



## Danksagung

Ich bedanke mich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Besonderer Dank gilt ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die persönliche Betreuung meiner Arbeit.

Das nächste große Dankeschön geht an Mag.pharm. Dr. Katharina Skoll, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist, genau wie Maria und Maria, die immer bereit waren zu helfen, wenn etwas anders als erwartet gelaufen ist.

Für weiteren moralischen Beistand bedanke ich mich bei Lore, Clara, Anna, Fabi und meinen Vorgängerinnen Magdalena und Hati, die mich wochenlang in die Abläufe eingeführt haben.

Danke auch an meine Eltern für die finanzielle Unterstützung und an Joul für die Unterstützung zuhause und das Trösten bei jeder kleinen Katastrophe, die während des Studiums aufgetreten ist.

Zuletzt noch ein Dankeschön an meine Studienfreunde, Sophie, Jakob, Magdalena, Pia und Ensar – allein wäre das Studium nicht machbar gewesen und jede Lehrveranstaltung mit euch war unabhängig vom Inhalt gleich viel schöner.

## Abstract

Certain pathogenic *E. coli* species use the specific adhesive FimH to attach to the urothelial and the colonic membrane. Thus, it enables pathogenic bacteria to be internalized into the host cells followed by infection of the tissue, causing urinary tract infections and colitis.

Mimicking this selective strategy with a targeter molecule could lead to a beneficial therapy outcome due to the internalization into infected or cancerous cells.

The aim of this thesis was to characterize a partial peptide of the FimH (residues 132-142) regarding its cell associative properties on bladder- and colon-carcinoma cells and compare it to a peptide consisting of the same amino acids in a randomized order. Furthermore, the internalization potential into the cells was investigated by using different incubation temperatures.

It could be evaluated that the FimH peptide had a higher binding affinity of up to 52 % for 5637-cells and up to 39 % higher binding affinity for Caco-2 cells compared to the control peptide.

Additionally, the FimH partial peptide was internalized into 5637-cells up to 45 % more effectively than the control peptide and up to 72 % more effectively into Caco-2 cells.

The peptides' cell uptake pathways were investigated as well. Macropinocytosis was the major uptake pathway for both, the scrambled and naturally occurring peptide sequence. After inhibiting this pathway, uptake of the peptides into the cells was reduced by 30 % when comparing it to the uptake into cells that had not been inhibited in any way. Although this pathway leads to internalization of the peptide it ends in lysosomal degradation which might not be favourable for a targeted drug delivery system.

Due to the presented results, the FimH peptide consisting of residues 132-142 could potentially be used as a ligand for drug-targeting vehicles in the future. Further studies could be conducted on whether endocytosis via another specific pathway can be reached when combining all the essential sequences. In addition, a possible cytotoxicity of the peptide should be characterised.

## Kurzfassung

Bestimmte pathogene E. coli Spezies verfügen über das Adhäsion FimH, mit dem sie sich sowohl in der Blase als auch im Darm anheften. Im Zuge dessen können sie internalisiert werden und Infektionen wie Harnwegsinfektionen und Colitis auslösen.

FimH als Targeter zu nutzen, um Arzneistoffe an die Glykokalyx des Urothels oder der Mukosa des Darms zu binden, die dann aktiv in infizierte oder mit Krebs befallene Zellen aufgenommen werden, könnte in der Therapie von Infektionen, Blasenkarzinomen und Kolonkarzinomen vorteilhaft sein.

Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen mit einem Teilpeptid aus FimH (Aminosäuren 132-142) an Blasen- und Darmkarzinomzellen im Vergleich zu einem Peptid aus den gleichen Aminosäuren und der gleichen Länge aber in randomisierter Reihenfolge durchzuführen, um dessen Zellinteraktionseigenschaften und Potential als Targeting-Ligand zu charakterisieren. Dazu wurden Zellen unter verschiedenen Bedingungen mit Peptidlösungen bestimmter Konzentrationen inkubiert.

Es zeigte sich, dass das FimH Teilpeptid im Vergleich zu der Kontrollsequenz eine um bis zu 52 % höhere Bindungsaffinität an 5637-Zellen und bis zu 39 % höhere Bindungsaffinität an Caco-2 Zellen aufweist.

Außerdem wird das FimH Teilpeptid im Vergleich zu der Kontrollsequenz um bis zu 45 % effektiver in 5637-Zellen aufgenommen. Für Caco-2 Zellen sind es bis zu 72 %.

Beide Peptide werden am ehesten über den Endocytoseweg der Macropinocytose in 5637- und Caco-2 Zellen aufgenommen. Blockiert man diesen Weg, reduziert sich die Aufnahme beider Peptide in beiden Zelllinien um etwa 30 % im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Dieser unspezifische Endocytoseweg führt zu Degradation im Lysosom. Für eine Anwendung als Targeting-Ligand sollte durch Modifikation der Peptidsequenz ein anderer, spezifischer Aufnahmeweg angestrebt werden.

Das FimH-Teilpeptid aus dem Aminosäuren 132-142 zeigt somit deutliches Potential für Drug-Targeting sowohl an Blasenkarzinom- als auch an Darmkarzinomzellen. Weitere Studien könnten sich damit beschäftigen, ob das Verlängern des FimH Teilpeptids mit weiteren essenziellen FimH-Resten zu einer Aufnahme in die Zelle über einen anderen spezifischen Endocytoseweg führt. Außerdem sollte eine mögliche Zytotoxizität des Peptids erforscht werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Überblick über <i>FimH</i> von <i>E. coli</i>	1
1.2. Harnblase	2
1.2.1 Rolle von <i>FimH</i> von <i>E. coli</i> bei pathogenen Vorgängen in der Blase	3
1.2.2 Behandlung von Blasenkrebs	3
1.3 Rolle von <i>FimH</i> von <i>E. coli</i> bei pathogenen Vorgängen im Darm	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit	5
<b>2. Materialien und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1. Verwendete Materialien und Geräte	7
2.1.1. Verwendete Materialien	7
2.1.2. Verwendete Geräte	9
2.1.3. Verwendete Lösungen und Medien	10
2.2 Charakterisierung des <i>FimH</i> Teilpeptids und der analogen Vergleichssequenz	12
2.2.1. Aufreinigung der Peptide mit Flash- und analytischer HPLC	13
2.2.2. Quantifizierung der Peptidlösungen mit UV/VIS Spektroskopie	14
2.3 Zellkultur	14
2.3.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung	14
2.3.2 Bindungsaffinität des Peptids an Zell-Monolayern und an Einzelzellen	15
2.3.3 Endocytosewege an Einzelzellen	16
2.3.4 Quantifizierung der aufgenommenen Peptidmenge	17
2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie	19
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>20</b>
3.1. Bindungsaffinität des Peptids an Zell-Monolayern und an Einzelzellen	20
3.1.1 5637-Zellen	20
3.1.2 Caco-2 Zellen	24
3.2 Endocytosewege mit Monolayern am Durchflusszytometer	28
3.2.1 5637-Zellen	28
3.2.2. Caco-2 Zellen	30
3.3 Quantifizierung der aufgenommenen Peptidmenge	32
3.3.1 Charakterisierung der Peptidlösungen	32
3.3.2 5637-Zellen am Mikroplattenlesegerät	32
3.3.3 Caco-2 Zellen am Mikroplattenlesegerät	36
3.4 Fluoreszenzmikroskopie	39
<b>4. Schlussfolgerung</b>	<b>40</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>42</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>Anhang 1: Aufreinigung der Peptide: HPLC-Spektren</b>	<b>46</b>

<b>Anhang 2: Internalisierung verschiedener BSA- und HSA-Partikel in differenzierte THP-1 Zellen .....</b>	<b>50</b>
<i>1. Methoden</i> .....	50
1.1 Zellkultur .....	50
1.2. Durchführung .....	50
<i>2. Ergebnisse und Diskussion</i> .....	51

# 1. Einleitung

## 1.1. Überblick über FimH von E. coli

Pathogene Spezies von Escherichia coli (E. coli), wie uropathogene E. coli (UPEC) und adhärenente und invasive E. coli (AIEC), exprimieren verschiedene adhäsive Zellorganellen, um sich am Epithel anheften und schließlich in dieses eindringen zu können. Das kann Infektionen, wie zum Beispiel Harnwegsinfektionen oder Colitis, zur Folge haben. Zu diesen adhäsiven Zellorganellen zählen Typ 1, P, S und F1C Fimbrien (1,2). Das Typ 1 Fimbrium ist mit FimD in der Wand des Bakteriums verankert und besteht aus sich wiederholenden FimA Domänen, an deren Ende ein FimF und ein FimG Pilus sitzt. An deren Spitze befindet sich das Adhäsiv und bakterielle Lektin FimH (3). FimH wird von 80 % der pathogenen E. coli exprimiert. Dadurch kann das Bakterium an terminale Mannose-Reste epithelialer Glykoproteine binden und somit das Gewebe befallen (4,5).

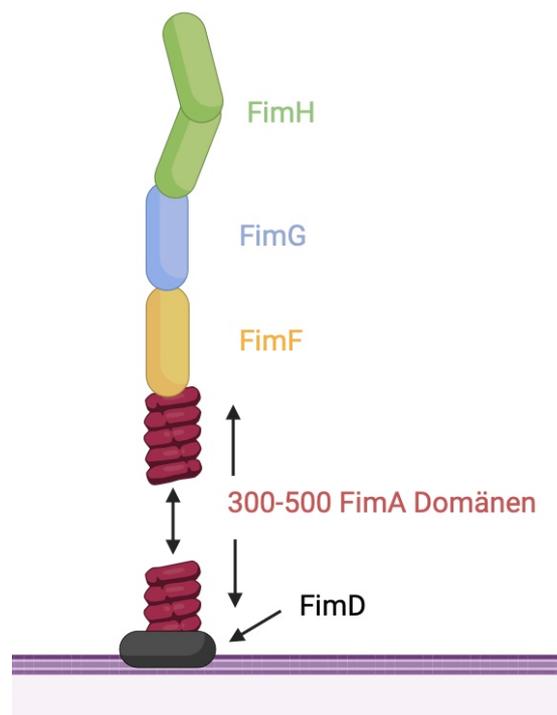


Abbildung 1 schematische Darstellung eines Typ-1 Fimbriums von E.coli (erstellt mit Biorender)

FimH besteht aus insgesamt 279 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1-156 bilden die N-terminale adhäsive Domäne aus und die Aminosäuren 160-279 die C-terminale Domäne, mit der das FimH an den Typ-1 Pilus gebunden ist. Ein Tetrapeptid-Loop verbindet die beiden. Eine Bindungstasche, die Kohlenhydrate bindet, ist an der Spitze der adhäsiven Domäne lokalisiert und erkennt  $\alpha$ -D-Mannosereste (1,6). Diese Bindungstasche wird aus den Aminosäuren 1-157

geformt, davon sind aber nicht alle an der Bindung beteiligt. Durch Mutationsstudien wurden die für die Bindung essenziellen Aminosäuren bestimmt, wobei die Aminosäuren Asn46, Asp47, Asp54, Gln133, Asn135, Asn138, Asp150 und Phe142 des FimH über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen mit den Hydroxylgruppen terminaler  $\alpha$ -D-Mannose-Reste reagieren. Wenn diese Aminosäuren durch Mutation ersetzt werden, geht die Bindungsaffinität an Urothelzellen verloren (7). Diese Bindungstasche wird von einer hydrophoben Region stabilisiert, die nah um sie herum liegt und für die besonders die Aminosäuren Phe1, Ile13, Tyr48, Thr51, Ile52, Tyr137 und Phe142, wichtig sind (3).

Terminale  $\alpha$ -D-Mannose-Reste werden beispielweise am Uroplakin Ia im Urothel oder am CEACAM 6 im Zwölffingerdarmepithel exprimiert (8,9). Die Bindung von FimH kann durch  $\alpha$ -D-Mannose und eine Reihe anderer Kohlenhydrate mit terminalen Mannoseresten inhibiert werden (10,11). Um das FimH abzusättigen und so dessen Bindung an das Urothel der Blase zu verhindern, sind am Markt zahlreiche Produkte mit  $\alpha$ -D-Mannose zur Behandlung unkomplizierter Harnwegsinfekte erhältlich.

## 1.2. Harnblase

Die Harnblase hat die wichtige Aufgabe, Urin über einige Stunden hinweg bis zur Ausscheidung zu halten und das Übertreten harmpflichtiger Stoffe in den systemischen Kreislauf zu verhindern. Die Kugelform des Organs ist ideal, um dessen Oberfläche möglichst klein zu halten und so die Wahrscheinlichkeit eines Stoffaustausches zwischen Urin und Blut gering zu halten. Je nach Füllungszustand variiert die Dehnung und somit die Größe der Blase. (12)

Seine Barrierefunktion erhält das Organ durch den speziellen Aufbau der Blasenwand. Die äußerste Schicht ist die Tunica adventitia (lockere Bindegewebsschicht) die zum Teil mit Tunica serosa (peritonealem Überzug) bedeckt ist. Darauf folgt die Tunica muscularis (glatte Muskelschicht), die Lamina propria (Bindegewebsschicht) und als innerste Schicht das Urothel, auch als Tunica mucosa bezeichnet (13).

Das Urothel selbst wird in drei weitere Zellschichten unterteilt. Die äußerste Schicht machen Basalzellen aus, darüber Intermediärzellen und zum Lumen hin sogenannte Umbrella-Zellen. Diese haben eine kuppelförmige Oberfläche, sind polyhedral und polyploid und durch tight junctions und adherens junctions verbunden. Damit hat die Blase einen sehr dichten Gewebsaufbau, der eine wichtige Barrierefunktion darstellt. An ihrer luminalen Seite exprimieren Umbrella-Zellen spezifische Transmembran-Glykoproteine, die Uroplakine, die urotheliale

Plaques ausbilden(12,14). Uroplakine haben große luminale Domänen, die in die Blase hineinragen und in Kontakt mit dem Urin stehen (8,15). Das Uroplakin Ia UPK1A ist ein Rezeptor für das FimH uropathogener E. coli-Spezies (5).

Eine urotheliale Glykokalyx an der luminalen Oberfläche der Umbrella-Zellen, die aus Uroplakinen, löslichen Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen besteht, bildet eine Mucinschicht aus, die zur Abwehr von pathogenen Erregern und zur Prävention eines Substanz austausch zwischen Blase und Blut dient (14).

### *1.2.1 Rolle von FimH von E. coli bei pathogenen Vorgängen in der Blase*

Studien an Urothelzellen von Mäusen haben gezeigt, dass das Uroplakin Ia im Vergleich zum Uroplakin Ib, an welches das FimH nicht bindet, ein anderes Glykosylierungsmuster aufweist. Wird Uroplakin Ia deglykosyliert, kommt es auch zu keiner Bindung mehr.

Uroplakin Ia trägt verzweigte Oligomannose-Strukturen, die das FimH spezifisch erkennen und binden. Durch das Anheften an die Zellmembran kann das Bakterium in Urothelzellen eindringen und dieses befallen. In den befallenen Zellen bilden UPECs dann intrazelluläre Bakterienkolonien (IBCs), welche ruhend und aktiv vorliegen, umliegende Zellen infizieren können und folglich für die hohe Rezidivrate von Blaseninfektionen verantwortlich sind (3). Dieses Verhalten wird nur bei UPECs beobachtet, die FimH exprimieren. Die intrazellulären Cluster schützen das Bakterium vor körpereigenen Abwehrmechanismen (15–17). Zudem ist der Erreger so gegen den Urin geschützt und hält sich in einer nährstoffreichen Umgebung auf. In Mäusemodellen wurde gezeigt, dass Antibiotika gegen Harnwegsinfektionen, die die bakterielle Besiedlung im Urin bekämpfen, bei intrazellulär angesiedelten UPECs keine Wirkung haben (8,15).

Sobald sich UPECS an das Urothel anheften, werden die Schutzmechanismen der Blase aktiviert. Die Ausschüttung von Zytokinen rekrutiert neutrophile Granulozyten, die die UPECS durch Phagozytose bekämpfen (11). Weiters werden Apoptosevorgänge ausgelöst, die zum Ablösen der mit UPECs infizierten Zellen und deren Ausscheidung mit dem Urin führen (15).

Das Anheften des FimH an Uroplakin Ia am Blasenepithel löst eine Signalkaskade aus, die die Neuordnung des Cytoskeletts der Host-Zelle mediiert und so das Eindringen des Bakteriums ermöglicht (2).

### *1.2.2 Behandlung von Blasenkrebs*

Der einzigartige Aufbau des Urothels stellt auch eine große Hürde bei der instillativen Therapie von Blasenkrebs dar. Wie Blasenkrebs behandelt wird, hängt davon ab, ob er muskel-invasiv oder nicht-muskel-invasiv wächst (18).

Bei nicht-muskel-invasiven Krebsarten umfasst dieser die chirurgische Entfernung des Tumors (transurethrale Resektion des Blasentumors, TURBT) in Kombination mit Immuntherapie und intravesikulärer Chemo- und Immuntherapie, bei der das Therapeutikum lokal über einen Katheter in die Blase instilliert wird (19). Zusätzlich kann noch Bestrahlung und photodynamische Therapie zum Einsatz kommen (18,20).

Ist eine intravesikuläre Chemotherapie indiziert, ist es nach der Instillation des Arzneistoffes für Patientinnen und Patienten notwendig, die Miktion hinauszuzögern, um die notwendigen Einwirkzeiten zu gewährleisten. Dies wird als unangenehm empfunden. Außerdem muss die Applikation mehrmals erfolgen (20).

Hohe Rezidivraten bei Blasenkrebs sind darauf zurückzuführen, dass die instillative Behandlung mit Immun- und Chemotherapeutika ineffizient ist. Das Urothel stellt eine Barriere für verwendete Arzneistoffe dar und Urin in der Blase erschwert durch Ausspülvorgänge deren Kontakt mit von Krebs befallenen Zellen. Es wird an Möglichkeiten geforscht, diese Effizienz durch Drug-Targeting, zum Beispiel mit PLGA-Partikeln mit WGA als Adhäsionsfaktor, zu verbessern (21). Die Bindungs- und Internalisierungseigenschaften des FimH scheinen Potenzial für eine Verwendung als Adhäsionsfaktor in der Harnblase zu bergen.

### 1.3 Rolle von FimH von *E. coli* bei pathogenen Vorgängen im Darm

FimH Analoga eignen sich möglicherweise auch als Adhäsionsfaktoren bei Darmerkrankungen. Einige *E. coli* Spezies kommen physiologisch im Darm vor und machen etwa 5 % der Darmflora aus. Der Dickdarm kann aber auch als Reservoir für pathogene *E. coli* Spezies dienen (8). Kommt das Mikrobiom des Darms aus dem Gleichgewicht, können pathogene Bakterien leichter an die Darmmukosa binden und diese infizieren (9). Die Bindungsaffinität FimH exprimierender *E. coli* Spezies ist nur vom Zielrezeptor abhängig, der ein bestimmtes Glykosylierungsmuster aufweisen muss (17). Eine im Ileum und Kolon vorherrschende pathogene *E. coli* Spezies wird adhärente und invasive *E. coli* (AIEC) genannt (3).

FimH spielt als pro-inflammatorischer Faktor bei der Pathogenese von Morbus Crohn eine große Rolle. Bei den für die Krankheit typischen chronischen Entzündungsvorgängen im Darm kommt es im Epithel des Ileums zur Überexpression des mannosylierten, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6). Das FimH der AIECs bindet an diesen

Rezeptor wie das FimH von UPECs an Uroplakin Ia im Urothel und kann so in die Mukosa der unteren Abschnitte des Dünndarms und des Dickdarms eindringen. Der Mechanismus der Internalisation ist noch nicht vollständig aufgeklärt (3). Ein weiterer Angriffspunkt für die Anheftung von FimH ist der toll-like receptor 4 (TLR4).

Die Anheftung von AIECs an die Darmmukosa führt zur Proliferation und Biofilmbildung der Bakterien. Durch die Interaktion mit TLR4 kommt es zu Entzündungsprozessen und einer vermehrten Ausschüttung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 und Interleukin 8, die proinflammatorisch und auf Dauer auch karzinogen wirken (22). Kolorektalkarzinome sind eng mit infektiösen Ursachen und im besonderen Morbus Crohn assoziiert (9).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits die bindungsaffinen Teile des FimH über Festphasensynthese hergestellt. Das Peptid, das in dieser Arbeit untersucht wird, umfasst die Aminosäuren 132-142 des FimH. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, enthält dieses Peptid die Aminosäuren Gln133, Asn135 und Asn138, welche unerlässlich für die Bindung an spezifische Mannosereste sind und außerdem Tyr137 und Phe142, welche im natürlich vorkommenden FimH die Bindungstasche stabilisieren.

