



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 546 T2** 2007.12.27

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 553 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 546.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/02257**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 904 957.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/037096**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/28** (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/22 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

803364 **20.02.1997** **US**

24198 **17.02.1998** **US**

(73) Patentinhaber:

**University of Maryland, Baltimore, Baltimore, Md.,
US**

(74) Vertreter:

**Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

FASANO, Alessio, Ellicott City, MD 21042, US

(54) Bezeichnung: **Rezeptoren für Zonula Occludens-Toxin**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Entstehung der folgenden Erfindung wurde von der Universität von Maryland, Baltimore, Maryland, unterstützt.

[0002] Die hier beschriebene Erfindung wurde durch Gelder der National Institutes of Health (NIH AI35740; NIH DK 48373; und NIH AI19716) unterstützt. Die Regierung hält bestimmte Rechte.

GEBIET DER ERFINDUNG

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft Rezeptoren für das Zonula-Occludens-Toxin von *Vibrio cholera* sowie Verfahren, welche dessen Verwendung beinhalten.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG**I. Funktion und Regulation intestinaler „tight junctions“**

[0004] Die "tight junctions" (nachfolgend "tj") oder Zonula occludens (nachfolgend „ZO“) sind eines der Kennzeichen absorptiver und sekretorischer Epithelien (Madara, J. Clin. Invest., 83:1089-1094 (1989); und Madara, Textbook of Secretory Diarrhea, Hrsg. Lebenthal et al., Kapitel 11, Seiten 125-138 (1990)). Als Barriere zwischen apikalen und basolateralen Kompartimenten regulieren sie selektiv die passive Diffusion von Ionen und wasserlöslichen gelösten Stoffen über den parazellulären Weg (Gumbiner, Am. J. Physiol., 253 (Cell Physiol. 22): C749-C758 (1987)). Diese Barriere hält jeden Gradienten aufrecht, der durch die Aktivität von Wegen erzeugt wurde, die in Zusammenhang mit der transzellulären Route stehen (Diamond, Physiologist, 20:10-18 (1977)).

[0005] Variationen bei der transepithelialen Leitfähigkeit können normalerweise zurückgeführt werden auf Veränderungen der Permeabilität des parazellulären Wegs, da die Widerstände der Plasmamembranen von Enterozyten relativ hoch sind (Madara, supra). Die ZO stellt die Hauptbarriere bei diesem parazellulären Weg dar, und der elektrische Widerstand von Epithelgeweben scheint von der Anzahl von Transmembranproteinsträngen und deren Komplexität in der ZO abzuhängen, wie durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie beobachtet wurde (Madara et al, J. Cell Biol., 101:2124-2133 (1985)).

[0006] Es gibt vielfältige Beweise dafür, dass die ZO, die einst als statische Struktur angesehen wurde, in Wirklichkeit dynamisch ist und sich leicht an eine Vielzahl entwicklungsbedingter Gegebenheiten (Magnuson et al, Dev. Biol., 67:214-224 (1978); Revel et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 40:443-455 (1976); und Schneeberger et al., J. Cell Sci., 32:307-324 (1978)), physiologischer Gegebenheiten (Gilula et al., Dev. Biol., 50:142-168 (1976); Madara et al., J. Membr. Biol., 100:149-164 (1987); Mazariegos et al., J. Cell Biol., 98:1865-1877 (1984); und Sardet et al., J. Cell Biol., 80:96-117 (1979)), und pathologischer Gegebenheiten (Milks et al., J. Cell Biol., 103:2729-2738 (1986); Nash et al., Lab. Invest., 59:531-537 (1988); und Shasby et al., Am. J. Physiol., 255 (Cell Physiol., 24):C781-C788 (1988)) anpasst. Die regulatorischen Mechanismen, die dieser Anpassung zugrunde liegen, werden noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch klar, dass in Gegenwart von Ca^{2+} der Zusammenbau der ZO das Ergebnis zellulärer Wechselwirkungen ist, die eine komplexe Kaskade biochemischer Ereignisse auslösen, welche schließlich zur Bildung und Modulierung eines organisierten Netzwerkes von ZO-Elementen führen, dessen Zusammensetzung bisher nur teilweise charakterisiert wurde (Diamond, Physiologist, 20:10-18 (1977)). Ein Kandidat für die Transmembran-Proteinstränge, Occludin, wurde vor kurzem identifiziert (Furuse et al., J. Membr. Biol., 87:141-150 (1985)).

[0007] In einem zytoplasmatischen, unter der Membran liegenden Plaque, der unter den Membrankontakten liegt, wurden sechs Proteine identifiziert, deren Funktion aber noch ermittelt werden muss (Diamond, supra). ZO-1 und ZO-2 liegen als Heterodimer (Gumbiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:3460-3464 (1991)) in einem Detergenz-stabilen Komplex mit einem nicht charakterisierten 130 kD-Protein (ZO-3) vor. Die meisten Immunelektronenmikroskopie-Studien lokalisierten ZO-1 genau unterhalb der Membrankontakte (Stevenson et al., Molec. Cell Biochem., 83: 129-145 (1988)). Zwei weitere Proteine, Cingulin (Citi et al., Nature (London), 333: 272-275 (1988)) und das 7H6-Antigen (Zhong et al., J. Cell Biol., 120: 477-483 (1993)) sind weiter entfernt von der Membran lokalisiert und wurden bisher noch nicht kloniert. Rab 13, ein kleines GTP-bindendes Protein wurde kürzlich ebenfalls an der Junction-Region lokalisiert (Zahraoui et al., J. Cell Biol., 124:101-115 (1994)). Es ist bekannt, dass weitere kleine GTP-bindende Proteine das corticale Zytoskelett regulieren, d. h. rho reguliert die Actin-Membran-Anheftung in fokalen Kontakten (Ridley et al., Cell, 70:389-399 (1992)), und rac reguliert die Wachstumsfaktor-induzierte Membranauffaltung (Ridley et al., Cell, 70:401-410 (1992)). Auf der

Grundlage der Analogie mit den bekannten Funktionen von Plaque-Proteinen in den besser charakterisierten Zell-Junctions, fokalen Kontakten (Guan et al., *Nature*, 358:690-692 (1992) und Adhärenz-Junctions (Tsukita et al., *J. Cell Biol.*, 123:1049-1053 (1992)) wurde die Hypothese aufgestellt, dass tj-assoziierte Plaque-Proteine an der Signaltransduktion in beiden Richtungen über die Zellmembran und an der Regulierung von Verbindungen mit dem kortikalen Actin-Zytoskelett beteiligt sind.

[0008] Um den vielen unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Anforderungen gerecht zu werden, denen Epithelien ausgesetzt sind, muss die ZO zu schnellen und koordinierten Antworten befähigt sein, die das Vorhandensein eines komplexen regulatorischen Systems erfordern. Die genaue Charakterisierung der Mechanismen, die am Zusammenbau und der Regulation der ZO beteiligt sind, ist gegenwärtig ein Gebiet aktiver Forschung.

[0009] Es gibt nun eine Vielzahl von Beweisen, dass strukturelle und funktionale tj-Verknüpfungen zwischen dem Actin-Zytoskelett und dem tj-Komplex absorptiver Zellen existieren (Gumbiner et al., supra; Madara et al., supra und Drenchahn et al., *J. Cell Biol.*, 107:1037-1048 (1988)). Das Actin-Zytoskelett besteht aus einem komplizierten Netzwerk von Mikrofilamenten, deren genaue Geometrie von einem großen Kader Actin-bindender Proteine reguliert wird. Ein Beispiel dafür, wie der Phosphorylierungszustand eines Actin-bindenden Proteins die Zytoskelett-Verknüpfung mit der Zell-Plasmamembran regulieren könnte, ist das myristoylierte Alanin-reiche C-Kinase-Substrat (nachfolgend „MARCKS“). MARCKS ist ein spezifisches Substrat für Proteinkinase C (nachfolgend „PKC“), das mit der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran assoziiert ist (Aderem, Elsevier Sci. Pub. (UK), Seiten 438-443 (1992)). In seiner nicht-phosphorylierten Form ist MARCKS mit dem Actin der Membran vernetzt. Es ist somit wahrscheinlich, dass das Actin-Netzwerk, das mit der Membran über MARCKS assoziiert ist, relativ rigide ist (Hartwig et al., *Nature*, 356:618-622 (1992)). Aktivierte PKC phosphoryliert MARCKS, das von der Membran freigesetzt wird (Rosen et al., *J. Exp. Med.*, 172:1211-1215 (1990); und Thelen et al., *Nature*, 351:320-322 (1991)). Das mit MARCKS verknüpfte Actin ist wahrscheinlich von der Membran räumlich getrennt und plastischer. Wenn MARCKS dephosphoryliert wird, kehrt es zur Membran zurück, wo es erneut mit Actin vernetzt wird (Hartwig et al., supra; und Thelen et al., supra). Diese Daten legen nahe, dass das F-Actin-Netzwerk über einen PKC-abhängigen Phosphorylierungsprozess umgeordnet werden kann, der Actin-bindende Proteine umfasst (wobei MARCKS eines davon ist).

[0010] Für eine Vielzahl intrazellulärer Mediatoren wurde gezeigt, dass sie die tj-Funktion und/oder -Struktur verändern. „Tight junctions“ der Gallenblase von Amphibien (Duffey et al, *Nature*, 204:451-452 (1981)) und das Intestinum von sowohl Goldfish (Bakker et al, *Am. J. Physiol.*, 246:G213-G217 (1984)) als auch der Flunder (Krasney et al, *Fed. Proc.*, 42:1100 (1983)) zeigen bei erhöhtem intrazellulärem cAMP einen erhöhten Widerstand gegenüber passivem Ioneneinstrom. Weiterhin scheint der Kontakt einer Gallenblase von Amphibien mit einem Ca^{2+} -Ionophor den tj-Widerstand zu erhöhen wird und Veränderungen in der tj-Struktur zu induzieren (Palant et al, *Am. J. Physiol.*, 245:C203-C212 (1983)). Weiterhin induziert die Aktivierung von PKC durch Phorbol ester die parazelluläre Permeabilität sowohl in der Niere (Ellis et al, *C. Am. J. Physiol.*, 263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32):F293-F300 (1992)) als auch in intestinalen Epithelzelllinien (Stenson et al, *C. Am. J. Physiol.*, 265 (Gastrointest. Liver Physiol., 28):G955-G962 (1993)).

