

**Synthese farbstoffmarkierter Gliadinpeptide
zur Untersuchung intrazellulärer
Transportprozesse im Rahmen von Zöliakie**

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Sevgi Arampatzi

vorgelegt dem Fachbereich der



Gießen

August 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

2. Gutachter: Prof. Dr. Richard Göttlich

Vorbemerkung

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um ein Kooperationsprojekt zwischen der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Maison, Institut für Organische Chemie und der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus-Peter Zimmer, Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung für Pädiatrie und Neonatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die in den Kapiteln 4.4 und 4.5 beschriebenen Zellassays wurden von Christian Zimmermann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer durchgeführt. Diese Ergebnisse sind daher in der geplanten Dissertationsschrift von Christian Zimmermann ebenfalls enthalten.

Bei dem in Kapitel 4.6 beschriebenen Nebenprojekt handelt es sich ebenfalls um eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer. Dieses wird daher in der geplanten Dissertationsschrift von Georg Leonhardt enthalten sein.

Die Messung aller in dieser Dissertationsarbeit verwendeten MALDI-TOF-Spektren erfolgte durch Prof. Günter Lochnit aus dem Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen April 2009 und Juni 2012 am Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Maison durchgeführt.

Mein Dank gilt Prof. Wolfgang Maison für die interessante Themenstellung, die freundliche Betreuung und den Freiraum zur Bearbeitung dieses Promotionsthemas.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der AG Maison möchte ich mich für die angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Faiza Khalil, Dorith Claes, Heike Thomanek, sowie die Ehemaligen Nina Deppermann, Christian Küchenthal und Falk Wienhold. Allen aktuellen Arbeitsgruppen-Mitgliedern in Hamburg wünsche ich weiterhin viel Erfolg. Ganz herzlich möchte ich mich bei „meinem“ Auszubildenden Marcus Zimmer für die seelische und praktische Unterstützung im Labor besonders in der Endphase dieser Doktorarbeit bedanken. Mein Dank gilt auch Claudia Wackendorff für die Synthese zahlreicher Peptide in Hamburg.

Unseren Kooperationspartnern, der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus-Peter Zimmer aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung für Pädiatrie und Neonatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich bei Prof. Silvia Rudloff für die kompetente und freundliche Beratung bedanken. Ein herzlicher Dank gebührt Christian Zimmermann für die Durchführung der Zellassays. Für die geduldige und kompetente Beantwortung zahlreicher Fragen danke ich ihm, sowie Georg Leonhardt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der AG Göttlich und AG Schreiner für den freundschaftlichen Austausch von Chemikalien und Wissen, sowie deren Hilfsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Lukas Wanka, der mir bei allen Fragen zur Peptidsynthese stets kompetent zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich Friederike Gasiorek und Jan-Philipp Berndt danken, die mich mit ihren Arbeiten tatkräftig unterstützt haben. Für euer Studium und eure Promotion wünsche ich euch viel Spaß und weiterhin viel Erfolg.

Ich danke allen Angestellten des Instituts für ihre Unterstützung durch zahlreiche Messungen. Vor allem Herrn Dr. Röcker, Herrn Dr. Neudert und Herrn Schmidt möchte ich für die ständige Unterstützung bei Reparaturen, Ratschläge und Organisation danken.

Prof. Günter Lochnit aus dem Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Messung zahlreicher MALDI-TOF-Spektren.

Meinen Kommilitonen Kerstin Sann, Rabea Dippel, Tamara Neu, Kira Hof, Daniela Zell und Alexander Rein danke ich für die lustigen Stunden während des Semesteressens, welches mich den Laboralltag - wenn auch für kurze Zeit - vergessen ließ.

Prof. Dr. Richard Göttlich danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die moralische Unterstützung und den Freiraum, den sie mir während meines Studiums und der Promotion gegeben haben.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
Ahx	Aminohexansäure
Äq.	Äquivalent
AS	Aminosäure
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
c	Konzentration
CatD	Cathepsin D
CTB	Choleratoxin B
DC	Dünnschichtchromatogram
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDT	Ethandithiol
EE	Early Endosome
EEA-1	Early Endosome Antigen-1
ES	Elektronensprayionisation
FcRn	Neonataler F _C -Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
Fmoc	Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl
HATU	2-(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HLA-DQ	Human Leukocyte Antigen des Isotyps DQ
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen des Isotyps DR
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPLC	High pressure liquid chromatography

ID	Ionendurchmesser
konz.	konzentriert
LAMP	Lysosome-associated Membrane Protein
LCMS	Liquid chromatography mass spectrometry
LE	Late endosome
Lsg.	Lösung
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight
M β CD	Methyl- β -cyclodextrin
MHC-I	Major Histocompatibility Complex class I
MHC-II	Major Histocompatibility Complex class II
MHS	6-Maleimidhexansäure-succinimid
Mtr	4-Methoxy-2,3,6 trimethylbenzolsulfonyl
Mtt	4-Methyltrityl
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIP-OSu	4-Hydroxy-3-iod-5-nitrophenyl-succinimid
p31-43	Gliadinpeptid: LGQQQPFPPQQPY
p56-68	Gliadinpeptid: LQLQPFPPQQLPY
PBS	Phosphate buffered saline
RT	Raumtemperatur
SPDP	<i>N</i> -succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
Trt	Trityl
R_f	Retentionsfaktor

Aminosäurecodes:

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
Y	Tyr	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Glutenunverträglichkeit	17
2	Kenntnisstand	23
2.1	Pathogenesemodell von Zöliakie.....	23
2.2	Intrazelluläre Transportvorgänge	25
2.3	Intrazellulärer Transport von Gliadinpeptiden durch Epithelzellen	29
2.4	Orale Toleranz.....	30
2.5	Choleratoxin.....	32
3	Zielsetzung.....	34
4	Resultate und Diskussion	36
4.1	Besondere Methoden und Reagenzien.....	36
4.2	Synthese der Zielverbindungen.....	48
4.3	Inkubationsstudien mit CatD	99
4.4	Untersuchung des intrazellulären Gliadinpeptidtransports mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie	110
4.5	Untersuchung des intrazellulären Gliadinpeptidtransports mit Hilfe eines Transwell-Systems	120
4.6	IgG-abhängige Transcytose von Gliadinpeptiden in Enterocyten	136
5	Zusammenfassung.....	140
6	Summary.....	145
7	Ausblick.....	149
8	Experimenteller Teil.....	151
8.1	Präparative Reinigung	151
8.2	Analytik	152
8.3	Synthesen bereits bekannter Verbindungen.....	154
8.4	Synthesen	154
8.5	Durchführung der Inkubationsstudien mit CatD.....	198
8.6	Durchführung der Zellassays	199
9	Gefahrstoffe	203
10	Literaturverzeichnis	206

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Mensch ist jeden Tag einer großen Vielfalt von potenziellen Krankheitserregern (Pathogenen) wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten ausgesetzt – durch Berührung, durch Aufnahme mit der Nahrung oder durch die Atemwege (Abb. 1). Tatsächlich müssen sich alle mehrzelligen Organismen gegen Infektion, die durch diese potenziell gefährlichen Eindringlinge hervorgerufen werden können, wehren.



Abb. 1.1: Sekundärelektronenmikroskop-Aufnahme des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* (links),¹ Cholerabakterien im Elektronenmikroskop (rechts).²

Die erste physikalische Barriere gegen pathogene Mikroorganismen bildet bei Wirbeltieren die Haut und andere Epithelien, wie Lungen- und Darmepithel (Abb. 1.2).

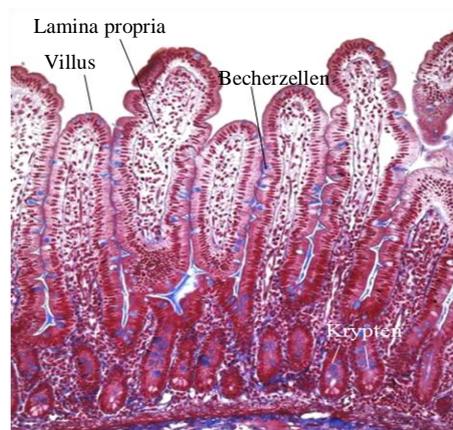


Abb. 1.2: Querschnitt durch die Dünndarmwand des Menschen mit Zotten (Villi), schleimabsondernden Becherzellen und Krypten.³

Im Körperinneren sind Epithelien mit einer Schleimschicht, bestehend aus Mucin und anderen Glykoproteinen, bedeckt, die sie vor mikrobiellen, mechanischen und chemischen Angriffen schützt. Außerdem enthält die Schleimschicht antimikrobielle Peptide, sog. Defensine,⁴⁻⁶ die Pathogene abtöten oder ihr Wachstum hemmen.⁷

Gelegentlich durchbrechen Mikroorganismen allerdings die Epithelbarrieren. Dann muss das Immunsystem diese erkennen und vernichten, ohne jedoch körpereigenen Zellen zu schaden.

Der menschliche Körper verfügt dabei über zwei Abwehrlinien: ein angeborenes (natives) Immunsystem, das rasch bestimmte Strukturmerkmale erkennt, die bei Krankheitserregern stark konserviert sind, aber dem Wirtsorganismus fehlen, und ein adaptives (erworbenes) Immunsystem, das auf spezifische Strukturen von bestimmten Mikroorganismen reagiert.^{8,9}

Beide Typen von Immunantworten arbeiten Hand in Hand, um eingedrungene Krankheitserreger zu bekämpfen. So aktiviert das angeborene Immunsystem das adaptive Immunsystem erst dann, wenn es auf Pathogenen charakteristische Merkmale identifiziert hat.

Das adaptive Immunsystem hat sich in der Evolution erst vor etwa 450 Millionen Jahren entwickelt und kommt ausschließlich bei Wirbeltieren vor. Dagegen findet man angeborene Immunantworten bei Wirbeltieren, Wirbellosen und auch bei Pflanzen.¹⁰

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das unspezifische, angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungsmaßnahme gegen eingedrungene Krankheitserreger. Diese angeborene Immunabwehr erkennt sog. pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) auf der Oberfläche von Pathogenen, die dem eigenen Körper fremd sind. Es handelt sich dabei meistens um mikrobielle DNA, Lipide, Polysaccharide oder Strukturproteine.^{7,11-12} Ein wichtiges PAMP ist das Lipopolysaccharid (LPS), eine spezifische Klasse von Glykolipiden, das in der Zellwand von gramnegativen Bakterien wie *E. coli* vorkommt (Abb. 1.3).¹

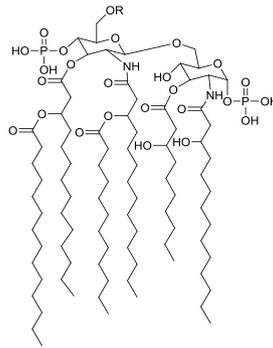


Abb. 1.3: Die Grundstruktur eines Lipopolysaccharids (LPS). Der hydrophobe Transmembranteil besteht aus sechs Fettsäureketten, die an zwei Glucosamine gebunden sind. An das LPS folgt eine lange, verzweigte Zuckerkette (gekennzeichnet mit R).¹³

Die Erkennung erfolgt mittels speziellen Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs), welche sowohl lösliche Rezeptoren im Blut (Komponenten des Komplementsystems)^a als auch membrangebundene Rezeptoren auf der Oberfläche von Wirtszellen sein können. Das Binden pathogenassoziierter Moleküle an spezifische Rezeptoren ruft zwei angeborene Immunantworten hervor: die Phagozytose durch Zellen wie Makrophagen und das Auslösen einer Entzündungsreaktion. Letzteres ist eine multikomponente, Antigen-unspezifische Reaktion des Körpers auf eine Infektion.¹⁴

Ein Beispiel für einen löslichen Mustererkennungsrezeptor ist das Mannose-bindende Lektin (MBL), ein sog. C-Typ Lektin (Abb. 1.4).¹⁵

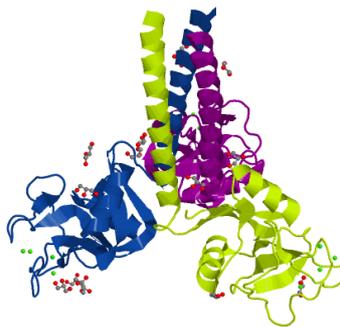


Abb. 1.4: Mannose-bindendes Lektin als Trimer.¹⁶

^a Das Komplementsystem ist ein Mechanismus des angeborenen Immunsystems. Es besteht aus etwa 20 miteinander interagierenden löslichen Proteinen, die hauptsächlich in der Leber produziert werden. Sie zirkulieren im Blut und der extrazellulären Flüssigkeiten, wo sie inaktiv bleiben, bis eine Infektion sie aktiviert. Je nach Auslöser unterscheidet man den klassischen (Antikörper), den alternativen (spontan) und den Lektinweg (MBL). Ursprünglich wurden diese Proteine entdeckt, weil sie die Wirkung von Antikörpern verstärken und ergänzen (komplementieren).

Dieses Serumprotein des Komplementsystems bildet Cluster aus sechs kohlenhydratbindenden Köpfen, die um einen zentralen kollagenähnlichen Stiel angeordnet sind. Diese Konstruktion bindet spezifisch an Mannose- und Fucosereste in der Zellwand von Bakterien oder Pilzen (Abb. 1.5). Die Bindung von MBL an das Pathogen aktiviert über assoziierte Proteasen den sog. Lektinweg¹⁷⁻¹⁸ des Komplementsystems,¹⁹ der zur Zerstörung (Lyse) des Pathogens führt.

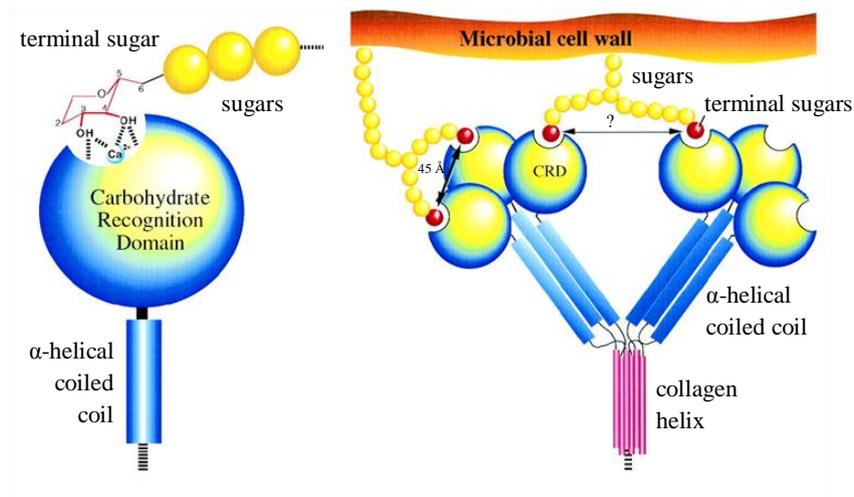


Abb. 1.5: MBP bindet über seine Kohlenhydrat-erkennende Domäne (carbohydrate recognition domain, CRD) terminale Zucker eines Oligosaccharids (rechts). CRD des C-Typ-Lektins (Ca^{2+} -abhängig) erkennt spezifisch äquatoriale OH-Gruppen an C3- und C4-Position, so wie sie z.B. in *N*-Acetylglucosamin, Fucose oder Mannose vorliegen (links).¹⁰

Viele der membrangebundenen Mustererkennungsrezeptoren sind Mitglieder der Toll-like-Rezeptor(TLR)-Familie (Abb. 1.6).^{13,20-22} Menschen verfügen über mindestens zehn TLRs.

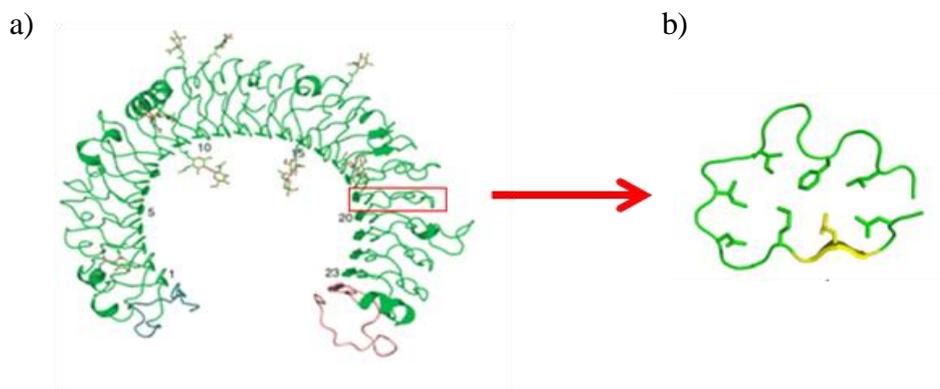


Abb. 1.6: Die PAMP-Erkennungseinheit des TLR3. Die 23 LRR (s. Text) sind in grün, der *N*-Terminus in blau und der *C*-Terminus in pink dargestellt (a). Die Struktur eines einzelnen LRR zeigt die Lage der Aminosäure-Seitenketten, die einen hydrophoben Kern bilden. Eine Leucinseitenkette ist in gelb dargestellt (b).²³

Abb. 1.6 zeigt die extrazelluläre Domäne dieser Transmembranproteine, die in erster Linie aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen besteht – man bezeichnet sie als leucinreiche Wiederholungen (leucine rich repeats, LRRs), weil jedes Repeat mindestens sechs Leucine enthält.²³⁻²⁴ Daran schließt sich eine Transmembranhelix, sowie eine intrazelluläre, signalübertragende TIR(Toll/Interleukin-1-Rezeptor)-Domäne an. Letztere dient als Andockstelle für bestimmte Proteine, die über eine Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors und letztlich zur Sekretion extrazellulärer Signalstoffe (Cytokine) führen.²⁵ Cytokine induzieren eine Entzündungsreaktion und tragen zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei.

Einige Zellen des angeborenen Immunsystems können auch direkt eine adaptive Immunantwort induzieren, indem sie mikrobielle Antigene sog.n T-Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. Solch eine Eigenschaft besitzen die dendritischen Zellen (Abb. 1.7). Sie erkennen mittels TLRs eingedrungene Mikroorganismen, phagozytieren diese an der Infektionsstelle und wandern zu einem peripheren Lymphorgan und stimulieren - als sog. Antigen-präsentierende Zellen - T-Zellen direkt zur Antwort auf die Pathogene.²⁶⁻²⁷

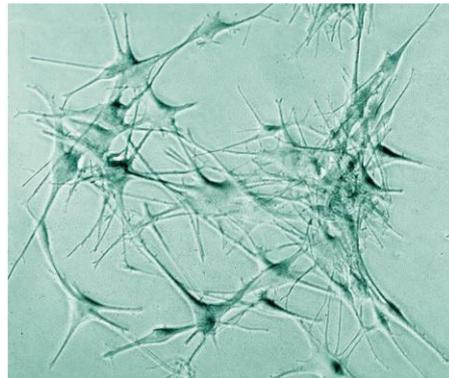


Abb. 1.7: Dendritische Zellen im Elektronenmikroskop.²⁸

TLRs befinden sich auch auf der Oberfläche von anderen phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Monocyten, neutrophilen Granulocyten, aber auch auf den Darm- sowie Lungenepithelien. Bindet ein Ligand an einen solchen Rezeptor, stülpt der Phagozyt seine Plasmamembran über den Erreger und nimmt ihn in ein großes membranbegrenztes Phagosom auf. Einmal phagozytiert, setzen die phagozytierenden Zellen eine beeindruckende Kombination aus abbauenden Enzymen (Lysozym, Hydrolasen), antimikrobiellen Peptiden (Defensinen), reaktiven Sauerstoffspezies frei.

Außerdem setzen aktivierte Makrophagen Signalstoffe (Chemokine) frei, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen, weitere phagozytierende Zellen an den Infektionsort locken und das adaptive Immunsystem aktivieren.²⁹

Anders als Bakterien oder Parasiten tragen Viren auf ihrer Oberfläche keine pathogenassoziierten molekularen Muster. Im Lebenszyklus vieler Viren tritt allerdings eine doppelsträngige RNS als Zwischenprodukt auf. Virusinfizierte Zellen können diese aufspüren. Durch Synthese und Ausschüttung zweier Cytokine – Interferon α (IFN- α) und Interferon γ (IFN- γ) wird ein intrazellulärer Signalweg induziert, der die Virusvermehrung hemmt. Außerdem werden Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert, die bei den infizierten Zellen die Apoptose einleiten.³⁰⁻³¹

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Für die erstaunliche Spezifität der adaptiven Immunantworten ist eine Untergruppe der weißen Blutzellen verantwortlich: die Lymphocyten. Man findet sie stets zirkulierend zwischen Blut und Lymphe (farblose Flüssigkeit in den Lymphgefäßen, die die Lymphknoten des Körpers untereinander und mit dem Blutkreislauf verbinden) (Abb. 1.8).³²⁻³³

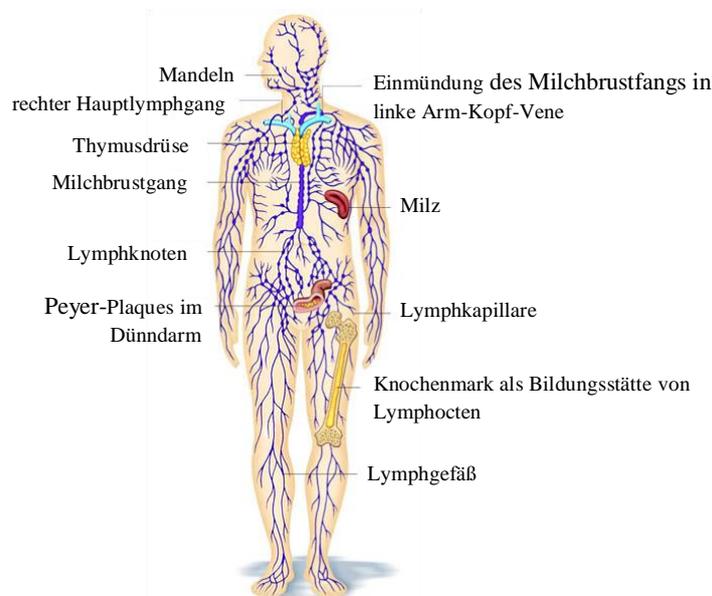


Abb. 1.8: Die Lymphorgane des Menschen.³⁴

T-Zellen entwickeln sich im Thymus und B-Zellen im Knochenmark (engl.: bone marrow, daher B), die deswegen als zentrale (oder primäre) Lymphorgane bezeichnet werden. Ein Teil

der jungen Lymphocyten reifen heran und wandern in periphere (oder sekundäre) Lymphorgane – wie Lymphknoten, Milz, ephitheliale lymphatische Gewebe des Magen-Darm-Traktes, Atemwege und Haut - wo sie erstmals auf fremde Antigene treffen. Erst nach dieser Antigenaktivierung werden T- und B-Zellen, die sich ursprünglich aus den gleichen Stammzellen entwickeln, morphologisch unterscheidbar. Sie werden zur Proliferation stimuliert und reifen zu Effektor-T-Zellen, sowie antikörpersezernierenden Effektor-B-Zellen heran.³⁵

Es gibt zwei unterschiedliche Klassen von T-Zellen: cytotoxische T-Lymphocyten (T_C) und Helfer-T-Zellen (T_H). Während T_C -Zellen infizierte Zellen direkt töten, helfen T_H -Zellen bei der Aktivierung von Makrophagen, B-Zellen und T_C -Zellen durch Ausschüttung von Cytokinen.³⁶

Das adaptive Immunsystem besteht aus zwei unterschiedlichen Systemen: der humoralen (oder Antikörper-vermittelten) Immunantwort und der zellulären (oder zellvermittelten) Immunantwort. Hierfür sind entsprechend die zwei unterschiedlichen Klassen von Lymphocyten verantwortlich: für die Ersteren die B-Zellen und für die Letzteren die T-Zellen.

Während bei der humoralen Immunantwort Antikörper an Pathogene binden, erkennen bei der zellulären Immunantwort cytotoxische T-Lymphocyten ein fremdes Antigen, welches ihnen auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen (Wirtszelle) präsentiert wird, und töten diese pathogeninfizierte Zelle ab.

Zudem kann sowohl die Antikörperbindung an eingedrungene Krankheitserreger, als auch die von T-Zellen vermittelten Signalmoleküle Makrophagen zur Phagocytose aktivieren.³⁷

1.1.2.1 Humorale Immunantwort

Bei der humoralen Immunantwort binden lösliche Proteine, die man als Antikörper oder Immunoglobuline bezeichnet, an körperfremde Antigene und kennzeichnen diese als Eindringlinge von außen. Die Sekretion der Antikörper erfolgt durch Plasmazellen, die aus Lymphocyten (B-Zellen) hervorgehen. In diesem Zusammenhang wird ein körperfremdes Makromolekül, das gezielt an einen Antikörper bindet, als Antigen bezeichnet. Löst die Bindung eines fremden Moleküls physiologisch eine Immunantwort aus, so wird diese als Immunogen bezeichnet. Die spezifische Affinität eines Antikörpers richtet sich nicht gegen

das gesamte Antigen, sondern nur gegen eine ganz bestimmte Stelle auf diesem Molekül, welches als Epitop oder antigene Determinate bezeichnet wird.

Antikörper

Antikörper verteidigen den menschlichen Organismus gegen Infektionen, indem sie Viren und Mikroorganismen inaktivieren, sowie das Komplementsystem und verschiedene Typen von Lymphocyten veranlassen, die eingedrungenen Krankheitserreger zu töten. Antikörper werden ausschließlich von B-Zellen synthetisiert – es gibt etwa 10^9 verschiedene Antikörperproteine, jedes mit einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz und einer unterschiedlichen Antigenbindungsstelle. Antikörper, die man auch als Immunglobuline (I_g) bezeichnet, sind die Hauptproteinkomponenten des Bluts, wo sie etwa 20% aller Plasmaproteine ausmachen.³⁸⁻⁴⁰

Die einfachsten Antikörpermoleküle sind Y-förmige Strukturen mit zwei identischen Antigenbindungsstellen (bivalente Antikörper). Die Grundstruktur enthält vier Polypeptidketten, zwei identische leichte Ketten oder L-Ketten (25 kD) und zwei identische schwere Ketten oder H-Ketten (50 kD; engl.: heavy), die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind.⁴¹⁻⁴² Die Funktion der Antikörper beschränkt sich nicht nur auf die Fähigkeit, Antigene zu binden, sondern sie besitzen auch andere wichtige biologische Aktivitäten, die man als Effektorfunktionen bezeichnet.³⁸ Beispielsweise starten Antikörper über den klassischen Weg die Komplementkaskade, welches zur Lyse der Zielzellen führt. Vermittelt werden diese Vorgänge über den „Stiel“ des Y-förmigen Moleküls, den man als F_c -Fragment (fragment crystallizing) bezeichnet. Entsprechend heißen die beiden „Arme“ F_{ab} -Fragmente (fragments, antigen-binding).⁴³⁻⁴⁴

Da in einem Antikörper zwei Bindungsstellen vorhanden sind, kann es mehrere Antigene vernetzen. Diese Aggregate können von Makrophagen schnell phagozytiert und abgebaut werden. Die sog. Scharnier-Region (oder hinge-Region) erhöht zudem wegen ihrer Segmentflexibilität die Effizienz der Antigenbindung und der Kreuzvernetzung (Abb. 1.9).⁴⁵

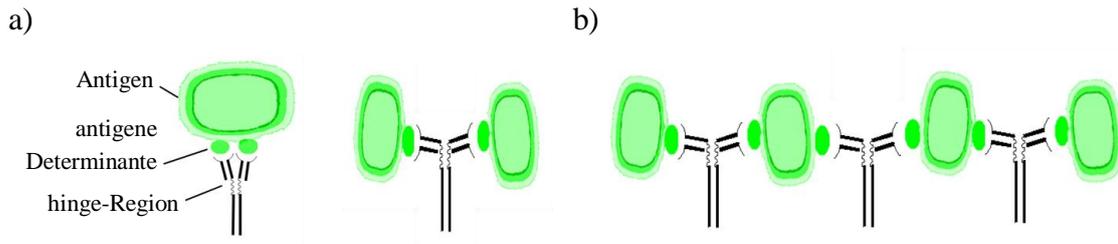


Abb. 1.9: Die durch die hinge-Region gegebene Flexibilität bei der Antigenbindung (a) sowie die Kreuzvernetzung von Antigenen durch Antikörper (b) in einer schematischen Darstellung.

Untersucht man die dreidimensionale Struktur von Antikörpermolekülen, so stellt sich heraus, dass jede leichte und schwere Kette aus einer bestimmten Anzahl von sich wiederholenden Strukturelementen, den Immunoglobulin(Ig)-Domanen, aufgebaut ist. Diese sog. Immunoglobulinfaltung besteht aus zwei β -Faltblattstrukturen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die L-Kette besteht aus einer *N*-terminalen variablen Domäne (V_L) und einer *C*-terminalen konstanten Domäne (C_L) bezogen auf die Aminosäuresequenz, während eine H-Kette aus einer *N*-terminalen V_H -Region, sowie – je nach Antikörperklasse – aus drei oder vier C_H -Regionen.⁴² Die Variabilität der Aminosäuresequenzen der variablen Domänen der L- und H-Ketten konzentriert sich auf drei kurze, sog. hypervariable oder komplementaritätsbestimmende Regionen (complementarity-determining regions, CDRs), die als Schleifen aus dem Ende der variablen Ig-Domänen herausragen und die Antigenbindungsstellen bilden (Abb. 1.10).

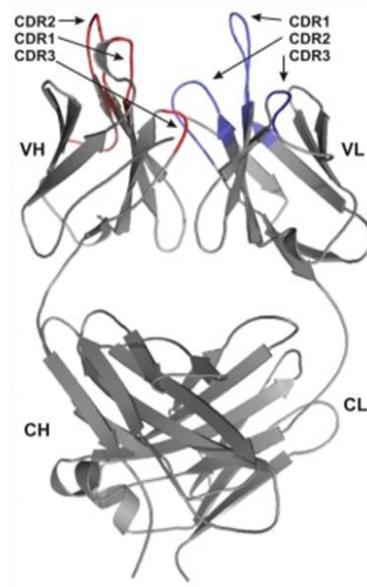


Abb. 1.10: Kristallstruktur des F_{ab} -Fragments eines monoklonalen Antikörpers einer Maus. Die jeweils drei CRDs der V_H -Region sind in rot und die der V_L -Region in blau dargestellt.⁴⁶

Abweichungen in der Aminosäuresequenz der Schleifen sind der wichtigste Mechanismus, mit dem das Immunsystem die Vielfalt der Antikörper (und auch der T-Zell-Rezeptoren, wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben wird) erzeugt.⁴⁷⁻⁴⁹

Pro Antikörper-, „Arm“ nähern sich sechs hypervariable Schleifen – nämlich jeweils drei der V_L- und V_H-Regionen – so einander an, dass sie eine einzige Oberfläche bilden, die die Antigenbindungsstelle aufbaut. Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-, sowie hydrophobe Wechselwirkungen ergeben eine hochspezifische, stark affine Antikörper-Antigen-Bindung. Gemäß dem „induced-fit“-Modell passt sich der Antikörper zu einem gewissen Grad in seiner Struktur an das Antigen an.⁵⁰⁻⁵³

In Säugetieren gibt es fünf verschiedene Klassen von Antikörpern: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Von allen Antikörpern liegt IgG im Blutserum in der höchsten Konzentration vor (75%). Es ist ein vierkettiges Monomer, das während der sekundären Immunantwort ausgeschüttet wird und u.a. die Aktivierung des Komplementsystems unterstützt.⁵⁴⁻⁵⁵

In Körpersekreten wie Muttermilch, Blut, Tränen, sowie Ausscheidungen der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes ist IgA der am häufigsten vorkommende Antikörper. Während IgA im Blut ein Monomer aus vier Polypeptidketten ist, liegt es in den Sekreten als Dimer aus acht Polypeptidketten vor. Das IgA-Dimer wird mit Hilfe eines spezifischen F_C-Rezeptors, welches auf der Oberfläche von sekretorischen Epithelzellen exprimiert ist, aus dem extrazellulären Raum durch die Epithelzelle hindurch in das Sekret transportiert. Dieser Rezeptor kann – wenn auch wesentlich schlechter – auch IgM in die Sekrete einbringen. Dies ist der Grund, warum bei Personen mit einem IgA-Mangel (das am häufigsten vorkommende Antikörperdefizit) keine klinischen Symptome nachweisbar sind.⁵⁶

1.1.2.2 Die zelluläre Immunantwort

Lösliche Antikörper erkennen sehr gut extrazelluläre Krankheitserreger, bieten aber gegen Mikroorganismen, die sich überwiegend im Inneren einer Wirtszelle aufhalten, wie beispielsweise Viren, keinen Schutz. Zur Bekämpfung derartiger Pathogene ist die von T-Zellen ausgehende zellvermittelte Immunantwort unerlässlich. Während B-Zellen und die von ihnen ausgeschütteten Antikörper intakte und native Antigene erkennen, reagieren T-Zellen mit Fragmenten (meistens kurze Peptidsequenzen) von Proteinantigenen, die innerhalb einer

Antigen-präsentierenden Zelle (dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen) entstehen.⁵⁷⁻⁵⁸ Die im Cytoplasma während des Proteinabbaus durch Proteasomen⁵⁹ entstandenen Peptidfragmente werden auf die Zelloberfläche transportiert, wo sie - gebunden an ein integrales Membranprotein – den T-Zellen präsentiert werden.⁶⁰⁻⁶³ Hierbei handelt es sich um Haupthistokompatibilitätsproteine (major histocompatibility; MHC-Proteine) der Klasse I^{b,64} (Abb. 1.11).

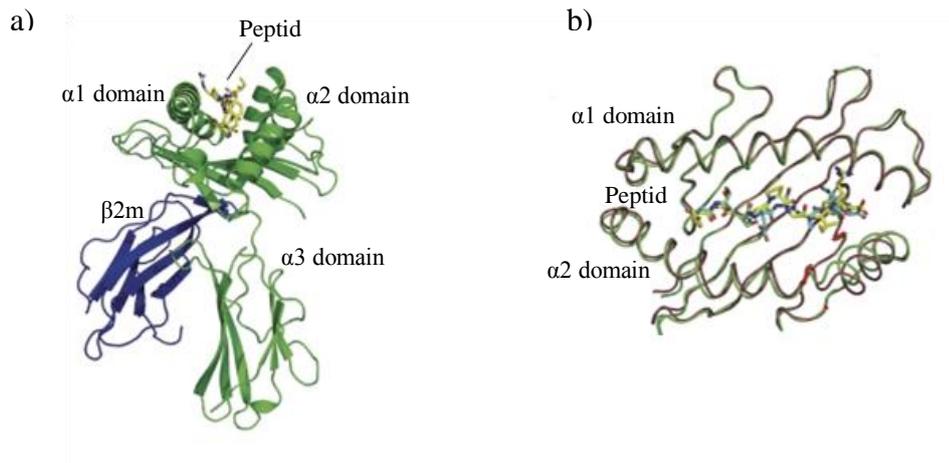


Abb. 1.11: Kristallstruktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls gebunden an ein 9mer-Peptid (a) sowie Blick von oben auf die Peptidbindungsstelle (b).⁶⁵

Der Komplex aus körperfremdem Peptid, MHC-Protein^c und T-Zell-Rezeptor löst bei den infizierten Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) aus.⁶⁶⁻⁶⁹

Klasse-I-MHC-Proteine bestehen aus einer membrandurchspannenden α -Kette (44 kD), die nicht kovalent an ein extrazelluläres, kleineres Polypeptid (12 kD), dem β_2 -Mikroglobulin gebunden ist.⁷⁰⁻⁷² Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 und α_3), wobei α_3 und die β_2 -Mikroglobulin-Untereinheit eine Immunoglobulinfaltung besitzen. Die beiden Helices der α_1 - und α_2 -Domänen bilden die Peptidbindungsstelle für die Präsentation an cytotoxische T-Lymphocyten.⁷²

Während MHC-Proteine^c der Klasse I auf fast allen Zellen vorhanden sind, findet man Klasse-II-MHC-Proteine nur auf Antigen-präsentierenden Zellen.⁷³⁻⁷⁴ Letztere bestehen aus

^b Dass cytotoxische T-Zellen ihre Antigene spezifisch, aber nur in Kombination mit körpereigenen MHC-Proteinen erkennen, wurde erstmals 1974 von Zinkernagel und Doherty entdeckt, wofür sie 1996 den Nobelpreis in Medizin erhielten.

^c Da man MHC-Proteine bei Menschen erst auf Leukocyten (weißen Blutzellen) entdeckte, heißen sie hier HLA- (human leukocyte antigen) Antigene.

zwei membrandurchspannenden Polypeptidketten (α - (33 kD) und β -Kette (30 kD)), mit jeweils einer Ig-ähnlichen Domäne (α_2 und β_2). Die Peptidbindungsstelle zur Präsentation an Helfer-T-Zellen wird von den Domänen α_1 und β_1 gebildet (Abb. 1.12).⁷⁵⁻⁷⁹

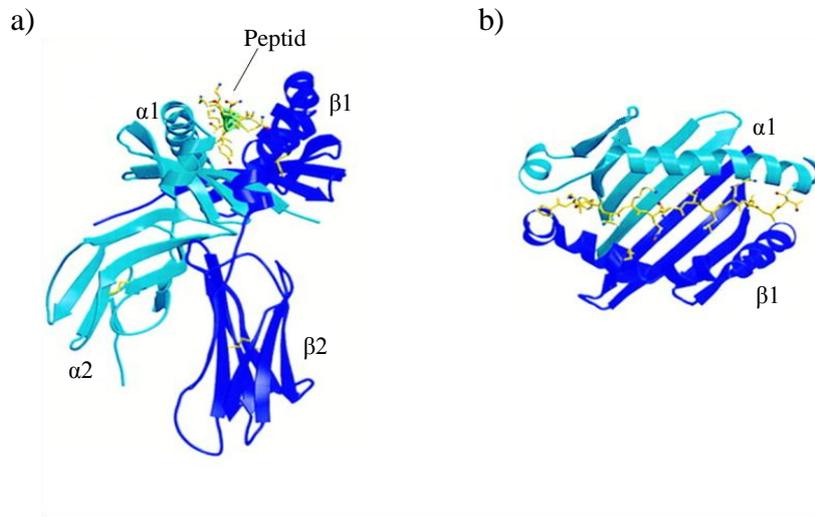


Abb. 1.12: Kristallstruktur eines MHC-Klasse-II-Proteins gebunden an ein Peptid (a) sowie Blick von oben auf die Peptidbindungsstelle (b).⁷⁴

Klasse-II-MHC-Proteine präsentieren Helfer-T-Zellen Peptide, die durch den Abbau von, durch Endocytose aufgenommenen, Proteinen stammen.⁶⁷ Anders als cytotoxische T-Zellen, sind Helfer-T-Zellen sowohl für die Abwehr von extrazellulären, als auch intrazellulären Krankheitserregern unerlässlich.

Helfer-Zellen aktivieren B-Lymphocyten zur Produktion von Antikörpern, induzieren bei Makrophagen die Phagocytose und helfen cytotoxischen T-Zellen bei der Tötung infizierter Zellen.⁷⁴ Sie tun dies durch die Sekretion verschiedener Cytokine und durch die Expression von kostimulatorischen Proteinen auf ihrer Oberfläche. Einmal aktiviert, können aus einer Helfer-T-Zelle zwei unterschiedliche Typen von Effektorzellen entstehen: T_H1 -Zellen (Sekretion von $IFN-\gamma$ oder $TNF-\alpha$), die bei der Aktivierung von Makrophagen und T_C -Zellen helfen, sowie T_H2 -Zellen (Sekretion von Interleukinen), die B-Zellen helfen.⁸⁰

Während also cytotoxische T-Zellen Peptide auf MHC-Klasse-I-Proteinen erkennen, werden Helfer-T-Zellen diese auf MHC-Klasse-II-Proteinen präsentiert.^{74,81-84} Die Erkennung erfolgt bei beiden Typen von T-Zellen mittels eines membrangebundenen T-Zell-Rezeptors, der in seiner Form Antikörpern sehr ähnlich ist. Dieser Antigen-Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten (α und β (jeweils 43 kD)), die beide die Plasmamembran durchspannen und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die α - und β -Ketten weisen jeweils zwei Ig-ähnliche Domäne mit einer konstanten und einer variablen Region auf.⁸⁵⁻⁸⁸ Die

variablen Regionen der α - und β -Kette eines T-Zell-Rezeptors bilden eine Bindungsstelle, die den Komplex aus MHC-Protein sowie dem daran gebundenen körperfremden Peptid erkennt.⁸⁹⁻⁹⁰

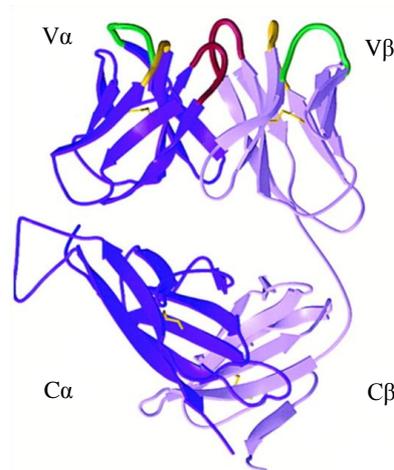


Abb. 1.13: Der T-Zell-Rezeptor. Die drei CRDs der $V\alpha$ - und $V\beta$ -Domänen sind jeweils in grün, gelb und rot dargestellt.⁷⁴

Die Affinität eines T-Zell-Rezeptors zu seinem MHC-Peptid-Komplex auf der Antigen-präsentierenden Zelle bzw. der Zielzelle ist in der Regel zu gering, um eine erfolgreiche Wechselwirkung zwischen den Zellen zu erzeugen. T-Zellen benötigen daher sog. Korezeptoren, die durch die Erhöhung der Gesamtstärke der Zell/Zell-Adhäsion die spezifische Bindung unterstützen.

T_C -Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche ein als $CD8^d$ bezeichnetes Transmembranprotein, welches aus zwei Polypeptidketten besteht, in der die Ig-ähnlichen extrazellulären Domänen nicht mit dem Antigen, sondern mit den konstanten Regionen des MHC-Klasse-I-Proteins in Wechselwirkung treten.⁹¹⁻⁹³

Im Gegensatz dazu wird von T_H -Zellen der Korezeptor $CD4^e$ exprimiert, der an MHC-Klasse-II-Proteinen bindet.⁹⁴⁻⁹⁷ Dieses besteht aus vier extrazellulären Immunoglobulin-Domänen und einem kleinen cytoplasmatischen Abschnitt.

^d Die Abkürzung CD steht für „cluster of differentiation“ (Differenzierungscluster) und bezeichnet einen Zelloberflächenmarker, mit dessen Hilfe man eine Abstammungslinie/Differenzierungsstadium erkennen kann.

^e AIDS (erworbenes Immundefektsyndrom; engl.: „acquired immunodeficiency syndrome“) ist ein Beispiel dafür, dass T_H -Zellen zu den wichtigsten Zellen der adaptiven Immunantwort gehören, da sie bei der Aktivierung fast aller adaptiven Immunantworten beteiligt sind. Das HI-Virus nutzt u.a. den $CD4$ -Korezeptor, um in Helfer-Zellen einzudringen. Ohne Helfer-T-Zellen können sich Aids-Patienten nicht einmal gegen harmlose Mikroorganismen wehren und sterben an den Folgen einer Infektion.

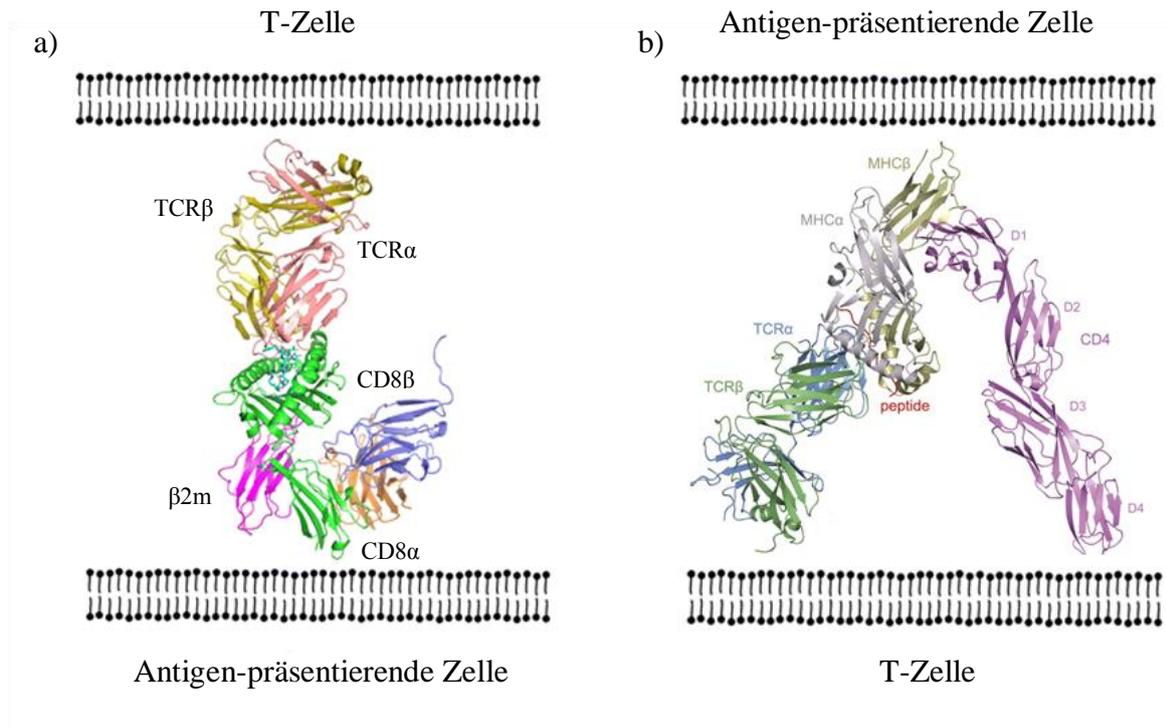


Abb. 1.14: a) T_C -Zellen erkennen mit Hilfe des Korezeptors CD8 körperfremde Peptide, die von MHC-Klasse-I-Proteinen präsentiert werden (aus Übersichtsgründen sind nur die Ig-Domänen dargestellt, die an der MHC-Bindung beteiligt sind).⁹⁸ b) T_H -Zellen erkennen mit Hilfe des Korezeptors CD4 MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe, die ihnen von APCs dargeboten werden.⁹⁹

Darüber hinaus sind T-Zell-Rezeptoren in der Plasmamembran mit sechs anderen Membranproteinen assoziiert (sog. CD3-Komplex), die, die durch eine Antigenbindung verursachte Signalkaskade, ins Innere der Zelle weiterleiten.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

Die Signalübertragungswege lösen bei cytotoxischen T-Zellen die Ausschüttung eines in der Membran der Zielzelle porenbildenden Proteins (Perforin) und bestimmter Proteasen (Granzyme) aus. Gleichzeitig wird durch Fas-Rezeptor-vermittelte (ein „Apoptoserezeptor“ auf der Oberfläche vieler Zellen) Reaktion die Apoptose der Zielzelle initiiert.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Hingegen werden Helfer-Zellen zur Sekretion von Cytokinen ($IFN-\gamma$, IL-2) angeregt, welche die Vermehrung, Differenzierung sowie Antikörperproduktion solcher Zellen, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind, unterstützen.

Zur Verstärkung der T-Zell-Antwort nutzen auch Antigen-präsentierende Zellen sog. kostimulatorische Proteine (z.B. B7-Proteine), die von einem weiteren Korezeptor CD28 auf der Oberfläche der T-Zelle¹⁰⁵ bzw. dem Korezeptor CD19 auf der Oberfläche einer B-Zelle erkannt werden.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Die Expression von kostimulatorischen Proteinen auf der Oberfläche von APCs wird erst durch die Bindung eines PAMPs an einen T-Zell-Rezeptor induziert.

Somit vermeidet das Immunsystem die Immunreaktion gegen ein Autoantigen (siehe Abschnitt 1.1.4).

1.1.3 Selbsttoleranz

Die Hauptfunktion des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor eindringenden Fremdorganismen zu schützen. Gleichzeitig müssen Angriffe gegen körpereigene Strukturen verhindert werden. Immunzellen, die Autoantigene erkennen entstehen durchaus, werden aber durch Selektionsprozesse schon in einem frühen Entwicklungsstadium abgetötet oder inaktiviert.

Die im Thymus produzierten unreifen T-Zell-Vorläufer exprimieren zunächst alle einen T-Zell-Rezeptor, sowie sowohl einen CD4- als auch CD8-Korezeptor. Durch positive Selektion werden diejenigen Zellen beseitigt, die unabhängig ob Autoantigen oder fremdes Antigen, nicht mit angemessener Affinität an MHC-Proteine der Klasse-I oder Klasse-II binden (über 95%).¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ Die überlebenden Zellen werden in einem zweiten Schritt einer negativen Selektion unterworfen.¹¹⁰ Hier werden Zellen, die eine hohe Affinität für an körpereigene Peptide gebundene MHC-Komplexe besitzen, zur Apoptose induziert (variiert zwischen 5 und 70%).¹¹¹ Somit schließen nur solche T-Zellen ihre Entwicklung ab, die nicht mit Selbstantigen-MHC-Komplexen reagieren und reifen entweder zu cytotoxischen T-Zellen (die nur CD8 exprimieren) oder zu T-Helferzellen (die nur CD4 exprimieren) heran, sofern sie im peripheren Lymphorgan durch eine Antigenbindung stimuliert werden. Trotzdem überleben einige selbstreaktive Zellen, welche durch sog. regulatorische T-Zellen supprimiert werden. Zur Differenzierung und Proliferation von Lymphocyten ist nicht nur die Antigenbindung, sondern auch ein kostimulatorisches Signal nötig, welches erst durch den Kontakt mit körperfremden Krankheitserregern ausgelöst wird.¹⁰⁶ Da selbstreaktive Lymphocyten in Abwesenheit solcher Signale auf ihr Antigen treffen, bleibt ihre Aktivierung aus.

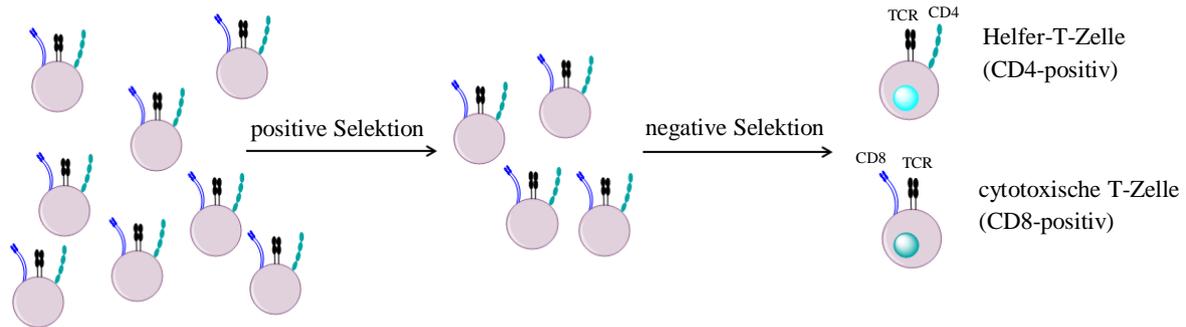


Abb. 1.15: Selektion von T-Zellen zur Induktion von Selbsttoleranz.

Der Selektionsprozess führt das Immunsystem zur sog. Selbsttoleranz: das Unvermögen gegen körpereigene Strukturen zu reagieren. Nach einem ähnlichen Prinzip läuft die Entwicklung von B-Zellen ab. B-Zellen, deren Antikörper stark mit Selbstantigenen reagieren, werden unterdrückt bzw. abgetötet.

1.1.4 Autoimmunkrankheiten

Der Selektionsprozess im Thymus unterdrückt wirksam die Immunantwort gegen Selbstantigene. Trotzdem kann die Toleranz gegen körpereigene Strukturen gelegentlich gebrochen werden, so dass T- und B-Zellen gegen Selbstantigene reagieren. In solch einem Fall liegt eine sog. Autoimmunerkrankung vor. Eine charakteristische Eigenschaft von Autoimmunkrankheiten ist, dass selektiv körpereigene Zellen, Organe oder Gewebe als Target für eine bestimmte Population von sog. autoreaktiven T- oder B-Zellen dienen. Beispiele für Autoimmunkrankheiten sind der insulinabhängige Diabetes mellitus, die Multiple Sklerose, die rheumatoide Arthritis sowie die Glutenunverträglichkeit.¹¹²⁻¹¹⁴

In vielen Fällen ist nicht geklärt, wodurch die selbstreaktiven Lymphocyten oder Antikörper entstehen. Oft können infektiöse Bakterien oder Viren eine Rolle spielen. Die Infektion führt dann zur Entstehung von Antikörpern und T-Zellen, die mit dem Erreger-Antigen reagieren. Ähnelt dieses Antigen stark einem Selbstantigen, kann eine Autoimmunreaktion die Folge sein.

1.2 Glutenunverträglichkeit

Mit einer Prävalenz von etwa 1% ist die glutensensitive Enteropathie (auch Zöliakie genannt) eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Gastrointestinaltrakts in der westlichen Bevölkerung. Gleichzeitig zählt sie zu den häufigsten Lebensmittelunverträglichkeiten. Die Aufnahme von Proteinen (Gluten) aus Weizen, Roggen, Gerste oder Hafer führt bei genetisch prädisponierten Personen zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Magen-Darm-Bereich ausgelöst durch eine Fehlreaktion des Immunsystems. Die bislang einzige Therapie der Zöliakie ist ein lebenslanger Verzicht auf glutenhaltige Lebensmittel.¹¹⁵⁻¹¹⁸

Histologisch unterscheidet sich die Dünndarmschleimhaut eines Zöliakiepatienten von dem eines gesunden Menschen durch eine Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und Expansion der Lamina propria (Darmwandschicht direkt unterhalb des Epithels) durch Einwanderung von Lymphocyten. Die Rückbildung der Zotten (Villi), ein sog. Zottenschwund, führt zu einer Oberflächenreduktion der Dünndarmschleimhaut (Abb. 1.16). Dadurch können Zöliakiepatienten Nährstoffe nicht mehr in ausreichender Form aufnehmen – Mangelerscheinungen wie vermindertes Wachstum, Anämie oder Osteoporose sind die Folge. Zu den weiteren Symptomen zählen: Durchfall, Blähungen, Gewichtsverlust, Müdigkeit und Schwäche.¹¹⁹⁻¹²⁰

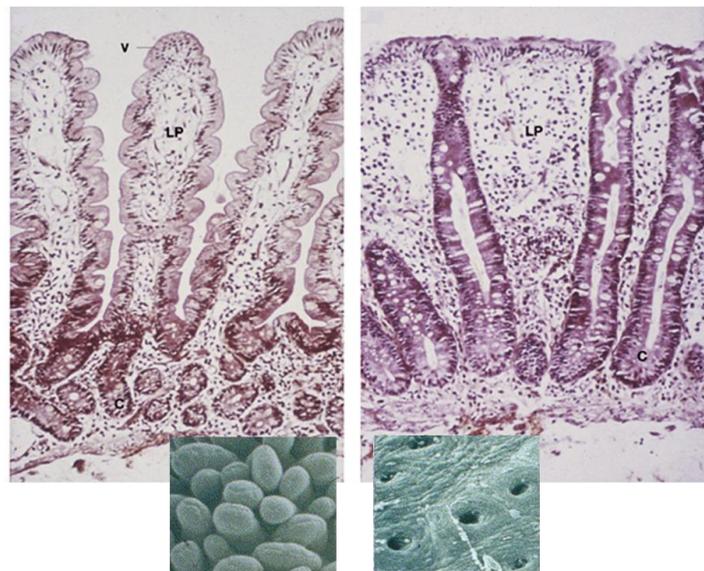


Abb. 1.16: Histologie der Dünndarmschleimhaut unter normalen Bedingungen (links) und bei Zöliakie (rechts). Zu sehen ist die Zottenatrophie, die Kryptenhyperplasie sowie die Vermehrung der intraepithelialen Lymphocyten. Die jeweils kleineren Abbildungen zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der gesunden Zotten (Villi) bzw. eine Zottenatrophie. (LP) Lamina propria, (V) Zotten, (C) Krypten.¹²¹

Zöliakiepatienten entwickeln Antikörper gegen Gliadin und die Gewebetransglutaminase 2 (tissue transglutaminase 2; tTG2) – letzteres ist ein körpereigenes Enzym und somit ein Indiz dafür, dass Glutenunverträglichkeit als Autoimmunkrankheit angesehen werden kann.¹²²⁻¹²³ Der serologische Nachweis von Anti-IgA- und Anti-IgG-Transglutaminase-Antikörpern, sowie Anti-Endomysium-Antikörpern kann zur Diagnostik von Zöliakie herangezogen werden, gefolgt von Dünndarmbiopsien.^{120,124}

1.2.1 Eigenschaften von Gluten

Für die meisten Menschen stellt Getreide einen wichtigen Bestandteil zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dar und gewährleistet eine gesunde, ausgewogene Ernährung. Zöliakiepatienten allerdings müssen glutenhaltige Getreideprodukte strikt meiden, da die orale Aufnahme zu einer Schädigung der Dünndarmschleimhaut und zu Entzündungen im Darmtrakt führt. Weizenproteine werden aufgrund ihrer Löslichkeit in vier Gruppen unterteilt: Albumine (löslich in Wasser), Globuline (löslich in Salzlösung (z.B. 10% NaCl), Glutenine (z.T. löslich in saurer oder alkalischer Lösung) und Gliadine (löslich in Alkohol). Gliadinpeptide (Monomere) und Gluteninpeptide (Polymere aufgrund von Disulfidbrücken) werden als „Gluten“ zusammengefasst. Gluten („Klebereiweiß“) ist ein Gemisch aus 90% Proteinen, 8% Lipiden und 2% Kohlenhydraten und hat für die Backeigenschaften von Weizenmehl eine zentrale Bedeutung. In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz (etwa 250-300 Aminosäuren) können Gliadine in weitere Untergruppen (α -, γ - und ω -Gliadine) unterteilt werden. Bei den Gluteninen unterscheidet man zwischen sog. „high-molecular-weight“ (HMW)- (650-800 Aminosäuren) und „low-molecular-weight“ (LMW)-Glutenin (270-330 Aminosäuren) (Abb. 1.17).^{120,125}

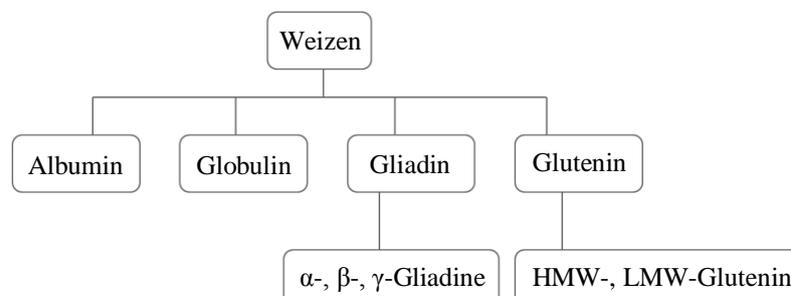


Abb. 1.17: Die Bestandteile von Weizenproteinen.¹²⁵

Die in Alkohol löslichen Fraktionen von unterschiedlichen Getreidesorten werden als „Prolamine“ bezeichnet. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Prolamine verschiedener Getreidesorten. Prolamine stellen die toxischen Bestandteile der einzelnen Getreidesorten dar und sind Auslöser für die Glutenerkrankung.

Tabelle 1: Übersicht über die toxischen Prolamine.¹²⁶

Getreidesorten	Prolamine
Weizen (Gluten)	Gliadin und Glutenin
Roggen	Secalin
Gerste	Hordein
Hafer	Avenin

Von allen Prolaminen ist die Toxizität des Gliadins am besten charakterisiert. Gliadinpeptide bestehen zu einem großen Anteil aus den beiden Aminosäuren Glutamin (35%) und Prolin (15%). Prolylreste zeigen aufgrund des in einen Fünfring eingebundenen Stickstoffs eine relativ hohe Stabilität gegenüber der enzymatischen Verdauung durch gastrointestinale Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin. So gelangen Glutenproteine während ihrer Verdauung in Form relativ langer Peptidketten vom Magen ins Duodenum (Zwölffingerdarm) und werden erst im Darmlumen durch mucosale, prolinspezifische Peptidasen langsam gespalten.¹²⁷

Aktuellen Erkenntnissen zufolge gibt es in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz zwei unterschiedliche Gruppen von Gliadinpeptiden, die auf unterschiedliche Art und Weise in den Krankheitsprozess involviert sind. Sog. „toxische“ Peptide können direkt Epithelschäden verursachen, wohingegen „immunodominante“ Peptide T-Zellen stimulieren können, die wiederum durch die Ausschüttung inflammatorischer Cytokine eine Immunreaktion induzieren.¹²⁷⁻¹²⁸

1.2.2 Das Autoantigen der Zöliakie: die Transglutaminase

Durch die repetitive Präsenz von Glutamin und Prolinresten stellen Gliadinpeptide ideale Substrate für das körpereigene Enzym Gewebetransglutaminase (tTG2) dar (Abb. 1.18).¹²⁹ Die tTG kommt u.a. in Fibroblasten, Endothelzellen und Monocyten vor. Sie ist intrazellulär lokalisiert, kann aber durch bestimmte Mechanismen (wie z.B. eine Infektion, mechanischer Stress oder eine Entzündungsreaktion) in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Transglutaminasen nehmen wichtige biologische Funktionen im Körper ein, indem sie Proteine selektiv miteinander kreuzvernetzen. So unterstützt tTG im Rahmen einer Apoptose durch Polymerisation das Cytoskelett (ein aus Proteinen aufgebautes Netzwerk im Cytoplasma eukaryotischer Zellen zur Stabilisierung der Zelle) der absterbenden Zelle und verhindert dadurch, dass potenziell gefährliche Antigene aus der Zelle heraustreten.¹³⁰⁻¹³¹

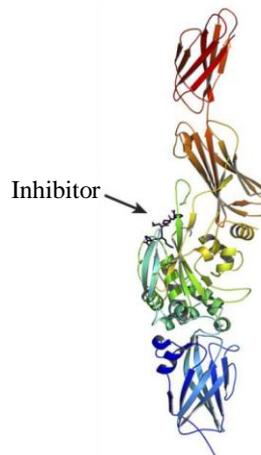


Abb. 1.18: Kristallstruktur von der Gewebetransglutaminase 2 (tTG2) gebunden an einen Inhibitor (Ac-P(DON)LPF-NH₂). Die N-terminale β -Faltblattstruktur ist in blau, die katalytische Domäne in grün und die zwei C-terminalen β -Faltblätter sind in gelb und rot dargestellt. (DON: 6-Diazo-5-oxo-norleucin).¹³²

Die Ca²⁺-abhängige tTG2 ist in Abhängigkeit vom pH-Wert sowohl zur Transamidierung als auch zur Deamidierung von Glutaminresten in Proteinen befähigt (Abb. 1.19). Bei der Transamidierung wird ein primäres Amin (häufig Lysin) einer Polypeptidkette mit der Glutaminseitenkette eines Proteins durch Bildung einer Isopeptidbindung kreuzvernetzt. Bei einem pH unterhalb von 6.5 oder bei Abwesenheit einesamins erfolgt die Deamidierung von Glutamin zur Glutaminsäure. Beide Reaktionen werden im aktiven Zentrum des Enzyms durch die Thiolgruppe eines Cysteins und durch die Bildung eines Thioesters als Intermediat katalysiert.¹³²⁻¹³³

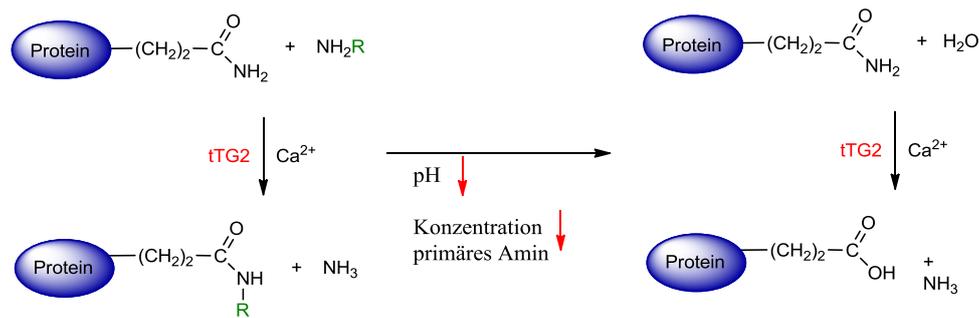


Abb. 1.19: Die Transglutaminase (tTG2) katalysiert bei einem pH > 6.5 die Transamidierung (Crosslinking) von Glutaminseitenketten in Proteinen oder Polypeptiden (links). Bei sinkendem pH oder bei Abwesenheit eines primärenamins überwiegt die Deamidierungsreaktion (rechts).¹¹⁹

1.2.3 MHC-II-Gliadin-Komplexe

Aufgrund des im Dünndarm vorherrschenden sauren Milieus resultieren bevorzugt deamidierte Gliadinpeptide. Diese Peptide binden nun aufgrund der negativen Ladung mit höherer Affinität an die MHC-Klasse-II-Proteine (Haupthistokompatibilitätsproteine; engl.: major histocompatibility) HLA-DQ2 bzw. HLA-DQ8 auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Außerdem liegen die Prolin-reichen Glutenepitope in einer sog. Polyprolin-II-helicalen Konformation vor, die von allen gebundenen MHC-II-Liganden eingenommen wird (Abb. 1.20). Beide Faktoren führen zur Bildung eines stabilen MHC-II-Gliadin-Komplexes.¹³⁴⁻¹³⁵ Die Erkennung des MHC-II-Gliadin-Komplexes durch körpereigene Helfer-T-Zellen induziert das adaptive Immunsystem, welches zur Sekretion von inflammatorischen Cytokinen, wie IFN- γ oder TNF- α , führt und eine Entzündungsreaktion der Dünndarmschleimhaut zur Folge hat.¹³⁶

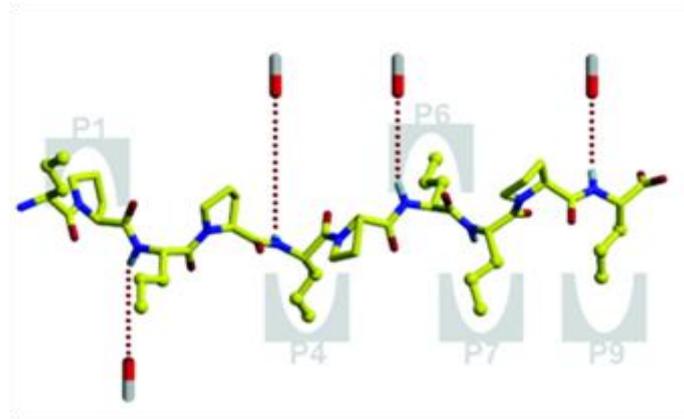


Abb. 1.20: Bindung eines Prolin-reichen Peptids (z.B. Gliadinpeptid) an HLA-DQ2 in der bevorzugten Polyprolin-II-helicalen Konformation. Dargestellt sind die Wechselwirkungen der Peptidseitenketten mit den HLA-DQ2-Bindungstaschen (P1, P4, P6, P7 und P9) sowie H-Brückenbindungen der NH-Gruppen des Peptidrückgrates (gestrichelte Linien).¹³⁴

Die HLA(*human leukocyte antigens*)-Antigene sind eng mit dem Ausbruch von Zöliakie assoziiert. Über 90% aller Zöliakiepatienten exprimieren HLA-DQ2, wohingegen die restlichen HLA-DQ2-negativen Zöliakiepatienten den Genotyp für HLA-DQ8 besitzen. Etwa 25% der europäischen Bevölkerung exprimieren den HLA-DQ2 Genotyp, doch nur 4% dieser genetisch prädisponierten Individuen entwickelt auch tatsächlich Zöliakie.^{115,137} Warum die meisten HLA-DQ2- bzw. -DQ8-positive Menschen trotz genetischer Prädisposition eine Toleranz gegenüber Getreideproteinen wie Gluten entwickeln können, ist derzeit noch nicht geklärt.

2 Kenntnisstand

2.1 Pathogenesemodell von Zöliakie

Gliadinpeptide können aufgrund des hohen Prolinanteils nicht bzw. nicht vollständig durch gastrointestinale Enzyme hydrolysiert werden. Im Darmlumen liegen sie in Form von relativ langen Peptidfragmenten (10-50 Aminosäuren) vor.¹²⁷ Bei einer vorliegenden Zöliakieerkrankung scheint ihre Passage durch die intestinale Epithelschicht aufgrund einer abgeschwächten Barrierefunktion erleichtert zu sein. Mögliche Ursachen hierfür könnten Infektionen oder mechanischer Stress sein.¹³⁸

Nachdem die Gliadinpeptide in der Lamina propria vorliegen, werden einige „immuno-dominante“ Peptide, so wie das p56-88 oder p56-68, durch die Gewebetransglutaminase (tTG2) deamidiert. Dadurch entstehen Epitope, die mit einer höheren Affinität an die MHC-II-Proteine HLA-DQ2 bzw. HLA-DQ8, welche auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, binden. Der Gliadin-HLADQ2/DQ8-Komplex wird von spezifischen CD4⁺ T-Helfer-Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt, die die Sekretion von inflammatorischen Cytokinen, wie TNF- α und IFN- γ , induzieren – eine Entzündung der Dünndarmschleimhaut ist die Folge. Die aktivierten CD4⁺ T-Zellen unterstützen des Weiteren B-Zellen bei der Ausschüttung von spezifischen Gliadin- bzw. tTG2-Antikörpern. Die Entzündungsreaktion aktiviert auch cytotoxische T-Lymphocyten, die Schäden an der Schleimhaut verursachen, was zur typischen Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie bei Zöliakiepatienten führt.¹³⁹ Durch die adaptive Immunantwort können jedoch nicht alle mit Zöliakie verbundenen Symptome erklärt werden – so wie beispielsweise die Expansion der Lamina propria durch die Einwanderung von intraepithelialen Lymphocyten (diese befinden sich zwischen den Epithelzellen an der basolateralen Seite des Epithels).

Hier kommen die sog. „toxischen“ Peptide (z.B. p31-43) zum Tragen, die das angeborene Immunsystem aktivieren. Das Peptid p31-43 kann direkt ein Stresssignal ausüben, indem es Epithelzellen, Makrophagen und dendritische Zellen zur Sekretion von Interleukin 15 (IL-15) induziert. Unter diesen Bedingungen exprimieren Enterocyten MHC-I-Proteine wie MIC (ein Stressprotein) oder HLA-E und intraepitheliale Lymphocyten (IEL) und Natürliche Killerzellen die zugehörigen Rezeptoren (NKG2D bzw. NKG2C). Das Binden der Rezeptoren

an ihre Liganden löst die cytotoxischen Funktionen beider Lymphocyten aus und führt letztendlich zur Apoptose der Epithelzellen, wodurch die Permeabilität der Dünndarmschleimhaut erhöht wird. Nun können größere Mengen an Gliadinpeptiden die Zellmembran passieren und der Krankheitsprozess setzt sich weiter fort.^{117-118,140}

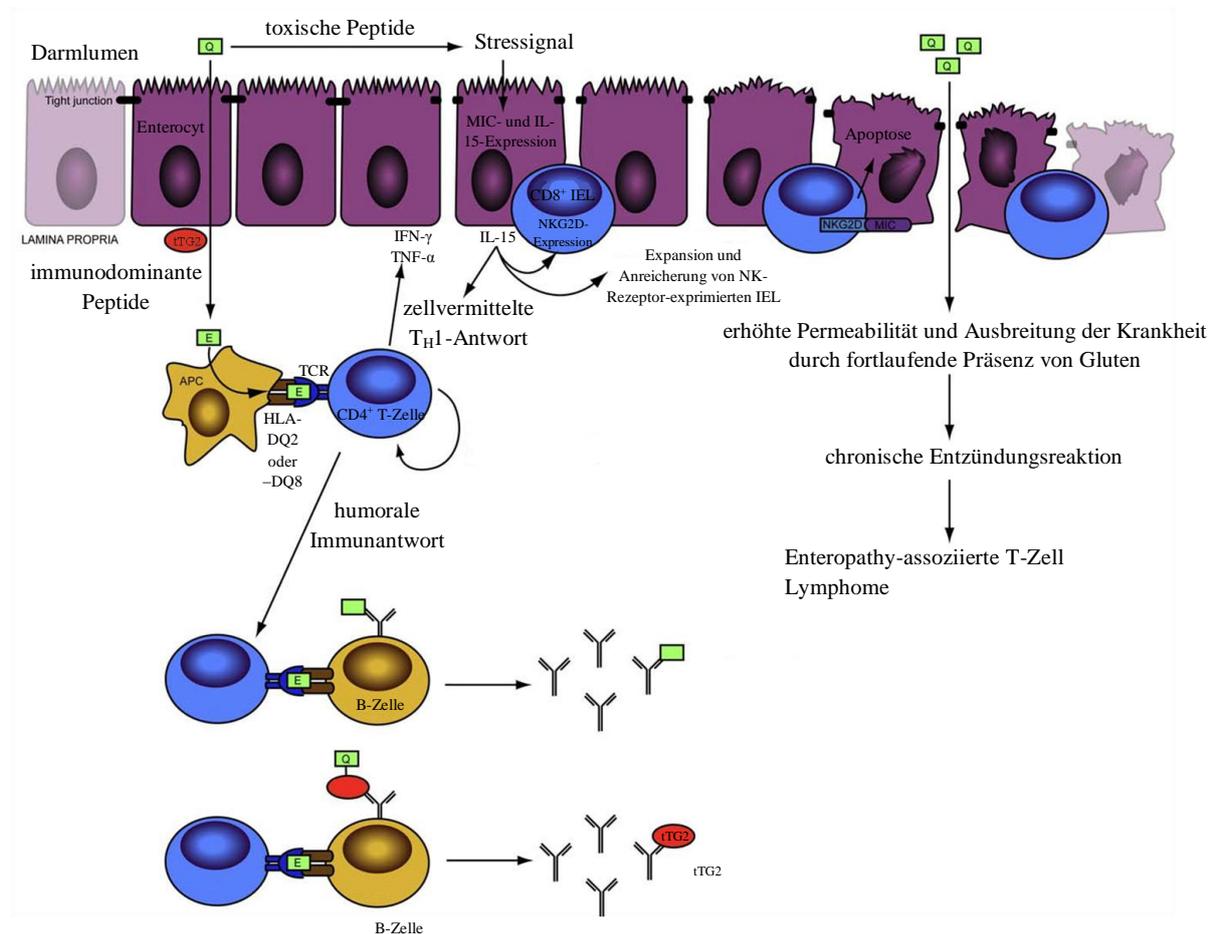


Abb. 2.1: Das Zusammenspiel von angeborenen und adaptiven Immunantworten gegenüber dem Glutenverzehr bei der Pathogenese von Zöliakie.¹³⁹

Da toxische und immunodominante Gliadinpeptide eine so unterschiedliche Wirkung auf das Immunsystem ausüben, wird vermutet, dass verschiedene Prozessierungsmechanismen vorliegen, die entweder die Eigenschaften des Antigens ändern oder dessen Präsentation an den MHC-Proteinen.

2.2 Intrazelluläre Transportvorgänge

Die Plasmamembran bildet die Grenzfläche zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Sie ist eine dynamische Struktur und trennt das intrazelluläre Milieu (Cytoplasma) von der extrazellulären Umgebung durch kontrollierte Auf- und Abgabe von Materie (z.B. Hormone, Peptide). Zu den vielfältigen Funktionen der Plasmamembran zählt die Signaltransduktion, interzelluläre Kommunikation, intrazelluläre Homöostase und die Immunantwort. Um diese Aufgaben zu erfüllen, muss die barrierebildende Plasmamembran überwunden werden. Hierfür gibt es verschiedene Mechanismen.¹⁴¹

Kleine, lipophile Moleküle können die Lipiddoppelschicht der Membran durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles durchwandern. Kleine, wasserlösliche Moleküle (wie z.B. Aminosäuren, Zucker, Wasser und Ionen) passieren die Plasmamembran durch Poren (sog. tight junctions), Kanäle oder aktive Transporter. Oligopeptide können durch Endocytose mit Hilfe von Vesikeln ins Zellinnere gelangen, wo ihr Abbau erfolgen kann.¹⁴²⁻¹⁴³

Bei der Endocytose unterscheidet man zwischen Phagozytose (Aufnahme von großen Partikeln) und Pinocytose (Aufnahme von in Flüssigkeit gelösten Partikeln). Phagozytose ist nur einigen spezialisierten Zellen des Immunsystems, nämlich Makrophagen, dendritischen Zellen, Monocyten und neutrophilen Granulocyten, vorbehalten. Bindet der Rezeptor (z.B. TLR oder Ig-Rezeptor) des Phagocyts ein mit Antikörpern umgebenes Bakterium (der Prozess, in dem Antikörper Pathogene markieren wird als Opsonierung bezeichnet), so nimmt der Phagocyt den Erregern in ein Phagosom auf (Abb. 2.2).

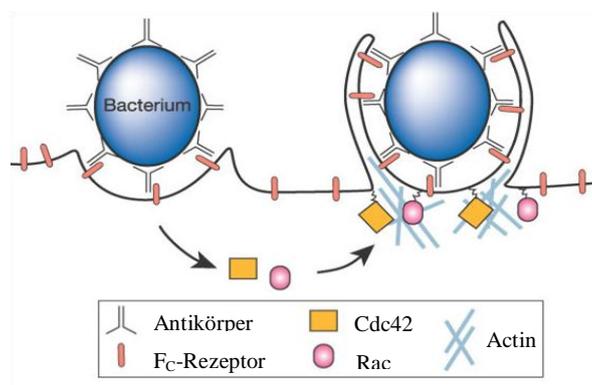


Abb. 2.2: F_C-Rezeptor (Membranrezeptor auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen, der an F_C-Domäne von Antikörpern bindet) erkennt ein von Immunoglobulinen umhülltes Bakterium. Eine Signalkaskade induziert die Umlagerung von Aktinfilamenten – das Bakterium wird in ein Phagosom aufgenommen.¹⁴¹

Die durch Proteinabbau entstandenen bakteriellen Peptide werden an der Oberfläche der phagocytierenden Zelle den T-Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert (siehe Abschnitt 1.1).

Im Gegensatz zur Phagozytose kommt die Pinocytose in fast allen Zellen vor. In Abhängigkeit von der Art des aufzunehmenden Produktes (Ligand, Rezeptor, Lipid) unterscheidet man des Weiteren z.B. die Rezeptor-vermittelte, die Clathrin-abhängige oder die Caveolin-vermittelte Endocytose (Abb. 2.2).¹⁴⁴

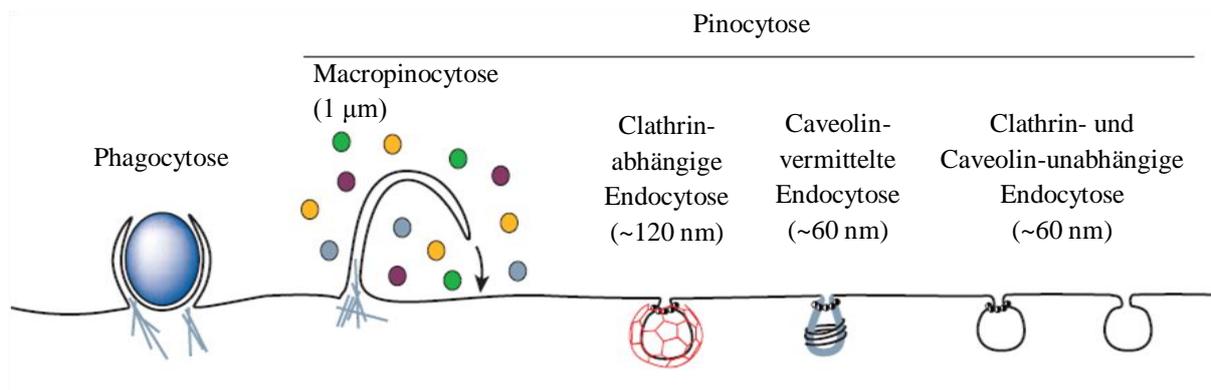


Abb. 2.3: Verschiedene Mechanismen zur Aufnahme von extrazellulärem Material über die Plasmamembran.¹⁴¹

In polaren Epithelzellen gibt es zusätzlich den gerichteten Transport, die Transcytose. Darunter versteht man den Endocytosevorgang von z.B. Gliadinpeptiden an der sog. apikalen Membran und ihre Exocytose (den reversen Prozess der Ausschleusung) an der basolateralen Membran mittels Transportvesikeln (siehe Abschnitt 2.2.2).¹⁴⁵

2.2.1 Endocytose

Als Endocytose bezeichnet man den Eintritt von Molekülen durch Membraneinstülpungen, die sich im Verlauf des Prozesses von der Zellmembran abschnüren. Die internalisierten Moleküle befinden sich nun in sog. endocytotischen Vesikeln (EV) und durchlaufen verschiedene membranumschlossene Zellorganelle im Endomembransystem. Als erstes erfolgt die Fusion mit frühen Endosomen (EE). Aufgrund des vorliegenden sauren pH-Werts (pH = 5.9-6.5) erfolgt hier beispielsweise die Dissoziation von Rezeptor-Ligand-Komplexen. Während die Rezeptoren über Recyclingvesikel (RV) wieder zurück an die Plasmamembran

transportiert werden, werden ihre Liganden mit Hilfe von Carriervesikeln (CV) in späte Endosomen (LE) geleitet, wo ihr lysosomaler Abbau stattfindet (Abb. 2.4).¹⁴⁶

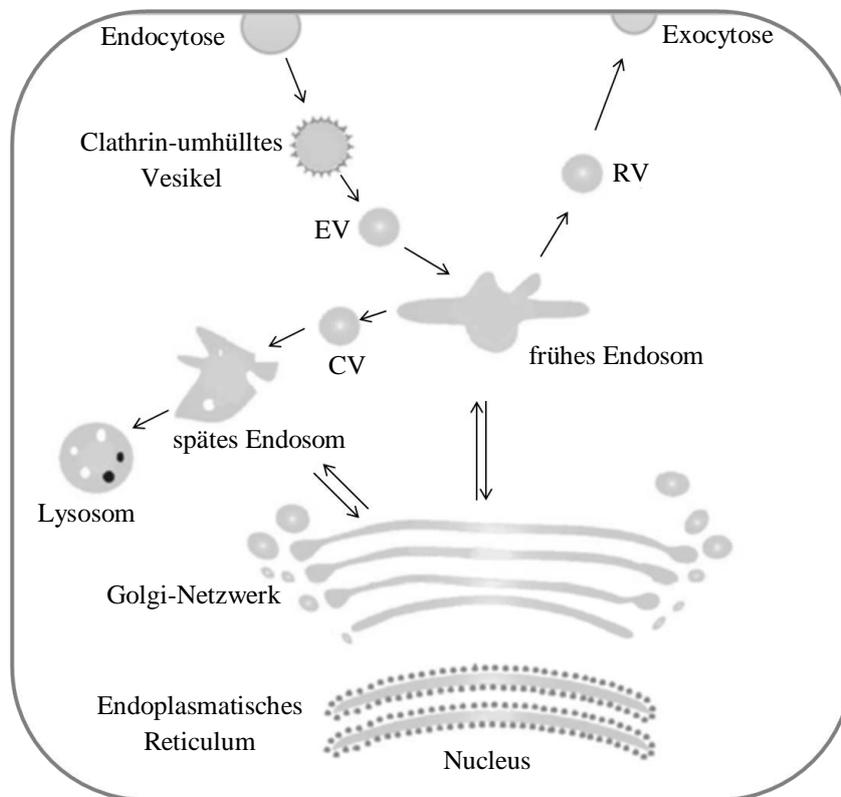


Abb. 2.4: Intrazelluläre Transportvorgänge von Makromolekülen durch die verschiedenen Zellkompartimente des Endomembransystems. Gezeigt ist sowohl die Endo- als auch Exocytose (Abkürzungen siehe Text).¹⁴⁶

Damit die EE ihre vielfältigen Funktionen während des Endocytosewegs ausüben können, sind verschiedene Proteine notwendig. Für die Aufnahme von inkorporiertem Material in die EE (Fusion) sind GTPasen wie beispielsweise das Rab5 (*Ras-associated binding protein*) und EEA1 (*early endosomal antigen 1*) – letzteres dient auch als Markerprotein für EE – unerlässlich.¹⁴⁷

Während die EE eher als „Sortierstation“ dienen, erfolgt in den LE erstmals der lysosomale Abbau von internalisierten Stoffen. Lysosomale Hydrolasen – erhalten durch Austausch mit dem trans-Golgi-Netzwerk – initiieren begünstigt durch den pH-Wert (pH = 5.0-6.0) den Abbauprozess. Auch hier spielen GTPasen wie das Rab7 und Rab9 eine entscheidende Rolle. Nützliche Markerproteine für LE sind hochgradig glykosylierte Proteine wie LAMPs (*lysosome-associated membrane proteins*) oder Igps (*lysosomal membrane glyoproteins*).