Das Hauptziel der Arbeit ist festzustellen, ob dieser Teil des FimH sich zum Targeting an Blasenkrebszellen und Kolonkarzinomzellen eignet. Es wurde bereits gezeigt, dass das isolierte FimH ausreicht, um sich an der humanen Blasenkrebszelllinie 5637 anzuheften und in diese einzudringen (3,15). In dieser Arbeit wird untersucht, ob auch das in der Arbeitsgruppe synthetisierte Teilstück dafür ausreichend ist und ob dieses auch an Darmzellen bindet bzw. in diese eindringt.

Wenn eine ausreichende Bindungsaffinität und ausreichende Internalisation des Peptids in die Zellen festgestellt wurde, kann als folgender Schritt untersucht werden, ob das Teilpeptid in Verbindung mit einem Arzneistoff für eine effektivere intravesikuläre Therapie von Blasenkarzinomen oder als Lokalthherapie von Kolonkarzinomen geeignet sein könnte. Das FimH als Adhäsion könnte durch eine über einen längeren Zeitraum bestehende Anheftung die Intervalle zwischen Applikationen von Arzneistoffen zur Therapie von Blasenkarzinomen verlängern und lange Einwirkzeiten verkürzen. Dies würde die Therapie für Patientinnen und Patienten wesentlich verbessern.

Diese Arbeit verfolgt die aufgelisteten konkreten Ziele:

- Die Quantifizierung der Bindungsaffinität des mit FITC markierten FimH Teilpeptids aus den Aminosäuren 132-142 an 5637- und Caco-2 Zellen einerseits am Zellmonolayer und andererseits an Einzelzellen im Vergleich mit einer randomisierten Kontrollsequenz aus den gleichen Aminosäuren in anderer Reihenfolge
- Die Feststellung, über welche Endocytosewege das FITC markierte FimH Teilpeptid aus den Aminosäuren 132-142 in 5637- und Caco-2 Zellen aufgenommen wird im Vergleich mit einer randomisierten Kontrollsequenz aus den gleichen Aminosäuren in anderer Reihenfolge
- Die Quantifizierung der Menge des aufgenommenen FITC markierten FimH Teilpeptids in die Zelle in Relation mit einer randomisierten Kontrollsequenz aus den gleichen Aminosäuren in anderer Reihenfolge

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Verwendete Materialien und Geräte

#### 2.1.1. Verwendete Materialien

<b>American Type Culture Collection (USA):</b>	5637-Zellen
	Caco-2 Zellen
<b>Applichem GmbH (Deutschland):</b>	Isopropanol
	EDTA Dinatriumsalz 2-hydrate
<b>Carl Roth GmbH und Co. KG (Deutschland):</b>	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	HEPES Pufferan®
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	NaCl
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	NaOH (in Plätzchen)
	Salzsäure, 37 %
	TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
<b>EMD Millipore Corp. (USA):</b>	Humanes Serumalbumin
<b>E. Merck KGaA (Deutschland):</b>	Nystatin
<b>Gibco (USA):</b>	Accutase
	TrypLE Select
	Trypsin-EDTA
<b>Greiner bio-one GmbH (Österreich):</b>	96-Well Mikroplatten (PS F-Boden, transparent, steril)
	48-Well Multiwellplatten (transparent, steril)

	75 cm <sup>2</sup> Gewebekulturflaschen
<b>Mediatech Inc. (USA):</b>	Fetales Kälberserum (FCS)
<b>MP Biomedicals LCC (USA):</b>	Olivenöl
<b>PAA Laboratories GmbH (Österreich):</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Sigma Aldrich (USA):</b>	Acetonitril
	Amiloridhydrochloridhydrat
	Chlorpromazinhydrochlorid
	Deoxycholsäure
	Fluorescein-iodthiocyanat (FITC)
	Gentamycinsulfat
	Heparin Natriumsalz aus porciner Dünndarmmukosa
	KCl
	L-Glutamin
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
	Pluronic® (Colliphor P188)
	Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)
	RPMI-1640 Pulver
	Trifluoressigsäure (TFA)
	Triton® X 100
	UV-Küvette micro (100µl)
	BCA Assay Kit
<b>Thermo scientific (USA):</b>	BodiPy® Fluoreszenzfarbstoff 495/503

**Tabelle 1: Reagenzien**

Eine Teilstruktur des FimH Peptids pathologischer E. coli Bakterien (Aminosäuren 132-142) und ein Peptid mit den gleichen Aminosäuren in zufälliger Reihenfolge (Kontrollsequenz) wurden zuvor in der Arbeitsgruppe synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2. Verwendete Geräte

<b>Analytische HPLC:</b>	Shimadzu Nexera XR mit Photodiodenarray UV Detektor (Shimadzu, Japan) <b>Säule:</b> EC Nucleodur C18 Gravity-SB (150/4,6mm, 5µm) (Macherey-Nagel, Deutschland)
<b>Brutschrank:</b>	Thermo Scientific BBD 6220 (Thermo Scientific, USA)
<b>Durchflusszytometer:</b>	Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., USA)
<b>Flash-HPLC:</b>	Büchi Pure E-850 Flash Prep (Büchi, Schweiz) <b>Säule:</b> PrepPure C18 250x10 (Büchi, Schweiz)
<b>Gefriertrocknung:</b>	Alphat 1-4 LDPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland)
<b>Magnetrührer:</b>	Heidolph MR 3000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG., Deutschland)
<b>Mikroplattenlesegerät:</b>	TECAN Infinite M200 Pro (TECAN Group Ltd., Österreich)
<b>Partikelcharakterisierung:</b>	Zetasizer NANO ZS (Malvern Instruments Ltd., UK)
<b>pH-Elektrode:</b>	Seven compact S210 (Mettler Toledo GmbH, Schweiz)
<b>Spektrophotometer:</b>	Lambda XLS (PerkinElmer Inc., USA)
<b>Ultraschallbad:</b>	Sonorex Super 10P (Bandelin electronics GmbH & CO KG., Deutschland)
<b>Ultraschallhomogenisator:</b>	Sonoplus HD2070 (Bandelin electronics GmbH & CO KG., Deutschland)

---

<b>Vakuumpkonzentrator:</b>	UNIVAPO 150H (Uni Equip Laborgerätebau und Vertriebs- GmbH, Deutschland)
<b>Vortexmischer:</b>	Heidolph REAX 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG., Deutschland)
<b>Waagen:</b>	Sartorius LC 4800P (Sartorius Lab Instruments GmbH & CO KG., Deutschland) Sartorius Cubis R MSX (SDEE) (Sartorius Lab Instruments GmbH & CO KG., Deutschland)
<b>Zentrifugen:</b>	Eppendorf Centrifuge 5804R (Eppendorf SE, Deutschland) HER MLE Z323K (bartelt GmbH, Österreich) Lynx 6000 Sorvall (Thermo Scientific, USA)

Tabelle 2: Geräte

### 2.1.3. Verwendete Lösungen und Medien

Die hergestellten Lösungen wurden bei Bedarf sterilfiltriert und aliquotiert, um längere Haltbarkeit zu gewährleisten.

<b>Acetonitril+0,08 % TFA (entgast)</b>	800 µl TFA wurden zu 1 L Acetonitril zugegeben, umgeschwenkt und für 10 Minuten entgast
<b>Amilorid-Stammlösung</b>	13,3 mg Amiloridhydrochloridhydrat wurden in 1 ml DMSO gelöst
<b>CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung</b>	2,65 g CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O wurden in 1 L dest. Wasser gelöst
<b>Chlorpromazin-Stammlösung</b>	0,16 mg Chlorpromazinhydrochlorid wurden in 1 ml DMSO gelöst
<b>HEPES isoton pH 7,4</b>	4,77 g HEPES und 8 g NaCl wurden in 1 L dest. Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt

<b>HEPES isoton pH 7,4 + 1 % BSA</b>	10 g BSA wurden in 1 L HEPES isoton pH 7,4 gelöst
<b>HEPES isoton pH 7,4 + 2 % FCS</b>	20 ml FCS wurden zu 1 L HEPES isoton pH 7,4 zugegeben
<b>Nystatin-Stammlösung</b>	2,5 mg Nystatin wurden in 1 ml DMSO gelöst
<b>PBS-Stammlösung (1:10) pH 7,2-7,3</b>	80 g NaCl, 2 g KCl, 7,65 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O und 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> wurden in 1 L dest. Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,2-7,3 eingestellt
<b>PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup></b>	100 ml PBS-Stammlösung 1:10 mit pH 7,2-7,3 wurden mit 900 ml dest. Wasser verdünnt
<b>PBS mit 0,1 % EDTA</b>	1 g EDTA*2H <sub>2</sub> O wurden in 900 ml dest. Wasser gelöst und 100 ml PBS-Stammlösung 1:10 mit pH 7,2-7,3 hinzugefügt
<b>PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup></b>	50 ml CaCl <sub>2</sub> Stammlösung, 0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1 g MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, 8 g NaCl und 0,764 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O wurden in 1 L dest. Wasser gelöst
<b>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium</b>	10,4 g RPMI-Pulver (1 Fläschchen) wurden in 1 L dest. Wasser gelöst, der pH mit 4M HCl auf 4,0 eingestellt und darin 2 g NaHCO <sub>3</sub> gelöst. Anschließend wurde der pH mit 4M NaOH auf 7,2 eingestellt, 100 ml FCS, 400 µl 200 mM L-Glutamin-Lösung und 2 ml Gentamycinlösung (110,01 mg/ ml) zugegeben. Das Medium wurde für die Zellkultur sterilfiltriert und aliquotiert.
<b>TRIS-Puffer 10mM mit pH 7,4</b>	1,21 g TRIS wurden in 1 L dest. Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt
<b>Wasser mit 0,1 % TFA (entgast)</b>	1 ml TFA wurden zu 1 L partikelfreiem Wasser zugegeben, umgeschwenkt und für 10 Minuten entgast

## Zellysepuffer

0,38 g EDTA\*2H<sub>2</sub>O, 5,8 g NaCl, 1 g SDS, 5 g Deoxycholsäure und 10 g Triton® X 100 wurden in 1 L TRIS-Puffer 10 mM mit pH 7,4 gelöst

Tabelle 3: Lösungen und Medien

## 2.2 Charakterisierung des FimH Teilpeptids und der analogen Vergleichssequenz

In vorangegangenen Arbeiten wurden Teile des FimH Peptids hergestellt. Das für diese Arbeit relevante Peptid entspricht den Aminosäuren 132-142 (one-letter-code: RQTNNYNSDDFK) der FimH-Primärsequenz. Dieses Peptid wird von fortan als Peptid 3 bezeichnet. Als Vergleichskontrolle wurde ein Peptid, das aus den gleichen Aminosäuren in randomisierter Reihenfolge besteht, herangezogen (one-letter-code: FRDTQNSYNDNK), fortan Sequenz 3. Beide Peptide liegen als TFA-Salz vor und sind am C-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-isothioyanat (FITC) markiert.

TFA-Salz	Summenformel: C <sub>83</sub> H <sub>106</sub> N <sub>22</sub> O <sub>28</sub> S <sup>2+</sup> Masse: 1890,73 g/mol Summenformel TFA: C <sub>4</sub> F <sub>6</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Masse TFA: 225,97 g/mol
Ohne TFA	Summenformel: C <sub>83</sub> H <sub>106</sub> N <sub>22</sub> O <sub>28</sub> S <sup>2+</sup> Masse: 1890,73 g/mol

Tabelle 4: Basisinformationen zu Peptid und Sequenz 3

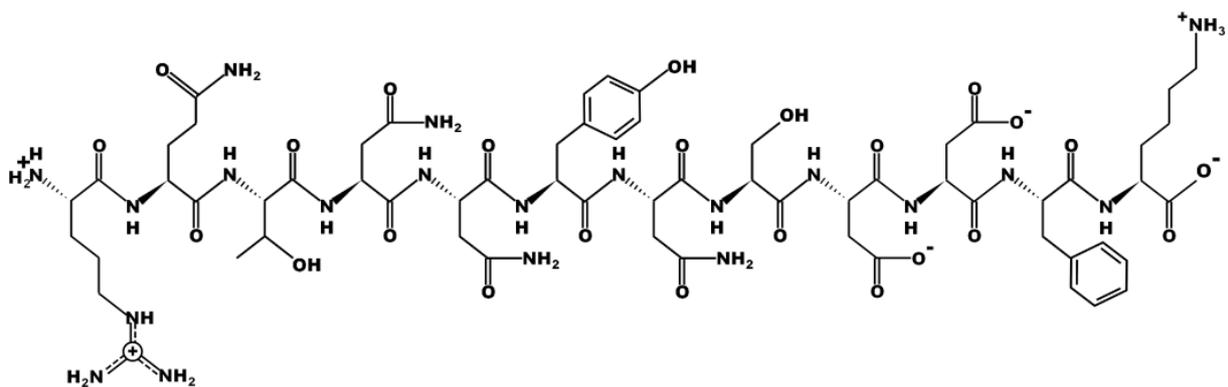


Abbildung 2: Peptid 3 Aminosäuresequenz mit Amid am C-Terminus (erstellt mit Pepdraw)

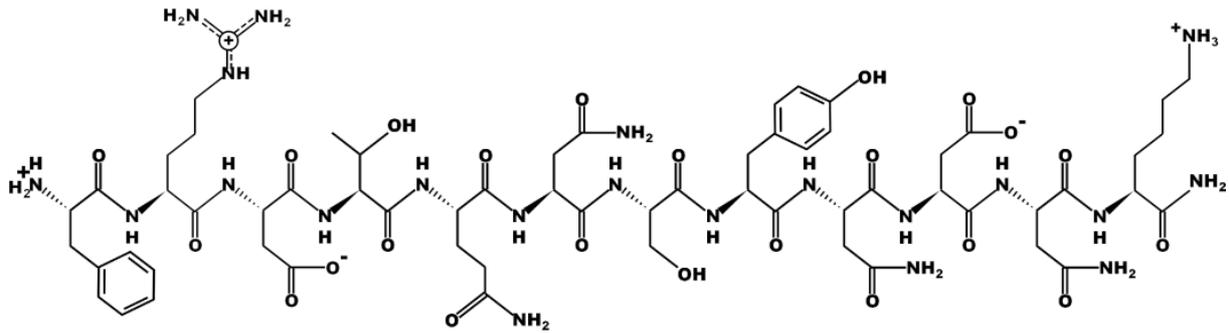


Abbildung 3: Sequenz 3 Aminosäuresequenz mit Amid am C-Terminus (erstellt mit Pepdraw)

Um die als gelbes Pulver vorliegenden, lyophilisierten Rohpeptide für folgende Experimente verwenden zu können, wurden sie mithilfe von Flash-HPLC gereinigt und die Reinheit an der analytischen HPLC überprüft. Dann war es möglich, die Menge an in Lösung vorliegenden Peptids mittels UV-Vis Spektroskopie zu quantifizieren.

### 2.2.1. Aufreinigung der Peptide mit Flash- und analytischer HPLC

Das bereits vom Syntheseharz abgespaltene und mit FITC markierte Rohpeptid wurde eingewogen und in 20 % Acetonitril in Wasser gelöst, sodass man eine Konzentration von 0,5 mg/ml erhielt. Danach wurde die Peptidlösung mittels präparativer HPLC aufgetrennt, wobei ein Gradient von 40 % Wasser+0,1 % TFA und 60 % Acetonitril+0,08 % TFA bis 20 % Wasser+0,1 % TFA und 80 % Acetonitril+0,08 % TFA angewandt wurde. Für eine ausreichende Auftrennung wurde eine PPC18 250x10 Säule mit einer Flussrate von 5 ml/Minute verwendet.

Von den stark gelb gefärbten Fraktionen wurde jeweils eine Probe genommen, die an der analytischen HPLC analysiert wurde. Dafür wurden die gleichen Fließmittel wie an der präparativen HPLC und die Säule EC Nucleodur C18 Gravity-SB (150/4,6 mm, 5 µm) mit einer Flussrate von 1 ml/Minute verwendet. Anhand der analytischen Spektren wurden dann die reinsten Fraktionen ausgewählt.

Diese wurden aliquotiert und bei Raumtemperatur mittels Speed-Vac das in der Lösung verbliebene Acetonitril abgedampft. Dann konnte das aufgereinigte Peptid lyophilisiert werden. In dieser Form wurde es im Kühlschrank gelagert und für Experimente verwendet.

Die HPLC-Spektren der verwendeten Fraktionen können im Anhang 1 nachgeschlagen werden.

### 2.2.2. Quantifizierung der Peptidlösungen mit UV/VIS Spektroskopie

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, waren Peptidlösungen mit vergleichbaren Konzentrationen notwendig. Um diese Konzentration zu ermitteln, wurden die Absorptionen bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen und in Relation mit den vorhandenen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin gesetzt.

$$\text{Proteinkonzentration [M]} = \frac{A(280) - A(\text{max}) * CF}{\epsilon} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Da Tryptophan und Tyrosin ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, kann dadurch die Menge des gesamten Peptids errechnet werden (23,24). Die erhaltenen Absorptionen, Fluoreszenzen und berechneten Konzentrationen werden für die bei jedem Experiment verwendeten Peptidlösungen in Kapitel 3 in den Tabellen 6-14 dargestellt.

Das für das Experiment gereinigte und lyophilisierte Peptid wurde zunächst in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  pH 7,04 gelöst, um eine Stammlösung zu erhalten. Gemessen wurden immer 100  $\mu\text{l}$  Lösung bei einer Wellenlänge von 495 nm für FITC und 280 nm für das Peptid. Als Nullwert wurde PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  pH 7,04 verwendet.

Für den 280 nm Messwert wurden durch Verdünnung der Peptidstammlösungen Werte zwischen 0,15 und 0,25 und für den 495 nm Messwert Werte zwischen 0,40 und 0,65 angestrebt.

Mit den erhaltenen Werten wurde mithilfe der oben angeführten Formel die Konzentration der Peptidstammlösung errechnet.

Für die Zellexperimente wurden durch Verdünnung mit RPMI-Medium Peptidlösungen in den Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  hergestellt und anschließend ihre Fluoreszenz bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung gemessen, um vergleichbare Fluoreszenzintensitäten der für jedes Experiment frisch hergestellten Peptidlösungen zu gewährleisten.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

Versuche wurden an humanen Blasenkarzinomzellen (Karzinomgrad II, 5637-Zellen) und an humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2 Zellen) durchgeführt. Für beide Zelllinien wurde als Nährmedium RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium) verwendet, das wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben vorbereitet wurde.

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Sobald eine Konfluenz von 80 % in den Flaschen erreicht wurde, wurden die Zellen subkultiviert (5637-Zellen 3-4 Tage und Caco-2 Zellen 7 Tage). Dabei wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zuerst wurde das verbrauchte Nährmedium abgesaugt und die Zellen gewaschen (5637-Zellen mit 2 ml PBS+0,1 % EDTA und Caco-2 Zellen mit 2 ml PBS ohne Zusätze, siehe Kapitel 2.1.3). Dann wurden die Zellen von der Wachstumsfläche abgelöst (5637-Zellen mit 2 ml Trypsin und 15 Minuten Inkubationszeit im Brutschrank, Caco-2 Zellen mit 2 ml TrypLE-Select und 20 Minuten Inkubationszeit im Brutschrank). Nach gründlichem Abklopfen der Zellen vom Flaschenboden am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und in einem 30 ml Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml RPMI-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 10 ml vorgelegtem frischem RPMI-Medium in der Flasche angesetzt (jeweils 200 µl Zellsuspension für die 5637-Zellen und 200 µl für die Caco-2 Zellen).

Von der übrigen Zellsuspension wurde bei Bedarf für Zellversuche die Zellzahl mithilfe einer Bürker-Türk Zählkammer bestimmt und die Zellzahl für das Aussäen in Monolayern durch Verdünnen mit RPMI-Medium eingestellt.

