen. Die deutliche Verlängerung der Plasma-HWZ gelang zu Beginn der 90er Jahre mit Darstellung der sterisch stabilisierten Liposomen [109]. In jüngerer Zeit steht die Verbindung dieser beiden Formen der Oberflächenmodifizierung zum Targeting von Liposomen im Mittelpunkt (s. Kap 2.4.2.3).

### 2.4.2.1 Sterische Stabilisierung

Die Notwendigkeit der Beeinflussung von Blutzirkulationszeit und Organverteilung von Liposomen intensivierte die Suche nach geeigneten Strukturen zur Oberflächenmodifizierung. Inkorporierung von hydriertem Phosphatidylinositol (PI) oder Gangliosiden, insbesondere Gangliosid GM<sub>1</sub> (Optimum 5 - 7mol% GM<sub>1</sub>), führte zur deutlichen Verlängerung der Plasma-HWZ, verstärkter Präsenz in Tumorgewebe und verringerter Ansammlung in Leber und Milz [110]. Als effektivste Substanzen erwiesen sich synthetische Polymere: adsorbierte Block-Copolymere [111, 112] und insbesondere kovalent gebundenes Polyethylenglycol (PEG) mit mittleren Molekülmassen (1500 - 5000), die als sterische Barriere für angreifende Plasmakomponenten fungieren. Erstere haben allerdings den Nachteil, daß die Polymer-Adsorption an der Membranoberfläche vielfach zum Verlust wässrigen Vesikelinhalts führt [113] oder die Adsorption in vivo keine ausreichende Stabilität aufweist [114], weshalb die Inkorporierung von PEG-PE heute das Mittel der Wahl darstellt.

Gegenüber der zunächst eingeführten Bezeichnung Kryptosomen [109] hat sich das Warenzeichen STEALTH<sup>®</sup>-Liposomen (Liposome Technology Inc., Menlo Park / CA, USA) durchgesetzt; beide verweisen auf die „Unsichtbarkeit“ gegenüber dem Immunsystem. Durch die Schaffung einer sterischen Barriere für Makromoleküle bleiben die Stealth-Eigenschaften der Vesikel von der Fluidität oder Ladung der anderen Membrankomponenten nahezu unbeeinflusst [115]. Blutzirkulationsdauer der Stealth<sup>®</sup>-Liposomen und ihre Verteilung in MPS-reichen Organen sind hauptsächlich abhängig von der Oberflächendichte der PEG-Ketten und ihrem Polymerisationsgrad (Länge), wobei häufig ein Maximum bzw. Minimum (Vorliegen eines Optimums) zu verzeichnen ist [115, 116]. Zum theoretischen Verständnis wurden von LASIC zwei Modelle herangezogen, die die sterische Abstoßung von Oberflächen bei Besatz mit nichtionischen, flexiblen, gut hydratisierbaren Polymeren mathematisch beschreiben und hier nur im Ansatz Beachtung finden sollen [102]: Für niedrige Oberflächendichten der Polymerketten, bei der keine gegenseitige Beeinflussung vorliegt, ordnen sich die PEG-Ketten in Form eines Pilzes an und schirmen so die Oberfläche sterisch ab (Pilzmodell). Kleine Makromoleküle können dennoch in der Lage sein, an der Oberfläche zu binden. Für höhere Polymer-Oberflächendichten, bei denen sich die PEG-Ketten gegenseitig beeinflussen, gilt das Bürstenmodell: die Polymere liegen mehr oder minder gestreckt vor und bestimmen wechselseitig ihre Ausdehnung und Flexibilität bzw. Mobilität. Bei sehr hoher Oberflächendichte kann einsetzende Kondensation der Ketten den vollständigen Verlust der Mobilität und den Zusammenbruch der Bürste oder auch Phasenseparation und Membrandefekte zur Folge haben, was wiederum die Adsorption von Proteinen begünstigt.

Die beiden genannten Modelle beschreiben in ihrer jeweils konsequenten Ausformung zwei Extrema theoretisch unendlich vieler Zustände. Die optimale Stabilität (hinsichtlich Proteinabsorption und Blutzirkulationsdauer) fand man nahe dem Übergang von der Pilz- in die Bürstenkonformation. Die längsten Blutzirkulationszeiten wurden bei Inkorporierung von 5-10mol% PEG-PE mit einer Kettenlänge von  $n = 40-130$  erzielt, das Optimum bei 5mol% und  $n = 40-70$  erreicht. Die Plasma-HWZ ist für die einzelnen Spezies sehr unterschiedlich und wächst mit steigendem Körpergewicht. Mit üblichen Formulierungen (5-10mol% <sup>1900</sup>PEG-DSPE) werden HWZ von 20 h in Mäusen und von >40 h im Menschen erreicht [117]. Entsprechend vorstehenden theoretischen Überlegungen empfiehlt LASIC eine Mischung von kürzeren (Bürste) und längeren (Pilz) Polymeren (4-6mol% PEG 2000 und 2mol% PEG 5000) zur Optimierung der biologischen Stabilität [116].

Aus dem Vergleich von PEG-PE-Derivaten mit Oligosaccharid-PE-Derivaten ähnlicher Hydrophilie schließen BLUME und CEVC auf die vorrangige Bedeutung der Mobilität der polaren Barriere, d.h. der Delokalisierung für das MPS erkennbarer Strukturen für ihre Stealth-Effektivität. Danach tritt die Bedeutung einer gesteigerten Oberflächenhydrophilie in den Hintergrund [115]. Die Verwendung einiger anderer Polymere, wie Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidon und weiterer Polysaccharid-Strukturen, wie Dextran- und Zellosederivate, mit denen keine adäquaten Stealth-Effekte zu erreichen sind, bestätigen diese Überlegung [116]. ALLEN faßt die Erfordernisse zur Maskierung gegenüber dem MPS bildhaft mit dem Ausdruck „to look like water“ zusammen [118].

Ungeachtet der sterischen Abschirmung der Oberfläche ist auch für Stealth<sup>®</sup>-Liposomen die Plasma-HWZ nicht völlig unabhängig von anderen Vesikeleigenschaften [102, 114]:

**Größe** Die für sehr kleine (< 70 nm) und sehr große (mehrere  $\mu\text{m}$ ) konventionelle Liposomen beobachteten Besonderheiten der Elimination (s. Kap. 2.4.1) gelten adäquat. Darüberhinaus berichten LITZINGER et al. über verstärkte Oponisierung von Stealth-Vesikeln < 70 nm, die die schnelle Clearance bedingt [119]. PEG-Liposomen > 200 nm unterliegen beschleunigter Clearance (HWZ wenige Stunden) und kumulieren vor allem in der Milz. MOGHIMI und DAVIS limitieren daher die o.g. Stealth-Eigenschaften auf einen Vesikelgrößenbereich von 70-200 nm [114].

**Ladung, Lipidzusammensetzung** Die erhöhte Aufnahme von PS enthaltenden PEG-Vesikeln durch Kupffer-Zellen wird auf dessen Tendenz zur Phasenseparation, insbesondere in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ , zurückgeführt. Liposomen (< 200 nm) der Zusammensetzung DOPE/Chol/<sup>5000</sup>PEG-PE kumulieren gegenüber DOPC/Chol/<sup>5000</sup>PEG-PE verstärkt in der Milz.

Mögliche Erklärungen für die genannten Abweichungen sind vielfach hypothetisch und schließen mechanische Filtration im Kapillarbett der Milz, spezifische Oponisierung und Dysoponisierung, verminderte hydrodynamische Stabilität im Blutfluß oder immunogene Reaktionen ein. Als sehr wahrscheinlich gilt die Beteiligung reversibler Clusterung durch

Lateral diffusion oder irreversibler Phasenseparation von Membranlipiden und damit dem Vorhandensein exponierter, nicht abgeschirmter Membranbereiche, die der Bindung von Opsoninen zugänglich sind.

Die verringerte Kumulation von Stealth<sup>®</sup>-Liposomen in MPS-reichen Organen führt über die verlängerte Zirkulation im Blutkreislauf konsequenterweise zur Ansammlung in Geweben mit erhöhter Kapillarpermeabilität und zu einem passiven Targeting in Entzündungs- [120] oder Infektionsgebiete [121] und Tumorgewebe [122]. Auch die vermehrte Penetration in Hautgewebe basiert auf Gefäßaustritt über (physiologische) Kapillarlücken [102]. Vor allem die Kumulation in Tumoren führte zu intensiver Forschung mit liposomalen Präparationen. Mit Stealth<sup>®</sup>-Liposomen werden 10 - 30mal höhere Zytostatikakonzentrationen im Tumor als bei Einsatz des freien Wirkstoffs erreicht [123]. In jüngerer Zeit wurden durch Varrrierung der Lipidzusammensetzung eine weiter verbesserte Tumorlokalisierung erzielt [124]. Bisher konnten allerdings nur einige wenige Präparate eine Markteinführung erreichen. Dazu gehören DaunoXome<sup>®</sup> (Daunorubicin, NEXSTAR Pharmaceuticals) und Caelyx<sup>®</sup> (Doxorubicin, ESSEX Pharma), von denen letzteres sterisch stabilisiert ist. Liposomales Cisplatin (Stealth<sup>®</sup>-Liposomen, SEQUUS, USA), Vincristin (INEX, Kanada) und Annamycin (ARONEX, USA) befinden sich in klinischer Prüfung [125].

Trotz der genannten Einschränkungen stellt die Entwicklung sterisch stabilisierter Liposomen einen entscheidenden Schritt in Richtung spezifisches Targeting dar. LASIC spricht von der „zweiten Liposomengeneration“, die Voraussetzung für eine „dritte Generation“ von ligandentragenden Liposomen ist [102].

#### **2.4.2.2 Rezeptorvermitteltes Targeting**

Der Erfolg rezeptorvermittelten Targetings ist, neben den in vorstehenden Kapiteln genannten Faktoren auf dem Weg des Ligand-Arzneistoff-Konjugats zur Zielstruktur, abhängig von der Selektivität und der Verteilung des anvisierten Rezeptors im Körper. Einige wenige Rezeptoren, zu denen der MR gehört, vermitteln die Endozytose arzneistofftragender Konjugate. Sofern nicht durch Nutzung von Fusionsproteinen die Aufnahme vermittelt wird, führen alle anderen Vorgänge mit Beteiligung von Rezeptoren (auf nichtphagozytierenden Zellen) zur extrazellulären Anreicherung bzw. Freisetzung von Arzneistoffen. Auf diese Unterscheidung sei im Zusammenhang mit Untersuchungen zum rezeptorvermittelten Targeting hingewiesen.

Die physiologische Verbreitung von KH-Rezeptoren und die Potenz von KH-Liganden zur Codierung von Information birgt eine hohe Spezifität der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung, die für ein Targeting genutzt werden kann. Entsprechend dem Schwerpunkt dieser Arbeit sollen im folgenden ausschließlich KH-vermittelte Wechselwirkungen via MR Beachtung finden.

Der Einsatz von Glykoproteinen als Targeting-Vehikel wurde vielfach mit Erfolg angewandt [51]. Eine andere Möglichkeit bietet der Einschluß von Arzneistoffen in eine ligandentragende „Verpackung“, wie im Falle oberflächenmodifizierter Liposomen. Da beide auf die Nutzung desselben Prinzips abzielen, sollen sie nicht getrennt voneinander behandelt werden.

Im Sinne eines Targeting wurden Man-tragende Konjugate mit sehr unterschiedlichen Zielstellungen untersucht. Dazu gehören die Steigerung der tumortoxischen Aktivität von Makrophagen, die Beseitigung von in Makrophagen persistierenden Erregern und die Applikation von Tetanus-Toxoid zur Steigerung der Antikörperproduktion [rev in 3]. Dazu gehört auch die Optimierung der Immunantwort durch die schnelle Aufnahme von Antigenen via Man-Liposomen durch Makrophagen [126], die Untersuchung der MR-Exprimierung Leishmania-infizierter Makrophagen [127] oder die selektive Beseitigung von Makrophagen zur Untersuchung autoimmuner oder immuner Vorgänge bei verschiedenen Infektionen von Auge und Hirn [128-130]. UMEZAWA und ETO berichten von der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke mittels mannosylierter Liposomen und deren Ansammlung in Mikrogliazellen [131]. Eine Reihe von Arbeitsgruppen nutzte mannosylierte Liposomen zum Leber-Targeting [132]. Daneben liegen eine Vielzahl von Arbeiten vor, die die prinzipielle Nutzung Man-tragender Carrier (Proteine, Polymere, Liposomen) als Targetingsysteme untersuchen.

Die zur Mannosylierung eingesetzten Substanzen und Methoden sind äußerst vielfältig. Abgesehen von den Eigenschaften der jeweils verwendeten Grundstruktur, dürften die sehr unterschiedlichen Ergebnisse bei der angestrebten Rezeptorvermittlung wenigstens zum Teil darauf zurückzuführen sein. Aus der Vielzahl der Arbeiten sollen im folgenden einige in Bezug auf Art und Dichte der Mannosylierung, Targeting-Erfolg und Rezeptorvermittlung betrachtet werden.

MR-vermitteltes Targeting bediente sich zum einen der Nutzung natürlicher Substanzen. Dazu gehören Mannan aus Hefen, Man-Glykoproteine aus Leishmania oder aus Mycobakterien gewonnene Lipo(arabino)mannane [rev. in 3, 133, 134]. Aus einer der letzteren, Man-Phosphatidylmyoinositol (Man-P(m)I), wurden von BARRATT et al. Liposomen (Man-P(m)I/Chol 2:1 [w/w]) präpariert, mit denen gegenüber PC/PS-Vesikeln eine Steigerung der Aufnahme durch Maus-Makrophagen um 100% erreicht werden konnte [135]. Die Daten lassen eine rezeptorvermittelte Aufnahme vermuten. Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnten die Steigerung der tumoriziden Aktivität von Ratten-Alveolarmakrophagen [136] und die Induzierung von NO-Synthase in Maus-Makrophagen [137] durch Man-P(m)I-Liposomen zeigen.

Zum anderen wurden, wie erwähnt, veränderte Substanzen natürlichen Ursprungs eingesetzt. Dazu zählen enzymatisch partiell deglykosylierte Glykoproteine und die sog. Neoglykoproteine. Letztere sind durch ihre chemische Derivatisierung von Vorteil, da die enzymatische Deglykosylierung meist unvollständig ist [51]. Allerdings haben diese Verbindungen im Hinblick auf eine Etablierung als Bestandteil von Arzneimitteln den Nachteil, daß sie nicht als chemisch definierte Verbindungen zu gewinnen und mit allen Problemen der Verunreinigung und Kontamination natürlicher Quellen behaftet sind.

Serumalbumine bovinen (BSA) oder humanen (HSA) Ursprungs mit unterschiedlichem Grad der Mannosylierung fanden vor allem aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit verbreitete Anwendung. GARCON et al. [138] erreichten durch kovalente Bindung von Man-BSA an vorgeformte Liposomen eine Steigerung der Aufnahme durch Maus-Peritonealmakrophagen in vitro zwischen 100 und 150%. Eine Abhängigkeit von der BSA-Mannosylierung (8 bzw. 36 Man-Reste/Albumin) ist erkennbar, allerdings geringer als erwartet. Die Ergebnisse belegen einen Rezeptormechanismus (Verdrängung durch freie Mannose). Vermittels solcher Liposomen verabreichtes Tetanustoxoid steigerte die Immunreaktion von Mäusen (IgG-Serumtiter) um den Faktor 10 gegenüber nichtmannosylierten Liposomen.

JANSEN et al. [139] konnten eine Abhängigkeit der Bindungsaffinität gegenüber dem MR vom Ausmaß der Albumin-Mannosylierung zeigen und nennen 22 Man-Reste, die für eine hochaffine Bindung erforderlich sind; MOLEMA und MEIJER [51] nennen 16 Man-Reste für eine optimale Bindung. Handelsübliches Man-BSA ist mit 15-25 Man-Resten substituiert (SIGMA Chemie). Mannosylierte Albuminderivate haben im letzten Jahrzehnt als Targeting-Vehikel für kovalent gebundene Arzneistoffe (Muramyldipeptid, Methotrexat) [3] und in jüngerer Zeit zur antiviralen Therapie [140] Aufmerksamkeit erfahren.

Zu den auf rein synthetischem Wege erreichten Mannosylierungen zählt die Ankopplung von Man-Determinanten an vorgeformte, PE-enthaltende Liposomen. Solche Präparationen haben unter dem Begriff neomannosylierte Liposomen Eingang in die Literatur gefunden. Dazu gehören eine Reihe von Arbeiten, in denen die Kopplung von p-Aminophenyl-Man (PAP-Man) mittels Glutaraldehyd erfolgt, woraus ein kurzer Spacer (ca. 10 Atome) zwischen PE und Man resultiert [127, 141, 142]. GHOSH und BACHHAWAT erreichten mit solchen Liposomen (ca. 16mol% PAP-Man-PE) eine Steigerung der Leberaufnahme (Maus) um 60% über einen Rezeptormechanismus (Inhibierung durch Mannan) [141]. Neueren Ergebnissen aus dieser Arbeitsgruppe zufolge konnte bei der Behandlung experimenteller Leishmania in Hamstern mittels in PAP-Man-Liposomen (ca. 60mol% PAP-Man-PE) eingeschlossenen Pentamidin-Derivaten die Parasiten-Belastung der Milz um 85% verringert werden (vs. 47% nichtglykosylierte und 66% glucosylierte Liposomen); der Nachweis eines Rezeptormechanismus erfolgt nicht, wird aber

vorausgesetzt [143]. In der Therapie von Aspergillosen in vivo (Maus) mit liposomalem AmphotericinB waren ähnliche Vesikel (ca. 8mol% PAP-Man) unmannosylierten Liposomen überlegen, die Toxizität verringert [144]. Untersuchungen der Organverteilung ergaben erhöhte Konzentrationen in Leber und Lunge, die z.T. auf Rezeptorvermittlung zurückzuführen sind [142].

Nach einer anderen Methode der Mannosylierung durch Inkorporierung von PAP-Man (10mol%) in PC/Chol-Liposomen [131] erzielten verschiedene Arbeitsgruppen unter Mitarbeit von HUITINGA eine selektive Beseitigung der Makrophagen in vivo (Maus, Ratte, Kaninchen) [128-130]. Die Daten lassen keine Angaben zu, die den Einfluß der Mannosylierung quantifizieren; in einer früheren Studie finden HUITINGA et al. [145] keinen Unterschied gegenüber Kontrollliposomen. Wie erwähnt, berichten UMEZAWA und ETO von der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (im Gegensatz zu unmannosylierten) mittels solcher PAP-Man-Liposomen und deren Ansammlung in Mikrogliazellen [131]; zu ähnlichen Ergebnissen kommen HUITINGA et al. [146].

Mit dem Einsatz mannosylierter Polymere auf Poly-L-Lysin-Basis als Arzneistoff-Carrier konnten erhebliche Steigerungen der Arzneistoffwirkung in Makrophagen erreicht werden [rev. in 52]: Bindung von Muramyl-dipeptid (MDP) an Man<sub>25</sub>-Polymere führte bei induzierter Hepatitis in Mäusen zu Überlebensraten von 60% vs. gleichartigen Proteinkonjugaten (Man<sub>33</sub>-BSA-MDP) 40%, die Steigerung der Antitumoraktivität durch Man<sub>80</sub>-Polymer-MDP zu 70% Überlebensrate (vergleichbare Überlebensrate mit Man<sub>25</sub>-BSA-MDP) und fehlender Protektion bei Verabreichung des freien MDP in allen Fällen. Aus der äußerst geringen Effizienz von BSA-MDP in vitro und in vivo wird auf Rezeptorvermittlung geschlossen. Als erheblicher Vorteil wird festgestellt, daß die Polymere im Gegensatz zum BSA keine Antikörperbildung induzierten. Bei Einsatz von Man<sub>50</sub>-Poly-L-Lysin erzielten Liang et al. eine Aufnahmesteigerung durch Alveolarmakrophagen (Ratte) in vitro um den Faktor 5, deren Rezeptorvermittlung mittels Inhibierung durch Man-BSA nachgewiesen wird [147].

MULLER und SCHUBER [148] erreichten durch Mannosylierung (15mol%) vorgeformter Liposomen über hydrophile Spacer (ca. 12 Atome) eine Steigerung der Aufnahme durch Makrophagen (Maus, Ratte) in vitro um 200 bis 800% (in Abhängigkeit von Zelltyp und Liposomenmarker). Die Autoren interpretieren die fehlende Verdrängung der Man-Liposomen durch Mannan als hochaffine Bindung am Rezeptor infolge Clusterung der Mannosegruppen, die durch die Flexibilität der Spacer ermöglicht ist. In vivo (Maus) zeigten solche Liposomen gegenüber nichtmannosylierten eine reduzierte Toxizität des eingeschlossenen LPS, dessen Targeting an Gewebsmakrophagen die verstärkte Regression solider Tumoren und verminderte Bildung von Lungenmetastasen (~ Faktor 2) erreichte [149].

Eine Studie von DOMURADO et al. [150] mit mannosylierten und fucosylierten Polymeren auf Polyaspartam-Basis in vivo (Maus) scheint das Erfordernis einer gewissen Flexibilität der

KH-Gruppen zur Clusterbildung zu bestätigen. Die Glykosylierung erfolgt durch Kopplung der KH-Monomere (Man, Fuc) über kurze Spacer (6 Atome) oder als Trimer (Fuc<sub>3</sub>) der Struktur  $[\beta\text{-L-Fuc-O-CH}_2\text{]}_3\text{-C-NH-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$ , woraus ein relativ rigider Cluster resultiert. Aus der Verlängerung der Plasma-HWZ von Glucoseoxidase (GO) aus *A. niger* (die via MR von Makrophagen aufgenommen wird) wird auf die Affinität der Glykopolymere zum MR geschlossen, die in Abhängigkeit von der Glykosylierungsdichte (3 bis 16mol%) und der Polymerdosis steigt. Für Man-Polymere wird eine leicht effizientere Wirkung festgestellt. Der Einsatz der Cluster-Polymere (Fuc<sub>3</sub>) ergibt gegenüber Monomer-Derivaten vergleichbarer KH-Dichte nur eine geringe Verlängerung der GO-HWZ, was der fehlenden Flexibilität der KH-Gruppen zugeschrieben wird. OHSUMI et al. kommen mit ähnlichen Man-Trimeren gegenüber bi- und monosubstituierten Derivaten zu ähnlich moderaten Ergebnissen [151].

Die eingangs genannten Substanzen natürlichen oder halbsynthetischen Ursprungs bedienen sich alle mehr oder minder der natürlich vorgegebenen Struktur der Liganden (bakterielle Lipide) oder erreichen Multivalenz durch Ankopplung einer Vielzahl von Liganden, wie im Falle des Man-BSA und glykosylierter Polymere. Bei Einbau in oder Kopplung an Liposomen ist die Zahl der an einer Struktur vorhandenen KH-Liganden nochmals erhöht. Offensichtlich ist aber die notwendige Anzahl der zur Verfügung stehenden Man-Reste weit größer, als die maximale Anzahl der an einer Bindung von komplexen Liganden beteiligten CRD des MR (s. Kap. 2.2.2.3). Dabei kann es sich um eine rein statistische Zunahme der Wahrscheinlichkeit einer geeigneten Anordnung von Man-Resten für eine hochaffine Bindung handeln, die durch eine Vielzahl von Liganden erhöht ist. Es ist ebenfalls denkbar, daß an der Bindung eines Konjugats mehrere Rezeptoren beteiligt sind.

Um sich dieser Fragestellung zu nähern, wurden von BIESSEN et al. [152] eine Reihe von Cluster-Mannosiden auf Lysinbasis mit 2 bis 6 Man-Resten (Man<sub>n</sub>L<sub>n-1</sub>) synthetisiert und deren Bindungsaffinität gegenüber dem MR durch Verdrängung zweier Liganden (Ribonuclease und rt-PA) untersucht. Die Mannosylierung erfolgte nach Aktivierung von PAP-Man mittels Thiophosgen durch Kopplung am Lysin, woraus sich entsprechend der Stellung der Aminogruppen eine gewisse Spacerfunktion ergibt. Die Potenz zur Ligandenverdrängung an isolierten humanen MR stieg mit jedem weiteren Man-Rest um eine Größenordnung, gegenüber freier Mannose unterschied sich das Dimannosid Man<sub>2</sub>L um mehr als zwei Zehnerpotenzen. Aus der Analyse der Daten wird auf die Beteiligung von nur jeweils einem MR bei der Bindung eines Clustermoleküls geschlossen. Die im Vergleich mit sehr ähnlichen Strukturen anderer Arbeitsgruppen erheblich höhere Affinität (bis zu 3 Zehnerpotenzen) führen die Autoren auf den optimalen Abstand der Man-Reste in den untersuchten Clustern zurück.

In vielen der genannten Arbeiten war zumindest zum Teil eine Rezeptorvermittlung über sehr unterschiedliche Versuche zur Verdrängung der Man-Konjugate nachzuweisen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um HARASHIMA zur Aufnahme Cetylmannosid enthaltender Liposomen (CetMan-MLV) hingegen relativieren die Rolle des MR und lassen auf die Beteiligung weiterer Mechanismen schließen. Dazu gehören Ergebnisse zur erhöhten Leber-Clearance von CetMan-MLV in vivo (Ratte), die einen Rezeptormechanismus nahelegen [153], Ergebnisse ex vivo (perfundierte Rattenleber), die gegenüber dem Rezeptormechanismus vor allem eine Beteiligung komplementvermittelter Oponisierung zeigen [154] sowie Ergebnisse in vitro, die die Komplementaktivierung in humanem Plasma in Abhängigkeit von der Größe der CetMan-MLV belegen [155]. Letzteres wird über den Verlust wässrigen Vesikelinhalts (6-CF) quantifiziert, d.h. über das Ausmaß der Membrandestabilisierung durch Komplementfaktoren, die darüberhinaus mit dem Anteil an Cetylmannosid korreliert. Ob dabei die Destabilisierung durch den Einbau der Cetylmannoside und eine damit erleichterte (weitere) Destabilisierung durch die Plasmakomponenten verursacht ist, oder die Man-Liganden selbst eine Rolle spielen, bleibt offen. Für die Aufnahme der CetMan-MLV in vivo dürften sich daher verschiedene Mechanismen überlagern (vgl. Kap. 2.4.1): Oponisierung durch Komplement, Membrandestabilisierung durch Einbau der Cetylmannoside (Oponisierung an Membranstörstellen), größenspezifische Oponisierung, Rezeptorvermittlung. In der Zusammenfassung der Ergebnisse [rev. in 156] kommt der Oponisierung durch Komplement die hauptsächliche Rolle zu und läßt die Rolle des MR bei der Aufnahme mannosylierter Liposomen in den Hintergrund treten. Allerdings handelt es sich bei den untersuchten Vesikeln um Liposomen ohne sterische Stabilisierung, die einen Angriff von Oponinen zulassen. Die Ergebnisse belegen die Komplexität der Mechanismen in vivo, stellen aber ein MR-vermitteltes Liposomentargeting nicht grundsätzlich in Frage.

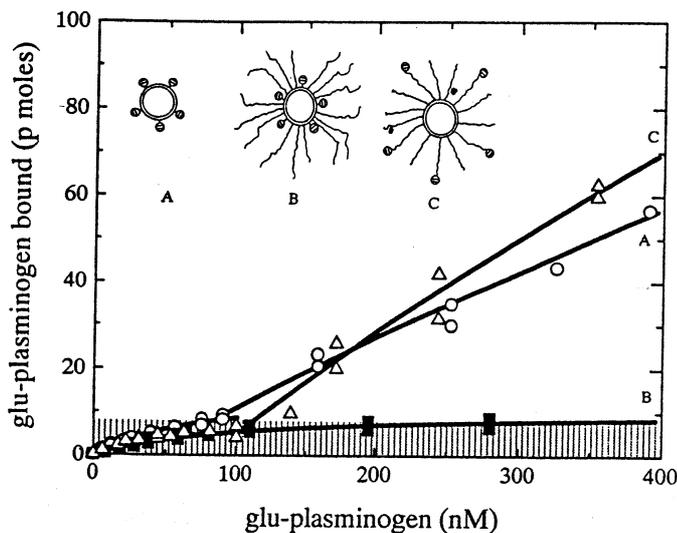
Die vorstehend zitierten Arbeiten ergeben hinsichtlich Ansatz, Methodik und Bewertung ein sehr heterogenes Bild. In-vivo- und in-vitro-Studien, der Beleg eines Rezeptormechanismus sowie die untersuchten Parameter (Konzentration von Markermolekülen, Plasma-Clearance der Targeting-Vehikel oder co-injizierter konkurrierender Liganden, Arzneistoffwirkung, Überlebensrate) sind untereinander kaum vergleichbar. Gleiches gilt für Quelle und Aktivierungsstatus von Zellen in Kultur im Hinblick auf die Regulation des MR. Besonders angesichts der Ergebnisse von HARASHIMA et al. [156] ist die Frage der Anwesenheit von Serum bei Zellstudien in vitro neu zu stellen. Insgesamt ergeben sich trotzdem einige wesentliche Schlußfolgerungen:

1. Ein Abstand zwischen Liganden und Grundstruktur, d.h. die Einführung von Spacern mit geeigneter Flexibilität, kann die Bindung am Rezeptor verbessern.
2. Die Möglichkeit einer Clusterung der KH-Gruppen scheint eine überragende Rolle zu spielen, sofern sie in den Strukturen nicht bereits vorhanden war.
3. Die Beteiligung anderer Mechanismen der Aufnahme durch Makrophagen ist möglich und könnte in vivo zur Maskierung der Rezeptorvermittlung führen.

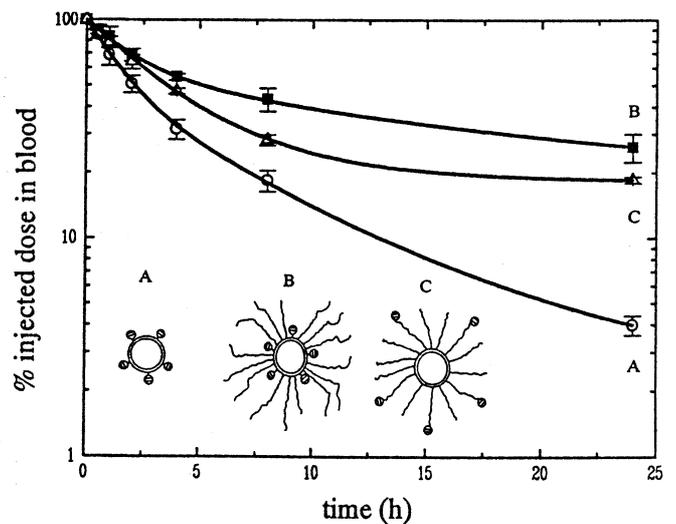
### 2.4.2.3 Liganden und sterische Stabilisierung

Wie erwähnt, zielen neuere Entwicklungen auf die Verbindung von sterischer Stabilisierung und rezeptorvermittelten Mechanismen für ein spezifisches Liposomentargeting ab [157]. Bereits zu Beginn der 90er Jahre nahmen BLUME et al. [158] dazu vergleichende Untersuchungen vor, deren Grundmuster eine Vielzahl weiterer Arbeiten folgten. Der gewählte Ansatz ist in Abb. 5 illustriert.

Ligandenbindung am Modellrezeptor



Serum-Clearance nach i.v.-Injektion (Maus)



**Abb. 5:** Ligandenkopplung an vorgeformte Liposomen: (A) direkt an der Liposomenoberfläche, (B) zusätzliche sterische Stabilisierung (PEG 5000), (C) Kopplung am PEG-Terminus (PEG 3500) [aus 158]

Die Ergebnisse zeigen, daß die freie Zugänglichkeit der Liganden bei konventionellen Liposomen in (erwartungsgemäß) erhöhter Bindung resultiert, die Clearance der Vesikel allerdings ebenfalls sehr schnell erfolgt (Präparation A). Sterische Stabilisierung (PEG 5000) zusätzlich zur Ligandenbindung an der Liposomenoberfläche resultiert in deutlicher Verlängerung der Blutzirkulationszeit, verhindert aber nahezu vollständig die Erkennbarkeit der Determinanten (Präparation B). Bei Einsatz von PEG 5000 (7mol%) ist die

Rezeptorbindung aufgrund der großen sterischen Barriere und direkter Ankopplung der Antikörper-Determinanten an die Liposomenoberfläche stark vermindert. Verbesserte Bindung wird durch Senkung des Anteils an PEG 5000 (auf etwa 4mol%) oder den Einsatz von PEG 2000 erreicht [rev. in 114]. Die Erkennung direkt gekoppelter Determinanten ist neben der Kopplungsdichte auch von der Größe des Moleküls gegenüber den eingesetzten PEG-Ketten abhängig [159]. Bei Kopplung der Liganden an das Ende der PEG-Ketten (PEG 3500) bleiben die verlängerte Zirkulationszeit und Ligandenerkennung weitgehend erhalten (Präparation C).

Da auch für weitere Proteine gezeigt werden konnte, daß bei Ankopplung am PEG-Terminus effiziente Ligandenerkennung unter weitgehendem Erhalt der Stealth-Eigenschaften möglich ist [160], finden in jüngerer Zeit vor allem solche Methoden Anwendung. Allerdings bringt die Präsentation von für die Zielzelle erkennbaren Determinanten trotz sterischer Stabilisierung in gewissem Maße auch die (unerwünschte) Clearance infolge Erkennung durch Zellen des MPS mit sich. Die Ligandendichte darf deshalb ein gewisses Höchstmaß nicht überschreiten. ALLEN et al. nennen 70-80µg Antikörper / µmol PL, über der die Erkennung durch das MPS (Elimination) deutlich ansteigt [161]. HARDING et al. berichten darüber hinaus, daß die Immunogenität liposomal gebundener gegenüber der freier Antikörper erhöht ist [162]. Eine Möglichkeit, immunogene Reaktionen zu verringern, bietet die Verwendung von Antikörperfragmenten. Trotzdem birgt das immunogene Potential solcher Formulierungen eine Problematik, die vielfach noch wenig Beachtung erlangt und einen breiteren Einsatz solcher sog. Immunoliposomen limitieren könnte.

Nicht zuletzt deshalb sind KH-vermittelte Wechselwirkungen von Interesse, da Glykoliganden normalerweise nicht immunogen wirken. Dessenungeachtet kann ihr Einbau in künstliche Membranen (wie Liposomen) in höheren als biologischen Konzentrationen und in Kombination zu immunogenen Reaktionen führen [109]. Gegenüber den vielfach genutzten Protein-Liganden dürfte das immunogene Potential von KH-Strukturen aber vergleichsweise gering sein. Unabhängig von Vorhandensein oder Art targetspezifischer Liganden sind bei wiederholter Gabe von Liposomen immunogene Reaktionen, wie allgemeine Stimulierung der Zellen des MPS, verstärkte Präsenz von Oponinen oder die Bildung spezifischer Antikörper, nicht auszuschließen [114].

Während die Erkennung von Antikörperliganden auch bei geringer Dichte häufig gewährleistet ist [160], stellt beim Einsatz von KH-Liganden die Notwendigkeit der Clusterung, die von der Ligandendichte und der Flexibilität der PEG-Spacer beeinflusst ist, eine gewisse Problematik für den Erhalt von Stealth-Eigenschaften dar. SHIMADA et al. [163] zeigen, daß terminal an PEG gebundene Gal-Reste (5 bis 20mol%) durch den Modellrezeptor RCA<sub>120</sub> erkannt werden, ein Targeting solcher Liposomen über Gal-

bindende Rezeptoren von Hepatozyten hingegen nicht erfolgreich war. Die Blutzirkulationszeit der Vesikel ist deutlich verringert, es erfolgt vorwiegend Clearance durch Kupffer-Zellen. Bei Verlängerung der Spacer (PEG 2000) werden die Gal-Reste trotz hoher Dichte (20mol%) durch RCA<sub>120</sub> nicht erkannt, was die Autoren auf die Verhinderung der Clusterbildung durch die hohe Flexibilität der PEG-Ketten zurückführen.