In der letzten Phase des Endocytosewegs erhalten die Lysosomen (LY) endocytisiertes Material durch Fusion mit den späten Endosomen. Hier erfolgt der abschließende Verdau durch Hydrolasen (wie z.B. Proteasen oder Lipasen) bei einem pH-Wert von 5.0-5.5 - oder die Speicherung von unverdaulichem Material.¹⁴⁶

2.2.2 Transcytose in polaren Epithelzellen

Nahrungsproteine werden nach ihrer Aufnahme zuerst durch Proteasen wie Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin im Gastrointestinaltrakt hydrolysiert und zu Peptiden unterschiedlicher Länge gespalten. Antigene, die gegenüber den harschen Bedingungen im Magen resistent waren, müssen im nächsten Verdauungsprozess das intestinale Epithel sowohl als physikalische, als auch als biologische Barriere passieren. Die Oberfläche des Dünndarmepithels ist von einer Monoschicht aus Epithelzellen umgeben. Bei 80% der Epithelzellen handelt es sich um Enterocyten mit einer charakteristischen, apikalen Bürstensaummembran und sog. Mikrovilli (Zotten). Diese bewirken eine enorme Vergrößerung der Oberfläche und ermöglichen dadurch die Resorption verschiedener Nahrungsproteine. Gegen das Lumen weisen die Enterocyten eine sog. Glycocalix auf, welche aus Glycokonjugaten (Glycoproteine und Glycolipide) besteht.¹⁴²⁻¹⁴³

In polaren Epithelzellen ist die Zelloberfläche in zwei funktional und biochemisch unterschiedliche Gebiete unterteilt: die apikale und die basolaterale Membran, welche sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden. An der apikalen Oberfläche sind die Enterocyten durch kleine Poren, sog. tight junctions, untereinander verbunden, die eine dichte Barriere gegen das Darmlumen darstellen. Sowohl in der apikalen, als auch basalen Membran befinden sich eine Reihe von Transportern, die für die spezifische und effiziente Resorption von Nahrungsbestandteilen nötig sind.

Abb. 2.5 zeigt mögliche Endocytosewege in einer polarisierten Epithelzelle. Von der basolateralen Membran internalisiertes Material wird beispielsweise zum größten Teil über die EE und LE in die Lysosomen transportiert. Moleküle, die recycelt werden, können entweder zur Membran zurückkehren, aus der sie endocytiert wurden, oder sie können die Epithelzelle durchqueren und auf der anderen Membranseite wieder abgegeben werden - ein Prozess, der als Transcytose bezeichnet wird.¹⁴⁶

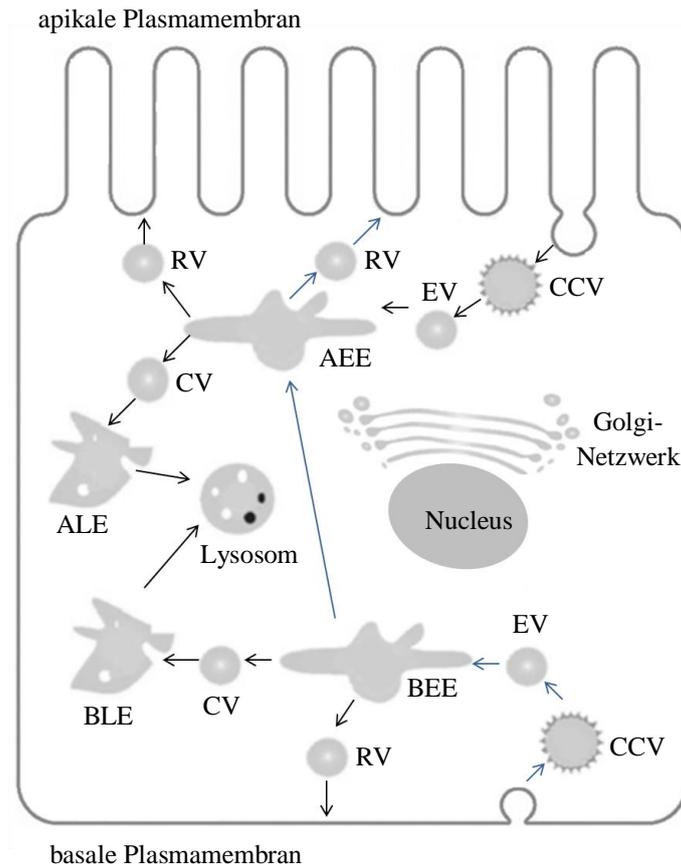


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Endocytosewege in einer polaren Epithelzelle. (CCV) Clathrin-coated Vesikel, (EV) endocytotische Vesikel, (RV) Recyclingvesikel, (AEE) apikales frühes Endosom, (CV) Carriervesikel, (ALE) apikales spätes Endosom, (BLE) basales spätes Endosom, (BEE) basales frühes Endosom. Ein möglicher Transcytoseweg ist mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.¹⁴⁶

2.3 Intrazellulärer Transport von Gliadinpeptiden durch Epithelzellen

Laut derzeitigem Kenntnisstand ist noch nicht geklärt, wie Gliadinpeptide das intestinale Epithel passieren.

Von der Arbeitsgruppe um Meresse *et al.* wird eine Rezeptor-vermittelte Transcytose eines IgA-Gliadin-Komplexes postuliert.¹⁴⁸ Demnach bilden die unverdauten, langen Gliadinfragmente polymere Komplexe mit intraluminal ausgeschütteten IgA-Antikörpern. Diese IgA-Gliadin-Komplexe könnten an einen IgA-Rezeptor und durch einen spezifischen Transcytoseweg in intakter Form von der apikalen in die basale Zellmembran der Enterocyten transportiert und in die Lamina propria freigesetzt werden (Abb. 2.6). Als Rezeptor wurde

CD71 benannt, ein Rezeptor, der eine entscheidende Rolle bei der Endocytose von Transferrin (ein Glykoprotein zum Transport von Eisen) spielt und von dem bekannt ist, dass er seine Liganden vor dem lysosomalen Abbau schützt. Bei Zöliakiepatienten wurde eine höhere Expression von CD71 an der apikalen Oberfläche von Enterocyten beobachtet.¹⁴⁸

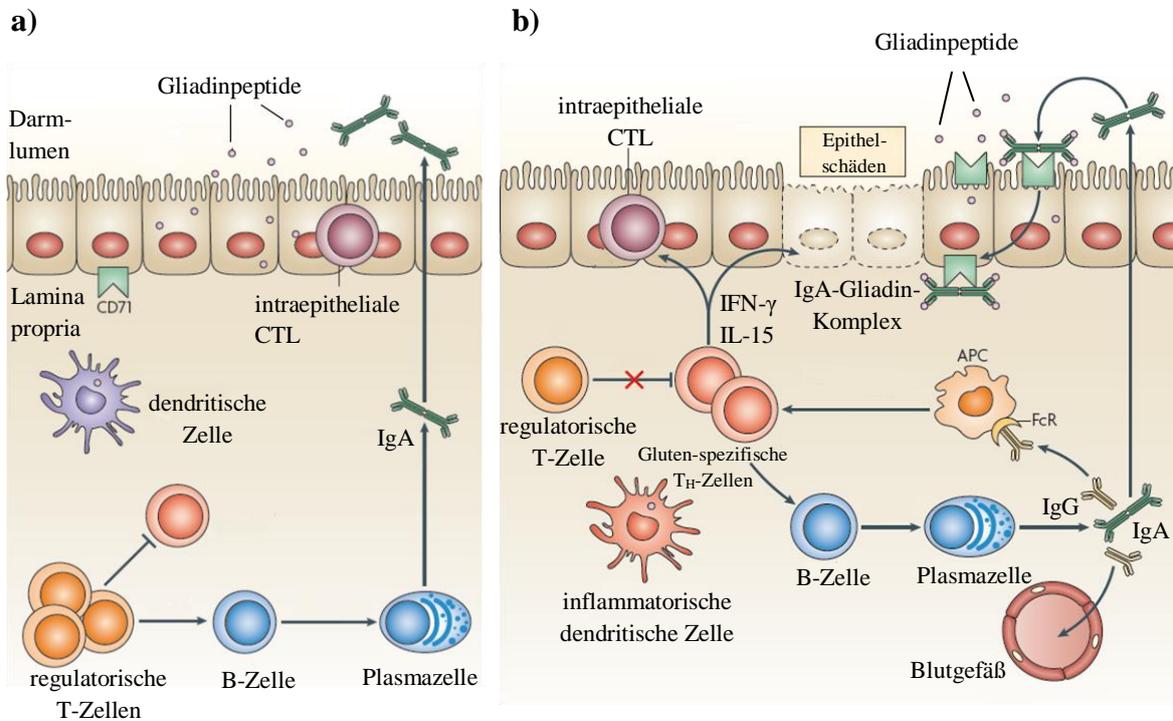


Abb. 2.6: a) Unter normalen Intestinalbedingungen wird IgA von Plasmazellen in die Lamina propria sezerniert. Nachdem sie die Epithelschicht passiert haben, werden sie im Darmlumen freigesetzt. b) Im Falle einer Entzündungsreaktion erfolgt die Retrotranscytose von IgA-Gliadin-Komplexen mittels CD71-Rezeptor in die Lamina propria. Glutenspezifische T_H -Zellen induzieren B-Zellen zur Sekretion weiterer Immunoglobuline (so wie IgG), die von F_c -Rezeptoren auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen (APCs) erkannt werden. IgA und IgG gelangen in die Blutbahn, wo sie zur Diagnose von Zöliakie herangezogen werden können.¹¹⁶

2.4 Orale Toleranz

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt nach dem Verzehr von Nahrungsmittelantigenen ihre Aufnahme durch Enterocyten mittels Endocytose. Die luminalen Antigene werden über die EE in die LAMP- sowie HLA-DR-positiven LE transportiert. LE haben eine wichtige immunologische Bedeutung, da sich in ihrem Lumen MHC-Proteine der Klasse II (HLA-DR) befinden, die dort mit exogenen Antigenen assoziieren können. Im weiteren Verlauf können

die Antigen-MHC-Komplexe an der Zelloberfläche an $CD4^+$ T-Lymphocyten mit Supressorwirkung, sogenannten regulatorischen T-Zellen des Immunsystems, präsentiert werden. Hierbei wird keine Immunantwort induziert, sondern eine Toleranzreaktion, welches als „orale Toleranz“ bezeichnet wird.

Immunodominante Gliadinpeptide, wie beispielsweise p56-68, werden ebenfalls in HLA-DR-positiven LE transportiert und könnten somit eine Toleranzreaktion induzieren. Bei Zöliakiepatienten werden jedoch auch diese immunodominanten Gliadinpeptide durch HLA-DQ-positive Antigen-präsentierende Zellen in der Lamina propria den T-Lymphocyten des Immunsystems präsentiert, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Im Gegensatz zu immunodominanten Gliadinpeptiden wird vermutet, dass toxische Gliadinpeptide, wie das p31-43, in den HLA-DR-negativen EE verbleiben und nicht in die LE transportiert werden. Somit können letztere nicht regulatorischen T-Lymphocyten im Dünndarm präsentiert werden, wodurch eine Toleranzreaktion ausbleibt (Abb. 2.7 a).¹⁴⁹⁻¹⁵⁰

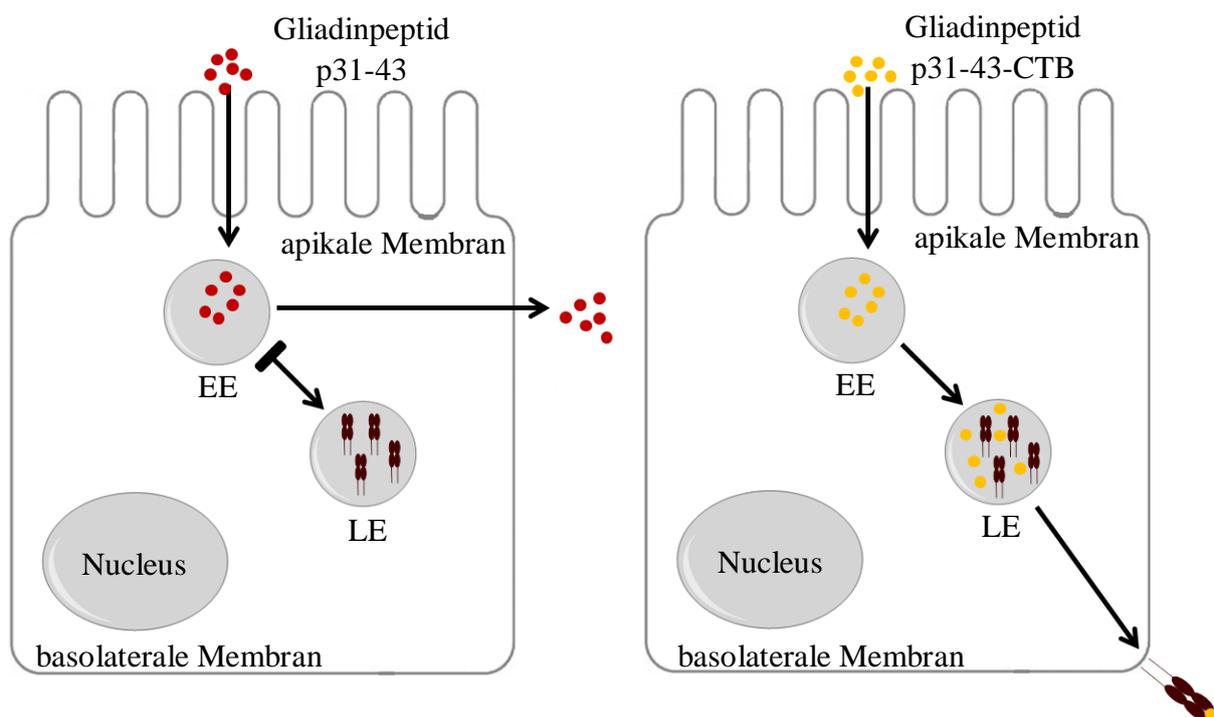


Abb. 2.7: a) Das toxische Gliadinpeptid wird an der apikalen Membran von Enterocyten mittels Endocytose aufgenommen. Die Induktion einer oralen Toleranz bleibt aus, da das Peptid in den LAMP- und HLA-DR-negativen EE lokalisiert bleibt. b) Durch Konjugation an CTB kann das toxische Peptid p31-43 in die LE transportiert werden. Ihre Präsentation an der basolateralen Membran via MHC-II-Proteinen kann möglicherweise eine orale Toleranz induzieren.

Bei der Entwicklung eines Therapieansatzes zur Behandlung von Zöliakie, ist die Lokalisation von toxischen Gliadinpeptiden in HLA-DR-positiven LE zur Induktion einer oralen Toleranz interessant. Dies kann durch die Konjugation der B-Untereinheit des Cholera-toxins als Adjuvans gewährleistet werden (Abb. 2.6 b). Diesbezüglich konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass die Konjugation des toxischen Gliadinpeptids p31-49 mit CTB den Transport des Peptids in die LE zur Folge hat.¹⁵⁰ Dies könnte eine Verminderung der toxischen Immunreaktion sowie einen Anstieg von regulatorischen T-Zellen bewirken.¹⁵¹

2.5 Cholera-toxin

Cholera-toxin ist ein Protein, welches von den Bakteriophagen *Vibrio cholerae* produziert wird. Es wurde erstmals im Jahre 1854 von dem Italiener Filippo Pacini als Ursache für die Cholera, einer Infektionskrankheit im Dünndarm, entdeckt.¹⁵² Cholera-toxin gehört zu der Familie der AB₅-Toxine.¹⁵³ Das 84 kDa-schwere Protein besteht aus einer A- und einer B-Untereinheit, die über nicht-kovalente Bindungen miteinander in Wechselwirkung stehen (Abb. 2.8 a). Die pentamere B-Untereinheit formen fünf identische Peptide, die zu einem Ring assoziiert sind (Abb. 2.8 b).

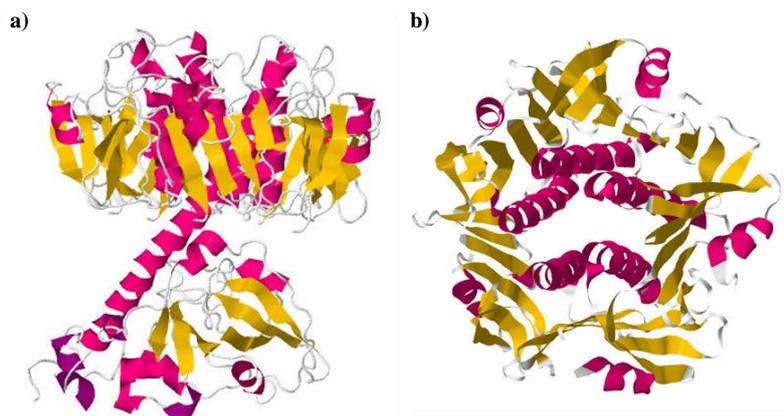


Abb. 2.8: Röntgenkristallstruktur von Cholera-toxin (a) sowie Blick von oben auf das CTB-Pentamer (b).¹⁵²

Während die A-Untereinheit die toxische Aktivität des Proteins bestimmt ist, ist das CTB-Pentamer (ein Lektin) für die Bindung verantwortlich.

Die Bindung erfolgt spezifisch über einen GM1-Gangliosid-Rezeptor, ein Sialinsäure-haltiges Oligosaccharid, welches kovalent an Plasmamembrane gebunden ist und sich auf der Oberfläche von Epithelzellen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen befindet.^{152,154-156}

Trennt man beide Untereinheiten voneinander, so ist keine Toxizität festzustellen. Daher kann CTB, gekoppelt an ein entsprechendes Antigen, als sog. Immunisator fungieren.^{151,157-158}

3 Zielsetzung

Zöliakie ist einer der häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes ausgelöst durch eine fehlende Toleranzentwicklung nach dem Verzehr glutenhaltiger Nahrungsmittel bei genetisch prädisponierten Personen. Bisher gilt eine lebenslange glutenfreie Ernährung als einzige wirkungsvolle Therapiemöglichkeit. Diese Diät stellt allerdings eine erhebliche Belastung für die Patienten dar, weil sie relativ aufwendig und teuer ist und schränkt zudem ihre Lebensqualität ein.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, weitere Erkenntnisse im Pathomechanismus der Zöliakie zu gewinnen. Der besondere Fokus sollte sich dabei auf den intrazellulären Transportweg von Gliadinpeptiden richten. Die Arbeit wurde in einem Kooperationsprojekt mit der Abteilung für Pädiatrie und Neonatologie am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es die von Zimmer *et al.* aufgestellte Hypothese, dass toxische Gliadinpeptide in EE lokalisiert sind, zu überprüfen.¹⁵⁰ Dazu wurden verschiedene Zellkompartimente mit Antikörpern markiert und ihre Kolo-kalisation mit fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt. Wie bereits erwähnt, könnte die Abwesenheit toxischer Gliadinpeptide in LAMP- und HLA-DR-postiven LE die Ursache für ihre Toxizität sein. Durch Konjugation toxischer Gliadinpeptide an die B-Untereinheit von Cholera-toxin (CTB) als Adjuvans sollten diese gezielt über GM1-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von den EE in die LE transportiert werden. Es ist bekannt, dass CTB bei Kopplung an ein Antigen eine veränderte Prozessierung bewirkt und dadurch Einfluss auf die Entwicklung der Immuntoleranz nehmen könnte.¹⁵¹ Diesbezüglich wurde in ersten Versuchen bereits gezeigt, dass die Konjugation des toxischen Peptids p31-49 mit CTB den Transport des Gliadinpeptids in das LE zur Folge hat.¹⁵⁰ Es galt daher zu prüfen, ob Endocytose und intrazellulärer Transport des ebenfalls toxischen Peptids p31-43 auf die gleiche Weise zu beeinflussen wäre.

Nach dem Transport toxischer Gliadinpeptide in die LE, sollte das Gliadinpeptid-CTB-Konjugat selektiv gespalten werden, um wieder die nativen Gliadinpeptide freizusetzen, so dass diese regulatorischen T-Zellen des Immunsystems präsentiert werden könnten.

Für diesen Ansatz sollten Gliadinpeptide mit einem peptidischen Linker dargestellt werden, der selektiv in den LE durch das Enzym Cathepsin D (CatD) gespalten wird. Bei letzterem handelt es sich um eine Aspartatprotease, die in hoher Konzentration in den LE vorliegt. Die Spaltung verschiedener Linker durch CatD sollte anhand von Inkubationsversuchen und mit Hilfe von Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) analysiert werden.

Durch Einbau einer Lysineinheit in die Linkersequenz können über die freie NH_2 -Gruppe in der Seitenkette stabile, fluoreszenzmarkierte Konjugate gebildet werden (Abb. 3.1). Ob bei den Gliadinpeptid-CTB-Konjugaten ein veränderter Prozessierungsweg vorliegt, kann ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

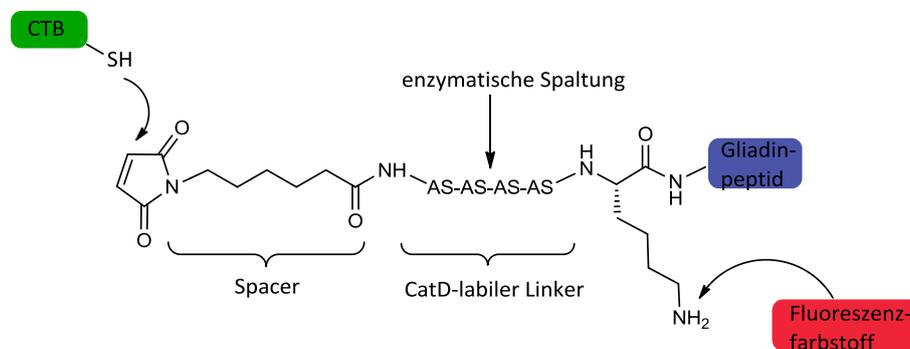


Abb. 3.1: Das darzustellende Konjugat aus fluoreszenzmarkiertem Gliadinpeptid und CTB. Das Peptid ist über einen CatD-spaltbaren Linker sowie einem Spacer mit Maleimidfunktionalität mit dem Adjuvans verbunden (AS: Aminosäure).

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte der vorliegende Mechanismus für therapeutische Ansätze in der Behandlung bzw. in der Entwicklung neuer Präventionsmöglichkeiten gegenüber Zöliakie genutzt werden. Möglicherweise können genetisch prädisponierte Personen durch „Impfen“ mit CTB-konjugierten Gliadinpeptiden vor dem Auftreten von Symptomen bewahrt werden.

4 Resultate und Diskussion

4.1 Besondere Methoden und Reagenzien

4.1.1 Festphasenpeptidsynthese

Als Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*; SPPS) bezeichnet man die Darstellung eines Peptids, welches über einen selektiv spaltbaren Linker (Ankergruppe) an ein unlösliches Trägermaterial (*resin*) kovalent gebunden ist. Die Methode wurde im Jahre 1963 von Robert Bruce Merrifield entwickelt, wofür er 1984 den Nobelpreis erhielt.¹⁵⁹

Das zu synthetisierende Peptid wird bei der SPPS stufenweise vom C- zum N-Terminus, also entgegen der „natürlichen“ Syntheserichtung aufgebaut.¹⁶⁰ Die erste N-terminal- und Seitenketten-geschützte Aminosäure ist über die Carboxylgruppe und über einen Linker an das feste Trägermaterial gebunden. Die Aminoschutzgruppe wird abgespalten und die Kupplung der nächsten geschützten Aminosäuren in der erforderlichen Reihenfolge durchgeführt. Nach Aufbau der gewünschten Peptidsequenz erfolgt die Abspaltung des Peptids von der festen Phase – häufig werden die Seitenkettenschutzgruppen dabei simultan abgespalten.¹⁶¹⁻¹⁶² Hierfür sind meist starke Säuren wie HF (Boc-Strategie) oder TFA (Fmoc-Strategie) notwendig (Abb. 4.1).

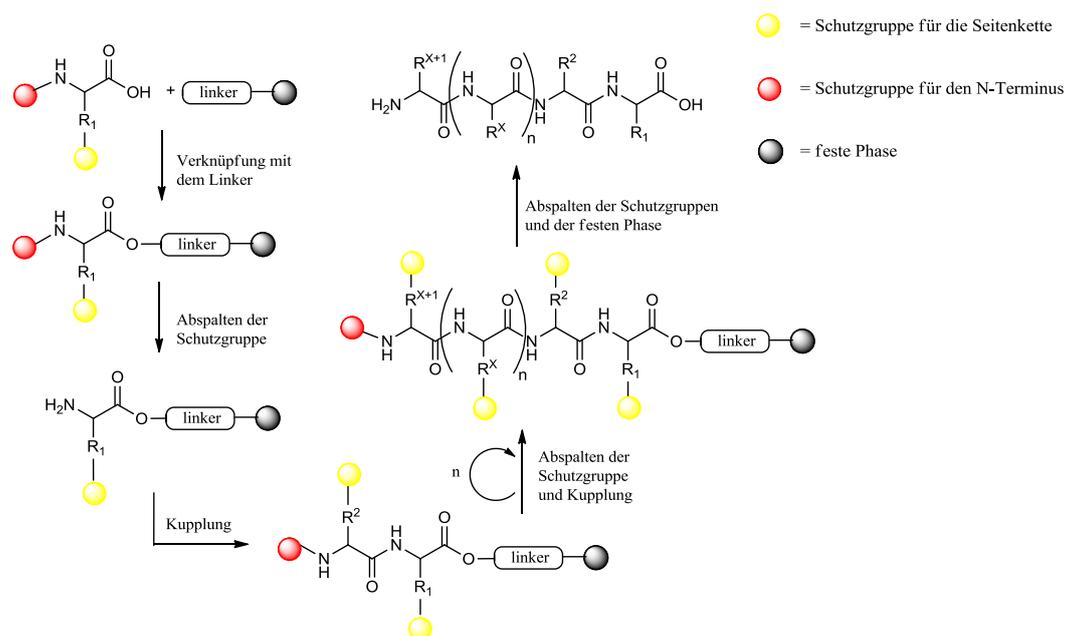


Abb. 4.1: Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese.¹⁶³

Als Festphase für die SPPS wird häufig Polystyrol-Harz eingesetzt, welches mit 1-2% Divinylbenzol (DVB) quervernetzt ist (Abb. 4.2). Die trockenen Polystyrol-Trägerkügelchen besitzen einen Durchmesser von 20-80 μm und können in organischen Lösungsmitteln wie CH_2Cl_2 oder DMF bis zum 6-fachen Volumen quellen.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵

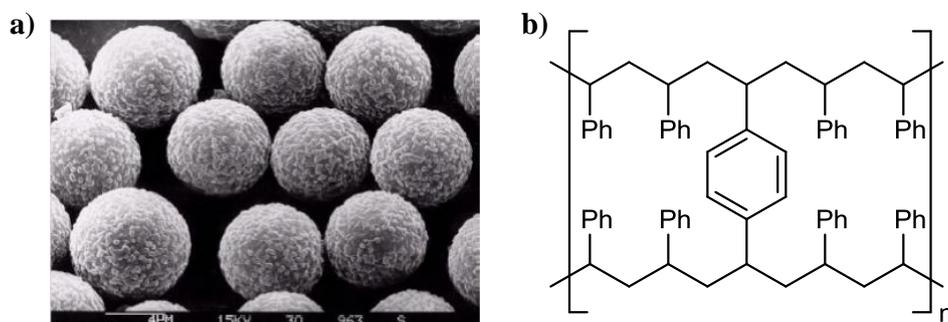


Abb. 4.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polystyrolkügelchen (a) sowie die Struktur des Styrol-Divinylbenzol-Copolymers (b).¹⁶¹⁻¹⁶²

Zur Verknüpfung der Syntheseintermediate mit der festen Phase kommen Linker zum Einsatz. Säurelabile Linker sind die ältesten und die am häufigsten verwendeten Linker zur Darstellung von Peptiden mit freier Carboxylgruppe am C-Terminus. Die Säurelabilität beruht meistens auf der Acidolyse benzylicher C-O-Bindungen und der Stabilität des resultierenden Benzylkations. Erstmals von Wang 1973 verwendet, hat sich der 4-Benzyloxy-benzylalkohol-Linker als einer der gängigsten Linker (Wang-Linker) erwiesen.¹⁶⁶ Quervernetztes Polystyrol, welches mit dem Wang Linker funktionalisiert ist, wird als Wang-Harz bezeichnet. Dargestellt werden kann es durch Veretherung mit Methyl-4-hydroxy-benzoat und anschließender Reduktion des Methylesters mit LiAlH_4 ausgehend vom Merrifield-Harz (Abb. 4.5).¹⁶⁷ Das Wang Harz ist geeignet für die Darstellung von Peptiden gemäß der Fmoc-Strategie. Die Acidolyse erfolgt mit 95% TFA.

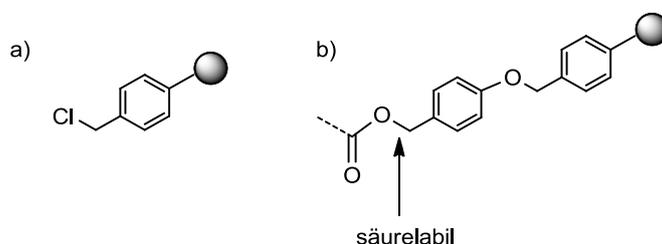


Abb. 4.5: (a) Merrifield-Harz¹⁵⁹ mit einer Chloromethylgruppe als Ankereinheit und (b) säurelabiles Wang-Harz.¹⁶⁶

Dialkoxy- und Trialkoxy-benzylester sind säurelabiler als der Wang-Linker. Ein Beispiel ist das Sasrin (*super acid-sensitive resin*)-Harz, welches bereits mit 0.5-1% TFA in CH_2Cl_2 abgespalten werden kann.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Auf gleiche Weise lassen sich Tritylalkohol-Linker abspalten. Diese super-säurelabilen Linker eignen sich für die Darstellung geschützter Peptidfragmente für die konvergente Peptidsynthese (Abb. 4.6).¹⁶⁹

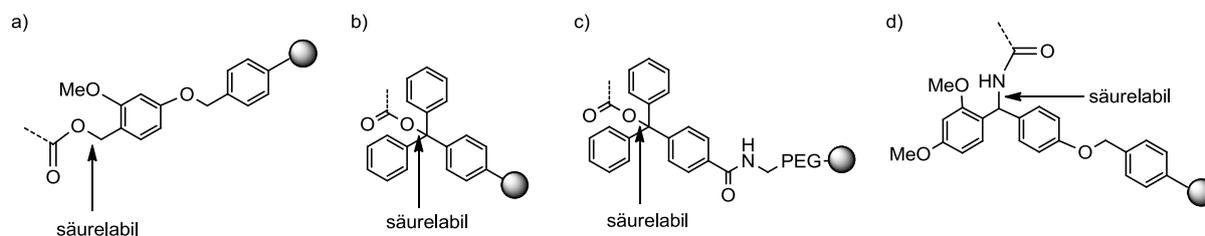


Abb. 4.6: (a) Sasrin-Harz, (b) Trityl-Harz, (c) NovaSyn TGT-Harz und (d) Rink-Amid-Harz.¹⁷¹

Unter konvergenter Synthese versteht man die Zerlegung des gewünschten Polypeptids in mehrere Segmente, die jeweils einzeln mittels linearer SPPS dargestellt werden. Die anschließende Verknüpfung der einzelnen geschützten Segmente führt zum Aufbau der Zielsequenz.

In vielen der für die Festphasensynthese verwendeten Harze sind die Linker über einen sog. Spacer mit dem Trägermaterial verbunden (Abb. 4.7). Diese flexiblen Spacer erleichtern die Diffusion der Reagenzien zu dem Festphase-gebundenen Syntheseintermediat, indem sie die Distanz zu den Polymer-Kügelchen vergrößern und somit sterische Einschränkungen minimieren – eine Tatsache, die vor allem für schwierig zu synthetisierende Peptidsequenzen von Vorteil ist.¹⁷²

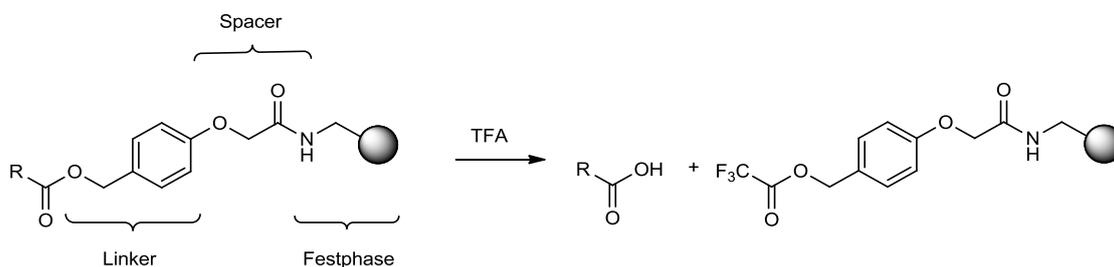


Abb. 4.7: Acidolyse eines säurelabilen Linkers.¹⁷³

Bei der SPPS ist eine besondere Kompatibilität der verschiedenen Schutzgruppen gefordert, welches als Orthogonalitätsprinzip bezeichnet wird.¹⁷⁴ Orthogonale Schutzgruppen können unter bestimmten Spaltbedingungen vollständig entfernt werden, ohne dabei andere Schutzgruppen zu beeinträchtigen. So beginnt jeder repetitive Syntheseschritt (Abspalten der

Schutzgruppe und Kupplungsreaktion) mit der selektiven Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe. Der Linker sowie die Seitenkettenschutzgruppen müssen unter diesen Bedingungen chemisch stabil bleiben. Die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc) und die basenlabile Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl-Gruppe (Fmoc)¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ zählen zu den zwei bevorzugten temporären Schutzgruppen für den *N*-Terminus.

Das Standardprotokoll nach Merrifield verwendet die Boc/Bn-Schutzgruppenstrategie, welches auf der selektiven Spaltung durch Acidolyse beruht. Die Boc-Gruppe wird als temporäre *N*-terminale Schutzgruppe in Kombination mit Benzyl-artigen Schutzgruppen für die Seitenketten der Aminosäuren eingesetzt (Abb. 4.8).¹⁵⁹

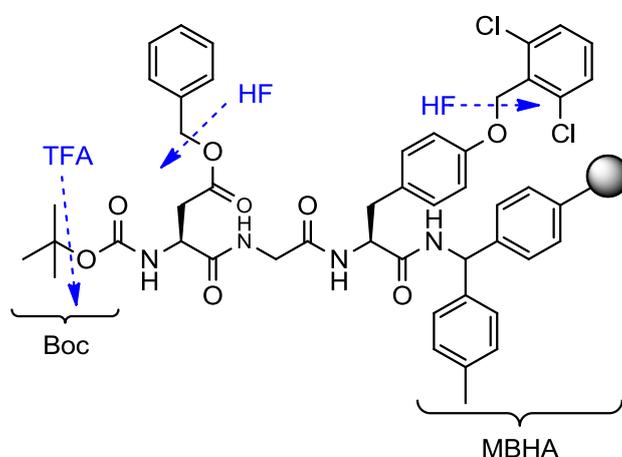


Abb. 4.8: Boc/Bn-Schutzgruppenstrategie in der SPPS. MBHA = 4-Methylbenzhydrylamin-Harz; 2,6-Dcb = 2,6-Dichlorobenzyl.¹⁷¹

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt mit TFA (20-50%), wohingegen die finale Abspaltung des dargestellten Peptids von der festen Phase mittels HF erfolgt,¹⁷⁷ wobei die Seitenkettenschutzgruppen ebenfalls abgespalten werden (Abb. 4.8).¹⁷⁸

Da die wiederholte Versetzung des Peptids mit starken Säuren wie TFA zu vorzeitiger Abspaltung von der festen Phase, Spaltung von empfindlichen Peptidbindungen sowie säurekatalysierten Seitenreaktionen führen kann, wurde in den 1970er Jahren eine mildere Methode für die Festphasensynthese von Peptiden entwickelt. Die Fmoc/^tBu-Schutzgruppenstrategie beruht auf der Basenlabilität der von Carpino im Jahre 1972 eingeführten Fmoc-Gruppe. Dieses wird über eine basenkatalysierte Eliminierung mit Piperidin (20-25%) abgespalten (Abb. 4.9).¹⁷⁹

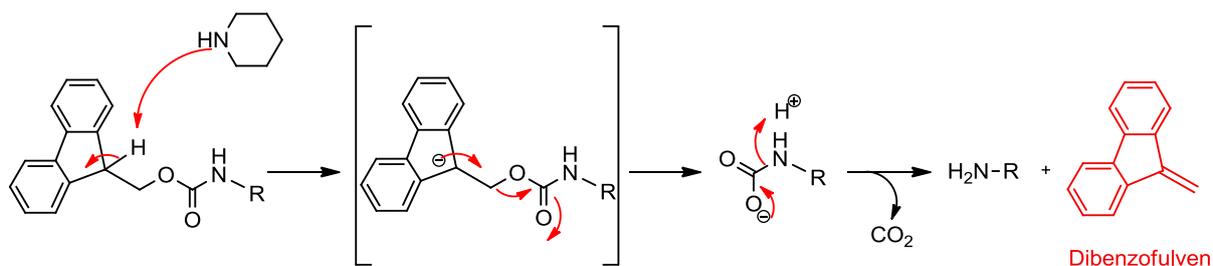


Abb. 4.9: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung. Die H-Abstraktion durch Piperidin führt zur Bildung eines Carbanions. Dieses instabile Intermediat zerfällt in das Eliminierungsprodukt Dibenzofulven und einem Carbaminsäure-Anion, welches decarboxyliert und zur Freisetzung der Aminosäure führt.¹⁷⁹

Die Abspaltung von der festen Phase sowie der meist *tert*-Butyl-geschützten Seitenketten erfolgt simultan in einem Schritt mit TFA (Abb. 4.10). Somit umgeht man bei dieser Methode im Gegensatz zur Boc-Strategie den Umgang mit gefährlichem HF, welches aufgrund seiner Eigenschaften Glas zu ätzen, spezielles Laborequipment erfordert.

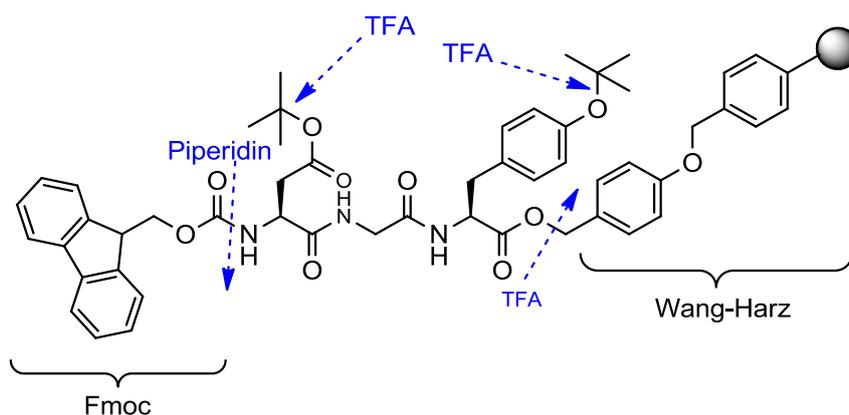


Abb. 4.10: Fmoc-/*t*-Bu-Schutzgruppenstrategie in der Festphasensynthese.¹⁷¹

Auf den Gebrauch von sog. „Scavengern“ ist bei beiden Strategien nicht zu verzichten. Da während der Abspaltung von der festen Phase reaktive Carbokationen entstehen, die das Peptid an empfindlichen Positionen (z.B. Tyrosin, Tryptophan)¹⁸⁰⁻¹⁸² irreversibel alkylieren können, müssen Reagenzien wie Anisol, Thioanisol, Dimethylsulfid, Ethandithiol, Triethylsilan oder Triisopropylsilan als Scavenger verwendet werden, die schneller mit den reaktiven Spezies reagieren als das synthetisierte Peptid.¹⁸³ Um das Risiko einer Racemisierung während der Kupplungsreaktion zu minimieren, hat sich die Verwendung von Kupplungsreagenzien wie Carbodiimide, Phosphonium- oder Uroniumsalze mit HOBt/HOAt als Additive als vorteilhaft erwiesen.¹⁸⁴⁻¹⁸⁵

4.1.2 Fluoreszenz

Bei Raumtemperatur befinden sich Moleküle im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Singulett-Grundzustandes (S_0). Wird ein Molekül mit Licht hohen Energiegehalts – beispielsweise UV/Vis-Strahlung – bestrahlt, so werden die Photonen absorbiert. Dadurch werden die Elektronen aus dem Grundzustand in verschiedene Schwingungsniveaus eines elektronisch angeregten Energieniveaus (S_1) oder direkt in höhere Energieniveaus (S_2, S_3 , usw.) gehoben.

Diese energiereichen Zustände sind ungünstig und somit instabil. Daher kehrt das Elektron aus dem durch Absorption erreichten angeregten Schwingungszustand zunächst in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes zurück. Dieser Vorgang geschieht strahlungslos und wird als vibronische Relaxation bezeichnet. Von diesem Zustand aus kann das Molekül direkt in den Grundzustand zurückkehren. Dabei wird Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittiert. Der Übergang erfolgt in der Regel zwischen 10^{-10} und 10^{-8} s und wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Ein Molekül, das sich in einem Schwingungsniveau eines höheren Energiezustandes (z.B. S_2) befindet, verliert innerhalb von 10^{-12} s überschüssige Schwingungsenergie durch Molekülstöße und gelangt dabei durch sog. interne Konversion in höhere Schwingungsniveaus des S_1 -Zustandes. Nach Schwingungsrelaxation in den S_1 -Grundzustand erfolgt eine Deaktivierung des Moleküls unter Abgabe eines Photons in das Schwingungsniveau des S_0 -Grundzustandes. Daher ist die Energie des emittierten Photons stets geringer als die des absorbierten Photons. Dies ist der Grund, warum man für das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum eine sog. „Rotverschiebung“ beobachtet. Die spektrale Verschiebung zwischen der Absorption von S_0 und der Emission von S_1 wird als „Stokes-Verschiebung“ bezeichnet.

Eine nützliche Methode, um die Absorptions- und Emissionsprozesse im Detail zu verstehen, ist die Darstellung in Form eines sog. Jablonski-Diagramms, welches erstmals von Alexander Jablonski in den 1930er Jahren eingeführt wurde.¹⁸⁶ Es stellt die Energieniveaus des Grund- bzw. angeregten Zustandes eines Moleküls oder Atoms dar. (Abb. 4.13).

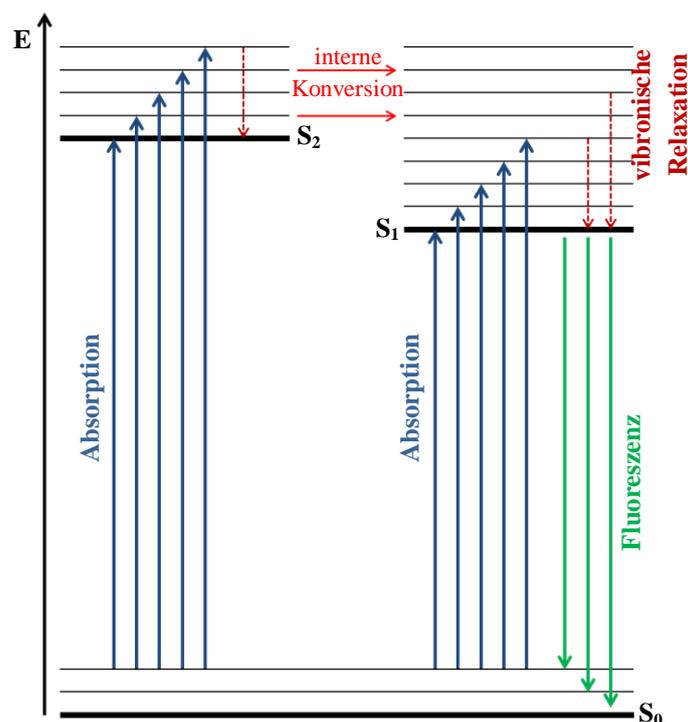


Abb. 4.13: Das Jablonski-Termschema.¹⁸⁷⁻¹⁸⁸

4.1.3 Fluorophore

Moleküle mit fluoreszierenden Eigenschaften werden als Fluorophore bezeichnet. Fluorophore sind Substanzen, die aufgrund ihres strukturellen Aufbaus in der Lage sind, absorbiertes Licht in Form von Fluoreszenz wieder abzugeben. Fluorophore verfügen über konjugierte Doppelbindungssysteme und sind planar. Häufig handelt es sich dabei um aromatische Verbindungen mit delokalisierten π -Elektronen. Diese besitzen zudem eine geringe Energiedifferenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustand, so dass relativ energiearme Photonen des UV- und sichtbaren Bereiches des elektromagnetischen Spektrums ausreichend sind, um die Elektronen in angeregte Energieniveaus zu heben. Im Allgemeinen gilt, je mehr konjugierte Doppelbindungen ein Molekül besitzt, desto geringer ist die benötigte Absorptionsenergie und desto länger die Absorptionswellenlänge (Abb. 4.15). Gleiches gilt für das Emissionslicht.¹⁸⁹

Mit zunehmender Konjugation nehmen die Fluoreszenzintensität und somit auch die Fluoreszenzquantenausbeute (ϕ) zu. Letzteres ist der Quotient aus der Anzahl absorbierter Photonen und der Anzahl emittierter Photonen. Die theoretische Obergrenze 1 wird nur von

wenigen Molekülen erreicht. Je höher der Wert, desto geeigneter ist eine Substanz für fluoreszenzspektroskopische Bestimmungen. Die Fluoreszenzeigenschaften werden stark von ihrer Umgebung beeinflusst. So spielen Lösungsmittelleffekte, pH-Werte und die Anwesenheit sonstiger chemischer Spezies eine wichtige Rolle für die Entstehung von Fluoreszenz.¹⁹⁰

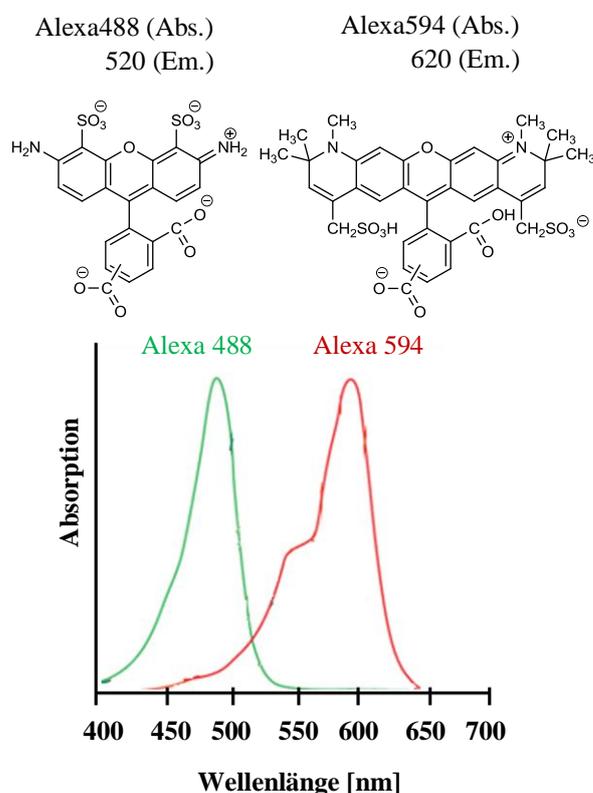


Abb. 4.15: Mit zunehmender Konjugation verschiebt sich die Absorption und Emission zu längeren Wellenlängen. So besitzt der Alexa594-Farbstoff aufgrund einer höheren Anzahl an π -Doppelbindungen eine längerwellige Absorption. Gleichzeitig steigt der Absorptionskoeffizient.¹⁹¹⁻¹⁹²

Es gibt viele organische Substanzen, die intrinsische Fluoreszenz (Autofluoreszenz) aufweisen und daher Anwendung bei der spezifischen Markierung von Komponenten in biologischen Systemen finden.¹⁹² Ein Beispiel ist das grün-fluoreszierende Protein (GFP), welches erstmals 1961 von Shimomura aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert wurde und mit dem Chemilumineszenz-Protein Aequorin assoziiert war.¹⁹³⁻¹⁹⁴ Tatsächlich erhält GFP in seinem Ursprungsorganismus seine Absorptionsenergie durch strahlungslosen Energietransfer von Aequorin und fluoresziert grün. Die Chromophor-Gruppe – ein Imidazolidonring – wird aus den drei Aminosäuren Ser-Tyr-Gly in einem autokatalytischen Prozess gebildet. Die enorme Bedeutung des GFP liegt heute in der Möglichkeit, dieses genetisch in Proteine von lebenden Zellen zu fusionieren.¹⁹⁵



Abb. 4.16: Die Qualle *Aequoria victoria*, aus dem das grün-fluoreszierende Protein (GFP) isoliert wurde. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei der grünen Erscheinung nicht um Fluoreszenz, sondern um ein Artefakt der Aufnahme handelt. Die GFP-Fluoreszenz findet man nur im Bereich der Tentakelansätze.¹⁹⁶

Für *in vitro*- und *in vivo*-Fluoreszenz imaging-Anwendungen werden jedoch typischerweise chemisch synthetisierte Fluorophore eingesetzt. Heutzutage sind Fluoreszenzfarbstoffe mit Absorptions- und Fluoreszenzmaxima im Spektralbereich von 350 bis 800 nm käuflich zu erwerben. Die Anforderungen an diese Farbstoffe sind vielfältig: hohe Photostabilität, hohe chemische Stabilität, hoher Absorptionskoeffizient, hohe Fluoreszenzquantenausbeute, gute Wasserlöslichkeit, geringe Toxizität. In Abbildung 4.17 ist eine Auswahl an verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt.¹⁹¹

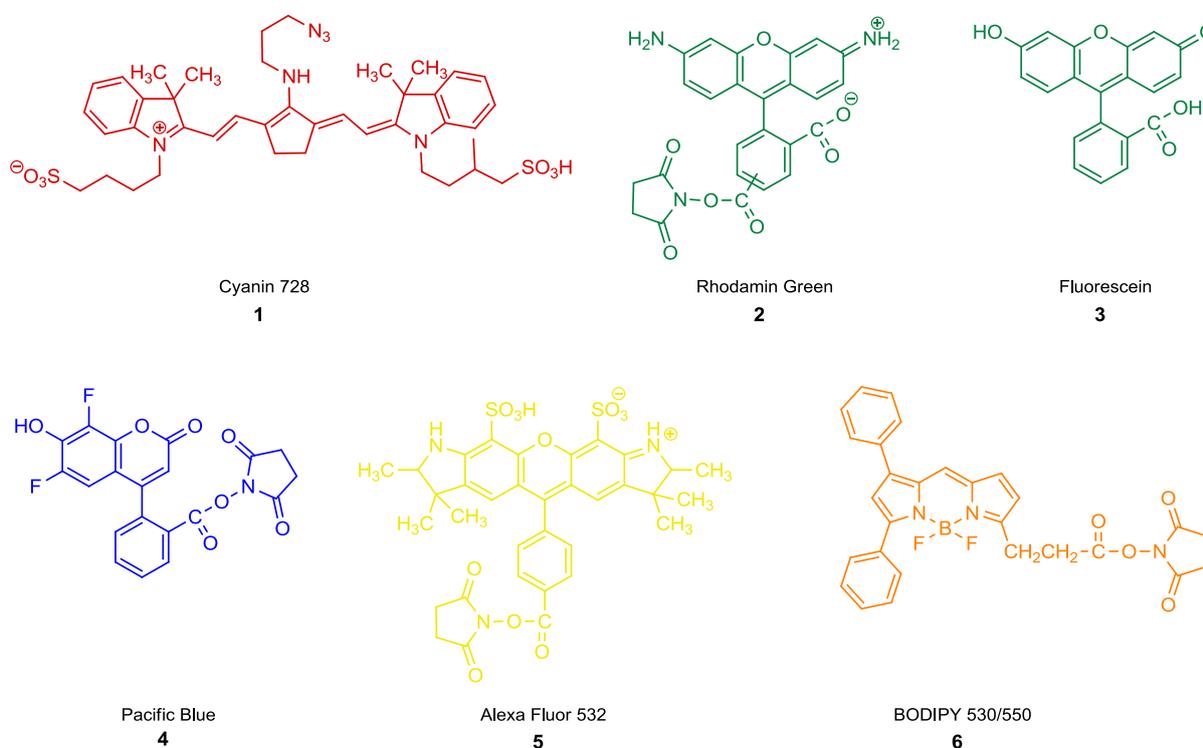


Abb. 4.17: Auswahl einiger kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoffe.¹⁹¹

Cyanin-Farbstoffe wie **1** sind Strukturen, die sich aus zwei quartären heteroaromatischen Basen zusammensetzen, die über eine Polymethinkette miteinander verknüpft sind. Je nach Struktur absorbieren sie im Bereich von 500 bis 750 nm, sind stabil in einem pH-Bereich von 4.0-9.0, besitzen jedoch geringe Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ bis zu 0.52).¹⁹⁷⁻²⁰¹

Fluorescein **3** und seine Derivate sind gängige Farbstoffe zur Markierung von Proteinen.²⁰² Neben der hervorragenden Fluoreszenzquantenausbeute ($\phi = 0.92$) und Wasserlöslichkeit stimmt das Absorptionsmaximum von 494 nm sehr genau mit der Spektrallinie (488 nm) des Argon-Ionenlasers überein, und stellt daher ein wichtiges Fluorophor für konfokale Laserscanning-Mikroskopie-Anwendungen dar. Nachteile sind die Tendenz zum Photo-bleaching (Fluoreszenzlöschung)²⁰³ und die pH-abhängige Fluoreszenz, mit signifikanter Reduktion bei einem pH-Wert unterhalb 7.0.²⁰⁴

Strukturelle Verwandtschaft mit dem Fluorescein besitzen die Rhodamin-Derivate **2**.²⁰⁵⁻²⁰⁶ Das Grundgerüst des Rhodamin-Fluorophors besteht aus einem planaren Xanthengerüst, das an den Positionen C3 und C6 jeweils eine Aminogruppe trägt. An Position 9 tragen Rhodamin-Derivate oft einen Benzoessäurerest. Alkylierungen der beiden aromatischen Amine oder des Xanthengerüsts führen zu einer breiten strukturellen Variabilität. So erfolgt die Einführung reaktiver Gruppen wie z.B. Sulfonylchlorid oder Maleinimid. Durch die unterschiedlichen Substituenten erhält man Rhodamin-Derivate, die ihr Absorptionsmaximum im Bereich von 485 bis 700 nm besitzen.²⁰⁷ Anwendung finden diese Fluorophore bei der Markierung von Nukleotiden und Nukleinsäuren.²⁰⁸

Für vielfarbige Fluoreszenzuntersuchungen, wie z.B. Immunofluoreszenzassays, ist ein Fluorophor, welcher blaues Licht emittiert, interessant, da es leicht von grünem, gelbem oder rotem Licht unterschieden werden kann. Chemisch gesehen stellen Coumarine Benzo- α -pyrone dar (Abb. 4.17, **4**). Durch ihre Absorption im UV-Bereich kann es jedoch zu Störungen der Messungen durch Autofluoreszenz des Gewebes bzw. zu Photoschäden an den lebenden Zellen oder am nativen Gewebe durch das energiereiche Licht kommen.^{191,209-210}

Zu den wohl bekanntesten, aber auch teuersten Fluorophoren zählen Alexa-Farbstoffe wie **5**. Sie zeichnen sich durch hohe Photostabilität, gute Wasserlöslichkeit, pH-unabhängige Fluoreszenzeigenschaften, klar definierte Absorptions- und Emissionsspektren, sowie hohe Fluoreszenzquantenausbeute und lange Fluoreszenzlebensdauer aus.¹⁹¹ Entstanden sind die Alexa-Fluorophore ausgehend von Coumarin- und Rhodamin-Farbstoffen durch Sulfonierung.²¹¹ Die zahlreichen kommerziell erhältlichen Alexa-Farbstoffe decken den vollständigen sichtbaren, sowie IR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums ab. Die

Nummer hinter dem Namen kennzeichnet dabei das jeweilige Absorptionsmaximum der Fluorophore.²¹²

BODIPY-Derivate wie **6** nehmen unter den Fluorophoren eine Sonderstellung ein, da sie relativ unpolar sind und der Chromophor keine Ladung trägt (Abb. 4.17, xx). Der Name BODIPY leitet sich von dem Grundgerüst aller BODIPY-Derivate ab: **Bordipyrrol** oder auch **Borat-Dipyrrromethin**. BODIPY-Farbstoffe werden bevorzugt für die Markierung von Nukleotiden, Aminosäuren und anderen niedermolekularen Liganden verwendet, da die Eigenschaften des natürlichen Liganden durch den Farbstoff kaum beeinflusst werden.²¹³⁻²¹⁴ BODIPY-Derivate sind deutlich photostabiler als Fluorescein- oder Rhodamin-Derivate, besitzen schmale und scharfe Emissionsbanden, wodurch sie für Untersuchungen mit mehreren Fluorophoren gut geeignet sind.²¹⁵⁻²¹⁶

4.1.4 Cathepsin D

Cathepsin D (CatD) zählt zur Klasse der Aspartatproteasen, welches sich überwiegend in den Endosomen und Lysosomen befindet. Bei sauren pH-Werten spaltet es hier intra- und extrazelluläre Proteine in größere Peptidfragmente und leitet somit ihre weitere Degradation durch verschiedene lysosomale Endo- und Exopeptidasen ein.²¹⁷ Darüber hinaus spielt CatD eine wichtige Rolle bei der Antigenprozessierung und -präsentation an CD4⁺ T-Zellen des Immunsystems durch MHC-Klasse-II-Proteine.²¹⁸

Die Beteiligung von CatD in vielen pathologischen Prozessen wie Apoptose,²¹⁹ Entzündungsreaktionen,²²⁰⁻²²¹ rheumatische Krankheiten²²² und Alzheimer Krankheit²²³ werden diskutiert. In Brustkrebszellen wird CatD in höherer Konzentration exprimiert, wodurch das Metastase-Risiko steigt. CatD wird daher zur Diagnose und Prognose von Brustkrebs als Tumormarker verwendet.²²⁴⁻²²⁵

Das Enzym wird als Präpro-CatD im rauen Endoplasmatischen Reticulum synthetisiert und über den Golgi-Komplex zu den Lysosomen transportiert. Dies geschieht über phosphorylierte Oligosaccharidketten des Enzyms mittels Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-vermittelter Aufnahme. In den Lysosomen erfolgt eine proteolytische Spaltung in Pro-CatD. Aus diesem bildet sich über einen autokatalytischen Prozess eine einkettige Intermediärform (48 kDa), die zu der stabileren zweikettigen Form mit einer kleinen N-terminalen Region (14 kDa) und einer größeren C-terminalen Region (34 kDa) umgeformt wird (Abb. 4.18).²¹⁷

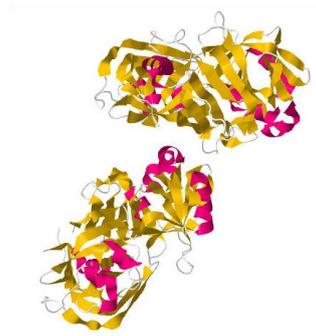


Abb. 4.18: Kristallstruktur von menschlichem CatD in aktiver Form bei einem pH-Wert von 7.5.²²⁶

Die Substratspezifität von CatD ist bekannt und in Abb. 4.19 dargestellt.²²⁷⁻²²⁹ So spaltet die Aspartatprotease selektiv die Bindung zwischen zwei hydrophoben - bevorzugt zwischen zwei aromatischen Aminosäuren - innerhalb einer Polypeptidkette. Peptide bestehend aus mindestens fünf Aminosäuren bilden geeignete CatD-Substrate. Beispielsweise spaltet CatD in dem Hexapeptid **7** selektiv die Bindung zwischen Phe-Phe und zwischen Phe-Tyr, wohingegen im Peptid **8** die Bindungen zwischen Ile-Leu und Phe-Phe gespalten werden (Abb. 4.19).

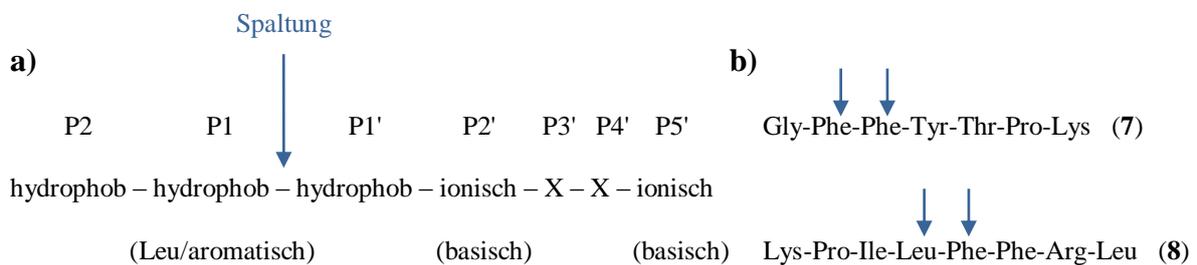


Abb. 4.19: **a)** Aminosäuresequenz-Muster, welches gewöhnlich durch CatD gespalten wird, sowie **b)** zwei CatD-Substrate als Beispiel (die Spaltstellen sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet).

Die katalytische Hydrolyse von Peptidbindungen durch CatD kann durch die Koordination eines Wassermoleküls zwischen zwei Aspartat-Resten im katalytisch aktiven Zentrum des Enzyms formuliert werden. Durch die sauren Bedingungen in den Endosomen und Lysosomen liegt eine Asparaginsäure dissoziiert vor. Das Aspartat-Anion abstrahiert das Proton eines Wassermoleküls. Die dadurch entstandene Hydroxygruppe kann den Carbonyl-Kohlenstoff einer Peptidbindung unter Bildung einer tetraedrigen Zwischenstufe nucleophil angreifen. Die Spaltung der tetraedrigen Zwischenstufe setzt die freie Carboxy- sowie Amino-Komponente durch erneute Deprotonierung einer Asparaginsäure frei (Abb. 4.20).

Durch diesen katalytischen Mechanismus lässt sich das pH-Optimum von CatD, welches bei $\text{pH} = 3.5\text{-}5.5$ liegt, erklären.²¹⁷

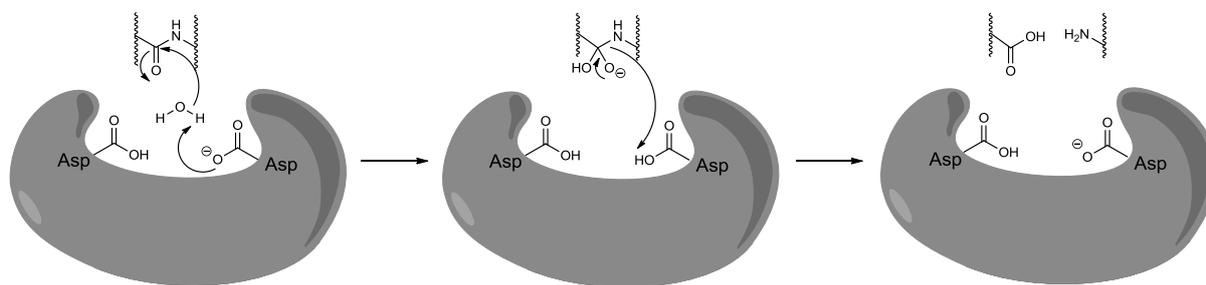


Abb. 4.20: Mechanismus der Peptidspaltung durch Aspartatproteasen.

4.2 Synthese der Zielverbindungen

4.2.1 Darstellung von Gliadinpeptiden mittels konvergenter Synthese

4.2.1.1 Fragmentkondensation in Lösung

Zur Herstellung des 13mer Gliadinpeptids LGQQQPFPPQQPY **9** wurde die Sequenz in zwei Fragmente unterteilt (Abb. 4.21), die anschließend einer Fragmentkondensation in Lösung unterzogen wurden.

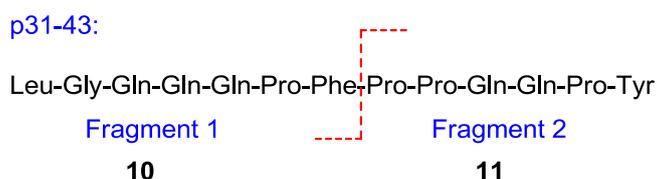


Abb. 4.21: Darstellung des Gliadinpeptids p31-43 und Unterteilung in zwei Fragmente.

Die Synthese des ersten Fragments Fmoc-LGQ(Trt)Q(Trt)Q(Trt)PF **10** erfolgte an einem Fmoc-Phe-NovaSynTGT-Harz mittels SPPS nach einem Standardprotokoll gemäß der Fmoc/^tBu-Strategie.^{159,178} Die Kupplungsschritte wurden mit 2 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Gly, Fmoc-(L)-Leu und 2 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt,²³⁰ sowie 4 Äq. der Base DIPEA durchgeführt.

Da es sich bei dem NovaSynTGT-Harz um ein stark säurelabiles Trägermaterial handelt, erfolgte die Abspaltung des vollständig geschützten Peptidfragments mit 1% TFA in CH_2Cl_2 . Nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP konnte das Produkt **10** mit einer Ausbeute von 28% erhalten werden (Abb. 4.22).

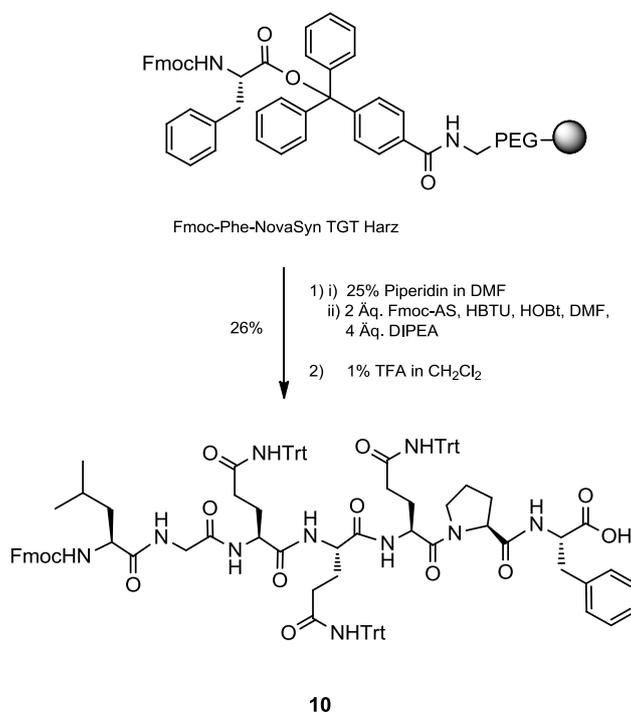


Abb. 4.22: Synthese und Abspaltung des ersten Fragments Fmoc-LGQ(Trt)Q(Trt)Q(Trt)PF **10** ausgehend vom Fmoc-Phe-NovaSynTGT-Harz. AS = Aminosäure.

Die Darstellung des zweiten Fragments PPQQPY **11** ausgehend von einem Fmoc-Tyr(^tBu)-NovaSynTGT-Harz erfolgte analog (Abb. 4.23).

Da es sich bei Fragment 2 aufgrund des hohen Prolinanteils um eine synthetisch problematische Peptidsequenz handelt, wurden Aliquots des Harzes abgespalten und massenspektrometrisch die Entstehung des jeweiligen Syntheseintermediats kontrolliert (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Massenspektrometrisch identifizierte Syntheseintermediate bei der Darstellung von Fragment 2.

m/z	Zuordnung	Fragment
373.3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PY(^t Bu)
580.3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Fmoc-PY(^t Bu)
705.5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Q(Trt)PY(^t Bu)
727.3	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Q(Trt)PY(^t Bu)
1172.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PQ(Trt)Q(Trt)PY(^t Bu)

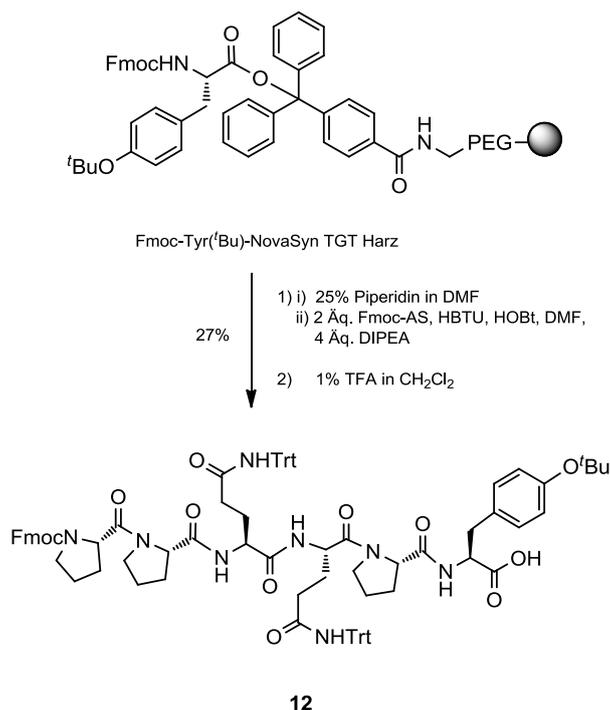


Abb. 4.23: Darstellung des zweiten Fragments Fmoc-PPQ(Trt)Q(Trt)PY(^tBu) **12** und Abspaltung vom Fmoc-Tyrt(^tBu)-NovaSynTGT-Harz.

Für die Fragmentkondensation in Lösung musste die Fmoc-Schutzgruppe an Fragment 2 abgespalten werden. Dies erfolgte nach einer Literatur bekannten Vorschrift²³¹ mit 20 Äq. Polymer-gebundenem Piperazin **13**, welches das freiwerdende Dibenzofulven an der festen Phase bindet und eine Rückreaktion mit dem Produkt verhindert (Abb. 4.24). Die chromatographische Reinigung mittels HPLC/RP lieferte **11** in 27% Ausbeute.

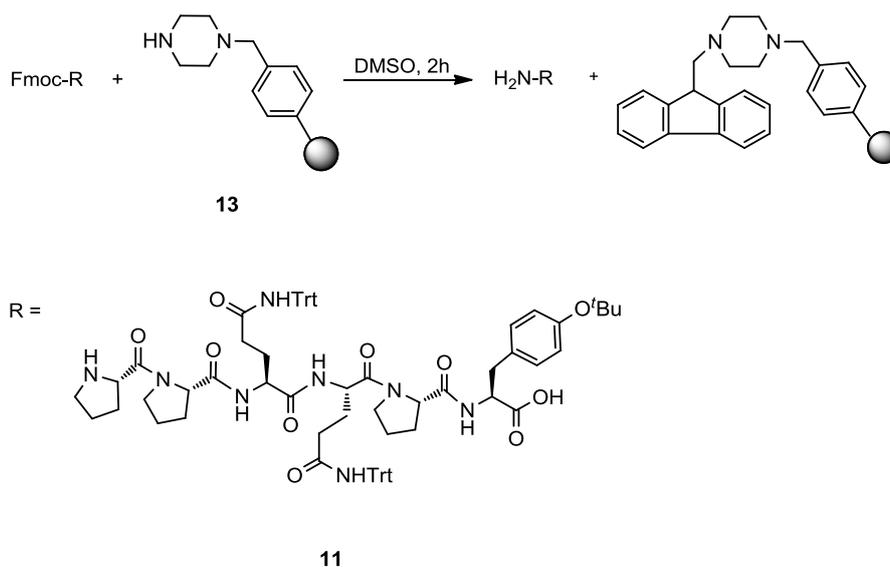


Abb. 4.24: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Polymer-gebundenem Piperazin **13** und das erhaltene Produkt **11**.

Dann wurden 1.2 Äq. des Fmoc-geschützten Fragments **10** mit 1.2 Äq. HBTU sowie 1.5 Äq. DIPEA in DMF als Lösungsmittel voraktiviert und anschließend Fragment 2 (**11**) mit weiteren 1.5 Äq. DIPEA zur Kondensation zugefügt (Abb. 4.25). Jedoch konnte massenspektrometrisch kein Produkt **14** nachgewiesen werden.

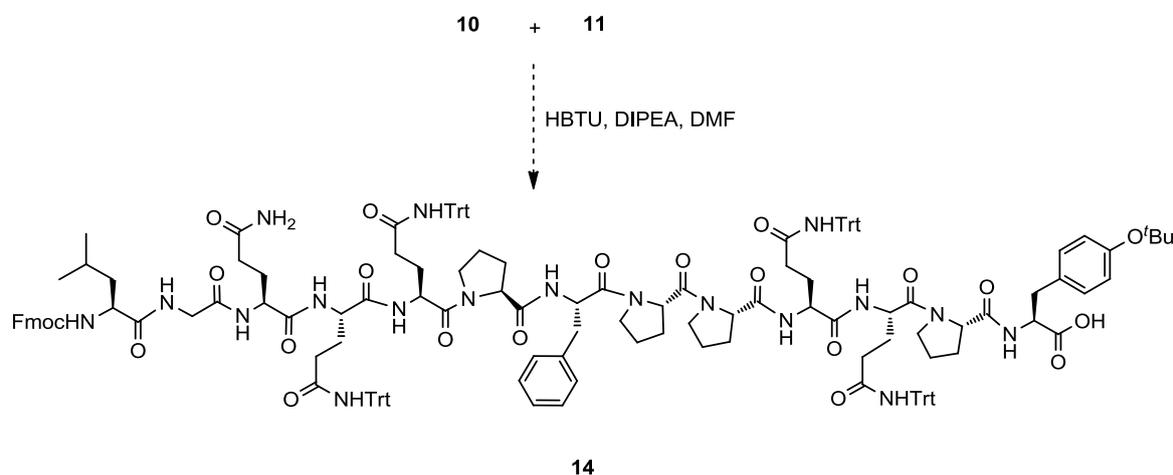


Abb. 4.25: Versuch zur Darstellung von **14** mittels Fragmentkondensation in Lösung.

4.2.1.2 Fragmentkondensation an der festen Phase (CSPPS)

Da die Löslichkeit von v.a. längeren geschützten Segmenten in organischen Lösungsmitteln gering ist, erfolgt bei der CSPPS die Kondensation der separat synthetisierten Peptidfragmente nacheinander an das C-terminale Peptidfragment, welches sich an der festen Phase befindet. Hierfür wurde das Gliadinpeptid LQLQFPQPQLPY **15** ebenfalls in zwei Segmente unterteilt.

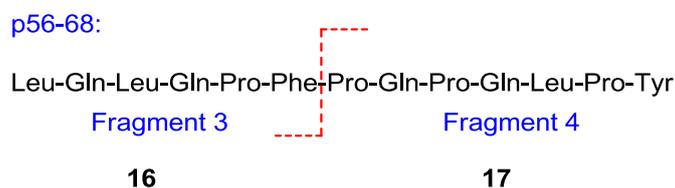


Abb. 4.26: Darstellung des Gliadinpeptids p56-68 und Unterteilung in zwei Fragmente

Die Synthese des Fragments Fmoc-LQ(Trt)LQ(Trt)PF **16** erfolgte an einem Fmoc-Phe-NovaSynTGT-Harz nach der in Abschnitt 4.2.1.1 bereits beschriebenen Vorgehensweise (Abb. 4.27). Nach Abspaltung von der festen Phase mit 1% TFA in CH₂Cl₂ konnte das gewünschte Fragment **16** massenspektrometrisch identifiziert werden. Als Nebenprodukt

wurde **16** mit vorzeitig abgespaltener Fmoc-Schutzgruppe nachgewiesen. Nach chromatographischer Reinigung wurden 67% des Produktes erhalten.

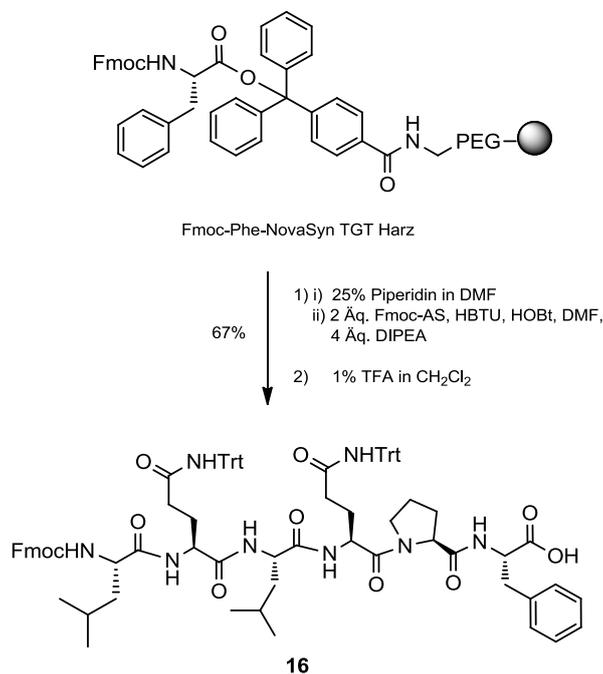


Abb. 4.27: Synthese des Fragments Fmoc-LQ(Trt)LQ(Trt)PF **16** und Abspaltung vom Fmoc-Phe-NovaSynTGT-Harz.

Die Darstellung des Fragments PQ(Trt)PQ(Trt)LPY(^tBu) **17** wurde an einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz durchgeführt, wobei hier wieder wahlweise nach einem Kupplungsschritt die Entstehung der gewünschten Syntheseintermediate mittels Aliquots an Harz massenspektrometrisch nachgewiesen wurden. In Tabelle 4.2 sind die identifizierten Segmente dargestellt.

Tabelle 4.2: Massenspektrometrisch nachgewiesene Fragmente bei der Synthese von PQ(Trt)PQ(Trt)LPY(^tBu).

m/z	Zuordnung	Fragment
279.1	[M+H] ⁺	PY
301.1	[M+Na] ⁺	PY
392.2	[M+H] ⁺	LPY
617.4	[M+H] ⁺	PQLPY
842.5	[M+H] ⁺	PQPQLPY

Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde das Peptidfragment **17** an der festen Phase belassen (Abb. 4.28).

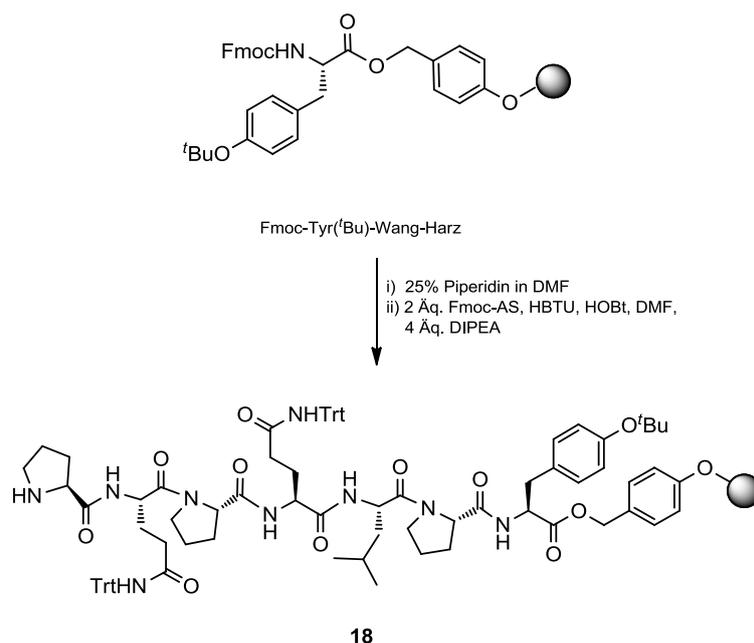
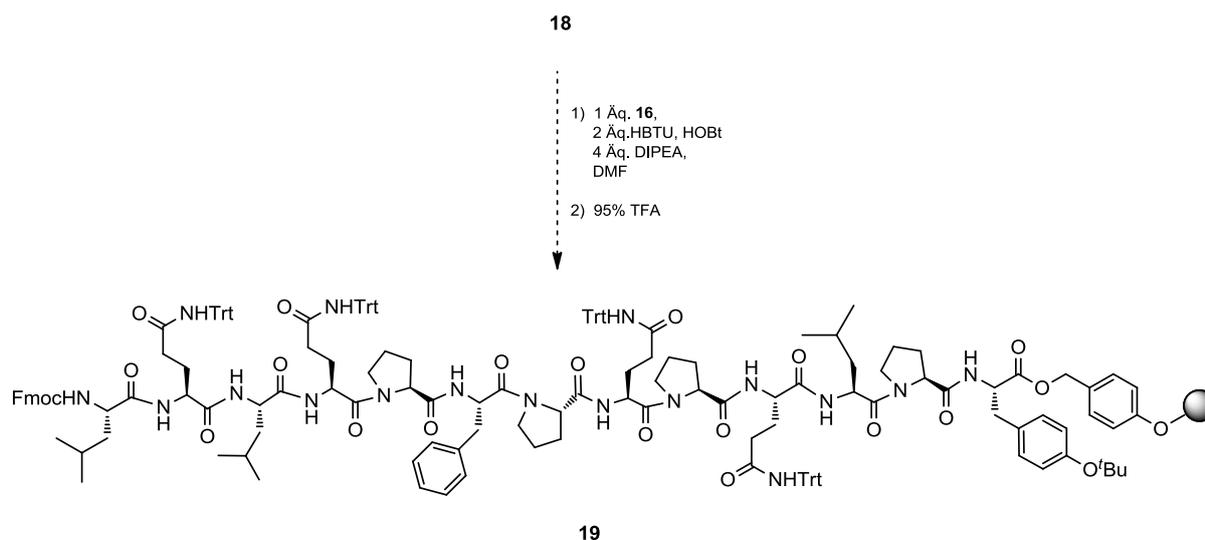


Abb. 4.28: Darstellung des Festphasen-gebundenen Fragments PQ(Trt)PQ(Trt)LPY(^tBu) ausgehend von einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz.

Die Kondensation wurde zweimal mit jeweils 1 Äq. XX, 2 Äq. HBTU/HOBT und 4 Äq. DIPEA in DMF für 2 h durchgeführt. Nach *N*-terminaler Entschützung wurde das Peptid mit 95% TFA von der festen Phase abgespalten (Abb. 4.29). Jedoch konnte massenspektrometrisch kein Produkt identifiziert werden. Weder die Zugabe von 2 Äq. des Fragments **16**, noch die wiederholte Durchführung des Kupplungsschrittes, noch die Verlängerung der Kupplungszeit lieferten das gewünschte Produkt **19**.



4.29: Versuch zur Darstellung von **19** mittels konvergenter Festphasenpeptidsynthese.

Die Peptidfragmente **10**, **11** und **16** konnten durch Synthese an NovaSynTGT-Harzen mit moderaten bis guten Ausbeuten dargestellt werden (**10** mit 28%, **11** mit 27% und **16** mit 67% Ausbeute). Die anschließende Kondensation sowohl in Lösung als auch an der festen Phase mit dem Festphasen-gebundenen Fragment **18** lieferten jedoch nicht die gewünschten Zielpeptide. Möglicherweise könnte dies daran liegen, dass in beiden Fällen die *N*-terminale Kupplung an unreaktiveres Prolin nötig war.

4.2.2 Darstellung von Gliadinpeptiden mittels linearer SPPS

Tabelle 4.3 stellt die im Rahmen dieser Arbeit für die Untersuchung des intrazellulären Transportweges benötigten Gliadinpeptide dar, die mittels linearer SPPS synthetisiert wurden.

Tabelle 4.3: Durch lineare SPPS dargestellte Gliadinpeptide. * Nach chromatographischer Reinigung.

Bezeichnung	Länge	Peptid	Ausbeute in %
M1 p31-49	19-mer	LGQQQPFPPQQPYQPQPF	81
M1 p31-43	13-mer	LGQQQPFPPQQPY	71*
M1 p31-43 deamid	13-mer	LGQEQPFPPQQPY	49*
G5 p56-68	13-mer	LQLQPFQQLPY	83
G5 p56-68 deamid	13-mer	LQLQPFQQLPELY	83
DQ2-a-I p60-68	9-mer	PFQQLPY	41*
DQ2-a-I p60-68 deamid	9-mer	PFQPELY	66*
p56-88	33-mer	LQLQPF(QQQLPY) ₃ QPQPF	87

Die Synthesen des 9mer Peptids PFPQQLPY **20** und der deamidierten Form PFPQPELY **21** erfolgten jeweils an einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz mittels linearer SPPS nach einem Standardprotokoll gemäß der Fmoc/^tBu-Schutzgruppenstrategie.²³² Die Kupplungsschritte wurden mit jeweils 6 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Glu(^tBu), Fmoc-(L)-Phe und 6 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 12 Äq. der Base DIPEA durchgeführt. Die Abspaltung der 9mere vom Harz erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP gelang die Darstellung von PFPQQLPY **20** mit 41% Ausbeute und von PFPQPELY **21** mit 66% Ausbeute (Abb. 4.30).

