

Verdauungsstabilität von Antigenen im Dünndarm

– Bedeutung für orale Immunisierungen –

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Fabian Reuter

Kiel, 2008

Referentin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2008

Zum Druck genehmigt: Kiel, 04.12.2008

Der Dekan

Zusammenfassung

Mukosale Immunisierungen werden durchgeführt, um an den Schleimhautoberflächen eine Immunglobulin A (IgA)-Sekretion zu induzieren, die durch Immunexklusion eine Pathogenaufnahme und somit eine systemische Infektion verhindern kann. Dazu sollte das Antigen an derjenigen Schleimhaut aufgenommen werden, für die der Immunschutz gewünscht ist. Die Effizienz der Antigenaufnahme kann durch sogenannte Targetingliganden gesteigert werden. Dies sind Moleküle wie die nichttoxischen B-Untereinheiten des Cholera-toxins (CTB) oder des hitzelablen Enterotoxins aus *E. coli* (LTB) oder das Agglutinin I aus *Ulex europaeus* (UEA I), die mit hoher Affinität an das Schleimhautoberflächenepithel binden. Im Gastrointestinaltrakt muss neben der physikalischen Barriere des Epithels allerdings auch die enzymatische Barriere der Proteasen überwunden werden. Daher sollte die Verdauungsstabilität von Vakzinen eine entscheidende Bedeutung für den Erfolg einer intragastralen Immunisierung haben. Eine mögliche Strategie zur Stabilisierung peptidischer Antigene ist die retro-inverse (RI) Modifikation. Jedoch ist die Fähigkeit von RI Peptiden, eine schützende Immunantwort an der intestinalen Mukosa zu induzieren, noch nicht ausreichend bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Stabilitäten der murinen B-Zell-Epitope Ova₈₃₋₉₈, Ova₁₀₃₋₁₁₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ des Modellantigens Hühner-Ovalbumin in muriner Intestinalflüssigkeit (IntFl) als freie Peptide und an CTB konjugiert untersucht. Balb/c-Mäuse wurden mit natürlichen oder RI Peptid-CTB Konjugaten systemisch (i.p.) oder intragastral (i.g.) immunisiert und die induzierten systemischen und mukosalen Immunantworten bewertet.

CTB, LTB und UEA I wurden durch eine synthetische Mischung der Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase, für die hier gezeigt werden konnte, dass sie zusammen nur etwa ein Drittel der gesamten Proteaseaktivität in muriner IntFl stellen, in drei Stunden partiell degradiert, während sie in der proteolytisch aktiveren natürlichen IntFl über den gleichen Zeitraum stabil waren. Da der Abbau der Liganden durch Zugabe von Fremdprotein zur synthetischen Enzymmischung verhindert werden konnte, scheint der Proteingehalt von natürlicher IntFl einen protektiven Effekt für die Liganden zu haben. Die Halbwertszeiten der drei Immunisierungspeptide in muriner IntFl lagen dagegen im Bereich von Millisekunden, konnten aber durch Konjugation der Peptide an CTB auf bis zu 12 Minuten verlängert werden. Die entsprechenden RI Peptide wurden in IntFl nicht abgebaut.

Während nach i.p. Applikation natürliche und RI Peptid-Konjugate vergleichbar hohe peptidspezifische IgG-Titer (10^5) oder IgA-Titer (10^2) erzeugten, lieferten nach i.g. Gabe RI Peptid-Konjugate stets höhere anti-Peptid IgG-Titer (10^3 - 10^4) und IgA-Titer (10^1 - 10^3) als ihre natürlichen Analoga. Lediglich das Konjugat mit dem stabilsten natürlichen Peptid (Ova₈₃₋₉₈) konnte überhaupt eine schwache IgA-Antwort ($10^{0.5}$) induzieren. Durch RI Peptid-Konjugate induzierte Antikörper banden jedoch nicht an das natürliche Ursprungprotein Ovalbumin.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Stabilisierung der Antigenformulation gegen proteolytischen Abbau eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche orale Vakzinierung ist, dabei die Aufrechterhaltung der natürlichen Antigenkonformation für die Induktion einer protektiven Immunität an den Mukosen jedoch keinesfalls außer Acht gelassen werden darf.

Abstract

Mucosal immunization induces the secretion of immunoglobulin A (IgA) at the respective mucosal surface. The secretory IgA bind pathogens and retain them in the mucus layer thereby preventing their uptake and a systemic infection. Consequently, vaccination should take place at that mucosal site which is to be protected. Efficiency of antigen uptake can be enhanced by so-called targeting ligands. These are molecules like the non-toxic B-subunits of cholera toxin (CTB) or of the heat-labile enterotoxin from *E. coli* (LTB) or the agglutinin I from *Ulex europaeus* (UEA I), which can bind to mucosal epithelial cells with high affinity. Within the gastrointestinal tract, besides the physical barrier of the epithelium, the enzymatic barrier consisting of a complex mixture of proteases has to be overcome. Digestive stability of vaccines will therefore be of utmost importance for successful intragastral immunization. A possible strategy for stabilization of peptidic antigens is the retro-inverse (RI) modification. Yet, the capability of RI peptides to induce a protective immune response at the intestinal mucosa is not well understood.

Therefore, the stabilities of three murine B-cell epitopes from the model antigen hen ovalbumin (Ova₈₃₋₉₈, Ova₁₀₃₋₁₁₈ and Ova₃₄₉₋₃₆₄) were determined in murine intestinal fluid (IntFl) as free peptides as well as CTB-peptide conjugates. Balb/c-mice were immunized by systemic (i.p.) or mucosal (i.g.) administration of either a natural or a RI peptides conjugated to CTB. Induced systemic and mucosa-associated immune responses were compared.

While CTB and LTB as well as UEA I were stable in natural murine IntFl, they were partially degraded by a mixture of trypsin, chymotrypsin and pancreatic elastase within three hours, although it could be shown that these three proteases only account for one third of the total proteolytic activity in natural IntFl. The degradation could be prevented by adding exogenous protein to the synthetic protease mixture. This protein content occurring naturally in IntFl seems to have a protective effect for the targeting ligands, stabilizing them for at least three hours in the small intestine. The three ovalbumin-derived peptides were degraded by IntFl with half-lives in the range of milliseconds, while conjugation to CTB prolonged these times up to 12 minutes. The corresponding RI peptides were not degraded by murine IntFl.

After i.p. application of natural or RI peptides conjugated to CTB similar IgG-titers (10^5) and IgA-titers (10^2) were obtained for each peptide. In contrast, i.g. immunization with RI peptides induced higher anti-peptid IgG-titers (10^3 - 10^4) or IgA-titers (10^1 - 10^3) than their natural analogs. Only peptide Ova₈₃₋₉₈ that showed the highest *in vitro*-stability could induce a weak IgA-response ($10^{0.5}$). Yet, antibodies induced by RI modified peptides failed to recognize the original whole protein ovalbumin.

Therefore, stabilization of antigens against proteolytic degradation is a prerequisite for successful oral vaccinations, yet maintaining the natural antigen conformation seems to be just as critical for inducing protective immunity by peptide-based vaccines.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	4
Abkürzungsverzeichnis	9
1 EINLEITUNG	11
1.1 Das mukosale Immunsystem des Darms	11
1.1.1 Mukosale Oberflächen	11
1.1.2 Aufbau des mukosalen Immunsystems im Darm	12
1.1.3 Immunantwort an der Darmmukosa	13
1.2 Mukosale Vakzinierungen über die Darmschleimhaut	17
1.2.1 Vorteile der mukosalen Immunisierung	18
1.2.2 Zusammensetzung intestinaler Vakzine	19
1.2.3 Besondere Anforderungen an intestinale Vakzine	21
1.3 Möglichkeiten zur Optimierung der Stabilität intestinaler Vakzine	21
1.3.1 Retro-inverse Peptide	22
1.3.2 Bedeutung der Verdauungsstabilität für Targetingliganden	25
1.4 Zielsetzung und Strategie	26
2 MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN	27
2.1 Tiere	27
2.2 Spezielle Geräte und Apparaturen	27
2.3 Verbrauchsmaterialien	28
2.4 Chemikalien	28
2.4.1 Allgemeine Reagenzien	28
2.4.2 Reagenzien für die Peptidsynthese	29
2.5 Proteine und Materialien für die Peptidsynthese	30
2.5.1 Proteine	30
2.5.2 Aminosäuren für die Peptidsynthese	30
2.6 Proteasen, Substrate und Inhibitoren	31
2.7 Antikörper	31

2.8	Nachweissysteme und Kits	32
2.9	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	32
2.10	Software und Online-Programme	33
3	METHODEN	34
3.1	Allgemeine proteinchemische Arbeiten	34
3.1.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	34
3.1.2	Gelelektrophoretische Methoden	35
3.1.3	Isolierung von Albumin aus murinem Serum	38
3.2	Peptidsynthese	39
3.2.1	Synthese festphasengebundener Peptide	40
3.2.2	Synthese löslicher Peptide	40
3.2.3	Peptidsynthese für die Immunisierungsstudie	41
3.3	Synthese von Peptidkonjugaten	41
3.3.1	CTB-Peptid-Konjugate	41
3.3.2	BSA-Peptid-Konjugate	43
3.4	Allgemeine Angaben zur Behandlung der Versuchstiere	45
3.5	Anästhesieren von Mäusen	45
3.6	Präparation von Intestinalflüssigkeit	46
3.6.1	Gewinnung unverdünnter Intestinalflüssigkeit	46
3.6.2	Gewinnung der Intestinalflüssigkeit durch Spülung	47
3.7	Aktivitätsbestimmung von intestinalen Verdauungsenzymen	47
3.7.1	Spezifische Enzymaktivitätsbestimmung	47
3.7.2	Unspezifische Enzymaktivitätsbestimmung	49
3.8	Bestimmung der Stabilität von Peptiden gegenüber intestinalen Proteasen	50
3.8.1	Halbwertszeiten von Peptiden in muriner Intestinalflüssigkeit	50
3.8.2	Halbwertszeiten von Proteinen in muriner Intestinalflüssigkeit	51
3.9	Immunisierungen	52
3.9.1	Immunisierungsplan	52
3.9.2	Immunisierungslösungen	53
3.9.3	Intragastrale Immunisierung	55
3.9.4	Intraperitoneale Immunisierung	55

3.10	Probengewinnung	55
3.10.1	Serum aus Blutproben	55
3.10.2	Fäzes	56
3.10.3	Terminale Probennahme	57
3.11	Immunoassays	58
3.11.1	G _{MI} -Bindungs-ELISA mit CTB-Konjugaten	58
3.11.2	Endpunkt-ELISA zur Bestimmung von Antikörpertitern	59
3.11.3	Peptomer-ELISA	61
3.11.4	Aminosäureaustausch-Assay („Alanin-Scan“)	62
3.12	Statistische Auswertungen	64
4	ERGEBNISSE ZUR VERDAUUNGSSTABILITÄT	65
4.1	Charakterisierung und Simulation von muriner Intestinalflüssigkeit	65
4.1.1	Enzymaktivitäten und Proteingehalt in natürlicher Intestinalflüssigkeit	65
4.1.2	Enzymaktivitäten und Proteingehalt in simulierter Intestinalflüssigkeit	66
4.1.3	Unspezifische Gesamtproteasenaktivität	68
4.1.4	Enzymaktivität bei Verdünnung natürlicher Intestinalflüssigkeit	72
4.2	Stabilität von Targetingliganden gegen intestinale Proteasen	73
4.2.1	Stabilität in natürlicher Intestinalflüssigkeit	74
4.2.2	Stabilität in simulierter Intestinalflüssigkeit	74
4.2.3	Stabilität in simulierter Intestinalflüssigkeit nach Proteinzusatz	75
4.3	Auswahl der Immunisierungspeptide	76
4.4	Stabilität der Immunisierungspeptide gegen intestinale Proteasen	80
4.4.1	Freie Immunisierungspeptide	80
4.4.2	Immunisierungspeptide in CTB-Konjugaten	81
5	ERGEBNISSE DER IMMUNISIERUNGSSTUDIE	84
5.1	Synthese und Reinigung von Komponenten für die Immunisierung	84
5.1.1	Peptide für die Immunisierungsstudie	84
5.1.2	CTB-Konjugate für die Immunisierungsstudie	84
5.1.3	Murines Serumalbumin	88
5.2	Kontrollen zum Verlauf der Immunisierung	89
5.2.1	Präimmunstatus	89

5.2.2	Allgemeiner Zustand der Tiere im Verlauf der Studie	91
5.2.3	Anti-CTx IgG als Erfolgskontrolle	92
5.2.4	Antigenität des Konjugationslinkers	93
5.3	Spezifische anti-Peptid Endpunkttiter	94
5.3.1	Anti-Peptid IgG-Titer im Serum	94
5.3.2	Anti-Peptid IgA im Fäzes	95
5.3.3	Anti-Peptid IgA in Intestinalflüssigkeit	96
5.3.4	Effekt von Proteinzusatz auf anti-Peptid Titer	98
5.3.5	Zur Antikörperbindung essentielle Aminosäuren	99
5.4	Kreuzreaktivitäten der Antikörper	101
5.4.1	Kreuzreaktivitäten nach Immunisierung mit natürlichen Peptiden	101
5.4.2	Kreuzreaktivitäten nach Immunisierung mit retro-inversen Peptiden	102
6	DISKUSSION	104
6.1	Bewertung von Verdauungsstabilitäten	105
6.1.1	Simulation natürlicher Intestinalflüssigkeit	105
6.1.2	Stabilität von Proteinen und Peptiden gegen intestinale Proteasen	107
6.2	Immunisierung mit Peptidkonjugaten	109
6.2.1	Zusammenhang von Stabilität und Immunogenität	110
6.2.2	Nebenreaktionen bei systemischer Immunisierung	112
6.2.3	Kreuzreaktionen nach Peptidimmunisierung	113
6.3	Fazit und Ausblick	116
	Literaturverzeichnis	117
	ANHANG	127
	Aminosäuresequenz von Ovalbumin	127
	Einzeltiter der Immunisierungsstudie	128
	Abbildungsverzeichnis	134
	Tabellenverzeichnis	135

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code benannt, Gewichts- und Volumenangaben entsprechen dem SI-System und werden hier nicht aufgeführt.

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AB	AquaBlock
<i>ad lib.</i>	<i>ad libitum</i> – nach Belieben
ANOVA	Analyse der Varianz
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl (-schutzgruppe)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Chymotrypsin
CTB	B-Untereinheit des Cholera-toxins aus <i>Vibrio cholerae</i>
CTx	Cholera-toxin aus <i>Vibrio cholerae</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
E	Elastase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Klassifikation der <i>Enzyme Commission</i>
EC(50)	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorbensassay (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl (-schutzgruppe)
G _{M1}	Gangliosid M1
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HWZ	Halbwertszeit
i.g.	intra-gastral
i.p.	intra-peritoneal
(S-)Ig	(sekretorisches) Immunglobulin
Int. Intens.	integrierte Intensität
IntFl	Intestinalflüssigkeit
LTB	B-Untereinheit des hitzelablen Enterotoxins aus <i>Escherichia coli</i>
LTx	hitzelablen Enterotoxin aus <i>Escherichia coli</i>

MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i>
MDP	N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (Muramyldipeptid)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MSA	murines Serumalbumin
MW	Molmasse (<i>Molecular weight</i>)
MWCO	Molmassesausschluss (<i>Molecular weight cut-off</i>)
n	Anzahl unabhängiger Messungen
n.b.	nicht bestimmbar
n.d.	nicht detektierbar
nat	natürlich
NHS	N-Hydroxy-Succinimidyl
OD	Optische Dichte
Ova	Ovalbumin
p.a.	zur Analyse (<i>pro analysis</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Proteaseinhibitor
pos.	positiv
rel.	relativ
RI	retro-invers
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SIF	simulierte Intestinalflüssigkeit (Puffer)
sim	simuliert
T	Trypsin
TBABH	Tetrabutylammoniumborhydrid
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloro acetic acid</i>)
TEAA	Triethylamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UEA I	Agglutinin I aus Stechginster (<i>Ulex europaeus</i>)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

1 Einleitung

Die Induktion einer Immunantwort an den Schleimhautoberflächen des Gastrointestinaltraktes im Rahmen einer oralen oder intragastralen Impfung hat zum Ziel, eine schützende Immunität gegen Erreger aufzubauen, die auf dieser Route in den Körper einzudringen drohen.

Durch das Ansprechen des lokalen Immunsystems im Darm wird nach Aktivierung der beteiligten Immunzellen als Resultat sekretorisches IgA in das Darmlumen abgegeben (siehe Abschnitt 1.1). Das dimere sekretorische IgA bildet eine antigenspezifische Barriere, indem es Erreger bereits im Lumen aggregiert. So können sie das Epithel nicht mehr durchdringen und werden letztendlich durch die Darmperistaltik aus dem Körper entfernt. Eine Infektion des Körpers wird durch diese neutralisierende Immunität präventiv verhindert, was mit systemischen Impfungen durch Injektionen nicht erreicht werden kann (siehe Abschnitt 1.2).

Eine besondere Herausforderung für den Einsatz von lokalen Impfstoffen im Gastrointestinaltrakt ist die stark proteolytische Umgebung, in der die Vakzine ihre Anwendung finden sollen. Die komplexe Zusammensetzung des intestinalen Milieus mit seinen zahlreichen Verdauungsenzymen macht eine Kenntnis des Zusammenhangs zwischen Verdauungsstabilität und Immunogenität eines Wirkstoffes notwendig. Eine Möglichkeit, peptidische Wirkstoffe an sich verdauungsstabil zu machen, ist die retro-inverse Modifikation (siehe Abschnitt 1.3).

1.1 Das mukosale Immunsystem des Darms

1.1.1 Mukosale Oberflächen

Der erste Kontakt zwischen exogenen Stoffen oder Erregern mit einem Organismus findet an den Oberflächen des Körpers statt. Dabei bietet die mehrschichtige verhornte Epidermis der Körperaußenseite eine chemisch und mechanisch relativ gut geschützte und mit etwa 2 m² eine relativ kleine Angriffsfläche verglichen mit den Schleimhäuten des Körpers. Die mukosalen Oberflächen in Atmungs-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt stellen mit ihren im erwachsenen Menschen insgesamt etwa 400 m² eine bedeutend größere und durch ihren primären Aufbau aus einer sehr dünnen Epithelzellschicht eine leichter zu durchdringende Angriffsfläche dar (Janeway *et al.*, 2005).

Die mukosalen Oberflächen stehen in ständigem Kontakt zu der komplexen Außenwelt und müssen als Bestandteile funktionaler Organe bestmögliche Gefahrenabwehr mit den ihnen

obliegenden physiologischen Funktionen (zum Beispiel Gasaustausch in den Lungen, Nahrungsaufnahme im Darm) vereinen. Aufgrund dieser Funktionen stellen die Schleimhäute teilweise durchlässige Barrieren dar und sind daher auch für Infektionen besonders anfällig.

Der besondere Aufwand, der zum Schutz dieser mukosalen Oberflächen betrieben werden muss, manifestiert sich darin, dass sich in gesunden erwachsenen Menschen rund 80 % der gesamten Immunzellen des Organismus an den Schleimhäuten finden (Holmgren und Czerkinsky, 2005). Diese Zellen treten gehäuft an oder in den verschiedenen Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissues*) auf.

1.1.2 Aufbau des mukosalen Immunsystems im Darm

Intestinales Epithel und lamina propria

Die Monozellschicht des Schleimhautepithels im Dünndarm bildet als Grenze zwischen dem Körpergewebe und dem Darmlumen die physikalische Barriere zwischen innerer und äußerer Umgebung. In diesem einlagigen Epithel sind die Zellen polar aufgebaut. Die apikale Seite ist dem Darmlumen zugewandt, die basolaterale Seite grenzt an die Basallamina und das subepitheliale Gewebe. Die Zellen sind nahe der apikalen Oberfläche durch *tight junctions* fest verbundenen, so dass nur Wasser, Ionen und kleine Moleküle die Barriere unkontrolliert passieren können (Madara, 1990). Peptide, Makromoleküle oder Mikroorganismen bedürfen eines aktiven Transportes, wodurch eine kontrollierte Zufuhr zu antigenpräsentierenden Zellen auf unterschiedlichen Wegen möglich ist (siehe 1.1.3).

Zusätzlich zu den makroskopischen Darmzotten weisen die einzelnen Epithelzellen auf ihrer apikalen Oberfläche dicht gestaffelte Mikrovilli auf. Über den Mikrovilli stellt die Glykokalyx eine dichte Barriere dar, die den meisten Mikroorganismen den Zugang zur apikalen Epithelzellmembran verwehrt (Frey *et al.*, 1996; Mantis *et al.*, 2000). Desweiteren wird von spezialisierten Becherzellen Mukus sezerniert, der auf dem Epithel eine zusätzliche Schutzschicht bildet, indem er als viskose Masse die Beweglichkeit von Bakterien und die Diffusion von Pathogenen hemmt.

An der basolateralen Seite der Epithelzellschicht befindet sich die *lamina propria*, in der diffus verteilte dendritische Zellen, Lymphozyten und Makrophagen vorkommen. Diese subepithelialen Immunzellen können eventuell an der Antigenaufnahme und der Induktion einer Immunantwort beteiligt sein. Vor allem aber finden sich hier die Effektorregionen, in denen die Ausschüttung von Immunglobulinen in das Darmlumen stattfinden (siehe 1.1.3).

Peyersche Plaques

Die Gesamtheit der Strukturen im Darm, in denen die Immunzellen organisiert sind, wird als Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) bezeichnet. In einigen Bereichen des subepithelialen Gewebes treten organisierte Ansammlungen von Lymphozyten mit besonderen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der umgebenden Gewebe- und Epithelzellen auf. Diese sogenannten Peyerschen Plaques bestehen aus großen B-Zell-Follikeln direkt unterhalb des Epithels und tiefer liegenden T-Zell-Bereichen (Mowat, 2003).

Makroskopisch faltet sich das Epithel über den Peyerschen Plaques nicht zu Darmzotten auf. Vielmehr bildet das hier auftretende Follikel-assoziierte Epithel (FAE) eine kuppelartig in das Darmlumen reichende Domregion. Im FAE kommen nur wenige Zellen vor, die Mukus, Defensine oder Lysozym produzieren (Owen, 1999). Dafür tritt hier neben den herkömmlichen Epithelzellen der charakteristische Zelltyp der M-Zellen auf (Holmgren und Czerkinsky, 2005). M-Zellen tragen nur rudimentär ausgebildete Mikrovilli auf der apikalen Seite und weisen eine Glykokalyx geringerer Höhe auf (Frey *et al.*, 1996; Mantis *et al.*, 2000). Ein weiteres morphologisches Merkmal der M-Zellen ist eine große basolaterale Tasche, in die Lymphozyten aus dem subepithelialen Gewebe einwandern können (Neutra *et al.*, 1996).

1.1.3 Immunantwort an der Darmmukosa

Anders als das in steriler Umgebung auf eingedrungene Antigene antwortende systemische Immunsystem muss das mukosale Immunsystem des Darms in einer Umgebung funktionieren, die durch Nahrungsaufnahme ständig von fremdem Material überschwemmt wird und die von zu dulddenden kommensalen Bakterien bewohnt ist, während potentiell gefährliche Erreger sofort bekämpft werden müssen. Das Immunsystem muss hier zuverlässig zwischen Nahrungsmittel und Krankheitserreger unterscheiden können und eine Immunantwort gegen exogene Pathogene auslösen, während gegenüber harmlosen Antigenen eine orale Toleranz aufrechterhalten werden soll (Strobel und Mowat, 1998). Fehlreaktionen können auf der einen Seite zu Infektionen durch aufgenommene Pathogene und auf der anderen Seite zum Beispiel zu Allergien gegen Nahrungsmittel, die fälschlicherweise als auszugrenzend bewertet wurden, führen (Berin und Sampson, 2005).

Unspezifische Abwehrmechanismen

Der Verdauungstrakt ist auf den Abbau unterschiedlichster Stoffklassen ausgerichtet. Die große Bandbreite degradierender Enzyme erschwert es aufgenommenen Pathogenen enorm, intakt die intestinale Mukosa zu erreichen. Der niedrige pH-Wert des Magens fördert die Denaturierung von Proteinen. Mukus und Glykokalyx erschweren im Darm den Zugang zum intestinalen Epithel. Kommensale Bakterien besetzen für eingedrungene Mikroorganismen geeignete Besiedlungsnischen. Die Peristaltik des Darms verhindert eine lange Verweildauer an einer Stelle.

Diese unspezifischen Abwehrmechanismen werden darüber hinaus noch von Komponenten des angeborenen Immunsystems unterstützt. So erkennen die intestinalen Epithelzellen mikrobielle Komponenten durch Mustererkennungsrezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLR) und sind in der Lage, Defensine zur mikrobiellen Abwehr auszuschütten oder durch die Abgabe von Chemokinen phagozytische Zellen zur unspezifischen Abwehr anzulocken (Neutra und Kozlowski, 2006).

Unterstützt werden die unspezifischen Abwehrmechanismen an der Darmmukosa wie im parenteralen System auch durch die Fähigkeit, eine adaptive Immunantwort gegen spezifische antigene Strukturen zu initiieren.

Antigenaufnahme und Induktion einer adaptiven Immunantwort

Um die Überwachung des Darminhaltes zu gewährleisten muss sich das lokale Immunsystem kontinuierlich in einem Status hoher Aktivität befinden (MacDonald, 2003). Ständig müssen Antigenproben aus dem Lumen über das Epithel transportiert und dem Immunsystem zur Bewertung zugeführt werden.

Die Enterozyten des Darmepithels besitzen die Fähigkeit, als antigenpräsentierende Zellen zu fungieren. Nach endozytotischer Aufnahme werden Proteine in den Lysosomen prozessiert (Terpend *et al.*, 1998) und im Komplex mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex MHC-II auf der basolateralen Seite als Exosomen abgeschnürt und den Lymphozyten in der *lamina propria* präsentiert (Van Niel *et al.*, 2003). Diese Aufnahmeroute wird vor allem im Zusammenhang mit der Induktion lokaler Toleranz an der intestinalen Mukosa diskutiert (Mowat, 2003).

Es ist auch möglich, dass Antigen aus dem Darmlumen durch intraepitheliale oder subepitheliale dendritische Zellen (DC) aufgenommen wird. Die Zellen können dazu die *tight junctions* der Epithelzellschicht öffnen, so dass sie mit ihren Dendriten in das Darmlumen

reichen können. Zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion bilden sie selbst wiederum *tight junctions* zu den benachbarten Epithelzellen (Rescigno *et al.*, 2001). Diese DCs können als antigenpräsentierende Zellen entweder mit lokalen Lymphozyten interagieren und eine Gedächtnisfunktion oder Immuntoleranz induzieren, oder sie wandern zu den peripheren Lymphknoten und aktivieren dort naive T-Zellen.

Wegen der wenig ausgeprägten Oberflächenbarrieren im Bereich der Peyerschen Plaques (rudimentäre Mikrovilli mit dünner Glykokalyx, keine mukusezernierenden Becherzellen, siehe 1.1.2) wird vermutet, dass M-Zellen der Hauptaufnahmeweg für partikuläre Antigene aus dem Darmlumen sind (Corr *et al.*, 2007). Durch die Bildung der M-Zell-Tasche beträgt der Abstand zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran an manchen Stellen nur noch 1 bis 2 μm , was eine schnelle Transzytose von aufgenommenem Material aus dem Darmlumen innerhalb von 10 bis 15 Minuten erlaubt (Neutra *et al.*, 2001). Dabei werden die Antigene durch das nur schwach ausgeprägte lysosomale System der M-Zellen nicht prozessiert, sondern in ihrer nativen Form an professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) in der basolateralen Tasche weitergereicht (Mowat, 2003).

Vermutlich treten hier dendritische Zellen als APC auf. Sie wandern antigenbeladen zu den B-Zell-Follikeln und den T-Zell-Bereichen der Peyerschen Plaques, um dort das Antigen zu präsentieren und eine Immunabwehrreaktion in Gang zu setzen (siehe Abbildung 1-1).

Lymphozytenmigration

Nach dem Zusammentreffen mit antigenpräsentierenden Zellen in den Peyerschen Plaques wandern die Lymphozyten über die afferenten Lymphgefäße zu den mesenterialen Lymphknoten. Eventuell findet auch erst hier der Kontakt zwischen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen und naiven T-Zellen statt, so dass zusätzlich eine systemische Immunantwort induziert werden kann (Mowat, 2003). Nach weiterer Differenzierung der Lymphozyten in den mesenterialen Lymphknoten gelangen sie in den Blutkreislauf (siehe Abbildung 1-1).

T-Zellen, die zuerst im GALT auf ein präsentiertes Antigen getroffen sind, regulieren die Exprimierung des $\alpha_4\beta_7$ -Integrins und des Rezeptors CCR9 hoch. Das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin tritt in Wechselwirkung mit dem mukosalen Adressin MADCAM-1 (Berlin *et al.*, 1993), CCR9 bindet den Liganden CCL25 am Dünndarmepithel (Campbell und Butcher, 2002). Diese Faktoren führen dazu, dass diese T-Zellen, die mit Antigen aus dem Dünndarm in Kontakt getreten sind, nach ihrer Reifung wieder zur intestinalen Mukosa zurückkehren. CD4^+ T-Zellen produzieren dort $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 und IL-4, CD8^+ T-Zellen entwickeln zytotoxische Aktivität.

Sezernierung von Immunglobulinen

Durch Faktoren wie TGF- β , IL-10 und andere zelluläre Signale von dendritischen Zellen und T-Zellen werden B-Zellen in den Peyerschen Plaques zu einer Subtypänderung veranlasst und reifen zu IgA-produzierenden Plasmazellen (Neutra und Kozlowski, 2006), welche über die mesenterialen Lymphknoten und den Blutkreislauf in die *lamina propria* der Darmzotten gelangen (siehe Abbildung 1-1).

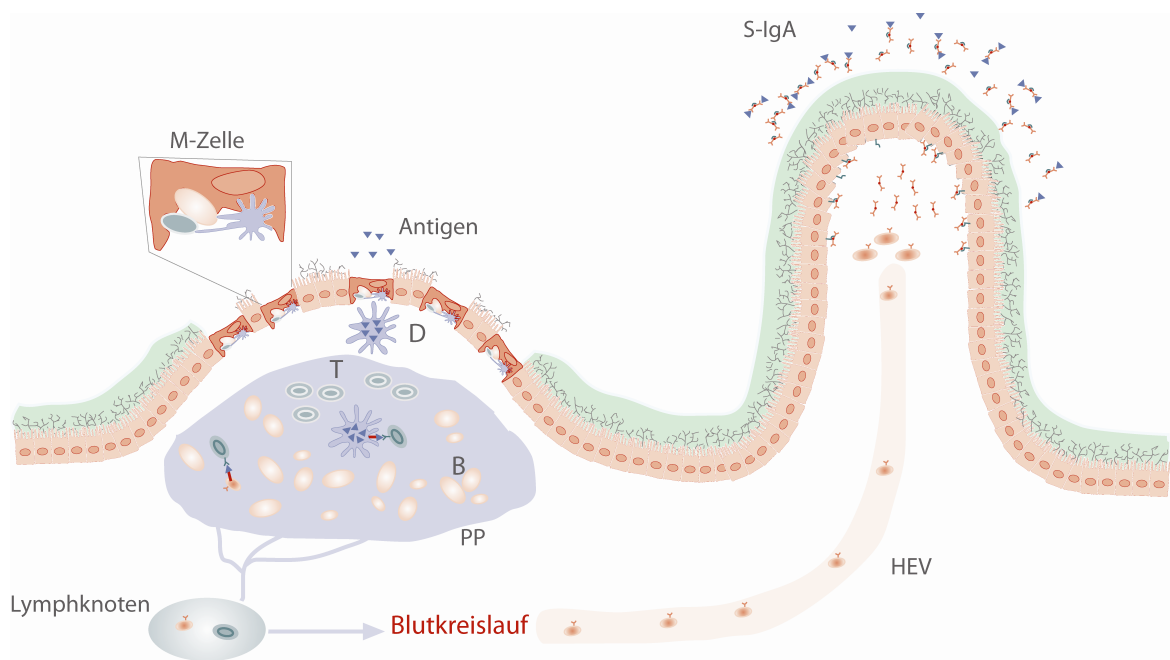


Abbildung 1-1: Immunantwort an der intestinalen Mukosa.

Antigen wird aus dem Darmlumen über M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels aufgenommen und an dendritische Zellen (D) weitergegeben. Diese präsentieren das Antigen im Reifungszentrum des Peyerschen Plaques (PP) naiven T-Zellen (T). Follikuläre B-Zellen (B) in der Corona des Follikels werden ebenfalls antigenspezifisch aktiviert. Die Lymphozyten gelangen über Lymphgefäße in die mesenterialen Lymphknoten und von dort in den Blutkreislauf. Über hochendotheliale Venen (HEV) gelangen B-Zellen in die lamina propria der Darmzotten, wo sie als Plasmazellen IgA sezernieren. Das IgA wird von polymeren Ig-Rezeptoren auf der basolateralen Seite der Epithelzellen gebunden und nach Transzytose ins Darmlumen abgegeben. Ein Teil des Rezeptors dimerisiert als sekretorische Komponente das sekretorische IgA (S-IgA). Erneut auftretendes Antigen wird durch S-IgA gebunden und kann nicht mehr aufgenommen werden. (Details siehe Text)

Enterozyten des Epithels nehmen die von den Plasmazellen sezernierten IgA-Moleküle rezeptorvermittelt auf und schütten sie als sekretorisches IgA (S-IgA) in das Darmlumen aus. Dabei bleibt ein Teil des Rezeptors als sekretorische Komponente an die Immunglobuline gebunden, wodurch S-IgA als Dimer vorliegt (Kaetzel *et al.*, 1991). Diese Dimerisierung erhöht die

Resistenz gegenüber intestinalen Proteasen und erlaubt eine bessere Aggregatbildung aus mehreren Antigen- und S-IgA-Molekülen (Kaetzel *et al.*, 1991).

Immunologisch bildet sich eine schützende Immunität an der Mukosa durch neutralisierende S-IgA Antikörper aus (siehe 1.2.1). Dabei werden mit mehr als 50 mg/kg Körpergewicht je Tag enorme Mengen an IgA synthetisiert und sekretiert (Holmgren und Czerkinsky, 2005; Mestecky *et al.*, 2005b).

Die Zellen des FAE über den Peyerschen Plaques können kein IgA translozieren, was eine Antigenaufnahme in diesen Bereichen wegen der fehlenden Aggregatbildung begünstigt. Dagegen besitzen M-Zellen einen IgA-spezifischen Rezeptor (Mantis *et al.*, 2002), der die Aufnahme von lumenalem IgA oder von Immunkomplexen erleichtern kann (Corthesy *et al.*, 1996).

1.2 Mukosale Vakzinierungen über die Darmschleimhaut

Während fehlerhafte Reaktionen des intestinalen Immunsystems zu Krankheitsbildern wie Allergien gegenüber harmlosen Nahrungsmitteln oder chronischen entzündlichen Darm-erkrankungen führen und ausbleibende Immunantworten die Gefahr einer Infektion bergen, bietet das Eingreifen in das Immunsystem medizinisch-therapeutische oder präventive Möglichkeiten. So kann versucht werden, bei bestehenden chronischen Entzündungen, Allergien oder Autoimmunerkrankungen Toleranz zu induzieren (Mestecky *et al.*, 2005a), wobei das zugrunde liegende Konzept für eine praktische Anwendung noch nicht ausreichend untersucht ist. Durch künstliche Stimulation einer Immunantwort kann auf der anderen Seite im Zuge einer Impfung ein lang anhaltender Schutz an der Schleimhaut erzeugt werden (Boyaka *et al.*, 2005; Holmgren und Czerkinsky, 2005).

Schutzimpfungen ermöglichen dabei nicht nur einen individuellen Schutz vor Krankheiten, sondern darüber hinaus bei hoher Durchimpfungsrate einen Populationsschutz, von dem auch kommende Generationen profitieren. Die Ausrottung der Pocken (WHO, 1980) und die erfolgversprechenden Kampagnen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Auslöschung der Poliomyelitis¹ und der Masern² – mit einem zuletzt berichteten Rückgang der masernbedingten Todesfälle weltweit um 68 % in den Jahren von 2000 bis 2006 – zeigen die Wirksamkeit solcher Impfprogramme. Umgekehrt kann eine nachlassende Impfdisziplin die

¹ <http://www.polioeradication.org>

² <http://www.measlesinitiative.org>

Wiederkehr solcher Erkrankungen fördern, wie eine statistische Erhebung des Robert Koch-Instituts (RKI) zeigt, in der für ein vermehrtes Auftreten von Masernerkrankungen 2006 in Nordrhein-Westfalen vor allem eine mangelnde Impfdisziplin verantwortlich gemacht wird (RKI, 2006).

1.2.1 Vorteile der mukosalen Immunisierung

Derzeit verwendete Impfstoffe werden nahezu ausschließlich systemisch verabreicht (Ogra *et al.*, 2001). Das physiologisch vom systemischen Immunsystem getrennte mukosale Immunsystem wird dadurch allerdings nicht optimal angesprochen, so dass keine ausreichende Immunität an der Mukosa induziert wird (Ogra *et al.*, 2001; Holmgren *et al.*, 2003; Boyaka *et al.*, 2005). Immunisierungen über die orale Route dagegen induzieren sekretorisches IgA (S-IgA) an den mukosalen Kompartimenten entlang der Nahrungsrouten, das heißt an der Mukosa in Mund, Waldeyerschem Ring und Gastrointestinaltrakt, und erzeugen einen starken immunologischen Schutz an diesen Schleimhäuten (Holmgren und Czerkinsky, 2005). Die Imitation der Pathogenaufnahmeroute ist somit essentiell für die Induktion von pathogen-spezifischem S-IgA und einem Immunschutz an der angesprochenen Mukosa.

Nach einer Antigenaufnahme über das GALT und anschließender Präsentation an T-Zellen exprimieren diese das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und den Chemokinrezeptor CCR9. Durch Wechselwirkung mit dem mukosalen Adressin MADCAM-1, dem Rezeptor für das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, werden diese Lymphozyten an die mukosalen Oberflächen dirigiert. Der CCR9 erlaubt eine Antwort auf das Chemokin CCL25, welches selektiv vom Epithel des Dünndarms sezerniert wird. Ein anderes Muster von Adhäsionsmolekül und Chemokinrezeptor exprimieren dagegen T-Zellen, denen ein Antigen nach systemischer Immunisierung in den peripheren lymphatischen Organen präsentiert wurde. Hier werden das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin VLA4 und der Chemokinrezeptor CCR4 gebildet. Eine Migration zu den mukosalen Oberflächen wird nicht herbeigeführt (Campbell und Butcher, 2002). Daher sind parenterale Immunisierungen generell nicht geeignet, um einen zuverlässigen Immunschutz an der Mukosa auszubilden.

