

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen

Abteilung Hirnforschung

Abteilungsleiter: PROFESSOR DR. R. MEYERMANN

Sektion für Immunpathologie des Nervensystems

Leiter: Professor Dr. H. Schlüsener

**Selektionierte Phagen als Modell für peptid-abhängigen
Makromolekültransport. Einsatz von Phagendisplaybibliotheken an
der gastrointestinalen Mukosa.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

DANIEL MATTHIAS DÜRR

aus Reutlingen

2002

Dekan:

PROFESSOR DR. C. D. CLAUSSEN

1. Berichterstatter:

PROFESSOR DR. H. SCHLÜSENER

2. Berichterstatter:

PROFESSOR DR. M. GREGOR

Meiner Frau



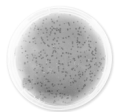
EINLEITUNG

<u>1.1 PHAGENDISPLAY</u>	4
1.1.1 Hintergrund	4
1.1.2 T7-Phagen	6
1.1.3 M13-Phagen	6
1.1.4 Phagendisplay- bibliotheken	7
1.1.5 Modelle der Peptidpräsentation	8
<u>1.2 DAS INTESTINUM</u>	10
1.2.1 Struktur	10
1.2.2 Die Mukosaschranke	10
1.2.3 Transportwege	13
<u>1.3 ZIELE DER ARBEIT</u>	16



MATERIAL

<u>2.1 CHEMIKALIEN</u>	18
<u>2.2 ANTIKÖRPER</u>	19
<u>2.3 MODELLE</u>	19
2.3.1 Bakteriophagen	19
2.3.2 Wirtsbakterien	19
2.3.3 Versuchstiere	20
<u>2.4 SEQUENZIERUNG,...</u>	20
2.4.1 Sequenzierung	20
2.4.2 Ansätze	20
2.4.2 Geräte	22



METHODEN

<u>3.1 PHAGENDISPLAY</u>	25
3.1.1 Prinzip der Phagendisplay- bibliothek	25
3.1.2 Technik	25
3.1.2.1 M13-PHAGEN	25
3.1.2.2 T7-PHAGEN	31
3.1.2.3 KONTROLLEN	33
<u>3.2 IMMUNHISTOCHEMIE</u>	33
3.2.1 Immunperoxidase-Färbung	34
3.2.2 Doppelfärbung	38
3.2.3 Mikroskopie	39
3.2.4 Kontrollen	39



ERGEBNISSE

3.3 PEPTIDBANK-RECHERCHE 40

4.1 PHAGENDISPLAY 45

4.1.1 M13-Phagen können in der Milz nachgewiesen werden! 45

4.1.2 Welche Phagenmenge kann nachgewiesen werden? 45

4.1.3 Insertsequenzen der selektionierten M13-Phagen 47

4.1.4 Datenbankrecherche 48

4.1.5 T7-Phagen 49

4.2 IMMUNHISTOLOGIE 50

4.2.1 Immunperoxidase-Färbung 50

4.2.2 Doppelfärbung 55

4.3 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 57



DISKUSSION

5.1 KONZEPTION 58

5.2 PHAGENDISPLAYTECHNIK 58

5.3 ERGEBNISSE 60

5.3.1 Peptidtransport 61

5.3.2 Makromolekularer Transport 65

5.4 SCHLUßFOLGERUNGEN 68

ZUSAMMENFASSUNG

69

LITERATUR

70

Abkürzungsverzeichnis 81

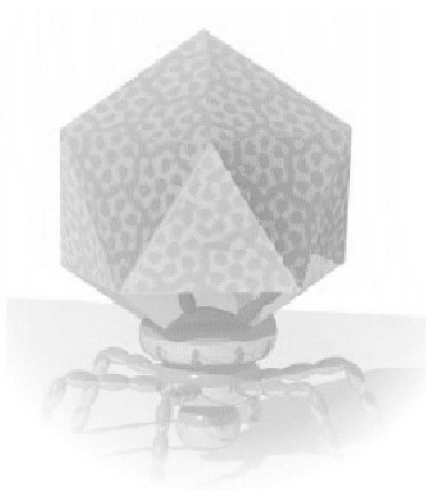
Abbildungsverzeichnis 81

Veröffentlichungen 83

Danksagung 85

Lebenslauf 87

1 EINLEITUNG



<u>1.1 PHAGENDISPLAY</u>	4
1.1.1 HINTERGRUND	4
1.1.2 T7-PHAGEN	6
1.1.3 M13-PHAGEN	6
1.1.4 PHAGENDISPLAY- BIBLIOTHEKEN	7
1.1.5 MODELLE DER PEPTIDPRÄSENTATION	8
<u>1.2 DAS INTESTINUM</u>	10
1.2.1 STRUKTUR	10
1.2.2 DIE MUKOSASCHRANKE	10
1.2.3 TRANSPORTWEGE	13
1.2.3.1 HAFTKOMPLEXE	13
1.2.3.2 APIKAL – PARAZELLULÄR	13
1.2.3.3 M-ZELLEN	13
1.2.3.4 SAUMZELLEN	14
<u>1.3 ZIELE DER ARBEIT</u>	16

Wirkungen von Medikamenten sind von besonderem Interesse, wenn ihre Selektivität Organ- oder sogar Zellspezifität einschließt. Derartige Wirkungen werden oft mit dem Begriff »Pharmatargeting« bezeichnet, welches in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Durch den zielgerichteten Einsatz von Pharmaka erhoffen sich viele Bereiche aus der Medizin vor allem eine Reduzierung der Dosierung sowie eine drastische Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen, da die Pharmaka durch das »Targeting« überwiegend der Zielstruktur zugeführt werden, so daß Beeinträchtigungen des übrigen Organismus weitgehend vermieden werden können. Bisher bekannte Technologien liegen in Antitumor-Antikörper, Polymer-Konjugate sowie liposomale Transportsysteme; entsprechende Präparate befinden sich auf dem Markt (Duncan 1997). In der Möglichkeit pharmazeutische Agenzien in einem Polymer oder Lipid einzukapseln oder daran zu koppeln, werden neue Therapieverfahren gesehen, welche die Sicherheit und Wirksamkeit der Pharmaka erhöhen (Langer 1998). Die Bedeutung von »Pharmatargeting« läßt sich daran ermessen, daß bis zu 15% aller Krankenhausaufenthalte, einige hunderttausend Tote sowie mehr als einhundert Milliarden US-Dollar Kosten des Gesundheitssystems in den USA jedes Jahr auf Arzneimittelnebenwirkungen zurückzuführen sind (Langer 1998).

Auch in der Gentherapie wird der zielgerichtete Einsatz von Agenzien, hier von DNA-Segmente tragenden Vektoren für in vivo Anwendung diskutiert. In diesem Zusammenhang wird unter »gene targeting« die Verwendung der homologen Rekombination verstanden, welche eine genaue Korrektur genetischer Defekte vornimmt (Yanez und Porter 1998, Barry et al. 1996).

Vierversprechende Ansätze für zielgerichtete Transportsysteme für Krebs-Therapeutika zeigen sich in Peptiden, an welche Therapeutika gekoppelt sind und somit spezifisch an angiogene Endothelzellen binden (Barinaga 1998). Peptide der Konjugate sollen dabei Liganden für Endothelzellen der Blutgefäße sein, so daß daran gekoppelte Pharmaka die Tumor-versorgenden Endothelzellen abtöten können.

Die experimentelle Entwicklung von Strategien zur Synthese von derartigen chimären Peptiden, insbesondere zur Bereitstellung spezifischer Peptide findet einen neuen Ansatz in der Verwendung von Phagendisplaybibliotheken. Dabei werden auf

der Oberfläche von Phagen Zufallspeptide präsentiert, deren Bindung an Zielstrukturen zur Selektion des Phagen und damit der Peptid-kodierenden DNA-Sequenz genutzt werden.

Herkömmliche Antikörpertechniken, die bei der Definition von unbekanntem Bindungsstellen an ihre Grenzen stießen, werden durch unterschiedliche Techniken mit Molekülbibliotheken wie Phagendisplay (O'Neil & Hoess 1995) oder Aptamere (Jayasena 1999) abgelöst. Phagendisplaybibliotheken bieten eine exponentiell hohe Anzahl von Bindungspartnern, unter denen zutreffende Liganden mit hoher Wahrscheinlichkeit zu selektieren sind (Pasqualini & Ruoslahti 1996, Pasqualini & Ruoslahti 1996, Russell 1996, Bruno & Kiel 1999).

Pasqualini war 1996 in der Lage, mit M13-Phagendisplaybibliotheken Peptide zu isolieren, die an Integrinstrukturen der Endothelzellen von Brustkrebstumoren selektiv binden. Inzwischen konnten mit selektierten Peptidsequenzen, die an das Zytostatikum Doxorubizin gekoppelt wurden, sogar erste therapeutisch erfolgreiche Einsätze im Tiermodell vorgestellt werden (Arap et al. 1998).

Für orale Therapeutika stellt die erste Hürde auf ihrem Weg zum Wirkungsort die gastrointestinale Mukosa dar. Anhand von Phagendisplay sollen in der vorliegenden Arbeit Möglichkeiten des selektiven Transportes über die komplexe intestinale Schranke untersucht werden.

Da Bakteriophagen auch als außergewöhnliches Beispiel für Makromoleküle betrachtet werden können und nur für Prokaryonten wie Bakterien infektiös sind, ist die Untersuchung des Peptid-abhängigen Transports von Makromolekülen am Modell von M13-Phagen über die gastrointestinale Schranke ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Bisher ist makromolekularer Transport über die Darmmukosa unbekannt. Nur M-Zellen, welche hauptsächlich Antigene aus dem Lumen an Lymphozyten weitergeben (Kerneis et al. 1997), verfügen über die Möglichkeit, Makromoleküle zu transportieren.

Phagendisplaybibliotheken wurden in dieser Arbeit erstmals zum Studium des Transports in vivo über die Darmmukosa angewendet. Diese Methode und die damit selektionierten Peptide wurden daher national (DE_198_45_251_A1) und international als Patent angemeldet (Anmeldenummer: PCT/EP99/05453).

Nachfolgend wird zuerst die noch junge Technik und der Hintergrund des Phagendisplays vorgestellt und anschließend werden die Strukturen, die auf unterschiedliche Art und Weise den selektiven Transport beeinflussen, genauer vorgestellt.

1.1 Phagendisplay

Bakteriophagen als Kernstück des Phagendisplays werden zunächst genauer beschrieben.

Bakteriophagen sind Träger von DNA, die ausschließlich Bakterien befallen können. Sie werden daher auch Bakterienviren genannt. Die Phagen-DNA wird über ein Kapsid von Bakterienzelle zu Bakterienzelle transportiert. In die für jeden Phagen spezifische Wirtszelle gelangt nur dessen DNA. Phagen können sich vermehren, indem sie die Syntheseapparatur der Wirtszelle für den Bau ihres Kapsids und die Replikation ihrer DNA benutzen. Zuletzt verlassen sie die Zelle. Dazu wird je nach Phagentyp die Bakterienzellwand lysiert oder der Phage durch die Zellwand ausgeschleust, was dann ein Weiterleben der Bakterienzelle ermöglicht.

1.1.1 Hintergrund

Schon vor 100 Jahren beschrieb Beijerinck am Tabakmosaikvirus eine subzelluläre Lebensform, die heute als Virus bezeichnet wird (Beijerinck 1899). Erst wesentlich später beobachtete Twort nach längerer Inkubation von Bakterienrasen an diesen helle punktförmige Aufhellungen (Twort 1915). Übertrug er Material aus diesen Stellen auf andere Bakterienrasen, so ließ sich damit auch nach millionenfacher Verdünnung noch eine Aufhellung induzieren. D'Herelle faßte diese Beobachtungen zusammen und sprach 1918 zum ersten mal von einem Bakterienfresser, dem Bakteriophagen (gr. φαγεῖν- fressen, d'Herelle 1917). Die bakterienlysierende Eigenschaft der damals beobachteten Phagen weckte viele Hoffnungen, Bakteriophagen als Therapeutikum gegen Bakterieninfektionen einzusetzen. Die Bemühungen in dieser Richtung blieben jedoch bis heute erfolglos.

Vielmehr lieferte die Beobachtung, wie sich ein Phage in der Zelle vermehrt, die Grundlagen für das Verständnis von Replikation und Translation und somit den Beginn der modernen Molekulargenetik. D'Herelle erweiterte zudem den Begriff

der Lysogenie, die er als »erbliche Fähigkeit einer Bakterienzelle zur Phagenproduktion« definierte.

In den dreißiger Jahren bildete sich mit A. Hershey, S. E. Luria und M. Delbrück ein Kern von Phagenforschern, die sich hauptsächlich mit den Phagentypen T1 bis T7 beschäftigten (Ellis & Delbrück 1939). An diesen Phagen wurde schon ein Jahr vor der Entdeckung der DNA-Doppelhelixstruktur im Jahre 1953 gezeigt, daß nur die DNA als genetisches Material in die Bakterienzelle hinein gelangt und das Kapselprotein außerhalb bleibt. Hiermit wurde die bis dahin gültige Annahme, Proteine seien Träger der Erbinformation, schon damals fragwürdig. In den darauffolgenden Jahren spielten Phagen eine große Rolle in der Kartierung von Genomen. Auch die Entdeckung von Restriktionsendonukleasen wurde am Phagenmodell gemacht (Arber & Dussoix 1962). Nicht zuletzt war die MS2-Phagen-DNA das erste Genom, dessen Basensequenz vollständig aufgeklärt wurde. Fragen des Kapsidaufbaus der Phagen in der Zelle und des Einsatzes von Phagen in der Optimierung von Vektoren sind Gegenstand der heutigen Phagenforschung.

Im Jahr 1985 (Smith 1985) konnten durch rekombinante Genveränderungen Oberflächenproteine der Phagen mit Peptiden fusioniert werden, um sie mit ihrer Peptidmustervielfalt zur Detektion von antigenen Determinanten zu benutzen. Drei Jahre später wurde die mit 10^6 noch geringe Komplexität der benutzten Peptidbibliotheken auf 10^9 erweitert (Parmley & Smith 1988). Damit wurden die Voraussetzungen für die Anwendung von Phagen zur Peptiddetektion und Peptidselektion entscheidend verbessert. Diese Errungenschaften führten zu der heutigen Technik des Phagendisplays, zum Beispiel in der Epitopdetektion (Koivunen et al. 1995).

1.1.2 T7-Phagen

T7-Phagen (siehe Abb. 1.1) gehören zur Familie der Podoviren. Ihr Genom liegt im Doppelstrang vor und ist mit 40 000 Basenpaaren in bis zu 19 Gene aufgeteilt. T7-Phagen zeichnen sich durch einen polyedrischen Kopf von 30 nm Durchmesser und einen nichtkontraktilen Fuß von 20 nm Länge aus, mit welchem sie spezifisch an Wirtsbakterien binden können. Haben Phagen an ein Wirtsbakterium gebunden, wird die Phagen-DNA in das Zytoplasma der Bakterienzelle injiziert (Krüger & Schroeder 1981). Nach Einbau der Phagen-DNA in das Genom der Bakterienzelle werden durch den starken Promotor der T7-Phagen (er wird wegen seiner Wirkungsstärke auch in vielen Vektoren eingesetzt (Studier & Moffatt 1986)), innerhalb kurzer Zeit 100 bis 200 Phagen im Zytoplasma zusammengesetzt. Nach 12 bis 15 Minuten lysiert die Zellwand der Wirtsbakterien aufgrund der hohen Zahl von Phagen, die nicht mehr von der Bakterienwand umschlossen werden können. Dabei werden die neu produzierten T7-Phagen freigesetzt. Eine mit T7-Phagen

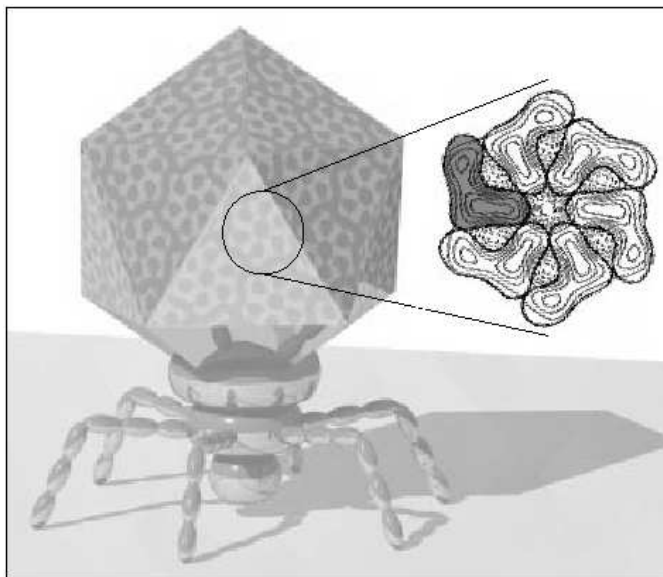


Abb.1.1 Struktur der T7-Phagen

T7-Phagen sind sehr klein und stabil. Der polyedrische Kopf mit einem Durchmesser von 30 nm sitzt auf der Fußplattform (Durchmesser 20nm), welche die Bindung an die Zielzelle ermöglicht.

versehene Bakterienkultur klart deshalb nach kurzer Zeit auf.

1.1.3 M13-Phagen

M13-Phagen (Abb. 1.2) wurden 1963 von Hofschneider entdeckt und gehören zu der Gruppe der Ff-Phagen (F=F-Pili, f=filamentös, Francke & Hofschneider 1966).

Ihr Genom besteht aus einzelsträngiger ringförmiger DNA, die sich mit ca. 6400 Basenpaaren in 10 Gene aufgeteilt. Ihre fadenförmige Struktur ist

900 nm lang und besitzt einen Durchmesser von 6 bis 10 nm.

Für die Infektion benützen M13-Phagen F-Pili von *Escherichia coli*-Bakterien, an welche sie ausschließlich binden können. Die Phagen-DNA wird wie bei T7-Phagen in die Bakterienzelle injiziert und in das Bakteriengenom eingebaut. Zehn Minuten nach einer Infektion werden neue Phagen aus der Bakterienzelle ausgeschleust, ohne die Bakterienzellwand zu lysieren (Model & Russel 1988). Dabei werden 200 bis 2000 Phagen pro Bakterienzelle freigesetzt.

1.1.4 Phagendisplaybibliotheken

Da das Phagenom schon lange bekannt war, konnte die DNA mit Hilfe von Restriktion und Ligation gezielt verändert werden. So konnte in das Oberflächenprotein gp3 von M13-Phagen eine Peptidsequenz eingefügt und an der Phagenoberfläche präsentiert werden (display). Durch Einfügen vieler unterschiedlicher Peptide in Bakteriophagen entstanden Phagendisplaybibliotheken (Burritt et al. 1996).

Es ist bekannt, daß viele Zellrezeptoren an kleine Peptidsequenzen binden (Pasqualini et al. 1996). Da derartige Peptide inzwischen technisch einfach hergestellt und in Phagenoberflächen inseriert werden können, entstand die bevorzugte Suche von Peptidepitopen und Peptidliganden mittels Phagendisplay (Scott & Smith 1990).

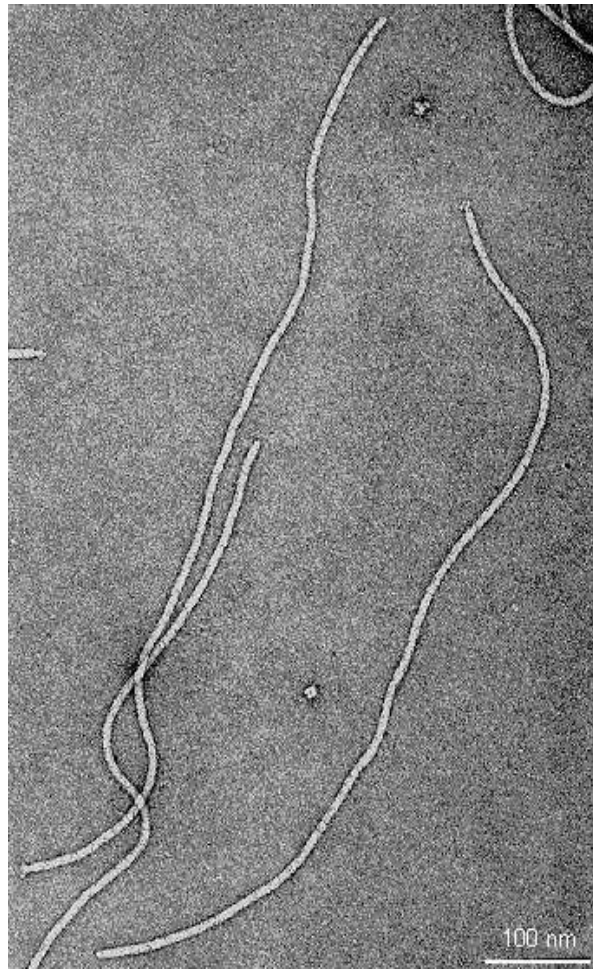


Abb.1.2 Struktur der M13-Phagen

Die EM-Aufnahme zeigt die fadenförmige Struktur der Fφ-Phagen. Die Länge dieser Phagen liegt bei 900 nm.

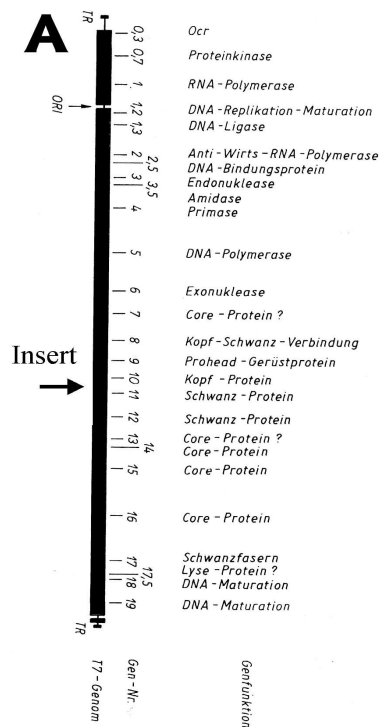
Erste biologisch relevante Peptidmuster, welche mittels Phagendisplaybibliotheken gefunden wurden, sind für Adhäsionsmoleküle in Gefäßen beschrieben worden (Rajotte et al. 1998).