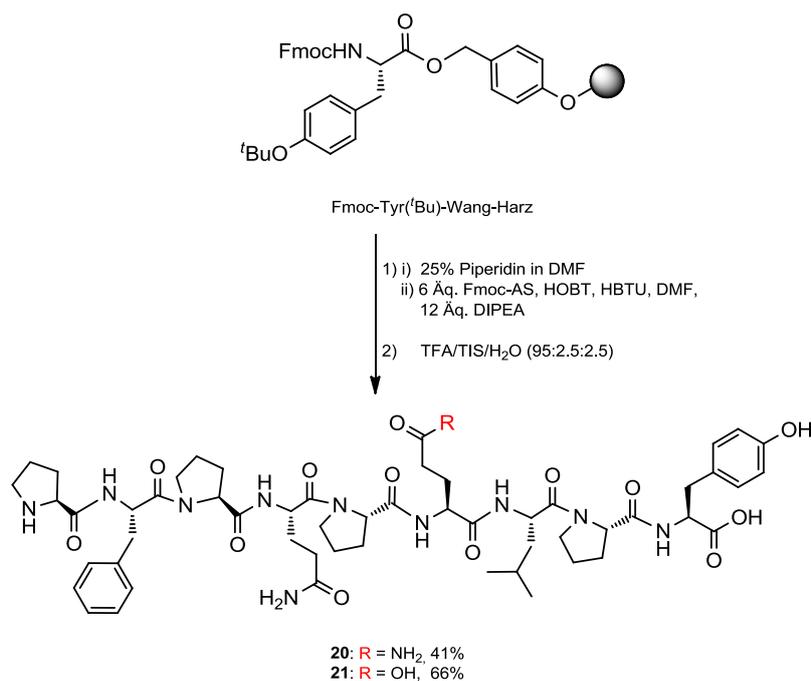


Abb. 4.30: Synthese von PFPQQLPY **20** und PFPQPELPY **21** ausgehend vom Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz.

Die Darstellung der Gliadinpeptide LGQQQPFPPQQPY (p31-43, **9**), LQLQPFPPQQLPY (p56-68, **15**) sowie der deamidierten Formen LGQEQLPFPQQPY (p31-43 deamid, **22**) und LQLQPFPPQPELPY (p56-68 deamid, **23**) wurde an einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz analog der Vorgehensweise wie für die 9mere beschrieben durchgeführt (Abb. 4.31 und 4.32).

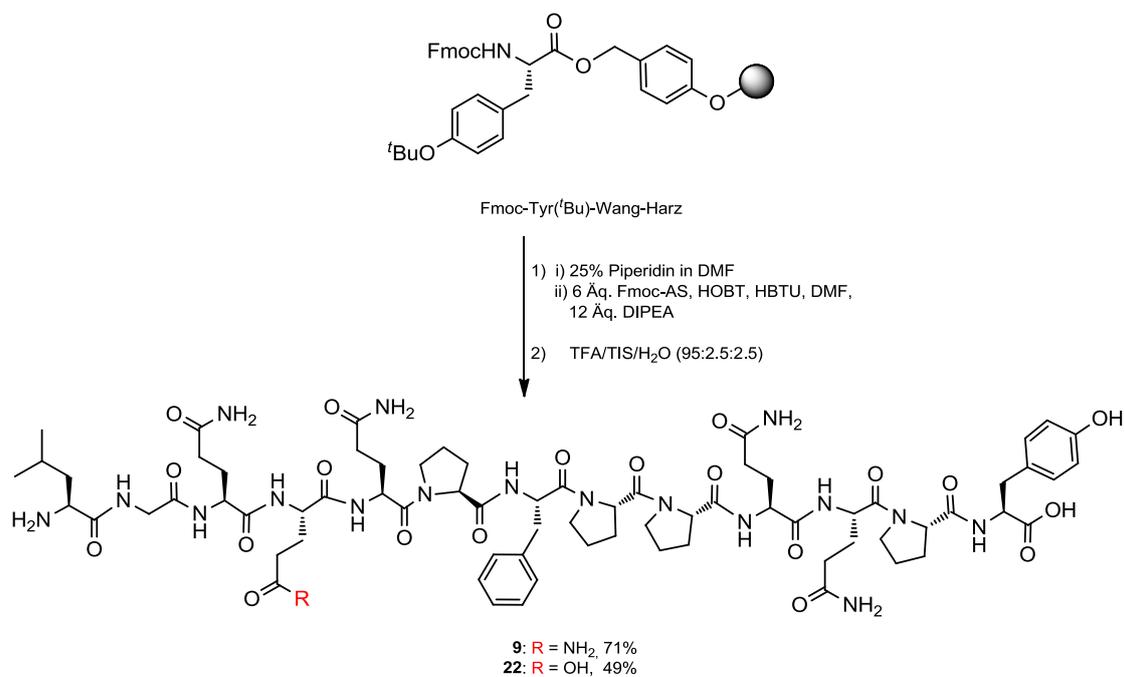


Abb. 4.31: Synthese von LGQQQPFPPQQPY **9** und des deamidierten Analogons **22** mittels linearer SPPS.

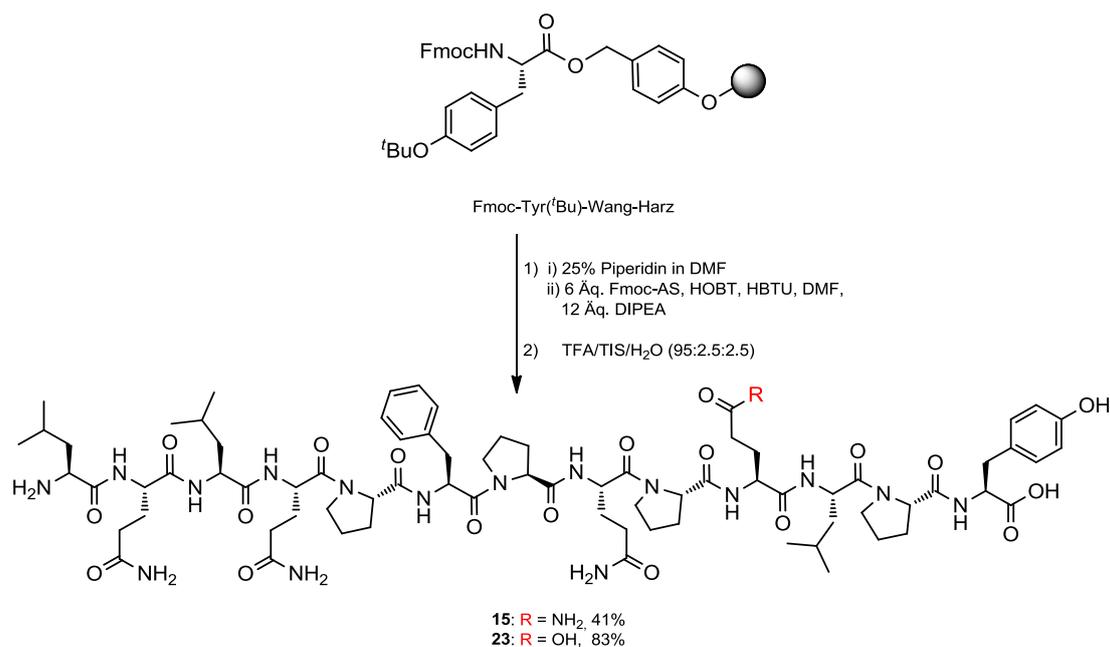


Abb. 4.32: Synthese von LQLQPFQPQLPY **15** und der deamidierten Form **23**.

Einzig die Synthese des p56-68 deamid **23** erfolgte an einem automatisierten Peptidsynthesizer mit jeweils 5.2 Äq. der jeweiligen Aminosäuren Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Glu(^tBu), Fmoc-(L)-Phe und 5 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt unter Zugabe von 10 Äq. der Base DIPEA.

Die Abspaltung der vier 13mere erfolgte mit Hilfe von TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) von der festen Phase. Nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP konnten 71% p31-43 (**9**) und 49% p31-43deamid (**22**) isoliert werden. Auf eine Reinigung von p56-68 (**15**) und p56-68deamid (**23**) konnte verzichtet werden, so dass diese jeweils mit einer Ausbeute von 83% in ausreichender Reinheit erhalten wurden.

Auch für die Darstellung des 19mers LGQQPFPPQQPYPQPQPF (p31-49, **24**; Abb. 4.33) und des 33mers LQLQPF(PQPQLPY)₃PQPQPF (p56-88, **25**; Abb. 4.34) wurde ein automatisierter Peptidsynthesizer verwendet. Ausgehend von einem Fmoc-Phe-Wang-Harz wurden jeweils 5 Äq. Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Phe und 5 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 10 Äq. der Base DIPEA zugefügt. Die Abspaltung wurde mit 95% TFA durchgeführt. Das Ausfällen aus eiskaltem Diethylether und anschließende Gefriertrocknung ergaben 81% des 19mers **24** und 87% des 33mer Peptids **25** in ausreichender Reinheit, so dass auf eine Reinigung mittels HPLC/RP verzichtet werden konnte.

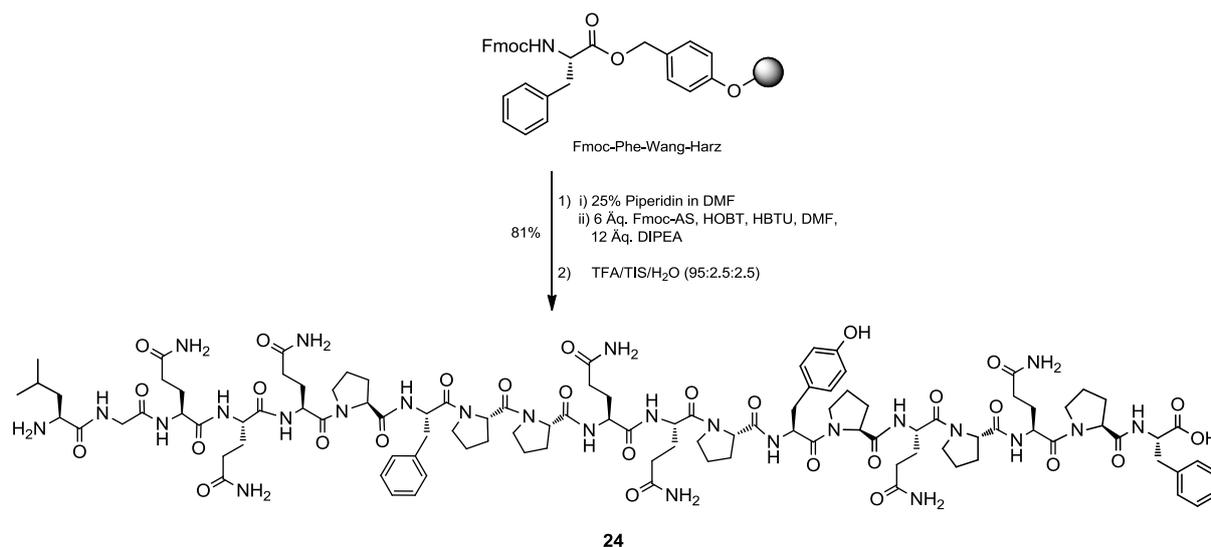


Abb. 4.33: Darstellung des 19mer Gliadinpeptids **24** an einem Fmoc-Phe-Wang Harz mittels automatisierter SPPS.

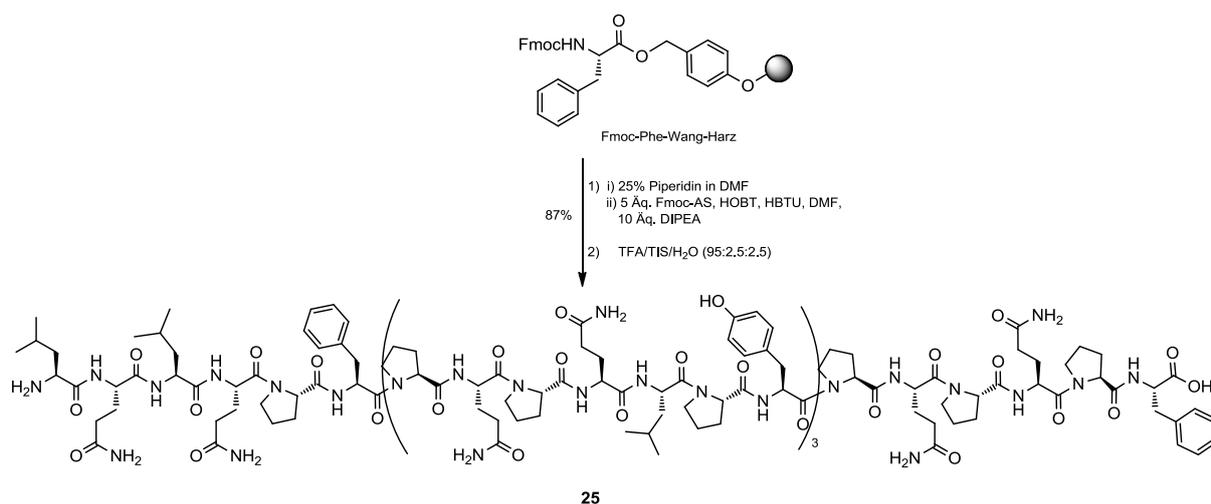


Abb. 4.34: Synthese des 33mer Peptids **25** an einem Fmoc-Phe-Wang-Harz mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers.

Die Darstellung der Gliadinpeptide **20**, **21**, der 13mere p31-43 (**9**), p31-43 deamid (**22**), p56-68 (**15**), p56-68 deamid (**23**) sowie des 19mer (**24**) und des 33mer Peptids (**25**) gelang mit guten bis sehr guten Ausbeuten z.T. manuell bzw. mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers. Die chromatographische Reinigung – sofern erforderlich - der Rohprodukte mittels HPLC/RP8 bzw. RP18 war problemlos möglich und lieferte die jeweiligen Produkte mit hoher Reinheit.

4.2.3 Markierung der Gliadinpeptide mit einem Fluoreszenzfarbstoff

Um den intrazellulären Transportweg von toxischen und immunodominanten Gliadinpeptiden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie am lebenden Zellkulturmodell zu untersuchen, ist die Fluoreszenzmarkierung dieser Peptide erforderlich. Hierfür wurden die im Abschnitt 4.2.2 mittels linearer SPPS dargestellten Gliadinpeptide mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Anforderungen an einen Fluoreszenzmarker wurden in Abschnitt 4.2.2 bereits beschrieben. Aufgrund der hohen Stabilität und Löslichkeit in einem weiten Bereich von Lösungsmitteln fiel die Wahl zum einen auf das PromoFluor488 (**26**) und zum anderen auf das Lissamin Rhodamin B (**27**). Ihre Strukturen sowie die Absorptions- und Emissionsspektren sind in Abb. 4.35 gezeigt (PromoFluor488: $\lambda_{\text{abs}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$; Lissamin Rhodamin B: $\lambda_{\text{abs}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$). Der PromoFluor-Farbstoff ist käuflich mit einer Succinimidyl-Aktivester-Einheit und das Lissamin Rhodamin-Fluorophor mit einer Sulfonylchlorid-Einheit zu erwerben.

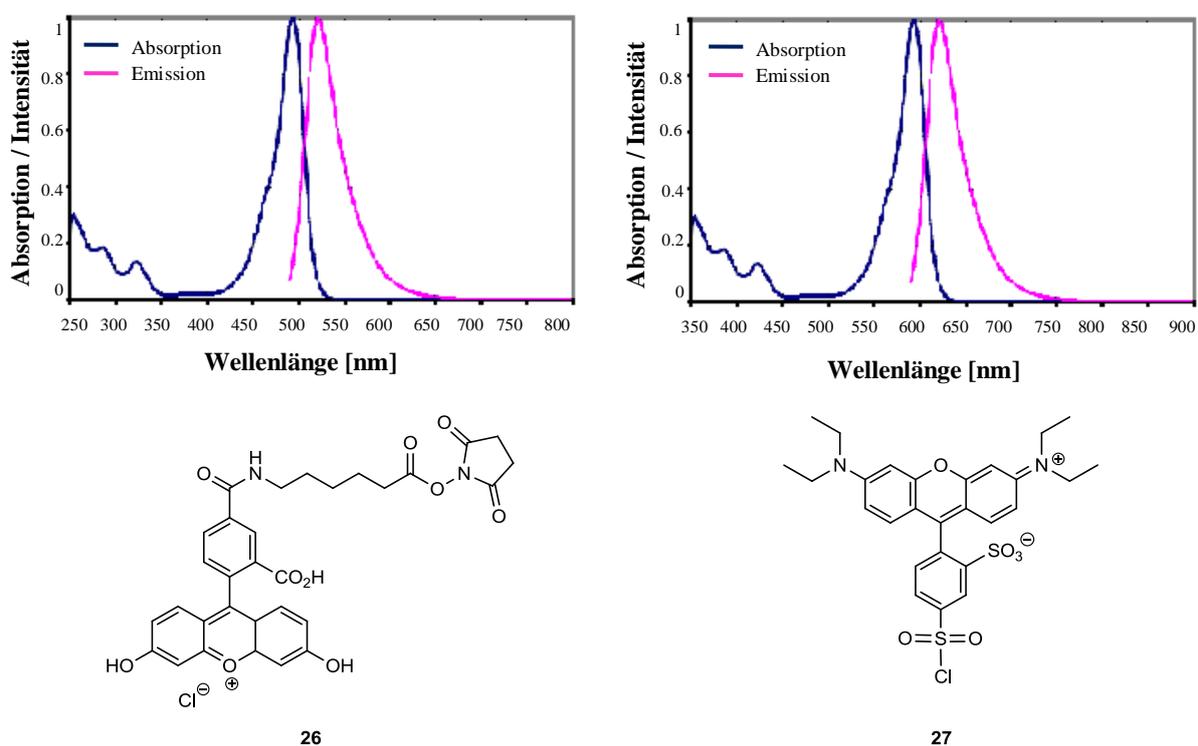


Abb. 4.35: Die für die Zellassays verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Die funktionellen Gruppen beider Fluoreszenzmarker reagieren jeweils selektiv mit der freien NH_2 -Gruppe der Gliadinpeptide und bilden so stabile Farbstoff-Peptid-Konjugate.

Im Folgenden wurden das toxische p31-43 (**9**), sowie das immunodominante p56-68 Gliadinpeptid (**15**) mit dem PromoFluor-Aktivester unter Zugabe von NEt₃ und DMF als Lösungsmittel markiert (Abb. 4.36 und Abb. 4.37).

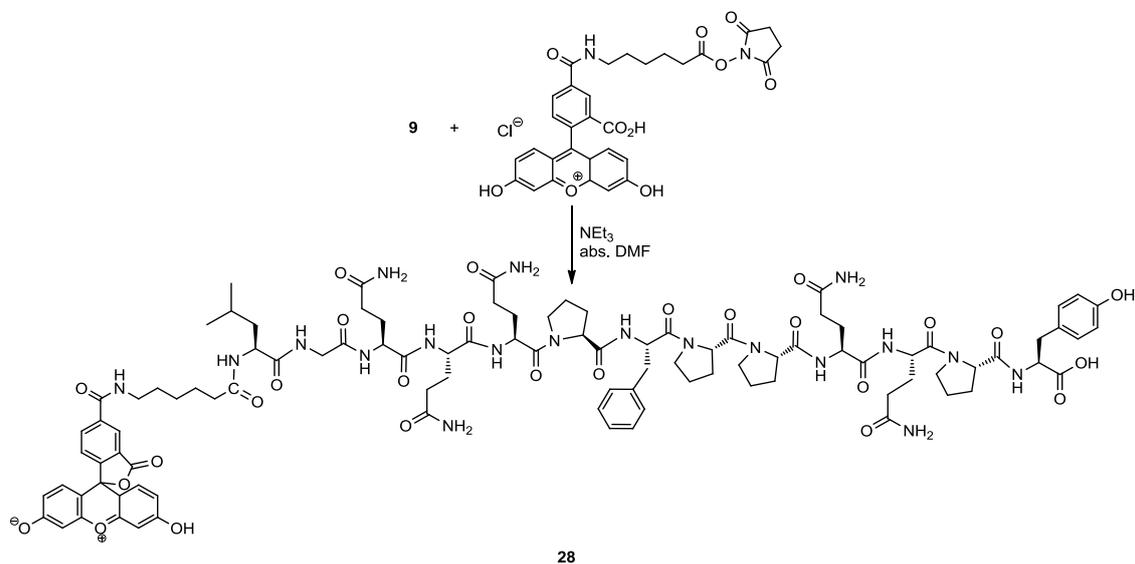


Abb. 4.36: Markierung des p31-43 Gliadinpeptids mit dem PromoFluor488-Farbstoff.

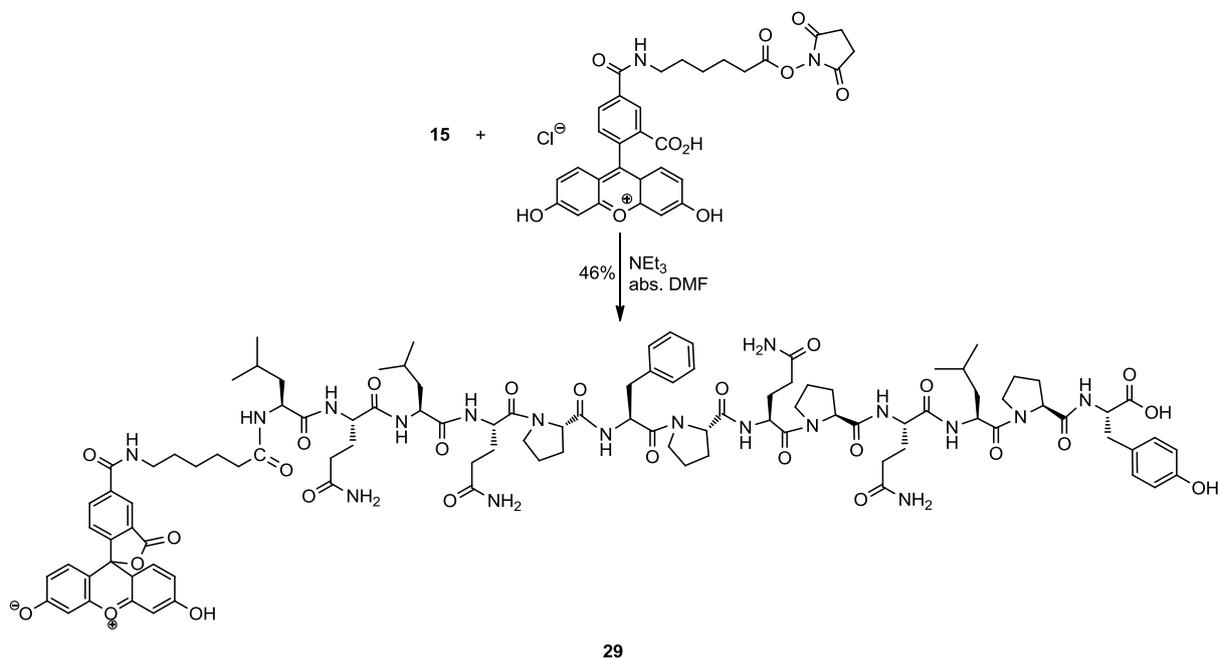


Abb. 4.37: Synthese des Fluoreszenz-markierten p56-68 Gliadinpeptids **29**.

Nach chromatographischer Reinigung an der HPLC/RP konnte **28** mit einer Ausbeute von 51% und **29** mit einer Ausbeute von 46% erhalten werden.

Analog erfolgte die Markierung des Gliadinpeptids p56-88 (**25**) mit dem PromoFluor-Farbstoff. Nach Reinigung konnten 62% des gewünschten Produkts **30** isoliert werden (Abb. 4.38).

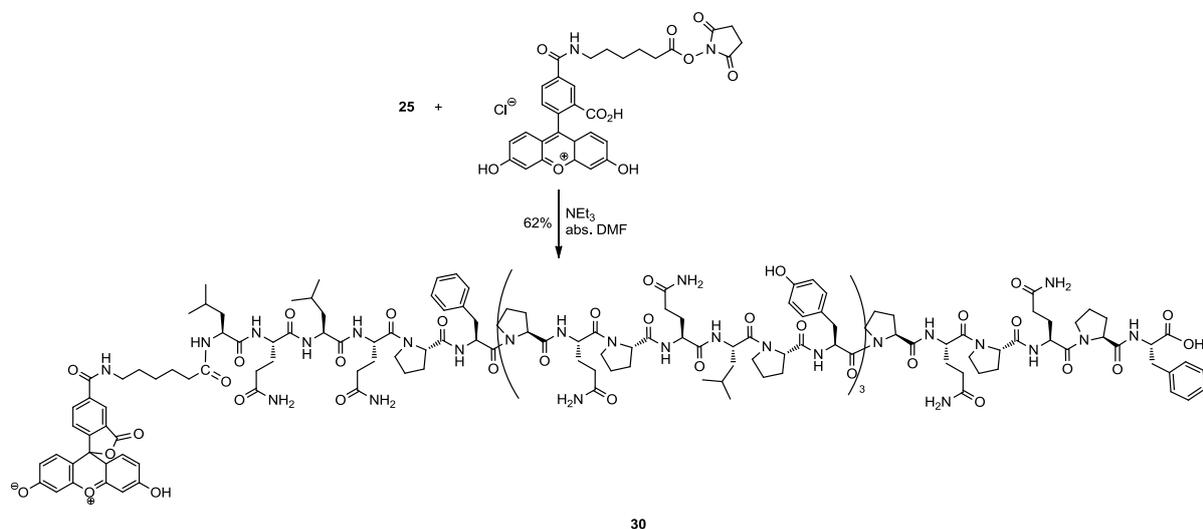


Abb. 4.38: Darstellung des PromoFluor-markierten 33mer Gliadinpeptids **30**.

Zusammenfassend gelang die Markierung der Gliadinpeptide p31-43 (**9**), p56-68 (**15**) und p56-88 (**25**) mit dem PromoFluor-Farbstoff mit guten Ausbeuten. Der Nachteil bei der Verwendung dieses Fluorophors ist die Tatsache, dass er relativ teuer ist.

Die Peptide p31-43 und p56-68 wurden des Weiteren mit dem Lissamin Rhodamin B-Farbstoff markiert. Dazu wurden jeweils 1.5 Äq. des Farbstoffs mit NEt_3 mit dem jeweiligen Peptid in DMF als Lösungsmittel umgesetzt (Abb. 4.39 und Abb. 4.40).

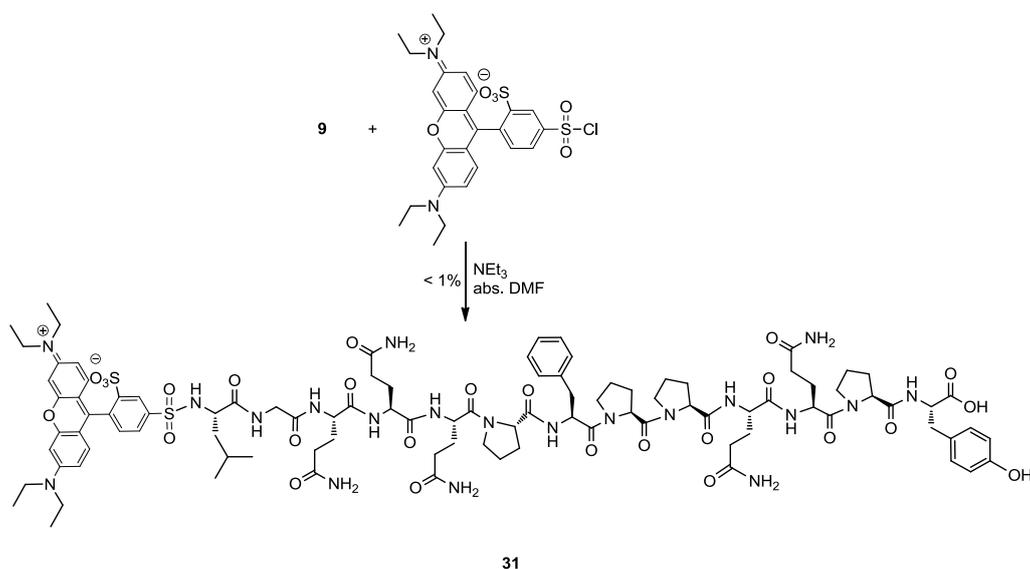


Abb. 4.39: Darstellung von Lissamin-markiertem p31-43 Gliadinpeptid **31**.

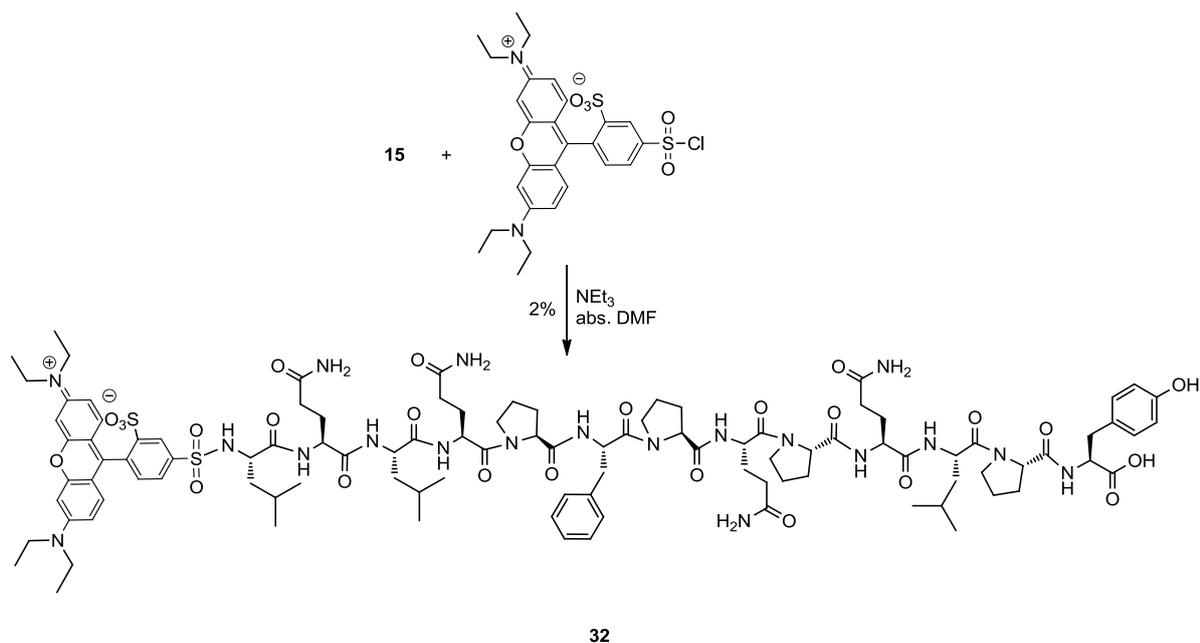


Abb. 4.40: Markierung des p56-68 Peptids mit dem Lissamin-Rhodamin-Fluorophor.

Die Reaktion zu den Lissamin-markierten Peptiden verlief unvollständig, vermutlich wegen sterischer Hinderung durch die Leucin-Seitenkette und das Aromatensystem am Farbstoff. Die LCMS-Läufe der Rohprodukte wiesen neben zahlreichen nicht identifizierbaren Nebenprodukten auch unmarkiertes Peptid und hydrolysierten Lissamin Rhodamin-Farbstoff auf. Daher gestaltete sich die Isolierung von reinem Produkt durch chromatographische Reinigung als schwierig, wodurch **31** in Spuren und **32** nur mit einer Ausbeute von 2% erhalten wurde.

4.2.4 Versuch zur Optimierung der Synthese Lissamin-markierter Gliadinpeptide

Die Synthese der in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen mit dem Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid-Farbstoff markierten Peptide verlief in nicht zufrieden stellenden Ausbeuten. Daher wurde versucht, diese Reaktion durch Markierung an der festen Phase zu optimieren. Hierfür wurden zwei Modellpeptide hergestellt: Ac-AKQY **33** sowie Ac-AAKQY **34** mit einem zusätzlichen Alanin als Spacer.

Beide Modellpeptide wurden jeweils an einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz mittels linearer SPPS nach einem Standardprotokoll gemäß der Fmoc/^tBu-Schutzgruppenstrategie dargestellt.

Die Kupplungsschritte wurden mit jeweils 2 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Lys(Mtt), Fmoc-(L)-Ala, Ac-(L)-Ala und 2 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 4 Äq. der Base DIPEA durchgeführt.

Bei der Mtt-Gruppe handelt es sich um eine besonders säurelabile Schutzgruppe, welche selektiv in Anwesenheit anderer säurelabiler Schutzgruppen wie ^tBu oder Trt mit 1% TFA in CH₂Cl₂ abgespalten werden kann. Dadurch wird die NH₂-Gruppe der Lysin-Seitenkette freigesetzt und eine Markierung mit dem Lissamin-Farbstoff an der festen Phase möglich gemacht. Die Verwendung von acetyliertem Ala anstelle von Fmoc-geschütztem Ala in *N*-terminaler Position ist zwingend erforderlich, da die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe bei der Umsetzung mit Lissamin Rhodamin B durch Zugabe von Base vorzeitig abgespalten werden kann, wodurch eine zweifache Markierung des Modellpeptids mit dem Farbstoff stattfinden würde.

In Abbildung 4.41 ist der Versuch zur Darstellung von Lissamin-markiertem Modellpeptid Ac-AKQY **33** gezeigt. Nach Synthese der Peptidsequenz Ac-AKQY wurde dieses an der festen Phase belassen (**35**) und die Mtt-Schutzgruppe selektiv mit 1% TFA abgespalten unter Beibehaltung der übrigen säurelabilen Schutzgruppen. Dann wurde mit 1.5 Äq. Lissamin Rhodamin B und 3 Äq. Et₃N zu **36** umgesetzt. Nach anschließender Abspaltung vom Harz mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) konnte jedoch das gewünschte Produkt **37** massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden, sondern nur deacetyliertes Edukt AKQY.

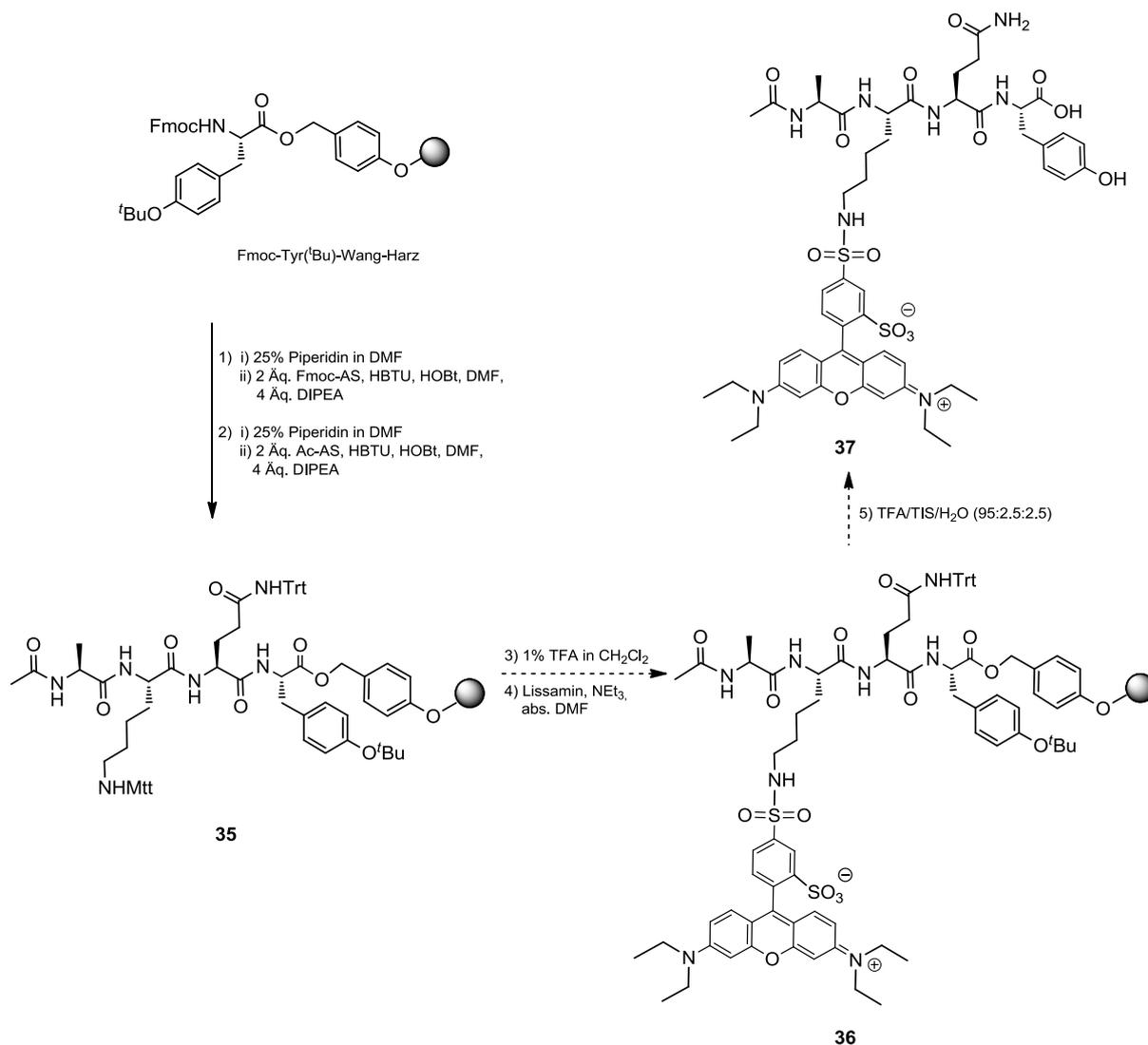


Abb. 4.41: Versuch zur Darstellung von Lissamin-markiertem Modellpeptid **37** an der festen Phase.

Der Versuch zur Synthese von Lissamin-markiertem Modellpeptid Ac-AAKQY **38** mit einem zusätzlichen Lysin als Spacer erfolgte analog und ist in Abb. 4.42 dargestellt. Auch hier konnte leider massenspektrometrisch kein fluoreszenzmarkiertes Produkt **38**, sondern nur unmarkiertes Edukt Ac-AAKQY **34**, identifiziert werden.

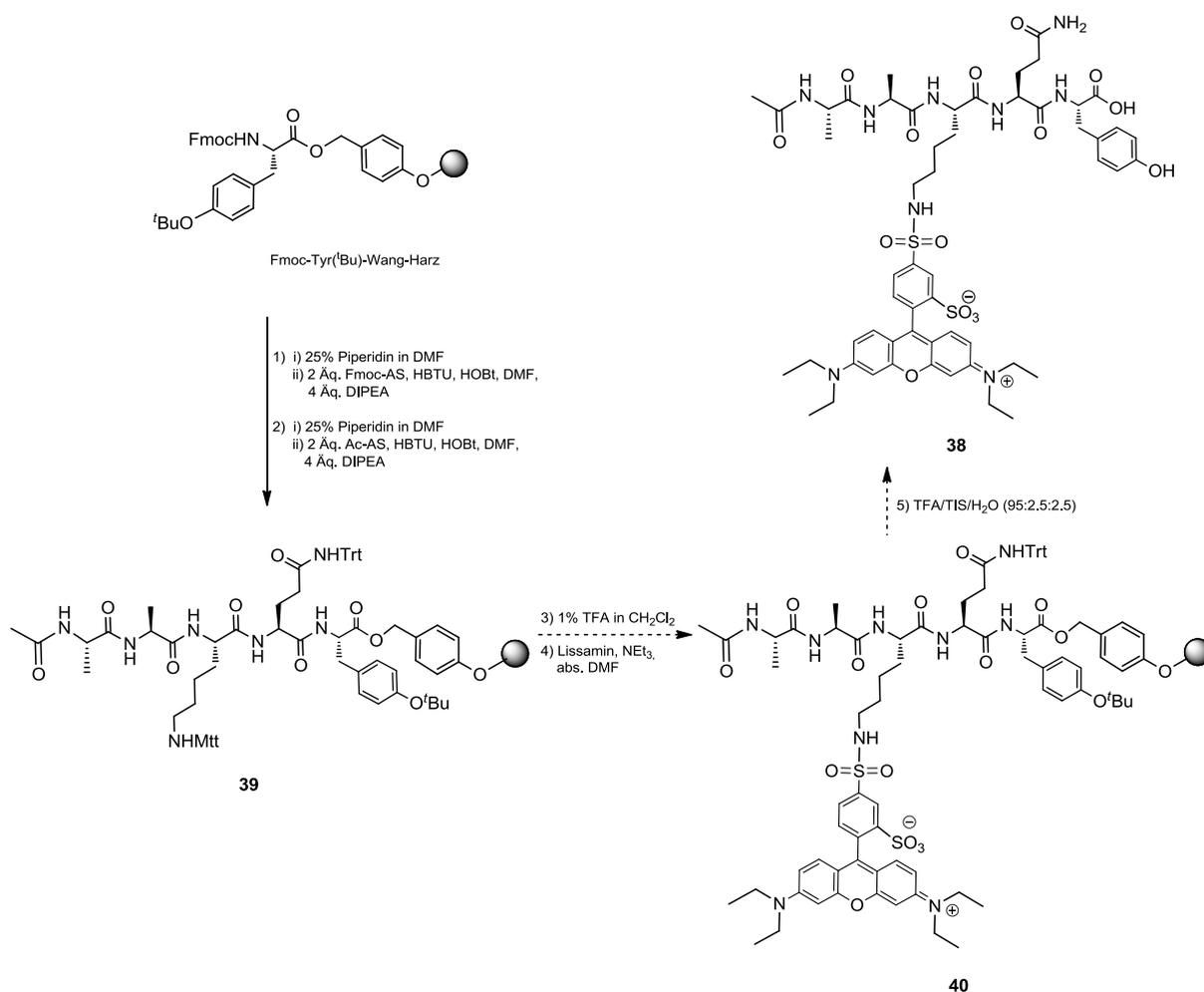


Abb. 4.42: Versuch zur Darstellung von Lissamin-markiertem Modellpeptid **38** an der festen Phase.

Die Versuche zur Darstellung von fluoreszenzmarkierten Peptiden **37** und **38** an der festen Phase anhand der beiden Modellpeptide Ac-AKQY **33** und Ac-AAKQY **34** brachten keinen Erfolg. Statt den gewünschten Produkten wurde nur das Edukt **34** bzw. im Fall von **37** deacetyliertes Edukt massenspektrometrisch nachgewiesen.

Vermutlich ist die sterische Hinderung durch das Harz und die sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen der Aminosäure-Seitenketten, sowie die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Peptidketten nicht zu unterschätzen. Die Verwendung eines Harzes mit geringerer Beladungsdichte könnte hier Aufschluss über den sterischen Effekt geben, gleichbedeutend mit der Tatsache, dass eine geringere Ausbeute an Produkt zu erwarten ist.

Desweiteren ist fraglich, ob die evtl. gebildete Farbstoff-Peptid-Bindung stabil gegenüber den Abspaltbedingungen ist. Möglich wäre der Zerfall des Farbstoffs in nicht fluoreszenzmarkierte Fragmente in Gegenwart von 95%iger TFA-Lösung. Der Einsatz eines

Harzes, welches sich bei milderer Reaktionsbedingungen abspalten lässt, könnte hier Aufschluss über die Bindungsstabilität geben.

4.2.5 Einbau von Spacern zur Markierung mit Lissamin-Rhodamin B

Der Lissamin-Rhodamin B-Farbstoff ist im Vergleich zum PromoFluor488-Farbstoff deutlich kostengünstiger. Da die Markierung der Gliadinpeptide mit dem Lissamin-Fluorophor wahrscheinlich aus sterischen Gründen jedoch mit schlechter Ausbeute erfolgte, wurden Glycin und Aminohexansäure (Ahx) als sog. Spacer eingebaut.

Zunächst wurde Glycinmethylester-Hydrochlorid **41** mit dem Lissamin-Farbstoff markiert. Dazu wurden 1.5 Äq. des Farbstoffs unter Zugabe von 3 Äq. NEt_3 in DMF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes mit einem Laufmittelverhältnis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4:1) konnte das Produkt **42** als lila Feststoff mit einer Ausbeute von immerhin 34% isoliert werden (Abb. 4.43). →

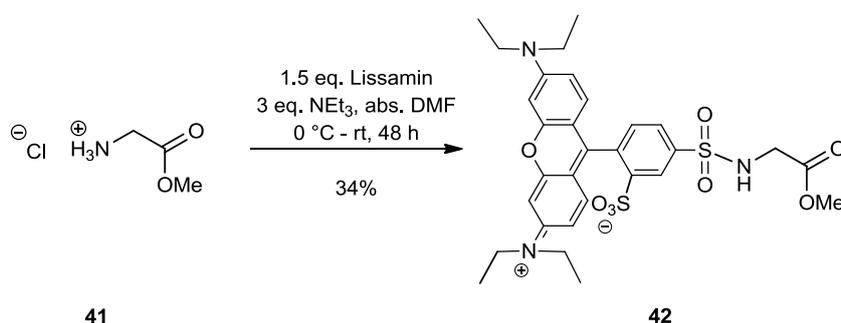
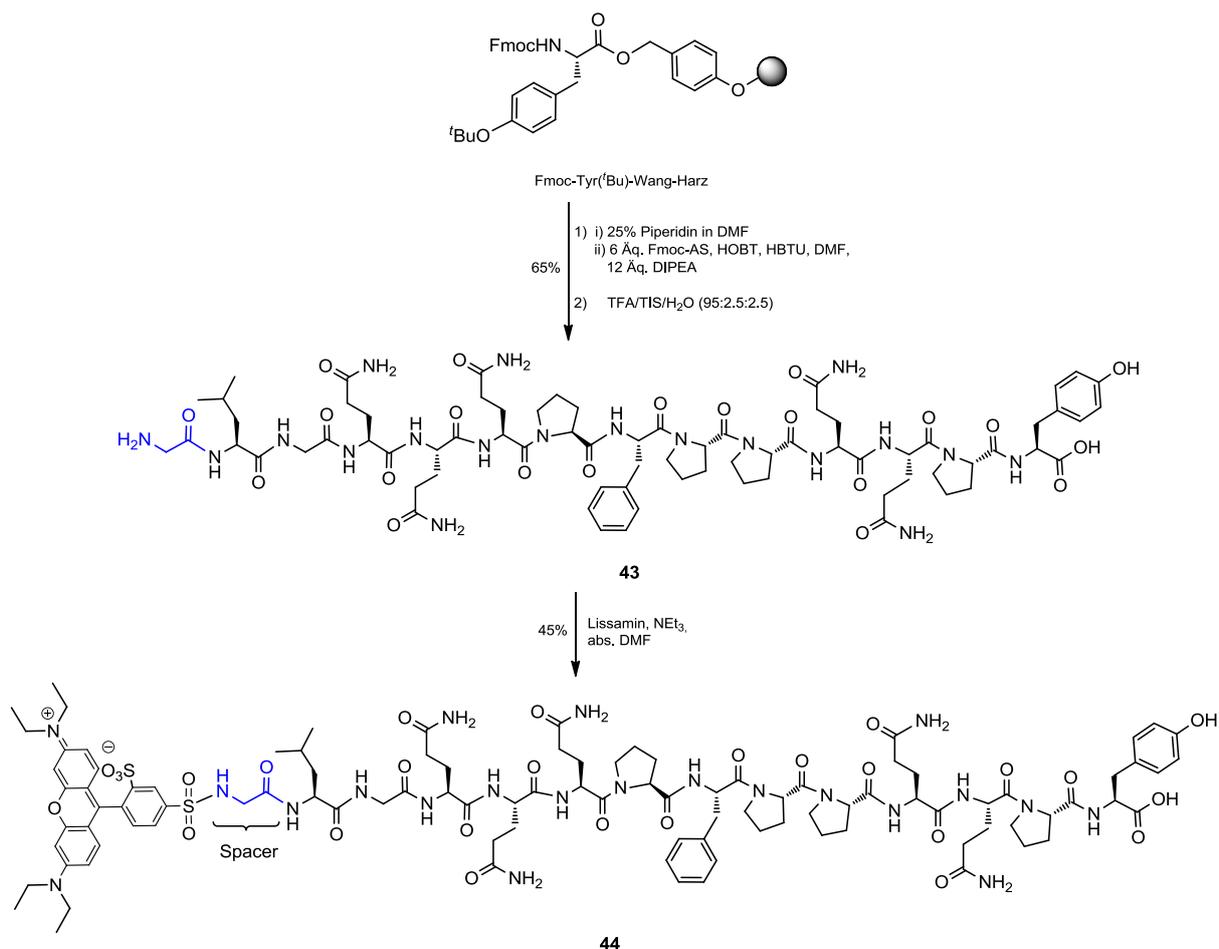


Abb. 4.43: Darstellung von Lissamin-markiertem Glycinmethylester **42**.

Daher wurde das Gliadinpeptid Gly-p31-43 (**43**) mittels linearer SPPS gemäß der Fmoc/^tBu-Strategie nach üblichem Standardprotokoll dargestellt. Nach Fällen des Peptids als TFA-Salz aus einer kalten Diethylether-Lösung und anschließender Gefriertrocknung, konnte **43** in ausreichender Reinheit mit einer Ausbeute von 65% erhalten werden.

Nach Reaktion von GLGQQQPFPPQQPY mit dem Lissamin-Rhodamin-Farbstoff und chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP wurde das Produkt **44** mit 45% Ausbeute erhalten (Abb. 4.44).



4.44: Synthese von Lissamin-markiertem p31-43-Gliadinpeptid mit Glycin als Spacer (**44**).

Für die Verwendung von Ahx als Spacer wurde nach einer Literatur bekannten Vorschrift Boc-Ahx-succinimid **45** synthetisiert.²³³⁻²³⁵ Dazu wurde Ahx **46** mit Boc₂O und 2 M NaOH in einem H₂O/Dioxan-Gemisch (1:2) zu Boc-geschütztem Ahx **47** umgesetzt. **47** konnte in einer Ausbeute von 79% erhalten werden. Die anschließende Reaktion mit NHS-OH und EDC in trockenem Diethylether lieferte Boc-Ahx-succinimid **45** in 70% Ausbeute (Abb. 4.45). Somit konnte das gewünschte Produkt **45** in zwei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 55% erhalten werden.

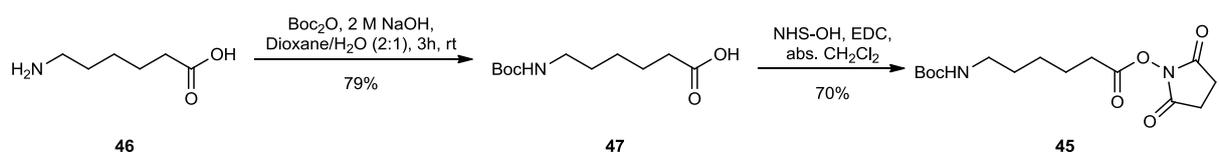


Abb. 4.45: Darstellung von Boc-Ahx-succinimid **45**.

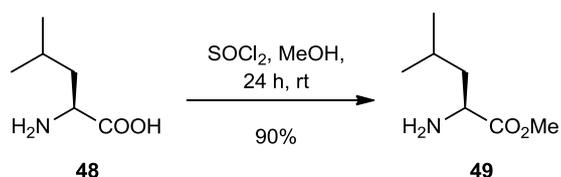


Abb. 4.46: Synthese von *N*-Leucinmethyl ester **49** aus **48** durch Methylierung mit Thionylchlorid in Methanol.

Die Kupplung von **45** mit *N*-(*L*)-Leucinmethyl ester **49**, welches zuvor mit Thionylchlorid und Methanol aus *N*-(*L*)-Leucin gemäß einer Literaturvorschrift dargestellt wurde (Abb. 4.46),²³⁶ lieferte das Kupplungsprodukt **50** mit einer Ausbeute von 85%. Die anschließende Boc-Abspaltung mit einem Gemisch aus TFA/CH₂Cl₂ im Verhältnis 1:1, verlief innerhalb von einer Stunde quantitativ. Die anschließende Kupplung von **51** mit dem Lissamin-Farbstoff ergab nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Lösungsmittelverhältnis von CH₂Cl₂/MeOH (3:1) das Produkt **52** in 54% Ausbeute (Abb. 4.47).

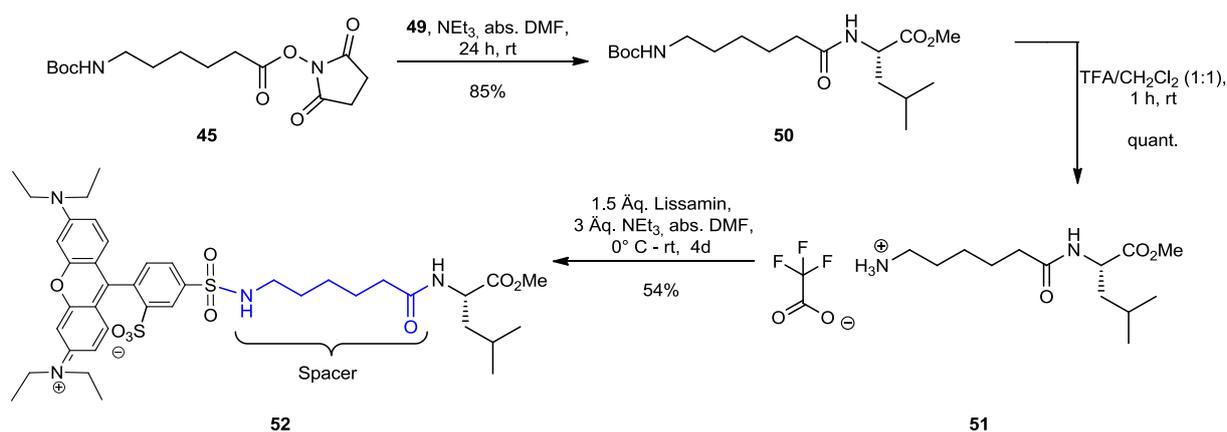


Abb. 4.47: Darstellung von Lissamin-markiertem Leucinmethyl ester mit Ahx als Spacer (**52**).

Durch die Verwendung eines Spacers konnten die Ausbeuten für die Markierung mit dem Lissamin-Farbstoff erhöht werden. Während die Synthese von Lissamin-markiertem Gliadinpeptid p31-43 mit Glycin als Spacer (**44**) mit einer Ausbeute von 45% gelang, konnte durch Verwendung von Ahx **52** mit sogar 54% Ausbeute dargestellt werden.

Daher wurden im Folgenden die für die Zellassays benötigten Gliadinpeptide mit Ahx als Spacer synthetisiert.

4.2.6 Synthese von Lissamin-markierten Gliadinpeptiden mit Ahx als Spacer

Mittels linearer SPPS erfolgte die Synthese des Gliadinpeptids p31-43 (**9**) wie bereits in Abschnitt 4.4.2 beschrieben ausgehend von einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz. Die Kupplung des Peptids mit Boc-Ahx **47** erfolgte an der festen Phase mit 4 Äq. HBTU/HOBt und 8 Äq. DIPEA. Nach Abspaltung vom Wang-Harz mit 95% TFA und anschließender Gefriertrocknung wurde das Produkt **53** mit einer Ausbeute von 19% erhalten (Abb. 4.48).

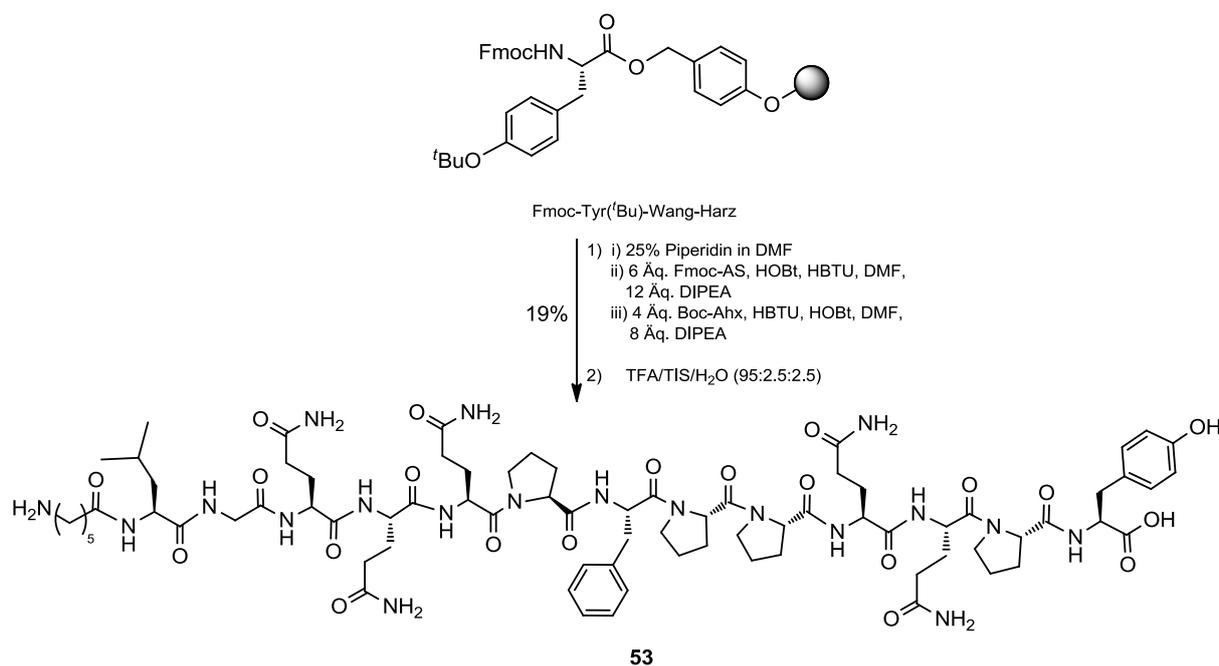


Abb. 4.48: Kupplung des Gliadinpeptids p31-43 mit Boc-Aminohexansäure an der festen Phase.

Anschließend wurde **53** mit 1.5 Äq. des Lissamin-Farbstoffs unter Zugabe von NEt₃ in abs. DMF als Lösungsmittel umgesetzt (Abb. 4.49).

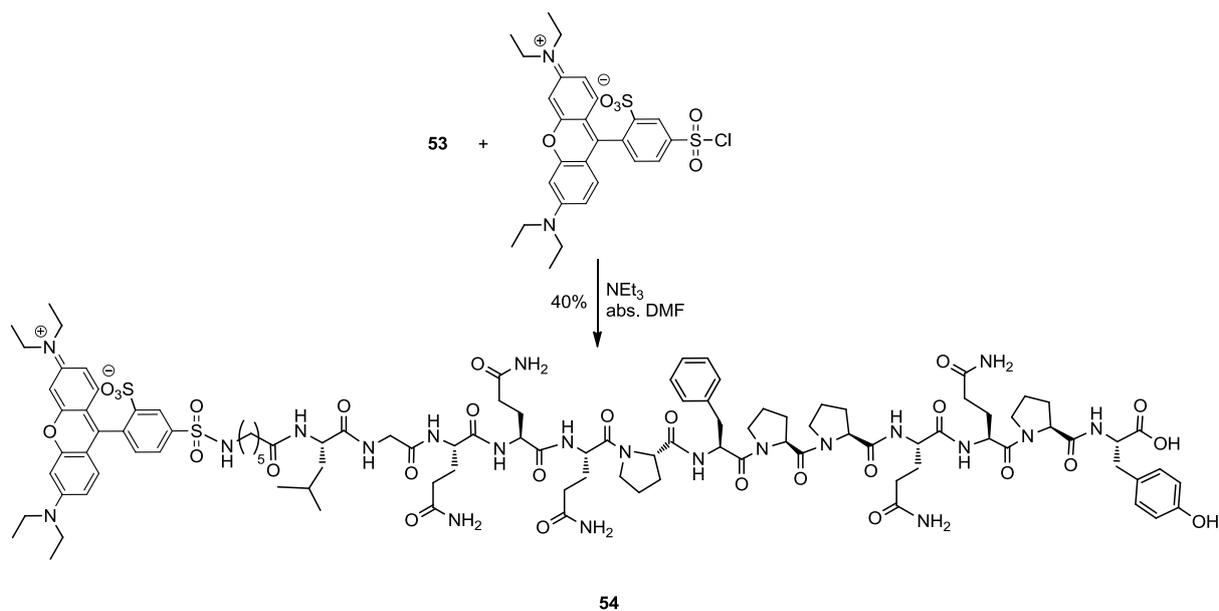


Abb. 4.49: Synthese von Lissamin-markiertem p31-43 mit Ahx als Spacer.

Die chromatographische Reinigung mittels HPLC/RP erwies sich im Vergleich zum Lissamin-markierten p31-43 ohne Ahx als Spacer als unproblematisch, da nur hydrolysiertes Lissamin-Farbstoff und minimale Verunreinigungen vom Produkt zu trennen waren. **54** konnte daher mit einer Ausbeute von 40% erhalten werden.

Die Kupplung von p31-43 deamid **22** mit Boc-Ahx wurde in Lösung durchgeführt. Dafür wurde Boc-Ahx-succinimid **45** mit **22** unter Zugabe von NEt_3 umgesetzt (Abb. 4.50).

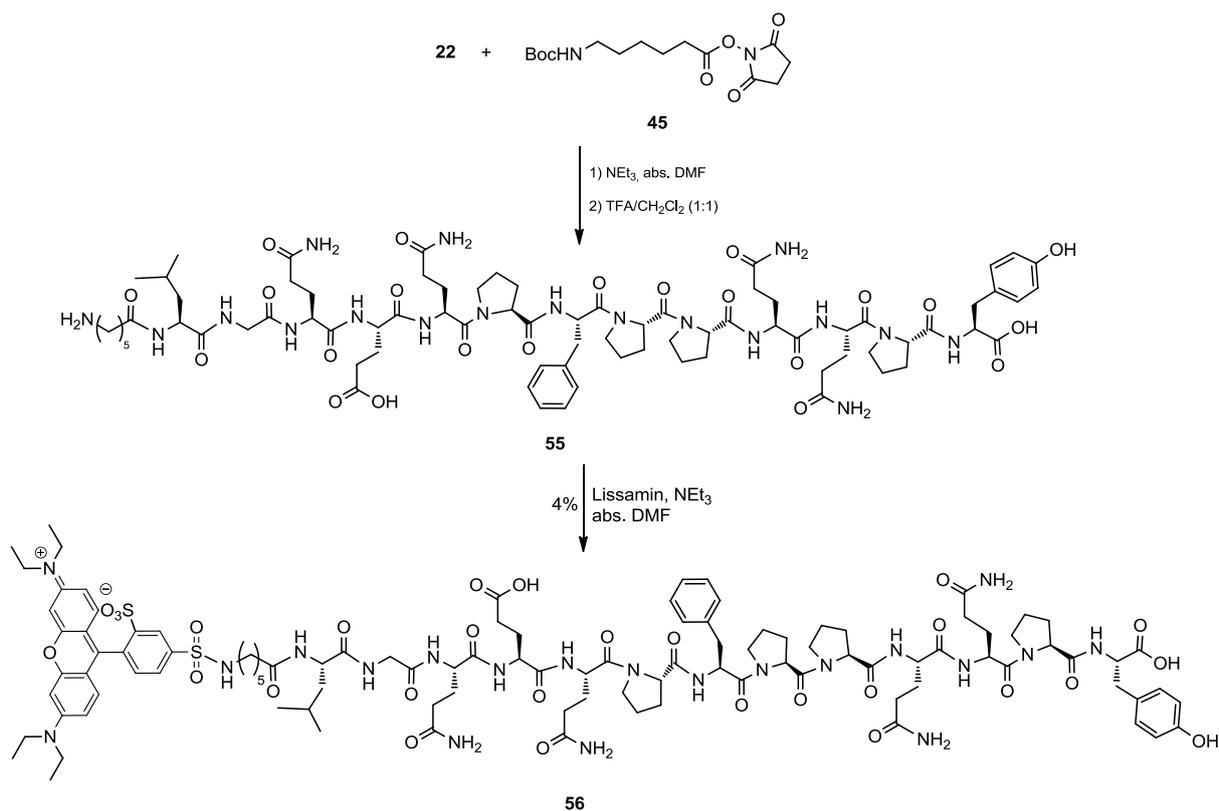


Abb. 4.50: Darstellung von Lissamin-markiertem p31-43deamid mit Ahx als Spacer (**56**).

Die Analyse mittels LCMS ergab, dass neben der gewünschten Verbindung, das Produkt mit vorzeitig abgespaltener Boc-Schutzgruppe vorlag, sowie nicht gekoppeltes Edukt **22**.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe im nächsten Schritt mit TFA/CH₂Cl₂ im Verhältnis 1:1 verlief quantitativ. Die Markierung von Ahx-p31-43 mit dem Lissamin-Fluorophor lieferte das Produkt **56** (Abb. 4.50) neben ungekoppeltem Lissamin-Farbstoff, sowie nicht identifizierbaren Nebenprodukten. Daher erwies sich die Reinigung mittels HPLC/RP als schwierig, weswegen das gewünschte Produkt nur mit einer Ausbeute von 4% rein isoliert werden konnte.

Nach der gleichen Syntheseroute wurden das Lissamin-markierte Ahx-p56-68 (**57**) und Ahx-p56-68 (**58**) deamid hergestellt (Abb. 4.51).

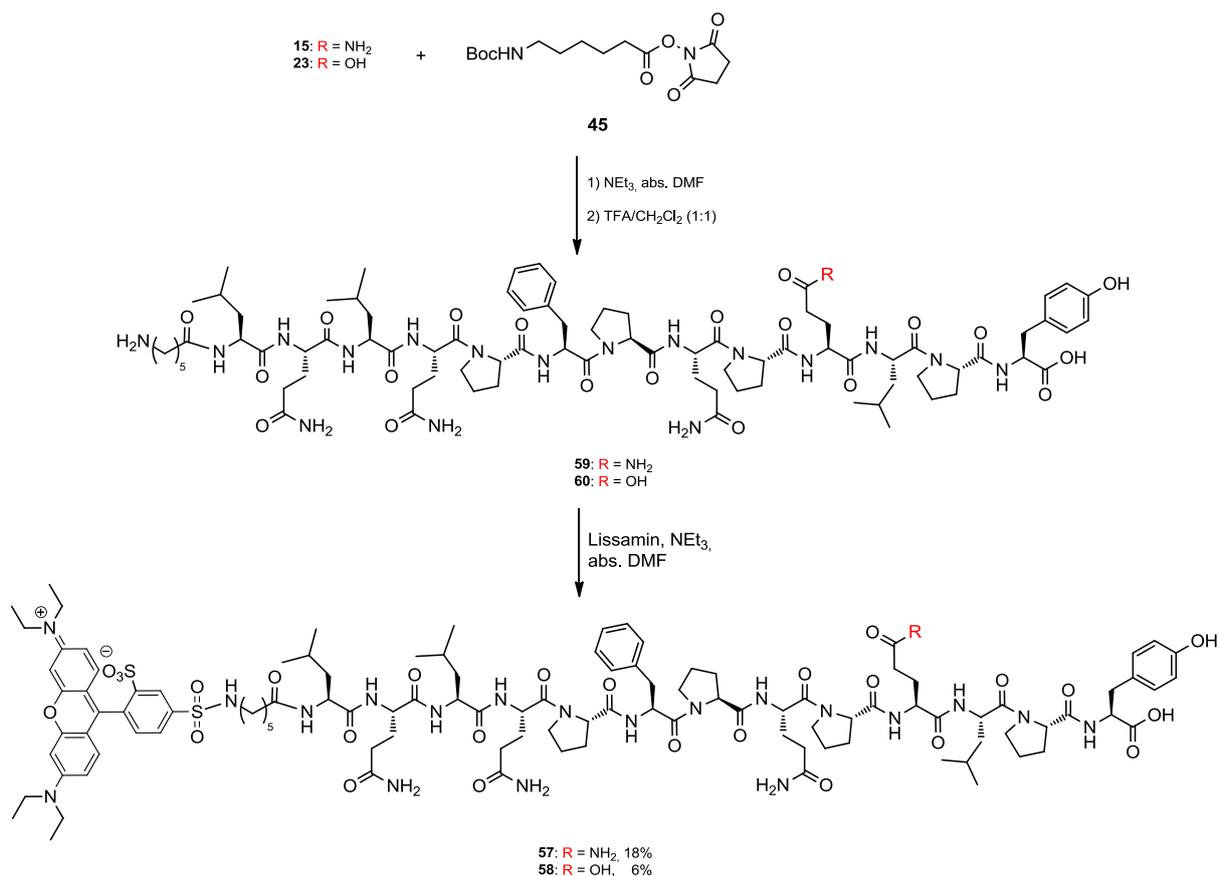


Abb. 4.51: Synthese von Liss-Ahx-p56-68 (**57**) und Liss-Ahx-p56-68 deamid (**58**).

Die Rohprodukte der Kupplung von **15** bzw. **23** mit Boc-Ahx-succinimid wiesen erneut Produkt mit vorzeitig abgespaltener Boc-Gruppe auf. Die vollständige Entschützung im Anschluss verlief quantitativ. Die Lissamin-markierten Peptide **57** und **58** konnten nach Reinigung immerhin mit einer Ausbeute von 15% und 6% erhalten werden. Die geringen Ausbeuten liegen darin begründet, dass die Reinigung aufgrund von vorliegenden Nebenprodukten schwierig ist.

Abbildung 4.52 zeigt den Syntheseweg zur Darstellung von Liss-Ahx-p31-49 (**61**). Letzteres konnte nach Reinigung mittels HPLC/RP mit einer Ausbeute von 13% isoliert werden.

Die Synthese von Lissamin-markiertem p56-88 Peptid (**62**) ist in Abbildung 4.53 dargestellt. Dieses wurde mit 18% Ausbeute erhalten.

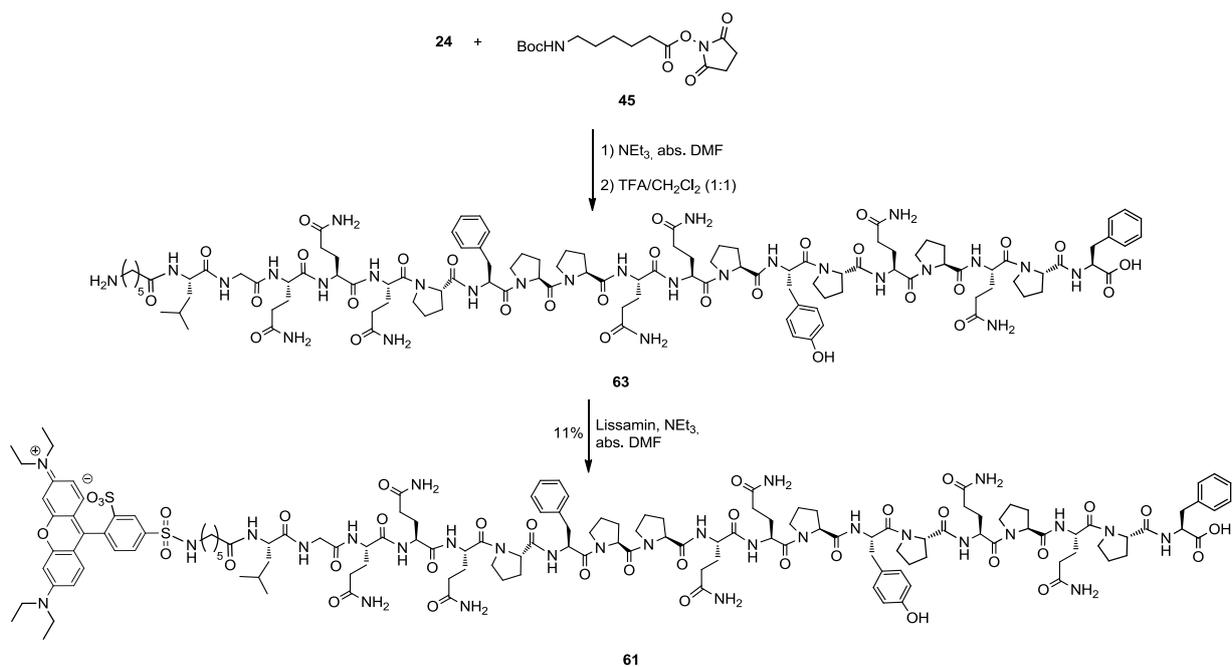


Abb. 4.52: Syntheseweg zur Darstellung von Liss-Ahx-p31-49 (**61**).

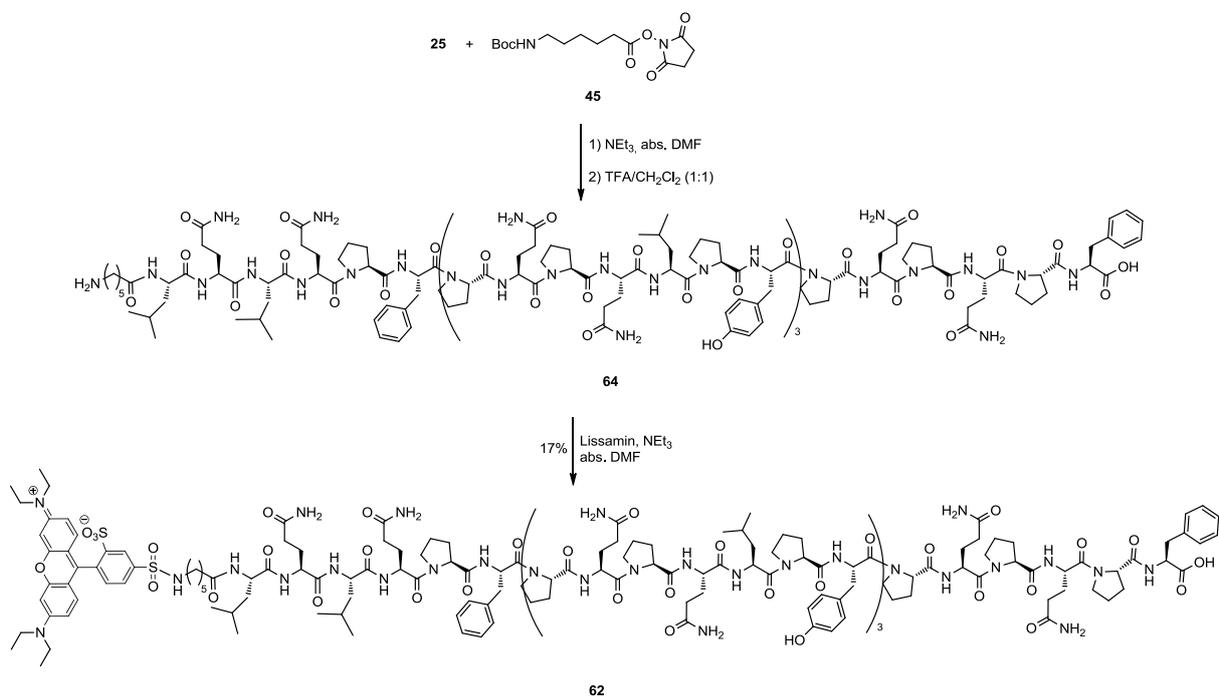


Abb. 4.53: Synthese von Liss-Ahx-p56-88 (**62**) durch Kupplung von Boc-Ahx-succinimid **45** an das Peptid p56-88 (**25**) und anschließender Reaktion mit Lissamin-Rhodamin B-Farbstoff.

Durch die Verwendung von Ahx als Spacer konnten die Ausbeuten zur Darstellung von Lissamin-markierten Gliadinpeptiden erhöht werden.

Zusammenfassend konnte Liss-Ahx-p31-43 (**54**) in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 8% dargestellt werden, während das Liss-Ahx-p31-43 deamid (**56**) mit 4% synthetisiert wurde. Liss-Ahx-p56-68 (**57**) sowie Liss-Ahx-p56-68 deamid (**58**) konnten in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 18% bzw. 6% gewonnen werden. Das Liss-Ahx-p31-49 (**61**) und Liss-Ahx-p56-88 (**62**) hingegen wurden mit 13% bzw. 18% Ausbeute erhalten.

Die Kupplung von Boc-Ahx-succinimid an das entsprechende Peptid ist an der festen Phase während der linearen Synthese des Peptids möglich. Hier erfolgte die Abspaltung des Peptids sowie der Boc-Schutzgruppe simultan während der Abspaltung vom Harz mit TFA. Eine Reinigung des abgespaltenen Kupplungsproduktes jedoch ist häufig unumgänglich. Liegt das Peptid allerdings schon in isolierter Form vor, so kann die Kupplung auch in Lösung mit guter Ausbeute durchgeführt werden. Eine Reinigung ist nur im letzten Schritt zur Isolierung des Lissamin-markierten Peptids erforderlich.

Durch den Einsatz von Ahx als Spacer konnte die sterische Hinderung bei der Kupplungsreaktion der Peptide mit dem Fluorophor minimiert werden. Das Vorhandensein von Nebenprodukten gestaltete die chromatographische Reinigung als schwierig, wodurch sich die immer noch nicht guten Ausbeuten erklären lassen.

4.2.7 Synthese von durch CatD selektiv spaltbaren, peptidischen Linkern

Bei der Entwicklung eines Therapieansatzes zur Behandlung der Autoimmunerkrankung Zöliakie, ist der gezielte Transport von toxischen Gliadinpeptiden, wie dem p31-43, in die HLA-DR-positiven LE interessant. Es wird vermutet, dass toxische Gliadinpeptide während ihres intrazellulären Transportweges in den HLA-DR-negativen EE verbleiben und daher keine orale Toleranz induzieren können. In ersten Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Konjugation des toxischen Gliadinpeptids p31-49 mit CTB den Transport des Peptids in die LE zur Folge hat. Nachdem CTB als Adjuvans seine Funktion erfüllt hat, muss dieses abgespalten werden, um das native Gliadinpeptid wieder freizusetzen, so dass letzteres regulatorischen T-Lymphocyten des Immunsystems präsentiert werden kann.

Hierfür ist es notwendig, einen sog. „Linker“ zwischen dem Peptid und CTB einzubauen, welcher selektiv in den späten Endosomen gespalten wird. Für das Design eines Linkers kann von der Tatsache Gebrauch gemacht werden, dass die Aspart-Protease CatD in höherer

Konzentration in den LE, sowie Lysosomen vorliegt. Die Substratspezifität des Enzyms ist Literatur bekannt.²²⁷⁻²²⁹ So spaltet es bevorzugt die Peptidbindung zwischen zwei hydrophoben Aminosäuren, v.a. aber zwischen zwei aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tyrosin.

Gemäß der Substratspezifität wurden daher peptidische Linker für die selektive Spaltung durch CatD dargestellt.

Der erste peptidische Linker Ac-AAALAK **65** wurde in Anlehnung an die von Czerwinski *et al.* veröffentlichte Arbeit²³⁷ mittels linearer SPPS gemäß der Fmoc/^tBu-Strategie ausgehend von einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz synthetisiert. Die Kupplungsschritte wurden mit jeweils 6 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Ala, Ac-(L)-Ala und 6 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 12 Äq. der Base DIPEA durchgeführt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) und lieferte das gewünschte Produkt **65** in ausreichender Reinheit mit einer Ausbeute von 46% (Abb. 4.54).

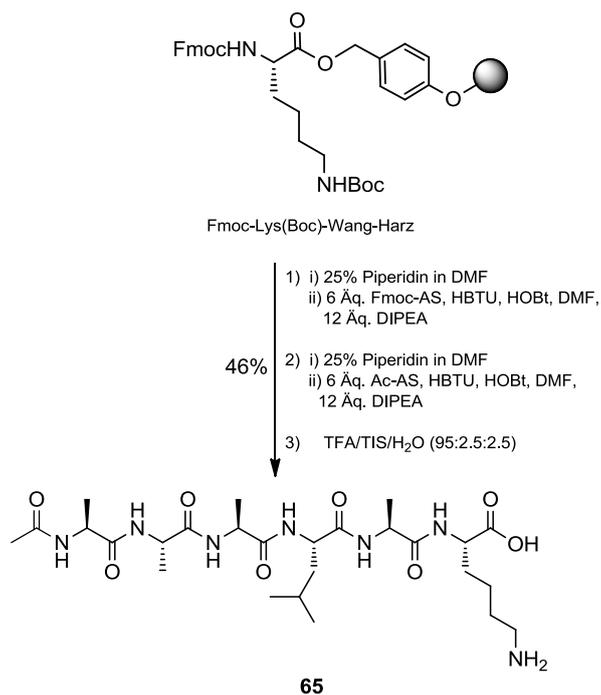


Abb. 4.54: Darstellung von Ac-AAALAK **65** ausgehend von einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz.

Durch den Einbau einer Lysineinheit in die Linkersequenz wurde eine Ankergruppe für die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff geschaffen. Eine Markierung wurde mit 2 Äq. des Lissamin Rhodamin B-Fluorophors unter Zugabe von 4 Äq. NEt₃ in abs. DMSO als Lösungsmittel durchgeführt. Nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP wurde **66** mit 39% Ausbeute erhalten (Abb. 4.55).

Abb. 4.56 zeigt das LCMS-Spektrum des Rohprodukts, Abb. 4.58 hingegen das LCMS-Spektrum des gereinigten Produkts **66**.

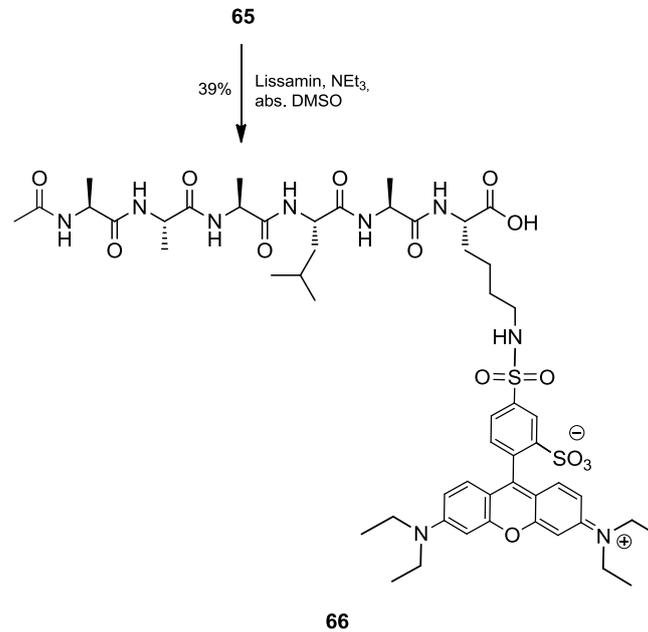


Abb. 4.55: Synthese von Lissamin-markiertem Linker **66**.

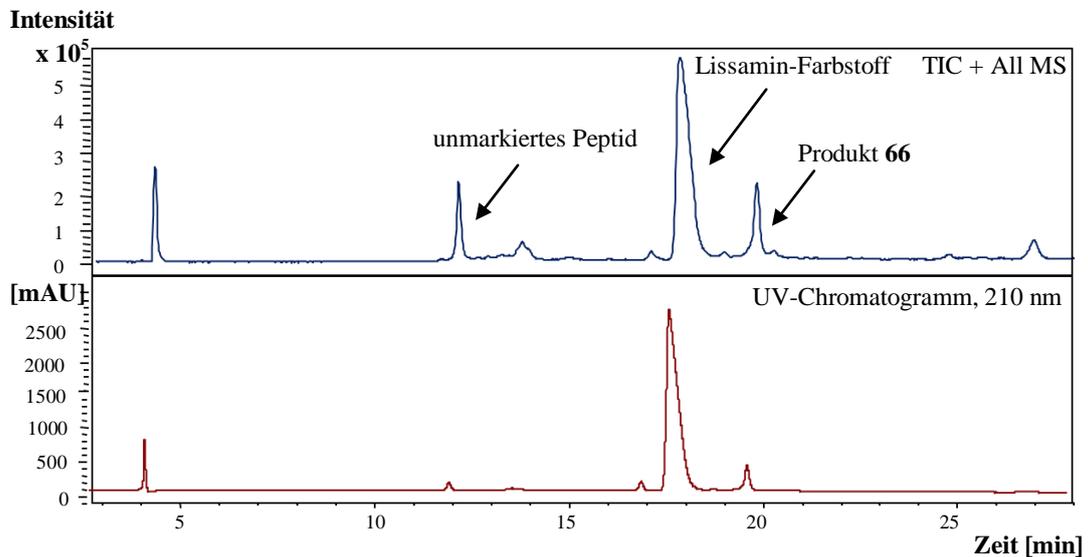


Abb. 4.56: LCMS-Spektrum des Rohprodukts. Das „total ion chromatogram“ (TIC) ist in blau dargestellt und das UV-Chromatogramm bei 210 nm in rot (oben). Die zugehörigen Massenspektren der einzelnen Signale sind in Abb. 4.57 gezeigt.