II. Zonula-Occludens-Toxin („Zot“) und Zonulin

[0011] Die meisten *Vibrio cholerae*-Vakzinkandidaten, die durch Deletion des *ctxA*-Gens konstruiert wurden, welches das Cholera-Toxin (CT) kodiert, sind in der Lage, starke Antikörperantworten auszulösen, aber mehr als die Hälfte der geimpften Personen entwickelt noch schwachen Durchfall (Levine et al., *Infect. Immun.*, 56(1):161-167 (1988)). Angesichts der Stärke des bei Fehlen von CT ausgelösten Durchfalls wurde die Hypothese aufgestellt, dass *V. cholerae* weitere enterotoxigene Faktoren produziert, die in den Stämmen noch vorhanden sind, bei denen die *ctxA*-Sequenz deletiert ist (Levine et al., supra). Als Ergebnis davon wurde ein zweites Toxin, Zonula-Occludens-Toxin (nachfolgend hier als „ZOT“ bezeichnet) entdeckt, das von *V. cholerae* produziert wird und zu dem verbleibenden Durchfall beiträgt (Fasano et al., *Proc. Nat., Acad. Sci., USA*, 88:5242-5246 (1991)). Das *zot*-Gen ist unmittelbar benachbart zu den *ctx*-Genen lokalisiert. Die hohe prozentuale Übereinstimmung des *zot*-Gens mit den *ctx*-Genen innerhalb von *V. cholerae*-Stämmen (Johnson et al., *J. Clin. Microb.*, 31/3: 732-733 (1993); und Karasawa et al., *FEBS Microbiology Letters*, 106:143-146 (1993)) legt eine mögliche synergistische Rolle von ZOT bei der Verursachung des akuten, dehydratisierenden Durchfalls nahe, der für Cholera typisch ist. Vor kurzem wurde das *zot*-Gen auch in weiteren Pathogenen des Darms identifiziert (Tschape, 2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salmonellosis, 47 (Zusammenfassung) (1994)).

[0012] Kürzlich wurde beschrieben, dass ZOT die intestinale Permeabilität durch Modulierung der Struktur

von interzellulären t_j erhöht, wenn es auf der Mukosa des Ileums eines Kaninchens getestet wird (Fasano et al., supra). Es wurde festgestellt, dass als Folge der Modifizierung des parazellulären Wegs die intestinale Mukosa durchlässiger wird. Weiterhin wurde festgestellt, dass ZOT den Na^+ -Glukose-gekoppelten aktiven Transport nicht beeinflusst, nicht zytotoxisch ist und den transepithelialen Widerstand nicht vollständig aufhebt (Fasano et al., supra).

[0013] In neuerer Zeit wurde festgestellt, dass ZOT in der Lage ist, t_j in der intestinalen Mukosa reversibel zu öffnen, und somit bei Verabreichung zusammen mit einem therapeutischen Agens den intestinalen Transport des therapeutischen Agens bewirken kann, wenn es in einer oralen Dosierungszusammensetzung für intestinalen Wirkstofftransport verwendet wird (WO 96/37196; US-Patentanmeldung Nr. 08/443,864, eingereicht am 24. Mai 1995 (inzwischen erteilt); und US-Patentanmeldung Nr. 08/598,852, eingereicht am 9. Februar 1996 (inzwischen US-Patent 5,665,389). Es wurde ebenfalls festgestellt, dass ZOT befähigt ist, t_j in der nasalen Mukosa reversibel zu öffnen, und somit ZOT in der Lage ist, bei Verabreichung zusammen mit einem therapeutischen Agens die nasale Absorption eines therapeutischen Agens zu erhöhen (US-Patentanmeldung Nr. 08/781,057, eingereicht am 9. Januar 1997).

[0014] In der vorliegenden Erfindung wurden die ZOT-Rezeptoren aus Herz-, Intestinum- und Hirngewebe sowie aus CaCo2-Zellen identifiziert und isoliert. Der ZOT-Rezeptor stellt den ersten Schritt eines Wegs dar, der an der Regulation der epithelialen Permeabilität beteiligt ist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Identifizierung des ZOT-Rezeptors aus Herz-, Intestinum- und Hirngewebe sowie aus CaCo2-Zellen.

[0016] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung der ZOT-Rezeptoren in einem Verfahren zum Screening von ZOT-Analoga (Antagonisten oder Agonisten).

[0017] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung von ZOT-Analoga, die über das Verfahren erhältlich sind.

[0018] Diese und weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung, die aus der nachfolgenden detaillierten Beschreibung der Erfindung ersichtlich werden, wurden in einer Ausführungsform gelöst durch einen Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera*, wobei der Rezeptor ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und eine N-terminale Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 aufweist, oder wobei der Rezeptor ein Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und eine N-terminale Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10 aufweist.

[0019] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wurden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten von ZOT aus *Vibrio cholera*, umfassend die folgenden Schritte:

- (A) Durchführung eines Affinitätsbindungsassays für eine Testsubstanz, wobei als Einfangligand ein im wesentlichen reiner Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3, oder ein im wesentlichen reiner Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10 verwendet wird; und
- (B) Durchführung eines Assays für diese Testverbindung, um zu bestimmen, ob die Testverbindung die biologische Aktivität von ZOT besitzt,

wobei die Testsubstanz, wenn sie spezifisch an den Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* bindet, aber keine biologische ZOT-Aktivität besitzt, ein Antagonist von ZOT aus *Vibrio cholera* ist.

[0020] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wurden die Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zum Screening auf einen Agonisten von ZOT aus *Vibrio cholera*, umfassend die folgenden Schritte:

- (A) Durchführung eines Affinitätsbindungsassays für eine Testsubstanz, wobei als Einfangligand ein im wesentlichen reiner Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 45

kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und einer N-terminalen Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3, oder ein im wesentlichen reiner Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und einer N-terminalen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10 verwendet wird; und
(B) Durchführung eines Assays für diese Testverbindung, um zu bestimmen, ob die Testverbindung die biologische Aktivität von ZOT besitzt,

wobei die Testverbindung ein Agonist von ZOT aus *Vibrio cholera* ist, wenn die Testverbindung spezifisch an den Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* bindet und die biologische Aktivität von ZOT besitzt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0021] [Fig. 1](#) zeigt die Wirkung des PKC-Inhibitors CGP41251 und dessen inaktiven Analogons CGP42700 auf Änderungen des durch pZ14-Überstand induzierten Gewebewiderstands (Rt) bei Kaninchen-Ileum.

[0022] Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen die Wirkung von ZOT auf die PKC-Aktivität über die Zeit bei zytosolischen Unterfraktionen ([Fig. 2A](#)) und Membran-Unterfraktionen ([Fig. 2B](#)).

[0023] [Fig. 3](#) zeigt eine Dosis-Antwort-Kurve für gereinigtes ZOT auf den Rt bei Kaninchen-Ileum.

[0024] [Fig. 4](#) zeigt die Wirkung von gereinigtem MBP-ZOT (Δ) im Vergleich mit gereinigtem ZOT (\square), und der MBP-Kontrolle (\blacksquare) auf den Rt bei Kaninchen-Ileum.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Wie oben besprochen betrifft die vorliegende Erfindung gemäß einer Ausführungsform einen Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera*, wobei der Rezeptor ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und eine N-terminale Aminosäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3, aufweist, oder ein Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und eine N-terminale Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10.

[0026] Der ZOT-Rezeptor kann zur Herstellung von Antikörpern, entweder polyklonal oder monoklonal, verwendet werden, wobei dem Fachmann allgemein bekannte Techniken verwendet werden (Abrams, *Methods Enzymol.*, 121:107-119 (1986)).

[0027] Alternativ kann der ZOT-Rezeptor zur Reinigung, über Affinitätschromatographie, von ZOT und von dessen Fusionsproteinen verwendet werden.

[0028] Darüber hinaus kann der ZOT-Rezeptor zum Screening auf Analoga von ZOT verwendet werden, die entweder Antagonisten oder Agonisten sind.

[0029] Dementsprechend wurden gemäß einer weiteren Ausführungsform die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten von ZOT von *Vibrio cholera*, umfassend die folgenden Schritte:

- (A) Durchführung eines Affinitätsbindungsassays für eine Testsubstanz, wobei als Einfangligand im wesentlichen reiner Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* verwendet wird; und
- (B) Durchführung eines Assays für diese Testverbindung, um zu bestimmen, ob die Testverbindung die biologische Aktivität von ZOT besitzt,

wobei die Testsubstanz ein Antagonist für ZOT aus *Vibrio cholera* ist, wenn die Testsubstanz spezifisch an den Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* bindet, jedoch nicht die biologische Aktivität von ZOT besitzt.

[0030] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wurden die oben beschriebenen Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch ein Verfahren zum Screening auf einen Agonisten von ZOT aus *Vibrio cholera*, umfassend die Schritte:

- (A) Durchführung eines Affinitätsbindungsassays für eine Testsubstanz, wobei als Einfang-Ligand im wesentlichen reiner Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* verwendet wird, und
- (B) Durchführung eines Assays für diese Testverbindung, um zu bestimmen, ob die Testverbindung die biologische Aktivität von ZOT besitzt,

wobei die Testverbindung ein Agonist für ZOT aus *Vibrio cholera* ist, wenn sie spezifisch an den Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* bindet und die biologische Aktivität von ZOT besitzt.

[0031] Die „biologische Aktivität von ZOT“ bedeutet hier die Fähigkeit, durch Modulieren der Struktur intrazellulärer t_j die Epithelpermeabilität reversibel zu erhöhen.

[0032] Für die vorliegende Erfindung ist der Assay zur Bestimmung der biologischen Aktivität von ZOT nicht entscheidend. Beispielsweise kann der Assay beinhalten (1) die Bestimmung einer Abnahme des Gewebewiderstands (R_t) von einem in Ussing-Kammern aufgetragenem Ileum, wie von Fasano et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:5242-5246 (1991) beschrieben; (2) die Bestimmung der Abnahme des Gewebewiderstandes (R_t) von Monolayern intestinaler Epithelzellen in Ussing-Kammern, wie unten in Beispiel 3 beschrieben; oder (3) die Untersuchung der intestinalen oder nasalen Erhöhung der Absorption eines therapeutischen Agens, wie beschrieben in der WO 96/37196; der US-Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 08/443,864, eingereicht am 24. Mai 1995 (inzwischen erteilt); der US-Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 08/598,852, eingereicht am 9. Februar 1996 (inzwischen US-Patent 5,665,389).