### *2.3.2 Bindungsaffinität des Peptids an Zell-Monolayern und an Einzelzellen*

Um die Bindungsaffinität- und Internalisierungseigenschaften der Peptide zu testen, wurden sowohl an Caco-2 Zellen als auch an 5637-Zellen Versuche bei 37 °C und 4 °C durchgeführt. Bei 37 °C herrschen physiologische Bedingungen und Stoffwechselprozesse laufen aktiv ab, während sie bei 4 °C nur stark eingeschränkt oder gar nicht stattfinden (25). Bei 37 °C kann man somit eine Internalisierung des Peptids in die Zelle messen, bei 4 °C nur eine Bindung an die Zelle.

Es wurden in zwei 96-Well Platten Monolayer mit 27 000 Zellen/160 µl/Well angelegt. Beide Monolayer wurden dann im Brutschrank inkubiert, bis die Konfluenz bei mindestens 80 % lag. Bei den Caco-2 Zellen war dies nach 3-4 Tagen und bei den 5637-Zellen nach zwei Tagen der Fall.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität wurde zunächst auf beiden Platten das Medium abgesaugt und jedes Well mit 50 µl HEPES isoton pH 7,4 gewaschen. Die Wells wurden mit 50 µl HEPES isoton pH 7,4+1 % BSA bedeckt und beide Platten bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Bei diesem Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Zellen mit BSA abgesättigt.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und je 50 µl der mit RPMI hergestellten Peptidverdünnungen von Peptid 3 und Sequenz 3 (100 µM, 50 µM und 25 µM) auf den Zellrasen pipettiert. Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und als Kontrollwert 50 µl RPMI verwendet. Dann wurde für zwei Stunden inkubiert, eine Platte bei 4 °C und die andere bei 37 °C.

Anschließend wurden die 100 % Beladung der Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung gemessen. Danach wurde die Peptidlösung mit der Vakuumpasteurpipette abgenommen, die Zellen mit 50 µl HEPES isoton pH 7,4 gewaschen und erneut gemessen. Dieser Wert wurde auf den zuerst gemessenen Wert bezogen und dadurch bestimmt, wieviel Peptid an den Zellen gebunden hatte.

Um die Fluoreszenzen der Einzelzellen zu messen, wurden die Monolayer weiter für eine Analyse am Durchflusszytometer vorbereitet. Dafür wurden die Zellen aus den Wells herausgelöst (5637-Zellen: 20 µl Accutase und 15 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C, Caco-2 Zellen: 20 µl TrypLE Select und 20 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C). Anschließend wurden mit einer Lösung aus 80 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS die ablösenden Reagenzien verdünnt und die abgelösten Zellen in Epruvetten, in denen bereits 320 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS vorgelegt war, transferiert. Die Wells wurden mit je 100 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS nachgewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls in die Epruvetten transferiert.

Die am Durchflusszytometer und am Mikroplattenlesegerät gemessenen Fluoreszenzintensitäten konnten dann verglichen und so Aussagen über die Bindungsaffinität der Peptide an die 5637- und Caco-2 Zellen getroffen werden.

### *2.3.3 Endocytosewege an Einzelzellen*

Bei diesen Experimenten wurden 5637- und Caco-2 Zellen zuerst mit Arzneistoffinhibitoren, die bestimmte Endocytosewege blockieren, behandelt und dann mit Peptid 3 und Sequenz 3 inkubiert. Als spezifischer Inhibitor der Clathrin-vermittelten Aufnahme wurde Chlorpromazin verwendet, für die Caveolae-vermittelte Endocytose Nystatin und für den macropinozytotischen Weg Amilorid (26).

Es wurde in einer 48-Well Platte ein Monolayer mit 300 µl Zellsuspension und 50 000 Zellen/Well angelegt. Der Monolayer wurde dann im Brutschrank inkubiert bis die Konfluenz bei ca. 80 % lag.

Danach wurde zunächst das Medium aus der Platte mittels Vakuum Pasteurpipette abgesaugt und die Wells mit 300 µl HEPES isoton 7,4 gewaschen. Anschließend wurde auf den Zellrasen eine Verdünnung aus 297 µl RPMI-Medium und 3 µl Arzneistoffstocklösung in DMSO (Chlorpromazin, Amilorid, Nystatin, Herstellung siehe 2.1.3) oder für die Blankwerte 3 µl DMSO pipettiert. So erhielt man eine finale Konzentration von 64,8 µM für Nystatin, für Chlorpromazin von 12 µM und für Amilorid von 1,2 µM. Die Platte wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Wells mit 300 µl HEPES isoton pH 7,4 gewaschen. Dann wurden auf die mit den Arzneistoffen behandelten Wells je 150 µl von den Verdünnungen von Peptid 3 und Sequenz 3 in RPMI mit der Konzentration 100 µM pipettiert und die Platte für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Für jede Peptidkonzentration mit jedem Arzneistoff wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Dann wurden die Peptidverdünnungen mittels Vakuum Pasteurpipette abgesaugt und die Wells mit HEPES isoton pH 7,4 gewaschen. Die behandelten Zellen wurden abgelöst (die Caco-2 Zellen mit je 100 µl TrypLE Select und 20 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C und die 5637-Zellen mit je 100 µl Accutase und 15 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C, bei beiden Zelllinien wurde jedes Well nach Ablauf der Inkubationszeit mit 500 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS verdünnt) und in Epprovetten transferiert, in denen 400 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS vorgelegt war. Die Fluoreszenz der behandelten Zellen wurde am Durchflusszytometer gemessen.

#### *2.3.4 Quantifizierung der aufgenommenen Peptidmenge*

Um die tatsächlich aufgenommene Menge an Peptid quantifizieren zu können, wurden die Zellen vollständig aufgelöst und der Überstand am Plattenlesegerät gemessen. Um zwischen Aufnahme und Bindung differenzieren zu können, wurden Versuche bei 4 °C und 37 °C durchgeführt.

Für diese Versuche wurden je zwei Monolayer mit 160 µl Zellsuspension mit 27 000 Zellen/Well angelegt. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellmonolayer für die Versuche verwendet.

Zunächst wurde auf beiden Platten das Medium mithilfe Vakuum-Pasteurpipette abgenommen und jedes Well mit 50 µl HEPES isoton pH 7,4 gewaschen. Die Wells wurden mit 50 µl HEPES isoton pH 7,4+1 % BSA bedeckt und bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Dadurch wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit dem Protein abgesättigt.

Danach wurde diese Lösung abgesaugt und je 50 µl des in RPMI-Medium gelösten Peptid 3 und der Sequenz 3 (100 µM, 50 µM und 25 µM) hinzu pipettiert. Pro Konzentration wurden drei Parallelversuche durchgeführt und als Kontrollwert 50 µl RPMI verwendet. Dann wurden beide Platten für zwei Stunden inkubiert, die eine bei 4 °C und die andere bei 37 °C.

Um die Zellmembran zu zerstören und auch Zellbestandteile aufzulösen wurden 50 µl Lysepuffer auf den Zellrasen aufgebracht. Es wurde für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um eine ausreichende Zellyse zu gewährleisten, wurde mit der Pipettenspitze über den Boden gekratzt und gründlich resuspendiert. Anschließend wurden die drei Zellversuche gepoolt und um Zellbestandteile abzutrennen bei 14 000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände zu je 2x50 µl in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert und die Fluoreszenz (485 nm/525 nm Exzitation/Emission und 80 % Verstärkung) bestimmt.

Die erhaltenen Werte wurden in die Gleichung der Kalibriergerade (siehe 2.3.4.1) eingesetzt und so der FITC-Gehalt der in die Zelle aufgenommenen Peptide berechnet und die in die Zelle aufgenommenen Peptide quantifiziert.

Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob Peptid, welches nach der Inkubation bei 4 °C nur außen haftet, durch erneute Inkubation bei 37 °C in die Zelle aufgenommen wird. Dafür wurde jeweils ein weiterer Monolayer für beide Zelllinien herangezogen (27 000 Zellen/Well/160 µl).

Die Platte wurde wie im dritten und vierten Absatz von Kapitel 2.3.4 beschrieben mit BSA behandelt, anschließend das Peptid hinzugefügt und bei 4 °C inkubiert. Die Hälfte der Wells wurde wie im fünften Absatz von Kapitel 2.3.4 beschrieben lysiert und zentrifugiert und die Fluoreszenzintensität des Überstands gemessen. Die andere Hälfte der Wells wurde weitere 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, danach noch einmal gewaschen, die Zellen wie im fünften Absatz von Kapitel 2.3.4 beschrieben lysiert und zentrifugiert und ebenfalls die Fluoreszenz von 2x50 µl des Überstands in einer 96-Well Platte am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und einer Verstärkung von 80% gemessen.

Diese Werte wurden miteinander verglichen und ermittelt, welcher Anteil der nach einer Inkubation bei 4 °C außen an den Zellen haftenden Peptide durch eine weitere Inkubation bei 37 °C in die Zellen aufgenommen wird.

#### *2.3.4.1 Kalibriergerade FITC in Zellysepuffer*

Um den Gehalt an Peptid über das gebundene FITC ermitteln zu können, wurde eine Eichgerade benötigt.

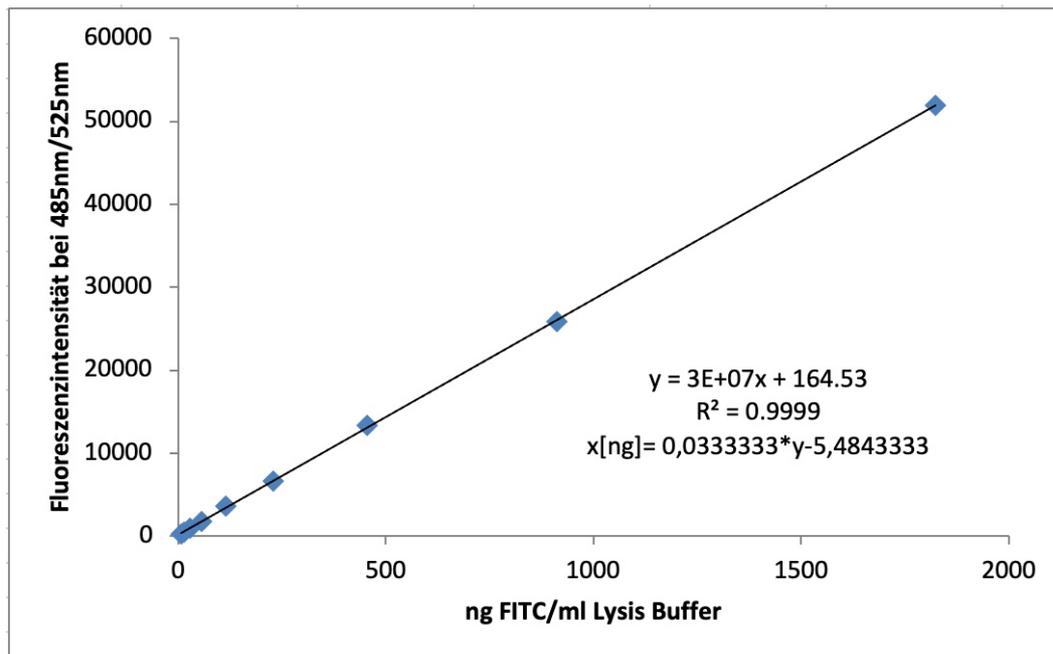


Abbildung 4 Kalibriergerade FITC in Lysis Puffer

Dafür wurden 0,35 mg FITC eingewogen und in 3 ml Lysepuffer gelöst. Von dieser Stammlösung aus wurden 14 1:1 Verdünnungen aus 500 µl der höheren Verdünnung und 500 µl Lysepuffer hergestellt und von jeder der Verdünnungen 3x50 µl in eine 96-Well Platte pipettiert. Am Mikroplattenlesegerät wurde die Fluoreszenz bei 485 nm/525 nm Ex/Em bei 80 % Verstärkung gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde die in Abbildung 4 dargestellte Gerade erstellt. Ein linearer Bereich konnte ab einer Konzentration von 1,823 µg/ ml bis zur Verdünnung der niedrigsten Konzentration ermittelt werden.

### 2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

5637-Zellen wurden im Flexiperm® angesetzt (Passage 129, 16 000 Zellen/160 µl/Well).

Lösungen von P3 und S3 wurden in einer Konzentration von 100 µM verwendet und je 50 µl gemeinsam mit 2 µl einer 1 mg/ml Lösung des blau fluoreszierenden Farbstoffs HOECHST33342, der den Zellkern färbt, aufgetragen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, mit 50 µl Paraformaldehyd (4 %) und 100 µl 100mM Ammoniumchlorid fixiert und die Zellmembranen mit 5 µl einer 1 mg/ml Lösung von ALEXA-WGA rot gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Bindungsaffinität des Peptids an Zell-Monolayern und an Einzelzellen

Die Experimente wurden, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben durchgeführt.

##### 3.1.1 5637-Zellen

Es wurden 5637-Zellen der Passage 120 verwendet.

##### 3.1.1.1 Charakterisierung der Peptidlösungen

Die in Tabelle 5 und 6 dargestellten Werte wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben ermittelt.

	<b>A<sub>max</sub> 495nm</b>	<b>A<sub>max</sub> 280nm</b>	<b>Dilutionsfaktor</b>	<b>Konzentration Stammlösung [µM]</b>
<b>P3<sub>p3b</sub></b>	0,230	0,675	20,571	379,950
<b>S3<sub>llp2d</sub></b>	0,617	0,207	20,571	299,597

Tabelle 5 Absorption Peptidlösungen

	<b>Stammlösung</b>	<b>100 µM</b>	<b>50 µM</b>	<b>25 µM</b>
<b>P3<sub>p3b</sub></b>	45 300	34 050	25 644	12 890
<b>S3<sub>llp2d</sub></b>	48 110	36 846	23 107	12 678

Tabelle 6 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen

##### 3.1.1.2 Durchflusszytometer

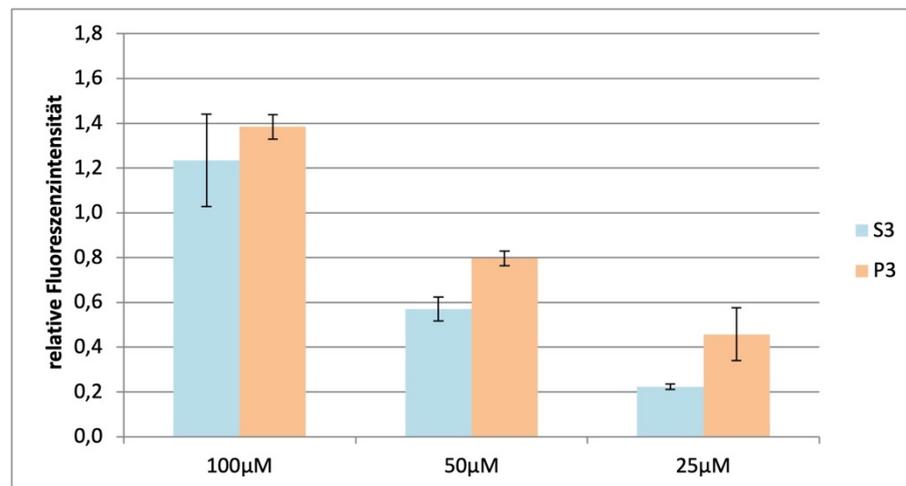


Abbildung 5 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an 5637-Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Das FimH Teilpeptid P3 hat bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C bei allen gemessenen Konzentrationen zwischen 10,87 % (100 µM) und 52,18 % (25 µM) besser an die 5637- Zellen

gebunden als die Kontrollsequenz S3. Die am Durchflusszytometer erhaltenen zellgebundenen Fluoreszenzen sind in Abbildung 5 dargestellt und werden im folgenden Absatz näher erläutert.

Es wurde für die 100  $\mu\text{M}$  Peptidlösungen für P3 eine relative Fluoreszenzintensität von  $1,38 \pm 0,05$  und von  $1,23 \pm 0,21$  für S3 erreicht. Damit wurde  $\text{P3}_{100 \mu\text{M}}$  um 10,87 % besser an die 5637-Zellen gebunden als  $\text{S3}_{100 \mu\text{M}}$ . Bei 50  $\mu\text{M}$  waren es für P3  $0,80 \pm 0,03$  und für S3  $0,57 \pm 0,05$  relative Fluoreszenzintensität und somit eine bessere Bindung von  $\text{P3}_{50 \mu\text{M}}$  gegenüber  $\text{S3}_{50 \mu\text{M}}$  um 28,75 %. Bei den Peptidlösungen mit 25  $\mu\text{M}$  wurden relative Fluoreszenzintensitäten von  $0,46 \pm 0,12$  für P3 und  $0,22 \pm 0,01$  für S3 erreicht.  $\text{P3}_{25 \mu\text{M}}$  hatte in dieser Konzentration eine um 52,18 % höhere Bindungsaffinität für die 5637-Zellen als  $\text{S3}_{25 \mu\text{M}}$ . Ein t-test zeigte für 100  $\mu\text{M}$  einen p-Wert von 0,3773 und somit nicht signifikante Ergebnisse. Für 50  $\mu\text{M}$  wurde ein p-Wert von 0,0066 erhalten und für 25  $\mu\text{M}$  ein p-Wert von 0,0001 erzielt. Diese Ergebnisse sind somit signifikant.

Peptid, das bei 37  $^{\circ}\text{C}$  an die Zelle bindet, wird durch die physiologischen Stoffwechselfvorgänge auch in die Zelle aufgenommen. Das FimH Teilpeptid bindet besser an 5637-Zellen und kann im Vergleich zur Kontrollsequenz auch vermehrt aufgenommen werden. Diese Ergebnisse zeigen das Potenzial für das FimH Teilpeptid als möglichen Targeter an 5637-Zellen und somit an Blasenkarzinomen.

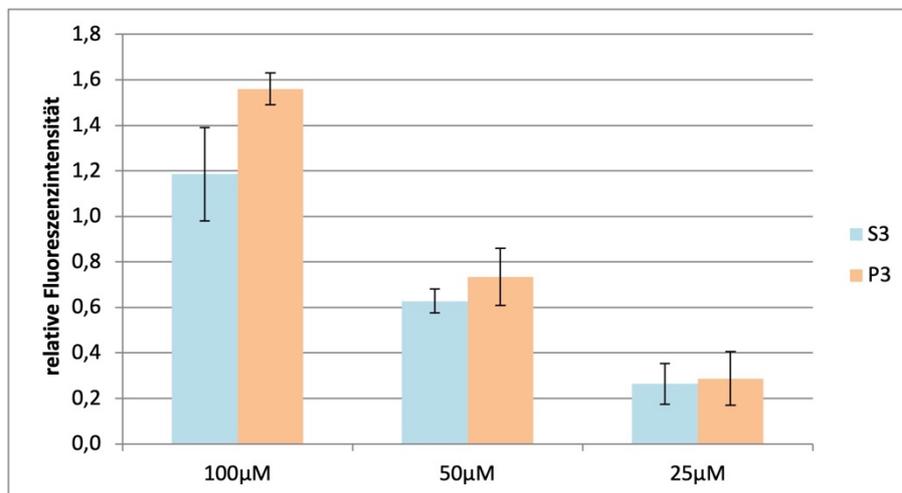


Abbildung 6 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4  $^{\circ}\text{C}$  an 5637-Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Im Durchflusszytometer zeigte das FimH Teilpeptid P3 zu den bei 4 °C inkubierten 5637-Zellen eine zwischen 10,34 % (25 µM) und 23,72 % (100 µM) höhere Bindungsaffinität als das Kontrollpeptid S3. Es konnte bei höheren eingesetzten Konzentrationen ein direkt proportionales Verhältnis zur zellgebundenen Fluoreszenz festgestellt werden.

Es wurde für die 100 µM Peptidlösungen für P3 eine relative Fluoreszenzintensität von  $1,56 \pm 0,07$  und von  $1,19 \pm 0,21$  für S3 erreicht (Abb. 6). Damit hat  $P3_{100 \mu M}$  um 23,72 % besser an die 5637- Zellen gebunden als  $S3_{100 \mu M}$ . Bei 50 µM waren es für P3  $0,73 \pm 0,13$  und für S3  $0,63 \pm 0,05$  relative Fluoreszenzintensität und somit eine bessere Bindung von  $P3_{50 \mu M}$  gegenüber  $S3_{50 \mu M}$  um 13,70 % (Abb. 6). Bei den Peptidlösungen mit 25 µM wurden relative Fluoreszenzintensitäten von  $0,29 \pm 0,12$  für P3 und  $0,26 \pm 0,09$  für S3 erreicht (Abb. 6).  $P3_{25 \mu M}$  hatte in dieser Konzentration eine um 10,34 % höhere Bindungsaffinität für die 5637-Zellen als  $S3_{25 \mu M}$ . Ein t-Test zeigte für 100 µM einen p-Wert von 0,0389 und für 50 µM einen p-Wert von 0,0267. Somit sind die Ergebnisse dieser beiden Konzentrationen signifikant. Für 25 µM wurde ein p-Wert von 0,154 erzielt. Diese Ergebnisse sind somit nicht signifikant.