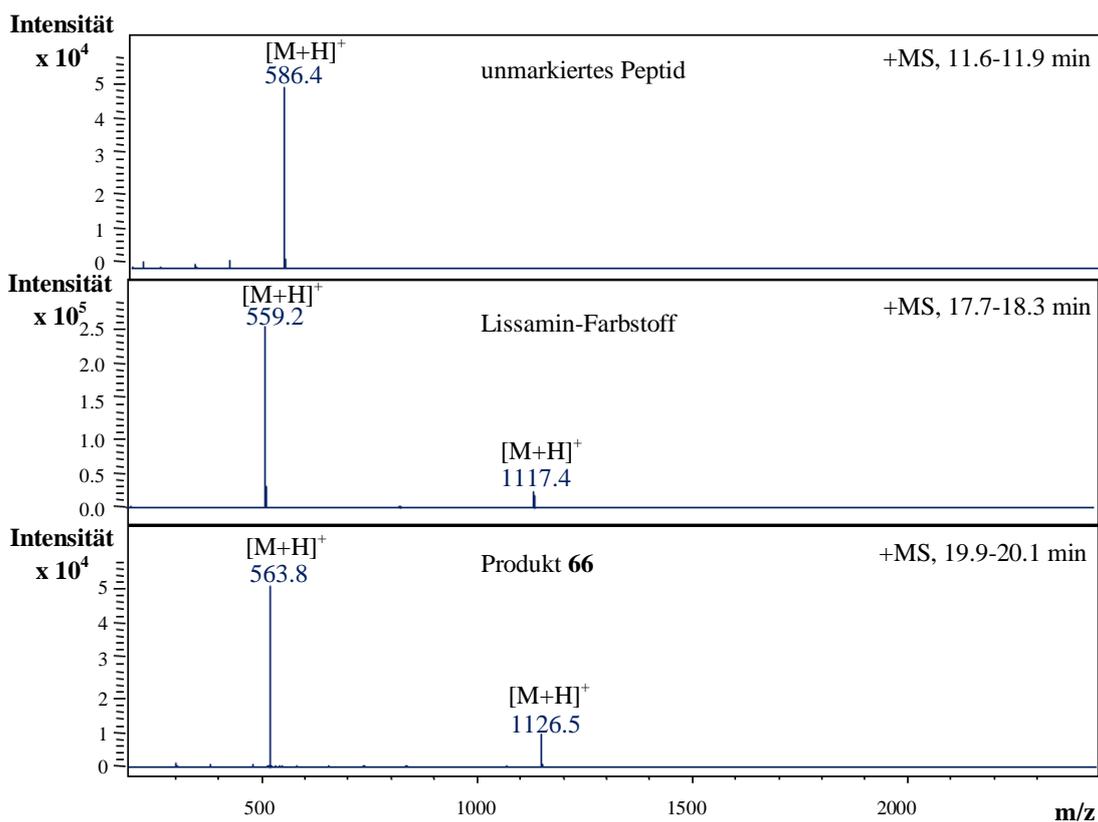


Abb. 4.57: Massenspektren der einzelnen Signale im Rohprodukt des Lissamin-markierten Linkers **66**.

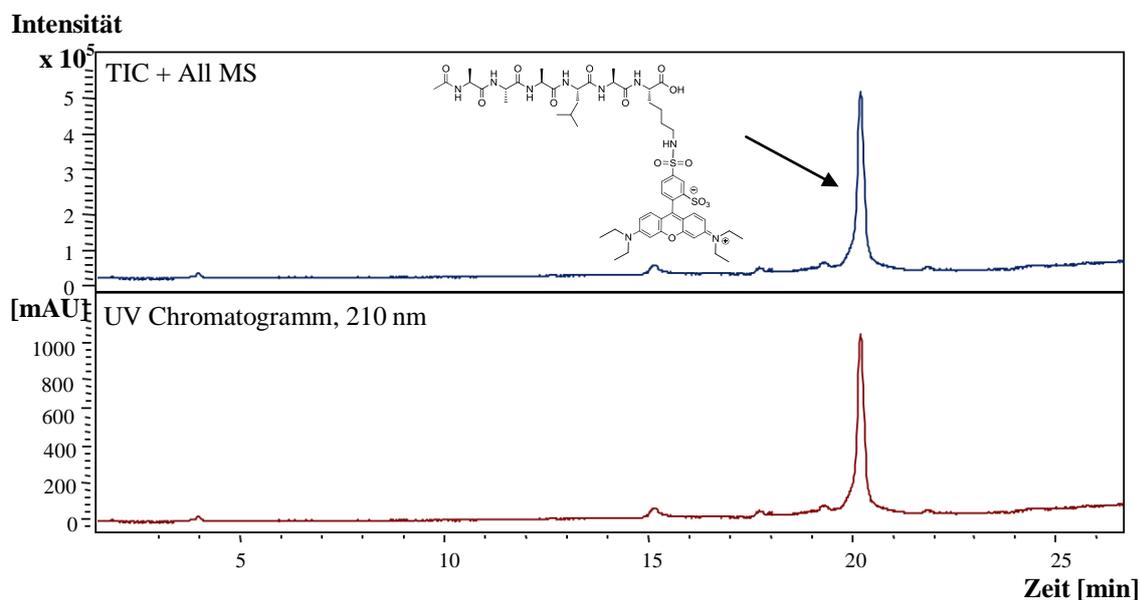


Abb. 4.58: LCMS-Spektrum der gereinigten Verbindung **66**. Das „total ion chromatogram“ (TIC) ist in blau dargestellt (oben) und das UV-Chromatogramm bei 210 nm in rot (unten).

Ebenfalls ausgehend von einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz erfolgte die Synthese des GLLFFK-Linkers **67** (Abb. 4.59). Für die Kupplungen wurden jeweils 4 Äq. Fmoc-(L)-Phe,

Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-Gly, 4 Äq. HBTU und HOBt, sowie 8 Äq. DIPEA verwendet. Nach der Abspaltung vom Harz mit 95% TFA und chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP wurden 74% des Linkers **67** erhalten.

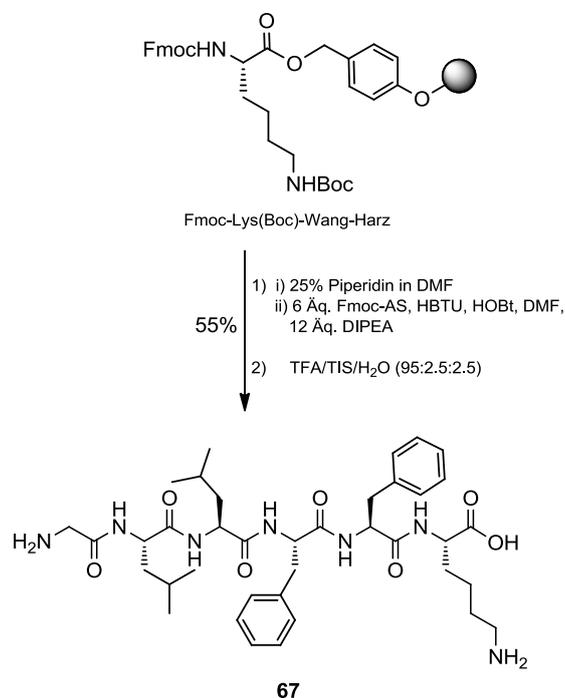


Abb. 4.59: Synthese des peptidischen Linkers GLLFFK **67**.

Die Darstellung von RGFFK **68** erfolgte an einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz durch Kupplung mit jeweils 2 Äq. Fmoc-(L)-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-(L)-Arg(Mtr), 2 Äq. HBTU/HOBt und 4 Äq. Base (Abb. 4.60).

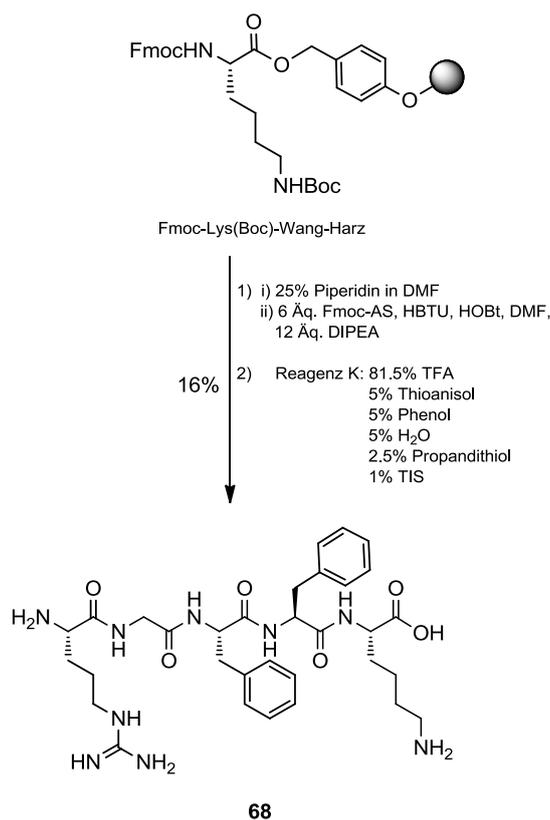


Abb. 4.60: Darstellung von RGFFK **68**.

Die Mtr-Schutzgruppe ist weniger säurelabil als Boc- oder ^tBu-Schutzgruppen. Daher kann die Abspaltung dieser Schutzgruppe je nachdem, wie häufig es in der Peptidsequenz vorhanden ist und welche Scavenger verwendet werden, bis zu 24 h benötigen. Eine spezielle Abspalllösung („Reagenz K“)¹⁸⁰ wird für die Abspaltung von der festen Phase benötigt, wie in Abb. 4.60 gezeigt ist.

Die erste Abspaltung des Linkers von dem Harz lieferte zwar das gewünschte Produkt **68**, jedoch konnte noch Mtr-geschütztes Peptid massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde das Rohprodukt erneut mit 1 mL der Abspalllösung versetzt und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde **68** aus kaltem Diethylether gefällt, gefriergetrocknet und chromatographisch gereinigt. RGFFK **68** wurde somit mit einer Ausbeute von 16% erhalten.

Analog zu RGFFK **68** wurde der Linker Ac-RGFFK **69** mit acetyliertem *N*-Terminus synthetisiert. Hierfür wurde nach der letzten Fmoc-Abspaltung an der festen Phase ein sog. „Capping“ mit 10% Pyridin und 10% Ac₂O durchgeführt.²³² Aufgrund der Problematik bei der Entfernung der Mtr-Schutzgruppe, erfolgte die Abspaltung vom Harz über 48 h, lieferte

dann aber nach Reinigung an der HPLC/RP das gewünschte Produkt **69** mit 41% Ausbeute (Abb. 4.61).

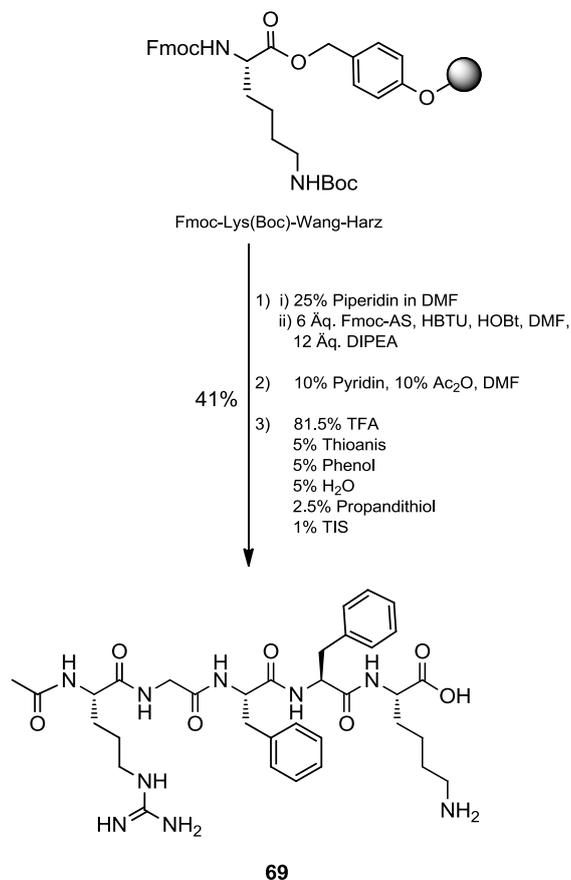


Abb. 4.61: Synthese von **69** einschließlich Capping zum acetylierten Produkt.

Die Darstellung des nächsten Linkers Ac-RGFFP **70** erfolgte mit jeweils 4 Äq. der benötigten Aminosäuren und Kupplungsreagenzien, sowie 8 Äq. der Base DIPEA. Die Acetylierung wurde mit 10% Pyridin und 10% Ac₂O durchgeführt. Nach Abspaltung vom Harz über 4 h, wies die massenspektrometrische Analyse das gewünschte Produkt neben nicht identifizierbaren Nebenprodukten auf. Daher konnte nach Reinigung mittels HPLC/RP **70** nur mit einer Ausbeute von 8% erhalten werden (Abb. 4.62).

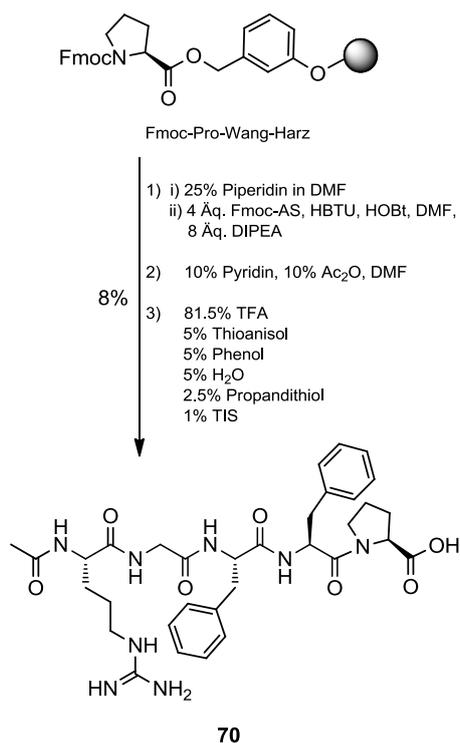


Abb. 4.62: Darstellung des Linkers Ac-RGFFP **70** an einem Fmoc-Pro-Wang-Harz.

Auch die Synthese mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers lieferte **70** nur in Spuren zusammen mit den gleichen nicht identifizierbaren Nebenprodukten, die auch bei manueller Synthese vorlagen.

Da sich die Synthese von Ac-RGFFP **70** ausgehend von einem Fmoc-Pro-Wang-Harz als schwierig erwies, wurde die Sequenz ausgehend von einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz dargestellt. Der Einbau von Lysin hat zudem den Vorteil, dass die Löslichkeit des Linkers verbessert und eine Ankergruppe für die Konjugation mit einem Fluoreszenzfarbstoff geschaffen wird. Eine zusätzliche Modifikation wurde durch die Einführung eines Glycins als Spacer vorgenommen.

Abb. 4.63 zeigt die Darstellung von Ac-RGFFPK **71** und Ac-RGFFPGK **72** an einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz. **71** wurde mit einer Ausbeute von 36% und **72** mit einer Ausbeute von 37% erhalten.

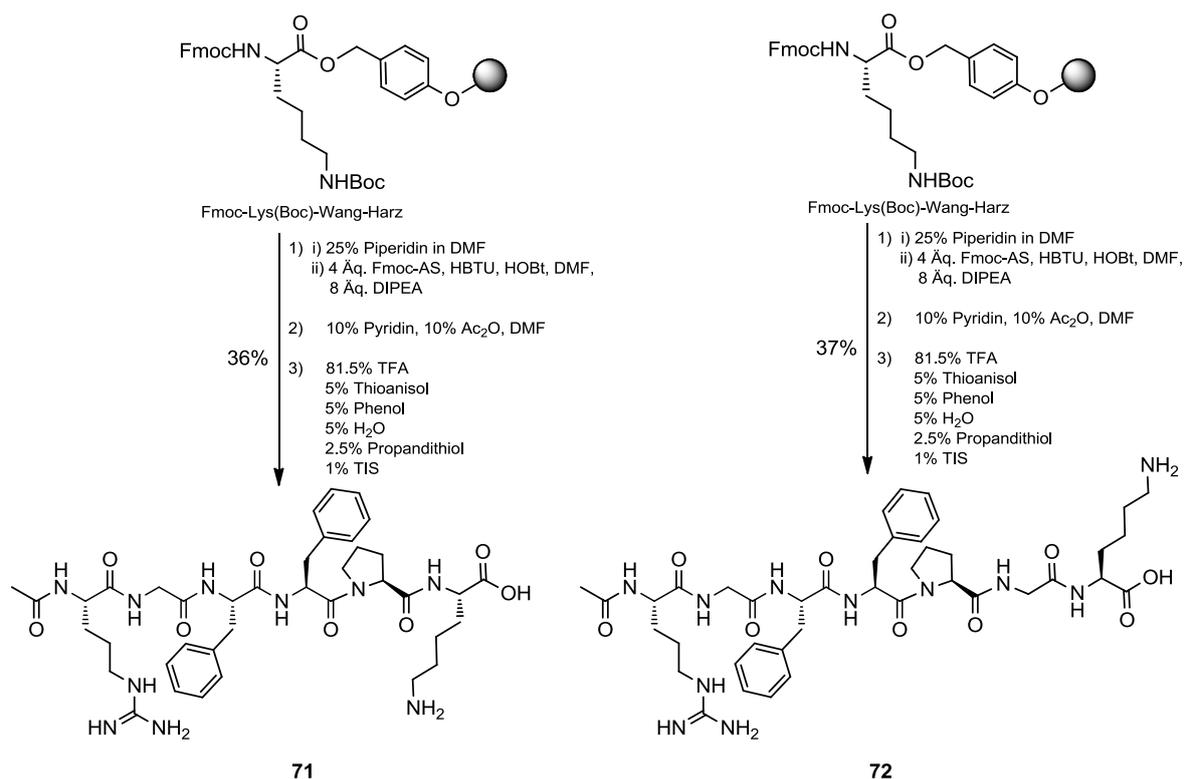


Abb. 4.63: Synthese der Linker Ac-RGFFPK **71** und Ac-RGFFPGK **72**.

Der letzte CatD-labile Linker wurde in Anlehnung an die von Scarborough *et al.* veröffentlichten Arbeiten dargestellt.

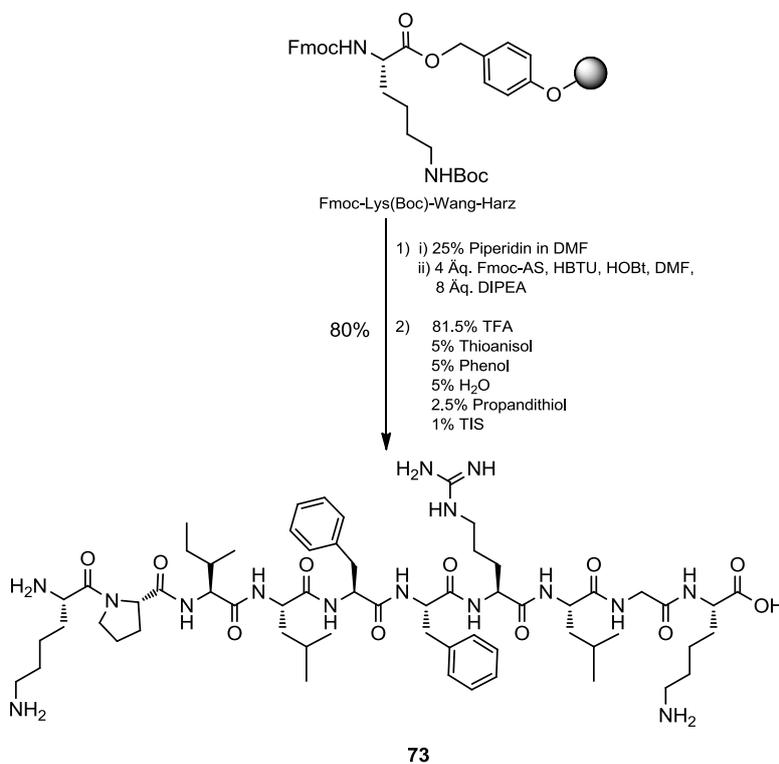


Abb. 4.64: Synthese des Linkers KPILFFRLGK **73** ausgehend von einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz.

Hierbei wird eine Spaltung der Phe-Phe-Bindung innerhalb des Substrats KPILFFRL beschrieben (Abb. 4.64). Dieses Substrat wurde C-terminal durch den Einbau eines Glycins als Spacer sowie eines Lysins modifiziert, analog den Arbeiten von Baechle *et al.*²³⁸ Der Linker KPILFFRLGK **73** wurde somit nach Abspaltung vom Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz über 48 h mit einer Ausbeute von 80% erfolgreich synthetisiert.

Zusammenfassend wurden acht verschiedene Linkermoleküle mit guten Ausbeuten synthetisiert. Einzig die Darstellung von Ac-RGFFP **70** war problematisch, da hier die Kupplung der ersten Aminosäure an das unreaktivere Prolin erfolgen musste. Zahlreiche Nebenprodukte gestalteten die Reinigung schwierig, wodurch nur 8% des Produktes erhalten werden konnte. Andere Linker, so wie Ac-AAALAK **65** und KPILFFRLGK **73**, erforderten hingegen keine Reinigung, sondern wurden nach Abspaltung vom Harz und Ausfällen aus eiskaltem Diethylether direkt mit hoher Reinheit und Ausbeuten von 46% bzw. 80% erhalten. Durch den Einbau eines Lysins in die Linkersequenz können über die freie NH₂-Gruppe in der Seitenkette stabile, fluoreszenzmarkierte Konjugate dargestellt werden. Dies wurde am Beispiel der Synthese von Ac-AAALAK(Liss) **66** mit einer moderaten Ausbeute von 39% gezeigt.

Im nächsten Schritt gilt es die selektive Spaltbarkeit der dargestellten Substrate **65** bis **73** durch CatD zu untersuchen. Dies wird in Abschnitt 4.5 beschrieben.

4.2.8 Synthese von Gliadinpeptiden mit CatD-lablen Linkern

Für die Synthese von CTB-Gliadinpeptid-Konjugaten wurde zunächst das toxische Peptid p31-43 mit jeweils zwei durch CatD spaltbaren Linkern synthetisiert (**74**, **76**). Diese sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Gliadinpeptide mit CatD-labilem Linker. * Nach chromatographischer Reinigung.

Länge	Gliadinpeptid		Ausbeute
18-mer	Ac-AAALALGQQQPFPPQQPY	74	41*
19-mer	Ac-AAALAKLGQQQPFPPQQPY	75	39*
18-mer	Ac-RGFFPLGQQQPFPPQQPY	76	49*
19-mer	Ac-RGFFPKLGQQQPFPPQQPY	77	61

Die Erweiterung der Linker Ac-AAALA und Ac-RGFFP mit einer zusätzlichen Lysinereinheit ermöglicht die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff über die freie NH₂-Gruppe in der Lysin-Seitenkette (**75**, **77**).

Die Synthese der Verbindungen **74** und **75** erfolgte wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben ausgehend von einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang Harz mittels linearer SPPS. Die Kupplungsschritte wurden mit jeweils 6 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Ala, Ac-(L)-Ala (und Fmoc-(L)-Lys(Boc) für **75**) und 6 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 12 Äq. der Base DIPEA durchgeführt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Die chromatographische Reinigung mittels HPLC/RP lieferte das gewünschte Produkt **74** mit einer Ausbeute von 41% und **75** mit einer Ausbeute von 39% (Abb. 4.65 und Abb. 4.66).

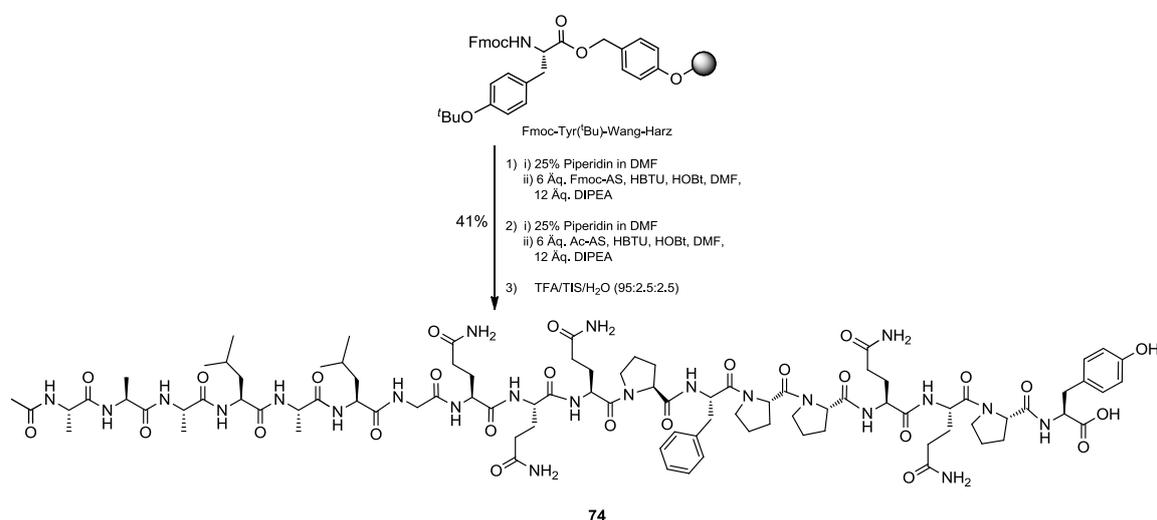


Abb. 4.65: Darstellung des Gliadinpeptids p31-43 mit CatD-labilem Linker Ac-AAALA.

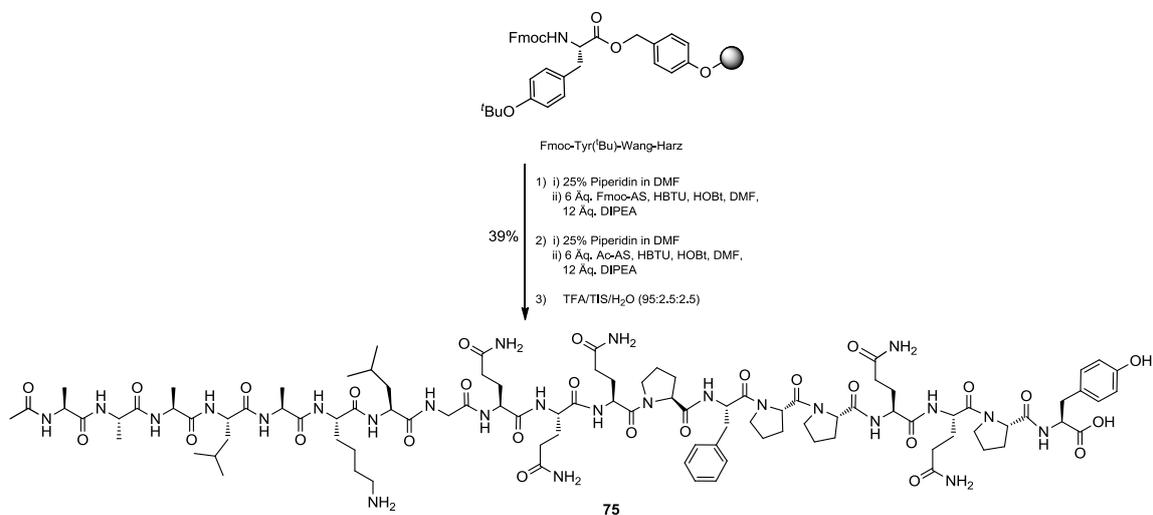


Abb. 4.66: Darstellung des Gliadinpeptids p31-43 mit CatD-labilem Linker und zusätzlicher Lysinereinheit.

Am Beispiel von Ac-AAALAKLGQQPFPPQQPY **75** wurde die Markierung mit dem Fluorophor Lissamin Rhodamin B durchgeführt (Abb. 4.67). Dazu wurde **75** mit 1.5 Äq. des Farbstoffs unter Zugabe von NEt_3 als Base und DMSO als Lösungsmittel umgesetzt. Das gewünschte Produkt **78** wurde mittels LCMS nachgewiesen (Abb. 4.68 und Abb. 4.69). Auf eine Reinigung wurde verzichtet.

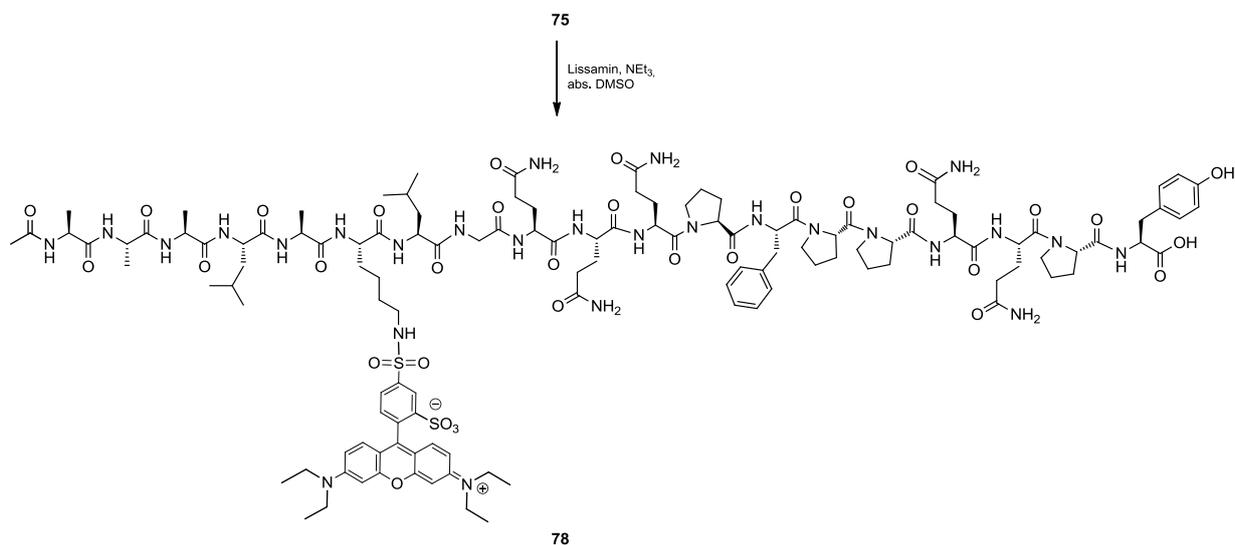


Abb. 4.67: Markierung von **75** mit dem Lissamin Rhodamin B-Farbstoff.

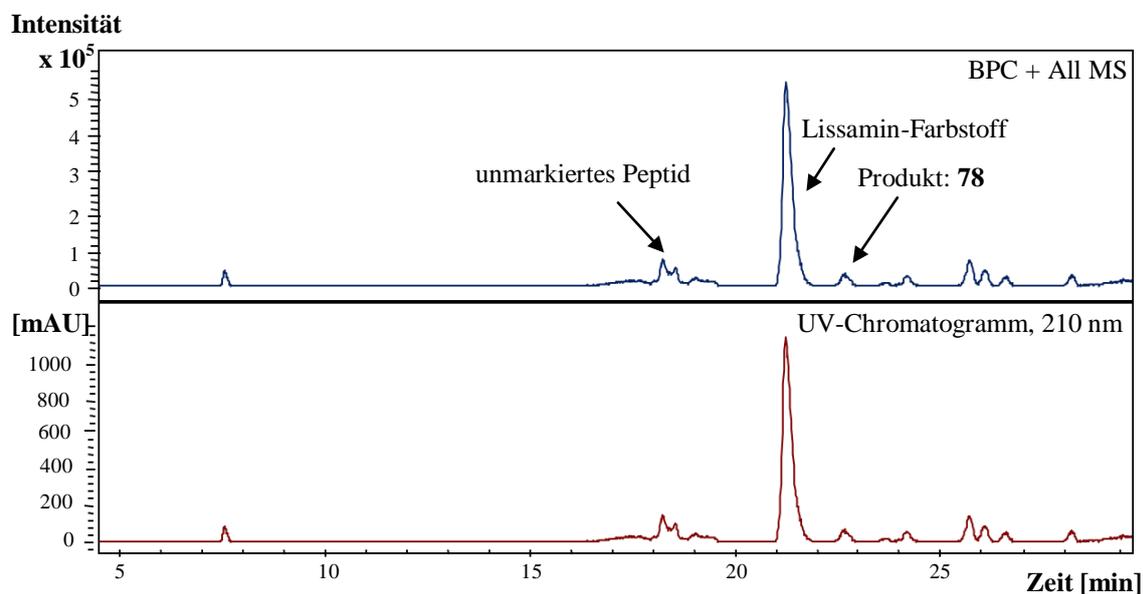


Abb. 4.68: LCMS-Spektrum des Rohproduktes von **78**. Das „base peak chromatogram“ (BPC) ist in blau zu sehen und das UV-Chromatogramm bei 210 nm in rot (oben). Die Massenspektren der relevanten Signale sind in Abb. 4.69 dargestellt.

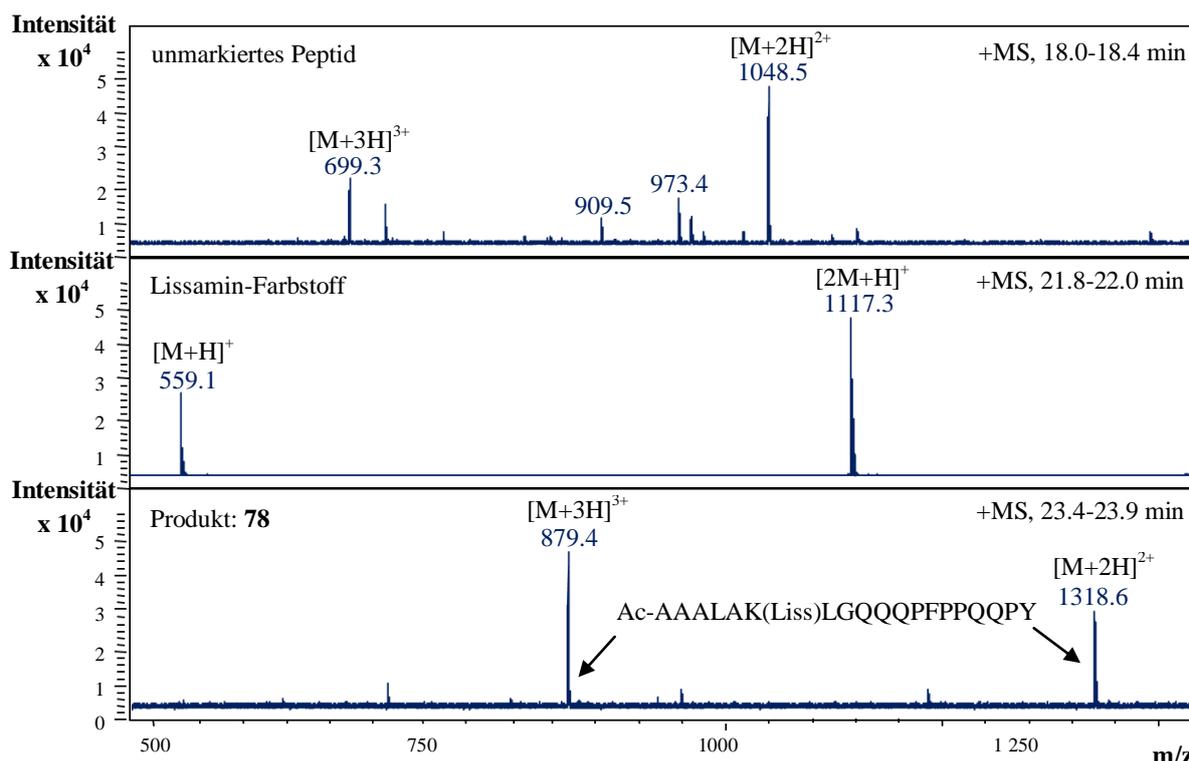


Abb. 4.69: Massenspektren des Rohproduktes des Lissamin-markierten Peptids **78**.

Die Darstellung von Ac-RGFFPLGQQQPFPPQQPY **76** sowie Ac-RGFFPKLGQQQPFPPQQPY **77** erfolgte an einem automatisierten Peptidsynthesizer mit jeweils 5.2 Äq. der entsprechenden Aminosäuren Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Arg(Mtr) (und Fmoc-(L)-Lys(Boc) für xx) und 5 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt unter Zugabe von 10 Äq. der Base DIPEA. Die Acetylierung wurde nach der letzten Fmoc-Abspaltung mit 10% Pyridin, 10% Ac₂O und HOBt in DMF als Lösungsmittel durchgeführt.

Die Abspaltung des Gliadinpeptids **76** vom Harz lieferte das gewünschte Produkt, jedoch konnte noch Mtr-geschütztes Peptid massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Nach chromatographischer Reinigung konnte aber reines **76** mit einer Ausbeute von 49% isoliert werden (Abb. 4.70).

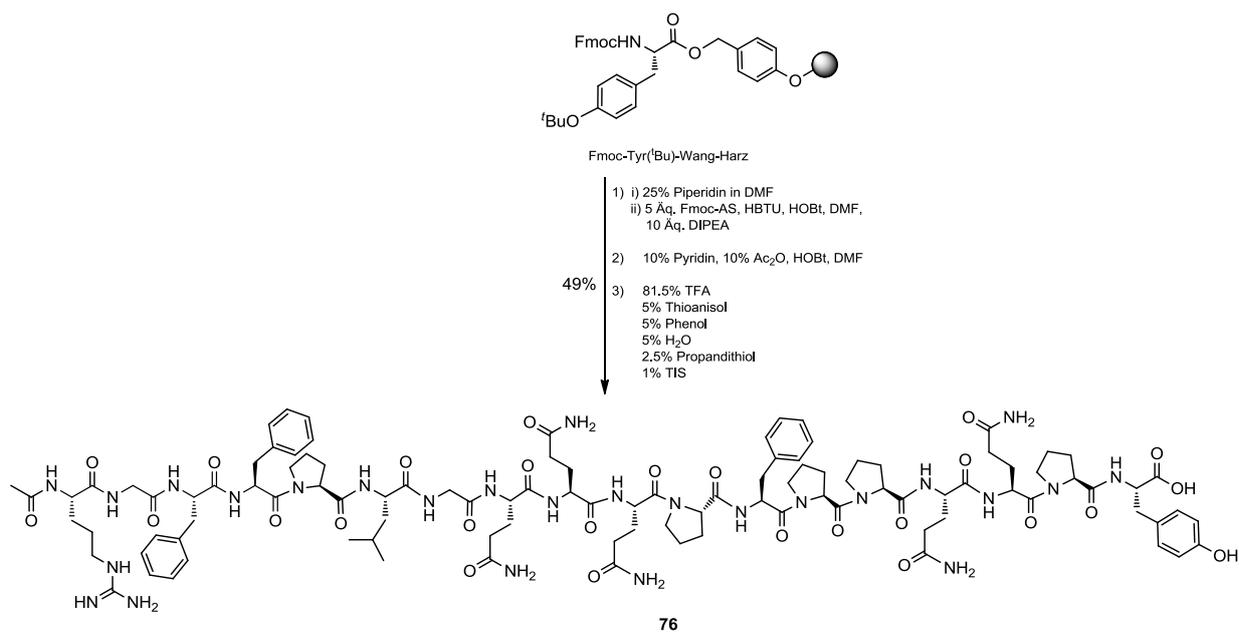


Abb. 4.70: Synthese von Ac-RGFFPLGQQQPFPPQPY **76**.

Im Gegensatz dazu wurde nach 48-stündiger Abspaltung vom Tyr(^tBu)-Wang-Harz das Produkt **77** mit einer Ausbeute von 61% in ausreichender Reinheit erhalten und wies kein Mtr-geschütztes Edukt mehr auf, so dass auf eine Reinigung verzichtet werden konnte (Abb. 4.71).

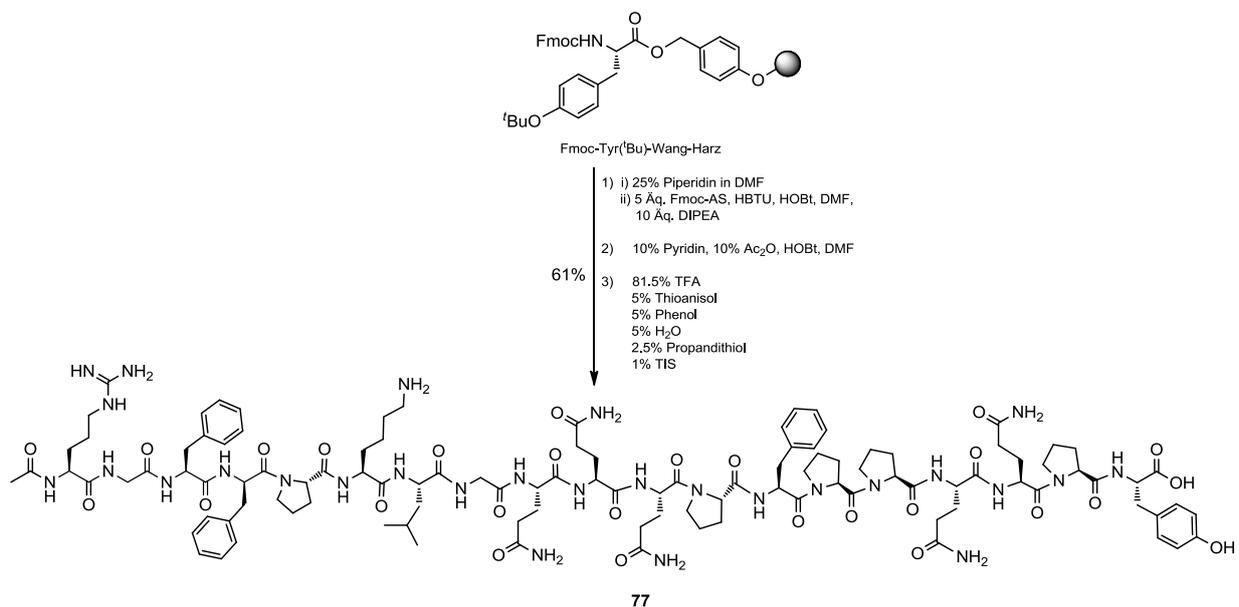


Abb. 4.71: Darstellung von **77**.

Somit konnten die in Tabelle 4.4 dargestellten Gliadinpeptide **74** bis **77** einschließlich CatD-labiler Linkereinheit in guten Ausbeuten erhalten werden.

Während die mittels linearer SPPS manuell hergestellten Verbindungen **74** und **75** Ausbeuten von 41% bzw. 39% lieferten, konnten **76** und **77** mit Hilfe eines Peptidsynthesizers mit Ausbeuten von 49% bzw. 61% erhalten werden. Durch die Synthese von Lissamin-markiertem Ac-AAALAK(Liss)LGQQQPFPQPYPY **78** konnte gezeigt werden, dass über die freie NH₂-Gruppe der Lysin-Seitenkette die Verknüpfung mit einem Fluoreszenzfarbstoff möglich ist. Solche fluoreszenzmarkierten Konjugate können zur Untersuchung durch konfokale Fluoreszenzlasermikroskopie mit Hilfe von Echtzeitaufnahmen herangezogen werden. Dadurch können Aussagen darüber gemacht werden, ob bei den CTB-Gliadinpeptid-Konjugaten ein veränderter Prozessierungsweg vorliegt.

4.2.9 Versuche zur Darstellung von CTB-Gliadinpeptid-Konjugaten

4.2.9.1 SPDP als Linker

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird vermutet, dass die Konjugation von CTB an das toxische Gliadinpeptid p31-43 den Transport des Peptids in die LE zur Folge hat und dadurch Einfluss auf die Entwicklung einer Immuntoleranz ausüben kann. Um zu prüfen, ob CTB tatsächlich eine veränderte Prozessierung bewirkt, wurde die Konjugation des Adjuvans an das Peptid zunächst über *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) als Linker durchgeführt. SPDP ist ein bifunktionaler Linker mit einer NHS-Aktivester- und einer Pyridinyldisulfid-Einheit. Ersteres reagiert effizient mit primären Aminen in Peptiden oder Proteinen und letzteres mit Thiolgruppen unter Bildung reversibler Disulfidbrücken (Abb. 4.72).

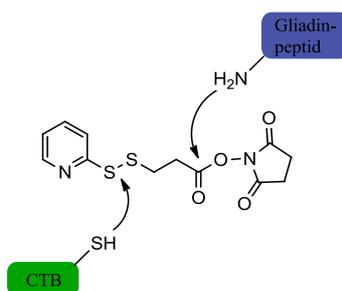


Abb. 4.72: Der für die Konjugation mit CTB verwendete, bifunktionale Linker SPDP.

Da die Prozessierung des CTB-Gliadinpeptid-Konjugats mittels Fluoreszenzmessungen beobachtet werden sollte, wurde das toxische Peptid p31-43 mit einer zusätzlichen Lysin-Einheit verlängert.

Die Darstellung von Lys-p31-43 (**79**) erfolgte mit Hilfe linearer SPPS gemäß der Fmoc/^tBu-Strategie wie bereits beschrieben. Die Kupplungsschritte wurden mit jeweils 6 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Lys(Boc) und 6 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 12 Äq. der Base DIPEA durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Durch Ausfällen aus kaltem Diethylether und anschließender Gefriertrocknung wurde **79** in ausreichender Reinheit mit einer Ausbeute von 58% erhalten (Abb. 4.73).

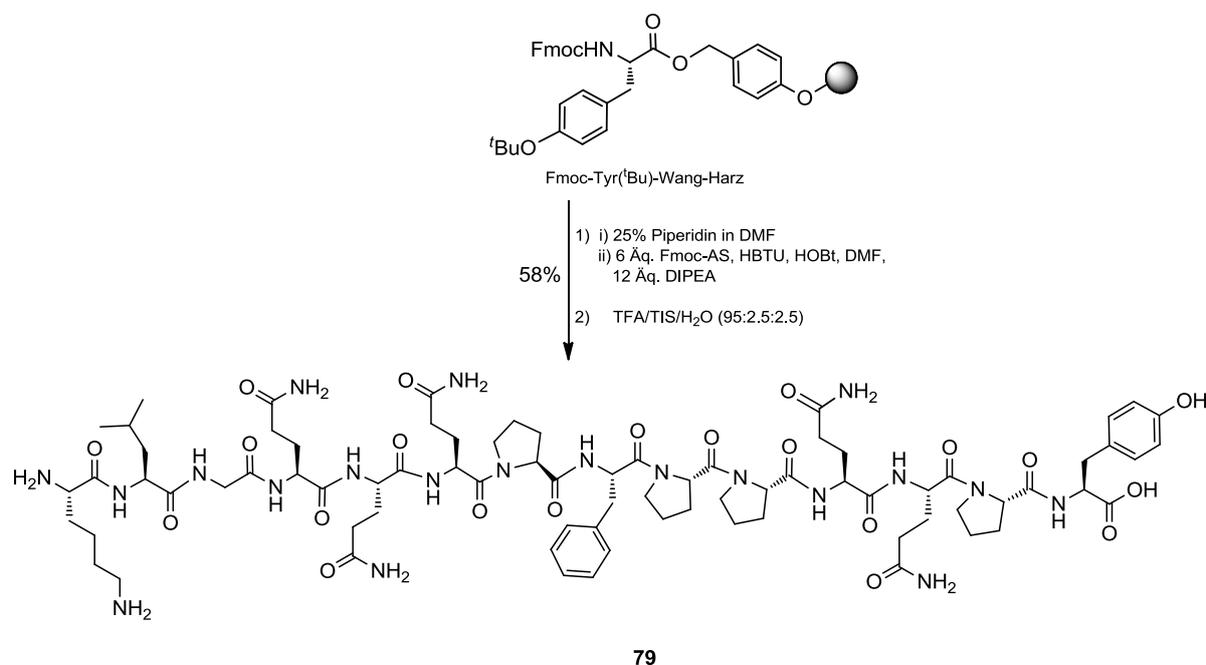


Abb. 4.73: Synthese von Lys-p31-43 (**79**) ausgehend von einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz mittels SPPS.

Die anschließende Kupplung mit dem SPDP-Linker wurde unter Zugabe von NEt₃ in DMF als Lösungsmittel durchgeführt (Abb. 4.74). Da die massenspektrometrische Analyse ergab, dass noch Edukt in Form des ungekuppelten Peptids **79** vorlag, wurde das Rohprodukt erneut mit 1 Äq. SPDP umgesetzt. Jedoch konnte hiernach weder Edukt noch Produkt **80** im Massenspektrum detektiert werden.

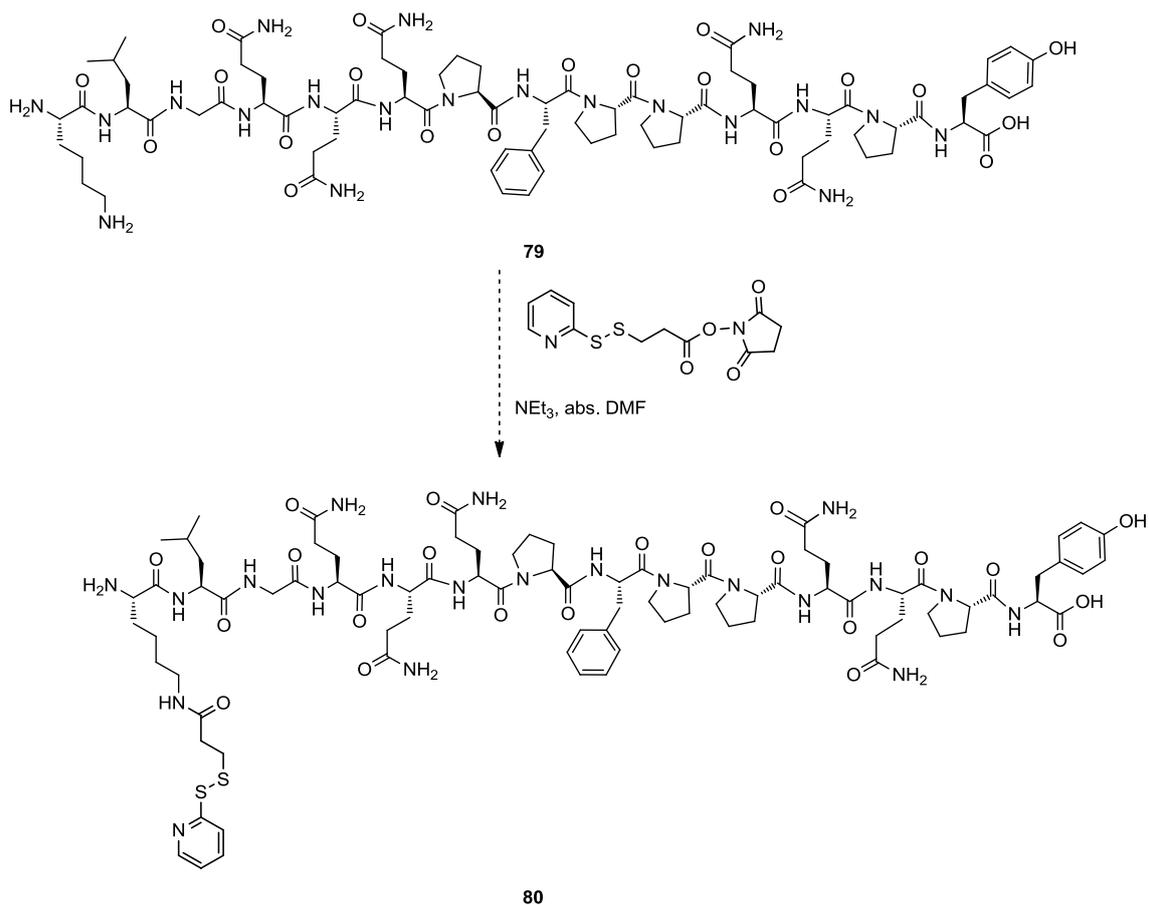


Abb. 4.74: Kupplung des Lys-p31-43 (**79**) mit dem SPDP-Linker in Lösung.

Eine Kupplung des Linkers wurde daher an fester Phase durchgeführt. Hierzu wurde Lys-p31-43 (**79**) wie oben beschrieben synthetisiert (Abb. 4.75).

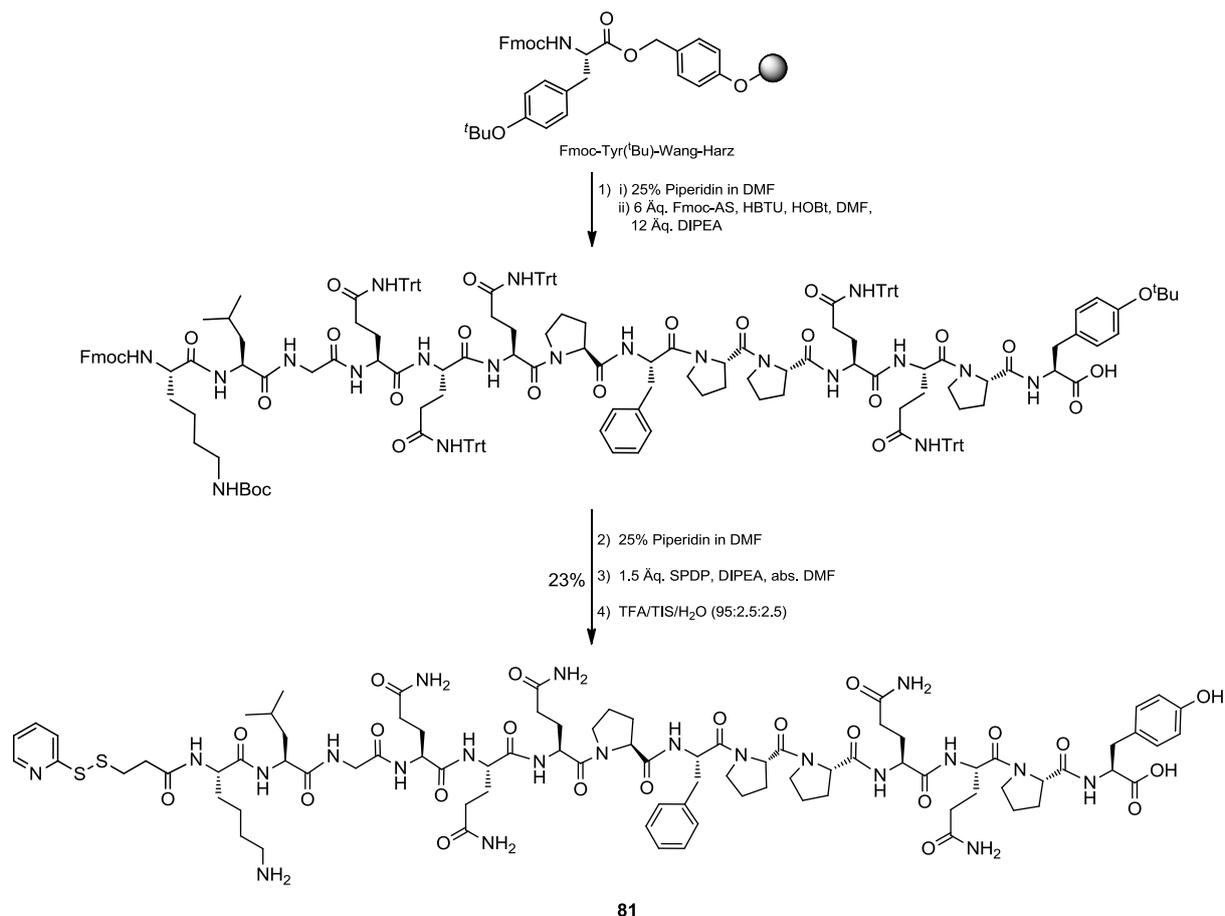


Abb. 4.75: Kupplung des SPDP-Linkers an der festen Phase.

Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurden 1.5 Äq. SPDP und 3 Äq. DIPEA zugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Abspaltung des Kupplungsproduktes vom Harz erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Die Fällung aus kaltem Diethylether und anschließender Gefriertrocknung lieferte das gewünschte Produkt **81** in 23% Ausbeute.

Im nächsten Schritt wurde **81** mit 1.5 Äq. Lissamin Rhodamin B-Farbstoff zur Synthese des fluoreszenzmarkierten Konjugats **82** umgesetzt (Abb. 4.76).

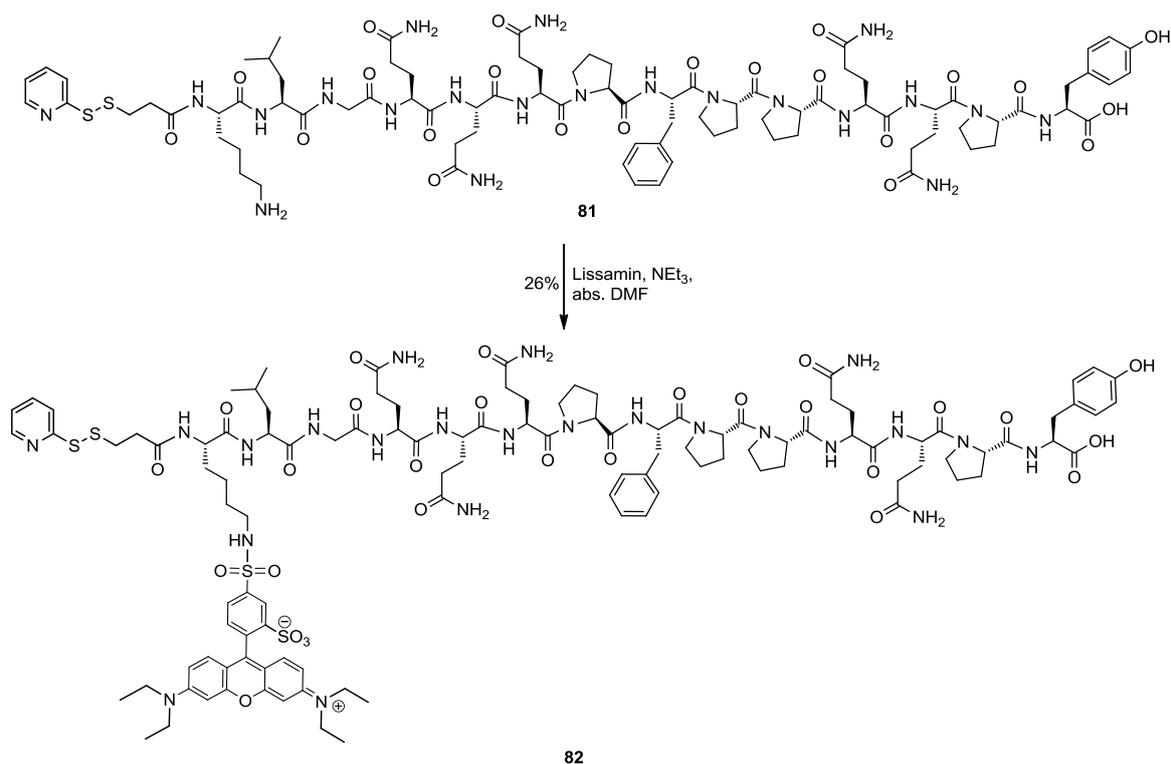


Abb. 4.76: Darstellung des fluoreszenzmarkierten Konjugats **82** durch Kupplung mit dem Lissamin-Farbstoff.

In Abb. 4.77 ist das LCMS-Spektrum des Rohprodukts gezeigt, wohingegen die zugehörigen Massenspektren in Abb. 4.78 dargestellt sind.

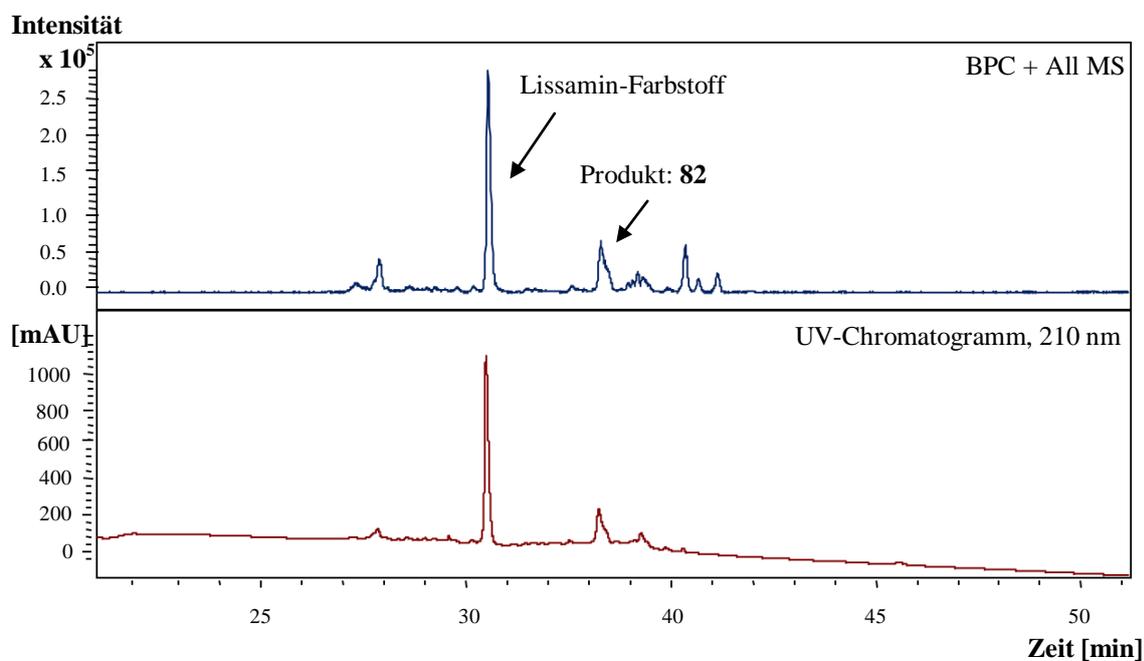


Abb. 4.77: Ausschnitt aus dem LCMS-Spektrum des Rohprodukts **82**. In blau ist das „base peak chromatogramm“, sowie in rot das UV-Chromatogramm (210 nm) zu sehen (oben). Die Massenspektren der relevanten Signale sind in Abb. 4.78 dargestellt.

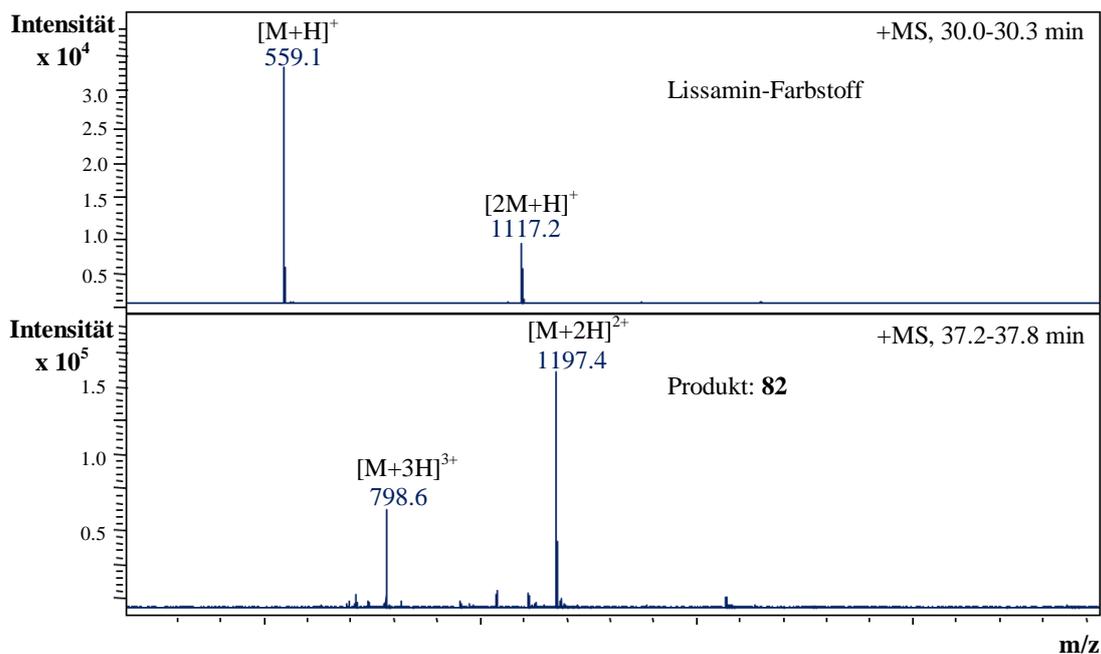


Abb. 4.78: Zum LCMS-Spektrum in Abb. 4.77 zugehörige Massenspektren.

Durch chromatographische Reinigung des Rohprodukts mittels HPLC/RP konnte **82** mit einer Ausbeute von 26% erhalten werden (Abb. 4.79).

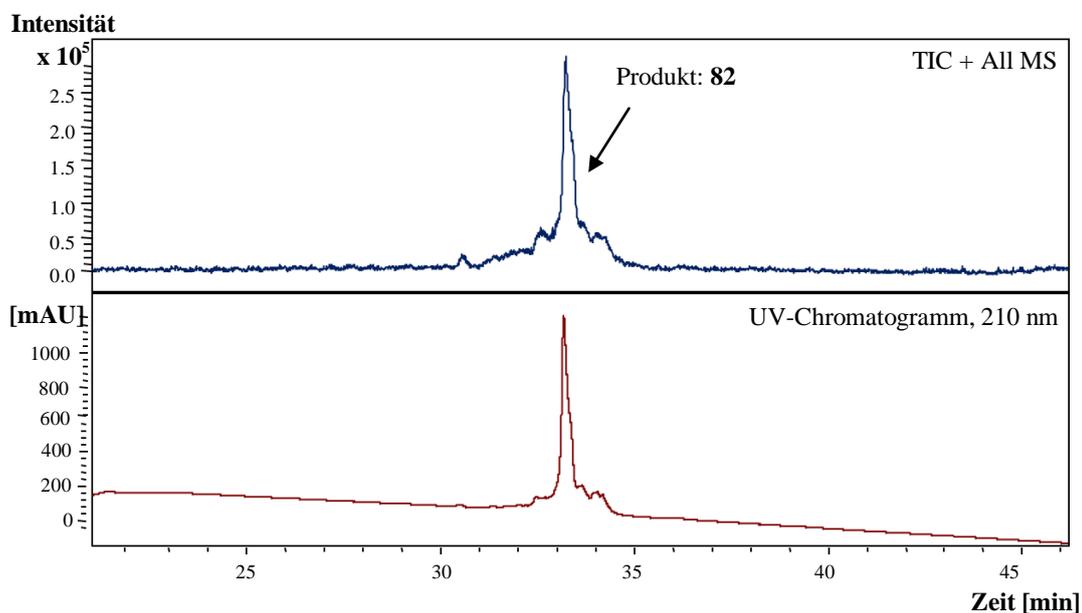


Abb. 4.79: Ausschnitt aus dem LCMS-Spektrum des gereinigten, fluoreszenzmarkierten Konjugats **82**.

Im letzten Schritt galt es, die Cystein-Reste des CTB über die Pyridinyldisulfid-Einheit des SPDP-Linkers an das fluoreszenzmarkierte Konjugat **82** zu koppeln. Dazu wurde 1 Äq. CTB in einem Phosphat-Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH = 7.8) gelöst und mit 1 Äq. **82** umgesetzt.

Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur konnten massenspektrometrisch nur die nicht umgesetzten Edukte nachgewiesen werden (Abb. 4.80).

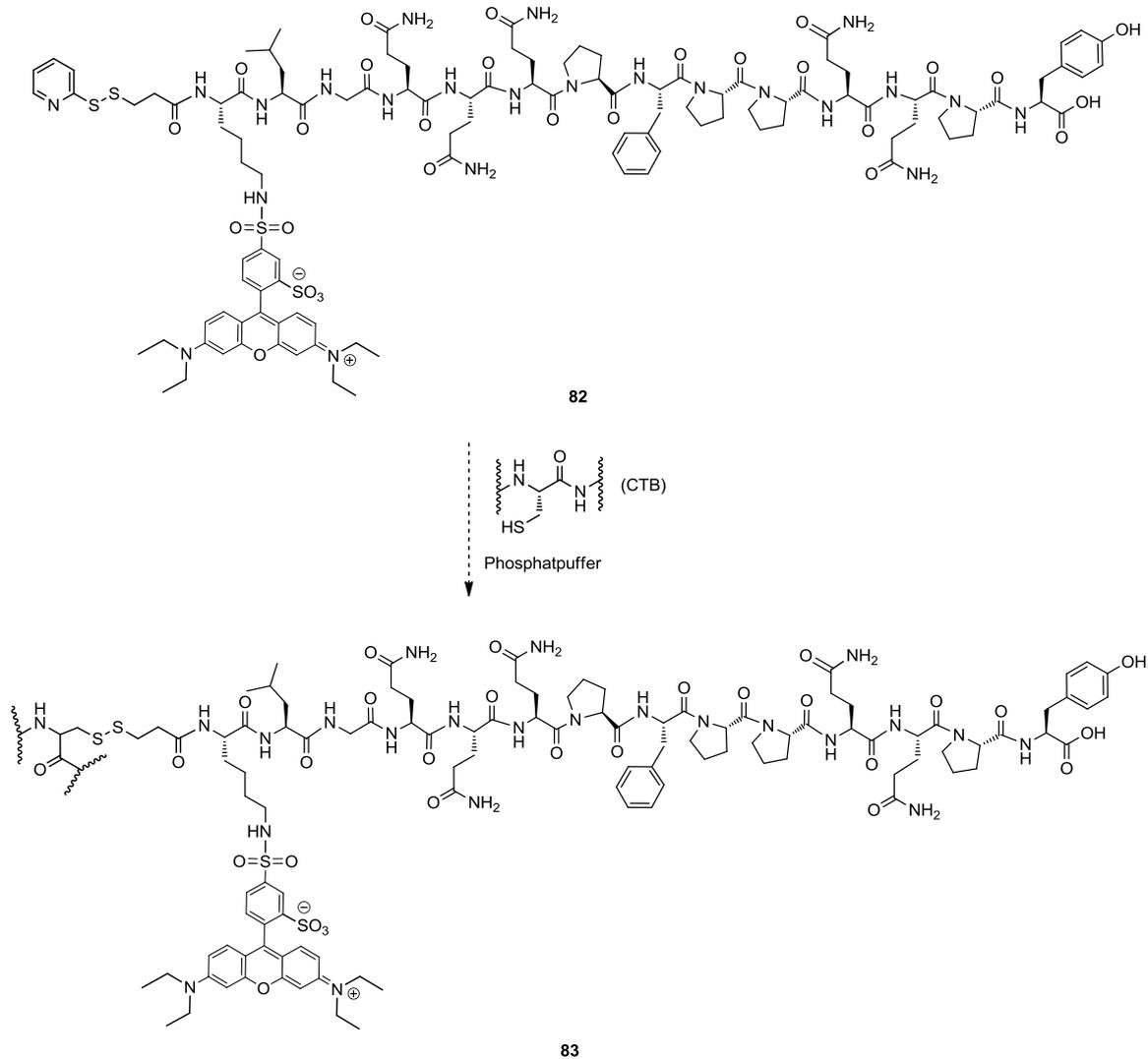


Abb. 4.80: Versuch zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten CTB-Gliadinpeptid-Konjugats **83**.

Der erneute Versuch zur Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Konjugats **82** mit CTB, wobei **82** diesmal in 20 Äq. eingesetzt wurde, lieferte wieder die nicht umgesetzten Edukte, sowie ein Dimer aus **82** wie das LCMS-Spektrum in Abb. 4.81 und die Massenspektren in Abb. 4.82 zeigen.

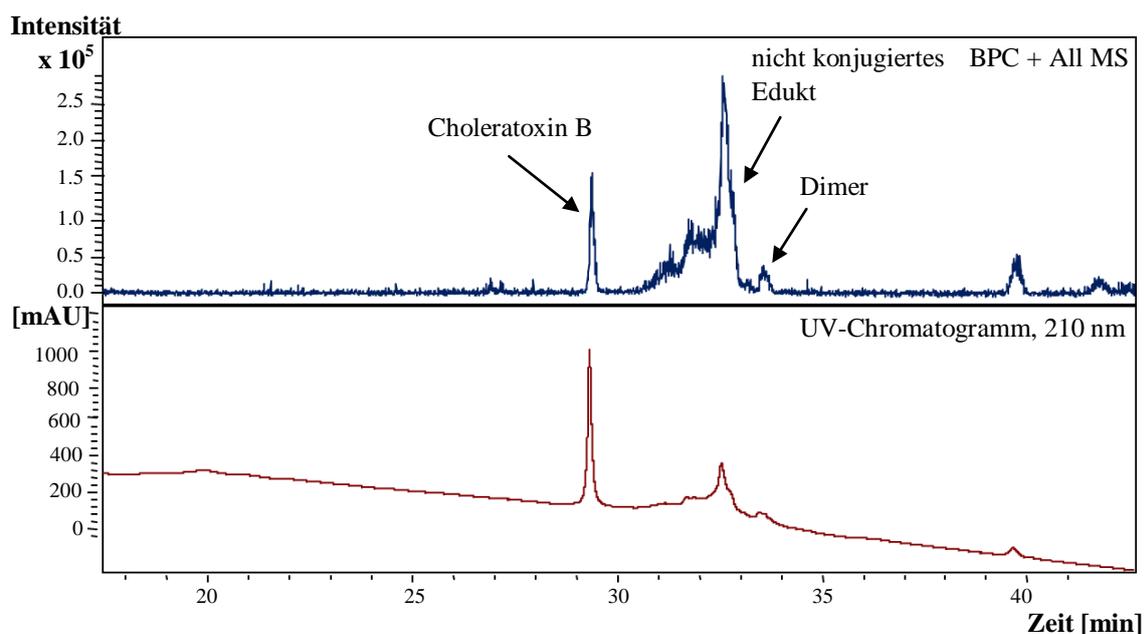


Abb. 4.81: Ausschnitt aus dem LCMS-Spektrum zur versuchten Darstellung von **83**. Das „base peak chromatogram“ (BPC) ist in blau und das UV-Chromatogramm (210 nm) in rot zu sehen. Die Massenspektren zu den Signalen sind unten dargestellt.

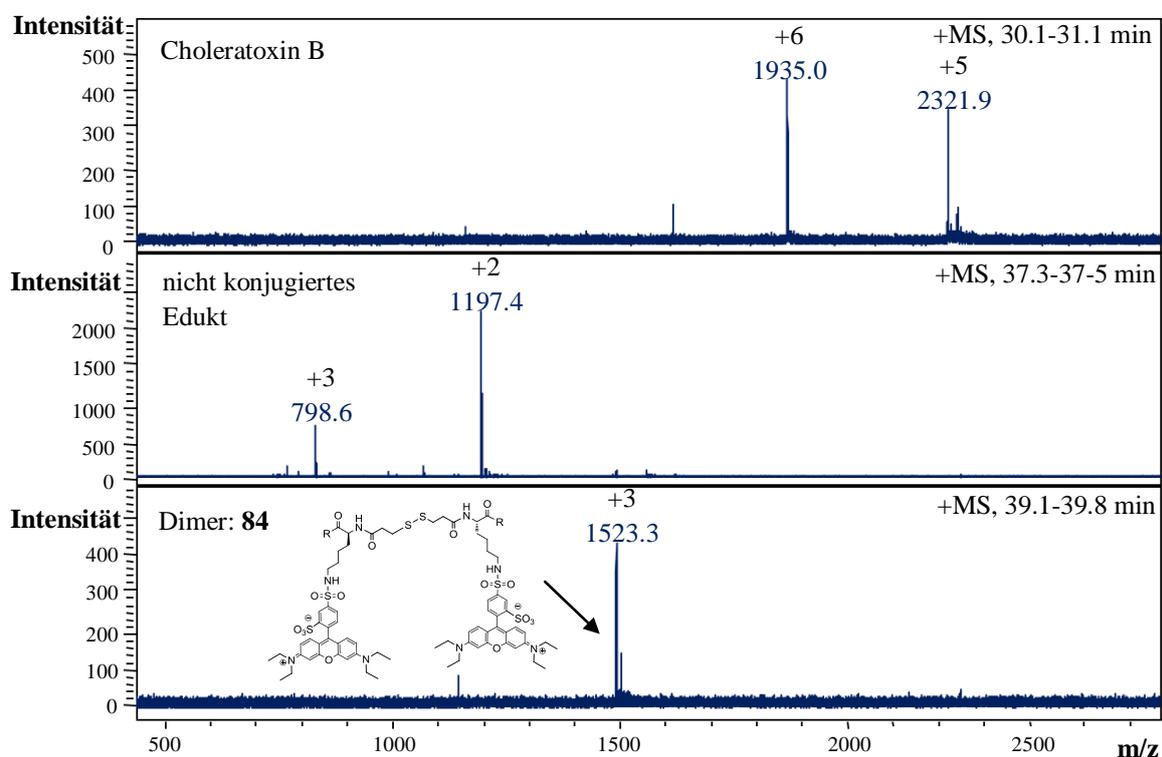


Abb. 4.82: Die Massenspektren zur versuchten Darstellung des CTB-Peptid-Konjugats und die Bildung eines Dimers **84**. Die Ladungen der Massensignale sind jeweils über den Massenwerten angezeigt. R = LGQQQPFPPQQPY für das Dimer.

4.2.9.2 MHS als Linker

Der Versuch zur Darstellung eines CTB-Gliadinpeptid-Konjugats über den SPDP-Linker schlug fehl, aufgrund der Bildung von Dimeren, wie in Abschnitt 4.4.9.1 beschrieben. Daher wurde zur Konjugation des Adjuvans an das Peptid ein weiterer Linker herangezogen. 6-Maleimidohexansäure-*N*-hydroxy-succinimid (MHS) ist ein bifunktionaler Linker, welches über eine lange, aliphatische Spacergruppe (Ahx) eine amin-, sowie eine thiolreaktive Gruppe besitzt. Die Aktivester-Einheit reagiert effizient mit primären Aminen unter Bildung einer Amidbindung, wohingegen die Maleimid-Funktionalität mit Molekülen, die eine Thiolgruppe enthalten, stabile Thioether-Bindungen bildet (Abb. 4.83).

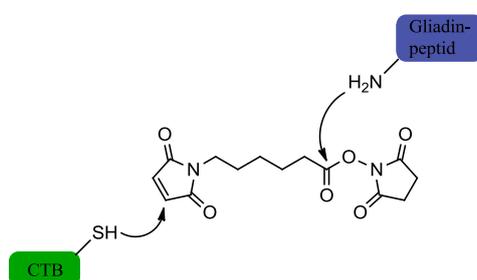


Abb. 4.83: Der für die Konjugation mit CTB verwendete, bifunktionale Linker MHS.

Um die Effizienz des MHS-Linkers zu beurteilen, wurde direkt eine Kupplung mit CTB durchgeführt. Hierzu wurde 1 Äq. CTB in einem Phosphat-Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH = 7.8) gelöst und mit 25 Äq. des Linkers umgesetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

CTB enthält pro Einheit zwei Cystein-Gruppen. Da es sich bei der B-Untereinheit um ein Pentamer handelt, enthält CTB insgesamt zehn Cystein-Einheiten. Bei einer vollständigen Kupplung der zehn Cystein-Gruppen mit jeweils einem MHS-Linker erwartet man eine Masse von 14.7 kDa. Die massenspektrometrische Analyse der Reaktion lieferte ein Massensignal von 14.4 kDa, welches einer Kupplung von neun Cystein-Gruppen mit jeweils einem MHS-Linker entspricht (Abb. 4.84).

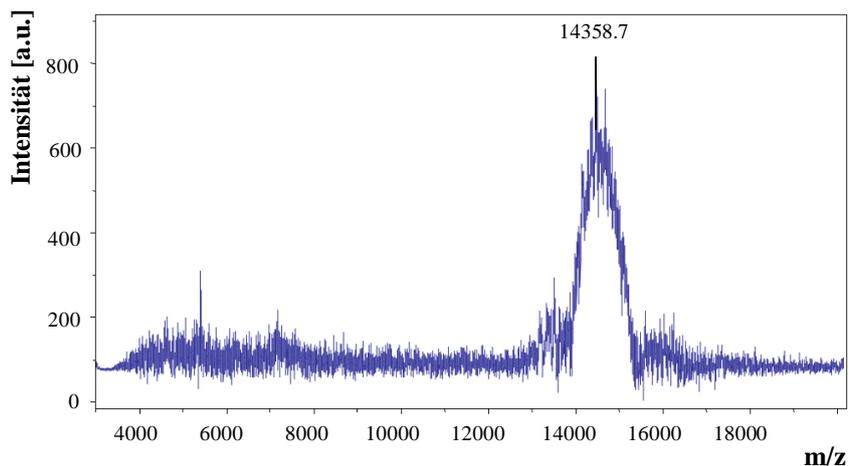


Abb. 4.84: Durch MALDI-TOF-Analyse kann das CTB-MHS-Konjugat **91** nachgewiesen werden.

Um das Vorliegen eines veränderten Transportweges bei der Konjugation von CTB an toxische Gliadinpeptide nachzuweisen, ist es nötig, ein fluoreszenzmarkiertes CTB-Peptid-Konjugat mit einem CatD-labilen peptidischen Linker darzustellen. Letzteres soll die selektive Wiederfreisetzung des toxischen Gliadinpeptids p31-43 in den LE und die Präsentation an das Immunsystem gewährleisten.

Somit erfolgte die Darstellung des toxischen Peptids p31-43 mit einer zusätzlichen Lysin-Einheit und AAALA als CatD-labiler Linker ausgehend von einem Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz gemäß der linearen SPPS. Für die Kupplungsschritte wurden 6 Äq. der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäuren, 6 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 12 Äq. DIPEA verwendet. Die Kupplung mit dem MHS-Linker erfolgte ebenfalls an der festen Phase. Dazu wurden 6 Äq. MHS mit 12 Äq. DIPEA zugefügt. Die abschließende Abspaltung des synthetisierten Peptids vom Harz erfolgte mit 95% TFA (Abb. 4.85). Das Fällen aus kaltem Diethylether lieferte das gewünschte Produkt **85** als farblosen Feststoff mit einer Ausbeute von 72%.

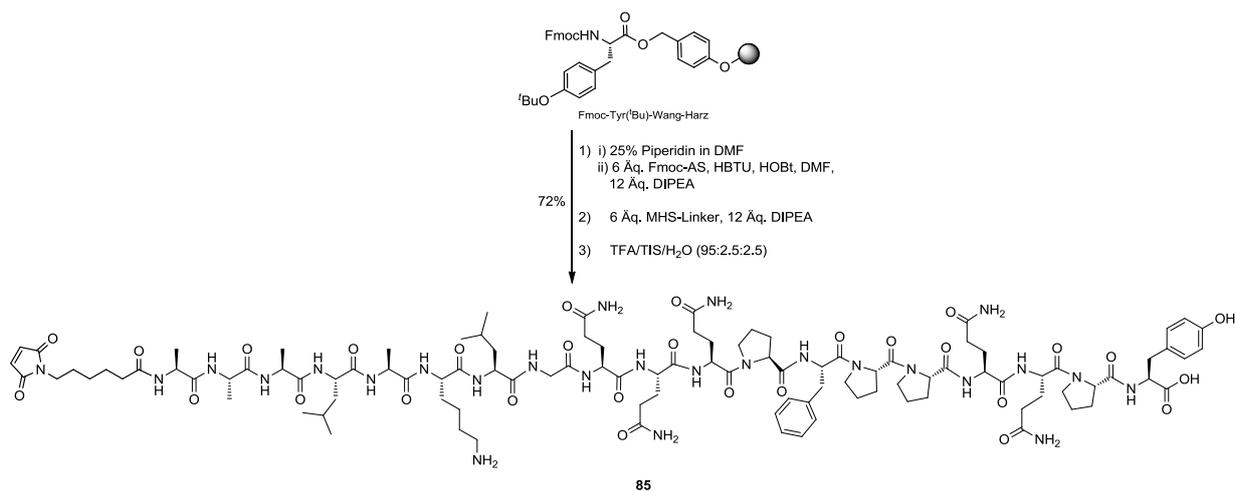


Abb. 4.85: Synthese von Lys-p31-43 und anschließende Kupplung mit dem MHS-Linker an der festen Phase.

Im nächsten Schritt wurde **85** mit dem PromoFluor-Farbstoff markiert. Hierzu wurde 1 Äq. des Peptids **85** mit 1 Äq. des Farbstoffs unter Zugabe von NEt₃ als Base in DMF gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 4.86). Durch Reinigung des Rohprodukts an der präparativen HPLC konnte 32% des Farbstoff-markierten Produkts **86** erhalten werden.