Daraufhin stellt sich die Frage, ob mit der Displaytechnik nicht auch in der Mukosaschranke des Darmes spezifische Peptidbindungsstellen zu finden wären, die für Transportvorgänge über die Mukosa verantwortlich gemacht werden können.

1.1.5 Modelle der Peptidpräsentation

Wie in das Oberflächenprotein von Phagen eingefügte Peptidsequenzen an der Oberfläche präsentiert werden, zeigen schematisch folgende Abbildungen.

Bei T7-Phagen codiert das Oberflächengen 10b (Abb. 1.3A) für die polyedrische Phagenkopfstruktur (Studier & Dunn 1982). 415 Proteinmoleküle, codiert von Gen



Gen 10b:
 5' 1047...GATCCG $\xrightarrow{EcoR I}$ AATTXXXX(N)XXXX $\xrightarrow{Hind III}$ AGCTT... 3'
 3' ...CTAGGCTTAA XXXX(N)XXXXTCGA A...5'

Abb. 1.3A Genkarte des T7-Phagen
 In das von Gen 10b kodierte Oberflächenprotein werden 150 Nukleotide rekombinant eingefügt

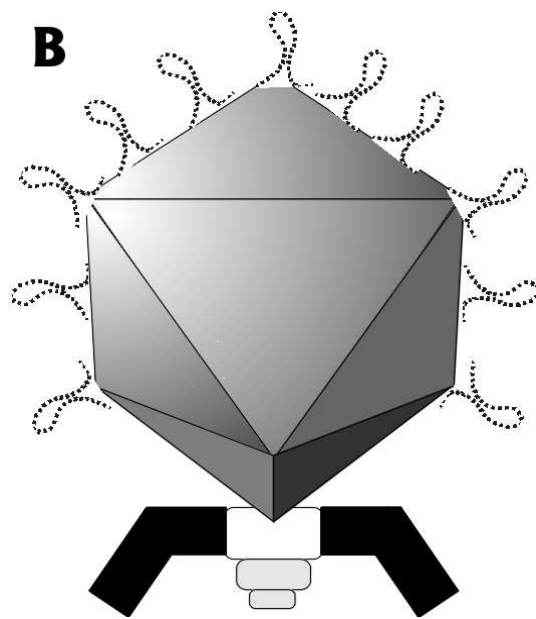
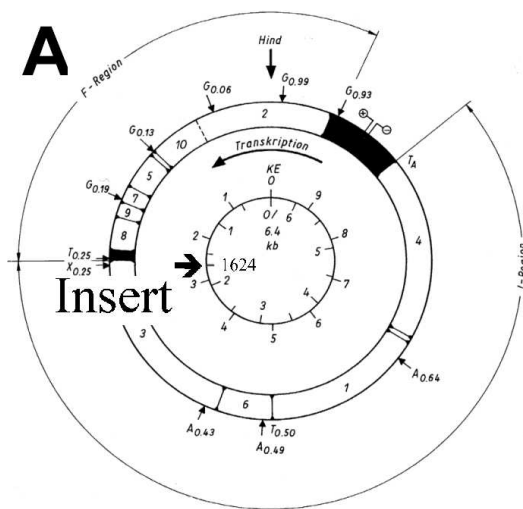


Abb. 1.3B Präsentation der Peptide
 Die eingefügten Sequenzen werden auf der Oberfläche der T7-Phagen dargestellt. Die Schleifenstruktur (Loop) ragt in den Raum. Von den 415 Kopien dieser Peptide wurden nur 10 symbolisch dargestellt.

10b werden dazu gebraucht. 415 Kopien der rekombinant eingefügten Sequenz werden daher ebenfalls auf der Oberfläche präsentiert. Eine Besonderheit besteht in der Schleifenform der Proteinmoleküle (Abb.1.3B). Dadurch bildet sich ein Proteingerüst (Scaffold), welches in den Raum hinausragt (Rosenberg et al. 1996).

Bei M13-Phagen ist das Oberflächenprotein gp3 für die Bildung eines Fadenendes, auch Phagenkopf genannt, verantwortlich. Es werden nur fünf gp3-Moleküle werden exprimiert. Abbildung 1.4A zeigt vereinfacht die Genkarte (Rasched & Oberer 1986) und die Stelle, an der die Basensequenz für das zu präsentierende Peptid eingefügt wird. In Schemazeichnung 1.4B sind die die exprimierten Peptidkopien zu sehen.



Gen gp3:
 5' 1624...TCT CAC TCT **XXX(N)XXX** GGT GGA GGT... 3'
 3' ...AGA GTG AGA **XXX(N)XXX** CCA CCT CCA...5'

Abb. 1.4A Genkarte der M13-Phagen
 In das Oberflächenprotein gp3 werden an der Stelle 1611 Sequenzen rekombinant eingefügt (Insert).

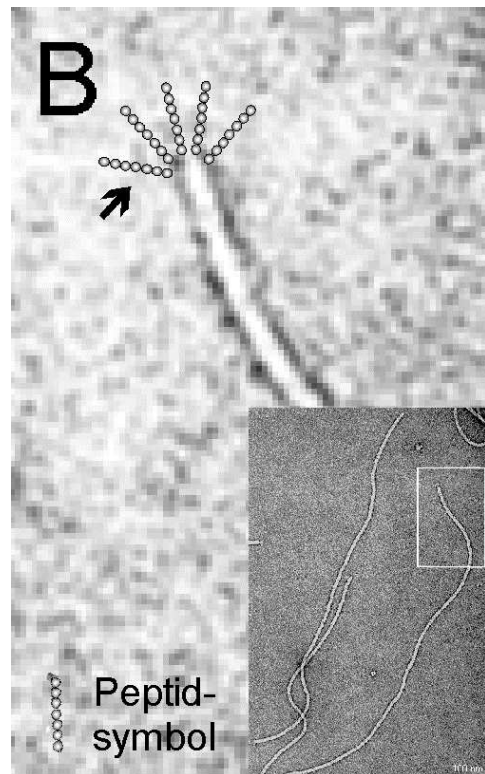


Abb. 1.4B Peptidpräsentation bei M13-Phagen

Das eingefügte Peptid wird fünfmal am Kopf der M13-Phagen exprimiert (Pfeil).

Zum Vergleich wurde Abbildung 1.2 nochmals eingeblendet.

1.2 Das Intestinum

1.2.1 Struktur

Der menschlichen Organismus besitzt eine innere Oberfläche von ca. 300 m². Über diese Fläche tauscht er Nähr- und Abfallstoffe wie auch Gase aus. Die Fläche teilt sich in 70 m² Lungenoberfläche für den Gasaustausch, 20 m² Urogenitaloberfläche für Sekretion und Ausscheidung von Flüssigkeiten und 200 m², den größten Anteil, Magen-Darm-Trakt-Oberfläche auf.

Für die Nahrungsaufnahme am bedeutendsten ist der Dünndarm. Nahrungsstoffe werden resorbiert und Substanzen für die Funktion und den Schutz des Darmes sezerniert. Die Mukosa des Dünndarmes zeichnet sich durch hohe Falten (Plicae circulares) aus, die zusammen mit den Zotten (Villi intestinales) und Lieberkühn-Krypten die Oberfläche zehnfach vergrößern. Die Zellen dieser Fläche bilden die Mukosaschranke.

1.2.2 Die Mukosaschranke

Die Dünndarmmukosa benutzt viele Mechanismen zum Schutz vor Pathogenen sowie den eigenen, von der Bauchspeicheldrüse sezernierten hochaktiven Verdauungsenzymen, wie Exopeptidasen (Karbonylpeptidase A und B) und Endopeptidasen (Trypsin, Chymotrypsin und Elastase). Den Schutzmechanismen des Darmes begegnen auch Substanzen aus dem Intestinaltrakt, die sich auf dem Weg in das Blutssystem befinden, und sie müssen diese Schutzmechanismen des Darmes umgehen oder überwinden.

Zuerst müssen unspezifische Hürden, die aus der Magensäure, dem Schleim der verschiedenen Drüsenzellen, den oben erwähnten Verdauungsenzymen sowie in der Peristaltik des Intestinaltraktes bestehen, überwunden werden, um die Saumzellen der Mukosa zu erreichen. Eine letzte Hürde vor der Saumzelle stellt die Glykoproteinschicht mit einer Dicke von 400-500 nm (Maury et al. 1995) dar. Sie dient hauptsächlich zum Schutz vor Verdauungsenzymen.

Spezifische Abwehrmechanismen wie Immunglobuline des Typs sIgA (sekretorisches IgA) und sIgM, müssen ebenfalls überwunden werden (Walker 1994, Neutra & Kraehenbuhl 1996). Antigene können über M-Zellen immunkompetenten T-Lymphozyten präsentiert werden, die B-Zellen zu

Antikörperproduktion der Typen IgA und IgM anregen. Diese Antikörper werden in exokrinen Geweben des Körpers und des Darmes mit einer sekretorischen Komponente versehen und als sIgA und sIgM oft zusammen mit Schleim sezerniert (Brandtzaeg 1996). Sie geben dadurch einen spezifischen Schutz vor schon bekannten Antigenen.

Einen Überblick über die verschiedenen Komponenten der Mukosaschranke gibt Abbildung 1.5.

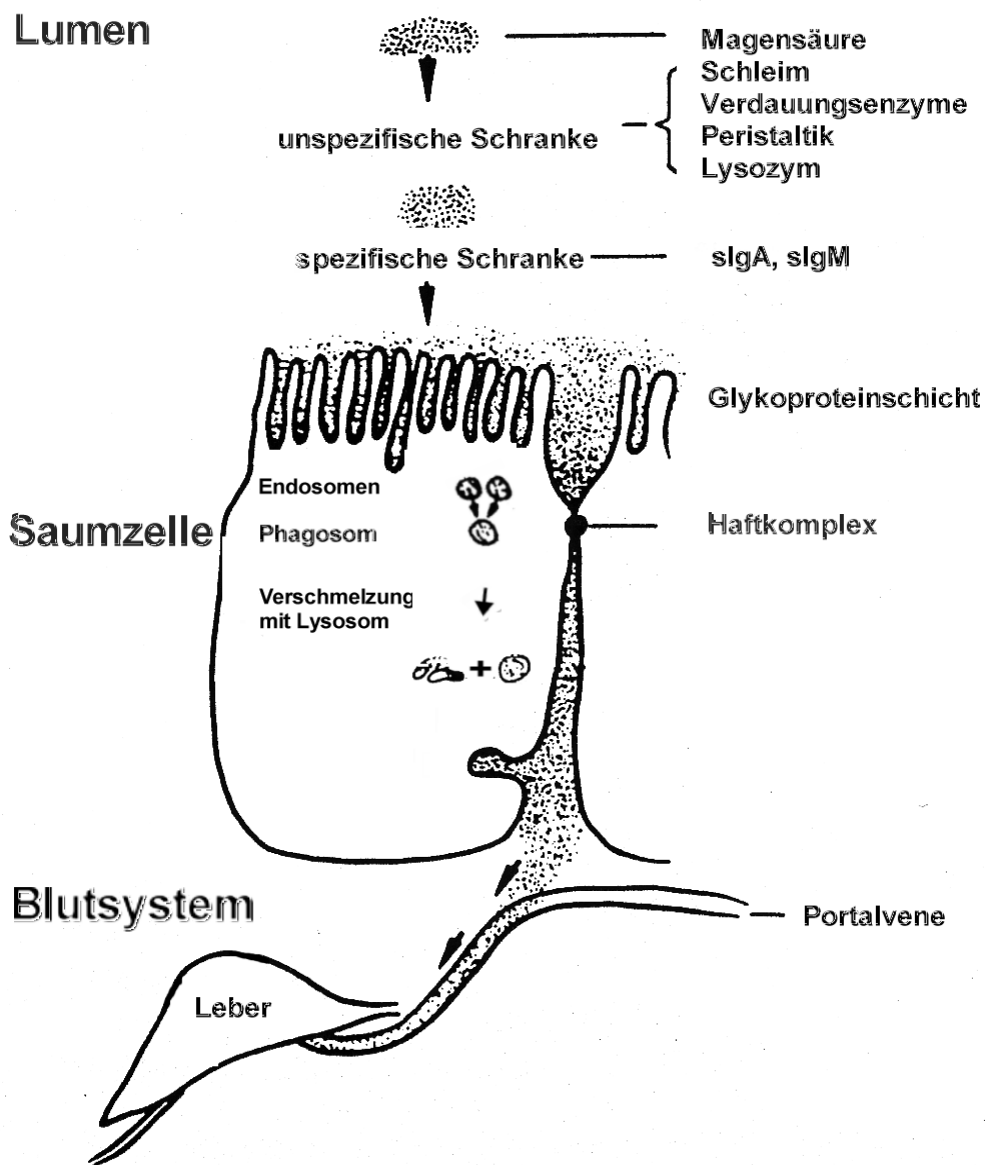


Abb. 1.5 Die Mukosaschranke

Unspezifische Schranken wie die Magensäure, der Schleim der Becherzellen, Verdauungsenzyme, die Peristaltikwirkung und Sekrete der Panethzellen (Lysozym und α_1 -Antitrypsin) schützen die Schleimhaut vor Pathogenen und Enterotoxinen.

Eine letzte unspezifische Schranke bildet die Glykoproteinschicht der Bürstensaumzellen. Diese Schicht von Glykoproteinen auf den Mikrovillifilamenten ist 400-500 nm dick und schützt die Dünndarmmukosa vor den Verdauungsenzymen.

Die spezifische Schranke beinhaltet unter anderem Immunglobuline der Typen sIgA und sIgM, die mit dem Schleim der Panethzellen ins Lumen abgegeben werden.

1.2.3 Transportwege

Bekannte Vorgänge, wie Makromoleküle das Mukosaepithel passieren können, werden nachfolgend vorgestellt. Ein spezifischer Transport ist in vielen Fällen jedoch noch unbekannt.

1.2.3.1 HAFTKOMPLEXE

Mechanisch werden Mukosaepithelzellen untereinander mit Haftkomplexen verbunden, wodurch ihre Zwischenräume gegen das Magenlumen abgedichtet werden.

Lange wurde gedacht, daß nur Wasser und Natrium durch die Poren der Haftkomplexe gelangen können. 1991 wurde diese Annahme widerlegt. Ein Peptid mit elf Aminosäuren Länge wurde auf seinem parazellulären Weg durch die Haftkomplexe nachgewiesen (Atisook & Madara 1991). Weiter konnte bei Widerstandsmessungen der Epithelzellen gezeigt werden, daß sich die Permeabilität der Haftkomplexe bei Entzündungen vergrößert und Makromoleküle wie BSA (Bovine Serum Albumin) die Haftkomplexe passieren können (Madara & Stafford 1989, Nash et al. 1987). Die Porengröße der Haftkomplexe liegt bei 5 nm (Madara & Pappenheimer 1987), welche kleine positiv geladene Moleküle, wie Kreatinin gut durchdringen können (Karlsson et al. 1999).

Permeabilitätszunahmen der Haftkomplexe mit der Folge einer makromolekularen Passage haben einen engen Zusammenhang mit ursächlich noch nicht verstandenen chronischen Krankheiten wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Schurmann et al. 1999, Söderholmet al. 1999).

1.2.3.2 APIKAL – PARAZELLULÄR

Ein weiterer Transportweg für Makromoleküle besteht in der apikalen Aufnahme und parazellulären Abgabe von Makromolekülen (Schurmann et al. 1999), wobei Haftkomplexe weitgehend umgangen werden.

1.2.3.3 M-ZELLEN

Membranöse Mukosazellen, deren Bildung durch tiefer liegendes Lymphgewebe der Peyerschen Plaques induziert wird (Kerneis et al. 1997, Neutra et al. 1996), werden M-Zellen genannt. Sie sind in der Lage von luminal angebotene Antigene über

aktiven Vesikeltransport nach basal weiterzugeben (Neutra et al. 1987). M-Zellen besitzen weder eine dicke Glykokalix noch einen Bürstensaum wie Enterozyten, weshalb luminale Antigene bis zur Plasmamembran der M-Zelle vordringen können. Die antigenträgenden Vesikel verschmelzen nicht mit Lysosomen und entgehen dadurch einer Verdauung durch diese Organellen. So können Antigene in einer Tasche unter den M-Zellen den hier anwesenden immunkompetenten Lymphozyten präsentiert werden. Die M-Zelle verfügt somit über Transzytoseeigenschaften, die es erlauben, adhärente Makromoleküle unverändert nach basal weiterzugeben (Neutra et al. 1987, Panja & Mayer 1996). In den erwähnten Taschen kann das antigene Material in Abhängigkeit von der Immunkompetenz der Substanz auch phagozytiert werden (Beier & Gebert 1998, Mestecky et al. 1997).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß ein selektiver Transport von Makromolekülen über die M-Zelle möglich ist.

1.2.3.4 SAUMZELLEN

Die häufigsten Zellen der Darmmukosa sind die Saumzellen, auch IEC (intestinal epithelial cells) oder Enterozyten genannt. Sie stehen im Zentrum des Nahrungsmitteltransportes. Mit Mikrovillistrukturen an der apikalen Seite vergrößern sie ihre Oberfläche bis zu 40fach. In der Glykoproteinschicht befinden sich Dissaccharidasen, Peptidasen und Lipasen, welche Proteine, Fette und Zucker in Aminosäuren, Peptide, Glukose und Fettsäuren spalten. Über verschiedene schon genauer beschriebene Rezeptorstrukturen werden diese in die Zelle aufgenommen (Adibi 1997, Ogihara et al. 1999, Nutting et al. 1999).

Der Transport von Makromolekülen ist durch die dicke Glykokalix kaum möglich. In der Pharmazie sind Präparationen in Gebrauch, welche die Schranke der Mukosazellen lockern und somit die Aufnahme von nicht transportablen Substanzen in die Zelle ermöglichen (Chao et al. 1999). Beispiele dafür sind wirkstoffhaltige Liposomen, Mikrosphären und Hydrogele (Duncan et al. 1996). Die aufgenommenen Substanzen blieben jedoch unter der Größe von Makromolekülen, die man bei einem Durchmesser von größer 4 nm ansetzt.

Dennoch konnte der Transport von Rinderalbumin mit einem Durchmesser von 4 nm in die Saumzelle bei jungen Tieren gezeigt werden (Teichberg et al. 1992).

Weiterhin konnte Lektin-gebundenes Ferritin, ein großes Molekül, die Saumzellen durchqueren, ohne dem lysosomalen Verdau zu unterliegen (Gonnella & Neutra 1984). An älteren Tieren wurde eine Makromolekülaufnahme nach Hemmung der luminalen Proteolyse gezeigt (Saffron et al. 1979, Walker et al. 1975). Zudem können junge Saumzellen Makromoleküle besser binden als reife. Dies konnte anhand von Krankheiten wie Zöliakie und Autoimmun-Enteropathie, bei denen der Lebenszyklus der Saumzellen verkürzt ist, belegt werden (Sanderson & Walker 1993, Kuvaeva 1979).

Weitere Arbeiten zeigten, daß Saumzellen durchaus in der Lage sind, Makromoleküle in Clathrin ummantelten Vesikeln unspezifisch zu transportieren (Walker 1994).

Für einen spezifischen Transport müssen aber vermutlich viele Arten von Makromolekülen bei ihrer Bindung an die Zellmembran ein Signal an die Zelle abgeben, welches die Umgehung des lysosomalen Verdaus vorsieht und für den Erfolg der basalen Ausschleusung entscheidend ist. Damit könnte von einer spezifischen zellulären Selektion des Transportes von Makromolekülen gesprochen werden.

Wenn Makromoleküle, zu denen im weiteren Sinne auch Phagen gerechnet werden können, die intestinale Schranke überschreiten, muß an einen Weg über M-Zellen und Saumzellen gedacht werden, da diese zur Transzytose befähigt sind.

Somit stellt sich die Frage, ob es Signale und Liganden gibt, welche die Transzytose von Makromolekülen in M-Zellen und Saumzellen induzieren.

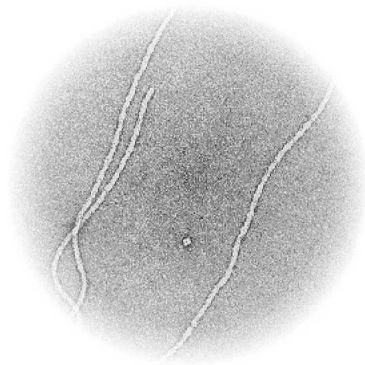
1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu prüfen, ob in-vivo eingesetzte Phagen-Display-Bibliotheken Hinweise auf eine selektive Vermittlung des Phagentransports über die Darmmukosa durch spezifische Phagenoberflächenstrukturen geben.

Folgende Fragen wurden aufgestellt:

- Können Bakteriophagen die Fähigkeit erwerben, die Mukosa des Darmes zu überqueren, indem an ihrer Oberfläche rekombinante Peptide exprimiert werden?
- Wenn Bakteriophagen ins Blutsystem gelangen können, in welcher Menge kommen sie dort tatsächlich an?
- Werden Bakteriophagen nach der Überquerung noch intakt sein?
- Können Peptidsequenzen selektioniert werden, die für die Induktion der Translokation über den Darm verantwortlich sind? Welche Bedeutung kann ihnen gegeben werden?
- Welche Strukturen der Darmmukosa können sie überwinden?