Bei 4 °C können aktive Stoffwechselprozesse reduziert werden, weshalb nur das an die Zellmembran gebundene Peptid ermittelt werden kann. Diese Eigenschaft kann für einen Targeter zwar nützlich sein, für die Behandlung von Blasenkarzinomen ist jedoch die bei 37 °C stattfindende Internalisierung wichtiger, da die Internalisierung eines Targeters diesen vor Ausspülvorgängen aus der Blase schützt.

### 3.1.1.3 Mikropplattenlesegerät

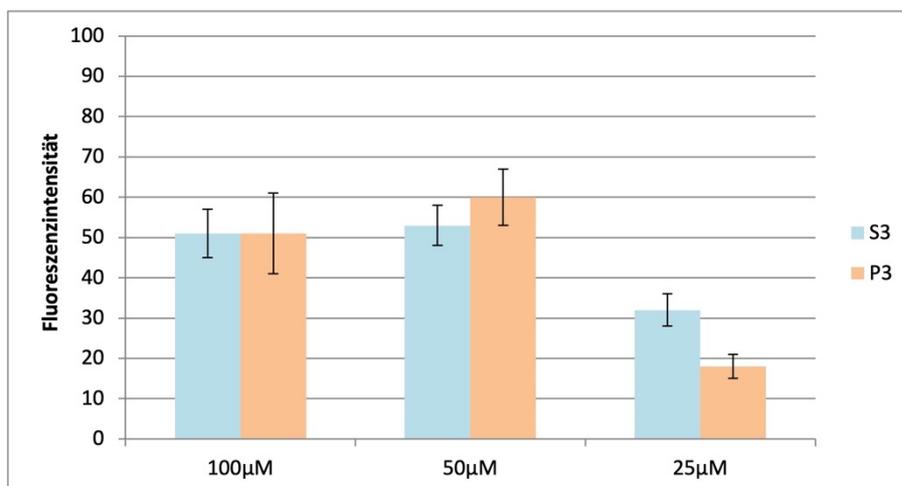


Abbildung 7 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an 5637-Zellen am Mikropplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=3)

Bei den am Mikroplattenlesegerät gemessenen Fluoreszenzintensitäten der bei 37 °C mit den Peptidlösungen inkubierten 5637-Zellen hat keines der beiden Peptide über alle Konzentration hinweg besser an die Zellen gebunden.

Für die 100 µM Peptidlösungen wurde für P3 eine Fluoreszenzintensität von  $51 \pm 10$  und für S3 von  $51 \pm 6$  gemessen (Abb. 7). Bei den 50 µM Lösungen waren es für P3  $60 \pm 7$  und für S3  $53 \pm 5$  (Abb. 7). Für die 25 µM Lösungen wurden Fluoreszenzintensitäten von  $18 \pm 3$  für P3 und  $32 \pm 4$  für S3 erzielt (Abb. 7). Ein t-test zeigte für 100 µM einen p-Wert von 0,432 und somit keine Signifikanz. Für 50 µM erhielt man einen p-Wert von 0,0006 und für 25 µM einen p-Wert von  $<0,0001$ . Diese Ergebnisse sind signifikant.

Es wurden im Monolayer ähnliche Ergebnisse erwartet wie am Durchflusszytometer. Die Diskrepanz zu den tatsächlichen Ergebnissen lässt sich möglicherweise durch die Unterschiede in der räumlichen Anordnung erklären. Liegen die Zellen im Monolayer vor, besteht ein höheres Potenzial zum Quenching und damit der Abschwächung von Fluoreszenzsignalen. Am Durchflusszytometer hingegen wird jede Zelle einzeln und von jeder Seite betrachtet und dadurch genauere Messergebnisse erzielt. Eine Quantifizierung des in die Zelle aufgenommenen Peptids durch Zelllyse (siehe Kapitel 3.3) ergibt aussagekräftigere Ergebnisse.

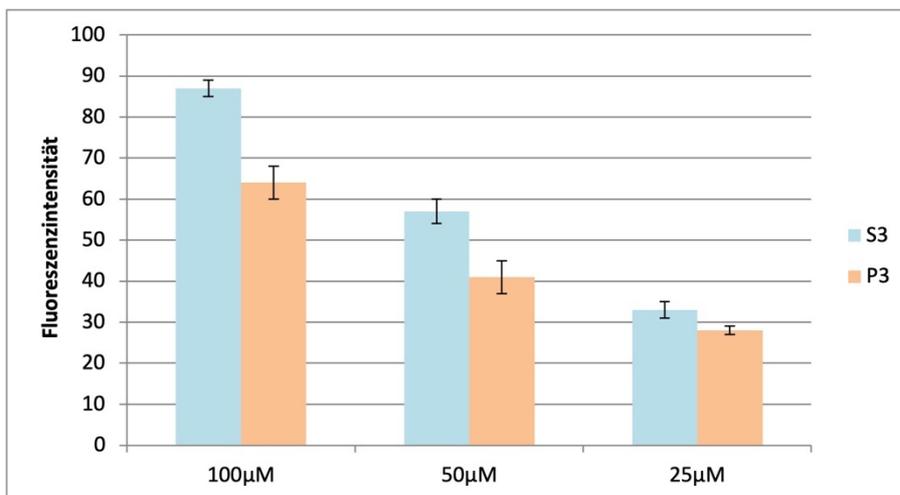


Abbildung 8 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an 5637-Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Bei den am Mikroplattenlesegerät gemessenen Fluoreszenzintensitäten der bei 4 °C mit den Peptidlösungen inkubierten 5637-Zellen zeigte sich, dass die Kontrollsequenz S3 eine zwischen 15,15 % (25 µM) und 28,07 % (50 µM) höhere Bindungsaffinität zeigte als das FimH Teilpeptid P3, was den am Durchflusszytometer erhaltenen Ergebnissen widerspricht.

Für die 100 µM Lösungen wurde eine Fluoreszenzintensität von  $64 \pm 4$  für P3 und von  $87 \pm 2$  für S3 gemessen. Dies entspricht einer höheren Bindungsaffinität von S3<sub>100 µM</sub> gegenüber P3<sub>100</sub>

$\mu\text{M}$  um 26,44 % (Abb. 8). Bei den 50  $\mu\text{M}$  Lösungen waren die gemessenen Fluoreszenzintensitäten  $41 \pm 4$  für P3 und  $57 \pm 3$  für S3, somit hat  $\text{S3}_{50 \mu\text{M}}$  eine um 28,07 % höhere Bindungsaffinität als  $\text{P3}_{50 \mu\text{M}}$  (Abb. 8). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten waren bei den 25  $\mu\text{M}$  Peptidlösungen  $28 \pm 1$  für P3 und  $33 \pm 2$  bei S3,  $\text{S3}_{25 \mu\text{M}}$  hat also um 15,15 % besser an die 5637-Zellen gebunden als  $\text{P3}_{25 \mu\text{M}}$  (Abb. 8). Ein t-test zeigte für 100  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  einen p-Wert von  $<0,0001$  und für 25  $\mu\text{M}$  einen p-Wert von 0,0004 und somit eine Signifikanz der Ergebnisse.

Die gemessenen höheren Fluoreszenzwerte am Zellmonolayer bei 4 °C am Mikroplattenlesegerät könnten dadurch erklärt werden, dass in die Zelle aufgenommenes Peptid zu einer geringeren Fluoreszenz im Monolayer führt als ein nur an der Oberfläche haftendes, weil es zu einem geringeren Signal durch Quenching kommt oder in Zellkompartimenten unterschiedliche pH-Werte vorherrschen und dadurch die Fluoreszenz gemindert ist. Am Durchflusszytometer, an dem P3 besser gebunden hat als S3, kann dies nicht beobachtet werden, da dort die Fluoreszenz einzeln vorliegender Zellen gemessen wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde durch Zellyse quantifiziert, wieviel FITC und somit Peptid tatsächlich in die Zellen aufgenommen wird. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 3.3 beschrieben.

Weiters ist die Messdauer am Durchflusszytometer höher als am Mikroplattenlesegerät und die Messung wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Es ist also möglich, dass in den Proben ein Temperaturgradient entstanden ist, der die Ergebnisse beeinflusst hat.

### 3.1.2 Caco-2 Zellen

Es wurden Caco-2 Zellen aus Passage 28 verwendet.

#### 3.1.2.1 Charakterisierung der Peptidlösungen

Die in Tabelle 7 und 8 dargestellten Werte wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben ermittelt.

	<b>A<sub>max</sub> 495nm</b>	<b>A<sub>max</sub> 280nm</b>	<b>Dilutionsfaktor</b>	<b>Konzentration Stammlösung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
<b>P3<sub>i</sub></b>	0,417	0,143	18,082	214,316
<b>S3<sub>cVII</sub></b>	0,369	0,141	11	221,846

Tabelle 7 Absorption Peptidlösungen

	<b>Stammlösung</b>	<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>P3<sub>i</sub></b>	38 887	35 247	24 668	11 969
<b>S3<sub>cVII</sub></b>	35 558	32 598	22 301	11 805

Tabelle 8 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen

### 3.1.2.2 Durchflusszytometer

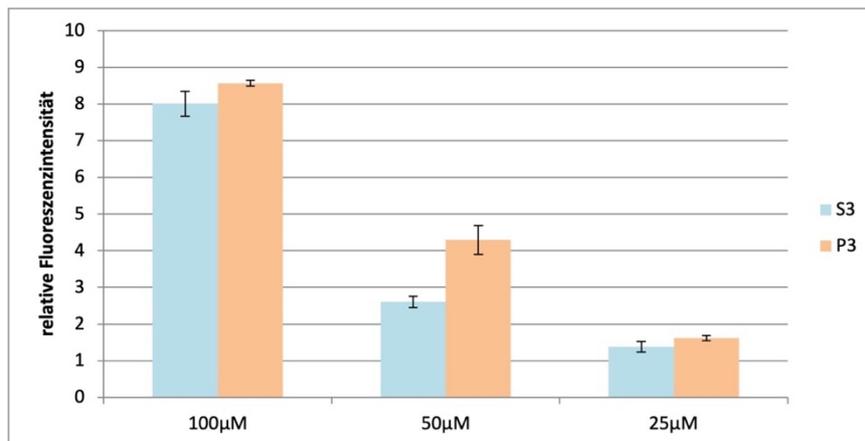


Abbildung 9 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an Caco-2 Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Wie auch bei den 5637-Zellen zeigte das FimH Teilpeptid P3 bei 37 °C an Caco-2 Zellen am Durchflusszytometer eine zwischen 6,53 % (25 µM) und 39,14 % (50 µM) höhere zellgebundene Fluoreszenz als die Kontrollsequenz S3. Die erhaltenen zellgebundenen Fluoreszenzen sind in Abbildung 9 dargestellt und werden im nächsten Absatz näher erläutert.

Am Durchflusszytometer wurde für die 100 µM Peptidlösungen für P3 eine relative Fluoreszenzintensität von  $8,57 \pm 0,08$  und von  $8,01 \pm 0,34$  für S3 erreicht. Damit wurde  $P3_{100 \mu M}$  um 6,53 % besser an die Caco-2 Zellen gebunden als  $S3_{100 \mu M}$ . Bei 50 µM waren es für P3  $4,29 \pm 0,39$  und für S3  $2,61 \pm 0,15$  relative Fluoreszenzintensität und somit eine bessere Bindung von  $P3_{50 \mu M}$  gegenüber  $S3_{50 \mu M}$  um 39,16 %. Bei den Peptidlösungen mit 25 µM wurden relative Fluoreszenzintensitäten von  $1,62 \pm 0,07$  für P3 und  $1,38 \pm 0,15$  für S3 erreicht.  $P3_{25 \mu M}$  hatte in dieser Konzentration eine um 14,84 % höhere Bindungsaffinität für die Caco-2 Zellen als  $S3_{25 \mu M}$ . Ein t-test zeigte für 100 µM und 50 µM einen p-Wert von  $<0,0001$  und somit signifikante Ergebnisse. Für 25 µM wurde ein p-Wert von 0,1129 erhalten, somit sind diese Ergebnisse nicht signifikant.

Auch hier zeigt eine höhere zellgebundene Fluoreszenz des FimH Teilpeptids im Vergleich zu der Kontrollsequenz vielversprechendes Potenzial als möglicher Targeter für Caco-2 Zellen und somit Kolonkarzinome.

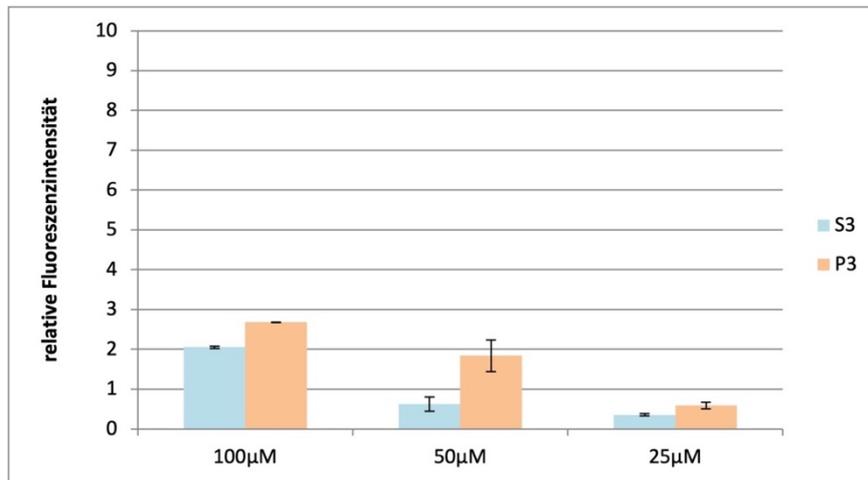


Abbildung 10 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an Caco-2 Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Wie bei den Ergebnissen für die 5637-Zellen hat das FimH Teilpeptid P3 auch bei 4 °C besser an die Caco-2 Zellen gebunden als die Kontrollsequenz S3, in Zahlen zwischen 23,13 % (100 µM) und 66,30 % (50µM). Bei den bei 4 °C inkubierten Caco-2 Zellen zeigte sich am Durchflusszytometer allerdings eine niedrigere Bindungsaffinität an die Zellen gegenüber der Inkubation bei 37 °C. Dies lässt sich über die geringere Stoffwechselaktivität der Zellen bei 4 °C erklären, die bei den Caco-2 Zellen die Bindungsaffinität stärker senkt als bei den 5637- Zellen.

Am Durchflusszytometer wurde für die 100 µM Peptidlösungen für P3 eine relative Fluoreszenzintensität von  $2,68 \pm 0,01$  und von  $2,06 \pm 0,03$  für S3 erreicht (Abb. 10). Damit wurde  $P3_{100 \mu M}$  um 23,13 % besser an die Caco-2 Zellen gebunden als  $S3_{100 \mu M}$ . Bei 50 µM waren es für P3  $1,84 \pm 0,40$  und für S3  $0,62 \pm 0,18$  relative Fluoreszenzintensität (Abb. 10) und somit eine bessere Bindung von  $P3_{50 \mu M}$  gegenüber  $S3_{50 \mu M}$  um 66,30 %. Bei den Peptidlösungen mit 25 µM wurden relative Fluoreszenzintensitäten von  $0,59 \pm 0,09$  für P3 und  $0,36 \pm 0,03$  für S3 erreicht (Abb. 10).  $P3_{25 \mu M}$  hatte in dieser Konzentration eine um 38,98 % höhere Bindungsaffinität für die Caco-2 Zellen als  $S3_{25 \mu M}$ . Ein t-Test zeigte für 100 µM und einen p-Wert von  $<0,0001$  und für 50 µM einen p-Wert von 0,0169 und somit signifikante Ergebnisse. Für 25 µM wurde ein p-Wert von 0,0238 erhalten, somit sind auch diese Ergebnisse signifikant.

### 3.1.2.3 Mikroplattenlesegerät

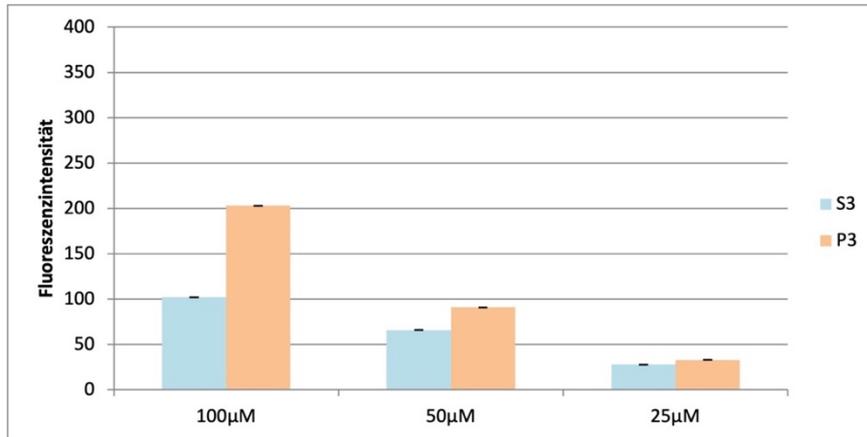


Abbildung 11 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an Caco-2 Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Wie es auch bei den 5637-Zellen der Fall war, zeigte sich auch bei den Caco-2 Zellen bei den am Mikroplattenlesegerät gemessenen zellgebundenen Fluoreszenzen der bei 37 °C inkubierten Zellen für das FimH Teilpeptid P3 eine höhere Bindung im Vergleich zu seiner Kontrollsequenz S3. Die zellgebundenen Fluoreszenzen sind für P3 zwischen 15,15 % (25 μM) und 49,75 % (100 μM) höher als für S3.

Für die 100 μM Lösungen wurde eine Fluoreszenzintensität von  $203 \pm 2$  für P3 und von  $102 \pm 3$  für S3 gemessen (Abb. 11). Dies entspricht einer höheren Bindungsaffinität von  $P3_{100 \mu M}$  gegenüber  $S3_{100 \mu M}$  um 49,75 %. Bei den 50 μM Lösungen waren die gemessenen Fluoreszenzintensitäten  $91 \pm 2$  für P3 und  $66 \pm 2$  für S3 (Abb. 11), somit hat  $P3_{50 \mu M}$  eine um 27,47 % höhere Bindungsaffinität als  $S3_{50 \mu M}$ . Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten waren bei den 25 μM Peptidlösungen  $33 \pm 1$  für P3 und  $28 \pm 2$  für S3 (Abb. 11),  $P3_{25 \mu M}$  hat also um 15,15 % besser an die Caco-2-Zellen gebunden als  $S3_{25 \mu M}$ . Ein t-Test zeigte für 100 μM und für 50 μM einen p-Wert von  $<0,0001$  und somit signifikante Ergebnisse. Für 25 μM wurde ein p-Wert von 0,0004 erzielt. Diese Ergebnisse sind ebenfalls signifikant.

Die höhere zellgebundene Fluoreszenz des FimH Teilpeptids im Vergleich zur Kontrollsequenz bei 37 °C bestätigt sich mit diesen Ergebnissen für die Caco-2 Zellen nicht nur am Durchflusszytometer, sondern auch am Mikroplattenlesegerät. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Potenzial als möglicher Targeter an Caco-2 Zellen und somit Kolonkarzinomen.