Für den Targeting-Erfolg von Stealth<sup>®</sup>-Liposomen via KH-Rezeptoren wird es also darauf ankommen, durch Anbindung möglichst weniger Liganden hohe Rezeptorspezifität zu erzielen. Länge und Flexibilität der Spacer scheint dabei eine erhebliche Rolle zuzukommen.

Die Untersuchung einer homologen Reihe von Mannosiden mit schrittweiser Vergrößerung des hydrophilen Spacers soll daher Aussagen über eine Optimierung der Wechselwirkung mit Rezeptoren zulassen. Die Testung der Liposomenaufnahme durch humane Zelllinien und native Makrophagen soll Erkenntnisse über die beteiligten Mechanismen und die Eignung der Mannoside für ein Liposomentargeting liefern. In Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit werden Fragen zur Clusterung, Veränderung der Eigenschaften der Liposomenoberfläche und zur Spezifität der Wechselwirkung mit Zellen diskutiert, die auch für das perspektivische Design sog. Cluster-Lipide von Bedeutung sind.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Substanzen

Nachfolgend sind häufig verwendete Substanzen und deren Herkunft aufgelistet (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis S. 3):

SPC	Lucas-Meyer, Hamburg
Cholesterol	Serva, Heidelberg
HSPC und HEPC	Lipoid KG, Ludwigshafen
DPPC	Sigma Chemie, Deisenhofen
DPPG und DSPG	Sygena Ltd., Liestal, Schweiz
<sup>2000</sup> PEG- und <sup>5000</sup> PEG-DPPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA

Die verwendeten Alkylglykoside wurden analog OGAWA et al. [164] am Institut synthetisiert und ihre Reinheit mittels DC, HPLC und NMR bestimmt [165, 166].

Substanzen, die nur für bestimmte Untersuchungen eingesetzt wurden, sind unter der Beschreibung der Methodik im Text ausgewiesen.

Salze, Puffer und Lösungsmittel waren von analytischer Reinheit.

#### 3.2 Liposomen

##### 3.2.1 Liposomenpräparation / Fluoreszenzmarkierung

###### 3.2.1.1 Wässrige Fluoreszenzmarkierung

Zur Herstellung von 1ml der verschiedenen Präparationen (jeweils 15 oder 30µmol/ml Gesamtlipid) wurden die CHCl<sub>3</sub>-Stammlösungen der entsprechenden Lipide in einen Rundkolben gefüllt, gemischt und zur Bildung eines Lipidfilms am Vakuumrotationsverdampfer bei ca. 35°C getrocknet. Anschließend wurden die Kolben für wenigstens 4h im Exsikkator unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) aufbewahrt. Danach erfolgte die Zugabe von 1ml 0.1M 6-CF-Lösung, die potentiometrisch auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde, und Dispergierung der Lipide mit Hilfe von Glasperlen bei ca. 70°C durch manuelles Schütteln über 10 Minuten. Die Dispersionen wurden anschließend über mind. 16h mechanisch geschüttelt (100 Bewegungen/min) und danach fünfmal durch eine Polycarbonatmembran (Nucleopor, Porengröße 200nm) extrudiert. Zur Abtrennung des nicht eingeschlossenen 6-CF erfolgte Dialyse an Nephrophan-R-Membranen über 4h gegen 0.15M PBS (pH 7.4; Durchfluß 250ml/h). Während der Dialyse der Präparationen wurden die Dialysekammern geschüttelt.

### 3.2.1.2 Lipophile Fluoreszenzmarkierung

Zur Fluoreszenzmarkierung der Liposomenmembran wurde zur Mischung der  $\text{CHCl}_3$ -Stammlösungen der Membranlipide (vgl. Kap. 3.2.1.1) eine 0,5mol% des Gesamtlipids entsprechende Menge ( $\text{CHCl}_3$ -Stammlösung 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) der Fluoreszenzmarker NBD-PE oder Rh-PE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) gegeben. Trocknung des Lipidfilms, Dispergierung und Extrusion erfolgten entsprechend Kap. 3.2.1.1, wobei zur Dispergierung 1ml 0,15M PBS verwendet wurde.

### 3.2.2 Charakterisierung

#### 3.2.2.1 Bestimmung der Einschlußrate

Zur Bestimmung der Einschlußrate wurde 1 $\mu\text{l}$  der dialysierten Vesikeldispersion mit 10ml PBS verdünnt und die Fluoreszenzintensität am Spektrofluorophotometer RF-5001 PC (Shimadzu) bestimmt, wobei lediglich der nicht eingeschlossene, nicht durch Dialyse abgetrennte Anteil des 6-CF ein Fluoreszenzsignal liefert (Selfquenching des 6-CF in Konzentrationen  $>0.01\text{M}$ ). Um die eingeschlossene Menge 6-CF zu erfassen, wurde 1 $\mu\text{l}$  der Vesikeldispersion zu 10ml einer 1%igen Lösung des Detergenz Triton X-100 (Ferak) in PBS gegeben. Infolge der eintretenden Lysis der Vesikel mit nachfolgender Verdünnung des eingeschlossenen 6-CF kommt es zur Fluoreszenz des Farbstoffes. Es wurden jeweils 2 Bestimmungen durchgeführt. Die 6-CF-Konzentration wurde anhand einer Eichkurve berechnet. Aus der Differenz der Konzentrationen der lysierten und intakten Vesikel errechnet sich die Einschlußrate:

$$\frac{C_{\text{Triton}} - C_{\text{Dialyse}}}{0,1 \times V} \times 100\% = E \%$$

- $C_{\text{Triton}}$  - Konzentration 6-CF nach Totallysis
- $C_{\text{Dialyse}}$  - nach Dialyse in PBS bestimmte Konzentration des nicht eingeschlossenen 6-CF
- $V$  - Verdünnungsverhältnis (1 $\mu\text{l}$  + 10ml =  $9,999 \times 10^{-5}$ )
- $E \%$  - Prozentualer Einschluß an 0,1M 6-CF-Lösung (bezogen auf 0,1M 6-CF = 100%)

#### 3.2.2.2 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität der Liposomenpräparationen wurde hinsichtlich 6-CF-Retention unter Bedingungen der Zelltests untersucht. Dazu wurden 40 $\mu\text{l}$  Liposomendispersion (30 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ) mit serumfreiem RPMI 1640, vergleichend dazu in PBS, bei 37°C inkubiert, der Einschluß entsprechend Kap. 3.2.2.1 nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und der Verlust an 6-CF berechnet.

### **3.2.2.3 Partikelgrößenbestimmung**

Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte am Malvern Autosizer II C. In die Küvetten wurden 2ml des zuvor gefilterten PBS (Sterilfilter Sartorius 0,22µm) und 25µl der entsprechenden Vesikelpopulation gegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte im Modus *Massenverteilung*. Die Bestimmung wurde jeweils wiederholt.

### **3.2.2.4 Gehalt Glykolipid**

Der Glykolipidgehalt der Liposomen wurde zu Beginn der Arbeiten für alle Präparationen mehrfach mittels HPTLC bestimmt. Es wurden keine signifikanten Veränderungen nach Extrusion oder Dialyse vom Ausgangsgehalt der Präparationen festgestellt. Deshalb wurde im weiteren auf die routinemäßige Bestimmung verzichtet.

## **3.3 Lektinbindung**

### **3.3.1 Trübungsmessung**

Zur Untersuchung der Lektinbindung mittels Trübungsmessung wurden in UV-Küvetten 1ml Puffer (1l Puffer: HEPES 5,8g, MES 4,88g, NaCl 8,18g, je 1mM CaCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub>), 25µl der jeweiligen Liposomenpräparation (15µmol/ml Gesamtlipid) und 10µl einer ConA-Lösung (25mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH) gegeben, umgeschüttelt und die Aggregation über Trübungsmessung bei 360nm am UV-Spektrometer (Shimadzu UV 120-02) bestimmt. Zur Untersuchung der Reversibilität/Spezifität der Bindung wurden 20µl einer Lösung der Methylglykoside (MeMan, MeGlc, MeGal - jeweils 100mg/ml) verwendet. Die Bestimmung erfolgte an mind. 3 Präparationen der gleichen Zusammensetzung und wurde jeweils wiederholt. Die Liposomenpräparationen für die Lektinbindungsstudien wurden entsprechend Kap. 3.2.1.2, allerdings ohne Fluoreszenzmarkierung, hergestellt.

### **3.3.2 Fluoreszenzmessung**

Zur Untersuchung der Lektinbindung mittels Fluoreszenzmessung wurde 1ml einer Pufferlösung (0,1M NaCl, 20mM HEPES, je 1mM CaCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub>) von FITC-markiertem ConA (20µg/ml, Sigma Chemie Deisenhofen) in Zentrifugenröhrchen gegeben. Es erfolgte eine Probennahme zur Erfassung der Ausgangsfluoreszenz. Anschließend wurden 50µl der jeweiligen Liposomenpräparation (20µmol/ml Gesamtlipid) zugesetzt und 30min bei RT inkubiert. Nach Abtrennung der Liposomen-Lektin-Aggregate mittels Ultrazentrifugation (Sorvall Ultra 80 Ultrazentrifuge, DuPont) bei 100.000g über 1h erfolgte Probennahme aus

dem Überstand. Beide Proben wurden 1:10 mit PBS verdünnt und nach 1h Wartezeit die Fluoreszenzintensität bei 520nm am Spektrofluorophotometer RF-5001 PC (Shimadzu) bestimmt. (Nach der Zentrifugation wiesen die Proben eine höhere Fluoreszenz als vor der Zentrifugation auf, die sich nach 1h Wartezeit auf den tatsächlichen Wert einstellte.) Aus der Differenz von Ausgangsfluoreszenz und Fluoreszenz im Überstand wurde der Anteil an gebundenem ConA berechnet.

### **3.4 Liposomen-Zell-Wechselwirkungen**

#### **3.4.1 Zellmodelle**

##### **3.4.1.1 Zelllinien**

U937-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA) wurden in RPMI 1640 (c.c. pro GmbH, Neustadt/W.), angereichert mit 10% hitzeinaktiviertem FKS (c.c. pro GmbH, Neustadt/W.), die HL60-Zellen (ATCC) in IMDM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), angereichert mit 20% FKS, im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Die Differenzierung in Makrophagenähnliche erfolgte in 12-well-Kulturplatten (5x10<sup>5</sup> Zellen/well) und wurde durch Zugabe von PMA (Calbiochem GmbH, Bad Soden) in einer Endkonzentration im Kulturmedium von 100nM induziert. Die PMA-Inkubation wurde über 48h für U937 und 72h für HL60 vorgenommen, der eine PMA-freie Periode zur Ausdifferenzierung von 48h folgte. Die Vitalität der Zellen wurde über Trypanblau-Ausschluß (Lösung 0,4%, Sigma Chemie, Deisenhofen) geprüft.

##### **3.4.1.2 Native Zellen**

Pericard-Monozyten/Makrophagen wurden aus der frischen Pericardflüssigkeit von Herz-OP-Patienten, Peritonealmakrophagen aus der frischen Dialyseflüssigkeit von Patienten nach Peritonealdialyse gewonnen. Nach Zentrifugation aus dem jeweiligen Medium wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit RPMI 1640 auf etwa 10<sup>6</sup> Zellen/ml verdünnt. Die Inkubation der Zellen entsprechend der nachfolgend beschriebenen Methoden erfolgte in 12x75mm Falcon<sup>®</sup> Polystyren-Teströhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg).

Zur **Differenzierung der Zelltypen** wurden zu 100µl Zellsuspension 5µl der *LeucoGATE*-Antikörperlösung (CD45-FITC und CD14-PhE) des *Simultest™ IMK Plus*-Kit (Becton Dickinson, Heidelberg) gegeben und 15min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde die Probe mit BD-Lyse (Becton Dickinson, Heidelberg) versetzt (10min, RT) und

anschließend 2 x mit PBS bei 6-8°C gewaschen. Abschließend wurden die Proben mit 0,5ml 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert (5min, RT) und mittels Durchflußzytometrie am FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) vermessen.

Zur **Detektion des MR** wurde ein monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG1 (Maus) gegen humane Makrophagen-MR (mAb-MR 15-2; Geschenk D. Rijken, Gaubius Lab., Leiden, Niederlande) verwendet. 50µl Zellsuspension wurden mit 5µl mAb-MR (10µg/ml) 30min bei 4°C inkubiert und zur Beseitigung nicht gebundenen Antikörpers 2 x mit kaltem (4°C) PBS gewaschen. Bei sichtbarem Anteil von Erythrozyten im Zentrifugat wurden die Proben 10min bei RT mit 2ml Erythrozyten-Lyse<sup>1</sup> behandelt. Anschließend wurde mit 50µl (5µg/ml) des sekundären Anti-Maus-IgG (PhE-markiert) über 30min bei 4°C inkubiert, 2 x mit kaltem PBS gewaschen, mit 0,5ml 2% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim) in PBS fixiert (5min, RT) und am FACScan vermessen. Zur Quantifizierung unspezifischer Bindung des Anti-Maus-IgG wurde jeweils eine Probe in gleicher Weise ohne Inkubation mit mAb-MR behandelt. Zur Auswertung wurde der Median der zellassozierten Fluoreszenz 2 (FL2, Bandfilter 585 ±21nm) herangezogen.

Alle Arbeiten zur Fluoreszenzmarkierung wurden am abgedunkelten Arbeitsplatz, die Inkubation in der Dunkelheit vorgenommen.

Die Vitalität der Zellen wurde über Propidiumiodid (Pri)-Ausschluß (Sigma Chemie, Deisenhofen; 0,5mg/ml; 1µl/100µl Zellsuspension) durch Vermessung der FL 2 am FACScan geprüft.

Zur **Blockierung/Verdrängung der Bindung am MR** wurden BSA (Sigma Chemie, Deisenhofen; 50mg/ml in PBS), MeMan und MeGal (100mg/ml in PBS) sowie verschiedene Liposomenpräparationen (3µmol/ml) verwendet, deren jeweilige Dosierung nachfolgend oder in Auswertung der Ergebnisse angegeben ist.

Zur Detektion der Bindung von mannosyliertem, FITC-markiertem BSA (Man-BSA<sub>FITC</sub>, Sigma Chemie, Deisenhofen; 1mg/ml in PBS) wurden jeweils 50µl Zellsuspension mit 200µl PBS verdünnt und mit 10µl MeMan-, MeGal- oder 20µl BSA-Lösung 30min bei RT vorinkubiert; danach erfolgte die Zugabe von 10µl Man-BSA<sub>FITC</sub>-Lösung. Nach Inkubation über weitere 30min bei RT wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit 0,5ml 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert (5min, RT) und am FACScan vermessen. Zur Auswertung

---

<sup>1</sup> Erythrozyten-Lyse:                    8,29 g    NH<sub>4</sub>Cl                    Sigma-Aldrich, Steinheim  
   0,372 g    Chelaplex III                Isocommerz, BT Herzberg  
   1,0 g      KHCO<sub>3</sub>                    Merck, Darmstadt  
   1 l        Wasser  
   eingestellt auf pH 7,2

wurde der Mittelwert der zellassozierten Fluoreszenz 1 (FL1, Bandfilter 530 ±11nm) herangezogen.

In gleicher Weise wurde die Beeinflussung der Bindung des mAb-MR am MR getestet. Nach Vorinkubation mit den o.g. Man-Liganden (30min, RT) wurden die Zellen entsprechend „Detektion des MR“ inkubiert und behandelt.

Zur Quantifizierung rezeptorvermittelter Liposomenaufnahme durch Blockierung des MR wurde in gleicher Weise mit o.g. Verdrängungsagenzien vorinkubiert.

### **3.4.2 Quantifizierung der Liposomenaufnahme**

#### **3.4.2.1 Zelllinien**

##### Durchführung

Zur Inkubation der differenzierten, adhärenen U937- und HL60-Zellen wurden 6-CF-markierte Liposomen verwendet. Vor der Inkubation wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen 2 x mit PBS gespült. Danach wurden je well 20µl Liposomendispersion (30µmol/ml) in 500µl FKS-freiem RPMI 1640 bzw. IMDM appliziert. Nach entsprechender Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Inkubationsmedium entfernt und 3 x mit kaltem (4°C) PBS gespült, um die Phagozytose zu stoppen und nicht aufgenommene Liposomen und freies 6-CF (Liposomenleakage) zu beseitigen. Anschließende Zugabe von 2ml Triton X-100 (1% in PBS) und kuzzeitiges Einfrieren bei -80°C diente der Lyse von Zellen und Liposomen, wodurch mit den Zellen assoziiertes liposomales 6-CF vollständig freigesetzt wurde. Die Fluoreszenz der Zell-Lysate wurde in geeigneter Verdünnung am Spektrofluorometer RF-5001 PC bestimmt.

In gleicher Weise wurde zur Quantifizierung der Liposomenadhärenz eine Kulturplatte bei 4°C (auf Eiswasser / Kühlschrank) behandelt.

PBS zur Spülung und die Liposomendispersion wurden entsprechend Inkubationsbedingungen vortemperiert.

Die Einsaat der Zellen in die Kulturplatte erfolgte jeweils so, daß für jede Liposomenpräparation 1 well ohne Zellen zur Erfassung unspezifischer Adhärenz am Plastmaterial und 2 wells mit Zellen zur Verfügung standen (gesamt 3 wells). Die Auswertung des Einflusses der Glykosylierung erfolgte jeweils nur innerhalb einer Kulturplatte. Deshalb wurden in jeder Kulturplatte neben den glykosylierten (jeweils 3wells) auch nichtglykosylierte Liposomen (3wells) appliziert, die als Vergleichswert dienen. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Tests zur Liposomenaufnahme für jede

Liposomenpräparation mindestens 6 x unter Einsatz einer jeweils frisch hergestellten Liposomencharge durchgeführt.

#### Auswertung

Um vom individuellen Einschlußverhalten der einzelnen Liposomenpräparationen (E %) zu abstrahieren, wurden alle Fluoreszenz-Meßwerte (F) der Lysate auf 1% 6-CF-Einschluß standardisiert:

$$\frac{F_{\text{Lysat}}}{E \%} = F_{\text{stand}}$$

Von der zellassozierten Fluoreszenz (Mittelwert 2 wells) wurde der Meßwert des jeweils zellfreien wells (unspezifische Adsorption am Plast) subtrahiert. Die Liposomenaufnahme ergibt sich dann aus der Differenz von Zellfluoreszenz bei 37°C und 4°C:

$$(F_{37^{\circ}\text{C Zellen}} - F_{37^{\circ}\text{C Plast}}) - (F_{4^{\circ}\text{C Zellen}} - F_{4^{\circ}\text{C Plast}}) = F_{\text{Aufnahme}}$$

#### **3.4.2.2 Native Zellen**

##### Durchführung

Zur Inkubation der nativen Zellen in Suspension wurden NBD-oder Rh-markierte Liposomen verwendet. 100µl Zellsuspension (ca. 10<sup>5</sup> Zellen) wurden mit FKS-freiem RPMI 1640 auf 500µl aufgefüllt, mit 20µl Liposomendispersion (3µmol/ml) bei 37°C inkubiert (Wasserbad) und jeweils 5000-10000 Zellen nach bestimmten Zeiten am FACScan vermessen. Parallel dazu wurden Proben in gleicher Weise bei 4°C (Eiswasser / Kühlschranks) behandelt. Vor Zugabe der Liposomen wurden die Proben entsprechend temperiert. Für jede Liposomenpräparation wurden jeweils 2 parallele Proben (37°, 4°C = 4 Proben) behandelt.

Sofern nicht anders ausgewiesen, wurden die Untersuchungen zur Liposomenaufnahme durch native Zellen an Zellpopulationen von mind. 20 Patienten vorgenommen.

##### Auswertung

Das Setzen von Fenstern in der Vorwärts-(FSC)/Seitwärtsstreuung(SSC) erlaubt die separate Auswertung der einzelnen Zellpopulationen (in der Regel Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten). Als Meßwert wurde der Mittelwert der zellassozierten FL1 für NBD und FL2 für Rh herangezogen, der von der Anzahl der vermessenen Zellen unabhängig ist. Die Liposomenaufnahme durch die Zellen ergibt sich aus der Differenz der zellassozierten Fluoreszenz bei 37°C und 4°C.

### **3.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Die Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie wurden freundlicherweise von Dr. U. Bakowsky (Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle) am Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) im Tapping Mode unter voll hydratisierten Bedingungen (PBS) durchgeführt. Auf die detaillierte Beschreibung soll deshalb hier verzichtet werden.

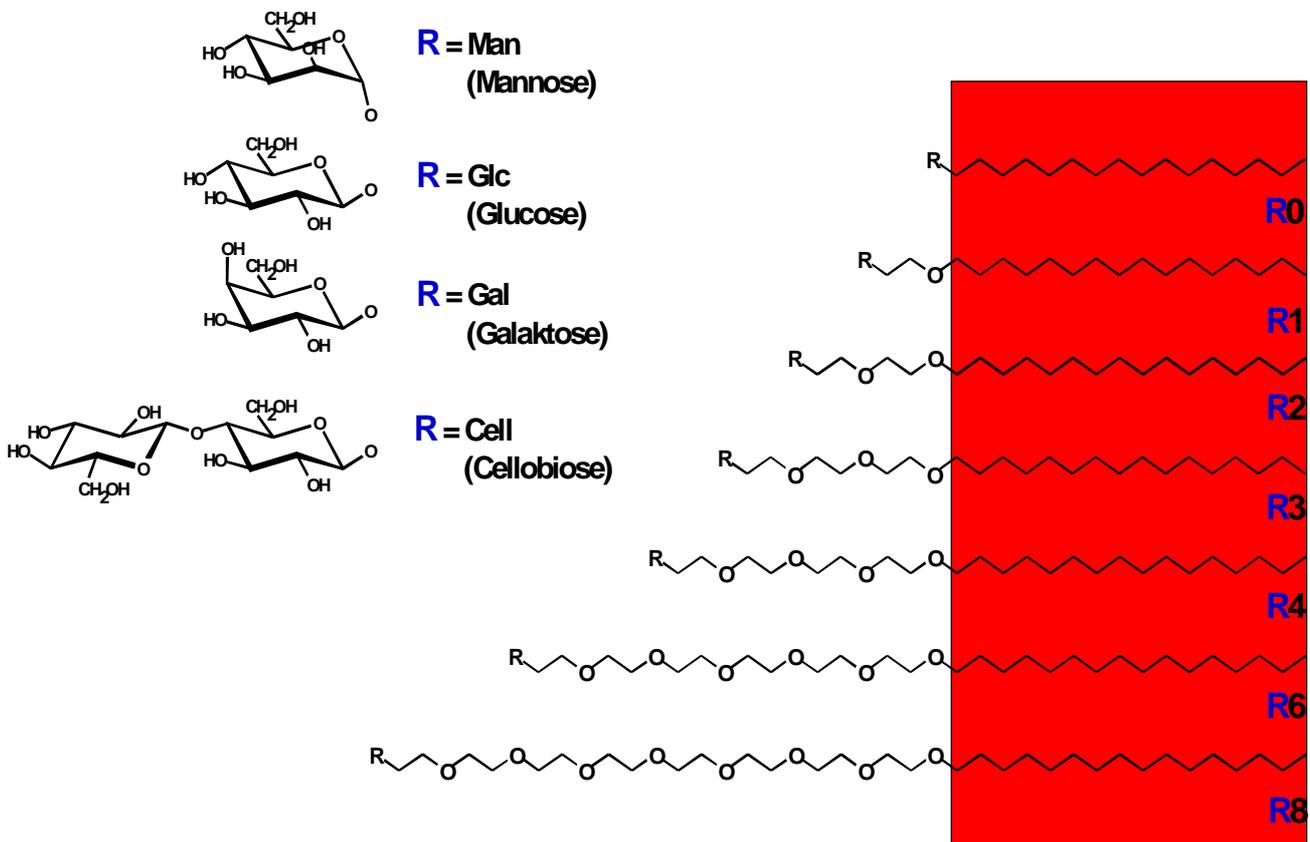
### **3.6 Statistik / Darstellung der Ergebnisse**

Die statistische Prüfung der Ergebnisse erfolgte unter Anwendung des t-Tests. Standardabweichungen, die der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht in den Abbildungen angegeben werden, sind im Anhang aufgelistet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Glykolipide

Entsprechend der Aufgabenstellung der Arbeit sollten durch den Einbau von Mannosiden in die Vesikelmembran ligandentragende Liposomen hergestellt und auf die Beeinflussung der Liposomenaufnahme über Mannoserezeptoren an Makrophagen getestet werden. Dazu wurden in der Arbeitsgruppe Alkylmannoside synthetisiert [165, 166], die im lipophilen Bereich konstant (Hexadecyl-Anker) und im hydrophilen Kopfgruppenbereich durch PEG-Spacer zunehmender Länge zwischen Lipidanker und KH-Ligand im Sinne einer homologen Reihe variieren (Abb. 6)<sup>2</sup>. Die schrittweise Verlängerung des Spacers sollte die Veränderung bzw. Optimierung der Erkennbarkeit der Liganden durch Rezeptoren systematisch untersuchen.



**Abb. 6:** Struktur der eingesetzten Alkylglykoside

<sup>2</sup> Im weiteren Verlauf der Arbeiten kamen auch die entsprechenden Glucoside, Galactoside und Cellobioside zum Einsatz. Die Bezeichnung der Glykolipide erfolgt durch das Kürzel für den Zucker der KG und die Anzahl der EtO-Einheiten des Spacers.

## 4.2 Stabilität der Liposomenpräparation

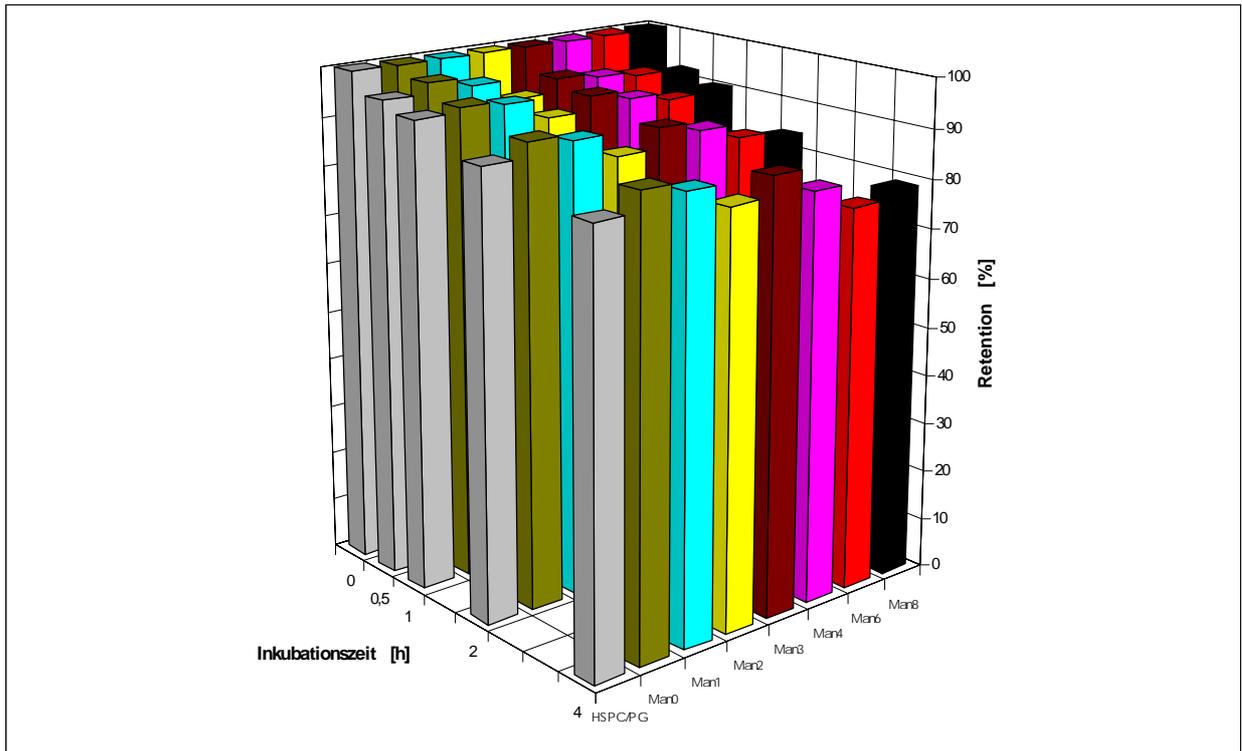
Zur Herstellung glykolipidhaltiger Liposomen mußte zunächst eine geeignete Grundlipidmatrix gefunden werden, die folgenden Ansprüchen genügen sollte:

- hohe Einschlußstabilität
- hohe Größenstabilität
- Eigenschaften der Matrixoberfläche möglichst „inert“.

Ungesättigte Phosphatidylcholine, wie das in der Arbeitsgruppe vielfach verwendete SPC, lassen sich leicht verarbeiten (Vesikelbildung, Extrusion), weisen ausreichende Vesikelgrößenstabilität und gute Mischbarkeit mit Alkylglykosiden auch in höherer Konzentration (bis 50mol%) auf. Die Einschlußstabilität besonders der Glykosid/SPC-Mischsysteme ist, auch nach Inkorporierung von 20mol% Cholesterol (Chol), nicht zufriedenstellend. Vesikel aus gesättigten Lipiden, die eine hohe Einschlußstabilität aufweisen, neigen zur Aggregation und Fusion. Bei Glykosid/DPPC-Mischvesikeln ist z.T. unmittelbar nach der Extrusion eine rapide Zunahme der Vesikelgröße zu verzeichnen. [167] Die Inkorporierung negativer Ladungsträger (PS, PG) zur Stabilisierung der Größe ist in solchen Systemen unumgänglich. Um den potentiellen Einfluß der Ladung auf die Liposomen-Zell-Wechselwirkungen oder die Anordnung der KH-Kopfgruppen so gering als möglich zu halten, wurden verschiedene Mischungen aus gesättigten Lipiden (DPPC, DSPC, HEPC, HSPC) und PG auf ihre Stabilität unter Bedingungen der Zelluntersuchungen (37°C, Kultumedium RPMI 1640) getestet (Daten nicht gezeigt). Im Ergebnis wurde die Mischung aus HSPC und 10mol% PG als geeignete Zusammensetzung der Lipidmatrix für die Zelltestung gewählt.

Ausgehend von der Überlegung, daß für die spezifische Erkennung durch Rezeptoren ein relativ geringer Gehalt an Mannosiden ausreichen sollte, um eine ausreichende Ligandendichte zu gewährleisten, wurde ein Glykolipidgehalt von 10mol% gewählt. Aus einer Überschlagsrechnung, die den Flächenbedarf der Lipide und die Größe der Liposomen einbezieht, ergaben sich für die hier verwendeten Vesikel (entsprechend ihrer Größenverteilung)  $10 - 30 \times 10^3$  Mannose-Liganden / Liposom.

Die Einschlußstabilität dieser Vesikel ist in Abb. 7 gezeigt.



**Abb. 7:** 6-CF-Retention von HSPC/PG 9:1 (M/M) mit einem Mannosidanteil von 10mol% in RPMI 1640 bei 37°C, Standardabweichungen im Anhang

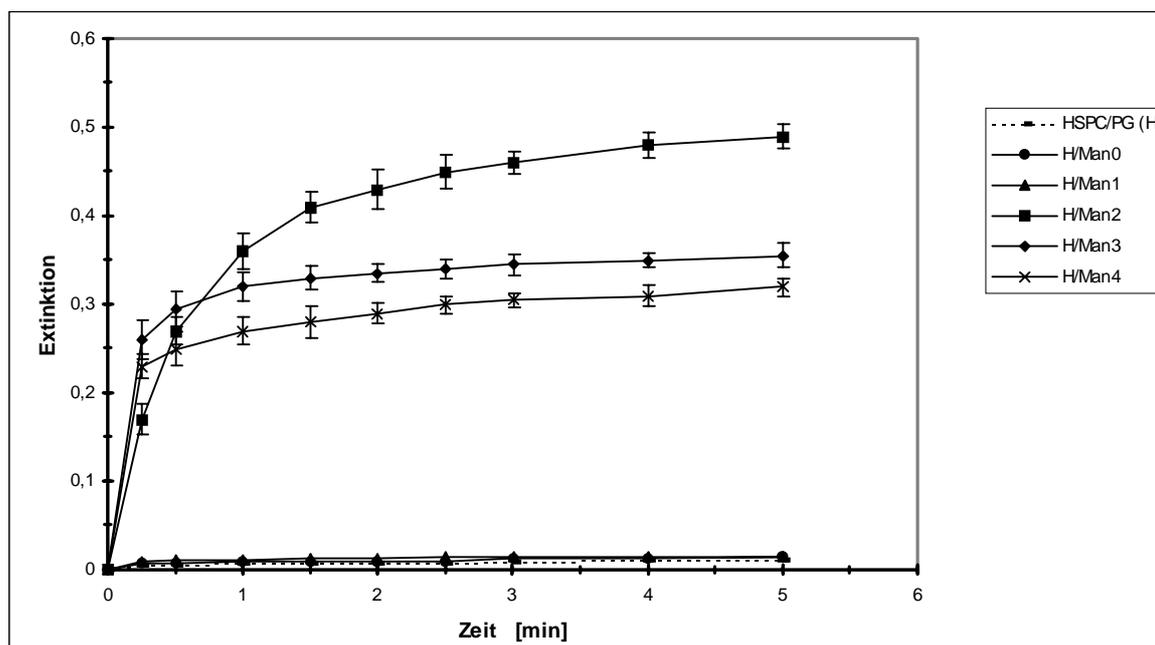
Nach 1h weisen alle Präparationen eine Retention >90% auf, die Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen sind marginal. Selbst nach einer Inkubationszeit von 4h zeigen die Vesikel eine Retentionsrate >75%, weshalb die Einschlußstabilität für die vorgesehenen Zelluntersuchungen (bis auf wenige Ausnahmen max. 1h) als ausreichend angesehen wurde.

Die Größe (mittlere Größe 170-180nm, 95% < 250nm) der Grundlipid- wie auch der Man-Liposomen blieb nach Einführung der negativen Ladung auch unter Inkubationsbedingungen gleichbleibend stabil (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Lektinbindung

Zur Abschätzung der Zugänglichkeit der Man-Liganden für Rezeptorproteine wurden ConA-Bindungsstudien durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß für die Detektion der Lektinbindung mittels Trübungsmessung ein Glykolipidgehalt von ca. 30mol% notwendig ist [167]. Zudem sollten qualitative Aussagen über die Zugänglichkeit der Liganden durch Abstandshaltung via EtO-Spacer erhalten werden, die von der

Konzentration der Mannoside weitgehend unbeeinflusst sein sollten. Für diese Untersuchung der ConA-Bindung wurde daher ein Mannosidgehalt von 30mol% gewählt. Abb. 8 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.