2 MATERIAL



2.1 CHEMIKALIEN 18

2.2 ANTIKÖRPER 19

2.3 MODELLE 19

2.3.1 BAKTERIOPHAGEN 19

2.3.2 WIRTSBAKTERIEN 19

2.3.3 VERSUCHSTIERE 20

2.4 SEQUENZIERUNG,... 20

2.4.1 SEQUENZIERUNG 20

2.4.2 ANSÄTZE 20

2.4.2 GERÄTE 22

Xylol	Fluka	95690
Zitronensäure Monohydrat	Merck	244

2.2 Antikörper

Zielstruktur	Katalogname	Firma	Kat.-Nr.
M13-Phagen	Anti-M13 (Schaf α -M13)	Pharmacia Biotech Europe, Freiburg	27-9410-01
Schafglobuline	Anti-Sheep IgG Peroxidase Conjugate	Sigma, St. Louis, USA	A-3415
Alkalische Phosphatase	APAAP Mouse Monoclonal (AP7/6/7 α -AP)	Dako, Glostrup, Dänemark	D 0651
Mausglobuline	Rabbit Anti-Mouse Immunoglobins	Dako, Glostrup, Dänemark	Z 0259
MHC II der Ratte	Mouse Anti I-A IgG, MRC OX-6	Serotec, CAMON, Wiesbaden	MCA 46G

2.3 Modelle

2.3.1 Bakteriophagen

Kit	Firma	Kat.-Nr.
T7Select415-1 Cloning Kit	Novagen, Madison, USA	70015-3
Ph.D.-7™	New England Biolabs® Inc., Beverly, USA	8100
M13KO7 – Phage aus EZtrap™ Phage Display cDNA Library Kit	Maxim Biotech, San Francisco, USA	PDL-1026

2.3.2 Wirtsbakterien

Stamm	Wirtsbakterium	Kit, Firma
E. coli BL21	F-ompT hsdS _R (R _R ⁻ m _R ⁻)gal dcm	für T7 –Phagen T7Select415-1 Cloning Kit, Novagen, Madison, USA
E. coli ER2537	F'lacI ^q Δ (lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB) Δ (hsdMS-mcrB)5(τ_k^- m _k ⁻ McrBC ⁻)	für M13 Phagen Ph.D.-7™, New England Biolabs® Inc., Beverly, USA

2.3.3 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Lewis Ratten aus der hauseigenen Zucht verwendet. Sie wurden nach durchschnittlich 25 Tagen vom Muttertier getrennt und mit Altromin® ernährt. Nach der kritischen Phase von 6-8 Wochen nach der Geburt wurden sie für die Versuche verwendet.

Die Versuche wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung HF1/98 durchgeführt.

2.4 Sequenzierung,...

2.4.1 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 100 µl der gereinigten Phagenlösung in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, versiegelt und an ein externes Labor (DNA Analytik Alt-Mörbe, Freiburg) geschickt. Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch die Cycle-Sequencing-Methode mit Sequitherm Excel II. Der benutzte DNA-Sequenzierung-Kit wird von Technologies/USA vertrieben.

2.4.2 Ansätze

Lösung	Ansatz
4 % Paraformaldehyd	450 ml Ansatz 250 ml Ampuwa erhitzen 18 gr PFA dazugeben 150 ml 3x PBS NaOH bis Lösung klar auf Eis kühlen pH auf 7,2 einstellen und mit Ampuwa auf 450 ml auffüllen Filtrieren und bei 4° C aufbewahren
DAB-Entwickler	in ca. 180 ml destilliertes Wasser 100 mg DAB (Diaminobenzidin) 20 ml Substratpuffer (10x) 66,6 µl 30%iges H ₂ O ₂ mit destilliertem Wasser auf 200 ml Volumen auffüllen (vor Anwendung gefiltert, lichtgeschützt höchstens 2 Stunden aufbewahrt)
Fast-Blue- Entwicklungs- lösung	50 ml Ansatz: 10 mg Naphtol AS-MX Phosphate 0,5 ml NN Dimethylformamid

	<p>in Eppendorfgesäß mischen 50 ml 0,1 M Tris-Puffer pH 8,2 4 Tropfen 10 % MgSO₄-Lösung Direkt vor Gebrauch 50 mg Fast Blue BB Salz 12 mg Levamisole zugeben und filtern</p>
Grund-Agar	<p>2g LB 1,2g AgarAgar 100ml Wasser Kurz aufgekocht und auf sterile Plastikplatten gegossen, bei 4°C gelagert</p>
LB	<p>1 g LB enthalten 0,25 g NaCl 0,25 g Hefeextrakt 0,5 g Bakterientrypton</p>
LB-Medium	<p>20 g LB 1 l deionisiertes Wasser</p>
M9 (20x)	<p>100 ml Ansatz: 2 g NH₄Cl 6 g KH₂PO₄ 12 g Na₂HPO₄ 100 ml destilliertes H₂O</p>
M9TB	<p>100 ml- Ansatz: 5 ml 20xM9 2 ml 20 % Glucose 0,1 ml 1 M MgSO₄ 100 ml destilliertes H₂O</p>
PBS	<p>1 Liter -Ansatz: 1,48 g Na₂HPO₄ 0,43 g KH₂PO₄ 7,2 g NaCl</p>
SL	<p>5 M NaCl 1 M Tris-Cl 0,5 M EDTA pH 8,0</p>
SM (10x)	<p>1000 ml Ansatz: 5,8 g NaCl 2 g MgSO₄ x 7 H₂O 50 ml 1 M Tris x Cl (pH 7,5) 5 ml 2 % BSA mit H₂O bis auf einen Liter dazugeben</p>
Substratpuffer (10x)	<p>21 g Zitronensäure Monohydrat 34 g Imidazol 29,2 g NaCl pH 7,0 auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen</p>
TBE (10x)	<p>1 Literansatz: 108 g Tris</p>

	55 g Borsäure 40 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
TBS	für M13-Phagen: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 250 ml Ansatz: 10 ml 1 M Tris-Cl 7,5 ml 5 M NaCl 222,5 ml Ampuwa
TBS	für Mikroskopie: 2 Liter Ansatz: 6,06 g Tris Ultrapure 16,36 g NaCl in 2 Liter destilliertem Wasser pH 7,5
Top-Agar	2 g LB 1 g Agarose 100 ml destilliertes Wasser Autoklaviert und bei 4° C aufbewahrt
Tris –BSA	50 ml Ansatz: 50 ml Trispuffer 50 mg BSA
Tris-Puffer	0,1 M Tris ultra Pure in destilliertem Wasser
Zitratpuffer	2,1 g Zitronensäure-Monohydrat auf 1l destilliertem Wasser, pH 6,0

2.4.3 Geräte

Typ	Hersteller	Gerätename
Dialyse	Pierce	Slide-A-Lyzer Cassette
Elektrophorese- spannungsgerät	Bio-Rad	Power PAC 3000
Filmtyp	Kodak	Dia ERY 64 T
Magnetrührer	UniEquip	new type are
Mikrotom	Microm	HM400
Mikrowelle	Moulinex	Microchef FM8930 1100W
Photomikroskop mit differentiellm Interferenzkontrast nach Nomarski	Olympus	Vanex AHB T3
Thermocycler	Biometra	Trio-Thermoblock
Zentrifuge (groß)	Heraeus Sepatech	Varifuge 3,0R
Zentrifuge (klein)	Eppendorf	Centrifuge 5415C

3 METHODEN



3.1 PHAGENDISPLAY **25**

3.1.1 PRINZIP DER PHAGEN- DISPLAYBIBLIOTHEK **25**

3.1.2 TECHNIK **25**

3.1.2.1 M13-PHAGEN **25**

3.1.2.1.1 Amplifikation der
Phagenbibliothek **26**

3.1.2.1.2 Verabreichung der
Phagen **26**

3.1.2.1.3 Herstellung des
Lysates **26**

3.1.2.1.4 Reinigung **27**

3.1.2.1.5 Plaque-Test S **28**

3.1.2.1.6 Plaque-Test HS **30**

3.1.2.1.7 Vom Plaque zur
Sequenz **30**

3.1.2.2 T7-PHAGEN **31**

3.1.2.2.1 T7-Phagenbibliothek **31**

3.1.2.3.2 Verabreichung der
Phagen **31**

3.1.2.4.3 Herstellung des
Lysates **31**

3.1.2.5.4 Reinigung **32**

3.1.2.6.5 Plaque-Test **32**

3.1.2.7.6 Vom Plaque zur Sequenz
33

3.1.2.3 KONTROLLEN **33**

3.2 IMMUNHISTOCHEMIE **33**

3.1 Phagendisplay

3.1.1 Prinzip der Phagendisplaybibliothek

1985 sah George Smith als erster die Möglichkeit, Bakteriophagen für die Detektion von Zielstrukturen zu nutzen (Smith 1985). Er entwickelte das Modell, und schon 1990 nutzten Scott und Smith die Vorteile von Peptidbibliotheken für die Detektion (Scott & Smith 1990). Inzwischen werden Bakteriophagen vielseitig bei der Epitopbestimmung von Zielstrukturen (Barry et al. 1996) oder auch zur Herstellung großer Mengen spezifischer DNA genutzt.

Bei der Phagendisplaytechnik werden Bakteriophagen an ihrem Oberflächenprotein gezielt verändert. Dazu wird das Gen, welches für ein Oberflächenprotein kodiert, mit einer Nukleinsäuresequenz (Insert) verändert. Die Information dieses Inserts wird bei der Translation zusammen mit dem Gen für das Oberflächenprotein abgelesen und bildet nun zusammen mit dem Insert die Oberfläche des Phagen. Die Aminosäuren des Inserts ergeben ein kurzes Peptid, das von der Phagenoberfläche abgewandt in den Raum gerichtet ist.

Eine Phagendisplaybibliothek entsteht, wenn möglichst jeder Phage, der ein anderes Peptid auf seiner Oberfläche trägt. Die Anzahl der verschiedenen Peptide einer Bibliothek wird in der Zahl der Komplexität erfaßt. Je nach Bibliothek variiert die Länge und Form der Peptide. Die in dieser Arbeit benutzte T7Select-Bibliothek enthielt Peptide mit einer Länge von 50 Aminosäuren und die M13-Phagen-Bibliothek Peptide aus sieben Aminosäuren.

3.1.2 Technik

3.1.2.1 M13-PHAGEN

Die kommerzielle Phagenbibliothek Ph.D.-7TM (siehe 2.3) enthielt 2×10^{12} M13mp19-Phagen mit einer Komplexität von 2×10^9 Transformanten. Für die Verabreichung der Phagen mittels Magensonde wurden für einen Versuch 10^{12} Phagen benötigt. Die Phagenbibliothek wurde daher zuerst im Wirtsbakterium ER2537 (siehe 2.4) amplifiziert.

3.1.2.1.1 Amplifikation der Phagenbibliothek

Nachdem entsprechend dem Standardprotokoll eine Minimalplatte des Wirtsbakteriums ER2537 hergestellt wurde, konnte eine Bakterienkolonie entnommen und in 50 ml LB-Medium bei 37° C mit 100 rpm 16 Stunden über Nacht inkubiert werden. Davon wurden je 5 ml zu vier mal 500 ml LB-Medium hinzugegeben und für viereinhalb Stunden bei 37° C mit 90 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Mit jeweils 10 µl der kommerziellen Phagenbibliothek wurden diese Bakterien angeimpft. Für fünf Stunden bei 37° C und 90 rpm konnten sich die Phagen in ihrem Wirtsbakterium vermehren. Das Lysat wurde für 30 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C zentrifugiert. 80 % des Überstandes wurden in einen frischen Zentrifugenbecher überführt, indem 1/6 Volumen 20 %iges PEG-8000 / 2,5 M NaCl vorgegeben war. Nach zweistündiger Inkubation bei 4° C konnten die Phagen während einstündiger Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4° C präzisieren. Der Überstand verworfen und die Sedimente mit jeweils 50 ml restlichem Überstand gelöst und in Falcon-Röhrchen überführt. Eine weitere Zentrifugation von 30 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C folgte. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente in 50 ml TBS aufgenommen. Nach Zentrifugation von zehn Minuten mit 10 000 rpm bei 4° C wurde der Überstand abgenommen und in 5 ml 10xSM konserviert.

Ein Plaque-Test dieser Phagenbibliothek (siehe 3.1.2.1.5) ergab eine Konzentration von $2,8 \times 10^{12}$ pfu/ml.

3.1.2.1.2 Verabreichung der Phagen

1 ml der Phagenbibliothek wurde in eine Spritze aufgezogen und über die Magensonde einer Lewis-Ratte nach zwölfstündiger Nahrungskarenz in den Magen gegeben (siehe Abbildung 3.1). Dazu wurde die Ratte kurz unter der Glasglocke mit Äther narkotisiert.

3.1.2.1.3 Herstellung des Lysates

Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Stunden wurde die Ratte wiederum narkotisiert und anschließend mit PBS perfundiert. Die Organe wurden entnommen und in 2 ml LB-Medium homogenisiert. Das Organhomogenat wurde zu 200 ml frischer ER2537 Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,6 gegeben und viereinhalb

Stunden mit 95 rpm bei 37° C inkubiert. In dieser Zeit konnten sich Phagen, wenn sie sich im Organhomogenat befanden, vermehren.

3.1.2.1.4 Reinigung

Das Lysat nach 3.1.2.1.3 wurde auf vier Falcon-Röhrchen verteilt und 30 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C zentrifugiert. 80 % des Überstandes wurden anschließend zu 1/6 Vol 20 %igem PEG-8000 (siehe 2.1) / 2,5M NaCl geschüttet und gut gemischt. In den folgenden zwei Stunden konnten die Phagen bei 4° C präzipitieren. Nach Zentrifugation von 60 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C wurden die vier Sedimente mit ein wenig Überstand gelöst und zusammen in ein Falcon-Röhrchen überführt, um die Phagen später besser in TBS (siehe 2.6.1) aufnehmen zu können. Nach

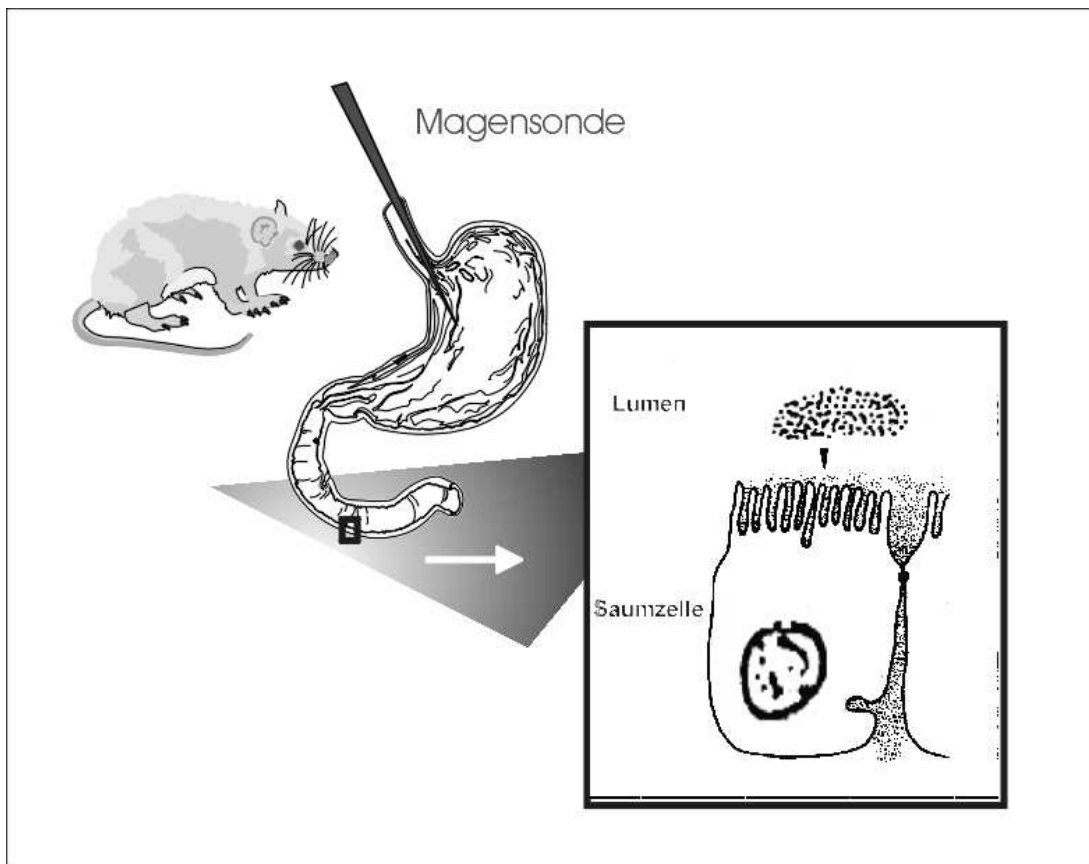


Abb.3.1 Gabe der Phagendisplaybibliothek

Die Phagenbibliothek wurde in 1 ml SM gelöst über eine Magensonde in den Magen der kurz narkotisierten Ratte gegeben. Die eingefügte Darstellung zeigt, wie die Phagen der Saumzelle präsentiert werden.

weiterer Zentrifugation von 30 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C wurde der Überstand verworfen und das Sediment konnte leicht antrocknen. Daraufhin wurde dieses in 2 ml TBS gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

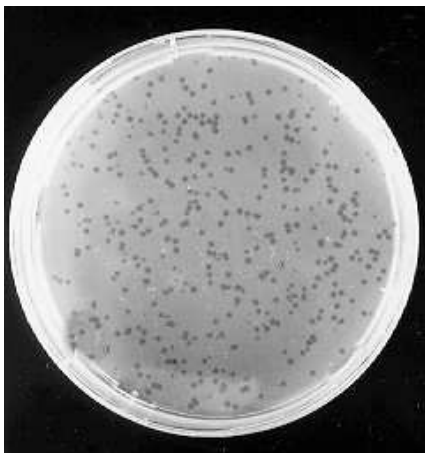
Um weitere Partikel, die ebenfalls in 20 % PEG-8000 / 2,5M NaCl gefällt wurden und sich nicht in TBS lösten, zu entfernen, wurde zehn Minuten mit 10 000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Um ein phagenfreundliches und stabiles Ionenmilieu zu schaffen, wurden 200µl SM(10x) (siehe 2.6.1) hinzugegeben.

In dieser Form wurden die Phagen bei 4° C gelagert und standen der Sequenzierung, einem Plaque-Test oder einer erneuten Gabe über die Magensonde zur Verfügung.

3.1.2.1.5 Plaque-Test S

Um die Konzentration von Phagen in einer Lösung zu bestimmen, wurde die Lösung soweit verdünnt, bis einzeln zählbare Plaques auf einer Kulturplatte sichtbar wurden. Der erste Schritt bestand in der Herstellung einer Verdünnungsreihe der Probe, die untersucht werden sollte. Die Sensitivität des Plaque-Test S lag anhand der Verdünnungsstufen und Mischungsverhältnisse bei 10000 Phagen pro Milliliter.

In zehn Eppendorf-Gefäße wurden 900 ml LB-Medium (siehe 2.6.1) vorgegeben. In



das erste Gefäß wurden weitere 90 ml LB-Medium gegeben, damit die erste Verdünnungsstufe schon bei 1:1000 lag. Von der Phagenlösung wurden 10 µl in das erste Eppendorf-Gefäß gegeben, aus dem ersten Eppendorf-Gefäß wiederum 100 µl entnommen und in das zweite Gefäß gegeben.

Nach Mischen und sorgfältigem Pipettenspitzenwechsel wurde dieser Schritt für die weiteren Gefäße wiederholt. Die Verdünnungsreihe ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Sensitivität dieser Verdünnungsreihe liegt bei 10^4 . Somit müssen sich mindestens 10 000 Phagen in der Ausgangslösung befinden, um

Abb.3.2 Plaque-Test

Über die Zahl der Aufhellungen (Plaques) wurde die Konzentration der Phagen in der Ausgangslösung errechnet

nachgewiesen werden zu können. In jeweils ein Mischgefäß wurden 250µl Bakterienkultur ER2537 mit OD₆₀₀ von 0,6, 10 µl Phagenverdünnung und 3 ml flüssigwarmer Topagar gegeben, gemischt und jeweils sofort auf eine vorgewärmte Grundagarplatte (Groundagar) gegeben.

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37° C inkubiert, um die Bakterien wachsen zu lassen.

Am folgenden Morgen konnte auf den Platten, welche Bakteriophagen enthielten, kleine punktförmige Aufhellungen gesehen werden. Eine Aufhellung entsprach dem Ort, an welchem ein einzelner Bakteriophage sich vermehrt und das Wachstum der Bakterien um sich herum gehemmt hatte. Ein Phage selbst ist zu klein, um ohne Vergrößerung gesehen zu werden, aber die durch den Phagen am Wachstum gehemmten Bakterien hinterlassen auf der Kulturplatte eine Aufhellung. Sie haben sich gegenüber den anderen Bakterien kaum vermehren können, da der Phage ihre Syntheseapparatur weitgehend beanspruchte. Die neu gebildeten Phagen wurden aus der Zelle ausgeschleust, und infizierten die Bakterien, die am nächsten lagen, und hemmten ebenfalls deren Wachstum (siehe Abb. 3.2).

Durch Zählen der Aufhellungen (Plaques) konnte die Konzentration der Phagen in der Ausgangslösung errechnet werden und in pfu/ml angegeben werden. Die Berechnung von pfu/ml erfolgte über die Animpfmenge (siehe Abb. 3.3).

Tabelle 3.1 Verdünnungsreihe für Plaque-Test S

Ûppendorf-Gefäß-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LB-Medium (µl)	990	900	900	900	900	900	900	900	900	900
Dazugegebene Phagenlösung (µl)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Verdünnungsfaktor	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹²

Aus jeder Verdünnung wurden 10 µl für den Nachweis auf Kulturplatten entnommen.

$$\text{Verdünnungsfaktor} \cdot \frac{1 \text{ (pfu)}}{\text{Animpfvolumen (ml)}} = \text{Phagenkonzentration} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right)$$

Abb.3.3 Berechnung der Phagenkonzentration bei Plaque-Test

3.1.2.1.6 Plaque-Test HS

Um sehr geringe Konzentrationen an Phagen nachzuweisen, wurde der Plaque-Test S modifiziert.