[0033] Antagonisten von ZOT können als anti-inflammatorische Wirkstoffe für die Behandlung von gastrointestinalen Zuständen verwendet werden, bei denen eine erhöhte intestinale Permeabilität beschrieben wurde, z. B. bei der Behandlung von inflammatorischen Darmerkrankungen, Enteropathie mit Proteinverlust, Nahrungsmittelallergien und Zöliakie.

[0034] Agonisten von ZOT öffnen t_j schnell auf reversible und reproduzierbare Weise, und können somit als Verstärker der intestinalen oder nasalen Absorption eines therapeutischen Agens auf die gleiche Weise verwendet werden, in der ZOT, wie in der WO 96/37196; der US-Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 08/443,864, eingereicht am 24. Mai 1995 (inzwischen erteilt); der US-Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 08/598,852, eingereicht am 9. Februar 1996 (inzwischen US-Patent 5,665,389) beschrieben, als Verstärker intestinaler oder nasaler Absorption verwendet wird.

[0035] Die nachfolgenden Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung und sollen in keiner Weise den Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung beschränken.

BEISPIEL 1

Wirkung von ZOT auf das Zytoskelett von Enterozyten

[0036] Im Dünndarm (Madara et al, J. Cell Biol., 97:125-136 (1983)) und in Nierenzellen (Meza et al, J. Cell Biol., 87:746-754 (1980)) können pathophysiologische Veränderungen der Zytoskelettanordnung wesentliche Veränderungen hinsichtlich des Widerstands, der Ladungsselektivität und der Struktur der verschließenden t_j hervorrufen. Die Antwort, die durch diese spezifischen Störungen hervorgerufen wird, besteht aus einer Expansion der verschließenden t_j -Struktur, und aus Veränderungen hinsichtlich der parazellulären Kationenselektivität. Diese Daten legen nahe, dass der parazelluläre Weg über intrazelluläre Ereignisse reguliert werden kann, die phänotypische Veränderungen in der Zelloberflächenstruktur, die ZO reguliert, hervorbringt. Jedoch ist die Kaskade intrazellulärer Ereignisse, die zu solchen Modifikationen von t_j führen, noch ungenau bekannt.

A. Die Wirkung von ZOT auf die Zytoskelettanordnung

[0037] Um zu untersuchen, ob ZOT eine Wirkung auf die Umordnung des Zytoskeletts hat, wurde die Überstandsfraction mit $M_r > 10000$, die nach Kultivierung des *V. cholerae*-Stammes CVD110, der mit dem Plasmid pZ14 transformiert ist, (nachfolgend „pZ14-Überstand“) auf Gewebekulturen von IEC6-Zellen getestet.

[0038] CVD110 ist ein *V. cholerae*-Stamm (El Tor-Biotyp), in dem alle bekannten Toxingene (ctxA-, zot- und ace-Gene) deletiert wurden (Michalski et al, Infect. Immun., 61:4462-4468 (1993)).

[0039] Das Plasmid pZ14 enthält das zot-Gen, das von dem induzierbaren tac-Promotor transkribiert wird. Das Plasmid pZ14 wurde durch Verdau von pBB241 mit HindIII konstruiert. pBB241 wurde erhalten durch Klonieren eines die gesamte zot-Sequenz enthaltenden ClaI-XbaI-Fragments in das Plasmid pUC19 (Baudry et al, Infect. Immun., 60:428-434 (1992)).

[0040] Der 5'-Überhang wurde mit Klenow-Fragment aufgefüllt und das linearisierte Plasmid mit XbaI verdaut, wodurch man ein zot-Fragment mit 1,5 kb erhielt. Dieses Fragment wurde in den Vektor pTTQ181 (Amersham,

Arlington Heights, IL) kloniert, der modifiziert war durch Unterbrechung des Amp^R-Gens durch die Kan^R-Kassette, die in dem in Maniatis et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989) beschriebenen pHSG274 vorkommt. Genauer gesagt wurde pTTQ181 mit EcoRI verdaut, aufgefüllt und mit XbaI verdaut. Das 1,5 kb XbaI-Fragment von zot wurde in der korrekten Orientierung in den erhaltenen Vektor ligiert und als „pZ14“ bezeichnet.

[0041] Die IEC6-Zellen waren abgeleitet von Kryptenzellen aus keimfreiem Dünndarm der Ratte (Quaroni et al, In: Methods in Cell Biology, Kapitel 20, 21B:403-426 (1980)) und wurden in Vollmedium in Zellkulturflaschen (Falcon) bei 37 °C in einer Atmosphäre aus 95 % O₂/5 % CO₂ kultiviert. Das Vollmedium umfasste Dulbeccos Modifiziertes Eagle's Medium, das mit 4,5 g/l Glukose supplementiert war und 5,0 % (Vol./Vol.) fötales Rinder-serum (bestrahlt), 10 µg/ml Insulin, 4,0 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Nummer der verwendeten Passage schwankte zwischen 15 und 20.

[0042] Die Überstandsfraktion mit M_r > 10000 wurde wie folgt hergestellt. Mit pZ14 transformierter CVD110 wurde über Nacht bei 37 °C in Luria Bertani (nachfolgend hier als „LB“ bezeichnet)-Nährmedium kultiviert, das 50 µg/ml Kanamycin enthielt, um Kanamycin-resistente Stämme zu selektieren, die das pZ14-Plasmid trugen. Die Kulturen wurden anschließend verdünnt, um eine anfängliche OD₆₀₀ von 0,4-0,5 zu erhalten. Um die Expression von ZOT vom tac-Promotor zu induzieren, wurden anschließend 2,0 mM Isopropyl-thio-β-D-galaktopyranosid (IPTG) (5'-3' Incorporation, Boulder, CO) den Kulturen zugegeben, die weitere zwei Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde das Kulturmedium geerntet, abgekühlt und 10 Minuten bei 4 °C mit 5.000 × g zentrifugiert. Die erhaltene Flüssigkeit wurde gesammelt und durch einen 0,45 µm-Filter (Millipore) geleitet. Anschließend wurde mit dem erhaltenen Kulturüberstand eine Ultrafiltration über Centricon-Filter (Vanguard International Corp., NJ) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa durchgeführt. Die Fraktion mit M_r > 10 kDa wurde zwei Mal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4) (nachfolgend hier als „PBS“ bezeichnet) gewaschen, auf das ursprüngliche Volumen in PBS rekonstituiert, und wie unten besprochen auf Aktivität hinsichtlich der Umordnung des Zytoskeletts untersucht.

1. Fluoreszenzmikroskopie

[0043] 2,0 × 10⁴ IEC6-Zellen/ml wurden auf Glas-Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C 30 µl des pZ14-Überstands (1:33 Verdünnung) oder 30 µl PBS als Negativkontrolle ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in 3,7 % (Vol./Vol.) Formaldehyd in PBS (pH 7,4) 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Waschen mit dem gleichen Puffer wurden die Zellen mit 0,5 % (Vol./Vol.) Triton X-100 (Sigma) in PBS (pH 7,4) 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die erhaltenen fixierten Zellen wurden anschließend mit 5,0 µg/ml Fluorescein-Phalloidin (Sigma) 30 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Deckgläser mit 1:1 Glycerin-PBS (pH 8,0) eingedekelt und für jeden Zustand 200 Zellen dreifach im Blindversuch mit einem Nikon Optiphot-Fluoreszenzmikroskop untersucht, um das (als Stressfasern definierte) F-Actin-Zytoskelettnetzwerk der Zellen sichtbar zu machen.

[0044] Die normale Verteilung von Stressfasern wurde in Zellen gesehen, die mit der PBS-Negativkontrolle inkubiert worden war. Wenn jedoch die IEC6-Zellen mit pZ14-Überstand inkubiert wurden, war eine völlige Umordnung des Zytoskeletts zu beobachten (die ihr Maximum bei 24-stündiger Inkubation erreichte), wobei die Stressfasern zur Zellperipherie umverteilt waren.

[0045] Nach 48-stündigem Kontakt mit dem pZ14-Kulturüberstand blieb die F-Actin-Organisation unverändert gegenüber den Zellen nach 24-stündigem Kontakt. Die F-Actin-Organisation in den Negativkontrollen blieb über die Untersuchungsdauer von 48 h unverändert.

2. Rasterelektronenmikroskopie

[0046] In Paralleluntersuchungen wurden mit pZ14-Überstand oder PBS-Negativkontrolle inkubierte IEC6-Zellen über Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

[0047] Genauer gesagt wurden IEC6-Zellen mit 5,0 × 10⁹ Zellen/Well auf Glas-Deckgläsern mit einem Durchmesser von 13 mm ausgesät, die in die Wells von 24-Well-Platten eingelegt waren. Nach 24-stündigem Kontakt mit entweder 30 µl pZ14-Überstand oder 30 µl PBS-Negativkontrolle bei 37 °C wurden die Zellen mit 2,5 % (Vol./Vol.) Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach 30-minütiger Nachfixierung in 1,0 % (Gew./Vol.) OsO₄ wurden die Zellen über eine abgestufte Ethanolreihe dehydratisiert, mit kritischer Punkttrocknung unter CO₂ getrocknet und anschließend über Sputtering mit Gold beschichtet. Die Proben wurden mit einem Cambridge Rasterelektronenmikroskop untersucht.

[0048] Die Modifizierungen der Oberfläche von Zellen, die ZOT ausgesetzt worden waren, waren im Vergleich mit der PBS-Negativkontrolle sichtbar. Genauer gesagt induzierte ZOT hauptsächlich einen Verlust an Microvilli um die Zellperipherie, wobei das Zentrum ausgespart blieb. Die Oberflächenveränderungen stimmen überein mit der durch ZOT induzierten Umverteilung von F-Actin, die in der oben beschriebenen Fluoreszenzmikroskopie zu sehen war.

3. Untersuchungen an Kaninchen-Ileum

[0049] Anschließend wurden Experimente zur Umordnung des Zytoskeletts durchgeführt, wobei Kaninchen-Ileum verwendet wurde, das wie von Fasano et al, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 8:5242-5246 (1991) auf Ussing-Kammern aufgetragen war.