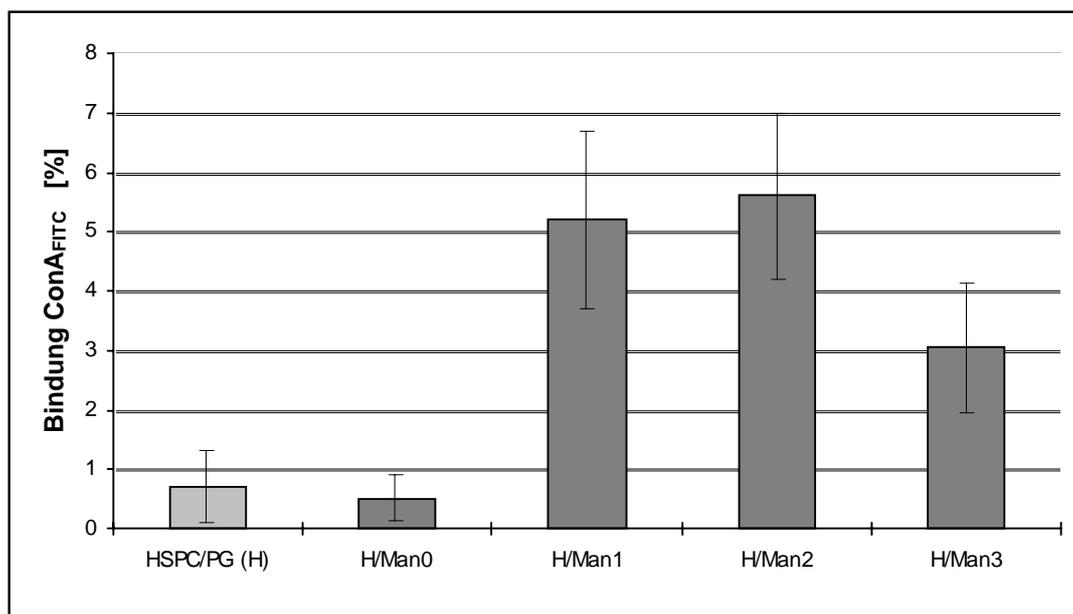
**Abb. 8:** ConA-Bindung an reinen HSPC/PG- und Man-Liposomen (30mol% Man, Trübungsmessung)

Eine unspezifische Bindung gegenüber der Grundlipidmatrix (reine HSPC/PG-Liposomen) erfolgt nicht. Die Aggregation war durch Zusatz freier Mannose innerhalb weniger Sekunden vollständig reversibel (nicht gezeigt). Damit sind die Ergebnisse spezifisch für zugängliche Man-Liganden und zeigen eine Exponiertheit der KH-Kopfgruppen bei einer Spacerlänge  $\geq 2\text{EtO}$ -Einheiten, die die ConA-Bindung ermöglicht. Die Notwendigkeit eines Mindestabstands der KH-Kopfgruppen für die Lektinbindung ist in weiteren Arbeiten belegt [167-170], wobei die Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen für die notwendige Spacerlänge kommen.

Der zeitliche Verlauf der ConA-Bindung zeigt für Man2 die größte absolute Extinktion, die ein Maß für die Größe der gebildeten Aggregate ist. Man3 und Man4 bilden demnach weniger große Aggregate, weisen aber eine höhere Aggregationsgeschwindigkeit auf, die auf die größere Affinität schließen läßt.

Die Testung der ConA-Bindung von Liposomen mit 10mol% Mannosidanteil erfolgte unter Anwendung einer analytisch sensitiveren Methode durch Einsatz von fluoreszenzmarkiertem ConA (ConA<sub>FITC</sub>). Aus Gründen der Substanzverfügbarkeit wurde diese Testung nur an Man0 bis Man3 vorgenommen, womit der Bereich der fraglichen Mindestlänge des Spacers für die Lektinbindung erfaßt ist. Nachteilig an dieser Methode erwies sich die notwendige Abtrennung der Liposomen-Lektin-Aggregate durch

Zentrifugation über 1h, woraus sich sehr lange Inkubationszeiten ergaben. Eine Erfassung des zeitlichen Ablaufs der Lektinbindung war daher nicht möglich. Abb. 9 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.



**Abb. 9:** ConA-Bindung an reinen HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man, Fluoreszenzmessung)

Auch hier ist eine unspezifische Bindung des Lektins an reine HSPC/PG-Liposomen nicht festzustellen. Abweichend von den durch Trübungsmessung erhaltenen Ergebnissen (Abb. 8) wurde auch für Man1-Liposomen eine ConA-Bindung festgestellt, wodurch sich die notwendige minimale Spacerlänge für die Erkennung durch das Lektin auf 1 EtO-Einheit reduziert. Ob dieses Ergebnis auf die Sensitivität der Methode oder die erheblich verlängerte Inkubationszeit zurückzuführen ist, bleibt spekulativ. Die Ergebnisse beider Methoden sind daher nur bedingt vergleichbar.

Man2 bindet die größte Menge an Protein, was in gewisser Übereinstimmung mit der durch Extinktionsmessung festgestellten Bildung von vergleichsweise großen Aggregaten steht. Demzufolge sind an der Man2-ConA-Wechselwirkung eine größere Anzahl Proteinmoleküle (und Liposomen) beteiligt. Die höher affinen Man3-Liposomen binden nur etwa die Hälfte Protein. Demnach wird die „Absättigung“ der Bindung (Ende der Aggregatbildung) durch weniger Proteinmoleküle (und Liposomen) erreicht, was zu kleineren Aggregaten und damit geringeren maximalen Extinktionswerten führt.

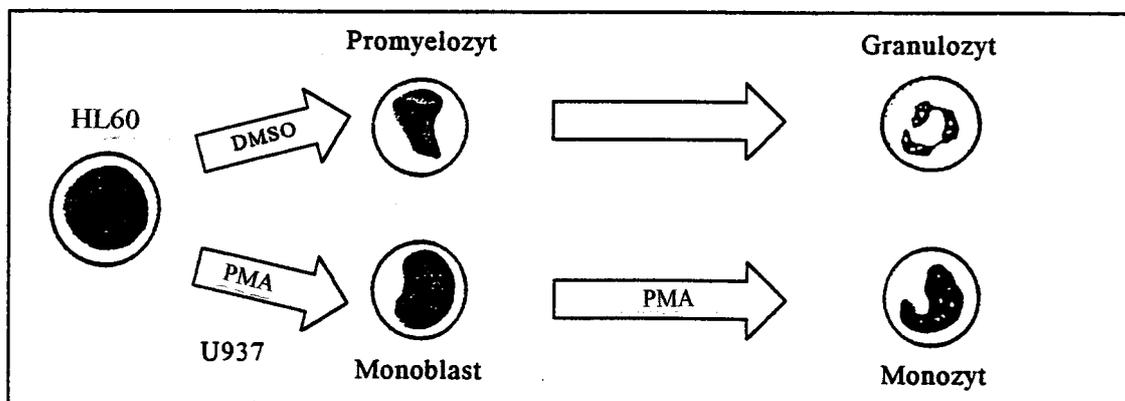
Ungeachtet dieser Unterschiede kann die Fähigkeit zur Lektinbindung und damit Exponiertheit der KH-Kopfgruppen bei Mannosiden mit einer Spacerlänge  $\geq 2$  EtO-Einheiten festgestellt werden, was eine Wechselwirkung mit zellulären MR prinzipiell ermöglicht.

## 4.4 Liposomen-Zell-Wechselwirkungen

### 4.4.1 Zelllinien

#### 4.4.1.1 Makrophagenmodell

HL60, eine promyelozytische Leukämie-Zelllinie, ist entsprechend ihrer frühen Stellung im System hämatopoetischer Zelldifferenzierung in der Lage, unter dem Einfluß verschiedener Substanzen in Granulozytenähnliche (DMSO, Retinolsäure), Monozytenähnliche (Vitamin D<sub>3</sub>) oder Makrophagenähnliche (PMA) zu differenzieren [rev. in 171]. U937, eine promonozytische Zelllinie, differenziert (ebenfalls unter dem Einfluß von PMA und Vitamin D<sub>3</sub>) entsprechend ihrer Stellung im hämatopoetischen System nur auf der monozytären Linie in Makrophagenähnliche (Abb. 10) [172].



**Abb. 10:** Vereinfachte Darstellung möglicher Differenzierungswege von HL60 und U937 entsprechend ihrer Stellung im hämatopoetischen System [verändert aus 172]

Mit der Differenzierung in Makrophagenähnliche sind morphologische Veränderungen, der Verlust der Proliferationsfähigkeit sowie die Ausprägung bestimmter Merkmale nativer Zellen, wie Adhärenz an (Plast)Oberflächen und Fähigkeit zur Phagozytose, verbunden. Bezüglich der Expression von mannosebindenden Proteinen und deren (intrazellulärer oder membranassoziierter) Lokalisation ist die Literatur verwirrend, was hier nicht im Detail diskutiert werden soll. Es besteht jedoch weitgehend Übereinstimmung darin, daß undifferenzierte Zellen beider Linien keine membranständigen MR exprimieren [58, 173-175], während die Expression Man-bindender Proteine unter PMA-Behandlung nur für U937 belegt ist [176]<sup>3</sup>. Daher sollte U937 als rezeptorpositives, HL60 als rezeptornegatives Zellmodell dienen.

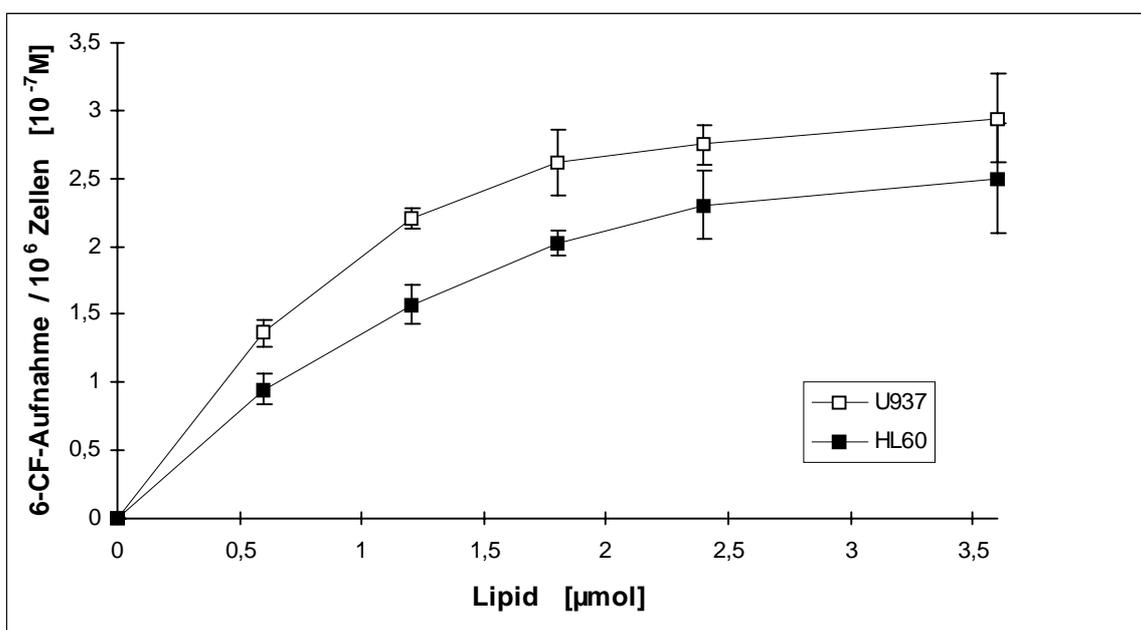
<sup>3</sup> Die Autoren finden 2 mannosebindende Proteine, die allerdings nicht mit dem MR nativer Zellen identisch sind. Die Bestimmung erfolgt aus Zell-Lysaten, weshalb die Lokalisierung dieser Lektine fraglich bleibt. Magnusson und Stendahl [177] weisen die Induktion einer Man-bindenden Aktivität bei U937-Subclones nach, die sie aber z.T. auch bei HL60 finden. Eine Reihe weiterer Arbeiten berührt die Frage der MR-Expression nicht und untersucht die Differenzierung in Makrophagenähnliche anhand Expression anderer Rezeptoren und Zelleigenschaften. Obwohl die MR-Expression als früher Marker der Differenzierung gilt, bleibt deren Nachweis in der vorliegenden Literatur vage und wird in Kap. 4.4.1.4 anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

Die Literaturangaben zur PMA-Konzentration reichen von  $>0,5\text{nM}$  [171] bis  $500\text{nM}$  [178], ROVERA et al. [179] finden die Induktion der Differenzierung im Bereich von  $1,6 - 160\text{nM}$  unabhängig von der PMA-Dosierung. Die Differenzierung beider Zelllinien sowie die Aufnahme reiner HSPC/PG- und ausgewählter Man-Liposomen wurde daher parallel bei Inkubation mit  $5\text{nM}$  und  $100\text{nM}$  getestet. Es wurden keine Unterschiede in der Liposomenaufnahme festgestellt. Da hinsichtlich Adhärenz und Vitalität der Zellen bei Inkubation mit  $100\text{nM}$  PMA stabilere Ergebnisse in der Zellkultivierung erzielt wurden, wurde diese Konzentration für die weitere Testung gewählt.

Die Vitalität der U937- und HL60-Zellen wurde nach Differenzierung mit  $>95\%$  festgestellt.

#### 4.4.1.2 Aufnahme reiner Grundlipidliposomen

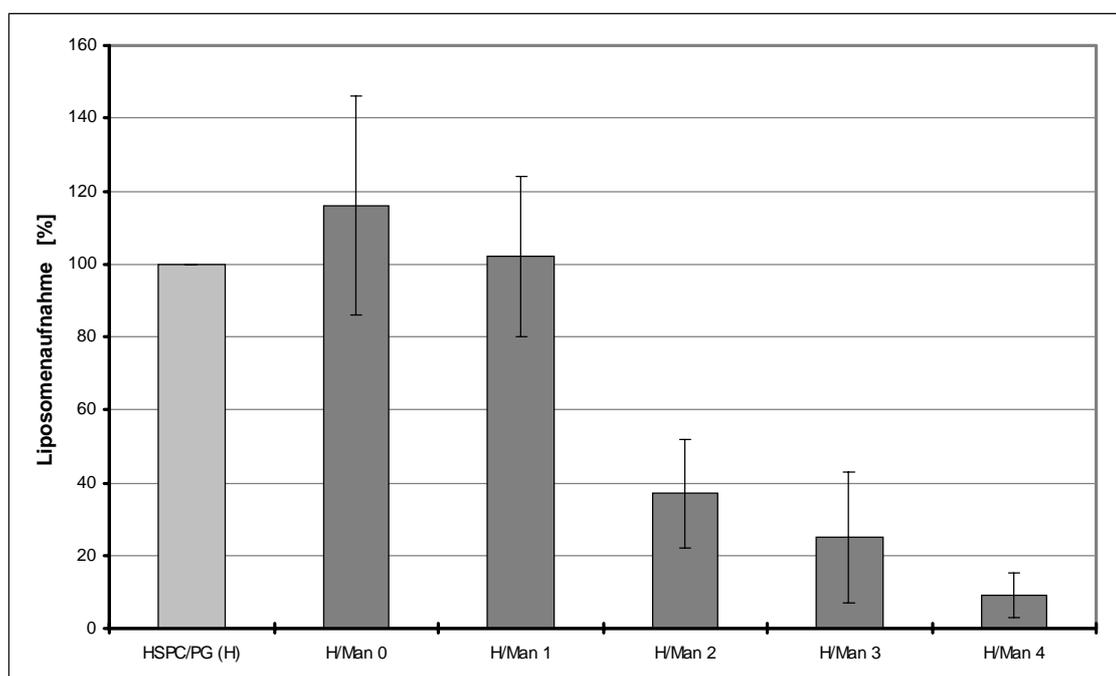
Die Aufnahme reiner HSPC/PG-Vesikel steigt mit der applizierten Menge und zeigt für beide Zelllinien im Bereich von  $1,8-2,4\mu\text{mol Lipid} / 10^6$  Zellen den Beginn der Sättigung (Abb. 11). Um mögliche Unterschiede in der Aufnahme glykosylierter Liposomen nicht durch die Absättigung der Phagozytosekapazität der Zellen zu verhindern, wurde für die weitere Testung eine Liposomenkonzentration von  $1,2\mu\text{mol Lipid} / 10^6$  Zellen gewählt.



**Abb. 11:** Aufnahme reiner HSPC/PG-Vesikel durch differenzierte HL60 und U937 nach 1h in Abhängigkeit von der applizierten Menge (n=4); Freies 6-CF wird nicht von den Zellen aufgenommen; die Fluoreszenz-Meßwerte repräsentieren damit ausschließlich liposomales 6-CF.

#### 4.4.1.3 Aufnahme mannosylierter Liposomen durch HL60-Zellen

Der Einsatz eines rezeptornegativen Zellmodells sollte zunächst den Einfluß der Liposomen-Oberflächenmodifikation durch die Mannoside gegenüber phagozytierenden Zellen ohne die Beteiligung spezifischer Wechselwirkungen abklären. Hierfür kamen die zu diesem Zeitpunkt der Arbeit zur Verfügung stehenden Man0 bis Man4 zum Einsatz. Abb. 12 zeigt die Phagozytose der Man-Liposomen gegenüber unmodifizierten Vesikeln.<sup>4</sup> Gegenüber reinen Grundlipidliposomen ist die Aufnahme solcher, die Man0 oder Man1 enthalten, leicht erhöht, ab Man2 ist mit zunehmender Spacerlänge eine Reduzierung der Aufnahme zu verzeichnen.



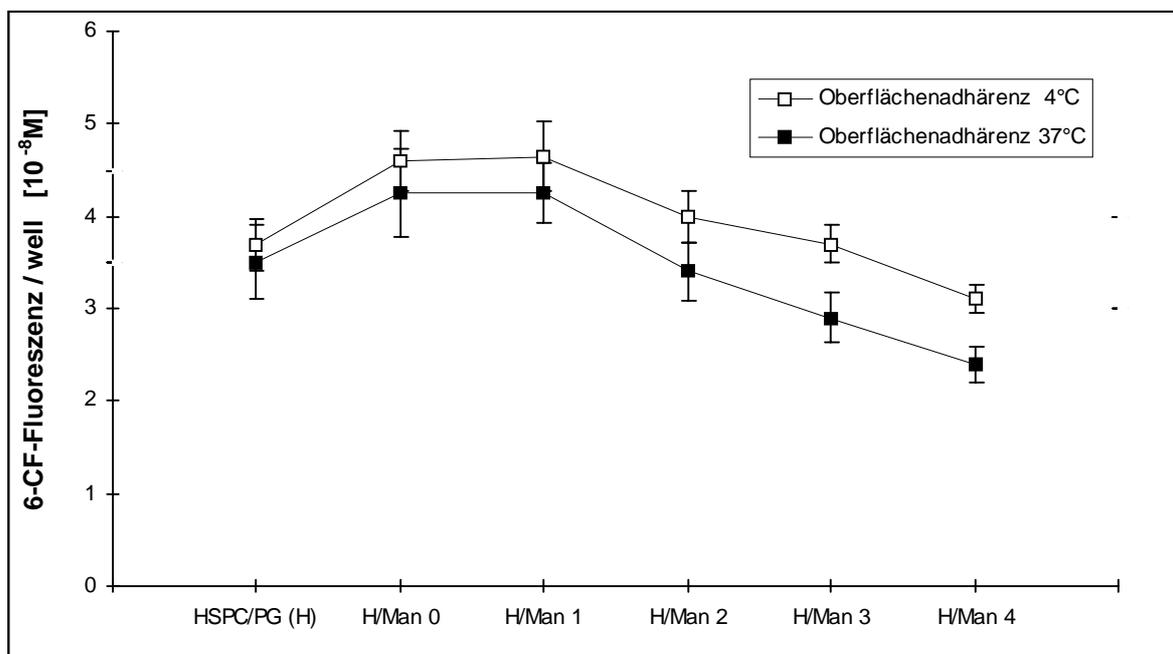
**Abb. 12:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch differenzierte HL60-Zellen nach 1h

Entsprechend dem Versuchsaufbau resultiert die Liposomenaufnahme aus den Meßwerten der zellassoziierten Fluoreszenz bei 37°C und 4°C und der unspezifischen Adhärenz der Liposomen (vgl. Kap. 3.4.2.1). Die Analyse dieser Einzeldaten läßt Aussagen über die Modifizierung der Oberflächeneigenschaften der Vesikel durch die Mannoside zu. Abb. 13 zeigt die Adhärenz der einzelnen Vesikelpopulationen in zellfreien wells bei 37°C und 4°C. Man0 und Man1 bewirken eine verstärkte Adhärenz der Vesikel. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe zeigen eine Rigidisierung der Liposomenmembran durch den Einbau von Glykosiden mit kurzem Spacer [180]. Die damit verbundene Zunahme von Störstellen in der

<sup>4</sup> Alle Untersuchungen zur Liposomenaufnahme wurden parallel bei 37°C (Adhärenz + Phagozytose) und 4°C (nur adhärenzte Liposomen ohne Beteiligung von Phagozytose) durchgeführt. Die angegebenen Werte ergeben sich aus der Differenz der Meßwerte bei 37°C und 4°C (vgl. Kap. 3.4.2.1) und repräsentieren nur den Anteil phagozytierter Liposomen. Um von unterschiedlicher Phagozytoseaktivität der Zellen an verschiedenen Versuchstagen zu abstrahieren, wurde innerhalb der Kulturplatten auf die Aufnahme reiner HSPC/PG-Vesikel (≅100%) bezogen und die Ergebnisse in % Aufnahme dieser unmodifizierten Liposomen dargestellt.

Membran lässt eine Erklärung der verstärkten Adhärenzneigung solcher Vesikel zu. Auch die bei 4°C (nochmals) erhöhte Adhärenz aller Präparationen dürfte auf (temperaturbedingte) Rigidisierung und Zunahme von Membranstörstellen zurückzuführen sein.

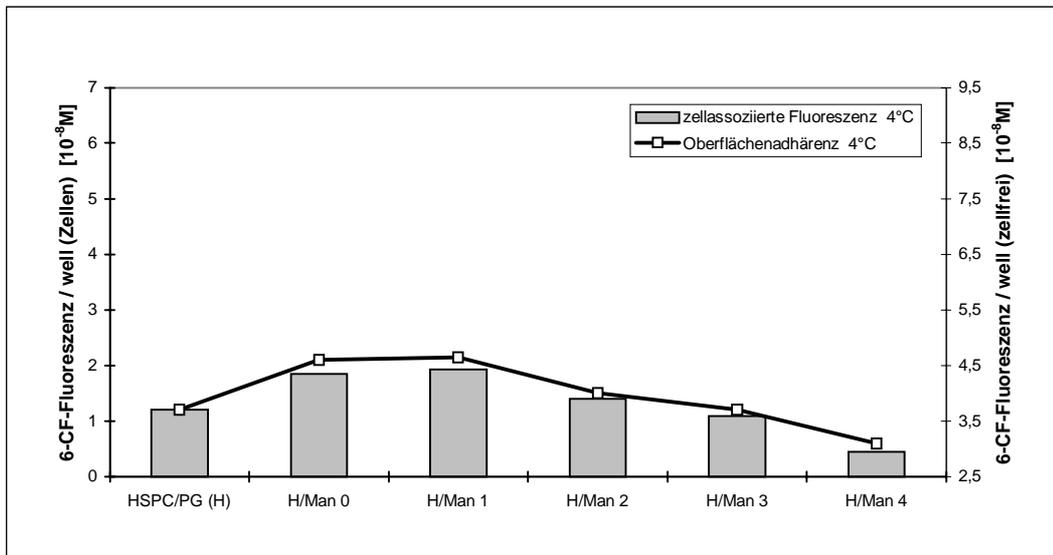
Im Vergleich mit der Aufnahme der Liposomen (Abb. 12) zeigen die Adhärenz-Kurven einen ähnlichen Verlauf (Abb. 13), was auf einen Zusammenhang zwischen Adhärenzverhalten der Vesikel und Phagozytose schließen lässt.



**Abb. 13:** Adhärenz reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) in zellfreien wells bei 4°C und 37°C nach 1h

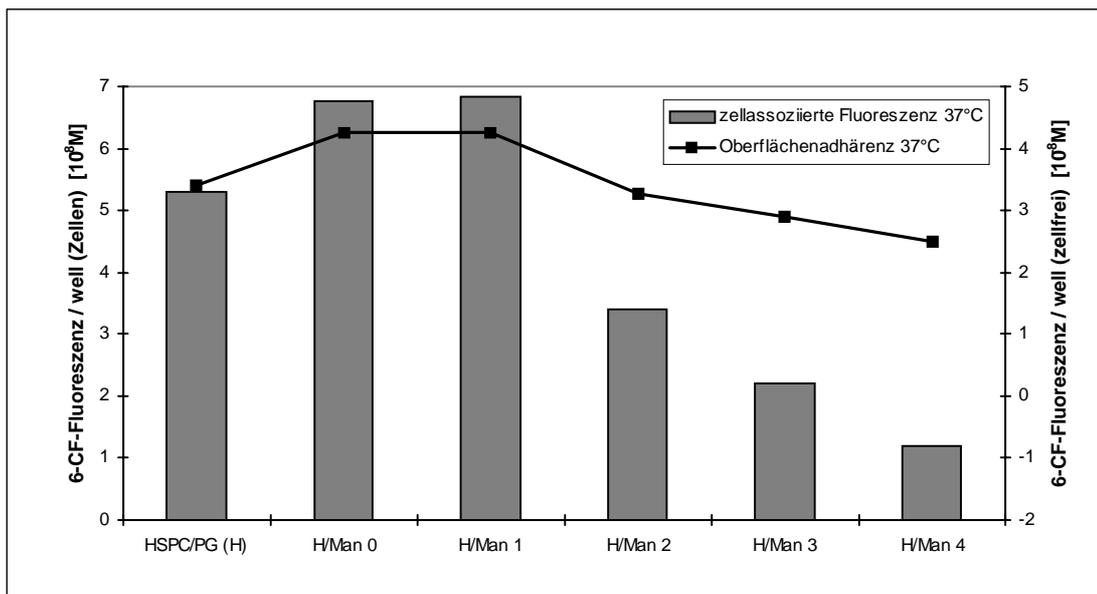
Dieser Zusammenhang wird aus der Gegenüberstellung von zellassoziierter Fluoreszenz<sup>5</sup> und (unspezifischer) Adhärenz der Vesikel bei 4°C und 37°C deutlich. Da bei 4°C keine Phagozytose erfolgt (die Zellfluoreszenz also ausschließlich adhärenente Vesikel repräsentiert), ist die Beeinflussung der beiden Parameter durch die Mannoside nahezu deckungsgleich (Abb. 14).

<sup>5</sup> erfasst keine an der Kulturplatte adhärenente Vesikel, repräsentiert also ausschließlich die mit den Zellen assoziierte Fluoreszenz



**Abb. 14:** Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten der Liposomen und zellosoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 4°C, Standardabweichungen im Anhang

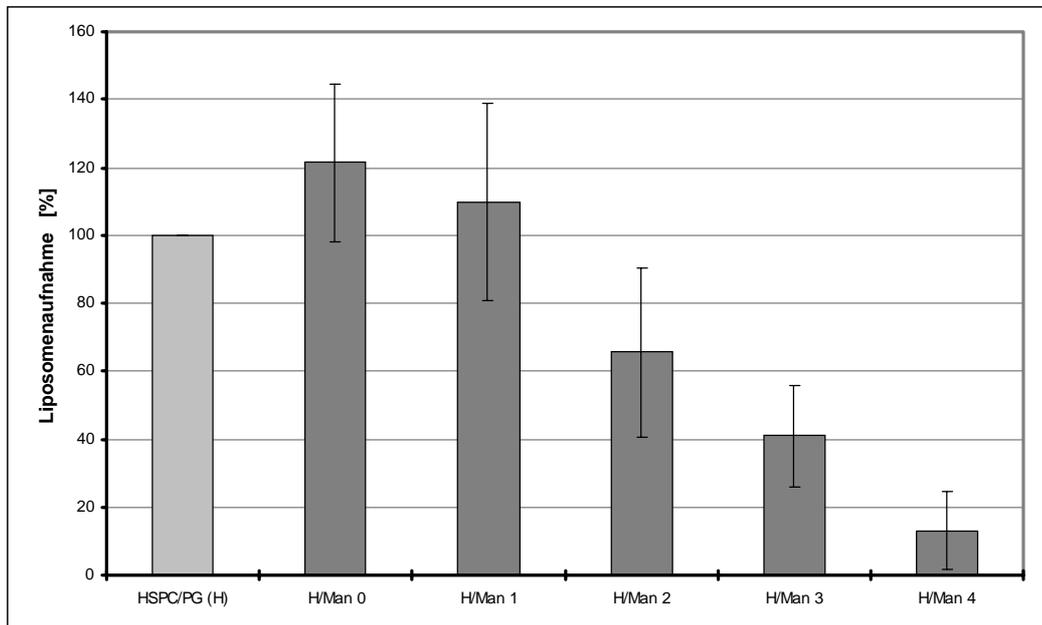
Bei 37°C hingegen weichen die beiden Kurven voneinander ab (Abb. 15). Die stärkere Adhärenz bei Man0 und Man1 spiegelt sich ebenfalls in der Zunahme adhärenter Vesikel und deren (geringfügig) vermehrter Phagozytose (Adhärenz als Voraussetzung der Phagozytose) wider. Die Abnahme der Zellfluoreszenz ab Man2 ist demgegenüber nicht allein auf die veränderte Adhärenz der Vesikel zurückzuführen (deutliche Diskrepanz der Veränderung von Adhärenz und Zellfluoreszenz). Man2, 3 und 4 müssen also über die Veränderung der Adhärenz hinaus zur Reduzierung der Phagozytose beitragen. Dieser Beitrag steigt mit zunehmender Spacerlänge und kann im Sinne einer sterischen Barrierewirkung interpretiert werden.



**Abb. 15:** Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten der Liposomen und zellosoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 37°C, Standardabweichungen im Anhang

#### 4.4.1.4 Aufnahme glykosylierter Liposomen durch U937

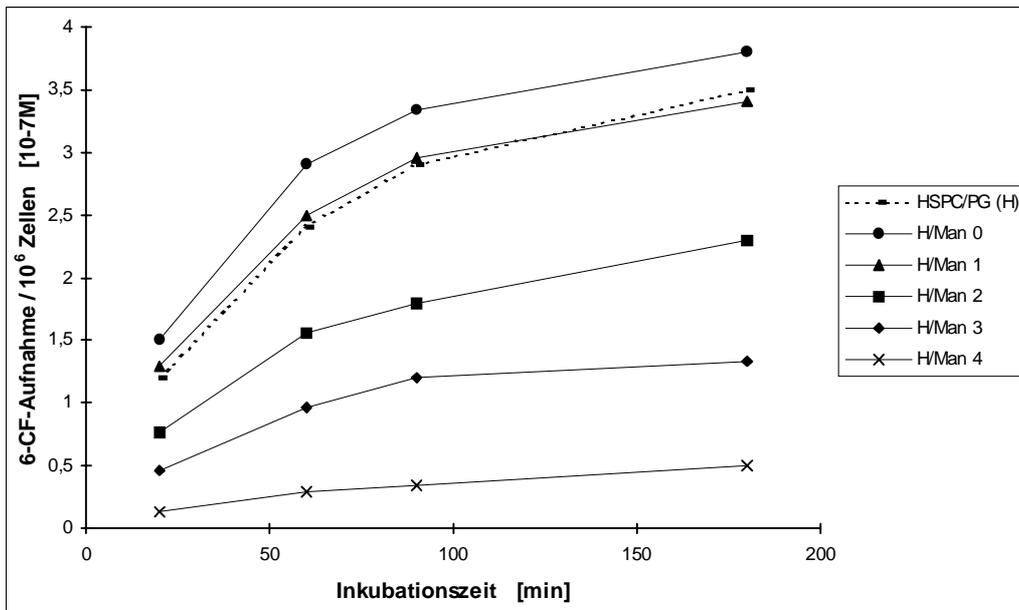
Der Einsatz differenzierter U937 sollte die Aufnahme der Man-Liposomen unter möglicher Beteiligung einer Rezeptorvermittlung untersuchen. Die Ergebnisse zeigen ein zunächst unerwartetes Bild (Abb. 16).



**Abb. 16:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h

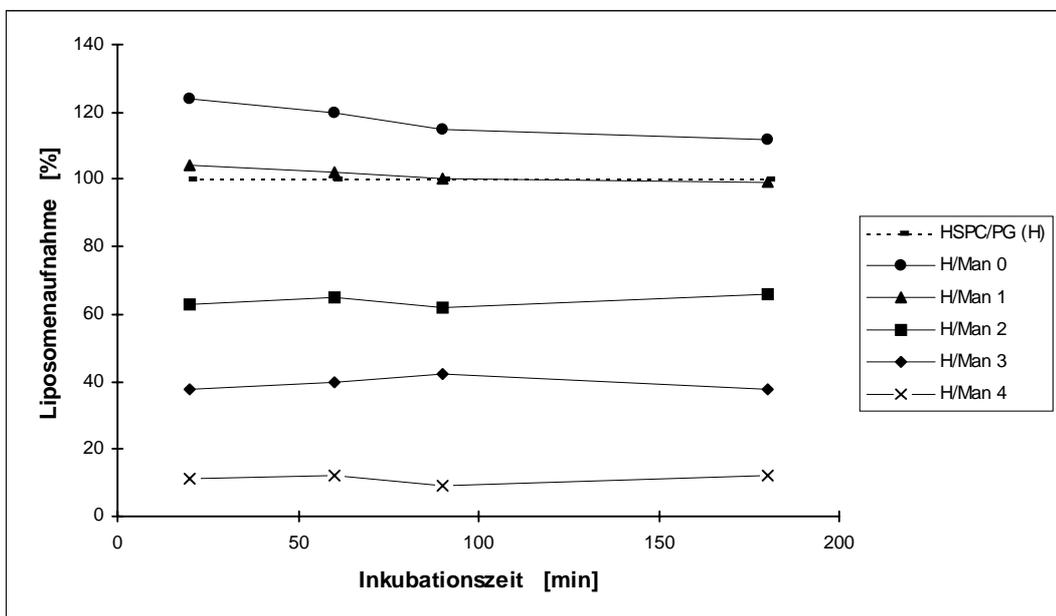
Im Vergleich mit den bei Einsatz von HL60-Zellen erhaltenen Ergebnissen zeigt sich eine ganz ähnliche Tendenz in der Aufnahme der Man-Liposomen. Auch gegenüber den U937-Zellen modifizieren die Liganden die Oberflächeneigenschaften der Liposomen in Abhängigkeit von der Spacerlänge in der beschriebenen Weise. Die Beteiligung einer Rezeptorvermittlung ist nicht erkennbar.

Abb. 17 zeigt den Zeitverlauf eines typischen Experiments. Die Unterschiede in der Aufnahme der einzelnen Präparationen sind nach 20min Inkubationsdauer sichtbar und zeigen keine wesentliche Veränderung über einen Zeitraum von 3h.



**Abb. 17:** Zeitverlauf der Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen durch differenzierte U937-Zellen

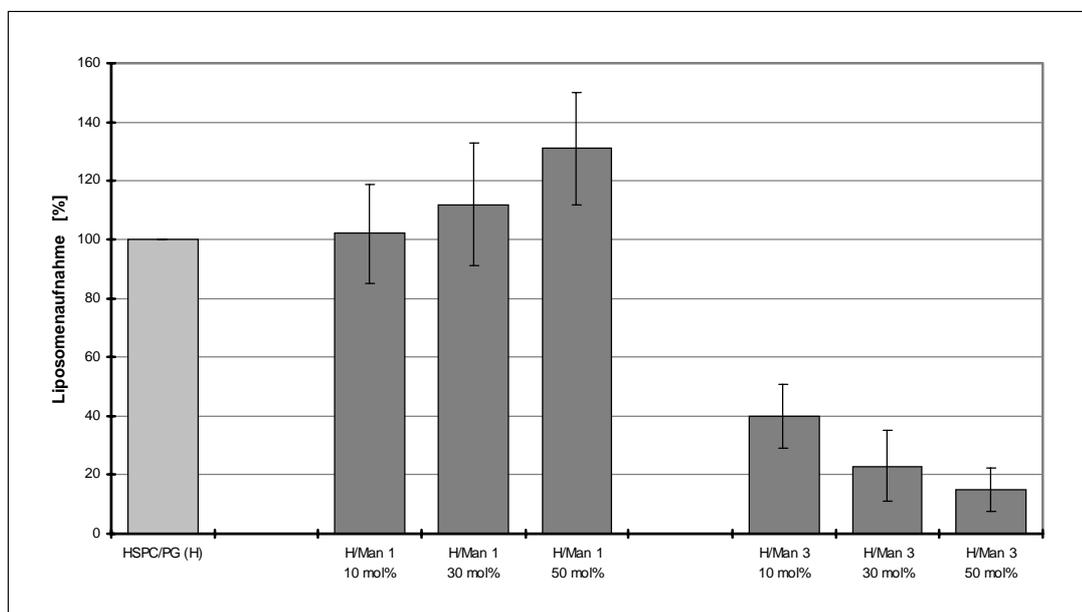
In Abb. 18 sind die prozentualen Änderungen der Aufnahme mehrerer Experimente gegenüber nichtmannosylierten Liposomen zusammengefasst. Die prozentualen Unterschiede bleiben über den gesamten Inkubationszeitraum konstant. Zu keinem Zeitpunkt der Liposomen-Zell-Wechselwirkung ist eine Rezeptorbeteiligung erkennbar.