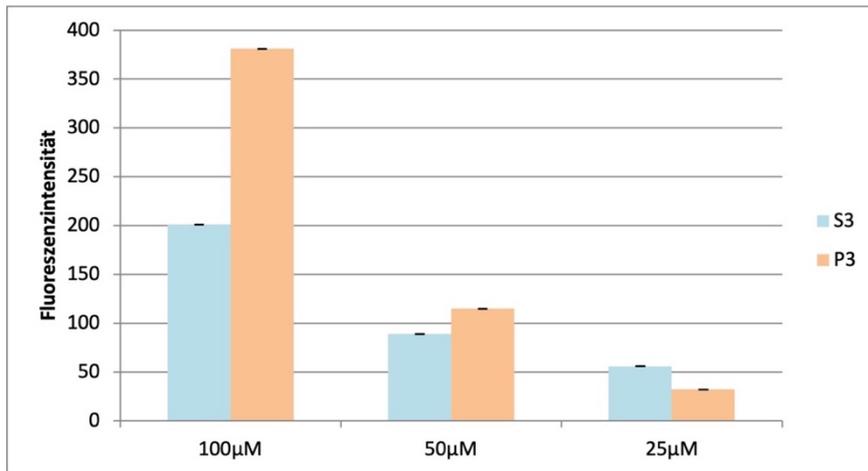


Abbildung 12 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an Caco-2 Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert und Standardabweichung, n=3)

Bei den Caco-2 Zellen, die bei 4 °C mit dem Peptid inkubiert wurden, konnte am Mikroplattenlesegerät eine im Vergleich zu den bei 37 °C gemessenen Werten erhöhte Bindung gemessen werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass das Peptid außen an der Zellmembran haftet und nicht in die Zellorganellen aufgenommen wird. Dies kann zu einem Quenching-Phänomen führen, was eine erniedrigte Fluoreszenz zur Folge hat. Bei den höheren Konzentrationen der Lösungen von 100 μM und 50 μM hatte P3 eine zwischen 22,60 % und 47,24 % höhere Bindungsaffinität zu den Caco-2 Zellen als S3, bei den 25 μM Lösungen hat S3 im Vergleich zu P3 vermehrt gebunden.

Für die 100 μM Lösungen wurde eine Fluoreszenzintensität von 381±4 für P3 und von 201±3 für S3 gemessen (Abb. 12). Dies entspricht einer höheren Bindungsaffinität von P3<sub>100 μM</sub> gegenüber S3<sub>100 μM</sub> um 47,24 %. Bei den 50 μM Lösungen waren die gemessenen Fluoreszenzintensitäten 115±4 für P3 und 89±2 für S3 (Abb. 12), somit hat P3<sub>50 μM</sub> eine um 22,60 % höhere Bindungsaffinität als S3<sub>50 μM</sub>. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten waren bei den 25 μM Peptidlösungen 32±1 für P3 und 56±3 für S3 (Abb. 12), S3<sub>25 μM</sub> hat also um 42,86 % besser an die Caco-2-Zellen gebunden als P3<sub>25 μM</sub>. Die bei einem t-Test erhaltenen p-Werte für 100 μM, 50 μM und 25 μM betragen <0,0001 und die Ergebnisse sind somit signifikant.

### 3.2 Endocytosewege mit Monolayern am Durchflusszytometer

Die Experimente wurden, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben durchgeführt.

#### 3.2.1 5637-Zellen

Es wurden 5637-Zellen der Passage 118 verwendet.

### 3.2.1.1 Charakterisierung der Peptidlösungen

Die in Tabelle 9 und 10 dargestellten Werte wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben ermittelt.

	<b>A<sub>max</sub> 495nm</b>	<b>A<sub>max</sub> 280nm</b>	<b>Dilutionsfaktor</b>	<b>Konzentration Stammlösung [µM]</b>
<b>P3<sub>p3a</sub></b>	0,561	0,192	20,571	329,005
<b>S3<sub>llp2a+b</sub></b>	0,588	0,2	20,571	325,691

Tabelle 9 Absorption Peptidlösungen

	<b>Stammlösung</b>	<b>100 µM</b>
<b>P3<sub>p3a</sub></b>	42 506	37 606
<b>S3<sub>llp2a+b</sub></b>	48 575	34 414

Tabelle 10 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen

### 3.2.1.2 Durchflusszytometer

Durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen, kann die Abnahme der zellgebundenen Fluoreszenz gemessen werden. Diese wurde grafisch in Abbildung 13 dargestellt.

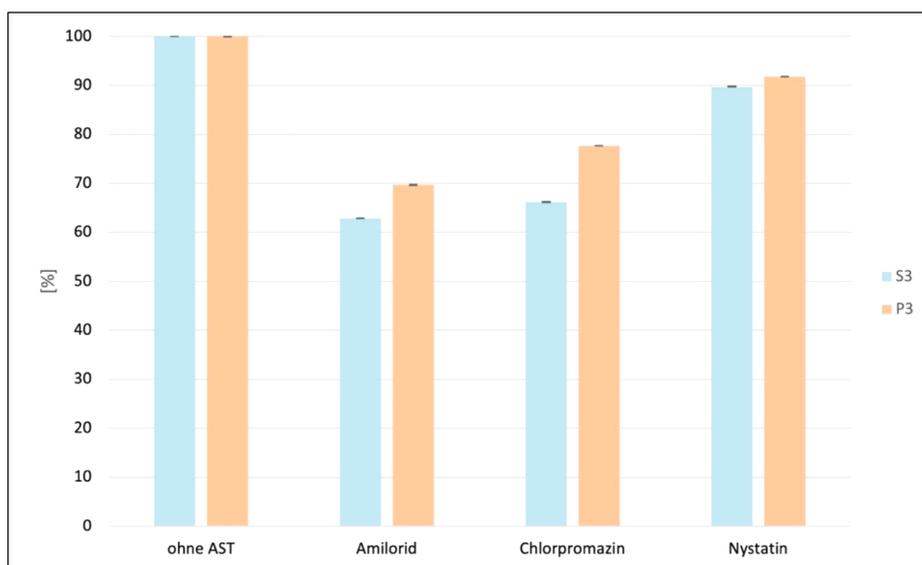


Abbildung 13 Zellgebundene Fluoreszenz der Peptidlösungen (100 µM) an 5637-Zellen, vorbehandelt mit Endocytoseinhibitoren, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Alle drei Arzneistofflösungen konnten die Aufnahme von beiden Peptiden in die 5637-Zellen inhibieren. Während Nystatin diese für P3 um 8,21 % ± 0,06 % und für S3 um 10,24 % ± 0,08

% verringerte, konnte die Aufnahme mit Chlorpromazin von P3 um 22,32 %±0,05 % und für S3 um 33,78 %±0,09 % reduziert werden. Am stärksten konnte die Internalisation der Peptide mit Amilorid blockiert werden, um 30,32 %±0,065 % für P3 und 37,17 %±0,04 % für S3.

Daraus lässt sich schließen, dass die Macropinocytose im Vergleich mit Clathrin- und Caveolae-vermittelter Endocytose jener Endocytoseweg ist, über den das Peptid am stärksten in die 5637-Zellen aufgenommen wird. Dabei handelt es sich um kontinuierliche unspezifische Endocytose mit hoher Umsatzrate und aufgenommene Stoffe werden als Teil der Immunabwehr im Lysosom der Zelle abgebaut (27). Um den Liganden folglich auch für Drug-Delivery-Vehikel verwenden zu können, wäre die Aufnahme über einen spezifischen Endocytoseweg erstrebenswert.

Es konnte gezeigt werden, dass neben dem Hauptaufnahmeweg der Macropinocytose auch über Clathrin-vermittelte Endocytose sowohl das Peptid als auch die randomisierte Sequenz aufgenommen wird. Das sind vielversprechende Ergebnisse, auf die in folgenden Arbeiten aufgebaut werden kann. Möglicherweise kann durch Kopplung mehrerer FimH Peptidbindungssequenzen eine Aufnahme hin zum Clathrin-vermittelten Weg gesteuert werden.

### 3.2.2. Caco-2 Zellen

Es wurden Caco-2 Zellen der Passage 32 verwendet.

#### 3.2.2.1 Charakterisierung der Peptidlösungen

Die in Tabelle 11 und 12 dargestellten Werte wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben ermittelt.

	<b>A<sub>max</sub> 495nm</b>	<b>A<sub>max</sub> 280nm</b>	<b>Dilutionsfaktor</b>	<b>Konzentration Stammlösung [µM]</b>
<b>P3<sub>p3e+f</sub></b>	0,543	0,188	20,571	347,367
<b>S3<sub>llp2c</sub></b>	0,490	0,172	20,571	349,914

Tabelle 11 Absorption Peptidlösungen

	<b>Stammlösung</b>	<b>100 µM</b>
<b>P3<sub>p3e+f</sub></b>	42 640	31 574
<b>S3<sub>llp2c</sub></b>	46 072	34 748

Tabelle 12 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen

### 3.2.2.2 Durchflusszytometer

Durch den Vergleich mit den Zellen, welche nicht behandelt wurden, kann die Abnahme der zellgebundenen Fluoreszenz gemessen werden. Diese wurde grafisch in Abbildung 14 dargestellt.

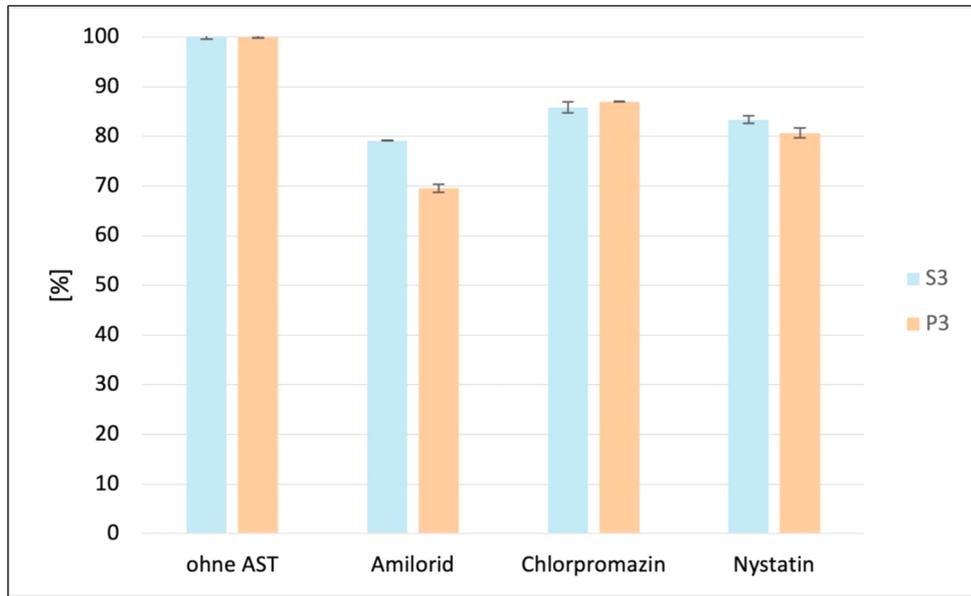


Abbildung 14 Zellgebundene Fluoreszenz der Peptidlösungen (100 µM) an Caco-2 Zellen, vorbehandelt mit Endocytoseinhibitoren, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Auch bei den Caco-2 Zellen konnten alle drei Arzneistofflösungen die Aufnahme von beiden Peptiden in die Zelle reduzieren. Während Chlorpromazin die Aufnahme von P3 um 12,97 %±0,05 % und von S3 um 14,14 %±0,09 % verringerte, waren es bei Nystatin eine Reduktion für P3 von 19,28 %±1 % und für S3 von 16,61 %±0,07 %. Am stärksten konnte die Internalisation der Peptide mit Amilorid blockiert werden, um 30,45 %±0,8 % für P3 und 20,81 %±0,03 % für S3.

Wie in die 5637-Zellen wird das FimH Teilpeptid auch in die Caco-2 Zellen am ehesten über unspezifische Macropinocytose aufgenommen. Anders als bei der Blasenkarzinom-Zelllinie werden beide Peptide allerdings eher über den spezifischen Caveolae-vermittelten Weg in die Zelle aufgenommen als über den Clathrin-vermittelten. Möglicherweise kann die Caveolae-vermittelte Endocytose durch Änderungen am Teilpeptid als Hauptaufnahmeweg in die Zelle forciert werden.

Auch mit Caco-2 Zellen könnten in zukünftigen Arbeiten Experimente durchgeführt werden, die erforschen, ob eine Kopplung mehrerer FimH Teilpeptide zu einer vermehrten Aufnahme über den Caveolae-vermittelten Endocytoseweg führt. Eine spezifische Aufnahme in die Zelle, die nicht zu einer Degradation im Lysosom führt, wäre eine günstige Eigenschaft für ein Drug-Delivery-Vehikel, das eine lokale Wirkung haben soll.

Es stellt sich außerdem die Frage, warum man die Aufnahme der Peptide in die Zelle in anderen Experimenten (siehe 3.1 und 3.3) gut zeigen, aber nur in geringem Ausmaß (bis zu 30 %) blockieren kann. Ein Ansatz zur weiteren Forschung mit dem Ziel einer Blockade größeren Ausmaßes wäre eine Adaption der Methode, z.B. durch Änderung der Länge der Inkubationszeiten. Möglicherweise werden die Peptide auch über einen anderen Aufnahmeweg wie z.B. einen rezeptorvermittelten Weg aufgenommen als über die Endocytosewege, die in dieser Serie an Experimenten blockiert wurden. Diese These lässt sich nur mit einem neuen Versuchsaufbau überprüfen.

### 3.3 Quantifizierung der aufgenommenen Peptidmenge

Die Experimente wurden, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben durchgeführt.

#### 3.3.1 Charakterisierung der Peptidlösungen

Die in Tabelle 13 und 14 dargestellten Werte wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben ermittelt.

	<b>A<sub>max</sub> 495nm</b>	<b>A<sub>max</sub> 280nm</b>	<b>Dilutionsfaktor</b>	<b>Konzentration Stammlösung [<math>\mu</math>M]</b>
<b>P3<sub>p3c+d</sub></b>	0,633	0,219	20,571	402,178
<b>S3<sub>llp2e+f</sub></b>	0,555	0,192	20,571	351,233

Tabelle 13 Absorption Peptidlösungen

	<b>Stammlösung</b>	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	<b>25 <math>\mu</math>M</b>
<b>P3<sub>p3c+d</sub></b>	45 812	35 769	25 058	12 377
<b>S3<sub>llp2e+f</sub></b>	49 468	36 194	25 169	12 520

Tabelle 14 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen

#### 3.3.2 5637-Zellen am Mikroplattenlesegerät

Es wurden 5637-Zellen der Passage 126 verwendet.

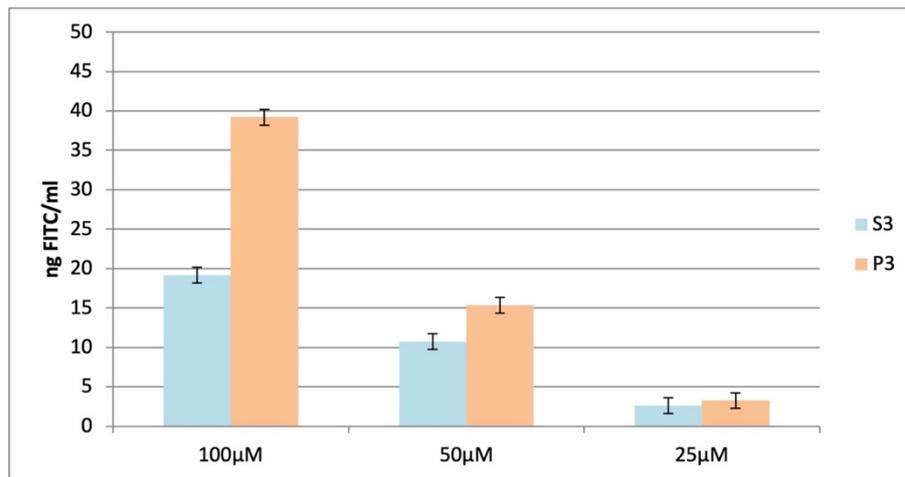


Abbildung 15 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte 5637-Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

P3 wurde über alle Konzentrationen hinweg bei 37 °C vermehrt in die 5637-Zellen aufgenommen (19,38 % (25 μM) bzw. 51,12 % (100 μM)) als die Kontrolle S3. Die erhaltenen Fluoreszenzen des Überstands der lysierten Zellen wurden in Abbildung 15 grafisch dargestellt.

Bei den 100 μM Peptidlösungen wurde nach dem Lysieren der behandelten Zellen für P3 eine Konzentration von 39,22 ng Peptid/ ml ± 1,97 ng und für S3 19,17 ng Peptid/ ml ± 1,86 ng erreicht und somit eine um 51,12 % höhere Konzentration für P3<sub>100 μM</sub> als für S3<sub>100 μM</sub>. Bei 50 μM waren es für P3 15,33 ng Peptid/ ml ± 1,85 ng und für S3 10,73 ng Peptid/ ml ± 2,07 ng und somit für P3<sub>50 μM</sub> ein um 30,00 % höherer Peptid-Gehalt als für S3<sub>50 μM</sub>. Bei 25 μM betrug die erzielten Peptid-Konzentrationen für P3 3,25 ng Peptid/ ml ± 1,98 ng und für S3 2,62 ng Peptid/ ml ± 2,12 ng, somit wurde um 19,38 % mehr P3<sub>25 μM</sub> in die Zelle aufgenommen als S3<sub>25 μM</sub>. Ein t-Test zeigte für 100 μM und für 50 μM einen p-Wert von <0,0001 und somit signifikante Ergebnisse. Für 25 μM wurde ein p-Wert von 0,012 erzielt. Diese Ergebnisse sind ebenfalls signifikant.

Diese Ergebnisse gleichen den in Kapitel 3.1 diskutierten, am Durchflusszytometer erhaltenen Ergebnissen der Bindungsaffinitätsversuche der 5637-Zellen und zeigen bei 100 μM eine noch höhere Aufnahme in die Zelle von P3 im Verhältnis zu S3 (52,12 % bei der Zelllyse im Vergleich zu 10,87% bei der Bindungsaffinität). Durch die Zelllyse sind diese Ergebnisse aussagekräftiger als die in Kapitel 3.1 besprochenen. Die mögliche Fehlerquelle der Abschwächung des Fluoreszenzsignals durch Kumulation des fluoreszenz-markierten Peptids in Zellorganellen kann durch Lysieren der Zellen verhindert werden. Die um über 50 % höhere Aufnahme des FimH Teilpeptids im Vergleich zur Kontrollsequenz in die 5637-Zellen bei 37 °C ist ein vielversprechendes Ergebnis im Hinblick auf eine zukünftige Verwendung des FimH Teilpeptids als Targeter für Blasenkarzinome, für deren Behandlung eine Aufnahme des mit Arzneistoff beladenen Targeters in die von Krebs befallenen Zellen einen Vorteil darstellen kann.

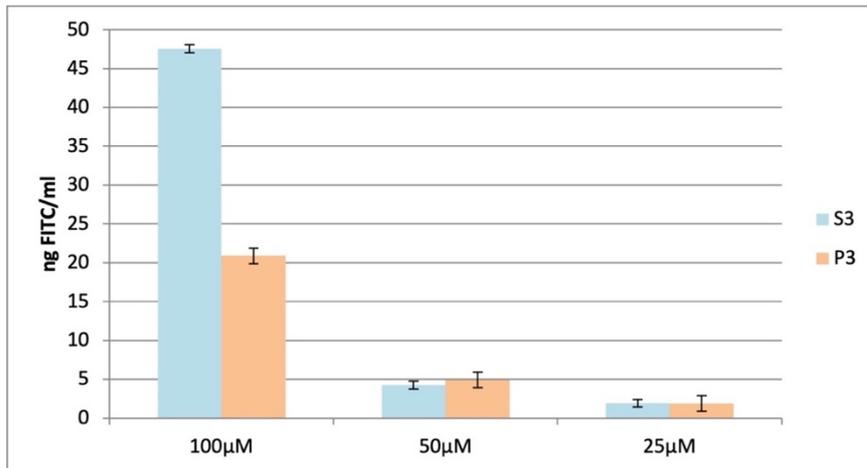


Abbildung 16 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 4 °C inkubierte und anschließend lysierte 5637-Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Bei den bei 4 °C inkubierten 5637-Zellen zeigte sich bei den 100 µM Peptidlösungen eine um 56,08 % höhere und somit deutlich bessere Bindung von S3 im Vergleich zu P3.