In der ersten Verdünnungsstufe wurden 100 µl Phagenlösung zugesetzt und zusätzlich eine Kulturplatte mit 100 µl unverdünnter Phagenlösung angelegt. Die Verdünnungsreihe wird in Tabelle 3.2 gezeigt.

Die Sensitivität betrug somit zehn Phagen pro Milliliter. Die Modifikation der Methode wurde geprüft, indem schon bekannte Phagenkonzentrationen mit Plaque-Test HS bestätigt werden konnten.

3.1.2.1.7 Vom Plaque zur Sequenz

Die Sequenz der vom Phagen präsentierten Peptide, konnte durch Sequenzierung des Inserts ermittelt werden. Dazu mußten Plaques ausgestochen und die darin enthaltenen Phagen nochmals amplifiziert werden, um genügend DNA für die Sequenzierungstechnik zu erhalten. Ausgestochene Plaques konnten in SM(1x) bei 4° C bis zur Sequenzierung gelagert werden.

Gelagerte oder frisch ausgestochene Plaques wurden in 36 ml frischer ER2537-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,6 gegeben. Phagen des Plaques konnten sich darauf in den Bakterien bei 37° C und 110 rpm vermehren. Nach viereinhalb Stunden wurde die Lösung für 30 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Im Sediment befanden sich die Bakterien und im Überstand die gelösten Phagen. Um die Phagen auszufällen, wurde 1/6 Volumen autoklaviertes 20%iges PEG-8000 / 2,5 M NaCl zum Überstand dazugegeben und kräftig gemischt. Eine Inkubation über Nacht bei 4° C unterstützte die Fällungsreaktion. Am folgenden Morgen wurde das Gemisch

Tabelle 3.2 Verdünnungsreihe des Plaque-Test HS

Eppendorf-Gefäß-Nr.	1	2	3
Menge LB-Medium (µl)	0	900	900
Dazugegebene Phagenlösung (µl)	100	100	-
Verdünnungsfaktor	1	10	100

Aus jeder Verdünnung wurden 100 µl für den Nachweis auf Kulturplatten entnommen.

45 Minuten lang mit 4000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Das entstandene Sediment enthielt die amplifizierten Phagen. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment konnte leicht antrocknen. Es wurde in 1 ml TBS gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Eine erneute Zentrifugation für zehn Minuten mit 10 000 rpm bei 4° C sorgte dafür, daß Teile der ebenfalls mit 20%igem PEG-8000 / 2,5 M NaCl gefällten Verunreinigungen von der Phagenlösung getrennt wurden. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Zur Kontrolle wurde ein Plaque-Test durchgeführt, welcher semiquantitativ Phagen nachwies. Nach Sequenzierung wurde das Ergebnis mit der bekannten Oberflächensequenz verglichen. 21 zusätzliche Nukleotide entsprachen der Insertsequenz. Die Peptidsequenz wurde anhand des genetischen Codes ermittelt.

3.1.2.2 T7-PHAGEN

3.1.2.2.1 T7-Phagenbibliothek

Für die Versuche mit T7-Phagen wurde eine T7-Phagenbibliothek von Professor Schlüsener (Tübingen) überlassen. In das Oberflächenprotein dieser T7-Select415-1b Phagen (Russel 1991) war ein Insert von 100 Nukleinsäuren zwischen die Restriktionsschnittstellen Eco RI und Hind III eingebracht worden. Das translatierte Produkt ergab ein Proteingerüst mit einer komplex in den Raum ragenden Struktur. Die Konzentration der Phagenlösung betrug $8,5 \times 10^{11}$ pfu /ml.

3.1.2.3.2 Verabreichung der Phagen

In einer Spritze aufgezogen wurde 1 ml der T7- Phagenbibliothek mit der Magensonde einer achtwöchigen Lewis-Ratte nach zwölfstündiger Nahrungskarenz in den Magen gegeben. Dazu wurde die Ratte kurz unter der Glasglocke mit Äther narkotisiert. Nach zwei bis sechs Stunden Inkubation wurde die Ratte wiederum narkotisiert und mit PBS perfundiert. Die Organe wurden entnommen und in 2 ml M9TB-Medium (siehe 2.6.1) homogenisiert.

3.1.2.4.3 Herstellung des Lysates

Das Organhomogenat oder ausgestochene Plaques wurden zu 35 ml frischer BL21-Bakterienkultur (siehe 2.4) mit einer OD₆₀₀ von 0,6 gegeben und vier Stunden mit 95 rpm bei 37° C inkubiert. In dieser Zeit konnten sich Phagen, wenn sie sich im

Organhomogenat oder im Plaque befanden, vermehren. Wenn die Bakterienkultur nach ungefähr zwei Stunden aufklarte, sprach dies für die Lyse der Bakterien durch T7-Phagen, da T7-Phagen ein Bakterium unter Destruktion der Zellwand verlassen.

3.1.2.5.4 Reinigung

Nach Zugabe von 3 ml 5 M NaCl zum Lysat wurde dieses für 30 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem frischen Gefäß mit 1/6 Volumen 50 %igem PEG 8000 vermischt und 30 Minuten zur Präzipitation auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 20 Minuten mit 4000 rpm bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das leicht angetrocknete Sediment wurde in 1,2 ml SM(1x) wieder gelöst. Der Extrakt wurde bei 10000g für zehn Minuten zentrifugiert.

Der letzte Schritt der Reinigung bestand in der Dialyse. Die Phagenlösung wurde in eine Slide-A-Lyzer® Kasette zwischen zwei Membranen von Porengröße 10 kDa gebracht. Die Kasette wurde an einer Boje in einen Liter SM(1x) gebracht und unter leichtem Rühren bei 4° C über Nacht dialysiert. Phagen von 30 nm Durchmesser wie der T7-Phage können aufgrund ihrer Größe nicht durch die Membran diffundieren. Aufgrund der Osmose stellte sich zwischen der Lösung, in der die Phagen gelöst waren, und dem SM-Medium ein Konzentrationsgleichgewicht ein. Niedermolekulare Substanzen, welche die Lösung verunreinigten, wanderten durch die Membran in das SM-Medium. Die Phagenlösung wurde somit gereinigt. Von der Kasette entnommen wurde die Phagenlösung bei 4° C gelagert. Ein Plaque-Test der Phagen aus dem Organhomogenat und die Sequenzierung aus ausgestochenen Plaques konnten folgen.

3.1.2.6.5 Plaque-Test

Zur Konzentrationsbestimmung von Phagen wurde die Lösung verdünnt, bis einzelne zählbare Plaques auf einer Kulturplatte detektierbar wurden. Eine standardmäßige Verdünnungsreihe (S), wie bei M13-Plaquetests, wurde hergestellt. 250 µl frische BL21 Bakterien mit einer OD₆₀₀ von 0,6 und 100 µl Phagenlösung aus der Verdünnungsreihe wurden zusammen mit 3,3 ml warmem Deckagar auf eine Grundplatte gegossen. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Morgen

danach konnten auf den Platten Plaques gezählt werden und die Phagenkonzentration nach bekannter Formel (siehe Abb. 3.3) errechnet werden.

Die frische BL21-Kultur wurde gewonnen, indem eine Kolonie von der Minimalnährbodenplatte in 50 ml M9TB über Nacht mit 92 rpm bei 37° C geschüttelt wurde. Davon wurden 20 µl in 100 ml LB gegeben und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert.

3.1.2.7.6 Vom Plaque zur Sequenz

Die im Plaque ausgestochene Phagenmenge war für eine Sequenzierung zu gering. Deshalb wurde vom Plaque ein Lysat hergestellt und dieses wiederum nach dem oben beschriebenen Reinigungsverfahren bearbeitet. Die Phagen wurden, in SM(1x) gelöst, zur Sequenzierung eingeschickt. Das Sequenzierungsergebnis wurde mit der bekannten Oberflächensequenz verglichen und das 100 bp lange Insert identifiziert. Die Peptidsequenz wurde anhand des genetischen Codes ermittelt. Da eine Verschiebung des Leserahmens (Frameshifting) auszuschließen war (Rosenberg et al. 1996), konnte eine eindeutige Translationssequenz von Aminosäuren ermittelt werden.

3.1.2.3 KONTROLLEN

Als Kontrollphagen wurden M13KO7-Phagen (siehe 2.3) verwendet. Sie wurden wie die Phagen aus der Bibliothek appliziert und nach dem Protokoll des mitgelieferten Kits präpariert. Die Firma New England Biolabs, Fr. Dr. Stamminger (Schwalbach/Ts) bestätigte, daß M13KO7-Phagen zur Negativkontrolle verwendet werden können und keine rekombinante Fusionspeptide auf ihrer Oberfläche darstellen.

3.2 Immunhistochemie

Die Technik der Immunhistochemie ist heute ein verbreitetes und bekanntes Verfahren, welches nur eine von spezifischen Färbemethoden darstellt (Mesa et al. 1977). Ebenso sind immunoenzymatische Färbemethoden schon länger ein Standard (Bergquist et al. 1976). Einen Überblick derzeitiger Standardmethoden geben Laborhandbücher (Naish 1997, Bourne 1997). Das Färbe- und Präparationsprotokoll

wurde an die Fragestellung und Laborumgebung angepasst und dabei leicht modifiziert. Um Phagen, die sich in der Darmmukosa oder der Milz befanden, zu färben, wurde die Färbung mit spezifischen Antikörpern unter Verwendung der Immunperoxidasefärbung und der Doppelfärbung genutzt. Die Gewebefixation und -bearbeitung war in beiden Fällen gleich.

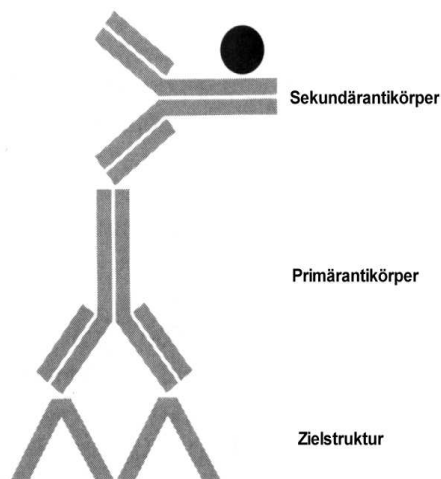
3.2.1 Immunperoxidase-Färbung

Das Prinzip der Immunperoxidase-Färbung wird in Abbildung 3.4 verdeutlicht.

Der Primärantikörper bindet an die gesuchte Zielstruktur. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und kann dessen Signal verstärken, indem ein Primärantikörper von mehreren Sekundärantikörper-Molekülen gebunden wird. Der Sekundärantikörper trägt das Enzym Peroxidase an seine Struktur gebunden. Das Enzym zerlegt sein Substrat Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoffradikale. Die Sauerstoffradikale oxidieren die Entwicklungssubstanz DAB und führen zur Braunfärbung durch lokale Präzipitation.

3.2.1.1 PRÄPARATION

Zwei bis sechs Stunden nach intragastraler Verabreichung von 1 ml Phagenlösung



wurde der Brustraum der Ratten nach kurzer Äthernarkose eröffnet. Nach Perfundierung mit frischem 4%igem Paraformaldehyd wurden Teile des Dünndarmes und der Milz entnommen und über Nacht in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C eingelegt.

Bevor die Gewebestücke auf Plastikgitterboxengröße zur Einbettung zurechtgeschnitten wurden, lagen sie zwei Stunden bei 4°C in PBS. Die

Abb.3.4 Prinzip der Immunperoxidasefärbung
An Zielstrukturen bindende Primärantikörper werden durch peroxidasekonjugierte Sekundärantikörper detektiert.

zugeschnittenen Präparate wurden in destilliertem Wasser gewässert, um restliches Paraformaldehyd zu entfernen.

Tabelle 3.3 Protokoll der Citadelparaffinierung

Programm -ablauf	Lösung	Dauer in Minuten
1	70 %iges Ethanol	30
2	70 %iges Ethanol	30
3	80 %iges Ethanol	60
4	96 %iges Ethanol	60
5	100 %iges Ethanol	60
6	100 %iges Ethanol	60
7	1:1 Mischung: 100 %iges Ethanol und Chloroform	60
8	1:1 Mischung: 100 %iges Ethanol und 100 %iges Chloroform	60
9	100 %iges Chloroform	60
10	100 %iges Chloroform	60
11	Paraffin	120
12	Paraffin	120
	Gesamtdauer: 13 Stunden	

3.2.1.2 PARAFFINEINBETTUNG

Die Gewebestücke wurden über Nacht in der Citadelparaffinierungsmaschine eingebettet (Tabelle 3.3 zeigt das Protokoll). Die Einbettung erfolgte, indem die Stücke in eine Ausgießschale mit warmem Paraffin getaucht wurden. Die Gitterboxen wurden als Träger des Paraffin-blocks verwendet und die Stücke in erkaltendes Paraffin gedrückt. Zur Aushärtung wurde die Schale 15 bis 30 Minuten auf die Kühlplatte gestellt. Die von den Ausgießformen abgenommenen Paraffinblöcke wurden bei minus 20°C aufbewahrt.

3.2.1.3 SCHNITTTECHNIK

Die Paraffinblöcke wurden zum Schneiden unter Eisbeutelkühlung in ein Mikrotom gespannt und mit 2-4 µm Dicke geschnitten. Im destillierten Wasserbad (Raumtemperatur) konnten sich die Schnitte ausdehnen, glätten und mit Wasser sättigen. In einem zweiten Wasserbad (45° C) wurde dieser Vorgang intensiviert. Nach ein bis zwei Minuten wurden die Schnitte auf silanbeschichtete Objektträger geladen. Die Inkubation bei 37° C über Nacht ließ die Schnitte trocknen und fixierte sie auf dem Objektträger.

3.2.1.4 LAGERUNG

Die auf dem Objektträger getrockneten Schnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert. Da das Gewebe nicht entparaffiniert war, wurden Oxidation und anderen Schädigungen vermieden.

3.2.1.5 ENTPARAFFINIERUNG

Vor der Färbung wurden die Objektträger eine halbe Stunde in Chloroform entwachst. Um den Schnitt hydrophil zu machen, wurden die Schnitte nach kurzem Abtrocknen in eine absteigende Alkoholreihe gebracht (fünf Minuten in 100 %igem Ethanol, dann mehrmaliges Eintauchen in 96 %iges und anschließend 70 %iges Ethanol). Abschließend wurde der Alkohol durch Eintauchen in destilliertes Wasser entfernt. Die Schnitte waren bereit für die Färbung.

3.2.1.6 BLOCKIERUNG DER ENDOGENEN PEROXIDASE UND UNSPEZIFISCHER BINDUNGEN

Die endogene Peroxidase der entparaffinierten Schnitte wurde in einem 15 Minuten langen Tauchbad aus einer Mischung von 200 ml 100 %igem Methanol und 6 ml 30 %igem Wasserstoffperoxid deaktiviert. Der Vorgang wurde in destilliertem Wasser abgebrochen. Die Schnitte wurden vor allen nachfolgenden Färbeschritten in einer Küvette mit TBS aufbewahrt.

Die unspezifischen Bindungen wurden mit 100 µl 10%igem Schweineserum (siehe 2.1) pro Schnitt für mindestens 30 Minuten bei 4° C blockiert.

3.2.1.7 AUFTRAGEN DER ANTIKÖRPER

Der Primärantikörper gegen M13-Phagen aus dem Schaf (Anti-M13, siehe 2.2) wurde 1:100 mit Tris-BSA (siehe 2.6.1) verdünnt und je 100 µl auf die Schnitte gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4° C wurde der Antikörper im TBS-Körbchen zehn Minuten abgewaschen.

Der mit Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper gegen Schafglobuline (siehe 2.2) wurde 1: 400 verdünnt, je 100 µl der Verdünnung auf die Schnitte gegeben, woraufhin eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur folgte. Nach Abschütten des Antikörpers wurden die Schnitte fünf Minuten in TBS gewaschen.

3.2.1.8 ENTWICKLUNG MIT DAB

Die Schnitte wurden für 105 Sekunden in 200 ml DAB-Entwickler (siehe 2.6.1) gefärbt. Die Reaktion wurde in destilliertem Wasser gestoppt und die Schnittserie in Tris-Puffer konserviert.

3.2.1.9 GEGENFÄRBUNG MIT HÄMALAUN

Die Zellkerne wurden durch ein- bis zweimaliges Eintauchen in 1:2 verdünntem Hämalaun gefärbt. Unter fließendem Wasser wurden die Schnitte fünf Minuten gewaschen.

Hämalaun als positiv geladener Farbstoff band an die sauren Phosphorgruppen der Nukleinsäuren des Chromatin. Die Phosphatgruppen gingen bei pH kleiner drei eine Komplexbindung mit den Schwermetallanteilen des Hämalaun unter Blaufärbung des Zellkerns ein. Mit aufsteigender Alkoholreihe von 70, 96 und 100% wurde das Gewebe gewaschen.

3.2.1.10 EINDECKUNG

Die gefärbten und gewaschenen Schnitte wurden mit Xylol in der Funktion als Intermedium zwischen Alkohol und Einschlußmittel behandelt und mit Harzlack bedeckt. Nach Deckglasversiegelung und Trocknen unter dem Abzug konnte mikroskopiert werden.

3.2.2 Doppelfärbung

Die Immunperoxidase-Färbung mit der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung (APAAP) zu kombinieren (siehe Abb. 3.5), ist das Prinzip der Doppelfärbung. Bei der APAAP-Färbung wird als Primärantikörper ein Antikörper aus der Maus gegen das MHC II -Protein der Ratte verwendet. Der Sekundärantikörper aus dem Kaninchen richtet sich gegen Mausproteine. Gegen die Alkalische Phosphatase richtet sich ein Antikörper aus der Maus (Tertiärantikörper), welcher durch den Sekundärantikörper ebenfalls gebunden wird. Die Alkalische Phosphatase wandelt den Entwickler FastBlue in einen blau präzipitierenden Farbstoff um. Bei der Doppelfärbung in dieser Arbeit wurde wie bei der Immunperoxidase-Färbung bis zu Punkt 3.2.1.9 beschrieben verfahren, jedoch mit folgenden Variationen.

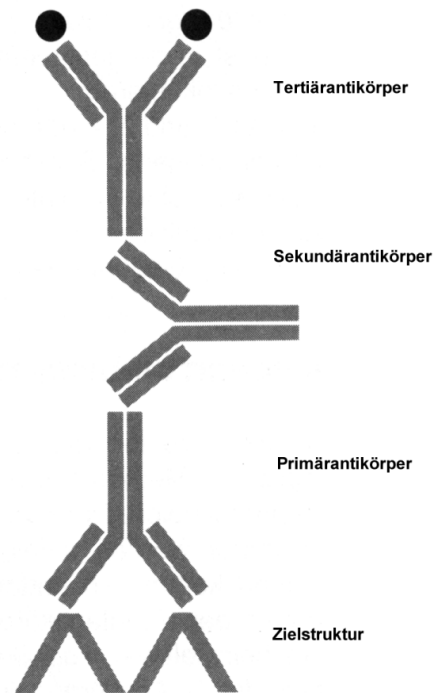


Abb.3.5 Prinzip der APAAP-Färbung

An Zielstrukturen bindende Primärantikörper werden durch Sekundärantikörper detektiert, welche wiederum mit Alkalischer Phosphatase konjugierte Tertiärantikörper binden.

3.2.2.1 MIKROWELLENFIXIERUNG

Um die Restaktivität der Peroxidase noch vollständiger zu inaktivieren, wurden die Schnitte im Anschluß an den Vorgang 3.2.1.6 in Zitratpuffer (siehe 2.6.1) zwölf Minuten bei Stufe eins in der Mikrowelle gekocht. Nach 30 Minuten Abkühlen wurden sie wieder in TBS-Küvetten gestellt.

3.2.2.2 BLOCKIERUNG UNSPEZIFISCHER BINDUNGEN

Mit 100 µl Schweineserum pro Schnitt (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) wurden die unspezifischen Bindungen für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

3.2.2.3 AUSRAGEN DER WEITEREN ANTIKÖRPER

Der Primärantikörper gegen MHC-II (siehe 2.2) wurde 1:100 mit Tris-BSA verdünnt, 100 µl wurden auf jedem Schnitt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkippen und Waschen der Schnitte in Tris-BSA wurden diese wieder für zehn Minuten in TBS überführt. 100 µl des Sekundärantikörpers aus der Maus, 1:20 mit Tris-BSA verdünnt, wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Abkippen und Waschen in Tris-BSA wurden die Schnitte zehn Minuten in die TBS-Küvette gestellt. Der Tertiärantikörper gegen Alkalische Phosphatase (siehe 2.2), 1:80 mit Tris-BSA verdünnt, wurde zu je 100 µl aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Entwickeln wurden die Antikörper abgekippt, die Schnitte in Tris-BSA gewaschen und in TBS-Küvetten getaucht.

3.2.2.4 ENTWICKLUNG MIT FAST BLUE

200 µl der frisch hergestellten Fast-Blue-Entwicklungslösung (siehe 2.6.1) wurden auf die Schnitte gegeben. Unter Mikroskopkontrolle wurde zwölf Minuten lang entwickelt und die Schnittserie in TBS überführt. Nach Wässern mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte zur Schwächung des Farbhintergrundes nochmals für zehn Minuten in der Mikrowelle bei Stufe eins gekocht.

3.2.2.5 HYDROPHILE EINDECKUNG

Die getrockneten Schnitte wurden mit hydrophilem Immuno-Mount Eindeckmittel versehen und mit Deckgläsern versiegelt.

3.2.3 Mikroskopie

Mit dem Photomikroskop wurden differentielle Interferenzkontrastaufnahmen nach Nomarski ohne Filter hergestellt.

3.2.4 Kontrollen

Zu allen Schnittpräparaten wurden Negativkontrollen angefertigt. Dabei wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen M13-Phagen ausgelassen, aber sonst wie im Positivfall verfahren.