Doch auch die einzelnen Regionen des mukosalen Immunsystems sind teilweise voneinander unabhängig zu sehen. Rektale und vaginale Immunisierungen bleiben in ihrer Wirkung in Form einer mukosalen S-IgA-Antwort auf die Induktorregion beschränkt und nach nasaler Antigenapplikation findet sich die stärkste Immunantwort an den Schleimhäuten des Atemtraktes. Die orale Gabe von Antigen wirkt sich immunologisch hauptsächlich im Verdauungstrakt aus (Holmgren und Czerkinsky, 2005). Induktor- und Effektorregion sind also über den Körper verteilt im Wesentlichen identisch. Lediglich als Nebenreaktion kommt

es zu leichteren Immunantworten an anderen Kompartimenten des MALT. Ein erwünschter Immunschutz im Dünndarm sollte somit am effektivsten durch intragastrale oder orale Applikation eines Impfstoffes erzeugt werden können.

Die Sekretion von S-IgA in das Darmlumen bewirkt eine Bindung des erneut auftretenden Antigens durch dimeres IgA. Dadurch wird eine Aufnahme des Antigens und somit eine systemische Infektion verhindert. Dieser Immunausschluss bietet die Möglichkeit, Erreger, die nach dem Durchdringen der Mukosa schwere systemische Krankheitsbilder verursachen, noch im Darm abzufangen. Zum Beispiel Rotaviren oder *Vibrio cholerae* oder Prionen, insbesondere an den Mukosen des Urogenitaltraktes auch HI-Viren, sind für das systemische Immunsystem besonders schwer zu bekämpfen, so dass eine mukosale Immunität von großem Vorteil für den Organismus wäre.

Nicht zuletzt ist eine orale Impfstoffgabe eine leicht durchzuführende Anwendung, die weniger Anforderungen an medizinische Ausbildung oder sterile Arbeitsmethoden stellt als Injektionen zur parenteralen Applikation. Dies ist im Hinblick auf einen Einsatz in logistisch schwer zugänglichen Regionen oder zum Beispiel bei ethnisch begründeter fehlender Akzeptanz invasiver medizinischer Eingriffe von nicht zu unterschätzendem Vorteil.

1.2.2 Zusammensetzung intestinaler Vakzine

Adjuvantien

Die meisten Proteine oder Peptide stellen nur schwache Immunogene an der intestinalen Mukosa dar. Eine Gabe dieser Antigene allein birgt daher die Gefahr, statt einer schützenden Immunität Toleranz zu induzieren. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Immunogenität ist der Einsatz stimulierender Zusätze, sogenannter Adjuvantien.

Die am besten untersuchten und am häufigsten eingesetzten mukosalen Adjuvantien im Bereich der intestinalen Immunisierung sind das Cholera Toxin (CT) und das hitzelabile Enterotoxin (LT) aus *E. coli* (Elson und Dertzbaugh, 2005; Freytag und Clements, 2005). Die beiden eng verwandten AB₅-Toxine weisen eine Sequenzhomologie von 80 % auf und sind strukturell identisch aufgebaut (Merritt und Hol, 1995; Fan *et al.*, 2000). Die homopentameren B-Untereinheiten bilden einen planaren Ring mit der Fähigkeit, das auf Zelloberflächen vorkommende Gangliosid G_{M1} zu binden (Van Heyningen *et al.*, 1971; Schengrund und Ringler, 1989). Die toxische A-Untereinheit besitzt eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität und aktiviert dadurch die Adenylatzyklase in betroffenen Zellen, was zu einer erhöhten cAMP-Konzentration und letztlich zu einer massiven Ausschüttung von Wasser und Elektrolyten

führt (Vanden Broeck *et al.*, 2007; Anosova *et al.*, 2008). Die adjuvante Wirkung resultiert vermutlich aus diversen Effekten, die CT und LT auf die Zellen der Darmmukosa haben. Eine erhöhte Permeabilität des Epithels führt zu einer vermehrten Aufnahme von parallel verabreichtem Antigen, die Antigenpräsentation durch verschiedene Zelltypen wird vermehrt und die Differenzierung von B-Zellen, die Proliferation von T-Zellen und die Cytokinproduktion werden unterstützt (Holmgren *et al.*, 2003; Elson und Dertzbaugh, 2005). Darüber hinaus veranlassen CT und LT dendritische Zellen, in das Follikel-assoziierte Epithel der Peyerschen Plaques zu wandern (Anosova *et al.*, 2008), was die schnelle und effektive Ausbildung einer Immunantwort ebenfalls begünstigt.

M-Zell-Targetingliganden

Da mikrobielle Pathogene ein unbeschädigtes Epithel nur über die M-Zell-Route überwinden können, nimmt man an, dass eine gezielte Applikation von Antigenen an M-Zellen, das sogenannte M-Zell-Targeting, die Pathogenaufnahme imitieren und so eine schützende S-IgA-Antwort induzieren kann (Neutra *et al.*, 1996; Frey und Neutra, 1997).

Als Targetingliganden eignen sich zum Einen Moleküle, deren Bindepartner im Darmepithel nur von M-Zellen exprimiert werden. Das Agglutinin I aus *Ulex europaeus* (UEAI), ein dimeres α -L-Fukose-spezifisches Lektin (Audette *et al.*, 2000), zum Beispiel bindet selektiv an murine M-Zellen (Clark *et al.*, 1995) und eignet sich daher im Maussystem für die Entwicklung M-Zell-spezifischer Targetingsysteme (Chen *et al.*, 1996). Zum Anderen sind ubiquitär auf den Plasmamembranen des Darmepithels vorkommende Moleküle aufgrund der fehlenden Glykokalyxbarriere auf M-Zellen (siehe 1.1.2) dort für partikuläre Liganden selektiv zugänglich. Die nichttoxischen B-Untereinheiten des Cholera-toxins (CTB) oder des hitzelablen Enterotoxins aus *E. coli* (LTB) binden an das Gangliosid G_{M1} . Dieses Gangliosid kommt auf der apikalen Membran aller intestinalen Epithelzellen vor, ist für partikelgebundenes CTB oder LTB jedoch nur auf M-Zellen erreichbar (Frey *et al.*, 1996).

Peptidpitope als Antigene

Sind von einem antigenen Protein, gegen das immunisiert werden soll, diejenigen Peptidfragmente bekannt, die zur Antikörperinduktion beitragen, muss nicht mehr das gesamte Protein in der Vakzinformulation vorhanden sein. Eine Beschränkung auf Peptide, die als B-Zell- und T-Zell-Epitope die Immunantwort induzieren, bietet die Möglichkeit, genauer definierte Impfstoffe herzustellen und dadurch adverse Nebenreaktionen, die bei Verwendung immunologisch weniger gut definierter proteinöser oder attenuierter Pathogene auftreten können, zu reduzieren.

Die geringere Größe ermöglicht zum Beispiel auch eine höhere Beladungsdichte von partikulären Vakzinsystemen. Die Peptidfragmentlänge ist dabei für T-Zell-Epitope durch die Bindefähigkeit der MHC-II-Moleküle limitiert. Für hochaffine Komplexe mit MHC-II-Molekülen sind Peptide mit einer Länge von mindestens 9 Aminosäuren notwendig (Siklodi *et al.*, 1998).

1.2.3 Besondere Anforderungen an intestinale Vakzine

Neben vielen anderen Faktoren, die im Verdauungstrakt eine zuverlässige Antigenapplikation erschweren, treffen sowohl Pathogene als auch Vakzine im Darm nicht nur auf die physikalische Barriere der Epithelzellschicht mit Glykokalyx und Mukus, sondern zusätzlich auch auf eine hohe enzymatische Barriere. Die zahlreichen und in komplexer Mischung vorliegenden Proteasen des Dünndarms sind darauf ausgerichtet, alles über die orale Route Ankommende zu hydrolysieren. Dies bietet einen gewissen Schutz vor pathogenen Strukturen, die durch Verdauung ihre Wirksamkeit verlieren. Allerdings haben sich die meisten intestinalen Pathogene im Laufe der evolutionären Entwicklung an diese Situation angepasst und ziehen sogar Vorteile daraus, indem sie wie zum Beispiel das Reovirus erst durch teilweise Hydrolyse aktiviert werden (Nibert *et al.*, 1991).

Für Wirkstoffe, die im Darm eingesetzt werden sollen, bedeutet die stark proteolytische Umgebung eine zusätzliche Anforderung an die Stabilität. Intestinale Vakzine sollten nicht nur potente Immunogene sein, sondern müssen auch ausreichend verdauungsstabil sein, um ihre Wirkung entfalten zu können. Über welche Zeiträume ein Antigen dabei stabil sein muss, ist jedoch nicht bekannt.

1.3 Möglichkeiten zur Optimierung der Stabilität intestinaler Vakzine

Für einen Einsatz im Verdauungstrakt ist es sinnvoll, Wirkstoffe vor enzymatischem Abbau zu schützen. Denn selbst bei einer pharmakologisch realisierbaren Darreichungsform, die eine Freisetzung zum Beispiel aus Kapseln direkt am Wirkungsort ermöglicht, muss die eigentliche medizinische Wirkung im proteolytischen Milieu stattfinden. Vakzine müssen frei über das Epithel transportiert werden und somit zumindest kurzzeitig ungeschützt vorliegen. Eine Strategie, peptidische Wirkstoffe verdauungsresistent zu machen, ist die retro-inverse Modifikation.

1.3.1 Retro-inverse Peptide

Strukturelle Eigenschaften retro-inverser Peptide

Die natürlichen Aminosäuren weisen am chiralen Zentrum eine L-Konformation auf. Peptide, die aus den enantiomeren α -D-Aminosäuren aufgebaut sind, können von den meisten Proteasen nicht beziehungsweise kaum abgebaut werden (Guichard *et al.*, 1994; Pappenheimer *et al.*, 1994; Gorris, 2005) und sind *in vivo* dadurch deutlich stabiler als natürliche Peptide, auf die das Verdauungssystem der meisten Organismen zugeschnitten ist.

Ein weiteres Ziel bei dem Einsatz modifizierter Peptide muss es sein, dass die gegen dieses Mimetikum gebildeten Immunglobuline auch die Struktur des natürlichen Vorbildes erkennen. Nur dann kann eine Immunisierung mit RI Mimetika neutralisierende Antikörper im Darm induzieren und vor Infektionen durch das natürliche Peptid oder Protein schützen.

Für Peptid-Protein-Interaktionen wie sie zwischen Antigen und Antikörper stattfinden sind im Wesentlichen die Eigenschaften der Aminosäuren-Seitenketten verantwortlich. Eine möglichst genaue Imitation dieser Strukturen sollte also für den Ersatz eines natürlichen Antigens durch ein retro-inverses Peptid zur Antikörperinduktion angestrebt werden. Die Kombination einer vom N-Terminus bis zum C-Terminus umgekehrten Reihenfolge der Aminosäuren (retro-Sequenz) mit dem Einsatz von D-Aminosäuren (inverse Enantiomere) führt zu retro-inversen (RI) Peptiden (Goodman und Chorev, 1979). Abbildung 1-2 zeigt beispielhaft die räumliche Anordnung der beiden Seitengruppen in einem natürlichen Dipeptid, seinem retro-inversen Analogon und den beiden Zwischenstufen – der natürlichen Sequenz aus D-Aminosäuren und der umgekehrten Sequenz aus natürlichen L-Aminosäuren.

Der Vergleich des Ursprungspeptids mit der RI Form zeigt, dass nach Änderung der Stereochemie an den chiralen Zentren der einzelnen Aminosäurepositionen und nach Umkehr der gesamten Richtung des Peptidrückgrats die Seitenketten die gleiche räumliche Ausrichtung aufweisen (Chorev *et al.*, 1979; Guptasarma, 1992).

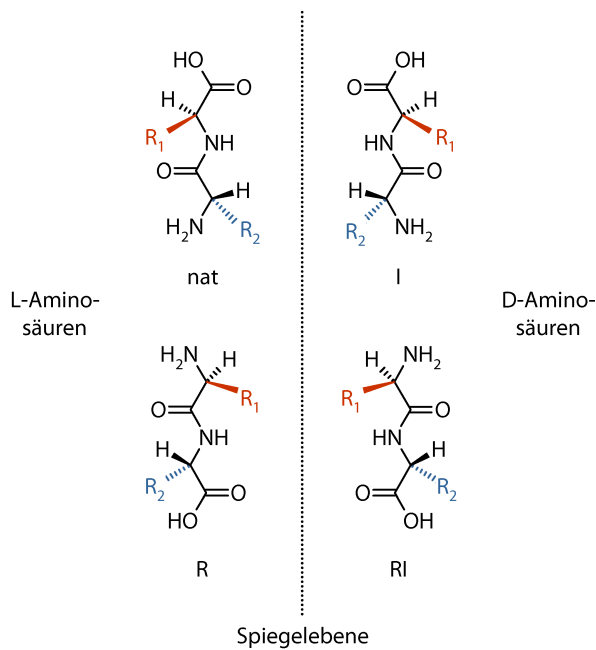


Abbildung 1-2: Stereochemie von Peptidmodifikationen.

Das natürliche Dipeptid aus L-Aminosäuren (nat) kann modifiziert werden, indem D-Aminosäuren mit inverser Chiralität eingesetzt werden (I), oder indem N- und C-Terminus getauscht werden und die retro-Sequenz (R) gebildet wird. Durch Kombination beider Modifikationen entsteht die retro-inverse Form (RI), bei der die Seitenketten der Aminosäuren (R_1 und R_2) in die gleiche Raumrichtung weisen wie beim natürlichen Peptid.

Antikörper gegen globuläre Proteine werden vor allem an Epitope binden, die an der Oberfläche des Proteins liegen. Das Peptidrückgrat wird dabei von den Seitenketten verdeckt, was die Interaktion zwischen Antikörper und Peptidepitop im Wesentlichen auf die Seitenketten der beteiligten Aminosäuren beschränkt. Durch Beschränkung auf kurze Peptide mit all ihren Vorteilen (siehe 1.2.2) sind die isolierten Epitope in einen weniger starren Kontext eingebunden; sie erhalten eine größere Flexibilität. Sterisch anspruchsvolle (zum Beispiel Tryptophan) oder wenig flexible (zum Beispiel Prolin) Aminosäuren und Wechselwirkungen zwischen benachbarten Aminosäuren erhalten einen größeren Einfluss. Zudem kann die Umkehr der Aminosäuresequenz im retro-inversen Peptid gegenüber dem natürlichen die Struktur beeinflussen.

In vivo hat sich gezeigt, dass bestimmte RI Peptide die immunologischen Eigenschaften ihrer natürlichen Analoga imitieren und eine lang anhaltende Immunantwort erzeugen können (Guichard et al., 1994). Es gibt jedoch keine allgemein anwendbare Möglichkeit zur Vorhersage, welche Peptidantigene für eine immunologisch erfolgreiche Imitation durch retro-inverse Modifikation geeignet sind.

Immunisierungen mit retro-inversen Peptiden

Obwohl retro-inverse Peptide ihre Vorteile gerade in der proteolytisch anspruchsvollen Umgebung des Gastrointestinaltraktes ausspielen können sollten, beschränken sich bisher veröffentlichte Studien meist auf andere Applikationswege, bei denen das vorliegende proteolytische Milieu den Impfstoff *per se* nur schwach bis gar nicht beeinträchtigen kann. Dennoch zeigen die Ergebnisse der Studien, dass retro-inverse Peptide grundsätzlich das Potential bergen, *in vivo* einen Immunschutz zu induzieren.

Ein Peptidepitop aus der immundominanten Schleife eines Kapsidproteins des Maul-und-Klauenseuche-Virus (FMDV) war in der retro-inversen Modifikation in der Lage, in Kaninchen nach subkutaner Applikation eine länger anhaltende und stärkere Antwort zu induzieren als das entsprechende natürliche Peptid, wobei das induzierte IgG auch das analoge natürliche Peptid erkannte (Muller *et al.*, 1995). Nach subkutaner Immunisierung mit diesem retro-inversen FMDV-Peptid in Konjugation mit dem Trägerprotein *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) waren Meerschweinchen (Briand *et al.*, 1997) ebenso wie Schweine nach systemischer Immunisierung (Nargi *et al.*, 1999) gegen eine Infektion durch FMDV geschützt.

Bei Mäusen (Swiss Albino) gelang die Induktion einer schützenden Immunität gegen die Wirkung einer doppelten letalen Dosis des Spinnengiftes Robustoxin durch vorherige kombinierte subkutane und intraperitoneale Immunisierung mit einem aus dem Toxin abgeleiteten RI Peptid (Fischer *et al.*, 2007). Die bisher einzige berichtete mukosale Anwendung ist ein induzierter Immunschutz mit hohen Lungen-IgA-Titern gegen eine Influenzainfektion bei Mäusen (Balb/c) durch intranasale Immunisierung mit einem retro-invers modifizierten B-Zell-Epitop des Influenza-Virus (Ben-Yedidia *et al.*, 2002).

Die geringe Anzahl erfolgreicher Studien zeigt, dass der immunologische Schutz durch kreuzreaktive Antikörper nach Vakzinierung mit RI Peptiden keine Selbstverständlichkeit ist. In der Literatur finden sich Studien, in denen Antiseren gegen natürliches Protein RI Peptide aus dem Protein erkennen (Briand *et al.*, 1995; Verdoliva *et al.*, 1995), sowie Studien, in denen keine solche Kreuzerkennung auftritt (Iwai *et al.*, 2001). Nach Applikation von retro-inversen Peptiden wird auch über Kreuzreakтивitäten von Antiseren mit den analogen natürlichen Peptiden und dem natürlichen Protein (Benkirane *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 2007) berichtet. Diese Studien beschränken sich allerdings stets auf die induzierten Antiseren oder monoklonale IgG-Antikörper, während sich zur Kreuzerkennung durch mukosales IgA keine Studien finden.

1.3.2 Bedeutung der Verdauungsstabilität für Targetingliganden

Die Stabilität der Targetingliganden CTB und LTB bei niedrigen pH-Werten impliziert das Potential, eine Magenpassage während einer oralen oder intragastralen Applikation unbeschadet zu überstehen (Ruddock *et al.*, 1995). Das Targeting an der intestinalen Mukosa wird durch die G_{M1} -Bindefähigkeit der beiden Liganden vermittelt (siehe 1.2.2). Dabei haben die homopentameren B-Untereinheiten jeweils fünf Bindestellen für das Gangliosid (Fishman *et al.*, 1978). Die Kristallstrukturen der Toxine mit Galaktose an den Bindestellen (Merritt *et al.*, 1994b) und des CTB- G_{M1} -Komplexes (Merritt *et al.*, 1994a) zeigen die dreidimensionale Struktur der Bindestellen und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Insgesamt sind beim CTB über direkte Interaktion der Seitenketten oder über durch Wassermoleküle vermittelte Wechselwirkung 15 Aminosäuren an der Ligandenbindung beteiligt (Jobling und Holmes, 2002). Dabei liegt die eigentliche Bindestelle innerhalb eines Monomers in der Umgebung des Tryptophan 88, jedoch ist die Beteiligung der Aminosäure Glycin 33 eines benachbarten Monomers essentiell (Merritt *et al.*, 1995; Merritt *et al.*, 1997). Die strukturelle Integrität der Pentamere in der proteolytischen Umgebung des Dünndarms sollte daher von entscheidender Bedeutung für den Erfolg eines G_{M1} -vermittelten Targetings sein. Bisherige Studien zur Stabilität beschränken sich jedoch auf die zur toxischen Wirkung des Choleratoxins notwendigen proteolytischen Aktivierung der A-Untereinheit (Lencer *et al.*, 1997; Rodighiero *et al.*, 1999) oder auf die chemische und physikalische Stabilität von CTB und LTB (Ruddock *et al.*, 1995) und lassen proteolytische Effekte auf die G_{M1} -Bindung durch die Targetingliganden unberücksichtigt.

1.4 Zielsetzung und Strategie

Eines der größten Probleme bei der Entwicklung oraler Vakzine ist die fehlende Kenntnis der Wirkung, die die proteolytische Umgebung des Verdauungstraktes auf einen Impfstoff ausübt, und welche Konsequenzen dies für die immunologische Wirksamkeit hat.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Ermittlung der Stabilitäten von Targetingliganden und von peptidischen B-Zell-Epitopen aus dem Modellantigen Ovalbumin in der intestinalen Umgebung. Dazu wurde nach Möglichkeiten gesucht, mit einem *ex vivo*- oder *in vitro*-Ansatz die natürliche Situation im Gastrointestinaltrakt der Maus nachzustellen. Zur Erzeugung verdauungsstabiler Peptide wurden die ausgewählten B-Zell-Epitope zusätzlich zu der natürlichen Form als retro-inverse Mimetika eingesetzt.

Desweiteren sollte in einer Immunisierungsstudie mit Balb/c-Mäusen überprüft werden, ob sich der Erfolg einer Immunisierung über die Stabilität der Peptide steuern lässt. Nach systemischer (intraperitonealer) oder mukosaler (intra-gastraler) Immunisierung wurden Antikörpertiter in verschiedenen Körperflüssigkeiten verglichen. Dabei lag das spezielle Interesse auf der Frage, ob retro-inverse Peptide aus ihrer weitgehenden Resistenz gegen intestinale Proteasen bei intra-gastraler Gabe einen Vorteil ziehen können, der sich in messbaren Unterschieden bei der Antikörperseznierung niederschlägt.

Der Erfolg einer Schutzimpfung mit Peptidepitopen zeichnet sich durch die Produktion von neutralisierenden Antikörpern aus, die auch das ursprüngliche Gesamtprotein erkennen. Daher wurden die induzierten Antikörper auf Kreuzreaktivitäten mit den jeweils analogen natürlichen beziehungsweise retro-inversen Peptiden und mit dem Gesamtprotein Ovalbumin untersucht.

2 Materialien und Bezugsquellen

Staatenzugehörigkeiten der Herstellerfirmen werden nur bei Firmen ohne Sitz einer Vertretung in Deutschlands aufgeführt.

2.1 Tiere

Die in der Immunisierungsstudie verwendeten Tiere wurden als 6 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse des Züchters Charles River (Sulzfeld; Stamm BALB/cAnNCrl) geliefert.

Zur Gewinnung von Intestinalflüssigkeit oder Darmlavages wurden weibliche Balb/c Mäuse des Züchters Harlan Winkelmann (Borchen; Stamm BALB/cOlaHsd) verwendet.

2.2 Spezielle Geräte und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
8-Kanal-Pipette	Capp (Odense, Dänemark)
AutoSpot Pipettierroboter ASP 222	Intavis (Köln)
Elektrophoresekammer	Fisher Scientific (Schwerte)
Elektrophorese-Spannungsquelle E815 / E835	Consort (Tumhout, Belgien)
Knopfkanülen	Popper & Sons (New Hyde Park, NY, USA)
Laborzentrifugen 5415 D / R	Eppendorf (Hamburg)
Mikroplatten-Lesegerät Versa Max	Molecular Devices (Ismaning)
Mikroplatten-Waschgerät Columbus Pro	Tecan (Crailsheim)
Infrarot-Scanner Odyssey Imaging System	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg) oder Gilson (Limburg-Offheim)
Ultraschallgerät Sonorex RK 10S	Bandelin Electronic (Berlin)
Ultrazentrifuge RC5C Plus, Rotor GSA	Sorvall/Thermo Fisher (Schwerte)
Vakuumkonzentrator SpeedVac SPD121P	ThermoElectron (Dreieich)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Dialyseschläuche Spectra/Por	SpectrumLabs (Rancho Dominguez, CA, USA)
Einwegspritzen	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Hämatokrit-Kapillaren	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Injektionskanülen	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Mikroplatten, 96-Loch (nicht- bzw. hochbindend)	Corning (Lowell, MA, USA)
Nylon Tampons (Filterwicks)	Whatman Polyfiltronics (Rockland, MA, USA)
Zellulosemembranen	Whatman (Dassel)

2.4 Chemikalien

2.4.1 Allgemeine Reagenzien

Allgemeine Laborchemikalien wurden in p.a.-Qualität von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) erworben und werden hier nicht detailliert aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 4K (29:1)	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
AquaBlock	EastCoast Bio (North Berwick, ME, USA)
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Bromessigsäure-NHS-Ester	Molecular Biosciences (Boulder, CO, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Cystein · HCl	Pierce (über Perbio, Bonn)
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Merck (Darmstadt)
N,N'-Dimethylacetamid	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
di-Na-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)

Bezeichnung	Hersteller
Gangliosid G _{M1}	Alexis/Axxora (Lörrach)
Isofluran	Baxter (München)
Magermilchpulver	Lactoland (Dülmen)
β-Mercaptoethanol	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Thimerosal	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Tween-20	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)

2.4.2 Reagenzien für die Peptidsynthese

Bezeichnung	Hersteller
Dichlormethan	Merck (Darmstadt)
Diisopropylcarbodiimid (DICD)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	LGC Promochem (Wesel)
Essigsäureanhydrid	Merck (Darmstadt)
N-Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)
N-Methylimidazol	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
1-Methyl-2-pyrrolidon	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (München)
Mischbett-Ionenaustauscher AG 501-X8 (D)	Bio-Rad Laboratories (München)
Molekularsieb, 8-12 mesh Kugeln, 4 Å	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Phosphorpentoxid	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Piperidin	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Silica Gel Blau (Blaugel)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure (TFA)	Acros Organics/Thermo (Geel, Belgien)
Triisobutylsilan (TIBS)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)

2.5 Proteine und Materialien für die Peptidsynthese

2.5.1 Proteine

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin	British Biocell (Cardiff, UK)
Casein (Hammarsten Qualität)	BDH Laboratory Supplies (Poole, UK)
Choleratoxin aus <i>Vibrio cholerae</i>	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Choleratoxin B-Untereinheit aus <i>Vibrio cholerae</i>	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Hitzelabiles Enterotoxin aus <i>E. coli</i> , B-Untereinheit	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. R. Hirst (The Australian National University, Canberra, Australia)
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (Muramyldipeptid, MDP)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Ovalbumin (grade VII)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

2.5.2 Aminosäuren für die Peptidsynthese

Alle Aminosäurederivate und sonstige Synthesebausteine waren von bester erhältlicher Qualität. Fmoc-geschützte L-Aminosäurebausteine wurden bei Novabiochem (Merck, Darmstadt) erworben, Fmoc-geschützte D-Aminosäurebausteine bei IRIS Biotech (Marktredwitz).

Bezeichnung	Hersteller
β -Alanin (Fmoc- β -Ala-Opfp)	Bachem (Weil am Rhein)
Aminoundecansäure (Fmoc-11-Aun-OH)	Peptides International (Louisville, KY, USA)
Biocytin (Fmoc-Lys (Biotin)-OH)	Advanced Chemtech (Louisville, KY, USA)
Carboxyglutaminsäure (Fmoc-Gla (OtBu) ₂ -OH)	Iris Biotech (Marktredwitz)
5(6)-Carboxymethylrhodamin	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)

2.6 Proteasen, Substrate und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Trypsin (<i>EC 3.4.21.4</i>)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Bovines Chymotrypsin (<i>EC 3.4.21.1</i>)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Bovine Pankreas-Elastase (<i>EC 3.4.21.36</i>)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Bz-Arg-pNA · HCl	Bachem (Weil am Rhein)
Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA	Bachem (Weil am Rhein)
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Bachem (Weil am Rhein)
4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF)	Merck (Darmstadt)
Aprotinin	AppliChem (Darmstadt)
Bestatin Hydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem (Darmstadt)

2.7 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Ziege anti-Maus IgA (α -Ketten spezifisch), HRP-markiert	Southern Biotech (über Biozol, Eching)
Ziege anti-Maus IgG (γ -Ketten spezifisch), HRP-markiert	Southern Biotech (über Biozol, Eching)
Ziege anti-Maus IgG, Alexa680-markiert	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Kaninchen anti-CTB IgG (polyklonal)	Abcam (Cambridge, England)
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-markiert (γ -schwere Ketten spezifisch)	Southern Biotech (über Biozol, Eching)
Anti-2,4 D	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Franék (Veterinary Research Institute, Brno, CZ)

2.8 Nachweissysteme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
D _c Protein Assay (Lowry)	Bio-Rad Laboratories (München)
Gradientengele	Pierce (über Perbio, Bonn)
Micro BCA Assay	Pierce Biotechnology (Bonn)
Molmassenstandard (Precision Plus)	Bio-Rad Laboratories (München)
QuantiCleave Protease Assay Kit	Pierce (über Perbio, Bonn)
Streptavidin, HRP-markiert	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
TBABH (Tetrabutylammoniumborhydrid)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie (München)
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich Chemie (München)
Zymogrammele und -puffer	Bio-Rad Laboratories (München)

2.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

D-PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline)

136 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 1,5 mM KH₂PO₄
 8,1 mM Na₂HPO₄
 auf pH 7,4 eingestellt

L-PBS ("Lite" PBS)

10 mM NaCl
 10 mM NaH₂PO₄
 auf pH 7,0 eingestellt

SIF-Puffer (für simulierte Intestinalflüssigkeit)

111,3 mM Na⁺
 4,6 mM K⁺
 101,5 mM Cl⁻
 in 8 mM Phosphatpuffer (pH 7,2)
 nach Lockwood und Randall (1949)

PBST

0,05% (w/v) Tween-20
 in D-PBS

SBC-EDTA

1 mM EDTA
 in 3% (w/v) NaHCO₃ (pH 8,3)
 mit Argon deoxigeniert

SIFT-Puffer

0,005% (w/v) Tween-20
in SIF

SIFTCaCl₂-Puffer

1 mM CaCl₂
in SIFT

2.10 Software und Online-Programme

Bezeichnung	Hersteller
Corel Draw 10	Corel (Unterschleißheim)
End Note 7	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, CA, USA)
ExPASy ³	Schweizer Institut für Bioinformatik (Basel, Schweiz)
Graph Pad Prism 4.03	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
Microsoft Office 2000/2007	Microsoft (Unterschleißheim)
RankPep ⁴	Harvard University (Boston, MA, USA)
ImageJ 1.38 ⁵	NIH (Bethesda, MD, USA)
Protein Explorer 2.80 ⁶	University of Massachusetts (Amherst, MA, USA)
ClustalW 2.0 ⁷	University College Dublin (Dublin, Irland)
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems (San Jose, CA, USA)
Cn3D 4.1	NCBI (Bethesda, MD, USA)
Odyssey v1.2	LI-COR (Lincoln, NE, USA)
MDL ISIS Draw 2.5	Symyx (Santa Clara, CA, USA)
Soft Max Pro 4.8	Molecular Devices (Ismaning)

³ <http://www.expasy.org/>

⁴ <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>

⁵ <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

⁶ http://www.umass.edu/microbio/chime/pe_beta/pe/protexpl/frntdoo2.htm

⁷ <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/clustalw2/>

3 Methoden

3.1 Allgemeine proteinchemische Arbeiten

3.1.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurden zwei Methoden angewandt, die beide auf der quantitativen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine bei alkalischem pH-Wert basieren. Das entsprechende Redox-Potential der Proteine liegt dabei insbesondere in Cystein-, Tryptophan- und Tyrosin-Seitenketten sowie in den Peptidbindungen (Wiechelmann *et al.*, 1988) und ist für die jeweiligen Methoden im angegebenen Messbereich proportional zur Proteinkonzentration.

Proteinbestimmung im BCA-Assay

Das reduzierte Kupfer wird von zwei Molekülen Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) unter Bildung eines blau-violetten Komplexes chelatisiert und kann photometrisch nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1985).

In einer nicht-bindenden 96-Loch-Mikroplatte mit Flachboden aus Polystyrol wurden mehrere Verdünnungen im Bereich von 5 bis 37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des als Standard dienenden bovinen Serumalbumins in einem Gesamtvolumen von 100 μL H_2O je Kavität in Duplikaten aufgetragen. Von der zu analysierenden Probe wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μL unterschiedliche Verdünnungen angefertigt, wobei die Konzentrationen nach Vorabschätzung möglichst im Bereich von 10 bis 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ liegen sollten. Zu jeder Probe wurden 100 μL einer frisch bereiteten Reaktionslösung des Mikro BCA Assays (Volumenverhältnis der im Kit enthaltenen Lösungen A : B : C = 25 : 24 : 1) gegeben. Die Mikroplatte wurde 60 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Der Proteingehalt der unbekannt Probe konnte durch Vergleich mit der konzentrationsabhängigen Farbintensität der Standardreihe im linearen Bereich bestimmt werden.

Proteinbestimmung nach Lowry

Das Cu^+ wird bei dieser Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung über ein Folinreagenz (Lowry *et al.*, 1951) nachgewiesen, wobei durch Reduktion der enthaltenen Molybdän- und Wolframsalze eine charakteristische Blaufärbung auftritt (Peterson, 1979).

In einer nicht-bindenden 96-Loch-Mikroplatte mit Flachboden wurden mehrere Standardverdünnungen von 1 bis 10 µg bovines Serumalbumins in einem Gesamtvolumen von 5 µL H₂O je Kavität doppelt vorgelegt. Von der zu analysierenden Probe wurden in einem Gesamtvolumen von 5 µL je Kavität unterschiedliche Verdünnungen angefertigt, wobei die Konzentrationen nach Vorabschätzung möglichst im Bereich der Kalibrationsgeraden liegen sollten. Aus den im Kit enthaltenen Lösungen wurde eine Reaktionslösung aus den Reagenzien A und S (Volumenverhältnis A : S = 49 : 1) hergestellt. Zu jeder Probe wurden 25 µL dieser Reaktionslösung und 200 µL Reagenz B gegeben. Während 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Folinreagenz reduziert, was in proteinhaltigen Lösungen zu einer blauen Färbung führte, die bei einer Wellenlänge von 750 nm im Mikroplatten-Lesegerät quantifiziert werden konnte. Der Proteingehalt der unbekannt Probe wurde durch Vergleich mit der konzentrationsabhängigen Farbintensität der Standardreihe im linearen Bereich bestimmt.

3.1.2 Gelelektrophoretische Methoden

Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; modifiziert nach Laemmli (1970)) dient der elektrophoretischen Auftrennung mit Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecylsulfate*, SDS) beladener Proteine in einer Gelmatrix nach ihrer Molmasse. Für Grundlagen zu dieser Methode sei auf die Literatur verwiesen (z.B. Dechert (2007))

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden mit reduzierendem vierfach konzentriertem SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, 10 Minuten bei 60°C inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und nebst einem Molmassenstandard in separate Taschen eines Polyacrylamid-Gels geladen. CTB- oder LTB-haltige Proben wurden mit einem Ladepuffer mit geringerem SDS-Gehalt versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die homopentamere Form dieser Proteine zu erhalten. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 160 V und maximaler Stromstärke von 45 mA je Gel in Tris/Glycin-Elektrodenpuffer. Der Gellauf wurde beendet, sobald der im Ladepuffer enthaltene Frontmarker Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hatte.

Die Polyacrylamidkonzentration der Sammelgele betrug 5% (w/v), während die Konzentration der Trenngele sich nach dem gewünschten Trennvermögen und den Molmassen der zu analysierenden Proteine richtete (siehe Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die SDS-PAGE.

	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	7,5 %
H ₂ O	3,69 mL	3,05 mL	2,46 mL	2,63 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,88 mL	1,88 mL	1,88 mL	
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)				0,47 mL
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)	1,86 mL	2,48 mL	3,10 mL	0,62 mL
10% (w/v) SDS	75 µL	75 µL	75 µL	38 µL
TEMED	11,25 µL	11,25 µL	11,25 µL	7,5 µL
10% (w/v) APS	45 µL	45 µL	45 µL	30 µL

Die Volumenangaben beziehen sich auf Gele der Größe 9 x 10 x 0,1 cm

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (siehe unten) und über einen Durchlichtscanner zur weiteren Auswertung digitalisiert.

Allgemeiner Ladepuffer (4x)

40% (w/v)	Glycerin
8% (w/v)	SDS
25% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,004% (w/v)	Bromphenolblau

CTB/LTB-Ladepuffer (4x)

40% (w/v)	Glycerin
0,4% (w/v)	SDS
20% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,004% (w/v)	Bromphenolblau

Elektrodenpuffer

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS

Gradientengelelektrophorese

War eine Auftrennung von Proteinen über einen weiten Molmassenbereich erforderlich, wurden käuflich erworbene Gradientengele verwendet, bei denen die Polyacrylamidkonzentration in Laufrichtung kontinuierlich von 4 % bis 20 % anstieg. Die Behandlung der Proben und die Elektrophorese erfolgten analog der oben beschriebenen Prozedur.

Zymographie

Proteasehaltige Proben wurden mit dem doppelten Volumen eines speziellen Zymographie-Probenpuffers versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Da der Probenpuffer SDS, aber keine Thiole enthielt, fand die Elektrophorese unter denaturierenden, nicht-reduzierenden Bedingungen statt.

Die Proben wurden auf caseinhaltige 12%ige Polyacrylamid-Fertiggele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V und maximal 45 mA über 90 Minuten mit dem oben beschriebenen Laufpuffer. Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurden die Proteasen im Gel renaturiert, indem die Gele zweimal in 75 mL eines Renaturierungspuffers für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert wurden.

Um proteolytische Aktivität nachweisen zu können, wurden die Gele zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 4 Stunden bei 37°C in jeweils 75 mL frischem Entwicklungspuffer geschwenkt. Während dieser Zeit konnten die elektrophoretisch getrennten Proteasen das im Gel enthaltene Casein abbauen. Die abschließende Coomassie-Färbung (siehe unten) führte somit zu einem überwiegend blau gefärbten Gel (durch den Caseingehalt), auf dem helle Banden (schwächer gefärbtes, proteolytisch degradiertes Casein) zu identifizieren waren. Die Zymogramme wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert und densitometrisch ausgewertet.

Zymographie-Probenpuffer

62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
25% (w/v)	Glycerin
4% (w/v)	SDS
0,01% (w/v)	Bromphenolblau

Zymographie-Renaturierungspuffer

2,5% (w/v)	Triton X-100
1:10 in H ₂ O	

Zymographie-Entwicklungspuffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
200 mM	NaCl
5 mM	CaCl ₂
0,02% (w/v)	Brij-35
1:10 in H ₂ O	

Coomassie-Färbung

Für die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 wurden die Gele in einer Glasschale mit Coomassie-Färbelösung auf einem Wippschüttler geschwenkt, bis die Gele vollständig und gleichmäßig intensiv angefärbt waren. Anschließend wurden sie zur Reduktion der Hintergrundfärbung mehrfach in frischer Entfärbelösung inkubiert und schließlich mit H₂O gewaschen. Die Dokumentation und Digitalisierung von Gelen zur weiteren Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtscanners. Bandenintensitäten wurden mit der Software ImageJ ausgewertet.