Bei 100 µM ergibt sich bei P3 nach dem Lysieren eine Konzentration von 20,89 ng Peptid/ ml ± 2,21 ng und bei S3 eine Konzentration von 47,56 ng Peptid/ ml ± 1,30 ng (Abb. 16). Somit zeigt sich eine um 56,08 % höhere Anheftung von S3<sub>100 µM</sub> im Vergleich zu P3<sub>100 µM</sub>. Bei 50 µM sind es für P3 4,91 ng Peptid/ ml ± 2,78 ng und für S3 4,26 ng Peptid/ ml ± 1,41 ng (Abb. 16) und somit eine um 13,24 % höhere Anheftung von P3<sub>50 µM</sub> im Vergleich zu S3<sub>50 µM</sub>. Bei 25 µM betragen die erhaltenen Peptid-Konzentrationen für P3 1,86 ng Peptid/ ml ± 2,01 ng und für S3 1,93 ng Peptid/ ml ± 1,12 ng (Abb. 16), also 3,63 % höher für S3<sub>25 µM</sub> als für P3<sub>25 µM</sub>. Ein t-Test zeigte für 100 µM einen p-Wert von <0,0001 und für 50 µM einen p-Wert von 0,0233 und somit signifikante Ergebnisse. Für 25 µM wurde ein p-Wert von 0,219 und somit nicht signifikante Ergebnisse erzielt.

Die wesentlich höhere Bindung an 5637-Zellen von S3 im Vergleich zu P3 ist vergleichbar mit der Bindungsaffinität am Monolayer, bei denen sich S3 um 26,44 % stärker an die Zelle angeheftet hat. Bei den Bindungsaffinitätsstudien erhielt man bei 4 °C am Durchflusszytometer allerdings eine höhere Affinität für P3. Dies könnte sich durch die Durchführung des Experiments im Sommer und die lange Messdauer des Durchflusszytometers erklären lassen. Mit großer Wahrscheinlichkeit konnte die Temperatur von 4 °C während der Messung nicht gehalten werden.

Es ist bemerkenswert, dass die Kontrollsequenz bei 4 °C eine höhere Bindungsaffinität an 5637-Zellen als das FimH Teilpeptid zeigt. Relevant für eine Nutzung als Targeter an Blasenkarzinomen ist wegen des ständigen Urinflusses durch die Blase jedoch die bei 37 °C stattfindende Aufnahme in die Zelle, die bei dem FimH Teilpeptid stärker ausgeprägt ist als bei S3.

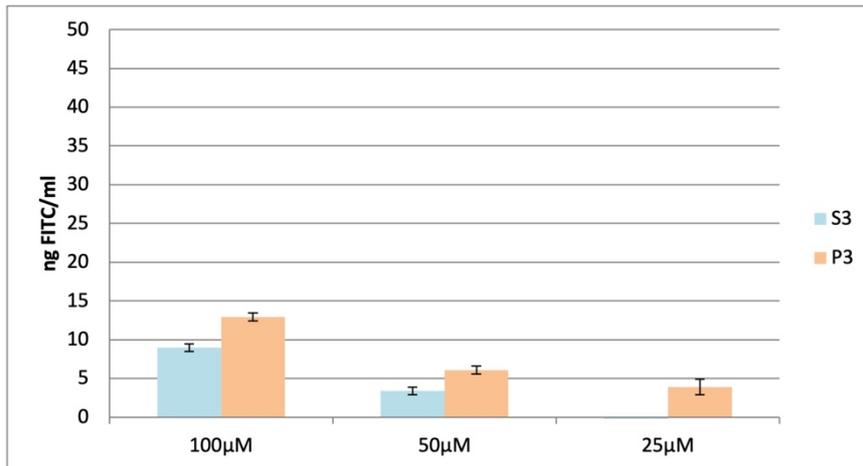


Abbildung 17 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, zuerst bei 4 °C und dann bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte 5637-Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Bei den zuerst bei 4 °C und dann bei 37 °C inkubierten 5637-Zellen wurde P3 verglichen mit S3 vermehrt in die Zellen aufgenommen (zwischen 44,57 % (50 μM) und 30,57 % (100 μM)). Die absolute Endkonzentration für beide Peptide im Zelllysate war niedriger als bei den nur bei 37 °C inkubierten Zellen, allerdings ist die Verteilung der Verhältnisse vergleichbar.

Bei einer Peptidkonzentration von 100 μM wurde nach dem Lysieren für P3 eine Konzentration von 12,92 ng Peptid ml±0,43 ng und für S3 8,97 ng Peptid/ ml±0,31 ng (Abb. 17) erreicht und somit eine höhere Aufnahme von P3<sub>100 μM</sub> um 30,57 % gegenüber S3<sub>100 μM</sub>. Bei 50 μM waren es für P3 6,08 ng Peptid/ ml±0,37 ng und für S3 3,37 ng Peptid/ ml±0,26 ng (Abb. 17), also um 44,57 % mehr P3<sub>50 μM</sub> als S3<sub>50 μM</sub>. Bei 25 μM betrug die erhaltene Peptid-Konzentration für P3 3,87 ng Peptid/ ml±0,41 ng (Abb. 17). Für S3 ergab sich nach dem Einsetzen in die Geradengleichung der Eichgerade ein negativer Wert. Da die gemessenen Fluoreszenzintensitäten hier zu niedrig und daher auch nicht aussagekräftig waren, wurde auf eine Darstellung in der Grafik verzichtet. Für 100 μM und 50 μM wurden p-Werte von <0,0001 erzielt und die Ergebnisse sind somit signifikant.

Bei der doppelten Inkubation bestätigte sich erneut, dass sich die Kontrollsequenz zwar mit einer höheren Affinität an die 5637-Zellen heftet, aber im Vergleich zum FimH Teilpeptid deutlich weniger in die Zelle aufgenommen wird. Wurden die Zellen zuerst für 2 Stunden bei 4 °C und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, wurde bei 100 μM Peptid (P3) ein Anteil von 32,94 %, bei 50 μM ein Anteil von 39,66 % und bei 25 μM sogar um 19,08% mehr Peptid aktiv in die Zelle aufgenommen als bei einer Inkubation von 2 Stunden bei 37 °C. Bei der doppelten Inkubation wurde mit 30 Minuten kürzer bei 37 °C inkubiert als bei den nur bei 37 °C inkubierten Zellen, möglicherweise könnte man diesen Anteil durch längere Inkubation noch erhöhen.

Dass auch bei einer kürzeren Inkubationszeit bei 37 °C bereits ein hoher Anteil an Peptid in die 5637-Zellen aufgenommen wird, ist eine günstige Eigenschaft als Targeter für Blasenkarzinome. Eine kürzere notwendige Einwirkzeit der Therapie, bei der die Miktion nicht so lange wie möglich hinausgezögert werden muss, wäre wesentlich angenehmer für Patientinnen und Patienten.

Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf ein hohes Potenzial des FimH Teilpeptids als möglicher Targeter an 5637-Zellen und somit Blasenkarzinomen.

### 3.3.3 Caco-2 Zellen am Mikroplattenlesegerät

Es wurden Caco-2 Zellen der Passage 36 verwendet.

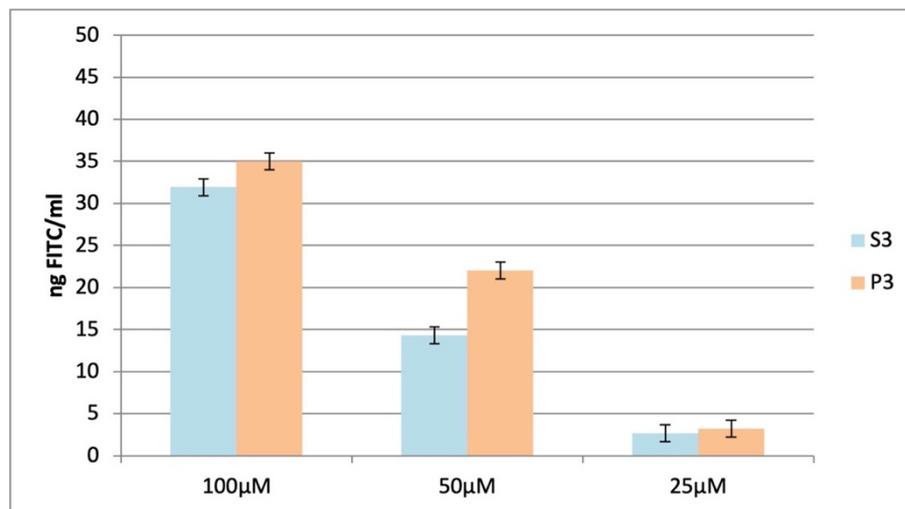


Abbildung 18 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte Caco-2 Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Wie bei den 5637-Zellen wurde bei einer Inkubation bei 37 °C auch bei den Caco-2 Zellen P3 vermehrt in die Zelle aufgenommen (zwischen 34,97 % (50 μM) und 8,72 % (100 μM)) verglichen mit der Kontrolle S3. Die erhaltenen Fluoreszenzen des Überstands der lysierten Zellen wurden in Abbildung 18 grafisch dargestellt.

Bei den 100 μM Peptidlösungen wurde nach dem Lysieren der behandelten Zellen für P3 eine Konzentration von 34,98 ng Peptid/ ml ± 1,86 ng und für S3 31,93 ng Peptid/ ml ± 2,04 ng erreicht und somit eine höhere Aufnahme von P3<sub>100 μM</sub> um 8,72 % im Vergleich zu S3<sub>100 μM</sub>. Bei 50 μM waren es für P3 22,02 ng Peptid/ ml ± 1,28 ng und für S3 14,32 ng Peptid/ ml ± 1,56 ng und somit um 34,97 % mehr Internalisation von P3<sub>50 μM</sub> als von S3<sub>50 μM</sub>. Bei 25 μM betragen die erzielten Peptid-Konzentrationen für P3 3,22 ng Peptid/ ml ± 0,89 ng und für S3 2,67 ng Peptid/ ml ± 0,76 ng und somit eine um 17,08 % höhere Peptid-Konzentration für P3<sub>25 μM</sub> als für S3<sub>25 μM</sub>. Für 100 μM und 50 μM wurden mit einem t-Test p-Werte von <0,0001 erzielt und die Ergebnisse sind

somit signifikant. Für 25  $\mu\text{M}$  zeigte sich ein p-Wert von 0,001 und somit ebenfalls signifikante Ergebnisse.

Dieses Ergebnis ist den bei den Bindungsaffinitätsversuchen bei 37 °C am Durchflusszytometer für die Caco-2 Zellen erhaltenen Ergebnissen sehr ähnlich und bestätigt die höhere Aufnahme des FimH Teilpeptids bei 37 °C in die Caco-2 Zellen durch den Lyseschnitt sogar mit erhöhter Aussagekraft. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf ein bestehendes Potenzial als Targeter an Caco-2 Zellen und somit Kolonkarzinomen dar.

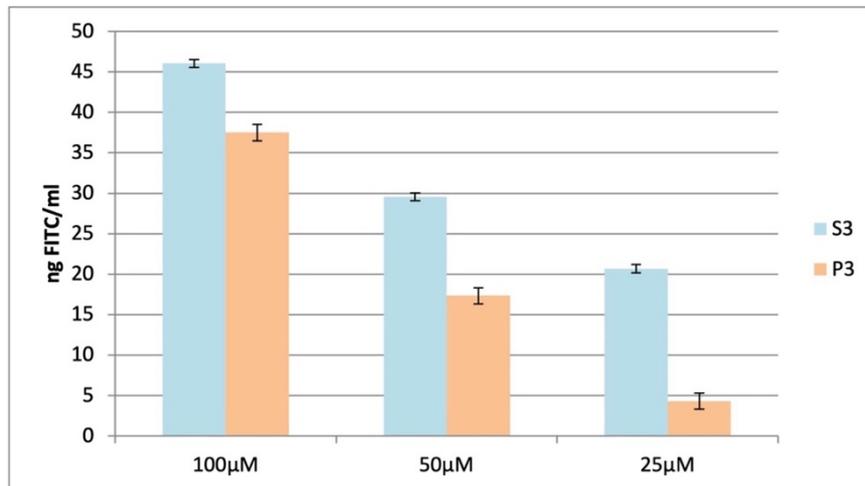


Abbildung 19 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 4 °C inkubierte und anschließend lysierte Caco-2 Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Bei den Caco-2 Zellen, die bei 4 °C inkubiert wurden, zeigte sich eine bessere Bindung an die Zellmembran von S3 im Vergleich zu P3, wie sie auch schon bei den 5637-Zellen beobachtet wurde. S3 hat in höherem Ausmaß an die Zelle gebunden als P3 (79,02 % (25  $\mu\text{M}$ ) bzw. 18,53 % (100  $\mu\text{M}$ )).

Bei den 100  $\mu\text{M}$  Peptidlösungen wurde nach dem Lysieren der behandelten Zellen für P3 eine Konzentration von 37,51 ng Peptid/ ml  $\pm$  1,94 ng und für S3 46,04 ng Peptid/ ml  $\pm$  1,25 ng (Abb.19) erreicht und somit eine höhere Anheftung von S3<sub>100  $\mu\text{M}$</sub>  um 18,53 % im Vergleich zu P3<sub>100  $\mu\text{M}$</sub> . Bei 50  $\mu\text{M}$  waren es für P3 17,34 ng Peptid/ ml  $\pm$  1,89 ng und für S3 29,56 ng Peptid/ ml  $\pm$  1,17 ng (Abb. 19), also um 41,34 % mehr S3<sub>50  $\mu\text{M}$</sub>  als P3<sub>50  $\mu\text{M}$</sub> . Bei 25  $\mu\text{M}$  betragen die erzielten Peptid-Konzentrationen für P3 4,34 ng Peptid/ ml  $\pm$  1,62 ng und für S3 20,69 ng Peptid/ ml  $\pm$  1,09 ng (Abb. 19), was eine um 79,02 % höhere Anheftung von S3<sub>25  $\mu\text{M}$</sub>  im Vergleich zu P3<sub>25  $\mu\text{M}$</sub>  darstellt. Für 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  wurden mit einem t-Test p-Werte von <0,0001 erzielt und die Ergebnisse sind somit signifikant.

Wie auch bei den Harnblasenkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die Kontrollsequenz durchaus an der Zellmembran haftet, aber deutlich mehr FimH Teilpeptid in die Zellen

aufgenommen werden kann, was folglich auch auf einen besseren möglichen Therapieerfolg hindeutet.

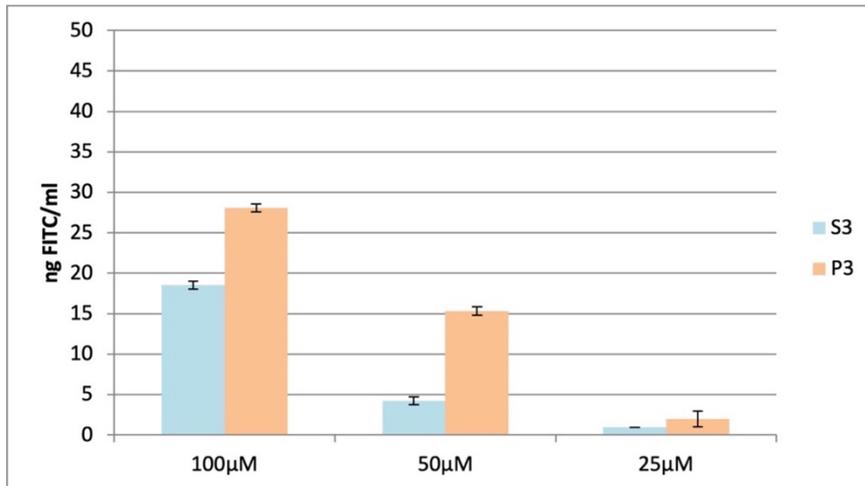


Abbildung 20 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, zuerst bei 4 °C und dann bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte Caco-2 Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2)

Bei den zuerst bei 4 °C und anschließend bei 37 °C inkubierten Caco-2 Zellen zeigte sich, wie auch bei den 5637-Zellen, eine um zwischen 72,45 % (50 µM) und 34,02 % (100 µM) erhöhte Aufnahme von P3 im Vergleich zu S3. Die erhaltenen Fluoreszenzen des Überstands der lysierten Zellen wurden in Abbildung 20 grafisch dargestellt.

Bei den 100 µM Peptidlösungen wurde nach dem Lysieren der behandelten Zellen für P3 eine Konzentration von 28,07 ng Peptid/ ml±0,62 ng und für S3 18,52 ng Peptid/ ml±0,58 ng erreicht, also eine um 34,02 % höhere Aufnahme von P3<sub>100 µM</sub> als von S3<sub>100 µM</sub>. Bei 50 µM waren es für P3 15,32 ng Peptid/ ml±0,54 ng und für S3 4,22 ng Peptid/ ml±0,69 ng, somit eine um 72,45 % höhere Internalisierung von P3<sub>50 µM</sub> als von S3<sub>50 µM</sub>. Bei 25 µM betragen die erzielten Peptid-Konzentrationen für P3 1,97 ng Peptid/ ml±0,86 ng und für S3 0,95 ng Peptid/ ml±0,14 ng, also um 51,78 % höher für P3<sub>25 µM</sub> als für S3<sub>25 µM</sub>. Für 100 µM und 50 µM wurden mit einem t-Test p-Werte von <0,0001 erzielt und die Ergebnisse sind somit signifikant. Für 25 µM zeigte sich ein p-Wert von 0,001 und somit ebenfalls signifikante Ergebnisse.

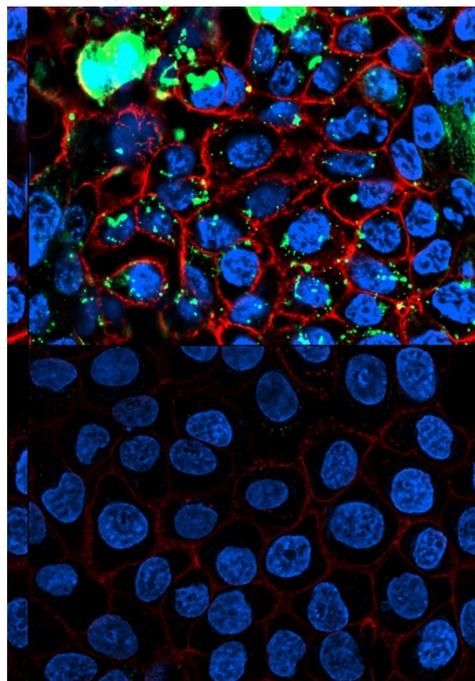
Im Vergleich zu der Inkubation bei 37°C wurde bei der doppelten Inkubation für 100 µM ein Anteil von 80,24 %, für 50 µM ein Anteil von 69,57 % und für 25 µM ein Anteil von 61,18 % an P3 in die Caco-2 Zellen aufgenommen. Dies sind höhere Anteile als bei den 5637-Zellen. Auch hier könnte man mit einer längeren Inkubationszeit womöglich eine noch höhere Konzentration an in die Zelle aufgenommenem Peptid erreichen. Dass in nur 30 Minuten ein hoher Anteil des FimH Peptids in die Zelle aufgenommen wird, ist eine sehr günstige Eigenschaft für einen Targeter zur Lokalthherapie an Kolonkarzinomen. Je schneller ein Targeter in einem Milieu mit hohem Abrieb internalisiert wird, desto besser und effizienter die Therapie.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das FimH Teilpeptid besser in die beiden Zelllinien aufgenommen wird als die Kontrollsequenz S3, welche sich vorwiegend an die Zellmembran anhaftet. Weil ein Arzneistoff erst seine Wirkung entfalten kann, wenn er internalisiert wurde, ist das FimH Teilpeptid besser für das Drug-Targeting an Blasenkarzinomzellen und Darmkarzinomzellen geeignet als die Kontrollsequenz.

### 3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um zu visualisieren, dass die Peptide auch in die Zelle aufgenommen werden, wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder von mit Peptid inkubierten 5637-Zellmonolayern aufgenommen. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben vorbereitet.

In den folgenden Bildern ist der Zellkern blau und die Zellmembran rot gefärbt. Die internalisierten Peptide fluoreszieren durch ihre Färbung mit FITC grün.



**Abbildung 21** fluorenzmikroskopische Aufnahme von 5637-Zellen nach Inkubation mit P3 (oben) und S3 (unten)

In dem oberen Bild sieht man 5637-Zellen, die mit dem FimH Teilpeptid P3 inkubiert wurden. In dem unteren Bild sind es 5637-Zellen, die mit der Kontrollsequenz S3 inkubiert wurden.