[0050] Genauer gesagt wurden erwachsene, männliche Weiße Neuseeländer-Kaninchen durch Genickbruch getötet. Ein 20 cm-Segment des Ileums wurde entnommen, von Darminhalt freigespült, entlang der Mesenteriumgrenze geöffnet und von Muskel- und Serosaschichten befreit. Acht Lagen der auf diese Weise hergestellten Mukosa wurden anschließend in Acrylglas-Ussing-Kammern (1,12 cm² Öffnung) aufgetragen, mit einer Voltage Clamp-Vorrichtung (EVC 4000 WPI, Sarasota, FL) verbunden und in einer Badelösung von frisch hergestellter Ringer-Lösung gehalten, die 53 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 30,5 mM Mannitol, 1,69 mM Na₂HPO₄, 0,3 mM NaH₂PO₄, 1,25 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl₂ und 25 mM NaHCO₃ enthielt. Die Badelösung wurde durch Reservoirs mit Wassermantel, die mit einer Konstanttemperatur-Zirkulationspumpe verbunden waren, bei 37 °C gehalten und mit 95 % O₂/5 % CO₂ begast.

[0051] Auf der Mukosa-Seite wurden 300 µl pZ14-Überstand zugegeben. 300 µl pZ14-Überstand wurden auch auf der Serosa-Seite zugegeben, um das osmotische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Der Potentialunterschied (PD) wurde alle 10 min gemessen, und der Kurzschlussstrom (Isc) und der Gewebewiderstand (Rt) wurden berechnet wie von Fasano et al., supra, beschrieben. Aufgrund der Gewebevariabilität wurden die Daten berechnet als Rt (Rt zum Zeitpunkt x)-(Rt zum Zeitpunkt 0). Am Ende jedes Experiments wurden 0,5 mM Glukose zur Mukosa-Seite jeder Kammer zugegeben. Nur solche Gewebe, die als Antwort auf Glukose einen Anstieg des Isc zeigten (was die Lebensfähigkeit des Gewebes anzeigte), wurden in die Analyse einbezogen.

[0052] Sobald die maximale Wirkung von ZOT auf Rt nach 60-minütiger Inkubation erhalten wurde, wurden die entweder dem pZ14-Überstand oder der PBS-Negativkontrolle ausgesetzten Gewebe fixiert und wie oben beschrieben mit Fluorescein-Phalloidin auf F-Actin gefärbt.

[0053] Das Ileum von Kontroll-Kaninchen zeichnete sich aus durch eine homogene fluoreszente Färbung des Bürstensaums und eine säulenartige Verteilung von Actin-Mikrofilamenten zwischen angrenzenden Enterozyten. Kaninchen-Ileum, das pZ14-Überstand ausgesetzt worden war, zeigte eine unregelmäßige Färbung des Bürstensaums, die einherging mit einer partiellen Umverteilung von F-Actin innerhalb des darunterliegenden Zytoplasmas. Diese Veränderungen waren im Vergleich mit den weniger differenzierten Kryptenzellen bei den reifen Zellen der Spitze der Villi deutlicher.

4. Beurteilung von Actin-Pools

[0054] Actin ist einer der Hauptbestandteile des zellulären Zytoskelettnetzwerks, und Verschiebungen zwischen dem löslichen, monomeren G-Actin-Pool und dem filamentösen F-Actin-Pool spiegeln Änderungen in der Actin-Organisation wider (Drenth et al, J. Cell Biol., 107:1037-1048). Dementsprechend wurde die Wirkung von ZOT auf die G- und F-Actin-Pools untersucht.

[0055] Genauer gesagt wurden Endothelzellen der Pulmonararterie von Rindern (Goldblum et al., J. Cell Physiol., 157:197-205 (1993)), die von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) als ATCC No. 209 CCL bezogen wurden, bei 37 °C unter 95 % O₂/5 % CO₂ in Dulbeccos Modifiziertem Eagle's Medium kultiviert, das mit 20 % (Vol./Vol.) hitzeinaktiviertem (30 min bei 56 °C) fötalem Kälberserum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 4,0 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und Vitaminen in Gegenwart von 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin angereichert war. Die Kulturen wurden durch einheitliche Morphologie und durch quantitative Bestimmung der Aktivität von Angiotensin-umwandelndem Enzym mit im Handel erhältlichem ³H-benzyl-Phe-Ala-Pro-Substrat (Ventrex Laboratories, Inc., Portland, ME) als endothelial bestimmt. Es wurden nur die Zellpassagen 3-7 verwendet.

[0056] Endotheliales F-Actin wurde wie von Goldblum et al, supra, beschrieben fluorometrisch gemessen.

Genauer gesagt wurden $5,8 \times 10^5$ Endothelzellen in 2,0 ml Dulbeccos Modifiziertem Eagle's Medium, das mit 20 % (Vol./Vol.) hitzeinaktiviertem (56 °C, 30 min) fötalem Kälberserum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 4,0 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und Vitaminen in Gegenwart von 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin angereichert war, in die Wells von 6-Well-Platten ausgesät und bei 37 °C 72 h in 95 % O₂/5 % CO₂ kultiviert. Die Monolayer wurden mit 30 µl pZ14-Überstand (1:33-Verdünnung) 24 h in Kontakt gebracht, wonach sie zwei Mal in einem Puffer, der 75 mM KCl, 3,0 mM MgSO₄, 1,0 mM Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), 10 mM Imidazol, 0,2 mM Dithiothreitol (DTT), 10 µg/ml Aprotinin und 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthielt, gewaschen und 15 min mit 3,7 % (Vol./Vol.) Formaldehyd fixiert wurden. Anschließend wurden die Monolayer mit 0,2 % (Vol./Vol.) Triton X-100 im obengenannten Puffer 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert, mit $1,65 \times 10^{-7}$ M NBD-Phalloidin (Sigma) 20 min gefärbt, und über Nacht bei -20 °C mit eiskaltem Methanol extrahiert. Das Färben und die Extraktionen wurden im Dunklen durchgeführt. Die Extrakte wurden in Küvetten geerntet und die intraendotheliale Fluoreszenz wurde in einem Perkin-Elmer LS30 Lumineszenzspektrometer bei Raumtemperatur bei einer Anregungswellenlänge von 465 nm (10 nm Spalte) und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (10 nm Spalte) gemessen und in willkürlich gewählten Fluoreszenzeinheiten pro mg Gesamt-Endothelzellprotein ausgedrückt.

[0057] Ein Auftragen von NBD-Phalloidin auf fixierte permeabilisierte Endothelzell-Monolayer führte zu einem 78,8 %igen Eindringen der Sonde in die Zelle, und gemessen über Fluorometrie wurden 99,98 % der intrazellulären Sonde mit einer einzigen Methanolbehandlung extrahiert.

[0058] Die Actin-Umordnung kann reziproke Veränderungen beim löslichen monomeren G- und beim filamentösen F-Actin-Pool beinhalten, während der Gesamt-Actin-Pool unverändert bleibt. Die oben beschriebenen Vorgehensweisen zur Bestimmung von F- und G-Actin-Pools umfassen Fixierungs-, Permeabilisierungs- und Extraktionsverfahren, die Proteinbestimmungen auf den gleichen Endothelzellmonolayern der Pulmonararterie von Rindern ausschließen. Daher wurden zur Standardisierung von F- und G-Actin-Messungen zusätzliche, gleichzeitig ausplattierte Zellen zur Gesamtproteinbestimmung unter identischen Bedingungen kultiviert wie die Monolayer, die auf die F- und G-Actin-Pools untersucht wurden.

[0059] Genauer gesagt wurden postkonfluente Endothelzell-Monolayer der Pulmonararterie von Rindern in den Wells von 6-Well-Platten zwei Mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und durch 1-2-minütigen Kontakt mit 0,5 mg/ml Trypsin unter sanftem Schütteln abgelöst und anschließend sofort mit dem oben beschriebenen, PBS enthaltenden Dulbecco's Medium neutralisiert. Die Zellen wurden bei 4 °C 10 min mit $600 \times g$ zentrifugiert, erneut zwei Mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und in Lysepuffer lysiert, der 3,0 % (Gew./Vol.) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1,0 mM DTT, 10 mM PMSF, 1,0 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) enthielt. Anschließend wurden die Lysate unter Verwendung des üblichen Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Chemical Division, Richmond, CA) auf ihre Proteinkonzentration hin untersucht.

[0060] Endotheliales G-Actin wurde über den DNaseI Inhibitionsassay wie von Goldblum et al, supra, beschrieben, gemessen. Genauer gesagt wurde DNaseI (Sigma) aus Rinderpankreas in 0,125 M Tris-HCl (pH 7,5), 5,0 mM MgCl₂, 2,0 mM CaCl₂, 1,0 mM NaN₃ und 0,1 mM PMSF mit einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, um deren Stabilität zu erhöhen. Die Stammlösung wurde dann $100 \times$ mit 20 mM Imidazol (pH 7,5), 30 mM NaCl₂ und 15 % (Vol./Vol.) Glycerin verdünnt. Das Enzym wurde alle zwei h frisch angesetzt und auf Eis aufbewahrt. DNA aus Kälberthymus (Typ 1, Sigma) wurde als Substrat für die DNaseI verwendet. Die strähnige DNA-Zubereitung wurde in kleine Stücke geschnitten und in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 4,0 mM MgSO₄, 1,8 mM CaCl₂ mit einer Konzentration von 80 mg DNA/ml suspendiert. Die DNA wurde durch 48-stündiges langsames Rühren bei 4 °C in Lösung gebracht, wonach die Lösung nacheinander durch Filter mit Porengrößen von 0,45 µm und 0,22 µm geleitet und bei 4 °C aufbewahrt wurde. Die Extinktion des fertigen Substrats bei 260 nm schwankte zwischen 1,05 und 1,15. Anschließend wurde die DNaseI in der Küvette eines Gilford „response spectrophotometer“ (Ciba Corning Diagnostics) mit DNA-Substrat gemischt und die Steigung des linearen Teils der OD bei 260 nm aufgezeichnet. Gereinigtes Skelettmuskel-Actin (Sigma), das in 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,0 M Na-Acetat, 1,0 mM CaCl₂, 1,0 mM Adenosin-Triphosphat (ATP), 0,75 M Guanidin-HCl gelöst war, wurde als G-Actin-Standard zur Kalibrierung des Assays verwendet.