<u>Coomassie-Färbelösung</u>		<u>Entfärbelösung</u>	
40% (v/v)	Methanol	40% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure	10% (v/v)	Essigsäure
0,2% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250		

3.1.3 Isolierung von Albumin aus murinem Serum

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von murinem Serumalbumin (MSA) für den Einsatz in der Immunisierungsstudie diente käuflich erworbenes Serum von weiblichen Balb/c-Mäusen (Harlan-Winkelmann, Borcheln). Die Aufbereitung folgte im Wesentlichen dem Protokoll von Chen *et al.* (2005). Dabei werden die Serumproteine mit einer Trichloressigsäure (TCA)-Lösung in Aceton gefällt. Der entstehende Albumin-TCA Komplex ist in organischen Lösungsmitteln löslich und kann daher nach Zentrifugation aus dem Überstand isoliert werden.

In konischen Zentrifugenbechern wurden auf Eis zu je 30 mL Mäuseserum (1:4 verdünnt in H₂O) 120 mL eiskalte frisch zubereitete TCA-Lösung (10% (w/v) in Aceton) gegeben. Der Ansatz wurde mit einem Vortex-Gerätes kräftig gemischt und für 90 Minuten bei -20°C belassen. Anschließend wurde mit 15000 x g bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und am Rotationsverdampfer auf etwa 30 mL eingengt. Zur weiteren Aufarbeitung wurde die stark saure MSA-haltige Lösung mit 5 M NaOH-Lösung auf einen neutralen pH-Wert eingestellt und unter mehrfachem Pufferwechsel gegen ein etwa 100fach größeres Volumen an D-PBS dialysiert (MWCO: 12-14000 Da; 1 h / 2 h / über Nacht / 2 h).

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Präparation erfolgte nach der Methode von Lowry (siehe 3.1.1), die Reinheit der Präparation wurde über SDS-PAGE bestimmt (siehe 3.1.2).

Die Albuminlösung wurde portioniert, gefriergetrocknet, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Peptidsynthese

Peptide wurden je nach ihrer Einsatzbestimmung als lösliche oder als festphasengebundene Peptide auf Zellulosemembranen nach der Methode von Frank (1992) synthetisiert. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweisen und der Behandlung der verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel findet sich in Lehrbüchern (Gorris *et al.*, 2007a).

Der für die Auftragung der entsprechenden Aminosäuren genutzte programmierbare Pipettierroboter erlaubt eine parallele Synthese von bis zu 1700 Peptiden mit einer maximalen Länge von 25 Aminosäuren auf vier Zellulosefiltern. Die Aminosäurelösungen werden dabei auf für jedes Peptid definierte Areale („Spots“) automatisch aufgetragen, wobei die Syntheserichtung – entgegen der Peptidbiosynthese *in vivo* – vom carboxyterminalen Ende zum Aminoterminus verläuft.

In einem zyklischen Reaktionsprozess werden über einen je nach Anwendung geeigneten Anker auf der Zellulosemembran die Aminosäurederivate nacheinander zu einer wachsenden Peptidkette aufgetragen. Dazu wird die Carboxylatfunktion der neu aufzutragenden Aminosäure als N-Hydroxybenzotriazol (HOBt)-Ester aktiviert und mit der freien Aminofunktion der letzten Aminosäure unter Bildung einer Peptidbindung gekoppelt. Um unerwünschte Nebenreaktionen bei der Synthese der wachsenden Peptidkette zu verhindern, bleiben alle Seitengruppen der Aminosäuren mit Schutzgruppen versehen, bis die letzte Aminosäure gekoppelt wurde. Die α -Aminogruppe der im aktuellen Zyklus aufzutragenden Aminosäure ist 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-geschützt. Aminogruppen die nach diesem Syntheseschritt frei liegen, da an ihnen keine neue Aminosäure gebunden wurde, werden mit Essigsäureanhydrid acetyliert („Capping“). So wird verhindert, dass durch Kopplung der anschließend folgenden Aminosäure Peptide mit internen Aminosäuredeletionen entstehen. Vor dem Auftragen der nächsten Aminosäure wird der Fmoc-geschützte Aminoterminus der Peptidkette selektiv mit Piperidin entschützt und ist bereit für die Reaktion mit der HOBt-aktivierten Carboxylfunktion der folgenden Aminosäure. Die Schutzgruppen der Seitenketten werden erst nach Kopplung der letzten Aminosäure und der Acetylierung des N-Terminus („End-Capping“) entfernt.

Das Ergebnis sind definierte Spots auf den Zellulosemembranen mit nanomolaren Mengen von Peptiden, die je nach eingesetztem Anker an die Filter gebunden bleiben oder als lösliche Peptide abgespalten werden können.

3.2.1 Synthese festphasengebundener Peptide

Peptide, die festphasengebunden auf den Zellulosefiltern eingesetzt und untersucht werden sollten, wurden mit β -Alanin als Anker auf den Membranen synthetisiert.

Der gesamte Filter wurde mit einem ersten β -Alanin-Anker derivatisiert. Ein zweiter β -Alanin-Anker wurde vom Pipettierroboter aufgetragen, wodurch gleichzeitig die Spots für die Peptidsynthese definiert wurden. Nach Abschluss der folgenden Synthesesyklen mit End-Capping und Abspalten der Schutzgruppen wurden die Filter getrocknet, in Folie eingeschweißt und in Gegenwart von Trockenmittel (Silicagel) bei -20°C gelagert.

3.2.2 Synthese löslicher Peptide

Peptide, die nach der Synthese vom Zellulosefilter abgespalten und als lösliche Peptide eingesetzt werden sollten, wurden über einen Lysin-Prolin-Anker auf den Filtern synthetisiert.

Der gesamte Filter wurde zunächst mit Prolin als erstem Anker derivatisiert. Der zweite Anker Lysin wurde mit *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-geschützter α -Aminogruppe eingesetzt. Im ersten Zyklus wurde die eingesetzte Aminosäure so an die freie ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes gebunden. Beim Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen unter stark sauren Bedingungen zum Ende der Peptidsynthese wurde auch die Boc-Schutzgruppe des Lysin-Ankers entfernt. Die Erhöhung des pH-Wertes während der Trocknung des Filters führte dann unter Umlagerung des Lysin-Prolin-Ankers zu einem Diketopiperazinderivat und einer Abspaltung des Peptids von der Zellulosemembran.

Nach der Trocknung waren die Peptide in ihren definierten Synthese-Arealen somit nur noch physikalisch an die Filter adsorbiert. Die Spots wurden mit einem 3 mm-Lochseisen ausgestanzt und einzeln in 2 mL-Reaktionsgefäße gegeben. Die Peptide wurden mit jeweils 1 mL TEAA-Puffer von der Zellulosemembran eluiert und im Vakuumkonzentrator gefriergetrocknet. Die Peptide wurden in je 100 μL PBST aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TEAA-Puffer

0,1 M Triethylamin

20% (v/v) Ethanol

mit Essigsäure auf pH 7,0 – 7,5 eingestellt

3.2.3 Peptidsynthese für die Immunisierungsstudie

Die in der Immunisierungsstudie eingesetzten Peptide (siehe Abschnitt 4.3) wurden im μmol -Maßstab im Forschungszentrum Borstel (R. Bartels) automatisch mit einem ABI 433A Peptide Synthesizer (Applied Biosystems, Darmstadt) synthetisiert und über Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) gereinigt.

3.3 Synthese von Peptidkonjugaten

3.3.1 CTB-Peptid-Konjugate

Für die Immunisierungsstudie wurden die aus dem Modellantigen Ovalbumin ausgewählten Peptide (siehe Abschnitt 4.3) an einen Targetingliganden gebunden, um das mukosale Epithel anzusteuern und somit eine selektive Aufnahme der Konjugate an der Schleimhaut des Intestinaltraktes zu ermöglichen (siehe Einleitung). Als Targetingligand diente die nicht toxische pentamere B-Untereinheit des Cholera-toxins aus *Vibrio cholerae* (CTB).

Die Synthese der CTB-Peptid-Konjugate folgte im Wesentlichen dem Protokoll von Bernatowicz und Matseuda (1986). Für die Bindung über einen nicht immunogenen S-Carboxymethyl-Crosslinker (Boeckler *et al.*, 1996) zwischen Lysin-Seitenketten des Proteins und der Thiol-Gruppe eines Cystein-Restes im Peptid wurde an die Aminosäuresequenzen der Peptide am C-terminalen Ende ein zusätzliches L-Cystein eingefügt. Weitere Cystein-Reste kamen in keinem der verwendeten Peptide vor, so dass alle Peptide über ihr C-terminales Ende an CTB gebunden werden konnten.

In Vorversuchen wurden durch Variation die optimalen molaren Verhältnisse ermittelt, die möglichst viel Peptid an das CTB binden ließen, ohne die G_{M1} -Bindefähigkeit des CTB im ELISA (siehe 3.11.1) zu beeinträchtigen. Im Folgenden sind die Bedingungen aufgeführt, die bei der Synthese der in der Immunisierungsstudie eingesetzten Konjugate vorlagen.

Es wurden 3,6 mL (310 nmol) CTB-Lösung (5 mg/mL (86,2 mM) in 3% (w/v) NaHCO₃) in einem 15 mL-Reaktionsgefäß vorgelegt und auf 4°C gekühlt. Im Dunklen wurden 29,4 µL (6,2 µmol) einer 4°C kalten Lösung von Bromessigsäure-N-Hydroxysuccinimidylester (NHS-Ester) (50 mg/mL (211 mM) in DMF) zugegeben. Im Inversionsmischer wurde für 30 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt. Diese Prozedur wurde nach erneutem Abkühlen der Reaktionslösung auf 4°C mit weiteren 29,4 µL (6,2 µmol) des Bromessigsäure-NHS-Esters wiederholt, so dass insgesamt ein 40facher molarer Überschuss der aktivierten Bromessigsäure zu CTB eingesetzt wurde. Überschüssiger Bromessigsäure-NHS-Ester wurde durch Zugabe von 1,24 mL (3,72 mmol) Glycin-Lösung (225 mg/mL (3 M) in SBC-EDTA) bei Raumtemperatur abgefangen. Die Lösung wurde im Dunklen für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Inversionsmischer gemischt. Anschließend wurde die Lösung im Dunklen bei 4°C gegen SBC-EDTA dialysiert (MWCO: 3500 Da; 3 x 1 h).

Von den natürlichen Peptiden wurden jeweils 1638 nmol, von den retro-inversen Peptiden 926,5 nmol in mit Aluminiumfolie umwickelten Reaktionsgefäßen vorgelegt (siehe Tabelle 3-2) und im Vakuumkonzentrator gefriergetrocknet.

Zu den natürlichen Peptiden wurden jeweils 1035 µL (65,52 nmol), zu den retro-inversen Peptiden jeweils 585,6 µL (37,06 nmol) der Lösung von aktiviertem CTB pipettiert, so dass jeweils ein 25facher molarer Überschuss von Peptid zu CTB vorlag. Die Lösungen wurden 4 Stunden bei Raumtemperatur im Inversionsmischer inkubiert.

Tabelle 3-2: Übersicht über die eingesetzten Peptide zur Synthese von CTB-Peptid-Konjugaten.

Peptid	Molmasse (g/mol)	Eingesetzte Menge		Puffer
		mg	µL	
nat Ova ₈₃₋₉₈	2033,3	3,33	333	20% (v/v) DMF in SBC-EDTA
nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	2156,5	3,53	353	10% (v/v) DMF in SBC-EDTA
nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	1921,1	3,15	315	SBC-EDTA
RI Ova ₈₃₋₉₈	2033,3	1,88	188	10% (v/v) DMF in SBC-EDTA
RI Ova ₁₀₃₋₁₁₈	2156,5	2,00	200	10% (v/v) DMF in SBC-EDTA
RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	1921,1	1,78	178	SBC-EDTA

(nat: natürliche Peptidsequenz, RI: retro-inverse Peptidsequenz)

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe eines 10fachen molaren Überschusses von Cystein-HCl (8,8 mg/mL (50 mM) in SBC-EDTA) zu Peptid während 90 Minuten bei Raumtemperatur im Inversionsmixer gestoppt. Die Lösungen wurden bei 4°C gegen D-PBS dialysiert (MWCO: 12-15000 Da; 3 x 2 h / über Nacht).

Die Konjugate wurden zunächst auf Eis gelagert. Mittels BCA-Test (siehe 3.1.1) wurden die Konzentrationen der Produktlösungen bestimmt. Anschließend wurden alle Proben mit 3% (w/v) NaHCO₃ auf 1 mg/mL verdünnt, portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Je 2,5 µL der Konjugatlösungen wurden auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung wurden die Bandenintensitäten über die Software ImageJ densitometrisch ermittelt.

$$\text{mDG} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{a + b + c + d + e} \quad \text{Gleichung 1}$$

Über Gleichung 1 wurde aus den gewichteten Intensitäten der Banden für unkonjugiertes (a), einfach (b), zweifach (c), dreifach (d) und vierfach (e) konjugiertes CTB der mittlere Derivatisierungsgrad (mDG) der Konjugatmischung bestimmt.

3.3.2 BSA-Peptid-Konjugate

Die Synthese von Konjugaten aus bovinem Serumalbumin (BSA) und Peptiden als Fängersystem im ELISA zur Antikörpertiterbestimmung (siehe 3.11.2) erfolgte analog zu der CTB-Konjugatsynthese mit der Funktionalisierung von Lysin-Seitenketten im BSA durch Bromessigsäure-N-Hydroxysuccinimidylester (NHS-Ester) und anschließender Bindung von Cystein-Seitenketten des Peptides an den Crosslinker.

Zunächst wurden 10 mL (3,76 µmol) BSA-Lösung (25 mg/mL in SBC-EDTA) auf 4°C gekühlt und im Dunklen mit 33,4 µL (14,1 µmol) einer 4°C kalten Lösung von Bromessigsäure-NHS-Ester (100 mg/mL (422 mM) in DMF) umgesetzt, während im Inversionsmixer über 30 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Der Schritt wurde nach erneutem Abkühlen auf 4°C mit weiteren 33,4 µL (14,1 µmol) Bromessigsäure-NHS-Ester wiederholt. Insgesamt wurde so ein 7,5facher molarer Überschuss des Esters zu BSA eingesetzt. Bei Raumtemperatur wurden 1,41 mL (2,82 mmol) Glycin-Lösung (150 mg/mL (2 M) in SBC-EDTA) zugegeben,

um überschüssigen Crosslinker abzufangen und die Reaktion zu beenden. Die Lösung wurde im Dunklen für 45 Minuten im Inversionsmischer bewegt. Anschließend wurde die Lösung im Dunklen bei 4°C gegen SBC-EDTA dialysiert (MWCO: 12-15000 Da; 3 x 1 h).

Tabelle 3-3: Übersicht über die eingesetzten Peptide zur Synthese von BSA-Peptid-Konjugaten.

Peptid	Molmasse (g/mol)	Eingesetzte Menge		Puffer
		mg	µL	
nat Ova ₈₃₋₉₈	2033,3	7,52	752	20% (v/v) DMF in SBC-EDTA
nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	2156,5	7,98	798	10% (v/v) DMF in SBC-EDTA
nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	1921,1	7,11	711	SBC-EDTA
RI Ova ₈₃₋₉₈	2033,3	7,52	752	10% (v/v) DMF in SBC-EDTA
RI Ova ₁₀₃₋₁₁₈	2156,5	7,98	798	10% (v/v) DMF in SBC-EDTA
RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	1921,1	7,11	711	SBC-EDTA

(nat: natürliche Peptidsequenz, RI: retro-inverse Peptidsequenz)

Von den Peptiden wurden jeweils 3,7 µmol in mit Aluminiumfolie umwickelten Reaktionsgefäßen vorgelegt (siehe Tabelle 3-3) und im Vakuumkonzentrator gefriergetrocknet.

Zu den Peptiden wurden jeweils 1503 µL (493 nmol) des aktivierten BSA gegeben, so dass ein 7,5facher molarer Überschuss von Peptid zu BSA vorlag. Die Lösungen wurden 4 Stunden bei Raumtemperatur im Inversionsmischer bewegt.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe eines 10fachen molaren Überschusses von Cystein-HCl (8,8 mg/mL (50 mM) in SBC-EDTA) zu Peptid während 90 Minuten bei Raumtemperatur im Inversionsmischer gestoppt. Die Lösungen wurden bei 4°C gegen D-PBS dialysiert (MWCO: 12-15000 Da; 3 x 24 h).

Die Konjugate wurden zunächst auf Eis gelagert. Mittels BCA-Test (siehe 3.1.1) wurden die Konzentrationen der Produktlösungen bestimmt. Anschließend wurden alle Proben mit 3% (w/v) NaHCO₃ auf 1 mg/mL verdünnt, portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4 Allgemeine Angaben zur Behandlung der Versuchstiere

Die in der Immunisierungsstudie verwendeten Tiere wurden als 6 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse des Züchters Charles River (Sulzfeld) geliefert und zu Adaptionszwecken vor Beginn der Versuche mindestens eine weitere Woche in den Tierhaltungsräumlichkeiten des Forschungszentrums Borstel bei Gabe von standardisiertem Futter (R/M-H, ssniff Spezialdiäten, Soest) und Wasser *ad libitum* gehalten. Das Futter enthielt nach Herstellerangaben ausschließlich Proteine pflanzlichen Ursprungs und somit kein Ovalbumin.

Haltung und Umgang mit den Tieren erfolgte stets gemäß den geltenden Tierschutzrichtlinien. Insbesondere auf die Einhaltung der Bestimmungen nach §§ 7, 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz wurde geachtet. Die Ausführungen der Standardlehrbücher (z.B. Buerge und Weiss (2004)) wurden als selbstverständliche Grundlage angesehen.

Die vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein erteilte Genehmigungsnummer für den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuch lautet G200 (Az. 48-4/06).

3.5 Anästhesieren von Mäusen

Vor Durchführung intragastraler Immunisierungen und vor der Tötung durch zervikale Dislokation wurden die Tiere in Vollnarkose versetzt.

In eine verschließbare Glaskammer wurde auf den Boden ein Zellstoffpapier gelegt und mit einer der Gefäßform angepassten löchrigen Metallplatte bedeckt. Das Inhalationsanästhetikum Isofluran wurde auf den Zellstoff gegeben, das Metallgitter verhinderte einen direkten Kontakt der Mäuse mit dem Isofluran. Die mit 0,37 g/L Isofluran befüllte Kammer (Otto, 2004) wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt, um eine gleichmäßige Verteilung des Narkosemittels in der Luft der Kammer zu erzeugen. Wurden die Tiere in das Gefäß gesetzt, war die Narkose nach 6-10 Minuten so tief, dass keine Schmerzempfindung (Zwischenzehenreflextest) mehr festgestellt werden konnte. Alle anschließenden Prozeduren wurden so rasch durchgeführt, wie es eine sorgfältige Arbeitsweise erlaubte. Nach circa 3-5 Minuten erwachten die Tiere wieder aus der Narkose.

3.6 Präparation von Intestinalflüssigkeit

Für die Präparation von muriner Intestinalflüssigkeit wurden 11 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse verwendet, die nach Lieferung durch den Züchter zu Adaptionszwecken vor der Organentnahme eine Woche im Forschungszentrum Borstel gehalten wurden.

Vor der Präparation von Intestinalflüssigkeit wurden die Tiere 2,5 Stunden bei Wasser *ad libitum* gefastet, um bei der Präparation im Dünndarm möglichst wenig Nahrung vorzufinden. Die Mäuse wurden einzeln durch inhalative Verabreichung von Isofluran anästhesiert (siehe Abschnitt 3.5).

Nach Tötung der narkotisierten Tiere durch zervikale Dislokation wurde das Peritoneum geöffnet und der Dünndarm resektiert. Das Duodenum wurde lokalisiert und mit einem Hämostaten distal vom Magenausgang abgeklemmt. Nach Durchtrennung zwischen Magen und Hämostat wurde das dem Darm anhaftende Mesenterium möglichst vollständig entfernt. Nahe dem distalen Ende des Dünndarms wurde dieser mit einem weiteren Hämostaten abgeklemmt und in Richtung des Rektums durchtrennt.

Anschließend wurde entweder die Intestinalflüssigkeit unverdünnt extrahiert (siehe 3.6.1) oder als verdünnte Darmlavage gewonnen (siehe 3.6.2).

3.6.1 Gewinnung unverdünnter Intestinalflüssigkeit

Der herauspräparierte mit Hämostaten verschlossene Dünndarm wurde auf eine eisgekühlte sterile Glasplatte gelegt. Am proximalen Ende wurde der Darm zur Hälfte aufgeschnitten, so dass ein Glasapplikator eingeführt werden konnte. Über dieses vom Durchmesser dem murinen Dünndarm angepasste Glasrohr wurde nun der Darm gezogen, wobei der gesamte Darminhalt in das Innere des Applikators gelangte. Beim Erreichen des distalen Darmendes wurde der Hämostat auf dieser Seite entfernt und der restliche Darminhalt in den Applikator gebracht. Anschließend wurde der Inhalt des Darms mit Hilfe von Nylon-Tampons (Filterwicks), die von oben durch das Glasrohr geschoben wurden, in ein 0,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gehalten. Das Reaktionsgefäß wurde mit sterilen Einwegnadeln am unteren Ende perforiert. Durch Zentrifugation mit 13200 x g bei 4°C wurde der flüssige Anteil des gewonnenen Darminhaltes in ein größeres Reaktionsgefäß transferiert. Die Intestinalflüssigkeiten aller Tiere einer Präparation wurden vereinigt, portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.6.2 Gewinnung der Intestinalflüssigkeit durch Spülung

Bei einer Darmlavage wird der Inhalt des Dünndarms mit einem definierten Volumen an SIF-Puffer heraus gespült und liegt somit in einer standardisierten Verdünnung vor.

Der herauspräparierte mit Hämostaten verschlossene Dünndarm wurde in einer Einwegpetrischale in eisgekühltem SIF-Puffer von serösem Blut an der abluminalen Seite befreit. Anhaftende Flüssigkeitstropfen wurden an der Wand der Petrischale abgestreift. Anschließend wurde der Dünndarm von proximal nach distal gespült. Eine mit einer 20G-Knopfkanüle versehene 10 mL Einwegspritze, gefüllt mit 2,5 mL eiskaltem SIF-Puffer und 7,5 mL Luft, wurde am proximalen Ende vorsichtig in den Dünndarm eingeführt und manuell abgedichtet. Der Hämostat am distalen Ende wurde gelöst und das Ende des Darms in ein gekühltes, vorgewogenes 15 mL-Röhrchen gehängt, ohne dass es zu Verlust an Darminhalt kam. Die Pufferlösung wurde langsam unter vorsichtiger Massage des Darms injiziert und durch den Darm in das Auffanggefäß gespült. Die Spülung wurde ein zweites Mal mit weiteren 2,5 mL eiskaltem SIF-Puffer wiederholt und Flüssigkeitsreste mit 7,5 mL Luft ausgetrieben.

Die Proben wurden zunächst auf Eis gelagert, bevor sie bei 4°C 5 Minuten mit $4000 \times g$ zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues vorgewogenes konisches 15 mL-Röhrchen überführt, um das gewonnene Volumen durch Wägung bestimmen zu können. Die Darmlavage wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.7 Aktivitätsbestimmung von intestinalen Verdauungsenzymen

3.7.1 Spezifische Enzymaktivitätsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der aktiven Enzyme in Lösung erfolgte durch die Hydrolyse von chromogenen para-Nitroanilid-Substraten unter Substratsättigungsbedingungen. Trypsin wurde mit N- α -benzoyl-Arg-para-Nitroanilid (L-BAPA) nachgewiesen, Chymotrypsin mit Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-para-Nitroanilid (Suc-AAPF-pNA) und Pankreas-Elastase mit Succinyl-Ala-Ala-Pro-Ala-para-Nitroanilid (Suc-AAPA-pNA). Diese Substrate werden spezifisch und mit vernachlässigbarer Kreuzreaktivität durch die jeweiligen Enzyme hydrolysiert (Laine *et al.*, 1993). Alle Substrat- und Enzymstammlösungen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Alle Reaktionen wurden in nicht-bindenden 96-Loch-Mikroplatten mit Flachboden durchgeführt. Zur Messung der Trypsinaktivität wurden in die Startkavität 4 μL der L-BAPA-Stammlösung mit soviel SIFTCaCl₂ gegeben, dass nach Hinzufügen der Enzymlösung jeweils ein Gesamtvolumen von 150 μL entstand. In weiteren Kavitäten wurden jeweils 2 μL der L-BAPA-Stammlösung mit 73 μL SIFTCaCl₂ vorgelegt. Nach Hinzufügen der Enzymlösung in die Startkavität wurde die Reaktionslösung gemischt und mit 75 μL über die weiteren Kavitäten seriell 1:2 verdünnt. Zur Messung der Aktivitäten von Chymotrypsin und Elastase wurden analoge Ansätze gemacht. Für Chymotrypsin wurden in die Startkavität 20 μL Suc-AAPF-pNA-Stammlösung bzw. für Elastase 20 μL Suc-AAPA-pNA auf 150 μL Gesamtvolumen gegeben, und in die weiteren Kavitäten 10 μL der jeweiligen Substratstammlösungen mit 65 μL SIFTCaCl₂.

Enzymstammlösungen

10 mg/mL Trypsin

1 mM HCl
20 mM CaCl₂
0,02% (w/v) Thimerosal

10 mg/mL Chymotrypsin

10 mM NaOAc (pH 4,0)
0,02% (w/v) Thimerosal

10 mg/mL Elastase

30 mM NaOAc, (pH 5,2)
0,02% (w/v) Thimerosal

Substrat-Stammlösungen

50 mM L-BAPA

in 50% (v/v) Aceton

10 mM Suc-AAPF-pNA

in Aceton

10 mM Suc-AAPA-pNA

in Aceton

Die Mikroplatten wurden in einem vorgewärmten Mikroplatten-Lesegerät bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde alle 2 Minuten die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen, bis die aufgezeichnete Umsatzkurve (mOD/min) ein Plateau erreichte. Aus der Steigung im steilsten Bereich der Messkurve wurde die Enzymaktivität bestimmt. Unter der hier herrschenden Substratsättigung ist die Steigung dabei proportional zur Enzymmenge. Die Werte aus der seriellen Enzymverdünnung wurden mit den entsprechenden Verdünnungs-

faktoren multipliziert und gemittelt. Als Standards dienten serielle Verdünnungen von reinen Enzymlösungen bekannter Konzentration.

3.7.2 Unspezifische Enzymaktivitätsbestimmung

Die unspezifische Aktivität von Proteasen in Intestinalflüssigkeiten oder Enzymlösungen wurde in einem Assay mit succinyliertem Casein als Substrat gemessen (Hatakeyama *et al.*, 1992). In diesem modifizierten Casein sind die Aminofunktionen der Aminosäureseitenketten mit Bernsteinsäureanhydrid geschützt. Durch proteolytischen Umsatz des Caseins entstehen neue freie Aminogruppen an den gespaltenen Peptidbindungen, die über eine Farbreaktion mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) quantifiziert werden können (Habeeb, 1966; Bubnis und Ofner, 1992). Da ein unspezifischer Assay nicht für einzelne Proteasen in einer Enzymmischung standardisiert ist, wurde als Standard natürliche murine Intestinalflüssigkeit in Verdünnungsreihen aufgetragen, zu der alle anderen Aktivitäten in Relation gesetzt wurden.

Auf einer nicht-bindenden 96-Loch-Mikroplatte mit Flachboden wurden für jede zu vermessende Probe in einer Kavität 95 μL 50 mM Boratpuffer (pH 8,5) sowie in einer weiteren Kavität ein gleiches Volumen succinyliertes Casein (2 mg/mL in Boratpuffer) vorgelegt. Von den proteasehaltigen Proben wurden mehrere unterschiedliche Verdünnungen angefertigt, davon je 5 μL zu den pufferhaltigen und den substrathaltigen Kavitäten pipettiert und diese Ansätze für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch hydrolytische Spaltung frei gewordenen Aminogruppen wurden während weiterer 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 μL TNBS-Reaktionslösung umgesetzt. Die Absorption der entstandenen Trinitrophenylgruppen bei 450 nm wurde im Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Die Färbung der Pufferkontrolle, entstanden durch freie Aminogruppen der in der Probe enthaltenen Proteine und durch Proteolyse dieser Probenproteine, wurde für jeden einzelnen Ansatz als Hintergrund gewertet.

TNBS-Reaktionslösung

5% (w/v) TNBS in Methanol

1:150 in 50 mM Boratpuffer (pH8,5) verdünnt

3.8 Bestimmung der Stabilität von Peptiden gegenüber intestinalen Proteasen

3.8.1 Halbwertszeiten von Peptiden in muriner Intestinalflüssigkeit

Als Kenngröße für die Stabilität von Peptiden in proteasehaltigen Lösungen dienen ihre Halbwertszeiten. Zur Bestimmung der Peptidhalbwertszeiten wurde ein in unserer Laborgruppe entwickeltes Testverfahren genutzt (Gorris, 2005; Gorris *et al.*, 2007b). Dabei werden den zu vermessenden Peptiden an beiden Enden spezielle Markierungen angehängt, um später in einem Fänger-ELISA nicht hydrolysierte Peptide photometrisch nachweisen zu können. Über Abstandhalter („Spacer“) wird am Aminoterminus eine 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)-Markierung angehängt, am Carboxyterminus eine Biotin-Markierung.

Auf einer nicht-bindenden 96-Loch-Mikroplatte wurden die so derivatisierten Peptide in Lösung vorgelegt und mit seriellen 1:3 Verdünnungen von muriner Darmlavage bekannter Vorverdünnung für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Proteaseinhibitoren und Erhitzen auf 90°C für 20 Minuten wurde die Hydrolyse terminiert. Über eine mit anti-2,4-D Antikörper beschichtete Mikroplatte wurden alle entstandenen aminoterminalen Peptidfragmente neben den nicht hydrolysierten Peptiden eingefangen. Nur ungespaltene Peptide trugen zusätzlich noch die Biotin-Markierung am C-Terminus und konnten über HRP-markiertes Streptavidin und TMB-Substrat nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.11).

Zur Auswertung wurde eine aus der Michaelis-Menten-Kinetik abgeleitete nicht-lineare Regression der Messdaten über eine 4-Parameter-Gleichung (Gleichung 2) durchgeführt (Rodbard und Hutt, 1974).

$$y = (a - b) \times 0,5^{\left(\frac{xt}{t_{1/2}}\right)} + b \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Gleichung erlaubt die Bestimmung von Halbwertszeiten ($t_{1/2}$ in s) aus dem Kurvenverlauf der OD-Werte (y) in Abhängigkeit der Verdünnung der Intestinalflüssigkeit (x) zwischen den Extremwerten für ungespaltenes Peptid (a) und vollständig gespaltenes Peptid (b) nach Inkubation für die Zeit t (hier 5400 s, bzw. 90 Minuten).

3.8.2 Halbwertszeiten von Proteinen in muriner Intestinalflüssigkeit

Je nach Größenordnung der Halbwertszeit wurden zwei Ansätze verfolgt. Bei relativ instabilen Proteinen mit kurzen Halbwertszeiten, die unterhalb der technisch durchführbaren Zeit zur Probennahme lagen, musste ein Ansatz analog zum Peptidverdau-Assay gewählt werden. Hier wurden also serielle Verdünnungen von Darmlavage als proteolytische Komponente verwendet. Bei stabileren Proteinen konnte die Degradation verfolgt werden, indem sie für variable Zeitintervalle in unverdünnter Intestinalflüssigkeit inkubiert wurden.

Variation der Verdünnung

In einzelnen Reaktionsgefäßen wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 2,5 mg/mL in SIFCaCl₂ vorgelegt und mit seriellen 1:5 Verdünnungen von muriner Darmlavage mit bekannter Vorverdünnung für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Drittel des Ansatzvolumens an SDS-PAGE Probenpuffer (4x) zugegeben und für 10 Minuten auf 60°C erhitzt.

Zur Auswertung wurden neben einem Molmassenstandard (Precision Plus, Bio-Rad, München) gleiche Volumina der einzelnen Proben per SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung wurden die Intensitäten der Banden über die 4-Parameter-Gleichung (Gleichung 2) ausgewertet.

Variation des Zeitpunktes der Probennahme

Zur Messung der Verdauungsstabilität von CTB, LTB und UEA I wurden jeweils 200 µg/mL dieser Proteine in unverdünnter Intestinalflüssigkeit bei 37°C inkubiert. Direkt nach dem Mischen der Komponenten und in bestimmten Zeitintervallen wurden aus den Ansätzen Proben entnommen und zum Abstoppen der Proteolyse mit eiskaltem SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Analog wurden Versuchsansätze mit simulierter Intestinalflüssigkeit mit oder ohne Zugabe von BSA oder Ova als Proteinzusatz durchgeführt. Die Inkubationen wurden nach Ablauf von 3 Stunden beendet.

Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung konnten die Intensitäten der Banden der nach unterschiedlichen Inkubationszeiten genommenen Proben zu nicht hydrolysiertem Protein in Relation gesetzt werden.

3.9 Immunisierungen

3.9.1 Immunisierungsplan

Gruppeneinteilung

Die verwendeten Mäuse wurden für den Tierversuch willkürlich zu Gruppen von 7 Tieren eingeteilt, die jeweils gemeinsam in einem Käfig gehalten wurden (siehe Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Übersicht über die Immunisierungsgruppen.

Gruppe	Route	Peptid	Gruppe	Route	Peptid
1	i.g.	nat Ova ₈₃₋₉₈	7	i.p.	nat Ova ₈₃₋₉₈
2	i.g.	RI Ova ₈₃₋₉₈	8	i.p.	RI Ova ₈₃₋₉₈
3	i.g.	nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	9	i.p.	nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈
4	i.g.	RI Ova ₁₀₃₋₁₁₈	10	i.p.	RI Ova ₁₀₃₋₁₁₈
5	i.g.	nat Ova ₃₄₉₋₂₆₄	11	i.p.	nat Ova ₃₄₉₋₂₆₄
6	i.g.	RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	12	i.p.	RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄
13	i.g.	nat Ova ₈₃₋₉₈ + MSA	18	i.p.	Puffer
14	i.g.	nat Ova ₈₃₋₉₈ + MSA	19	i.p.	CTB
15	i.g.	nat Ova ₈₃₋₉₈ + MSA			
16	i.g.	Puffer			
17	i.g.	CTB			

Jeweils 7 Tiere in einer Gruppe wurden entweder intragastral (i.g.) oder intraperitoneal (i.p.) mit CTB-Peptidkonjugaten immunisiert. Die drei Ovalbumin (Ova)-Peptide wurden in natürlicher (nat) oder retro-inverser (RI) Form eingesetzt (vergleiche Abschnitt 4.3). Einige Gruppen erhielten zusätzlich murines Serumalbumin (MSA). Als Kontrollen erhielten einige Gruppen nur Puffer oder nur CTB.

Vor Beginn der Immunisierungen wurden Blut- und Fäzesproben gesammelt, um den Prä-immunstatus der Tiere feststellen zu können. Im Verlauf der Immunisierungsstudie wurden die Tiere regelmäßig gewogen, um adverse Effekte der Behandlung frühzeitig erkennen zu können. Desweiteren wurden regelmäßig weitere Blut- und Fäzesproben genommen, um den Verlauf der Immunantwort verfolgen zu können. Am Ende des Versuchs wurden zusätzlich die Intestinalflüssigkeiten der Tiere isoliert. Die Immunisierungslösungen wurden entweder direkt in den Magen (intragastral, i.g.) zur mukosalen Immunisierung oder in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) zur systemischen Immunisierung appliziert. Als Kontrollen dienten Gruppen von Mäusen, die auf einer der Routen unkonjugiertes CTB und Adjuvanslösung bekamen und Gruppen, die nur Puffer bekamen.

Allgemeiner Zeitplan

Die Tiere einer Gruppe wurden stets an gleichen Tagen behandelt. Der zeitliche Ablauf (siehe Tabelle 3-5) war für alle Gruppen von Mäusen unabhängig von Immunisierungsrouten oder Art der verabreichten Immunisierungslösung.

Tabelle 3-5: Immunisierungsplan.

Tag	-1	0	10	20	27	34	41	48	54/55
Immunisierung		Priming		1. Boost		2. Boost		3. Boost	
Probennahme	B/F		B/F		B/F		B/F		B/F/I

Zeitliche Abfolge der Immunisierungen und Probennahmen (B: Blut, F: Fäzes, I: Intestinalflüssigkeit).

3.9.2 Immunisierungslösungen

Um eine gleichbleibende Antigen- und Adjuvansqualität über den Verlauf der gesamten Studie zu gewährleisten, wurden alle Komponenten, die für die Immunisierungen benötigt wurden, vor der Studie angesetzt, entsprechend portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Lagerung von adjuvans- und antigenfreien Lösungen erfolgte bei -20°C . Die zu applizierenden Mischungen wurden kurz vor der Immunisierung einer Gruppe von 7 Mäusen in einer für 8 Tiere ausreichenden Menge aus den Stammlösungen hergestellt, zunächst auf Eis gelagert und unmittelbar vor der Applikation für jedes einzelne Tier auf 37°C erwärmt.

Intragastrale Immunisierungslösungen

Bei intragastralen Immunisierungen wurden je Tier 300 µL Immunisierungslösung verabreicht. Die Immunisierungslösungen enthielten je Tier 5 µg Choleratoxin (CTx) als mukosales Adjuvans und 35 µg CTB-Peptid-Konjugat sowie für bestimmte Immunisierungsgruppen 7,5 mg murines Serumalbumin (MSA) in 3% (w/v) NaHCO₃. Eine Kontrollgruppe erhielt unkonjugiertes CTB anstelle des Konjugates und Adjuvans, eine andere nur Pufferlösung.

Stammlösungen

Adjuvans:	1 mg/mL Choleratoxin (CTx) in D-PBS
Konjugat:	1 mg/mL in 3% (w/v) NaHCO ₃ (Synthese siehe 3.3.1)
MSA:	30,6 mg/mL in 3% (w/v) NaHCO ₃ (siehe 3.1.3)
CTB:	1 mg/mL in 3% (w/v) NaHCO ₃

Intraperitoneale Immunisierungslösungen

Bei intraperitonealen Immunisierungen wurden je Tier 200 µL Immunisierungslösung appliziert. Die Lösungen enthielten je Tier 50 µg N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (Muramyldipeptid, MDP) als Adjuvans und 10 µg CTB-Peptid-Konjugat in 200 µL D-PBS. Eine Kontrollgruppe erhielt unkonjugiertes CTB anstelle des Konjugates und Adjuvans, eine andere nur Pufferlösung.