**Abb. 18:** prozentuale Veränderung der Liposomenaufnahme durch differenzierte U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (n = 4)

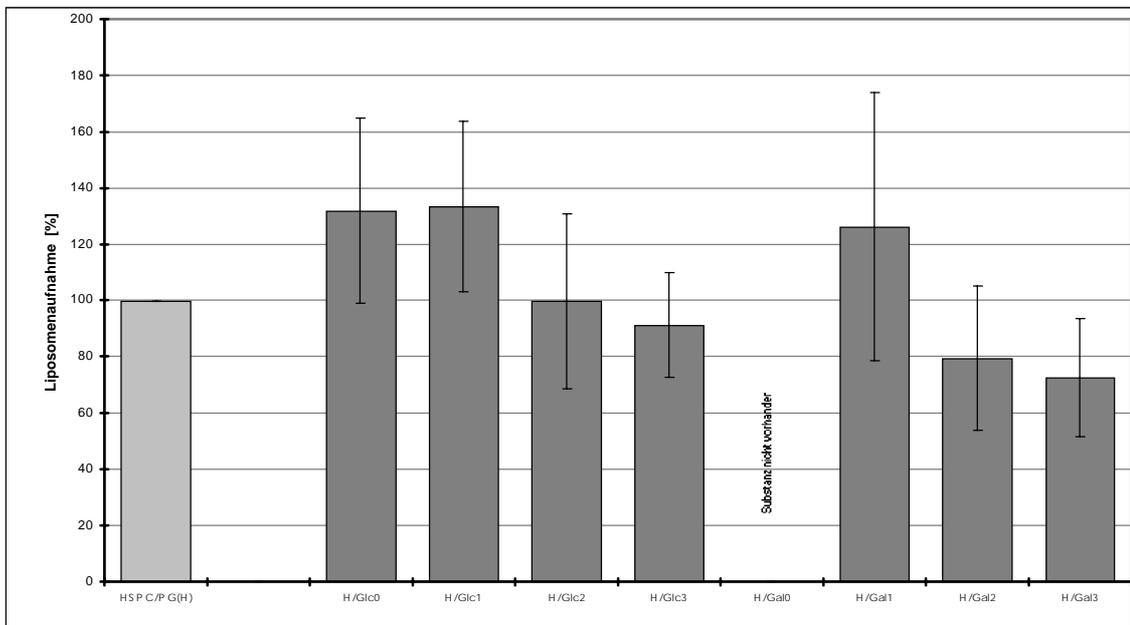
Auch die Steigerung des Man-Gehalts ergab keine qualitativ anderen Ergebnisse. Wie am Beispiel von Man0 und Man3 gezeigt (Abb. 19), führt die Zunahme des Man-Anteils auf 30mol% bzw. 50mol% ausschließlich zur Verstärkung der bereits bekannten Effekte: die

Adhärenzneigung und damit die Phagozytose nehmen bei Einbau eines kurzen Derivats (Man1) zu, die sterische Hinderung durch Einbau eines Derivats mit längerem Spacer (Man3) resultiert in weiter verringerter Aufnahme der Vesikel. Auf die Beteiligung einer Rezeptorvermittlung geben die Ergebnisse keinen Hinweis.



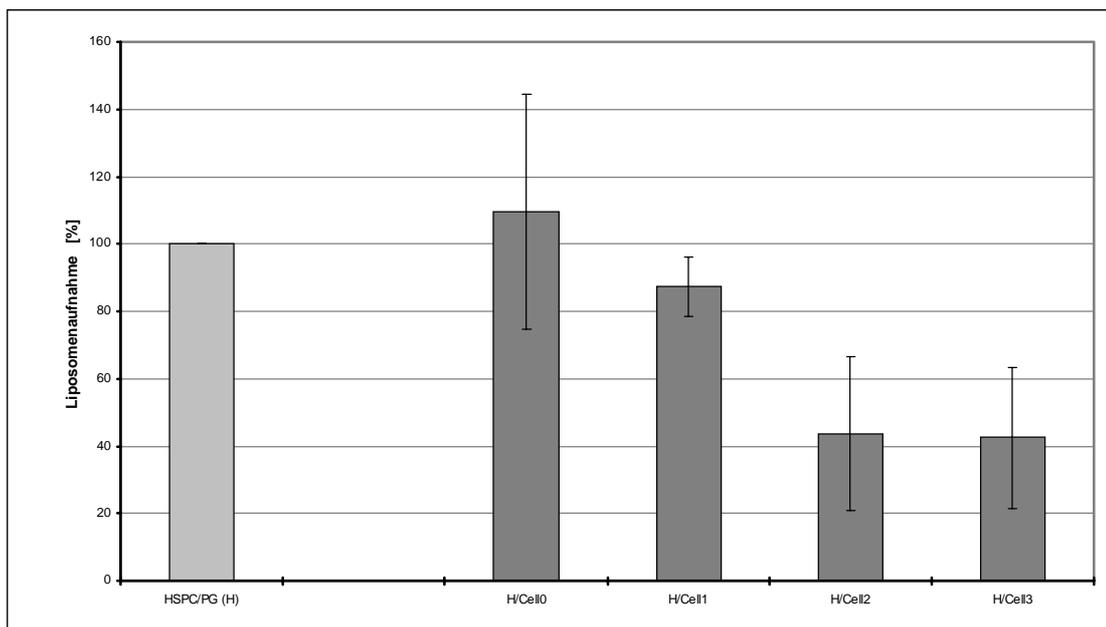
**Abb. 19:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (Man1, Man3) durch differenzierte U937-Zellen in Abhängigkeit vom Man-Gehalt

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen unspezifische Wirkungen der Mannoside auf die Liposomenaufnahme, die von der Zucker-Kopfgruppe unabhängig sein sollten. Die Untersuchungen wurden deshalb in gleicher Weise unter Verwendung strukturgleicher Glucoside (Glc), Galaktoside (Gal) und Cellobioside (Cell) wiederholt. Der Einsatz der sehr ähnlichen monosaccharidischen Glykolipide (Glc, Gal) zeigt eine ähnliche Beeinflussung der Phagozytose mit zunehmender Spacerlänge (Abb. 20), wenngleich alle Ergebnisse zu größeren Werten hin verschoben sind. Insbesondere bei Glc ist die Liposomenaufnahme bei Einbau der kürzeren Derivate deutlich erhöht, eine „Hinderung“ durch die Derivate mit längerem Spacer (Glc2, Glc3) nur noch beim Vergleich der Glucoside untereinander sichtbar. Nach Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe, die eine deutlich schlechtere Mischbarkeit der Glucoside in Phospholipiden zeigen, ist dieses Verhalten auf die größere Adhärenzneigung der Glc-Vesikel zurückzuführen. Die Galaktoside Gal2 und Gal3 bewirken wieder eine Reduzierung der Aufnahme, obwohl sie die Ergebnisse der Mannoside nicht erreichen.



**Abb. 20:** Aufnahme reiner HSPC/PG-, Glc- und Gal-Liposomen (10mol% Glc und Gal) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h

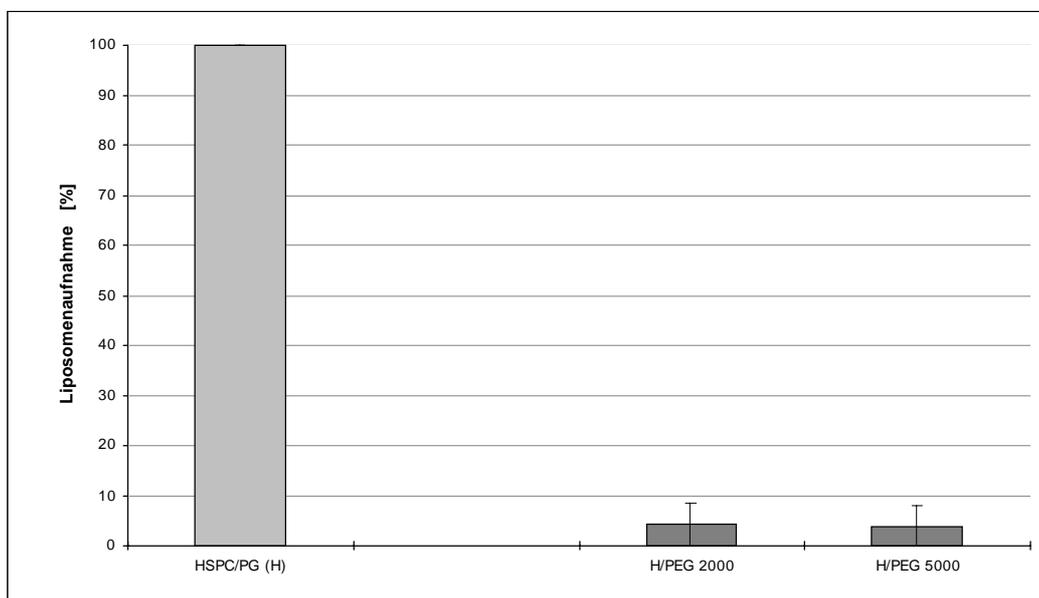
Bei Einsatz der disaccharidischen Cellobioside ist die Aufnahme durch die Zellen weiter verringert (Abb. 21). Im Vergleich mit den monosaccharidischen Glykolipiden macht sich bereits bei Cell1 eine beginnende sterische Hinderung der Aufnahme aufgrund der größeren Kopfgruppe bemerkbar.



**Abb. 21:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Cell-Liposomen (10mol% Cell) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h

Da sich die Beeinflussung der Phagozytose aus einer Überlagerung von Membranstörung (verstärkte Adhärenzneigung) und sterischer Abschirmung ergibt, ist das quantitativ unterschiedliche Verhalten der Glykosidgruppen erklärbar. Trotzdem ist die gleichartige Tendenz der Beeinflussung, d.h. das qualitativ gleichartige Verhalten sichtbar. Bei Überwiegen der Membranstörung durch den Einbau der Glykolipide ist die Phagozytose

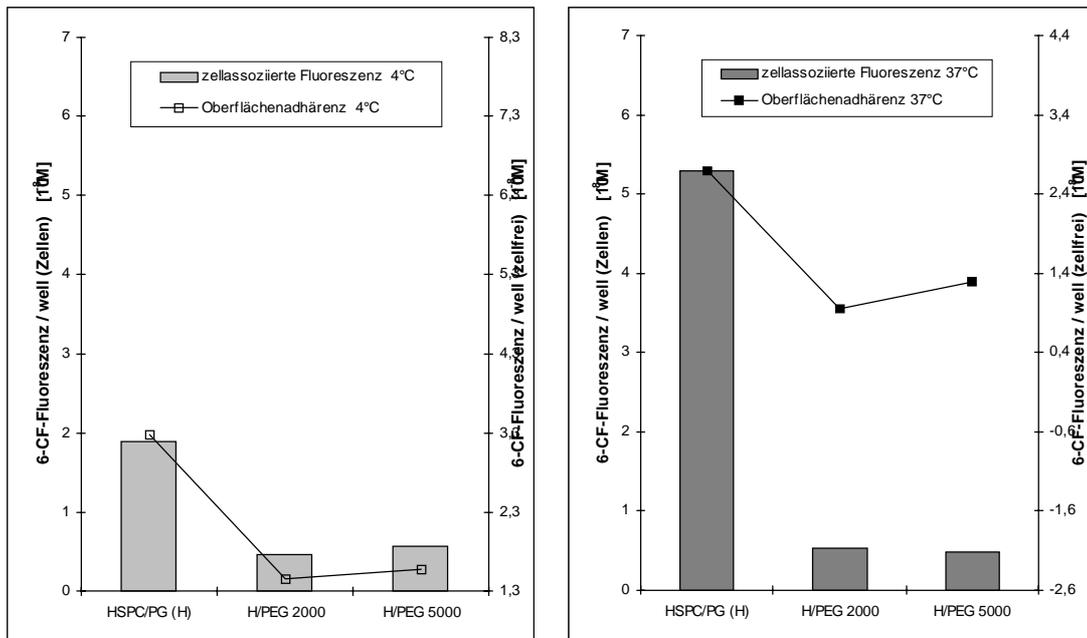
erhöht. Bei Überwiegen der sterischen Hinderung, die jeweils mit Verlängerung des Spacers oder Vergrößerung der Kopfgruppe zunimmt, ist die Aufnahme verringert. Dieser Effekt ist bei den hier eingesetzten Derivaten (Spacer max. 4 EtO-Einheiten) z.T. gering ausgeprägt.



**Abb. 22:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und PEG-Liposomen (10mol% <sup>2000</sup>PEG-PE bzw. <sup>5000</sup>PEG-PE) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h

Als Vergleich wurde die Phagozytose „typischer“ Stealth-Liposomen durch U937-Zellen herangezogen (Abb. 22). Die Aufnahme dieser, durch PEG 2000 (ca. 40 EtO-Einheiten) oder PEG 5000 (ca. 100 EtO) modifizierten Liposomen ist erwartungsgemäß nahezu vollständig unterdrückt.

In Abb. 23 ist wiederum die zellassoziierte Fluoreszenz den Adhärenzeigenschaften der Stealth-Vesikel gegenübergestellt. Auch hier zeigt sich die, bereits bei den Mannosiden erwähnte (vgl. Abb. 14 und Abb. 15), Diskrepanz zwischen Zellfluoreszenz und Adhärenz bei 37°C. Daraus ergibt sich auch für Glykolipide mit längerem Spacer ein Stealth-Potential gegenüber Phagozytoseprozessen, die ohne Beteiligung von Glykorezeptoren ablaufen. Ob dieses Potential der vergleichsweise kurzen Spacer in vivo bei Anwesenheit von Serumproteinen erhalten bleibt, ist fraglich und weiterer Testung vorbehalten.



**Abb. 23:** Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten von Stealth-Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 4°C und 37°C, Standardabweichungen im Anhang

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Liposomenaufnahme durch HL60 (erwartungsgemäß) wie auch durch U937 ohne Beteiligung eines Rezeptormechanismus erfolgt. Auch Versuche zur Bindung bzw. Aufnahme von Man-BSA und dessen Verdrängung durch Methylmannosid (MeMan) oder durch nichtmannosyliertes BSA ließen keine Rezeptorvermittlung erkennen (Daten nicht gezeigt). Deshalb müssen beide Zellmodelle als rezeptornegativ angesehen werden.

Insgesamt zeigt sich gegenüber diesen (rezeptornegativen) Zellen die Tendenz, daß mit zunehmender Spacerlänge der Glykolipide und zunehmender Modifizierung der Liposomenoberfläche durch KH-Gruppen (Gehalt an Mannosid) eine Reduktion von Phagozytoseprozessen eintritt. Im Vergleich mit „klassischen“ Stealth-Lipiden ist diese Unterdrückung relativ schwach, dürfte sich aber mit zunehmender Länge der Spacer verstärken.

Da die Unterdrückung der Liposomenaufnahme durch Phagozyten nicht eigentliche Aufgabenstellung der Arbeit war, wurden die Untersuchungen in dieser Richtung nicht fortgesetzt.

#### 4.4.2 Native Zellen

Zur Erlangung von Testergebnissen an einem rezeptorpositiven Zellmodell, wurden die Untersuchungen an nativen Zellen weitergeführt. Dazu wurden Monozyten/Makrophagen aus der Pericardflüssigkeit von Herz-OP-Patienten (Herzpunktat-Monozyten/Makrophagen, HPM) und Makrophagen aus der Dialyseflüssigkeit von Patienten nach Peritonealdialyse (Peritonealmakrophagen, PTM) eingesetzt.

Die Messung der nativen Zellen mittels Durchflußzytometrie (FACScan) erforderte die Fluoreszenzmarkierung der Liposomenmembran, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch freigesetzten wässrigen Fluoreszenzmarker zu vermeiden. Dazu wurden NBD-PE bzw. Rh-PE verwendet.

##### 4.4.2.1 Zelltypcharakterisierung

In Abb. 24 ist die Charakterisierung am FACScan an einem typischen Beispiel für Zellen aus Pericardflüssigkeit dargestellt. Die in der FSC/SSC-Auftragung (A) zu unterscheidenden Zellpopulationen sind mit einiger Näherung leicht zuzuordnen, da in gewissem Maße die Vorwärtsstreuung (FSC) mit der Größe, die Seitwärtsstreuung (SSC) mit der Granularität der Zellen korreliert. In der Region R1 befinden sich die Leukozyten, in R2 die Monozyten, ausdifferenzierte, große Makrophagen vor allem in R3.

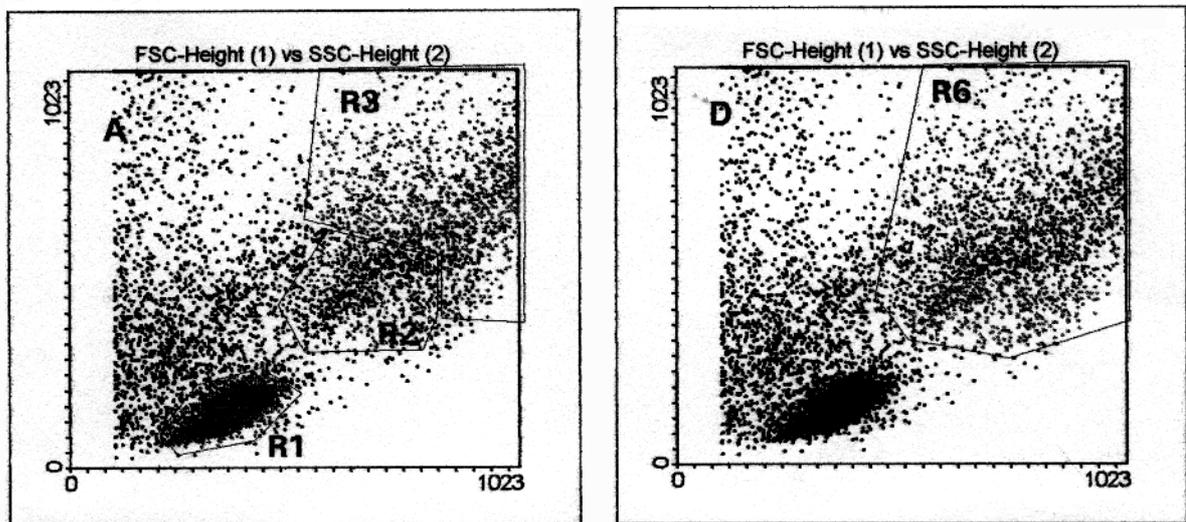
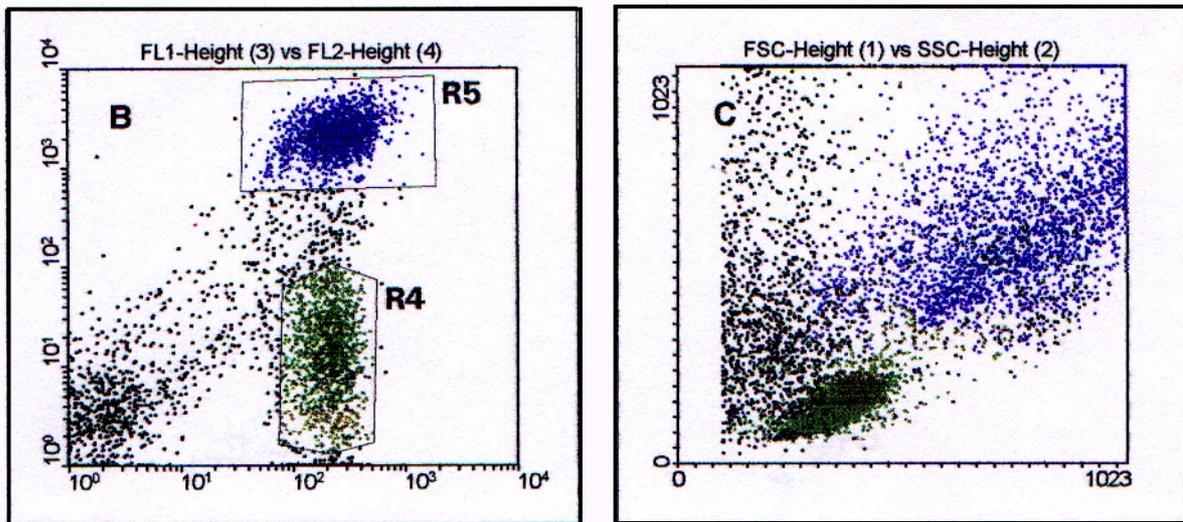


Abb. 24 a: Zelltypcharakterisierung am FACScan bei Pericard-Zellen



**Abb. 24 b:** Zelltypcharakterisierung am FACScan bei Pericard-Zellen

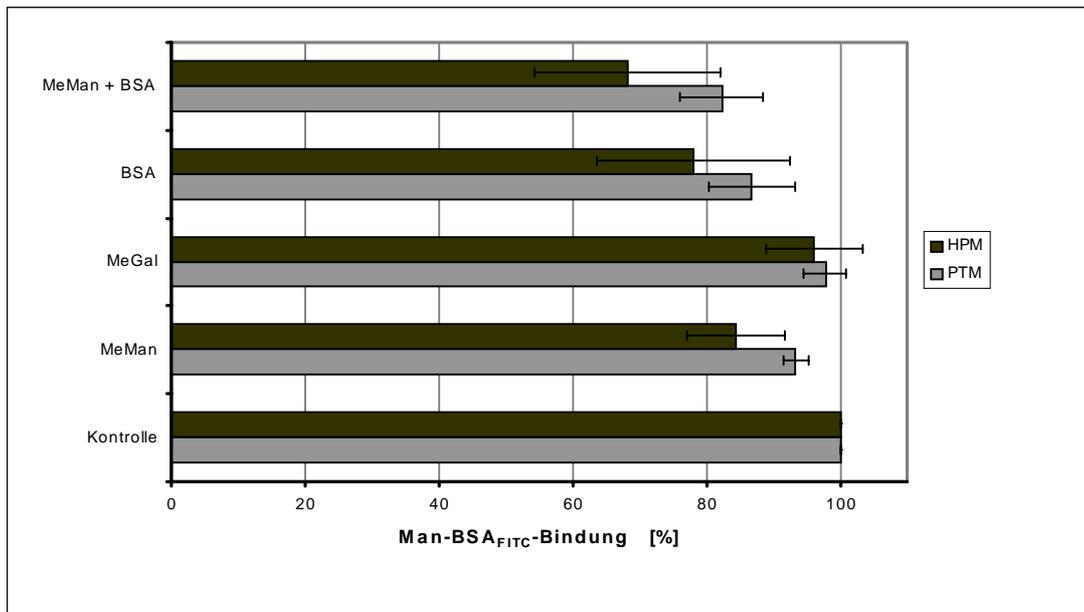
Durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper (CD45-FITC und CD14-PhE) an Zelloberflächenantigene erfolgt die spezifische Zelltypcharakterisierung in der FL1/FL2-Auftragung (Abb. 24 b, B). Die CD45-positiven Leukozyten (grün) erscheinen durch starke Fluoreszenz1 in R4, die CD45- und CD14-positiven Monozyten/Makrophagen (blau) durch starke FL1 und FL2 in R5. Die korrespondierende Darstellung im FSC/SSC (C) ist in farblich adäquater Markierung gegenübergestellt und bestätigt im wesentlichen die o.g. Zuordnung im FSC/SSC (vgl. Abb. 24 a, A).

Makrophagen und Monozyten verschiedenen Differenzierungsgrades bilden keine abgrenzbaren Zellpopulationen, weshalb die Auswertung an der Gesamtheit der Zellen in R6 vorgenommen wurde (Abb. 24 a, D).

#### 4.4.2.2 Detektion des Mannoserezeptors

Zur Analytik eines zellulären Membranproteins kommen prinzipiell die Detektion über seine Funktion oder die Bindung monoklonaler Antikörper zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Bindungs- und Verdrängungsstudien vorgenommen, von denen hier nur einige vorgestellt und diskutiert werden sollen.

Da erst zu einem späten Zeitpunkt der Untersuchungen ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung stand, mußte sich der Nachweis eines MR zunächst auf die Prüfung des Vorhandenseins der Funktion, d.h. der Bindung von Man-Liganden, beschränken. Dazu wurde fluoreszenzmarkiertes Man-BSA (Man-BSA<sub>FITC</sub>) verwendet und dessen Verdrängung durch verschiedene Substanzen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt.



**Abb. 25:** Inhibierung der Bindung von Man-BSA<sub>FITC</sub> (Endkonzentration 50 µg/ml) durch Methylglykoside (5 mg/ml) und BSA (5 mg/ml) bei HPM (n=5) und PTM (n=6)

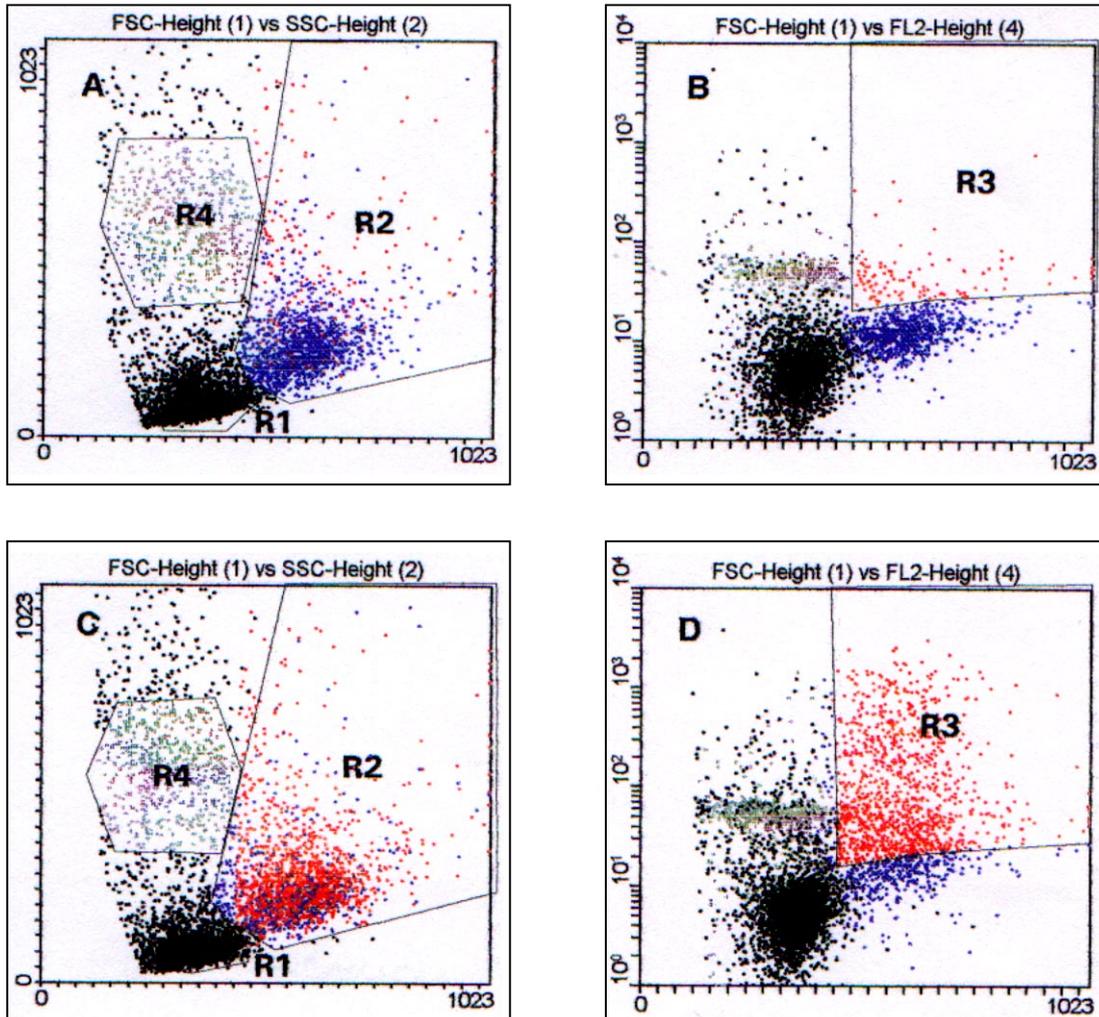
Wie in Kap. 2.4.2.2 erwähnt, ist die Verdrängung durch Liganden geringerer Komplexität häufig problematisch und gelingt nicht oder nur unvollständig. Die vorliegenden Ergebnisse spiegeln diese Problematik wider. Der Einfluß des MeMan ist gegenüber MeGal zwar erkennbar, aber äußerst gering<sup>6</sup>. Zieht man in Betracht, daß es sich um einen 2000fachen (!) Überschuß der Mannosid-Liganden (molares Verhältnis) handelt, ist die Hemmung durch nichtmannosyliertes BSA (100facher Überschuß) vergleichsweise stark ausgeprägt. Dementsprechend deutlicher erniedrigt ist die Bindung durch Vorinkubation mit BSA *und* MeMan, was die Beteiligung sowohl spezifischer als auch unspezifischer Prozesse zeigt. Ob der spezifische Anteil über Vermittlung der Man-Liganden tatsächlich so gering oder der sehr unterschiedlichen „Komplexität“ und damit Affinität der Liganden zuzuschreiben ist, muß offen bleiben. Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt ähnliche Resultate. JANSEN et al. [139] konnten bei der Inhibierung der Bindung unterschiedlich mannosylierten HSA ex vivo (perfundierte Rattenleber) eine Abhängigkeit bei der Rezeptorverdrängung von der Komplexität der Mannoseliganden feststellen. Höher mannosylierte Derivate (22 bzw. 40 Man-Reste) wurden selbst durch einen 500fachen Überschuß von Mannan nicht vollständig verdrängt (ca. 40% Verdrängung für Man<sub>22</sub>-HSA, 10% für Man<sub>40</sub>-HSA). Die Autoren belegen mindestens einen weiteren, an der Aufnahme beteiligten Mechanismus, der mit der Anzahl negativer Ladungen der Man-HSA-Moleküle korreliert und durch negativ geladene Substrate (z.B. Dextransulfat) hemmbar ist.

<sup>6</sup> Die geeignete Konzentration der Verdrängungsagenzien wurde in Vorversuchen ermittelt. Unterhalb dieser Konzentrationen war keine reproduzierbare Verdrängung des Man-BSA<sub>FITC</sub> detektierbar. Die weitere Steigerung des Überschusses von Man-Liganden (bis zum 20.000fachen) erbrachte eine weitere Senkung der Man-BSA<sub>FITC</sub>-Bindung, die jedoch nicht mehr spezifisch war und ebenso durch gleiche Konzentrationen MeGlc und z.T. auch MeGal erreicht wurde. Der im Text jeweils genannte Überschuß ist für KH-haltige Verdrängungsagenzien auf den Gehalt an KH berechnet und repräsentiert das molare Verhältnis der KH.

Die hier beobachtete relativ geringe Potenz zur spezifischen Verdrängung der Man-BSA<sub>FITC</sub>-Bindung kann damit durch die fehlende Komplexität des MeMan bedingt sein. Die relativ große Verdrängungspotenz des (unmannosylierten) BSA bestätigt KH-unabhängige Prozesse. Dessenungeachtet zeigen die vorliegenden Ergebnisse die Beteiligung einer Rezeptorvermittlung und damit die Anwesenheit von MR bei den untersuchten Zellen, lassen allerdings keine Aussagen über deren Ausmaß zu.

Die Ergebnisse von Studien zur Bindung und Verdrängung an Lektinen zellulärer Membranen sind daher entsprechend vorsichtig zu interpretieren und repräsentieren häufig eine Überlagerung von spezifischen und unspezifischen Mechanismen. Letztere können bei Einsatz komplexerer Liganden (wie Man-BSA) von erheblichem Ausmaß sein.

Wie erwähnt, stand zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit ein monoklonaler Antikörper (mAb-MR), spezifisch für den humanen 175-kD-MR [181], zur Verfügung. Die Detektion erfolgte durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers. Unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an HPM und PTM trat nur in Ausnahmefällen auf und wurde jeweils geprüft (Leerwert). Bindung des mAb-MR an Blutmonozyten, Leukozyten oder Granulozyten war nicht festzustellen. Die Fluoreszenzmeßwerte sind somit MR-spezifisch. In Vorversuchen brachte die Anwendung höherer Antikörperkonzentrationen als die angegebene (Kap. 3.4.1.2) keine Steigerung der Fluoreszenzausbeute, was auf die quantitative Erfassung der exprimierten MR schließen läßt. Für HPM wurden zwischen 30% und 57% (n=8), für PTM zwischen 15% und 52% (n=28) der Monozyten/Makrophagen-Population als rezeptorpositiv (MR $\oplus$ ) bestimmt. Abb. 26 illustriert die MR-Detektion an einer typischen Peritoneal-Zellpopulation.

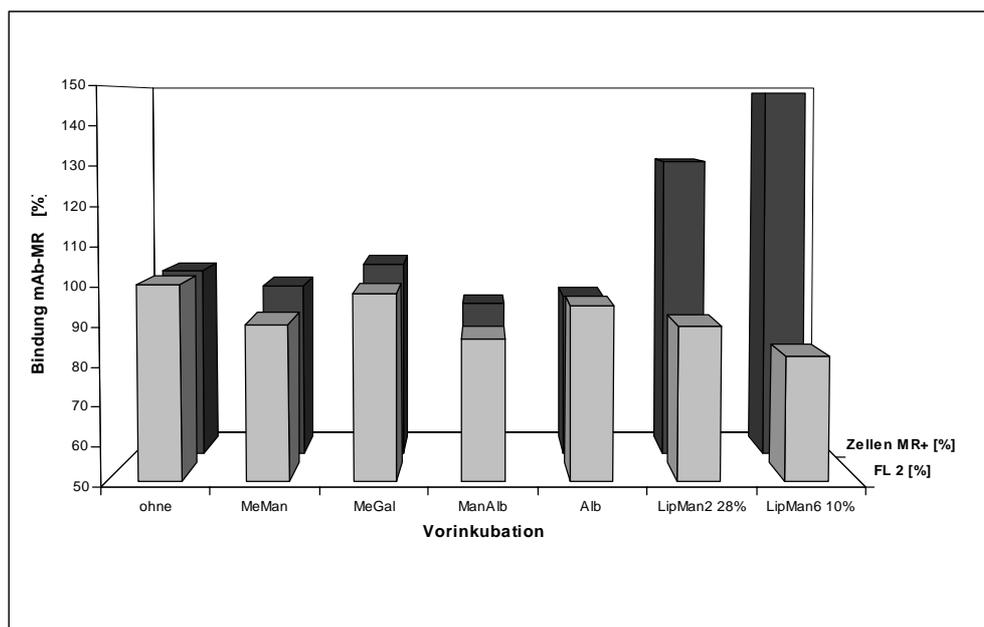


**Abb. 26:** Detektion des MR am FACScan bei Peritoneal-Zellen

Der Leerwert (nur sekundärer Antikörper) zeigt in der FSC/SSC-Auftragung (A) die Lymphozyten in R1(schwarz), Monozyten/Makrophagen in R2 (blau), Granulozyten in R4 (grau). Die korrespondierende Darstellung im FSC/FL2 (B) läßt nur wenige Zellen in R3 erkennen, die durch unspezifische Bindung geringe FL2 aufweisen. Nach Inkubation mit mAb-MR und sekundärem Antikörper erscheinen die rezeptorpositiven Zellen (rot) in der FSC/FL2-Auftragung durch starke FL2 in R3 (D). Die korrespondierende Darstellung im FSC/SSC (C) zeigt die Verteilung der MR<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Monozyten/Makrophagen-Population (R2). Die blaue Markierung repräsentiert rezeptornegative Zellen. Die Fluoreszenzintensität in FL2 korreliert mit der Rezeptordichte der Zellen und wurde jeweils bestimmt. Zwischen dem prozentualen Anteil von MR<sup>+</sup>-Zellen an der Population und der (mittleren) Rezeptordichte bestand keine erkennbare Abhängigkeit (Daten nicht gezeigt).