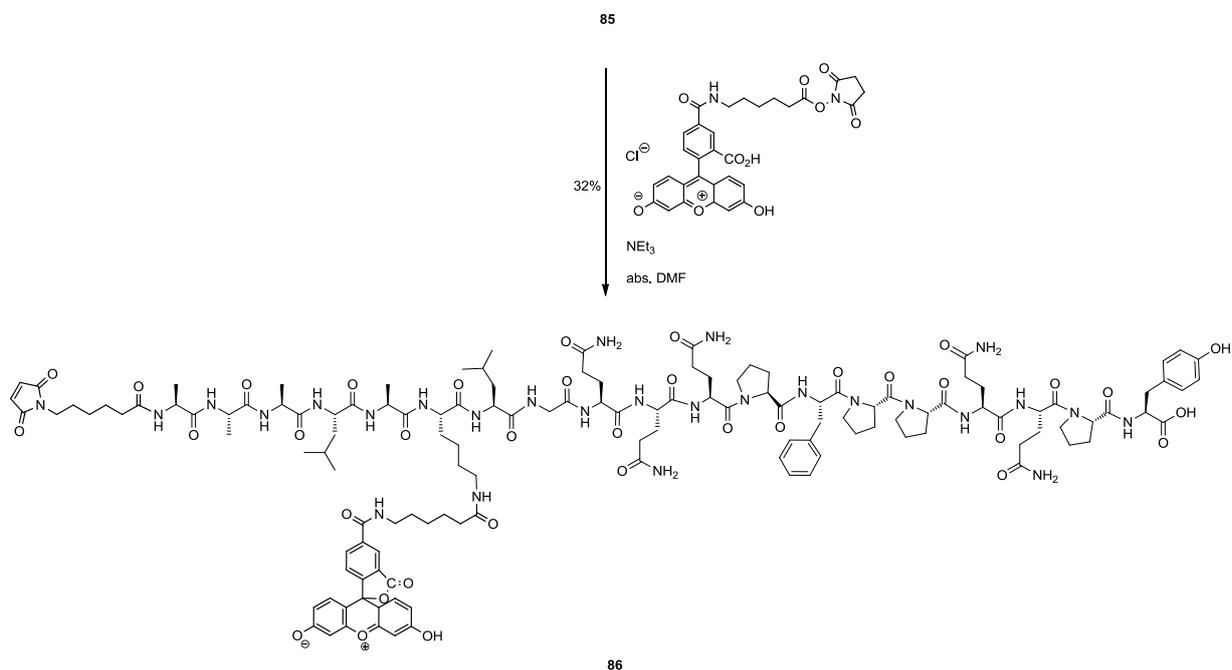


Abb. 4.86: Darstellung von fluoreszenzmarkiertem Peptid **86**.

Im letzten Schritt erfolgte die Darstellung des fluoreszenzmarkierten CTB-Gliadinpeptid-Konjugats **87**. Dazu wurde 1 Äq. CTB mit 25 Äq. **86** in einem 1:1-Gemisch aus Phosphat-

Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH= 7.8) und DMSO gelöst und 48 h über Nacht gerührt (Abb. 4.87).

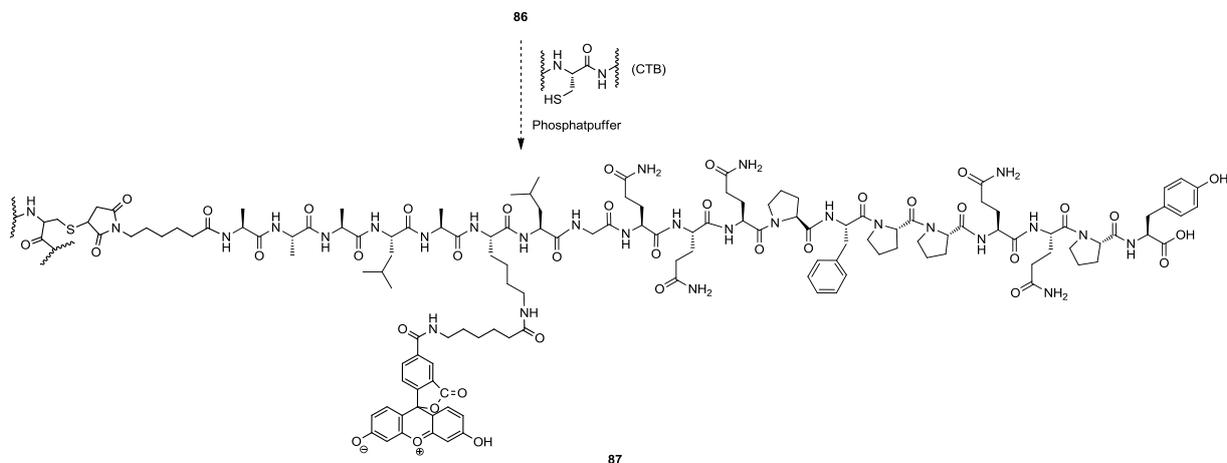


Abb. 4.87: Versuch zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten CTB-Gliadinpeptid-Konjugats **87** mit CatD-labilem AAALA-Linker und MHS-Linker.

Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die massenspektrometrische Analyse des Rohprodukts mittels MALDI-TOF. Jedoch konnten nur die unmarkierten Edukte, aber nicht das gewünschte CTB-Gliadinpeptid-Konjugat **87** nachgewiesen werden.

Ziel zukünftiger Arbeiten sollte daher die Optimierung der Konjugationsreaktion mit CTB sein. Ein möglicher Ansatz könnte in der Verwendung eines Reduktionsmittels wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) liegen, um bereits zu Disulfidbrücken oxidierte Cystein-Einheiten innerhalb des CTB zu spalten und die Thiol-Einheiten für die Konjugation mit dem Gliadinpeptid wieder freizusetzen.²³⁹⁻²⁴⁰

4.3 Inkubationsstudien mit CatD

Eines der Ziele der vorliegenden Doktorarbeit war die Synthese von CTB-Gliadinpeptid-Konjugaten einschließlich eines Linkers, welches selektiv in den LE gespalten wird, um das native Peptid wieder freizusetzen. Hierfür wurden die in Abschnitt 4.4.7 gezeigten peptidischen Linkersequenzen dargestellt.

Molecular Modelling-Analysen mit der Schrödinger-Software zeigen, wie beispielsweise das Substrat AAALA in das aktive Zentrum der Aspart-Protease bindet. AAALA befindet sich in einer gestreckten β -Faltblattkonformation in der aktiven Tasche und ermöglicht so durch Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen) eine spezifische Enzym-Substrat-Bindung. Zur Darstellung von fluoreszenzmarkierten Konjugaten ist die Erweiterung der Linkersequenz um einen Lysin-Rest am C-terminalen Alanin erforderlich. Wie aus dem Docking-Versuch in Abb. 4.89 abzuleiten ist, sollte die Erweiterung um Lysin möglich sein.

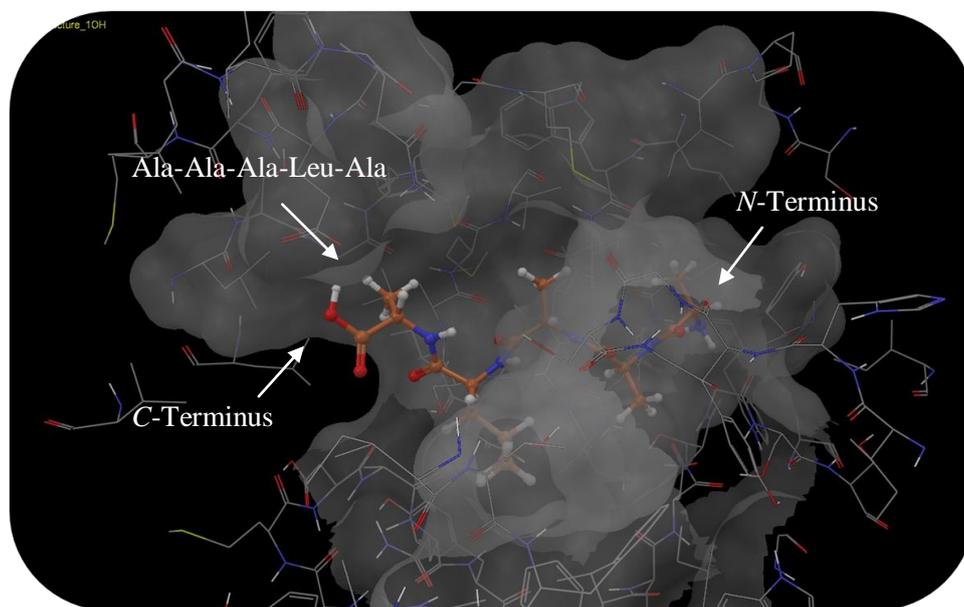


Abb. 4.89: Aktives Zentrum von CatD mit AAALA als Ligand. C-Atome sind in orange, O-Atome in rot, N-Atome in blau und H-Atome in weiß dargestellt.

Um nun zu prüfen, ob und wie die in 4.4.7 synthetisierten Linker *in vitro* durch CatD gespalten werden, wurden diese mit dem Enzym inkubiert und mittels LCMS analysiert.

Dazu wurden Ac-AAALAK **65**, GLLFFK **67**, Ac-RGFFPK **71** und KPILFFRLGK **73** mit voraktiviertem CatD in NaOAc/NaCl-Puffer (pH = 3.5) bei 37 °C verdaut. Nach 8 h Inku-

bationsdauer wurde die Probe zentrifugiert und die Spaltprodukte qualitativ mit Hilfe von LCMS identifiziert.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Peptide mit einer Leu-Ala-Bindung sensitiv gegenüber lysosomalen Hydrolasen sind.^{237,241-242} Abb. 4.90 zeigt die LCMS-Läufe vor und nach der Inkubation von Ac-AAALAK **65** im Vergleich.

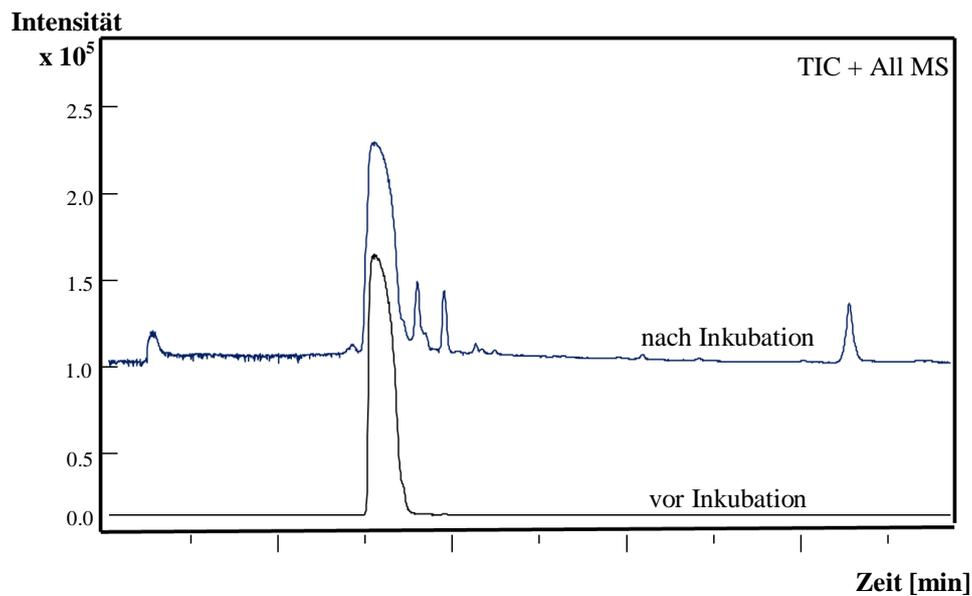


Abb. 4.90: LCMS-Läufe vor und nach der Inkubation von Ac-AAALAK **65**.

Wie das LCMS-Chromatogramm in Abb. 4.91 zeigt, wurde Ac-AAALAK in die erwarteten Fragmente Ac-AAAL und AK gespalten, die beide jeweils mit einer Retentionszeit von $t_R = 13.5$ min eluieren. Aufgrund der langen Inkubationszeit von 8 h ist außerdem eine nahezu vollständige Degradation des Linkers anhand weiterer identifizierbarer Spaltfragmente zu erkennen. Diese sind in Tabelle 4.5 wiedergegeben. Da die Linker für den *in vitro*-Verdau jeweils in erhöhter Konzentration eingesetzt wurden, ist noch unverdautes Edukt vorhanden.

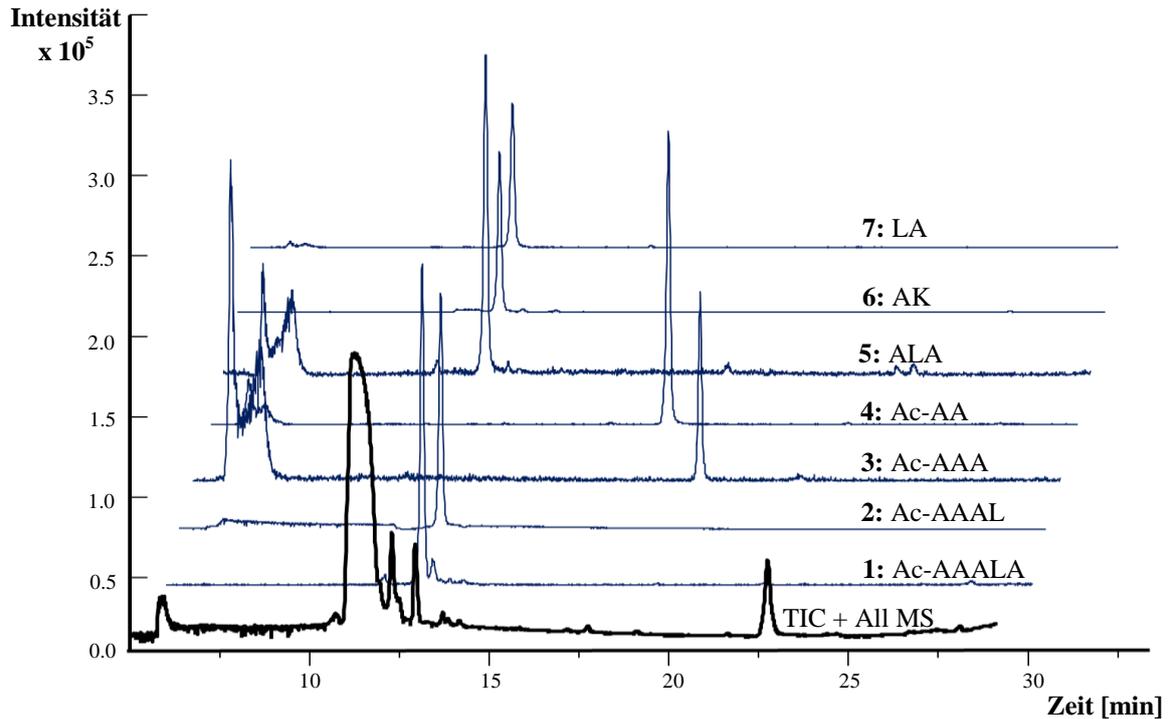


Abb. 4.91: LCMS-Chromatogramm der Inkubation von Ac-AAALAK in Gegenwart von CatD bei pH = 3.5 und 37 °C nach 8 h (in schwarz dargestellt). Die „extracted ion chromatograms“ (EIC) der einzelnen Spaltprodukte sind in blau gezeigt.

Tabelle 4.5: Die durch Inkubation von Ac-AAALAK mit CatD identifizierte Spaltprodukte. Die mit * gekennzeichneten Fragmente wurden massenspektrometrisch in Spuren nachgewiesen.

Peak Nr.	t_R [min]	m/z	Zuordnung	Fragment
1	13.3	458.3	$[M+H]^+$	Ac-AAALA
		480.2	$[M+K]^+$	
2	13.5	387.2	$[M+H]^+$	Ac-AAAL
		409.2	$[M+Na]^+$	
		425.2	$[M+K]^+$	
3	24.3	274.1	$[M+H]^+$	Ac-AAA
		296.1	$[M+Na]^+$	
4	22.1	225.1	$[M+Na]^+$	Ac-AA
5	13.5	274.1	$[M+H]^+$	ALA
*	12.0	331.2	$[M+H]^+$	LAK
		369.2	$[M+K]^+$	
*	12.2	402.3	$[M+H]^+$	ALAK
6	13.5	256.1	$[M+K]^+$	AK
7	13.5	203.1	$[M+H]^+$	LA

Wie aus Tabelle 4.5 ersichtlich, werden bei achtstündiger Inkubation mit CatD neben der bevorzugten Spaltstelle Leu-Ala auch die Bindungen zwischen Ala-Ala, Ala-Leu, sowie Ala-Lys gespalten.

In Abbildung 4.92 sind die LCMS-Läufe vor und nach der Inkubation von GLLFFK **67** mit CatD gezeigt.

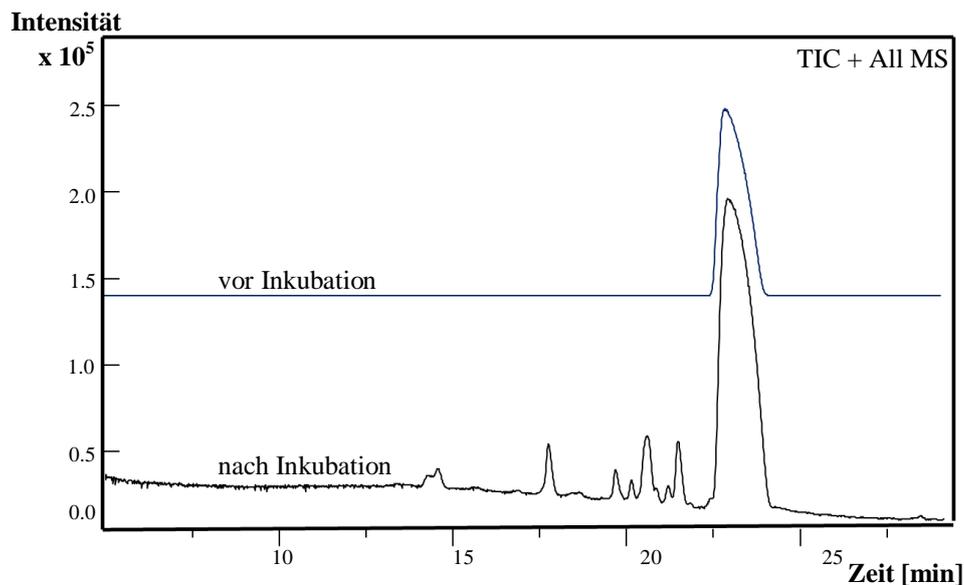


Abb. 4.92: LCMS-Läufe vor und nach der Inkubation von GLLFFK **67**.

Gemäß der Substratspezifität des Enzyms wurden die Spaltprodukte GLLF, sowie FK identifiziert, welches einer Spaltung des Linkers zwischen den beiden aromatischen Phenylalanin-Resten entspricht. Während das Fragment GLLF mit hoher Intensität bei einer Retentionszeit von $t_R = 22.8$ min eluiert, konnte das Fragment FK massenspektrometrisch nur in Spuren nachgewiesen werden. Vermutlich liegt dies daran, dass das Substrat weitere Spaltstellen besitzt, wie aus Abb. 4.93 und Tabelle 4.6 ersichtlich wird.

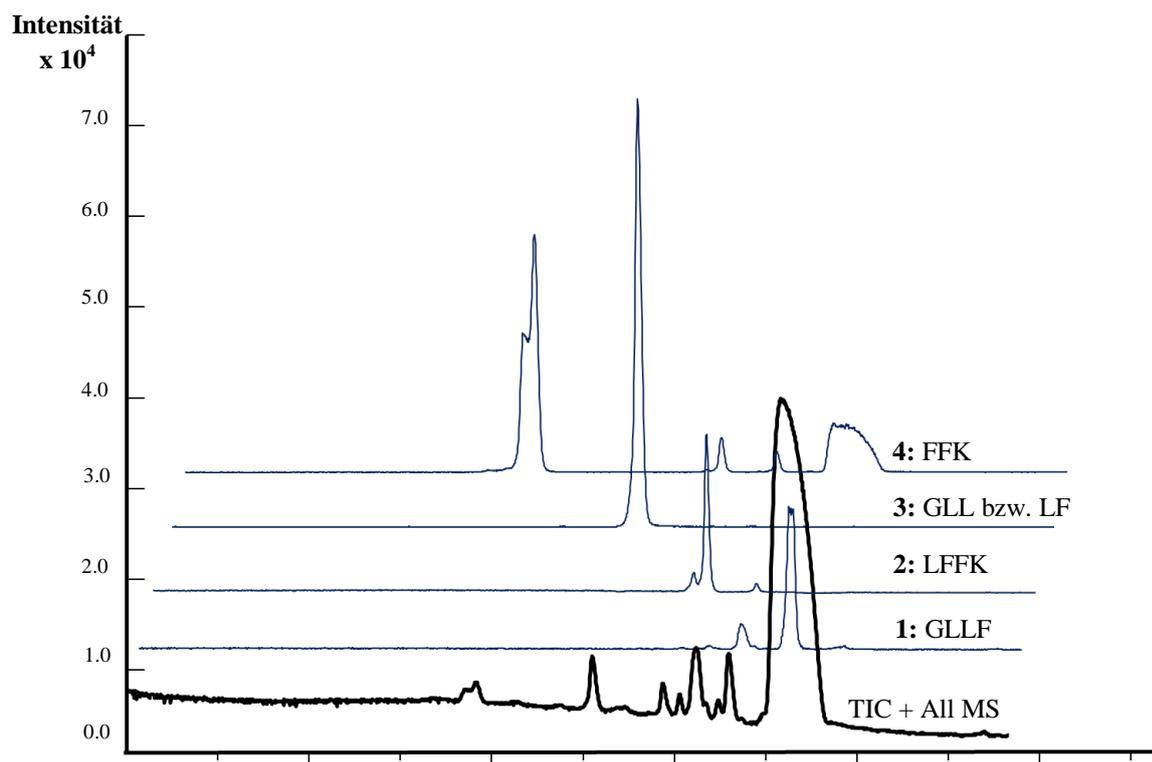


Abb. 4.93: LCMS-Chromatogramm der Inkubation von GLLFFK in Gegenwart von CatD bei pH = 3.5 und 37 °C nach 8 h (in schwarz dargestellt). Die „extracted ion chromatograms“ (EIC) der einzelnen Spaltprodukte sind in blau gezeigt.

Tabelle 4.6: Die durch Inkubation von GLLFFK mit CatD identifizierten Spaltprodukte. Das mit * gekennzeichnete Fragment wurde massenspektrometrisch in Spuren nachgewiesen. n.b.: nicht bestimmt.

Peak Nr.	t_R [min]	m/z	Zuordnung	Fragment
1	22.8	449.3	$[M+H]^+$	GLLF
2	20.1	554.3	$[M+H]^+$	LFFK
		577.3	$[M+Na]^+$	
3	17.7	302.2	$[M+H]^+$	GLL bzw. LF
4	14.4	441.3	$[M+H]^+$	FFK
		463.2	$[M+Na]^+$	
*	n.b.	294.2	$[M+H]^+$	FK
*	n.b.	147.1	$[M+H]^+$	K

So konnte massenspektrometrisch das Signal 554.3 $[M+H]^+$, und das Na^+ -Addukt bei 577.3 nachgewiesen werden, welches LFFK als Spaltfragment zugeordnet werden kann. Auch die beiden Spaltprodukte GLL ($t_R = 17.7$ min) und FFK ($t_R = 14.4$ min) konnten identifiziert werden, welches auf eine Spaltung der Leu-Phe-Bindung hindeutet. Bei letzterem handelt es

sich um die bevorzugt gespaltene Spaltstelle – entgegen der Erwartung, dass bevorzugt zwischen der Phe-Phe-Bindung gespalten wird. Demnach enthält **67** nicht nur eine Spaltstelle für CatD, sondern drei. Bei den gespaltenen Bindungen handelt es sich jeweils um die Phe-Phe-, Leu-Phe- und Leu-Leu-Bindungen. Letztere konnten bereits in Arbeiten von Pimenta *et al.* als Spaltstellen identifiziert werden.²²⁷

Das Substrat Ac-RGFFPK **71** wurde in Anlehnung an das CatD-Substrat Benzyl-RGFFP-4-Methoxy-naphthylamin dargestellt, welches kommerziell erhältlich ist. Dieses wird als Substrat zur Bestimmung der CatD-Aktivität eingesetzt. Durch Spaltung der Phe-Phe-Bindung werden das Fluorophor und der Quencher räumlich voneinander getrennt, so dass eine Fluoreszenz messbar wird.

Die LCMS-Läufe vor und nach dem Verdau von Ac-RGFFPK **71** mit voraktiviertem CatD sind in Abb. 4.94 dargestellt.

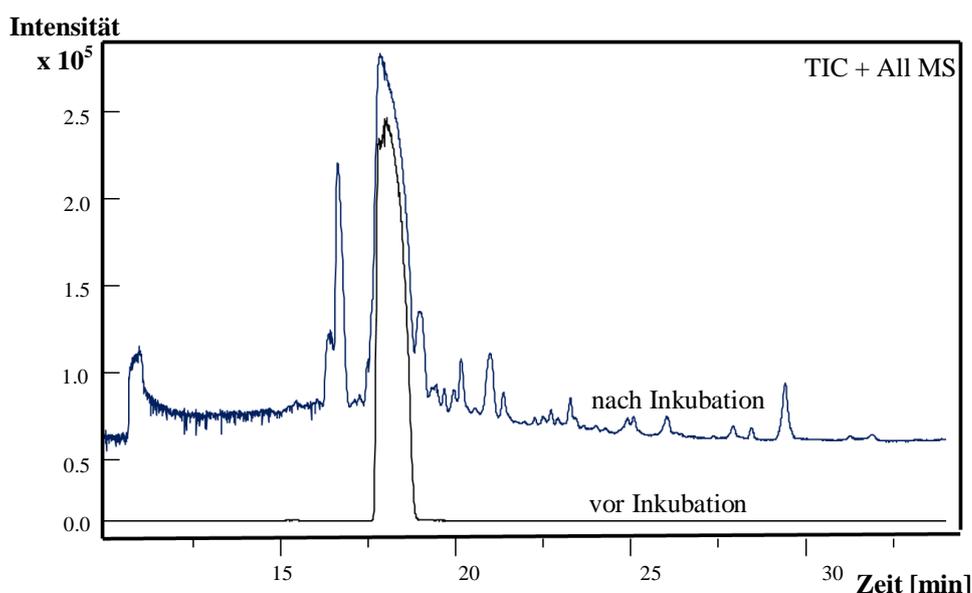


Abb. 4.94: LCMS-Läufe vor und nach der Inkubation von Ac-RGFFPK **71**.

Bei dem Inkubationsexperiment konnten neben unverdaulichem Substrat **71** – wie zu erwarten – die Spaltfragmente Ac-RGF und FPK identifiziert werden, welche mit den Retentionszeiten $t_R = 14.3$ min bzw. $t_R = 16.4$ min eluieren (Abb. 4.95). Das Fragment mit der höchsten Intensität ist jedoch deacetyliertes RGFFP ($t_R = 14.0$ min).

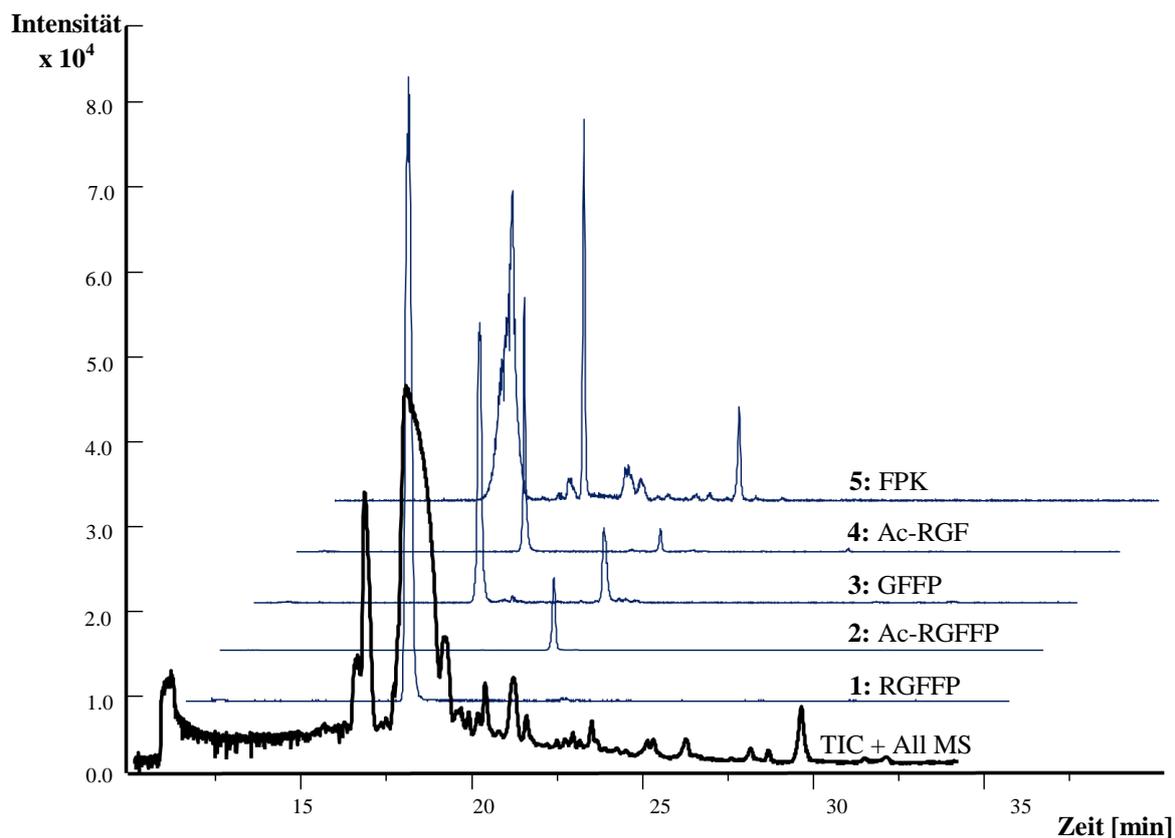


Abb. 4.95: LCMS-Chromatogramm der Inkubation von Ac-RGFFPK **71** in Gegenwart von CatD bei pH = 3.5 und 37 °C nach 8 h (in schwarz dargestellt). Die „extracted ion chromatograms“ (EIC) der einzelnen Spaltprodukte sind in blau gezeigt.

Auch bei diesem Substrat ist nach achtstündiger Inkubationszeit eine vollständige Degradation zu beobachten, wie die Tabelle 4.7 zeigt.

Tabelle 4.7: Die durch Inkubation von Ac-RGFFPK mit CatD identifizierten Spaltprodukte. Das mit * gekennzeichnete Fragment wurde massenspektrometrisch in Spuren nachgewiesen.

Peak Nr.	t_R [min]	m/z	Zuordnung	Fragment
1	14.0	623.3	$[M+H]^+$	RGFFP
		646.3	$[M+Na]^+$	
		323.7	$[M+H+Na]^{2+}$	
2	20.2	568.3	$[M+H]^+$	Ac-RGFF
3	14.2	490.2	$[M+Na]^+$	GFFP
4	14.3	421.2	$[M+H]^+$	Ac-RGF
5	16.4	391.2	$[M+H]^+$	FPK
*	15.6	274.2	$[M+H]^+$	Ac-RG
*	n.b.	244.2	$[M+H]^+$	PK
*	25.0	147.1	$[M+H]^+$	K

Somit ist CatD auch fähig, Bindungen zwischen Arg-Gly, Gly-Phe, Phe-Pro und Pro-Lys zu spalten.

Der Linker KPILFFRLGK **73** wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Baechle *et al.*²³⁸ dargestellt und *in vitro* mit CatD im NaOAc/NaCl-Puffer bei pH = 3.5 für 8 h verdaut (Abb. 4.96), sowie die Spaltprodukte mittels LCMS analysiert (Abb. 4.97).

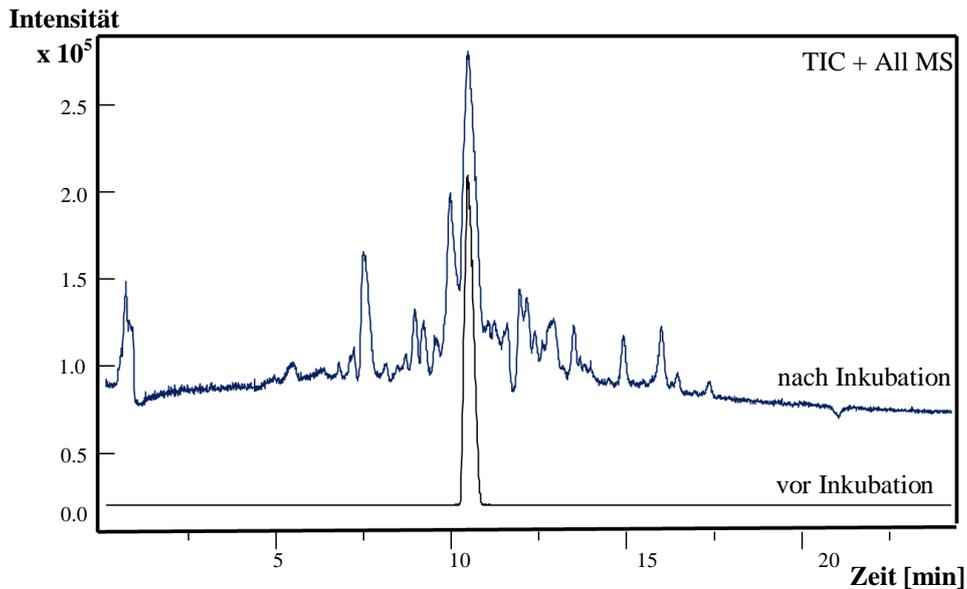


Abb. 4.96: LCMS-Läufe vor und nach der Inkubation von KPILFFRLGK **73**.

Wie in den Arbeiten von Scarborough *et al.* bereits beschrieben,²⁴³ wurde innerhalb dieses Substrates die Phe-Phe-Bindung in die Fragmente KPILF ($t_R = 19.3$ min) und FRLGK ($t_R = 15.1$ min) bevorzugt gespalten (Abb. 4.97). Jedoch konnten auch die Fragmente LFFRLGK ($t_R = 19.9$ min) und FFRLGK ($t_R = 17.6$ min) identifiziert werden. Dies deutet auf die Spaltung zwischen den Bindungen Ile-Leu und Leu-Phe hin, welches in Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen von Baechle *et al.* steht. Desweiteren konnten Spaltungen zwischen den Pro-Ile- und Leu-Gly-Bindungen identifiziert werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass CatD bevorzugt Bindungen zwischen ungeladenen bzw. hydrophoben Bindungen spaltet, wie schon in der Literatur beschrieben.²⁴³ Die identifizierten Spaltfragmente sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

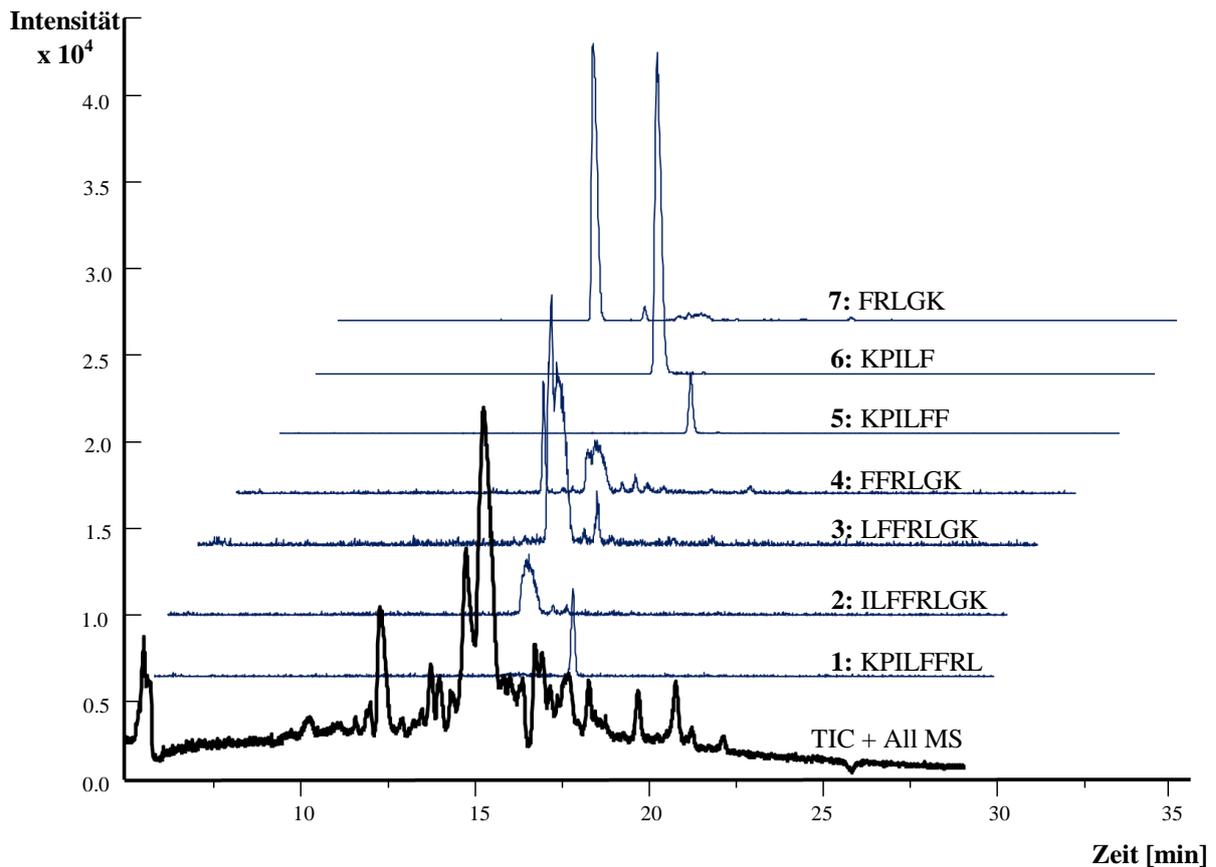


Abb. 4.97: LCMS-Chromatogramm der Inkubation von KPILFFRLGK **73** in Gegenwart von CatD bei pH = 3.5 und 37 °C nach 8 h (in schwarz dargestellt). Die „extracted ion chromatograms“ (EIC) der einzelnen Spaltprodukte sind in blau gezeigt.

Tabelle 4.7: Die durch Inkubation von KPILFFRLGK mit CatD identifizierte Spaltprodukte. Die mit * gekennzeichneten Fragmente wurden massenspektrometrisch in Spuren nachgewiesen.

Peak Nr.	t_R [min]	m/z	Zuordnung	Fragment
1	23.1	1033.7	$[M+H]^+$	KPILFFRL
2	20.1	993.7	$[M+H]^+$	ILFFRLGK
3	19.9	880.5	$[M+H]^+$	LFFRLGK
4	17.6	767.5	$[M+H]^+$	FFRLGK
5	22.7	764.5	$[M+H]^+$	KPILFF
6	19.3	617.4	$[M+H]^+$	KPILF
		639.4	$[M+Na]^+$	
		655.3	$[M+K]^+$	
7	15.1	620.4	$[M+H]^+$	FRLGK
		642.3	$[M+Na]^+$	
		659.4	$[M+K]^+$	
*	20.3	1090.7	$[M+H]^+$	KPILFFRLG
	bzw. 22.2			bzw. PILFFRLGK

Demnach werden alle vier Linkersequenzen (**65**, **67**, **71** und **73**) durch CatD gespalten. Aufgrund der erhöhten Inkubationszeit von 8 h sind nahezu alle Fragmente nachzuweisen, die einer vollständigen Degradation entsprechen. Da die Substrate jedoch in Überschuss eingesetzt wurden, enthalten alle LCMS-Läufe noch unverdautes Edukt.

Nachdem das CTB-Gliadinpeptid-Konjugat selektiv in den LE gespalten wird, gilt es das Gliadinpeptid in möglichst nativer Form wieder freizusetzen, um es den T-Zellen des Immunsystems zu präsentieren. Dies ist entscheidend, um Einfluss auf die Entwicklung einer Immuntoleranz zu nehmen. Jedoch wird die Aminosäuresequenz des natürlichen Peptids nach erfolgter Spaltung mit CatD durch Spaltfragmente des Linkers verlängert. Bei der Wahl eines geeigneten Linkers sollten daher die verbleibenden Aminosäuren möglichst keinen Einfluss auf die natürlichen Eigenschaften des Gliadinpeptids ausüben.

In Abschnitt 4.4.8 wurden die mit einem CatD-labilen Linker dargestellten Gliadinpeptide (bei denen es sich jeweils um das toxische p31-43-Peptid handelt) bereits beschrieben. Für die Synthese von selektiv spaltbaren CTB-Gliadinpeptid-Konjugaten fiel unsere Wahl aus oben genannten Gründen auf den Linker Ac-AAALA, da die Verlängerung der natürlichen Gliadinpeptidsequenz um eine einzige Aminosäure – nämlich Alanin – den geringsten Einfluss auf die nativen Eigenschaften des Peptids haben sollte.

Um zu prüfen, ob auch Ac-AAALALGQQQPFPPQQPY **74** *in vitro* gespalten wird, wurde ein Verdau mit aktiviertem CatD bei einem pH-Wert von 3.5 durchgeführt. Hierzu wurde eine physiologische Konzentration von **74** mit dem Enzym für 90 min bzw. 8 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe zentrifugiert und die Spaltprodukte mittels MALDI-Tof analysiert. Das Massenspektrum in Abb. 4.98 zeigt neben dem unverdauten Substrat auch ein Massensignal geringer Intensität bei 1598.8 [M+H]⁺, welches dem erwarteten Spaltprodukt ALGQQQPFPPQQPY entspricht. Jedoch sind auch weitere Signale vorhanden, bei denen es sich um Spaltprodukte des nativen Gliadinpeptids handelt. Die identifizierten Spaltfragmente und ihre Massen sind in Tabelle 4.8 dargestellt. Diese deuten auf Spaltung der Leu-Gly-, Gln-Gln-, sowie Phe-Pro-Bindungen hin. Nach achtstündiger Inkubation anstelle von 90 min bleibt das Spaltprofil unverändert. Die Identifizierung von Leu-Gly und Phe-Pro als Spaltstellen bestätigt die Annahme, dass CatD Substrate bevorzugt zwischen hydrophoben und ungeladenen Aminosäuren spaltet.

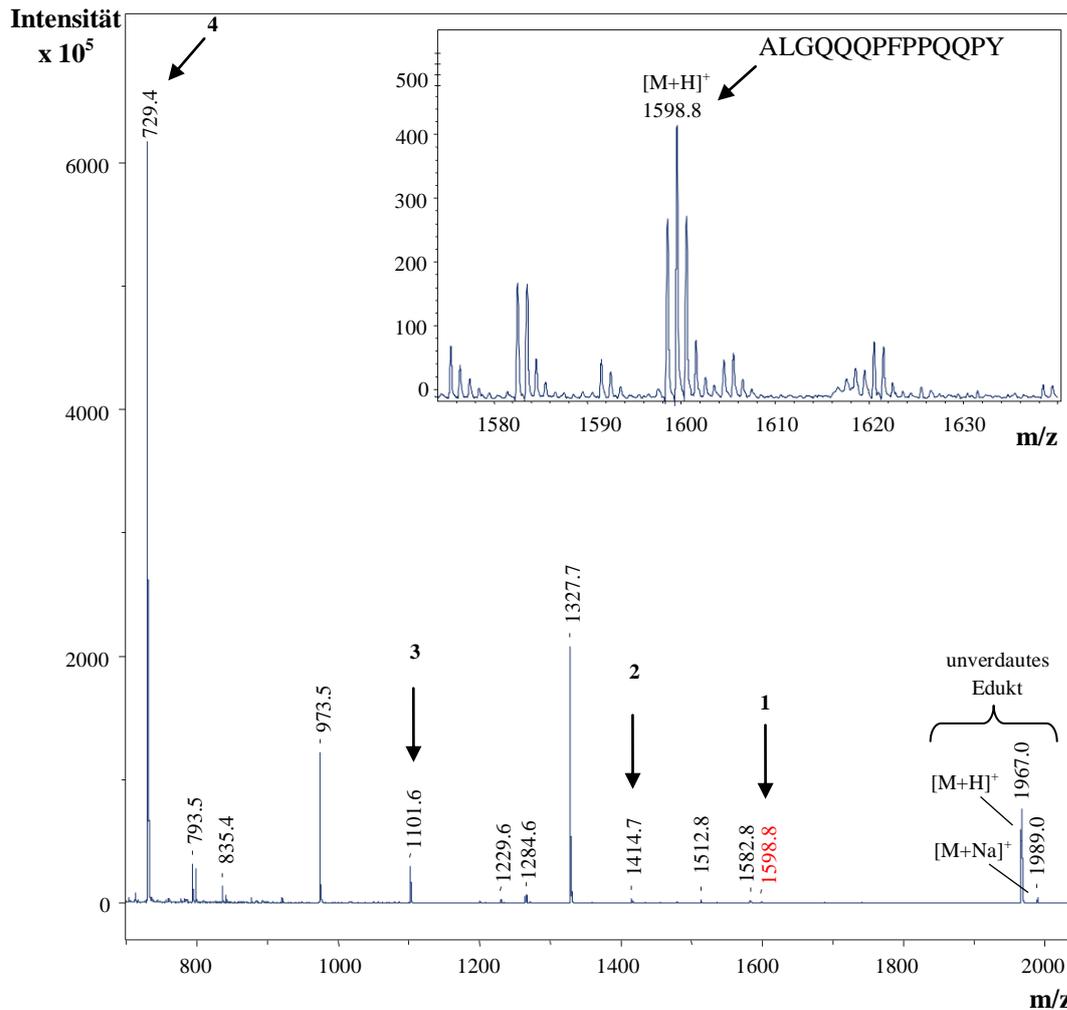


Abb. 4.98: Maldi-Spektrum des CatD-Verdau von **74** mit dem Spaltprodukt ALGQQQPFPPQQPY. Die Inkubation wurde bei pH = 3.5 und 37 °C für 90 min durchgeführt.

Tabelle 4.8: Die in dem Inkubationsexperiment von Ac-AAALALGQQQPFPPQQPY **74** mit CatD identifizierten Spaltprodukte.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	1598.8	$[M+H]^+$	ALGQQQPFPPQQPY
2	1414.7	$[M+H]^+$	GQQQPFPPQQPY
3	1229.6	$[M+H]^+$	QQPFPPQQPY
4	729.4	$[M+H]^+$	PPQQPY

Gemäß der Hypothese von Zimmer *et al.* sind toxische Gliadinpeptide, wie das p31-43, in den HLA-DR-negativen EE lokalisiert. Die Abwesenheit in den HLA-DR- und LAMP-positiven LE könnte die Ursache für ihre Toxizität darstellen. In den durchgeführten *in vitro*-Inkubationsstudien liegt das Gliadinpeptid p31-43 mit CatD-labilem Linker (Ac-

AAALALGQQPFPPQQPY) erstmals in - für LE typischen - Konditionen vor. So ist die Aspartat-Protease CatD ausschließlich in den späten, jedoch nicht in den EE lokalisiert. Hier übernimmt es den Verdau von Peptiden und Proteinen. Eine Spaltung des nativen Gliadinpeptids in kleinere Peptidfragmente, wie in Abb. 4.98 und Tabelle 4.8 gezeigt, ist daher nicht unwahrscheinlich und konnte hiermit erstmals gezeigt werden.

4.4 Untersuchung des intrazellulären Gliadinpeptidtransports mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Der Fokus der vorliegenden Doktorarbeit lag auf der Untersuchung der intrazellulären Transportprozesse von Gliadinpeptiden in Enterocyten. Der Hypothese von Zimmer *et al.* nach werden toxische Gliadinpeptide, wie das p31-43 (**9**), im Gegensatz zu immunodominanten Peptiden (wie p56-68; **15**), nicht in die HLA-DR-positiven LE transportiert. Die Induktion einer oralen Toleranz bleibt aus, da das Peptid in den LAMP- und HLA-DR-negativen EE lokalisiert ist. Der gezielte Transport von toxischen Gliadinpeptiden in LE kann von großer Bedeutung sein. Dadurch wäre eine Präsentation an der basolateralen Membran via MHC-II-Proteinen und die Aktivierung von supprimierenden T-Lymphocyten möglich, welches zur Induktion einer oralen Toleranz führen könnte.

Gliadinpeptide werden physiologisch über Endocytose aufgenommen und transportiert. Für *in vitro*-Untersuchungen des intrazellulären Transportwegs von Gliadinpeptiden können Caco-2-Zellen verwendet werden. Diese exprimieren einen intestinalen Phänotyp mit Enzymen und Hydrolasen der Bürstensaummembran und sind zur Endocytose befähigt.

In den folgenden Kapiteln 4.4 und 4.5 werden Zellassays beschrieben, die in Zusammenarbeit mit Christian Zimmermann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse sind daher in der geplanten Dissertationsschrift von Christian Zimmermann ebenfalls enthalten.

4.4.1 Live Imaging

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden kann der Transportweg der Peptide, d.h. die Aufnahme über Endocytose und der Transport im endosomalen Kompartiment, durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit (*Live Imaging*) verfolgt werden.

Als Ausgangsmaterial für die Echtzeitaufnahmen wurden etwa $5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² Caco-2-Zellen auf Glas-Coverslips in einem Zellkulturmedium, bestehend aus einem Indikator (Phenolrot) und verschiedenen Aminosäuren als Nährlösung, ausgesät. In einem Brutschrank (37 °C und 5% CO₂-Anteil) wurden die Zellen für 2 Tage inkubiert, bis die Coverslips bis zu 90% konfluent mit einem dichten Zellrasen besiedelt waren. In diesem Stadium veränderten die Zellen ihre Eigenschaften. Sie differenzierten aus und bildeten durch Tight junctions einen dichten Epithelverband. Es entstand die für Enterocyten typische Polarität mit apikaler und basolateraler Membran.

Für das *Live Imaging* wurden die Caco-2-Zellen mit 300 µL fluoreszenzmarkiertem Gliadinpeptid ($c = 70$ µg/mL), gelöst in PBS-Puffer (phosphatgepufferte NaCl/KCl-Lösung) und DMEM als Medium, für 2 h inkubiert. Das *Live Imaging* wurde für 20 min durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in Abständen von 30 sec mit einem Laser beschossen und mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops optisch verfolgt.

Abb. 4.99 a) zeigt eine Gruppierung von Zellen vor Beginn des *Live Imagings*. Nach 20 minütiger Inkubation mit PromoFluor-markiertem Gliadinpeptid ist die Beladung mit Peptid (grün) in Bereichen des Cytoplasma zu erkennen (b), welche vorher schwarz gefärbt waren, da sich dort noch kein Peptid befand.

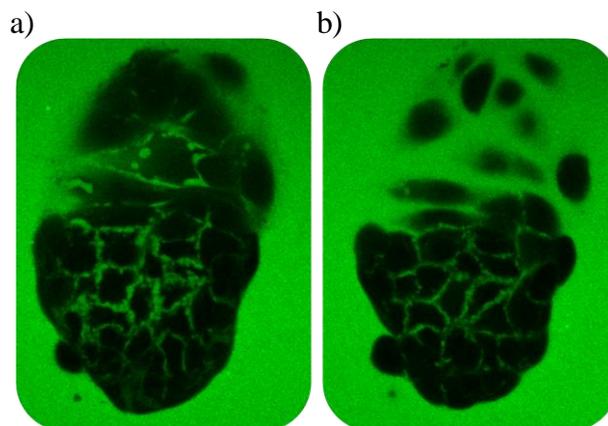


Abb. 4.99: a) Aufnahme einiger Zellgruppierungen zu Beginn des *Live Imagings*, sowie b) nach 20 minütiger Peptidinkubation.

Für die Versuchsdurchführung wurden sowohl Lissamin Rhodamin B- (rot), als auch PromoFluor-markierte (grün) Gliadinpeptide verwendet. In Abb. 4.100 sind Gruppierungen einiger Zellen nach der Gliadinpeptid-Inkubation gezeigt. Bei den schwarzen Bereichen handelt es sich um extrazellulären Raum, auf dem sich kein Peptid befindet. Im Cytoplasma hingegen befinden sich abgrenzbare Bereiche, die mit Peptid beladen sind. Es werden beide Formen der fluoreszenzmarkierten Peptide von Caco-2-Zellen absorbiert, das Lissamin-markierte p31-43 jedoch in höherer Konzentration. Dies ist erkennbar an der Anwesenheit von zahlreichen rot gefärbten, scharf abgrenzbaren Bereichen (rechts in Abb. 4.100), wobei es sich um Kompartimente des endocytotischen Weges handelt.

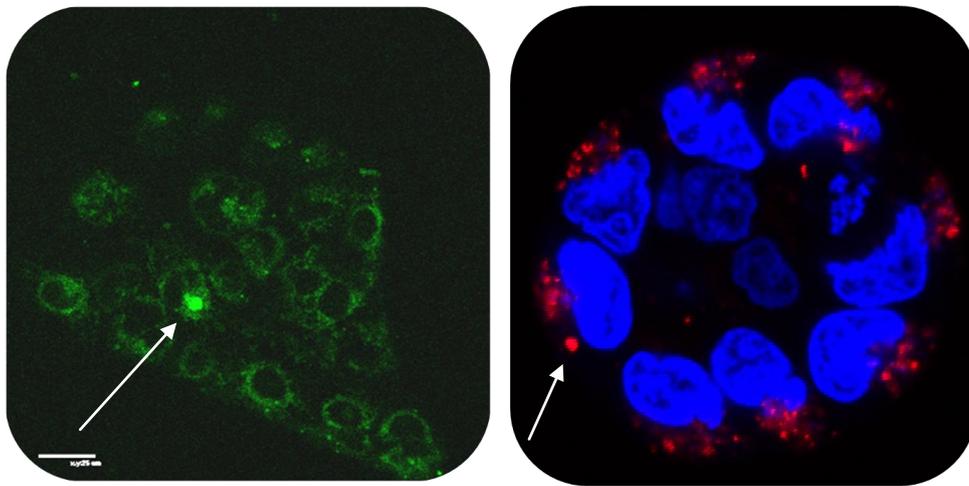


Abb. 4.100: PromoFluor-markiertes (links) und Lissamin-markiertes Gliadinpeptid p31-43 (rechts), welche von Caco-2-Zellen absorbiert wurden. Weiße Pfeile deuten jeweils auf Stellen mit internalisierten Peptiden hin. In der rechten Abbildung sind zusätzlich die Zellkerne fluoreszenzmarkiert (siehe dazu Abschnitt 4.6.2).

Dass die Gliadinpeptid-Aufnahme in intestinalen Caco-2-Zelllinien tatsächlich über Endocytose erfolgt, kann durch die Temperaturabhängigkeit der Peptidaufnahme gezeigt werden. Während die in Abb. 4.101 (rechts) dargestellten Ergebnisse einer Peptidinkubation bei 37 °C entsprechen, findet bei 4 °C und sonst identischen Bedingungen keine Gliadinpeptid-Aufnahme statt (links in Abb. 4.101).

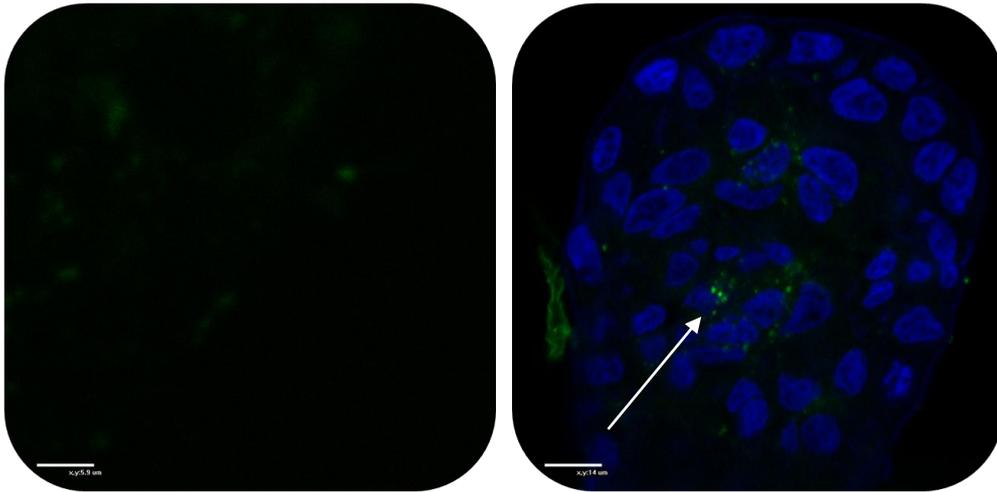


Abb. 4.101: Die Peptidinkubation bei 4 °C (links) zeigt, dass eine Aufnahme von Gliadinpeptiden nahezu vollständig blockiert werden kann. Rechts ist eine Gliadinpeptid-Aufnahme bei 37 °C gezeigt. In der rechten Abbildung wurden zusätzlich die Zellkerne mit einem blauen Hoechst-Farbstoff fluoreszenzmarkiert.

In den durchgeführten Echtzeitaufnahmen zeigten weder die PromoFluor-, noch die Lissamin-markierten Gliadinpeptide Anzeichen von Photobleaching. Darunter versteht man die Zersetzung des Fluorophors in nicht fluoreszenzaktive Fragmente durch das einwirkende Anregungslicht. Somit sind beide Farbstoffe für Immunfluoreszenz-Experimente geeignet.

4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe des in Abschnitt 4.6.1 durchgeführten *Live Imagings* konnte gezeigt werden, dass die fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptide prinzipiell von intestinalen Caco-2-Zelllinien aufgenommen werden. Jedoch kann keine Aussage über ihre Lokalisation im endosomalen Kompartiment gemacht werden. Aber gerade vor dem Hintergrund der Hypothese von Zimmer *et al.* ist die Kenntnis über die Lokalisation von toxischen oder immunodominanten Gliadinpeptiden in den EE oder LE entscheidend. Für diese Zwecke könnten indirekte Immunfluoreszenz-Aufnahmen Aufschluss geben.

Bei dem immunohistochemischen Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie werden die Zellen oder Zellorganelle mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Farbstoffe sind an einen sekundären Antikörper gekoppelt, der wiederum an das Fc-Fragment eines Primärantikörpers bindet. Die Visualisierung erfolgt durch Bindung des farbstoffmarkierten, sekundären Antikörpers an Markerproteine (Antigen) auf der Oberfläche der Zellorganelle. Durch den

Einsatz verschiedener Fluorophore können mehrere Antigene in einem Versuch markiert werden. Mittels spezieller Farbfilter können dann alle Farben isoliert oder im sog. Overlay zeitgleich beobachtet werden.

Für die Versuchsdurchführung wurden Caco-2-Zellen analog der in Abschnitt 4.6.1 beschriebenen Vorgehensweise zum Wachstum gebracht und dann mit 300 μL fluoreszenzmarkiertem Gliadinpeptid inkubiert. Die Bearbeitung der Zellen für das immunohistochemische Verfahren begann mit einer milden chemischen Fixierung mittels Aldehyd-Lösungen, in diesem Fall mit 3%iger Paraformaldehyd-Lösung. Dadurch bleibt die Struktur der Zelle erhalten, jedoch ist sie nicht mehr zur Endocytose befähigt. Für die Doppelmarkierungstechnik der Zellkompartimente musste nun die Zellmembran wieder mit 100 μL einer 0.15%igen Triton-X-100-Lösung permeabilisiert und im Anschluss mit 100 μL einer 1%igen Lösung aus fetalem Kälberserum (FKS) in PBS-Puffer blockiert werden, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Das Early-Endosom-Antigen (EEA1) wurde für die Markierung der EE eingesetzt, wohingegen die LE mit Antikörpern gegen das lysosomale Markerprotein LAMP-2 gekoppelt wurden. Gemäß der Doppelmarkierungstechnik wurde dann der jeweilige primäre Antikörper zur Bindung an das entsprechende Zellkompartiment (EEA1 oder LAMP-2) inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper, welches wiederum an den Primärantikörper bindet. Die sekundären Antikörper waren bei Inkubation von Lissamin-markierten Gliadinpeptiden (rot) mit dem Alexa Fluor 488-Farbstoff (grün) und bei der Inkubation von PromoFluor-markierten Peptiden (grün) mit dem Alexa Fluor 555-Farbstoff (rot) gekoppelt. Für Zellkernfärbungen wurde der Hoechst-Farbstoff 33342 verwendet (Abb. 4.102). Dieser membrangängige, fluoreszierende Bisbenzimid-Farbstoff bindet spezifisch an Adenin-Thymin-Regionen der DNS und besitzt ein Emissionsmaximum von 460 nm, welches als blaues Signal sichtbar gemacht werden kann.

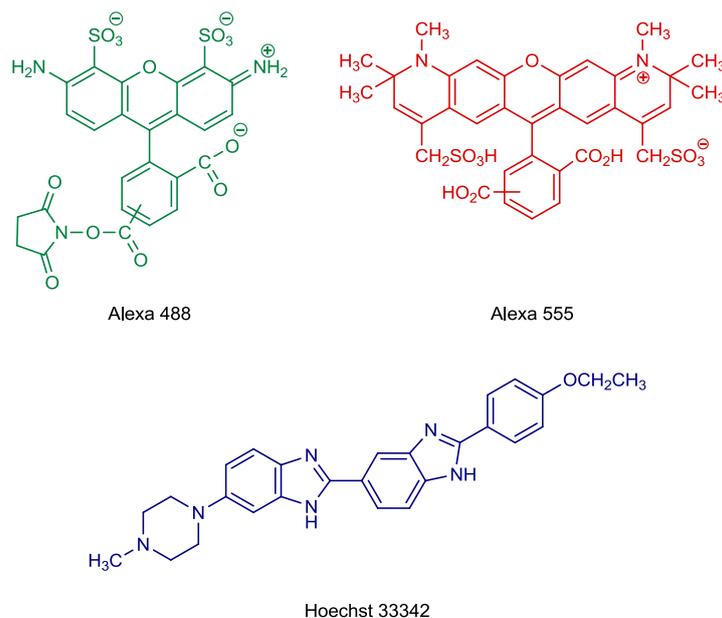


Abb. 4.102: Die für die Markierung der Zellorganelle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 488 und 555, welche jeweils an sekundäre Antikörper gekoppelt waren und der für die Färbung der Zellkerne eingesetzte Hoechst-Farbstoff.

4.4.2.1 PromoFluor-markierte Gliadinpeptide in den EE und LE

Das Transportverhalten von Gliadinpeptiden kann nach Inkubation mit Caco-2-Zellen z.T. mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (wie in 4.6.2 beschrieben) nachgewiesen werden. Dem endocytotischen Wege folgend, werden Nahrungsmittelproteine an der apikalen Membran aufgenommen, erst in die EE und dann in die LE transportiert. EE kann durch Antikörper gegen EEA1 und LE durch Antikörper gegen LAMP-2 markiert werden. Liegen das fluoreszenzmarkierte Peptid sowie der Marker im gleichen Kompartiment, so handelt es sich um eine Co-Lokalisation.

In Abb. 4.103 c) ist die Überlagerungsabbildung von PromoFluor-markiertem p56-68 (**29**) und den EE dargestellt. Eine vorliegende Co-Lokalisation erscheint durch die Mischung von grüner und roter Farbe als gelblich. Dies liegt jedoch in diesem Fall nicht vor. Somit entspricht dieses Ergebnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothese, dass immunodominante Gliadinpeptide, wie das p56-68, in die LE transportiert werden können.

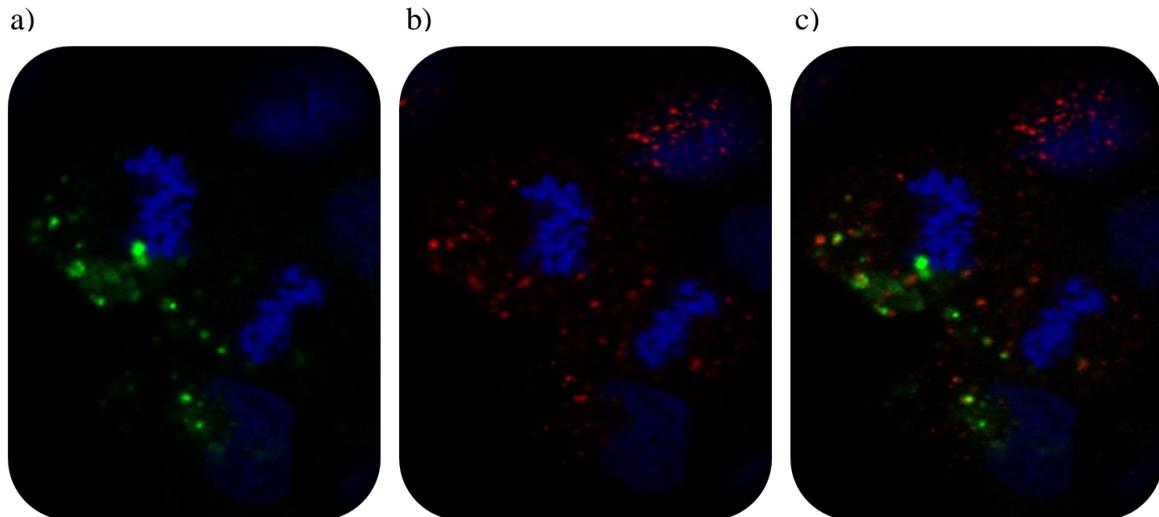


Abb. 4.103: Es liegt keine Co-Lokalisation des p56-68 und den gegen EEA1 markierten EE vor (c). Das PromoFluor-markierte p56-68 (grün) und die rot markierten EEA1 sind jeweils getrennt voneinander in den Teilabbildungen a) und b) dargestellt.

Abb. 4.104 zeigt den Overlay von PromoFluor-markiertem p31-43 (28) und den gegen LAMP-2 markierten LE. Auch hier liegt keine Co-Lokalisation vor, denn toxische Gliadinpeptide sollten laut Hypothese von Zimmer *et al.* in den frühen Endosomen lokalisiert bleiben.

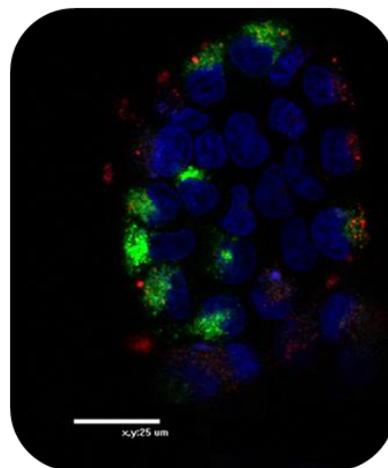


Abb. 4.104: Die Überlagerungsdarstellung von p31-43 und den gegen LAMP-2 markierten LE zeigt, dass – wie erwartet - keine Co-Lokalisation vorliegt.

Abb. 4.103 und Abb. 4.104 zeigen eine der wenigen Positiv-Bespiele bei dem vorliegenden immunohistochemischen Verfahren. Vielmehr war die Durchführung der Co-Lokalisations-Experimente im Falle der PromoFluor-markierten Gliadinpeptiden mit einigen Problemen behaftet.

Aufgrund der geringen Aufnahmefähigkeit in die Caco-2-Zellen, lag nur eine sehr geringe Menge Peptid in den Zellen vor (Abb. 4.105 a), welches für eine evtl. doch vorliegende Co-Lokalisation vermutlich nicht ausreichend war.

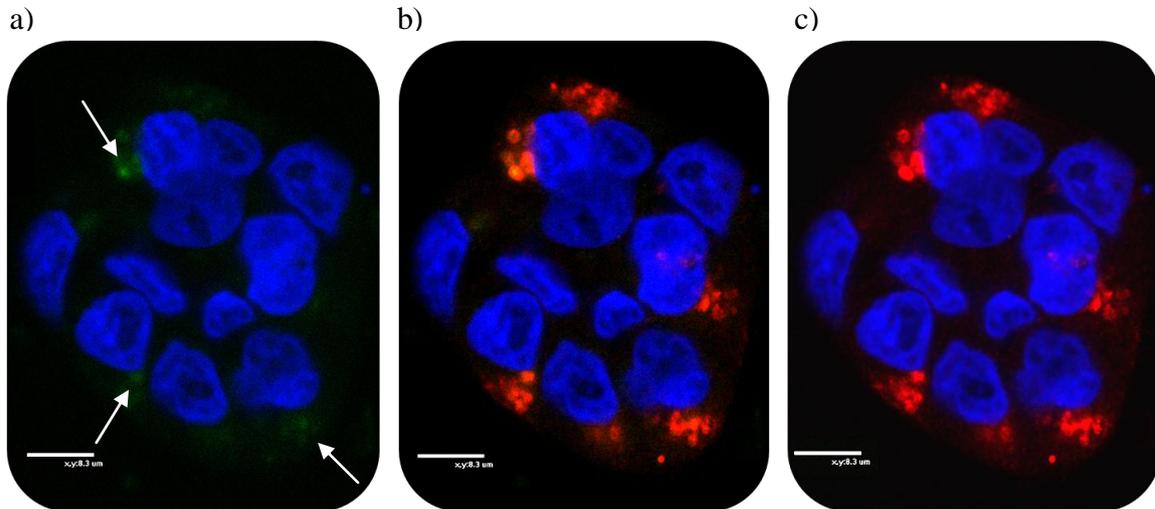


Abb. 4.105: Überlagerungsdarstellung von p31-43 und den gegen LAMP-2 markierten LE. Es liegt keine Co-Lokalisation vor (c). Das PromoFluor-markierte Gliadinpeptid p31-43 (grün) und die rot markierten Markerproteine LAMP-2 sind jeweils getrennt voneinander in den Teilabbildungen a) und b) gezeigt. Die weißen Pfeile deuten auf Bereiche mit internalisiertem Gliadinpeptid.

Die zahlreichen Schritte der Fixierung und des Waschens schienen zudem das Peptid aus den Zellen heraus zu spülen (Abb. 4.106 b).

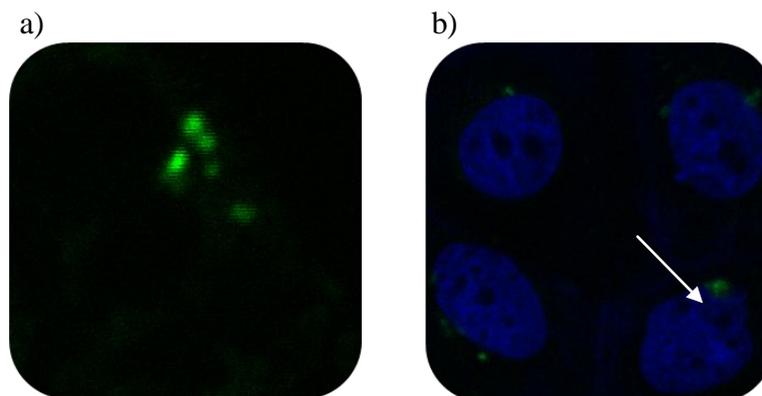


Abb. 4.106: a) Fluoreszenzmarkiertes Gliadinpeptid, welches durch die intestinalen Caco-2-Zelllinien aufgenommen wurde. Es handelt sich um eine Aufnahme vor dem Schritt der Fixierung mit Paraformaldehyd und vor den Waschvorgängen. b) Nach der Fixierung wurde eine große Menge des Peptids aus den Zellen heraus gespült.

4.4.2.2 Lissamin-markierte Gliadinpeptide in den EE und LE

Wie in Abschnitt 4.6.2 bereits angesprochen, werden Lissamin-markierte Gliadinpeptide besser in Caco-2-Zellen aufgenommen.

So ist in Abb. 4.107 a) ein Bereich häufiger Co-Lokalisation von Lissamin-markiertem, toxischem Gliadinpeptid p31-43 (**31**) mit den gegen EEA1 markierten EE zu sehen. Im Gegensatz dazu erfolgt keine Co-Lokalisation von p31-43 in den gegen LAMP-2 markierten LE (Abb. 4.107 b).

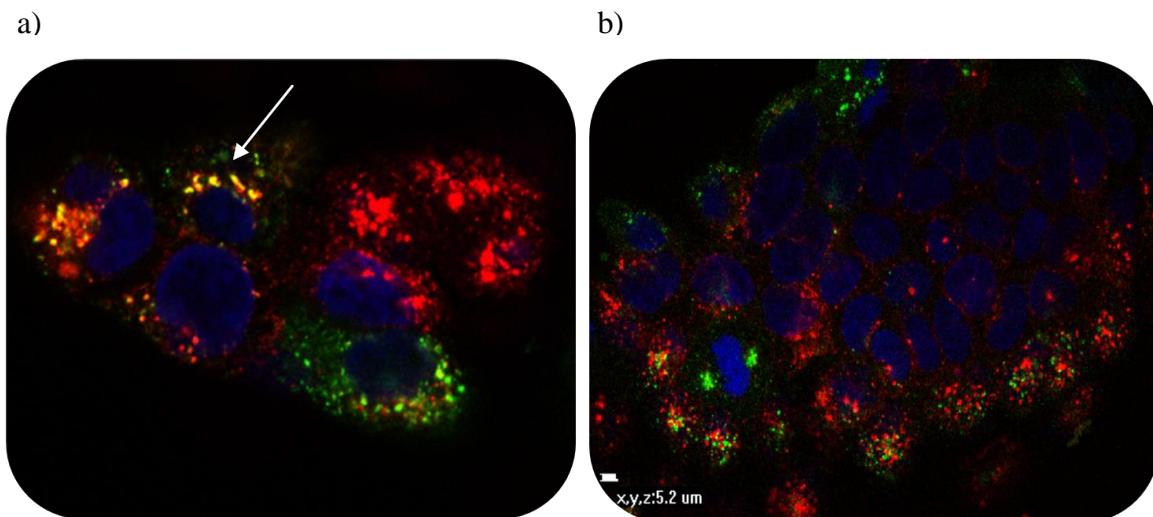


Abb. 4.107: **a)** Aufnahme von Liss-p31-43 (rot) in die frühen EE (weißer Pfeil). Die gegen EEA1 markierten EE sind in grüner Fluoreszenzfarbe dargestellt und die Zellkerne in blau. **b)** Liss-p31-43 ist in nicht relevanter Menge in den LE lokalisiert. Das gegen LAMP-2 markierte LE ist in grün dargestellt.

Betrachtet man die Überlagerungsdarstellungen von Lissamin-markiertem, immunodominantem Gliadinpeptid p56-68 (**32**), so ist zunächst eine Aufnahme in die EE – so wie dies für jedes Nahrungsantigen zutrifft – zu sehen (Abb. 4.108 a). Jedoch kann im nächsten Schritt – entgegen der Erwartung - keine Co-Lokalisation von Liss-p56-68 in den LE identifiziert werden (b).

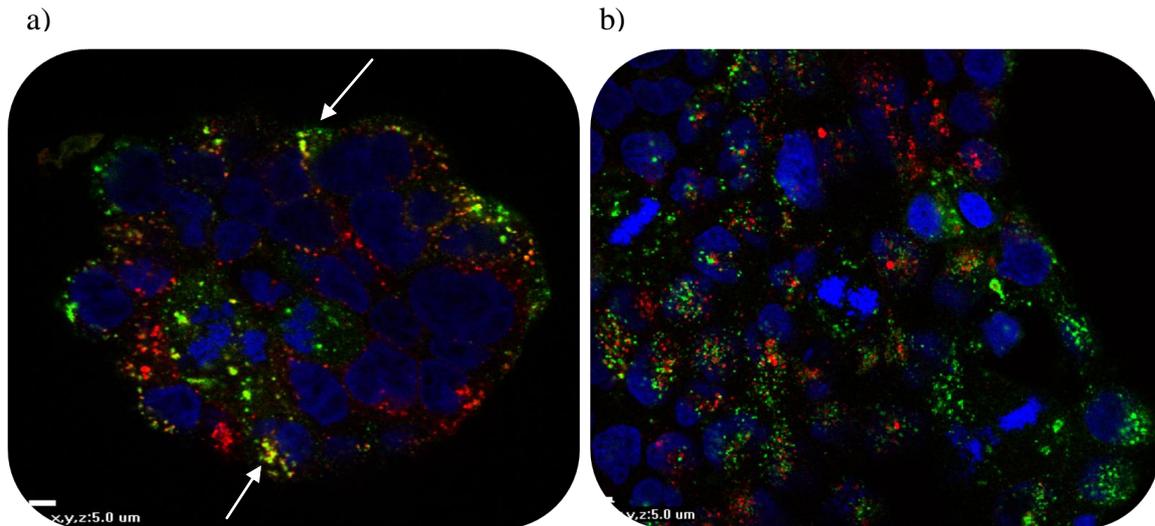


Abb. 4.108: **a)** Co-Lokalisation von Liss-p56-68 (rot) in den gegen EEA1 grün markierten EE (Bereiche der Co-Lokalisation sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet). **b)** Entgegen der zugrundeliegenden Hypothese ist keine signifikante Aufnahme von immunodominantem p56-68 in die LE zu erkennen. Die gegen LAMP-2 markierten LE sind in grün dargestellt.

Zusammenfassend konnte anhand des *Live Imaging* gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkierte Gliadinpeptide mittels Endocytose von Caco-2-Zellen aufgenommen werden können. Hierbei zeigten die mit dem PromoFluor-Farbstoff markierten Peptide nur eine geringe Aufnahmefähigkeit, wohingegen die Lissamin-markierten Peptide in signifikanter Menge internalisiert wurden. Dass es sich bei der vorliegenden Internalisierung um eine Endocytose handelte, konnte durch Vergleich der Aufnahmen bei 4 °C und 37 °C gezeigt werden.

Wie die Co-Lokalisationsexperimente von Liss-p31-43 und Liss-p56-68 zeigen, wurden beide in die EE aufgenommen. Dies war zu erwarten, da Nahrungsmittelproteine an der apikalen Membran der Enterocyten aufgenommen, und über die EE in die LE transportiert werden. Gemäß der von Zimmer *et al.* aufgestellten Hypothese konnte keine signifikante Aufnahme des toxischen Gliadinpeptids p31-43 in die LE beobachtet werden. Jedoch konnte – entgegen der Erwartung – auch keine Co-Lokalisation von nicht toxischem p56-68 in den LE festgestellt werden.

Indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie ist prinzipiell eine elegante Methode, um eine Aussage über die Lokalisation von Antigenen im endosomalen Kompartiment zu machen. Im Falle von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden stößt sie jedoch auf Grenzen. Für das

immunohistochemische Verfahren ist die Fixierung der Caco-2-Zellen, sowie anschließende Permeabilisierung mit dem Tensid Triton-X-100 unerlässlich. Im letzten Schritt werden Löcher in der Zellmembran erzeugt, um eine Aufnahme der primären und sekundären Antikörper für die Doppelmarkierungstechnik zu ermöglichen. Da es sich bei der Aufnahme des Gliadinpeptids hingegen um keine Rezeptor-vermittelte Endocytose handelt, wird bei diesem Arbeitsschritt gleichzeitig das Peptid aus der Zelle heraus gespült. Somit liegt keine ausreichende Menge des Gliadinpeptids vor, um eine evtl. vorliegende Co-Lokalisation anzuzeigen.

Um den Schritt der Fixierung und Permeabilisierung zu umgehen, ist eine DNA-Transfektion der Caco-2-Zellen mit fluoreszierenden Proteinen möglich. Dabei wurde Fremd-DNA in die Zellen eingebracht, welche Gene besitzen, die die Synthese von fluoreszierenden Proteinen codieren. So könnten sich z.B. bei der anschließenden Differenzierung der Caco-2-Zellen fluoreszierende Markerproteine der EE und LE ausbilden. Eine Transfektion ist jedoch nur sinnvoll, sofern eine Transfektionsrate von mindestens 50% vorliegt. Dies trifft für Caco-2-Zellen nicht zu. Vielmehr wurden die Proteine von den Zellen nicht angenommen, so dass diese Möglichkeit nicht zum Erfolg führte.

Aufgrund dieser vorliegenden methodischen Schwierigkeiten im Rahmen der durchgeführten Experimente mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, können die oben gezeigten Ergebnisse bei der Beurteilung der Hypothese nicht berücksichtigt werden.

Erfolgsversprechend wäre die Durchführung der Co-Lokalisationsexperimente mit einem fluoreszenzmarkierten CTB-Gliadinpeptid-Konjugat, da CTB über eine GM1-Rezeptor-vermittelte Endocytose aufgenommen wird.

4.5 Untersuchung des intrazellulären Gliadinpeptidtransports mit Hilfe eines Transwell-Systems

Während des Verdauungsprozesses müssen Nahrungsantigene das intestinale Epithel sowohl als physikalische, als auch als biologische Barriere passieren.

Kleine, wasserlösliche Moleküle (Zucker, Aminosäuren, Vitamine, Mineralien) werden über einen sog. parazellulären Weg durch das intestinale Epithel transportiert. Der parazelluläre

Transport wird durch die Permeabilität von Tight Junctions reguliert. Größere, lipophile Substanzen (Peptide, Proteine) können über (z.T. Rezeptor-vermittelte) Endocytose ins Darmlumen gelangen (transzellulärer Transport). Das internalisierte Material gelangt häufig über das EE und LE in die Lysosomen, wo es weiter enzymatisch abgebaut wird. Über Endocytose aufgenommene Antigene können außerdem in HLA-DR-positiven intestinalen Kompartimenten T-Lymphocyten des Immunsystems präsentiert werden.

Bis jetzt ist nicht bekannt, wie Gliadinpeptide das intestinale Epithel passieren. Während immunodominante Gliadinpeptide, wie das p56-68, eine adaptive Immunantwort induzieren, können toxische Peptide, wie p31-43, direkt Schäden an der Epithelschicht verursachen, indem sie das angeborene Immunsystem aktivieren. Da toxische und immunodominante Gliadinpeptide eine so unterschiedliche Wirkung auf das Immunsystem ausüben, wird vermutet, dass verschiedene Prozessierungsmechanismen vorliegen, die entweder die Eigenschaften des Antigens ändern oder dessen Präsentation an den MHC-Proteinen. Es stellt sich daher die Frage, ob und wie das intestinale Epithel eine Rolle bei der Prozessierung von Gliadinpeptiden (parazellulärer oder transzellulärer Weg) und somit einen entscheidenden Schritt bei der Pathogenese von Zöliakie spielt.

4.5.1 Experimentelle Durchführung

Um den Transport von Gliadinpeptiden durch intestinale Epithelzellen zu untersuchen, können Caco-2-Zellen verwendet werden. Von dieser menschlichen, intestinalen Epithel-Zelllinie ist bekannt, dass sie eine Monolage mit vielen intestinalen Funktionen ausbildet. So differenzieren Caco-2-Zellen bei Kultivierung spontan zu Epithelzellen mit Tight Junctions, einer Mikrovilli-Struktur, einer Vielzahl von Verdauungsenzymen, Transportern und Rezeptoren an der Bürstensaummembran und der typischen Polarität aus apikaler und basolateraler Membran.

Für die *in vitro*-Untersuchung des Gliadinpeptidtransports wurden etwa 7.5×10^4 Zellen/well Caco-2-Zellen auf Transwell-Filtern in einem Zellkulturmedium, bestehend aus DMEM, 20% FKS und 1% PenStrep (Antibiotika), ausgesät. Die Zellen wurden für 16 Tage wachsen gelassen, bis die Transwell-Filter postkonfluent mit einem dichten, lückenlosen Zellrasen besiedelt waren. Dann wurde für 30 min in Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Um die Unversehrtheit der Zellmembran zu kontrollieren,

erfolgte vor und nach der Versuchsdurchführung die Messung des Widerstandes zwischen dem apikalen und basolateralen Medium mit Hilfe einer Elektrode. Zur Untersuchung des Transports wurden jeweils 100 μL fluoreszenzmarkiertes Gliadinpeptid apikal, sowie 400 μL HBSS basolateral zugegeben. Die Inkubationen wurden mit PromoFluor-markiertem p31-43 und p56-68 Gliadinpeptid in einer konzentrations- (32 μmol , 145 μmol Peptidlösung), temperatur- (37 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}$), sowie zeitabhängigen Weise (3 h, 24 h) durchgeführt. Ob eine Transcytose (Endocytose in einer polarisierten Epithelzelle) als potentiell möglicher transzellulärer Mechanismus des Gliadintransports in Frage kommt, wurde durch Co-Inkubation mit dem Endocytosehemmer Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) geprüft.

Nach der Inkubation wurden die apikalen und basolateralen Überstände der Transwells mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen, um den Transport der Gliadinpeptide durch die Zellmembran zu quantifizieren. Strukturelle Veränderungen der Peptide wurden anhand von MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die Transwellmembran hingegen, auf der sich die Zellen befinden, wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert, um die zelluläre Aufnahme der Peptide zu bestimmen (Abb. 4.109).

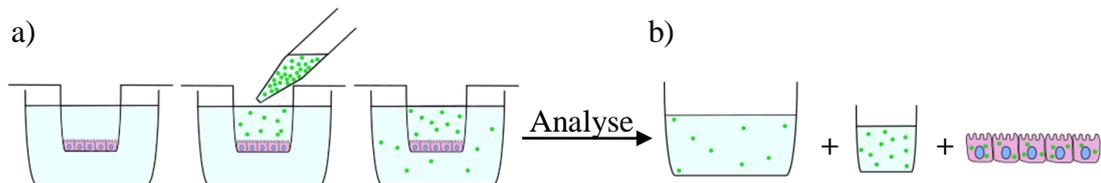
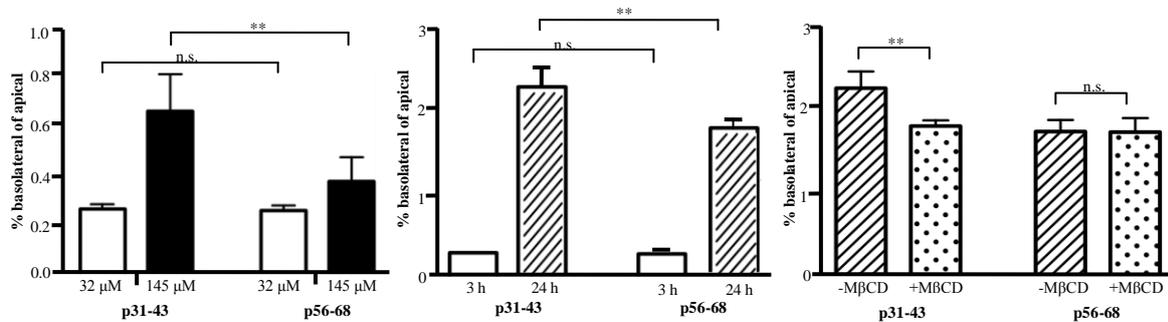


Abb. 4.109: Durchführung des Experiments. **a)** Caco-2-Zellen wurden in einem Transwellssystem mit fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden inkubiert. **b)** Die apikalen und basolateralen Überstände wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert, wohingegen die Transwellmembran mit Hilfe von Durchflusszytometrie und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie charakterisiert wurde.