Zu jeder Färbung wurden zusätzlich Positivkontrollen an Gewebematerial angefertigt, in dem die gesuchte Zielstruktur nach Lokalisation und Positivität bekannt war.

3.3 Peptidbank-Recherche

Die nach Sequenzierung des Inserts der Phagen ermittelten Peptidsequenzen wurden mit bekannten Sequenzen verglichen.

Hierzu wurden die Advanced BLAST Suchmaschine des NCBI (National Center of Biotechnology Information), welche unter der Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> zu finden ist, und die Kabat-Datenbank verwendet. Die BLAST-Suchmaschine fragt mehrere Datenbanken gleichzeitig ab. Die Datenbanken sind unter Punkt 3.3.1 aufgeführt.

Altschul et al. beschrieben 1990 den Algorithmus der Suchmaschine, der durch seine Schnelligkeit und Sensitivität Aufsehen erregte (Altschul et al. 1990). Inzwischen wurde der Algorithmus erweitert und ermöglicht mit Gapped Blast den Vergleich von Sequenzen, bei denen Homologielücken auftreten (Altschul et al. 1997).

Die selektierten Peptidsequenzen wurden an die Suchmaschine mit Parametern laut Tabelle 3.4 übergeben. Erklärungen zu den Parametern sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.4 Parameterliste der Proteinbank-Recherche

Parameter	Wert
<i>Program</i>	BLASTP 2.0.9 [May-07-1999]
<i>Database</i>	nr und kabat
<i>Organism limit</i>	none
<i>Expect</i>	1000
<i>Filter</i>	default
<i>Matrix</i>	PAM30

Tabelle 3.5 Erklärungen zur Parameterliste

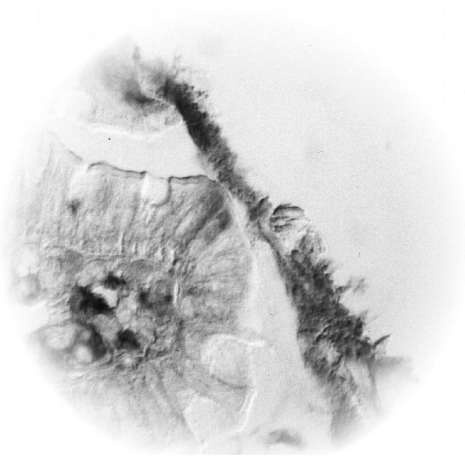
BLASTP	Name des Suchprogrammes, das Aminosäureanfragen mit Proteinsequenzen in der Datenbank vergleicht.
<i>nr</i>	bedeutet, daß die Datenbanken Genbank, PDB™, PRF und PIR benutzt wurden.
<i>expect</i>	beschreibt die Anzahl der Treffer, die bei einer Datenbank bestimmter Größe statistisch erwartet werden können. Die Erhöhung des <i>expect</i> -Wertes sorgt dafür, daß mehr Positionen auf der Trefferliste verglichen werden und somit auch Treffer, die nicht von großer statistischer Signifikanz sind, angezeigt werden.
<i>filter</i>	bezieht sich auf das eingegebene Peptid und filtert statistisch signifikante, aber biologisch uninteressante Ergebnisse von der BLASTP-Ergebnisausgabe (zum Beispiel Aminosäure-Wiederholungen, wie PPPPPPPPPPP bei Proteinsequenzen) aus.
<i>matrix</i>	Mögliche Aminosäurenlücken und -ersetzungen bei potentiellen Treffern werden durch eine Matrix, welche bekannte Ersetzungen und Lücken aus evolutionären Prozessen beinhaltet, berücksichtigt.
<i>PAM30</i>	PAM30 ist die Matrix für Peptidsuchen mit einer Länge kleiner als 35 Aminosäuren.

3.3.1 Datenbanken

Tabelle 3.6 Mit BLAST benutzte Datenbanken

Abkürzung	Name der Datenbank	Internetadresse
GenBank	National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.gov/Web/Genbank
PDB™	Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb
SwissProt		http://www.expasy.ch/sprot
PRF	Protein Research Foundation	http://www.prf.or.jp
PIR	Protein Identification Resource	in Datenbank des NCBI integriert
Kabat (Johnson et al. 1996)	The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest	http://immuno.bme.nwe.edu

4 ERGEBNISSE



4.1 PHAGENDISPLAY **45**

4.1.1 M13-PHAGEN KÖNNEN IN DER
MILZ NACHGEWIESEN WERDEN! 45

4.1.2 WELCHE PHAGENMENGE KANN
NACHGEWIESEN WERDEN? 45

4.1.3 INSERTSEQUENZEN DER
SELEKTIONIERTEN M13-PHAGEN 47

4.1.4 DATENBANKRECHERCHE 48

4.1.5 T7-PHAGEN 49

4.2 IMMUNHISTOLOGIE **50**

4.2.1 IMMUNPEROXIDASE-FÄRBUNG 50

4.2.2 DOPPELFÄRBUNG 55

4.3 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE **57**

4.1 Phagendisplay

4.1.1 M13-Phagen können in der Milz nachgewiesen werden!

Nach erstmaliger Gabe von 1 ml M13-Phagenbibliothek mit einer Konzentration von $2,8 \times 10^{12}$ pfu/ml über die Magensonde konnten nach Amplifikation der Phagen aus Milzhomogenat mittels Plaque-Test Phagen in der Milz nachgewiesen werden (Abb.4.1).

M13-Milzhomogenat	Kontrolle	
$8,95 \times 10^{10} \pm 0,25$	0	[pfu/ml]
$2,1 \times 10^{13} \pm 0,8$	0	[pfu/ml]

Abb. 4.1 Semiquantitativer (Plaque-Test S) Nachweis von M13-Phagen in der Milz. Zwei Stunden nach Gabe der Phagenbibliothek konnten in der Milz Phagen nachgewiesen werden.

Ergebnisse der Versuche entsprachen der erwarteten Konzentrationsbreite nach Amplifikation von Phagen. Die Konzentrationsangaben sind semiquantitativ und belegen eindeutig, daß M13-Phagen im Milzhomogenat waren.

M13-Phagen waren in der Lage die Darmmukosa zu überqueren. Erstaunlicherweise waren sie unbeschadet und noch intakt, da sie mittels Plaque-Test nachgewiesen werden und somit Bakterien infizieren konnten.

In Kontrolltieren derselben Generation, die jedoch keine Phagen-Applikation hatten, konnten keine Phagen in der Milz nachgewiesen werden.

4.1.2 Welche Phagenmenge kann nachgewiesen werden?

Um Phagen aus dem Milzhomogenat ohne vorherige Amplifikation nachzuweisen, wurde der Plaque-Test HS (siehe 3.1.2.1.7) gewählt.

Nach Applikation von 1 ml M13-Phagenbibliothek mit einer Konzentration von $2,8 \times 10^{12}$ pfu/ml konnten zwei Stunden später Phagen aus Milzhomogenat mittels

Plaque-Test HS nachgewiesen werden. Als Vergleichsorgan wurde aus Rücksichtnahme auf besondere Interessen des Instituts das Gehirn gewählt.

Aus dem Gewicht des homogenisierten Organs wurde anhand der spezifischen Dichte das Volumen ermittelt (Für die Berechnung wurde mit einem gerundeten Wert nach für die spezifische Dichte von 1g/ml gerechnet, Forbes et al. 1953). Das Homogenatvolumen setzte sich aus 2 ml LB-Lösung und dem Volumen des Organes zusammen. Somit wurde errechnet, wie viele Phagen im Organ nachzuweisen waren.

Im Milzhomogenat konnten zwischen 24 und 499 Phagen nachgewiesen werden, in Hirngewebe sogar zwischen 2618 und 3486 (Abbildung und Tabelle 4.2).

Die Kontrolle bestand in Organen derselben Rattengeneration, die jedoch ohne

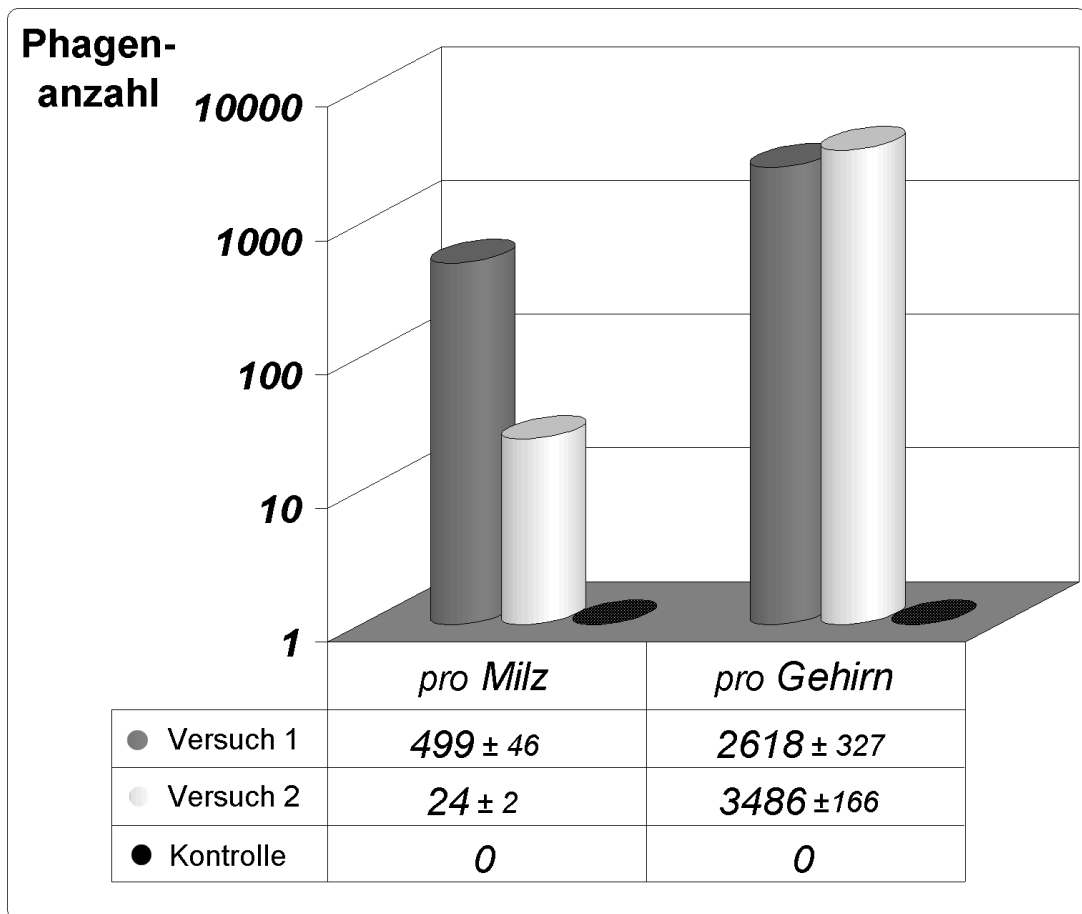


Abb. 4.2 Quantitativer Nachweis von M13-Phagen in Organen
Zwei Stunden nach Applikation konnte mit Plaque-Test HS die Phagenmenge direkt aus dem Organhomogenat bestimmt werden.

Phagenapplikation, präpariert wurden.

Die im Vergleich zur Milz hohe Anzahl an nachgewiesenen Phagen im Gehirn bleibt interessant und könnte auf Peptidbindungsstellen an Hirnstrukturen hindeuten, die jedoch immunhistologisch weiter zu klären wäre. Insgesamt sind jedoch nur wenige Phagen von den 10^{12} verabreichten in das Blutsystem gelangt. Dies unterstützt die Vorstellung von einem spezifischen Transport.

4.1.3 Insertsequenzen der selektionierten M13-Phagen

In der Milz und im Gehirn gefundene M13-Phagen unterschieden sich durch das Insert im Oberflächenprotein von M13KO7-Phage, der als Kontrolle diente.

Um die Insertpeptide genauer zu definieren, wurden beispielhaft sieben Phagenklone sequenziert. Dazu wurden Phagenklone aus der ersten Runde von Plaque-Tests gepickt. Die Nukleotidsequenz ist in ihrer Aminosäure-Entsprechung im 1-Buchstaben-Code dargestellt (Tab. 4.2).

Auffallend ist das häufige Vorkommen der Aminosäuren Prolin (P) und Serin (S). Prolin bedingt eine Richtungsänderung im Peptidfaden und hat dadurch zum einen Einfluß auf die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen aber auch auf die Peptidstruktur kurzer Peptide, wodurch sich besondere Ligandeneigenschaften ergeben können.

Tabelle 4.2 Sequenzen der selektionierten Peptide von M13-Phagen aus Milzhomogenat

Nr.	Nukleotidsequenz	flankierende AS	Peptide	flankierende AS
1	TATCCTAGGCTTCTGACTCCT	S	Y P R L L T P	G
2	TGGCCGTATCCGCCTGCGGGG	S	W P Y P P A G	G
3	TATACGCCTCCGTCGGTTTCT	S	Y T P P S V S	G
4	GCGCATTTGAAGGCGTCGATT	S	A H L K A S I	G
5	ACTCATTTTCCTAGTTGGAAT	S	T H F P S W N	G
6	AGTAATCTGTCTCCGCGTACT	S	S N L S P R T	G
7	GCTGTTTTTGTGAAGGAGCTG	S	A V F V K E L	G

4.1.4 Datenbankrecherche

Der Vergleich selektierter Peptide mit schon bekannten Peptiden und Proteinen von Internetdatenbanken (BLAST) brachte Übereinstimmungen mit Proteinen von den pathogenen Organismen HIV-1 und HHV-7. Die Suchergebnisse wurden nach humanpathogener Relevanz und Funktion des Proteins der übereinstimmenden Sequenz überprüft und ausgewählt.

Zu folgenden Peptiden wurden Übereinstimmungen gefunden:

Anfragesequenz:	1 Y T P P S V S 7 (Peptid Nr. 3)
Suchergebnis:	...473 Q T P P S V S 479...
	(AF069672) gag protein [Human immunodeficiency virus type 1] Länge = 491 AS
Anfragesequenz:	1 S N L S P R T 7 (Peptid Nr. 6)
Suchergebnis:	...143 Q S L S P R T 250...
	(AF069672) gag protein [Human immunodeficiency virus type 1], Länge = 491 AS
Anfragesequenz:	1 A V F V K E L 7 (Peptid Nr. 7)
Suchergebnis:	...1270 I V F V K E L 1276...
	(AF037218) very large tegument protein [Human herpesvirus 7], Länge = 2059 AS

Übereinstimmungen mit Hüllproteinen der invasiven Pathogene HH7 und HIV-1 wurden gefunden.

4.1.5 T7-Phagen

Im Gegensatz zum M13-Phagensystem konnten in parallelen Versuchen keine positiven Ergebnisse mit dem T7-Phagensystem erzielt werden. Das T7-System eignete sich nicht, um Peptide über die Darmmukosa zu selektionieren.

4.2 Immunhistologie

4.2.1 Immunperoxidase-Färbung

Da bestimmte selektionierte Phagen die Schleimhaut des Darmes nachweislich überqueren konnten, wurde durch immunhistochemische Färbung des Jejunums versucht, die Translokation morphologisch zu verfolgen.

Drei verschiedene Klone wurden miteinander verglichen, siehe Tabelle 4.3.

Immunhistologisch konnte bestätigt werden, daß der Kontrollphage M13KO7 nicht durch die Darmmukosa transloziert wird (siehe Abbildung 4.3).

Die Histologie zeigte ferner keine Translokation von M13-Phagen mit irrelevanter Sequenz (Abb. 4.4).

Tabelle 4.3 Aufstellung der Präparate, zum immunhistologischen Vergleich

Klon	Beschreibung	(pfu/ml) bei Applikation
M13KO7	M13-Phage ohne Insert, als Negativkontrolle	$1,14 \times 10^{11}$
PNS	M13-Phage mit irrelevantem Insert aus intravenöser Selektion, zur Negativkontrolle und Abgrenzung gegenüber anderen Peptiden	1×10^{12}
Klon 1	M13-Phage mit Insert (Y P R L L T P), selektioniert über die Mukosa	$1,5 \times 10^{12}$

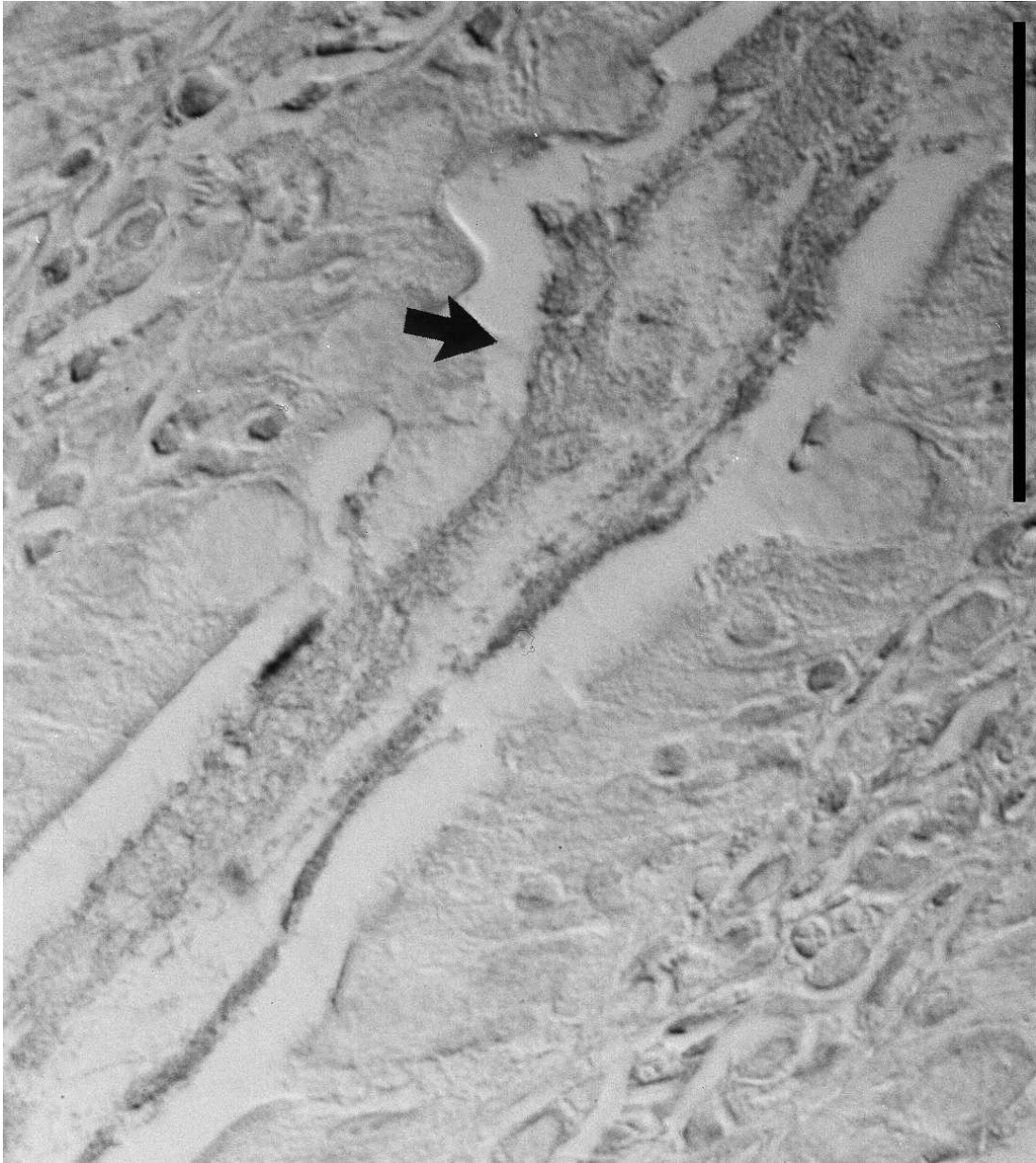


Abb. 4.3 M13-Phagen ohne Insert überqueren die Mukosa nicht.

Nach zweistündiger Phagen-Applikation im Dünndarm zeigt sich eine Peroxidasefärbung (braun) des Darminhaltes zwischen den Zotten (siehe Pfeil). Die Mukosazellen zeigen keine Peroxidasefärbung.

Färbung:

Primärantikörper (1:100, Schaf \propto -M13)

Sekundärantikörper (1:400, Esel \propto -Schaf)

Der Balken repräsentiert 50 μ m.