Von den eingangs genannten und hier angewandten Möglichkeiten der Detektion ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse einzig die Antikörperbindung als geeignete Methode eines sensitiven und quantifizierbaren Nachweises des MR zu bewerten.

Im Hinblick auf die Inkubation der Zellen mit Man-Liposomen wurde die gegenseitige Beeinflussung der Bindung von mAb-MR und Man-Liganden durch Vorinkubation mit verschiedenen Substanzen untersucht. Abb. 27 zeigt die an PTM erhaltenen Ergebnisse. Es sind jeweils die Veränderung des nachweisbaren Anteils an MR<sup>+</sup>-Zellen und deren Fluoreszenzintensität (mittlere Rezeptordichte) gegenübergestellt.



**Abb. 27:** Beeinflussung der Antikörperbindung am MR durch Vorinkubation mit verschiedenen Substanzen

Die Bindung des mAb-MR ist durch die Vorinkubation beeinflusst, wenn auch nur in geringem Maße. Wiederum ist der Einfluß der Man-Liganden zu erkennen, wobei die Reduzierung mit der Größe des Liganden in der Reihenfolge MeMan < Man-BSA < Man-Liposomen geringfügig zunimmt, was auf eine sterische Hinderung der mAb-MR-Bindung hinweist. Diese Hinderung fällt für die vergleichsweise großen Liposomen-“Reste“ geringer als erwartet aus. Der Einfluß des unmannosylierten BSA zeigt einen relevanten unspezifischen Anteil an der Reduktion der Antikörperbindung. Die MR-Dichte ist durch die Man-Liganden etwas stärker reduziert als der Anteil der MR<sup>+</sup>-Zellen. Die Vorinkubation mit Man-Liposomen hingegen (hier am Beispiel Man2 und Man6 gezeigt) resultierte in einer Steigerung der Anzahl rezeptorpositiver Zellen, woraus man eine Aktivierung von Rezeptoren nach Kontakt mit Man-Liposomen ableiten kann. Systematische Untersuchungen hierzu wurden nicht vorgenommen, könnten aber für weiterführende Untersuchungen von Interesse sein, weshalb dieses Ergebnis hier erwähnt sein soll.

Gleiche Untersuchungen an HPM führten zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). BARRETT-BERGSHOEFF et al. zufolge bindet der mAb-MR nahe der Bindungsstelle für t-PA, also nahe der CRD, was die Autoren aus der Inhibierung der t-PA-Bindung durch den mAb-MR schließen [182]. Eine solche Inhibierung der Bindung eines Proteins dürfte auch für (ungleich größere) Liposomen zutreffen. Auch aus den hier gezeigten Ergebnissen geht eine gegenseitige Beeinflussung von Antikörper und Man-Liganden durch sterische Hinderung hervor. Es war daher nicht möglich, bei der Untersuchung zur Aufnahme von Man-Liposomen rezeptorpositive Zellen mittels simultaner mAb-MR-Bindung zu selektieren und gesondert auszuwerten. Trotzdem liefert die sichere Detektion des MR wichtige Informationen über die vorliegende Zellpopulation und beschränkte Möglichkeiten einer selektiven Auswertung (s. Kap. 4.4.2.3.2).

#### 4.4.2.3 Aufnahme mannosylierter Liposomen durch Pericard-Monozyten/Makrophagen

Die Testung des Einflusses der Mannosylierung an einem rezeptorpositiven Zellmodell wurde zunächst an HPM vorgenommen. Dazu kamen wiederum Man0 bis Man4 und die zu diesem Zeitpunkt neu synthetisierten Verbindungen Man6 und Man8 zum Einsatz. Abb. 28 zeigt den Zeitverlauf eines typischen Experiments.

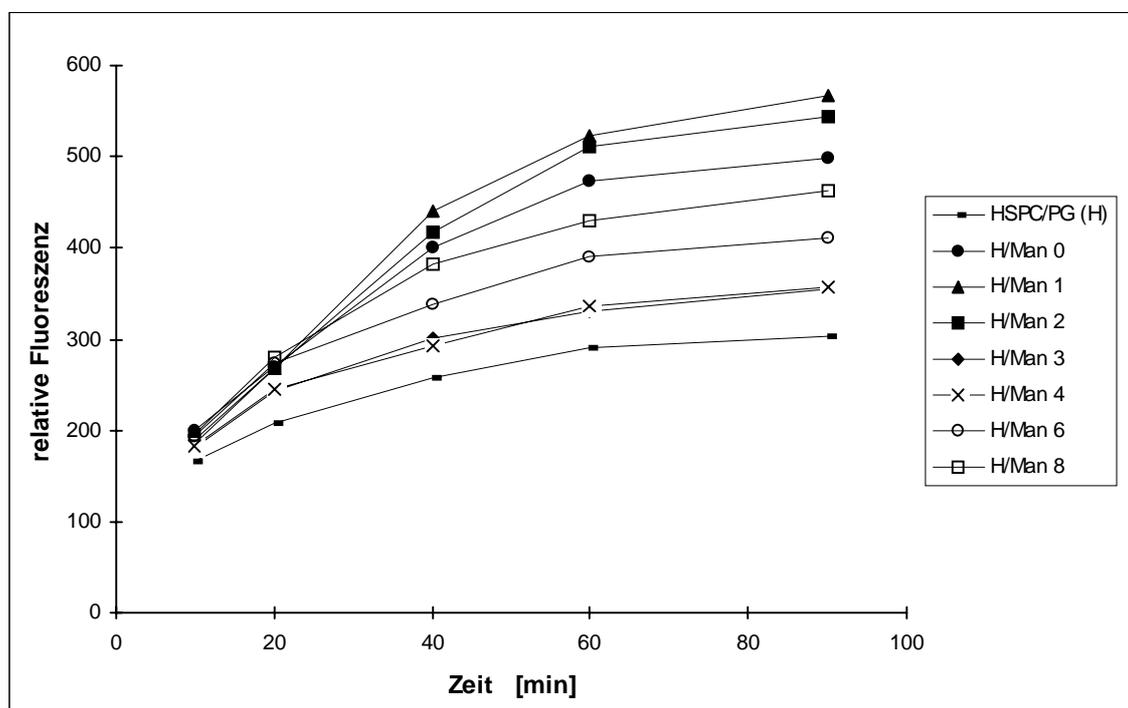
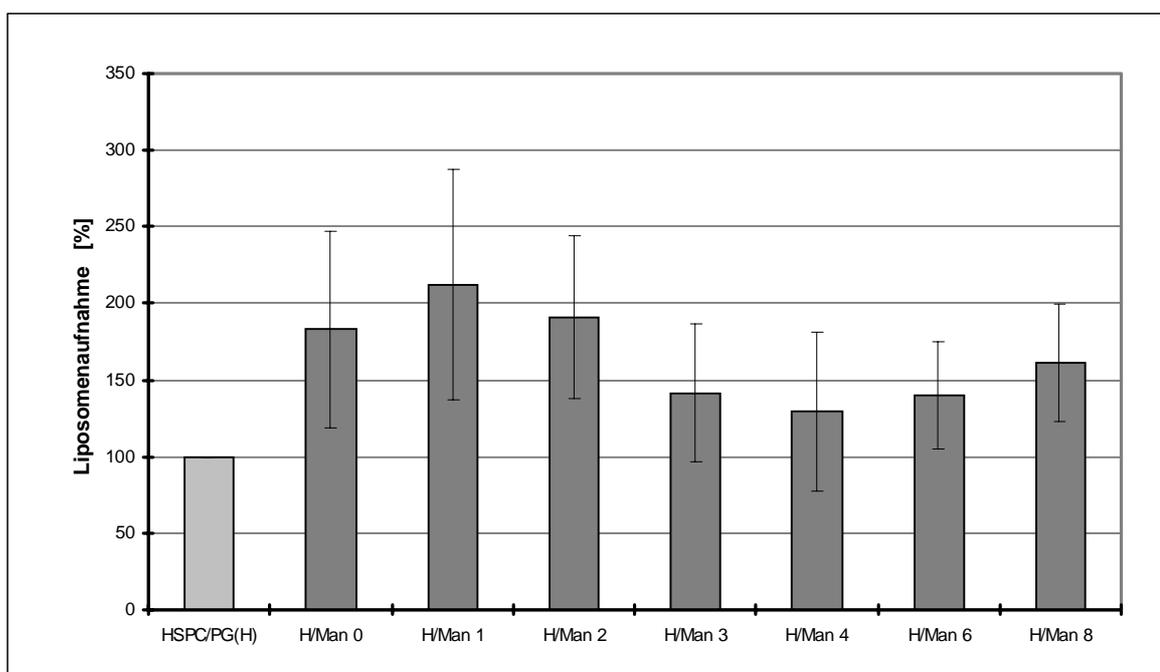


Abb. 28: Zeitverlauf der Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen durch HPM

Die Unterschiede in der Aufnahme der einzelnen Präparationen werden nach einer Inkubationsdauer >20min deutlich und bleiben in ihrer Qualität unverändert. Bei Inkubationszeiten  $\geq 90$ min ließ die Stabilität der Zellen häufig deutlich nach, was die

reproduzierbare Erfassung der Zellpopulationen am FACScan nur noch bedingt zuließ. Da sich nach Inkubationszeiten >60min keine qualitativen Änderungen der Wechselwirkung mehr ergaben, wurden die Meßwerte nach 60min zur Quantifizierung der Liposomenaufnahme herangezogen.

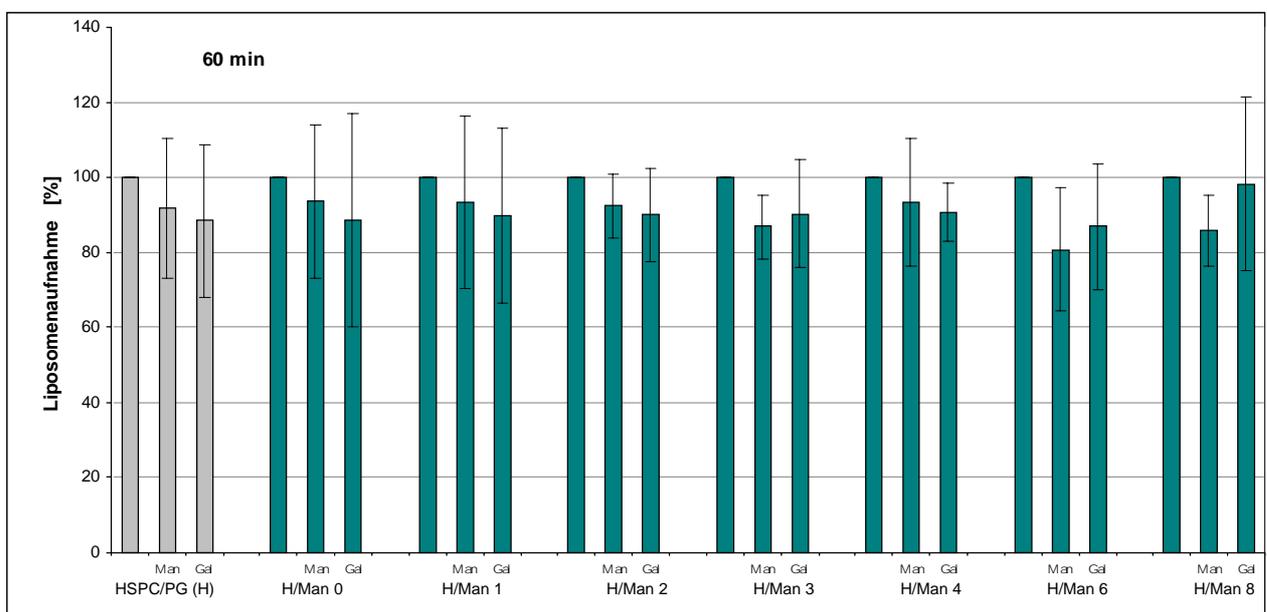
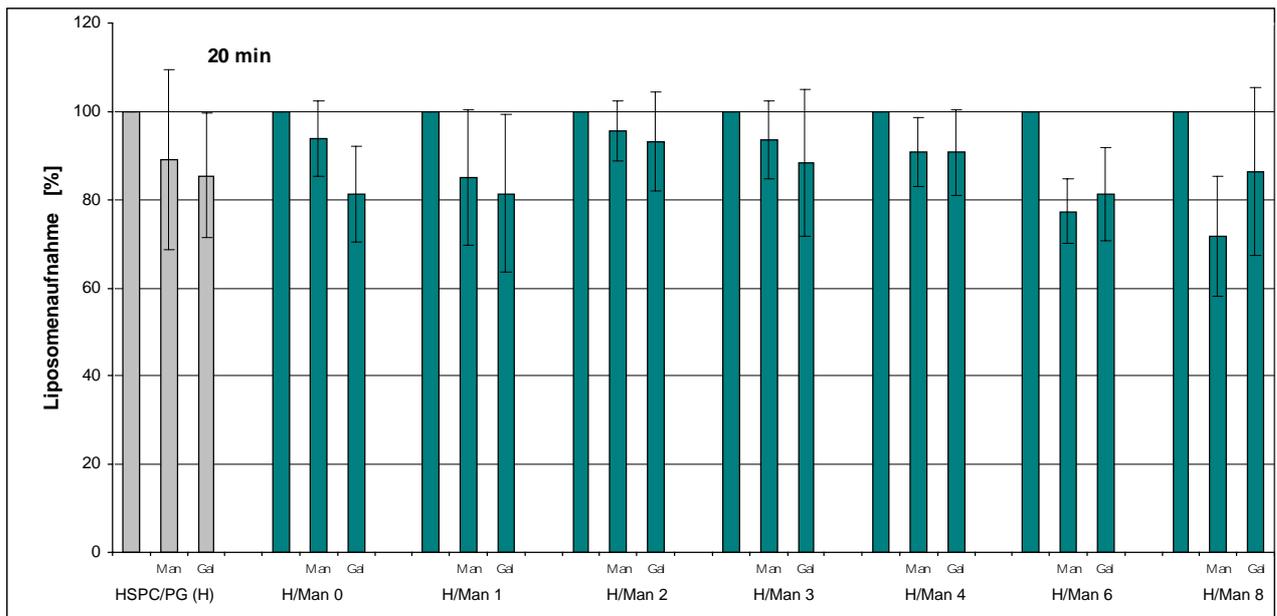
Abb. 29 zeigt die Liposomenaufnahme durch die Gesamtpopulation der Monozyten/Makrophagen (vgl. Abb. 24 a, D). Die Ergebnisse unterliegen einer erheblichen Streuung und lassen erst bei Testung einer relativ großen Anzahl von Patientenmaterial (>20) Tendenzen in der Veränderung der Aufnahme erkennen. Gegenüber reinen HSPC/PG-Vesikeln ist die Aufnahme aller mannosylierten Liposomen erhöht, wobei die deutliche Steigerung durch kürzere Mannoside (Man0 - Man2) auffällig ist. Unterschiede zwischen den Mannosiden mit längerem Spacer (Man3 - Man8) sind kaum zu erkennen. Für eine vermutete Rezeptorvermittlung fällt die Steigerung der Aufnahme dieser Präparationen mit Werten zwischen 30% und 60% relativ gering aus.



**Abb. 29:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch HPM nach 60min

#### 4.4.2.3.1 Verdrängung der Liposomenaufnahme

Die Vor- und Co-Inkubation der Zellen mit Methylglykosiden sollte Aufschluß über eine mögliche Rezeptorbeteiligung bei der Liposomenaufnahme geben. Die Zellen wurden jeweils 30min mit den Methylglykosiden vorinkubiert. Während der anschließenden Inkubation mit Liposomen lag dieselbe Methylglykosid-Konzentration vor. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt.



**Abb. 30:** Inhibierung der Liposomenaufnahme durch Methylglykoside (5mg/ml) bei HPM nach 20min und 60min Liposomen-Inkubationsdauer (n=8)

Auch hier unterliegen die Resultate einer erheblichen Streuung. Um Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche herzustellen, wurde die Liposomenaufnahme ohne Verdrängungsagensatz für jede Präparation =100% gesetzt und die Beeinflussung als prozentuale Abweichung berechnet. Der Einfluß der Methylglykoside läßt keine spezifischen Mechanismen erkennen. Im Mittel aller Versuche führt die Inkubation mit MeMan bei allen Präparationen zu einer leichten Senkung der Liposomenaufnahme, die auch durch MeGal erreicht wird. Diese Art der Beeinflussung erfolgt bereits gegenüber nichtmannosylierten HSPC/PG-Liposomen und in ganz ähnlicher Weise bei Man0 bis Man4. Lediglich bei Man6 und Man8 ließe sich eine Verdrängung durch MeMan diskutieren, die aber aufgrund der breiten Streuung der erhaltenen Ergebnisse statistisch

nicht signifikant ist. Eine Änderung dieser Tendenz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ist nicht festzustellen. Nach 20min und 60min Inkubationsdauer werden nahezu identische Ergebnisse erzielt. Auch die Auswertung der Zellfluoreszenz bei 4°C (Liposomenbindung ohne Beteiligung von Phagozytose) ergab keine Unterschiede, die eine Rezeptorvermittlung nachweisen (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie bei den Versuchen zur Verdrängung der Man-BSA<sub>FITC</sub>-Bindung (Kap. 4.4.2.2) konnten durch weitere Steigerung der Methylglykosid-Konzentration keine eindeutigeren Ergebnisse erzielt werden.

Da die untersuchten Liposomen ebenfalls multivalente Man-Konjugate darstellen, gelten die dort diskutierten Gesichtspunkte zur geringen bzw. fehlenden Verdrängung durch MeMan adäquat. Wie in Kap 2.4.2.2 bereits an Beispielen diskutiert, ist die Literatur zur Inhibierung der Aufnahme mannosylierter Liposomen widersprüchlich, was in der unterschiedlichen Komplexität der Liganden begründet sein kann. Dessenungeachtet berichten GARCON et al. [138] über erfolgreiche Verdrängung von Man-BSA-Liposomen durch freie Mannose, MULLER und SCHUBER [148] hingegen über fehlende Beeinflussung der Aufnahme von Man-Liposomen durch Mannan. Letzteres ist umso bemerkenswerter, als es sich bei Mannan um einen komplexeren Man-Liganden hoher Bindungsaffinität und damit großer Verdrängungspotenz handelt.

Insbesondere die schlechte Reproduzierbarkeit der hier erzielten Ergebnisse erschwert das Erkennen deutlicher Tendenzen. Die in Abb. 30 gezeigten Ergebnisse repräsentieren ca. 80% der Untersuchungen zur Inhibierung der Liposomenaufnahme. In keinem der Experimente blieb die Liposomenaufnahme unbeeinflusst von der Methylglykosid-Inkubation; in einigen Experimenten war nach Vorinkubation mit MeMan auch eine Steigerung der Aufnahme von Man-Liposomen, vor allem solcher mit längerem Spacer ( $\geq 4$  EtO-Einheiten), zu beobachten (nicht gezeigt). HOPPE und LEE zufolge [183] hemmen freie D-Mannose und L-Fucose die Bindung von Man-BSA am MR, können aber in geringen Konzentrationen auch stimulierend wirken. Dabei ist die Konzentration freien Zuckers für eine maximale Stimulierung der Bindung abhängig von der KH-Dichte des Man-BSA<sup>7</sup>. Eine Steigerung der Anzahl der MR war nicht oder kaum festzustellen. Die Autoren vermuten aufgrund der Parallelität zwischen Inhibierungspotenz und Potenz zur Bindungsstimulierung des jeweils verwendeten Zuckers<sup>8</sup> als Mechanismus eine Lösung der Bindung einzelner KH-Einheiten des Man-BSA vom Rezeptor und damit der Möglichkeit zur optimalen räumlichen Neuordnung. Die abgelösten Man-Einheiten können so erneut fester binden, woraus sich eine insgesamt stärkere Wechselwirkung ergibt. Die in der

---

<sup>7</sup> maximale Stimulierung für	Man <sub>43</sub> -BSA	10,0 mM freie Mannose
	Man <sub>24</sub> -BSA	2,1 mM
	Man <sub>13</sub> -BSA	1,9 mM
	Man <sub>5</sub> -BSA	0,2 mM

<sup>8</sup> Die Autoren belegen auch für Glucose und N-Acetyl-D-Glucosamin die Stimulierung der Bindung am MR, allerdings erst bei zehnfach höherer Konzentration (ca. 100 mM).

Literatur diskutierte Notwendigkeit der Wechselwirkung mit mehreren CRD des MR für eine hochaffine Ligandenbindung [63] unterstützt diese Annahme. Übereinstimmend damit finden OHSUMI et al. die abnehmende Potenz zur Bindungsstimulierung mit zunehmender Affinität des Verdrängungsagens [151]. BIESSEN et al. [152] folgern aus der detaillierten Analyse von Verdrängungsstudien für Liganden mittlerer Affinität die Bindungsstimulierung durch freie Mannose niedriger Konzentration aufgrund Bindung (Verdrängung + Neuordnung) am CRD4 und eine Inhibierung durch freie Mannose hoher Konzentration aufgrund Bindung auch an den weniger affinen CRD6 bis 8 (vollständige Verdrängung). Der stimulierende Effekt freier Mannose ist für Liganden geringerer Affinität weniger ausgeprägt, für Liganden mit sehr hoher Bindungsaffinität nicht zu beobachten.

Bei den hier vorgestellten Verdrängungsversuchen betrug die MeMan-Konzentration 20mM und ist damit deutlich höher als die durch HOPPE und LEE [183] ausgewiesenen Konzentrationen zur Bindungsstimulierung. Faßt man die verwendeten Liposomen gegenüber dem dort zitierten Man<sub>43</sub>-BSA als „höher mannosylierte“ Konjugate auf, könnten die genannten Literaturdaten eine Erklärung für die in einigen Experimenten beobachtete Steigerung der Aufnahme von Man-Liposomen liefern. Eine Rezeptorbeteiligung wäre demnach bei den Mannosiden mit längerem Spacer zu vermuten, bleibt aber spekulativ.

Angesichts der sehr unterschiedlichen Ergebnisse und diskutierten Mechanismen in der Literatur ist für eine Rezeptorverdrängung offensichtlich eine ganze Reihe von Faktoren maßgeblich, die sich in der gegenseitigen Beeinflussung der Bindungsaffinitäten des Man-Konjugats (abhängig von dessen Komplexität und der Anordnung bzw. Flexibilität der einzelnen Liganden) und des inhibierenden Agens (abhängig von dessen Komplexität und Konzentration) niederschlagen und deren Zusammenwirken den jeweils erzielten Effekt bestimmt.

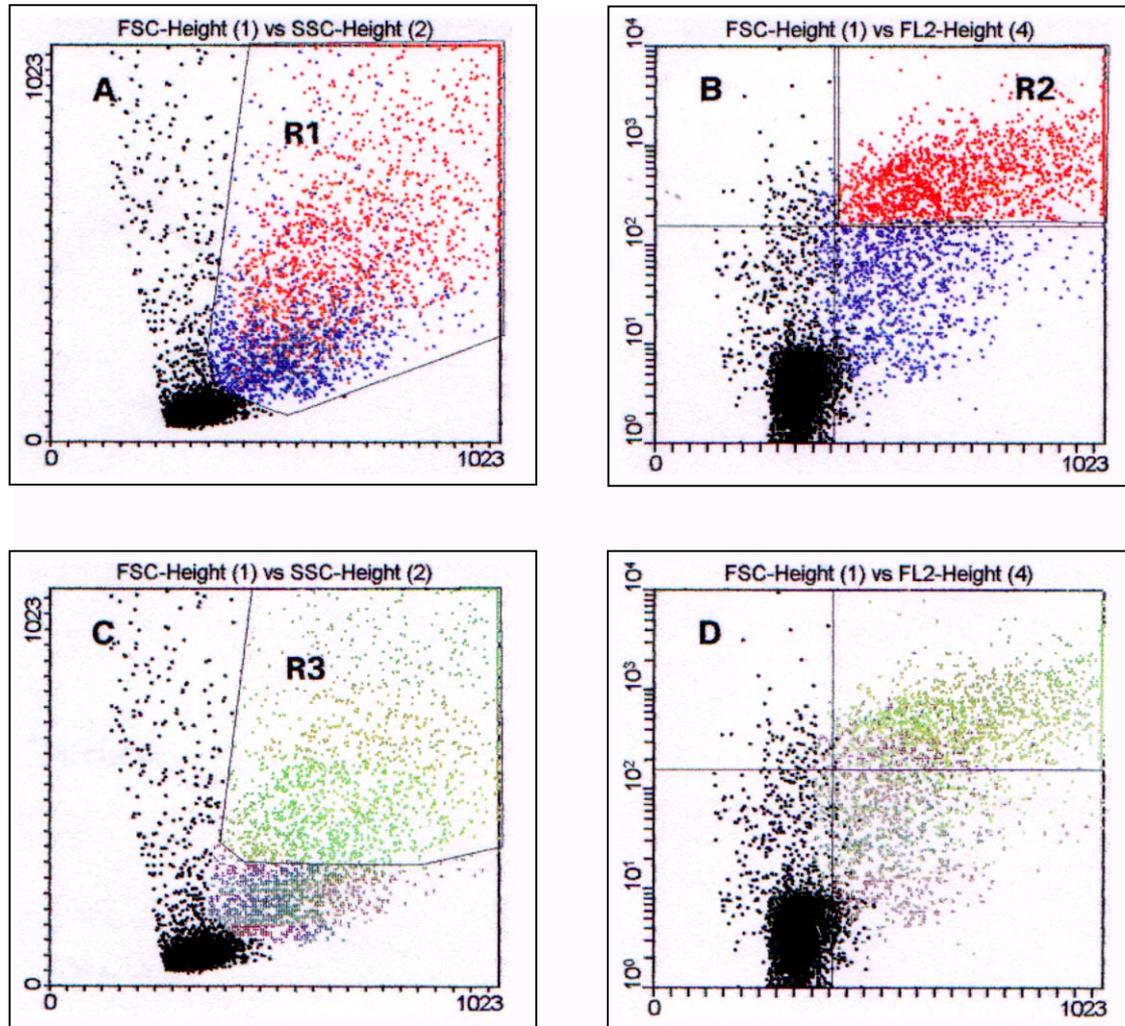
Ungeachtet der möglichen Erklärungen lassen die hier vorliegenden Daten zur Verdrängung keinen eindeutigen Schluß auf eine Rezeptorvermittlung bei der Aufnahme der Man-Liposomen zu. Im weiteren wurde daher auf Versuche zur Inhibierung verzichtet und nach anderen Möglichkeiten gesucht, eine mögliche Rezeptorbeteiligung nachzuweisen.

#### **4.4.2.3.2 Selektion rezeptorpositiver Zellen**

Der Einsatz des mAb-MR zur Quantifizierung der Rezeptoren am jeweils verwendeten Zellmaterial zeigte, daß nur ein Teil der Monozyten/Makrophagen MR exprimiert und damit zur rezeptorvermittelten Phagozytose befähigt ist. Sofern an den erzielten, moderaten Steigerungsraten bei der Aufnahme der Man-Liposomen eine MR-Vermittlung beteiligt ist,

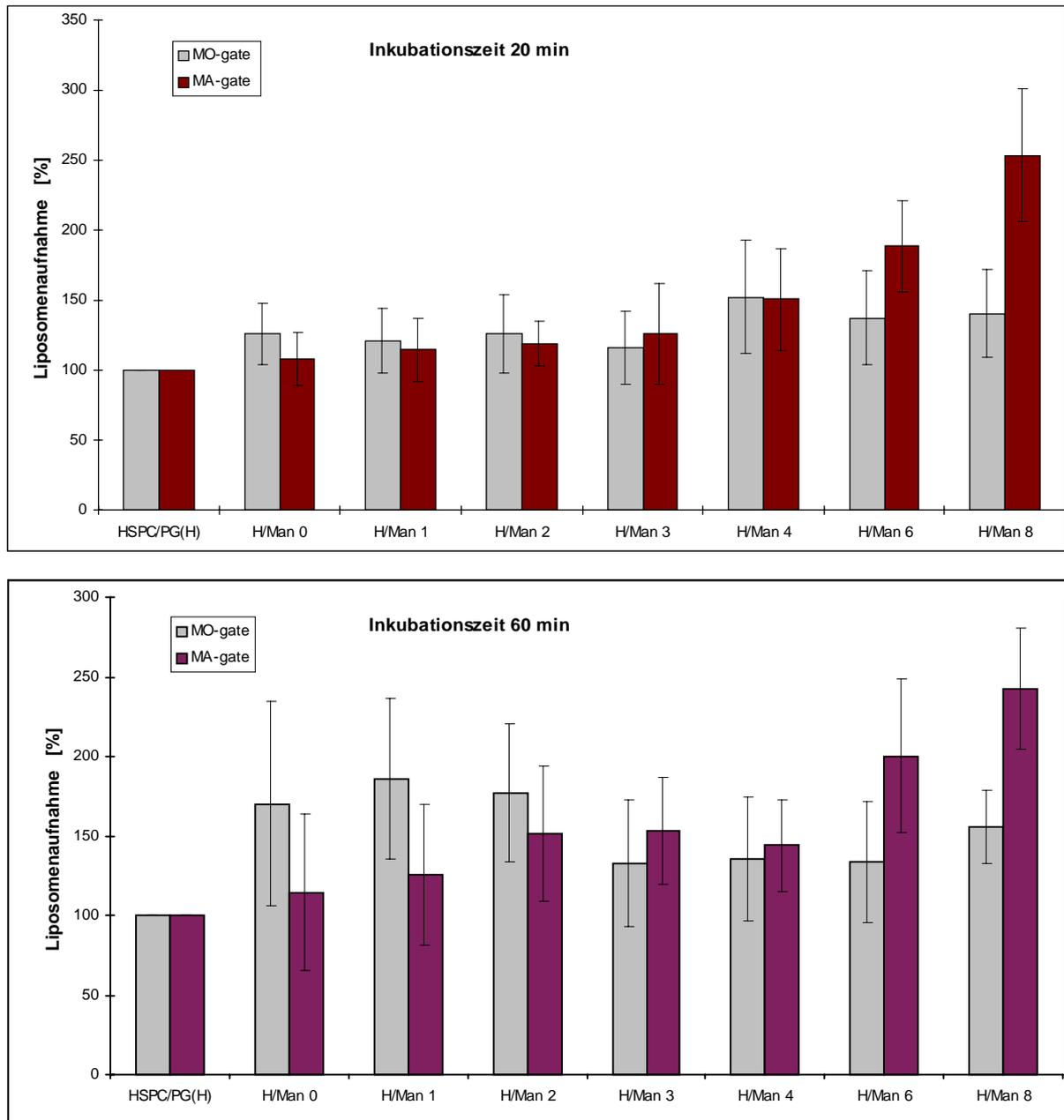
sind dafür entsprechend dieser Ergebnisse zwischen ca. 15 und 50% der Zellen verantwortlich.

Abb. 31 zeigt die Verteilung der MR $\oplus$ -Zellen innerhalb der HPM-Gesamtpopulation und deren Lokalisierung in der FSC/SSC-Auftragung an einem Beispiel.



**Abb. 31:** Verteilung der MR $\oplus$ -Zellen innerhalb der HPM-Gesamtpopulation

Die MR $\oplus$ -Zellen (rot) erscheinen in der FSC/FL2-Auftragung in R2 (B). Die korrespondierende Darstellung im FSC/SSC (A) zeigt eine inhomogene Verteilung der MR $\oplus$ -Zellen innerhalb der HPM-Gesamtpopulation (R1), die von den (kleineren) Monozyten zu den (größeren) Makrophagen hin verschoben ist. (Die blaue Markierung repräsentiert rezeptornegative Zellen.) Das Setzen eines analytischen Fensters R3 (C) erfaßt einen erhöhten Anteil MR $\oplus$ -Zellen und läßt deren relative Selektion bei der Auswertung zu: die korrespondierende Darstellung im FSC/FL2 (D) zeigt, daß diese Eingrenzung vor allem MR $\oplus$ -Zellen erfaßt (grün). Die Quadranten dienen der Orientierung im Vergleich mit B. Die Liposomenaufnahme der so selektierten Zellen (MA-gate) ist in Abb. 32 dargestellt. Die Aufnahme durch die HPM-Gesamtpopulation (MO-gate) ist jeweils gegenübergestellt.



**Abb. 32:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) bei analytischer Selektion von MR<sup>+</sup>-HPM nach 20min und 60min Inkubationszeit (n=10); Die selektive Auswertung wurde an Zellpopulationen vorgenommen, bei denen sich die MR<sup>+</sup>-Zellen analytisch gut erfassen ließen (ausreichende Zellzahl im analytischen Fenster R3, vgl. Abb. 31,C)

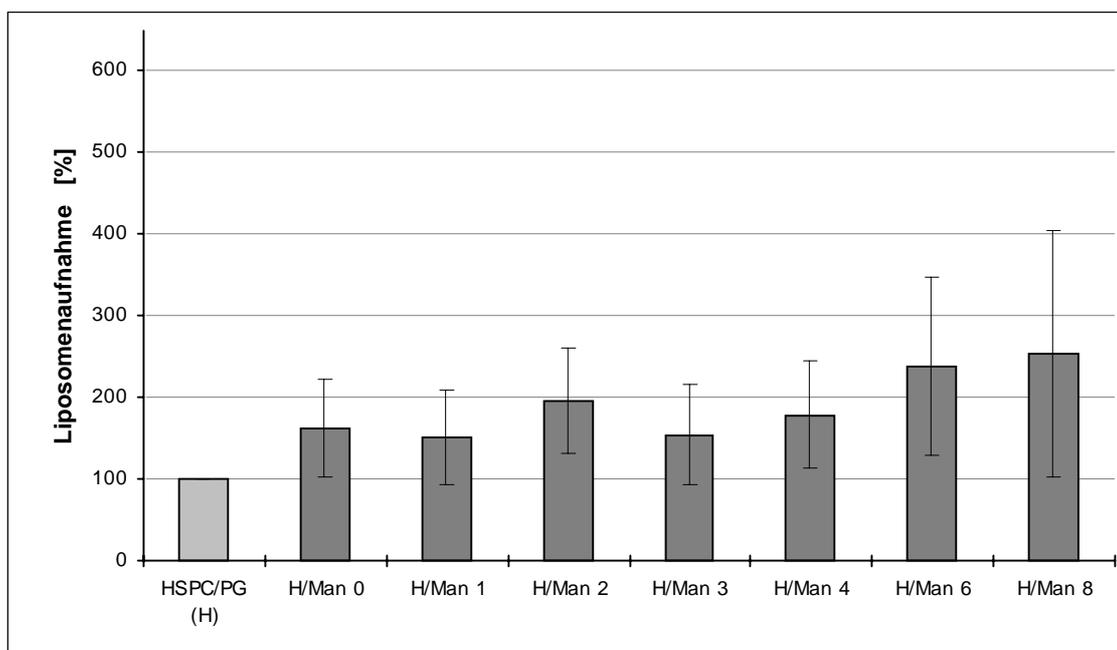
Der erhöhte Anteil von MR<sup>+</sup>-Zellen läßt eine andere Tendenz in der Aufnahme der Man-Liposomen erkennen. Im Vergleich der selektierten Zellen mit der Gesamtpopulation fällt die Steigerung durch die kurzen Mannoside (Man0 bis Man2) geringer aus, was nach 60min Inkubationszeit besonders deutlich ist. Mannoside mit mittlerer Spacerlänge (Man3 und Man4) zeigen nur geringe Unterschiede in der Beeinflussung der Aufnahme durch die beiden Populationen, während die Mannoside mit längerem Spacer (Man6 und Man8) deutliche Abweichungen erkennen lassen, die bereits nach 20min Inkubationszeit

auftreten. Nach diesen Ergebnissen sind für die Steigerung der Aufnahme durch kurze Mannoside vor allem rezeptornegative Zellen (Monozyten) verantwortlich, was mit den Ergebnissen der Liposomenaufnahme durch U937 und HL60 (Kap. 4.4.1.3 und 4.4.1.4) in gewisser Übereinstimmung steht. Die geringfügig verstärkte Aufnahme der Man-Liposomen mit mittlerer Spacerlänge durch MR $\oplus$ -Zellen ist erst nach 60min Inkubationsdauer erkennbar und statistisch nicht signifikant. Die Beteiligung einer Rezeptorvermittlung kann daher für Man0 bis Man4 weitgehend ausgeschlossen werden. Die im Vergleich zur HPM-Gesamtpopulation durch MR $\oplus$ -Zellen hingegen deutlich veränderte Aufnahme von Man-Liposomen mit längerem Spacer lässt für Man6 und Man8 eine Rezeptorbeteiligung vermuten.