[0061] In 6-Well-Platten gewachsene Rinderendothelzell-Monolayer wurden mit 30 µl pZ14-Überstand in Kontakt gebracht. Die Monolayer wurden mit Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, und mit 0,5 ml/Well Lysepuffer, der Hanks Balanced Salt Solution umfasste, die 1,0 % (Vol./Vol.) Triton X-100, 2,0 mM MgCl₂, 2,0 mM EGTA, 0,2 mM ATP, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF enthielt, 5 min permeabilisiert. Anschließend wurden die G-Actin enthaltenden Überstände im DNaseI-Inhibitionsassay untersucht, um inhibitorische Aktivitäten zu erzeugen, die in den linearen Teil der Standardkurve fielen, d. h. 30-70 % Inhibition. Die inhibitorischen Aktivitäten wurden auf G-Actin-Konzentrationen interpoliert, die zur Berechnung von G-Actin, ausgedrückt in

µg/mg Gesamt-Endothelzellprotein, verwendet wurden.

[0062] Als Negativkontrollen wurden Monolayer verwendet, die mit 30 µl pZ14-Überstand, der 15 min gekocht worden war, um den Effekt von ZOT auf Rt auszuschalten, und mit 30 µl Überstand des V. cholera-Stammes CVD110 (Michalski et al, supra), der mit pTTQ181 (Amersham, Arlington Heights, IL) (nachfolgend hier als „pTTQ181-Überstand“ bezeichnet) in Kontakt gebracht worden waren.

[0063] Im Vergleich entweder mit pTTQ181-Überstand oder den gekochten pZ14-Überständen induzierte der pZ14-Überstand eine signifikante Abnahme des G-Actin-Pools (- 27 %) und eine reziproke Zunahme des F-Actin-Pools (+ 22 %) (siehe Tabelle I unten). Diese Verschiebung von G- nach F-Actin ist mit einer Actin-Polymerisation vereinbar. Diese Wirkung wurde durch 15-minütiges Kochen des pZ14-Überstands vollständig aufgehoben.

Tabelle 1

G- und F-Actin-Assays und Wirkung des PKC-Inhibitors CGP41251 auf die Actin-Polymerisation

Stamm (N)*	G-Actin (µg/mg Protein)	p-Wert**	F-Actin (U/mg Protein)	p-Wert**
pTTQ181 (20)	106,1 (3,92)***	-	341,34 (5,28)***	-
pZ14 (38)	76,0 (4,16)	0,0001	415,73 (22,03)	0,0036
CGP41251 + pZ14 (30)	108,6 (7,2)	0,7803	335,67 (12,1)	0,673
CGP42700 + pZ14 (30)	84,8 (4,0)	0,0011	446,17 (18,5)	0,0001

* Anzahl der Experimente

** im Vergleich mit der pTTQ181-Negativkontrolle

*** Standardabweichung (S.E.)

5. Wirkung von ZOT auf die F-Actin- und ZO-1-Proteinverteilung

[0064] Parallele Untersuchungen wurden hinsichtlich der Wirkung von ZOT auf die F-Actin- und ZO-1-Proteinverteilung in IEC6-Zellen durchgeführt, die apikal geschnitten waren, um den tj-Komplex enthalten.

[0065] Genauer gesagt wurden $2,0 \times 10^4$ IEC6-Zellen/ml, die auf Deckgläsern kultiviert wurden, 24 h bei 37 °C mit 30 µl pZ14-Überstand inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur in 3,7 % (Vol./Vol.) Formaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach Waschen mit dem gleichen Puffer wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % (Vol./Vol.) Triton X-100 in PBS (pH 7,4) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen sowohl mit 5,0 µg/ml Fluorescein-Phalloidin als auch mit 2,0 µg/ml anti-ZO-1-Antikörper 7445 (Zymed Laboratory Inc., South San Francisco, CA) 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit PBS (pH 7,4) gewaschen, die Deckgläser mit Glyzerin-PBS (1:1-Verdünnung) (pH 8,0) eingedeckelt und mit einem Nikon Optiphot Fluoreszenzmikroskop für jede Bedingung 200 Zellen dreifach im Blindversuch untersucht. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Prozentsatz von Zellen, die eine Umordnung des Zytoskeletts zeigten.

[0066] Als Negativkontrolle wurde das komplexe Netzwerk von F-Actin-Filamenten von IEC6-Zellen (mit Fluorescein-Phalloidin gefärbt) 24 h mit 30 µl pTTQ181-Überstand inkubiert.

[0067] Die Immunfluoreszenzlokalisierung von ZO-1 innerhalb der gleichen Zellen, die mit dem anti-ZO-1-Antikörper 7445 markiert waren, der beide ZO-1-Isoenzyme erkennt, zeigte eine einheitliche, kontinuierliche Färbung von ZO-1 ausschließlich entlang der Zell-Zell-Grenzen. Im Gegensatz dazu induzierte der pZ14-Überstand einen Verlust an zentral lokalisierten, transzytoplasmatischen Actin-Filamenten sowie eine Umverteilung von ZO-1 von der Zell-Zell-Grenze. Die Umverteilung von ZO-1-Protein aus dem tj-Komplex hing nicht mit dessen Tyrosinphosphorylierung zusammen.

[0068] Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse, dass die durch ZOT induzierte Actin-Polymerisation mechanistisch mit der Umverteilung des ZO-1-Proteins aus dem tj-Komplex in Zusammenhang steht. ZO-1 kann daher eine Verbindung zwischen der ZOT-induzierten Actin-Umordnung und der Öffnung der tj sein.

BEISPIEL 2

Intrazellulärer Mediator von ZOT

[0069] Mehrere intrazelluläre Mediatoren wurden mechanistisch mit Veränderungen in der tj-Permeabilität verknüpft, einschließlich cAMP, Ca^{++} und PKC (Madara, supra; und Balda et al, J. Membrane Biol., 122:193-202 (1991)). Die Beobachtung, dass die Antwort auf Theophyllin (ein Phosphodiesterase-Inhibitor) in Kaninchen-Ileum, das zuvor mit V. cholerae 395-Überstand (der sowohl CT als auch ZOT enthält) in Kontakt gebracht worden war, eine Peak-Antwort des Isc ähnlich der in Geweben, die mit der Negativkontrolle in Kontakt gebracht worden waren, auslöste, legt nahe, dass durch ZOT induzierte Veränderungen der Gewebepерmeabilität nicht über cAMP vermittelt werden (Fasano et al, supra). Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn ZOT enthaltende Überstände allein oder in Kombination mit gereinigtem CT getestet wurden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Gesamtmenge von intrazellulärem cAMP in Kontrollgeweben oder Geweben, die mit ZOT in Kontakt gebracht wurden waren, nicht vergleichbar sind. Um zu bestimmen, ob PKC eine ZOT-Aktivität vermittelt, wurden daher Kaninchen-Dünndärme und IEC6-Zellen mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin in Kontakt gebracht (MacLeod et al, Amer. Physiol. Soc., 192:C950-C955 (1992)).

A. Kaninchen-Dünndärme

[0070] Genauer gesagt wurde von den Muskel- und Serosa-Schichten befreites Kaninchen-Ileum in Ussing-Kammern aufgetragen und anschließend mit 300 μl (1:33-Verdünnung) pZ14-Überstand in Kontakt gebracht, entweder allein oder in Kombination mit 10 nM Staurosporin, das 10 min vor und während des Kontakts mit pZ14-Überstand zugegeben wurde. Veränderungen des Rt wurden anschließend in Intervallen von 10 min aufgezeichnet.

[0071] Es zeigte sich, dass 10 nM Staurosporin die durch pZ14-Überstand induzierte Abnahme des Rt vollständig verhindert. Da Staurosporin ein starker, aber nicht-selektiver Inhibitor der PKC-Aktivität ist (Meyer et al, Int. J. Cancer, 43:851-856 (1989)), wurde anschließend ein Staurosporin-Derivat, d. h. CGP41251, das PKC selektiv inhibiert (Meyer et al, supra) hinsichtlich der durch ZOT induzierten Umordnung von Actin und der Gewebepерmeabilität getestet.

[0072] Genauer gesagt wurde von den Muskel- und Serosaschichten befreites Kaninchen-Ileum in Ussing-Kammern aufgetragen und dann mit 300 μl (1:33-Verdünnung) pZ14-Überstand in Kontakt gebracht, entweder allein oder in Kombination mit 10 nM CGP41251, das 10 min vor und während des Kontakts mit dem pZ14-Überstand zugegeben wurde. Als Negativkontrollen wurden Ussing-Kammern verwendet, die 10 min vor und während des Kontakts mit pZ14-Überstand mit 10 mM eines inaktiven Staurosporin-Analogons, d. h. CGP42700 (Meyer et al, supra) in Kontakt gebracht wurden. Veränderungen des Rt wurden anschließend in Intervallen von 10 min aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0073] Wie in [Fig. 1](#) gezeigt verhinderte die Vorbehandlung mit 10 nM CGP41251, aber nicht mit dessen inaktivem Analogon CGP47200 die durch pZ14-Überstand induzierten Veränderungen des Rt. Es wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet, wenn die Gewebe auf ähnliche Weise mit pTTQ181-Überstand in Kontakt gebracht wurden.

[0074] Phorbol-ester sind PKC-Aktivatoren. Dementsprechend wurde der Phorbol-ester 12-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) getestet, um zu bestätigen, dass ZOT über PKC wirkt.

[0075] Genauer gesagt wurde von den Muskel- und Serosaschichten befreites Kaninchen-Ileum in Ussing-Kammern aufgetragen und anschließend mit 300 μl (1:33-Verdünnung) pZ14-Überstand in Kontakt gebracht, entweder allein oder in Kombination mit 10^{-8} M TPA, das 10 min vor und während des Kontakts mit pZ14-Überstand zugegeben wurde. Veränderungen des Rt wurden anschließend in Intervallen von 10 min aufgezeichnet.

[0076] Im Vergleich mit pTTQ181-Überstand wurde mit pZ14-Überstand eine signifikante Abnahme des Rt induziert ($-7,33 \pm 2,55$ gegenüber $-2,57 \pm 1,51$ mOhm $\cdot\text{cm}^2$; $p < 0,005$). Bei Zugabe zum gleichen Gewebe bewirkte TPA zusammen mit pZ14-Überstand eine Verringerung des Rt (Gesamtveränderung des Rt: $-7,37 \pm$

3,2 mOhm·cm²), die sich nicht von der Verringerung unterscheidet, die mit TPA allein beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von ZOT und TPA auf die intestinale Permeabilität nicht-additiv ist, was nahelegt, dass beide über PKC wirken.