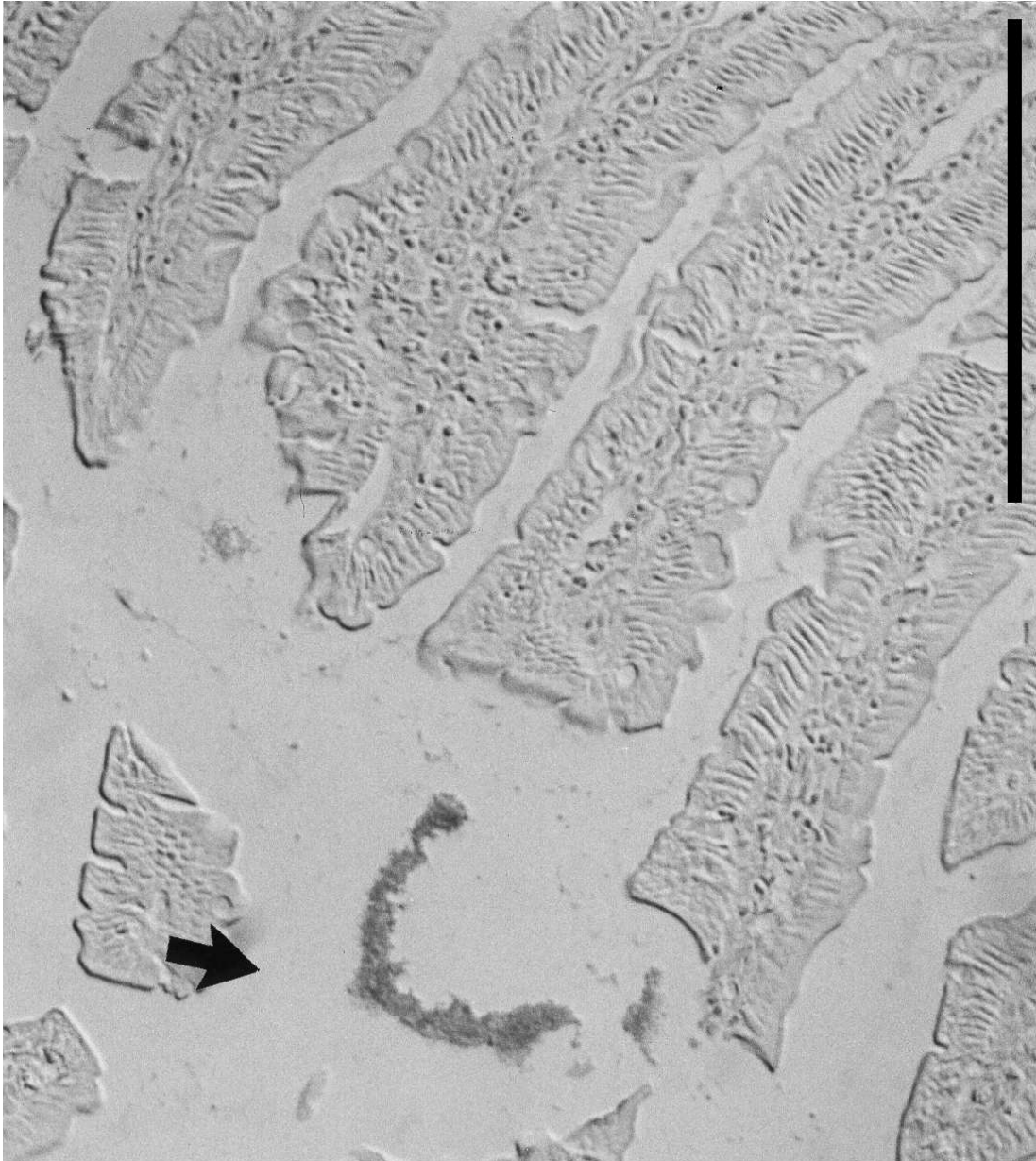


Abb. 4.4 M13-Phagen mit einem irrelevanten Insert (siehe 4.2.1) überqueren die Mukosa nicht.

Der Pfeil zeigt die luminale Peroxidasefärbung (braun) von Darminhalt zwei Stunden nach Applikation der rekombinanten M13-Kontrollphagen (PNS). Eine peroxidasespezifische Braunfärbung der Dünndarmfalten (Plicae circulares) ist nicht zu erkennen.

Färbung: Primärantikörper (1:100, Schaf ∞ -M13)

Sekundärantikörper (1:400, Esel ∞ -Schaf)

Der Balken repräsentiert 50 μ m.

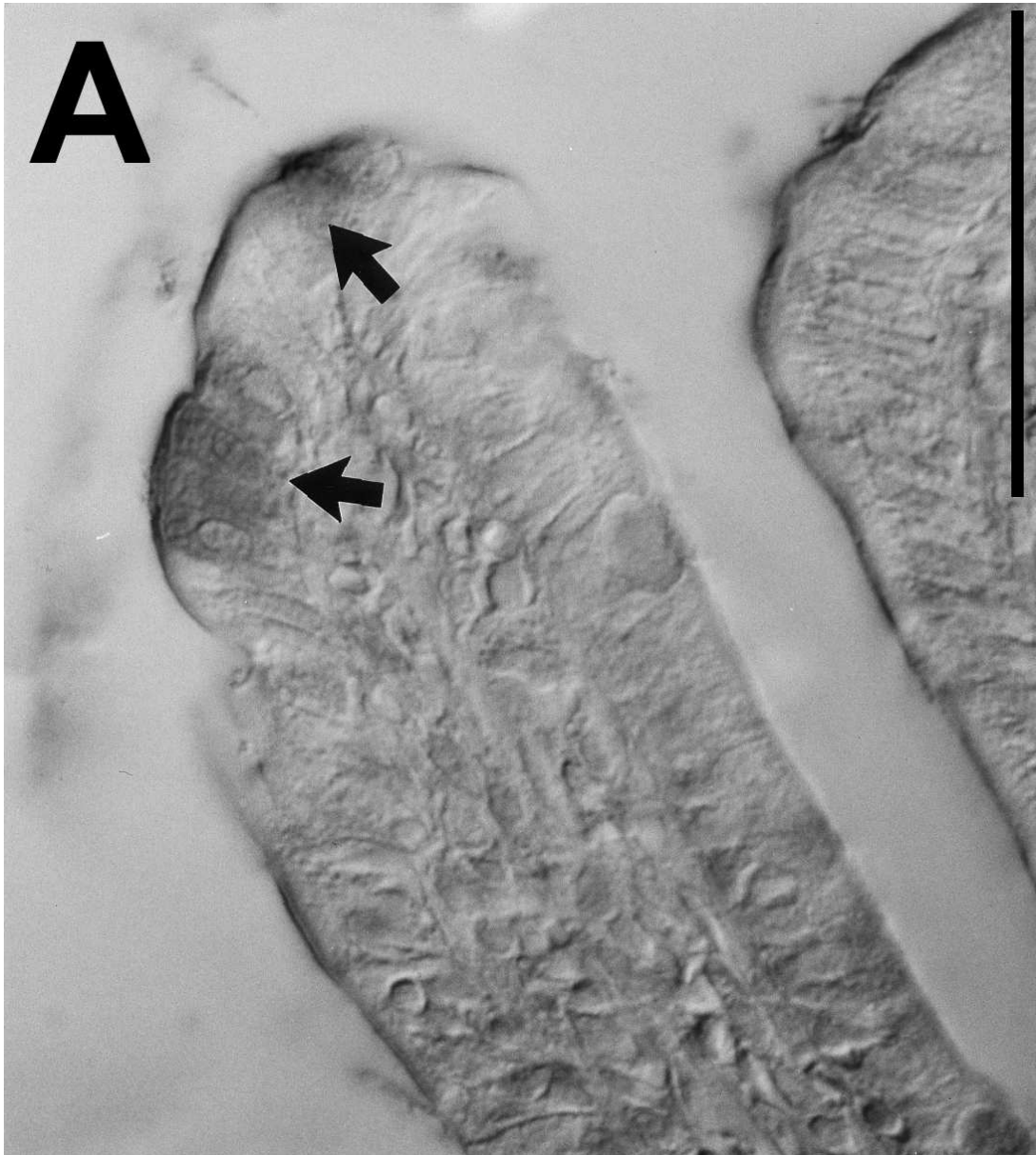


Abb. 4.5

Immunohistochemischer Nachweis des rekombinanten M13-Phagen KLON 1 nach zweistündiger Applikation.

A: Die deutliche Peroxidase-Färbung von Phagen (Pfeile) zeigen braun das Zytoplasma von an der Zottenspitze gelegenen Enterozyten. Keine Anfärbung von kryptennahen Zellen (M-Zellbereiche) konnte gesehen werden. Das Darmlumen besitzt eine kräftige Peroxidasefärbung (braun), die Dünndarmschleimhaut ist mit Hämalaun gegengefärbt.

Der Balken repräsentiert 50 μ m.

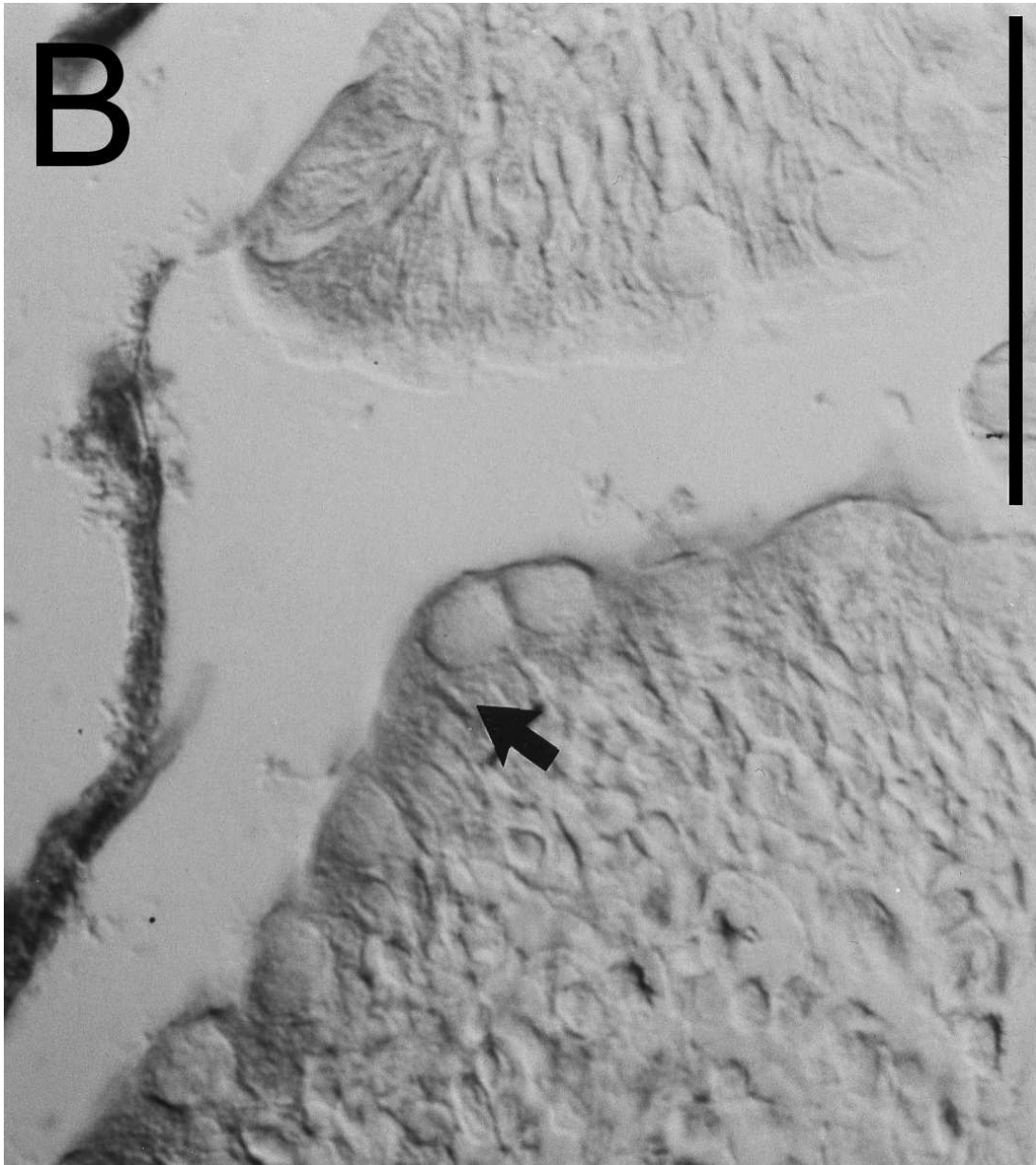


Abb. 4.5

B: Das Zytoplasma von Enterozyten ist braun gefärbt. Die Färbung nimmt von luminal bis zur Submukosa ab. Abnehmenden fadenförmige Braunfärbung in der Submukosa spricht für schon translozierte M13-Phagen.

Färbung:

Primärantikörper gegen M13-Phagen (1:100, Schaf ∞ -M13)

Sekundärantikörper gegen Schaf (1:400, Esel ∞ -Schaf)

Der Balken repräsentiert 50 μ m.

4.2.2 Doppelfärbung

Ob Zusammenhänge zwischen Zellen der lokalen Antigenpräsentation und der M13-Phagen-Färbung von Epithelzellen bestehen, wurde anhand der Doppelfärbung untersucht. Es wurde gegen den typischen Rezeptor für antigenpräsentierende Zellen MHC-II und M13-Phagen gefärbt.

Zuerst wurde die immunohistochemische M13-Färbung und anschließend die MHC-II-Färbung (siehe 2.2) durchgeführt.

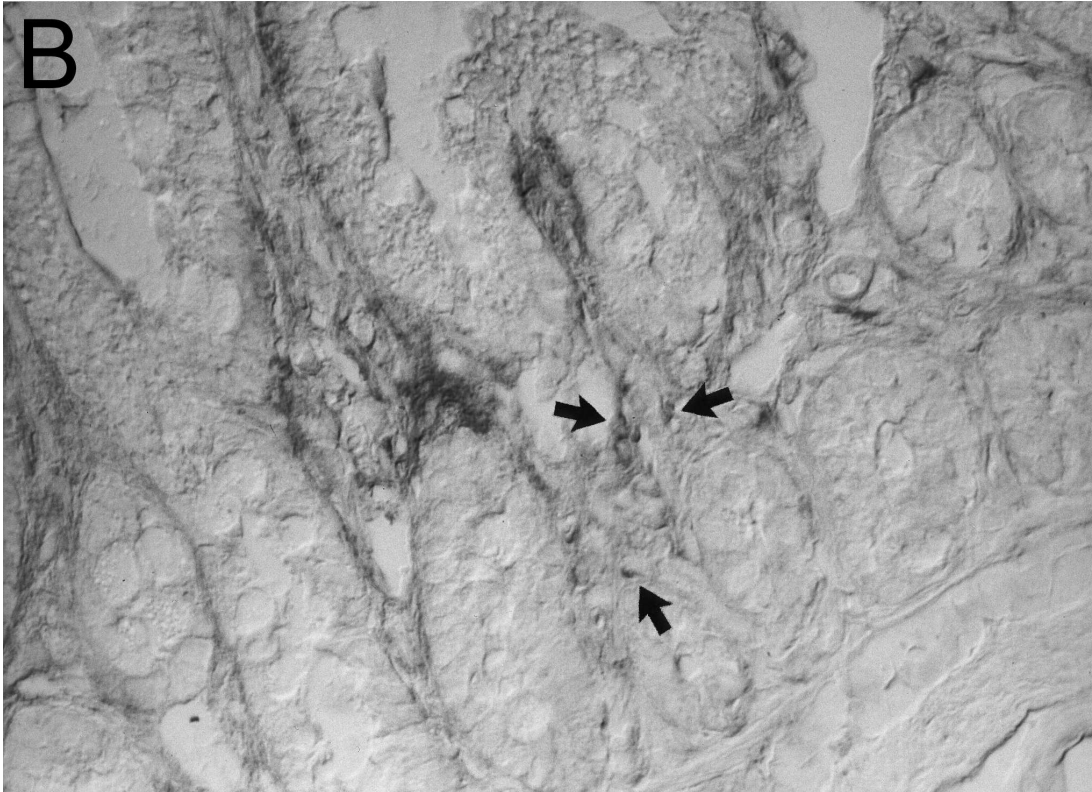
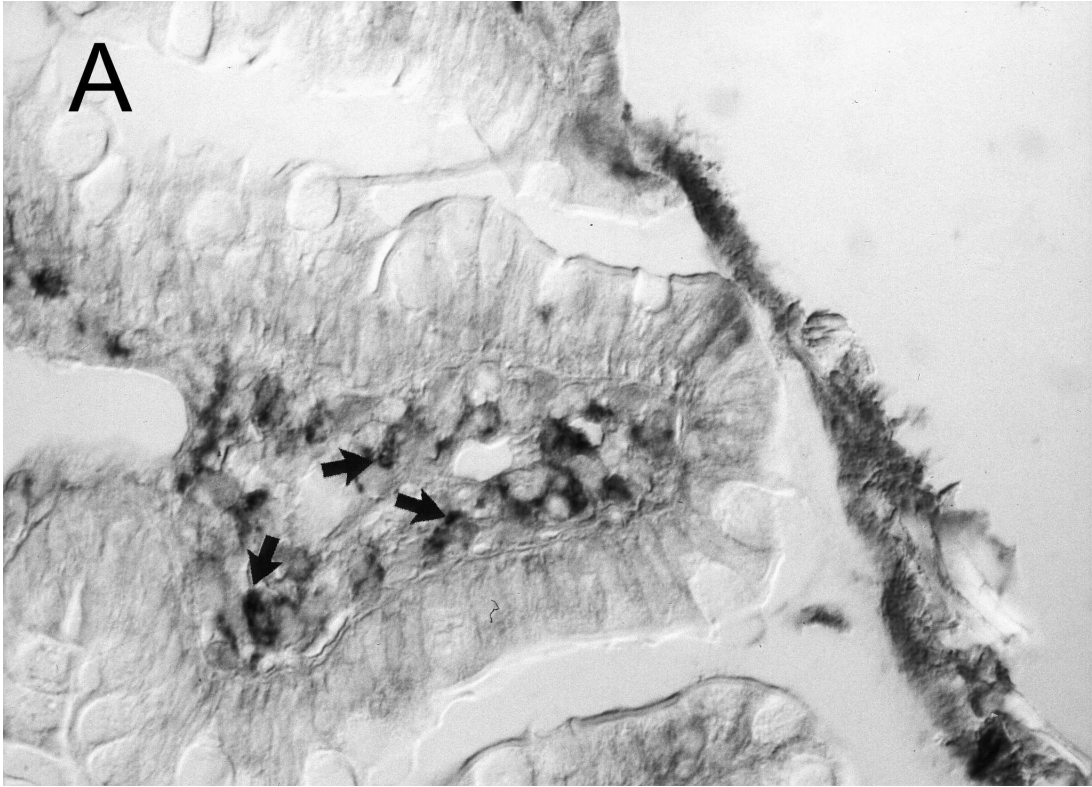
Abb. 4.6

Doppelfärbung gegen M13-Phagen (braun) und MHC-II Protein (blau).

In der ersten Färbung wurde der Primärantikörper gegen M13-Phagen (1:100, Schaf ∞ -M13) und der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (1:400, Esel ∞ - Schaf) verwendet. In der zweiten Färbung wurden der Primärantikörper gegen MHC-II (1:100, MRC OX-6, Serotec), der Sekundärantikörper (1:20, Hase ∞ - Maus) und der mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Tertiärantikörper (1:80, AP7/6/7 ∞ -AP) benutzt. Mit der Fastblue-Reaktion wurde durch die AP der blaue Farbton entwickelt.

Die Abbildung zeigt die Blaufärbung von MHC-II positiven Zellen in der Submukosa (siehe Pfeile). Die durch Phagen bedingte Braunfärbung des Lumens (A) sowie die der Submukosa in fadenförmiger Verteilung (B) sind deutlich zu erkennen.

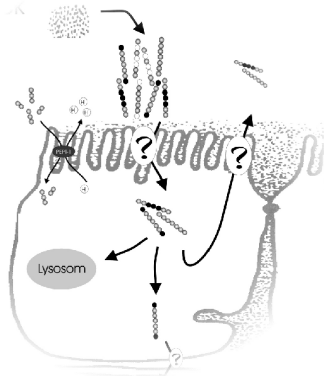
Abbildung B zeigt somit den Translokationsweg der M13-Phagen in tieferen Zellschichten.



4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Peptide aus M13-Phagendisplaybibliotheken können an der Gastrointestinalschranke in vivo selektiert werden
- M13-Phagen können mittels selektierter Peptid-Inserts die Fähigkeit erwerben, die Darmmukosa zu überqueren und so in das Blutssystem gelangen. Sie bleiben dabei infektiös und intakt.
- Selektierte Phagen können die Darmmukosa zellulär über Enterozyten und parazellulär passieren.
- Die Sequenzen selektierter Peptide zeigen Homologien zu Hüll- und Oberflächenproteinen von HIV-1 und HHV-7.
- Es wurde bestätigt, daß das M13-Phagensystem für die Selektion von Peptiden an der gastrointestinalen Mukosa eingesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu, ist das T7-415Select-Phagensystem dafür ungeeignet.
- Die Methode und erhaltenen Sequenzen wurden als nationales und internationales Patent angemeldet.

5 DISKUSSION



5.1 KONZEPTION 58

5.2 PHAGENDISPLAYTECHNIK 58

5.3 ERGEBNISSE 60

5.3.1 PEPTIDTRANSPORT 61

**5.3.2 MAKROMOLEKULARER
TRANSPORT 65**

5.4 SCHLUBFOLGERUNGEN 68

5.1 Konzeption

Medikamente, welche nur an spezifische Zielstrukturen binden und nur dort wirken sollen, werden zur Zeit immer genauer definiert. So konnte mittels M13-Phagendisplaybibliotheken gezeigt werden, daß Peptide mit bestimmten Strukturmustern an Endothelzellen von Brustkrebstumoren spezifisch binden (Arap et al. 1998, Pasqualini et al. 1997).

Viele oral verabreichte Pharmazeutika müssen die gastrointestinale Schranke überschreiten. Wenn bestimmte Peptide in der Lage sind, an diese komplexe Schranke zu binden und sie zu überqueren, könnten Substanzen, die an entsprechende Peptide gekoppelt sind oder diese primär enthalten, damit selektiv über die Darmmukosa transportiert werden.

Unter dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit der Einsatz von Phagendisplaybibliotheken für die Selektion solcher Peptide an der gastrointestinalen Schranke untersucht.

5.2 Phagendisplaytechnik

Die Anwendung von Phagendisplaybibliotheken bestand bisher in der Identifizierung bestimmter Epitope, bei denen Antikörpertechniken an ihre Grenzen stießen (Parmley & Smith 1988, Smith 1985, Scott & Smith 1990). Die erst 15 Jahre alte Methode wird inzwischen in vivo angewendet. Für die Selektion von Peptiden erwiesen sich M13-Phagendisplaybibliotheken als geeignet. In der Arbeit von Pasqualini und Ruoslahti wurde gezeigt, wie anhand M13-Phagenbibliotheken Peptide selektioniert werden konnten, die spezifisch an Endothelzellen von Brustkrebstumoren binden (Pasqualini & Ruoslahti 1996, Rajotte et al. 1998) und damit erste Erfolge mit Aussicht auf eine therapeutische Anwendung peptidgekoppelter Pharmaka gaben (Koivunen et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Möglichkeit geprüft, spezifische Peptide aus Phagendisplaybibliotheken an der gastrointestinalen Schranke zu selektionieren.