#### 4.4.2.4 Aufnahme mannosylierter Liposomen durch Peritoneal-Makrophagen

Die Testung der Aufnahme von Man-Liposomen durch native Zellen wurde im weiteren an PTM vorgenommen und parallel das gesamte verwendete Zellmaterial hinsichtlich der MR-Expression charakterisiert.

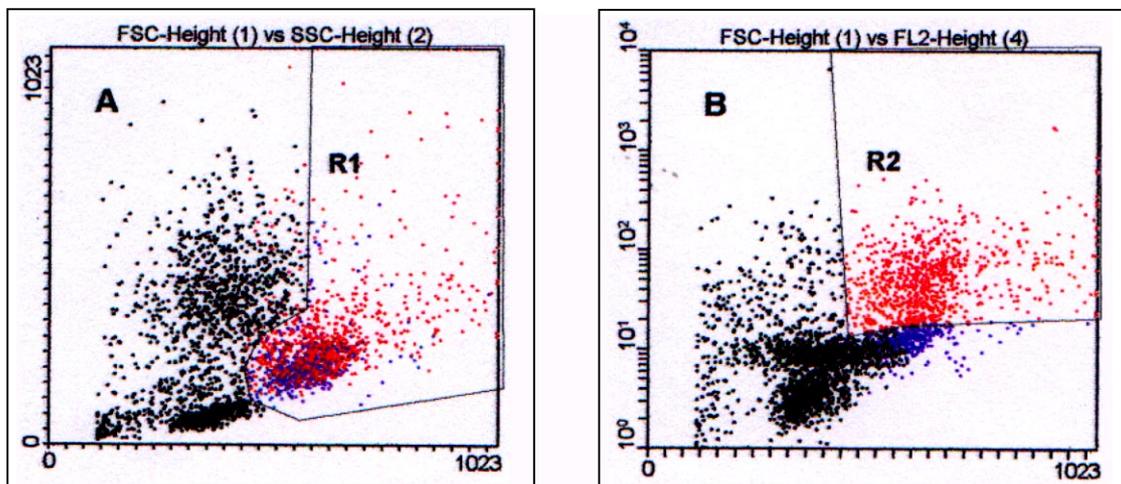
Abb. 33 zeigt die Liposomenaufnahme der PTM-Gesamtpopulation. Auch hier unterliegen die Ergebnisse einer erheblichen Streuung. Ähnlich wie bei HPM ist die Aufnahme aller mannosylierten Liposomen gegenüber reinen HSPC/PG-Vesikeln erhöht. Innerhalb der homologen Reihe der Mannoside sind nur geringe Unterschiede zu erkennen, wobei die Steigerung der Aufnahme durch Man6 und Man8 etwas deutlicher ausfällt. Die statistische Prüfung der Ergebnisse zeigt innerhalb der Mannoside keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 33:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch PTM nach 60min (n=15); Die Skalierung der Ordinate wurde zum besseren Vergleich der Skalierung aus Abb. 36 angeglichen.

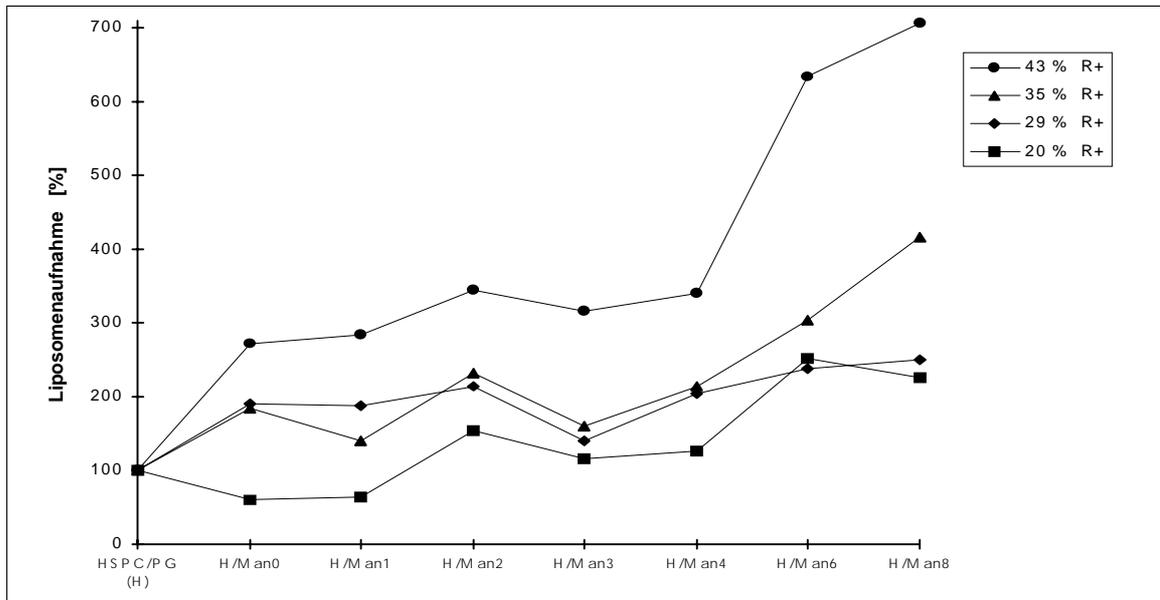
Die Schwankungsbreite in der Reaktion der Zellen auf die Inkubation mit Liposomen sowohl bei Einsatz der gleichen Liposomenspezies als auch gegenüber den einzelnen Mannosiden läßt keinen eindeutigen Schluß auf eine Rezeptorbeteiligung zu. Deshalb wurde auch hier versucht, die MR $\oplus$ -Zellen in der Auswertung zu selektieren.

In Abb. 34 ist die Verteilung der MR $\oplus$ -Zellen (rot) innerhalb der PTM-Gesamtpopulation an einem typischen Beispiel (vgl. auch Abb. 26) gezeigt. Ihre Lokalisierung in der FSC/SSC-Auftragung (A) weist eine vergleichsweise homogene Verteilung auf, weshalb eine analytische Selektion von MR $\oplus$ -Zellen, wie im Falle der HPM, nicht möglich war. Für PTM mußte daher eine andere Möglichkeit gesucht werden, um einen erhöhten Anteil von MR $\oplus$ -Zellen zu erfassen.



**Abb. 34:** Verteilung der MR $\oplus$ -Zellen innerhalb der PTM-Gesamtpopulation

Wie erwähnt, wurden der Anteil an MR $\oplus$ -Zellen und die FL2-Intensität der untersuchten Monozyten/Makrophagen-Populationen bestimmt. Da auch hier nur ein Teil der Zellen MR exprimiert, sollte sich eine gewisse Abhängigkeit der Aufnahme mannosetragender Liposomen von diesem Anteil ergeben. Abb. 35 zeigt einige Beispiele für Aufnahmeprofile von Zellmaterial mit unterschiedlichem Anteil rezeptorpositiver Zellen.



**Abb. 35:** Aufnahmeprofile von HPM (ausgewählte Beispiele), HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol%)

Beim Vergleich der Einzelexperimente ist die Beeinflussung der Liposomenaufnahme durch den Anteil MR-exprimierender Zellen an der Gesamtpopulation erkennbar, die jedoch ebenfalls keine strenge Tendenz aufweist. Deutlichere Effekte werden erst bei Betrachtung des prozentualen Anteils von MR $\oplus$ -Zellen und der Rezeptordichte (Median der Fluoreszenzintensität der gebundenen Antikörper) sichtbar. Tab. 2 listet diese Zahlen für PTM verschiedener Patienten (Auswahl).

	A				B			C	
% MR $\oplus$ -Zellen	52	43	49	35	20	24	19	35	17
rel. Fluoreszenzintensität (Rezeptor-Dichte)	102	60	72	100	24	31	39	26	80

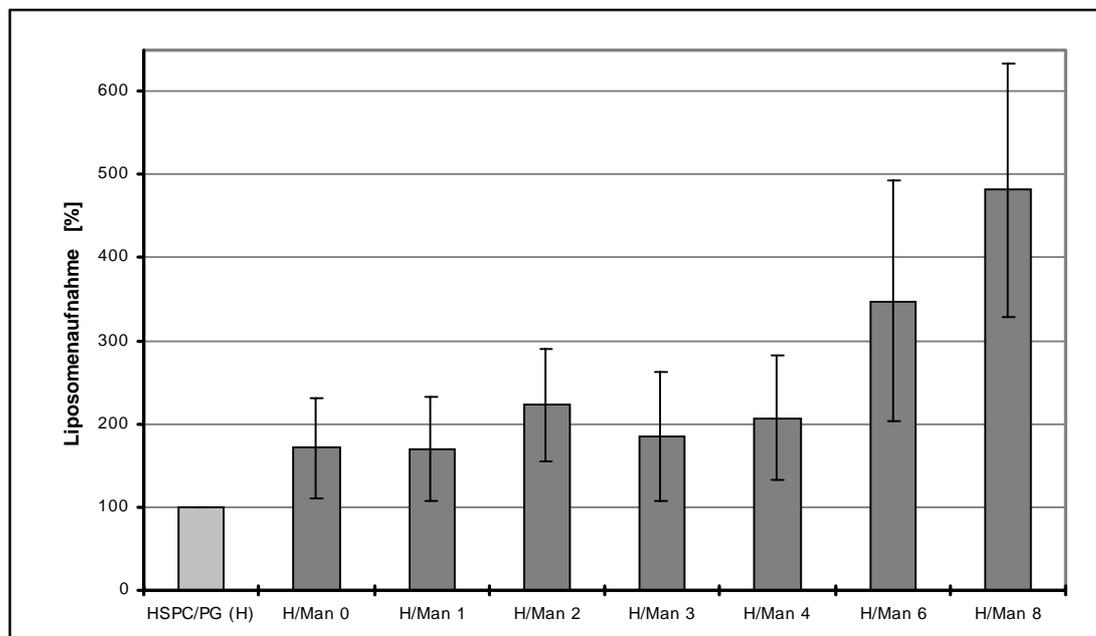
**Tab. 2:** Prozentualer Anteil an MR $\oplus$ -Zellen und deren mittlere Rezeptordichte für PTM verschiedener Patienten (Auswahl)

Die genannten Parameter lassen zwischen zwei Gruppen von Zellpopulationen grob unterscheiden:

1. PTM mit relativ hohem Anteil MR $\oplus$ -Zellen und relativ großer Rezeptordichte (A),
2. solchen mit relativ niedrigen Zahlenwerten in beiden Parametern (B).

Darüberhinaus sind Übergänge möglich (C).

Abb. 36 zeigt die Liposomenaufnahme der Zellpopulationen aus Gruppe A und wertet damit einen erhöhten Anteil MR $\oplus$ -Zellen mit relativ hoher Rezeptordichte aus.



**Abb. 36:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen durch MR<sup>+</sup>-PTM nach 60min (n=8)

Gegenüber der Auswertung der PTM-Gesamtpopulation (Abb. 33) ergibt sich ein verändertes Bild in der Aufnahme der Man-Liposomen. Während bei Man0 bis Man4 kaum Unterschiede in der Aufnahme im Vergleich mit der Gesamtpopulation zu erkennen sind, ist bei Man6 und Man8 eine erhebliche Steigerung durch die selektierten Zellen zu verzeichnen. Für diese Steigerung der Aufnahme sind demzufolge die MR<sup>+</sup>-Zellen verantwortlich, was wiederum für die Mannoside mit längerem Spacer eine Rezeptorbeteiligung nahelegt. Auffällig ist auch hier die offenbar fehlende Fähigkeit der Mannoside mit mittlerer Spacerlänge, die vom Modellrezeptor ConA erkannt wurden, zur Wechselwirkung mit dem MR.

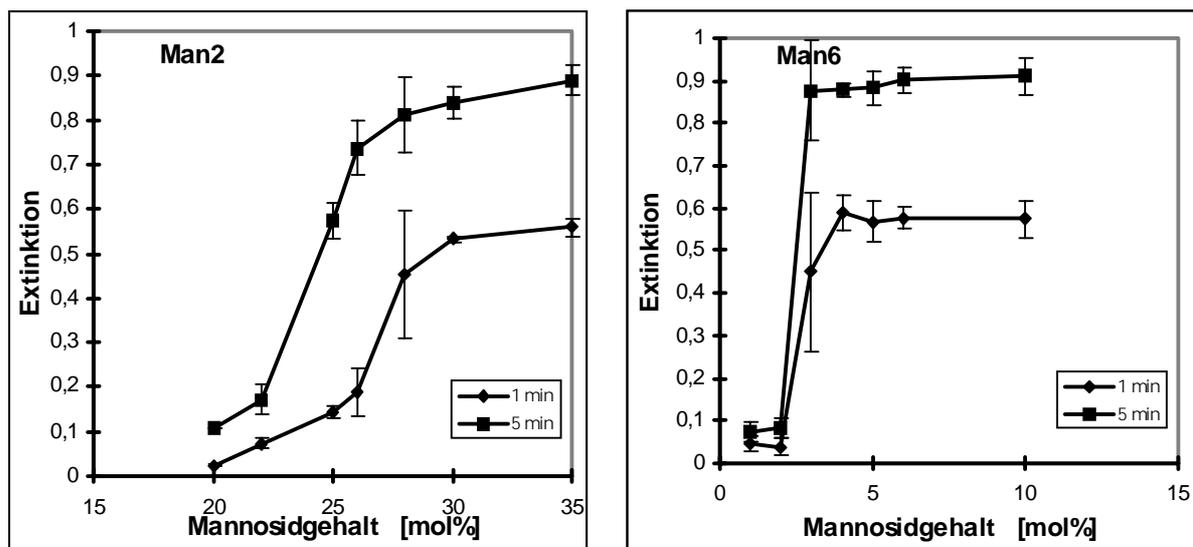
Auf die begrenzte Übertragbarkeit von Lektin-Bindungsstudien auf Ligand-Zell-Wechselwirkungen wurde bereits hingewiesen (Kap. 2.3). Trotzdem ist die Potenz für eine Rezeptorvermittlung ausschließlich der Mannoside mit längerem Spacer gegenüber beiden nativen Zellmodellen, an denen die Expression von MR nachgewiesen wurde, bemerkenswert. Nicht nur die eingangs vorgestellten Ergebnisse der ConA-Bindung, sondern auch die Liposomenaufnahme durch U937 und HL60 lassen auf eine räumliche Exponiertheit der KH-Kopfgruppen bei Mannosiden ab etwa 2 EtO-Einheiten schließen. Die Diskrepanz zur fehlenden Wechselwirkung mit MR der nativen Zellen legt nahe, daß neben der Exponiertheit der Man-Kopfgruppen weitere Faktoren oder Liposomeneigenschaften eine Rolle spielen. Um für die Untersuchung dieser Frage von den vergleichsweise komplexen Wechselwirkungen mit Zellen zu abstrahieren, wurde wiederum auf den Modellrezeptor ConA zurückgegriffen. Der Einsatz dieses einfachen Systems sollte es zulassen, allein die Fähigkeit der Man-Liganden zur Wechselwirkung zu untersuchen.

## 4.5 Rezeptorbindung und Liganden-Clusterung

### 4.5.1 Lektinbindung

Wie in Kap. 2.4.2.2 bereits anhand von Literaturdaten diskutiert, kann neben der Flexibilität der Spacer auch die Clusterung von KH-Gruppen für die Wechselwirkung mit (Membran-)Lektinen von Bedeutung sein. Bei den hier untersuchten Alkylmannosiden handelt es sich um monovalente Liganden. Eine Anreicherung von Liganden im Sinne einer Clusterbildung sollte daher vom Gehalt an Glykolipid und der Liposomenmatrix beeinflusst sein. Die Untersuchung der Lektin-Bindung wurde deshalb an Liposomen mit unterschiedlichem Glykolipidgehalt und verschiedener Grundlipidmatrix durchgeführt.

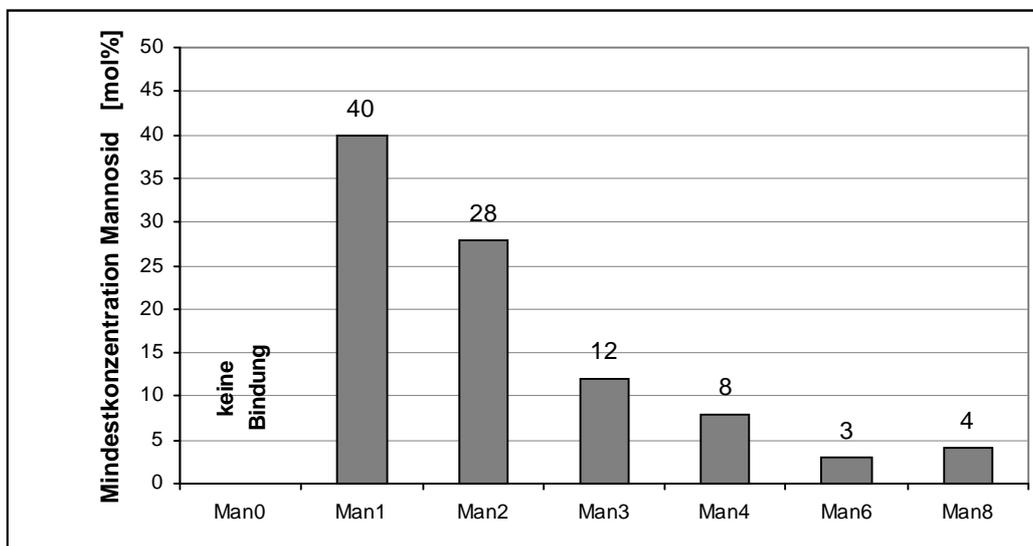
Die Ergebnisse zeigen eine notwendige Mindestkonzentration (Schwellenkonzentration) an Glykolipid bzw. -ligand, bei der die Bindung des Lektins einsetzt (Grundlipidmatrix SPC/Chol 7:3 M/M). Unterhalb dieser Schwellenkonzentration erfolgt keine bzw. deutlich verminderte Bindung, was auf die Notwendigkeit einer lokalen Anreicherung der Mannoside schließen lässt. Abb. 37 zeigt am Beispiel von Man2- und Man6-Liposomen das Ausmaß der Lektinbindung bei verschiedenem Gehalt an Glykolipid nach 1min und 5min.



**Abb. 37:** Lektinbindung an Man2- und Man6-Liposomen in Abhängigkeit vom Mannosidgehalt

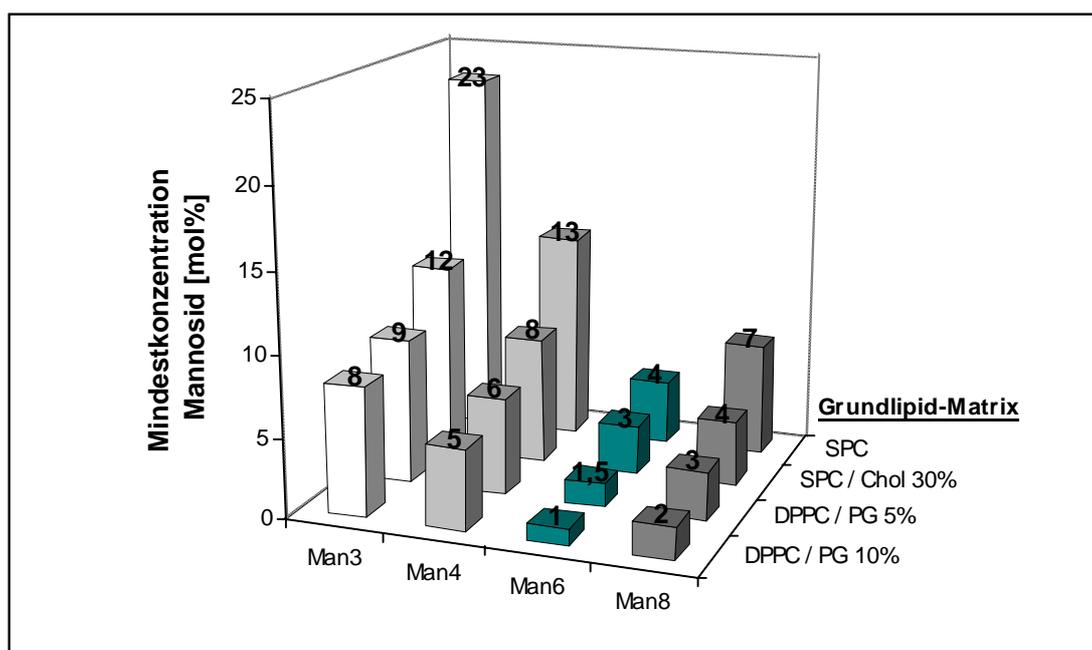
Das Einsetzen erster Bindungsvorgänge bis zum Erreichen der vollen Bindungsaktivität findet in einem relativ kleinen Konzentrationsbereich statt. Die Bindungsaktivität ändert sich danach bei weiterer Steigerung der Glykolipidkonzentration nur noch unwesentlich. Als Mindestkonzentration wurde die für die (nahezu) volle Bindungsaktivität des ConA notwendige Konzentration gewertet (Man2: 28%, Man6: 3%). Die vergleichsweise großen Standardabweichungen dieser Werte sind Ausdruck für die Sensibilität der Lektinbindung im Bereich der Schwellenkonzentration. Die Steilheit der Kurven im Schwellenbereich nimmt mit wachsender Spacerlänge zu.

Abb. 38 zeigt die Schwellenkonzentration für alle untersuchten Mannoside. Die z.T. erheblichen Unterschiede dieser Konzentration in Abhängigkeit von der Länge des Spacers lassen für eine lokale Anreicherung von Liganden die Bildung von Man-Clustern aufgrund der unterschiedlichen Mischbarkeit der einzelnen Mannoside in der Grundlipidmatrix vermuten.



**Abb. 38:** Mindestkonzentration der Mannoside für die Bindung von Man-Liposomen durch ConA

Dementsprechend sollte eine solche Clusterung von einer Veränderung der Art der Lipidmatrix abhängig sein und sich in veränderter Lektinbindung bemerkbar machen. In Abb. 39 sind für ausgewählte Mannoside die Ergebnisse bei Einsatz verschiedener Grundlipide bzw. Lipidmischungen gegenübergestellt.



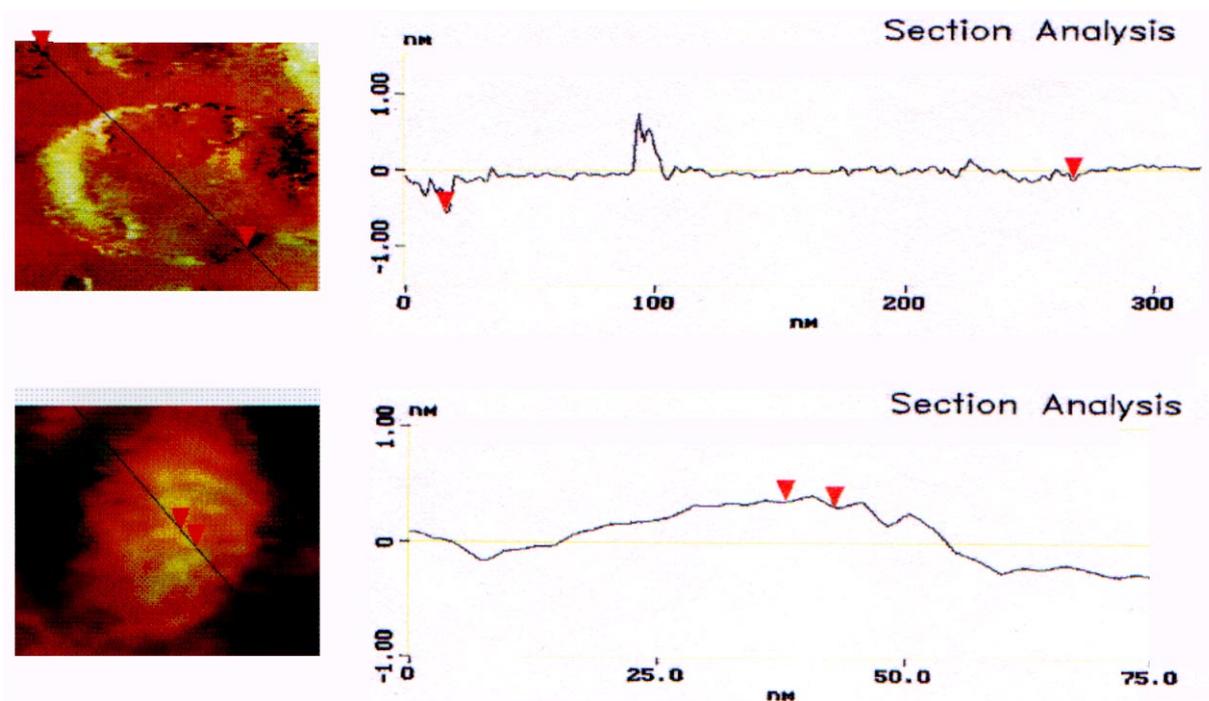
**Abb. 39:** Mindestkonzentration der Mannoside für die Bindung von ConA in Abhängigkeit von der Grundlipidmatrix

Im Vergleich zu SPC/Chol verschiebt sich die notwendige Schwellenkonzentration der Mannoside bei Verwendung rigiderer Lipidmatrices (DPPC/PG 5mol%, DPPC/PG 10mol%) zu kleineren Werten; bei Einsatz einer fluideren Matrix aus reinem SPC zu höheren Werten.

In den rigiden DPPC/PG-Matrices kommt es aufgrund der relativ schlechten Mischbarkeit bereits bei geringeren Konzentrationen der Mannoside zur Ausbildung von Domänen und damit zur Bindung des Lektins. Darüberhinaus ist eine Anreicherung der Mannoside an den Grenzflächen zwischen DPPC- und PG-Domänen wahrscheinlich. Darauf weist insbesondere die weitere Verringerung der Schwellenkonzentration bei Einsatz von 10mol% PG gegenüber 5mol% PG hin.

Bei Verwendung des fluideren reinen SPC erfolgt aufgrund besserer Mischbarkeit eine Domänenbildung / Clusterung und damit Bindung des Proteins erst bei höherem Gehalt an Glykolipid.

Ausgewählte Präparationen wurden im Hinblick auf die genannten Clusterungseffekte mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht, die der Illustration dienen sollen. Abb. 40 zeigt die Aufnahme jeweils eines Liposoms mit einem kurzen Derivat (Man1) unterhalb und einem Derivat mit längerem Spacer (Man6) oberhalb der Schwellenkonzentration (je 10mol% Man).



**Abb. 40:** AFM-Aufnahme und Oberflächen-Scan von Man1- (oben) und Man6-Liposomen (unten), jeweils 10mol% Man

In der gedruckten Abbildung der Liposomen selbst schlecht sichtbar, zeigt die Darstellung der Oberflächen-Scans Unterschiede in der Struktur der Liposomenoberfläche. (Die Lage der Scans ist durch die Linie im Bild, die Lokalisierung definierter Bereiche durch die roten Pfeile gekennzeichnet.) Während Man1-Liposomen eine relativ glatte Oberfläche aufweisen (Fehlen zusammenhängender Bereiche), zeigt sich bei Man6 eine deutlichere Strukturierung und damit rauhere Oberfläche. Die relativ breiten Peaks (und Täler) können als entmischte Areale interpretiert werden, die auf eine Clusterung des Man6 zurückgeführt werden können. Diese Interpretation steht in Übereinstimmung mit den für die ConA-Bindungsergebnisse diskutierte Clusterbildung in Abhängigkeit von Spacerlänge und Man-Konzentration<sup>9</sup>.

Die Existenz eines Schwellenwertes der Ligandenkonzentration für das Auslösen der Lektin-Agglutination ist bereits seit längerem bekannt. RANDO und BANGERTER nennen als mögliche physiologische Funktion das Ein- bzw. Ausschalten von Zell-Zell-Erkennungsvorgängen [184]. Glykolipid-Schweleneffekte bei der Agglutination von Liposomen durch Lektine und die mögliche Rolle der Ligandenclusterung durch Phasenseparation sind in einer Reihe früherer Arbeiten für unterschiedliche Systeme belegt [rev. in 185]. Die Abhängigkeit der Schwellenkonzentration von der Spacerlänge finden ORR et al. an Man-Cholesterol-Derivaten, wobei übereinstimmend mit den hier gezeigten Ergebnissen kürzere Spacer eine höhere Glykolipidkonzentration für die ConA-Bindung erfordern [186]. CHAKRABARTI und PODDER zeigen, daß darüberhinaus die Diffusion von Glykoliganden in der Membran für die notwendige Oberflächendichte zur Lektinbindung von Bedeutung sein kann [187]. Diese Interpretation wird aus Ergebnissen abgeleitet, die verminderte Bindungsraten bei Ausschluß der Möglichkeit zur Lateraldiffusion zeigen [188]. Demgegenüber zeigen Untersuchungen an planaren Schichten, daß eine verlangsamte Lateraldiffusion in rigiden Matrices die Ligand-Protein-Wechselwirkung erleichtert [189]. Ob einer veränderten Lateraldiffusion oder der Clusterung die entscheidende Rolle zukommt, sei dahingestellt. Eine lokale Anreicherung von Liganden gilt in allen genannten Arbeiten als Voraussetzung für die Proteinbindung. Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen die Notwendigkeit der lokalen Anreicherung der Mannoside für eine Erkennung durch das Lektin, die für die einzelnen Mannoside bei unterschiedlicher Konzentration eintritt und von der Rigidität der Grundlipidmatrix beeinflußt ist. Letzteres weist auf eine Clusterbildung hin. Übereinstimmend mit dieser Interpretation

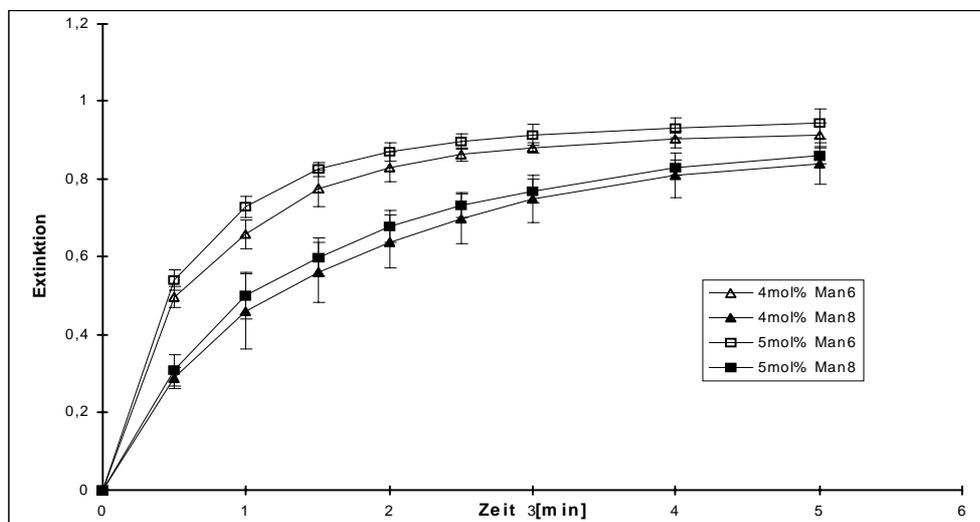
---

<sup>9</sup> Bei weiteren AFM-Untersuchungen erwies sich die Fusionsneigung der Vesikel auf der Substratoberfläche (Siliziumoxid) als äußerst problematisch. Es ist deshalb nicht möglich, an dieser Stelle Aufnahmen intakter Liposomen mit dem gleichem Mannosid unterhalb und oberhalb der Schwellenkonzentration zu zeigen. Auf den damit ausschließlich illustrativen Charakter der Aufnahmen wurde bereits hingewiesen, die jedoch die prinzipielle Eignung der Methode als direkten analytischen Zugang für die Untersuchung von Clusterungseffekten in Mischsystemen belegen.

konnte an Monoschichten solcher Mischsysteme (Man0, Man3, Man8 in DMPC, DPPC, DSPC) gezeigt werden, daß die Tendenz zur Phasenseparation der Mannoside mit wachsender Länge des Spacers sowie bei Kondensierung der Matrix zunimmt [190]. Dieses Verhalten wurde auch für weitere Mischsysteme mit Sialyl-Lewis<sup>x</sup> im Hinblick auf dessen Funktionalisierung gegenüber dem Rezeptor beschrieben [191]. Ergebnisse, die eine veränderte Lektinbindung durch Variierung der Lipidmatrix zeigen [192, 193], dürften z.T. ebenfalls durch damit verbundene Clusterung interpretierbar sein.

Die bereits in Kap. 4.3 genannten unterschiedlichen Literaturergebnisse zur minimalen Spacerlänge für die Lektinbindung sind daher sehr wahrscheinlich auf Unterschiede im Glykolipidgehalt und der Grundlipidmatrix der eingesetzten Liposomen zurückzuführen. Bei RCA<sub>120</sub>-Bindungsstudien an Gal-Liposomen finden bspw. SASAKI et al. [170] 2 EtO-Einheiten bei 10mol% Gal in DPPC/DCP/Chol, BENDAS [167] nennt 3 EtO-Einheiten bei 20mol% und 2 EtO-Einheiten bei 33mol% Gal in SPC als Mindestlänge des Spacers. Die eingangs gezeigte Untersuchung der ConA-Bindung bei Einsatz von 30mol% Man (Trübungsmessung), aus denen eine Mindestlänge von 2 EtO-Einheiten hervorgeht, macht im Vergleich mit den zuletzt gezeigten Ergebnissen (Abb. 38) den Zusammenhang zwischen Spacerlänge und Konzentration des Glykolipids deutlich. Die dort eingesetzten 30mol% Man schließen für Man2 bis Man4 die Schwellenkonzentration ein, für Man1 nicht. Offensichtlich gilt für die untersuchten Mannoside ab einer absoluten Mindestspacerlänge (1 EtO-Einheit) eine relative Mindestspacerlänge in Abhängigkeit vom Man-Gehalt.

Die Schwellenkonzentration nimmt mit zunehmender Spacerlänge erheblich ab. Abweichend davon erfordert Man8 im Vergleich mit Man6 wieder geringfügig höhere Konzentrationen in allen untersuchten Matrices (vgl. Abb. 39), was eine Veränderung der gezeigten Tendenz innerhalb der homologen Reihe andeutet. Abb. 41 stellt den zeitlichen Verlauf der ConA-Bindung von Man6 und Man8 unterschiedlicher Konzentration am Beispiel von SPC/Chol-Liposomen gegenüber.