Auf dem Bild oben zeigt sich eine starke grüne Fluoreszenz innerhalb der rot gefärbten Zellmembran; dies impliziert, dass das FimH Teilpeptid gut in die Zelle aufgenommen wurde. Für S3 konnte fluoreszenzmikroskopisch mit den gleichen Parametern keine grüne Fluoreszenz gezeigt werden. Dies würde die in den Zellyseversuchen ermittelten Ergebnisse dahingehend untermauern, dass das FimH Teilpeptid P3 bei 37 °C besser in die 5637-Zellen aufgenommen

wird als die Kontrollsequenz S3, die sich eher nur an die Zelle anheftet. Dieser Unterschied wurde durch die parallele Durchführung der Experimente bei 4 °C und der physiologischen Temperatur von 37 °C mehrmals gezeigt.

Die vorteilhaften Internalisierungseigenschaften des FimH Teilpeptids bergen hohes Potential für seine Verwendung als Teil eines Drug-Targeting-Vehikels für die lokale Therapie an Blasen- und Kolonkarzinomen. Auswaschvorgänge durch den ständigen Durchfluss von Urin in der Blase oder der Abrieb von Wirkstoff durch Kot im Kolon könnten dadurch umgangen werden.

Die mit P3 inkubierten Zellen zeigen auf diesen Bildern erste Anzeichen von Apoptose, wie das Destabilisieren der Zellmembran. Daraus lässt sich schließen, dass das P3 möglicherweise zytotoxisch ist. Bei den mit S3 inkubierten Zellen lassen sich keine Anzeichen für eine Zytotoxizität beobachten. Diese Zellen sehen subjektiv anders aus, als die mit P3 inkubierten. Vor allem wenn eine Anwendung für P3 als Adhäsionsfaktor zum Drug Targeting angestrebt wird, sollte es davor noch Zellviabilitätstests unterzogen werden, um diesen Verdacht auszuschließen oder zu bestätigen.

#### 4. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das FimH Teilpeptid aus den Aminosäuren 132-142 Potenzial als Ligand für Drug Targeting zeigt, im Speziellen für die intravesikuläre Anwendung an Blasenkarzinomen und zur lokalen Anwendung an Darmkarzinomen.

Für das FimH Teilpeptid konnte eine konzentrationsabhängige Bindungsaffinität festgestellt werden, die bei 37 °C an 5637-Zellen um bis zu 52,18 % höher und an Caco-2 Zellen um bis zu 39,14 % höher ist als die der randomisierten Kontrollsequenz. Außerdem können bei einer Inkubation von 37 °C, die auf eine Inkubation mit 4 °C folgt, Spitzen einer konzentrationsabhängigen höheren Internalisierung von P3 im Vergleich zu S3 von für die 5637-Zellen bis zu 44,57 % und für die Caco-2 Zellen von bis zu 72,45 % erreicht werden. Bei einer Inkubation bei 4 °C bindet zwar ein geringerer Anteil von P3 im Vergleich zu S3, allerdings wird dieses im Gegensatz zu S3 fast vollständig aufgenommen. Dies ist eine für lokale Karzinombehandlung im Darm und in der Blase vorteilhaft, da in diesen Organen der ständige Durchfluss von Urin und der Durchlauf von Kot Drug-Delivery erschwert.

Sowohl die Bindungsaffinität an als auch die Internalisierung des FimH-Teilpeptids in die Karzinomzellen sind vielversprechende Eigenschaften, auf die man in der weiteren Forschung nach einem geeigneten Drug Targeting Vehikel aufbauen kann.

Im Zuge dieser Arbeit wurden auch die für die Peptide spezifischen Endocytosewege untersucht, über die das FimH Teilpeptid und die Kontrollsequenz in die verwendeten Zelllinien aufgenommen werden, wobei hier der macropinozytische Weg überwogen hatte. Durch die Blockierung dieses Weges konnte die Aufnahme des FimH Teilpeptids in die 5637-Zellen um 30,52% und in die Caco-2 Zellen um 30,45% verringert werden. Eine Aufnahme über die unspezifische Macropinocytose bedeutet, dass das FimH Teilpeptid in das Lysosom der Zellen aufgenommen wird. Möglicherweise wird die Teilsequenz dort abgebaut und eignet sich somit nicht als Ligand für Drug Targeting. In zukünftigen Studien könnte erforscht werden, ob man durch Verlängern des FimH-Teilpeptids mit weiteren FimH Sequenzen eine Aufnahme in die Zelle über spezifische Endocytosewege erreichen kann, die für ein Drug-Targeting besser geeignet wären. Die Methode durch Adaption der Inkubationszeiten oder Verwenden weiterer Inhibitoren, die andere Endocytosewege blockieren, zu ändern wäre ein weiterer möglicher Forschungsansatz.

In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob und in welchem Ausmaß das FimH Teilpeptid zytotoxisch wirkt. Dies muss in weiteren Experimenten festgestellt werden. Im Durchflusszytometer waren dafür aber keine besonderen Anhaltspunkte zu beobachten.

## Literaturverzeichnis

1. Schembri MA, Kjaergaard K, Sokurenko E V, Klemm P. Molecular Characterization of the *Escherichia coli* FimH Adhesin [Internet]. 2001. Verfügbar unter: [https://academic.oup.com/jid/article/183/Supplement\\_1/S28/2191052](https://academic.oup.com/jid/article/183/Supplement_1/S28/2191052)
2. Mulvey M. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* [Internet]. 2002 [zitiert 9. Februar 2024];4(5):257–71. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x?sid=nlm%3Apubmed#b107>
3. Mydock-McGrane LK, Hannan TJ, Janetka JW. Rational design strategies for FimH antagonists: new drugs on the horizon for urinary tract infection and Crohn's disease. Bd. 12, *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor and Francis Ltd; 2017. S. 711–31.
4. Kurimura Y, Nishitani C, Arika S, Saito A, Hasegawa Y, Takahashi M, u. a. Surfactant protein D inhibits adherence of uropathogenic *Escherichia coli* to the bladder epithelial cells and the bacterium-induced cytotoxicity: A possible function in urinary tract. *Journal of Biological Chemistry*. 16. November 2012;287(47):39578–88.
5. Zhou G, Sebbel P, Wen-Jun M, Guangwei M, Neubert T, Glockshuber R. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci*. 2001;114:4095–103.
6. Choudhury D, Thompson A, Stojanoff V, Langermann S, Pinkner J, Hultgren S, u. a. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1999. 1999;285(5430).
7. Hung CS, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, DeFusco A, u. a. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol*. 2002;44(4):903–15.
8. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses [Internet]. 2000. Verfügbar unter: [www.pnas.org](http://www.pnas.org)
9. Zarei O, Arabestani MR, Majlesi A, Mohammadi Y, Alikhani MY. Determination of virulence determinants of *Escherichia coli* strains isolated from patients with colorectal cancer compared to the healthy subjects. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019;12:52–9.
10. Bouckaert J, Berglund J, Schembri M, De Genst E, Cools L, Wuhler M, u. a. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol Microbiol*. Jänner 2005;55(2):441–55.
11. Wellens A, Garofalo C, Nguyen H, Van Gerven N, Slättegård R, Hernalsteens JP, u. a. Intervening with urinary tract infectious using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. *PLoS One*. 30. April 2008;3(4).
12. Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. Bd. 278, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. American Physiological Society; 2000.

13. Martin BF. Cell replacement and differentiation in transitional epithelium: a histological and autoradiographic study of the guinea-pig bladder and ureter. *Bd. 112, J. Anat.* 1972.
14. Dalghi M, Montalbetti N, Carattino M, Apodaca G. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. *Physiol Rev.* 2020;1621–705.
15. Mulvey M, Lopez-Boado Y, Wilson C, Roth R, Parks W, Heuser J, u. a. Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1–Piliated Uropathogenic Escherichia coli. *Science (1979).* 1998;282:1494–7.
16. Martinez J, Mulvey M, Schilling J, Pinkner J, Hultgren S. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journa.* 2000;19(12):2803–12.
17. Bouckaert J, Mackenzie J, De Paz JL, Chipwaza B, Choudhury D, Zavialov A, u. a. The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven and quasi-independent of Escherichia coli pathotypes. *Mol Microbiol.* September 2006;61(6):1556–68.
18. Kamat A, Hahn N, Efstathiou J, Malmström PU, Choi W. Bladder cancer. *The Lancet.* 2016;388(10061).
19. Kamat AM, Lamm DL. INTRAVESICAL THERAPY FOR BLADDER CANCER. 2000.
20. Chatomas R, Lorch A, Bruins H, Comperat E, Cowan N. The 2021 Updated European Association of Urology Guidelines on Metastatic Urothelial Carcinoma. *Eur Urol.* 2022;81(1):95–103.
21. Neutsch L, Wambacher M, Wirth EM, Spijker S, Kählig H, Wirth M, u. a. UPEC biomimicry at the urothelial barrier: Lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy. *Int J Pharm.* 2013;450(1–2):163–76.
22. Chevalier G, Laveissière A, Desachy G, Barnich N, Sivignon A, Maresca M, u. a. Blockage of bacterial FimH prevents mucosal inflammation associated with Crohn’s disease. *Microbiome.* 1. Dezember 2021;9(1).
23. Pierce Biotechnology. TECH TIP #6 Extinction Coefficients [Internet]. 2013. Verfügbar unter: [www.thermoscientific.com/pierce](http://www.thermoscientific.com/pierce).
24. Pierce Biotechnology. TECH TIP #31 Calculate dye:protein (F/P) molar ratios [Internet]. 2011. Verfügbar unter: [www.thermoscientific.com/pierce](http://www.thermoscientific.com/pierce)
25. Knapp BD, Huang KC. The Effects of Temperature on Cellular Physiology. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2022;51:499–526. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-112221->
26. Skoll K, Palmethofer J, Lummerstorfer M, Anzengruber M, Gabor F, Wirth M. Human serum albumin nanoparticles as a versatile vehicle for targeted delivery of antibiotics to combat bacterial infections. *Nanomedicine.* 1. Juni 2023;50.
27. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J Pharm Sci.* 2013;8(1):1–10.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 schematische Darstellung eines Typ-1 Fimbriums von E.coli (erstellt mit Biorender).....	1
Abbildung 2: Peptid 3 Aminosäuresequenz mit Amid am C-Terminus (erstellt mit Pepdraw) .....	12
Abbildung 3: Sequenz 3 Aminosäuresequenz mit Amid am C-Terminus (erstellt mit Pepdraw) .....	13
Abbildung 4 Kalibriergerade FITC in Lysis Puffer .....	19
Abbildung 5 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an 5637- Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	20
Abbildung 6 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an 5637- Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	21
Abbildung 7 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an 5637- Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=3) .....	22
Abbildung 8 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an 5637- Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	23
Abbildung 9 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an Caco-2 Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	25
Abbildung 10 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an Caco-2 Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	26
Abbildung 11 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 37 °C an Caco-2 Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	27
Abbildung 12 zellgebundene Fluoreszenz von P3 und S3 bei 4 °C an Caco-2 Zellen am Mikroplattenlesegerät bei 485 nm/525 nm Ex/Em und 50 % Verstärkung (Mittelwert und Standardabweichung, n=3) .....	28
Abbildung 13 Zellgebundene Fluoreszenz der Peptidlösungen (100 µM) an 5637- Zellen, vorbehandelt mit Endocytoseinhibitoren, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	29
Abbildung 14 Zellgebundene Fluoreszenz der Peptidlösungen (100 µM) an Caco-2 Zellen, vorbehandelt mit Endocytoseinhibitoren, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	31
Abbildung 15 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte 5637- Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	33

Abbildung 16 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 4 °C inkubierte und anschließend lysierte 5637- Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	34
Abbildung 17 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, zuerst bei 4 °C und dann bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte 5637- Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	35
Abbildung 18 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte Caco-2 Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	36
Abbildung 19 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, bei 4 °C inkubierte und anschließend lysierte Caco-2 Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	37
Abbildung 20 Gehalt an aufgenommenen Peptiden in ng/ ml, zuerst bei 4 °C und dann bei 37 °C inkubierte und anschließend lysierte Caco-2 Zellen, gemessen bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 80 % Verstärkung (Mittelwert mit Standardabweichung, n=2) .....	38
Abbildung 21 fluorenmikroskopische Aufnahme von 5637- Zellen nach Inkubation mit P3 (oben) und S3 (unten).....	39

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien .....	8
Tabelle 2: Geräte .....	10
Tabelle 3: Lösungen und Medien .....	12
Tabelle 4: Basisinformationen zu Peptid und Sequenz 3 .....	12
Tabelle 5 Absorption Peptidlösungen .....	20
Tabelle 6 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen.....	20
Tabelle 7 Absorption Peptidlösungen .....	24
Tabelle 8 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen.....	24
Tabelle 9 Absorption Petidlösungen .....	29
Tabelle 10 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen.....	29
Tabelle 11 Absorption Peptidlösungen .....	30
Tabelle 12 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen.....	30
Tabelle 13 Absorption Peptidlösungen .....	32
Tabelle 14 Fluoreszenzintensität Peptidlösungen.....	32

# Anhang 1: Aufreinigung der Peptide: HPLC-Spektren

## Prep

**Method Name:**  
**Run Name:** 2023-08-08\_11-09-40\_P3  
**Run Date:** 2023-08-08 11:15

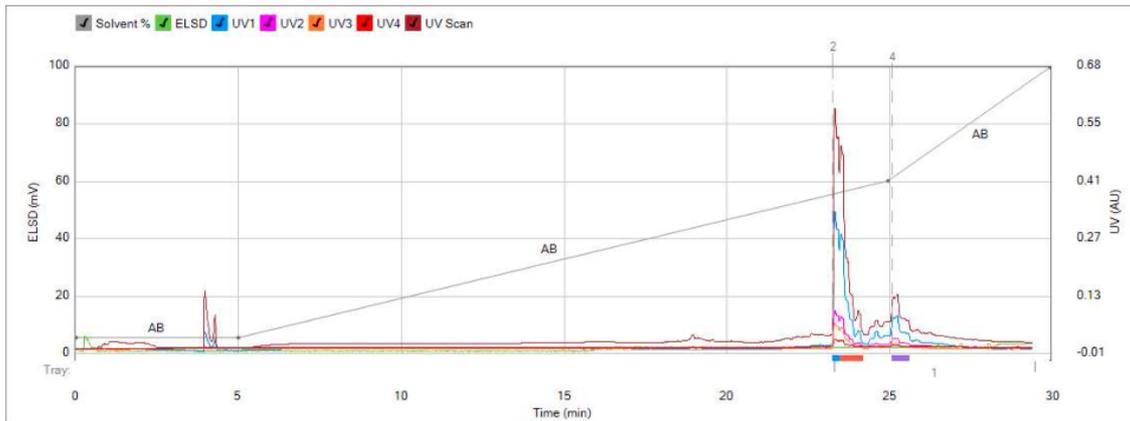


Column: PrepPure C18 250x10  
 Flow Rate: 5 mL/min  
 Equilibration: 2.0 min  
 Run Length: 30.0 min  
 Instrument Type: C-850  
 Mode: Prep  
 Sample type: Liquid

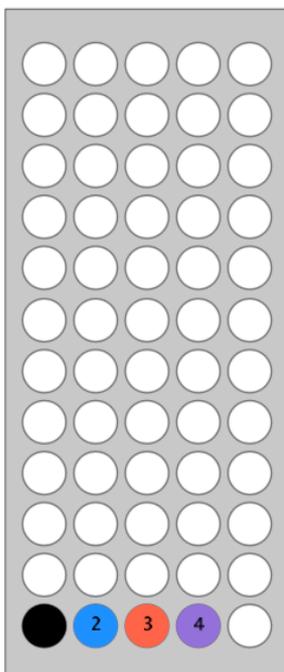
Solvent A: Water + 0.1% TFA  
 Solvent B: Acetonitrile + 0.1% TFA  
 Solvent C: Empty  
 Solvent D: Empty  
 Slope Detection: Off

UV Threshold: 0.05 AU  
 UV Sensitivity: High  
 UV1 λ: 214 nm  
 UV2 λ: 280 nm  
 UV3 λ: 440 nm  
 UV4 λ: 320 nm (M)  
 UV scan start λ: 200 nm (M)  
 UV scan end λ: 500 nm (M)

ELSD Threshold: 20 mV  
 ELSD Sensitivity: Low  
 Collection: Collect Peaks  
 Per-Vial Volume: 25 mL  
 Non-Peak Volume: 25 mL



1 - 6C1D



Gradient Table

	Min	Solvents	% 2nd
1	0.0	AB	5
2	5.0	AB	5
3	20.0	AB	60
4	5.0	AB	100

Vial Mapping Table

Peak #	Start Tray:Vial	End Tray:Vial
1	1:2	1:2
2	1:3	1:3
3	1:4	1:4

Anhangsabbildung 1: Peptid 3 nach der Flash HPLC

# Prep

**Method Name:**  
**Run Name:** 2023-08-08\_13-15-19\_S3\_II  
**Run Date:** 2023-08-08 13:21

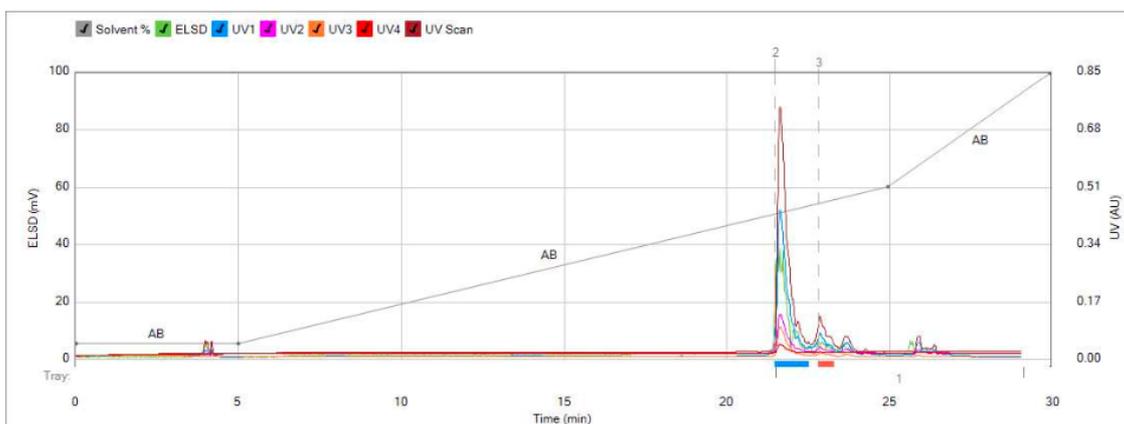


Column: PrepPure C18 250x10  
 Flow Rate: 5 mL/min  
 Equilibration: 2.0 min  
 Run Length: 30.0 min  
 Instrument Type: C-850  
 Mode: Prep  
 Sample type: Liquid

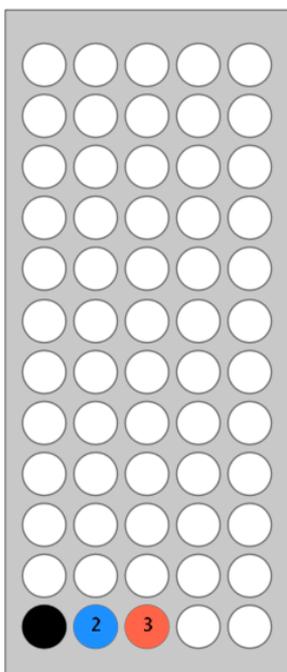
Solvent A: Water + 0.1% TFA  
 Solvent B: Acetonitrile + 0.1% TFA  
 Solvent C: Empty  
 Solvent D: Empty  
 Slope Detection: Off

UV Threshold: 0.05 AU  
 UV Sensitivity: High  
 UV1  $\lambda$ : 214 nm  
 UV2  $\lambda$ : 280 nm  
 UV3  $\lambda$ : 440 nm  
 UV4  $\lambda$ : 320 nm (M)  
 UV scan start  $\lambda$ : 200 nm (M)  
 UV scan end  $\lambda$ : 500 nm (M)

ELSD Threshold: 20 mV  
 ELSD Sensitivity: Low  
 Collection: Collect Peaks  
 Per-Vial Volume: 25 mL  
 Non-Peak Volume: 25 mL