Stammlösungen:

Adjuvans:	1 mg/mL Muramyldipeptid (MDP) in D-PBS
Konjugat:	1 mg/mL in 3% (w/v) NaHCO ₃ (Synthese siehe 3.3.1)
CTB:	1 mg/mL in 3% (w/v) NaHCO ₃

3.9.3 Intra-gastrale Immunisierung

Die Mäuse wurden eine Stunde vor und zwei Stunden nach einer intra-gastralen Immunisierung bei Wasser *ad libitum* gefastet. Unmittelbar vor der Immunisierung wurden die Tiere inhalativ anästhesiert (siehe Abschnitt 3.5).

Die intra-gastrale Applikation erfolgte über eine in den Magen geführte Knopfkanüle (Shimizu, 2004). Nach der Immunisierung wurde die Spitze der Knopfkanüle visuell auf Blutspuren untersucht, um sicher zu gehen, dass keine Verletzung des Ösophagus aufgetreten war. Im Anschluss an die Immunisierung wurden die Tiere in der Hand gehalten, bis sie erste Anzeichen des Erwachens zeigten und in ihren Käfig zurückgesetzt werden konnten.

3.9.4 Intraperitoneale Immunisierung

Eine 26G-Injektionskanüle wurde an einer Bauchseite zwischen der letzten und vorletzten Zitze angesetzt und 5-10 mm tief in Richtung gegenüberliegender Schulter in die Mitte der Bauchhöhle geführt (Shimizu, 2004). Dabei wurde darauf geachtet, bei aufeinanderfolgenden Gaben bei jedem Tier wechselnd auf der linken oder rechten Bauchhälfte zu applizieren. Die zuvor angewärmte Antigenlösung wurde in die Bauchhöhle appliziert. Durch anschließendes leichtes Massieren wurde die Verteilung der Antigenlösung in der Bauchhöhle gewährleistet.

3.10 Probengewinnung

3.10.1 Serum aus Blutproben

Zur wiederholten Abnahme geringer Blutmengen wird für Mäuse eine Punktion der lateralen Schwanzvenen empfohlen, wobei nicht mehr als 96 $\mu\text{L}/\text{kg}$ Körpergewicht auf einmal abgenommen werden sollten (Diehl *et al.*, 2001). Die Mäuse wurden für ungefähr 10 Minuten in einem Käfig ohne Streu unter eine Rotlicht-Wärmelampe gesetzt, um die Durchblutung in den Extremitäten zu fördern. Anschließend wurde unter Fixierung eine gut sichtbare lateral gelegene Vene im unteren Drittel der Schwanzlänge mit einer 20G-Kanüle punktiert. Der austretende Blutstropfen wurde über eine 60 μL -Hämatokrit-Kapillare aufgenommen. Es wurden bei dieser Methode maximal 180 μL Blut gewonnen. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Blut aus den Kapillaren in beschriftete 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt.

Zur Gewinnung des Serums wurden die frischen Blutproben über Nacht bei Raumtemperatur belassen und am darauf folgenden Morgen eine Stunde bei 4°C gekühlt. Dadurch entstand ein geronnener Blutklumpen, der sich beim Abkühlen auf 4°C weiter kontrahierte. Die Proben wurden 15 Minuten bei 4°C mit 16000 x g zentrifugiert. Das Serum bildete den Überstand und wurde in ein vorgewogenes 0,5 mL-Reaktionsgefäß transferiert. Per Auswaage der Gefäße wurde das Volumen bestimmt und protokolliert. Die Proben wurden unmittelbar nach der Aufbereitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.10.2 Fäzes

Um den Verlauf der mukosalen Immunantwort verfolgen zu können, wurden Fäzesproben zur Bestimmung von sekretorischem IgA (sIgA) gesammelt. Die Sammlung erfolgte vor der Blutentnahme. Die Tiere einer Gruppe wurden in unterteilten Käfigen voneinander separiert, so dass nach ungefähr 15 Minuten individuell zuzuordnende Fäzesproben gesammelt werden konnten. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme für jedes Tier einzeln in vorgewogenen 2 mL-Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert, nach Beendigung der Probennahmen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Das hier angewandte Verfahren zur Homogenisierung der Fäzesproben und zur Extraktion von S-IgA wurde von Koertge und Butler (1986) entwickelt und von Haneberg *et al.* (1994) modifiziert. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Fäzesproben zunächst im Vakuumkonzentrator gefriergetrocknet. Anschließend wurde durch Auswaage der Gefäße das Trockengewicht der Fäzesproben bestimmt. Über Nacht wurden die Proben bei 4°C gelagert. Am nächsten Morgen wurde zu jeder Probe das 15-fache ihres Trockengewichtes (15 mL/g) an eiskalter Proteaseinhibitor-Lösung gegeben. Nach kurzem Mischen mit einem Vortex-Gerät wurden die Proben 30 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die aufgeschwämmten Fäzesproben so lange mit einem Titanstab zerstoßen, bis eine homogene Suspension entstand. Das Homogenat wurde auf einem Inversionsmixer mit 1-2 rpm bei 4°C für 20 Minuten geschwenkt. Anschließend wurde mit 10000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein konisches 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gelagert.

Mit dem feuchten Sediment aus dem ersten Schritt wurde die Extraktion wie oben beschrieben mit dem zehnfachen Volumen des ursprünglichen Trockengewichtes an eiskalter Proteaseinhibitor-Lösung wiederholt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden beide Überstände, die derselben Fäzesprobe entstammten, vereinigt. Abschließend wurden die

Überstände 5 Minuten mit 3000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der finale Überstand wurde auf 1,5 mL-Reaktionsgefäße verteilt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Proteaseinhibitor-Lösung

154 nM	Aprotinin
10 µM	Leupeptin
200 µM	AEBSF
6 µM	Bestatin
in D-PBS (pH 7,4)	

3.10.3 Terminale Probennahme

Am Ende der Immunisierungsstudie wurde den Mäusen in der finalen Probennahme neben Blut und Fäzes auch Intestinalflüssigkeit entnommen.

Die Fäzesproben wurden am Tag vor der Blut- und Sekretentnahme gesammelt und wie oben beschrieben aufgearbeitet (siehe 3.10.2).

Vor dem terminalen Experiment wurden die Tiere 2,5 Stunden bei Wasser *ad lib.* gefastet, um bei der Präparation des Dünndarms möglichst wenig Nahrung vorzufinden. Die Mäuse wurden einzeln durch inhalative Verabreichung von Isofluran anästhesiert (siehe Abschnitt 3.5). Der Narkosezustand wurde überprüft und das unter Narkose befindliche Tier wurde gewogen.

Die terminale Blutentnahme wurde über den retrobulbären Gefäßplexus durchgeführt (Fukuta, 2004). So ließen sich größere Mengen Blut gewinnen, als über die Schwanzvene. Die Proben wurden wie oben beschrieben aufbereitet und gelagert (siehe 3.10.1).

Nach Tötung der narkotisierten Tiere durch zervikale Dislokation wurde Intestinalflüssigkeit wie beschrieben isoliert (siehe 3.6.2). In Variation zu dem beschriebenen Protokoll wurde zur äußeren Befeuchtung und zur Spülung des Dünndarms eisgekühlte Proteaseinhibitor-Lösung (siehe 3.10.2) benutzt.

3.11 Immunoassays

Alle hier verwendeten Zweit-Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert. Als Nachweissystem diente ein auf 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) basierendes Reagenz (Frey *et al.*, 2000). Die beiden hierfür benötigten Substratlösungen wurden bei 4°C gelagert und erst kurz vor dem Einsatz auf Raumtemperatur gebracht und gemischt. TMB-haltige Lösungen wurden dabei stets im Dunklen gehalten.

TMB-Substrat Lösung A

3,075 mM H_2O_2
in 205 mM Citratpuffer (pH 4,0)

TMB-Substrat Lösung B

41 mM TMB
8,2 mM TBABH
in Dimethylacetamid

3.11.1 G_{M1} -Bindungs-ELISA mit CTB-Konjugaten

Eine stark bindende 96-Loch-Mikroplatte wurde mit 75 μL einer Lösung von 7 ng/mL Gangliosid G_{M1} in D-PBS je Kavität befüllt. Die Platte wurde für 15-16 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit D-PBS gewaschen.

Unspezifische Bindestellen wurden mit 250 μL PBS/AB je Kavität über 2 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde viermal mit D-PBS gewaschen.

Von den in PBS/AB auf 200 ng/mL verdünnten CTB-Peptid-Konjugaten wurden in der ersten Spalte 90 μL vorgelegt. Zusätzlich wurde in einer Zeile nur PBS/AB zur Bestimmung des Hintergrundsignals aufgetragen. In den Spalten 2 bis 12 wurden je Kavität 60 μL PBS/AB vorgelegt. Mit 30 μL aus den Kavitäten der ersten Spalte wurde eine 1:3-Verdünnungsreihe über die Spalten 1 bis 12 durchgeführt. Die Platte wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend viermal mit PBST gewaschen.

Zum Nachweis von gebundenem CTB wurden in jede Kavität 75 μL Kaninchen anti-CTB IgG (1:10.000 in PBS/AB verdünnt) gegeben. Nach Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde viermal mit PBST gewaschen.

Als Zweit-Antikörper wurden jeweils 75 μL HRP-markierter Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:4000 in PBS/AB verdünnt) aufgetragen und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde sechsmal mit PBST gewaschen.

Währenddessen wurden die TMB-Substrate A und B für den Nachweis auf Raumtemperatur erwärmt und 6 Minuten vor dem Auftragen gemischt. Die Substratlösung wurde durch Invertieren gemischt und im Dunklen gehalten. Je Kavität wurden 75 µL der Substratlösung aufgetragen. Die Platten wurden im Dunklen bei Raumtemperatur entwickelt. Nach genau 30 Minuten wurde die Nachweisreaktion durch Zugabe von 125 µL H₂SO₄ je Kavität gestoppt. Unmittelbar danach wurden die Platten im Mikroplatten-Lesegerät bei Wellenlängen von 450 und 405 nm ausgelesen.

PBS/AB

1% (v/v) AquaBlockPP-82

in D-PBS

3.11.2 Endpunkt-ELISA zur Bestimmung von Antikörpertitern

Die Antikörperkonzentrationen in den während der Immunisierungsstudie gewonnenen Körperflüssigkeiten wurden als Endpunkttiter im Fänger-ELISA bestimmt.

Stark bindende 96-Loch-Mikroplatten wurden je nach gewünschter Titerbestimmung mit 75 µL einer Beschichtungs-Lösung (siehe Tabelle 3-6) je Kavität befüllt und für 15 bis 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit D-PBS gewaschen.

Tabelle 3-6: Beschichtungs-Lösungen.

ELISA Beschichtungs-Lösungen		
anti-Peptid-ELISA	BSA-Peptid-Konjugat	10 µg/mL in L-PBS
anti-Ova-ELISA	Ovalbumin	10 µg/mL in L-PBS
anti-CTx-ELISA	Choleratoxin	5 µg/mL in L-PBS

zu immobilisierende Komponenten für den Einsatz im Fänger-ELISA

Unspezifische Bindestellen wurden mit 200 µL Blockingpuffer (BlottoPBS) je Kavität über 6 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde viermal mit D-PBS gewaschen.

Verwendung von Serumproben

In die Kavitäten der ersten Spalte wurden je 75 µL BlottoPBS ohne Probenzugabe zur Bestimmung des Plattenhintergrundes gegeben. In den Kavitäten der zweiten Spalte wurden 2 µL der Serumproben mit BlottoPBS zu je 150 µL gemischt. Je nach Höhe der Titer mussten die Proben zusätzlich vorverdünnt werden. Die sieben parallel genommenen Proben einer Immunisierungsgruppe wurden stets zusammen auf einer Platte aufgetragen. In den restlichen Kavitäten wurden je 75 µL BlottoPBS vorgelegt. Mit 75 µL aus den Kavitäten der zweiten Spalte wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe bis zur Spalte 12 durchgeführt.

Verwendung von Fäzes- oder Intestinalflüssigkeitsproben

Zur Auftragung von Fäzesproben oder Intestinalflüssigkeitsproben wurden dem Blockingpuffer kurz vor der Verwendung Proteaseinhibitoren zugesetzt, um enzymatische Nebenreaktionen zu unterbinden, die den ELISA stören könnten.

In die Kavitäten der ersten Spalte wurden je 75 µL BlottoPBS-PI ohne Probenzugabe zur Bestimmung des Plattenhintergrundes gegeben. In den Kavitäten der zweiten Spalte wurden 64 µL der zu bestimmenden Proben mit BlottoPBS-PI zu je 150 µL gemischt. Je nach Höhe der Titer mussten die Proben zusätzlich vorverdünnt werden. Die sieben parallel genommenen Proben einer Immunisierungsgruppe wurden stets zusammen auf einer Platte aufgetragen. In den restlichen Kavitäten wurden je 75 µL BlottoPBS vorgelegt. Mit 75 µL aus den Kavitäten der zweiten Spalte wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe bis zur Spalte 12 durchgeführt.

Nach dem Probenauftrag wurden die Platten für 15 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend viermal mit PBST gewaschen.

Als Zweit-Antikörper wurden je nach gewünschtem Nachweis HRP-markierte Ziege anti-Maus IgG oder Ziege anti-Maus IgA Antikörper in einer Vorverdünnung von 1:2000 in BlottoPBS eingesetzt. Die Platten wurden mit 75 µL Zweit-Antikörper je Kavität für genau 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und sechsmal mit PBST gewaschen.

Die TMB-Farbreaktion erfolgte wie unter 3.11.1 beschrieben. Unmittelbar danach wurden die Platten im Mikroplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen.

Bestimmung des Endpunkttiters

Für jede Platte wurde aus den OD-Werten von sieben Hintergrundkavitäten ein Schwellenwert bestimmt, der mit 99,9%iger Zuverlässigkeit oberhalb des Plattenhintergrunds lag und somit kein Hintergrundsignal darstellte (Frey *et al.*, 1998). Zur Bestimmung des Endpunkttiters einer Probe war die stärkste Verdünnung maßgeblich, die ein Signal über diesem Schwellenwert lieferte. Dabei ist der Titer der reziproke Wert dieser Verdünnung.

Die Endpunkttiter der Tiere, die während der Immunisierungsstudie nur Adjuvans verabreicht bekamen (siehe Tabelle 3-4), wurden als Immunisierungshintergrund gewertet. Dazu wurden die individuellen Endpunkttiter (zum Beispiel anti-Peptid oder anti-Ova) der immunisierten Tiere bestimmt und anschließend die mittleren Titer der in Zeitpunkt, Immunisierungsrouten und Art der Körperflüssigkeitsprobe übereinstimmenden Proben der Adjuvansgruppe subtrahiert. Aus den für jedes Tier individuellen Einzeltitern (aufgeführt im Anhang) wurden die Mittelwerte und Standardfehler einer Gruppe berechnet.

<u>BlottoPBS</u>		<u>BlottoPBS-PI</u>	
5% (w/v)	Magermilchpulver	154 nM	Aprotinin
in D-PBS		10 µM	Leupeptin
		200 µM	AEBSF
		6 µM	Bestatin
		in BlottoPBS	

3.11.3 Peptomer-ELISA

Die Bewertung der Immunogenität des in der Synthese eingesetzten Crosslinkers, der als S-Carboxymethyl-Brücke in den Immunisierungskonjugaten CTB und Peptide verbindet, erfolgte im ELISA-Format. Als Referenz dienten dabei zu sogenannten Peptomeren polymerisierte in Bezug auf die Immunisierungsstudie irrelevante Peptide der Sequenz KIKQIINMWQEVGKAMYAC. In den Peptomeren verbindet ein identischer S-Carboxymethyl-Crosslinker die Peptide linear zwischen einem aminoterminalen Lysin und einem carboxyterminalen Cystein.

Stark bindende 96-Loch-Mikroplatten wurden mit 100 µL einer Lösung von 5 µg/mL Peptomer in 10% (v/v) Essigsäure je Kavität befüllt und für 15 bis 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit D-PBS gewaschen.

Unspezifische Bindestellen wurden mit 250 μ L Blockinglösung (BlottoPBS) je Kavität über 6 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde viermal mit D-PBS gewaschen.

In die Kavitäten der ersten Spalte wurden je 75 μ L BlottoPBS ohne Probenzugabe zur Bestimmung des Plattenhintergrundes gegeben. In den Kavitäten der zweiten Spalte wurden 2 μ L von gepoolten Gruppenserum aus der Immunisierungsstudie mit BlottoPBS zu je 150 μ L gemischt. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich in einer Kavität 2 μ L einer Serummischung von mit dem entsprechenden Peptomer immunisierten Balb/c-Mäusen einer früheren Studie mit BlottoPBS zu 150 μ L gemischt. In den restlichen Kavitäten wurden je 75 μ L BlottoPBS vorgelegt. Mit 75 μ L aus den Kavitäten der zweiten Spalte wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe bis zur Spalte 12 durchgeführt. Nach dem Probenauftrag wurden die Platten für 15 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend viermal mit PBST gewaschen.

Die Inkubation mit Zweitantikörper und die TMB-Farbreaktion erfolgte wie unter 3.11.2 beschrieben.

Unmittelbar danach wurden die Platten im Mikroplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen.

3.11.4 Aminosäurenaustausch-Assay („Alanin-Scan“)

Um zu evaluieren, welchen Einfluss die einzelnen Aminosäuren der zur Immunisierung verwendeten 16mer Peptide auf die Bindung der Antikörper aus den polyclonalen Immunisierungsseren haben, wurde ein sogenannter Alanin-Scan durchgeführt. Dazu wurden die Peptide festphasengekoppelt synthetisiert (siehe 3.2.1), wobei jeweils an einer Position die Aminosäure der Originalsequenz durch ein Alanin ersetzt wurde. Alanin-Positionen der Originalsequenz wurden durch Glycin ersetzt. Zeigt ein solcherart modifiziertes Peptid im folgenden Assay eine schwächere oder ganz fehlende Bindung von Antikörpern im Vergleich zum Originalpeptid, so kann davon ausgegangen werden, dass die ausgetauschte Aminosäure an dieser Position einen entscheidenden Beitrag zur Antikörperbindung leistet.

Nachdem die bei -20°C gelagerten Filter in 15 Minuten auf Raumtemperatur angewärmt worden waren, wurden sie einzeln in Inkubationsschalen (3,5 x 5 cm Grundfläche) für 10 Minuten in je 5 mL Ethanol auf dem Wippschüttler inkubiert und anschließend 3 x 10 Minuten in je 5 mL D-PBS gewaschen.

Vor der ersten Benutzung wurden je drei Filter zusammen in einer Edelstahlschale 2 x 5 Minuten in je 100 mL DMF im Ultraschallbad beschallt. Nach einem Waschschrift für

5 Minuten in 100 mL H₂O je Edelstahlschale bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler wurde 2 x 7 Minuten in 100 mL Puffer A je Edelstahlschale beschallt. Die Filter wurden einzeln erst 30 Sekunden, dann noch 3 x 5 Minuten in je 7,5 mL D-PBS gewaschen. Dieses „Stripping“ wurde zur Entfaltung der immobilisierten Peptide durchgeführt.

Die Peptidfilter wurden in je 5 mL Blocking-Puffer für 4 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde 10 Minuten in 5 mL D-PBS gewaschen.

Als primäre Antikörper dienten Gruppenserum, die aus gleichen Volumina aller Serumproben einer Immunisierungsgruppe hergestellt wurden. Die Filter wurden in 3,5 mL 1:1000 in Blocking-Puffer verdünntem Serum bei 4°C über Nacht auf dem Wippschüttler inkubiert und anschließend für 6 x 10 Minuten in je 5 mL PBST bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Serum-IgG Antikörper wurde auf die Filter als Zweit-Antikörper ein Alexa680-markierter Ziege anti-Maus IgG Antikörper (1:5000 in Blocking-Puffer; 3,5 mL je Filter) gegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Abschließend wurden die Filter 6 x 10 Minuten in je 5 mL PBST gewaschen und mit Hilfe eines Infrarot-Scanners bei 700 nm ausgelesen. Die Fluoreszenzintensitäten der Peptidspots wurden mit der vom Gerätehersteller vertriebenen Software bestimmt und zur Intensität des entsprechenden Originalpeptidspots in Relation gesetzt.

Puffer A

8 M Harnstoff
 1% (w/v) SDS
 0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol
 in Essigsäure; pH 6,9 – 7,0

Blocking-Puffer

1% (w/v) Casein
 in PBST

3.12 Statistische Auswertungen

Statistische Auswertungen wurden mit der Software GraphPad Prism 4 (Motulsky, 2003) durchgeführt.

Bei Messungen mit kleiner Probenzahl ($n = 3-5$) wurden Unterschiede zwischen mehreren unabhängigen Probenansätzen mit einem Kruskal-Wallis Test und anschließendem Vergleich der einzelnen Gruppen mit einem post hoc Test nach Dunn ermittelt.

Bei den Ergebnissen der Titerbestimmung aus der Immunisierungsstudie lagen größere Probenzahlen ($n = 6-7$) vor. Hier wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post hoc Test nach Bonferroni durchgeführt.

Abweichungen zwischen zwei einzelnen Probenansätzen wurden über einen ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test, Abweichungen von einem theoretischen Wert über einen ungepaarten einseitigen Student's t-Test ermittelt.

Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der entsprechende p-Wert kleiner als 0,05 war. Weitere Abstufungen wurden folgendermaßen gekennzeichnet:

n.s.	:		p	>	0,05	
*	:	0,01	<	p	<	0,05
**	:	0,001	<	p	<	0,01
***	:		p	<	0,001	

4 Ergebnisse zur Verdauungsstabilität

4.1 Charakterisierung und Simulation von muriner Intestinalflüssigkeit

Um die Stabilität von Peptiden oder Proteinen unter möglichst *in vivo*-nahen Bedingungen vor einer Immunisierung zu testen, wurde murine Intestinalflüssigkeit isoliert. Die Gewinnung aus frisch präpariertem Dünndarm von Balb/c-Mäusen erfolgte durch den Einsatz von Nylon Tampons (siehe 3.6.1). So konnte eine Spülung des Darms und die damit verbundene Verdünnung der Intestinalflüssigkeit umgangen werden. Durch das Fasten der Tiere vor der Präparation war im Dünndarm nur noch wenig Fäzes vorhanden. Die Ausbeute an unverdünnter natürlicher Intestinalflüssigkeit betrug im Mittel etwa 100 µL je Tier.

4.1.1 Enzymaktivitäten und Proteingehalt in natürlicher Intestinalflüssigkeit

Die Aktivitäten ausgewählter Proteasen in muriner Intestinalflüssigkeit wurden mit Hilfe von spezifischen chromogenen Substraten für Trypsin (*EC 3.4.21.4*), für Chymotrypsin (*EC 3.4.11.4*) oder für Pankreas-Elastase (*EC 3.4.361.4*) bestimmt (siehe 3.7.1).

Obwohl spezifische Substrate für die jeweiligen Enzyme eingesetzt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der komplexen Proteasenmischung muriner Intestinalflüssigkeit weitere Enzyme vorkommen, die die verwendeten Substrate spalten und so den Umsatz beeinflussen. Der Übersichtlichkeit halber werden die gemessenen Aktivitäten hier und im Folgenden jeweils den genannten drei Proteasen zugeordnet anstatt die präzisere Beschreibung „trypsin-, chymotrypsin- oder elastase-artige Aktivitäten“ zu verwenden.

Es wurden unabhängig voneinander insgesamt drei Präparationen zur Gewinnung von unverdünnter Intestinalflüssigkeit durchgeführt (siehe Tabelle 4-1). Die Konzentrationen der bestimmten Parameter wiesen jeweils zwischen den drei Präparationen keine signifikanten Unterschied auf ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test, post hoc Test nach Dunn).

Murine Intestinalflüssigkeit enthielt im Mittel über alle Präparationen 2,39 mg/mL Trypsin und 1,88 mg/mL Chymotrypsin. Die Konzentration von Elastase war mit durchschnittlich 0,73 mg/mL etwa halb so hoch wie die Konzentrationen der beiden anderen bestimmten Proteasen⁸. Der mittlere Gesamtproteingehalt lag bei 24,77 mg/mL.

Tabelle 4-1: Vergleich verschiedener Präparationen muriner Intestinalflüssigkeit.

Präparation	Anzahl Tiere	Trypsin	Chymotrypsin	Elastase	Protein
IntFl 05	8	2,23 ± 0,47 mg/mL	2,13 ± 0,78 mg/mL	0,66 ± 0,56 mg/mL	24,52 ± 2,42 mg/mL
IntFl 06	17	2,81 ± 0,82 mg/mL	1,89 ± 0,39 mg/mL	0,90 ± 0,17 mg/mL	24,18 ± 6,52 mg/mL
IntFl 08	19	2,22 ± 0,29 mg/mL	1,74 ± 0,28 mg/mL	0,57 ± 0,12 mg/mL	25,17 ± 6,43 mg/mL

Die Präparationen wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Die Intestinalflüssigkeiten (IntFl) aller Tiere einer Präparation wurden vereinigt und in spezifischen Enzymassays und im Proteinassay gegenüber Standardverdünnungsreihen analysiert. (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

4.1.2 Enzymaktivitäten und Proteingehalt in simulierter Intestinalflüssigkeit

Nachdem die Konzentrationen der drei gemessenen Proteasen bekannt waren, war es möglich, eine simulierte Intestinalflüssigkeit (sim IntFl) aus diesen Enzymen herzustellen. Als Puffer diente dabei eine der natürlichen intestinalen Umgebung angepasste Pufferlösung (siehe Abschnitt 2.9). Da die simulierte Intestinalflüssigkeit aus den drei Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase in eben den Konzentrationen zusammengesetzt wurde, welche für natürliche Intestinalflüssigkeit (nat IntFl) gemessen worden waren, wurden wie erwartet diese Aktivitäten auch in den spezifischen Assays bestätigt (siehe Tabelle 4-2 und Abbildung 4-1).

In der statistischen Auswertung fanden sich keine signifikanten Abweichungen der spezifischen Proteaseaktivitäten in simulierter Intestinalflüssigkeit gegenüber denjenigen im natürlichen Vorbild (in allen Fällen $p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test, post hoc Test nach Dunn).

⁸ Der Übersichtlichkeit halber werden Enzymkonzentrationen hier stets in mg/mL oder ähnlichen Einheiten angegeben. Die zur Konzentrationsbestimmung verwendeten Standards enthielten nach Herstellerangaben folgende Aktivitäten: Trypsin 12400 BAEE U/mL, Chymotrypsin 81 BTEE U/mL, Elastase 7,2 SucAAApNA U/mL.

Tabelle 4-2: Proteasekonzentrationen in simulierter Intestinalflüssigkeit.

	Trypsin	Chymotrypsin	Elastase
nat IntFl	2,39 ± 0,59 mg/mL	1,88 ± 0,44 mg/mL	0,73 ± 0,37 mg/mL
sim IntFl	2,92 ± 0,86 mg/mL	1,62 ± 0,29 mg/mL	1,17 ± 0,50 mg/mL
sim IntFl + BSA	2,64 ± 0,44 mg/mL	2,04 ± 0,32 mg/mL	1,15 ± 0,04 mg/mL

Vergleich der Konzentrationen in simulierter Intestinalflüssigkeit (sim IntFl) mit oder ohne BSA-Zusatz im Vergleich zu natürlicher (nat IntFl). Die Enzymkonzentrationen wurden in spezifischen Assays als Aktivitäten im Vergleich zu Standardverdünnungsreihen ermittelt. (n = 3-5; Mittelwerte ± Standardabweichungen)

Da die Simulation als reine Enzymmischung in Pufferlösung keine weiteren proteinösen Komponenten enthielt, lag der Gesamtproteingehalt signifikant niedriger als der von natürlicher Intestinalflüssigkeit (siehe Abbildung 4-1).

Zur Anpassung der Proteinkonzentration wurde bovines Serumalbumin (BSA) zugegeben, so dass der Gesamtproteingehalt mit demjenigen von natürlicher Intestinalflüssigkeit übereinstimmte. Auf die Enzymaktivitäten in den spezifischen Assays hatte die Proteinzugabe in simulierter Intestinalflüssigkeit keinen Einfluss (siehe Tabelle 4-2 und Abbildung 4-1).

Hinsichtlich der drei gewählten Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase lag somit eine *in vitro*-Simulation vor, die die Enzymaktivitäten genau wiedergab und über den Proteingehalt moduliert werden konnte, ohne diese Aktivitäten zu beeinflussen.

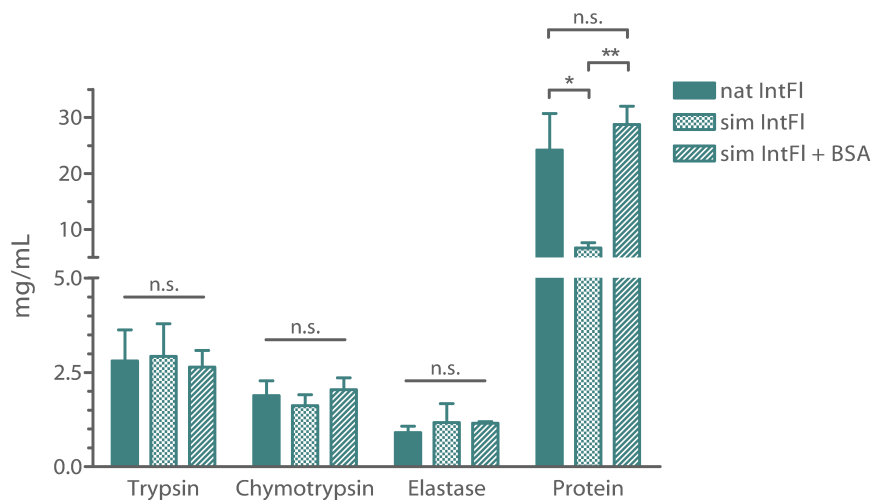


Abbildung 4-1: Vergleich von natürlicher und simulierter Intestinalflüssigkeit.

Die Konzentrationen wurden in spezifischen Enzymassays und im Proteinassay ermittelt. (n = 3-5; Mittelwerte + Standardabweichungen; Kruskal-Wallis / Dunn-Test: n.s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

4.1.3 Unspezifische Gesamtproteasenaktivität

Unspezifische Proteasenaktivität im Casein-Assay

In einem Assay mit succinyliertem Casein als Substrat wurden die unspezifischen Aktivitäten in Proteaselösungen gemessen (siehe 3.7.2). Für den Assay wurde natürliche Intestinalflüssigkeit selbst als Referenz gewählt, um unspezifische Aktivitäten in den aufgetragenen Proben direkt mit dem komplexeren Vorbild *ex vivo* vergleichen zu können. Die Messungen ergaben daher relative Aktivitätswerte im Vergleich zu natürlicher Intestinalflüssigkeit.

Wie oben beschrieben (siehe 4.1.2) deckten die drei in simulierter Intestinalflüssigkeit verwendeten Proteasen in spezifischen Assays die jeweilige Aktivität in natürlicher Intestinalflüssigkeit ab. Die Aktivität des simulierenden Enzymcocktails machte jedoch nur etwa ein Viertel der proteolytischen Aktivität natürlicher Intestinalflüssigkeit aus (siehe Tabelle 4-3). Diese Relation war unabhängig von der Anwesenheit zugesetzten Proteins ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test, post hoc Test nach Dunn).

Zusätzlich wurden die drei Proteasen als Einzelenzymlösungen der jeweiligen im spezifischen Assay in natürlicher Intestinalflüssigkeit gemessenen Konzentration eingesetzt (siehe Tabelle 4-3 und Abbildung 4-2). Die Summe der einzeln gemessenen Aktivitäten betrug etwa ein Drittel der Aktivität natürlicher Intestinalflüssigkeit. Die durch die Schwankungsbreite des enzymatischen Assays begründete Diskrepanz zwischen dieser Summe der Aktivitäten und der Aktivität der simulierten Intestinalflüssigkeit, die alle drei Enzyme gemeinsam beinhaltet, war dabei statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; ungepaarter zweiseitiger Student's t-Test).

Tabelle 4-3: Gesamtproteasenaktivität.

Enzymlösung	unspezifische Aktivität (% nat IntFl)
Trypsin	9,9 ± 3,6 %
Chymotrypsin	16,1 ± 5,5 %
Elastase	7,7 ± 2,5 %
sim IntFl (T, C und E)	26,8 ± 8,4 %
sim IntFl + BSA (T, C, E und BSA)	25,0 ± 8,4 %

Proteaseaktivitäten im unspezifischen Assay. Die Prozentangaben sind relative Aktivitäten im Vergleich zu natürlicher Intestinalflüssigkeit (= 100%). (n = 4-6; Mittelwerte ± Standardabweichungen)

Die Ergebnisse aus dem unspezifischen Assay stellen den deutlichen Überschuss an proteolytischer Aktivität aller intestinalen Enzyme gegenüber den spezifischen Aktivitäten von Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase in natürlicher Intestinalflüssigkeit dar.

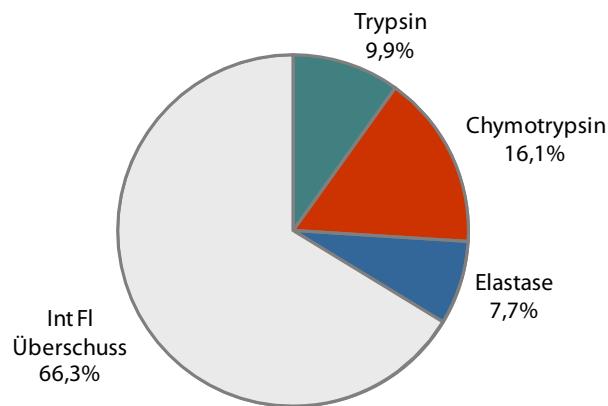


Abbildung 4-2: Anteil der Einzelproteasen an der Gesamtaktivität simulierter IntFI.

Die Proteasen wurden einzeln wie in simulierter Intestinalflüssigkeit vorkommend im unspezifischen Assay eingesetzt und mit natürlicher Intestinalflüssigkeit verglichen. (n = 4-6; Mittelwerte; 100% entspricht natürlicher Intestinalflüssigkeit)

Zymographie

Die Ergebnisse des unspezifischen Assays konnten mit Hilfe der Zymographie (siehe 3.1.2) bestätigt werden.

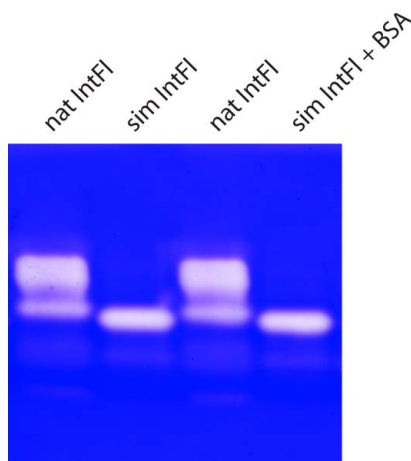


Abbildung 4-3: Zymogramm.

Natürliche (nat IntFI) und simulierte Intestinalflüssigkeit ohne (sim IntFI) oder mit BSA Zusatz (sim IntFI + BSA). 1µL der 1:100 verdünnten Proben wurden je Spur in Zymogramm-Probenpuffer über ein Casein-haltiges Gel elektrophoretisch getrennt. Nach Renaturierung, Inkubation bei 37°C und Coomassie-Färbung erscheinen proteolytisch aktive Banden als helle Bereiche vor blauem Casein-Hintergrund.

Für simulierte Intestinalflüssigkeit – mit oder ohne Proteinzusatz – traten diskrete proteolytisch aktive Banden im Bereich der eingesetzten Proteasen auf. Natürliche Intestinalflüssigkeit erzeugte zusätzlich zu einer Bande im gleichen Bereich mehrere deutlich aktive Banden im Bereich geringerer Wanderungsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 4-3).

Es konnte ein deutlicher Überschuss an proteolytischer Aktivität für natürliche Intestinalflüssigkeit gegenüber den hier verwendeten Simulationen dargestellt werden. Die simulierte Intestinalflüssigkeit repräsentierte lediglich einen kleinen Ausschnitt des Proteolysemusters natürlicher Intestinalflüssigkeit. Die komplexe Enzymmischung im Mäusedarm enthält also zahlreiche weitere aktive Proteasen, die einen erheblichen Beitrag zur Gesamtaktivität leisten.

BSA-Verdau durch simulierte Intestinalflüssigkeit und Einzelenzyme

Ein weiterer Blick auf die proteolytische Potenz von simulierter Intestinalflüssigkeit wurde durch eine dreistündiger Inkubation von 25 mg/mL bovinem Serumalbumin (BSA) in simulierter Intestinalflüssigkeit sowie in den drei Enzymen einzeln geworfen.

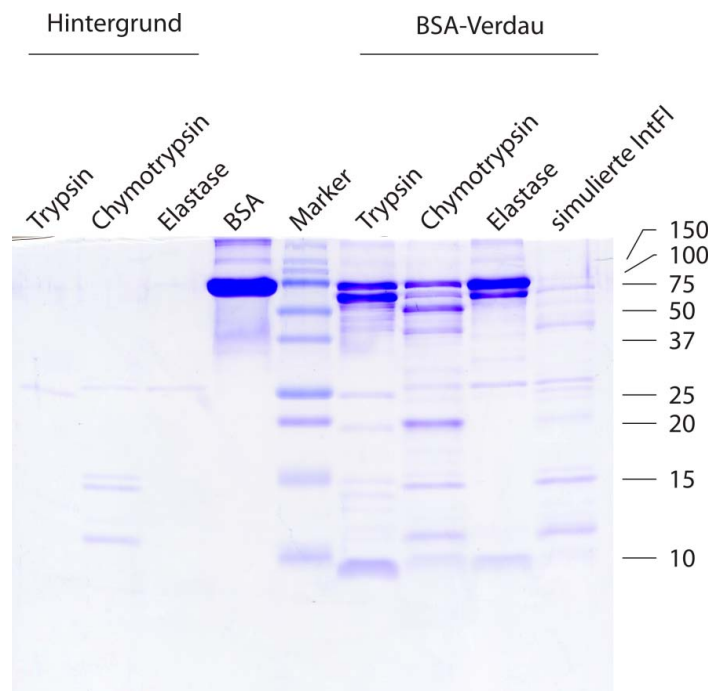


Abbildung 4-4: Proteolysemuster von BSA.

Verdau durch Einzelenzyme oder simulierte Intestinalflüssigkeit. Nach Inkubation von 25mg BSA je mL der Enzymlösungen für 3h bei 37°C wurden 6µL 1:25 verdünnter Proben per SDS-PAGE aufgetrennt. (Beschriftung rechts: Molmassenstandard (Precision Plus, BioRad) in kDa).

Die entstanden Verdaumuster nach SDS-PAGE unterschieden sich erheblich (siehe Abbildung 4-4). Die eingesetzte Menge an BSA wurde innerhalb von 3 Stunden von keiner der Proteasen vollständig abgebaut, und es finden sich noch relativ große Fragmente mit Molmassen im Bereich von 50 bis 75 kDa. Durch eine Mischung der drei Enzyme wurde die gleiche Menge an

BSA vollständig abgebaut. Im Wesentlichen resultieren hier sehr kleine Fragmente, die in der angewandten SDS-PAGE nicht dargestellt werden konnten. Gut erkennbar sind hier die kooperativen Effekte der Enzymmischung. Durch eine Protease gespaltene Produkte scheinen wiederum ein Substrat für eine andere Protease darzustellen, während sie in einer Einzelenzymmischung weniger schnell abgebaut werden.

