

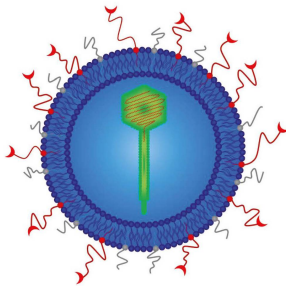


Manuel Weis (Autor)

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

Manuel Weis

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



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

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

Copyright:

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

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



Inhaltsverzeichnis

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



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



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



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



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



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