B. IEC6-Zellen

[0077] Anschließend wurde die Wirkung von ZOT auf das Actin-Zytoskelett von IEC6-Zellen in Gegenwart von PKC-Inhibitoren untersucht.

[0078] Genauer gesagt wurden vor und während des Kontakts mit 30 µl pZ14-Überstand $2,0 \times 10^5$ IEC6-Zellen mit entweder 10 nM CGP41251 oder mit 10 nM CGP42700 30 min vorbehandelt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden auf Deckgläschen kultivierte $2,0 \times 10^4$ IEC6-Zellen/ml 10 min bei Raumtemperatur in 3,7 % (Vol./Vol.) Formaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach Waschen im gleichen Puffer wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % (Vol./Vol.) Triton X-100 in PBS (pH 7,4) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei 37 °C mit 5,0 µg/ml Fluorescein-Phalloidin inkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit PBS (pH 7,4) gewaschen, die Deckgläschen mit Glycerin-PBS (1:1-Verdünnung) (pH 8,0) eingedeckelt, und für jede Bedingung 200 Zellen dreifach im Blindversuch mit einem Nikon Optiphot Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Ergebnisse wurden angegeben als Prozentsatz von Zellen, die eine Umordnung des Zytoskeletts zeigten.

[0079] Bei Zugabe von pZ14-Überstand zeigten 62 % der Zellen eine Umordnung des Zytoskeletts, während eine Auswirkung nur bei 27 % der Zellen, die mit PBS Kontakt hatten, und bei 21 % der Zellen, die mit pTTQ181-Überständen Kontakt hatten, vorlag. Eine Vorbehandlung mit 10 nM CGP41251, jedoch nicht mit 10 nM von dessen inaktivem Analogon CGP42700, blockierte die Wirkungen von ZOT auf das Zytoskelett (31 % bzw. 58 % betroffene Zellen).

[0080] Darüber hinaus war die ZOT-induzierte Actin-Polymerisation, d. h. eine Abnahme des G- und ein Anstieg des F-Actin-Pools signifikant blockiert, wenn Endothelzellen von Rinderpulmonararterien wie oben beschrieben getestet wurden und mit 10 nM CGP412512 vorbehandelt wurden, während eine Vorbehandlung mit 10 nM CGP42700 nicht zu einer solchen Blockierung führte (siehe Tabelle 1 oben).

[0081] Diese kombinierten Daten zeigen, dass ZOT PKC aktiviert, und dass diese Aktivierung proximal sowohl von der Actin-Polymerisation als auch von der letztendlichen Öffnung von TJ auftritt.

C. Der PKC-Zustand

[0082] PKC liegt in allen Zellen in zwei Zuständen vor, d. h. einem inaktiven Zustand, bei dem die Kinase mit dem Zytoplasma assoziiert ist, und einem aktiven Zustand, bei dem das Molekül vom Zytoplasma zu den Membranen transloziert wird (Thomas et al., *Methods Enzymol.*, 1410:399-435 (1987)). Dementsprechend wurde der Zustand in IEC6-Zellen, die Kontakt mit pZ14-Überstand hatten, direkt gemessen.

[0083] Genauer gesagt wurden konfluente IEC6-Monolayer über ansteigende Zeitintervalle (0, 3 min, 10 min) mit 30 µl pZ14-Überstand (1:33-Verdünnung) behandelt.

[0084] Nach dem Kontakt mit ZOT wurden die IEC6-Zellen über mechanisches Aufbrechen (erzwungene 3-malige Passage durch eine 25-gauge Nadel) lysiert, die zytoplasmatischen und die Membranfraktionen wurden über 30-minütige Zentrifugation mit $13.000 \times g$ bei 4 °C getrennt und durch Bestimmung des Einbaus von ³²P aus [γ -³²P] ATP in Histon 1 auf PKC-Aktivität untersucht (Ellis et al, *Am. J. Physiol.* 263:F293-F300 (1992)). Als Kontrolle wurde die PKC-Aktivität auch unter Verwendung eines PKC-Assay-Systems (Gibco BRL, Grand Island, NY) bestimmt, das auf der Messung der Phosphorylierung von acetyliertem basischem Myelinprotein basiert, wie beschrieben von Yasuda et al, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 166:1220 (1990). Der Nettowert der PKC-Aktivität spiegelt den Unterschied zwischen der PKC-Aktivität in Gegenwart und bei Fehlen von PKC 19-26, einem PKC-Pseudosubstrat-Inhibitor (Yasuda et al, *supra*), wider. Die gesamte spezifische PKC-Aktivität (pmol/min) wurde bezogen auf das Gesamtprotein normalisiert. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 2A-Fig. 2B](#) gezeigt.

[0085] Wie in den [Fig. 2A-Fig. 2B](#) gezeigt, induzierte der pZ14-Überstand einen signifikanten Anstieg (1,72-fach) der Membran-PKC Aktivität ([Fig. 2B](#)) und, in geringerem Ausmaß, der zytosolischen PKC-Aktivität ([Fig. 2A](#)). Bei einem Mittelwert von 3 Experimenten erreichte dieser durch ZOT-induzierte Anstieg der PKC-Aktivität sein Maximum bei 3 min (134,0 pmol/min/mg Protein verglichen mit dem Basiswert von 77,6

pmol/min/mg Protein) und kehrte nach 10 min zum Basiswert zurück (65,4 pmol/min/mg Protein). Diese Daten zeigen direkt, dass die Wirkung von ZOT auf die Gewebepерmeabilität durch PKC vermittelt wird.

D. PKC-Isoenzym

[0086] Molekulares Klonieren und Sequenzanalyse von PKC haben gezeigt, dass eine Genfamilie vorliegt, die mehrere nah verwandte, aber unterschiedliche Isoenzyme mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften codiert (Azzai et al., Eur. J. Biochem., 208:547-557 (1992)).

[0087] Staurosporin und dessen spezifischeres Derivat CGP41251 inhibieren im Vergleich mit den Ca^{2+} -unabhängigen Gruppe-B Isoenzymen bevorzugt die Ca^{2+} -abhängigen Gruppe-A PKC-Isoenzyme (McGlynn et al, J. Cell. Biochem., 49:239-250 (1992); und Marte et al, Cell Growth and Differ., 5:239-247 (1994)). Infolgedessen wurden Experimente durchgeführt, die sich auf PKC- α konzentrierten, das einzige nachweisbare Ca^{2+} -abhängige PKC-Isoenzym, das für Enterozyten des Ileums beschrieben wurde (Hyun et al, Comp. Biochem. Physiol., 108C:171-178 (1994)).

[0088] Genauer gesagt wurden 15-30 μg Protein/Spur zytosolischer Membranfraktionen, die wie oben beschrieben erhalten wurden, mit einem 8,0 % (Gew./Vol.) SDS-PAGE getrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden in einer „Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad) auf eine Nylonmembran (N-Immobilon, Millipore) übertragen. Die Membran wurde in 0,05 % (Vol./Vol.) Tween 20 enthaltendem PBS (nachfolgend hier als „PBS-T“ bezeichnet) gespült und 1 h bei Raumtemperatur in PBS-T blockiert, das 5,0 % (Vol./Vol.) fettfreie Milch enthielt. Affinitätsgereinigte anti-PKC- α - und anti-PKC-Antikörper (Gibco BRL) wurden verdünnt, um optimale Sättigungsbedingungen (1:500-Verdünnung) in 0,83 % (Vol./Vol.) fettfreie Milch enthaltendem PBS-T zu erhalten, und 16 h bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran zunächst mit 5,0 % (Vol./Vol.) fettfreier Milch in PBS-T gewaschen (3 \times 15 min), anschließend mit PBS-T (1 \times 15 min) und bei Raumtemperatur 2 h mit einer 1:30.000-Verdünnung von Meerrettichperoxidase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit 5,0 % (Vol./Vol.) fettfreier Milch in PBS-T wurden immunreaktive Banden unter Verwendung verstärkter Chemilumineszenz (Amersham) entwickelt.

[0089] Als Kontrollen wurden Isoform-spezifische synthetische Peptide (Gibco BRL) mit Aminosäuresequenzen für jede jeweilige PKC-Isoform verwendet. Die synthetischen Peptide basierten auf einzigartigen Sequenzen in der V_3 -Region von α -PKC: (Ala-Gly-Asn-Lys-Val-Ile-Ser-Pro-Ser-Glu-Asp-Arg-Arg-Gln, SEQ ID NO:4), und der V_3 -Region von ϵ -PKC: (Lys-Gly-Phe-Ser-Tyr-Phe-Gly-Glu-Asp-Leu-Met-Pro, SEQ ID NO:5).

[0090] Wie durch Immunblotting festgestellt wurde, induzierte eine akute (3 min) Behandlung von IEC6-Zellen mit pZ14-Überstand eine signifikante Translokation von PKC- α -Isoenzym aus dem Zytosol zur Membran der Zellen. Diese Verringerung war nach 10-minütiger Inkubation teilweise aufgehoben. 10^{-7} M TPA induzierte eine ähnliche, aber anhaltendere (bis zu 2 h) Verringerung von zytosolischer PKC- α , während die Herunterregulation dieser Isoform nach einer Inkubation von 24 h beobachtet wurde. Eine kontinuierliche, zeitabhängige Akkumulation der PKC- α regulatorischen Untereinheit wurde im Zellzytosol beobachtet. Weder in den Membranfraktionen, die von Zellen gewonnen wurden, welche Kontakt mit pZ14-Überstand hatten, noch in der TPA-Positivkontrolle wurde ein signifikanter Anstieg von PKC- α nachgewiesen.

[0091] Diese Ergebnisse liefern einen starken Beweis dafür, dass PKC- α der intrazelluläre Mediator der ZOT-induzierten Umordnung von Actin und des t_j -Abbaus ist.

E. Serin-Phosphorylierung

[0092] Weiterhin wurden Experimente in IEC6-Zellen durchgeführt, um zur Identifizierung des Substrats der PKC-Phosphorylierung die Serin-Phosphorylierung von Zielprotein(en) sowohl in der Unterfraktion der zellulären Membranen als auch in der Unterfraktion des Zytosols zu bestimmen.