Ein Vergleich mit natürlicher Intestinalflüssigkeit war mit dieser Methode nicht sinnvoll, da die Abbaubanden des BSA von den zahlreich vorkommenden Hintergrundbanden des natürlichen Proteingehaltes im Dünndarm überlagert würden.

4.1.4 Enzymaktivität bei Verdünnung natürlicher Intestinalflüssigkeit

Der Einfluss einer Verdünnung von natürlicher Intestinalflüssigkeit auf die Gesamtproteasenaktivität wurde im unspezifischen Assay gemessen (siehe 3.7.2). Nach Inkubation unterschiedlicher Verdünnungen von natürlicher Intestinalflüssigkeit wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und auf ihre Proteaseaktivität untersucht.

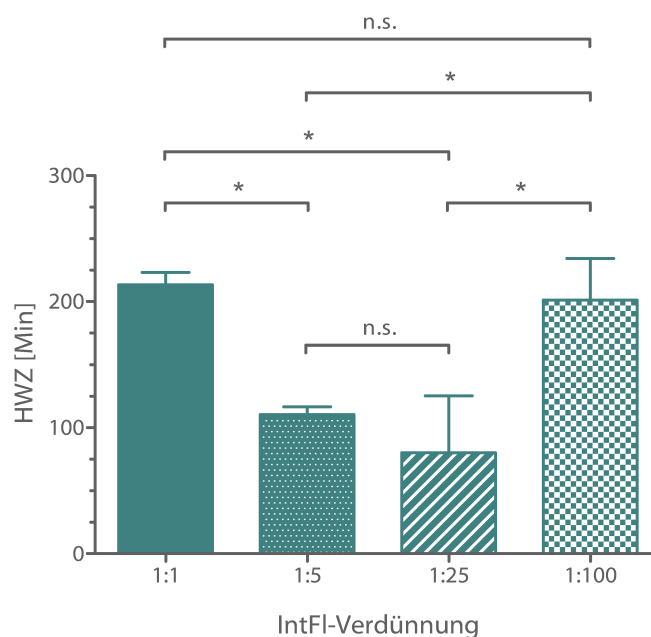


Abbildung 4-5: Halbwertszeiten verdünnter Intestinalflüssigkeit.

Die Verdünnungen wurden inkubiert, unspezifische Proteasenaktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die Halbwertszeiten der Aktivität bestimmt. (n = 3; Mittelwerte + Standardabweichungen; Kruskal-Wallis / Dunn-Test: n.s. $p > 0,05$; * $p < 0,05$)

Die im Assay eingesetzten Proben unverdünnter oder verdünnter Intestinalflüssigkeit vor Beginn der Inkubation erzeugten gleiche OD-Werte ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test, post hoc Test nach Dunn). Die Abnahme der Aktivität erfolgte in Abhängigkeit vom Verdünnungsfaktor unterschiedlich schnell, was sich in differierenden Halbwertszeiten der Gesamtproteasenaktivität äußerte (siehe Abbildung 4-5).

In 5fach und 25fach verdünnter Intestinalflüssigkeit nahm die Gesamtproteasenaktivität signifikant schneller ab als in unverdünnter. Bei einer starken Verdünnung von 1:100 während der Inkubation war die Proteasenaktivität wieder länger stabil, die Halbwertszeit vergleichbar mit der von unverdünnter Intestinalflüssigkeit.

Die Halbwertszeit der Proteasenaktivität muriner Intestinalflüssigkeit im unspezifischen Assay war somit weder von der Verdünnung unabhängig, noch konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnungsfaktor und Enzymstabilität beobachtet werden.

4.2 Stabilität von Targetingliganden gegen intestinale Proteasen

Die im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Strategie zur intestinalen Immunisierung mit Peptid-Antigenen beruhte auf der Konjugation dieser Peptide an einen Targetingliganden, durch den die Bindung an die Zielzellen im Dünndarm verbessert und so die Immunreaktion verstärkt werden sollte (siehe 1.2.2 und 1.3.2). Geeignete Liganden für ein M-Zell-Targeting im Dünndarm sind die beiden homologen pentameren B-Untereinheiten des Choleratoxins (CTB) und des hitzelablen Enterotoxins aus *E.coli* (LTB) sowie ein pflanzliches Agglutinin aus *Ulex europaeus* (UEA I). Da die Integrität der Liganden für ein erfolgreiches Targeting im Dünndarm notwendig ist, wurde ihre Stabilität gegenüber intestinalen Proteasen ermittelt.

Die Konzentration der Liganden in den Versuchsansätzen wurde dabei so gewählt, dass sie der Situation während der Immunisierung (siehe 3.9.2) *in vivo* entsprach. Als Versuchsdauer wurde eine Zeit von drei Stunden gewählt, da dies bereits die murine Darmtransitzeit von 154 Minuten (Schwarz *et al.*, 2002) überschreitet.

4.2.1 Stabilität in natürlicher Intestinalflüssigkeit

In unverdünnter natürlicher Intestinalflüssigkeit waren alle drei untersuchten Targetingliganden CTB, LTB und UEA I über 3 Stunden stabil. Die Intensität der jeweiligen Coomassie-gefärbten Proteinbande nach Ablauf der Inkubationszeit auf einem Polyacrylamidgel unterschied sich nicht von der Intensität der Bande zum Startzeitpunkt (siehe Tabelle 4-4; $p > 0,05$; ungepaarter einseitiger Student's t-Test).

Tabelle 4-4: Stabilität von Targetingliganden in natürlicher Intestinalflüssigkeit.

Targetingligand	nach Inkubation in nat IntFl
CTB	136,3 ± 22,2 %
LTB	124,2 ± 28,1 %
UEA I	118,6 ± 56,6 %

Angegeben sind die relativen Intensitäten von Coomassie-gefärbten Banden nach Inkubation und SDS-PAGE bezogen auf den Startzeitpunkt (100%). (n = 3-5; Mittelwerte ± Standardabweichungen)

4.2.2 Stabilität in simulierter Intestinalflüssigkeit

Analog zum Versuchsansatz mit natürlicher Intestinalflüssigkeit wurden die Targetingliganden in simulierter Intestinalflüssigkeit inkubiert. Nach Trennung der Probenansätze über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung traten hier signifikante Unterschiede in der Intensität der Proteinbanden zwischen Startzeitpunkt und nach Inkubation auf ($p < 0,05$; einseitiger Student's t-Test). Alle drei untersuchten Liganden wurden durch die Enzymmischung aus Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase teilweise degradiert (siehe Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Degradation von Targetingliganden in simulierter Intestinalflüssigkeit.

Targetingligand	nach Inkubation in sim IntFl
CTB	69,0 ± 18,2 %
LTB	66,0 ± 12,3 %
UEA I	73,7 ± 13,8 %

Angegeben sind die relativen Intensitäten von Coomassie-gefärbten Banden nach dreistündiger Inkubation und SDS-PAGE bezogen auf den Startzeitpunkt (100%). (n = 3-5; Mittelwerte ± Standardabweichungen)

4.2.3 Stabilität in simulierter Intestinalflüssigkeit nach Proteinzusatz

Der proteolytische Abbau der Targetingliganden in simulierter Intestinalflüssigkeit konnte verhindert werden, indem Fremdprotein (bovines Serumalbumin oder Ovalbumin) entsprechend dem Gesamtproteingehalt natürlicher Intestinalflüssigkeit zugesetzt wurde. Hier waren die Targetingliganden wie in natürlicher Intestinalflüssigkeit über drei Stunden stabil (siehe Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Stabilität von Targetingliganden in simulierter Intestinalflüssigkeit mit Protein.

Targetingligand	nach Inkubation in sim IntFl + BSA	nach Inkubation in sim IntFl + Ova
CTB	104,5 ± 6,2 %	101,4 ± 6,1 %
LTB	96,4 ± 2,2 %	103,9 ± 4,4 %
UEA I	n.d.	133,3 ± 21,3 %

Angegeben sind die relativen Intensitäten von Coomassie-gefärbten Banden nach dreistündiger Inkubation und SDS-PAGE bezogen auf den Startzeitpunkt (100%). (n = 3-5; Mittelwerte ± Standardabweichungen; n.d. nicht detektierbar)

Der Proteingehalt scheint eine entscheidende Komponente in der Intestinalflüssigkeit zu sein, wenn es darauf ankommt, relativ stabile Proteinstrukturen vollständig vor Verdau zu schützen. Ohne diesen Fremdproteinanteil wurden die betrachteten Targetingliganden in gesamtproteolytisch weit schwächerer simulierter Intestinalflüssigkeit partiell abgebaut.

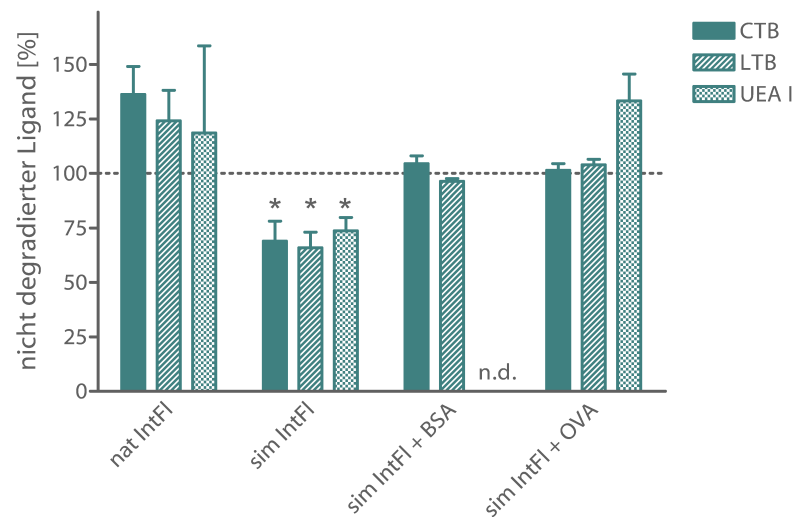


Abbildung 4-6: Stabilität von Targetingliganden in Intestinalflüssigkeit.

Inkubation für 3 h bei 37°C, Auswertung nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. 100% entspricht der Bandenintensität im jeweiligen Versuchsansatz zum Startzeitpunkt. (n = 3-5; Mittelwerte + Standardabweichungen; Student's t-Test (Abweichung von 100 %): * p<0,05)

In vivo sollten das in der hier durchgeführten Immunisierungsstudie verwendete CTB und die beiden anderen Liganden in der proteasereichen Umgebung, die Ziel einer intestinalen Immunisierung ist, stabil sein und als Träger für peptidische Antigene auch in Hinsicht auf Verdauungsstabilität geeignet sein.

4.3 Auswahl der Immunisierungspeptide

Ausgehend von Ergebnissen vorangegangener Studien aus unserem Labor wurden die hier eingesetzten Immunisierungspeptide aus dem Modellantigen Ovalbumin ausgewählt.

In Peptidbibliotheken waren lineare Peptide mit einer Länge von 16 Aminosäuren aus Ovalbumin synthetisiert worden. Die Peptidsequenzen waren von jeder zweiten Aminosäureposition der Ovalbuminsequenz gestartet worden (Ova₁₋₁₆, Ova₃₋₁₈, Ova₅₋₂₀, und so weiter), so

dass aufeinander folgende Peptide in 14 ihrer 16 Aminosäuren identisch waren. Aus der 385 Aminosäuren langen Ovalbuminsequenz entstanden so 186 16mer Peptide.

Nach einer Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit Ovalbumin war eine Kartierung zur Erkennung linearer B-Zell Epitope durchgeführt worden (Externest, 2000). Die hier ausgewählten Peptide gehörten zu denjenigen, die in den Peptidbibliotheken von anti-Ovalbumin-Seren und -Fäzesproben mehrerer Mäuse mit hohen Signalintensitäten erkannt wurden.

Die retro-inversen Mimetika der ausgewählten Peptide waren ebenfalls durch Serum-IgG und durch IgA in Fäzesproben nach Immunisierung mit Ovalbumin erkannt worden (Gorris, 2001). Besonders hervorzuheben ist hierbei das Peptid Ova₁₀₃₋₁₁₈, das in retro-inverser Form sogar besser erkannt wurde als in natürlicher Form.

Tabelle 4-7: Ausgewählte Ovalbuminepitope.

Ovalbumin-Epitop	Sequenz	Hydrophobizität	MHC-II-Bindfähigkeit
Ova ₈₃₋₉₈	LRDINQITKPNDVYS	-0,887	7,3 %
Ova ₁₀₃₋₁₁₈	SRLYAEERYPILPEYL	-0,606	4,9 %
Ova ₃₄₉₋₃₆₄	VDAASVSEEFRADHPF	-0,344	5,8 %

Aufgeführt sind die Position der 16mer Peptide in der Ovalbuminsequenz mit ihrer Aminosäuresequenz und den berechneten Werten für Hydrophobizität und Bindfähigkeit an MHC-II-Moleküle des Haplotyps H2d (Details siehe Text).

Zusätzlich wurden rechnergestützte Vorhersagen über die Anwendung ProtParam⁹ auf dem ExPASy Proteomics Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik (Gasteiger *et al.*, 2003) durchgeführt. Die Hydrophobie der Peptide wurde als Hinweis auf eine nicht exponierte Lage im Gesamtprotein über die Formel von Kyte und Doolittle (1982) berechnet. Hydrophile und damit an der Proteinoberfläche zugängliche Epitope sollten leichter für Immunglobuline zugänglich sein, um nach einer Peptidimmunisierung wiedererkannt zu werden. Hydrophobe Peptide erhalten bei dieser Analyse positive, hydrophile Peptide negative Zahlenwerten. Das Spektrum der Hydrophobizitätswerte nach dieser Berechnung reicht für die 16mer Peptide aus Ovalbumin von 1,938 (hydrophob) bis -1,575 (hydrophil).

⁹ <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

Alle für diese Immunisierungsstudie ausgewählten Ppeptide waren mit negativen Werten, also hydrophilen Eigenschaften, bewertet worden (siehe Tabelle 4-7). Auch in der Abbildung der Kristallstruktur von Ovalbumin (Stein *et al.*, 1991) ist die exponierte Lage der drei Epitope an der Moleküloberfläche erkennbar (siehe Abbildung 4-7).

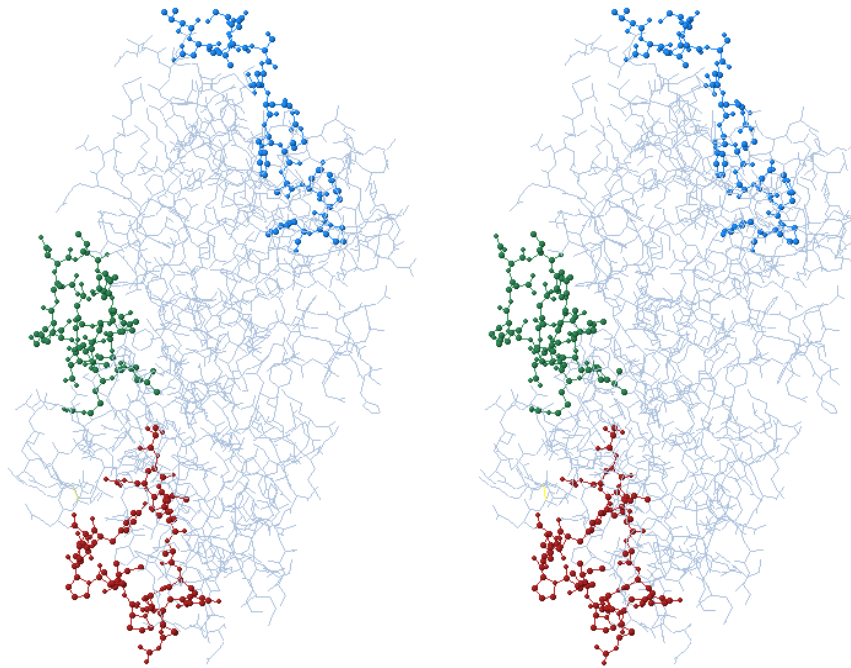


Abbildung 4-7: Stereobild von Ovalbumin.

Die Abbildung mit den drei Immunisierungspeptiden Ova₈₃₋₉₈ (grün), Ova₁₀₃₋₁₁₈ (rot) und Ova₃₄₉₋₃₆₄ (blau) wurde mit dem Programm ProteinExplorer aus den Kristallstrukturdaten des UniProtKB/Swiss-Prot Eintrags P01012 erstellt.

Da die ausgewählten Peptide bei einer Immunisierung auch als T-Zell-Epitope im Zusammenhang mit MHC-II-Molekülen präsentiert werden sollten (siehe 1.1.3), wurde die MHC-II-Bindfähigkeit der Motive für den Haplotyp H2d des Balb/c-Mäusestamms durch das Programm RankPep¹⁰ (Reche *et al.*, 2004) berechnet. Bei dieser Methode wird die Bindfähigkeit von Peptiden an MHC-II-Moleküle mit dem auf einen Wert von 100 % gesetzten Konsensuspeptid der Sequenz QMVHAAHAE verglichen. Für alle 16mer Peptide aus

¹⁰ <http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>

Ovalbumin ergab sich ein Spektrum der relativen Bindefähigkeit von -20,6 % bis 99,7 %. Da der Median bei 2,1 % lag, gehören die drei ausgewählten Peptide in Balb/c-Mäusen zu den 40 % der besten MHC-II-bindenden 16mer Peptide aus Ovalbumin (siehe Tabelle 4-7).

Tabelle 4-8: Immunisierungspeptide.

Ovalbumin-Epitop	Form	Sequenz
Ova ₈₃₋₉₈	nat	LRDINQITKPNDVYS
	RI	syvdpnkti qnidrl
Ova ₁₀₃₋₁₁₈	nat	SRLYAEERYPILPEYL
	RI	lyeplipyreeaylrs
Ova ₃₄₉₋₃₆₄	nat	VDAASVSEEFRADHPF
	RI	fphdarfeesvsadv

Die Peptide aus Ovalbumin wurden in der hier durchgeführten Immunisierungsstudie verwendet. Aufgeführt sind die Position der 16mer Peptide in der Ovalbuminsequenz und die Aminosäuresequenzen (L-Aminosäuren in Großbuchstaben, D-Aminosäuren in Kleinbuchstaben) der natürlichen (nat) und der retro-inversen (RI) Formen.

4.4 Stabilität der Immunisierungspeptide gegen intestinale Proteasen

4.4.1 Freie Immunisierungspeptide

Bei einer Immunisierung sollten die drei Peptidpitope Ova₈₃₋₉₈, Ova₁₀₃₋₁₁₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ aus dem Modellantigen Ovalbumin jeweils in natürlicher und in retro-inverser Form eingesetzt werden (siehe Abschnitt 4.3). Vor der Verwendung für eine intragastrale Applikation zur mukosalen Immunisierung sollten die Stabilitäten dieser Peptide in muriner Intestinalflüssigkeit ermittelt werden.

Die Degradation der natürlichen 16mer Peptide konnte aufgrund der kurzen Halbwertszeiten nicht zeitabhängig in unverdünnter Intestinalflüssigkeit bestimmt werden. Daher wurde ein Format gewählt, bei dem die Peptide in Gegenwart von verdünnter Intestinalflüssigkeit für einen festgelegten Zeitraum inkubiert wurden (siehe 3.8.1).

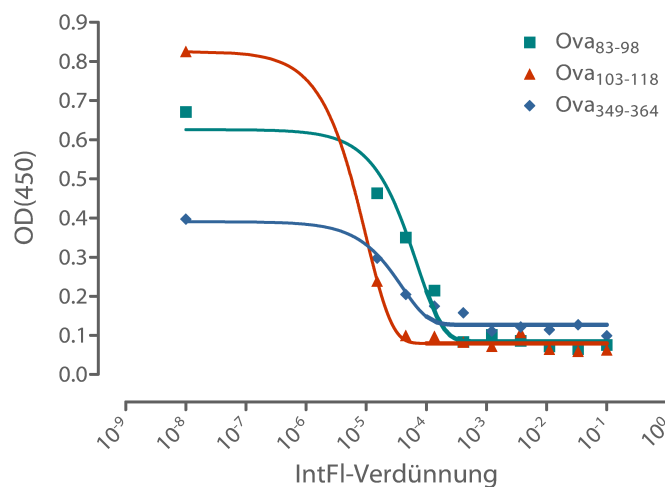


Abbildung 4-8: Peptidverdau im Proteolyseassay.

Die natürlichen Peptide Ova₈₃₋₉₈, Ova₁₀₃₋₁₁₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ wurden in Gegenwart von verdünnter Intestinalflüssigkeit inkubiert. Die 4-Parameter-Gleichung (Gleichung 2) wurde den Signalintensitäten unverdauter Peptide angepasst .

Bei den gewählten Versuchsbedingungen folgte die Proteolyse einer Enzymkinetik pseudoerster Ordnung, wobei für schnell abgebaute Peptide konzentrationsabhängige Messungen in zeitabhängige Werte übertragen werden können (Gorris, 2005). Daher kann aus der Inkubation in seriellen Verdünnungen einer Enzymlösung auf den zeitlichen Verlauf der Proteolyse geschlossen werden. Die Versuchsdaten wurden dazu an eine entsprechende

Funktion (Gleichung 2) angepasst, um die Halbwertszeiten in unverdünnter Intestinalflüssigkeit abschätzen zu können.

Während die Halbwertszeiten für die natürlichen Immunisierungspeptide in der Größenordnung von Millisekunden lagen (siehe Tabelle 4-9 und Abbildung 4-10), wurden die RI Mimetika der Peptide nicht abgebaut, sondern blieben in allen Verdünnungsstufen der Intestinalflüssigkeit stabil.

4.4.2 Immunisierungspeptide in CTB-Konjugaten

Zur Immunisierung wurden die Peptide nicht in freier Form sondern an CTB konjugiert eingesetzt. Daher wurden die Halbwertszeiten in Intestinalflüssigkeit zusätzlich für Peptide in konjugierter Form gemessen. Der Versuchsansatz folgte dabei dem generellen Aufbau des Verdauassays für freie Peptide. Die Konjugate wurden in seriellen Verdünnungen von Intestinalflüssigkeit für einen festgelegten Zeitraum inkubiert (siehe Abschnitt 3.8).

Die Auswertung erfolgte hier über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Auf den Gelen waren Banden für unkonjugiertes CTB sowie für die einzelnen Derivatisierungsstufen erkennbar (siehe Abbildung 4-9 und Abbildung 4-11), wobei im Verlauf der abnehmenden Verdünnung die hochderivatisierten Konjugatbanden für natürliche Peptide immer weiter verschwanden, während die unteren Banden an Intensität zunahmen.

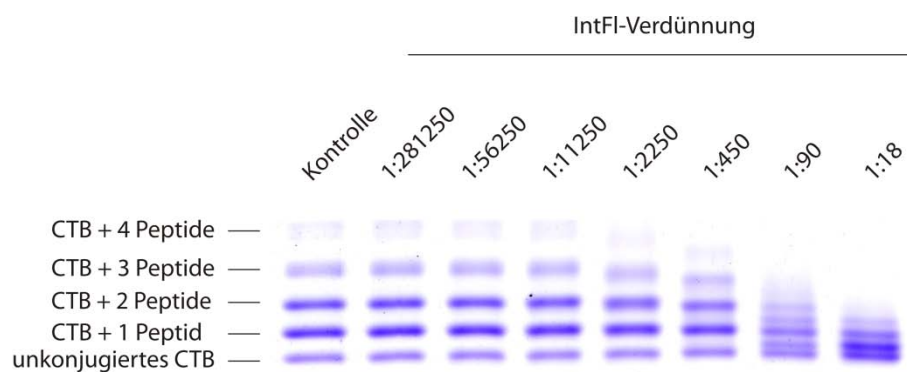


Abbildung 4-9: Degradation des natürlichen Peptids 2 im CTB-Konjugat.

Das CTB-Peptid-Konjugat wurde in seriellen Verdünnungen von natürlicher Intestinalflüssigkeit inkubiert. Die Proben wurden per SDS-PAGE getrennt und Coomassie-gefärbt. Die Färbeintensität der CTB Bande wurde densitometrisch ausgewertet.

Da die natürlichen Peptide schrittweise abgebaut wurden, was zu einer Verschiebung der entsprechenden Konjugatbande zu leichter Molmasse führte, ohne dass die Bande direkt auf die nächstweniger konjugierte fiel, erfolgte die Bewertung der Peptidstabilitäten indirekt über die Messung der Intensitätszunahme der unkonjugierten CTB-Banden. Die Auswertung der unkonjugierten CTB-Bande berücksichtigte somit nicht die teilweise Degradation der Peptide, wurde aber auch nicht durch diffuse Verschiebungen verfälscht.

Es ergaben sich für die natürlichen Peptide Halbwertszeiten im Bereich von mehreren Sekunden bis Minuten (siehe Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Halbwertszeiten der Immunisierungspeptide.

	HWZ freies Peptid	HWZ im Konjugat
Ova ₈₃₋₉₈	9,9 ms	12,0 min
Ova ₁₀₃₋₁₁₈	1,4 ms	1,7 min
Ova ₃₄₉₋₃₆₄	5,2 ms	15,5 s

Die Peptide wurden in freier Form oder im CTB-Konjugat durch natürliche Intestinalflüssigkeit verdaut.

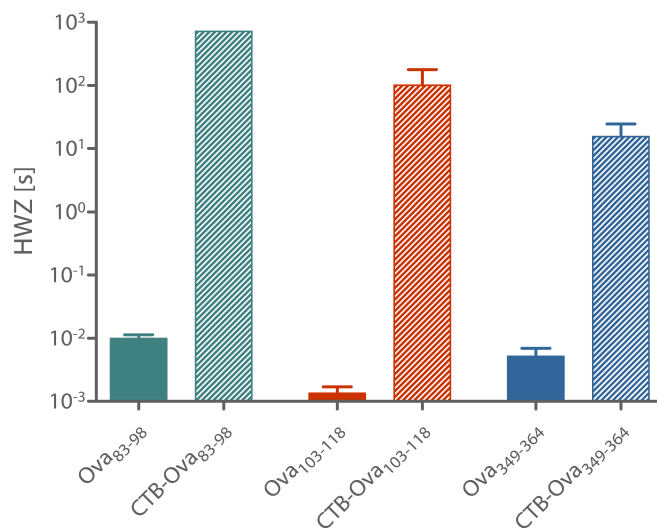


Abbildung 4-10: Stabilisierung der Peptide durch Konjugation an CTB.

Halbwertszeiten der freien Peptide und der Peptide im CTB-Konjugat in natürlicher Intestinalflüssigkeit (Mittelwerte + Standardabweichung)

Der Faktor, um den sich die Halbwertszeiten der Peptide zwischen freier und konjugierter Form änderten, war für die Peptide Ova₈₃₋₉₈ und Ova₁₀₃₋₁₁₈ gleich groß ($73 \cdot 10^3$), während das Peptid Ova₃₄₉₋₃₆₄ weniger stark stabilisiert wurde (mit einem Faktor von $3 \cdot 10^3$). Das Peptid Ova₈₃₋₉₈ (LRDILNQTITKPNDVYS) war in beiden Formen das stabilste.

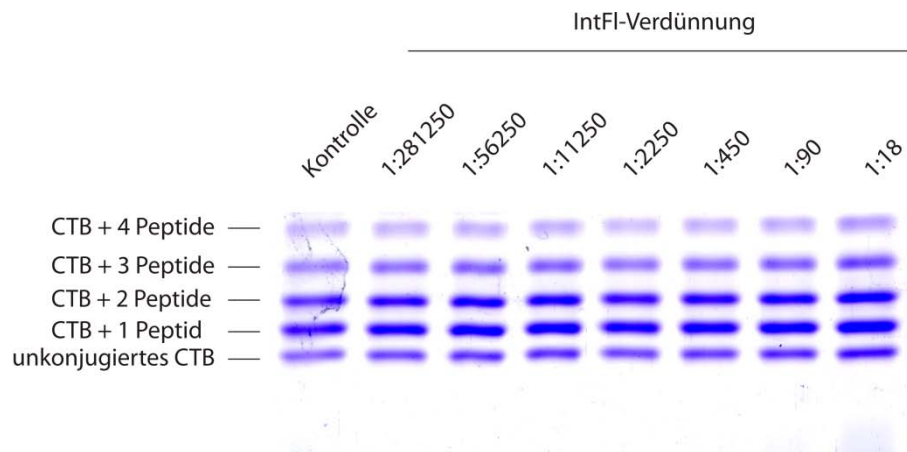


Abbildung 4-11: Stabilität des retro-inversen Peptids 2 im CTB-Konjugat.

Das CTB-Peptid-Konjugat wurde in seriellen Verdünnungen von natürlicher Intestinalflüssigkeit inkubiert. Die Proben wurden per SDS-PAGE getrennt und Coomassie-gefärbt. Die Färbeintensität der CTB Bande wurde densitometrisch ausgewertet.

Die retro-inversen Peptide waren wie in der freien Form auch im Konjugat mit CTB in natürlicher Intestinalflüssigkeit stabil (vergleiche Abbildung 4-11).

Wie im Abschnitt 4.2 beschrieben erkennt man zusätzlich auch auf diesen Gelen, dass CTB selbst nicht degradiert wird (siehe Abbildung 4-9 und Abbildung 4-11).

5 Ergebnisse der Immunisierungsstudie

5.1 Synthese und Reinigung von Komponenten für die Immunisierung

5.1.1 Peptide für die Immunisierungsstudie

Die in der Immunisierungsstudie eingesetzten natürlichen und retro-inversen 16mer Peptide aus Ovalbumin (siehe Tabelle 4-8) wurden nach dem Fmoc-Festphasenverfahren hergestellt. Die Reinheit der synthetisierten Peptide nach säulenchromatographischer Reinigung über RP-HPLC wurde aus dem UV-Spektrum und dem Massenspektrum (MALDI-TOF) ermittelt. Jedes der sechs Peptide lag demnach mit einer Reinheit von über 97 % vor.

Sowohl die CTB-Konjugate für den Einsatz in der Immunisierungsstudie als auch die BSA-Konjugate für die ELISA-Auswertung wurden aus den Peptiden des selben Syntheseansatzes hergestellt, so dass hinsichtlich der Peptidqualität identische Ausgangsmaterialien vorlagen.

5.1.2 CTB-Konjugate für die Immunisierungsstudie

Optimierung der Konjugatsynthese

Das homopentamere CTB besitzt die Fähigkeit, über fünf Bindestellen an das im Dünndarm-epithel vorkommende Gangliosid G_{M1} zu binden. Diese Eigenschaft sollte das CTB bei einem Einsatz als Targetingligand während einer intestinalen mukosalen Immunisierung beibehalten (siehe 1.2.2). Da an der G_{M1} -Bindung ein Lysin der CTB-Struktur beteiligt ist (Jobling und Holmes, 2002) und die Konjugation der Peptide an Lysin-Seitenketten erfolgte, wurden Bedingungen ermittelt, unter denen die Targetingliganden mit möglichst hoher Peptidladung ihre G_{M1} -Bindefähigkeit behalten. Hierzu wurden zunächst verschiedene molare Verhältnisse von Peptid zu CTB in parallelen Reaktionsansätzen mit dem natürlichen Peptid Ova₁₀₃₋₁₁₈ getestet.

Die Derivatisierungsgrade der resultierenden CTB-Konjugate wurden über SDS-PAGE ermittelt. Nach Coomassie-Färbung konnten diskrete Banden für die unkonjugierte monomere B-Untereinheit des Targetingliganden sowie mehrere Banden in gleichen Abständen für unterschiedlich stark derivatisierte CTB-Monomere unterschieden werden. Die Intensitäten dieser Banden wurden gemessen und zueinander in Relation gesetzt (siehe 3.3.1, Gleichung 1). So konnte als mittlerer Derivatisierungsgrad die Zahl der Peptide je CTB-Monomer bestimmt

werden. Die G_{M1} -Bindefähigkeit wurde im ELISA mit dem Gangliosid als immobilisierter Komponente gemessen (siehe 3.11.1) und mit der Bindefähigkeit von unkonjugiertem CTB verglichen.

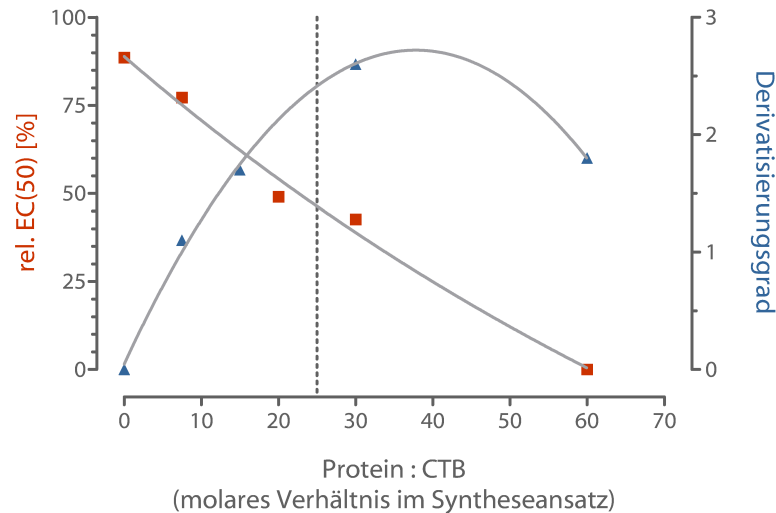


Abbildung 5-1: Optimierung der CTB-Konjugatsynthese.

Der mittlere Derivatisierungsgrad der CTB-Monomere wurde über die Intensität der zu einzelnen Derivatisierungsstufen gehörigen Banden nach SDS-PAGE berechnet. Die EC(50)-Werte aus einem G_{M1} -ELISA sind als relative Werte aufgeführt (100% entspricht unkonjugiertem CTB, 0% entspricht einem Protein : CTB-Verhältnis bei der Synthese von 60:1). Die gestrichelte Linie zeigt das für die Synthese der Immunisierungskonjugate gewählte molare Verhältnis von 25:1.

Für die Synthese der Immunisierungskonjugate wurde als Kompromiss zwischen den bewerteten Konjugateigenschaften ein molares Verhältnis von Peptid zu CTB von 25:1 gewählt. Nach den Optimierungsversuchen war bei diesem Verhältnis die G_{M1} -Bindefähigkeit auf eine mittlere Stärke zwischen unkonjugiertem CTB und dem schwächsten gemessenen Wert bei 60fachem Peptidüberschuss reduziert. Der Derivatisierungsgrad lag bei dem gewählten Verhältnis nahe dem gemessenen Maximum (siehe Abbildung 5-1).

Derivatisierungsgrad der Immunsierungskonjugate

Die Immunsierungskonjugate wurden mit einem molaren Verhältnis von Peptid zu CTB von 25:1 im Syntheseansatz hergestellt (siehe 3.3.1). Im entstandenen Produkt lag eine Mischung aus unterschiedlich hoch beladenen CTB-Molekülen vor, die über SDS-PAGE getrennt werden konnten. Nach Coomassie-Färbung wurde für jedes Konjugat ein Derivatisierungsprofil erstellt (siehe Abbildung 5-2), aus dem ersichtlich wurde, mit welchem prozentualen Anteil die einzelnen Derivatisierungsstufen im Gemisch vorhanden waren (siehe 3.3.1, Gleichung 1).

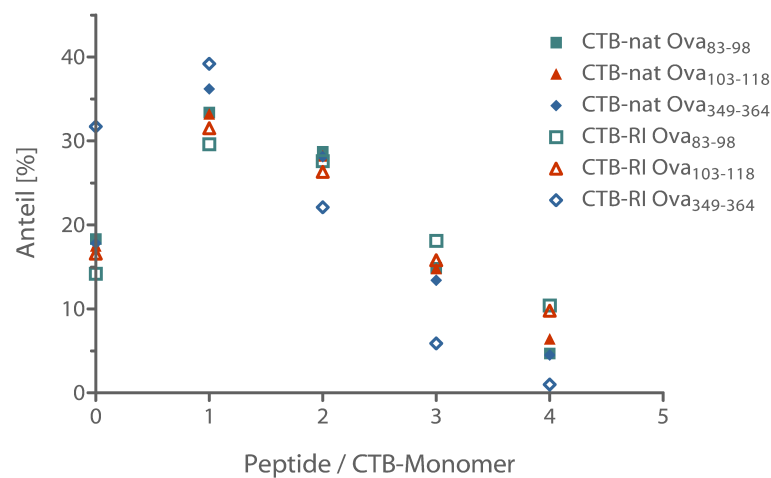


Abbildung 5-2: Derivatisierungsprofil der Immunsierungskonjugate.

Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die einzelnen Derivatisierungsgrade quantifiziert und in Relation gesetzt (nat: natürliche Peptide, RI: retro-inverse Peptide).

Im statistischen Mittel waren ein bis zwei Peptide je CTB-Monomer gebunden (siehe Tabelle 5-1), wobei ein Maximum in der Verteilung bei der Beladung mit einem Peptid auftrat (siehe Abbildung 5-2). Für das RI Peptid Ova₃₄₉₋₃₆₄ lag ein verhältnismäßig großer Teil an unkonjugiertem CTB im Gemisch vor, während die hochkonjugierten Anteile gering ausfielen. Für dieses Konjugat findet sich daher im statistischen Mittel auch die geringste Peptidbeladung.

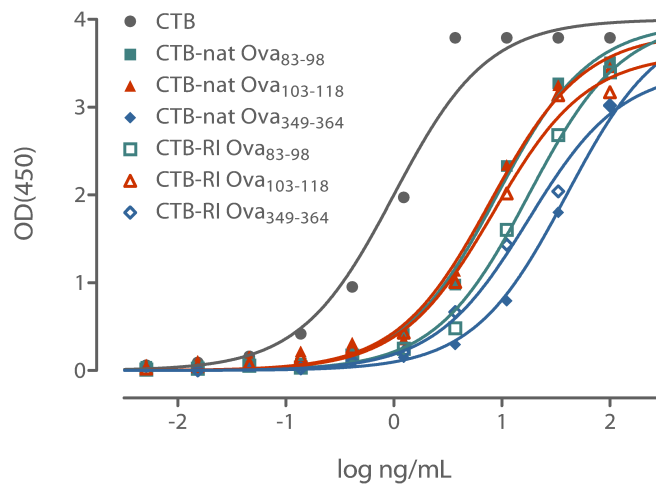
Tabelle 5-1: Mittlerer Derivatisierungsgrad der Immunisierungskonjugate.

	mittlerer Derivatisierungsgrad	
	Monomer	Pentamer
CTB-nat Ova ₈₃₋₉₈	1,5	7,5
CTB-nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	1,6	8,0
CTB-nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	1,5	7,5
CTB-RI Ova ₈₃₋₉₈	1,8	9,0
CTB-RI Ova ₁₀₃₋₁₁₈	1,7	8,5
CTB-RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	1,1	5,5

nat: natürliche Peptide, RI: retro-inverse Peptide

G_{M1}-Bindefähigkeit der Immunisierungskonjugate

Die G_{M1}-Bindefähigkeit der Konjugate wurde im ELISA überprüft (siehe 3.11.1).