4.5.2 Fluoreszenzspektroskopie und MALDI-TOF-Analyse mit PromoFluor-markierten Gliadinpeptiden

In Grafik 1 a+b) sind die Ergebnisse des konzentrations- und zeitabhängigen Transports von PromoFluor-markiertem toxischen p31-43 und immunodominantem p56-68 von der apikalen zur basolateralen Membran in % dargestellt. Beide Peptide sind befähigt, eine intakte Monoschicht aus Caco-2-Zellen zu passieren. Wie zu erwarten, ist der Transport nach 24-

stündiger Inkubation und bei höherer Peptidkonzentration erhöht. Im Vergleich zum Gliadinpeptid p56-68, ist die Aufnahme vom toxischen p31-43 signifikant höher. Zudem wird durch Co-Inkubation mit M β CD die Aufnahme von toxischem Gliadinpeptid p31-43 merklich inhibiert (Grafik 1c), welches ein Indiz für das überwiegende Vorliegen des transzellulären Transportweges ist.



Grafik 1: Transport von Gliadinpeptiden vom apikalen zum basolateralen Kompartiment einer Caco-2-Monoschicht gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie und angegeben in %. **a)** Inkubation der Gliadinpeptide p31-43 und p56-68 jeweils mit einer Konzentration von 32 μ mol/ μ L bzw. 145 μ mol/ μ L. Die Inkubationsdauer beträgt 3 h. **b)** Inkubation von p31-43 und p56-68 für 3 h bzw. 24 h. Die Konzentrationen betragen jeweils 32 μ mol. **c)** Inkubation der Peptide p31-43 und p56-68 ($c = 32$ μ mol/ μ L) mit bzw. ohne Endocytose-Hemmer M β CD. Die Ergebnisse sind als Mittelwert zweier Versuchsreihen und deren Standardabweichung angegeben. Der p-Wert bezieht sich auf die statistische Signifikanz und ist als ** ($p > 0.01$) angegeben. n.s.: nicht signifikant.

Durch Analyse mittels MALDI-TOF konnte nach dreistündiger Inkubation mit dem PromoFluor-markierten Gliadinpeptid p56-68 im apikalen Überstand das intakte, fluoreszenzmarkierte Peptid durch das Signal 2040.0 $[M+H]^+$, sowie als Na-Addukt ($m/z = 2063.0$) nachgewiesen werden (Abb. 4.110; **1** in Tabelle 4.9). Darüber hinaus sind zahlreiche Fragmente mit und ohne den PromoFluor-Farbstoff zu finden. Fragmente wie z.B. PromoFluor-LQLQPFQPQLP, PromoFluor-LQL oder PromoFluor-LQ deuten auf eine sukzessive C-terminale Spaltung einzelner Aminosäuren innerhalb des Peptids hin. Wohingegen Fragmente wie QLQPFQPQLPY, QPFQPQLPY oder FPQPQLPY einer sukzessiven N-terminalen Spaltung entsprechen (Tabelle 4.9).

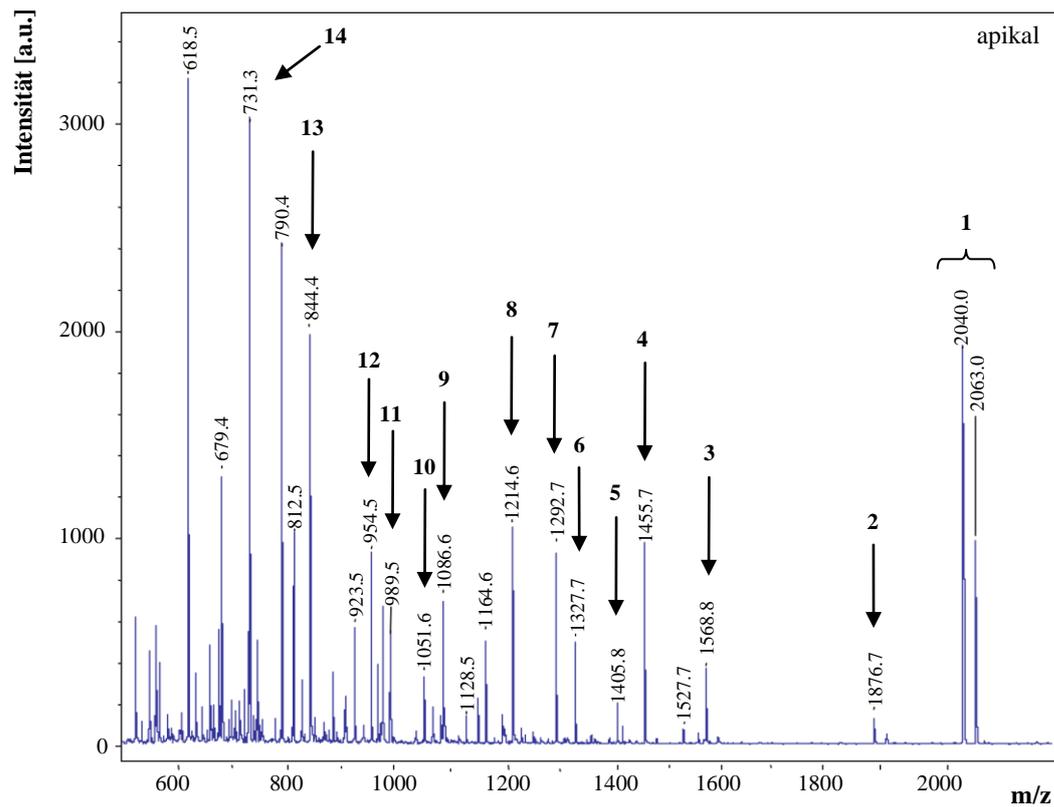


Abb. 4.110: Massenspektrometrische Analyse des apikalen Mediums eines Transwellsystems nach dreistündiger Inkubation mit dem Gliadinpeptid p56-68 ($c = 145 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.9: Die mittels MALDI-TOF im apikalen Medium nachweisbaren Gliadinfragmente.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	2040.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	intaktes PromoFluor-LQLQPFQPQLPY
	2063.0	$[\text{M}+\text{K}]^+$	
2	1867.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PromoFluor-LQLQPFQPQLP
3	1568.8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LQLQPFQPQLPY
4	1455.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	QLQPFQPQLPY
5	1405.8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LQLQPFQPQLP
6	1327.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LQPFQPQLPY
7	1292.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	QLQPFQPQLP
8	1214.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	QPFQPQLPY
9	1086.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PFPQPQLPY
10	1051.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	QPFQPQLP
11	989.5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	FPQPQLPY
12	954.5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LQPFQPQ oder QPFQPQLP
13	844.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PromoFluor-LQL
14	731.3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PromoFluor-LQ

Die massenspektrometrische Analyse der basolateralen Überstände von mit PromoFluor-p56-68 inkubierten Caco-2-Zellen weist das Peptid ausschließlich in intakter Form auf (Abb. 4.111).

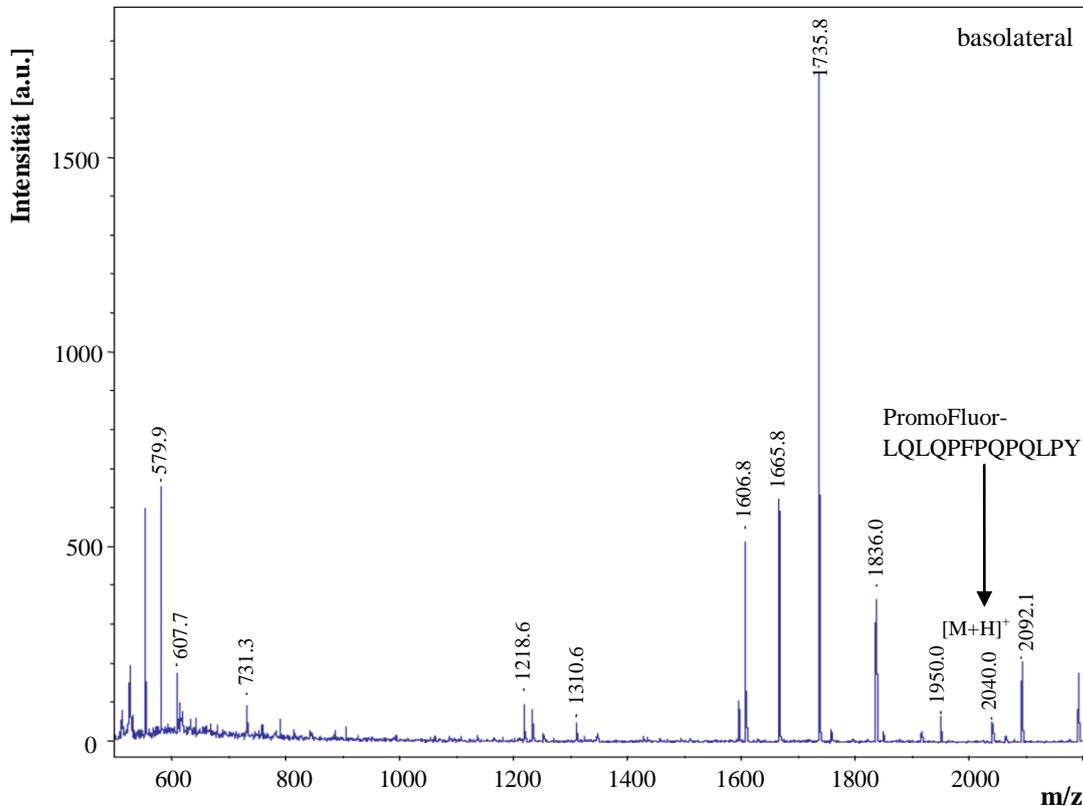


Abb. 4.111: Analyse des basolateralen Überstandes mittels MALDI-TOF nach dreistündiger Inkubation mit dem PromoFluor-p56-68 ($c = 145 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Auch die apikalen und basolateralen Überstände von PromoFluor-p31-43 nach dreistündiger Inkubation wurden massenspektrometrisch analysiert.

Hier konnten in den apikalen Überständen, neben intaktem Peptid mit dem Massensignal 1999.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, zahlreiche Spaltprodukte von PromoFluor-p31-43, sowie Fragmente mit abgespaltenem Farbstoff nachgewiesen werden (Abb. 4.112). Diese sind in Tabelle 4.10 dargestellt. Wie schon bei dem PromoFluor-markierten p56-68-Peptid deuten auch hier Fragmente wie PromoFluor-LGQQQPFPQQP, PromoFluor-LGQQQPF oder PromoFluor-LGQ auf eine sukzessive Spaltung einzelner Aminosäuren entlang des *N*-Terminus hin. Die Fragmente GQQQPFPQQPY, QQPFPQQPY oder FPPQQPY hingegen entsprechen einer Spaltung entlang des *C*-Terminus.

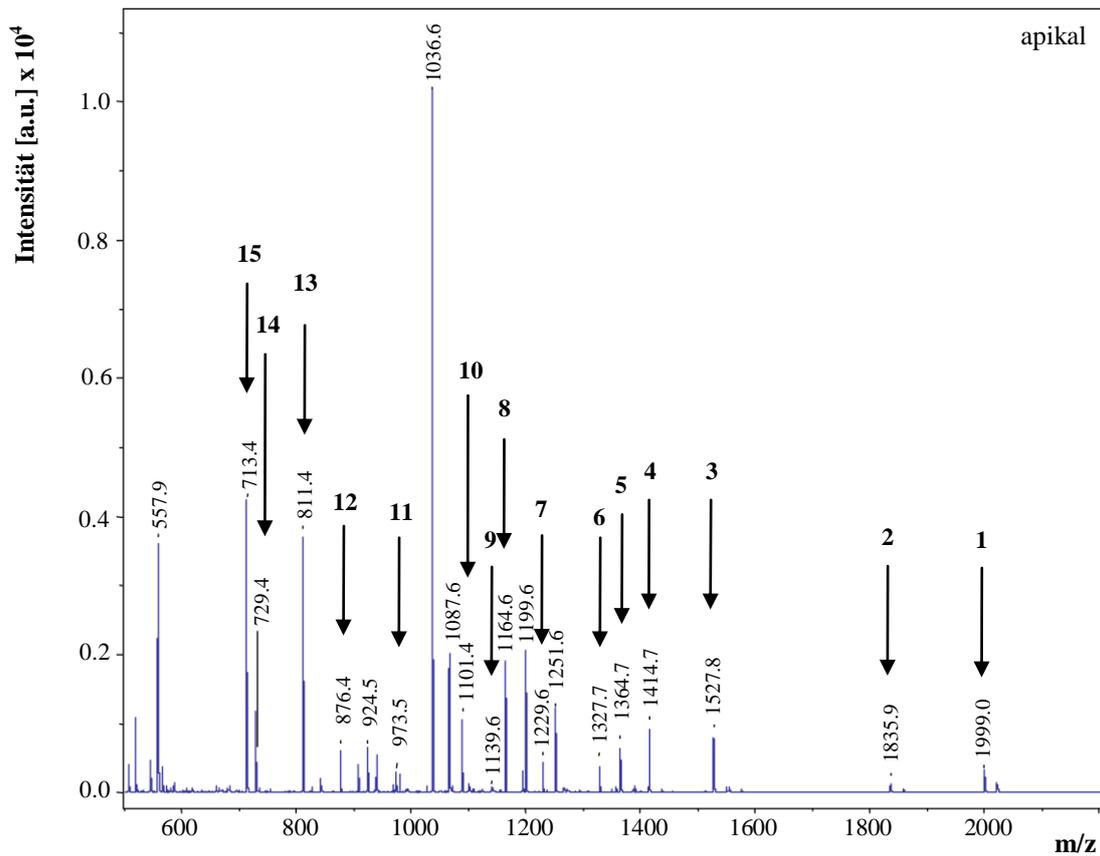


Abb. 4.112: Massenspektrometrische Analyse des apikalen Mediums eines Transwellsystems nach dreistündiger Inkubation mit dem Gliadinpeptid p31-43 ($c = 145 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.10: Die nach Inkubation mit p31-43 im apikalen Medium nachgewiesenen Peptidfragmente.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	1999.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	intaktes PromoFluor-LGQQQPFPPQQPY
2	1835.9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PromoFluor-LGQQQPFPPQQP
3	1527.8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LGQQQPFPPQQPY
4	1414.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	GQQQPFPPQQPY
5	1364.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LGQQQPFPPQQP
6	1327.7	$[\text{M}+\text{K}]^+$	PromoFluor-LGQQQPF
7	1229.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	QQPFPPQQPY
8	1164.6	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	PromoFluor-LGQQQP
9	1139.6	$[\text{M}+\text{K}]^+$	LGQQQPFPPQ oder QPFPPQQPY
10	1101.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	QPFPPQQPY
11	973.5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PFPPQQPY
12	876.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	FPPQQPY
13	811.4	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	PromoFluor-LGQ
14	729.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PPQQPY
15	713.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PFPPQQ / QQPFPP / QPFPPQ / FPPQQP

In den basolateralen Überständen von mit PromoFluor-p31-43 inkubierten Caco-2-Zellen ist massenspektrometrisch kein Peptid in intakter Form zu finden (Abb. 4.113). Auch die Anzahl der Spaltprodukte ist deutlich geringer (Tabelle 4.11).

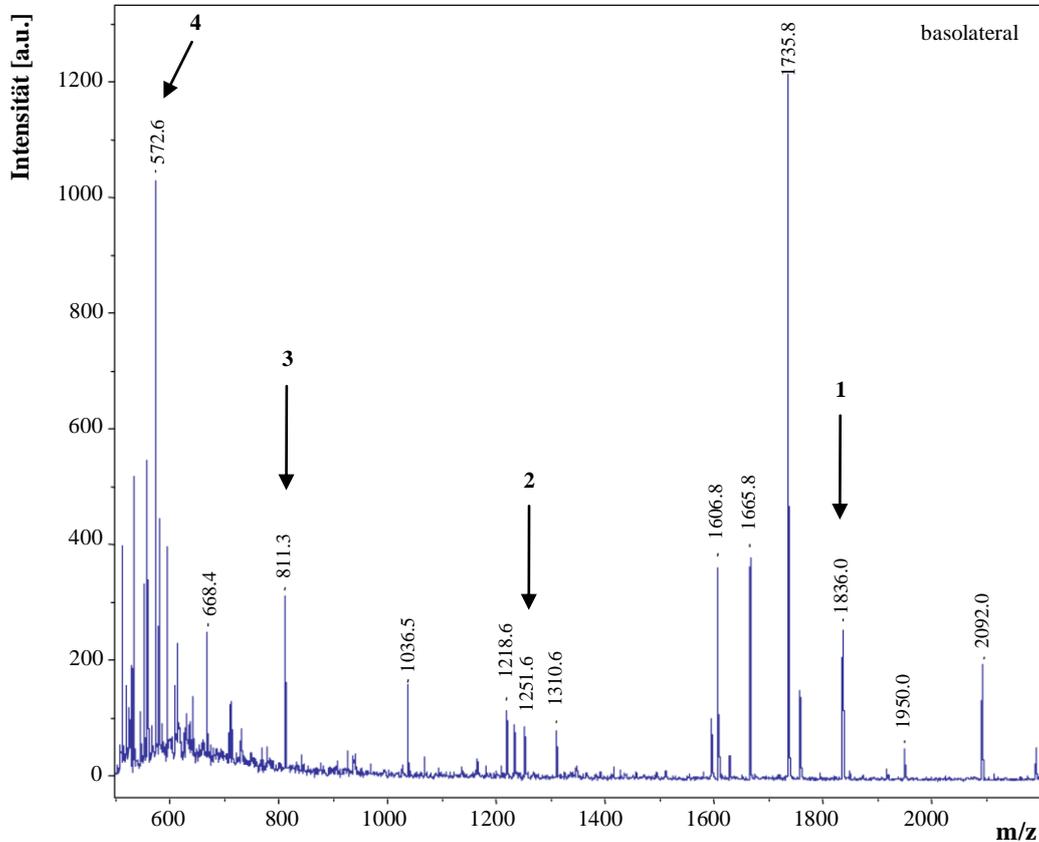


Abb. 4.113: Massenspektrometrische Analyse des basolateralen Mediums eines Transwell-Systems nach dreistündiger Inkubation mit PromoFluor-markiertem p31-43 ($c = 145 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.11: Die mittels MALDI-TOF im basolateralen Medium nachweisbaren Gliadinfragmente nach Inkubation mit PromoFluor-markiertem p31-43-Peptid.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	1836.0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PromoFluor-LGQQQPFPPQQP
2	1251.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	GQQQPFPPQQP
3	811.3	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	PromoFluor-LGQ
4	572.8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	LGQQQ

Zusammenfassend konnten mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie strukturelle Veränderungen sowohl des immunodominanten PromoFluor-p56-68 (**29**), als auch des toxischen PromoFluor-p31-43-Peptids (**28**) identifiziert werden. Bei den vorliegenden Fragmenten handelt es sich um die sukzessive, sowohl C- als auch N-terminale, Abspaltung einzelner Aminosäuren entlang der Peptidsequenz. Auffällig ist das vermehrte Auftreten von Spaltprodukten im apikalen Überstand im Vergleich zum basolateralen Medium. Vermutlich werden die Gliadinpeptide auf der apikalen Seite durch verschiedene Peptidasen degradiert, welche auf der Oberfläche von Caco-2-Zellen exprimiert sind.

Ähnliche Ergebnisse konnte bereits die Arbeitsgruppe von Schumann *et al.* erzielen.²⁴⁴ Sie wiesen eine Transcytose des Gliadinpeptids p56-88 und teilweise Degradation durch ein rab5-positives^{f,245} Endocytose-Kompartiment nach.

4.5.3 Durchflussscytometrie und Fluoreszenz-Laser-Scanning Mikroskopie mit PromoFluor-markierten Gliadinpeptiden

Das Prinzip der Durchflussscytometrie

Die Durchflussscytometrie beschreibt ein Messverfahren, welches die Analyse von Zellen erlaubt, die in einem hohen Tempo einzeln an einem Licht- bzw. Laserstrahl vorbei fließen. Je nach Form und Struktur der Zellen werden unterschiedliche Effekte erzeugt, aus denen die Eigenschaften der Zellen abgeleitet werden können.

Die Zellprobe in Form einer Suspension durchläuft das Cytometer und wird mit Hilfe eines laminaren Mantelstroms (Pufferlösung) hydrodynamisch fokussiert. Dadurch tritt die Probe in Form einzelner Zellen nacheinander in den Kanal einer Küvette, wo diese den Messbereich eines Laserstrahls passieren. Das dabei entstehende Streulicht und Fluoreszenzsignal im Fall von fluoreszenzmarkierten Zellproben wird von einem Detektor ausgewertet, bei dem es sich in der Regel um einen Photomultiplier handelt, welches das eingehende Signal verstärkt.

^f Rab5 ist eine in den EE lokalisierte GTPase. Es reguliert die Fusion von Endocytose-Vesikeln mit den EE.

Wenn einzelne fluoreszierende Partikel den Laserstrahl passieren, so wird die Energie des emittierten Photons durch den Photomultiplier in ein elektronisches Signal (Spannung) umgewandelt. Das Cytometer misst die Summe aller Signale über die Zeit.

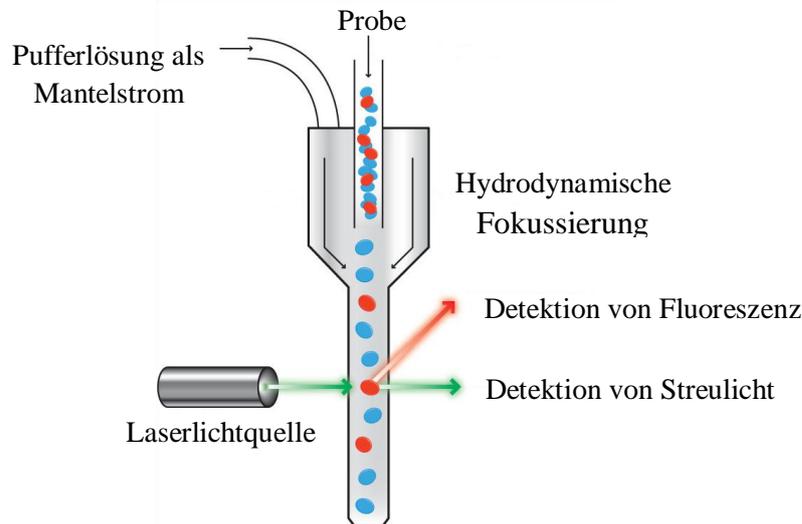


Abb. 4.114: Schematische Darstellung des Prinzips eines Durchflusscytometers.²⁴⁶

Zur Auswertung der Messdaten wird auf der x-Achse in logarithmischer Verstärkung die Lichtintensität und auf der y-Achse die Zellzahl eingetragen.²⁴⁷⁻²⁴⁹

Endocytose ist ein temperaturabhängiger Prozess. Mit Hilfe von Durchflusscytometrie konnte gezeigt werden, dass beide fluoreszenzmarkierten Peptide p31-43 und p56-68 bei 37 °C nach dreistündiger Inkubation durch Caco-2-Zellen aufgenommen werden. Dies ist jeweils in Abb. 4.115 a) und c) durch eine Rechtsverschiebung der grünen Kurve zu höherer Fluoreszenzintensität zu erkennen, im Vergleich zur Kontrollkurve (in schwarz dargestellt). Im Gegensatz dazu wird die Aufnahme bei einer Temperatur von 4 °C merklich herab gesetzt (als rote Kurve in Abb. 4.115 a) und c) dargestellt). Die Fluoreszenzintensität der roten Kurven liegt jeweils im Bereich des Kontrollversuchs, somit sind die roten und schwarzen Kurven fast deckungsgleich.

Auch die mikroskopische Beurteilung der Zellen ergab das gleiche Ergebnis. Hierfür wurde die Transwellmembran, auf der sich die Zellen befinden, isoliert und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben. Die Peptidaufnahme in die Zellen wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop beurteilt (Abb. 4.115 b) und d).

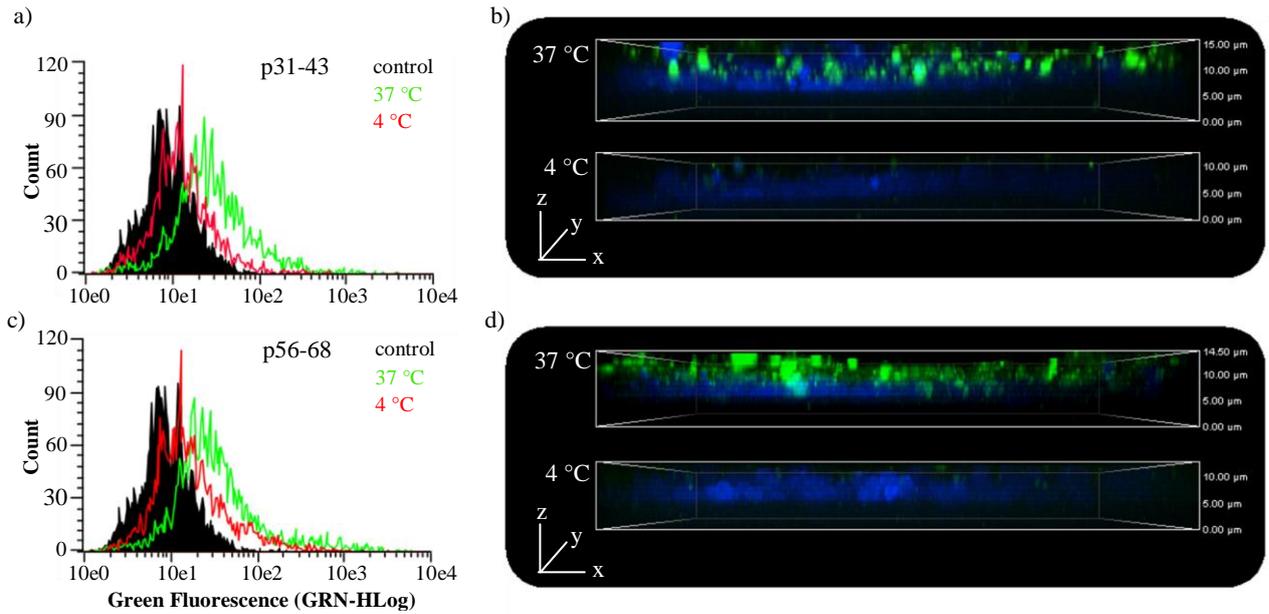


Abb. 4.115: Durchflusszytometrie von Caco-2-Zellen nach dreistündiger Inkubation mit dem Gliadinpeptid p31-43 (a) und p56-68 (c) bei 37 °C und 4 °C. Mikroskopische Beurteilung der Zellen nach Inkubation mit p31-43 (b) bzw. p56-68 (d) bei 37 °C und 4 °C mittels konfokalem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop. Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt und sind in blau dargestellt. Die mit dem PromoFluor-Farbstoff markierten Gliadinpeptide sind in grün dargestellt.

Bei Co-Inkubation von PromoFluor-p31-43 mit dem Endocytosehemmer M β CD zeigen die durchflusszytometrische und mikroskopische Analyse eine deutliche Inhibition der Peptidaufnahme in die intestinalen Zellen (in Abb. 4.116 a) als rote Kurve dargestellt, sowie in Abb. 4.104 b) unten). Im Gegensatz dazu kann keine signifikante Hemmung der Aufnahme von PromoFluor-p56-68 beobachtet werden (Abb. 4.116 c) und d). Somit scheint der transzelluläre Transport über Endocytose, im Gegensatz zu p56-68, der bevorzugte Aufnahmeweg für das toxische Gliadinpeptid p31-43 zu sein.

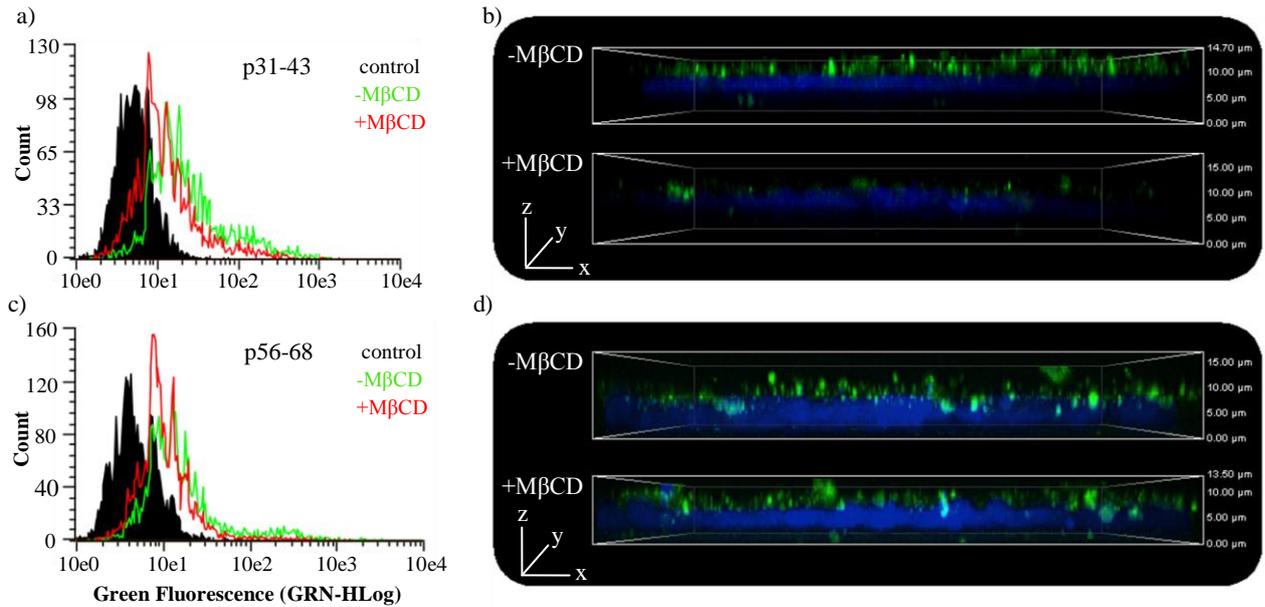


Abb. 4.116: Durchflusszytometrie von Caco-2-Zellen nach dreistündiger Inkubation mit dem Gliadinpeptid p31-43 (a) und p56-68 (c) mit (rote Kurve) und ohne (grüne Kurve) M β CD. Mikroskopische Beurteilung der Zellen nach Inkubation mit p31-43 (b) bzw. p56-68 (d) mit (unten) bzw. ohne (oben) M β CD mittels konfokalem Fluoreszenz-Laserscanning-Mikroskop. Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt und sind in blau dargestellt. Die mit dem PromoFluor-Farbstoff markierten Gliadinpeptide sind in grün dargestellt.

4.5.4 MALDI-TOF-Analyse mit Lissamin-markierten Gliadinpeptiden

Um das Vorliegen von strukturellen Veränderungen, wie bereits anhand von PromoFluor-markierten Peptiden p31-43 (28) und p56-68 (29) nachgewiesen, zu überprüfen, wurden *in vitro*-Untersuchungen mit Lissamin-markierten p31-43- (54) und p56-68-Peptiden (57) durchgeführt. Hierzu wurden diese wie in Abschnitt 4.7.1 beschrieben in einem Transwellsystem für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die apikalen und basolateralen Überstände der Transwells mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Nach 24-stündiger Inkubation mit Liss-Ahx-p56-68 (57) ist kein intaktes Peptid im apikalen Überstand zu identifizieren (Abb. 4.117). Vielmehr kann mit dem Massensignal 2082.0 [M+H]⁺ das Peptid mit C-terminal abgespaltenem Tyrosin nachgewiesen werden. Auch Fragmente wie Liss-Ahx-LQLQPFQPQL, Liss-Ahx-LQLQ oder Liss-Ahx-L deuten auf eine sukzessive C-terminale Spaltung hin. Ahx-LQLQPFQPQ stellt ein zusätzlich N-terminal gespaltenes Fragment dar (Tabelle 4.12).

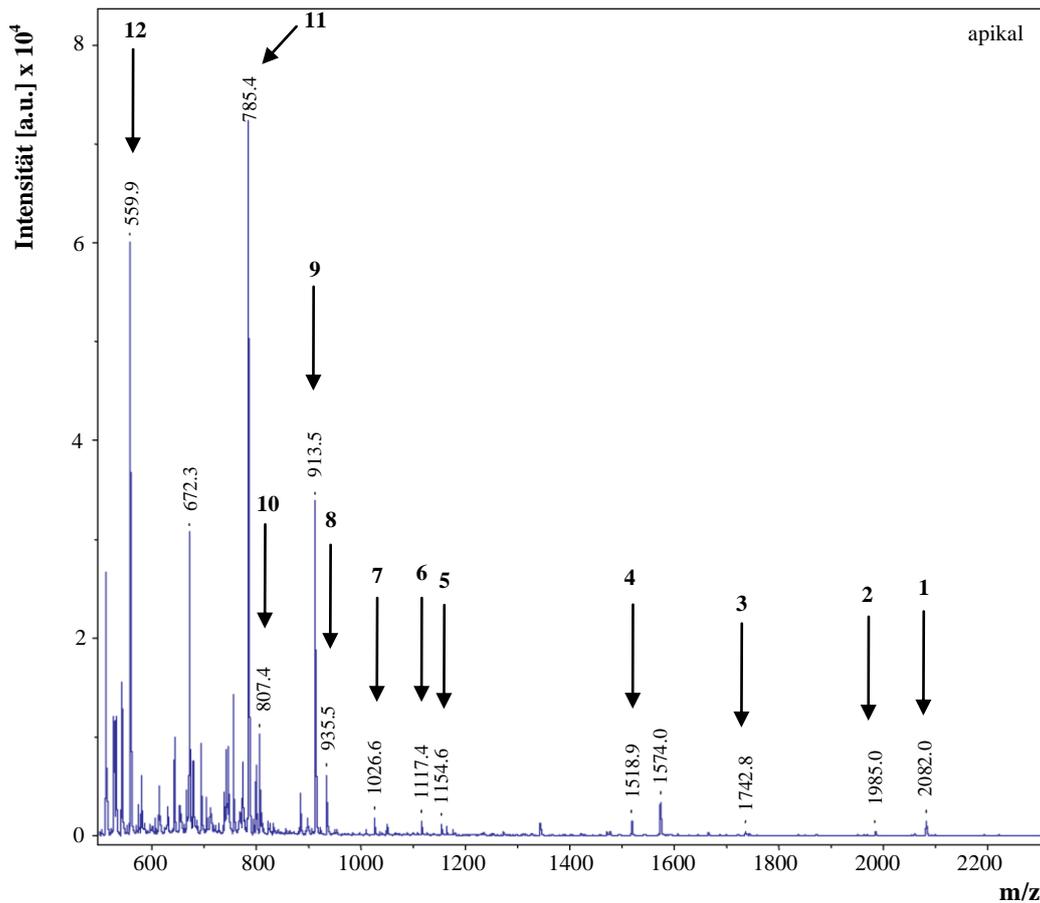


Abb. 4.117: Massenspektrometrische Analyse des apikalen Mediums eines Transwellsystems nach 24-stündiger Inkubation mit dem Lissamin-markierten Gliadinpeptid p56-68 ($c = 32 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.12: Die im apikalen Medium nachweisbaren Gliadinfragmente nach Inkubation mit Lissamin-markiertem p56-68. Ahx wurde als Spacer für die Markierung der Peptide mit dem Lissamin-Farbstoff verwendet.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	2082.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LQLQPFQPQLP
2	1985.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LQLQPFQPQL
3	1742.8	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LQLQPFQPQ
4	1518.9	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Ahx-LQLQPFQPQ
5	1154.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-LQLQ
6	1117.4	$[2\text{M}+\text{H}]^+$	Lissamin-Farbstoff
7	1026.6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-LQL
8	935.5	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LQ
9	913.5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-LQ
10	807.4	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-L
11	785.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-L
12	559.9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Lissamin-Farbstoff

Wie bereits bei den PromoFluor-markierten Peptiden weist das Liss-Ahx-p56-68 im basolateralen Überstand deutlich weniger Spaltprodukte auf (Abb. 4.118). Bei diesen handelt es sich um Lissamin-markierte, entlang des C-Terminus gespaltene Fragmente (Tabelle 4.13).

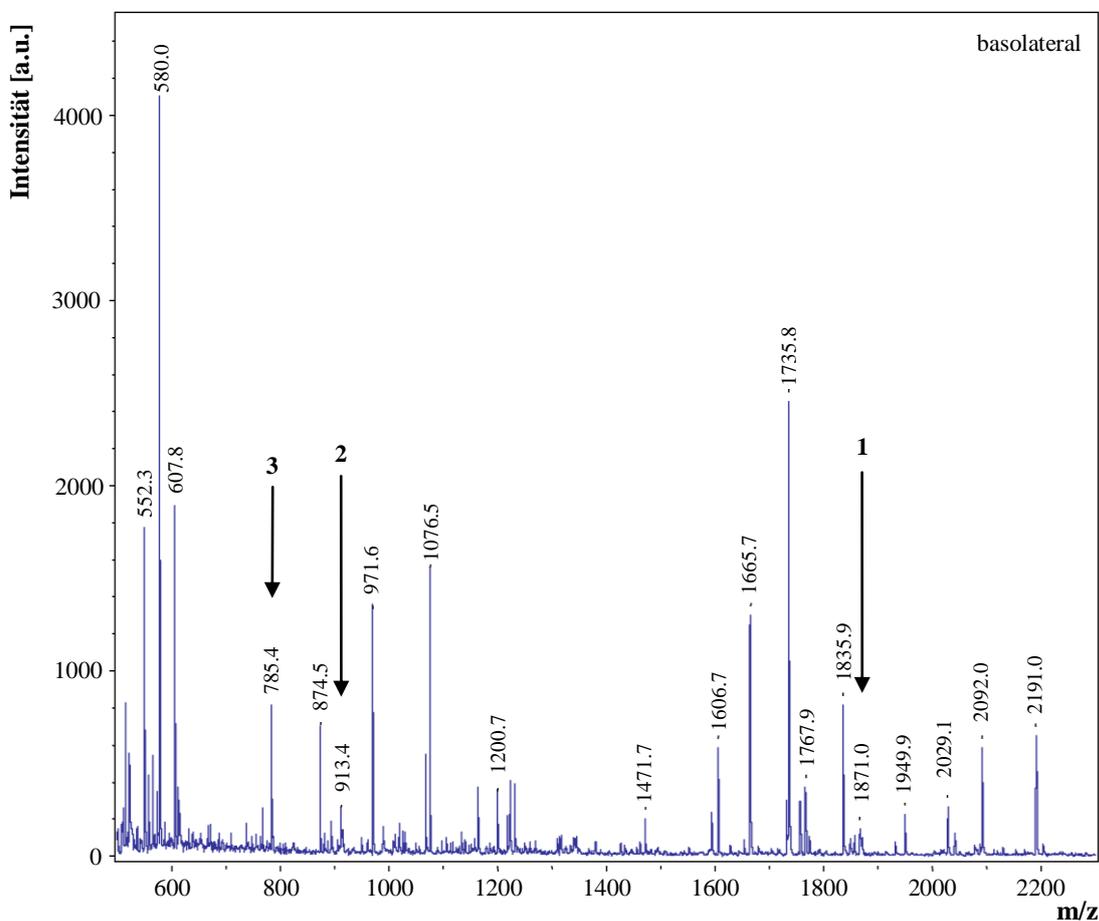


Abb. 4.118: Massenspektrometrische Analyse des basolateralen Mediums eines Transwellssystems nach 24-stündiger Inkubation mit Lissamin-markiertem p56-68 ($c = 32 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.13: Die mittels MALDI-TOF im basolateralen Medium nachweisbaren Gliadinfragmente nach Inkubation mit Lissamin-markiertem p56-68-Peptid.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	1871.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LQLQPFQPQ
2	913.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-LQ
3	785.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-L

Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Lissamin-markierten Gliadinpeptid p31-43 konnte im apikalen Überstand das intakte, fluoreszenzmarkierte Peptid durch das Signal $m/z = 2203.1$ als Na-Addukt nachgewiesen werden (Abb. 4.119; **1** in Tabelle 4.14). Darüber hinaus sind

zahlreiche Fragmente mit und ohne den Lissamin-Farbstoff zu finden, welche in Tabelle 4.14 aufgelistet sind.

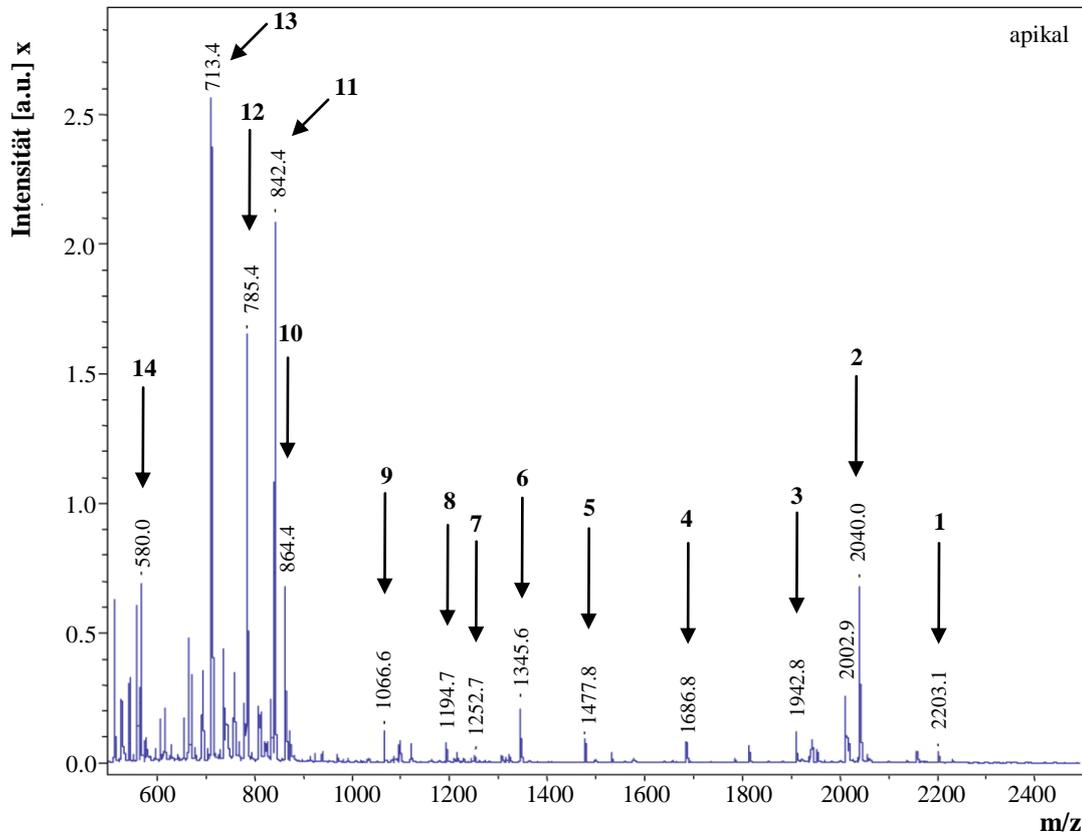


Abb. 4.119: Massenspektrometrische Analyse des apikalen Mediums eines Transwellsystems nach 24-stündiger Inkubation mit dem Gliadinpeptid p31-43 ($c = 32 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.14: Die im apikalen Medium nachweisbaren Fragmente nach Inkubation mit Liss-markiertem p31-43.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	2203.1	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Intaktes Liss-Ahx-LGQQQPFPPQQPY
2	2040.2	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LGQQQPFPPQQP
3	1942.8	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LGQQQPFPPQQ
4	1686.8	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LGQQQPFPP
5	1477.8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Ahx-LGQQQPFPPQQP
6	1345.6	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LGQQQP
7	1252.7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Ahx-LGQQQPFPPQ
8	1194.7	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	QQQPFPPQQP
9	1066.6	$[\text{M}+\text{K}]^+$	Ahx-LGQQQFPF
10	864.4	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Liss-Ahx-LG
11	842.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-LG
12	785.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-L
13	713.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	PFPPQQ / QQPFPP / QPFPPQ / FPPQQP
14	580.0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	Ahx-LGQQ

Fragmente wie z.B. Liss-Ahx-LGQQQPFPPQQP, Liss-Ahx-LGQQQP oder Liss-Ahx-LG deuten auf eine sukzessive C-terminale Spaltung einzelner Aminosäuren innerhalb des Peptids hin. Wohingegen Fragmente wie Ahx-LGQQQPFPPQQP, QQPFPPQQP oder PFPPQQ einer zusätzlichen, sukzessiven N-terminalen Spaltung entsprechen (Tabelle 4.14).

Einige der im apikalen Überstand identifizierten Spaltprodukte sind auch im basolateralen Medium nachweisbar (Abb. 4.120). Diese sind in Tabelle 4.15 aufgelistet.

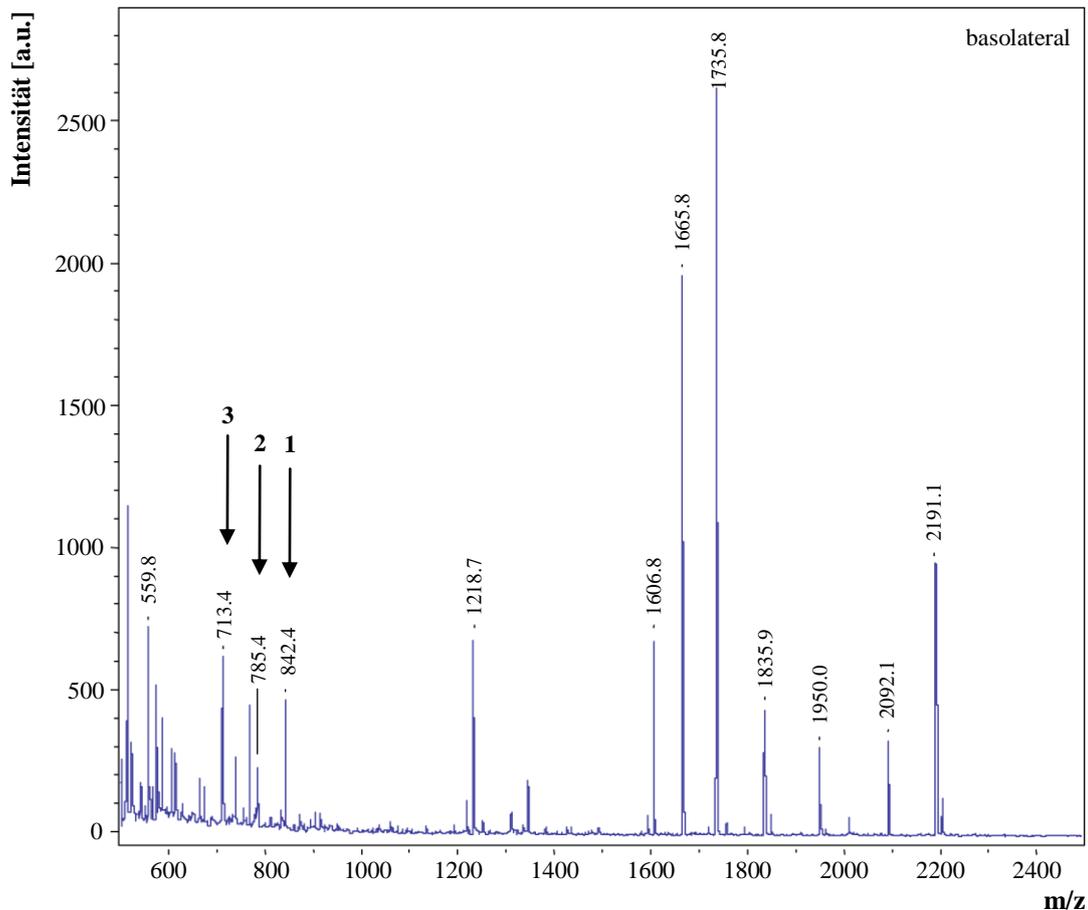


Abb. 4.120: Massenspektrometrische Analyse des basolateralen Mediums eines Transwellsystems nach 24-stündiger Inkubation mit Lissamin-markiertem p31-43 ($c = 32 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$).

Tabelle 4.15: Die mittels MALDI-TOF im basolateralen Medium nachweisbaren Gliadinfragmente nach Inkubation mit Liss-markiertem p31-43-Peptid.

Peak Nr.	m/z	Zuordnung	Fragment
1	842.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-LG
2	735.4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Liss-Ahx-L
3	713.4	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	PFPPQQ / QQPFPP / QPFPPQ / FPPQQP

Vergleicht man die massenspektrometrischen Ergebnisse der Inkubation mit Lissamin-markiertem p31-43 (**54**) bzw. p56-68 (**57**), so ist ein ähnlicher Trend wie bei den PromoFluor-markierten Gliadinpeptiden ersichtlich. Bei den Fragmenten handelt es sich um die sukzessive C- und N-terminale Spaltung einzelner Aminosäuren entlang der Peptidsequenz, welche im apikalen Überstand vermehrt auftreten. Dies ist ein weiteres Indiz für den vermutlichen Verdau der Gliadinpeptide durch verschiedene Oberflächen-Peptidasen auf der apikalen Seite von Caco-2-Zellen.²⁵⁰

4.6 IgG-abhängige Transcytose von Gliadinpeptiden in Enterocyten

Im Rahmen eines Nebenprojektes sollte geklärt werden, ob toxische Gliadinpeptide im Immunkomplex mit Anti-Gliadin-spezifischen Antikörpern der Klasse IgG bis in die LE transportiert werden können. Dieses Projekt ist daher in der geplanten Dissertationsschrift von Georg Leonhardt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer enthalten.

Das Erreichen der LE bzw. Lysosomen, welche im Gegensatz zu EE MHC-Klasse-II-Proteine (z.B. das HLA-DR-Antigen) enthalten, wird als notwendige Voraussetzung für die Präsentation exogener Antigene durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) angesehen. Auch Enterocyten können als APC fungieren. So werden exogene Antigene an der apikalen Membran der Enterocyten mittels Endocytose aufgenommen. Ihr Transport über die EE in die LAMP- und HLA-DR-positiven LE könnte die Entwicklung einer oralen Toleranz induzieren. Nur so können Antigene an der basolateralen Membran von intestinalen Epithelzellen an HLA-DR-Antigene binden und regulatorischen T-Helferzellen des Immunsystems mit Supressorwirkung präsentiert werden.²⁵¹⁻²⁵²

In Abschnitt 2.3 wurde bereits beschrieben, dass Gliadinpeptide in der Lage sind, mit spezifischen Antikörpern polyvalente Komplexe zu bilden.¹⁴⁸ Die Hypothese besagt, dass solche Gliadin-Ig-Komplexe durch Bindung an den sog.n „neonatalen“ Fc-Rezeptor für IgG (FcRn)²⁵³ intrazellulär bis in die LE transportiert werden könnten. Eine der Funktionen von FcRn ist u.a. die Transcytose von IgG von der apikalen zur basolateralen Membranseite in verschiedenen Epithelzellen.²⁵⁴⁻²⁵⁵ Dieser IgG-Transport spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion von sog. „passiver Immunität“. So scheint das Stillen von Säuglingen während des ersten Zufütterns von Gluten einen protektiven Effekt gegenüber der Zöliakie zu haben.

Möglicherweise ist dieser Effekt auf Gliadin-spezifische Antikörper zurückzuführen, die in der Muttermilch nachgewiesen wurden.²⁵⁶

Es ist bekannt, dass Zöliakiepatienten Antikörper gegen Gliadin entwickeln. Der serologische Nachweis von IgA-, sowie IgG-Gliadin-Antikörpern kann zur Diagnostik von Zöliakie herangezogen werden.^{120,124} Dass toxische Gliadinpeptide in die LE umgeleitet werden, konnte bereits durch Inkubation von Duodenalbiopsien von Zöliakiepatienten mit Serum von Zöliakiepatienten gezeigt werden.²⁵⁷

Im Rahmen des Projektes sollen Dünndarmbiopsien von Zöliakie- und Kontrollpatienten, sowie Caco-2-Zellen mit Immunkomplexen aus toxischem Gliadinpeptid und Anti-Gliadin-IgG inkubiert werden, um zu prüfen, ob das toxische Peptid auf diese Weise in die LE umgeleitet werden kann. Da das toxische Gliadinpeptid p31-43 - wie oben beschrieben - keine adaptive Immunantwort auslösen kann, existieren auch keine humanen Antikörper gegen dieses Peptid. Daher sollte 4-Hydroxy-3-iod-5-nitrophenylacetat (NIP) als Bindeglied zwischen den IgG-Antikörpern, sowie dem p31-43-Peptid fungieren (Abb. 4.121).

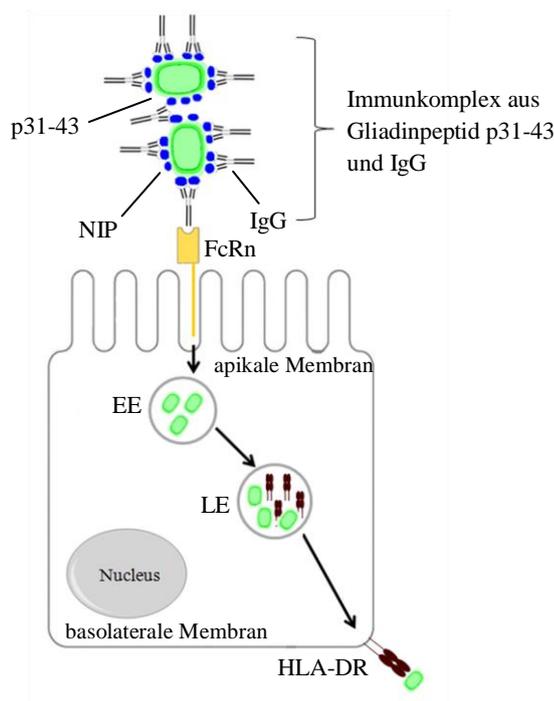


Abb. 4.121: Immunkomplex aus dem toxischen Gliadinpeptid p31-43 und spezifischen IgG-Antikörpern könnten durch Bindung an den „neonatalen“ Fc-Rezeptor für IgG (FcRn) endocytotisch über EE in LE gelangen, wo sie durch Bindung an HLA-DR regulatorischen T-Zellen präsentiert werden könnten. FcRn bindet IgG pH-abhängig nur bei $\text{pH} < 6.5$.

Als Antikörper können gemäß einer Literaturvorschrift spezielle monoklonale IgG-Antikörper (Maushybridoma-Zelllinie) verwendet werden, welche gegen NIP gerichtet sind.²⁵⁸

NIP ist als Succinimid-Aktivester (NIP-OSu; **89**) kommerziell erhältlich und reagiert effizient mit freien Aminogruppen des Gliadinpeptids. Durch Einbau einer zusätzlichen, C-terminalen Lysin-Einheit, kann neben dem freien N-Terminus eine zweite Bindungsstelle zur Konjugation an NIP geschaffen werden. Somit sind pro Gliadinpeptid zwei Bindungsstellen für den Antikörper vorhanden. Auf diese Weise können mehrere Peptide über die Antikörper zu größeren Komplexen verbunden werden. Nur solche multimeren Komplexe können vermittelt über IgG/FcRn in die späten Endosomen gelangen.

Die Darstellung von p31-43-Lys (**88**) erfolgte ausgehend von 100 mg Fmoc-(L)-Lys(Boc)-Wang-Harz mit Hilfe linearer SPPS gemäß der Fmoc/^tBu-Strategie. Die Kupplungsschritte wurden mit jeweils 6 Äq. der Aminosäuren Fmoc-(L)-Tyr(^tBu) Fmoc-(L)-Pro, Fmoc-(L)-Gln(Trt), Fmoc-(L)-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-(L)-Leu, Fmoc-(L)-Lys(Boc) und 6 Äq. der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, sowie 12 Äq. der Base DIPEA durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Durch chromatographische Reinigung mittels präparativer HPLC wurden 47 mg **88** als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 41% erhalten (Abb. 4.122).

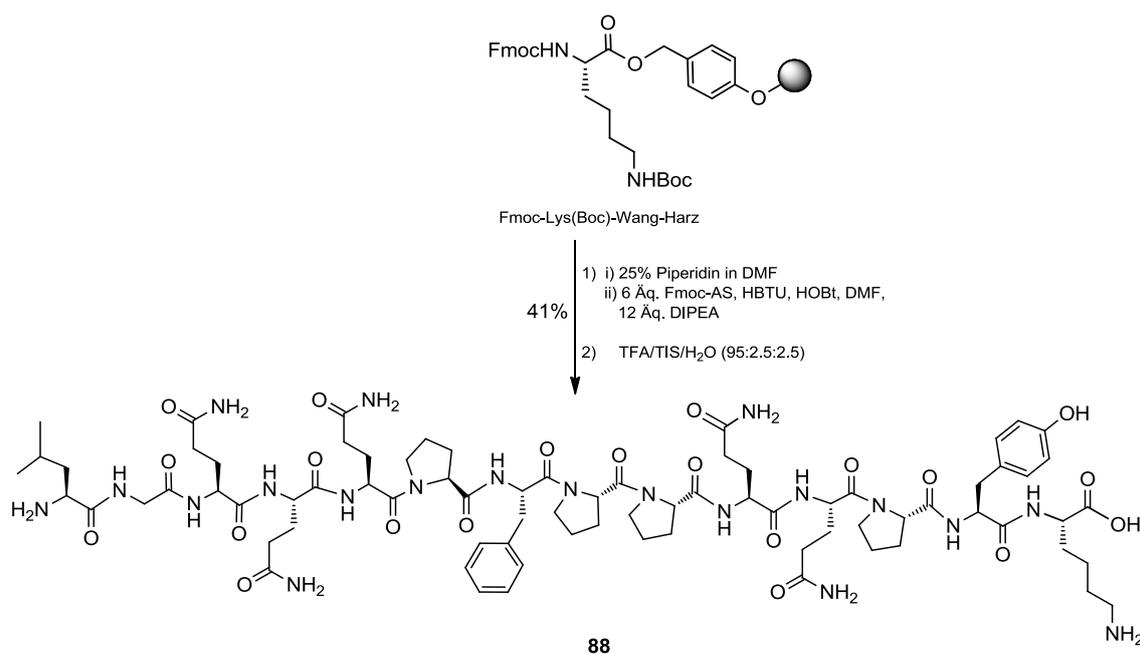


Abb. 4.122: Synthese von p31-43-Lys (**88**) ausgehend von einem Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz mittels SPPS.

Die Kupplung des p31-43-Lys (**88**) wurde mit 4 Äq. NIP-OSu **89** unter Zugabe von NEt_3 in DMSO als Lösungsmittel durchgeführt. Die gelbe Reaktionslösung wurde für 2 d bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Die chromatographische Reinigung mittels HPLC/RP lieferte 12 mg des gewünschten Komplexes **90** in Form eines gelben Feststoffs mit einer Ausbeute von 44% (Abb. 4.123).

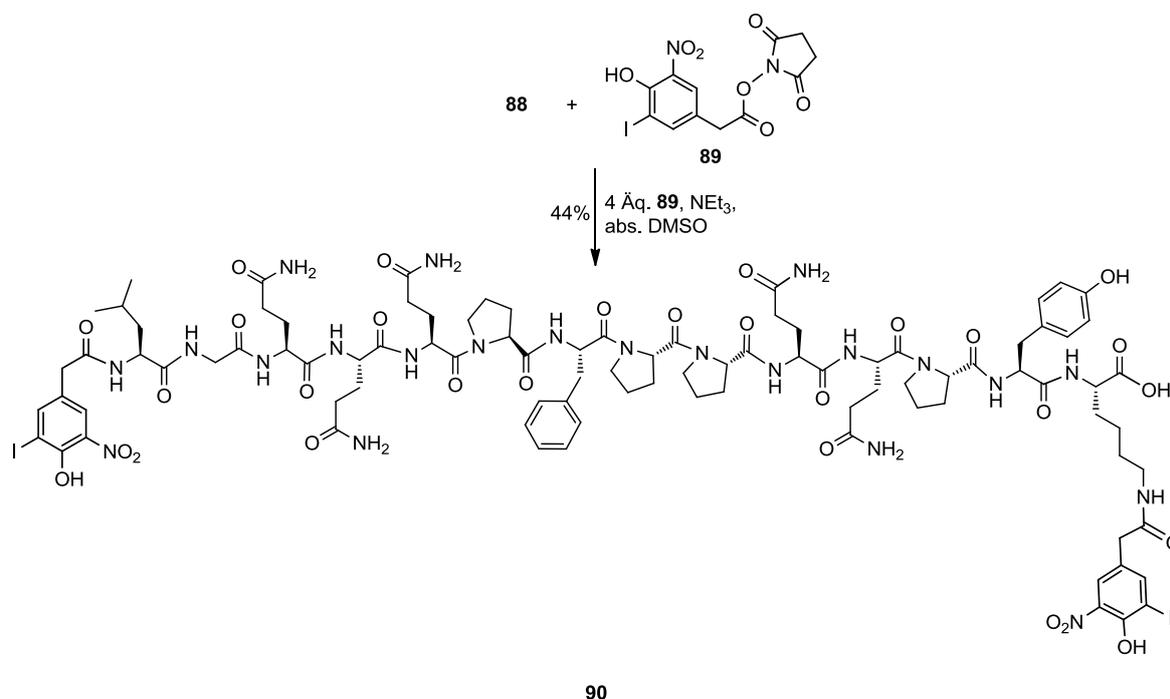


Abb. 4.123: Darstellung des NIP-Gliadinpeptid-Komplexes **90** durch Kupplung mit NIP-OSu.

Der auf diese Weise hergestellte NIP-Gliadinpeptid-Komplex **90** kann zur Immunkomplexbildung mit spezifischen Antikörpern, wie IgG, herangezogen werden. Diese Immunkomplexe wiederum können zur Inkubation von Biopsien von Zöliakiepatienten und Caco-2-Zellen verwendet werden. Im vorliegenden Projekt soll eine Modifikation des Transportweges toxischer Gliadinpeptide mit Hilfe von Antikörpern erreicht werden, ähnlich wie es durch Konjugation an CTB bereits gelungen ist.¹⁵⁰ Zur Visualisierung des intrazellulären Gliadintransportweges können Antikörper gegen das toxische Peptid p31-43, sowie gegen Marker der intestinalen Zellkompartimente (z.B. LAMP, EEA1) in Elektronenmikroskopie und konfokaler Lasermikroskopie angewendet werden.

Bei einem erfolgreichen Ausgang dieses Projektes könnte der Mechanismus nicht nur als mögliche Erklärung des protektiven Effektes der Muttermilch fungieren, sondern auch einen Ansatz zur Entwicklung einer Therapie oder neuer Präventionsmöglichkeiten gegenüber Zöliakie genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Mit einer Prävalenz von 1% ist Zöliakie (Glutenunverträglichkeit) eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Gastrointestinaltrakts. Durch Aufnahme von Gluten über die Nahrung leiden genetisch prädisponierte Personen an einer Entzündungsreaktion im Dünndarm. Die Arbeitsgruppe um Zimmer *et al.* vermutet, dass toxische Gliadinpeptide während des intestinalen Transportwegs in den EE verbleiben und nicht in die LE transportiert werden, wodurch die Entwicklung einer oralen Immuntoleranz ausbleibt. Es ist bekannt, dass durch Konjugation an CTB der Transport in die LE mittels GM1-Rezeptor-vermittelter Endocytose erfolgt.¹⁵⁰

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Synthese farbstoffmarkierter Gliadinpeptide und der Untersuchung ihres intrazellulären Transportwegs und ist ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer aus der Abteilung für Pädiatrie und Neonatologie am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es ist gelungen, ein Konzept für die Darstellung eines fluoreszenzmarkierten CTB-Gliadinpeptid-Konjugats mit selektiv spaltbarem Linker zu entwickeln. Der eingebaute MHS-Linker mit Maleimidfunktionalität kann zur Verknüpfung mit CTB genutzt werden. Gelingt die Konjugation mit CTB kann das so modifizierte, toxische Gliadinpeptid p31-43 dazu genutzt werden, um zu überprüfen, ob die Kopplung mit dem Adjuvans tatsächlich den Transport in die LE zur Folge hat. Dadurch könnte p31-43 regulatorischen T-Zellen des Immunsystems präsentiert werden und Einfluss auf die Entwicklung einer Immuntoleranz nehmen.

Die Syntheseroute beginnt mit der Darstellung von immunodominanten und toxischen Gliadinpeptiden mittels linearer SPPS gemäß der Fmoc-Strategie. Die 9mere (**20**, **21**), 13mere (**9**, **15**, **22**, **23**), das 19mer (**24**) und das 33mer-Peptid (**25**) wurden mit Gesamtausbeuten von 41-83% synthetisiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Markierung der Peptide p31-43 (**9**), p56-68 (**15**), sowie des p56-88 (**25**) mit dem Fluoreszenzfarbstoff PromoFluor488 und lieferte die gewünschten Produkte **28**, **29** und **30** mit Gesamtausbeuten von 51%, 46 % und 62%. Die Kupplung mit einem zweiten Fluorophor, dem Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid, konnte durch Einbau von Ahx als Spacer optimiert werden. Dabei ist es möglich, den Spacer entweder während der

SPPS an das Peptid zu koppeln und anschließend vom Harz abzuspalten oder aber die Kupplung in Lösung durchzuführen. Somit wurden verschiedene Liss-Ahx-markierte Gliadinpeptide in einer dreistufigen Syntheseroute mit Gesamtausbeuten von 6-18% erhalten (Abb. 5.1).

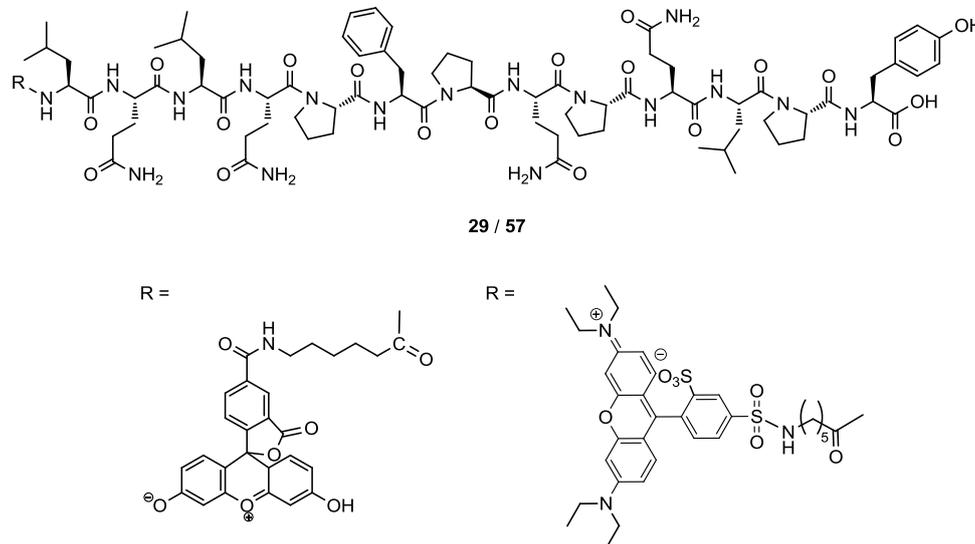


Abb. 5.1: Das mit dem PromoFluor488-Farbstoff, sowie mit dem Lissamin Rhodamin B-Fluorophor markierte Gliadinpeptid p56-68 (**29** und **57**).

Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung konnte die Aufnahme der Gliadinpeptide in Caco-2-Zellen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie anhand eines *Live Imagings* verfolgt werden. Beide Farbstoffe eigneten sich gut für die Fluoreszenz-Experimente, wobei die Lissamin-markierten Peptide in höherer Konzentration absorbiert wurden. Dass die Gliadinpeptid-Aufnahme tatsächlich über Endocytose erfolgt, konnte durch die Temperaturabhängigkeit der Peptidaufnahme gezeigt werden.

In einem weiteren Experiment wurde mit Hilfe eines Transwellsystems untersucht, ob und wie das intestinale Epithel eine Rolle bei der Prozessierung von Gliadinpeptiden spielt. Dazu wurden Caco-2-Zellen auf einem Transwellfilter zu intestinalen Epithelzellen kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass beide fluoreszenzmarkierten Peptide p31-43 und p56-68 befähigt waren in Abhängigkeit von Konzentration, Temperatur und Inkubationsdauer eine intakte Monoschicht aus Caco-2-Zellen zu passieren. Im Vergleich zum Gliadinpeptid p56-68 war die Aufnahme vom toxischen p31-43 signifikant höher. Zudem wurde durch Co-Inkubation mit dem Endocytosehemmer M β CD die Aufnahme von toxischem Gliadinpeptid p31-43 merklich inhibiert, welches ein Indiz für das überwiegende Vorliegen des transzellulären Transportwegs, d.h. der Aufnahme mittels Endocytose, ist. Interessanterweise wiesen

MALDI-TOF-Analysen strukturelle Veränderungen der Peptide auf. So konnten zahlreiche Spaltfragmente überwiegend im apikalen Überstand der Transwells identifiziert werden, welche einer sukzessiven C- und N-terminalen Spaltung einzelner Aminosäuren entlang der nativen Gliadinpeptidsequenz entsprechen. Vermutlich werden die Gliadinpeptide auf der apikalen Seite durch verschiedene Peptidasen degradiert, welche auf der Oberfläche von Caco-2-Zellen exprimiert sind.

Bei der Darstellung eines CTB-Gliadinpeptid-Konjugats ist der Einbau eines selektiv spaltbaren Linkers notwendig, um das native Peptid nach dem Transport in die LE wieder freizusetzen, so dass es den Zellen des Immunsystems präsentiert werden kann. Hierzu wurden acht verschiedene peptidische Linker wie beispielsweise Ac-AAALAK **65**, GLLFFK **67**, Ac-RGFFPK **71** oder KPILFFRLGK **73** gemäß der Substratspezifität von CatD hergestellt und mit Gesamtausbeuten von 8-80% erhalten. CatD befindet sich in höherer Konzentration in den LE und spaltet selektiv die Bindung zwischen zwei hydrophoben Aminosäuren innerhalb einer Polypeptidkette. Um ihre Wirksamkeit als CatD-labile Linker zu prüfen, wurden oben genannten Peptide einem Inkubationsexperiment mit voraktiviertem CatD bei pH = 3.5 für 8 h unterzogen. Dabei wurden die meisten Substrate an den bevorzugten Stellen gespalten. Auch das toxische Gliadinpeptid p31-43, dessen Sequenz mit dem peptidischen, CatD-labilen Linker Ac-AAALA verlängert wurde, lieferte das erwartete Spaltfragment, wenn auch in geringer Konzentration. Dieses wurde zuvor in zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 41% synthetisiert (Abb. 5.2).

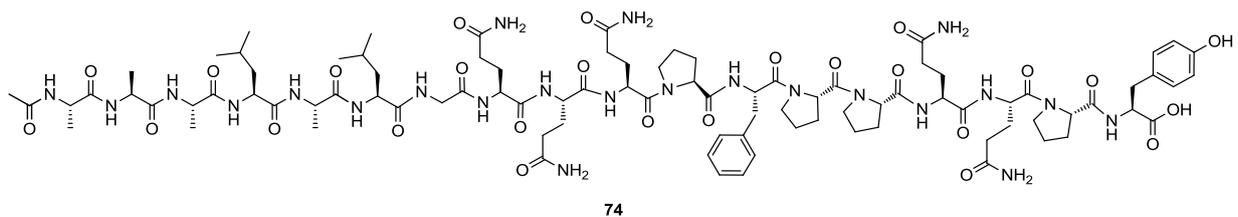


Abb. 5.2: Gliadinpeptid p31-43 mit CatD-labilem Linker Ac-AAALA (**74**), welches im Inkubationsexperiment durch CatD gespalten wurde.

Interessant war dabei der Nachweis von weiteren Fragmenten, die Spaltprodukten des nativen Gliadinpeptids entsprachen. Offenbar ist die Degradation von Gliadinpeptiden, welche laut Literatur aufgrund des hohen Prolinanteils nicht bzw. nicht vollständig durch gastrointestinale Enzyme hydrolysiert werden,¹²⁷ durchaus möglich, sofern sie in die LE gelangen.

Dass prinzipiell Moleküle mit einer Maleimidfunktionalität für die Konjugation mit CTB geeignet sind, konnte erfolgreich mit dem bifunktionalen Linker MHS gezeigt werden. MHS reagiert zum einen effizient mit primären Aminen und ebenso mit Thiolgruppen (innerhalb eines Cysteins beispielsweise) unter Bildung reversibler Disulfidbrücken. CTB besitzt als Pentamer insgesamt zehn Cystein-Einheiten, von denen neun – wie mittels MALDI-TOF-Analyse nachgewiesen - als Ankergruppen für die Konjugation dienen. Der Einbau einer zusätzlichen Lysin-Einheit wiederum ermöglichte die Markierung mit dem PromoFluor-Farbstoff über die freie NH₂-Gruppe in der Lysin-Seitenkette. Das so modifizierte, toxische Gliadinpeptid **86** konnte in vier Schritten mit einer Gesamtausbeute von 23% dargestellt werden (Abb. 5.3). Der anschließende Versuch zur Konjugation mit CTB gelang jedoch nicht, so dass eine Optimierung der Konjugationsreaktion Ziel zukünftiger Arbeiten darstellen sollte.

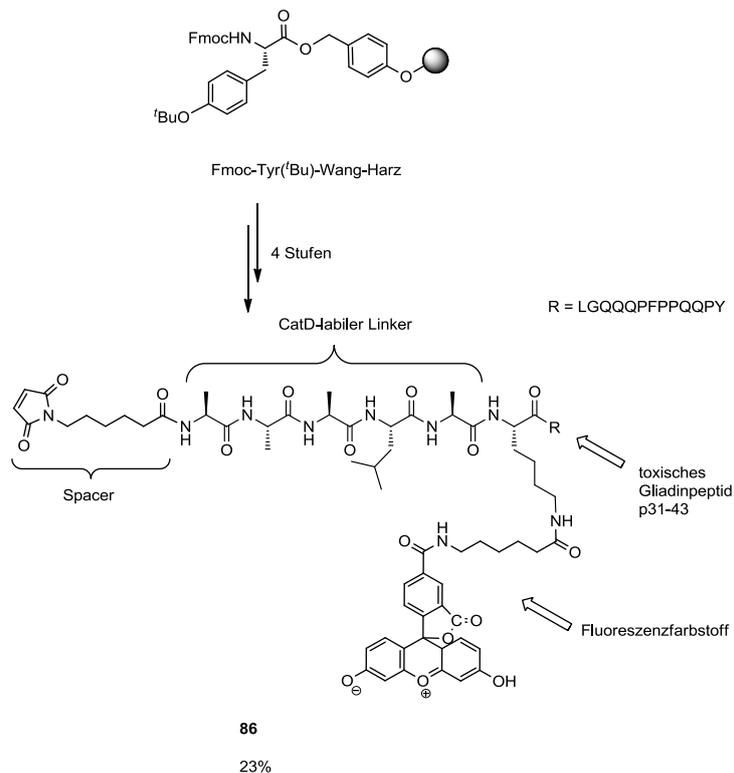


Abb. 5.3: Fluoreszenzmarkiertes Gliadinpeptid-Konjugat **86**. Der MHS-Spacer kann zur Konjugation des toxischen Gliadinpeptids p31-43, welches um einen CatD-labilen, peptidischen Linker verlängert wurde, mit CTB genutzt werden.

Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde der Zellkern von Caco-2-Zellen, sowie Zellorganelle des endosomalen Kompartimentes mit Hilfe einer Doppelmarkierungstechnik fluoreszenzmarkiert, um Aussagen über die Lokalisation von Gliadinpeptiden in EE oder LE zu treffen. Als Ergebnis ist hervorzuheben, dass es sich bei

dem immunohistochemischen Verfahren zwingend um eine Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme handeln sollte. Ansonsten wird durch Fixierung und anschließende Permeabilisierung der Zellen, wobei bei letzterem Schritt Löcher in der Zellmembran erzeugt werden, offenbar das fluoreszenzmarkierte Gliadinpeptid aus den Zellen heraus gespült. Somit lag häufig keine ausreichende Menge des Gliadinpeptids vor, um eine evtl. vorliegende Co-Lokalisation anzuzeigen. Nach der erfolgreichen Darstellung eines CTB-Gliadinpeptid-Konjugats hingegen, könnte - aufgrund einer GM1-Rezeptor-vermittelten Endocytose des Antigens - problemlos eine Aussage über die Lokalisation des toxischen Peptids p31-43 getroffen werden.

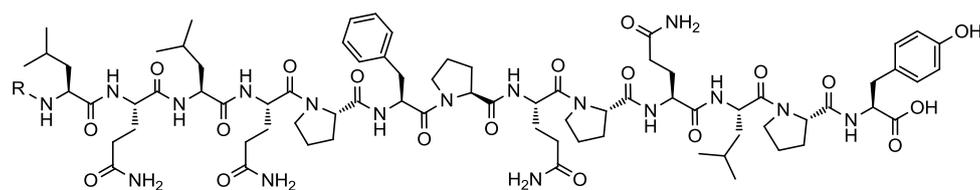
6 Summary

Diagnosed in approximately 1% of the Western population celiac disease is one of the most common autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. The ingestion of gluten leads to a chronic inflammation of the small intestine in disease-susceptible individuals. The working group of Zimmer *et al.* hypothesizes, that toxic gliadin peptides bypass HLA-DR-positive LE in intestinal cells, but are mainly localized in the EE resulting in a breakdown in oral tolerance. The conjugation of toxic gliadin peptides to CTB, a protein well known for its function as a carrier of immunization when coupled to an antigen, could redirect the peptides into the LE, thus offering a promising therapeutic approach in the treatment of celiac disease.

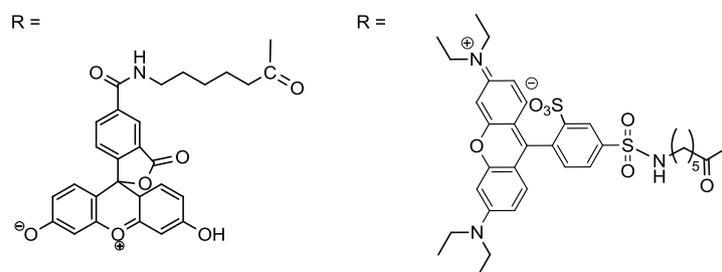
This project presents the synthesis of dye-labeled gliadin peptides and the measurement of their intracellular transport pathways in co-operation with the working group of Prof. Zimmer in the Department of Pediatrics. An efficient concept for the synthesis of a toxic gliadin peptide-CTB conjugate incorporating a selectively cleavable linker was established. For the conjugation with CTB the attached MHS linker with maleimide functionality can be used. If a successful conjugation with CTB can be achieved, the so modified toxic gliadin peptide p31-43 can be utilized to control if a sorting into the LE is the result.

The synthetic route starts with the synthesis of immunogenic and toxic gliadin peptides by linear SPPS according to the Fmoc-strategy. Eight peptides with sequences ranging from 9 to 33 amino acids could be obtained in 41-83% overall yield.

Next the gliadin peptides p31-43 (**9**), p56-68 (**15**) and p56-88 (**25**) were labeled with the PromoFluor488 fluorescent dye, giving the labeled products **28**, **29** and **30** in very good yields. The labeling with a second Fluorophor, namely Lissamine Rhodamine B sulfonyl chloride, could be optimized by inserting Ahx as spacer (scheme 6.1). Following this route, different Liss-Ahx-labeled gliadin peptides were prepared (3 steps, 6-18%).



29 / 57



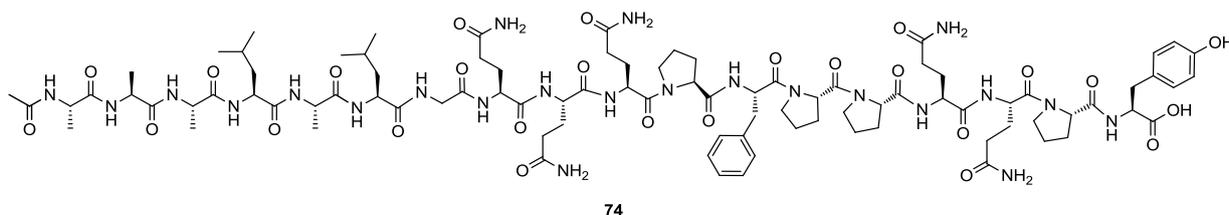
Scheme 6.1: Gliadin peptide p56-68 labeled with the PromoFluor488 (**29**) and the Lissamine Rhodamine B dye (**57**).

By labeling the gliadin peptides with a fluorescent dye the measurement of their absorption by Caco-2 cells can be accomplished in a *Live Imaging* using confocal fluorescence microscopy.

In a further experiment the mechanism of translocation and processing of gliadin peptides by enterocytes was studied. Therefore, a transwell system was used with postconfluent and differentiated polarized Caco-2 cells, a human intestinal epithelial cell line. It was observed that both dye-labeled peptides p31-43 and p56-68 are able to cross the intact monolayer of Caco-2 cells into the basolateral compartment in a concentration-, temperature- and time-dependent manner. Compared with the immunogenic p56-68 the passage of the toxic p31-43 was significantly increased. Moreover, the translocation of p31-43 could be inhibited by the endocytosis inhibitor M β CD, implicating an increased transcellular transport (uptake by endocytosis) in contrast to p56-68. Interestingly, structural changes of the gliadin peptides could be revealed by MALDI-TOF mass spectrometry. The mainly in the apical compartment identified cleavage products indicate a degradation by peptidases, which are expressed on the surface of Caco-2 cells.

For the design of a gliadin peptide-CTB conjugate the incorporation of a selectively cleavable linker is necessary, in order to release the free peptide again, which then can be presented to regulatory T cells of the immune system. Therefore, eight different peptidic linker such as Ac-AAALAK **65**, GLLFFK **67**, Ac-RGFFPK **71** or KPILFFRLGK **73** according to the substrate specificity of CatD were synthesized in 8-80% overall yield. CatD, a major intracellular aspartic protease, which is present in the LE predominantly, cleaves the peptide bond between two

hydrophobic amino acids within a polypeptide chain. In order to investigate whether the peptidic substrates were cleaved by CatD a digest assay with activated CatD at pH = 3.5 for 8 h was accomplished. Most of the substrates were cleaved at the expected cleavage sites. The cleavage profile of the toxic gliadin peptide p31-43, incorporating the CatD-labile linker Ac-AAALA, also showed the formation of the expected cleavage product. Prior, the synthesis of this substrate could be realized in two steps with an overall yield of 41% (scheme 6.2).

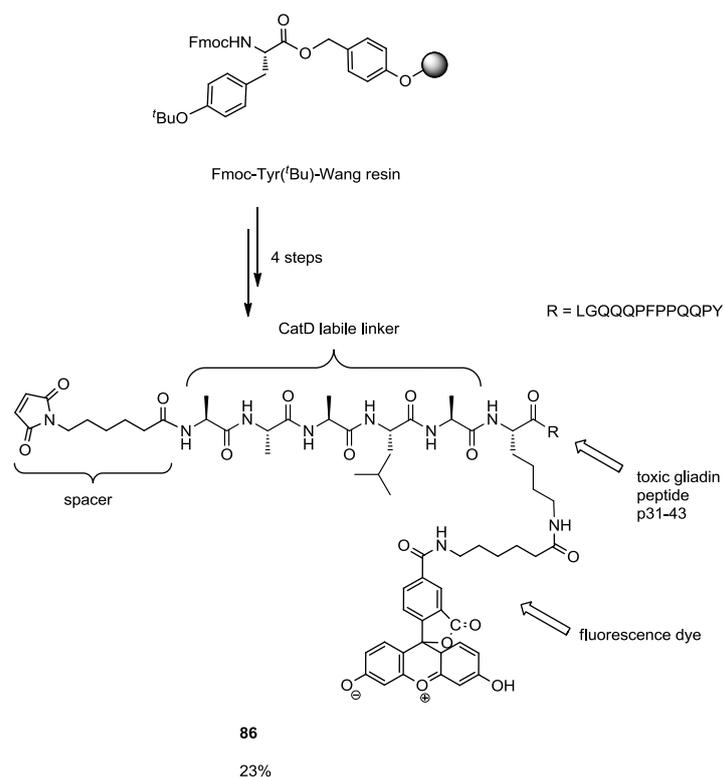


Scheme 6.2: Gliadin peptide p31-43 incorporating the CatD-labile linker Ac-AAALA showed the formation of the expected cleavage product in a digest assay with CatD.