**Abb. 41:** Zeitlicher Verlauf der ConA-Bindung an Man6- und Man8-Liposomen unterschiedlicher Man-Konzentration (Grundlipid SPC/Chol 7:3 M/M)

Man8 weist bei beiden gezeigten Konzentrationen im Vergleich mit Man6 eine geringere Agglutinationsgeschwindigkeit auf (Steilheit der Trübungszunahme), was eine verzögerte Bindung der Man-Liganden am ConA belegt. In allen anderen Matrices wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Verlängerung des Spacers (>8 EtO) wird den zitierten Untersuchungen an planaren Schichten zufolge [190, 189] sehr wahrscheinlich die Tendenz zur Entmischung und Domänenbildung verstärken, muß aber nicht mit einer Steigerung der Fähigkeit zur Lektinbindung verbunden sein. Auf die Bedeutung sowohl der Multivalenz als auch einer geeigneten räumlichen Anordnung von Liganden wurde in Kap. 2.3 bereits eingegangen. Für das Erreichen dieser Eigenschaften gegenüber einem bestimmten Rezeptor scheinen neben ausreichender Spacerlänge und der Ausbildung von KH-Clustern weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. Bindungsstudien von SHIMADA et al. [163] zeigen, daß bei terminaler Bindung von Gal-Resten (20 mol%) an Liposomen über PEG-Spacer verschiedener Länge (PEG<sub>10, 20, 40</sub>)<sup>10</sup> die Bindung durch RCA<sub>120</sub> nur im Falle von PEG<sub>10</sub> erfolgt, d.h. die Gal-Reste bei Einsatz der längeren Spacer (PEG<sub>20, 40</sub>) vom Lektin nicht erkannt werden. Die Autoren vermuten, daß die große Flexibilität der längeren PEG-Ketten eine geeignete Clusterung der Gal-Reste verhindert. Interessanterweise ist das Ausmaß der Lektinbindung für unterschiedliche Konzentrationen von Gal-PEG<sub>10</sub> im Bereich zwischen 5 und 20mol% kaum verändert, d.h. daß die Dichte auch der längeren Gal-Liganden im Sinne eines Schwellenwertes mit 20mol% ausreichend sein dürfte. Trotzdem erfolgt keine Bindung durch das Lektin. Leider liegen für die längeren PEG-Derivate keine Daten zum möglichen Einfluß einer veränderten Konzentration auf die Bindung vor. Dennoch machen die Ergebnisse im Vergleich mit Untersuchungen zur Aufnahme von antennären und Cluster-Galaktosiden [194-198] die Bedeutung einer *geeigneten* Clusterung gegenüber RCA<sub>120</sub> wie auch zellulären Gal-Rezeptoren deutlich. In vivo (Ratte) werden die o.g. Gal-PEG<sub>10</sub>-Liposomen nahezu vollständig von Kupffer-Zellen, nicht von Hepatozyten aufgenommen. BIESSEN et al. [199] finden die rezeptorvermittelte Aufnahme von laktosyliertem Poly-L-Lysin (≥5 Laktose-Reste) hingegen fast ausschließlich durch Hepatozyten. Die sehr intensiv untersuchten Wechselwirkungen gegenüber dem Asialoglykoprotein-Rezeptor von Hepatozyten und dem Gal-Rezeptor auf Kupffer-Zellen zeigen (obwohl beide Gal-erkennende Proteine), daß die strukturellen Anforderungen an Gal-Determinanten für die Bindung sehr spezifisch sind. Ähnlich hohe Spezifität trivalenter Man-Cluster verschiedener Struktur belegen KÖTTER et al. [200] gegenüber Man-bindenden Typ-1-Fimbriae von E.coli. Ob mit einem vorliegenden Targeting-System die konkreten Anforderungen (Ausbildung *spezifischer* Cluster) erfüllt werden, bleibt jeweils der experimentellen Untersuchung

---

<sup>10</sup> PEG<sub>40</sub> = 40 EtO, MW ~2000; PEG<sub>20</sub> = 20 EtO, MW ~1000; PEG<sub>10</sub> = 10 EtO, MW ~500

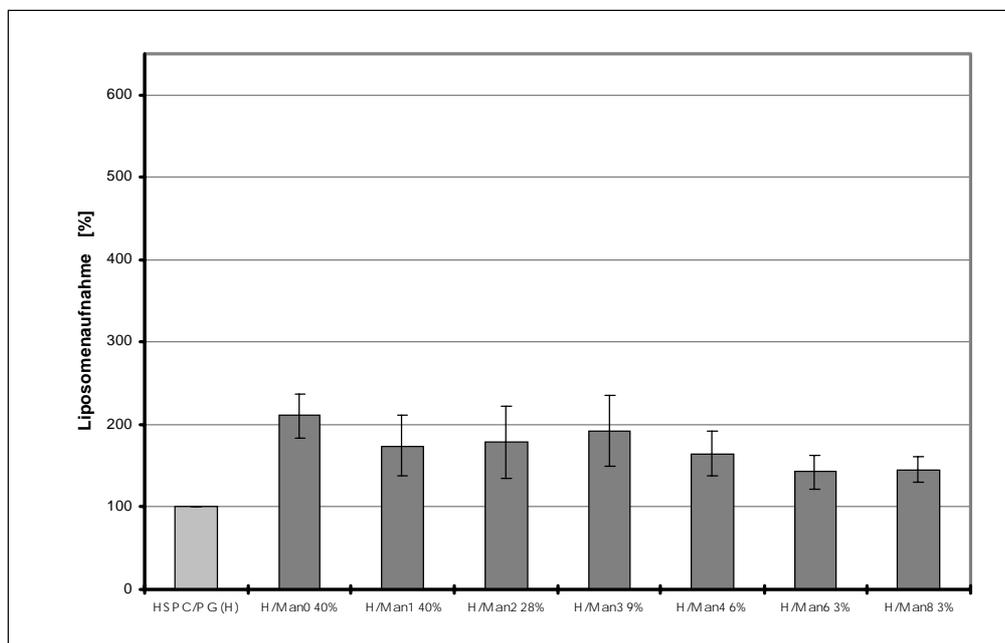
vorbehalten.

Zusammenfassend zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse zur ConA-Bindung, daß neben einer Mindestlänge des Spacers zwischen Lipid-Anker und KH-Kopfgruppe der räumlichen Organisation (Anreicherung bzw. Clusterung) der Liganden in der Membran entscheidende Bedeutung bei der Protein-Erkennung zukommt. Darüberhinaus spielt die Länge bzw. Flexibilität der Spacer eine wichtige Rolle. Unter Annahme einer wieder zunehmenden Schwellenkonzentration bei weiterer Verlängerung des Spacers (größer 8 EtO) wird das Optimum geeigneter Man-Cluster für ConA bei etwa 4 bis 8 EtO-Einheiten durchlaufen.

Für die Wechselwirkung mit einem bestimmten Rezeptor sind demnach mehrere Faktoren, wie die Exponiertheit der Liganden, ihre Clusterung und die Flexibilität des Spacers, maßgeblich, deren Zusammenwirken im jeweils erreichten Bindungsergebnis resultiert.

#### 4.5.2 Liposomen-Zell-Wechselwirkungen

Ungeachtet der beschränkten Übertragbarkeit solcher Ergebnisse auf andere KH-Rezeptoren wurden im letzten Teil der Arbeit Liposomen, deren Mannosidgehalt etwa der für die ConA-Bindung notwendigen (Schwellen-)Konzentration entspricht, an PTM getestet. Abb. 42 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.



**Abb. 42:** Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (Man-Gehalt im Bereich der Schwellenkonzentration ConA-Bindung) durch PTM nach 60min (n=5); Die Skalierung der Ordinate wurde zum besseren Vergleich wiederum der Skalierung aus Abb. 36 angeglichen.

Im Vergleich mit den Ergebnissen bei einem einheitlichen Mannosidgehalt von 10mol% (vgl. Abb. 36) zeigt sich, besonders bei Betrachtung der Mannoside mit längerem Spacer, ein verändertes Aufnahmeprofil. Durch die Angleichung der Mannosidkonzentrationen an

die in den Lektin-Bindungsstudien erhaltenen Ergebnisse erfolgt eine gewisse Nivellierung in der Aufnahme durch die Zellen, was auf eine Angleichung in der Liposomen-Zell-Wechselwirkung schließen läßt. Ob es sich dabei um eine Angleichung unterhalb oder oberhalb der für den konkreten Rezeptor (MR) notwendigen Konzentration handelt, kann nicht schlüssig beantwortet werden. HAENSLER und SCHUBER [201] finden die Schwellenkonzentration von Gal-Liposomen für die Bindung durch RCA und Gal-Rezeptoren von Peritonealmakrophagen (Maus) in vitro in etwa dem gleichen Konzentrationsbereich (10-15mol%) und erzielen eine Steigerung der Aufnahme von 50 bis 200% (in Abhängigkeit von der applizierten Liposomenmenge). Unter Annahme des Erreichens der notwendigen Schwellenkonzentration für den MR wären demnach alle Mannoside in ähnlicher Weise zur Rezeptorvermittlung befähigt. Gegen diese Interpretation spricht die Steigerung der Aufnahme auch durch Man0 (40mol%), für das in keinem der Experimente (Testung bis zu 60mol%) Bindungsfähigkeit gegenüber ConA gezeigt werden konnte.

Unter Einbeziehung der Gesamtheit der Ergebnisse ist bei der Interpretation des Einflusses der homologen Reihe der Mannoside vielmehr von einer Überlagerung unspezifischer Adsorption und Rezeptorbeteiligung auszugehen. Da aus allen bisher gezeigten Daten hervorgeht, daß Mannoside mit kurzem Spacer zu verstärkter Adhärenz der Liposomen und damit erhöhter Phagozytose führen, ist dieser Effekt auch bei erhöhtem Anteil dieser Mannoside (bis 40mol%) anzunehmen. Bei Derivaten mit längerem Spacer, die in relativ geringer Konzentration in der Liposomenmembran vorliegen (insbes. Man4 bis Man8 - 6mol% bis 3mol%), ist dieser Einfluß vernachlässigbar. Hier könnte es sich um eine Angleichung der Liposomen-Zell-Wechselwirkung über die Glykoliganden handeln, d.h. alle Liganden sind in entsprechender Konzentration unabhängig von ihrer Spacerlänge zur Ausbildung bindungsfähiger Cluster und damit zur Wechselwirkung mit dem Rezeptor befähigt. Einer solchen Interpretation zufolge wäre die Steigerung der Aufnahme durch kurze Mannoside und durch solche mit längerem Spacer unterschiedlichen Mechanismen zuzuschreiben. Wo die Grenze zwischen (in diesem Sinne) kurzen und längeren Spacern genau verläuft, ist von untergeordneter Bedeutung. Allein die relativ hohen Konzentrationen, die bei einer Spacerlänge bis 2 EtO-Einheiten für eine Proteinerkennung notwendig sind, schließen diese Derivate aufgrund der damit verbundenen Destabilisierung der Liposomen aus. Somit sind vor allem Man4, Man6, Man8 und evtl. längere Derivate für eine Rezeptorvermittlung interessant. Dessenungeachtet zeigen die erhaltenen Daten die Beeinflussung der Liposomen-Zell-Wechselwirkungen durch die Konzentration der Liganden und bestätigen die Relevanz der an ConA erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich.

Für eine gesonderte Auswertung MR<sup>+</sup>-Zellen war das Datenmaterial dieser (letzten) Untersuchungen nicht ausreichend. Die Testung der Liposomenaufnahme unter weiterer Variierung der Man-Konzentration muß weiterführenden Untersuchungen überlassen werden. Die zuletzt dargestellten Ergebnisse sind deshalb als hypothetischer Ansatz und nicht im Sinne eines abgeschlossenen Ergebnisses aufzufassen. Sie sollen vor allem im Sinne eines Ausblicks die Möglichkeit der untersuchten Strukturen für das Erreichen einer effizienten Rezeptorvermittlung und damit Targetings aufzeigen, deren Potential mit den vorgelegten Ergebnissen nicht erschöpft scheint. Die Inkorporierung sog. Clusterlipide in oder Bindung multivalenter KH-Konjugate (wie Man-BSA) an Liposomen kann dazu ein Weg sein. Ob solche vorgeformten und je nach Struktur relativ fixen Cluster den Erfordernissen gegenüber einem anvisierten Rezeptor entsprechen, ist vor der experimentellen Untersuchung schwer abzuschätzen. Wie bereits erwähnt (Kap 2.4.2.2), belegt die Literatur eine Vielzahl von mehr oder minder erfolgreichen Ansätzen zur Schaffung von Multivalenz bzw. Clusterung, die sich unterschiedlichster Strukturen bedienen [202-204].

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß nicht, wie ursprünglich angenommen, die Exponiertheit der Liganden die entscheidende Rolle bei der Erkennung spielt, sondern vor allem der lokalen Anreicherung von Liganden durch Clusterung der Glykolipide eine überragende Bedeutung zukommt. Obgleich eine Mindestlänge des Spacers zwischen KH-Kopfgruppe und Lipidanker erforderlich ist, beeinflußt die Spacerlänge vor allem die Eigenschaften des Glykolipids hinsichtlich der Tendenz zur Entmischung bzw. Clusterbildung. Darüberhinaus bestimmt die Spacerlänge die Flexibilität der einzelnen KH-Liganden. Diese Faktoren bestimmen insgesamt die (mögliche) Anordnung der Liganden, die sich gegenüber einem bestimmten Rezeptor als geeignet erweisen kann. Insofern sind die Anforderungen für eine effiziente Rezeptor-Wechselwirkung als geeignete Clusterung zu bezeichnen, die vom Zusammenwirken der genannten Faktoren abhängt. Das Erreichen geeigneter Anordnung kann für die untersuchten Liposomen als variable Clusterung aufgefaßt werden, die von den Eigenschaften der Glykolipide und der Grundlipidmatrix bestimmt wird. Die Untersuchung des Einflusses einer Mischung von Derivaten verschiedener Spacerlänge wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, könnte aber aus derzeitigem Stand der Ergebnisse wichtige Erkenntnisse zum perspektivischen Design sog. antennärer bzw. Cluster-Lipide liefern. Die Anwendung physiko-chemischer Methoden, die eine direkte Untersuchung von Liposomen-Oberflächenstrukturen zulassen, scheint dabei unverzichtbar.

Die Inkorporierung vergleichsweise einfacher Strukturen, wie die hier untersuchten Alkylglykoside, stellt unter Variierung von Spacerlänge und Lipidmatrix ein flexibles System

zur Untersuchung der beteiligten Mechanismen dar. Angesichts des erheblichen Synthesaufwands zur Darstellung von Cluster-Strukturen ist der Einsatz monovalenter Derivate ein ebenso potenter Ansatz zur Optimierung der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung. Trotz der unterschiedlichen Bewertung zur Eignung lieferte die Untersuchung der homologen Reihe der Mannoside eine Reihe von Erkenntnissen, die das Verständnis der beteiligten Mechanismen erst ermöglichten. Die Testung einiger weniger Mannoside mit weiter verlängertem Spacer sollte weiteren Aufschluß über die Rolle und wechselseitige Beeinflussung von Spacerlänge, Exponiertheit und Clusterung zur Ausbildung geeigneter Anordnung der Liganden und damit zum Erreichen eines rezeptorvermittelten Liposomen-Targetings geben.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wechselwirkung oberflächenmodifizierter Liposomen mit Makrophagen. Durch den Einbau von Mannosiden (Man) in die Vesikelmembran wurden ligandentragende Liposomen hergestellt und auf die Beeinflussung der Phagozytose über Mannoserezeptoren (MR) an Makrophagen *in vitro* getestet. Dazu fanden Alkylmannoside Verwendung, die im lipophilen Bereich konstant (Hexadecyl-Anker) und im hydrophilen Kopfgruppenbereich durch PEG-Spacer zunehmender Länge zwischen Lipidanker und KH-Ligand variieren. Die schrittweise Verlängerung des Spacers im Sinne einer homologen Reihe sollte die Veränderung bzw. Optimierung der Erkennbarkeit der Liganden durch Rezeptoren systematisch untersuchen. Um die Komplexität der beteiligten Mechanismen aufzuzeigen, wurde die theoretische Betrachtung wie auch die Diskussion der Ergebnisse nicht auf Liposomen-Zell-Wechselwirkungen beschränkt.

Die eingesetzten Liposomen wurden hinsichtlich Einschluß- bzw. Retentionsverhalten und Größe charakterisiert. Die Wahl des Grundlipidgemisches HSPC/PG 9:1 (M/M) garantierte ausreichende Vesikelstabilität unter Inkubationsbedingungen (Zellkulturmedium, 37°C).

Die Untersuchung der Zugänglichkeit der Man-Liganden für Rezeptorproteine mittels ConA-Bindung ergab eine Mindestlänge des Spacers, die für die Erkennung durch das Lektin notwendig ist. In Abhängigkeit von der Methode wurden 1 oder 2 EtO-Einheiten als Mindestspacerlänge erhalten. Übereinstimmend zeigten die Bindungsstudien die räumliche Exponiertheit der Man-Kopfgruppen bei Mannosiden ab einer Spacerlänge von 2 EtO-Einheiten. Daraus wurde für Derivate mit längerem Spacer auf die prinzipielle Möglichkeit zur Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren geschlossen.

Zur Differenzierung spezifischer (rezeptorvermittelter) und unspezifischer Wechselwirkungen kamen rezeptornegative ( $MR\emptyset$ ) und rezeptorpositive ( $MR\oplus$ ) Zellen zum Einsatz. HL60- und U937-Zellen, die unter PMA-Inkubation in Makrophagenähnliche differenzieren, wurden als  $MR\emptyset$ , native humane Pericard-Monozyten/Makrophagen und Peritonealmakrophagen (PTM) als  $MR\oplus$  Zellmodelle verwendet. Die Aufnahme von Man-Liposomen (10mol% Man) wurde jeweils gegen unmodifizierte Liposomen getestet.

Gegenüber  $MR\emptyset$  Zellen bewirken kurze Mannoside (Man0, Man1) eine Steigerung der Liposomenaufnahme, die auf die Störung der Integrität der Vesikelmembran zurückzuführen ist. Die damit verbundene Zunahme von Membranstörstellen führt zu einer erhöhten Adhärenzneigung der Vesikel, die als initialer Schritt der Phagozytose die verstärkte Aufnahme der Liposomen durch die Zellen bedingt. Längere Mannoside (ab Man2), für die die ConA-Bindung räumliche Exponiertheit auswies, bewirken eine verminderte Liposomenaufnahme. Der Vergleich des Adhäsionsverhaltens mit der

Aufnahme der Liposomen zeigt, daß diese Mannoside über die ebenfalls verminderte Adhäsionsneigung hinaus zur Unterdrückung der Aufnahme beitragen. Dabei wächst das Ausmaß der Unterdrückung mit zunehmender Spacerlänge, was auf eine sterische Hinderung der Phagozytose durch die Mannoside schließen läßt.

Der Einfluß der KH-Kopfgruppe auf diese unspezifischen Wirkungen wurde durch Untersuchungen unter Verwendung strukturgleicher Glucoside (Glc), Galaktoside (Gal) und Cellobioside getestet. Der Einsatz der monosaccharidischen Glykolipide (Glc, Gal) zeigt eine ähnliche Beeinflussung der Phagozytose mit zunehmender Spacerlänge. Bei Einsatz der disaccharidischen Cellobioside ist die Aufnahme durch die Zellen aufgrund der größeren Kopfgruppe weiter verringert. Obwohl der Einfluß von Glykolipiden gleicher Spacerlänge quantitative Unterschiede zeigt, ist die Tendenz innerhalb der jeweils homologen Reihe übereinstimmend. Danach führen kürzere Derivate vor allem durch Membranstörungen zur Verstärkung der Adhärenz, Glykolipide mit längerem Spacer (oder größerer Kopfgruppe) wirken vor allem als sterische Barriere. Die Beeinflussung der Liposomenaufnahme wird durch das Überwiegen einer dieser Eigenschaften bestimmt. Gegenüber „klassischen“ Stealth-Liposomen (PEG 2000, PEG 5000) ist die Unterdrückung der Liposomenaufnahme durch die untersuchten Derivate (Spacer max. 4 EtO-Einheiten) weniger ausgeprägt, dürfte sich aber mit weiterer Verlängerung der Spacer verstärken.

Der Einsatz MR<sup>+</sup> Zellen untersucht die rezeptorvermittelte Aufnahme als zentrale Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit. Dem Nachweis des MR am verwendeten Zellmaterial galt daher besondere Aufmerksamkeit. Dazu wurden sowohl die Detektion der Rezeptorfunktion durch Bindung bzw. Verdrängung von Man-Liganden (Man-BSA<sub>FITC</sub>) als auch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers (mAb-MR) herangezogen.

Die Ergebnisse zeigen für beide Zellmodelle Bindung von Man-BSA<sub>FITC</sub>, dessen spezifische Verdrängung durch Methylglykoside (MeMan, MeGal) nur in geringem Maße und erst bei erheblichem Überschuß der Verdrängungsagenzien möglich ist. Die demgegenüber relativ große Verdrängungspotenz von unmannosyliertem BSA belegt die Beteiligung sowohl spezifischer als auch unspezifischer Prozesse. Literaturdaten zeigen, daß die Verdrängung durch Liganden geringerer Komplexität häufig problematisch ist und nicht oder nur unvollständig gelingt. Die hier beobachtete relativ geringe Potenz zur spezifischen Verdrängung kann somit durch die fehlende Komplexität des MeMan bedingt sein. Dessenungeachtet zeigen die erhaltenen Ergebnisse die Beteiligung einer Rezeptorvermittlung und damit die Anwesenheit von MR bei den untersuchten Zellen, lassen allerdings keine Aussagen über deren Ausmaß zu.

Gleiches gilt für die Inhibierung der Aufnahme von Man-Liposomen. Auch hier zeigte sich eine fehlende oder geringe Potenz von Methylglykosiden zur spezifischen Verdrängung. Faßt man die untersuchten Liposomen als multivalente Man-Konjugate auf, gelten die

Aussagen zur unterschiedlichen Komplexität der Liganden adäquat. Im Gegensatz dazu war in einigen Experimenten nach Vor/Coinkubation mit MeMan eine Steigerung der Aufnahme von Man-Liposomen (Spacer  $\geq 4$  EtO-Einheiten) zu beobachten. Die Literatur liefert für beide Ergebnisse Interpretationsansätze. Eine Rezeptorbeteiligung wäre demnach bei Mannosiden mit längerem Spacer zu vermuten, bleibt aber spekulativ. Die sehr unterschiedlichen Literaturergebnisse und diskutierten Mechanismen, die teils in Übereinstimmung, teils im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen stehen, machen die Vielzahl beteiligter Faktoren für eine Rezeptorverdrängung deutlich, die im Zusammenwirken von Komplexität, Flexibilität und Konzentration der Liganden den jeweils erzielten Effekt bestimmen. Ungeachtet der möglichen Erklärungen muß die fehlende Potenz der Verdrängung mittels Methylglykosiden zur Klärung einer Rezeptorvermittlung bei der Liposomenaufnahme festgestellt werden, weshalb im weiteren auf Versuche zur Inhibierung verzichtet wurde.

Die Detektion des MR mittels mAb-MR zeigt, daß jeweils nur ein Teil der untersuchten Monozyten/Makrophagen MR exprimiert: es wurden zwischen 15% und 57% der Zellen als MR $\oplus$  bestimmt. In Übereinstimmung mit Literaturangaben zeigte die Beeinflussung der Antikörperbindung durch Man-Liganden, daß der mAb-MR in der Nähe der Man-Erkennungsdomänen bindet. Eine simultane Inkubation der Zellen mit Man-Liposomen und mAb-MR zur direkten Selektion und Auswertung von MR $\oplus$  Zellen war daher nicht möglich. Trotzdem ist die sichere Detektion des MR ein essentielles Instrument zur Charakterisierung der Zellpopulationen und muß aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als einzig geeignete Methode eines sensitiven und quantifizierbaren Nachweises bewertet werden.

Die Liposomenaufnahme durch native (MR $\oplus$ ) Zellen wies eine erhebliche Streuung der Ergebnisse auf, die eindeutige Effekte und Tendenzen zunächst nur schwer erkennen ließ. Die Auswertung der Monozyten/Makrophagen-Gesamtpopulationen ergab für kurze Mannoside wiederum eine erhöhte Liposomenaufnahme. Bei Einsatz der längeren Mannoside wurden sehr moderate Steigerungsraten erzielt, die hinter den Erwartungen für eine rezeptorvermittelte Aufnahme zurückblieben. Erst die selektive Auswertung von MR $\oplus$  Zellen und deren Vergleich mit der Gesamtpopulation läßt deutliche Unterschiede im Einfluß der Mannoside erkennen. Danach sind für die gesteigerte Liposomenaufnahme durch kürzere Mannoside (Man0, Man1, Man2) vor allem (MR $\emptyset$ ) Monozyten verantwortlich, was in Übereinstimmung mit den an HL60 und U937 erhaltenen Ergebnissen steht. Demgegenüber führen Derivate mit langem Spacer (Man6, Man8) zu einer deutlichen Steigerung der Liposomenaufnahme durch MR $\oplus$  Zellen. Eine Rezeptorvermittlung kann auf Grundlage dieser Ergebnisse für Man0 bis Man4 weitgehend ausgeschlossen werden. Die erhöhte Aufnahme läßt hingegen für Man6 und Man8 auf eine Rezeptorbeteiligung

schließen. Bemerkenswert bleibt die mangelnde Fähigkeit der Mannoside mittlerer Spacerlänge (Man3, Man4) zur Rezeptorvermittlung, die den Ausgangsuntersuchungen zufolge vom Modellrezeptor ConA erkannt werden. Neben der Exponiertheit der Man-Kopfgruppen sind offensichtlich weitere Faktoren für die Rezeptorerkennung von Bedeutung.

Deshalb wurde durch Variierung von Mannosidgehalt und Grundlipidmatrix die Rolle der Liganden-Clusterung bei der Rezeptorbindung näher untersucht. Um dabei von den vergleichsweise komplexen Mechanismen bei Liposomen-Zell-Wechselwirkungen zu abstrahieren, wurde wiederum ConA als Modellrezeptor eingesetzt.

Die Bindung des Lektins erfordert eine Mindestkonzentration der Mannoside, die mit wachsender Spacerlänge abnimmt. Diese Schwellenkonzentration, die für Man1 bis Man8 in einer SPC/Chol-Matrix Werte zwischen 40mol% und 3mol% aufweist, verschiebt sich in einer rigideren Lipidmatrix (DPPC/PG) zu jeweils kleineren, in einem fluideren Grundlipid (SPC) zu größeren Werten. Gegenüber Man0 erfolgt keine Bindung. Die Existenz einer Schwellenkonzentration und deren Abhängigkeit von der Lipidmatrix läßt auf Clusterbildung schließen, die auf unterschiedliche Mischbarkeit der einzelnen Mannoside in der jeweils vorliegenden Grundlipidmatrix zurückzuführen ist. Eine Anreicherung von Mannosiden an Domängengrenzen der Matrix spielt dabei ebenfalls eine Rolle. Dementsprechend ist die Fähigkeit zur Bindung des Lektins relativ unabhängig von der Länge des Spacers und belegt eine vorrangige Rolle der Liganden-Clusterung. Die gegenüber Man6 wieder erhöhte Schwellenkonzentration bei Man8 und Literaturergebnisse zeigen darüberhinaus eine Beeinflussung der Lektinbindung durch die Flexibilität der Spacer. Für die Wechselwirkung mit einem Rezeptor sind demnach die Exponiertheit der Liganden, ihre Clusterung und Flexibilität maßgeblich, deren Zusammenwirken die Fähigkeit zur Bindung bestimmt.

Trotz der beschränkten Übertragbarkeit solcher Ergebnisse auf andere KH-Rezeptoren wurden im letzten Teil der Arbeit Liposomen, deren Mannosidgehalt etwa der für die ConA-Bindung notwendigen (Schwellen-)Konzentration entsprach, an PTM getestet. Die Ergebnisse zeigen eine Nivellierung der Liposomenaufnahme, was auf eine Angleichung der Liposomen-Zell-Wechselwirkung schließen läßt. Ob es sich dabei um eine Angleichung unterhalb oder oberhalb der für den konkreten Rezeptor (MR) notwendigen Konzentration handelt, kann nicht schlüssig beantwortet werden. Die vorstehenden Untersuchungen lassen verschiedene Interpretationen zu und sind im Sinne eines Ansatzes für weitere Arbeiten zu verstehen. Dessenungeachtet zeigen diese Daten die Beeinflussung der Liposomen-Zell-Wechselwirkungen durch die Konzentration der Liganden und bestätigen die Relevanz der an ConA erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich.

Ausgehend von der Aufgabenstellung zeigen die Ergebnisse insgesamt, daß Mannoside ohne oder mit kurzem Spacer (gegenüber allen untersuchten Zellmodellen) vorrangig durch die Verstärkung der Vesikeladhärenz die Liposomenaufnahme steigern. Sofern vorhanden, erfordert die Fähigkeit zur Bindung durch Rezeptorproteine hohe Konzentrationen dieser Mannoside in der Membran. Allein durch die damit verbundene Destabilisierung der Liposomen scheidet ihr Einsatz für ein rezeptorvermitteltes Targeting aus. Derivate mit längerem Spacer sind demgegenüber in geringeren Konzentrationen zur Bindung an Rezeptorproteinen befähigt. Für eine Wechselwirkung mit MR nativer Zellen erwiesen sich besonders Man6 und Man8 als geeignet. Zur Bindung durch ConA wird die optimale Spacerlänge offenbar durch Man6 bedient. Gegenüber dem MR nativer Zellen scheint mit Man8 das Optimum der Spacerlänge noch nicht erreicht. Neben Man6 und Man8 sind damit längere Derivate für das Erreichen einer rezeptorvermittelten Liposomenaufnahme als potent zu bewerten.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß nicht der Exponiertheit, sondern der räumlichen Organisation der Liganden entscheidende Bedeutung bei Protein-Erkennungsprozessen zukommt. Obgleich eine Mindestlänge des Spacers zwischen KH-Kopfgruppe und Lipidanker erforderlich ist, beeinflusst die Spacerlänge vor allem die Eigenschaften des Glykolipids hinsichtlich seiner Tendenz zur Entmischung bzw. Clusterbildung. Darüberhinaus bestimmt die Spacerlänge die Flexibilität der einzelnen KH-Liganden. Für den Erfolg beim Erreichen effizienter Rezeptorbindung ist daher eine geeignete Clusterung bzw. Anordnung notwendig, die vom Zusammenwirken der genannten Faktoren abhängt. Ob mit einem vorliegenden Targeting-System diese Anforderungen erfüllt werden, bleibt der experimentellen Untersuchung vorbehalten.