[0093] Genauer gesagt wurden mit zunehmenden Zeitintervallen (0, 15 min, 30 min, 45 min) $2,0 \times 10^5$ IEC6-Zellen/Well mit 10^{-10} M gereinigtem MBP-ZOT (das in Beispiel 5 gewonnen wurde) in Kontakt gebracht. Die Reaktion wurde mit kaltem PBS (pH 7,4) (drei Mal gewaschen) gestoppt und die Zellen wurden abgekratzt und wie oben beschrieben lysiert. Anschließend wurden Zytosol-Unterfraktionen und Membran-Unterfraktionen wie oben beschrieben gewonnen. 20-30 μg jeder Präparation wurden über 8,0 % (Gew./Vol.) SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden in einer „Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad) auf eine Nylonmembran (N-Immobilon, Millipore) übertragen. Die Membran wurde gespült und 1 h bei Raum-

temperatur in 5,0 % (Vol./Vol.) fettfreie Milch enthaltendem PBS-T blockiert. Monoklonale anti-Serin-Antikörper (Sigma Immunochemicals) wurden verdünnt, um optimale Sättigungsbedingungen (1:1000-Verdünnung) in 0,83 % (Vol./Vol.) fettfreie Milch enthaltendem PBS-T zu erhalten, und 16 h bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran zunächst mit 5,0 % (Vol./Vol.) fettfreier Milch in PBS-T gewaschen (3 × 15 min), anschließend mit PBS-T (1 × 15 min) gewaschen, und bei Raumtemperatur 2 h mit einer 1:30.000-Verdünnung von Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörpern inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit 5,0 % (Vol./Vol.) fettfreier Milch in PBS-T wurden immunreaktive Banden unter Verwendung verstärkter Chemilumineszenz (Amersham) entwickelt.

[0094] Die Ergebnisse zeigen, dass gereinigtes MBP-ZOT eine zeitabhängige Serin-Phosphorylierung eines zytoplasmatischen Proteins mit einem scheinbaren MG von 100-120 kDA induzierte. Dieses Protein könnte das Zielmolekül der durch ZOT induzierten PKC-Phosphorylierung darstellen, und könnte an dem intrazellulären Signalisieren, das zur Öffnung von *tj* führt, beteiligt sein.

BEISPIEL 3

Selektivität der Wirkung von ZOT

[0095] Um ein optimales in vitro-System zur Untersuchung der Wirkung von ZOT auf *tj* zu erstellen, wurden mehrere Zelllinien hinsichtlich ihres Ansprechens auf ZOT gescreent. Dies wurde gemacht, da der Ussing-Kammer-Assay zwar sensitiv ist, jedoch nicht für das Screening einer großen Anzahl von Proben geeignet ist. Auf der Suche nach einem alternativen System wurde ein Gewebekultur-Assay für ZOT entwickelt.

A. Spezifische Wirkung von ZOT auf verschiedene Zelllinien

[0096] Um zu bestimmen, ob ZOT entweder eine selektive oder eine breite Wirkung auf die *tj*-Regulation ausübt, wurden mehrere Zelllinien hinsichtlich ihres Ansprechens auf ZOT getestet. Genauer gesagt wurden die menschlichen Colon-Karzinom-Zelllinien HT-29 Cl 19A (Van den Berghe et al, Biochem. J., 258:673-679 (1992)) und CaCo2 (Nath et al, J. Diarrhoeal Dis., 8:133-142 (1990)), bei 37 °C in feuchter Atmosphäre von 95 % O₂/5 % CO₂ in Dulbecco's Modifiziertem Eagle's Medium, das 10 % (Vol./Vol.) fötales Kälberserum, 40 µg/l Penicillin und 90 µg/l Streptomycin enthielt, in Zellkulturflaschen (Falcon) kultiviert. Alle fünf Tage wurden die Zellen nach Trypsin-Behandlung in einem Oberflächenverhältnis von 1:5 subkultiviert, sobald sie 70-80 % Konfluenz erreicht hatten. Die Passagennummer der in dieser Untersuchung verwendeten Zellen schwankte zwischen 15 und 30.

[0097] Die HT-29 Cl 19A- oder CaCo2-Monolayer wurden bis zur Konfluenz (12-14 Tage nach Plattieren bei einem Oberflächenverhältnis von 1:2,5) auf Zellkultur-behandelten Polycarbonatfiltern kultiviert, die fest an einem Polystyrolring (6,4 mm Durchmesser, Transwell Costar) angebracht waren. Die Filter wurden in einen genau passenden Einsatz eingesetzt, der das Serosa- und das Mukosa-Kompartiment einer modifizierten Ussing-Kammer voneinander trennte, und die Experimente wurden durchgeführt, so wie sie oben für das Kaninchen-Intestinum beschrieben sind.

[0098] Im Vergleich mit Monolayern, die mit 30 µl der Negativkontrolle pTTQ181-Überstand Kontakt hatten, wurden keine signifikanten Veränderungen des *Rt* bei HT-29 Cl 19A-Monolayern (*n* = 4 für eine Testdauer von bis zu 3 h für jede Probe) erhalten, die mit 30 µl pZ14-Überstand (1:33-Verdünnung) Kontakt hatten. Andererseits induzierten 30 µl pZ14-Überstand beim Testen in CaCo2-Zell-Monolayern eine signifikante Abnahme des *Rt*, was nahelegt, dass zwischen diesen zwei Zelllinien eine unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber ZOT vorliegt.

B. Organisation von F-Actin

[0099] Um die Wirkung von ZOT auf die Organisation von F-Actin zu untersuchen, wurden IEC6-Zellkulturen und LLC-PK₁-Zellkulturen (Hull et al, In Vitro, 12:670-677 (1976)) auf die gleiche Weise getestet.

[0100] Die LLC-PK-Zellen, d. h. Zellen des Cortex der Schweineiere (Hull et al, supra), wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95 % O₂/5 % CO₂ in Zellkulturflaschen (Falcon) kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus Dulbecco's Modifiziertem Essentiellen Medium, das mit 10 % (Vol./Vol.) fötalem Rinderserum supplementiert war. Zellen von den Passagen 185 bis 200 wurden durch Trypsinierung mit 0,25 % (Gew./Vol.) Trypsin in 0,02 % (Gew./Vol.) EDTA wöchentlich passagiert, sobald sie 70-80 % konfluente Monolayer gebildet hatten.

[0101] Zellen, die mit 30 µl pZ14-Überstand Kontakt hatten und anschließend wie oben beschrieben mit Fluorescein-Phalloidin auf F-Actin markiert wurden, zeigten eine signifikante Umorganisation von Actin, während bei LLC-PK₁-Zellen keine signifikanten Veränderungen festgestellt wurden.

[0102] Die Beobachtung, dass ZOT eine selektive permeabilisierende Wirkung ausübt (möglicherweise mit einem spezifischen zellulären Rezeptor interagiert, der nur auf „sensitiven“ Zellen vorliegt), kombiniert mit dessen Wirkung auf das Zytoskelett und die Aktivierung von PKC, zeigt, dass ZOT statt direkt auf tj zu wirken vielmehr über einen intrazellulären Weg wirkt.

BEISPIEL 4

Rolle von Phospholipase C bei der Aktivität von ZOT

[0103] Phospholipase C (nachfolgend hier als „PLC“ bezeichnet) ist ein Enzym, das Phosphatidylinositoldi-phosphat (nachfolgend hier als „PIP₂“ bezeichnet) in Inositoltriphosphat (nachfolgend hier als „IP₃“ bezeichnet) plus Diacylglycerin (nachfolgend hier als „DAG“ bezeichnet) umwandelt. PLC kann am Zusammenbau und der Versiegelung von ZO teilnehmen, ebenso wie an ihrer Regulation. Die Wirkung von PKC auf ZO ist gegenüber der Aktivierung von PKC, die durch sowohl IP₃ (via Ca²⁺) als auch durch DAG induziert wird, sekundär (Berridge et al, Nature, 341:197-205 (1989)).

[0104] Oben wurde gezeigt, dass die Wirkung von ZOT auf die Umordnung des Zytoskeletts, die Actin-Polymerisation und die Veränderungen der Gewebepерmeabilität die Aktivierung von PKC beinhaltet. Um zu bestimmen, ob das primäre Ziel von ZOT PKC oder PLC ist, wurden die oben in Beispiel 1 beschriebenen Experimente in IEC6-Zellen und Ussing-Kammern wiederholt, wobei die Proben jedoch 10 min mit 100 mM Neomycinsulfat präinkubiert und während des Kontakts mit pZ14-Überstand mit 100 mM Neomycinsulfat inkubiert wurden. Neomycin ist eine Substanz, die an PIP₂ bindet und dessen Umwandlung durch PLC in IP₃ plus DAG verhindert.

[0105] Im Vergleich mit IEC6-Zellkulturen, die nur mit ZOT in Kontakt gebracht wurden (49,0 Å 9,23; p < 0,05) zeigten IEC6-Zellkulturen, die mit 100 mM Neomycin vorbehandelt und anschließend mit pZ14-Überstand in Kontakt gebracht wurden, einen geringeren Prozentsatz an Zellen mit Umordnung des Zytoskeletts (12,0 Å 5,17). Ein vorheriger Kontakt von Kaninchen-Ileum mit 100 mM Neomycinsulfat verhinderte teilweise die gesteigerte Gewebepерmeabilität, die von ZOT in unbehandelten Geweben induziert wurde.

[0106] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transmembran-PLC eine Rolle bei der durch ZOT induzierten Umordnung von Actin und der Gewebepерmeabilität spielen kann.

BEISPIEL 5

Aufreinigung von ZOT

[0107] 5000 ml pZ14-Überstand wurden mit einem Laminarflussfilter mit einer MG-Ausschlussgrenze von 10 kDa 1000-fach aufkonzentriert und anschließend einer 8,0 % (Gew./Vol.) SDS-PAGE unterworfen. Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie Blau auf dem SDS-PAGE-Gel nachgewiesen. Bei Verwendung des pTTQ181-Kontrollüberstands, der auf die gleiche Weise behandelt wurde, war keine Bande nachweisbar, die ZOT entsprach. Obwohl das zot-Gen hinter dem hochinduzierbaren und starken tac-Promotor in pZ14 angeordnet war, war somit die Konzentration des Proteins in dem 1000-fach aufkonzentrierten pZ14-Überstand über das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel immer noch nicht nachweisbar.