Interestingly the cleavage profile additionally showed the formation of several other fragments indicating that the toxic gliadin peptide itself was attributed to unspecific hydrolysis. Obviously gliadin peptides, which were regarded as stable towards hydrolysis by gastrointestinal enzymes, can be degraded if they are transported into the late endosomes.

That principally molecules with a maleimide functionality are suitable for the conjugation with CTB, could successfully be shown with the bifunctional MHS linker. MHS is a heterobifunctional cross-linking reagent incorporating two orthogonal functionalities: the NHS ester, which reacts efficiently with primary amines to form stable amide bonds and the thiol-reactive maleimide group for binding to the cysteine residues of CTB. Here, nine of the overall ten cysteine residues of CTB served as anchor groups for the conjugation as identified by MALDI-TOF analysis. Introduction of the PromoFluor488-dye via the ϵ -amino group of an additionally added lysine, was realized. The so modified toxic gliadin peptide **86** was obtained in four steps with an overall yield of 23% (scheme 6.3).

The following attempt to conjugate **86** with CTB was not successful, unfortunately. The improvement of this reaction should be the aim of work in the future.



Scheme 6.3: Dye-labeled gliadin peptide conjugate **86**. The maleimide bearing spacer can be utilized for the connection of the toxic gliadin peptide p31-43, which incorporates a CatD-cleavable linker, with CTB.

In order to investigate whether gliadin peptides are localized in the EE or LE indirect immunofluorescence microscopy was accomplished, where the nucleus and the cell organelles were marked with dye-labeled antibodies. For this experiment a receptor-mediated uptake of the antigen is necessary, otherwise the gliadin peptides are washed out the cells during the preparing procedures for the immunofluorescence assay. Therefore, the amount of dye-labeled gliadin peptides internalized by the Caco-2 cells were not sufficient to indicate a possibly existing co-localisation. In contrast, the toxic gliadin peptide p31-43 conjugated to CTB, which is absorbed by GM1-receptor-mediated endocytosis, could deliver evidence of the localization of the toxic peptide without problems.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich das toxische Gliadinpeptid p31-43 so modifiziert werden, dass es für eine CTB-Konjugation genutzt werden kann. Die Konjugation kann - nach Optimierung der Reaktionsbedingungen - durch den MHS-Linker mit Maleimid-Funktionalität realisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch Verlängerung des p31-43-Peptids um einen CatD-sensitiven Linker, das gewünschte Spaltprodukt, wenn auch in geringer Konzentration, gebildet wurde. Die Toxizität des p31-43-Peptids wird durch das Verbleiben in den EE begründet. Ziel zukünftiger Arbeiten sollte daher die Konjugation des Gliadinpeptids mit CTB sein. Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte untersucht werden, ob die CTB-Konjugation den Transport des toxischen Peptids in die LE zur Folge hat. Somit könnte das native Gliadinpeptid in den LE wieder freigesetzt werden, um durch Präsentation an das Immunsystem eine orale Toleranz zu induzieren.

Aufbauend auf diesem Ergebnis könnte der vorliegende Mechanismus für therapeutische Ansätze in der Behandlung bzw. in der Entwicklung neuer Präventionsmöglichkeiten gegenüber Zöliakie genutzt werden. Möglicherweise können genetisch prädisponierte Personen durch „Impfen“ mit CTB-konjugierten Gliadinpeptiden vor dem Auftreten von Symptomen bewahrt werden.

Im Moment wissen wir jedoch nicht, ob auch innerhalb des dargestellten Gliadinpeptid-CTB-Konjugats eine Spaltung des CatD-labilen Linkers möglich ist und ob auch eine geringe Wiederfreisetzung des Peptids ausreicht, um eine Immunantwort durch regulatorische T-Zellen auszulösen. Da während des CatD-Verdau auch Spaltprodukte des nativen Gliadinpeptids nachgewiesen wurden, stellt sich die Frage, ob diese ebenfalls eine Immunantwort induzieren können. Dies sollte das Ziel zukünftiger Arbeiten darstellen.

Für diesen Zweck kann eine in der Literatur beschriebene Methode zur Induktion einer regulatorischen Immunantwort bei dendritischen Zellen verwendet werden.²⁵⁹ Es wurde gezeigt, dass Enterocyten bei Inkubation mit einem Antigen Exosome sezernieren, welche dieses Antigen exprimieren. Desweiteren befindet sich das Integrin $\alpha\beta6$ auf der Oberfläche der Exosomen. Durch die freigesetzten Exosomen ist es Enterocyten also möglich, Antigene extrazellulär weiter zu transportieren, welche dann mit anderen Zellen interagieren können. Es gilt nun zu prüfen, ob nach der Inkubation von HT-29-Zellen mit Gliadinpeptiden die

freigesetzten Exosome bei Inkubation mit dendritischen Zellen eine regulatorische Immunantwort regeneriert wird.

Ein weiteres Ziel im Rahmen des Transwell-Experiments sollte in der Identifizierung der Peptidasen auf der Oberfläche von Caco-2-Zellen liegen, die für die Spaltung der Gliadinpeptide p31-43 und p56-68 in Frage kommen.

8 Experimenteller Teil

Alle Reaktionen wurden, sofern erforderlich, mit Stickstoff als Schutzgas unter Verwendung der Schlenk-Technik in absolutierten Lösungsmitteln und in ausgeheizten Schlenckgefäßen durchgeführt. Die getrockneten Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden gewonnen. Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Novabiochem, Sigma Aldrich, Merck Fluka, VWR, R&D Systems und Promokine käuflich erworben.

8.1 Präparative Reinigung

8.1.1 Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung der Produkte erfolgte entweder isokratisch oder mit einem Gradienten. Dabei wurde der Anteil des polaren Lösungsmittels nach einem Säulenvolumen jeweils verdoppelt. In den folgenden Ausführungen ist jeweils nur das erste Laufmittelgemisch angegeben. Alle Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden destilliert. Als Trennmittel wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 60-200 µm der Firma J. T. Baker verwendet. Zur Kontrolle der Reaktion wurde der R_f -Wert durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgelplatten der Firma Merck bestimmt. Die Visualisierung der Spots erfolgte mit Hilfe folgender Reagenzien: Ninhydrin (0.2% Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-1,3-indandion) in Ethanol) und UV-Licht (254 nm).

8.1.2 HPLC

Die Reinigung der Substanzen durch semipräparative Hochflüssigkeitschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi Elite LaChrom vorgenommen (Pumpe L-7150). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption (HPLC Detektor L-7455), das Sammeln der Fraktionen mit Hilfe eines Teledyne ISCO Foxy Jr. Folgende Säulen wurden zur Trennung verwendet: Standard RP18 (Kieselgel der Marke LiChrosorb RP-18 von Merck, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 8 mm ID) Standard RP8 (Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 8 mm ID).

8.2 Analytik

8.2.1 NMR-Spektroskopie

Die Messungen der ^1H -NMR-Spektren erfolgten an einem Avance II 400 MHz WB (AV 400) der Firma Bruker BioSpin GmbH bei Raumtemperatur. Chemische Verschiebungen sind als δ -Werte in ppm in Bezug auf TMS als internen Standard angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizität dienten die üblichen Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit. Kopplungen wurden mit dem Signal J gekennzeichnet und in Hz angegeben.

8.2.2 Massenspektrometrie

Die **ES-Massenspektren** wurden mit einem MicroTOF-Gerät der Firma Bruker Daltonics aufgenommen. Die Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe der Software MicroTOF Control, die Auswertung mit Hilfe der Software Data Analysis. Für die Aufnahme von LCMS-Spektren wurde eine analytische HPLC der Marke Merck-Hitachi Elite LaChrom zugeschaltet (Pumpe L-2100, Autosampler L-2200, UV-Detektor L-7455). Zur Trennung von Gemischen diente eine RP18e Chromolith-Säule von Merck (100 mm x 3 mm ID) und die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software HyStar.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Ultraflex-I-Gerät der Firma Bruker Daltonics aufgenommen und mit der Software flexAnalysis nachbearbeitet.

8.2.3 HPLC

Analytische HPLC-Chromatogramme wurden an einer Merck-Hitachi Elite LaChrom durchgeführt (Pumpe L-2130). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software EZ ChromElite. Als Detektoren dienten die Module L-7455 (UV/VIS-Absorption) und L-2480 (Fluoreszenz). Zur Trennung wurden folgende Säulen verwendet: Standard RP18-gel (Kieselgel der Marke LiChrosorb RP-18 von Merck, Partikelgröße 5 μm , 250 mm x 4.6 mm ID), RP8-gel (Merck, Partikelgröße 5 μm , 250 mm x 4.6 mm ID).

8.2.4 Peptidsynthese

Sofern Peptide nicht manuell dargestellt wurden, erfolgte die Synthese mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers der Marke Liberty 12 von der Firma CEM. Das Gerät war mit einer Mikrowelle und einem UV-Monitoring Kit ausgestattet.

8.2.5 pH-Wert-Bestimmung

Die Ermittlung von pH-Werten erfolgte mit Hilfe eines Five Easy FE20-Gerätes von der Firma Mettler Toledo.

8.2.6 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem Mikrotiterplatten-Fluorimeter (Fluoroskan Ascent FL) der Firma Thermo Scientific aufgenommen (Filter: $\lambda_{\text{abs}} = 585 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$). Zur Auswertung der Spektren diente eine Kombination des MS Office Programms Excel und GraphPad Prism 4.0.

8.2.7 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden an einem Guava easyCyte Mini-Gerät der Firma Merck Millipore durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe des MS Office Programmes Excel und GraphPad Prism 4.0.

8.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Präparaten erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops der Marke Nikon Eclipse TE2000-E. Als Laserquelle dienten drei Laser mit den Emissionswellenlängen 405 nm, 488 nm und 543 nm. Die Steuerung des

Mikroskops erfolgte mit der Software EZ-C1 3.80. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder wurde mit der Software EZ-C1 3.80 Free Viewer vorgenommen.

8.3 Synthesen bereits bekannter Verbindungen

Folgende Substanzen wurden nach in der Literatur bekannten Verfahren dargestellt: *N*-Boc-Aminohexansäure **47**;²³³ *N*-Boc-Aminohexansäure-*N*-hydroxy-succinimidester **45**;²³⁴ *N*-(*L*)-Leucin-methylester **49**.²³⁶

8.4 Synthesen

8.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

8.4.1.1 Peptidsynthese an einem NovaSynTGT-Harz (AAV 1)

In einer 5 mL-Spritze wurde 1 Äq. Fmoc-Phe-NovaSynTGT-Harz in 2 mL CH₂Cl₂ für 30 min vorgequollen. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und das Harz dreimal mit jeweils 2 mL DMF gewaschen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte zweimal für 20 min mit jeweils 2 mL Piperidin (25%ige Lösung in DMF). Nach dem Entfernen der Abspalllösung wurde das Harz viermal mit je 2 mL DMF gewaschen.

Die Vollständigkeit der Fmoc-Abspaltung wurde mit einem TNBS-Test²⁶⁰ (TNBS (1%ige Lösung in DMF) und DIPEA (10%ige Lösung in DMF) bzw. mit einem Chloranil-Test²⁶¹ (*p*-Chloranil und Acetaldehyd (jeweils 2%ige Lösungen in DMF) geprüft.

Die Kupplungen der Fmoc-geschützten Aminosäuren (2 Äq.) an das NovaSynTGT-Harz erfolgten zweimal für jeweils 30 min mit 2 Äq. HBTU, 2 Äq. HOBt, sowie 4 Äq. DIPEA in 2 mL DMF. Anschließend wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF, dreimal mit CH₂Cl₂ und zuletzt dreimal mit DMF gewaschen. Nach zweimaliger Kupplung erfolgte jeweils die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Die Abspaltung des Peptids vom säurelabilen Harz erfolgte viermal für 15 min mit jeweils 2 mL TFA (1% TFA in CH_2Cl_2). Das Filtrat wurde in 5 mL Pyridin (10%ige Lösung in MeOH) aufgenommen. Abschließende Waschschrte erfolgten dreimal mit CH_2Cl_2 , dreimal mit DMF, dreimal mit MeOH, dreimal mit CH_2Cl_2 sowie dreimal mit MeOH. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum und anschließender Gefriertrocknung konnte somit das gewünschte Peptid als Rohprodukt erhalten werden.

8.4.1.2 Peptidsynthese an einem Wang-Harz (AAV 2)

In einer 5 mL-Spritze wurde 1 Äq. Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz in 2 mL CH_2Cl_2 für 30 min vorgequollen. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und das Harz dreimal mit jeweils 2 mL DMF gewaschen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte zweimal für 10 min mit jeweils 2 mL Piperidin (25%ige Lösung in DMF). Nach Entfernen der Abspatlösung wurde das Harz viermal mit je 2 mL DMF gewaschen.

Es wurden, sofern nicht anders vermerkt, jeweils 2 Äq. der benötigten Fmoc-geschützten Aminosäuren zweimal für jeweils 20 min mit 2 Äq. des Kupplungsreagenzes HBTU, 2 Äq. des Additivs HOBt, sowie 4 Äq. DIPEA in 2 mL DMF an das Harz gekuppelt. Anschließend wurde das Harz dreimal mit je 2 mL DMF, dreimal mit CH_2Cl_2 und zuletzt dreimal mit DMF gewaschen. Nach zweimaliger Kupplung erfolgte jeweils die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Nach Synthese des gewünschten Peptids wurde zunächst die noch vorhandene Fmoc-Schutzgruppe zweimal für 10 min mit jeweils 2 mL Piperidin (25%ige Lösung in DMF) abgespalten. Dann wurde viermal mit DMF und sechsmal mit einem CH_2Cl_2 /MeOH-Gemisch (1:1) gewaschen. Zuletzt wurde mit eiskaltem Diethylether gewaschen und das Harz für 2 h an der Lyophylle getrocknet.

Die Abspaltung des auf diese Weise synthetisierten Peptids vom Wang-Harz erfolgte viermal mit 1 mL TFA (95%ige Lösung in H_2O mit 2.5% TIS) für jeweils 30 min. Das Harz wurde dabei jedes Mal mit 1 mL der Abspatlösung nachgespült. Die abgespaltene Lösung wurde in einer zehnfachen Menge kaltem Diethylether als farbloser Feststoff ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde die Lösung dekantiert. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte somit das gewünschte, vollständig entschützte Peptid als Rohprodukt erhalten werden.

8.4.1.3 Abspaltung eines Arg-enthaltenden Peptids vom Harz (AAV 3)

Die Synthese des Peptids einschließlich einer Arg-Einheit in der Sequenz erfolgte analog AAV 2. Die Abspaltung des auf diese Weise dargestellten Peptids vom Wang-Harz wurde zunächst einmal für 48 h mit 5 mL der Abspalllösung (81.5% TFA, 5% Thioanisol, 5% Phenol, 5% H₂O, 2.5% Propandithiol, 1% TIS) durchgeführt, sowie im Anschluss zweimal für jeweils 30 min. Die abgespaltene Lösung wurde in einer zehnfachen Menge aus kaltem Diethylether gefällt. Nach Zentrifugation wurde die Lösung dekantiert. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte somit das gewünschte, vollständig entschützte Peptid als Rohprodukt erhalten werden.

8.4.1.4 Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (AAV 4)

Unter N₂-Atmosphäre wurde 1 Äq. des Peptids in 2 mL abs. DMF oder DMSO gelöst. Dann wurde solange Et₃N zugegeben, bis der pH etwa 8 betrug und die Lösung auf 0 °C gekühlt. 1.5 Äq. des Fluoreszenzfarbstoffs wurde ebenfalls in dem abs. Lösungsmittel (8 mL) gelöst und portionsweise zur Peptid-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h über Nacht bei RT und unter Lichtausschluss gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nach anschließender Gefriertrocknung das fluoreszenzmarkierte Peptid als Rohprodukt erhalten.

8.4.1.5 Acetylierung an der festen Phase (AAV 5)

Das gewünschte Peptid wurde gemäß AAV 2 dargestellt. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde viermal mit DMF gewaschen. Dann wurde das Harz mit 5 mL Ac₂O und Pyridin (jeweils 10%ige Lösung in DMF) für 30 min versetzt. Anschließend wurde jeweils dreimal mit DMF, CH₂Cl₂, erneut DMF und CH₂Cl₂, dreimal mit einem CH₂Cl₂/MeOH-Gemisch (1:1) und zuletzt sechsmal mit eiskaltem Ether gewaschen und das Harz mittels Gefriertrocknung getrocknet. Die Abspaltung des N-terminal acetylierten Peptids erfolgte wie bereits in AAV 2 beschrieben.

8.4.1.6 Kupplung mit Boc-Ahx-succinimid (AAV 6)

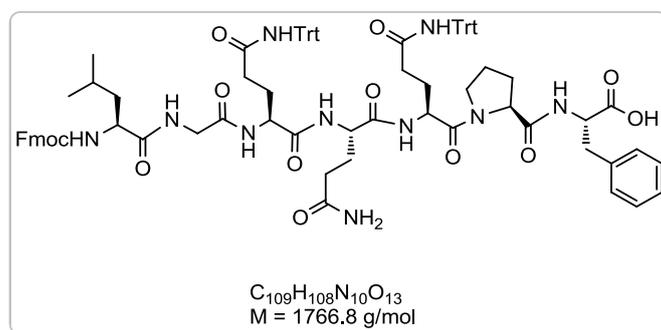
Unter N₂-Atmosphäre wurde 1 Äq. des Peptids und 1 Äq. Boc-Ahx-succinimid in abs. DMF gelöst. Dann wurde solange NEt₃ zugegeben, bis der pH = 8 betrug. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

8.4.1.7 Boc-Entschützung (AAV 7)

Das Boc-geschützte Amin wurde in einer 1:1-Mischung aus TFA und CH₂Cl₂ gelöst und bis zur vollständigen Umsetzung bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung eingengt und TFA dreimal mit CH₂Cl₂ koevaporiert.

8.4.2 Darstellung von Gliadinpeptid-Fragmenten

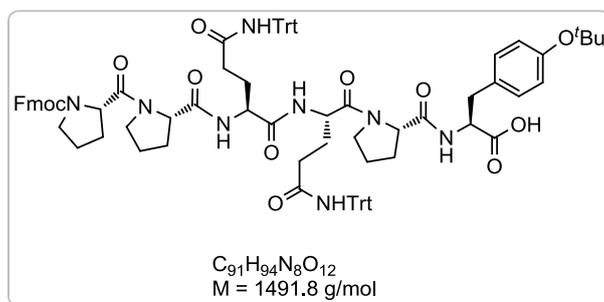
Fmoc-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln(Trt)-(L)-Gln(Trt)-(L)-Gln(Trt)-(L)-Pro-(L)-Phe **10**



In einer 5 mL-Spritze wurden 150.0 mg (0.03 mmol) Fmoc-Phe-NovaSynTGT-Harz nach AAV 1 umgesetzt. Es wurden 20.2 mg (0.06 mmol) Fmoc-(L)-Pro, dreimal jeweils 36.6 mg (0.06 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 17.8 mg (0.06 mmol) Fmoc-Gly und 21.2 mg (0.06 mmol) Fmoc-(L)-Leu an das säurelabile Harz gekuppelt. Pro Kupplungsschritt wurden je 22.8 mg (0.06 mmol) HBTU, 8.1 mg (0.06 mmol) HOBt, sowie 20 µL (0.12 mmol) DIPEA zugegeben. Die Abspaltung des Peptids vom NovaSynTGT-Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 1. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum und anschließender Gefriertrocknung konnten somit 70.0 mg eines farblosen Feststoffs als Rohprodukt erhalten werden. Die chromatographische Reinigung mittels HPLC/RP mit einem Laufmittelverhältnis von H₂O/MeCN (20/80) ergab **10** in Form eines farblosen Feststoffs (15.0 mg, 8.5 µmol, 28%).

HPLC (RP-18, 250 x 4.6 mm ID, 5 μ m Partikel, 3 mL/min, 20 zu 80 % MeCN in 15 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 7.1$ min. MS (ES): m/z (%) = 902.9 [M+H+K]²⁺ (100 %), MS (ES): m/z (%) = 1788.7 [M+Na]⁺ (17 %).

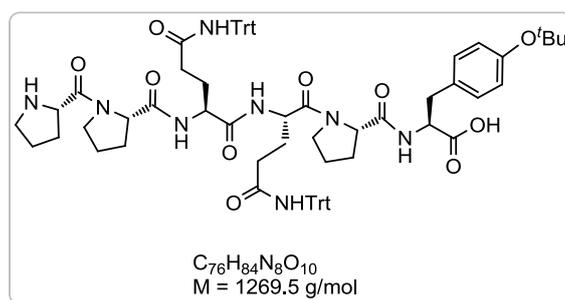
Fmoc-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln(Trt)-(L)-Gln(Trt)-(L)-Pro-(L)-Tyr(^tBu) **12**



In einer 5 mL-Spritze wurden 200.0 mg (0.04 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-NovaSynTGT-Harz nach AAV 1 umgesetzt. Die Kupplungsschritte wurden dreimal mit jeweils 27.0 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Pro, dreimal mit jeweils 48.9 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), sowie mit jeweils 30.3 mg (0.08 mmol) HBTU, 10.8 mg (0.08 mmol) HOBT und 27 μ L (0.16 mmol) DIPEA durchgeführt. Das synthetisierte Peptid **12** wurde nach AAV 1 vom säurelabilen Harz abgespalten und in Form eines gelben Öls als Rohprodukt erhalten. Dieses wurde ohne weitere Reinigung zu **11** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 777.0 [M+Na+K]²⁺ (100 %).

(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln(Trt)-(L)-Gln(Trt)-(L)-Pro-(L)-Tyr(^tBu) **11**

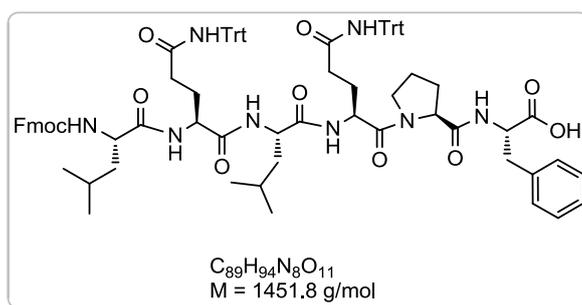


In einer 10 mL-Spritze wurden 15 Äq. (590.0 mg, 0.89 mmol) Polymer-gebundenes Piperazin **13** in 8 mL CH₂Cl₂ für 2 h vorgequollen. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt. Dann wurde 1 Äq. (88.0 mg, 0.06 mmol) des Fmoc-geschützten Peptids **12** in DMSO gelöst und zugefügt. Es wurde für 2 h mit einem Laborschüttler geschüttelt. Die Lösung wurde abgesaugt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Somit konnten 56.0 mg (0.04 mmol,

75%) eines gelben Öls als Rohprodukt erhalten werden, welches chromatographisch mittels HPLC/RP mit einem Laufmittelverhältnis von H₂O/MeCN (5/95) gereinigt wurde. Dies lieferte **11** als farblosen Feststoff (20.0 mg, 0.02 mmol, 27%).

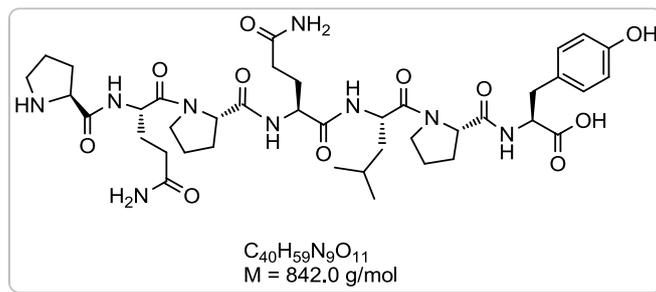
HPLC (RP-18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm Partikel, 3 mL/min, 30 zu 95 % MeCN in 10 min mit H₂O, 230 nm): $t_R = 9.2$ min. MS (ES): m/z (%) = 1269.6 [M+H]⁺ (100 %).

Fmoc-(L)-Leu-(L)-Gln(Trt)-(L)-Leu-(L)-Gln(Trt)-(L)-Pro-(L)-Phe **16**



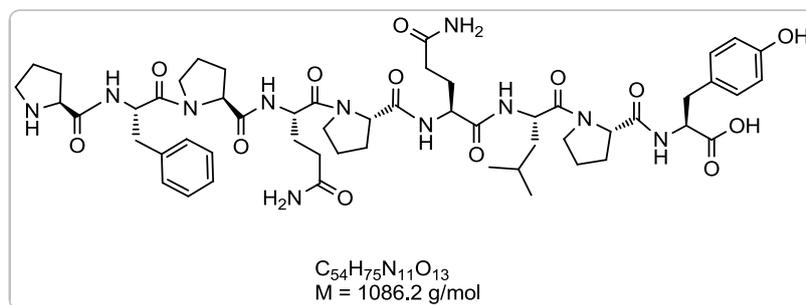
Es wurden 300.0 mg (0.06 mmol) Fmoc-Phe-NovaSyn TGT Harz nach AAV 1 umgesetzt. Die Kupplungsschritte wurden dreimal mit 40.5 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Pro, zweimal mit 73.3 mg (0.12 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), zweimal mit 42.4 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie jeweils mit 45.5 mg (0.12 mmol) HBTU, 16.2 mg (0.12 mmol) HOBT und 41 µL (0.24 mmol) DIPEA durchgeführt. Das synthetisierte Peptid wurde nach AAV 1 vom säurelabilen Harz abgespalten und in Form eines gelben Öls als Rohprodukt erhalten. Die Aufreinigung erfolgte chromatographisch mittels HPLC/RP mit einem Laufmittelverhältnis H₂O/MeCN (5/95) und lieferte 58.0 mg (0.04 mmol, 67%) **16** in Form eines farblosen Feststoffs.

HPLC (RP-18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm Partikel, 3 mL/min, 20 zu 95 % MeCN in 15 min mit H₂O, 230 nm): $t_R = 10.0$ min. MS (ES): m/z (%) = 748.4 [M+2Na]²⁺ (100 %), MS (ES): m/z (%) = 1474.7 [M+Na]⁺ (87 %).

(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr 17

In einer 5 mL-Spritze wurden 200.0 mg (0.14 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Es wurden dreimal je 94.5 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Pro, 99.0 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie zweimal 171.0 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt) an das Harz gekuppelt. Pro Kupplungsschritt wurden jeweils 106.2 mg (0.28 mmol) HBTU, 37.8 mg (0.28 mmol) HOBt, sowie 95 μ L (0.56 mmol) DIPEA zugegeben. Um den Reaktionserfolg zu überprüfen, wurde eine kleine Menge des synthetisierten Peptids nach AAV 2 vom Wang Harz abgespalten und in Form eines gelben Öls als Rohprodukt isoliert. Der Großteil des Peptids wurde für eine Fragmentkondensation an der festen Phase am Harz belassen.

MS (ES): m/z (%) = 842.5 $[M+H]^+$ (100 %).

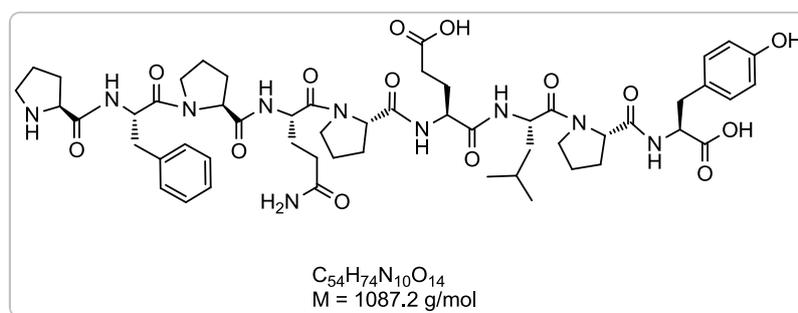
8.4.3 Darstellung von Gliadinpeptiden**(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr 20**

Es wurden 100.0 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 141.2 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, 148.4 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, zweimal jeweils 256.5 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), sowie 162.7 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe mit jeweils 159.3 mg (0.42 mmol)

HBTU, 58.4 mg (0.42 mmol) HOBt, sowie 140 μL (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP mit einem Laufmittelverhältnis von $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (5/95) konnten 31.0 mg (0.03 mmol, 41%) des gewünschten Peptids **20** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, 5% MeCN isokratisch mit H_2O , 210 nm): $t_R = 2.3$ min. MS (ES): m/z (%) = 565.8 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 554.8 $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ (96%), MS (ES): m/z (%) = 1108.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (37%).

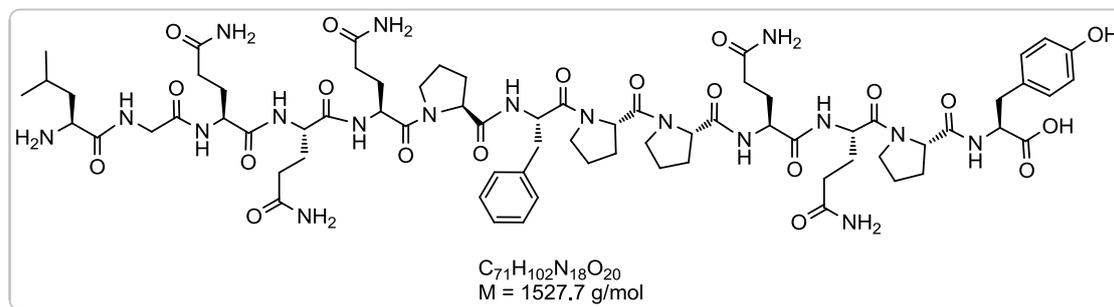
(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Glu-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr **21**



Es wurden 100.0 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 141.2 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, 148.4 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, 180.0 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Glu(^tBu), 256.5 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), sowie 162.7 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe mit jeweils 159.3 mg (0.42 mmol) HBTU, 58.4 mg (0.42 mmol) HOBt, sowie 140 μL (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Die Reinigung über präparative HPLC lieferte 50.0 mg (0.05 mmol, 66%) des Peptids **21** als farblosen Feststoff.

HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, 5% zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 2.8$ min. MS (ES): m/z (%) = 1087.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 544.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (44%), MS (ES): m/z (%) = 555.3 $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ (29%), MS (ES): m/z (%) = 563.2 $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ (15%).

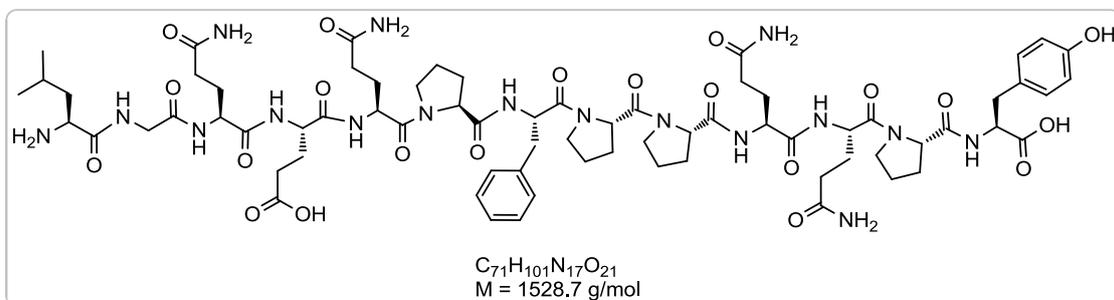
(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr 9



In einer 5 mL-Spritze wurden 100.0 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 141.2 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal 256.5 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 162.7 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 148.4 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie 124.9 mg (0.42 mmol) Fmoc-Gly mit jeweils 159.3 mg (0.42 mmol) HBTU, 58.4 mg (0.42 mmol) HOBt, sowie 140 μ L (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte somit ein gelblicher Feststoff als Rohprodukt erhalten werden, welches mittels präparativer HPLC gereinigt wurde. Das gewünschte Peptid wurde als farbloser Feststoff erhalten (76.0 mg, 0.05 mmol, 71%).

HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μ m Partikel, 3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 15 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 3.0$ min. MS (ES): m/z (%) = 1527.6 [M+H]⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 764.3 [M+2H]²⁺ (37%).

(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Glu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr 22

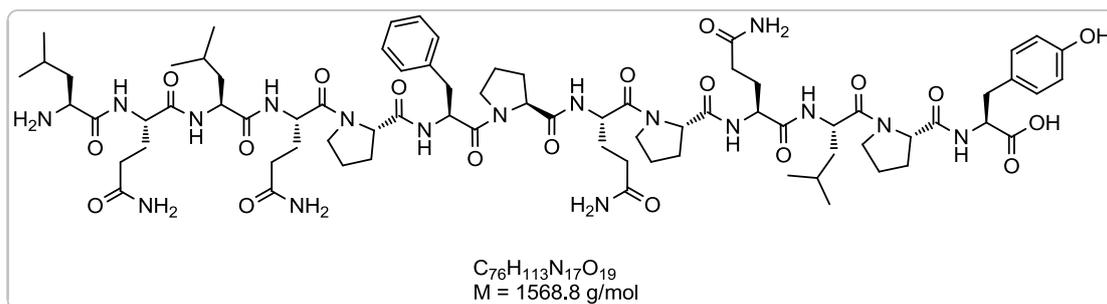


Es wurden 100.0 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 141.2 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, viermal

jeweils 256.5 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 180.8 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Glu(^tBu), 162.7 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 148.4 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie 124.9 mg (0.42 mmol) Fmoc-Gly mit jeweils 159.3 mg (0.42 mmol) HBTU, 58.4 mg (0.42 mmol) HOBt, sowie 140 μ L (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Nach Abspaltung des Peptids vom Wang Harz und anschließender Gefriertrocknung konnte somit ein gelblicher Feststoff als Rohprodukt erhalten werden. Diese wurde mittels HPL/RP gereinigt und lieferte 52 mg (0.03 mmol, 49%) **22** als farblosen Feststoff.

HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μ m Partikel, 3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H₂O, 210 nm): t_R = 2.4 min. MS (ES): m/z (%) = 1528.7 [M+H]⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 764.8 [M+2H]²⁺ (36%).

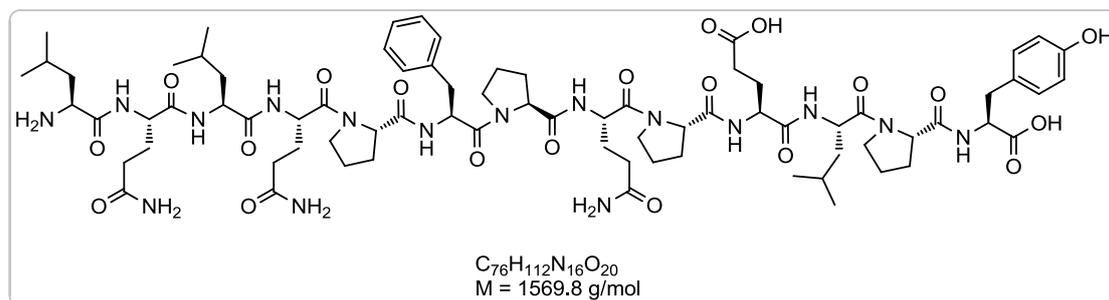
(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr 15



Ausgehend von 100.0 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz erfolgte die Synthese von **xx** gemäß AAV 2. Dazu wurden viermal jeweils 87.7 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Pro, dreimal 91.9 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Leu, viermal 158.8 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt) und 100.7 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Phe mit jeweils 94.8 mg (0.26 mmol) HBTU, 34.8 mg (0.26 mmol) HOBt, sowie 85 μ L (0.50 mmol) DIPEA gekuppelt. Die Abspaltung erfolgte ebenfalls wie in AAV 2 beschrieben. Die Reinigung mittels präparativer HPLC und anschließende Gefriertrocknung lieferte das Produkt als farblosen Feststoff (65 mg, 0.04 mmol, 83%).

HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μ m Partikel, 3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H₂O, 210 nm): t_R = 2.5 min. MS (ES): m/z (%) = 1568.7 [M+H]⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 784.9 [M+2H]²⁺ (35%).

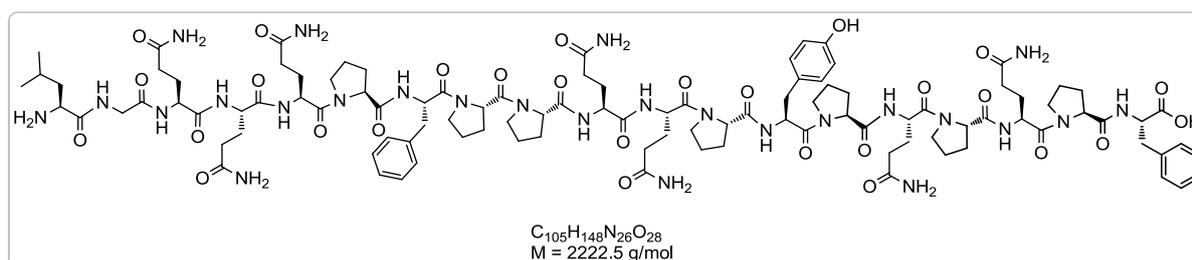
(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr 23



Die Darstellung von **xx** erfolgte mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers ausgehend von 71.0 mg (0.05 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz. Für die Kupplungsschritte wurden dreimal 91.9 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Leu, viermal jeweils 87.7 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Pro, dreimal 158.8 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 110.6 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Glu(^tBu) und 100.7 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Phe mit jeweils 94.8 mg (0.26 mmol) HBTU, 34.8 mg (0.26 mmol) HOBt, sowie 85 μ L (0.50 mmol) DIPEA gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte wie in AAV 2 beschrieben. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden 65 mg (0.04 mmol, 83%) des deamidierten Peptids **23** als farbloser Feststoff erhalten. Aufgrund ausreichender Reinheit konnte auf eine Reinigung verzichtet werden.

MS (ES): m/z (%) = 1569.7 $[M+H]^+$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 785.4 $[M+2H]^{2+}$ (50%).

(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L) 24

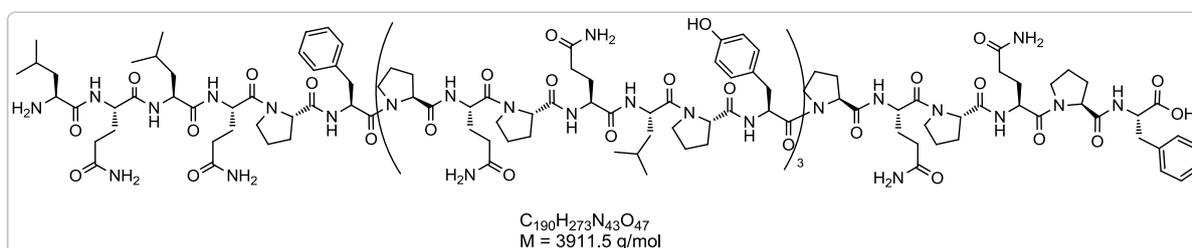


Mit 140.0 mg (0.10 mmol) Fmoc-Phe-Wang-Harz erfolgte die Synthese von **xx** mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers. Dazu wurden jeweils 168.7 mg (0.50 mmol) Fmoc-(L)-Pro, 305.3 mg (0.50 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 229.8 mg (0.50 mmol) Fmoc-(L)-Tyr(^tBu), 148.7 mg (0.50 mmol) Fmoc-Gly, 167.7 mg (0.50 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie 193.7 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Phe mit jeweils 189.7 mg (0.50 mmol) HBTU, 67.6 mg (0.50 mmol) HOBt, sowie 17 μ L (1.00 mmol) DIPEA gekuppelt. Die Abspaltung vom Harz

erfolgte wie in AVV 2 beschrieben. Nach Gefriertrocknung wurde **24** als farbloser Feststoff (180 mg, 0.08 mmol, 81%) erhalten, welches ohne weitere Reinigung umgesetzt werden konnte.

MS (ES): m/z (%) = 1112.1 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 741.7 $[M+3H]^{3+}$ (23%),
MS (ES): m/z (%) = 2223.2 $[M+H]^+$ (10%).

(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-((L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr)₃-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe **25**

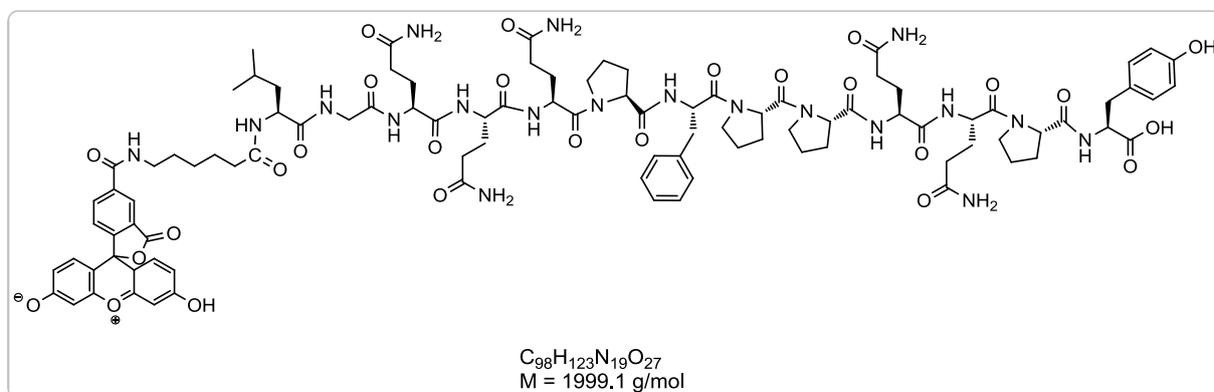


Die Darstellung von **25** erfolgte mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers ausgehend von 71.0 mg (0.05 mmol) Fmoc-Phe-Wang-Harz. Für die Kupplungsschritte wurden jeweils 88.4 mg (0.25 mmol) Fmoc-(L)-Leu, 152.7 mg (0.25 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 84.4 mg (0.25 mmol) Fmoc-(L)-Pro, 96.9 mg (0.25 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 114.9 mg (0.25 mmol) Fmoc-(L)-Tyr(^tBu) und mit jeweils 94.9 mg (0.25 mmol) HBTU, 33.8 mg (0.25 mmol) HOBt, sowie 90 μ L (0.50 mmol) DIPEA gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte wie in AAV 2 beschrieben. Nach Gefriertrocknung wurden 170 mg (0.04 mmol, 87%) des 33mer Peptids **25** als farbloser Feststoff mit ausreichender Reinheit erhalten.

MS (ES): m/z (%) = 1304.6 $[M+3H]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1956.4 $[M+2H]^{2+}$ (19%),
MS (ES): m/z (%) = 978.7 $[M+4H]^{4+}$ (13%).

8.4.4 Synthese PromoFluor-markierter Gliadinpeptide

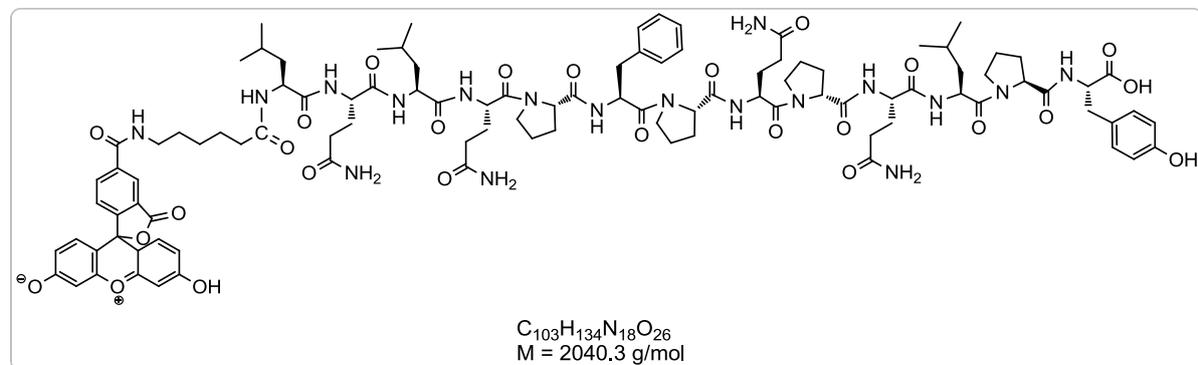
PromoFluor-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr 28



Es wurden 15.0 mg (9.82 μmol) des Peptids **9** mit 6.1 mg (9.82 μmol) des PromoFluor-Farbstoffs nach AAV 4 umgesetzt. Nach Reinigung des Rohproduktes an der präparativen HPLC konnten 10.0 mg (5.00 μmol , 51%) des fluoreszenzmarkierten Peptids **28** als gelber Feststoff erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 25 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 7.1 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 1000.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1999.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (24%), MS (ES): m/z (%) = 667.3 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (16%).

PromoFluor-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr 29

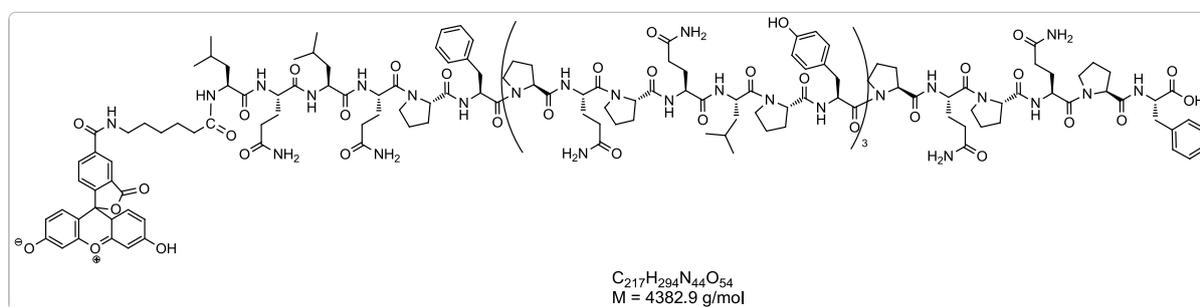


Nach AAV 4 wurden 10.0 mg (6.38 μmol) des Peptids **15** mit 4.0 mg (6.38 μmol) des PromoFluor-NHS-Esters umgesetzt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mittels

HPLC/RP gereinigt und lieferte nach Gefriertrocknung das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (6.0 mg, 2.91 μmol , 46%).

HPLC (Chromolith® RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 2 zu 98% MeCN in 15 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 2.4$ min. MS (ES): m/z (%) = 1021.0 [M+2H]²⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 2041.0 [M+H]⁺ (9%), MS (ES): m/z (%) = 681.0 [M+3H]³⁺ (4%).

Promo-Fluor-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-((L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr)₃-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe 30

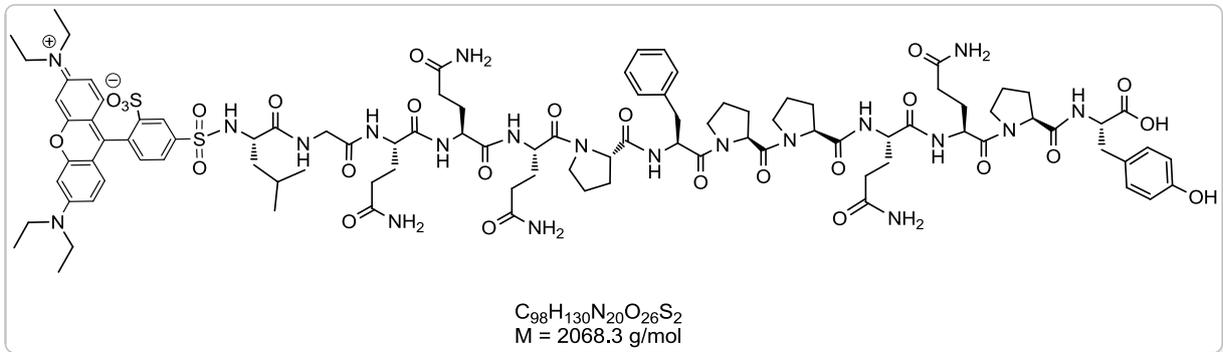


Es wurden 24.5 mg (6.26 μmol) des Peptids **25** mit 3.9 mg (6.26 μmol) des PromoFluor-Fluoreszenzfarbstoffs wie in AVV 4 beschrieben umgesetzt. Nach Reinigung des Rohproduktes an der präparativen HPLC und anschließender Gefriertrocknung konnten 17.0 mg (3.88 μmol , 62%) von **30** als gelber Feststoff gewonnen werden.

HPLC (RP-18, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 25 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 14.6$ min. MS (ES): m/z (%) = 1461.6 [M+3H]³⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1096.5 [M+4H]⁴⁺ (34%), MS (ES): m/z (%) = 2192.5 [M+2H]²⁺ (17%), MS (ES): m/z (%) = 877.4 [M+5H]⁵⁺ (15%).

8.4.5 Synthese Lissamin-markierter Gliadinpeptide

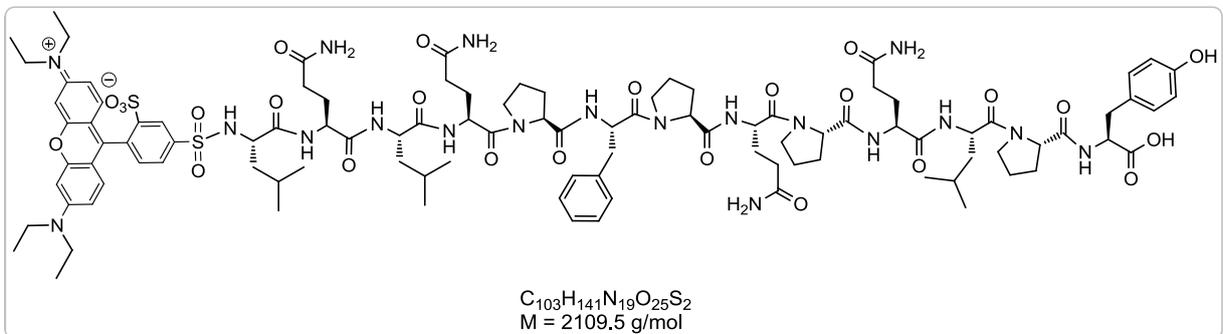
Lissamin-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **54**



Es wurden 20.0 mg (13.09 μmol) des Peptids **9** mit 11.3 mg (19.64 μmol) des Lissamin Rhodamin Sulfonylchlorid-Farbstoffs nach AAV 4 umgesetzt. Durch Reinigung über präparative HPLC konnte aufgrund einer Reihe von Nebenprodukten das komplexe Roh-produktgemisch nicht vollständig gereinigt werden. Das gewünschte farbstoffmarkierte Peptid **54** konnte daher nur in Spuren als lila Feststoff isoliert werden.

HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, 5 zu 50% MeCN in 15 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 2.7 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 1034.9 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 690.3 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (7%).

Lissamin-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr **57**



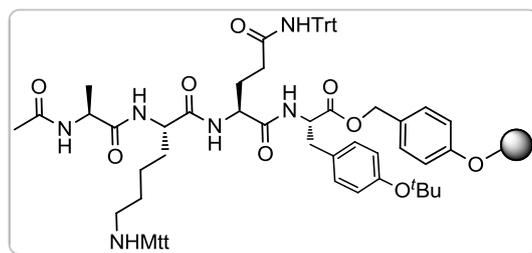
Es wurden 20.0 mg (12.75 μmol) **15** mit 11.0 mg (19.12 μmol) des Lissamin-Farbstoffs gemäß AAV 4 umgesetzt. Die chromatographische Reinigung erwies sich aufgrund des

komplexen Rohproduktgemisches als schwierig, wodurch nach anschließender Gefrier-trocknung nur 4.0 mg (1.90 μmol , 2%) von **57** in Form eines lila Feststoffs erhalten werden konnten.

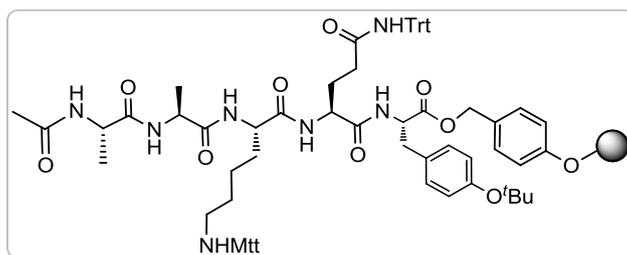
HPLC (RP-8, 250 x 4.6 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, 5 zu 50% MeCN in 15 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 3.0$ min. MS (ES): m/z (%) = 1055.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 704.0 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (9%), MS (ES): m/z (%) = 2109.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (5%).

8.4.6 Darstellung von Modellpeptiden zur Optimierung der Lissamin-Markierung

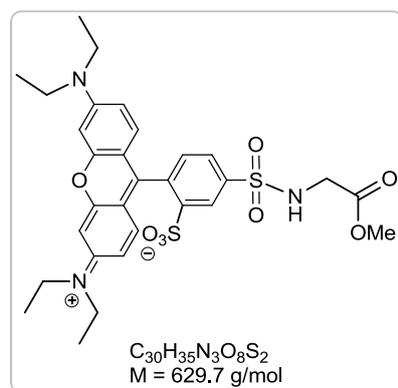
Ac-(L)-Ala-(L)-Lys(Mtt)-(L)-Gln(Trt)-(L)-Tyr(^tBu) **35**



Es wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden 86 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 87 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Lys(Mtt) und 44 mg (0.14 mmol) Ac-(L)-Ala mit jeweils 56 mg (0.14 mmol) HBTU, 19 mg (0.14 mmol) HOBt, sowie 50 μL (0.28 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Das Peptid wurde nicht abgespalten, sondern für die Markierung mit Lissamin-Farbstoff an der festen Phase belassen.

Ac-(L)-Ala-(L)-Ala (L)-Lys(Mtt)-(L)-Gln(Trt)-(L)-Tyr(^tBu) 39

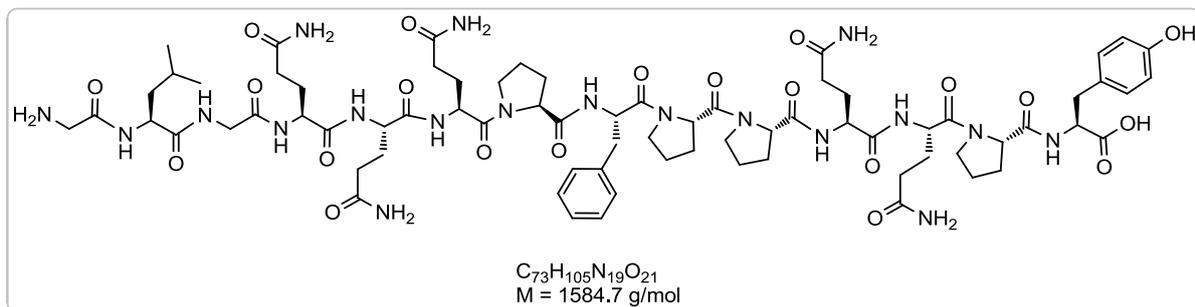
In einer 5 mL-Spritze wurden 100.0 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Es wurden 86 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 87 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Lys(Mtt), 44 mg Fmoc-(L)-Ala, 44 mg (0.14 mmol) Ac-(L)-Ala, 56 mg (0.14 mmol) HBTU, 19 mg (0.14 mmol) HOBt, sowie 50 μ L (0.28 mmol) DIPEA für die Kupplungsschritte verwendet. Das Harz wurde für eine Markierung mit dem Lissamin-Farbstoff an der festen Phase belassen.

Lissamin-Glycinmethylester 42

Nach AAV 4 wurden 10 mg (0.08 mmol) Glycinmethylester-Hydrochlorid **41**, 33 μ L (0.24 mmol) NEt₃ und 69 mg (0.12 mmol) Lissamin Rhodamin B umgesetzt und 3 d bei RT unter N₂-Atmosphäre gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem CH₂Cl₂/MeOH (4:1) als Eluent gereinigt. Somit wurden 17 mg (27.00 μ mol, 34%) des gewünschten Produkts **42** als lila Feststoff erhalten.

$R_f = 0.7$ (CH₂Cl₂/MeOH, 4:1, UV). MS (ES): m/z (%) = 630.2 [M+H]⁺ (100%). MS (ES): m/z (%) = 652.2 [M+Na]⁺ (12%).

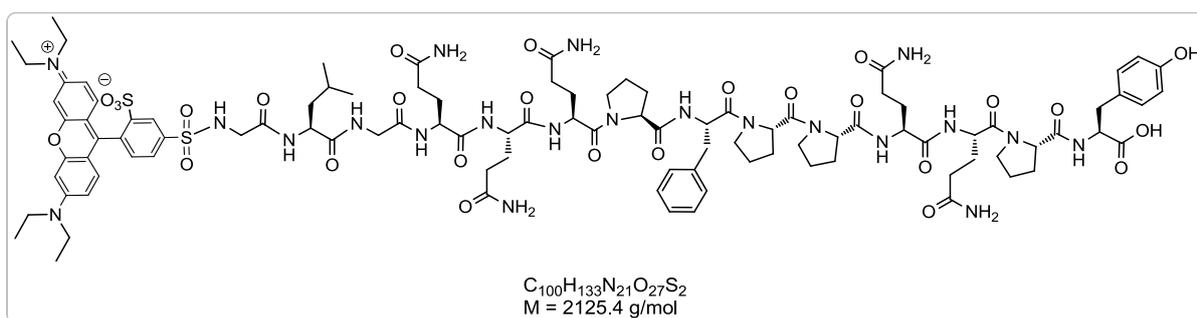
Gly-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **43**



In einer 5 mL-Spritze wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 47 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal jeweils 86 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 54 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 50 mg (0.14 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie zweimal jeweils 42 mg (0.14 mmol) Fmoc-Gly mit jeweils 53 mg (0.14 mmol) HBTU, 19 mg (0.14 mmol) HOBt, sowie 50 μ L (0.28 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte **43** in Form eines farblosen Feststoffs mit ausreichender Reinheit erhalten werden (72 mg, 0.05 mmol, 65%).

MS (ES): m/z (%) = 1584.8 $[M+H]^+$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 792.9 $[M+2H]^{2+}$ (83%).

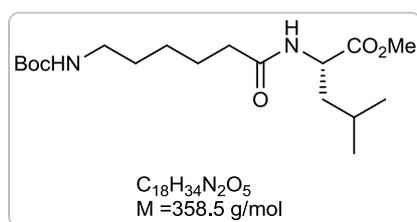
Lissamin-Gly-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **44**



20 mg (12.62 μ mol) des Peptids **43** wurde unter N_2 -Atmosphäre nach AAV 4 mit 11 mg (18.93 μ mol) Lissamin-Farbstoff umgesetzt. Das Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt und somit konnten 12 mg (5.65 μ mol, 45%) des gewünschten Lissamin-markierten Peptids als lila Feststoff erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 70% MeCN in 20 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 15.2$ min. MS (ES): m/z (%) = 1063.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 709.3 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (25%).

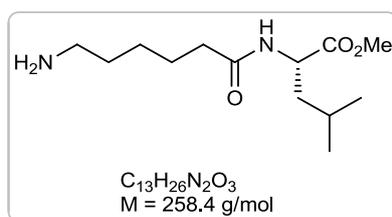
N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-Aminohexansäure-(L)-Leucin-methylester **50**



150 mg (0.46 mmol) des Aktivesters **45** und 66 mg (0.46 mmol) Leucinmethylester **49** wurden unter N_2 -Atmosphäre in abs. DMF gelöst. Dann wurden 0.20 mL (1.37 mmol) NEt_3 zugefügt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Destillation im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit EtOAc aufgenommen, erst mit 1 N HCl, dann mit gesättigter NaCl-Lsg gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Somit wurden 139 mg (0.39 mmol, 85%) des gewünschten Produkts **50** erhalten, welches ohne weitere Reinigung direkt zu **51** umgesetzt wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.68-4.60 (m, 1H, NHCHC(O)), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.10 (t, 2H, NHCH_2 , $^3J = 7.0$ Hz), 2.22 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{C(O)}$, $^3J = 7.5$ Hz), 1.70-1.59 (m, 4H, 3x CH_2 , CH_3CHCH_3), 1.55-1.46 (m, 3H, 3x CH_2 , CH_3CHCH_3), 1.44 (s, 9H, CH_3), 1.39-1.31 (m, 2H, CH_2CH), 0.94 (dd, 6H, CH_3 , $^3J = 6.3$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz). MS (ES): m/z (%) = 381.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 359.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (9%).

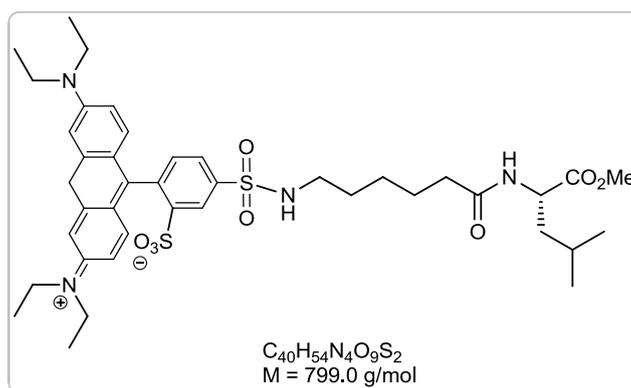
Aminohexansäure-(L)-Leucin-methylester **51**



Es wurden 139 mg (0.39 mmol) **50** in 10ml eines TFA/CH₂Cl₂-Gemisch (1:1, 10 mL) gelöst und unter RT gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde per DC-Kontrolle überprüft. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel destilliert und 100 mg Aminohexansäure-(L)-Leucin-methylester **51** als gelbes Öl quantitativ erhalten. Das Rohprodukt wurde direkt zu **52** umgesetzt.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39 (br s, 2H, NH₂), 4.57-4.50 (m, 1H, NHCHC(O)), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.11-2.96 (m, 2H, NH₂CH₂), 2.34 (t, 2H, CH₂C(O), ³J = 7.1 Hz), 1.79-1.66 (m, 3H, 3x CH₂, CH₃CHCH₃), 1.65-1.52 (m, 4H, 3x CH₂, CH₃CHCH₃), 1.48-1.36 (m, 2H, CH₂CH), 0.90 (t, 6H, CH₃, ³J = 5.9 Hz). MS (ES): m/z (%) = 259.2 [M+H]⁺ (100%).

Lissamin-Aminohexansäure-(L)-Leucin-methylester **52**

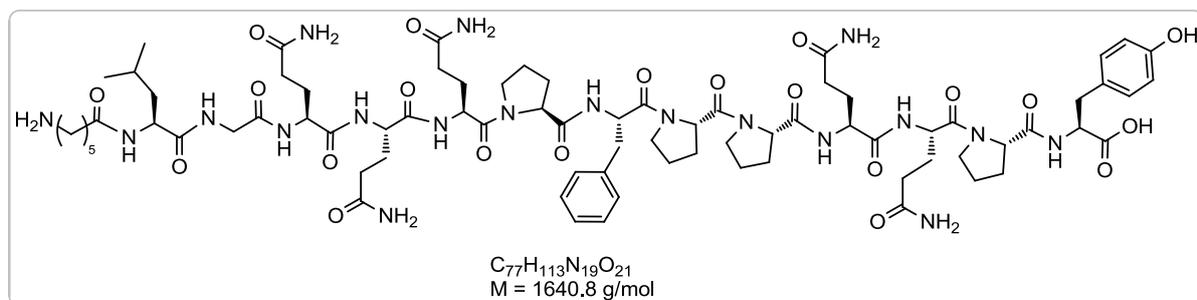


Nach AAV 4 wurden 50 mg (0.13 mmol) **51**, 60 µL (0.40 mmol) NEt₃ und 116.0 mg (0.20 mmol) Lissamin Rhodamin B umgesetzt und 4 d bei RT unter N₂-Atmosphäre gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum wurde ein lila Feststoff als Rohprodukt erhalten, welches säulenchromatographisch mit einem Laufmittelverhältnis CH₂Cl₂/MeOH (3:1) gereinigt wurde. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden 58 mg (0.73 µmol, 54%) **52** in Form eines lila Feststoffs erhalten. Das Produkt wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

R_f = 0.8 (CH₂Cl₂/MeOH, 3:1, UV). MS (ES): m/z (%) = 821.4 [M+Na]⁺ (100%).

8.4.7 Darstellung von Lissamin-markierten Gliadinpeptiden mit Ahx als Spacer

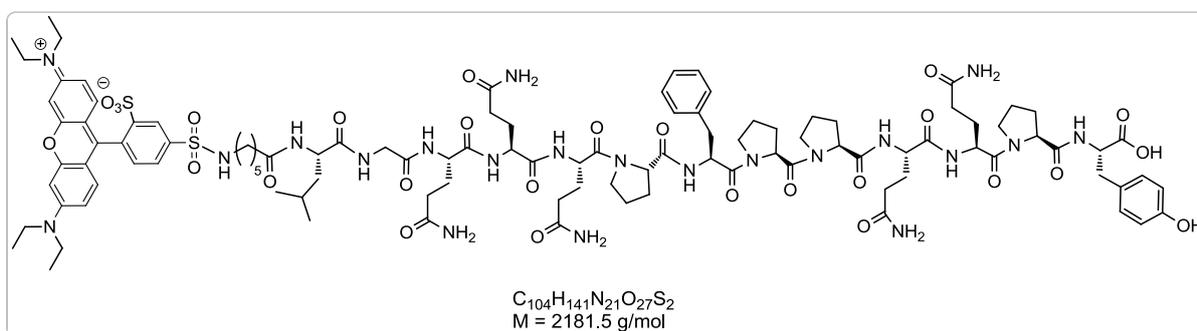
Aminohexansäure-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **53**



In einer 5 mL-Spritze wurden 50 mg (0.04 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang Harz nach AAV 2 umgesetzt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurden 46 mg (0.14 mmol) Boc-Aminohexansäure mit 53 mg (0.14 mmol) und 20 mg (0.14 mmol) HOBt an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte **53** in Form eines farblosen Feststoffs mit ausreichender Reinheit erhalten werden (19 mg, 0.01 mmol, 33%).

MS (ES): m/z (%) = 820.9 $[M+2NH]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1640.8 $[M+H]^+$ (19%).

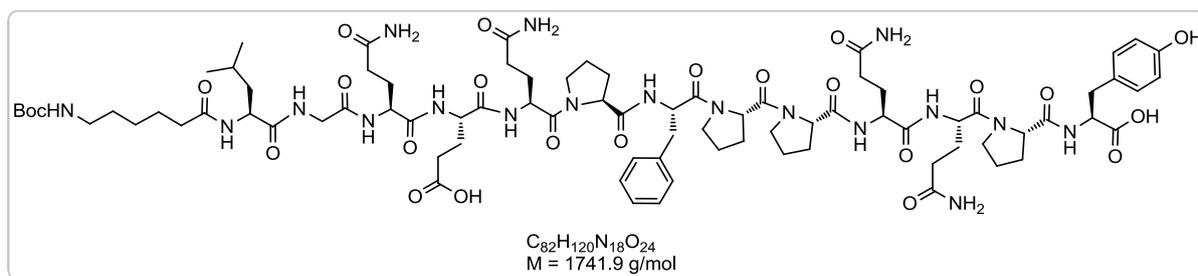
Lissamin-Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **54**



Es wurden 19 mg (11.58 μmol) **53** mit 10 mg (17.37 μmol) des Lissamin Rhodamin B-Farbstoffs nach AAV 4 umgesetzt. Die Reinigung über präparative HPLC lieferte 10 mg (4.59 μmol , 40 %) des gewünschten Produktes als lila Feststoff.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 80% MeCN in 20 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 15.2$ min. MS (ES): m/z (%) = 1113.4 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 749.9 $[\text{M}+3\text{Na}]^{3+}$ (40%).

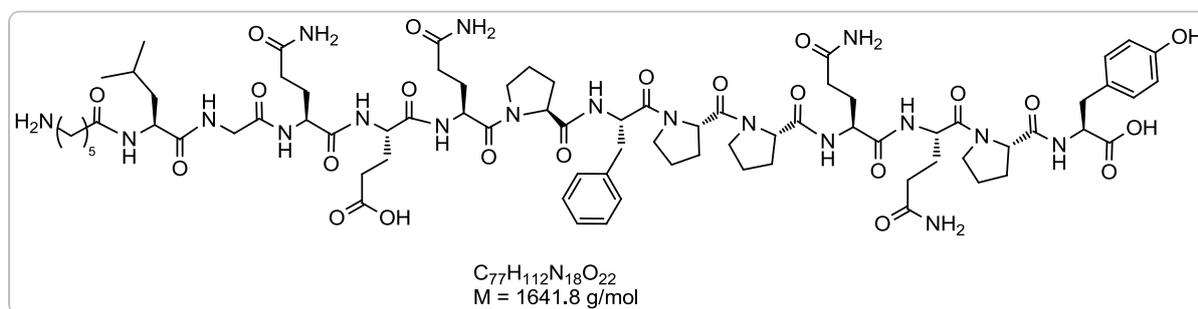
N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Glu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **91*



Es wurden 20 mg (13.09 μmol) des Peptids **22** mit 4 mg (13.09 μmol) Boc-Ahx-succinimid **45** nach AAV 6 umgesetzt. Es wurde das Produkt **91** als farbloses Öl, sowie das bereits Boc-entschützte Nebenprodukt erhalten, wie massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. Das Reaktionsgemisch wurde ohne Reinigung zu **55** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 1742.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 871.9 $[\text{M}+3\text{H}]^{2+}$ (21%).

Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Glu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **55**

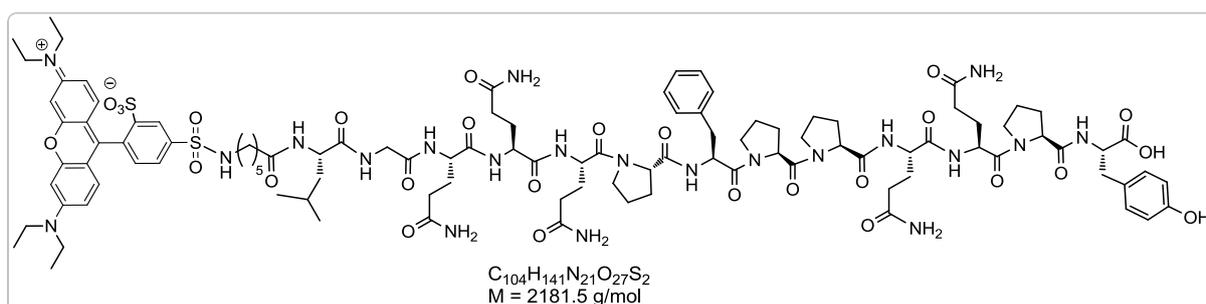


Es wurden 23 mg (13.21 μmol) **91** nach AAV 7 umgesetzt. Die Reaktion verlief quantitativ und 22 mg (13.21 μmol) des Boc-entschützten Produktes **55** konnten in Form eines farblosen

Feststoffs isoliert und massenspektrometrisch nachgewiesen werden. **55** wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 821.4 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1641.7 $[M+H]^+$ (36%).

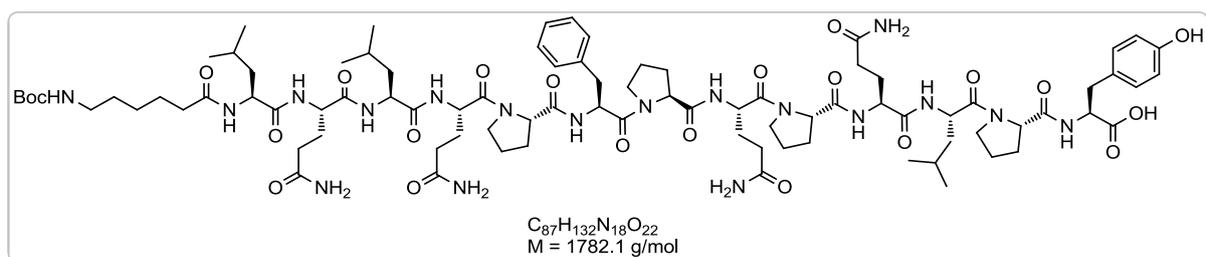
Lissamin-Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Glu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **56**



Gemäß AAV 4 wurden 20 mg (12.18 μmol) **55** mit 11 mg (18.27 μmol) Lissamin-Farbstoff umgesetzt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mittels HPLC/RP gereinigt. Aufgrund des komplexen Reaktionsgemisches und einer Reihe von nicht identifizierbaren Nebenprodukten konnte das Produkt **56** (1 mg, 0.46 μmol , 4%) nur in Spuren als lila Feststoff erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 85% MeCN in 25 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 8.6 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 1091.9 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 728.3 $[M+3H]^{3+}$ (7%).

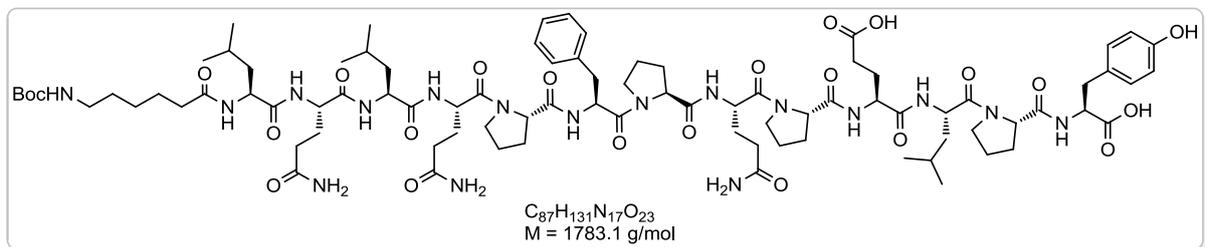
N*-(tert-Butoxycarbonyl)-Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr **92*



32 mg (19.08 μmol) **59** wurden mit 16 mg (28.55 μmol) Lissamin-Fluoreszenzfarbstoff nach AAV 4 umgesetzt. Nach zweimaliger Reinigung mittels präparativer HPLC wurde das Produkt (8 mg, 3.60 μmol , 18%) als lila Feststoff erhalten.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 50 zu 65% MeCN in 20 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 10.4$ min. MS (ES): m/z (%) = 1112.0 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 741.7 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (5%), MS (ES): m/z (%) = 2222.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (3%).

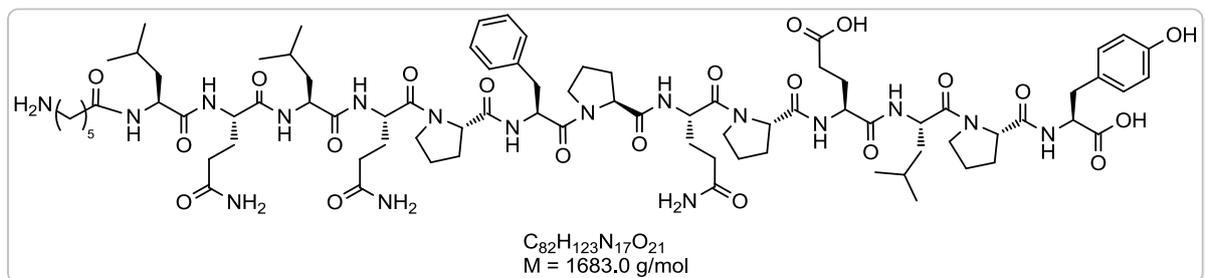
N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Glu-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr **93*



Nach AAV 6 wurden 30 mg (19.11 μmol) des Peptids **23** mit 6 mg (19.11 μmol) Boc-Ahx-succinimid umgesetzt. Neben bereits Boc-entschütztem Nebenprodukt konnte das Produkt **93** als farbloses Öl dargestellt werden. Das Reaktionsgemisch wurde ohne Reinigung zu **60** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 1783.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 891.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (39%).

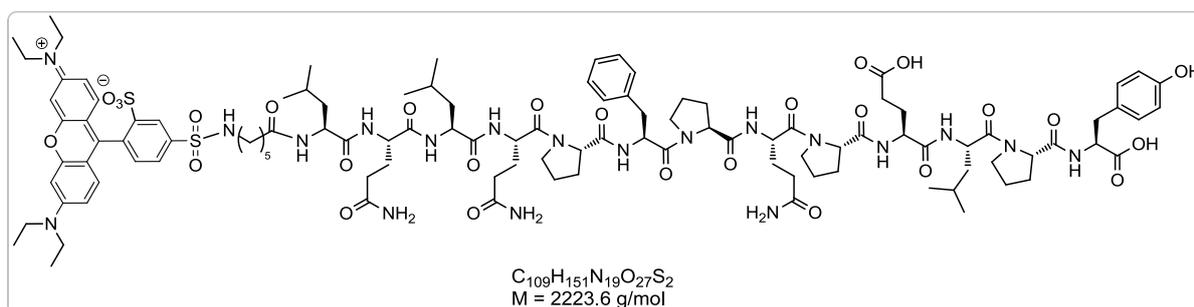
Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Glu-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr **60**



Es wurden 34 mg (19.11 μmol) **93** nach AAV 7 umgesetzt. Somit konnten 32 mg (19.11 μmol) des freien Amins **60** quantitativ als farbloser Feststoff gewonnen werden. Dieses wurde ohne Reinigung zu **58** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 841.9 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1683.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (93%).

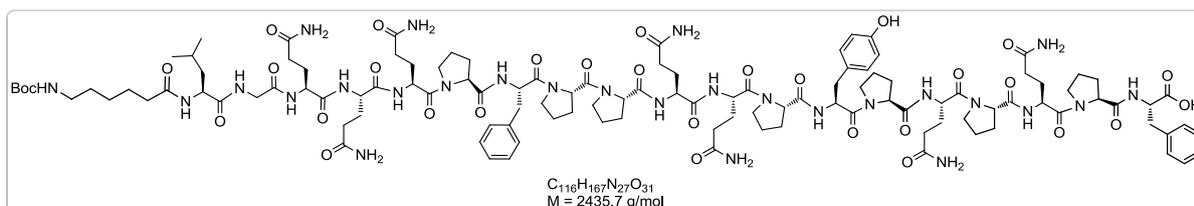
Lissamin-Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Glu-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr 58



32 mg (19.11 μmol) des Peptids **60** und 17 mg (28.67 μmol) Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid wurden nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde zweimal über präparative HPLC gereinigt. Somit konnten 3 mg (1.35 μmol , 6%) des gewünschten Lissamin-markierten Produkts **58** als lila Feststoff erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 50 zu 75% MeCN in 20 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 11.2$ min. MS (ES): m/z (%) = 1112.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 2223.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (7%), MS (ES): m/z (%) = 742.0 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (3%).

***N*-(tert-Butoxycarbonyl)-Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L) 94**

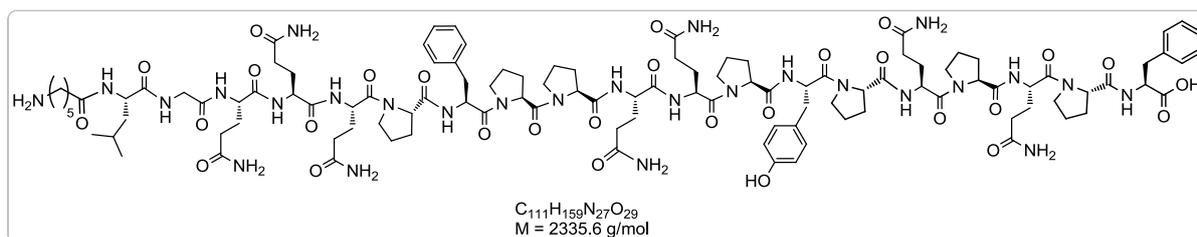


Es wurden 30 mg (13.50 μmol) des Peptids **24** mit 4 mg (13.50 μmol) Boc-Ahx-succinimid nach AAV6 umgesetzt. Neben dem gewünschten Kupplungsprodukt **94** (farbloses Öl) konnte

bereits Boc-entschütztes Nebenprodukt massenspektrometrisch identifiziert werden. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Reinigung zu **63** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 1218.6 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 2436.0 $[M+H]^+$ (8%).

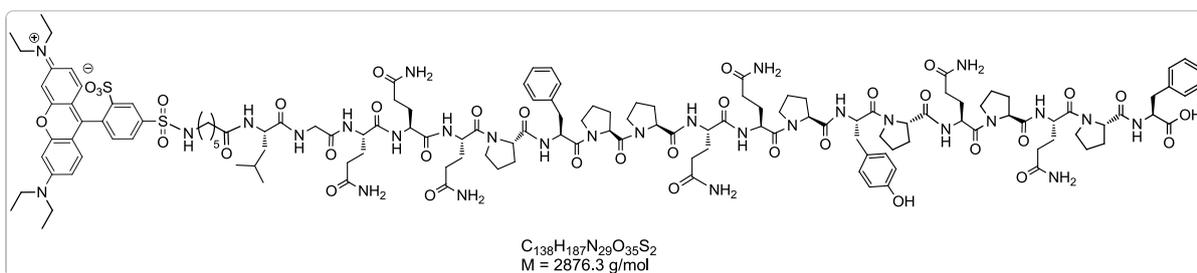
Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L) **63**



Nach AAV 7 wurden 33 mg (13.50 μmol) **94** umgesetzt. Nach anschließender Gefrier-trocknung konnten 32 mg (13.50 μmol) quantitativ als farbloser Feststoff gewonnen werden. Dieses wurde direkt zu **61** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 1168.5 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 779.4 $[M+3H]^{3+}$ (28%), MS (ES): m/z (%) = 2336.0 $[M+H]^+$ (7%).

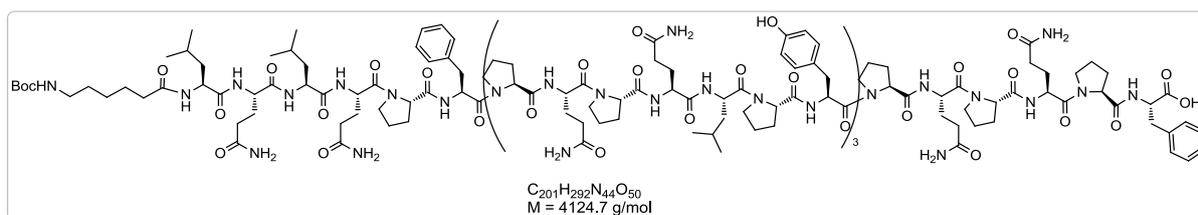
Lissamin-Aminohexansäure-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L) **61**



32 mg (13.50 μmol) **63** wurden mit 12 mg (2.02 μmol) des Lissamin-Farbstoffs nach AAV 4 umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC/RP konnten 5 mg (1.74 μmol , 13%) eines lila Feststoffs isoliert werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 25 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 16.9$ min. MS (ES): m/z (%) = 959.4 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1438.6 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (51%), MS (ES): m/z (%) = 719.8 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ (10%).

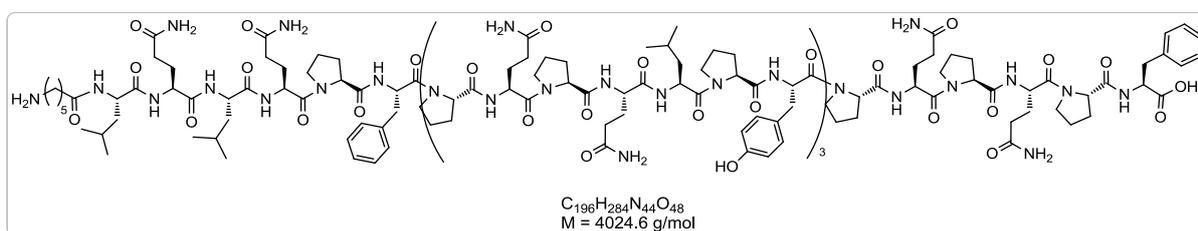
N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-((L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr)₃-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe **95*



Es wurden 40 mg (10.02 μmol) des 33mer Peptids **25** mit 3 mg (10.02 μmol) Boc-Ahx-succinimid nach AAV 6 umgesetzt. Das Kupplungsprodukt **95** (41 mg, 10.02 μmol) wurde quantitativ als farbloses Öl erhalten. Es wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 1375.7 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 2063.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (25%), MS (ES): m/z (%) = 1032.0 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ (11%).

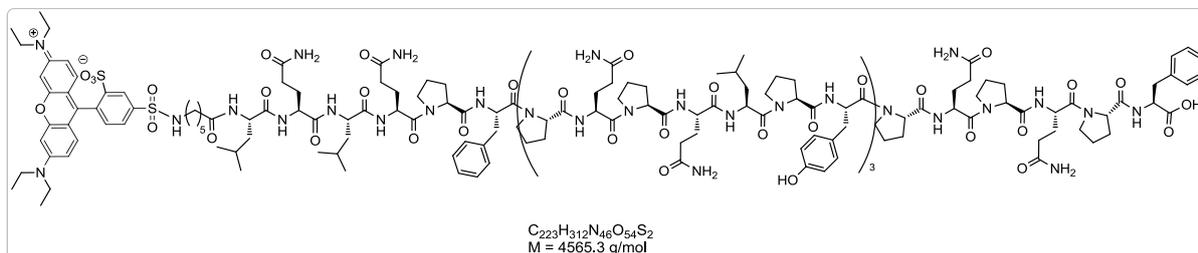
Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-((L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr)₃-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe **64**



41 mg (10.02 μmol) des Boc-geschützten Peptids **95** wurden nach AAV 7 umgesetzt. Das freie Amin **64** (41 mg, 10.02 μmol) konnte quantitativ als farbloser Feststoff erhalten werden. Es wurde ohne Reinigung zu **62** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 1342.3 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1007.0 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ (23%), MS (ES): m/z (%) = 2013.0 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (18%).