**Abbildung 5-3: G_{M1}-Bindung der Immunisierungskonjugate.**

Serielle Verdünnungen der Konjugate wurden im G_{M1}-Fänger-ELISA aufgetragen und detektiert. (nat: natürliche Peptide, RI: retro-inverse Peptide)

Für alle in der Immunisierungsstudie verwendeten CTB-Peptid-Konjugate konnte im ELISA-Format eine intakte G_{M1}-Bindefähigkeit nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-3). Zwar ist die Bindung der konjugierten CTB-Derivate schwächer als die Bindung von unkonjugiertem

CTB, doch liegen die EC(50)-Werte der Konjugate in der durch die Optimierungsversuche vorhergesagten Größenordnung. Die Konjugate sollten somit für den Einsatz als mukosale Targetingsysteme geeignet sein.

5.1.3 Murines Serumalbumin

Da sich wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben gezeigt hat, dass die Gegenwart von zusätzlichem Protein die Stabilität von Targetingliganden in muriner Intestinalflüssigkeit erhöht, erhielten in der Immunisierungsstudie drei Gruppen von Mäusen zusätzlich zu jeweils einem natürlichen Peptidkonjugat über die intragastrale Route murines Serumalbumin (siehe 3.9.2).

Das murine Serumalbumin wurde aus dem Serum von weiblichen Balb/c-Mäusen – also Tieren des selben Inzuchtstamms wie diejenigen in der Immunisierungsstudie – isoliert (siehe 3.1.3), um keine adversen Immunreaktionen durch die zusätzliche Komponente hervorzurufen.

Die Analyse der aus dem Serum isolierten Albumin-Fraktion mittels SDS-PAGE ergab eine Reinheit von 88 %.

5.2 Kontrollen zum Verlauf der Immunisierung

5.2.1 Präimmunstatus

Vor Beginn der Immunisierungsstudie wurde allen Tieren Blut abgenommen, um den Präimmunstatus bewerten zu können. Die Präimmunseren der Tiere wurden auf vorhandene IgG-Antikörper gegen Ovalbumin und gegen die Peptide getestet, mit denen sie später immunisiert werden sollten. Die Kontrollgruppen, welche später nur Adjuvans oder reine Pufferlösung appliziert bekommen sollten (siehe 3.9.1, Tabelle 3-4), wurden auf Antikörper gegen alle drei natürlichen und alle drei retro-inversen Peptide überprüft. Endpunkttiter konnten in diesen ELISAs für sämtliche Präimmunseren nicht ermittelt werden, da die OD-Werte stets unterhalb der entsprechenden Schwellenwerte (siehe 3.11.2) der Mikroplatten lagen (siehe Abbildung 5-4 bis Abbildung 5-6).

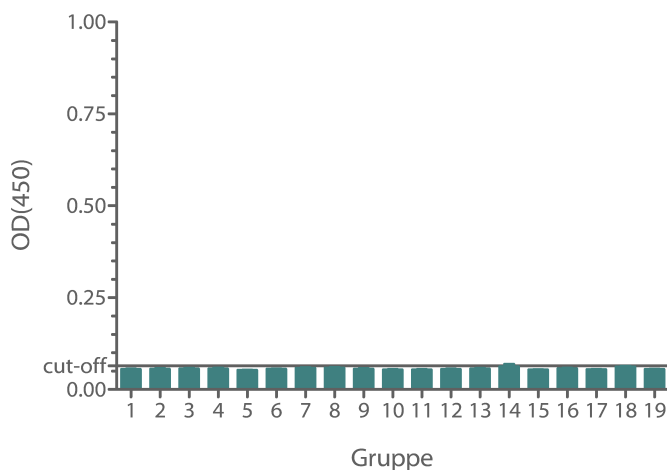


Abbildung 5-4: anti-Ova IgG in Präimmunseren.

Angegeben sind die OD-Werte bei 450 nm bei einer Probenverdünnung von 1:75, die Linie (cut-off) markiert den mittleren Schwellenwert der verwendeten Platten ($n = 7$; Mittelwerte + Standardfehler). Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3-4.

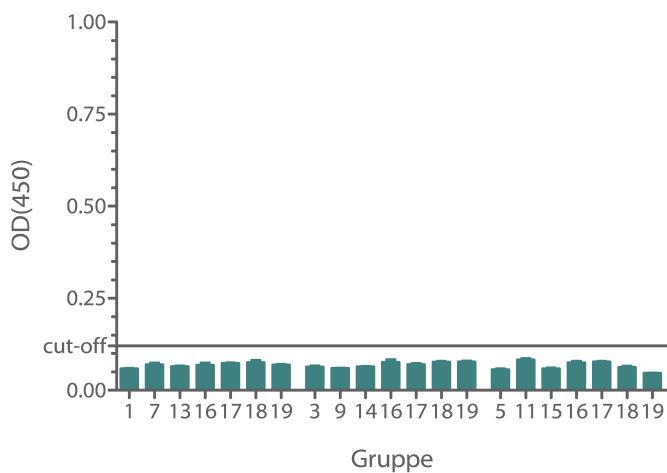


Abbildung 5-5: anti-nat-Peptid IgG in Präimmunseren.

Angegeben sind die OD-Werte bei 450 nm bei einer Probenverdünnung von 1:75, die Linie (cut-off) markiert den mittleren Schwellenwert der verwendeten Platten (n = 7; Mittelwerte + Standardfehler). Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3-4.

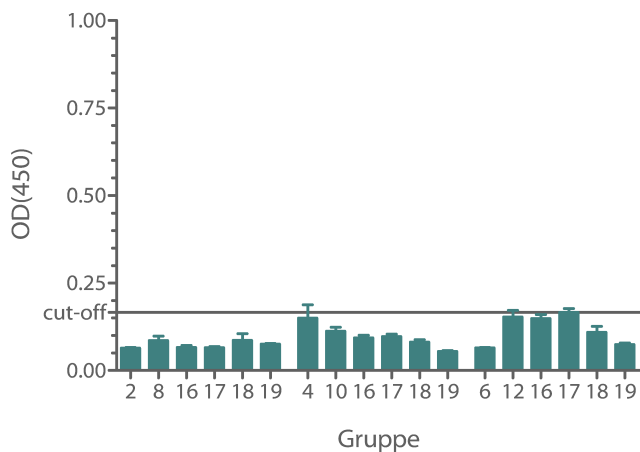


Abbildung 5-6: anti-RI Peptid IgG in Präimmunseren.

Angegeben sind die OD-Werte bei 450 nm bei einer Probenverdünnung von 1:75, die Linie (cut-off) markiert den mittleren Schwellenwert der verwendeten Platten (n = 7; Mittelwerte + Standardfehler). Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3-4.

Alle Tiere konnten hinsichtlich der Versuchsanordnung als immunologisch naiv betrachtet werden.

5.2.2 Allgemeiner Zustand der Tiere im Verlauf der Studie

Als Kriterien für den allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere dienten die Entwicklung des Körpergewichtes sowie eine visuelle Kontrolle des körperlichen Zustandes und der motorischen Aktivität.

Im Verlauf der Studie lag die durchschnittliche Entwicklung der Körpergewichte aller Tiere in dem vom Hersteller angegebenen altersentsprechenden Rahmen¹¹. Innerhalb von 54 Tagen nahmen die Tiere im Mittel um 20,9 ($\pm 5,3$) % zu (siehe Abbildung 5-7). Bei einzelnen Tieren kam es zum Ende der Studie gelegentlich zu Gewichtsabnahmen von 1-2 % verglichen mit der vorangegangenen Messung 14 bis 16 Tage zuvor. Da die Körpergewichte nach den ersten Wochen im Mittel aber bei allen Tieren weniger schnell zunahmten, konnte dies als normal betrachtet werden, insbesondere da im Aussehen oder Verhalten der Mäuse keine Anzeichen für eine Krankheit auftraten.

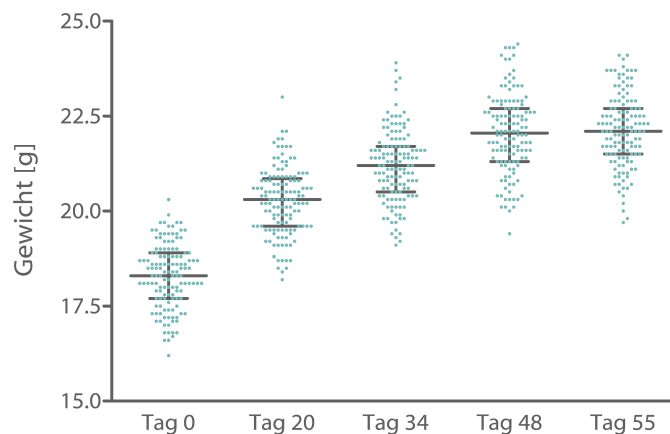


Abbildung 5-7: Verlauf der Körpergewichte während der Immunisierungsstudie.

Dargestellt sind die Mediane mit den Interquartilen sowie die einzelnen Werte für jede Maus.

Bei intragastralen Immunisierungen starben insgesamt 4 Tiere (bei 1,3 % der durchgeführten intragastralen Eingriffe) während der Narkose, jedoch nie mehr als eines pro Gruppe.

¹¹ http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_c_BALB_c_mice.pdf

5.2.3 Anti-CTx IgG als Erfolgskontrolle

Im anti-CTx ELISA mit Präimmunsereen erkennt man den naiven Status aller Gruppen vor Beginn der Immunisierungen (siehe Abbildung 5-8 und Abschnitt 5.2.1). Nach vier Immunisierungen mit CTB-Konjugaten (Gruppen 1 bis 15, siehe Tabelle 3-4) oder mit unkonjugiertem CTB (Gruppen 17 und 19) weisen die Seren bei gleicher Verdünnung wie zu Beginn hohe OD-Werte auf, während die Seren derjenigen Kontrollgruppen, die ausschließlich Puffer verabreicht bekamen (16 und 18), auch nach den Immunisierungen keine signifikant vom Schwellenwert der Platten abweichenden Signale erzeugen (siehe Abbildung 5-9).

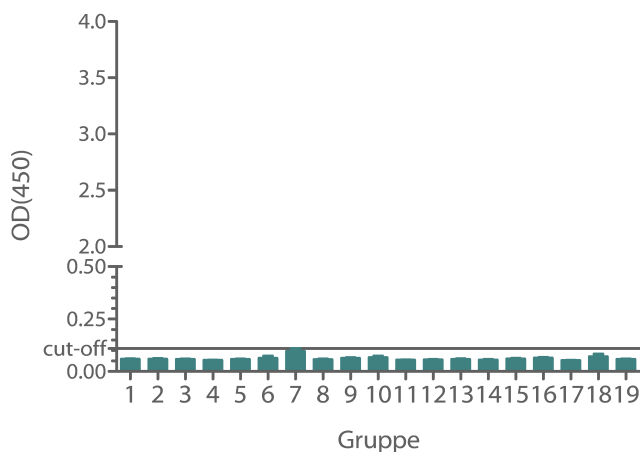


Abbildung 5-8: anti-CTx IgG in den Präimmunsereen.

Angegeben sind die OD-Werte bei 450 nm bei einer Probenverdünnung von 1:75, die Linie (cut-off) markiert den mittleren Schwellenwert der verwendeten Platten (n = 7; Mittelwerte + Standardfehler). Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3-4.

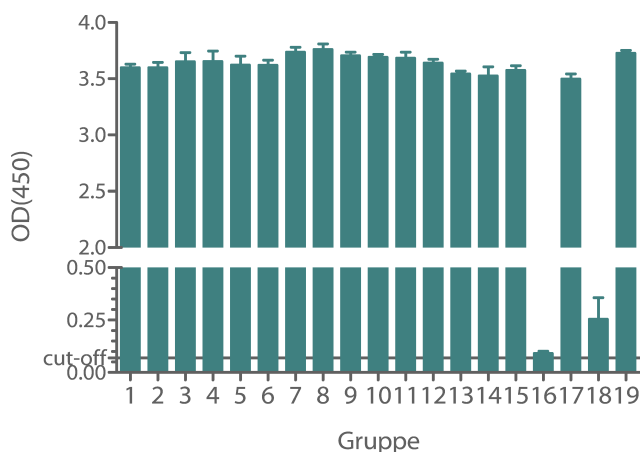


Abbildung 5-9: anti-CTx IgG in den finalen Serumproben.

Angegeben sind die OD-Werte bei 450 nm bei einer Probenverdünnung von 1:75, die Linie (cut-off) markiert den mittleren Schwellenwert der verwendeten Platten (n = 7; Mittelwerte + Standardfehler). Gruppeneinteilung siehe Tabelle 3-4.

Daraus lässt sich ableiten, dass das Immunsystem aller Mäuse auf die Gabe der Immunisierungskonjugate beziehungsweise des unkonjugierten Targetingliganden reagiert hat.

5.2.4 Antigenität des Konjugationslinkers

Um zu erkennen, ob durch die Immunisierung auch Antikörper gegen den Crosslinker, über den die Kopplung der Peptide an CTB erfolgte, induziert worden sind, wurde ein anti-Crosslinker-ELISA mit nicht sequenzverwandten Peptiden durchgeführt (siehe 3.11.3).

Als Kontrolle dienten Peptide der Sequenz KIKQIINMWQEVGKAMYAC (nach Analyse mit dem Programm LALIGN (Huang und Miller, 1991) höchstens 10,5 % Sequenzübereinstimmung zu den Immunisierungspeptiden), die über den gleichen Crosslinker, der die Immunisierungspeptide an den Targetingliganden CTB band, linear zu Peptomeren polymerisiert waren.

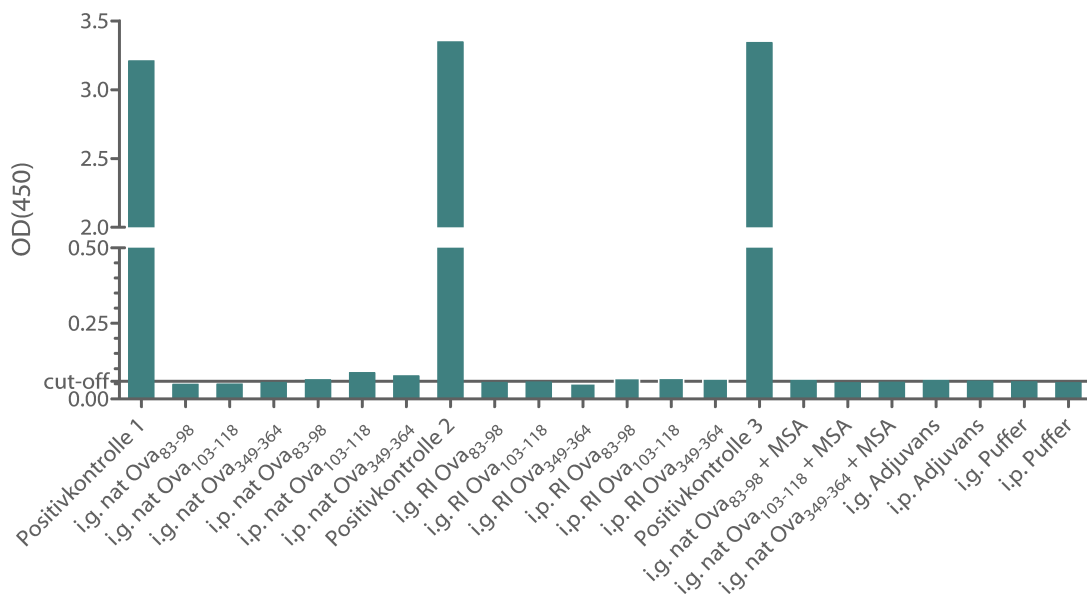


Abbildung 5-10: Erkennung des Crosslinkers in Peptomeren.

Erkennung durch Seren der Immunisierungsstudie im ELISA mit 1:75 verdünnten Seren. Als Positivkontrolle dienten Seren aus peptomerimmunisierten Mäusen. Die Linie (cut-off) markiert den mittleren Schwellenwert der verwendeten Platten (i.g.: intragastral; i.p.: intraperitoneal; MSA: murines Serumalbumin)

Es traten in keinem der Seren aus der hier durchgeführten Immunisierungsstudie mit CTB-Peptid-Konjugaten wesentliche Signale auf (siehe Abbildung 5-10), während die Peptomere als Positivkontrollen hohe OD-Werte erzeugten. In den Seren aus der hier durchgeführten Studie waren offenbar keine Antikörper gegen den Crosslinker gebildet worden, welche weitere Auswertungen im ELISA mit BSA-Peptid-Konjugaten hätten verfälschen können.

5.3 Spezifische anti-Peptid Endpunkttiter

5.3.1 Anti-Peptid IgG-Titer im Serum

Für die Bestimmung der induzierten spezifischen Antikörper gegen das verabreichte Immunisierungspeptid wurden Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen BSA-Peptid-Konjugat beschichtet und anschließend im ELISA die Endpunkttiter bestimmt (siehe 3.11.2).

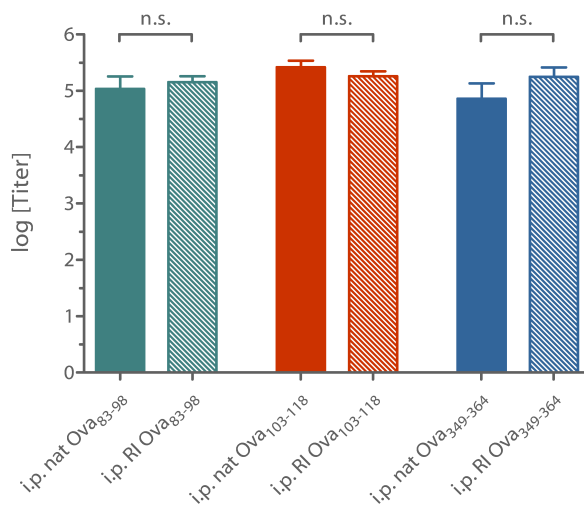


Abbildung 5-11: anti-Peptid IgG-Titer im Serum nach systemischer Immunisierung.

Endpunkttiter nach 4 intraperitonealen (i.p.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni)

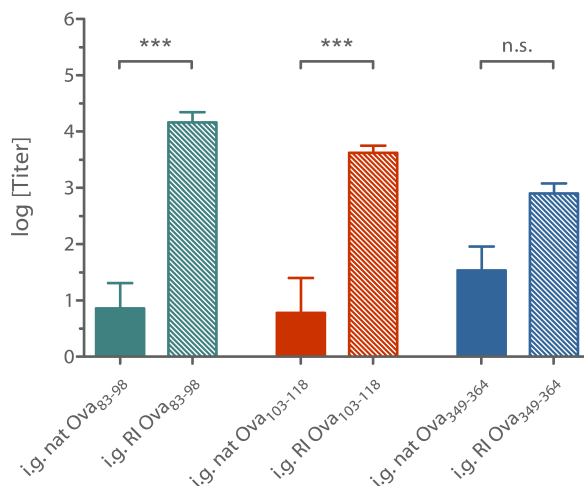


Abbildung 5-12: anti-Peptid IgG-Titer im Serum nach intragastraler Immunisierung.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni)

In den Serumproben fanden sich am Ende der Studie, also nach viermaliger intraperitonealer (i.p.) Gabe von Antigenlösungen, hohe Peptid-spezifische IgG-Titer von 10^5 bis 10^6 , unabhängig von der verwendeten Peptidsequenz als auch von natürlicher oder retro-inverser

Form (siehe Abbildung 5-11). Generell waren also alle drei Peptide sowohl in ihrer natürlichen Form als auch als retro-inverse Mimetika in der Lage, eine starke systemische Immunreaktion auszulösen.

Nach intragastraler Gabe fanden sich im Serum generell niedrigere IgG-Titer als nach systemischer Immunisierung. Hier traten nach Immunisierung mit retro-inversen Peptiden Titer von 10^3 bis 10^4 auf. Die Titer der durch natürliche – verdauungslabile – Peptide induzierten Antikörper lagen stets niedriger bei 10^1 bis 10^2 (siehe Abbildung 5-12). Für die Peptide 1 und 2 war dieser Unterschied deutlich signifikant ($p < 0,001$; einfaktorische Varianzanalyse, post hoc Test nach Bonferroni).

5.3.2 Anti-Peptid IgA im Fäzes

Nach systemischer Applikation der Immunisierungskonjugate wurde hier auch eine IgA-Antwort an der intestinalen Mukosa beobachtet. Im Fäzes traten spezifische IgA-Titer von 10^1 bis 10^2 auf. Wie bei den IgG-Titern im Serum wichen die Endpunkttiter nach Immunisierung mit retro-inversen Peptidkonjugaten nicht signifikant von denjenigen nach Immunisierung mit natürlichen Peptidkonjugaten ab. Eine Ausnahme stellte hier das Paar nat Ova₈₃₋₉₈ – RI Ova₈₃₋₉₈ dar, bei dem ein signifikant höherer IgA-Titer im Fäzes nach systemischer Immunisierung mit der retro-inversen Variante gefunden wurde (siehe Abbildung 5-13).

Die gewünschte mukosale Immunantwort in Form von IgA-Titern im Fäzes nach intragastraler Immunisierung war nach Gabe von retro-inversen Peptidkonjugaten stets signifikant höher als nach Gabe der natürlichen Analoga (einfaktorische Varianzanalyse, post hoc Test nach Bonferroni). Endpunkttiter konnten für die natürlichen Peptide hier überhaupt nur für Ova₈₃₋₉₈ bestimmt werden. Für die anderen beiden Peptide verschwanden die Titer hinter den Kontrolltitern aus den adjuvansimmunisierten Tieren (siehe Abbildung 5-14).

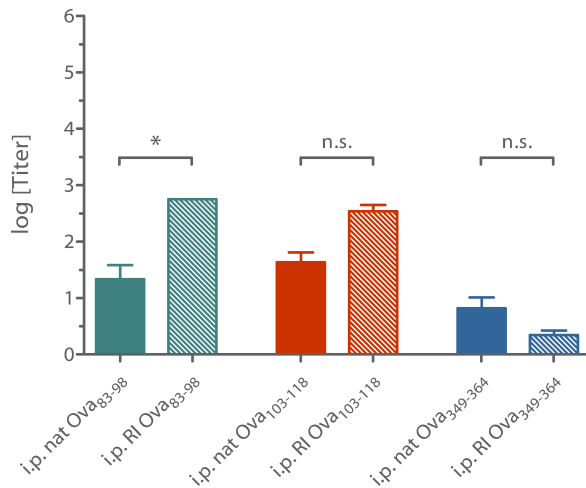


Abbildung 5-13: anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes nach systemischer Immunisierung.

Endpunkttiter nach 4 intraperitonealen (i.p.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni)

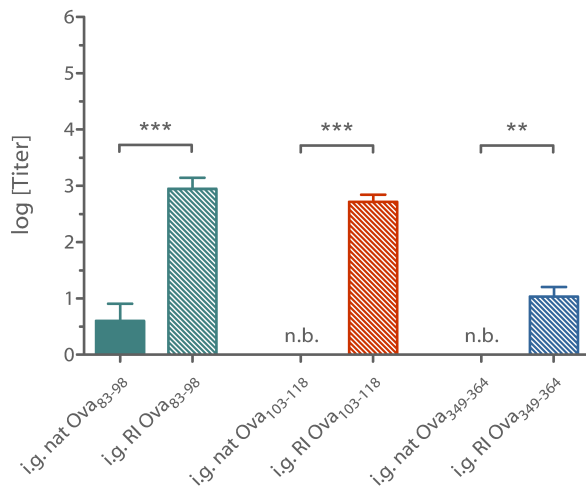


Abbildung 5-14: anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes nach intragastraler Immunisierung.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni; n.b.: nicht bestimmbar)

5.3.3 Anti-Peptid IgA in Intestinalflüssigkeit

Die Titer der gegen die Peptide gerichteten IgA-Antikörper, die in den Intestinalflüssigkeiten der Tiere gemessen wurden, glichen im Wesentlichen den Ergebnissen für die anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes.

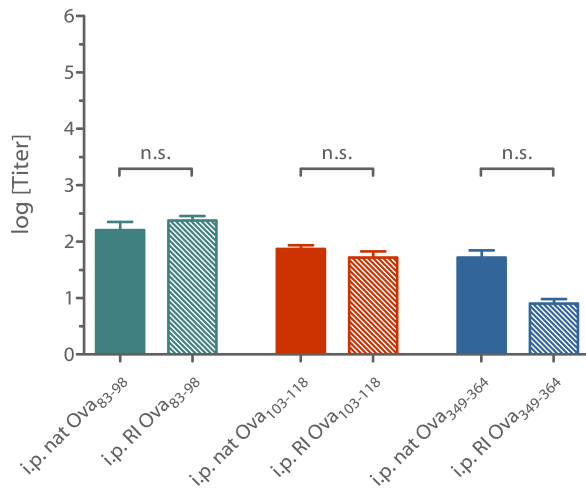


Abbildung 5-15: anti-Peptid IgA-Titer in Intestinalflüssigkeit nach systemischer Immunisierung.

Endpunkttiter nach 4 intraperitonealen (i.p.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni)

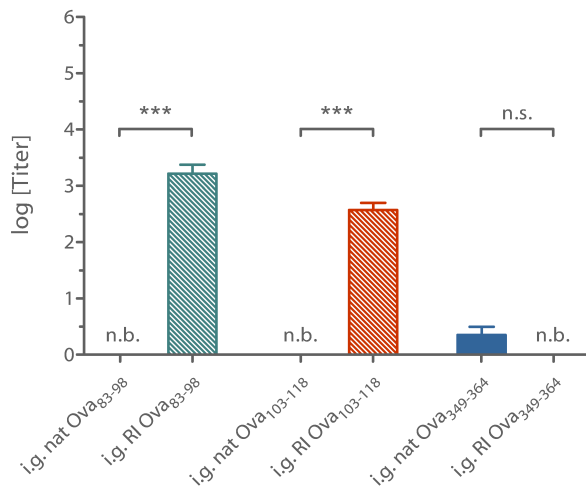


Abbildung 5-16: anti-Peptid IgA-Titer in Intestinalflüssigkeit nach intragastraler Immunisierung.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni; n.b.: nicht bestimmbar)

Auch hier fanden sich keine Unterschiede zwischen den natürlichen und retro-inversen Peptidpaaren nach systemischer Immunisierung (siehe Abbildung 5-15). Nach intragastraler Gabe natürlicher Peptide waren für die Peptide Ova₈₃₋₉₈ und Ova₁₀₃₋₁₁₈ keine IgA-Titer bestimmbar, während nach Gabe dieser Peptide als retro-inverse Mimetika Titer im Bereich von 10^3 gemessen wurden. Gegen das retro-inverse Peptid Ova₃₄₉₋₃₆₄ traten keine höheren IgA-Titer auf als in der Kontrollgruppe. Für das natürliche Peptid Ova₃₄₉₋₃₆₄ wurde hier jedoch ein – wenn auch sehr schwacher – Titer gemessen (siehe Abbildung 5-16).

5.3.4 Effekt von Proteinzusatz auf anti-Peptid Titer

Durch Vergleich von Gruppen, die intragastral nur mit natürlichen Peptidkonjugaten immunisiert wurden, und Gruppen, die zusätzlich zu den jeweiligen Peptidkonjugaten murines Serumalbumin erhielten (siehe 3.9.2), sollten Effekte dieses zugesetzten „Bystanderproteins“ auf die induzierten Antikörpertiter bewertet werden.

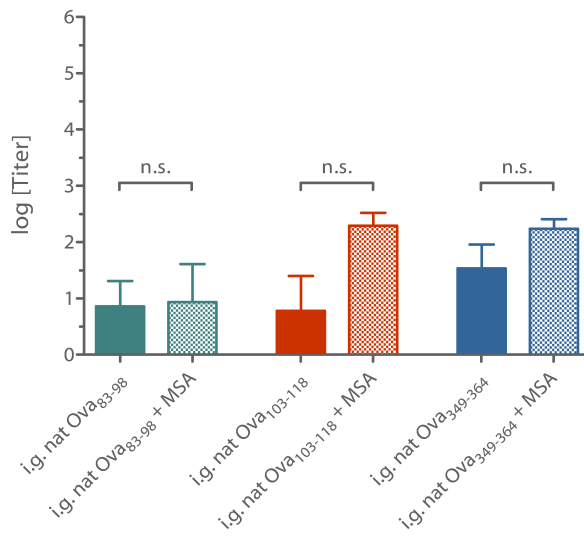


Abbildung 5-17: anti-Peptid IgG-Titer in Serum nach intragastraler Immunisierung mit MSA-Zusatz.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni)

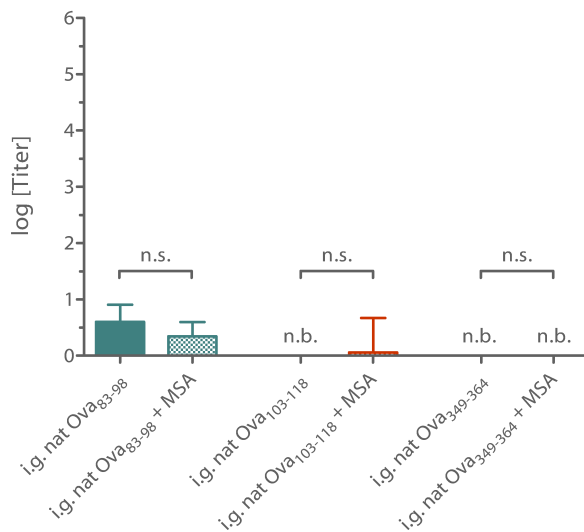


Abbildung 5-18: anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes nach intragastraler Immunisierung mit MSA-Zusatz.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni; n.b.: nicht bestimmbar)

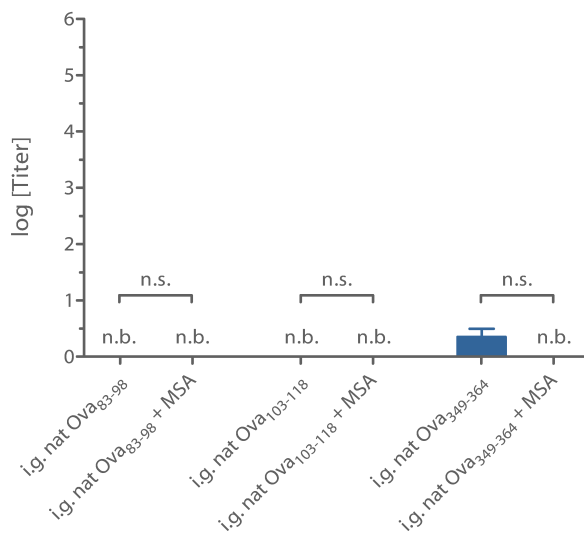


Abbildung 5-19: anti-Peptid IgA-Titer in Intestinalflüssigkeit nach intragastraler Immunisierung mit MSA-Zusatz.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; Statistik: ANOVA/Bonferroni; n.b.: nicht bestimmbar)

Die Titer wurden *in vivo* durch Proteinzusatz nicht erkennbar beeinflusst. Weder die IgG-Titer im Serum (siehe Abbildung 5-17) noch die IgA-Titer in Fäzes (siehe Abbildung 5-18) oder Intestinalflüssigkeit (siehe Abbildung 5-19) änderten sich signifikant durch Zusatz von MSA zur intragastralen Immunisierungslösung.

5.3.5 Zur Antikörperbindung essentielle Aminosäuren

Die für eine Antikörperbindung essentiellen Aminosäuren in den Peptiden wurden über einen Aminosäureaustausch-Assay („Alanin-Scan“) ermittelt (siehe 3.11.4). Der punktuelle Austausch einzelner Aminosäuren durch Alanin (bzw. Alanin durch Glycin), die an der Antikörperbindung partizipieren, führte zu einer Schwächung der Bindung an das Peptid verglichen mit der Originalsequenz.

Für den Fall des Peptides Ova₃₄₉₋₃₆₄ mit der Sequenz VDAASVSEEFRAADHPF stimmten die für die Erkennung durch Serum-IgG relevanten Aminosäuren in natürlicher und retro-inverser Form überein. Im natürlichen Peptid führte der Austausch der Aminosäuren von Position 9 bis 16 zu einer Schwächung der Antikörperbindung (siehe Abbildung 5-20), im retro-inversen Peptid der Austausch der Positionen 1 bis 7 (siehe Abbildung 5-21). Da die Sequenz der Aminosäuren im retro-inversen Peptid umgekehrt ist, entsprechen diese Positionen den Aminosäuren 16 bis 10 in der natürlichen Form. Innerhalb dieses Sequenzbereichs finden sich gehäuft aromatische (F) oder geladene Aminosäuren (R, H, D), die aufgrund ihrer Eigenschaften an intermolekulare Wechselwirkungen zum Beispiel mit Immunglobulinen teilhaben können.

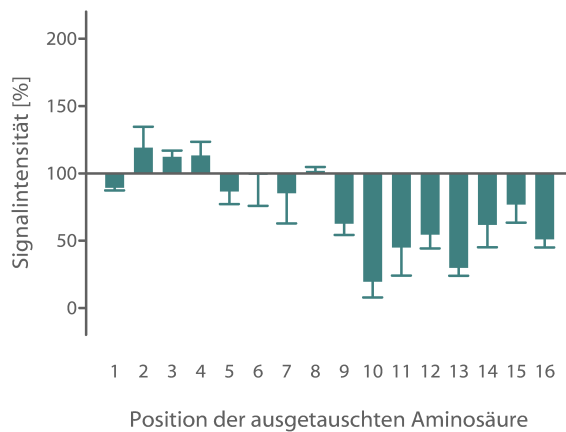


Abbildung 5-20: Aminosäurenaustausch im Peptid natOva₃₄₉₋₃₆₄.

Erkennung durch Gruppenserum der i.p. immunisierten Mäuse. 100% entspricht der Erkennung des natürlichen Originalpeptids.

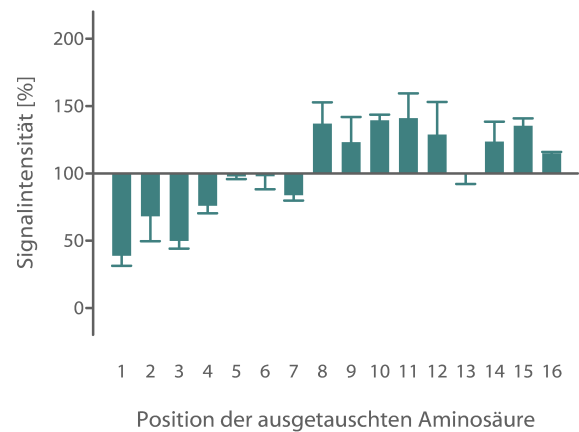


Abbildung 5-21: Aminosäurenaustausch im Peptid RI Ova₃₄₉₋₃₆₄.

Erkennung durch Gruppenserum der i.p. immunisierten Mäuse. 100% entspricht der Erkennung des retro-inversen Originalpeptids.

Für die anderen beiden Peptidpaare konnten solche Analogien zwischen den antikörperbindenden Aminosäuren in natürlichem und retro-inversem Peptid nicht gefunden werden. Hier verteilten sich die Aminosäuren, deren Austausch durch Alanin zu einer Minderung der Antikörperbindung führte, über die gesamte Sequenz, wobei in diesen Sequenzen auch die Verteilung von geladenen oder aromatischen Aminosäuren heterogener war als in dem oben dargestellten Peptid.

5.4 Kreuzreaktivitäten der Antikörper

Neben den spezifischen Antikörpertitern, die sich nach Immunisierung mit einem der Peptidkonjugate gegen dieses spezifische Peptid richteten, waren auch Kreuzreaktivitäten zwischen den beiden Peptidmodifikationen von Interesse. Daher wurden im ELISA-Format Serum-IgG oder Fäzes-IgA auf die Bindung an diejenige Modifikation überprüft, die nicht zur Immunisierung in dem jeweiligen Tier eingesetzt wurde.

Ein weiteres Ziel der Peptidimmunisierungen war die Induktion von Antikörpern, welche nicht nur die isolierten Peptidsequenzen wiedererkennen, sondern an diese auch im Gesamtproteinkontext binden. Da die eingesetzten Immunisierungspeptide ursprünglich aus der Sequenz des Ovalbumins stammen (siehe Abschnitt 4.3), wurde zusätzlich im ELISA Ovalbumin als immobilisierte Fängerkomponente zur Bestimmung der Endpunkttiter eingesetzt (siehe 3.11.2).

5.4.1 Kreuzreaktivitäten nach Immunisierung mit natürlichen Peptiden

Die hohen spezifischen IgG-Titer gegen das jeweilige systemisch eingesetzte Immunisierungspeptid im Serum (siehe 5.3.1) spiegelten sich darin wider, dass auch die korrespondierenden retro-inversen Peptide von diesen durch natürliche Peptide induzierten IgG-Antikörpern erkannt wurden (siehe Abbildung 5-22). Allerdings waren diese Titer stets signifikant niedriger als die jeweiligen anti-nat Peptid Titer ($p < 0,001$; einfaktorielle Varianzanalyse, post hoc Test nach Bonferroni). Auch das gesamte Ovalbumin-Protein wurde nach allen drei systemischen Immunisierung mit natürlichem Peptid durch Serum-IgG erkannt. Für den Fall der Peptide Ova₁₀₃₋₁₁₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ ist diese Erkennung etwas besser als die Kreuzerkennung der RI Peptide, wobei der Unterschied aber statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,05$; einfaktorielle Varianzanalyse, post hoc Test nach Bonferroni).

Nach intragastraler Immunisierung mit natürlichen Peptiden war nur das Peptid Ova₈₃₋₉₈ in der Lage gewesen, peptidspezifisches IgA zu induzieren, das im Fäzes über dem Hintergrund nachgewiesen werden konnte (siehe 5.3.2). Diese Antikörper waren schwach kreuzreaktiv mit dem analogen RI Peptid, aber vollständig mit Ovalbumin, wobei dieser Titer bei einer geringen Höhe im Bereich von $10^{0,5}$ lag (siehe Abbildung 5-23).