Der Einsatz vergleichsweise einfacher Strukturen, wie der hier verwendeten Alkylglykoside, stellt unter Variierung von Spacerlänge, Glykosidkonzentration und Lipidmatrix ein flexibles System zur Untersuchung der beteiligten Mechanismen dar. Angesichts des erheblichen Synthesaufwands zur Darstellung vorgeformter Cluster-Strukturen ist der Einsatz monovalenter Derivate ein ebenso potenter Ansatz zur Optimierung der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung, dessen Potential mit den vorliegenden Ergebnissen nicht erschöpft ist. Die Testung einiger weniger Mannoside mit weiter verlängertem Spacer sollte die Beantwortung offener Fragen zur Ausbildung geeigneter Anordnung der Liganden zulassen und damit das Erreichen rezeptorvermittelten Liposomen-Targetings ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Baenkler H.W. (Hrsg.), Medizinische Immunologie, Losebl.-Ausg., ecomed, Landsberg/Lech 1995
- 2 van Furth R., Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages in *Mononuclear Phagocytes*, van Furth R. (ed.), Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht (1992), 3-12
- 3 Pontow S.E., Kery V., Stahl P.D., *Int. Rev. Cytol.* 137B (1992), 221-244
- 4 Klinische Immunologie und Allergologie, Jäger L. (Hrsg.), Teil 1/2, 3. erw. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena 1989
- 5 van Oss, Phagocytosis in *Methods Enzymol.* 132 (1986), 3-15, Academic Press, New York
- 6 Janeway C.A., Travers P., Immunologie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg ... 1995
- 7 Absolom D.R., Oponins and dysopsonins in *Methods Enzymol.* 132 (1986), 281-318, Academic Press, New York
- 8 Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R.A., *J. Exp. Med.* 169 (1989), 1733-1745
- 9 Sastry K., Ezekowitz R.A., *Curr. Opin. Immunol.* 5 (1993), 59-66
- 10 Holmskov U., Jensenius J.C., *Behring Inst. Mitt.* 93 (1993), 224-235
- 11 Haurum J.S., Thiel S., Haagsman H.P., Laursen S.B., Larsen B., Jensenius J.C., *Biochem. J.* 293 (1993), 873-878
- 12 Absolom D.R., *Can. J. Microbiol.* 34 (1988), 287-298
- 13 Kohada A., Miyake Y., Sugai M., Tsuru H., Suginaka H., *Chemotherapy* 37 (1991), 50-56
- 14 Ofek I., Goldhar J., Keisari Y., *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995), 239-276
- 15 Gordon S., Perry V.H., Rabinowitz S., Chung L.P., Rosen H., *J. Cell Sci. Suppl.* 9 (1988), 1-26
- 16 Relman D., Tuomanen E., Falkow S., Golenbock D.T., Saukkonen K., Wright S.D., *Cell* 61 (1990), 1375-1382
- 17 Rao S.P., Ogata K., Catanzaro A., *Infect. Immun.* 61 (1993), 663-670
- 18 Ofek I., Sharon N., *Infect. Immun.* 56 (1988), 539-547
- 19 Gbarah A., Gahmberg C.G., Ofek I., Jacobi U., Sharon N., *Infect. Immun.* 59 (1991), 4524-4530
- 20 Sauter S.L., Rutherford S.M., Wagener C., Shively J.E., Hefta S.A., *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 15510-15516
- 21 Sandberg A.L., Mudrick L.L., Cisar J.O., Metcalf J.A., Malech H.L., *Infect. Immun.* 56 (1988), 267-269
- 22 Ofek I., Rest R.F., Sharon N., *ASM News* 58 (1992), 429-435
- 23 Bodmer J.L., Physiology and Pathology in *Mononuclear Phagocytes*, Dean R.T. and Jessup W. (eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1985), 68-78
- 24 Palatnik D.G., Borojevic R., Previato J.O., Mendonca-Previato L., *Infect. Immun.* 57 (1989), 754-763
- 25 Russel D.G., Talamas-Rohana P., *Immunol. Today* 10 (1989), 328-333
- 26 Ross G.D., Vetvicka V., *Clin. Exp. Immunol.* 92 (1993), 181-184
- 27 Salmon J.E., Kapur S., Kimberly R.P., *J. Exp. Med.* 166 (1987), 1798-1813
- 28 Roseman S., *Chem. Phys. Lipids* 5 (1970), 270-297
- 29 Ashwell G., Morell A., *Adv. Enzymol.* 41 (1974), 99-128
- 30 Prieels J.P., Pizzo S.V., Glasgow L.R., Paulson J.C., Hill R.L., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75 (1978), 2215-2219
- 31 Schlesinger P.H., Doebber T., Mandell B., Deschryver C., Miller J., Rodman J., Stahl P., *Biochem. J.* 176 (1978), 103-111
- 32 Shepherd V.L., Lee Y.C., Schlesinger P.H., Stahl P.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1019-1022
- 33 Kaplan A., Achord D.T., Sly W.S., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74 (1977), 2026-2030
- 34 Drickamer K., Taylor M.E., *Annu. Rev. Cell Biol.* 9 (1993), 237-264

- 35 McWilliam A.S., Tree P., Gordon S., Carbohydrate recognition receptors of the macrophage and their regulation in *Mononuclear Phagocytes*, van Furth R. (ed.), Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht (1992), 224-232
- 36 Imamura T., Toyashima S., Osawa T., *Biochim. Biophys. Acta* 805 (1984), 235-244
- 37 Kawasaki T., Masayuki I., Kozutsumi Y., Yamashima I., *Carbohydrate Res.* 151 (1986), 197-206
- 38 Rice K.G., Weiss O.A., Barthel T., Lee R.T., Lee Y.C., *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 18429-18434
- 39 Schlepper-Schäfer J., Kolb-Bachofen V., Kolb H., *Biochem. J.* 186 (1980), 827-831
- 40 Schlepper-Schäfer J., Kolb-Bachofen V., *Blood Cells* 14 (1988), 259-269
- 41 Cherayil B.J., Chaitovitz S., Wong C., Pillai S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 7324-7328
- 42 Cherayil B.J., Weiner S.J., Pillai S., *J. Exp. Med.* 170 (1989), 1959-1972
- 43 Crocker P.R., Gordon S., *J. Exp. Med.* 164 (1986), 1862-1875
- 44 Crocker P.R., Werb Z., Gordon S., Bainton D.F., *Blood* 76 (1990), 1131-1138
- 45 Czop J.K., Austen K.F., *J. Immunol.* 134 (1985), 2588-2593
- 46 Czop J.K., Kay J., *J. Exp. Med.* 173 (1991), 1511-1520
- 47 Vlassara H., Brownlee M., Cerami A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), 5588-5592
- 48 Radoff S., Cerami A., Vlassara H., *Diabetes* 39 (1990), 1510-1518
- 49 Dahms N.M., Lobel P., Kornfeld S., *J. Biol. Chem.* 264 (1989), 12115-12118
- 50 Roche A.C., Midoux P., Bouchard P., Monsigny M., *FEBS Lett.* 193 (1985), 63-68
- 51 Molema G., Meijer D.K.F., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 14 (1994), 25-50
- 52 Monsigny M., Roche A.-C., Midoux P., Mayer R., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 14 (1994), 1-24
- 53 Ludwig T., Le Borgne R., Hoflack B., *Trends Cell Biol.* 5 (1995), 202-206
- 54 Ezekowitz R.A.B., The mannose receptor and phagocytosis in *Mononuclear Phagocytes*, van Furth R. (ed.), Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht (1992), 208-213
- 55 Taylor M.E., Conary J.T., Lennartz M.R., Stahl P.D., Drickamer K., *J. Biol. Chem.* 265 (1990), 12156-12162
- 56 Ezekowitz R.A.B., Sastry K., Bailly P., Warner A., *J. Exp. Med.* 172 (1990), 1785-1794
- 57 Mullin N.P., Hall K.T., Taylor M.E., *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 28405-28413
- 58 Shepherd V.L., Campbell E.J., Senior R.M., Stahl P.D., *J. Reticuloendothel. Soc.* 32 (1982), 423-431
- 59 Kataoka M., Tavassoli M., *Exp. Hematol.* 13 (1985), 44-50
- 60 Stahl P., Schlesinger P.H., Sigardson E., Rodman J.S., Lee Y.C., *Cell* 19 (1980), 207-215
- 61 Lennartz M.R., Cole F.S., Stahl P.D., *J. Biol. Chem.* 264 (1989), 2385-2390
- 62 Taylor M.E., Drickamer K., *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 399-404
- 63 Taylor M.E., Bezouska K., Drickamer K., *J. Biol. Chem.* 267 (1992), 1719-1726
- 64 Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A., *Nature* 360 (1992), 127-134
- 65 Ezekowitz R.A.B., Williams D.J., Koziel H., Armstrong M.Y.K., Warner A., *Nature* 351 (1991), 155-158
- 66 Murai M., Aramaki Y., Tsuchiya S., *J. Leukoc. Biol.* 57 (1995), 687-691
- 67 Fogelman A.M., Seager J., Groopman J.E., Berliner J.A., Haberland M.E., Edwards P.A., Golde D.W., *J. Immunol.* 131 (1983), 2368-2373
- 68 DeFife K.M., Jenney C.R., McNally A.K., Colton E., *J. Immunol.* 158 (1997), 3385-3390
- 69 Goldstein I.J., Hugues R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N., *Nature* 285 (1980), 66
- 70 Barondes S.H., *Trends Biochem. Sci.* 13 (1988), 480-482
- 71 Cook G.M.W., *J. Cell Sci.* 4 (1986), 45-70
- 72 Kornfeld R., Kornfeld S., *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985), 631-664
- 73 Barondes S.H., *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981), 207-231
- 74 Sharon N., Lis H., *Science* 276 (1989), 227-246
- 75 Gabius H.-J., *Pharm. Res.* 15 (1998), 23-30

- 76 Drickamer K., J. Biol. Chem. 263 (1988), 9557-9560
- 77 Barondes S.H., Science 223 (1984), 1259-1264
- 78 Whitney P.L., Powell J.T., Sanford G.L., Biochem. J. 238 (1986), 683-689
- 79 Kasai K.-I., Hirabayashi J., J. Biochem. 119 (1996), 1-8
- 80 Drickamer K., Dordal M.S., Reynolds L., J. Biol. Chem. 261 (1986), 6878-6887
- 81 Spiess M., Biochemistry 29 (1990), 10009-10018
- 82 Weis W.I., Crichlow G.V., Murthy H.M.K., Hendrickson W.A., Drickamer K., J. Biol. Chem. 266 (1991), 20678-20686
- 83 Merkle R.K., Cummings R.D., Lectin affinity chromatography of glycopeptides in *Methods Enzymol.* 138 (1987), 232, Academic Press, New York
- 84 Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G., Montreuil J., Eur. J. Biochem. 117 (1981), 41-55
- 85 Shinohara Y., Sota H., Kim F., Shimizu M., Goto M., Tosu M., Hasegawa Y., J. Biochem. 117 (1995), 1076-1082
- 86 Reddy V.S., Rao V.S.R., Int. J. Biol. Macromol. 14 (1992), 185-192
- 87 Ogata S., Muramatsu T., Kobata A., J. Biochem. 78 (1975), 687-696
- 88 Imberty A., Perez S., Glycobiol. 4 (1994), 351-366
- 89 Gabius H.-J., Brinck U., Lüsebrink T., Ciesiolka T., Gabius S., Histochem. J. 23 (1991), 303-311
- 90 Kery V., Krepinsky J.J., Warren C.D., Capek P., Stahl P.D., Arch. Biochem. Biophys. 298 (1992), 49-55
- 91 Roche A.C., Barzilay M., Midoux P., Junqua S., Sharon N., Monsigny M., J. Cell Biochem. 22 (1983), 131-140
- 92 Monsigny M., Roche A.-C., Midoux P., Biol. Cell 51 (1984), 187-196
- 93 Drickamer K., Cell 67 (1991), 1029-1032
- 94 Harrison F.L., Chesterson C.J., FEBS Lett. 122 (1980), 157-165
- 95 Gabius H.-J., Int. J. Biochem. 26 (1994), 469-477
- 96 Lampreave F., Alava M.A., Pineiro A., J. Chromatogr. A 698 (1995), 107-122
- 97 Rademacher T.W., Parekh R.B., Dwek R.A., Annu. Rev. Biochem. 57 (1988), 735-838
- 98 Parekh R.B., Curr. Opin. Struct. Biol. 1 (1991), 750-754
- 99 Hatton M.W.C., März L., Regoeczi E., Trends Biochem. Sci. 8 (1983), 287-291
- 100 Betageri G.V., Jenkins S.A., Parson D.L., Liposome drug delivery systems, Technomic Publishing Co., Lancaster (1993)
- 101 Schreier H., Pulmonary application of liposomes in *Medical Applications of Liposomes*, Lasic D.D. and Papahadjopoulos D. (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam (1998), 221-230
- 102 Lasic D.D., Liposomes: from physics to applications, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993)
- 103 Cevc G., Blume G., Biochim. Biophys. Acta 1124 (1992), 226-232
- 104 Gregoriadis G., Senior J., FEBS Lett. 119 (1980), 43-46
- 105 Moghimi S.M., Patel H.M., FEBS Lett. 233 (1988), 143-14
- 106 New R.R.C., Black D.V.C., Parker R.J., Puri A., Scherphof G.L., Liposomes in biological systems in *Liposomes: a practical approach*, New R.R.C. (ed.), Oxford University Press, Oxford (1990), 221-252
- 107 Liu D., Liu F., Song Y.K., Biochim. Biophys. Acta 1235 (1995), 140-146
- 108 Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H., Pharm. Res. 11 (1994), 402-406
- 109 Blume G., Cevc G., Biochim. Biophys. Acta 1029 (1990), 91-97
- 110 Gabizon A., Papahadjopoulos D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85 (1988), 6949-6953
- 111 Jamshaid M., Farr S.J., Kearney P., Kellaway I.W., Int. J. Pharm. 48 (1988), 125-131
- 112 Moghimi S.M., Porter C.J.H., Illum L., Davis S.S., Int. J. Pharm. 68 (1991), 121-126
- 113 Woodle M.C., Newman M.S., Martin F.J., Int. J. Pharm. 88 (1992), 327-334
- 114 Moghimi S.M., Davis S.S., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 11 (1994), 31-59

- 115 Blume G., Cevc G., *Biochim. Biophys. Acta* 1146 (1993), 157-168
- 116 Lasic D.D., *Angew. Chem.* 106 (1994), 1765-1779
- 117 Woodle M.C., Lasic D.D., *Biochim. Biophys. Acta* 1113 (1992), 171-199
- 118 Allen T.M., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13 (1994), 285-309
- 119 Litzinger D.C., Buiting A.M., van Rooijen N., Huang L., *Biochim. Biophys. Acta* 1190 (1994), 99-107
- 120 Boermann O.C., Oyen W.J.G., Storm G., Corvo M.L., van Bloois L., van der Meer J.W.M., Corstens F.H.M., *Ann. Rheum. Dis.* 56 (1997), 369-373
- 121 Bakker-Woudenberg I.A., Lokerse A.F., ten Kate M.T., Mouton J.W., Woodle M.C., Storm G., *J. Infect. Dis.* 168 (1993), 164-171
- 122 Lasic D.D. and Papahadjopoulos D., Cancer therapy in *Medical Applications of Liposomes*, Lasic D.D. and Papahadjopoulos D. (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam (1998), 221-230
- 123 Working P.K., Newman M.S., Huang S.K., Mayhew E., Vaage J., Lasic D.D., *J. Liposome Res.* 4 (1994), 667-687
- 124 Francis G.E., Delgado C., Fisher D., Malik F., Agrawal A.K., *J. Drug Targ.* 3 (1996), 321-340
- 125 Lasic D.D., *Trends Biotechnol.* 16 (1998), 307-321
- 126 Alving C.R., Theoretical basis for development of liposomes as carriers for vaccines in *Medical Applications of Liposomes*, Lasic D.D. and Papahadjopoulos D. (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam (1998), 145-163
- 127 Dutta M., Bandyopadhyay R., Basu M.K., *Parasitology* 109 (1994), 139-147
- 128 Forrester J.V., Huitinga I., Lumsden L., Dijkstra C.D., *Curr. Eye Res.* 17 (1998), 426-437
- 129 Zysk G., Brück W., Huitinga I., Fischer F.R., Flachsbarth F., van Rooijen N., Nau R., *J. Neuroimmunol.* 73 (1997), 77-80
- 130 Rossi C.P., Delcroix M., Huitinga I., McAllister A., van Rooijen N., Claassen E., Brahic M., *J. Virol.* 71 (1997), 3336-3340
- 131 Umezawa F., Eto Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 (1988), 1038-1044
- 132 Wu J., Zern M.A., *J. Hepatol.* 24 (1996), 757-763
- 133 Sunamoto J., Iwamoto K., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2 (1986), 117-136
- 134 Jones M.N., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13 (1994), 215-250
- 135 Barratt G., Tenu J.-P., Yapo A., Petit J.-F., *Biochim. Biophys. Acta* 862 (1986), 153-164
- 136 Barratt G., Nobile T., Yapo A., Petit J.-F., Tenu J.-P., *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138 (1987), 437-450
- 137 Tenu J.-P., Sekkai D., Yapo A., Petit J.-F., Lemaire G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (1995), 295-301
- 138 Garcon N., Gregoriadis G., Taylor M., Summerfield J., *Immunol.* 64 (1988), 743-745
- 139 Jansen R.W., Molema G., Ching T.L., Oosting R., Harms G., Moolenaar F., Hardonk M.J., Meijer D.K.F., *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 3343-3348
- 140 Meijer D.K., Molema G., Moolenaar F., de Zeeuw D., Swart P.J., *J. Controll. Rel.* 39 (1996), 163-172
- 141 Ghosh P., Bachhawat B.K., *Biochim. Biophys. Acta* 632 (1980), 562-572
- 142 Ahmad I., Sarkar A.K., Bachhawat B.K., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 10 (1991), 171-179
- 143 Banerjee G., Nandi G., Mahato S.B., Pakrashi A., Basu M.K., *J. Antimicrob. Chemother.* 38 (1996), 145-150
- 144 Ahmad I., Sarkar A.K., Bachhawat B.K., *Mol. Cell Biochem.* 91 (1989), 85-90
- 145 Huitinga I., Damoiseaux J.G.M., Flachsbarth F., van Rooijen N., Döpp E.A., Dijkstra C.D., *Immunobiol.* 185 (1992), 11-19
- 146 Huitinga I., van Rooijen N., de Groot C.J., Uitdehaag B.M., Dijkstra C.D., *J. Exp. Med.* 172 (1990), 1025-1033

- 147 Liang W.W., Shi X., Deshpande D., Malanga C.J., Rojanasakul Y., *Biochim. Biophys. Acta* 1279 (1996), 227-234
- 148 Muller C.D., Schuber F., *Biochim. Biophys. Acta* 986 (1989), 97-105
- 149 Dumont S., Muller C.D., Schuber F., Bartholeyns J., *Anticancer Res.* 10 (1990), 155-160
- 150 Domurado M., Domurado D., Vansteekiste S., de Marre A., Schacht E., *J. Controll. Rel.* 33 (1995), 115-123
- 151 Ohsumi Y., Hoppe C.A., Ogawa T., Lee Y.C., *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (1988), 241-249
- 152 Biessen E.A.L., Noorman F., van Teijlingen M.E., Kuiper J., Barrett-Bergshoeff M., Bijsterbosch M.K., Rijken D.C., van Berkel T.J.C., *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 28024-28030
- 153 Yamashita C., Matsuo H., Akiyama K., Kiwada H., *Int. J. Pharm.* 70 (1991), 225-233
- 154 Matsuo H., Funato K., Harashima H., Kiwada H., *J. Drug Targ.* 2 (1994), 141-146
- 155 Ferdous A.J., Ishida T., Shinohara M., Harashima H., Kiwada H., *Biopharm. Drug Dispos.* 17 (1996), 145-154
- 156 Harashima H., Kiwada H., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 19 (1996), 425-444
- 157 Allen T.M., *Drugs* 56 (1998), 747-756
- 158 Blume G., Cevc G., Crommelin M.D., Bakker-Woudenberg I.A., Klufft C., Storm G., *Biochim. Biophys. Acta* 1149 (1993), 180-184
- 159 Allen T.M., Agrawal A.K., Ahmad I., Hansen C.B., Zalipsky S., *J. Liposome Res.* 4 (1994), 1-25
- 160 Hansen C.B., Kao G.Y., Moase E.H., Zalipsky S., Allen T.M., *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (1995), 133-144
- 161 Allen T.M., Brandeis E., Hansen C.B., Kao G.Y., Zalipsky S., *Biochim. Biophys. Acta* 1237 (1995), 99-108
- 162 Harding J.A., Engbers C.M., Newman M.S., Goldstein N.I., Zalipsky S., *Biochim. Biophys. Acta* 1327 (1997), 181-192
- 163 Shimada K., Kamps J.A.A.M., Regts J., Ikeda K., Shiozawa T., Hirota S., Scherphof G.L., *Biochim. Biophys. Acta* 1326 (1997), 329-341
- 164 Ogawa T., Beppu K., Nakabayashi S., *Carbohydrate Res.* 93 (1981), C6-C9
- 165 Wilhelm F., *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle* (1994)
- 166 Wilhelm F., Chatterjee S.K., Rattay B., Nuhn P., Benecke R., Ortwein J., *Liebigs Ann.* (1995), 1673-1679
- 167 Bendas G., *Dissertation Martin-Luther-Universität Halle* (1994)
- 168 Sundler R., *Biochim. Biophys. Acta* 771 (1984), 59-67
- 169 Yoshioka H., Ohmura T., Hasegawa M., Hirota S., Makino M., Kamiya M., *J. Pharm. Sci.* 82 (1993), 273-275
- 170 Sasaki A., Murahashi N., Yamada H., Morikawa A., *Biol. Pharm. Bull.* 18 (1995), 740-746
- 171 Collins S.J., *Blood* 70 (1987), 1233-1244
- 172 Harris P., Ralph P., *J. Leukoc. Biol.* 37 (1985), 407-422
- 173 Roche A.C., Midoux P., Pimpaneau V., Negre E., Mayer R., Monsigny M., *Res. Virol.* 141 (1990), 243-249
- 174 Hardy C.L., Omoto E., Tavassoli M., *Pathobiology* 58 (1990), 179-184
- 175 Pimpaneau V., Midoux P., Monsigny M., Roche A.C., *Carbohydr. Res.* 213 (1991), 95-108
- 176 Hass R., Köhler L., Rehfeldt W., Lessmann V., Müller W., Resch K., Goppelt-Struebe M., *Cancer-Res.* 50 (1990), 323-327
- 177 Magnusson K.-E., Stendahl O., *Glycoconjugate J.* 5 (1988), 271-281
- 178 Stein M., Braulke Th., von Figura K., Hasilik A., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 (1987), 413-418
- 179 Rovera G., Santoli G., Damsky C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979), 2779-2783
- 180 Schubert K., *Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle* (1995)
- 181 Noorman F., Braat E.A.M., Barrett-Bergshoeff M., Barbe E., van Leeuwen A., Lindeman J., Rijken D.C., *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997), 63-72

- 182 Barrett-Bergshoeff M., Noorman F., Bos R., Rijken D.C., *Thromb. Haemostas.* 77 (1997), 718-724
- 183 Hoppe C.A., Lee Y.C., *J. Biol.Chem.* 257 (1982), 12831-12834
- 184 Rando R.R., Bangerter F.W., *J. Supramol. Struct.* 11 (1979), 295-309
- 185 Grant C.W.M., Peters M.W., *Biochim. Biophys. Acta* 779 (1984), 403-422
- 186 Orr G.A., Rando R.R., Bangerter F.W., *J. Biol. Chem.* 254 (1979), 4721-4725
- 187 Chakrabarti A., Podder S.K., *Biochim. Biophys. Acta* 1024 (1990), 103-110
- 188 Astumian R.D., Schelly Z.A., *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984), 304-308
- 189 Bakowsky U., Vogel J., Bendas G., Rothe U., "Untersuchungen des Mischverhaltens ausgewählter einkettiger Alkylmannoside mit verschiedenen Phosphatidylcholinen an der Wasser/Luft-Grenzfläche", Arbeitstagung SFB 197 Erlbach, Nov. 1996, Poster B11, Brosch. S. 76
- 190 Bakowsky U., Bendas G., Vogel J., Rothe U., „Lateral structure of glycolipids in model membranes - investigated by fluorescence film balance and high resolution atomic force microscopy“, Vortrag 12th International Liposome Workshop, Oberjoch/Allgäu, März 1998, zur Publikation vorgesehen
- 191 Vogel J., Bendas G., Bakowsky U., Hummel G., Schmidt R.R., Kettmann U., Rothe U., *Biochim. Biophys. Acta* 1372 (1998), 205-215
- 192 Sundler, R., *FEBS Lett.* 141 (1982), 11-13
- 193 Murahashi N., Sasaki A., *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996), 418-423
- 194 Spanjer H.H., van Berkel T.J.C., Scherphof G.L., Kempen H.J.M., *Biochim. Biophys. Acta* 816 (1985), 396-402
- 195 Biessen E.A.L., Beuting D.M., Roelen H.C.P., van de Marel G.A., van Boom J.H., van Berkel T.J.C., *J. Med. Chem.* 38 (1995), 1538-1546
- 196 Anderson D.A., Vansteenkiste S., Schacht E.H., Sen S.K., Seymour L.W., *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (1995), 339-345
- 197 Murahashi N., Ishihara H., Sasaki A., Sakagami M., Hamana H., *Biol. Pharm. Bull.* 20 (1997), 740-746
- 198 Biessen E.A.L., Vietsch H., van Berkel T.J.C., *Biochem. J.* 302 (1994), 283-289
- 199 Biessen E.A.L., Beuting D.M., Vietsch H., Bijsterbosch M.K., van Berkel T.J.C., *J. Hepatol.* 21 (1994), 806-815
- 200 Kötter S., Krallmann-Wenzel U., Ehlers S., Lindhorst T.K., *J. Chem. Soc. (Perkin 1)* (1998), 2193-2200
- 201 Haensler J., Schuber F., *Biochim. Biophys. Acta* 946 (1988), 95-105
- 202 Nashikawa M., Ohtsubo Y., Ohno J., Fujita T., Koyama Y., Yamashita F., Hashida M., Sezaki H., *Int. J. Pharm.* 85 (1992), 75-85
- 203 Kichler A., Schuber F., *Glycoconjugate J.* 12 (1995), 275-281
- 204 Lindhorst T.K., *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 44 (1996), 1073-1079

## 7 Anhang

Standardabweichungen (soweit nicht in den Abbildungen angegeben)

zu Abb. 7: 6-CF-Retention von HSPC/PG 9:1 (M/M) mit einem Mannosidanteil von 10mol% in RPMI 1640 bei 37°C

Zeit [h]		HSPC/PG	Man0	Man1	Man2	Man3	Man4	Man6	Man8
0	Mittelwert	100	100	100	100	100	100	100	100
	Stabw.	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	Mittelwert	96	98	96	92	95	94	93	92
	Stabw.	2,81	2,42	1,98	4,76	4,22	3,26	2,01	2,63
1	Mittelwert	94	95	94	90	93	91	90	90
	Stabw.	3,22	2,86	3,64	5,11	3,95	3,85	2,25	3,67
2	Mittelwert	89	92	91	86	90	88	85	84
	Stabw.	4,14	3,62	3,55	3,78	5,32	4,21	3,72	5,18
4	Mittelwert	85	89	87	83	87	82	77	79
	Stabw.	5,62	5,16	6,11	6,21	7,33	5,96	6,52	6,84

zu Abb. 14: Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten der Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1 h bei 4°C

		HSPC/PG (H)	H/Man 0	H/Man 1	H/Man 2	H/Man 3	H/Man 4
zellassozierte Fluoreszenz 4°C	Mittelwert	1,2	1,85	1,93	1,4	1,1	0,45
	Stabw.	0,32	0,5	0,6	0,4	0,35	0,15
Oberflächenadhärenz 4°C	Mittelwert	3,7	4,6	4,65	4	3,7	3,1
	Stabw.	0,28	0,32	0,38	0,28	0,2	0,15

zu Abb. 15: Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten der Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1 h bei 37°C

		HSPC/PG (H)	H/Man 0	H/Man 1	H/Man 2	H/Man 3	H/Man 4
zellassozierte Fluoreszenz 37°C	Mittelwert	5,3	6,75	6,85	3,4	2,2	1,2
	Stabw.	1,2	1,5	1,3	1,2	0,9	0,8
Oberflächenadhärenz 37°C	Mittelwert	3,5	4,25	4,25	3,4	2,9	2,4
	Stabw.	0,4	0,47	0,33	0,32	0,27	0,2

Abb. 18: prozentuale Veränderung der Liposomenaufnahme durch differenzierte U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (n = 4)

Zeit [min]		HSPC/PG (H)	H/Man 0	H/Man 1	H/Man 2	H/Man 3	H/Man 4
20 min	Mittelwert	100	124	104	63	38	11
	Stabw.	0	18,15	19,47	15,84	8,42	6,12
60 min	Mittelwert	100	120	102	65	40	12
	Stabw.	0	19,95	23,27	21,54	12,62	10,48
90 min	Mittelwert	100	115	100	62	43	9
	Stabw.	0	22,38	21,19	24,21	15,24	7,96
180 min	Mittelwert	100	112	99	66	38	12
	Stabw.	0	18,35	25,18	15,83	14,42	8,56

zu Abb. 23: Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten von Stealth-Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 4°C und 37°C

		HSPC/PG (H)	H/PEG 2000	H/PEG 5000
zellassozierte Fluoreszenz 4°C	Mittelwert	1,90	0,47	0,57
	Stabw.	0,45	0,16	0,38
Oberflächenadhärenz 4°C	Mittelwert	3,27	1,45	1,57
	Stabw.	0,49	0,43	0,31

		HSPC/PG (H)	H/PEG 2000	H/PEG 5000
zellassozierte Fluoreszenz 37°C	Mittelwert	5,30	0,52	0,48
	Stabw.	0,44	0,15	0,28
Oberflächenadhärenz 37°C	Mittelwert	2,7	0,95	1,3
	Stabw.	0,21	0,30	0,80

zu Abb. 27: Beeinflussung der Antikörperbindung am MR durch Vorinkubation mit verschiedenen Substanzen

Vorinkubation mit		ohne	MeMan	MeGal	ManAlb	Alb	LipMan2 28%	LipMan6 10%
Zellen REZ <sup>+</sup> [%]	Mittelwert	100	96	102	91	93	130	148
	Stabw.	0,00	5,90	3,26	10,97	5,97	17,39	12,87
FL 2 [%]	Mittelwert	100	90	98	86	95	90	82
	Stabw.	0,00	3,09	2,98	6,16	6,16	11,11	8,05

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> schematische Struktur des MR, bestehend aus Transmembran-Region (TMR), 8 CRD und 2 extrazellulären Domänen (Fibronectin Type II Repeat und cysteinreiche Domäne) unbekannter Funktion; waagerechte Striche markieren die notwendigen CRD für die Bindung von monomeren Man, Man-BSA und Mannan [aus 57].....	15
<b>Abb. 2:</b> Oligosaccharid-Liganden für Zellmembran-Rezeptoren [verändert aus 93, 52] .....	22
<b>Abb. 3:</b> N-Glykan-Struktur von Serumproteinen [aus 96].....	23
<b>Abb. 4:</b> Lokalisierung von Liposomen 24h nach i.v.-Injektion [aus 106].....	26
<b>Abb. 5:</b> Ligandenkopplung an vorgeformte Liposomen: (A) direkt an der Liposomenoberfläche, (B) zusätzliche sterische Stabilisierung (PEG 5000), (C) Kopplung am PEG-Terminus (PEG 3500) [aus 158].....	36
<b>Abb. 6:</b> Struktur der eingesetzten Alkylglykoside.....	47
<b>Abb. 7:</b> 6-CF-Retention von HSPC/PG 9:1 (M/M) mit einem Mannosidanteil von 10mol% in RPMI 1640 bei 37°C, Standardabweichungen im Anhang.....	49
<b>Abb. 8:</b> ConA-Bindung an reinen HSPC/PG- und Man-Liposomen (30mol% Man, Trübungsmessung) .....	50
<b>Abb. 9:</b> ConA-Bindung an reinen HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man, Fluoreszenzmessung).....	51
<b>Abb. 10:</b> Vereinfachte Darstellung möglicher Differenzierungswege von HL60 und U937 entsprechend ihrer Stellung im hämatopoetischen System [verändert aus 172] .....	52
<b>Abb. 11:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG-Vesikel durch differenzierte HL60 und U937 nach 1h in Abhängigkeit von der applizierten Menge (n=4); Freies 6-CF wird nicht von den Zellen aufgenommen; die Fluoreszenz-Meßwerte repräsentieren damit ausschließlich liposomales 6-CF. ....	53
<b>Abb. 12:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch differenzierte HL60-Zellen nach 1h.....	54
<b>Abb. 13:</b> Adhärenz reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) in zellfreien wells bei 4°C und 37°C nach 1h.....	55
<b>Abb. 14:</b> Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten der Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 4°C, Standardabweichungen im Anhang.....	56
<b>Abb. 15:</b> Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten der Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 37°C, Standardabweichungen im Anhang.....	56
<b>Abb. 16:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h.....	57
<b>Abb. 17:</b> Zeitverlauf der Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen durch differenzierte U937-Zellen .....	58
<b>Abb. 18:</b> prozentuale Veränderung der Liposomenaufnahme durch differenzierte U937-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (n = 4) .....	58
<b>Abb. 19:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (Man1, Man3) durch differenzierte U937-Zellen in Abhängigkeit vom Man-Gehalt .....	59
<b>Abb. 20:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG-, Glc- und Gal-Liposomen (10mol% Glc und Gal) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h.....	60
<b>Abb. 21:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Cell-Liposomen (10mol% Cell) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h.....	60
<b>Abb. 22:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und PEG-Liposomen (10mol% <sup>2000</sup> PEG-PE bzw. <sup>5000</sup> PEG-PE) durch differenzierte U937-Zellen nach 1h .....	61
<b>Abb. 23:</b> Gegenüberstellung von Adhärenzverhalten von Stealth-Liposomen und zellassoziierter Fluoreszenz nach 1h bei 4°C und 37°C, Standardabweichungen im Anhang .....	62
<b>Abb. 24 a:</b> Zelltypcharakterisierung am FACScan bei Pericard-Zellen.....	63
<b>Abb. 25:</b> Inhibierung der Bindung von Man-BSA <sub>FITC</sub> (Endkonzentration 50 µg/ml) durch Methylglykoside (5 mg/ml) und BSA (5 mg/ml) bei HPM (n=5) und PTM (n=6) .....	65
<b>Abb. 26:</b> Detektion des MR am FACScan bei Peritoneal-Zellen .....	67
<b>Abb. 27:</b> Beeinflussung der Antikörperbindung am MR durch Vorinkubation mit verschiedenen Substanzen.....	68
<b>Abb. 28:</b> Zeitverlauf der Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen durch HPM .....	69
<b>Abb. 29:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch HPM nach 60min.....	70
<b>Abb. 30:</b> Inhibierung der Liposomenaufnahme durch Methylglykoside (5mg/ml) bei HPM nach 20min und 60min Liposomen-Inkubationsdauer (n=8) .....	71
<b>Abb. 31:</b> Verteilung der MR <sup>+</sup> -Zellen innerhalb der HPM-Gesamtpopulation.....	74

<b>Abb. 32:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) bei analytischer Selektion von MR $\oplus$ -HPM nach 20min und 60min Inkubationszeit (n=10); Die selektive Auswertung wurde an Zellpopulationen vorgenommen, bei denen sich die MR $\oplus$ -Zellen analytisch gut erfassen ließen (ausreichende Zellzahl im analytischen Fenster R3, vgl. Abb. 31,C) .....	75
<b>Abb. 33:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol% Man) durch PTM nach 60min (n=15); Die Skalierung der Ordinate wurde zum besseren Vergleich der Skalierung aus Abb. 36 angeglichen. ....	76
<b>Abb. 34:</b> Verteilung der MR $\oplus$ -Zellen innerhalb der PTM-Gesamtpopulation .....	77
<b>Abb. 35:</b> Aufnahmeprofile von HPM (ausgewählte Beispiele), HSPC/PG- und Man-Liposomen (10mol%) .....	78
<b>Abb. 36:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen durch MR $\oplus$ -PTM nach 60min (n=8)...	79
<b>Abb. 37:</b> Lektinbindung an Man2- und Man6-Liposomen in Abhängigkeit vom Mannosidgehalt.....	80
<b>Abb. 38:</b> Mindestkonzentration der Mannoside für die Bindung von Man-Liposomen durch ConA .	81
<b>Abb. 39:</b> Mindestkonzentration der Mannoside für die Bindung von ConA in Abhängigkeit von der Grundlipidmatrix .....	81
<b>Abb. 40:</b> AFM-Aufnahme und Oberflächen-Scan von Man1- (oben) und Man6-Liposomen (unten), jeweils 10mol% Man .....	82
<b>Abb. 41:</b> Zeitlicher Verlauf der ConA-Bindung an Man6- und Man8-Liposomen unterschiedlicher Man-Konzentration (Grundlipid SPC/Chol 7:3 M/M) .....	84
<b>Abb. 42:</b> Aufnahme reiner HSPC/PG- und Man-Liposomen (Man-Gehalt im Bereich der Schwellenkonzentration ConA-Bindung) durch PTM nach 60min (n=5); Die Skalierung der Ordinate wurde zum besseren Vergleich wiederum der Skalierung aus Abb. 36 angeglichen. 86	

#### **EJPB Keywords for doctoral theses**

liposomes, targeted delivery, receptor, in vitro assay, cell culture

## **Erklärung**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Der benutzten Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), Oktober 1999

Andreas Engel

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. habil. P. Nuhn für die Überlassung der interessanten Thematik sowie für die gewährte Unterstützung, Förderung und Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. habil. J. Wagner sowie Frau Dr. D. Riemann vom Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle für die Möglichkeit der Zelluntersuchungen und die vertrauensvolle Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich bei Frau Bornschein und Frau Jung für die tatkräftige Unterstützung bei der Vorbereitung der Zellexperimente sowie bei Herrn Dr. M. Lohn für Anregungen und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. R. Gonzales-Rothi danke ich für die Möglichkeit des Forschungsaufenthaltes an der University of Florida und die dort gewährte Unterstützung. D. Soucy gilt dabei mein Dank für die Einführung in die Zellkultur.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. S.C. Chatterjee und Herrn Dr. F. Wilhelm für die arbeitsaufwendige Bereitstellung der synthetischen Glykolipide verpflichtet. Für die Anfertigung der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen bedanke ich mich bei Herrn Dr. U. Bakowsky. Ganz besonderer Dank für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die kollegiale Zusammenarbeit gebührt meinen Laborkollegen Herrn Dr. G. Bendas und Herrn J. Vogel. Für moralische Unterstützung und Förderung sei nicht zuletzt Herrn Dr. M. Ausborn Dank.

Für Unterstützung und Verständnis während der Erstellung der Arbeit danke ich meinen Kollegen der Apotheke des Universitätsklinikums Leipzig, insbesondere Herrn Dr. E. Fickweiler und Frau E.-M. Wiegel. Allen nicht namentlich erwähnten Personen, die einen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit hatten, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls ganz herzlich danken.

## Lebenslauf

Andreas Engel	geb. am 03.06.1964	in Eisenach
Sept. 1970 - Aug. 1978	Besuch der POS "Ernst Thälmann" in Eisenach	
Sept. 1978 - Aug. 1982	Besuch der EOS "J. W. von Goethe" in Gerstungen, Abitur	
Nov. 1982 - April 1984	Wehrdienst	
Sept. 1984 - Dez. 1984	Studium der Mathematik an der Karl-Marx-Universität Leipzig; Abbruch des Studiums auf eigenen Wunsch	
Mai 1985 - Aug. 1987	Apothekenhilfe / Apotheken-Facharbeiter in der Tenneberg- Apotheke in Waltershausen; Erwachsenen-Qualifizierung zum Apotheken-Facharbeiter	
Sept. 1987 - Aug. 1991	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, 1. und 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung	
Sept. 1991 - März 1992	Pharmaziepraktikant in der Engel-Apotheke in Halle	
April 1992 - Dez. 1992	Diplomarbeit am FB Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg	
Oktober 1992	Approbation als Apotheker	
Jan. 1993 - Sept. 1997	wissenschaftlicher Mitarbeiter am FB Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg	
Nov. 1993 - Mai 1994	Forschungsaufenthalt an der University of Florida, Gainesville, USA	
seit August 1997	Apotheker in der Apotheke des Universitätsklinikums Leipzig	