Lissamin-Aminohexansäure-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-((L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Leu-(L)-Pro-(L)-Tyr)₃-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe **62**

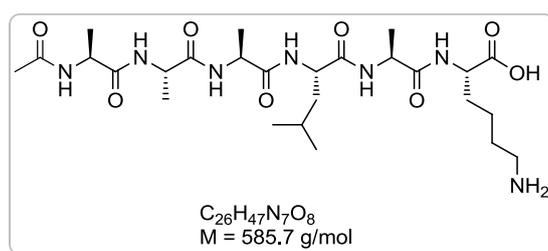


Nach AAV 4 wurden 41 mg (10.02 μmol) des Peptids **64** mit 9 mg (15.28 μmol) des Lissamin Rhodamin B-Farbstoffs umgesetzt. Durch Reinigung über präparative HPLC konnten 8 mg (1.75 μmol , 18%) eines lila Feststoffs gewonnen werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 25 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 17.0$ min. MS (ES): m/z (%) = 1522.7 [M+3H]³⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1142.3 [M+4H]⁴⁺ (43%).

8.4.8 Synthese von peptidischen Linkern

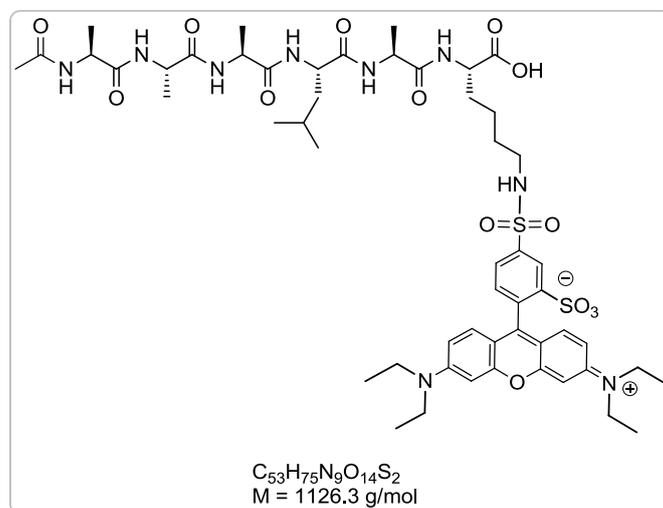
Ac-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Lys **65**



Es wurden 200 mg (0.14 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden dreimal jeweils 262 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Ala, 297 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie 110 mg (0.84 mmol) Ac-(L)-Ala mit jeweils 319 mg (0.84 mmol) HBTU, 114 mg (0.84 mmol) HOBt, sowie 300 μL (1.68 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Nach anschließender Gefriertrocknung wurde das Peptid **65** als farbloser Feststoff (38 mg, 0.06 mmol, 46%) erhalten, welches direkt ohne Reinigung zu **66** umgesetzt wurde.

MS (ES): m/z (%) = 586.4 $[M+H]^+$ (100%).

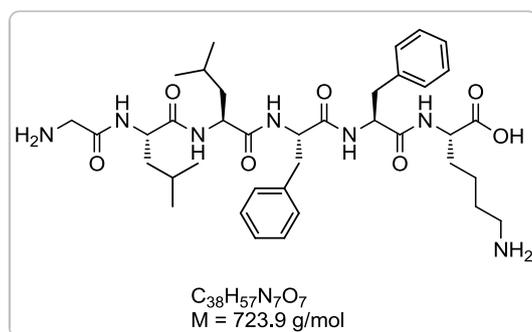
Ac-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Lys(Lissamin) **66**



Es wurden 20 mg (34.15 μmol) des Linkers **65** mit 39 mg (68.30 μmol) Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt. Somit konnten 15 mg (13.32 μmol , 39%) des fluoreszenzmarkierten Linkers **66** als lila Feststoff erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 25 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 15.0$ min. MS (ES): m/z (%) = 563.7 $[M+2H]^{2+}$ (100%). MS (ES): m/z (%) = 1126.5 $[M+H]^+$ (14%).

Gly-(L)-Leu-(L)-Leu-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Lys **67**

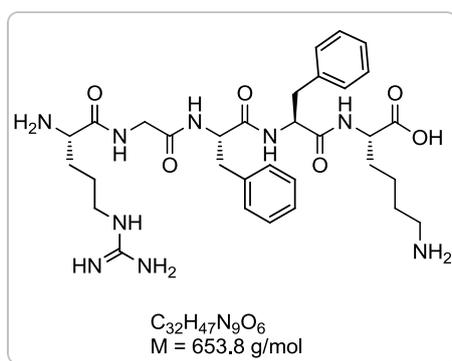


In einer 5 mL-Spritze wurden 200 mg (0.14 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden zweimal jeweils 109 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 99 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Leu, sowie 83 mg (0.28 mmol) Fmoc-Gly mit jeweils 106 mg (0.28 mmol) HBTU, 38 mg (0.28 mmol) HOBt, sowie 100 μL (0.56 mmol) DIPEA an

das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Die Reinigung über präparative HPLC lieferte den Linker **67** als farblosen Feststoff (75 mg, 0.10 mmol, 74%).

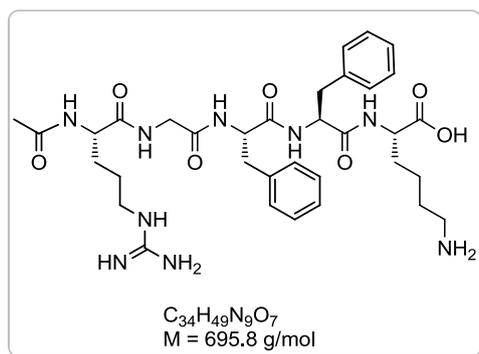
HPLC (RP-8, 250 x 8 mm ID, 5 μ m Partikel, 2 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 25 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 13.2$ min. MS (ES): m/z (%) = 724.4 [M+H]⁺ (100%). MS (ES): m/z (%) = 362.7 [M+2H]²⁺ (93%).

(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Lys **68**



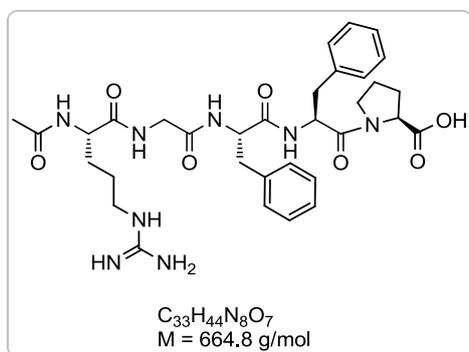
In einer 5 mL-Spritze wurden 200 mg (0.14 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Es wurden zweimal jeweils 109 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 83 mg (0.28 mmol) Fmoc-Gly, 170 mg (0.28 mmol) sowie Fmoc-(L)-Arg(Mtr) an das Harz gekuppelt. Pro Kupplungsschritt wurden jeweils 106 mg (0.28 mmol) HBTU, 38 mg (0.28 mmol) HOBt, sowie 100 μ L (0.56 mmol) DIPEA zugegeben. Das synthetisierte Peptid wurde nach AAV 3 vom Harz abgespalten und in Form eines braunen Öls als Rohprodukt erhalten. Da im Rohprodukt massenspektrometrisch noch Mtr-geschütztes Edukt identifiziert werden konnte, wurde das Rohprodukt erneut in 1 mL Abspalllösung aufgenommen. Nach 16 h Rühren bei RT wurde das Peptid aus Diethylether gefällt und an der Lyophylle getrocknet. Die Reinigung erfolgte chromatographisch mittels HPLC/RP mit einem H₂O/MeCN (50/50) als Eluent. Somit konnten 15 mg (0.02 mmol, 16%) **68** in Form eines sandfarbenen Feststoffs erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μ m Partikel, 2 mL/min, MeCN 50% isokratisch mit H₂O, 210 nm): $t_R = 2.8$ min. MS (ES): m/z (%) = 654.4 [M+H]⁺ (100%).

Ac-(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Lys 69

Es wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden zweimal jeweils 109 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 83 mg (0.28 mmol) Fmoc-Gly, sowie 170 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Arg(Mtr) mit jeweils 106 mg (0.28 mmol) HBTU, 39 mg (0.28 mmol) HOBT, sowie 100 μL (0.56 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde ein Capping nach AAV 5 durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 3. Das Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt. Nach anschließender Gefriertrocknung wurde der Linker **69** als farbloser Feststoff (20 mg, 0.03 mmol, 41%) erhalten.

HPLC (RP-8, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 20 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 4.6 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 348.7 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 696.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (66%).

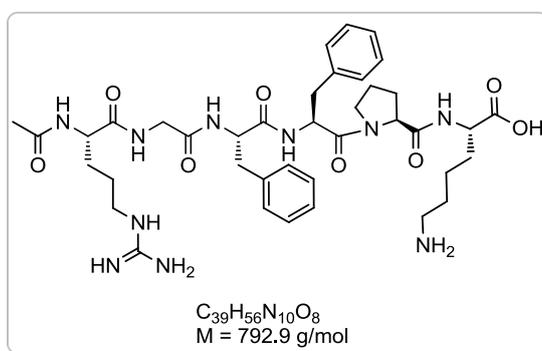
Ac-(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Pro 70

Es wurden 50 mg (0.03 mmol) Fmoc-Pro-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden zweimal jeweils 47 mg (0.12 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 36 mg (0.12 mmol) Fmoc-Gly, sowie 73 mg (0.12 mmol) Fmoc-(L)-Arg(Mtr) mit jeweils 46 mg (0.12 mmol) HBTU, 17 mg (0.12 mmol) HOBT, sowie 120 μL (0.36 mmol) DIPEA an das

Harz gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde ein Capping nach AAV 5 durchgeführt. Die Abspaltung des Linkers vom Wang-Harz erfolgte gemäß AAV 3. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mittels HPLC/RP gereinigt. Aufgrund einer Reihe von nicht identifizierbaren Nebenprodukten konnten somit nur 2 mg (2.25 μ mol, 8%) **70** als farbloser Feststoff erhalten werden.

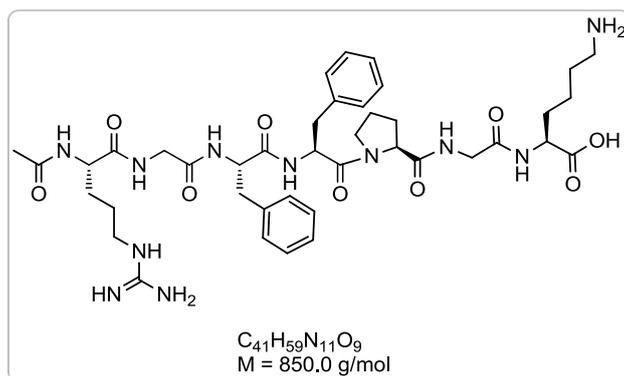
HPLC (RP-8, 250 x 8 mm ID, 5 μ m Partikel, 3 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 15 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 2.4$ min. MS (ES): m/z (%) = 665.3 [M+H]⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 333.2 [M+2H]²⁺ (29%).

Ac-(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Lys **71**



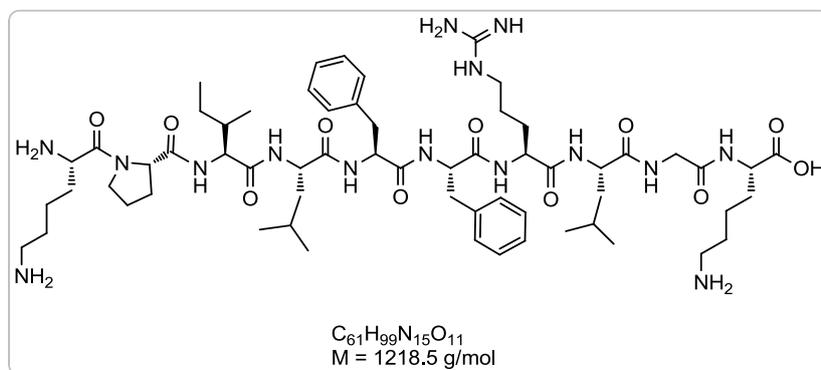
In einer 5 mL-Spritze wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Es wurden 95 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Pro, zweimal jeweils 109 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 83 mg (0.28 mmol) Fmoc-Gly, sowie 170 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Arg(Mtr) an das Harz gekuppelt. Pro Kupplungsschritt wurden jeweils 106 mg (0.28 mmol) HBTU, 39 mg (0.28 mmol) HOBt, sowie 100 μ L (0.56 mmol) DIPEA zugegeben. Nach AAV5 wurde eine Acetylierung an der festen Phase vorgenommen. Dann wurde das synthetisierte Peptid nach AAV3 vom Harz abgespalten und in Form eines gelben Öls als Rohprodukt erhalten. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden auf diese Weise 20 mg (0.03 mmol, 36%) des Produktes **71** in Form eines farblosen Feststoffs gewonnen. Aufgrund ausreichender Reinheit konnte auf eine weitere Reinigung verzichtet werden.

MS (ES): m/z (%) = 397.2 [M+2H]²⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 793.4 [M+H]⁺ (20%).

Ac-(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Pro-Gly-(L)-Lys 72

Es wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden zweimal jeweils 83 mg (0.28 mmol) Fmoc-Gly, 95 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Pro, zweimal jeweils 109 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Phe, sowie 170 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Arg(Mtr) mit jeweils 106 mg (0.28 mmol) HBTU, 39 mg (0.28 mmol) HOBt, sowie 100 μL (0.56 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde ein Capping nach AAV 5 durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 3. Das Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte **72** in Form eines farblosen Feststoffs (22 mg, 0.03 mmol, 37%) erhalten werden.

HPLC (RP-8, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 25 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 4.7 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 425.8 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 850.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (22%).

(L)-Lys-(L)-Pro-(L)-Ile-(L)-Leu-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Arg-(L)-Leu-Gly-(L)-Lys 73

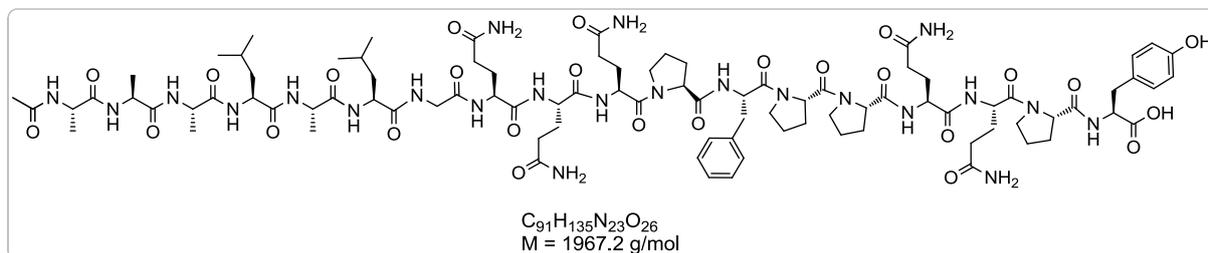
In einer 5 mL-Spritze wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Es wurden 83 mg (0.28 mmol) Fmoc-Gly, 99 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Leu,

170 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Arg(Mtr), zweimal jeweils 109 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 99 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Ile, sowie 95 mg (0.28 mmol) Fmoc-(L)-Pro an das Harz gekuppelt. Pro Kupplungsschritt wurden jeweils 106 mg (0.28 mmol) HBTU, 39 mg (0.28 mmol) HOBt, sowie 100 μ L (0.56 mmol) DIPEA zugegeben. Das synthetisierte Peptid wurde nach AAV 3 vom Harz abgespalten und in Form eines gelben Öls als Rohprodukt erhalten. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden 68 mg (0.06 mmol, 80%) des Produkts **73** in Form eines farblosen Feststoffs gewonnen. Aufgrund ausreichender Reinheit konnte auf eine weitere Reinigung verzichtet werden.

MS (ES): m/z (%) = 609.9 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 406.9 $[M+3H]^{3+}$ (69%), MS (ES): m/z (%) = 1218.8 $[M+H]^+$ (5%).

8.4.9 Darstellung von Gliadinpeptiden mit CatD-labilen Linkern

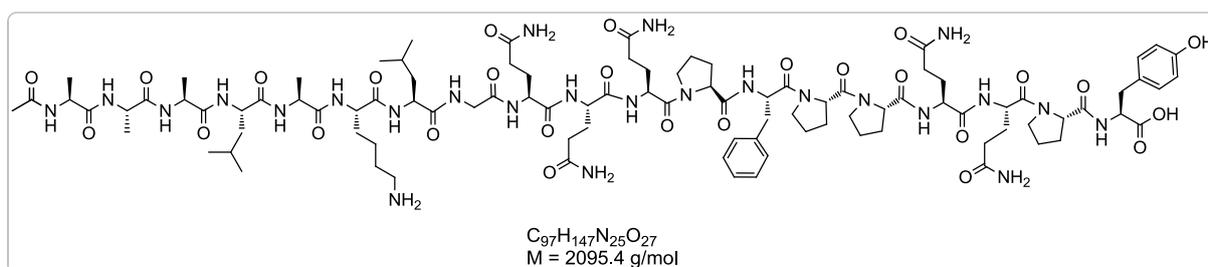
Ac-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **74**



In einer 5 mL-Spritze wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 142 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 257 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 163 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe, zweimal 148 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, 125 mg (0.42 mmol) Fmoc-Gly, dreimal 131 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Ala und 55 mg (0.42 mmol) Ac-(L)-Ala mit jeweils 159 mg (0.42 mmol) HBTU, 58 mg (0.42 mmol) HOBt, sowie 140 μ L (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang-Harz erfolgte ebenfalls gemäß AAV 2. Das Rohprodukt (gelbliches Öl) wurde chromatographisch mittels HPLC/RP mit $H_2O/MeCN$ als Eluent gereinigt. Somit konnten 56 mg (0.03 mmol, 41%) des Peptids **74** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, MeCN 5 zu 75% in 10 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 6.2$ min. MS (ES): m/z (%) = 984.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1968.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (7%).

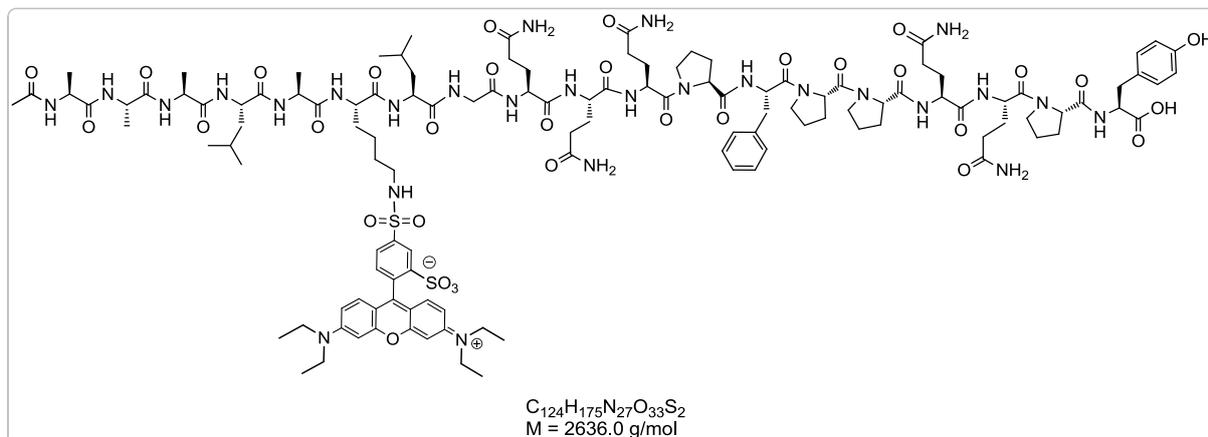
Ac-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Lys-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **75**



Es wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 142 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 257 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 163 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe, zweimal 148 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, 125 mg (0.42 mmol) Fmoc-Gly, 197 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Lys(Boc), dreimal 131 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Ala und 55 mg (0.42 mmol) Ac-(L)-Ala mit jeweils 159 mg (0.42 mmol) HBTU, 58 mg (0.42 mmol) HOBT, sowie 140 μL (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Das synthetisierte Peptid wurde ebenfalls gemäß AVV 2 vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Rohprodukts (gelblicher Feststoff) erfolgte über präparative HPLC und lieferte **75** (57 mg, 0.03 mmol, 39%) als farblosen Feststoff.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 10 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 2.6$ min. MS (ES): m/z (%) = 1048.6 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 699.4 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (34%), MS (ES): m/z (%) = 2096.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (2%).

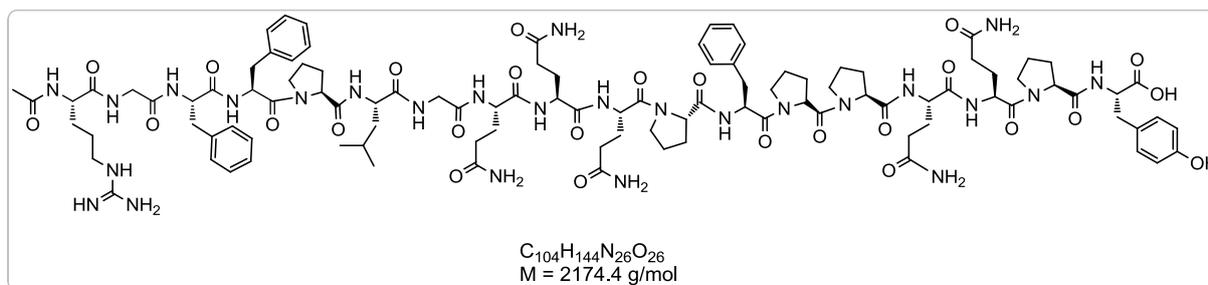
Ac-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Lys(Lissamin)-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr 78



Nach AAV 4 wurden 20 mg (9.55 μmol) des Peptids **75** mit 8 mg (14.32 μmol) des Lissamin-Farbstoffs umgesetzt. Das gewünschte Produkt **78** wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Auf eine Reinigung wurde verzichtet.

MS (ES): m/z (%) = 879.4 $[M+3H]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1318.6 $[M+2H]^{2+}$ (65%).

Ac-(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr 76

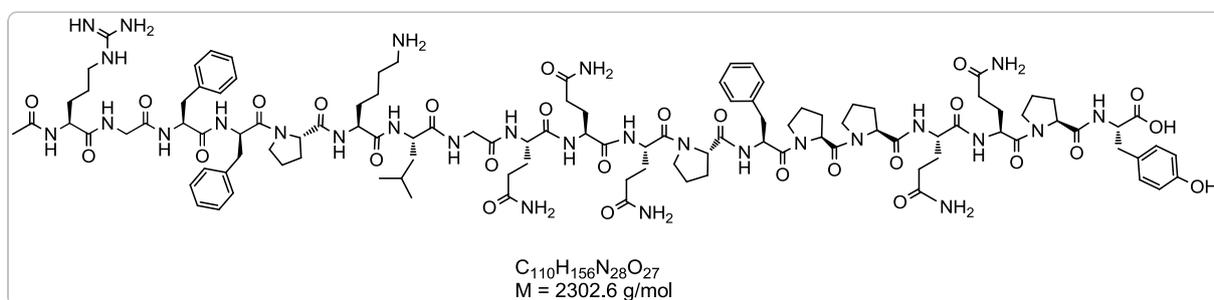


Mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers wurden 71 mg (0.05 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden fünfmal jeweils 88 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 159 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), dreimal 101 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 92 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, zweimal jeweils 77 mg (0.26 mmol) Fmoc-Gly und 158 mg (0.26 mmol) Ac-(L)-Arg(Mtr) mit jeweils 95 mg (0.26 mmol) HBTU, 35 mg (0.26 mmol) HOBt, sowie 85 μL (0.50 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde ein Capping analog AAV 5 durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang-Harz erfolgte nach AAV 2. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mittels HPLC/RP mit $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ als Eluent gereinigt.

Somit konnten 53 mg (0.02 mmol, 49%) des Peptids **76** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μ m Partikel, 3 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 10 min mit H₂O, 210 nm): t_R = 2.6 min. MS (ES): m/z (%) = 1099.0 [M+H+Na]²⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1088.0 [M+2H]²⁺ (74%), MS (ES): m/z (%) = 2175.0 [M+H]⁺ (21%), MS (ES): m/z (%) = 1107.0 [M+H+K]²⁺ (18%).

Ac-(L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Phe-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Lys-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **77**

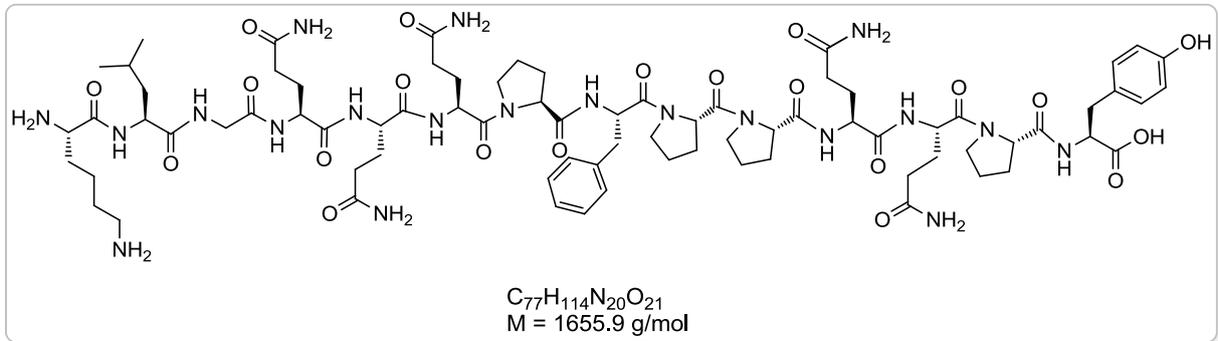


Es wurden 71 mg (0.05 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers nach AAV 2 umgesetzt. Dazu wurden fünfmal jeweils 88 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 159 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), dreimal 101 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 92 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu, zweimal jeweils 77 mg (0.26 mmol) Fmoc-Gly, 122 mg (0.26 mmol) Fmoc-(L)-Lys(Boc) und 158 mg (0.26 mmol) Ac-(L)-Arg(Mtr) mit jeweils 95 mg (0.26 mmol) HBTU, 35 mg (0.26 mmol) HOBt, sowie 85 μ L (0.50 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde ein Capping analog AAV 5 durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids vom Wang-Harz erfolgte nach AAV 2. Nach anschließender Gefriertrocknung konnte **77** (70 mg, 0.03 mmol, 61%) in Form eines farblosen Feststoffs mit ausreichender Reinheit dargestellt werden.

MS (ES): m/z (%) = 1152.0 [M+2H]²⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 768.4 [M+3H]³⁺ (21%), MS (ES): m/z (%) = 2303.1 [M+H]⁺ (8%).

8.4.10 Versuch zur Darstellung von CTB-Gliadinpeptid-Konjugaten

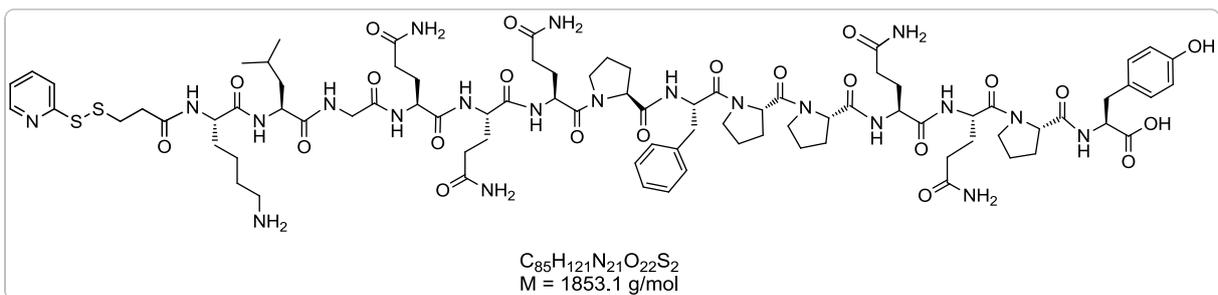
(L)-Lys-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **79**



Nach AAV 2 wurden 200 mg (0.14 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 283 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 513 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 325 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 297 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Leu, 250 mg (0.84 mmol) Fmoc-Gly und 394 mg (0.84 mmol) Fmoc-(L)-Lys(Boc) mit jeweils 319 mg (0.84 mmol) HBTU, 117 mg (0.84 mmol) HOBt, sowie 300 μL (1.68 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Hälfte des synthetisierten Peptids wurde gemäß AVV 2 vom Harz abgespalten. Nach anschließender Gefriertrocknung konnten 67 mg (0.04 mmol, 58%) **79** in ausreichender Reinheit in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden. Die zweite Hälfte des synthetisierten Peptids wurde am Harz belassen und direkt zu **81** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 828.4 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1656.7 $[M+H]^+$ (82%).

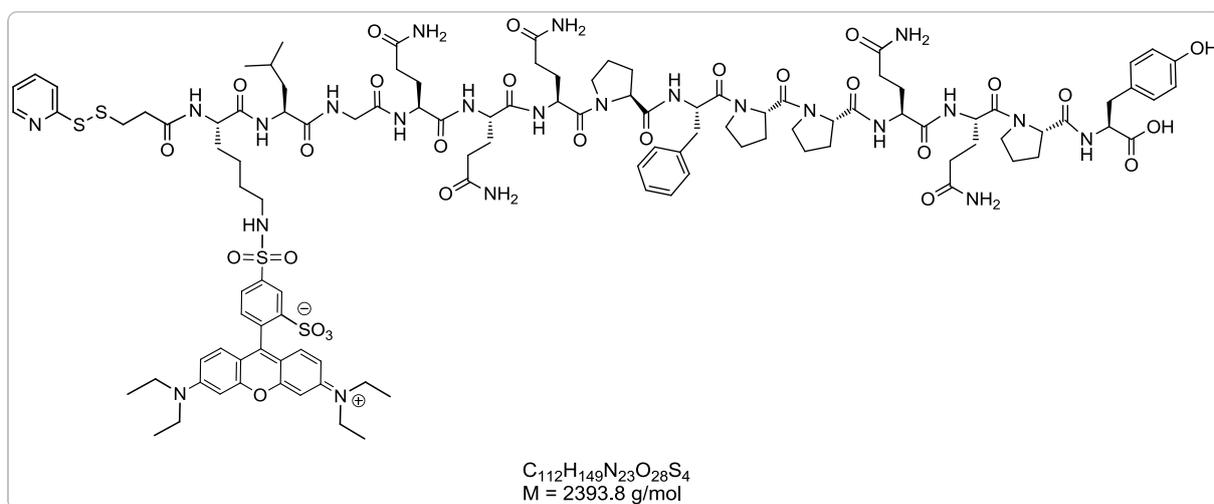
SPDP-(L)-Lys-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **81**



Es wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz, wie oben beschrieben, nach AAV 2 umgesetzt und am Harz belassen. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurden 33 mg (0.11 mmol) einer Lösung des SPDP-Linkers in DMF und 36 μ L (0.21 mmol) Et₃N zum Peptid an der festen Phase zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei RT im Laborschüttler geschüttelt. Im Anschluss wurde das Harz jeweils dreimal mit DMF, CH₂Cl₂, erneut DMF und CH₂Cl₂, dreimal mit einer Mischung aus CH₂Cl₂/MeOH (1:1), sowie sechsmal mit Diethylether gewaschen. Nach 1 h Gefriertrocknung erfolgte die Abspaltung des Konjugats gemäß AAV 2 vom Harz. Nach erneuter Gefriertrocknung des Rohproduktes (gelbes Öl) wurden 30 mg (0.02 mmol, 23%) des gewünschten Produkts **81** als farbloser Feststoff gewonnen. Dieses wurde aufgrund ausreichender Reinheit direkt zu **82** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 927.4 [M+2H]²⁺ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1853.7 [M+H]⁺ (19%).

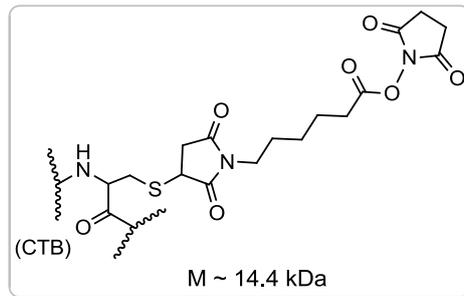
SPDP-(L)-Lys(Lissamin)-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **82**



30 mg (16.18 μ mol) des Peptids **81** wurden mit 14 mg (24.27 μ mol) Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt, so dass nach anschließender Gefriertrocknung 10 mg (4.18 μ mol, 26%) des fluoreszenzmarkierten Konjugats **82** in Form eines lila Feststoff erhalten wurden.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 25 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 17.6$ min. MS (ES): m/z (%) = 1197.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 798.6 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (30%).

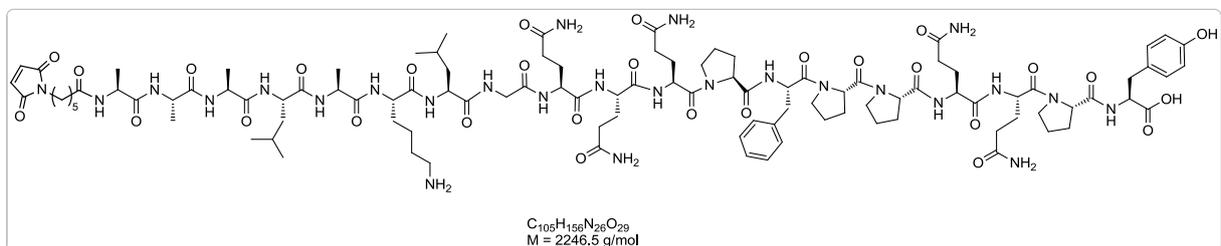
CTB-6-Maleimidohexansäure-succinimid-Konjugat **91**



Es wurden 1 mg (0.02 μmol) CTB und 0.1 mg (0.43 μmol) MHS-Linker in einem 1:1-Gemisch aus Phosphat-Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH = 7.8) und DMSO gelöst. Die leicht gelbliche Reaktionslösung wurde für 48 h bei RT gerührt. Nach Entfernen der Lösungsmittel und anschließender Gefriertrocknung wurde das Konjugat **91** massenspektrometrisch nachgewiesen. Bei **91** handelt es sich um die Verknüpfung von neun Cystein-Einheiten mit jeweils einem MHS-Linker.

MS (Maldi): m/z (%) = 14358.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%).

MHS-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Lys-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr **85**

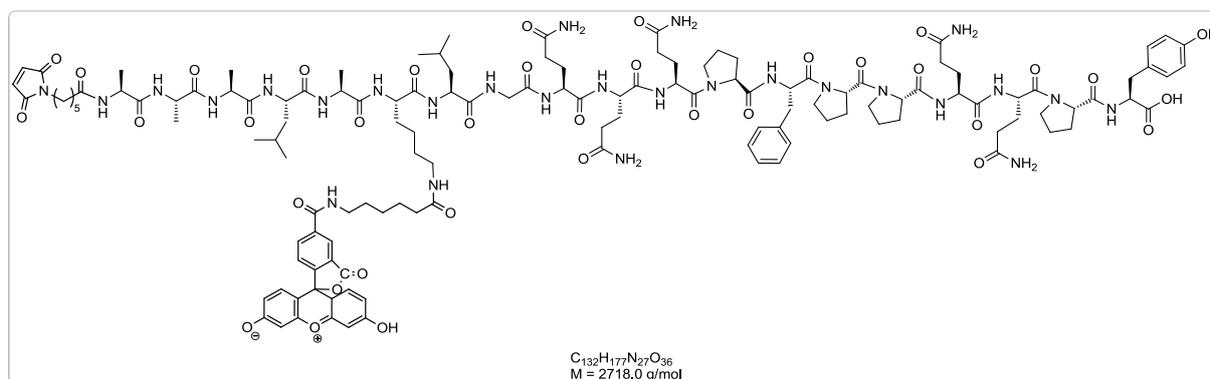


Mit Hilfe eines automatisierten Peptidsynthesizers wurden ca. 20 mg (13.00 μmol) Fmoc-Tyr(^tBu)-Wang-Harz nach AAV 2 umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden viermal jeweils 26 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 48 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 30 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Phe, zweimal 27 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Leu, 23 mg

(0.08 mmol) Fmoc-Gly, 37 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Lys(Boc) und viermal 24 mg (0.08 mmol) Fmoc-(L)-Ala mit jeweils 30 mg (0.08 mmol) HBTU, 11 mg (0.08 mmol) HOBT, sowie 26 μL (0.16 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde das Harz gewaschen und für 2 h im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Harz mit einer Lösung aus 6 Äq. des MHS-Linkers in DMF und 140 μL DIPEA versetzt. Die Suspension wurde für 1 h im Laborschüttler geschüttelt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde ebenfalls gemäß AAV 2 mit TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) durchgeführt. Nach Gefriertrocknung des Rohprodukts wurden 21 mg (9.35 μmol , 72%) des gewünschten Produkts **85** als farbloser Feststoff gewonnen. Dieses wurde aufgrund ausreichender Reinheit direkt zu **86** umgesetzt.

MS (ES): m/z (%) = 749.7 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1124.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (39%).

MHS-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Ala-(L)-Leu-(L)-Ala-(L)-Lys(PromoFluor)-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr
86

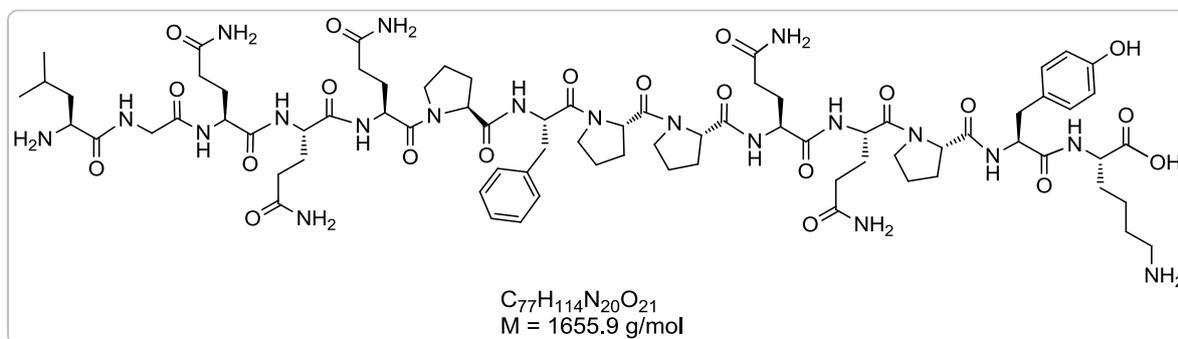


18 mg (8.01 μmol) des Peptids **85** wurden mit 5 mg (8.01 μmol) des PromoFluor488-Farbstoffs nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt, so dass ein gelber Feststoff (7 mg, 2.58 μmol , 32%) erhalten werden konnte.

HPLC (RP-18, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 2 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 30 min mit H₂O, 210 nm): $t_R = 21.85$ min. MS (ES): m/z (%) = 906.8 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1359.7 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (15%), MS (ES): m/z (%) = 680.3 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ (11%).

8.4.11 Darstellung eines NIP-Gliadinpeptid-Komplexes

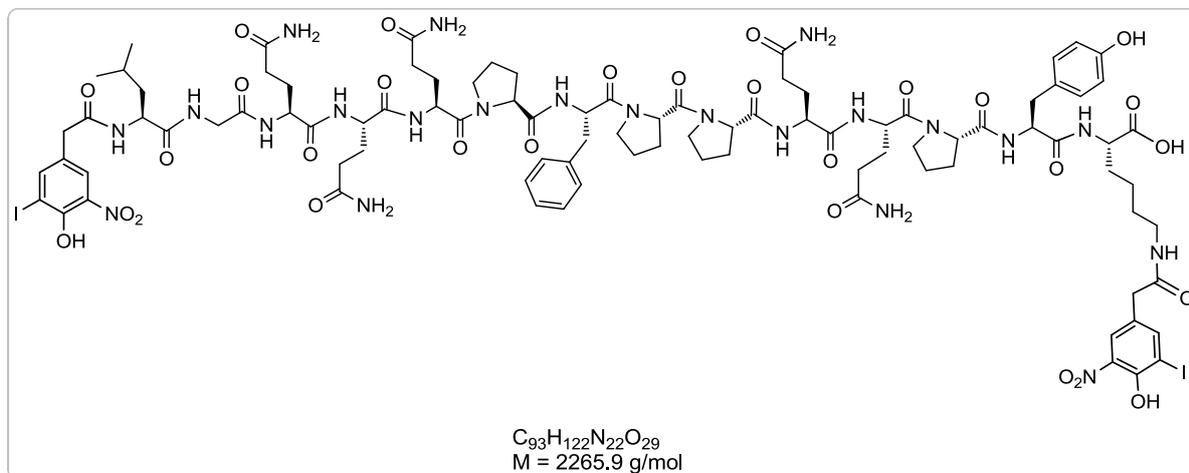
(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr-(L)-Lys **88**



Nach AAV 2 wurden 100 mg (0.07 mmol) Fmoc-Lys(Boc)-Wang-Harz umgesetzt. Für die Kupplungsschritte wurden 257 mg (0.42 mmol) Fmoc-Tyr(^tBu), viermal jeweils 141 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Pro, fünfmal je 257 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Gln(Trt), 163 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Phe, 148 mg (0.42 mmol) Fmoc-(L)-Leu und 125 mg (0.42 mmol) Fmoc-Gly mit jeweils 159 mg (0.42 mmol) HBTU, 58 mg (0.42 mmol) HOBt, sowie 140 μL (0.84 mmol) DIPEA an das Harz gekuppelt. Die Abspaltung des synthetisierten Peptids vom Harz erfolgte ebenfalls nach AAV 2. Die chromatographische Reinigung mittels präparativer HPLC lieferte **88** (47 mg, 0.03 mmol, 41%) als farblosen Feststoff.

HPLC (RP-8, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, MeCN 5 zu 95% in 15 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 2.8 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 828.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 1655.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (35%).

NIP-(L)-Leu-Gly-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Phe-(L)-Pro-(L)-Pro-(L)-Gln-(L)-Gln-(L)-Pro-(L)-Tyr-(L)-Lys(NIP) 90



Unter N_2 -Atmosphäre wurden 20 mg (12.08 μmol) des Peptids **88** in 2 mL abs. DMSO gelöst. Dann wurde solange NEt_3 zugegeben, bis der pH etwa 8 betrug. 20 mg (48.31 μmol) NIP-OSu **89** wurden ebenfalls in 5 mL DMSO gelöst und langsam zur Peptid-Lösung zugetropft. Die gelbe Reaktionslösung wurde für 46 h bei RT und unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Nach Reinigung über präparativer HPLC konnten 12 mg (5.30 μmol , 44%) **90** in Form eines gelben Feststoffs gewonnen werden.

HPLC (RP-8, 250 x 8 mm ID, 5 μm Partikel, 3 mL/min, MeCN 5 zu 50% in 10 min mit H_2O , 210 nm): $t_R = 2.8 \text{ min}$. MS (ES): m/z (%) = 1133.8 $[M+2H]^{2+}$ (100%), MS (ES): m/z (%) = 2266.5 $[M+H]^+$ (7%).

8.5 Durchführung der Inkubationsstudien mit CatD

10 µg menschliches, rekombinates CatD wurden von der Firma R&D Systems käuflich erworben. Nach Erhalt wurde das farblose, lyophilisierte Pulver in 100 µL PBS-Puffer (pH = 7.4) gelöst, zu jeweils 5 µL-Aliquots aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für jeden Inkubationsversuch wurde ein frisches Aliquot verwendet, um Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden. Der pH-Wert der Puffer wurde mit Hilfe eines pH-Meters eingestellt. Alle Inkubationsexperimente wurden als Doppelbestimmung mit einer Inkubationsdauer von 8 h bzw. 90 min durchgeführt.

Für jedes Inkubationsexperiment wurde bei pH = 3.5 voraktiviertes CatD verwendet. Dazu wurden die 5 µL-Aliquots jeweils in 20 µL NaOAc/NaCl-Puffer (0.1 M, pH = 3.5) gelöst und 30 min bei 37 °C vorinkubiert.

Dann wurden die Linker Ac-AAALAK (xx), GLLFFK (xx), Ac-RGFFPK (xx), KPILFFRLGK (xx), sowie Ac-AAALALGQQQPFPPQQPY (xx) je nach Löslichkeit in NaOAc-Puffer und DMSO gelöst und mit jeweils 25 µL aktiviertem CatD bei pH = 3.5 und 37 °C verdaut. Die Details der Inkubation veranschaulicht Tabelle 8.1.

Tabelle 8.1: Experimentelle Daten bezüglich des Inkubationsexperiments.

Verbindung	Menge [mg]	Zugabe NaOAc- Puffer [µL]	Zugabe DMSO [µL]	Inkubationsdauer
Ac-AAALAK	2.2	150	20	8 h
GLLFFK	2.3	300	100	8 h
Ac-RGFFPK	2.5	150	50	8 h
KPILFFRLGK	2.0	150	50	8 h
Ac-AAALAL- GQQQPFPPQQPY	0.5	100	10	1) 8 h 2) 90 min

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Inkubationslösungen in Eppendorf-Gefäße aus Polyethylen mit Filtern (Porengröße 3 K) umgefüllt und zentrifugiert. Das Eppendorf-Gefäß wurde mit 50 µL H₂O und 50 µL MeCN gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Inkubationsproben wurden mittels LCMS bzw. MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert.

8.6 Durchführung der Zellassays

8.6.1 Live Imaging

Als Ausgangsmaterial für die Echtzeitaufnahmen wurden etwa 5×10^4 Zellen/cm² Caco-2-Zellen auf Glas-Coverslips in einem Zellkulturmedium, bestehend aus einem Indikator (Phenolrot) und verschiedenen Aminosäuren als Nährlösung, ausgesät. In einem Brutschrank (37 °C und 5% CO₂-Anteil) wurden die Zellen für 2 d inkubiert, bis die Coverslips bis zu 90% konfluent mit einem dichten Zellrasen besiedelt waren.

Die Caco-2-bewachsenen Coverslips wurden in eine Multiwellplatte überführt. 70 µg der Fluoreszenz-markierten Peptide wurden mit 860 µL DMEM verdünnt. Dann wurden die Caco-2-Zellen mit 300 µL der fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptid-Lösung für 2 h inkubiert. Anschließend wurde mit PBS mehrmals gewaschen und ein *Live Imaging* über 20 min erstellt. Dabei wurden die Zellen in Abständen von 30 sec mit einem Laser beschossen und mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops optisch verfolgt.

8.6.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie-Versuche wurden Caco-2-Zellen analog der in Abschnitt 8.8.1 beschriebenen Vorgehensweise zum Wachstum gebracht und dann mit 300 µL fluoreszenzmarkiertem Gliadinpeptid inkubiert. Direkt nach der Inkubation erfolgte die Fixierung mit 3%iger Paraformaldehyd-Lösung. Pro Coverslip wurden die Caco-2-Zellen mit 300 µL einer 3%igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS für 4 min bei RT inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Auf jeden Coverslip wurden 300 µL PBS aufgetragen und unter dem Konfokalmikroskop von jedem Chamber ein Bild aufgenommen. Die auf diese Weise fixierten Zellen konnten bei 4 °C im Dunkeln maximal einen Monat gelagert werden, sollten aber zeitnah mikroskopiert werden, da die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe mit der Zeit abschwächt.

Für die Doppelmarkierungstechnik der Zellkompartimente wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dafür wurde jeweils zweimal für 5 min mit einem Laborschüttler inkubiert. Dann wurden 150 µL einer 1%igen Triton-X-100-Lösung mit 850 µL einer PBS-Lösung auf 0.15% verdünnt. Mit jeweils 100 µL dieser 0.15%igen Triton-Lösung pro Chamber wurde für

jeweils 1 min in einer Feuchtkammer die Zellmembran permeabilisiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde im Anschluss mit 100 μ L einer 1%igen Lösung aus FKS in PBS für 30 min in der Feuchtkammer inkubiert.

Danach wurden die Caco-2-Zellen mit 100 μ L primären Antikörpern (beispielsweise LAMP-2-Antikörper) bei RT im Dunkeln für 1 h inkubiert. Somit erfolgte die Kopplung an LAMP-2-Markerproteine auf der Oberfläche LE. Es wurde einmal kurz, dann dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 100 μ L der fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper (IgG markiert mit dem Alexa Fluor 555-Farbstoff) für 45 min bei RT im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde mit 100 μ L des Hoechst-Farbstoffs 33342 für 5 min im Dunkeln inkubiert, um die Zellkerne blau anzufärben. Nachdem einmal kurz, dann dreimal für jeweils 5 min mit PBS-Lösung gewaschen wurde, wurden die Zellen mit 4 Tropfen eines Ividi Mounting Mediums fixiert und somit haltbar gemacht.

Für die Markierung der EE wurden EEA1-Antikörper eingesetzt. Die Markierung wurde analog der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt.

Je nachdem ob PromoFluor-markierte (grün) oder Lissamin-Farbstoff-markierte (rot) Gliadinpeptide verwendet wurden, wurden entweder sekundäre Antikörper gekoppelt mit dem Alexa Fluor-Farbstoff 555 (rot) oder dem Alexa Fluor-Farbstoff 488 (grün) verwendet.

Für die Auswertung mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop wurden PBS-Rückstände auf den Coverslips mit Zellstoff und entmineralisiertem H₂O entfernt. Nach dem Auftragen von Immersionsöl wurden die Zellproben bei einer Vergrößerung von 63 x mikroskopiert. Dabei wurde zunächst per Immunfluoreszenz eine geeignete Stelle im Präparat gesucht und eingestellt. Anschließend konnten die Farben einzeln oder im sog. Overlay durch Laser der verschiedenen Wellenlängen (405 nm, 488 nm, 543 nm) betrachtet werden. Das entstehende Bild ließ sich mit der Software EZ-C1 3.80 Free Viewer darstellen und bearbeiten. Eine wichtige Funktion der Software war die Analyse der Co-Lokalisationen der verschiedenen Farben und die Angabe eines Co-Lokalisationskoeffizienten.

8.6.3 Transwell-Experimente

Es wurden etwa 7.5×10^4 Zellen/well Caco-2-Zellen auf Transwell-Filtern in einem Transwell-System ausgesät. Das Zellkulturmedium bestehend aus DMEM, 20% FKS und 1% PenStrep (Antibiotika) wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden so lange wachsen gelassen, bis die Transwell-Filter postkonfluent mit einem dichten, lückenlosen Zellrasen besiedelt waren (15 bis 16 d). Vor der Versuchsdurchführung erfolgte die Messung des Widerstandes zwischen dem apikalen und basolateralen Medium mit Hilfe einer Elektrode, um die Unversehrtheit der Zellmembran zu kontrollieren.

Dann wurden die Zellen in dem Transwell-System für 30 min in HBSS-Lösung bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Zur Hemmung der Endocytose wurden einigen Transwells auf der apikalen Seite der Endocytosehemmer M β CD zugesetzt. Zur Hemmung der Zellaktivität wurden einige der Transwells bei 4 °C vorinkubiert. Nach 30 min Vorinkubation wurde erneut der Widerstand zwischen apikaler und basolateraler Seite gemessen, um die Unversehrtheit der Membran zu prüfen.

Zur Untersuchung des Transports wurden jeweils 100 μ L fluoreszenzmarkiertes Gliadinpeptid apikal, sowie 400 μ L HBSS basolateral zugegeben. Inkubiert wurde jeweils mit den PromoFluor- bzw. Lissamin-markierten Gliadinpeptiden p31-43, sowie p56-68. Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

- 1) Inkubation mit 145 nmol/mL über 3 h
- 2) Inkubation mit 32 nmol/mL über 3 h
- 3) Inkubation mit 32 nmol/mL über 24 h
- 4) Inkubation mit 32 nmol/mL über 24 h mit apikalem Zusatz von M β CD
- 5) Inkubation mit 32 nmol/mL über 3 h bei 4 °C

Nach der jeweiligen Inkubation wurde erneut der Widerstand zwischen apikaler und basolateraler Seite gemessen, um die Unversehrtheit der Membran zu prüfen.

Nach der Inkubation wurden die apikalen und basolateralen Überstände der Transwells mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen, um den Transport der Gliadinpeptide durch die Zellmembran zu quantifizieren. Diese Messung erfolgte im Fall der PromoFluor-markierten Peptide bei 485 nm als Absorptionswellenlänge und 538 nm als Emissionswellenlänge. Strukturelle Veränderungen der PromoFluor- und Lissamin-markierter Peptide wurden anhand von MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die Transwellmembran, auf der

sich die Zellen befinden, wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie und konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie analysiert, um die zelluläre Aufnahme der Peptide zu bestimmen. Für letzteres wurden die Transwellmembran isoliert und die Zellen mittels 3%iger Paraformaldehyd-Lösung für 5 min fixiert. Die Färbung der Zellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff erfolgte wie in Abschnitt 8.8.2 beschrieben. Nach Montieren der Transwells auf Objektträgern wurde die Peptidaufnahme in die Zellen mittels konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops beurteilt.

9 Gefahrstoffe

Verbindung	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Acetaldehyd	Gefahr	224-351-319-335	210-233-281-305/351/338-308/313
Acetanhydrid	Gefahr	226-332-302-314-335	280-301/330/331-305/351/338-309/310
Aceton	Gefahr	225-319-336-EUH066	210-233-305/351/338
Acetonitril	Gefahr	225-302/312/332-319	210-305/351/338-403/235
Boc ₂ O	Gefahr	<u>226</u> -315-317-319-330-335	260-280-284-305/351/338-310
<i>p</i> -Chloranil	Achtung	315-319-410	273-302/352-305/351/338
Dichlormethan	Achtung	351	281-308/313
Diethylether	Gefahr	224-302-336-EUH019-EUH066	210-304/340-403/235
Dimethylformamid	Gefahr	360D-226-312/332-319	201-210-302/352-305/351/338-308/313
Dimethylsulfoxid	Achtung	227	
1,4-Dioxan	Gefahr	225-351-319-EUH019-EUH066	210-281-305/351/338-308/313
DIPEA	Gefahr	225-301-314-412	210-233-240-273-280-301/330/331-305/351/338-309/310-403/235
EDC-Hydrochlorid	Gefahr	314	280-260
Ethylacetat	Gefahr	225-319-336-EUH066	210-240-305/351/338
HBTU	Gefahr	228-315-319	210-302/352-305/351/338
HCl	Achtung	290	
HF	Gefahr	330-310-300-314	260-264-280-284-301/310-

			302/350
HOBt	Gefahr	203	210-370/380-240-250-280-372
Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid	Achtung	315-319-335	305/351/338
Methanol	Gefahr	225-301/311/331	210-280-302/352-309/310- 403/235
MHS	Achtung	315-319-335	261-305/351/338-302/352- 321-405-501A
Natriumhydroxid	Gefahr	290-314	280-301/330/331- 305/351/338-309/310
Paraformaldehyd	Achtung	228-302/332-351-335- 315-319-317	281-302/352-305/351/338- 308/313-304/340
Phenol	Gefahr	301/311/331-314-341-373	280-302/352-301/330/331- 309-310-305/351/338
Piperidin	Gefahr	225-300-311/331-314	210-233-240-280- 301/330/331-302/352- 304/340-305/351/338- 309/310-403/235
PromoFluor488- <i>N</i> - hydroxy-succinimid	Achtung	319	305/351/338-337/313
Propandithiol	Achtung	315-319-335	261-305/351/338
Pyridin	Gefahr	225-302/312/332	210-302/352-304/340-403/235
SPDP	Achtung	315-319-335	261-264-280-302/352- 304/340-305/351/338-312- 321-332/313-337/313-362- 403/233-405-501
Thioanisol	Achtung	226	210
Thionylchlorid	Gefahr	302-314-331-335- EUH014-EUH029	280-301/330/331-304/340- 305/351/338-309/310
TNBS	Gefahr	301-314-317-EUH001	260-264-280-301/310- 301/330/331-302/352- 303/361/353-304/340-

			305/351/338-321-333/313-405-501
Triisopropylsilan	Achtung	226	210-260-262
Triton-X-100-Lsg.	Gefahr	318-412	273-280-305/351/338
Toluol	Gefahr	225-304-315-336-361D-373	210-240-301/310-331-302/352-403/235
Triethylamin	Gefahr	225-332-312-302-314-335	210-280-301/310-331-302/352-305/351/338-309/310
Trifluoressigsäure	Gefahr	314-332-412	273-280-301/310-331-305/351/338-309/310

10 Literaturverzeichnis

- (1) Beutler, B.; Rietschel, E. T. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 169.
- (2) <http://mediknet.blogspot.de/2012/05/cholera.html>; 15.10.2012.
- (3) <http://www.mikroskopie-forum.de/index.php?topic=13351.0>; 03.09.2012.
- (4) Ganz, T.; Lehrer, R. I. *Curr. Opin. Immunol.* **1994**, *6*, 584.
- (5) Kagan, B. L.; Ganz, T.; Lehrer, R. I. *Toxicology* **1994**, *87*, 131.
- (6) Oppenheim, J. J.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Yang, D. *Ann. Rheum. Dis.* **2003**, *62*, 17.
- (7) Medzhitov, R.; Janeway, C., Jr. *Immunol. Rev.* **2000**, *173*, 89.
- (8) Medzhitov, R.; Janeway Jr, C. A. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 4.
- (9) Fearon, D. T.; Locksley, R. M. *Science* **1996**, *272*, 50.
- (10) Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A. B. *Science* **1999**, *284*, 1313.
- (11) Beutler, B. *Mol. Immunol.* **2004**, *40*, 845.
- (12) Janeway, C. A.; Medzhitov, R. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197.
- (13) Jin, M. S.; Lee, J.-O. *Immunity* **2008**, *29*, 182.
- (14) Robertson, M. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R595.
- (15) Takahashi, K.; Ip, W. K. E.; Michelow, I. C.; Ezekowitz, R. A. B. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 16.
- (16) Weis, W. I.; Drickamer, K. *Structure* **1994**, *2*, 1227.
- (17) Fujita, T.; Matsushita, M.; Endo, Y. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 185.
- (18) Wallis, R. *Immunobiology* **2002**, *205*, 433.
- (19) Muller-Eberhard, H. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 321.
- (20) Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 335.
- (21) Underhill, D. M.; Ozinsky, A. *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 103.
- (22) Kaisho, T.; Akira, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1589*, 1.
- (23) Choe, J.; Kelker, M. S.; Wilson, I. A. *Science* **2005**, *309*, 581.
- (24) Botos, I.; Segal, D. M.; Davies, D. R. *Structure* **2011**, *19*, 447.
- (25) Xu, Y.; Tao, X.; Shen, B.; Horng, T.; Medzhitov, R.; Manley, J. L.; Tong, L. *Nature* **2000**, *408*, 111.
- (26) Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13*, 291.
- (27) Banchereau, J.; Steinman, R. M. *Nature* **1998**, *392*, 245.
- (28) <http://www.chemiereport.at/zulassung-fuer-ersten-impfstoff-gegen-hirntumor>; 03.09.2012.
- (29) Aderem, A.; Underhill, D. M. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 593.
- (30) Burshtyn, D. N.; Long, E. O. *Trends Cell Biol.* **1997**, *7*, 473.
- (31) Timonen, T.; Helander, T. S. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 667.
- (32) Butcher, E. C.; Picker, L. J. *Science* **1996**, *272*, 60.
- (33) Picker, L. J.; Butcher, E. C. *Annu. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 561.
- (34) <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/lymphsystem/>; 03.09.2012.
- (35) Cyster, J. G. *Science* **1999**, *286*, 2098.
- (36) Podack, E. R.; Kupfer, A. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1991**, *7*, 479.
- (37) Unanue, E.; Allen, P. *Science* **1987**, *236*, 551.
- (38) Davies, D. R.; Metzger, H. *Annu. Rev. Immunol.* **1983**, *1*, 87.
- (39) Davies, D. R.; Sheriff, S.; Padlan, E. A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10541.
- (40) Wilson, I. A.; Stanfield, R. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 113.
- (41) Burton, D. R. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 64.
- (42) Amzel, L. M.; Poljak, R. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 961.

-
- (43) Segal, D. M.; Padlan, E. A.; Cohen, G. H.; Rudikoff, S.; Potter, M.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*, 4298.
- (44) Poljak, R. J.; Amzel, L. M.; Avey, H. P.; Chen, B. L.; Phizackerley, R. P.; Saul, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1973**, *70*, 3305.
- (45) Yguerabide, J.; Epstein, H. F.; Stryer, L. *J. Mol. Biol.* **1970**, *51*, 573.
- (46) Pizarro, J. C.; Boulot, G.; Bentley, G. A.; Gómez, K. A.; Hoebeke, J.; Hontebeyrie, M.; Levin, M. J.; Smulski, C. R. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1375.
- (47) Wu, T. T.; Kabat, E. A. *J. Exp. Med.* **1970**, *132*, 211.
- (48) Novotný, J.; Haber, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 4592.
- (49) Chothia, C.; Novotný, J.; Brucoleri, R.; Karplus, M. *J. Mol. Biol.* **1985**, *186*, 651.
- (50) Koshland, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44*, 98.
- (51) Rini, J. M.; Schulze-Gahmen, U.; Wilson, I. A. *Nature* **1992**, *255*, 959.
- (52) Koshland, D. E. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2468.
- (53) Koshland, D. E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *33*, 2375.
- (54) Seiler, F. R.; Gronski, P.; Kurrle, R.; Lüben, G.; Harthus, H.-P.; Ax, W.; Bosslet, K.; Schwick, H.-G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 139.
- (55) Seiler, F. R.; Gronski, P.; Kurrle, R.; Lüben, G.; Harthus, H.-P.; Ax, W.; Bosslet, K.; Schwick, H.-G. *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 141.
- (56) Stelzner, A.; Groh, A.; Vogt, K. H.; Kittlick, M. *Food / Nahrung* **1987**, *31*, 397.
- (57) Eichmann, K. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 54.
- (58) Eichmann, K. *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 56.
- (59) Kloetzel, P.-M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 179.
- (60) Goldberg, A. L.; Rock, K. L. *Nature* **1992**, *357*, 375.
- (61) Rock, K. L.; Goldberg, A. L. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 739.
- (62) Howard, J. C. *Curr. Opin. Immunol.* **1995**, *7*, 69.
- (63) Zinkernagel, R. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1938.
- (64) Zinkernagel, R. M.; Doherty, P. C. *Nature* **1974**, *248*, 701.
- (65) Liu, J.; Dai, L.; Qi, J.; Gao, F.; Feng, Y.; Liu, W.; Yan, J.; Gao, G. F. *J. Virol.* **2011**, *85*, 7372.
- (66) Leonhardt, R. M.; Knittler, M. R. *BIOspektrum* **2003**, *9*, 23.
- (67) Germain, R. N. *Cell* **1994**, *76*, 287.
- (68) Matsumura, M.; Fremont, D.; Peterson, P.; Wilson, I. *Science* **1992**, *257*, 927.
- (69) Townsend, A.; Bodmer, H. *Annu. Rev. Immunol.* **1989**, *7*, 601.
- (70) Peterson, P. A.; Rask, L.; Lindblom, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*, 35.
- (71) Grey, H. M.; Kubo, R. T.; Colon, S. M.; Poulik, M. D.; Cresswell, P.; Springer, T.; Turner, M.; Strominger, J. L. *J. Exp. Med.* **1973**, *138*, 1608.
- (72) Bjorkman, P. J.; Parham, P. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 253.
- (73) Kaufman, J. F.; Auffray, C.; Korman, A. J.; Shackelford, D. A.; Strominger, J. *Cell* **1984**, *36*, 1.
- (74) Bjorkman, P. J. *Cell* **1997**, *89*, 167.
- (75) Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Urban, R. G.; Strominger, J. L.; Wiley, D. C. *Nature* **1993**, *364*, 33.
- (76) Murthy, V. L.; Stern, L. J. *Structure* **1997**, *5*, 1385.
- (77) Fremont, D. H.; Hendrickson, W. A.; Marrack, P.; Kappler, J. *Science* **1996**, *272*, 1001.
- (78) Fremont, D. H.; Monnaie, D.; Nelson, C. A.; Hendrickson, W. A.; Unanue, E. R. *Immunity* **1998**, *8*, 305.
- (79) Reinherz, E. L.; Tan, K.; Tang, L.; Kern, P.; Liu, J.-h.; Xiong, Y.; Hussey, R. E.; Smolyar, A.; Hare, B.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Chang, H.-C.; Wagner, G.; Wang, J.-H. *Science* **1999**, *286*, 1913.
- (80) Lichtman, A. H.; Abbas, A. K. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, R242.
- (81) Rudolph, M. G.; Stanfield, R. L.; Wilson, I. A. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 419.
- (82) Hennecke, J.; Wiley, D. C. *Cell* **2001**, *104*, 1.

-
- (83) Garboczi, D. N.; Ghosh, P.; Utz, U.; Fan, Q. R.; Biddison, W. E.; Wiley, D. C. *J. Immunol.* **1996**, *185*, 6394.
- (84) Ding, Y.-H.; Smith, K. J.; Garboczi, D. N.; Utz, U.; Biddison, W. E.; Wiley, D. C. *Immunity* **1998**, *8*, 403.
- (85) Bentley, G. A.; Mariuzza, R. A. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 563.
- (86) Garcia, K. C.; Teyton, L.; Wilson, L. A. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 369.
- (87) Marrack, P.; Kappler, J. In *Advances in Immunology*; Frank, J. D., Ed.; Academic Press: 1986; Vol. Volume 38, p 1.
- (88) Marrack, P.; Kappler, J. *Science* **1987**, *238*, 1073.
- (89) Davis, M. M.; Boniface, J. J.; Reich, Z.; Lyons, D.; Hampl, J.; Arden, B.; Chien, Y. H. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 523.
- (90) Davis, S. J.; Ikemizu, S.; Evans, E. J.; Fugger, L.; Bakker, T. R.; van der Merwe, P. A. *Nature Immunol.* **2003**, *4*, 217.
- (91) Salter, R. D.; Benjamin, R. J.; Wesley, P. K.; Buxton, S. E.; Garrett, T. P. J.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Norment, A. M.; Littman, D. R.; Parham, P. *Nature* **1990**, *345*, 41.
- (92) Gao, G. F.; Tormo, J.; Gerth, U. C.; Wyer, J. R.; McMichael, A. J.; Stuart, D. I.; Bell, J. I.; Jones, E. Y.; Jakobsen, B. K. *Nature* **1997**, *387*, 630.
- (93) Gao, G. F.; Jakobsen, B. K. *Immunol. Today* **2000**, *21*, 630.
- (94) Peterlin, B. M.; Trono, D. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 97.
- (95) Sweet, R. W.; Truneh, A.; Hendrickson, W. A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 622.
- (96) Sakihama, T.; Smolyar, A.; Reinherz, E. L. *Immunol. Today* **1995**, *16*, 581.
- (97) Leahy, D. J. *FASEB J.* **1995**, *9*, 17.
- (98) Wang, R.; Natarajan, K.; Margulies, D. H. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 2554.
- (99) Yin, Y.; Wang, X. X.; Mariuzza, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 5405.
- (100) Clevers, H.; Alarcon, B.; Wileman, T.; Terhorst, C. *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, *6*, 629.
- (101) Jorgensen, J. L.; Reay, P. A.; Ehrlich, E. W.; Davis, M. M. *Annu. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 835.
- (102) Itoh, N.; Yonehara, S.; Ishii, A.; Yonehara, M.; Mizushima, S.-I.; Sameshima, M.; Hase, A.; Seto, Y.; Nagata, S. *Cell* **1991**, *66*, 233.
- (103) Kagi, D.; Ledermann, B.; Burki, K.; Seiler, P.; Odermatt, B.; Olsen, K. J.; Podack, E. R.; Zinkernagel, R. M.; Hengartner, H. *Nature* **1994**, *369*, 31.
- (104) Lowin, B.; Hahne, M.; Mattmann, C.; Tschopp, J. *Nature* **1994**, *370*, 650.
- (105) June, C. H.; Ledbetter, J. A.; Linsley, P. S.; Thompson, C. B. *Immunol. Today* **1990**, *11*, 211.
- (106) Weintraub, B. C.; Goodnow, C. C. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R575.
- (107) Schwartz, J.-C. D.; Zhang, X.; Nathenson, S. G.; Almo, S. C. *Nature Immunol.* **2002**, *3*, 427.
- (108) Janeway, C. A. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, R342.
- (109) von Boehmer, H. *Cell* **1994**, *76*, 219.
- (110) Nossal, G. J. V. *Cell* **1994**, *76*, 229.
- (111) Sha, W. C.; Nelson, C. A.; Newberry, R. D.; Kranz, D. M.; Russell, J. H.; Loh, D. Y. *Nature* **1988**, *336*, 73.
- (112) Shi, F.-D.; Ljunggren, H.-G.; Sarvetnick, N. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 97.
- (113) Hahn, M.; Nicholson, M. J.; Pyrdol, J.; Wucherpfennig, K. W. *Nature Immunol.* **2005**, *6*, 490.
- (114) Ely, L. K.; Burrows, S. R.; Purcell, A. W.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 575.
- (115) Tjon, J.; van Bergen, J.; Koning, F. *Immunogenetics* **2010**, *1*.
- (116) Jabri, B.; Sollid, L. M. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 858.
- (117) Schuppan, D.; Junker, Y.; Barisani, D. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 1912.
- (118) Koning, F.; Schuppan, D.; Cerf-Bensussan, N.; Sollid, L. M. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2005**, *19*, 373.

- (119) Sollid, L. M. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 647.
- (120) Caspary, W. F. *Ernaehrung und Medizin* **2009**, *24*, 56.
- (121) Brandtzaeg, P. *Immunol. Lett.* **2006**, *105*, 127.
- (122) Caputo, I.; Barone, M. V.; Martucciello, S.; Lepretti, M.; Esposito, C. *Amino Acids* **2009**, *36*, 693.
- (123) Dieterich, W.; Ehnis, T.; Bauer, M.; Donner, P.; Volta, U.; Riecken, E. O.; Schuppan, D. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 797.
- (124) Lurz, E.; Scheidegger, U.; Spalinger, J.; Schöni, M.; Schibli, S. *Eur. J. Pediatr.* **2009**, *168*, 839.
- (125) Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Corazza, G. R. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *140*, 408.
- (126) Zilbauer, M.; Zimmer, K. P. *Aktuelle Ernährungsmedizin* **2002**, *27*, 277.
- (127) Silano, M.; Vincentini, O.; De Vincenzi, M. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1489.
- (128) Vilasi, S.; Sirangelo, I.; Irace, G.; Caputo, I.; Barone, M. V.; Esposito, C.; Ragone, R. *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 322.
- (129) Molberg, Ø.; McAdam, S. N.; Sollid, L. M. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2000**, *30*, 232.
- (130) Griffin, M.; Casadio, R.; Bergamini, C. M. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 377.
- (131) Aeschlimann, D.; Thomazy, V. *Connect. Tissue Res.* **2000**, *41*, 1.
- (132) Pinkas, D. M.; Strop, P.; Brunger, A. T.; Khosla, C. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e327.
- (133) Esposito, C.; Caputo, I.; Troncone, R. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2572.
- (134) Kim, C.-Y.; Quarsten, H.; Bergseng, E.; Khosla, C.; Sollid, L. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 4175.
- (135) Dewar, D.; Pereira, S. P.; Ciclitira, P. J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 17.
- (136) Dieterich, W.; Esslinger, B.; Schuppan, D. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *132*, 98.
- (137) Mäki, M.; Collin, P. *Lancet* **1997**, *349*, 1755.
- (138) Lammers, K. M.; Lu, R.; Brownley, J.; Lu, B.; Gerard, C.; Thomas, K.; Rallabhandi, P.; Shea-Donohue, T.; Tamiz, A.; Alkan, S.; Netzel-Arnett, S.; Antalis, T.; Vogel, S. N.; Fasano, A. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 194.
- (139) Bethune, M. T.; Khosla, C. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e34.
- (140) Hüe, S.; Mention, J.-J.; Monteiro, R. C.; Zhang, S.; Cellier, C.; Schmitz, J.; Verkarre, V.; Fodil, N.; Bahram, S.; Cerf-Bensussan, N.; Caillat-Zucman, S. *Immunity* **2004**, *21*, 367.
- (141) Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, *422*, 37.
- (142) Shimizu, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 232.
- (143) Shimizu, M.; Ok Son, D. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 885.
- (144) Mellman, I. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 575.
- (145) Okamoto, C. T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998**, *29*, 215.
- (146) Mukherjee, S.; Ghosh, R. N.; Maxfield, F. R. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 759.
- (147) Jovic, M.; Sharma, M.; Rahajeng, J.; Caplan, S. *Histol. Histopathol.* **2010**, *25*, 99.
- (148) Meresse, B.; Ripoche, J.; Heyman, M.; Cerf-Bensussan, N. *Mucosal Immunol.* **2008**, *2*, 8.
- (149) Zimmer, K.-P.; Naim, H.; Weber, P.; Ellis, H. J.; Ciclitira, P. J. *FASEB J.* **1998**, *12*, 1349.
- (150) Zimmer, K.-P.; Fischer, I.; Mothes, T.; Weissen-Plenz, G.; Schmitz, M.; Wieser, H.; Büning, J.; Lerch, M. M.; Ciclitira, P. C.; Weber, P.; Naim, H. Y. *Gut* **2010**, *59*, 300.
- (151) Sun, J.-B.; Raghavan, S.; Sjöling, Å.; Lundin, S.; Holmgren, J. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 7634.
- (152) Sánchez, J.; Holmgren, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1347.
- (153) Smith, D. C.; Lord, J. M.; Roberts, L. M.; Johannes, L. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 397.
- (154) Pina, D. G.; Johannes, L. *Toxicon* **2005**, *45*, 389.
- (155) Ivarsson, M. E.; Leroux, J.-C.; Castagner, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 4024.
- (156) Ivarsson, M. E.; Leroux, J.-C.; Castagner, B. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4098.
- (157) Sun, J. B.; Czerkinsky, C.; Holmgren, J. *Scand. J. Immunol.* **2010**, *71*, 1.

- (158) Sun, J.-B.; Flach, C.-F.; Czerkinsky, C.; Holmgren, J. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 8278.
- (159) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- (160) Bruice, T. C.; Benkovic, S. J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6267.
- (161) Merrifield, R. B. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799.
- (162) Merrifield, R. B. *Angewandte Chemie* **1985**, *97*, 801.
- (163) Fields, G. B. In *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
- (164) Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951.
- (165) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5463.
- (166) Wang, S.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328.
- (167) Fuller, W. D.; Goodman, M.; Naider F. R.; Zhu, Y. F. *Biopolymers* **1996**, *40*, 183.
- (168) Mergler, M.; Gosteli, J.; Grogg, P.; Nyfeler, R.; Tanner, R. *Chimia* **1999**, *53*, 29.
- (169) Mergler, M.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005.
- (170) Sheppard, R. C.; Williams, B. J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451.
- (171) In *Novabiochem Catalog 2011/2012*.
- (172) Sparrow, J. T. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1350.
- (173) Zaragoza Dörwald, F. *Organic Synthesis on Solid Phase*; Wiley-VCH:Weinheim, 2002.
- (174) Albericio, F. *J. Pept. Sci.* **2000**, *55*, 123.
- (175) Atherton, E.; Hübscher, W.; Sheppard, R. C.; Woolley, V. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 833.
- (176) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- (177) Lenard, J. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 625.
- (178) Sewald, N.; Jakubke, H. D. *Peptides: Chemistry and Biology*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- (179) Altmann, K.-H.; Mutter, M. *Chem. unserer Zeit* **1993**, *27*, 274.
- (180) King, D. S.; Fields, C. G.; Fields, G. B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 255.
- (181) Sieber, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1637.
- (182) Fields, C. G.; Fields, G. B. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6661.
- (183) Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
- (184) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- (185) Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, *1984*, 572.
- (186) Jablonski, A. *Nature* **1933**, *131*, 839.
- (187) Stephenson, L. M.; Hammond, G. S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 261.
- (188) Stephenson, L. M.; Hammond, G. S. *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 279.
- (189) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005; Vol. 7.
- (190) Schwedt, G. *Analytische Methoden: Grundlagen, Methoden und Praxis*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1995.
- (191) <http://www.probes.invitrogen.com/handbook/>.
- (192) Lichtmann, J. W.; Conchello, J. A. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 910.
- (193) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223.
- (194) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Physiol.* **1963**, *62*, 1.
- (195) Tsien, R. Y. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509.
- (196) http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/5_gfp.htm; 15.10.2012.
- (197) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Waggoner, A. S. *Cytometry* **1989**, *10*, 11.
- (198) Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 356.
- (199) Ernst, L. A.; Gupta, R. K.; Mujumdar, R. B.; Waggoner, A. S. *Cytometry* **1989**, *10*, 3.
- (200) Effenberger, F.; Schlosser, H.; Bäuerle, P.; Maier, S.; Port, H.; Wolf, H. C. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 274.

- (201) Effenberger, F.; Schlosser, H.; Bäuerle, P.; Maier, S.; Port, H.; Wolf, H. C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 281.
- (202) Mottram, L. F.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R. E.; Peterson, B. R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 581.
- (203) Song, L.; van Gijlswijk, R. P. M.; Young, I. T.; Tanke, H. J. *Cytometry* **1997**, *27*, 213.
- (204) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*, L7.
- (205) Lefevre, C.; Kang, H. C.; Haugland, R. P.; Malekzadeh, N.; Arttamangkul, S.; Haugland, R. P. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 482.
- (206) Leytus, S. P., Melhado, L. L., Mangel, W. F. *J Biochem* **1983**, *209*, 299.
- (207) Beaumont, P. C.; Johnson, D. G.; Parsons, B. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1993**, *89*, 4185.
- (208) Raemdonck, K.; Remaut, K.; Lucas, B.; Sanders, N. N.; Demeester, J.; De Smedt, S. C. *Biochemistry* **2006**, *45*, 10614.
- (209) Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., Uriarte, E. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887.
- (210) Murata, C.; Masuda, T.; Kamochi, Y.; Todoroki, K.; Yoshida, H.; Nohta, H.; Yamaguchi, M.; Takadate, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 750.
- (211) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105.
- (212) Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W.-Y.; Haugland, R. P. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179.
- (213) Xie, S.-X.; Petrache, G.; Schneider, E.; Ye, Q.-Z.; Bernhardt, G.; Seifert, R.; Buschauer, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *16*, 3886.
- (214) Middleton, R. J.; Briddon, S. J.; Cordeaux, Y.; Yates, A. S.; Dale, C. L.; George, M. W.; Baker, J. G.; Hill, S. J.; Kellam, B. J. *Med. Chem.* **2007**, *50*, 782.
- (215) Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184.
- (216) Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202.
- (217) Minarowska, A.; Gacko, M.; Karwowska, A.; Minarowski, Ł. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2008**, *46*, 23.
- (218) Germain, R. N.; Margulies, D. H. *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 403.
- (219) Chwieralski, C. E.; Welte, T.; Bühling, F. *Apoptosis* **2006**, *11*, 143.
- (220) Conus, S.; Perozzo, R.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Scapozza, L.; Yousefi, S.; Simon, H.-U. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 685.
- (221) Erdmann, S.; Ricken, A.; Hummitzsch, K.; Merkwitz, C.; Schliebe, N.; Gaunitz, F.; Strotmann, R.; Spanel-Borowski, K. *Eur. J. Cell Biol.* **2008**, *87*, 311.
- (222) Sohar, N.; Hammer, H.; Sohar, I. *Biol. Chem.* **2005**, *383*, 865.
- (223) Davidson, Y.; Gibbons, L.; Pritchard, A.; Hardicre, J.; Wren, J.; Tian, J.; Shi, J.; Stopford, C.; Julien, C.; Thompson, J. J. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2006**, *77*, 515.
- (224) Berchem, G.; Glondu, M.; Gleizes, M.; Brouillet, J.-P.; Vignon, F.; Garcia, M.; Liaudet-Coopman, E. *Oncogene* **2002**, *21*, 5951.
- (225) Liaudet-Coopman, E.; Beaujouin, M.; Derocq, D.; Garcia, M.; Glondu-Lassis, M.; Laurent-Matha, V.; Prébois, C.; Rochefort, H.; Vignon, F. *Cancer Lett.* **2006**, *237*, 167.
- (226) Baldwin, E. T.; Bhat, T. N.; Gulnik, S.; Hosur, M. V.; Sowder, R. C.; Cachau, R. E.; Collins, J.; Silva, A. M.; Erickson, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 6796.
- (227) Pimenta, D. C.; Oliveira, A.; Juliano, M. A.; Juliano, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1544*, 113.
- (228) Dunn, B. M.; Hung, S.-H. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 231.
- (229) Arnold, D.; Keilholz, W.; Schild, H.; Dumrese, T.; Stevanović, S.; Rammensee, H.-G. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 171.
- (230) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3561.
- (231) Carpino, L. A.; Mansour, E. M. E.; Knapczyk, J. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 666.
- (232) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239.

- (233) Biraboneye, A. C.; Madonna, S.; Laras, Y.; Krantic, S.; Maher, P.; Kraus, J.-L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4358.
- (234) Becker, S.; Höbenreich, H.; Vogel, A.; Knorr, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Reetz, M. T.; Kolmar, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 5085.
- (235) Becker, S.; Höbenreich, H.; Vogel, A.; Knorr, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Reetz, M. T.; Kolmar, H. *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 5163.
- (236) Fu, Y.; Xu, B.; Zou, X.; Ma, C.; Yang, X.; Mou, K.; Fu, G.; Lü, Y.; Xu, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 1102.
- (237) Czerwinski, G.; Tarasova, N. I.; Michejda, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 11520.
- (238) Baechle, D.; Cansier, A.; Fischer, R.; Brandenburg, J.; Burster, T.; Driessen, C.; Kalbacher, H. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 166.
- (239) Righetti, P. G. *J Chromatogr A.* **2005**, *1079*, 24.
- (240) Dalgalarondo, M.; Raymond, J.; Azanza, J. L. *Biochimie* **1985**, *67*, 629.
- (241) Fitzpatrick JJ, G. M. *Anticancer. Drug Des.* **1995**, *10*, 11.
- (242) Trouet, A.; Masquelier, M.; Baurain, R.; Deprez-De Campeneere, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 626.
- (243) P. E. Scarborough, K. G., C. Topham, G. R. Richo, G. E. Conner, T. L. Blundell, and B. M. Dunn *Protein Sci.* **1993**, *2*, 264.
- (244) Schumann, M.; Richter, J. F.; Wedell, I.; Moos, V.; Zimmermann-Kordmann, M.; Schneider, T.; Daum, S.; Zeitz, M.; Fromm, M.; Schulzke, J.-D. *Gut* **2008**.
- (245) Stenmark, H.; Vitale, G.; Ullrich, O.; Zerial, M. *Cell* **1995**, *83*, 423.
- (246) http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Introduction_to_flow_cytometry.pdf;
15.10.2012.
- (247) Mandy, F. F.; Bergeron, M.; Minkus, T. *Transfus. Sci.* **1995**, *16*, 303.
- (248) Brown, M.; Wittwer, C. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1221.
- (249) http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow.html;
07.01.2013.
- (250) Howell, S., Kenny, A.J., Turner, A.J. *Biochem. J.* **1992**, *284*, 595.
- (251) Mayrhofer, G. *Immunol. Cell Biol.* **1995**, *73*, 433.
- (252) Hershberg, R. M.; Mayer, L. F. *Immunol. Today* **2000**, *21*, 123.
- (253) Zhu, X.; Meng, G.; Dickinson, B. L.; Li, X.; Mizoguchi, E.; Miao, L.; Wang, Y.; Robert, C.; Wu, B.; Smith, P. D.; Lencer, W. I.; Blumberg, R. S. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 3266.
- (254) Spiekermann, G. M.; Finn, P. W.; Ward, E. S.; Dumont, J.; Dickinson, B. L.; Blumberg, R. S.; Lencer, W. I. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 303.
- (255) Tzaban, S.; Massol, R. H.; Yen, E.; Hamman, W.; Frank, S. R.; Lapierre, L. A.; Hansen, S. H.; Goldenring, J. R.; Blumberg, R. S.; Lencer, W. I. *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 673.
- (256) Verhasselt, V. *Curr. Opin. Immunol.* **2010**, *22*, 623.
- (257) Lübbling, N.; Barone, M. V.; Rudloff, S.; Troncone, R.; Auricchio, S.; Zimmer, K.-P. *Pediatr. Res.* **2011**, *70*, 357.
- (258) Claypool, S. M.; Dickinson, B. L.; Wagner, J. S.; Johansen, F.-E.; Venu, N.; Borawski, J. A.; Lencer, W. I.; Blumberg, R. S. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 1746.
- (259) Chen, X., Song, C.-H., Feng, B.-S., Li, T.-L., Li, P.,; Zheng, P.-Y., Chen, X.-M., Xing, Z. and Ping-Chang Yang *J. Leukoc. Biol.* **2011**, *90*, 751.
- (260) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260.
- (261) Vojtkovsky, T. *J. Pept. Res.* **1995**, *8*, 236.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)