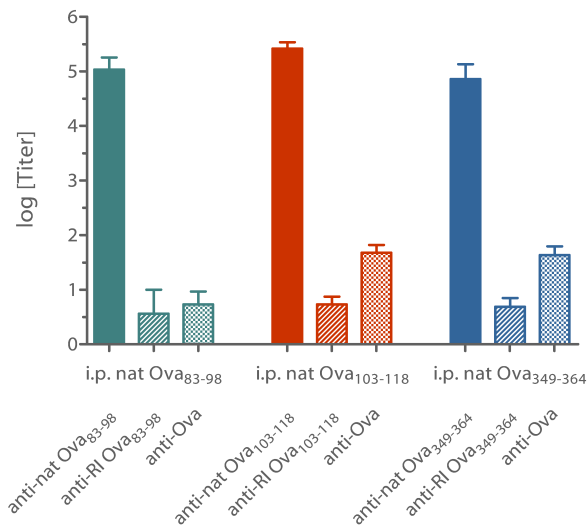


Abbildung 5-22: Kreuzerkennung durch anti-nat IgG im Serum.

Endpunkttiter nach 4 intraperitonealen (i.p.) Applikationen von natürlichen Peptiden. (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler)

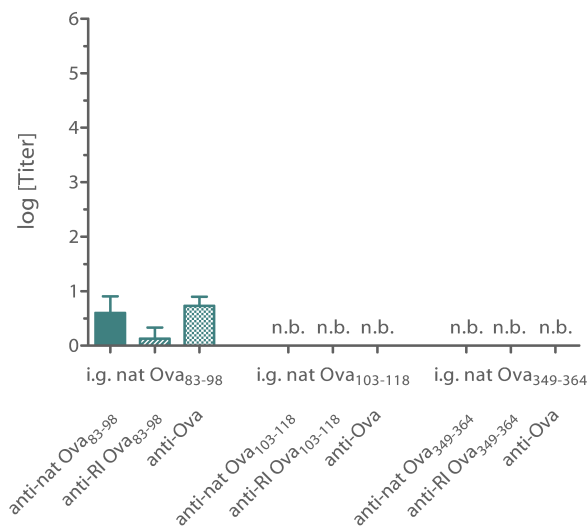


Abbildung 5-23: Kreuzerkennung durch anti-nat IgA im Fäzes.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen von natürlichen Peptiden. (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; n.b.: nicht bestimmbar)

5.4.2 Kreuzreaktivitäten nach Immunisierung mit retro-inversen Peptiden

Obwohl die systemischen Immunisierungen mit RI Peptiden zu vergleichbar hohen peptidspezifischen Serum-IgG-Titern geführt hatten wie mit natürlichen Peptiden (siehe 5.3.1), erkannten diese Antikörper das Ovalbumin als Gesamtprotein nicht. Auch die natürlichen Vorbilder der RI modifizierten Peptide wurden nur im Falle der mit RI Ova₈₃₋₉₈ immunisierten Tiere erkannt. Dies allerdings auch nur mit einem Titer, der deutlich unter demjenigen der RI Peptid-Selbsterkennung lag (siehe Abbildung 5-24).

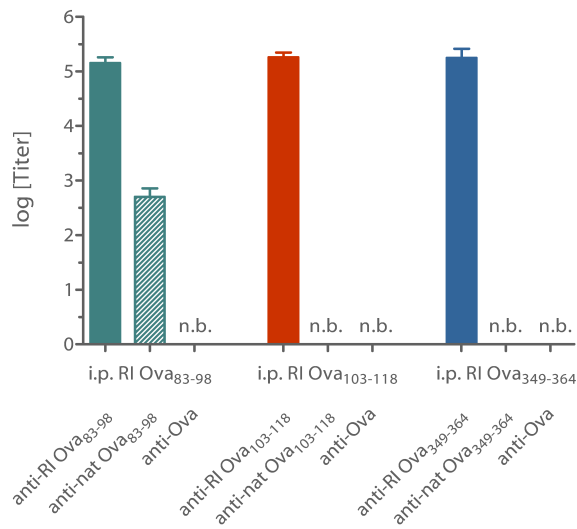


Abbildung 5-24: Kreuzerkennung durch anti-RI IgG im Serum.

Endpunkttiter nach 4 intraperitonealen (i.p.) Applikationen von RI Peptiden. (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; n.b.: nicht bestimmbar)

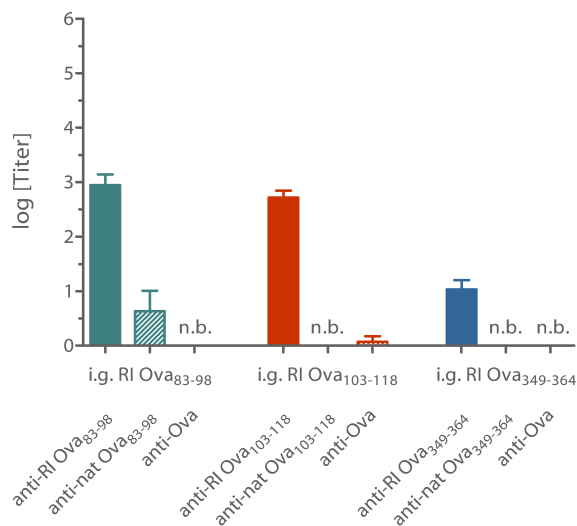


Abbildung 5-25: Kreuzerkennung durch anti-RI IgA im Fäzes.

Endpunkttiter nach 4 intragastralen (i.g.) Applikationen von RI Peptiden. (n = 6-7; Mittelwert ± Standardfehler; n.b.: nicht bestimmbar)

Nach intragastraler Immunisierung mit RI Peptiden traten relativ hohe RI Peptidspezifische IgA-Titer im Fäzes auf (siehe 5.3.2). Doch die Kreuzerkennung von analogen natürlichen Peptid- oder Proteinstrukturen war ähnlich der nach systemischer Immunisierung mit RI Peptiden festgestellt. Ovalbumin wurde von keiner anti-RI Peptid IgA-Probe erkannt und Ova₈₃₋₉₈ war als einziges Peptid in der Lage, in seiner retro-inversen Form IgA zu erzeugen, welches zumindest natürliches Ova₈₃₋₉₈ erkannte (siehe Abbildung 5-25).

6 Diskussion

Trotz des Vorhandenseins zahlreicher systemischer Impfstoffe ist die Entwicklung oraler Vakzine von besonderem Interesse. Der explizite Nutzen liegt darin, dass sekretorisches IgA, welches nur nach mukosaler Aufnahme des Antigens zuverlässig gebildet wird (Ogra *et al.*, 2001; Holmgren *et al.*, 2003; Boyaka *et al.*, 2005), im Darmlumen die erneute Aufnahme seines Antigens verhindert. Diese Immunexklusion ist von besonderer Bedeutung, wenn die Ausbreitung eines Pathogens nach erfolgter Infektion des Epithels nicht mehr oder nur unzureichend aufgehalten werden kann, wie es zum Beispiel bei Infektionen mit HIV oder Prionen der Fall ist. Es scheint jedoch ein hoher pathogenspezifischer S-IgA-Titer nötig zu sein, um jedwede mukosal auftretende Dosis eines Pathogens sicher zu eliminieren (Bade *et al.*, 2006). Für eine erfolgreiche Immunisierung an der intestinalen Mukosa muss daher ein potentes Antigen zur Verfügung stehen, das allen Anforderungen an ein effektives aber sicheres Medikament genügt, und das in der proteolytischen Umgebung des Dünndarms ausreichend stabil ist um effizient aufgenommen zu werden. Im Blickpunkt dieser Arbeit standen daher die Fragen nach der Verdauungsstabilität von Antigenen und von Targeting-liganden, welche die Aufnahme an der Schleimhaut verbessern sollen, sowie nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der Stabilität von Antigenen und der Stärke der induzierten Immunantwort.

Zur Betrachtung dieses komplexen Problems wurden als Antigene nicht ganze Proteine sondern einzelne Epitope in Form von linearen Peptiden verwendet. Solche Peptidvakzine haben neben dem Nutzen der gut definierten antigenen Struktur auch eine erhebliche kommerzielle Bedeutung, da sie in großen Mengen frei von biologischen Kontaminationen produziert werden können. Das Fehlen eines schützenden Proteingerüsts birgt allerdings die Gefahr, beim Einsatz in mukosalen Impfstoffen besonders proteolyseanfällig zu sein. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Überprüfung, ob eine Stabilisierung peptidischer Antigene durch retro-inverse Modifikation (siehe 1.3.1) zu einer verbesserten mukosalen Immunantwort führt. Darüberhinaus galt es zu klären, ob retro-invers modifizierte Peptide ihre natürlichen Analoga in ausreichendem Maße imitieren, um potentiell protektive Antikörper zu induzieren.

6.1 Bewertung von Verdauungsstabilitäten

6.1.1 Simulation natürlicher Intestinalflüssigkeit

Unverdünnte Intestinalflüssigkeit

Um die Faktoren, die eine proteolytische Degradation von Wirkstoffen im Dünndarm beeinflussen, beurteilen zu können, ist es notwendig, die Situation *in vivo* zu kennen. Da Konzentrations- oder Aktivitätsmessungen von Bestandteilen der Intestinalflüssigkeit im lebenden Organismus nicht ohne Weiteres möglich sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit natürliche Intestinalflüssigkeit aus Balb/c-Mäusen – dem Stamm, der auch in der Immunisierungsstudie als Modellorganismus diente – isoliert (siehe 3.6.1). Die angewandte Methode zur Extraktion von Intestinalflüssigkeit war schonend genug, um eine Schädigung des Darmepithels zu vermeiden (persönliche Mitteilung S. Bade). Ein besonderer Vorteil dieser Art der Gewinnung natürlicher Intestinalflüssigkeit ist die Möglichkeit, Untersuchungen direkt im unverdünnten *ex vivo*-System durchzuführen. Dadurch sind die Bestandteile der Intestinalflüssigkeit aus dem lebenden Organismus *in vitro* verfügbar ohne dass mit störenden Effekten durch Pufferzugabe oder ähnlichem gerechnet werden müsste.

Erst die technische Durchführbarkeit setzt diesem *in vivo*-nahen System Grenzen: bei Zeiträumen im Minutenbereich und darunter wird eine Probennahme nicht mehr durchführbar. Hier können aber alternativ serielle Verdünnungen einen zeitlichen Verlauf ersetzen (Gorris, 2005). Für Versuche, bei denen die zeitliche Auflösung kein Hindernis darstellt, sollte aber immer ein Ansatz mit unverdünnter natürlicher Intestinalflüssigkeit favorisiert werden.

Wahl der zu simulierenden Parameter

Wenn in früheren Studien Verdauungsstabilitäten beliebiger Strukturen geprüft werden sollten, so wurden die Analyten in den meisten Fällen nur einzelnen Proteasen (meist Trypsin, eventuell Chymotrypsin) ausgesetzt (Woodley, 1994). Dadurch können zwar Aussagen über spezifische Stabilitäten getroffen werden und es können Vergleiche – zum Beispiel zwischen zwei unterschiedlichen Modifikationen – im Hinblick auf Proteaseresistenzen gezogen werden, doch die Stabilität in dem komplexen Gemisch von Proteasen im Gastrointestinaltrakt und die zahlreichen weiteren Einflussgrößen im natürlichen Organismus können nicht abgeschätzt werden. Hier ist die Verwendung einer Enzymmischung notwendig, die alle Komponenten der Intestinalflüssigkeit enthält. Beispielsweise kann der gegenseitige Abbau der Proteasen, die Heterolyse, welche neben der Degradation durch Proteasen der gleichen Art

(Homolyse) vorkommt, nur in Lösungen mit mehr als einer enzymatischen Komponente beobachtet werden. Die Art und Geschwindigkeit, mit der ein Enzymgemisch im Verlauf der Zeit seine Aktivität verliert, wird von dessen Zusammensetzung abhängen. Auch weitere natürlich vorkommende oder durch Nahrung zugeführte Bestandteile der intestinalen Flüssigkeit wie Gallensäuren, Lipide, Polysaccharide oder Proteine können Effekte auf Enzymaktivitäten und auf Stabilitäten von Proteinen haben (Holtmann *et al.*, 1997; Mouecoucou *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005).

Aufgrund der hohen Komplexität des Gastrointestinaltraktes wird es allerdings kaum möglich sein, die natürliche Intestinalflüssigkeit durch artifizielle Enzymgemische vollständig nachzustellen. Daher kommen inzwischen komplexere Systeme zum Einsatz, die ursprünglich aus den Modellorganismen stammen (zum Beispiel Pankreasextrakt aus Schweinen (Vieths *et al.*, 1999; Anderle *et al.*, 2002)). Solche *ex vivo*-Modelle sollten dem natürlichen Vorbild insgesamt am nächsten kommen.

Der Vorteil von Einzelenzymlösungen liegt in der exakten Definition der Zusammensetzung und der Beobachtung des Einflusses einer einzelnen Protease auf ein Protein, zum Beispiel zur Ermittlung des entstehenden Musters aus Peptidfragmenten. Die hier verwendete simulierte Intestinalflüssigkeit stellt einen Kompromiss zwischen definierter manipulierbarer Zusammensetzung und den vernetzten Einflüssen der Proteasen untereinander dar. Sie enthielt Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase in den Konzentrationen, die denjenigen in natürlicher Intestinalflüssigkeit entsprachen. Daher sollte die Lösung eine bessere Näherung an die natürliche Umgebung darstellen als der Einsatz von Einzelenzymlösungen. Dennoch stellte auch diese Simulation nur einen Ausschnitt der gesamtproteolytischen Aktivität dar, der etwa ein Drittel der unspezifischen Proteaseaktivität wiedergibt (siehe 4.1.3) und einen bedeutend geringeren Proteingehalt aufwies. Dabei bot die Simulation aber die Möglichkeit der einfachen Manipulation, wie zum Beispiel der Zugabe von Protein, um zusätzlich den natürlichen Proteingehalt zu simulieren, und so weitere Einflüsse auf den Verdau von Antigenen oder Targetingliganden zu erkennen.

6.1.2 Stabilität von Proteinen und Peptiden gegen intestinale Proteasen

Stabilität von Targetingliganden

Für den Einsatz in einem intestinalen Vakzinierungssystem sollten verwendete Targetingliganden die gastrointestinale Passage strukturell unbeschadet überstehen, um ihre zielbindenden Eigenschaften zu behalten.

Die hier untersuchten Liganden CTB und LTB sowie UEA I sind als Proteine nicht *per se* resistent gegen den Abbau durch Proteasen. Jedoch sind sie in muriner Intestinalflüssigkeit über drei Stunden stabil. In der Enzymmischung aus Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Elastase, die hier als simulierte Intestinalflüssigkeit eingesetzt wurde, wurden alle drei Liganden dagegen im gleichen Zeitraum teilweise degradiert (siehe Abschnitt 4.2). Allerdings zeigt auch diese nur partielle Degradation in einem Zeitraum, der in der Maus bereits für eine vollständige gastrointestinale Passage mit einer Transitzeit von 154 ± 24 Minuten (Schwarz *et al.*, 2002) ausreicht, die besondere Stabilität der drei Proteine. Dies wird im Vergleich zu Ovalbumin, welches in muriner Intestinalflüssigkeit rasch mit einer Halbwertszeit von 1,2 Sekunden abgebaut wird (nicht gezeigt), deutlich. Die Zugabe des bedeutend instabileren Ovalbumins zur Proteasenlösung verhinderte die zuvor beobachtete partielle Degradation der Targetingliganden wiederum vollständig (siehe 4.2.3).

Offenbar ist Ovalbumin als favorisiertes Proteasensubstrat in der Lage, ohnehin schwerer abzubauen Proteine vor einem Angriff durch die Enzyme zu schützen. Als Erklärungsmodell könnte eine reversible Hemmung der Proteasen dienen, wobei das bevorzugte Substrat Ovalbumin im zeitlichen Mittel sehr viel häufiger das aktive Zentrum der Enzyme besetzt, so dass die Targetingliganden als weniger gut geeignete Substrate nicht gebunden und hydrolysiert werden. Da diese Wirkung in einer Mischung mehrerer Proteasen unterschiedlicher Konzentrationen beobachtet wird, muss es als Effekt dieser dynamischen Mischung gesehen werden. Wie in der Simulation das Ovalbumin oder auch bovines Serumalbumin kann in muriner Intestinalflüssigkeit das natürlich vorkommende Protein diesen protektiven Effekt ausüben.

Die besondere Stabilität von CTB und LTB ist sicherlich auch das Resultat einer evolutionären Optimierung. Die Resistenz dieser Bestandteile bakterieller Toxine gegen proteolytischen Abbau sind für die Bakterien und ihre Wirkung notwendig. Umso beachtlicher ist diese

Stabilität, da die Targetingliganden zahlreiche – von dem Programm PeptideCutter¹² (Gasteiger *et al.*, 2003) vorhergesagte – Schnittstellen für Trypsin (70) oder Chymotrypsin (CTB: 145, LTB: 135) besitzen. Mit ihrer symmetrisch aufgebauten Ringstruktur aus fünf Untereinheiten könnten die beiden Proteine auch ein Beispiel für einen Zusammenhang zwischen Symmetrie und Stabilität (Blundell und Srinivasan, 1996) sein.

Stabilitäten von peptidischen Antigenen

Die Halbwertszeiten der in den Vakzinformulationen verwendeten Peptide Ova₈₃₋₉₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ in muriner Intestinalflüssigkeit lagen mit 9,9 ms beziehungsweise 5,2 ms zwischen dem Median (15,3 ms) und der 25-Perzentile (4,8 ms) aller 16mer Peptide aus Ovalbumin (Gorris, 2005); die Halbwertszeit des Peptids Ova₁₀₃₋₁₁₈ lag mit 1,4 ms zwischen der 25-Perzentile und der kürzesten für 16mer Peptide aus Ovalbumin gemessenen Halbwertszeit (0,8 ms). Die Peptide waren somit nicht überdurchschnittlich stabil. Die Konjugation der Immunisierungspeptide an den Targetingliganden CTB hatte einen erheblichen stabilisierenden Effekt für die Peptide (siehe 4.4.2). Das selbst verdauungsstabile CTB scheint durch seine Größe – das Pentamer hat eine Molmasse von etwa 60 kDa – oder die Lokalisation der Peptidbindestellen sterisch den Zugriff intestinaler Proteasen auf die Peptide verhindert zu haben. Dadurch verlängerten sich die Halbwertszeiten aller drei natürlichen Peptide. Für die Peptide Ova₈₃₋₉₈ und Ova₁₀₃₋₁₁₈ war der Stabilisierungsfaktor ($73 \cdot 10^3$) identisch (siehe 4.4.2). Die hier gemessenen Halbwertszeiten der freien Peptide korrelierten dabei mit der Zahl der potentiellen Proteaseschnittstellen.

Die Positionen der Schnittstellen (siehe Tabelle 6-1) konnten allerdings nicht als Erklärung für die schwächere Stabilisierung des Peptids Ova₃₄₉₋₃₆₄ im CTB-Konjugat dienen. Eventuell könnten die Peptide Ova₈₃₋₉₈ und Ova₁₀₃₋₁₁₈ durch Konjugation deshalb besser geschützt werden, weil sie besonders viele ihrer potentiellen Proteaseschnittstellen im Bereich des C-Terminus tragen, der im Konjugat nahe am sterisch anspruchsvollen CTB liegt und so für proteolytische Enzyme schwer zugänglich ist. Eine Konjugation über den C-Terminus könnte einen Vorteil für solche Peptide gegenüber Peptiden, die präferentiell am N-Terminus geschnitten werden, bringen. Die reine Zahl der ermittelten potentiellen Schnittstellen für die hier eingesetzten Immunisierungspeptide erlaubt eine solche Interpretation jedoch nicht ohne

¹² <http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>

Weiteres, da keine Informationen über Wahrscheinlichkeiten und Präferenzen einzelner Schnittstellen vorlagen.

Wie erwartet wurden die aus α -D-Aminosäuren aufgebauten retro-inversen Peptide weder in freier Form noch in Konjugation mit CTB von den intestinalen Proteasen abgebaut. Die Spezifizierung der Enzyme auf die natürlicherweise nahezu ausschließlich vorkommenden L-Aminosäuren bietet somit die Möglichkeit durch Einsatz der enantiomeren Moleküle, generell verdauungsstabile Peptide herzustellen.

Tabelle 6-1: Potentielle Proteaseschnittstellen.

	Ova ₈₃₋₉₈	Ova ₁₀₃₋₁₁₈	Ova ₃₄₉₋₃₆₄
Schnittstellen nach Aminosäureposition			
Arg-C Proteinase	2	2, 8	11
Chymotrypsin	15	4, 15	10, 16
Enterokinase	---	---	---
Pepsin (pH>2)	1, 5	3, 12, 15, 16	9, 10, 15
Trypsin	2	2, 8	11

6.2 Immunisierung mit Peptidkonjugaten

Obwohl der Einsatz peptidischer Antigene durch die langwierige und schwierige Identifikation von Epitopen, welche einen breiten immunologischen Schutz gegen das Ursprungspathogen induzieren können, noch limitiert ist, bieten sie entscheidende Vorteile. So ist es möglich, definierte Immunantworten ohne schwer kalkulierbare Nebenreaktionen zu induzieren. Auch das Durchlaufen einer abgeschwächten Infektion, wie es im Falle von Impfungen mit attenuierten Pathogenen der Fall ist, wird vollständig vermieden.

Bislang unklar und daher ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen Verdauungsstabilität und Immunogenität oraler Peptidvakzine zu untersuchen.

6.2.1 Zusammenhang von Stabilität und Immunogenität

Intragastrale Immunisierung mit natürlichen Peptiden

Das Peptid Ova₈₃₋₉₈ hat die wenigsten Proteaseschnittstellen (siehe Tabelle 6-1), hat die längste gemessene Halbwertszeit als freies Peptid und im CTB-Konjugat (siehe Abschnitt 4.4) und war das einzige Peptid, das in natürlicher Form nach intragastraler Gabe einen messbaren IgA-Titer erzeugte. Im Gegensatz dazu waren die beiden anderen Peptide, die aufgrund ihrer zahlreicheren potentiellen Proteaseschnittstellen weniger stabil waren, nicht in der Lage, IgA-Titer zu induzieren (siehe Abbildung 5-14). Im Serum traten andererseits auch nach intragastraler Gabe des kurzlebigen Peptids Ova₃₄₉₋₃₆₄ (Halbwertszeit von 15,5 s im CTB-Konjugat) IgG-Titer auf (siehe Abbildung 5-12).

Diese Diskrepanz lässt verschiedene Interpretationen zu. So ist es nicht vollkommen auszuschließen, dass Teile der Vakzinlösungen zum Beispiel beim Entfernen der Applikationskanüle aus dem Magen in die Mundhöhle gelangten und dort über Mikroverletzungen, die bei der Sichtkontrolle auf Blutspuren nicht erkannt werden konnten, systemisch aufgenommen wurden. Dann müssten diese minimalen systemischen Impfdosen zur Induktion einer leichten Reaktion ausgereicht haben.

War dies nicht der Fall, dann muss trotz der schnellen Degradation des Peptids noch genug antigenes Material an der Mukosa aufgenommen worden sein, um das Immunsystem zu stimulieren. Eine mögliche Begründung für das Ausbleiben einer lokalen IgA-Antwort könnten dabei Unterschiede im mukosalen und systemischen Paratop-Repertoire sein. Ist nur im systemischen Immunsystem eine zu dem Antigen passende B-Zelle vorhanden, so kommt es auch nur dort zu einer B-Zell-Stimulierung und aufgrund der immunologischen Umgebung zur Bildung von IgG. An der Mukosa sollten B-Zellen primär zu einer IgA-Antwort und erst nachgeordnet, wenn überhaupt, zur Bildung von IgG stimuliert werden. Das intragastral verabreichte Antigen müsste für ein solches exklusives Ansprechen des systemischen Immunsystems von der Mukosa in den Körper disseminiert sein.

Da bekannt ist, dass man zur Induktion von S-IgA relativ hohe Antigendosen benötigt, und das Peptid vermutlich nur in sehr geringen Mengen aufgenommen wurde, könnte es ebenfalls möglich sein, dass während der initialen Schritte der B-Zell-Aktivierung keine ausreichende „Homing“-Funktion induziert wurde und dass der Subklassenwechsel nicht bis zu IgA-produzierenden Zelle durchlaufen wurde. Die niedrige Antigendosis könnte dann für eine Fehlleitung der immunologischen Signale gesorgt haben.

Bystander-Effekt

Da in den Studien zur Verdauungsstabilität von Targetingliganden ein protektiver Effekt von zugegebenem Protein für die Liganden festgestellt werden konnte, wurde ein ähnlicher Ansatz auch während der intragastralen Immunisierung mit natürlichen Peptidkonjugaten überprüft.

Auf die Stärke der Immunantwort durch natürliche CTB-Peptid-Konjugate hatte die Zugabe von Protein zur Immunisierungslösung keinen Einfluss (siehe 5.3.4). Weder IgG-Titer im Serum noch IgA-Titer in Fäzes oder Intestinalflüssigkeit konnten erhöht werden.

Der grundlegende Unterschied zu den Studien mit simulierter Intestinalflüssigkeit war, dass dort Protein zu einer artifiziellen Proteasemischung zugegeben wurde, um Targetingliganden vor dem Verdau durch ausgewählte Proteasen zu schützen. Dies sollte und konnte die Wirkung des natürlich vorkommenden Proteingehaltes in muriner Intestinalflüssigkeit simulieren. Die Zugabe von Protein zu einer intragastral verabreichten Immunisierungslösung war jedoch lediglich eine Addition zu dem ohnehin vorhandenen Proteingehalt. Der protektive Effekt des natürlichen Proteins konnte nicht so viel weiter gesteigert werden, dass Immunisierungskonjugate mit natürlichem Peptid in Anwesenheit von zugesetztem Protein eine stärkere Immunantwort auslösten als die gleichen Konjugate ohne Proteinzusatz.

Retro-inverse Peptidmodifikation

Durch retro-inverse Modifikation der Immunisierungspeptide konnte geprüft werden, inwieweit die Stabilität des Antigens mit der induzierbaren Immunantwort zusammenhängt.

Die Peptide Ova₈₃₋₉₈ und Ova₁₀₃₋₁₁₈ induzierten in ihrer RI Form nach intragastraler Immunisierung sowohl systemisch im Serum als auch lokal in Fäzes und Intestinalflüssigkeit signifikant höhere peptidspezifische Antikörpertiter als die vergleichbaren natürlichen Peptide (siehe Abschnitt 5.3). Das Peptid Ova₃₄₉₋₃₆₄ erzeugte immer niedrigere Titer als die anderen beiden Peptide auf der jeweils vergleichbaren Route (mit Ausnahme von Serum-IgG nach systemischer Immunisierung, wo alle Titer sehr hoch waren). Dass dafür der geringere mittlere Derivatisierungsgrad dieses Peptidkonjugates (siehe Tabelle 5-1) verantwortlich sein könnte ist unwahrscheinlich, da nach viermaliger Gabe der Immunisierungslösungen dieser Effekt bei verdauungsstabilen Peptiden keine Rolle mehr spielen sollte. Eine lysosomale Prozessierung nach Aufnahme des Antigens durch mukosale Epithelzellen sollte für RI Peptide aufgrund der verwendeten D-Aminosäuren nicht zur Degradation führen und somit ebenfalls generell nicht zu Unterschieden in der Immunantwort Anlass geben. Vermutlich waren für das Antigenmotiv nicht genügend naive B-Zellen vorhanden. Es könnte aber auch eine schwächere

MHC-II-Bindung für die weniger ausgeprägte Immunantwort verantwortlich sein. Die Präsentation von RI Peptiden im Kontext von MHC oder die Stimulation von T-Zellen durch RI Peptide wurde beobachtet, wird aber nach wie vor kontrovers diskutiert. Es gibt dazu eine Reihe von Studien, die zeigen, dass RI Peptide präsentierbar und T-Zell-stimulierend sind (Bartnes *et al.*, 1997; Meziere *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1999) aber auch andere, in denen dies nicht gefunden wurde (Herve *et al.*, 1997; Iwai *et al.*, 2001). Daher scheinen diese Fähigkeiten stark vom jeweiligen Sequenzmotiv abhängig zu sein. Wenn das retro-inverse Peptid Ova₃₄₉₋₃₆₄ hier im MHC-II-Kontext schlechter präsentiert wurde als die anderen RI Peptide, könnte das zu der schwächeren Immunreaktion geführt haben, die sich in den beobachteten niedrigeren Titern äußert. Andererseits sollten alle Konjugate gleich gute T-Zell-Unterstützung über die T-Zell-Epitope des Targetingliganden CTB erhalten haben, wenn das CTB im Lysosom prozessiert werden kann.

Der systemische Einsatz von retro-inversen Peptidkonjugaten führte nicht zur Verstärkung der Immunantwort. Die Verdauungsstabilität zeigt somit ihre Vorteile besonders im proteolytisch anspruchsvollen Milieu des Verdauungstraktes, wo die natürlichen Peptide zu schnell abgebaut werden, um vergleichbar hohe Titer zu induzieren.

6.2.2 Nebenreaktionen bei systemischer Immunisierung

Nach intraperitonealer Applikation der Immunisierungskonjugate traten in der hier durchgeführten Studie stets auch messbare IgA-Titer in Fäzes und Intestinalflüssigkeit auf (siehe Abbildung 5-13 und Abbildung 5-15), obwohl ein solcher Zusammenhang zwischen systemischem und mukosalem Immunsystem nicht vorausgesetzt werden kann (Ogra *et al.*, 2001; Holmgren *et al.*, 2003; Boyaka *et al.*, 2005).

Eine Erklärung für das Auftreten von spezifischem IgA im Darm nach systemischer Immunisierung könnte ein Transsudieren von Serum-IgA sein. Allerdings trägt dieses monomere Serum-IgA höchstens 2 % zum gesamten luminalen IgA bei, während der bedeutend größere Anteil dimeres sekretorisches IgA ist (Meckelein *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass bei systemischen Immunisierungen als Adjuvans eingesetztes Choleratoxin auch eine mukosale Immunantwort auslösen kann (Cox *et al.*, 2006), könnte eher eine Erklärung bieten. Zwar wurde ein Muramyldipeptid als systemisches Adjuvans eingesetzt, doch waren die Immunisierungspeptide an die B-Untereinheit des Choleratoxins konjugiert. Es ist also möglich, dass die Zusammensetzung der Konjugate selbst zu einer Verbindung zum mukosalen Immunsystem geführt hat. Unabhängig von der Ursache bleibt festzuhalten, dass

wie beim Serum-IgG nach systemischer Immunisierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Titern eines natürlichen Peptids und seines jeweiligen retro-inversen Analogons auftraten.

6.2.3 Kreuzreaktionen nach Peptidimmunisierung

Die Ergebnisse der experimentellen Immunisierung zeigten, dass stabilere Antigene im Vergleich zu instabileren zu höheren Immunantworten führen, wenn das Antigen über die intragastrale Route verabreicht wird. Bei ausreichender Imitation der natürlichen Peptidstruktur durch die retro-inversen Mimetika sollten die durch eine der beiden Modifikationen induzierten Antikörper auch die jeweils andere in gleicher Weise erkennen können.

Allerdings waren Kreuzerkennungen zwischen Antikörpern gegen die eine Peptidmodifikation und Peptiden der anderen Modifikation in dieser Studie mit diesem Idealbild nicht vergleichbar. Die Kreuzerkennung durch im Serum auftretende IgG-Antikörper gegen systemisch verabreichtes natürliches Peptid, die auch an ihr Ursprungsmolekül Ovalbumin oder ihre retro-inversen Mimetika banden (siehe Abbildung 5-22), zeigt, dass diese Art der Erkennung von verwandten Epitopen generell nach einer Peptidimmunisierung möglich ist. Die Titer gegen Ovalbumin waren dabei für die Peptide Ova₁₀₃₋₁₁₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ immerhin noch etwa 30 % so hoch wie die spezifischen Titer gegen das natürliche Peptid, die Erkennung der RI Peptide für alle drei Peptide noch 10 bis 15 %.

Nach intragastraler Gabe von natürlichen Peptiden war eine Kreuzreaktivität von IgA sehr viel schwerer nachzuweisen, da nur das Ova₈₃₋₉₈ überhaupt einen messbaren IgA-Titer induzierte. Die gebildeten IgA banden dann allerdings auch ähnlich stark an Ovalbumin wie an das natürliche Peptid selbst (siehe Abbildung 5-23). Das entsprechende RI Ova₈₃₋₉₈ hingegen wurde vom anti-nat Ova₈₃₋₉₈ IgA nur sehr schlecht gebunden. Dabei erreichte dieser schwächere Titer aber in Relation zu dem gegen das natürliche Peptid selbst gerichteten Titer immerhin eine Höhe von etwa 20 %. Auch hier lässt sich also feststellen, dass über eine Immunisierung mit natürlichen Peptiden erzeugte Antikörper fähig sind, sowohl das Ursprungprotein als auch retro-inverse Mimetika zu erkennen.

Nach Immunisierung mit retro-inversen Peptiden waren systemisch ebenso hohe peptid-spezifische IgG-Titer erzeugt worden, wie nach Immunisierung mit natürlichen Peptiden (siehe Abbildung 5-11). Doch reichte in diesen Fällen die strukturelle Imitation des natürlichen Vorbildes offenbar nicht aus, um eine Ovalbumin-Erkennung durch anti-RI Peptid Antikörper zu erreichen. Auch waren nur die durch das RI Peptid Ova₈₃₋₉₈ induzierten

Antikörper (Serum-IgG nach systemischer Immunisierung oder Fäzes-IgA nach intragastraler Immunisierung) in der Lage, ihr natürliches Pendant zu erkennen (siehe Abbildung 5-24 und Abbildung 5-25). Um den Erfolg der hohen peptidspezifischen Antikörpertiter nach intragastraler Immunisierung mit RI Peptiden für einen protektiven Schutz gegen das Ursprungprotein zu nutzen, sollte daher versucht werden, die Imitation der natürlichen Struktur weiter zu optimieren.

Da Immunglobuline nicht vollständig auf die Erkennung eines Epitops in starrer Konfiguration beschränkt sind, sondern in gewissem Grade eine Flexibilität des Paratops aufweisen können, können Multispezifitäten auftreten (James *et al.*, 2003; Jimenez *et al.*, 2003). Zum Beispiel können nach Immunisierung mit antigenem Protein Antikörper induziert werden, die nicht nur an ein bekanntes Epitop dieses Proteins binden, sondern ebenso an eine Imitation dieses Epitops aus D-Aminosäuren (Scheerer *et al.*, 2007). Auch in dieser Arbeit war eine Kreuzreaktivität von anti-Ova Immunglobulinen mit natürlichen und retro-inversen Peptidepitopen für die Auswahl der Immunisierungspeptide ausschlaggebend (siehe Abschnitt 4.3). Nach den hier durchgeführten Immunisierungen mit Peptidkonjugaten findet sich nun eine messbare Kreuzreaktivität zum Ursprungprotein der peptidischen Antigene fast ausschließlich nach Verwendung natürlicher Peptidantigene. Obwohl die spezifischen Titer nach retro-inverser Immunisierung im Serum genauso hoch und im Fäzes sogar höher waren, findet sich nur für ein natürliches Peptid eine Kreuzerkennung.

Die Umkehr des Peptidrückgrats in den RI modifizierten Epitopen könnte Konfigurationen dieser Peptide thermodynamisch bevorzugen, die sich so sehr von den Konfigurationen der natürlichen Peptide unterscheiden, dass sich diese Unterschiede auch in den Paratopen der Antikörper widerspiegeln. Sind diese Antigen-Bindestellen strukturell so unterschiedlich, dass sie sich trotz einer gewissen Flexibilität innerhalb der Paratope den Konformationsunterschieden der Peptide nicht anpassen können, so kann keine Kreuzreaktivität stattfinden. Der Effekt dieser zu großen Unterschiede zwischen natürlichen und retro-inversen Epitopen und den daraus resultierenden unterschiedlichen Paratopen entspräche dabei der Beobachtung einer Antikörper-Erkennung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Auch wenn eine flexible Antigenbindung nach dem Prinzip des Induced-Fit für andere Fälle möglich ist, repräsentiert hier das Schlüssel-Schloss-Prinzip offenbar die Hürde, die bei zu großen Differenzen zwischen zwei Antigenen die Paratopbindung auf eines der Epitope beschränkt. Dabei stellen die beiden Modelle die Extremformen der möglichen Wechselwirkungen zwischen Epitop und Paratop dar. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip müsste jeder Antikörper auf strukturell vollkommen identische Antigene limitiert sein. Dies würde allerdings

de facto vorkommende Kreuzreaktionen generell ausschließen. Eine Erkennung, bei der sich das Paratop einer angebotenen Struktur anpasst (Induced-Fit), birgt bei zu großer Flexibilität hingegen die Gefahr allzu unspezifischer Bindung. Das würde das Prinzip der adaptiven Immunantwort unmöglich machen. Tatsächlich sollten Zwischenformen die Situation besser beschreiben, wobei der Schlüssel-Schloss-Anteil zur Spezifität der Antikörper beiträgt, während der Induced-Fit-Anteil für ausreichend hohe Sensitivität sorgt, um auch leicht veränderte – zum Beispiel partiell denaturierte oder degradierte – Zielstrukturen noch zu erkennen. Die hier verwandten retro-inversen Peptide besaßen offenbar zu große Unterschiede zu ihren natürlichen Analoga, um kreuzreaktive Antikörper induzieren zu können.

Die fehlende Kreuzreaktivität zeigt auch, dass die vorangegangene Auswahl von B-Zell-Epitopen, welche nach intragastraler Immunisierung mit Ovalbumin besonders gut erkannt wurden, kein ausreichendes Kriterium war. Auf eine Bindung des Gesamtproteins durch anti-Peptid Antikörper konnte allein dadurch nicht geschlossen werden. Die Strategie der Epitopkartierung zur Auswahl geeigneter Immunisierungspeptide führte hier somit zu keinem zuverlässigen Ergebnis. Ein Immunschutz gegen das Gesamtprotein ließe sich in diesem speziellen Fall daher nicht erreichen, obwohl die retro-inversen Peptide ihr Potential deutlich gemacht haben: die spezifische Peptiderkennung ist bei ihnen an der intestinalen Mukosa deutlich höher als nach Immunisierung mit natürlichen Peptiden.

6.3 Fazit und Ausblick

In den Versuchen zur Stabilität der Targetingliganden CTB, LTB und UEA I wurde deutlich, wie entscheidend der Einsatz von natürlichen Proteaselösungen für *in vitro*-Studien ist. Der Proteingehalt, der hier über vollständige Stabilität oder partielle Degradation der Targetingliganden entschied, könnte in anderen Fällen einen noch größeren Einfluss ausüben. Es ist vorstellbar, dass diese Stabilisierung von Wirkstoffen durch den natürlichen Proteingehalt im Dünndarm bis zu einer Entscheidung über Stabilität oder vollständigem proteolytischen Abbau führt. Dabei ist ein solcher Einfluss wie er hier im murinen System beobachtet wurde wegen seiner Unspezifität auch im humanen Organismus wahrscheinlich. In praktischer Hinsicht könnte dies einen Einfluss auf die Entscheidung haben, ob vor einer oralen Wirkstoffgabe gefastet werden sollte oder nicht.