1 - 6C1D



Gradient Table

	Min	Solvents	% 2nd
1	0.0	AB	5
2	5.0	AB	5
3	20.0	AB	60
4	5.0	AB	100

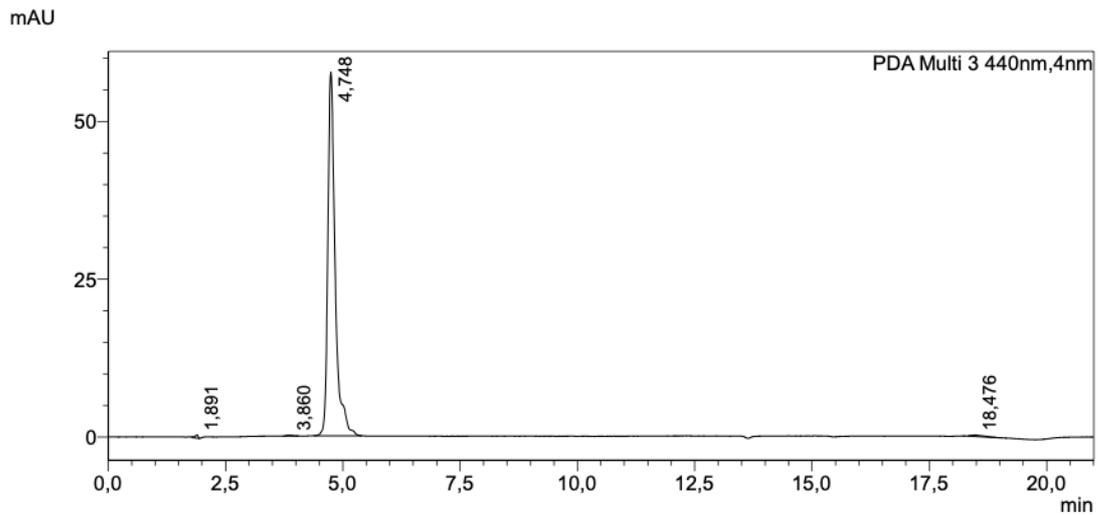
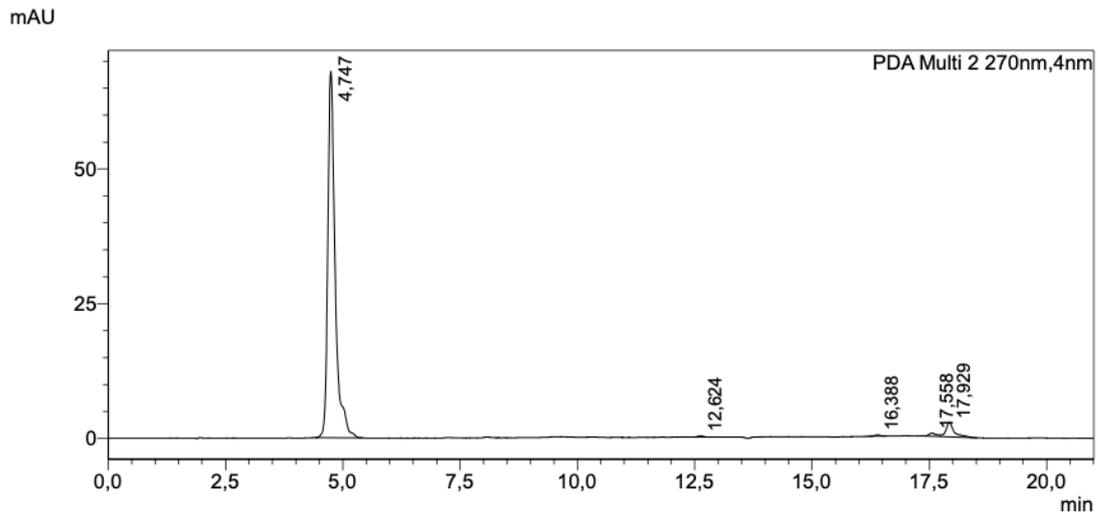
Vial Mapping Table

Peak #	Start Tray:Vial	End Tray:Vial
1	1:2	1:2
2	1:3	1:3

Anhangsabbildung 2: Sequenz 3 nach der Flash HPLC

Sample Name : S3\_p7  
Sample ID : 3  
Data Filename : 08.08.2023\_S3\_p7\_3\_014.lcd  
Method Filename : MN\_Säule\_peptide-analysis\_ACN\_H2O\_TFA.lcm  
Batch Filename : 230808\_s3\_p3.lcb  
Vial # : 1-7  
Injection Volume : 5 uL  
Date Acquired : 2023-08-08 19:51:46  
Date Processed : 2023-08-09 09:59:21  
Sample Type : Unknown  
Acquired by : Dip\_Diss  
Processed by : Dip\_Diss

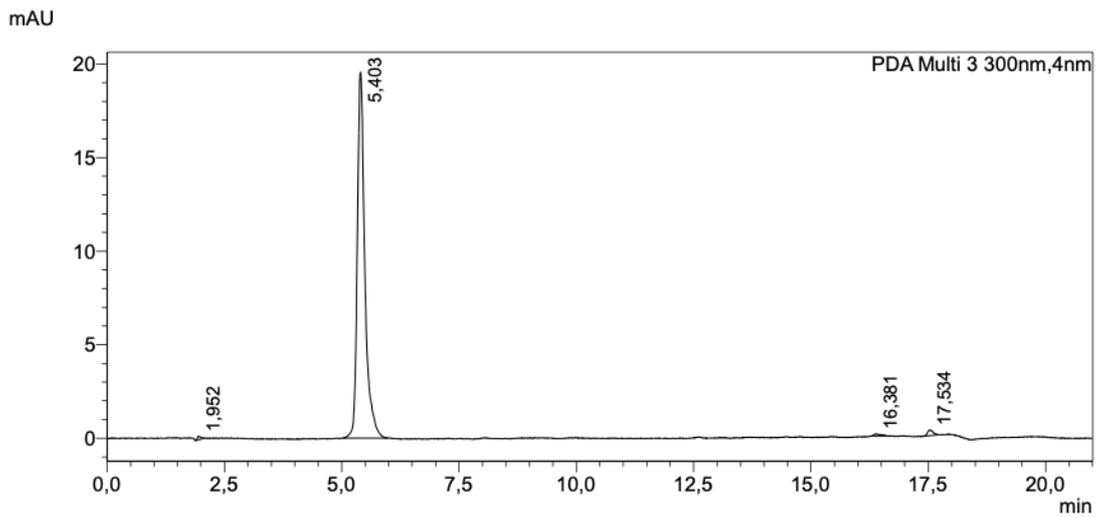
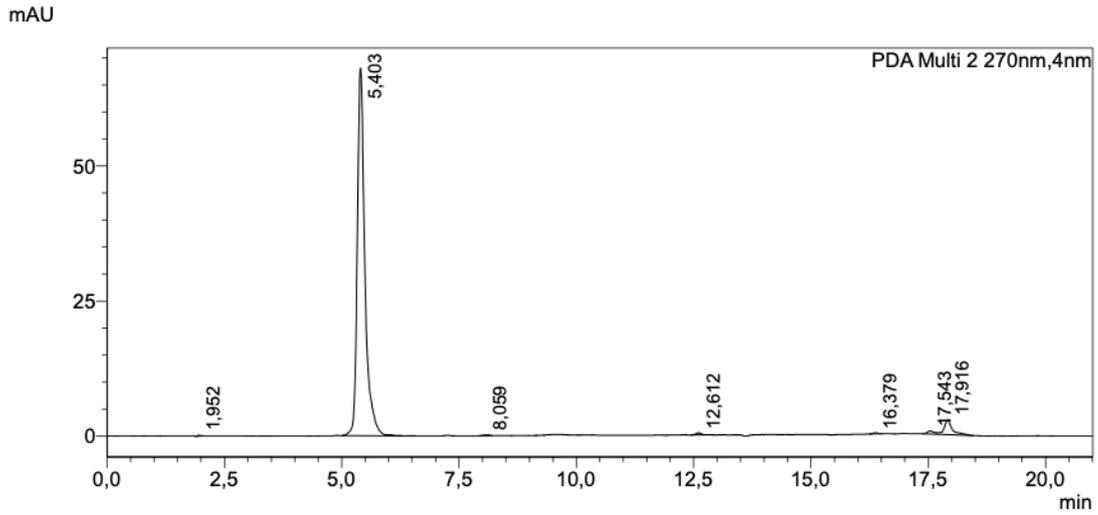
Anhangsabbildung 3: reinster Peak der Sequenz 3 an der Analytischen HPLC I



Anhangsabbildung 4 reinster Peak der Sequenz 3 an der Analytischen HPLC II

Sample Name : P3\_p3  
Sample ID : 3  
Data Filename : 08.08.2023\_P3\_p3\_3\_008.lcd  
Method Filename : MN Säule\_peptide-analysis\_ACN\_H2O\_TFA.lcm  
Batch Filename : 230808\_s3\_p3.lcb  
Vial # : 1-4  
Injection Volume : 5 uL  
Date Acquired : 2023-08-08 17:43:41  
Date Processed : 2023-08-08 18:04:42  
Sample Type : Unknown  
Acquired by : Dip\_Diss  
Processed by : Dip\_Diss

Anhangsabbildung 5 reinsten Peak des Peptid 3 an der Analytischen HPLC I



Anhangsabbildung 6 reinsten Peak des Peptid 3 an der Analytischen HPLC II

## Anhang 2: Internalisierung verschiedener BSA- und HSA-Partikel in differenzierte THP-1 Zellen

### 1. Methoden

#### 1.1 Zellkultur

Es wurde die humane Monozytenzelllinie THP-1 verwendet, bei der es sich um eine Suspensionszelllinie handelt. Die Zellen wurden alle drei Tage subkultiviert. Dafür wurden sie in der 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche im RPMI-Medium suspendiert und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Sie wurden mit 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, das verbrauchte Medium mit einer Vakuum Pasteurpipette abgenommen und die Zellen in 2 ml RPMI-Medium (Herstellung siehe Kapitel 2.3) suspendiert. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde in einer Bürker-Türk Zählkammer bestimmt und 500 000 Zellen in 10 ml RPMI-Medium in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche angesetzt.

Um die THP-1 Zellen für die Experimente zu adhären Makrophagen zu differenzieren, wurde eine Lösung von PMA in DMSO (0,01 mg/ml) verwendet. Es wurde ein Monolayer in einer 48-Well Platte mit 90 000 Zellen/Well/300 µl RPMI+20 % FCS angelegt. In jedes Well wurden dann unter Lichtschutz 1 µl einer Lösung von 0,01 mg/ml PMA in DMSO pipettiert und resuspendiert (Konzentration von 33 ng/ml bzw. 54,146 nM PMA). Nach drei Tagen wurde vorsichtig mit der Kolbenhubpipette das Medium gewechselt (RPMI+20 % FCS) um das PMA zu entfernen. Am Tag nach dem ersten Mediumwechsel konnte der Monolayer bereits für Experimente verwendet werden. Bei einer längeren Kultivierung wurde das Medium alle sechs Tage gewechselt.

#### 1.2. Durchführung

Mit der in der Arbeitsgruppe etablierten Methode wurden je eine Charge BSA-Partikel mit Bodipy in HEPES isoton pH 7,4 und HSA-Partikel mit Bodipy in HEPES isoton pH 7,4 hergestellt. Von jeder Partikelsuspension wurden zwei Verdünnungen mit HEPES isoton pH 7,4 hergestellt, eine mit einer Fluoreszenz von etwa 200 und die andere mit einer Fluoreszenz von etwa 600 (bei 485 nm/525 nm Ex/Em, 50 % Verstärkung).

Das Medium wurde zunächst vorsichtig mit der Kolbenhubpipette aus der Platte mit dem Monolayer abgenommen und je 2x200 µl jeder Partikelsuspension und je 2x200 µl HEPES isoton pH 7,4 für die Kontrollwerte auf die Wells aufgetragen. Dann wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte für eine Minute auf einen Eisblock gestellt, um die Aufnahme der Partikel in die Zellen zu stoppen, dann wurden bei Raumtemperatur die Partikellösungen vorsichtig mit der Kolbenhubpipette abgenommen. Auf einen zusätzlichen Waschschrift wurde wegen der Empfindlichkeit der Zellen verzichtet.

Die Hälfte der Proben wurde mit 100 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS bedeckt, die andere Hälfte mit 100 µl einer Heparin-Lösung mit 4000 IU/ml. Mit der Heparin-Lösung konnten Partikel abgewaschen werden, die nur auf der Zelloberfläche anhafteten und nicht aufgenommen wurden. Die Platte wurde für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.

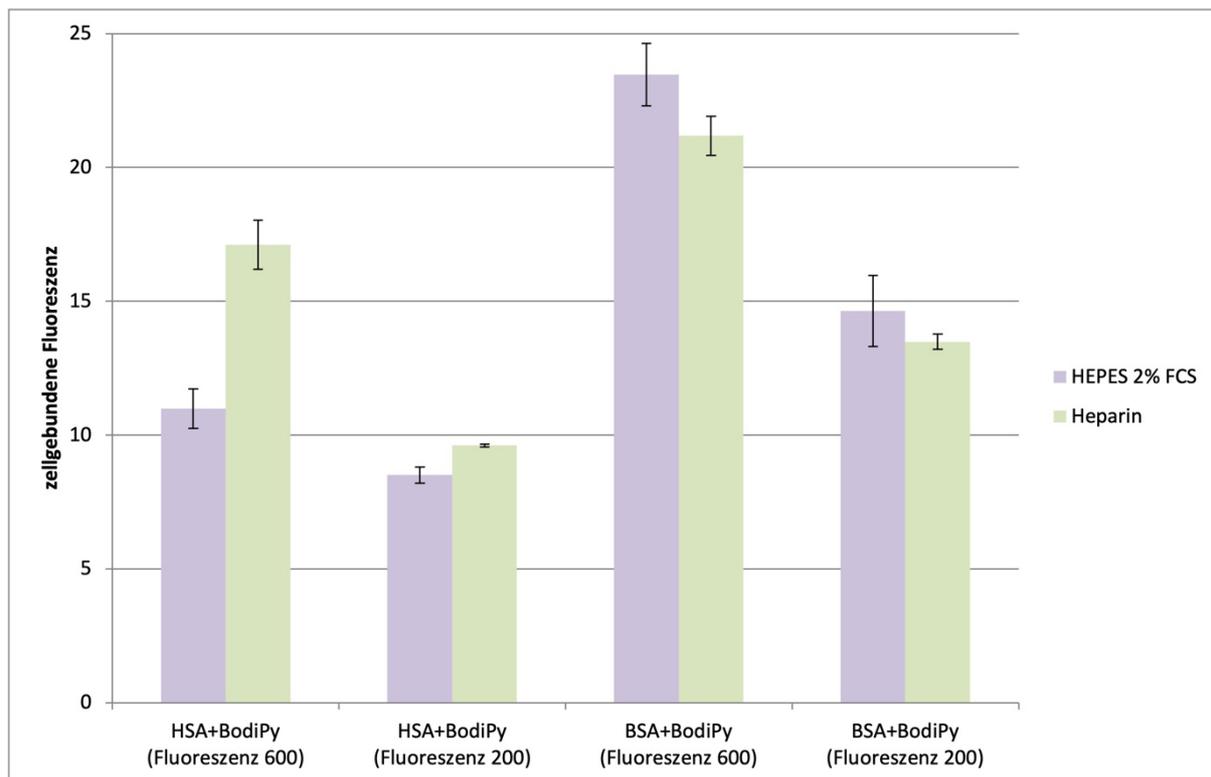
Dann wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, in jedes Well 100 µl auf 37 °C vorgewärmtes Trypsin pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurde ein unbehandeltes Well als frischer Kontrollwert mit abgelöst, um die Viabilität der Zellen im Durchflusszytometer mit den behandelten vergleichen zu können.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500 µl HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS in jedes Well pipettiert, vorsichtig suspendiert und der Inhalt jedes Wells in eine Eprovette überführt. An diesen Zellsuspensionen wurde dann die zellgebundene Fluoreszenz, Viabilität und Granularität am Durchflusszytometer gemessen.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

Durch den Vergleich der Bindungsaffinität von Mikropartikeln aus Humanem Serumalbumin mit BodiPy und Bovinem Serumalbumin mit BodiPy an differenzierten humanen Makrophagen sollte determiniert werden, welches Hüllmaterial sich am beständigsten gegen die Immunabwehr durch Makrophagen zeigt. Durch einen Waschschrift mit Heparin-Lösung wurden Partikel von der Zelloberfläche gewaschen, die nicht in die Zelle aufgenommen wurden. Dadurch sollte ermittelt werden, ob die Partikel sich nur an die Zellmembran anheften oder internalisiert werden.

Die Bindungsaffinität wurde durch die Messung der zellgebundenen Fluoreszenzen bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Anhangsabbildung 7 grafisch dargestellt.



Anhangsabbildung 7 zellgebundene Fluoreszenz von HSA und BSA-Partikeln an differenzierten THP-1 Zellen am Durchflusszytometer (Mittelwert mit Standardabweichung, n=3)

Die Partikel aus bovinem Serumalbumin wurden eher in die Makrophagen aufgenommen als jene aus humanem Serumalbumin.

Zunächst werden die zellgebundenen Fluoreszenzintensitätswerte der mit HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS gewaschenen Zellen diskutiert. Für HSA-Partikel mit BodiPy konnte eine relative Fluoreszenzintensität von  $10,99 \pm 0,74$  für Partikel mit Fluoreszenz 600 und von  $8,51 \pm 0,29$  für die Partikel mit Fluoreszenz 200 ermittelt werden. Bei den Partikeln aus BSA mit BodiPy waren es für die Fluoreszenz 600  $23,47 \pm 1,16$  und für die Fluoreszenz 200  $14,64 \pm 1,33$  relative Fluoreszenzintensität und somit eine bessere Bindung von  $\text{BSA+BodiPy}_{\text{Fluoreszenz600}}$  gegenüber  $\text{HSA+BodiPy}_{\text{Fluoreszenz600}}$  um 213,55 % und von  $\text{BSA+BodiPy}_{\text{Fluoreszenz200}}$  gegenüber  $\text{HSA+BodiPy}_{\text{Fluoreszenz200}}$  um 168,08 %.

Hinsichtlich der zellgebundenen Fluoreszenzintensität der mit Heparin gewaschenen Zellen konnte für HSA-Partikel mit BodiPy eine relative Fluoreszenzintensität von  $17,11 \pm 0,92$ , für die Partikel mit Fluoreszenz 600 und von  $9,61 \pm 0,05$  für die Partikel mit Fluoreszenz 200 ermittelt werden. Bei den Partikeln aus BSA mit BodiPy waren es für die Fluoreszenz von 600  $21,19 \pm 0,73$  und für die Partikel mit Fluoreszenz 200  $13,49 \pm 0,29$  relative Fluoreszenzintensität

und somit eine bessere Bindung von BSA+BodiPy<sub>Fluoreszenz600</sub> gegenüber HSA+BodiPy<sub>Fluoreszenz600</sub> um 123,85 % und von BSA+BodiPy<sub>Fluoreszenz200</sub> gegenüber HSA+BodiPy<sub>Fluoreszenz200</sub> um 140,37 %.

Vergleicht man die zellgebundenen Fluoreszenzen der mit HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS und mit Heparin gewaschenen Zellen, so erhält man für die HSA-Partikel mit BodiPy mit Fluoreszenz 600 eine höhere Bindungsaffinität von 64,23 % und für die Partikel mit Fluoreszenz 200 von 11,45 % für die mit Heparin gewaschenen Zellen. Bei den BSA-Partikeln mit BodiPy haben die mit HEPES isoton pH 7,4+2 % FCS gewaschenen Zellen die Partikel mit Fluoreszenz 600 um 9,71 % und die Partikel mit Fluoreszenz 200 um 7,86 % besser gebunden als die mit Heparin gewaschenen.

Von den Makrophagen internalisierte Partikel werden aus der Zirkulation entfernt, abgebaut und sind somit für einen zielgerichteten Arzneistofftransport ungeeignet. Diese Ergebnisse zeigen, dass man sich bei Mikropartikeln als Arzneiform eher für humanes Serumalbumin als bovines Serumalbumin als Hüllmaterial entscheiden soll. HSA entspricht körpereigenem Material und wird deshalb von Makrophagen in geringerem Ausmaß erkannt. Deshalb bleibt es eher in der Zirkulation, wo die Partikel bei einer Arzneistoffbeladung ihre Wirkung entfalten können.