M13-Phagendisplaybibliotheken wurden dazu erstmals *in vivo* gastrointestinal verabreicht und Peptide selektioniert. Diese Neuerung wurde zum nationalen und internationalen Patent angemeldet (DE_198_45_251_A1, PCT/EP99/05453).

Für die vorliegende Arbeit bestand die Notwendigkeit, die Empfindlichkeit des M13-Phagennachweises zu verbessern. Der Nachweis mit Plaque-Test S läßt zu, daß ein einzelner Phage ebenso nachgewiesen wird, wie zum Beispiel eine Zahl von 10^{10} M13-Phagen, da die Replikation von Bakteriophagen in einem bestimmten Bakterienvolumen immer einen Endpunkt erreicht, an dem alle Bakterien infiziert und zur maximalen M13-Phagen-DNA-Amplifikation gezwungen worden sind. Zudem hat ein M13-Phagennachweis mit Plaque-Test S zum Beispiel aus Organhomogenat nur eine Sensitivität von ca. 10^3 M13-Phagen. Daher wurde mit Plaque-Test HS der Plaque-Test S verbessert, indem eine vorherige M13-Phagen-Amplifikation aus Organhomogenat entfallen konnte und die Sensitivität eine Zahl von zehn M13-Phagen erreichte. Mit diesem empfindlichen Test konnte die Menge von M13-Phagen, welche die Enterozyten-Schranke überschritten haben, direkt aus dem Organhomogenat bestimmt werden.

Da zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen wurde, daß nur *M-Zellen*, also spezielle, hauptsächlich Antigen-transportierende Zellen der Darmmukosa, selektiven Transport über die gastrointestinale Mukosa vermitteln können, war es überraschend, daß der Transport von M13-Phagen nicht über diese Zellen nachgewiesen werden konnte. Sogar intakte M13-Phagen konnten im Milzhomogenat nachgewiesen werden. Immunhistologisch war eine Translokation der M13-Phagen über Enterozyten zu finden. Diese Enterozyten befanden sich an der Zottenspitze in der Nähe des freien Darmlumens. Mit der M13-spezifischen Färbung konnte zudem der Weg der M13-Phagen im Interstitium verfolgt werden. Aufgrund der gefärbten Strukturen ist ein Transport von M13-Phagen über die Lymphe zu vermuten. Der Transport von M13-Phagen über M-Zellen konnte auch nicht in naher Umgebung von Peyerschen Plaques (Neutra & Kraehenbuhl 1996) gesehen werden.

Zur Unterscheidung von M-Zellen gegenüber Saumzellen (Enterozyten) sollte zudem der offenbar hohe Besatz mit MHC-II Rezeptoren von M-Zellen immunhistologisch dargestellt und als Unterscheidungsmerkmal ausgenutzt werden (Allan et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bei der Doppelfärbung vergeblich nach MHC-II-Rezeptor-positiven Zellen im Sinn von M-Zellen gesucht.

Somit konnte ein Transport über M-Zellen nicht nachgewiesen werden, da die Phagensuspension die tieferen Schichten möglicherweise nicht erreicht hat und keine typische Braunfärbung für M13-Phagen, wie auch Blaufärbung für MHC-II-Rezeptoren an Epithelien in Lymphgewebe-nahen Bereichen zu finden war.

Im weiteren ist der Nachweis von M-Zellen mittels MHC-II Rezeptordetektion inzwischen zweifelhaft geworden, da MHC-II Rezeptoren und Antigenpräsentation unter bestimmten Bedingungen auch bei Saumzellen zu finden sind (Panja & Mayer 1996).

5.3 Ergebnisse

Nach Gabe von M13-Phagenbibliotheken in den Magen konnten M13-Phagen in der Milz nachgewiesen werden. Sieben in das Organ translozierte M13-Phagenklone, die Peptid-Inserts an ihrer Oberfläche tragen, wurden sequenziert und mit DNA-Sequenzen bekannter Peptide und Proteine in Datenbanken verglichen. Dabei konnten bei drei selektierten Peptiden Übereinstimmungen mit Hüllproteinen der invasiven Pathogene HIV-1 und HHV-7 gefunden werden. Ein umfassender Vergleich dieser selektierten Peptide mit bekannten Peptiden erfolgte über Internetdatenbanken und führte zu Übereinstimmungen im GAG-Protein von HIV-1 (AF069672 und AF069672) und im »very large tegument protein« von HHV-7 (AF037218). Beides sind Hüllproteine invasiver Pathogene. Obwohl der Antirezeptor für HIV-1 auch der CD4-Rezeptor von Lymphozyten ist (Trkola et al. 1996), sind, analog zu Ergebnissen mit Glykoprotein B an HHV-7 (Secchiero et al. 1997), weitere Bindungsstellen der Hüllproteine an Wirtszellmembranen denkbar. Die selektierten Sequenzen könnten daher neue Bindungsstellen mit Wirtszellmembranen von HIV-1 und HHV-7 beschreiben.

Da M13-Phagen ohne rekombinante Peptidpräsentation nach intragastraler Gabe nicht in der Milz nachgewiesen werden konnten, liegt ein selektiver Insert-vermittelter Transport der M13-Phagen nahe. Offenbar wurden Insert-Peptide, die in der Lage sind, Transport zu induzieren, selektioniert. Ein selektiver Transport von M13-Phagen über Enterozyten konnte zusätzlich immunhistologisch bestätigt werden. Ein wichtiges Kontrollexperiment zeigte, daß M13-Phagen mit einem nicht an der gastrointestinalen Schranke selektionierten Insert nicht in der Lage waren, die Mukosa zu überschreiten. Ein peptidspezifischer Transport von M13-Phagen wurde somit gesichert. Im weiteren wird eine Spezifität der selektionierten M13-Phagen darin unterstützt, daß M13-Phagen nur in einer geringen Anzahl die Mukosa translozierten, wie es mit Plaque-Test HS (siehe 4.1.2) nachgewiesen wurde.

Im folgenden werden die Ergebnisse unter zwei Perspektiven betrachtet. Eine Perspektive zielt auf den Transport von Peptiden, die andere auf denjenigen von Makromolekülen, für welche Bakteriophagen als brauchbares Modell betrachtet werden.

5.3.1 Peptidtransport

Die Selektion verschiedener Peptide mit der Eigenschaft, die gastrointestinale Schranke zu überwinden, werden in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Damit ist die Existenz von Peptid-vermittelten Transportvorgängen über die gastrointestinale Mukosa wahrscheinlich gemacht worden.

Der kürzlich beschriebene Oligopeptidtransporter Pept-1 kann zum Beispiel Di- und Tripeptide von luminal in Enterozyten im Austausch mit Protonen aufnehmen (Liang et al. 1995). Pept-1 ist in der Bürstensaummembran verankert und bindet verschiedene Di- und Tripeptide. Antibiotika wie Cephalosporin und Cephalexin (Dantzig & Bergin 1990), haben in ihrer β -Lactam-Struktur Ähnlichkeit mit Tripeptiden, die Pept-1 erkennt; Pept-1 trägt dadurch zur Antibiotikaaufnahme bei (Adibi 1997). Für längere Peptide hat Pept-1 offenbar keine Bindungs- und Transportspezifität. Ein Transport der selektionierten Heptapeptide über Pept-1 scheint unwahrscheinlich. Dennoch aber werden längere Peptide über Schranken wie zum Beispiel Hexapeptide über die Blut-Hirn-Schranke (Kreuter et al. 1995), transportiert.

Ein weiterer Transportweg der translozierten M13-Phagen über die Mukosa könnte darin bestehen, daß die präsentierten Peptide Liganden von Rezeptoren imitierten, die für die Aufnahme einer bestimmten Substanz verantwortlich sind. Auf diese Weise konnte durch Koppelung von Teilen des Antikörpers gegen Insulinrezeptoren mit Peptiden die Blut-Hirn-Schranke überschritten werden. (Wu et al. 1997). Obwohl keine Ähnlichkeiten der selektierten Peptide mit bekannten Proteinen, welche über die gastrointestinale Schranke aufgenommen werden, anhand der Datenbankrecherche gefunden werden konnten, könnte ein Rezeptor-vermittelter Transport durch noch unbekannte Rezeptoren möglich sein. Bekannte Adhäsions-Rezeptoren wie Integrine können vielseitige zelluläre Signalkaskaden und im besonderen die zelluläre Aufnahme bewirken. Motive für Liganden, die an Integrine binden, suchte Ruoslahti (Ruoslathi, 1997). Er erhielt ein Peptid mit der Sequenz Arg-Gly-Asp-Sequenz (RGD). Übereinstimmungen der in dieser Arbeit selektierten Peptide mit diesem Motiv (RGD) gibt es keine, dennoch ist eine zelluläre Aufnahme über Integrinliganden denkbar.

Ein neuer Aspekt des Rezeptor-vermittelten Peptidtransportes gibt Burton. Er charakterisiert einen Peptidtransport als aktiven energieverbrauchenden Prozeß, bei dem neben der Peptidaufnahme in die Zelle auch ein aktiver sekretorischer Transport von Peptiden zurück ins Darmlumen entdeckt wurde (Burton et al. 1996). Für Peptide, die in Enterozyten aufgenommen wurden, bietet sich daher außer einer Prozessierung durch lysosomalen Abbau und einem transzellulären Transport mit basaler Ausscheidung auch eine aktive apikale Ausschleusung der Zelle an, womit die Peptide erneut der intestinalen Schranke gegenüber stehen (Abbildung 5.1).

Die Selektion der in M13-Phagenbibliotheken verabreichten Peptide könnte somit auch intrazellulär und nicht nur an der Bürstensaummembran stattfinden. Ob solche zusätzlichen noch nicht definierten Selektionswege auch bei M13-Phagengekoppelten Peptiden aktivierbar sind, ist noch zu untersuchen.

Eine Möglichkeit, die Peptidaufnahme in die Zelle in ihrer Spezifität zu reduzieren, um danach eine intrazelluläre Peptidselektion überprüfen zu können, könnte die Anwendung bürstensaumlockernder Substanzen wie Natriumcaprat bieten. Mit

dieser Technik wurde bereits der Transport von Decapeptiden über Enterozyten gezeigt (Chao et al. 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit an der Gastrointestinalschranke mit M13-Phagen selektierten Peptide weisen eine Häufung der Aminosäuren Prolin und Serin auf, die eine gewisse Verwandtschaft in ihrer Größe zeigen. Prolin bedingt eine starke Richtungsänderung im Peptidfaden, worin sich rezeptorseitige Erfordernisse für Peptidliganden andeuten können.

Der Vergleich mit schon bekannten Peptidmustern, wie sie zum Beispiel an

Peptidbibliothek

Enterozyt

Blutsystem

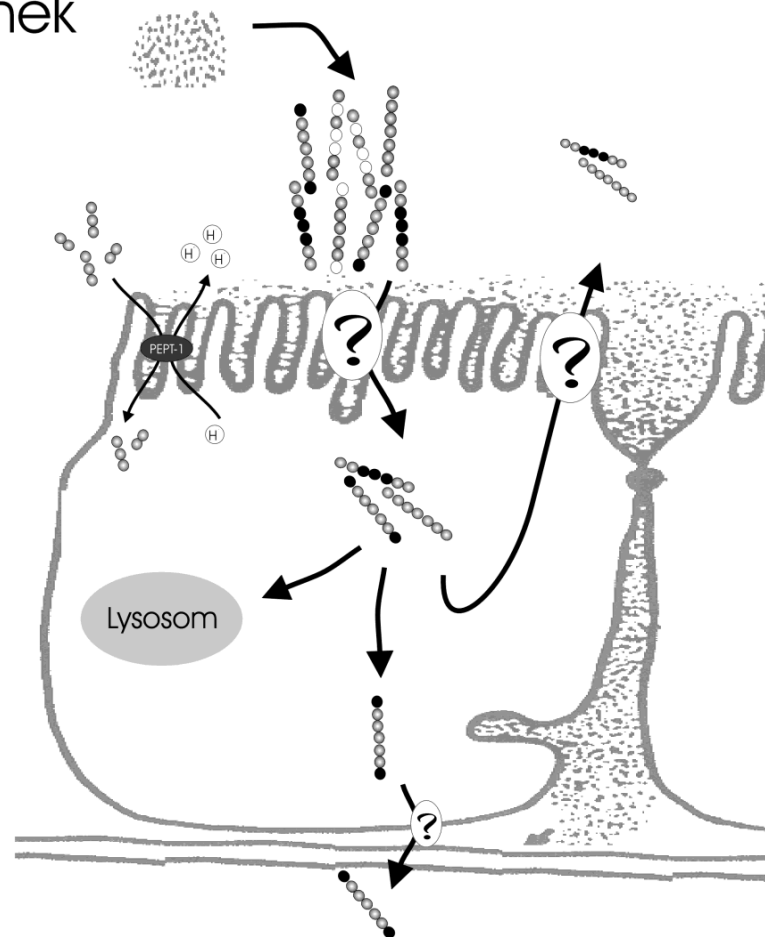


Abb.5.1 Wege der Peptidtranslokation

Aus der Phagendisplaybibliothek aufgenommene Peptide können mit Lysosomen verschmelzen, apikal ins Lumen transportiert oder basal ausgeschleust werden. Alle drei Wege könnten zusätzlich zu der Aufnahme in die Zelle bei der Peptidselektion aktiv sein.

Endothelzellen von Brustkrebstumoren ebenfalls über M13-Phagendisplay selektioniert wurden (Arap et al. 1998, Rajotte et al. 1998), brachte keine Übereinstimmungen. Die selektionierten Motive Arg-Gly-Asp (RGD, Integrin-Ligandenmotiv), Asn-Gly-Arg (NGR) und Gly-Ser-Leu (GSL) wurden zudem aus bereits vorselektionierten Peptidbibliotheken mit der vorgegebenen Struktur $CX_3CX_3CX_3C$ (C = Cystein, X_3 = variables Tripeptid), selektioniert. Eine Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit selektionierten Peptiden besteht nicht.

Bei therapeutischer Anwendung von selektionierten Peptidsequenzen konnte mit peptidgekoppeltem Doxorubizin, einem Zytostatikum, eine bis zu vierzigfache Dosisreduktion erreicht werden (Arap et al. 1998). Dies deutet auf einen hohen Nutzen von selektionierten Peptiden bei Pharmakadosierung und bei Reduktion von Toxizität von Pharmaka hin. Bei oral verabreichten, an gastrointestinal selektionierte Peptide gebundenen Medikamenten, bestehen Aussichten auf einen ähnlichen Vorteil.

Wechselt man die Perspektive des spezifischen Transports von der Peptid- zur Makromolekül-Translokation, so liegt die Vorstellung eines makromolekularen Transports durch Peptidinduktion und -vermittlung nahe.

Evidenz dafür kommt von verschiedenen Bakterien und Viren, die Mechanismen entwickelt haben, um in Enterozyten einzudringen können (Ploegh 1998). Sie besitzen Proteine mit Peptidliganden, mit denen sie an Zellen binden und zelluläre Signalkaskaden, wie die Aufnahme in eine Zelle, auslösen vermögen. Yersinien können durch hochaffine Bindung von Invasin an $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren der Wirtszellen, wie zum Beispiel Enterozyten, in diese eindringen (Leong et al. 1990, Isberg & Tran-van-Nhieu 1995). Ähnlich dringt *Listeria monocytogenes* in Epithelzellen ein. Es bindet mit Internalin an E-Cadherin, welches auf eukaryontischen Zellen exprimiert wird (Mengaud et al. 1996). M13-Phagen mit einem spezifischen Insert-Peptid an ihrer Oberfläche könnten ebenfalls wie Pathogene durch spezifische Bindung an die Zellmembran unter Auslösung zellulärer Signalkaskaden ihre apikale Aufnahme und basale Ausschleusung der Wirtszelle aufzwingen.

5.3.2 Makromolekularer Transport

M13-Phagen können als Makromoleküle mit einem Durchmesser von 6 bis 10 nm und einem Molekulargewicht von 130 kDa (Klaus et al. 1992) betrachtet werden. Primär sind sie nicht fähig, in eukaryontische Zellen einzudringen (Francke & Hofschneider 1966). Beachtenswerterweise erwerben M13-Phagen-Moleküle durch inserierte spezifische Peptide die Fähigkeit, die Darmmukosa zu translozieren. Dabei konnten M13-Phagen in dieser Arbeit immunhistologisch sowohl in Enterozyten als auch parazellulär nachgewiesen werden.

Bei Untersuchungen von makromolekularem Transport durch *Enterozyten* wurde als Haupttransportweg von Proteinen die Endozytose gefordert und beschrieben (Sanderson & Walker 1993). Makromolekularer Transport durch Enterozyten konnte zum Beispiel für Rinderalbumin (BSA) und Meerrettichperoxidase (HRP) gezeigt werden (Teichberg et al. 1992, Udall et al. 1981), wobei besonders die intrazellulären Mechanismen ungeklärt blieben. Enterozyten waren in der Lage kleine Mengen an Peptiden und Proteinen basal weiterzugeben (Neutra & Kraehenbuhl 1996); ob dafür eine besondere Struktur oder sogar Sequenz eine Rolle spielt, blieb offen.

Über das Verhalten von Makromolekülen an Enterozyten ist noch wenig bekannt. Es wird zum Beispiel postuliert, daß einige Makromoleküle durch Bindung an Enterozytenmembranen den luminalen Verdauungsenzymen, aber auch der intrazellulären Verdauung durch Lysosomen entgehen können (Panja & Mayer 1996). Makromoleküle aus Proteinen mit spezifischer Bindungsfähigkeit an Mukosazellen sind offenbar in der Lage, an sie gekoppelte Substanzen über die Mukosaschranke zu transportieren (Sun et al. 1994), obwohl in den meisten Fällen M-Zellen dafür verantwortlich gemacht wurden.

Einen Hinweis auf noch unbekannte intrazelluläre Transportwege für Makromoleküle in Enterozyten gibt der erst kürzlich beschriebene vesikuläre Transport von Ovalalbumin und Meerrettichperoxidase, welche, apikal aufgenommen, innerhalb weniger Minuten den parazellulären Raum erreichten (Schurmann et al. 1999).

Ferner könnten pH-stabile Makromoleküle bei ihrer enteralen Transzytose von folgendem neu entdeckten Mechanismus profitieren: Kalzium-gesteuerte Verschmelzung von Lysosomenmembranen mit der basalen Zellmembran konnte gegen lysosomalen Verdau-resistenten Molekülen einen eigenen Transzytoseweg sichern (Rodriguez et al. 1997). Eine Übersicht der bisher diskutierten Transzytosewege für Makromoleküle gibt Abbildung 5.2.

Welchen Weg haben die in dieser Arbeit verwendeten M13-Phagen nun eingeschlagen?

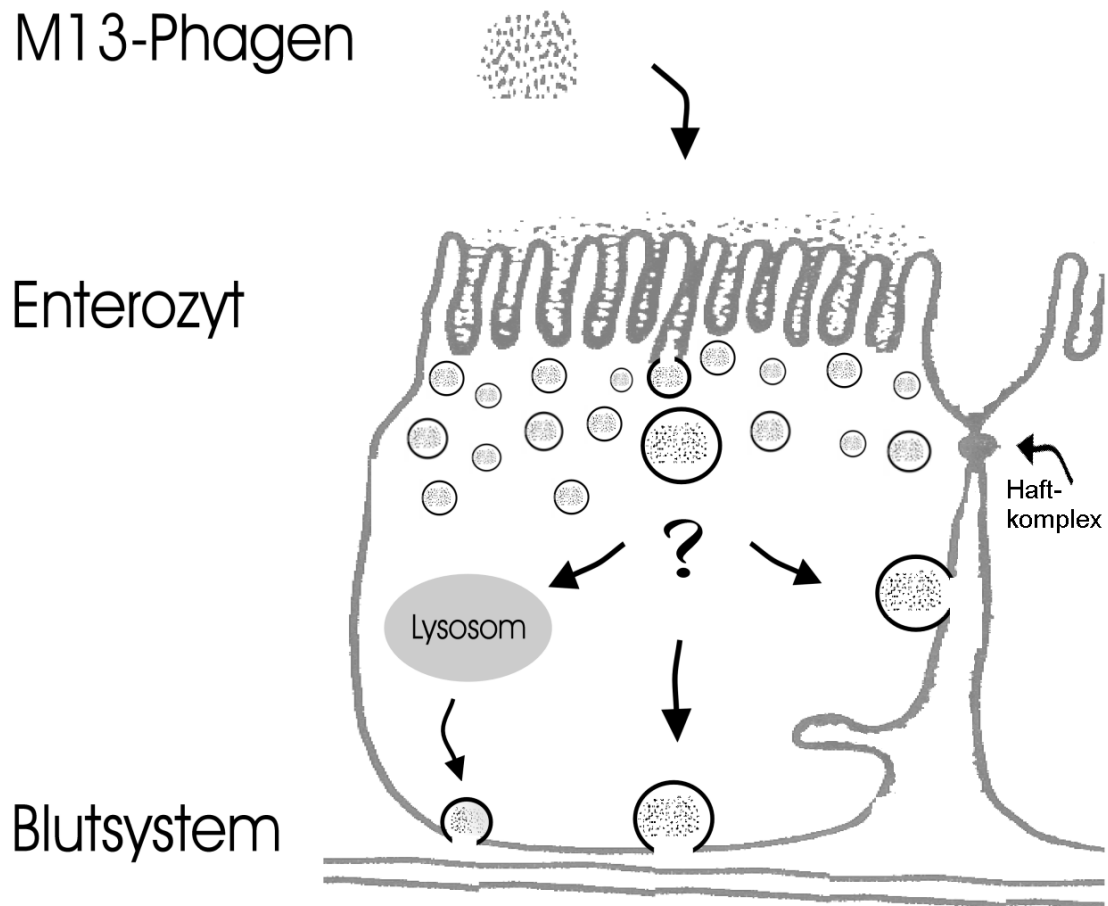


Abb.5.2 Wege der Makromolekültranslokation

Nach Endozytose von M13-Phagen bieten sich drei Wege der Translokation. Eine Ausschleusung kann entweder nach Verschmelzung mit Lysosomen an der Zellbasis erfolgen; oder die Zellbasis, oder aber der parazelluläre Haftkomplex-distante Raum werden direkt ohne Lysosomenkontakt durch Ausschleusung erreicht.