Die Verzögerung des proteolytischen Abbaus, die für natürliche Peptide durch Konjugation an Targetingliganden erreicht wurden, war nicht ausreichend, um zuverlässig eine mukosale S-IgA-Ausschüttung zu induzieren. Die Tatsache, dass nur das natürliche Peptidkonjugat mit der längsten Halbwertszeit nach intragastraler Gabe einen messbaren Fäzes-IgA-Titer erzeugte, gibt aber einen Hinweis auf eine mögliche Korrelation zwischen Verdauungsstabilität und Immunogenität für labile Peptide. Besonders deutlich wird der Zusammenhang allerdings erst für den Extremfall der vollständig stabilen retro-inversen Peptide, die auf der gastrointestinalen Route zu einer erheblich stärkeren Immunantwort führten.

Da der Einsatz von linearen Peptidepitopen nicht zuverlässig zu einer Erkennung des Ursprungsproteins führte, besteht hierzu weiterer Aufklärungsbedarf. Ein Ziel muss es sein, die Verdauungsstabilität, die zu einer Verbesserung der Immunantwort führt, mit einer optimierten strukturellen Imitation relevanter Epitope des Ursprungsproteins zu verknüpfen. Dies könnte zum Beispiel mit Ansätzen versucht werden, die auch nicht-lineare Epitope als stabile zyklische RI Peptide nachbilden. Eventuell könnten auch Haptene geeignet sein, kreuzreaktive Antikörper zu induzieren. Als weitere Strategie könnten im Vorfeld eines *in vivo*-Einsatzes von Immunisierungspeptiden Evolutions-Logarithmen genutzt werden, um die Sequenzen rechnergestützt im Hinblick auf Verdauungsstabilität weiter zu optimieren.

Auch wenn noch weiterer Verbesserungsbedarf besteht, zeigt diese Arbeit, dass der Einsatz verdauungsstabiler Strukturen zur intragastralen Immunisierung ein erfolgversprechendes Konzept zur Verbesserung von mukosalen Immunantworten ist.

Literaturverzeichnis

- Anderle P, Langguth P, Rubas W. und Merkle H.P. (2002). „In vitro assessment of intestinal IGF-I stability.“ *J Pharm Sci* **91**(1): 290-300.
- Anosova N.G., Chabot S., Shreedhar V., Borawski J.A., Dickinson B.L. und Neutra M.R. (2008). „Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches.“ *Mucosal Immunol* **1**(1): 59-67.
- Audette G.F, Vandonselaar M. und Delbaere L.T. (2000). „The 2.2 A resolution structure of the O(H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*.“ *J Mol Biol* **304**(3): 423-433.
- Bade S., Baier M., Boetel T. und Frey A. (2006). „Intranasal immunization of Balb/c mice against prion protein attenuates orally acquired transmissible spongiform encephalopathy.“ *Vaccine* **24**(9): 1242-1253.
- Bartnes K., Hannestad K., Guichard G. und Briand J.P. (1997). „A retro-inverso analog mimics the cognate peptide epitope of a CD4+ T cell clone.“ *Eur J Immunol* **27**(6): 1387-1391.
- Benkirane N., Guichard G., Van Regenmortel M.H., Briand J.P. und Muller S. (1995). „Cross-reactivity of antibodies to retro-inverso peptidomimetics with the parent protein histone H3 and chromatin core particle. Specificity and kinetic rate-constant measurements.“ *J Biol Chem* **270**(20): 11921-11926.
- Ben-Yedidia T., Beignon A.S., Partidos C.D., Muller S. und Arnon R. (2002). „A retro-inverso peptide analogue of influenza virus hemagglutinin B-cell epitope 91-108 induces a strong mucosal and systemic immune response and confers protection in mice after intranasal immunization.“ *Mol Immunol* **39**(5-6): 323-331.
- Berin M.C. und Sampson H.A. (2005). „Food Allergy: Immunophysiology.“ In: *Mucosal Immunology*, Mestecky J., Lamm M.E., McGhee J.R., Bienenstock J., Mayer L. und Strober W. (Ed.), Academic Press, Burlington, 3. Auflage: 1335-1349.
- Berlin C., Berg E.L., Briskin M.J., Andrew D.P., Kilshaw P.J., Holzmann B., Weissman I.L., Hamann A. und Butcher E.C. (1993). „Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1.“ *Cell* **74**(1): 185-195.
- Bernatowicz M.S. und Matsueda G.R. (1986). „Preparation of peptide-protein immunogens using N-succinimidyl bromoacetate as a heterobifunctional crosslinking reagent.“ *Anal Biochem* **155**(1): 95-102.
- Blundell T.L. und Srinivasan N. (1996). „Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14243-14248.

- Boeckler C., Frisch B., Muller S. und Schuber F. (1996). „Immunogenicity of new heterobifunctional cross-linking reagents used in the conjugation of synthetic peptides to liposomes.“ *J Immunol Methods* **191**(1): 1-10.
- Boyaka P.N., McGhee J.R., Czerkinsky C. und Mestecky J. (2005). „Mucosal Vaccines: An Overview.“ In: *Mucosal Immunology*, Mestecky J., Lamm M.E., McGhee J.R., Bienenstock J., Mayer L. und Strober W. (Ed.), Academic Press, Burlington, 3. Auflage: 855-874.
- Briand J.P., Benkirane N., Guichard G., Newman J.F., Van Regenmortel M.H., Brown F. und Muller S. (1997). „A retro-inverso peptide corresponding to the GH loop of foot-and-mouth disease virus elicits high levels of long-lasting protective neutralizing antibodies.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12545-12550.
- Briand J.P., Guichard G., Dumortier H. und Muller S. (1995). „Retro-inverso peptidomimetics as new immunological probes. Validation and application to the detection of antibodies in rheumatic diseases.“ *J Biol Chem* **270**(35): 20686-20691.
- Bubnis W.A. und Ofner C.M., 3rd (1992). „The determination of epsilon-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid.“ *Anal Biochem* **207**(1): 129-133.
- Buerge T. und Weiss T. (2004). „Handling and Restraint.“ In: *The Laboratory Mouse*, Hedrich H.J. (Ed.), Academic Press, London: 517-526.
- Campbell D.J. und Butcher E.C. (2002). „Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues.“ *J Exp Med* **195**(1): 135-141.
- Chen H., Torchilin V. und Langer R. (1996). „Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers.“ *Pharm Res* **13**(9): 1378-1383.
- Chen Y.Y., Lin S.Y., Yeh Y.Y., Hsiao H.H., Wu C.Y., Chen S.T. und Wang A.H. (2005). „A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum.“ *Electrophoresis* **26**(11): 2117-2127.
- Chorev M., Shavitz R., Goodman M., Minick S. und Guillemin R. (1979). „Partially modified retro-inverso-enkephalinamides: topochemical long-acting analogs in vitro and in vivo.“ *Science* **204**(4398): 1210-1212.
- Clark M.A., Jepson M.A., Simmons N.L. und Hirst B.H. (1995). „Selective binding and transcytosis of Ulex europaeus 1 lectin by mouse Peyer's patch M-cells in vivo.“ *Cell Tissue Res* **282**(3): 455-461.
- Corr S.C., Gahan C.C. und Hill C. (2007). „M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis.“ *FEMS Immunol Med Microbiol.*

- Corthesy B., Kaufmann M., Phalipon A., Peitsch M., Neutra M.R. und Kraehenbuhl J.P. (1996). „A pathogen-specific epitope inserted into recombinant secretory immunoglobulin A is immunogenic by the oral route.“ *J Biol Chem* **271**(52): 33670-33677.
- Cox E., Verdonck F., Vanrompay D. und Goddeeris B. (2006). „Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa.“ *Vet Res* **37**(3): 511-539.
- Dechert U. (2007). „Gelelektrophoresen.“ In: Gentechnische Methoden, Jahnson M. (Ed.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 4. Auflage: 39-90.
- Diehl K.H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.M. und van de Vorstenbosch C. (2001). „A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes.“ *J Appl Toxicol* **21**(1): 15-23.
- Elson C.O. und Dertzbaugh M.T. (2005). „Mucosal Adjuvants.“ In: Mucosal Immunology, Mestecky J., Lamm M.E., McGhee J.R., Bienenstock J., Mayer L. und Strober W. (Ed.), Academic Press, Burlington, 3. Auflage: 967-986.
- Externest D. (2000). „Analyse der Immunantwort und Erkennung linearer B-Zell Epitope nach mukosaler und systemischer Immunisierung: Neue Erkenntnisse für die Entwicklung von mukosalen Peptidvakzinen.“ Dissertation, WWU Münster.
- Fan E., Merritt E.A., Verlinde C.L. und Hol W.G. (2000). „AB(5) toxins: structures and inhibitor design.“ *Curr Opin Struct Biol* **10**(6): 680-686.
- Fischer P., Comis A., Tyler M. und Howden M. (2007). „Oral and parenteral immunization with synthetic retro-inverso peptides induce antibodies that cross-react with native peptides and parent antigens.“ *Indian J Biochem Biophys* **44**(3): 140-144.
- Fishman P.H., Moss J. und Osborne J.C., Jr. (1978). „Interaction of cholera toxin with the oligosaccharide of ganglioside GM1: evidence for multiple oligosaccharide binding sites.“ *Biochemistry* **17**(4): 711-716.
- Frank R. (1992). „Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support.“ *Tetrahedron* **48**(42): 9217-9232.
- Frey A., Di Canzio J. und Zurakowski D. (1998). „A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays.“ *J Immunol Methods* **221**(1-2): 35-41.
- Frey A., Giannasca K.T., Weltzin R., Giannasca P.J., Reggio H., Lencer W.I. und Neutra M.R. (1996). „Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting.“ *J Exp Med* **184**(3): 1045-1059.
- Frey A., Meckelein B., Externest D. und Schmidt M.A. (2000). „A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays.“ *J Immunol Methods* **233**(1-2): 47-56.

- Frey A. und Neutra M.R. (1997). „Targeting of mucosal vaccines to Peyer's patch M cells.“ *Behring Inst Mitt*(98): 376-389.
- Freytag L.C. und Clements J.D. (2005). „Mucosal adjuvants.“ *Vaccine* **23**(15): 1804-1813.
- Fukuta K. (2004). „Collection of Body Fluids.“ In: *The Laboratory Mouse*, Hedrich H.J. (Ed.), Academic Press, London: 543-554.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D. und Bairoch A. (2003). „ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.“ *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3784-3788.
- Goodman M. und Chorev M. (1979). „On the concept of linear modified retro-peptide structures.“ *Acc Chem Res* **12**(1): 1-7.
- Gorris H.-H. (2001). „Analyse der Erkennung antigener Epitope und Epitopmimetika nach Immunisierung mit unterschiedlichen Adjuvantien.“ Diplomarbeit, WWU Münster.
- Gorris H.-H. (2005). „Entwicklung eines Hochdurchsatz-Proteolysetests und Analyse der Proteolyseresistenz von Peptidepitopen.“ Dissertation, Universität Lübeck.
- Gorris H.-H., Bade S. und Frey A. (2007a). „Peptidarrays auf Cellulosemembranen.“ In: *Gentechnische Methoden*, Jahson M. (Ed.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 4. Auflage: 519-544.
- Gorris H.-H., Bade S., Röckendorf N. und Frey A. (2007b). „Methods for Determining the Cleavability of Substrates.“ Patent No. WO 2007/051605 A2.
- Guichard G., Benkirane N., Zeder-Lutz G., van Regenmortel M.H., Briand J.P. und Muller S. (1994). „Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso-peptidomimetics.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 9765-9769.
- Guptasarma P. (1992). „Reversal of peptide backbone direction may result in the mirroring of protein structure.“ *FEBS Lett* **310**(3): 205-210.
- Habeeb A.F. (1966). „Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid.“ *Anal Biochem* **14**(3): 328-336.
- Haneberg B., Kendall D., Amerongen H.M., Apter F.M., Kraehenbuhl J.P. und Neutra M.R. (1994). „Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces.“ *Infect Immun* **62**(1): 15-23.
- Hatakeyama T., Kohzaki H. und Yamasaki N. (1992). „A microassay for proteases using succinylcasein as a substrate.“ *Anal Biochem* **204**(1): 181-184.

- Herve M., Maillere B., Mourier G., Texier C., Leroy S. und Menez A. (1997). „On the immunogenic properties of retro-inverso peptides. Total retro-inversion of T-cell epitopes causes a loss of binding to MHC II molecules.“ *Mol Immunol* **34**(2): 157-163.
- Holmgren J. und Czerkinsky C. (2005). „Mucosal immunity and vaccines.“ *Nat Med* **11**(4): 45-53.
- Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K. und Mharandi A. (2003). „Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges.“ *Vaccine* **21**(2): 89-95.
- Holtmann G., Kelly D.G., Sternby B. und DiMagno E.P. (1997). „Survival of human pancreatic enzymes during small bowel transit: effect of nutrients, bile acids, and enzymes.“ *Am J Physiol* **273**(2 Pt 1): G553-558.
- Huang X. und Miller W. (1991). „A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm.“ *Adv App Math* **12**: 337-357.
- Iwai L.K., Duranti M.A., Abel L.C., Juliano M.A., Kalil J., Juliano L. und Cunha-Neto E. (2001). „Retro-inverso peptide analogues of Trypanosoma cruzi B13 protein epitopes fail to be recognized by human sera and peripheral blood mononuclear cells.“ *Peptides* **22**(6): 853-860.
- James L.C., Roversi P. und Tawfik D.S. (2003). „Antibody multispecificity mediated by conformational diversity.“ *Science* **299**(5611): 1362-1367.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M. und Shlomchik M. (2005). „Immunologie“. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Auflage.
- Jimenez R., Salazar G., Baldrige K.K. und Romesberg F.E. (2003). „Flexibility and molecular recognition in the immune system.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 92-97.
- Jobling M.G. und Holmes R.K. (2002). „Mutational analysis of ganglioside GM(1)-binding ability, pentamer formation, and epitopes of cholera toxin B (CTB) subunits and CTB/heat-labile enterotoxin B subunit chimeras.“ *Infect Immun* **70**(3): 1260-1271.
- Kaetzel C.S., Robinson J.K., Chintalacheruvu K.R., Vaerman J.P. und Lamm M.E. (1991). „The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8796-8800.
- Koertge T.E. und Butler J.E. (1986). „Dimeric mouse IgA is transported into rat bile five times more rapidly than into mouse bile.“ *Scand J Immunol* **24**(5): 567-574.
- Kyte J. und Doolittle R.F. (1982). „A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.“ *J Mol Biol* **157**(1): 105-132.
- Laemmli U.K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* **227**(5259): 680-685.

- Laine J., Beattie M. und LeBel D. (1993). „Simultaneous kinetic determinations of lipase, chymotrypsin, trypsin, elastase, and amylase on the same microtiter plate.“ *Pancreas* **8**(3): 383-386.
- Lencer W.I., Constable C., Moe S., Rufo P.A., Wolf A., Jobling M.G., Ruston S.P., Madara J.L., Holmes R.K. und Hirst T.R. (1997). „Proteolytic activation of cholera toxin and Escherichia coli labile toxin by entry into host epithelial cells. Signal transduction by a protease-resistant toxin variant.“ *J Biol Chem* **272**(24): 15562-15568.
- Lockwood J.S. und Randall H.T. (1949). „The place of electrolyte studies in surgical patients.“ *Bull N Y Acad Med* **25**: 228-239.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951). „Protein measurement with the Folin phenol reagent.“ *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- MacDonald T.T. (2003). „The mucosal immune system.“ *Parasite Immunol* **25**(5): 235-246.
- Madara J.L. (1990). „Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier.“ *Am J Pathol* **137**(6): 1273-1281.
- Mantis N.J., Cheung M.C., Chintalacheruvu K.R., Rey J., Corthesy B. und Neutra M.R. (2002). „Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor.“ *J Immunol* **169**(4): 1844-1851.
- Mantis N.J., Frey A. und Neutra M.R. (2000). „Accessibility of glycolipid and oligosaccharide epitopes on rabbit villus and follicle-associated epithelium.“ *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**(6): G915-923.
- Meckelein B., Externest D., Schmidt M.A. und Frey A. (2003). „Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures.“ *Clin Diagn Lab Immunol* **10**(5): 831-834.
- Merritt E.A. und Hol W.G. (1995). „AB5 toxins.“ *Curr Opin Struct Biol* **5**(2): 165-171.
- Merritt E.A., Sarfaty S., Chang T.T., Palmer L.M., Jobling M.G., Holmes R.K. und Hol W.G. (1995). „Surprising leads for a cholera toxin receptor-binding antagonist: crystallographic studies of CTB mutants.“ *Structure* **3**(6): 561-570.
- Merritt E.A., Sarfaty S., Jobling M.G., Chang T., Holmes R.K., Hirst T.R. und Hol W.G. (1997). „Structural studies of receptor binding by cholera toxin mutants.“ *Protein Sci* **6**(7): 1516-1528.
- Merritt E.A., Sarfaty S., van den Akker F., L'Hoir C., Martial J.A. und Hol W.G. (1994a). „Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide.“ *Protein Sci* **3**(2): 166-175.
- Merritt E.A., Sixma T.K., Kalk K.H., van Zanten B.A. und Hol W.G. (1994b). „Galactose-binding site in Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT).“ *Mol Microbiol* **13**(4): 745-753.

- Mestecky J., Moldoveanu Z. und Elson C.O. (2005a). „Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens.“ *Vaccine* **23**(15): 1800-1803.
- Mestecky J., Moro I., Kerr M.A. und Woof J.M. (2005b). „Mucosal Immunoglobulins.“ In: *Mucosal Immunology*, Mestecky J., Lamm M.E., McGhee J.R., Bienenstock J., Mayer L. und Strober W. (Ed.), Academic Press, Burlington, 3. Auflage: 153-181.
- Meziere C., Viguier M., Dumortier H., Lo-Man R., Leclerc C., Guillet J.G., Briand J.P. und Muller S. (1997). „In vivo T helper cell response to retro-inverso peptidomimetics.“ *J Immunol* **159**(7): 3230-3237.
- Moreno F.J., Mackie A.R. und Mills E.N. (2005). „Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion.“ *J Agric Food Chem* **53**(25): 9810-9816.
- Motulsky H. (2003). „Prism 4 Statistics Guide -Statistical analyses for laboratory and clinical researchers.“ In, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.
- Mouecoucou J., Fremont S., Sanchez C., Villaume C. und Mejean L. (2004). „In vitro allergenicity of peanut after hydrolysis in the presence of polysaccharides.“ *Clin Exp Allergy* **34**(9): 1429-1437.
- Mowat A.M. (2003). „Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.“ *Nat Rev Immunol* **3**(4): 331-341.
- Muller S., Guichard G., Benkirane N., Brown F., Van Regenmortel M.H. und Briand J.P. (1995). „Enhanced immunogenicity and cross-reactivity of retro-inverso peptidomimetics of the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus.“ *Pept Res* **8**(3): 138-144.
- Nargi F., Kramer E., Mezencio J., Zamparo J., Whetstone C., Van Regenmortel M.H., Briand J.P., Muller S. und Brown F. (1999). „Protection of swine from foot-and-mouth disease with one dose of an all-D retro peptide.“ *Vaccine* **17**(22): 2888-2893.
- Neutra M.R., Frey A. und Kraehenbuhl J.P. (1996). „Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization.“ *Cell* **86**(3): 345-348.
- Neutra M.R. und Kozlowski P.A. (2006). „Mucosal vaccines: the promise and the challenge.“ *Nat Rev Immunol* **6**(2): 148-158.
- Neutra M.R., Mantis N.J. und Kraehenbuhl J.P. (2001). „Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues.“ *Nat Immunol* **2**(11): 1004-1009.
- Nibert M.L., Furlong D.B. und Fields B.N. (1991). „Mechanisms of viral pathogenesis. Distinct forms of reoviruses and their roles during replication in cells and host.“ *J Clin Invest* **88**(3): 727-734.
- Ogra P.L., Faden H. und Welliver R.C. (2001). „Vaccination strategies for mucosal immune responses.“ *Clin Microbiol Rev* **14**(2): 430-445.

- Otto K. (2004). „Anesthesia, Analgesia and Euthanasia.“ In: The Laboratory Mouse, Hedrich H.J. (Ed.), Academic Press, London: 555-569.
- Owen R.L. (1999). „Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective.“ *Semin Immunol* **11**(3): 157-163.
- Pappenheimer J.R., Dahl C.E., Karnovsky M.L. und Maggio J.E. (1994). „Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1942-1945.
- Peterson G.L. (1979). „Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.“ *Anal Biochem* **100**(2): 201-220.
- Reche P.A., Glutting J.P., Zhang H. und Reinherz E.L. (2004). „Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles.“ *Immunogenetics* **56**(6): 405-419.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P. und Ricciardi-Castagnoli P. (2001). „Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.“ *Nat Immunol* **2**(4): 361-367.
- RKI (2006). „Masern im Jahr 2005 und Ausbrüche in Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen in der ersten Hälfte des Jahres 2006.“ *Epidemiologisches Bulletin*: 205-211.
- Rodbard D. und Hutt D.M. (1974). „Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labelled antibody) assays: A generalized weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting.“ *Proceedings, Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine Int Atomic Energy Agency Vienna, Austria: Unipub, New York*: 165-192.
- Rodighiero C., Aman A.T., Kenny M.J., Moss J., Lencer W.I. und Hirst T.R. (1999). „Structural basis for the differential toxicity of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Construction of hybrid toxins identifies the A2-domain as the determinant of differential toxicity.“ *J Biol Chem* **274**(7): 3962-3969.
- Ruddock L.W., Ruston S.P., Kelly S.M., Price N.C., Freedman R.B. und Hirst T.R. (1995). „Kinetics of acid-mediated disassembly of the B subunit pentamer of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Molecular basis of pH stability.“ *J Biol Chem* **270**(50): 29953-29958.
- Scheerer P., Kramer A., Otte L., Seifert M., Wessner H., Scholz C., Krauss N., Schneider-Mergener J. und Hohne W. (2007). „Structure of an anti-cholera toxin antibody Fab in complex with an epitope-derived D-peptide: a case of polyspecific recognition.“ *J Mol Recognit* **20**(4): 263-274.
- Schengrund C.L. und Ringler N.J. (1989). „Binding of Vibrio cholera toxin and the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli to GM1, derivatives of GM1, and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands.“ *J Biol Chem* **264**(22): 13233-13237.

- Schwarz R., Kaspar A., Seelig J. und Kunnecke B. (2002). „Gastrointestinal transit times in mice and humans measured with 27Al and 19F nuclear magnetic resonance.“ *Magn Reson Med* **48**(2): 255-261.
- Shimizu S. (2004). „Routes of Administration.“ In: *The Laboratory Mouse*, Hedrich H.J. (Ed.), Academic Press, London: 527-542.
- Siklodi B., Vogt A.B., Kropshofer H., Falcioni F., Molina M., Bolin D.R., Campbell R., Hammerling G.J. und Nagy Z.A. (1998). „Binding affinity independent contribution of peptide length to the stability of peptide-HLA-DR complexes in live antigen presenting cells.“ *Hum Immunol* **59**(8): 463-471.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. und Klenk D.C. (1985). „Measurement of protein using bicinchoninic acid.“ *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Stein P.E., Leslie A.G., Finch J.T. und Carrell R.W. (1991). „Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution.“ *J Mol Biol* **221**(3): 941-959.
- Strobel S. und Mowat A.M. (1998). „Immune responses to dietary antigens: oral tolerance.“ *Immunol Today* **19**(4): 173-181.
- Terpend K., Boisgerault F., Blaton M.A., Desjeux J.F. und Heyman M. (1998). „Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma.“ *Gut* **42**(4): 538-545.
- Van Heyningen W.E., Carpenter C.C., Pierce N.F. und Greenough W.B., 3rd (1971). „Deactivation of cholera toxin by ganglioside.“ *J Infect Dis* **124**(4): 415-418.
- Van Niel G., Mallegol J., Bevilacqua C., Candalh C., Brugiere S., Tomaskovic-Crook E., Heath J.K., Cerf-Bensussan N. und Heyman M. (2003). „Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice.“ *Gut* **52**(12): 1690-1697.
- Vanden Broeck D., Horvath C. und De Wolf M.J. (2007). „Vibrio cholerae: Cholera toxin.“ *Int J Biochem Cell Biol* **39**(10): 1771-1775.
- Verdoliva A., Ruvo M., Cassani G. und Fassina G. (1995). „Topological mimicry of cross-reacting enantiomeric peptide antigens.“ *J Biol Chem* **270**(51): 30422-30427.
- Vieths S., Reindl J., Müller U., Hoffmann A. und Hausteil D. (1999). „Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure.“ *Eur Food Res Technol* **209**: 379-388.
- WHO (1980). „Declaration of global eradication of smallpox.“ *Weekly Epidemiological Record*: 148.

Wiechelman K.J., Braun R.D. und Fitzpatrick J.D. (1988). „Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.“ *Anal Biochem* **175**(1): 231-237.

Wilson D.B., Pinilla C., Wilson D.H., Schroder K., Boggiano C., Judkowski V., Kaye J., Hemmer B., Martin R. und Houghten R.A. (1999). „Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands.“ *J Immunol* **163**(12): 6424-6434.

Woodley J.F. (1994). „Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery.“ *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **11**(2-3): 61-95.

Anhang

Aminosäuresequenz von Ovalbumin

(UniProtKB/Swiss-Prot accession number P01012)

Die Immunisierungspeptide Ova₈₃₋₉₈, Ova₁₀₃₋₁₁₈ und Ova₃₄₉₋₃₆₄ sind unterstrichen.

10	20	30	40	50	60
GSIGAASMEF	CFDVFKEKLV	HHANENIFYC	PIAIMSALAM	VYLGAKDSTR	TQINKVVRFD
70	80	90	100	110	120
KLPGFGDSIE	AQCGTSVNVH	<u>SSLRDILNQI</u>	<u>TKPNDVYSFS</u>	<u>LASRLYAEER</u>	<u>YPILPEYLQC</u>
130	140	150	160	170	180
VKELYRGGLE	PINFQTAADQ	ARELINSWVE	SQTNGIIRNV	LQPSSVDSQT	AMVLVNAIVF
190	200	210	220	230	240
KGLWEKAFKD	EDTQAMPFRV	TEQESKPVQM	MYQIGLFRVA	SMASEKMKIL	ELPFASGTMS
250	260	270	280	290	300
MLVLLPDEVS	GLEQLESIIN	FEKLTEWTSS	NVMEERKIKV	YLPRMKMEEK	YNLTSVLMAM
310	320	330	340	350	360
GITDVFSSSA	NLSGISSAES	LKISQAVHAA	HAEINEAGRE	VVGSAEAGVD	<u>AASVSEEFRA</u>
370	380	385			
<u>DHPFLFCIKH</u>	IATNAVLFFG	RCVSP			

Gruppe 12: intraperitoneale Immunisierung mit retro-inversem Ova₃₄₉₋₃₆₄

	Maus #	78	79	80	81	82	83	84
Serum-IgG	anti-nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	anti-RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	6,107	5,505	4,903	4,903	4,903	5,204	5,204
	anti-Ova	n.b.	n.b.	0,258	n.b.	n.b.	n.b.	0,258
Fäces-IgA	anti-nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	anti-RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	0,301	0,602	0,000	0,301	0,301	0,301	0,602
	anti-Ova	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
intestinales IgA	anti-RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄	0,903	0,903	0,602	0,903	0,903	1,204	-----
	anti-Ova	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-----

Gruppe 13: intragastrale Immunisierung mit natürlichem Ova₈₃₋₉₈ und MSA

	Maus #	85	86	87	88	89	90	91
Serum-IgG	anti-nat Ova ₈₃₋₉₈	1,548	n.b.	2,451	0,043	2,752	2,150	n.b.
	anti-Ova	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Fäces-IgA	anti-nat Ova ₈₃₋₉₈	n.b.	n.b.	0,946	0,043	1,548	0,043	0,344
	anti-Ova	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,172	n.b.	n.b.
intestinales IgA	anti-nat Ova ₈₃₋₉₈	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,602	n.b.	n.b.
	anti-Ova	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Gruppe 14: intragastrale Immunisierung mit natürlichem Ova₁₀₃₋₁₁₈ und MSA

	Maus #	92	93	94	95	96	97	98
Serum-IgG	anti-nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	2,494	1,591	-----	2,494	1,591	2,795	2,795
	anti-Ova	n.b.	n.b.	-----	n.b.	n.b.	0,172	0,774
Fäces-IgA	anti-nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	0,597	n.b.	-----	n.b.	1,500	0,296	1,500
	anti-Ova	n.b.	n.b.	-----	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
intestinales IgA	anti-nat Ova ₁₀₃₋₁₁₈	0,473	n.b.	-----	n.b.	0,473	0,473	0,473
	anti-Ova	n.b.	n.b.	-----	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Gruppe 15: intragastrale Immunisierung mit natürlichem Ova₃₄₉₋₃₆₄ und MSA

	Maus #	99	100	101	102	103	104	105
Serum-IgG	anti-nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	2,537	2,236	2,537	2,537	2,537	1,333	1,935
	anti-Ova	n.b.	n.b.	1,376	n.b.	0,172	n.b.	n.b.
Fäces-IgA	anti-nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,000	n.b.	0,000
	anti-Ova	n.b.	n.b.	0,437	n.b.	1,075	n.b.	0,473
intestinales IgA	anti-nat Ova ₃₄₉₋₃₆₄	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,301	n.b.	n.b.
	anti-Ova	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,516	n.b.	n.b.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Immunantwort an der intestinalen Mukosa.	16
Abbildung 1-2: Stereochemie von Peptidmodifikationen.	23
Abbildung 4-1: Vergleich von natürlicher und simulierter Intestinalflüssigkeit.	68
Abbildung 4-2: Anteil der Einzelproteasen an der Gesamtaktivität simulierter IntFl.	70
Abbildung 4-3: Zymogramm.	70
Abbildung 4-4: Proteolysemuster von BSA.	71
Abbildung 4-5: Halbwertszeiten verdünnter Intestinalflüssigkeit.	72
Abbildung 4-6: Stabilität von Targetingliganden in Intestinalflüssigkeit.	76
Abbildung 4-7: Stereobild von Ovalbumin.	78
Abbildung 4-8: Peptidverdau im Proteolyseassay.	80
Abbildung 4-9: Degradation des natürlichen Peptids 2 im CTB-Konjugat.	81
Abbildung 4-10: Stabilisierung der Peptide durch Konjugation an CTB.	82
Abbildung 4-11: Stabilität des retro-inversen Peptids 2 im CTB-Konjugat.	83
Abbildung 5-1: Optimierung der CTB-Konjugatsynthese.	85
Abbildung 5-2: Derivatisierungsprofil der Immunisierungskonjugate.	86
Abbildung 5-3: G_{M1} -Bindung der Immunisierungskonjugate.	87
Abbildung 5-4: anti-Ova IgG in Präimmunseren.	89
Abbildung 5-5: anti-nat-Peptid IgG in Präimmunseren.	90
Abbildung 5-6: anti-RI Peptid IgG in Präimmunseren.	90
Abbildung 5-7: Verlauf der Körpergewichte während der Immunisierungsstudie.	91
Abbildung 5-8: anti-CTx IgG in den Präimmunseren.	92
Abbildung 5-9: anti-CTx IgG in den finalen Serumproben.	92
Abbildung 5-10: Erkennung des Crosslinkers in Peptomeren.	93
Abbildung 5-11: anti-Peptid IgG-Titer im Serum nach systemischer Immunisierung.	94
Abbildung 5-12: anti-Peptid IgG-Titer im Serum nach intragastraler Immunisierung.	94
Abbildung 5-13: anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes nach systemischer Immunisierung.	96
Abbildung 5-14: anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes nach intragastraler Immunisierung.	96
Abbildung 5-15: anti-Peptid IgA-Titer in Intestinalflüssigkeit nach systemischer Immunisierung.	97
Abbildung 5-16: anti-Peptid IgA-Titer in Intestinalflüssigkeit nach intragastraler Immunisierung.	97
Abbildung 5-17: anti-Peptid IgG-Titer in Serum nach intragastraler Immunisierung mit MSA-Zusatz.	98

Abbildung 5-18: anti-Peptid IgA-Titer im Fäzes nach intragastraler Immunisierung mit MSA-Zusatz.	98
Abbildung 5-19: anti-Peptid IgA-Titer in Intestinalflüssigkeit nach intragastraler Immunisierung mit MSA-Zusatz.	99
Abbildung 5-20: Aminosäureaustausch im Peptid natOva ₃₄₉₋₃₆₄ .	100
Abbildung 5-21: Aminosäureaustausch im Peptid RI Ova ₃₄₉₋₃₆₄ .	100
Abbildung 5-22: Kreuzerkennung durch anti-nat IgG im Serum.	102
Abbildung 5-23: Kreuzerkennung durch anti-nat IgA im Fäzes.	102
Abbildung 5-24: Kreuzerkennung durch anti-RI IgG im Serum.	103
Abbildung 5-25: Kreuzerkennung durch anti-RI IgA im Fäzes.	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die SDS-PAGE.	36
Tabelle 3-2: Übersicht über die eingesetzten Peptide zur Synthese von CTB-Peptid-Konjugaten.	42
Tabelle 3-3: Übersicht über die eingesetzten Peptide zur Synthese von BSA-Peptid-Konjugaten.	44
Tabelle 3-4: Übersicht über die Immunisierungsgruppen.	52
Tabelle 3-5: Immunisierungsplan.	53
Tabelle 3-6: Beschichtungs-Lösungen.	59
Tabelle 4-1: Vergleich verschiedener Präparationen muriner Intestinalflüssigkeit.	66
Tabelle 4-2: Proteasekonzentrationen in simulierter Intestinalflüssigkeit.	67
Tabelle 4-3: Gesamtproteasenaktivität.	69
Tabelle 4-4: Stabilität von Targetingliganden in natürlicher Intestinalflüssigkeit.	74
Tabelle 4-5: Degradation von Targetingliganden in simulierter Intestinalflüssigkeit.	75
Tabelle 4-6: Stabilität von Targetingliganden in simulierter Intestinalflüssigkeit mit Protein.	75
Tabelle 4-7: Ausgewählte Ovalbuminepitope.	77
Tabelle 4-8: Immunisierungspeptide.	79
Tabelle 4-9: Halbwertszeiten der Immunisierungspeptide.	82
Tabelle 5-1: Mittlerer Derivatisierungsgrad der Immunisierungskonjugate.	87
Tabelle 6-1: Potentielle Proteaseschnittstellen.	109

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Fabian Reuter
Geburtstag / -ort: 05.12.1978 in Münster

Schulbildung

1985-1989 Besuch der Grundschule Wellsee in Kiel
1989-1998 Besuch der Kieler Gelehrtenschule
Juni 1998 Abitur mit der Note 1,2

1998-1999 Zivildienst an einer Kindertagesstätte des Studentenwerks Schleswig-Holstein in Kiel

Studium

1999-2004 Studium im Studiengang Diplom-Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
August 2001 Vordiplom mit der Gesamtnote *sehr gut*
Januar - Juli 2004 Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.-J. Galla mit dem Thema *Zellelastizität und Struktur des Cytoskeletts von porcinen Gehirnkapillarendothelzellen unter dem Einfluss von TNF- α in vitro.*
05. Juli 2004 Diplom mit der Gesamtnote *sehr gut*

Promotion

2004-2008 Promotion am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Mukosaimmunologie

Abstracts

Reuter F., Bade S., Hirst T.R. und Frey A. (2005). „Enteric stability of ganglioside G_{MI}-binding vaccine targeting ligands.“ 12th International Congress of Mucosal Immunology (SMI); Boston, MA, USA.

Reuter F., Bade S., Hirst T.R. und Frey A. (2005). “Fate of vaccine targeting ligands upon exposure to intestinal proteases.” 36th Joint Annual Meeting of the German and the Scandinavian Societies for Immunology; Kiel. *Immunobiology* **210**(6-8):K.22/483.

Reuter F., Bade S., Hirst T.R. und Frey A. (2005). “*In vitro* proteolytic activity of intestinal fluid on vaccine targeting ligands.” Jahrestreffen des AK-Vakzine der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI); Borstel.

Reuter F., Bade S., Hirst T.R., Becker W.M. und Frey A. (2007). “Small intestinal fluid: a proteolytic barrier for allergens and vaccines.” 2. Gemeinsamer Deutscher Allergie-Kongress (ÄDA, DGAKI, GPA); Lübeck. *Allergo Journal* **16**:S55.

Bade S., Gorris H.H., Reuter F., Becker W.M. und Frey A. (2007). “Gastrointestinal processing of food allergens.” 2. Gemeinsamer Deutscher Allergie-Kongress (ÄDA, DGAKI, GPA); Lübeck. *Allergo Journal* **16**:S57.

Reuter F., Bade S. und Frey A. (2008). “Digestive stability of antigens – relevance for oral immunization.” Jahrestreffen des AK-Vakzine der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI); Borstel.

Bade S., Hauber H.P., Reuter F., Becker W.M. und Frey A. (2008). „Stabilität von Erdnussallergenen gegenüber intestinalen Proteasen.“ 3. Gemeinsamer Deutscher Allergie-Kongress (ÄDA, DGAKI, GPA); Erfurt. *Allergo Journal* **17**:S66.

Publikationen

Reuter F., Bade S., Hirst T.R. und Frey A. „Bystander protein protects potential vaccine targeting ligands against intestinal proteolysis.“ Manuskript in Vorbereitung zur Einreichung.

Bade S., Gorris H.H., Koelling S., Olivier V., Reuter F. und Frey A. „Digestive enzymes are compartmentalized within the small intestinal lumen.“ Manuskript in Vorbereitung zur Einreichung.

Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Referentin Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus für die Prüfungsbetreuung und bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme des Korreferats.

Meinem Betreuer PD Dr. Andreas Frey danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Bereitstellung des Themas, für hilfreiche Diskussionen und sein Engagement.

Dr. Steffen Bade danke ich für Hilfestellungen und Diskussionen besonders bei immunologischen Fragestellungen, Dr. Niels Röckendorf ebenso bei chemischen Themen.

Für Unterstützung bei Manuskriptdurchsichten und Diskussionen danke ich Dr. Barbara Frey.

Hans-Heiner Gorris, Thurid Böthel, Katrin Wehry und Naho Fujimoto standen als nette und hilfsbereite Kollegen im Arbeitskreis zur Seite.

Imke Wysokinski, Hanne Krüger, Heidi Ehmke und allen Azubis danke ich für Unterstützung bei der Laborarbeit.

Meiner Familie danke ich für alle Unterstützung auf meinem Weg zur Promotion.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Ich erkläre, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden ist.

Strande, den 18.10.2008

Fabian Reuter.