M13-Phagen haben nach dem Transport ihre Fähigkeit, Bakterien zu infizieren, behalten, wodurch sie überhaupt nachgewiesen werden konnten. Obwohl M13-Phagen extrem pH-stabil sind und ein Lysosomen-vermittelter Transport nicht ausgeschlossen werden kann, ist in Enterozyten keine lysosomale Beteiligung der M13-Phagen-Transzytosewege anzunehmen, da lysosomale Vermittlung bei Transzytose von Makromolekülen meist fehlt (Walker 1994). Daher kommen von den bisher bekannten Transzytosewegen für M13-Phagen die direkte basale oder parazelluläre Ausschleusung (Abbildung 5.2) in erster Linie in Frage.

Ein Transport der M13-Phagen durch *Haftkomplexe* (Abb.5.2) war aufgrund der Größenverhältnisse unwahrscheinlich, da M13-Phagen einen Querdurchmesser von 6-10 nm (Klaus et al. 1992) gegenüber einer Porengröße von nur 5 nm der Haftkomplexe (Madara & Pappenheimer 1987) aufweisen.

Der bewiesene Transport eines Peptides von elf Aminosäuren Länge (Atisook & Madara 1991) sowie derjenige von Makromolekülen wie BSA bei Entzündungen in den parazellulären Raum (Madara & Stafford 1989, Nash et al. 1987) weisen allerdings auf eine nicht statisch zu betrachtende Porengröße der Haftkomplexe hin.

Permeabilitätsveränderungen der Haftkomplexe wurden bei Mastzelledegranulation (Berin et al. 1997) und im Zusammenhang mit noch nicht aufgeklärten chronischen Darmkrankheiten wie Colitis ulzerosa und Morbus Crohn beschrieben (Schurmann et al. 1999, Söderholm et al. 1999).

Ob rekombinante M13-Phagen in der Lage sind, die Permeabilität von Haftkomplexen zu modulieren, ist bisher nicht beurteilbar und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.4 Schlußfolgerungen

Mit M13-Phagendisplaybibliotheken können an der gastrointestinalen Mukosa Peptide selektioniert werden, die für die Translokation der M13-Phagen über den Enterozyten verantwortlich zu sein scheinen.

Die selektionierten Peptide weisen durch Übereinstimmungen mit Hüllproteinen von HIV-1 und HHV-7 auf neue Bindungsstellen dieser Liganden hin.

Mehrere spezifische Transportmechanismen wie auch Bindungspartner können für die in dieser Arbeit selektionierten Peptide diskutiert werden. Der Einsatz von selektionierten Peptiden, zum Beispiel in der Gen- und Krebstherapie, ist als Fusionspeptide in chimerischen Therapeutika durchaus denkbar.

Enteral selektionierte Peptide mit transportinduzierenden Eigenschaften sind Kandidaten für Versuche, sie an orale Therapeutika zu koppeln und damit den transenteralen Wirkstofftransport zu erleichtern, mit der Aussicht, die Wirkstoffdosis entscheidend zu reduzieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz von Phagendisplaybibliotheken wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vivo* über die gastrointestinale Schranke untersucht und zum nationalen und internationalen Patent angemeldet (DE_198_45_251_A1, PCT/EP99/05453). Phagendisplaybibliotheken finden bisher ihren Einsatz in der Epitopidentifizierung von Zielstrukturen. Dazu werden je eine Sequenz in ein Oberflächengen von Bakteriophagen aus Bibliotheken hoher Komplexität inseriert und somit die translatierte Sequenz als Fusionspeptid auf der Oberfläche von Bakteriophagen zur Darstellung gebracht.

Inserts der selektierten M13-Phagen wurden sequenziert und auf Homologie mit bekannten Proteinen und Peptiden aus Internetdatenbanken überprüft. Dabei zeigten sich Übereinstimmungen mit Hüllproteinen von HHV-7 und HIV-1, die auf neue Bindungsstellen dieser invasiven Pathogene mit Wirtszellmembranen hindeuten.

Der Transportweg der selektierten Phagen konnte über Enterozyten und parazellulär nachgewiesen werden, womit neue makromolekulare oder peptidinduzierte Transportwege über Haftkomplexe und Enterozyten zu diskutieren sind. Auf beiden Wegen könnten spezifische Peptide für den Transport, dessen Induktion und Selektion verantwortlich gemacht werden.

Erst kürzlich begann der Einsatz von Phagendisplaybibliotheken für *in vivo* Experimente, wodurch Peptide selektioniert wurden, die spezifisch an Oberflächenproteine von Brustkrebsendothelzellen binden und durch Koppelung an Zytostatika eine bis zu 40fache Dosisreduzierung des Zytostatikums erreicht werden konnte. Enteral selektionierte Peptide mit transportinduzierenden Eigenschaften sind daher Kandidaten für Versuche, an orale Therapeutika gekoppelt zu werden und damit den transenteralen Wirkstofftransport zu erleichtern mit der Aussicht, die Wirkstoffdosis entscheidend zu reduzieren.

7 LITERATUR

- ADIBI, S.A. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* **113**, 332-340.
- ALLAN, C.H., MENDRICK, D.L. & TRIER, J.S. (1993). Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express Class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* **104**, 698-708.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**, 403-410.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic.Acids.Res.* **25**, 3389-3402.
- ARAP, W., PASQUALINI, R. & RUOSLAHTI, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **279**, 377-380.
- ARBER, W. & DUSSOIX, D. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage. *J.Mol.Biol.* **5**, 18-36.

- ATISOOK, K. & MADARA, J.L. (1991). An oligopeptide permutes intestinal tight junctions at glucose-elicited dilations. *Gastroenterology* **100**, 719-724.
- BARRY, M.A., DOWER, W.J. & JOHNSTON, S.A. (1996). Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat.Med.* **2**, 299-305.
- BARINAGA, M. (1998). Peptide-guided cancer drugs show promise in mice. *Science* **279**, 323-324.
- BEIER, R. & GEBERT, A. (1998). Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am.J.phys.gastr.Physiol.* **38**, G130-G137
- BEIJERINK, M.W. (1899). Über ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabakblätter. *Zentr Bakteriol Parasitenk* **5**, 27-29.
- BERGQUIST, N.R., CARLSSON, J. & HULDT, G. (1976). Comparative studies of fluorochrome and enzyme-labelled antibodies. pp. 37-41. *In: Feldmann.C., et.al., ed. -Holland*
- BERIN, M.C., KILIAAN, A.J., YANG, P.C., GROOT, J.A., TAMINIAU, J.A. & PERDUE, M.H. (1997). Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* **113**, 856-864.
- BOURNE.J.A. (1997). *Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden.* Carpinteria, DAKO Corporation.
- BRANDTZAEG, P. (1996). The human intestinal immune system: basic cellular and humoral mechanisms. *Baillieres.Clin.Rheumatol.* **10**, 1-24.

- BRUNO, J.G. & KIEL, J.L. (1999). In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens.Bioelectron.* **14**, 457-464.
- BURRITT, J.B., BOND, C.W., DOSS, K.W. & JESAITIS, A.J. (1996). Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal.Biochem.* **238**, 1-13.
- BURTON, P.S., CONRADI, R.A., HO, N.F., HILGERS, A.R. & BORCHARDT, R.T. (1996). How structural features influence the biomembrane permeability of peptides. *J.Pharm.Sci* **85**, 1336-1340.
- CHAO, A.C., NGUYEN, J.V., BROUGHALL, M., GRIFFIN, A., FIX, J.A. & DADDONA, P.E. (1999). In vitro and in vivo evaluation of effects of sodium caprate on enteral peptide absorption and on mucosal morphology. *Int.J.Pharmaceutics* **191**, 15-24.
- D'HERELLE, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *Cr Acad Sci Paris* **165**, 373-375.
- DANTZIG, A.H. & BERGIN, L. (1990). Uptake of cephalosporin, cephalexin, by a dipeptid transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2. *Biochim Biophys Acta* **1027**, 211-217.
- DUNCAN, J.D., GILLEY, R.M., SCHÄFER, D.P., MOLDOVEANU, Z. & MESTECKY, J. (1996). Poly (lactide-co-glycolide) microencapsulation of vaccines for mucosal immunization. In *Mucosal Vaccines*, eds. KIYONO, H., OGRA, P.L. & MCGHEE, J.R., S. 159-173. San Diego: Academic Press.
- DUNCAN, J.D. (1997). Drug Targeting: Where are we now and where are we going? *J.Drug.Target.***5**, 1-4.

- ELLIS, E.L. & DELBRÜCK, M. (1939). The growth of bacteriophage. *J.Gen.Physiol.* **22**, 365-384.
- FORBES, R.M., COOPER, A.R., MITCHELL, H. H. (1953). The composition of the adult human body as determined by chemical analysis. *J.Biol.Chem.* **203**, 357-366
- FRANCKE, B. & HOFSCHEIDER, P.H. (1966). Über infektiöse Substrukturen aus Escherichia coli Bakteriophagen. VII. Formation of a biologically intact replicative form in ribonucleic acid bacteriophage (M12)-infected cells. *J.Mol.Biol.* **16**, 544-552.
- GONNELA, P.A. & NEUTRA, M.R. (1984). Membrane bound and fluid-phase macromolecules enter separate prelysosomal compartments in absorptive cells of suckling rat ileum. *J.Cell Biol.* **99** , 909-917.
- ISBERG, R.R. & TRAN-VAN-NHIEU, G. (1995). The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol* **5**, 120-124.
- JAYASENA, S.D. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin.Chem.* **45**, 1628-1650.
- JOHNSON, G., KABAT, E.A. & WU, T.T. (1996). Kabat database of sequences of proteins of immunological interest. In *Weirs handbook of experimental immunology I. Immunochemistry and molecular Immunology*, eds. HERZENBERG, W.M., WEIR, L.A. & HERZENBERG, C., pp. 1-21. Cambridge: Blackwell Science Inc.

- KARLSSON, J., UNGELL, A.L., GRASJO, J. & ARTURSSON, P. (1999). Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *Eur.J.Pharmaceut.Sci.* **9**, 47-56.
- KERNEIS, S., BOGDANOVA, A., KRAEHENBUHL, J.P. & PRINGAULT, E. (1997). Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**, 949-952.
- KLAUS, S., KRÜGER, D.H. & MEYER, J. (1992). *Bakterienviren*. Jena Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- KOIVUNEN, E., ARAP, W., VALTANEN, H., RAINISALO, A., MEDINA, O.P., HEIKKILA, P., KANTOR, C., GAHMBERG, C.G., SALO, T., KONTTINEN, Y.T., SORSA, T., RUOSLAHTI, E. & PASQUALINI, R. (1999). Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat.Biotechnol.* **17**, 768-774.
- KOIVUNEN, E., WANG, B. & RUOSLAHTI, E. (1995). Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology N.Y.* **13**, 265-270.
- KREUTER, J., ALYAUTDIN, R.N., KHARKEVICH, D.A. & IVANOV, A.A. (1995). Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* **674**, 171-174.
- KRÜGER, D.H. & SCHROEDER, C. (1981). Bacteriophage T3 and bakteriofage T7 virus - host cell interactions. *Microbiol Rev* **45**, 9-51.
- KUVAEVA, I.B. (1979). Permeability of the gastrintestinal tract for macromolecules in health and disease. *Hum.Physiol.* **4**, 272-283.

- LANGER, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature* **392**, 5-10
- LEONG, J.M., FOURNIER, R.S. & ISBERG, R.R. (1990). Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J.* **9**, 1979-1989.
- LIANG, R., FEI, Y.J., PRASAD, P.D., RAMAMOORTHY, S., HAN, H., YANG, F.T., HEDIGER, M.A., GANAPATHY, V. & LEIBACH, F.H. (1995). Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J.Biol Chem.* **270**, 6456-6463.
- MADARA, J.L. & PAPPENHEIMER, J.R. (1987). Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelial. *J.Membr.Biol.* **100**, 149-164.
- MADARA, J.L. & STAFFORD, J. (1989). Interferon- γ directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J.Clin.Invest.* **83**, 724-727.
- MAURY, J., NICOLETTI, C., GUZZO, C.L. & MAROUX, S. (1995). The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *Eur.J.Biochem.* **228**, 323-331.
- MENGAUD, J., OHAYON, H., GOUNON, P., MEGE, R.M. & COSSART, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**, 923-932.
- MESA, T.R., PASCAL, R.R. & FENOGLIO, C.M. (1977). Immunoperoxidase: a sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. *Hum.Pathol.* **8**, 313-320.

- MESTECKY, J., MOLDOVEANU, Z., MICHALEK, S.M., MORROW, C.D., COMPANS, R.W., SCHAFER, D.P. & RUSSELL, M.W. (1997). Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes. *J. Contr. Release* **48**, 243-257.
- MODEL, P. & RUSSEL, M. (1988). *Filamentous phages*. New York: Plenum Press.
- NASH, S. (1997). *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*. Carpinteria: DAKO Corporation.
- NASH, S., STAFFORD, J. & MADARA, J.L. (1987). effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration of the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* **80**, 1104-1113.
- NEUTRA, M.R. & KRAEHENBUHL, J.P. (1996). Antigen uptake by M-cells for effective mucosal vaccines. In *Mucosal Vaccines*, eds. KIYONO, H., OGRA, P.L. & MCGHEE, J.R., pp. 41-55. San Diego: Academic Press.
- NEUTRA, M.R., PHILLIPS, T.L., MAYER, E.L. & FRANCKE, B. (1987). Transport of membran-bound macromolecules by M-cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res.* **247**, 537-546.
- NEUTRA, M.R., PRINGAULT, E. & KRAEHENBUHL, J.P. (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* **14**, 275-300.
- NUTTING, D.F., KUMAR, S., ST-HILAIRE, R.J. & MANSBACH, C.M. (1999). Nutrient absorption. *Curr. opin. Gastroenterol.* **15**, 113-119.
- O'NEIL, K.T. & HOESS, R.H. (1995). Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 443-449.

- OGIHARA, H., SUZUKI, T., NAGAMACHI, Y., INUI, K. & TAKATA, K. (1999). Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *Histochem.J.* **31**, 169-174.
- PANJA, A. & MAYER, L. (1996). Antigen presentation in the intestine. *Baillieres.Clin.Gastroenterol.* **10** , 407-425.
- PARMLEY, S.F. & SMITH, G.P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318.
- PASQUALINI, R., KOIVUNEN, E. & RUOSLAHTI, E. (1997). Alpha v integrins as receptor for a tumor targeting by circulating ligands. *Nat.Biotechnol.* **15**, 542-546
- PASQUALINI, R., KOIVUNEN, E. & RUOSLAHTI, E. (1996). Peptides in cell adhesion: powerful tools for the study of integrin-ligand interactions. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **29**, 1151-1158.
- PASQUALINI, R. & RUOSLAHTI, E. (1996). Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380**, 364-366.
- PASQUALINI, R. & RUOSLAHTI, E. (1996). Tissue targeting with phage peptide libraries. *Mol.Psychiatry* **1**, 423
- PLOEGH, H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248-253.
- RAJOTTE, D., ARAP, W., HAGEDORN, M., KOIVUNEN, E., PASQUALINI, R. & RUOSLAHTI, E. (1998). Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J.Clin.Invest.* **102**, 430-437.

- RASCHED, I. & OBERER, E. (1986). Ff coliphages: Structural and functional relationship. *Microbiol Rev* **50**, 401-427.
- RODRIGUEZ, A., WEBSTER, P., ORTEGO, J. & ANDREWS, N.W. (1997). Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J.Cell Biol* **137**, 93-104.
- ROSENBERG, A., GRIFFIN, K., STUDIER, F.W., MCCORMICK, M., BERG, J., NOVY, R. & MIERENDORF, R. (1996). T7Select Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *inNovations* **6**, 1-7.
- RUOSLATHI, E. (1997). Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney-Int.***51**, 1413-1417
- RUSSEL, M. (1991). Filamentous phage assembly. *Mol.Microbiol.* **5**, 1607-1613.
- RUSSELL, S.J. (1996). Peptide-displaying phages for targeted gene delivery? *Nat.Med.* **2**, 276-277.
- SAFFRON, M., FRANCO-SAENZ, R., KONG, A., PEPHADJOPOULOS, D. & SZOKA, F. (1979). A model for the study of oral administration of peptide hormones. *Can.J.Biochem.* **57**, 548-553.
- SANDERSON, I.R. & WALKER, W.A. (1993). Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* **104**, 622-639.
- SCHURMANN, G., BRUWER, M., KLOTZ, A., SCHMID, K.W., SENNINGER, N. & ZIMMER, K.P. (1999). Transepithelial transport processes at the

intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int.J.Colorectal.Dis.* **14**, 41-46.

SCOTT, J.K. & SMITH, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-390.

SECCHIERO, P., SUN, D., DE-VICO, A.L., CROWLEY, R.W., REITZ-MS, J., ZAULI, G., LUSSO, P. & GALLO, R.C. (1997). Role of the extracellular domain of human herpesvirus 7 glycoprotein B in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J.Virol.* **71**, 4571-4580.

SMITH, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.

SÖDERHOLM, J.D., PETERSON, K.H., OLAISON, G., FRANZEN, L.E., WESTROM, B., MAGNUSSON, K.E. & SJODAHL, R. (1999). Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* **117**, 65-72.

STUDIER, F.W. & DUNN, J.J. (1982). Organization and expression of bacteriophage T7 DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47**, 999-1007.

STUDIER, F.W. & MOFFATT, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**, 113-130.

SUN, J.B., HOLMGREN, J. & CZERKINSKY, C. (1994). Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 10795-10799.

- TEICHBERG, S., WAPNIR, R.A., MOYSE, J. & LIFSHITZ, F. (1992). Development of the neonatal rat small intestinal barrier to nonspecific macromolecular absorption. *Pediatr.Res.* **341**, 50-57.
- TRKOLA, A., DRAGIC, T., ARTHOS, J., BINLEY, J.M., OLSON, W.C., ALLAWAY, G.P., CHENG, M.C., ROBINSON, J., MADDON, P.J. & MOORE, J.P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**, 184-187.
- TWORT, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* **2**, 1241-1243.
- UDALL, J.N., PANG, K. & FRITZE, L. (1981). Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr.Res.* **15**, 241-244.
- WALKER, W.A. (1994). Uptake of antigens: Role in gastrointestinal disease. *Acta.Paediatr.Jpn.* **36**, 597-610.
- WALKER, W.A., WU, M., ISSELBACHER, J.K. & BLOCH, K.J. (1975). Intestinal uptake of macromolecules IV. *Gastroenterology* **69**, 1123-1129.
- WU, D., YANG, J., PARDRIDGE, W.M. (1997). Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *J.Clin.Invest.* **100**, 1804-1812
- YANEZ, R.J., PORTER, A.C. (1998) Therapeutic gene targeting. *Gene Ther.* **5**, 149-159

Abbildungsnachweis	
1.1	modifiziert nach Rosenberg et al. 1996
1.2	modifiziert nach Klaus et al. 1992
1.3A	modifiziert nach Klaus et al. 1992
1.3B	D. Dürr
1.4A	modifiziert nach Klaus et al. 1992
1.4B	modifiziert nach Klaus et al. 1992
1.5	stark modifiziert nach Walker 1994
3.1	D. Dürr
3.2	D. Dürr
3.3	D. Dürr
3.4	modifiziert nach Bourne 1997
3.5	modifiziert nach Bourne 1997
4.1 bis 4.6	D. Dürr
5.1	stark modifiziert nach Walker 1994
5.2	stark modifiziert nach Walker 1994
Abkürzungen	
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
GAG-Protein	Glykosaminoglykan-Protein: Hüllprotein
GALT	Magen assoziiertes Lymphgewebe (Gut associated lymphoid tissue)
HHV-7	Humanes Herpesvirus Typ 7
HIV-1	Humanes Immunschwäche Virus Typ 1
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish-Peroxidase)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sIgA	Sekretorisches Immunglobulin des Typs A
sIgM	Sekretorisches Immunglobulin des Typs M
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)

Herzlich danken möchte ich PROF. H. SCHLÜSENER, der mir das Thema überlassen hat und mich stets mit fachlichem Rat und freundlicher Betreuung unterstützt hat.

Mein weiterer Dank geht an PROF. K. HARZER für seine konstruktiven Ratschläge und Hilfestellungen während dieser Arbeit.

Zugleich danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung für das gute Arbeitsklima und im besonderen FR. K. SEID und FR. J. KRETSCHMER für die praktische Anleitung bei der Laborarbeit.

Teilen dieser Arbeit wurde folgendermaßen veröffentlicht:

- Poster auf Falk-Symposium Nr.110 vom 16. bis 17. Oktober 1998 in Titisee
- Nationaler Patentanmeldung Nummer DE_198_45_251_A1
- Internationaler Patentanmeldung mit Anmelde­nummer PCT/EP99/05453



Name: DANIEL MATTHIAS DÜRR
Geburtsort: Pfullingen
Geburtsdatum: 13. Februar 1975
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Heike Dürr, geb. Hakenjos

Schule:

Jul 81 – Aug 94 Schulausbildung mit Allgemeiner Hochschulreife
Aug 94 – Okt 95 Zivildienst

Studium:

Okt 95 Beginn des Studiums der Humanmedizin
Okt 97 Aufnahme in das Graduiertenkolleg »Zellbiologie
in der Medizin«
März 99 Erstes Staatsexamen
Okt 99 Wahl zum studentischen Vertreter im Fakultätsrat
18. September 01 Zweites Staatsexamen
15.11.2002 Drittes Staatsexamen