A. MBP-ZOT

[0108] Zur Erhöhung der hergestellten Menge von Zot wurde das zot-Gen somit im Leserahmen mit dem Maltose-Bindungsprotein (nachfolgend „MBP“)-Gen fusioniert, um ein MBP-ZOT-Fusionsprotein zu erzeugen.

[0109] Der MBP-Vektor pMAL-c2 (Biolab) wurde zur Expression und Aufreinigung von ZOT durch Fusion des zot-Gens mit dem malE-Gen von E. coli verwendet. Dieses Konstrukt verwendet den starken, induzierbaren tac-Promotor und die Translationsinitiiierungssignale von malE für eine starke Expression des klonierten zot-Gens. Der Vektor pMAL-c2 weist eine exakte Deletion der malE-Signalsequenz auf, die zu zytoplasmatischer Expression des Fusionsproteins führt. Für eine leichtere Isolierung des Fusionsproteins wurde eine Affinitätschromatographie-Aufreinigung für MBP verwendet (Biolab).

[0110] Genauer gesagt wurde der Vektor pMAL-c2 mit EcoRI (welches am 3'-Ende des malE-Gens schneidet) linearisiert, mit Klenow-Fragment aufgefüllt, und mit XbaI (für das eine einzige Schnittstelle in dem pMAL-c2-Polylinker vorliegt) verdaut. Der orf, welcher für ZOT kodiert, wurde aus dem Plasmid pBB241 subkloniert (Baudry et al., supra)). Das Plasmid pBB241 wurde mit BssHII verdaut, mit Klenow-Fragment aufgefüllt und mit XbaI verdaut. Dann wurde das XbaI-Fragment mit stumpfen Enden in pMAL-c2 subkloniert, wodurch man das Plasmid pLC10-c erhielt. Da sowohl das Insert als auch der Vektor stumpfe und klebrige Enden aufwies, erhielt man die korrekte Orientierung mit dem 3'-Ende von malE, das mit dem 5'-Terminus des Inserts fusioniert war. pLC10-c wurde anschließend durch Elektroporation in den E.coli-Stamm DH5 α übertragen. In pBB241 liegt die BssHII-Restriktionsstelle innerhalb des orf von zot. Die Aminosäuren 1-8 von ZOT fehlen somit in dem MBP-ZOT-Fusionsprotein.

[0111] Zur Aufreinigung des MBP-ZOT-Fusionsproteins wurden 10 ml Luria Bertani-Nährmedium, das 0,2 % (Gew./Vol.) Glukose und 100 μ m/ml Ampicillin enthielt, mit einer einzelnen, pLC10-c enthaltenden Kolonie beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde in 1:100 in 1,0 ml des gleichen frischen Mediums verdünnt und unter Schütteln bei 37 °C kultiviert, bis eine Zelldichte von etwa $1,0 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht wurde. Zur Induzierung der Expression von MBP-ZOT wurden dann 0,2 mM IPTG zugegeben und die Kultur weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien pelletiert und in 20 ml eiskaltem „Säulenpuffer“ resuspendiert, der 20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1,0 mM EDTA, 10 mM 2-ME und 1,0 mM NaN₃ enthielt. Die Bakteriensuspension wurde durch Behandlung in einer „French Press“ lysiert und 30 min mit $13.000 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, 1:5 mit Säulenpuffer verdünnt und damit eine 1×10 Säule eines Amyloseharzes (Biolabs, MBP-Fusion Purification System) beladen, das zuvor mit Säulenpuffer äquilibriert worden war. Nach Waschen der Säule mit 5 Volumina Säulenpuffer wurde das MBP-ZOT-Fusionsprotein durch Auftragen von 10 ml 10 mM Maltose in Säulenpuffer eluiert. Die typische Ausbeute aus 1,0 ml Kulturlösung betrug 2-3 mg Protein.

[0112] Der MBP-Fusionspartner des aufgereinigten MBP-ZOT-Fusionsproteins wurde unter Verwendung von 1,0 μ g Faktor Xa Protease (Biolabs) pro 20 μ g MBP-ZOT abgespalten. Faktor Xa Protease spaltet unmittelbar vor dem Amino-Terminus von ZOT. Das auf diese Weise erhaltene ZOT-Protein wurde auf einem 8,0 % (Gew./Vol.) SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und unter Verwendung einer Elektroseparationskammer (Schleicher & Schuell, Keene, NH) durch Elektroelution aus dem Gel gewonnen.

[0113] Beim Austesten in Ussing-Kammern induzierte das erhaltene, aufgereinigte ZOT eine dosisabhängige Abnahme des Rt, wobei der ED₅₀ $7,5 \times 10^{-8}$ M betrug ([Fig. 3](#)).

B. 6 \times His-ZOT

[0114] Das zot-Gen wurde über PCR mit Deep Vent Polymerase (New England Biolabs) amplifiziert, wobei DNA des Plasmids pBB241 (Baudry et al, supra) als Template verwendet wurde. Die verwendeten Vorwärts- und Rückwärts-Primer waren: 5'-CGGGATCCCGTATGAGTATCTTT-3' (SEQ ID NO:6) bzw. 5'-CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (SEQ ID NO:7). Die 5'-Enden dieser Oligonukleotide enthalten eine BamHI- bzw. eine HindIII-Restriktionsschnittstelle. Das erhaltene Amplicon (1,2 kb) wurde über 8,0 % (Gew./Vol.) Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit einer „Xtreme spin column“ (Pierce) von Salzen und freien Nukleotiden gereinigt. Danach verwendete man die oben genannten beiden Restriktionsenzyme für den Verdau des aufgereinigten Amplicons und insertierte das erhaltene, verdaute Amplicon in den Vektor pQE30 (Quiagen), der zuvor mit BamHI und HindIII verdaut worden war, wodurch man das Plasmid pSU113 erhielt. pQE30 ist ein Expressionsvektor, der zu hoher Expression eines rekombinanten Proteins mit einem 6-Polyhistidin-Tag (6 \times His) führt. Das Expressionsprodukt des Plasmids pSU113 ist somit ein 6 \times His-ZOT-Fusionsprotein. pSU113 wurde anschließend in E.coli DH5 α transformiert.

[0115] Zur Aufreinigung des 6 \times His-Zot-Fusionsproteins ließ man die erhaltenen, transformierten E.coli über Nacht bei 37 °C in 150 ml 2,0 % (Gew./Vol.) Glukose, 25 μ g/ml Kanamycin und 200 μ g/ml Ampicillin enthaltendem Luria Bertani-Nährmedium wachsen, bis die A₆₀₀ etwa 1,10 betrug. Danach gab man 75 ml der Über-Nacht-Kulturen zu 1000 ml Luria Bertani-Nährmedium, das 2,0 % (Gew./Vol.) Glukose, 25 μ g/ml Kanamycin und 200 μ g/ml Ampicillin enthielt, und inkubierte etwa 3 h bei 37 °C unter starkem Schütteln, bis die A₆₀₀ etwa 0,7-0,9 betrug. Danach gab man IPTG bis zu einer Endkonzentration von 2,0 mM zu und ließ das Wachstum 5 h bei 37 °C weiterlaufen. Anschließend wurden die Zellen durch 20minütige Zentrifugation mit $4000 \times g$ geerntet, die Zellen in 5,0 ml/g Nassgewicht Puffer A resuspendiert, der 6,0 M GuHCl, 0,1 M Natriumphosphat und 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0) enthielt, und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung 30 min mit $10.000 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert, dem erhaltenen Überstand 4,0-5,0 ml/g Nassgewicht einer 50 % Aufschlammung von SUPERFLOW-Harz (QIAGEN) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Mit dem

erhaltenen Harz wurde eine 1,6 × 8,0-Säule befüllt, die dann nacheinander gewaschen wurde mit Puffer A, Puffer B, der 8,0 M Harnstoff, 0,1 M Natriumphosphat und 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0) enthielt, und Puffer C, der 8,0 M Harnstoff, 0,1 M Natriumphosphat und 0,01 M Tris-HCl (pH 6,3) enthielt. Jeder Waschschrift wurde solange durchgeführt, bis die A_{600} der Durchflusslösung weniger als 0,01 betrug. Das 6×His-ZOT-Fusionsprotein wurde aus der Säule mit 20 ml Puffer C eluiert, der 250 mM Imidazol enthielt. Anschließend wurde die das 6×His-ZOT-Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen mit dem von Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404 (1964) beschriebenen Verfahren überprüft und das Gel mit Comassie-Blau gefärbt. Die 6×His-ZOT-Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden gegen 8,0 M Harnstoff dialysiert, vereinigt und 100-fach mit PBS verdünnt. Danach wurden 4,0 ml einer 50 % Aufschlämmung von SUPERFLOW-Harz zugegeben, 2 h bei Raumtemperatur gerührt und mit dem erhaltenen Harz eine 1,6 × 8,0-Säule beladen, die dann mit 50 ml PBS gewaschen wurde. Das 6×His-Zot-Fusionsprotein wurde mit 10 ml PBS, das 250 mM Imidazol enthielt, von der Säule eluiert. Das erhaltene Eluat wurde gegen PBS dialysiert und das 6×His-ZOT-Fusionsprotein wie oben beschrieben über SDS-PAGE überprüft.

BEISPIEL 6

Herstellung von anti-ZOT-Antiserum

[0116] Um ein spezifisches Antiserum zu erhalten, wurde ein chimäres Glutathion-S-Transferase-(GST)-ZOT-Protein exprimiert und aufgereinigt.

[0117] Genauer gesagt wurde ein Oligonukleotidprimer verwendet, um den zot-orf über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des Plasmids pBB241 (Baudry et al, supra) als Template-DNA zu amplifizieren. Der Vorwärts-Primer (TCATCACGGCGCGCCAGG, SEQ ID NO:8) entsprach den Nukleotiden 15-32 des orf von zot, und der Rückwärts-Primer (GGAGGTCTAGAATCTGCCCGAT, SEQ ID NO:9) entsprach dem 5'-Ende des orf von ctxA. Daher fehlten die Aminosäuren 1-5 von ZOT in dem erhaltenen Fusionsprotein. Das Amplifizierungsprodukt wurde in den Polylinker (SmaI-Schnittstelle) inseriert, der am Ende des GST-Gens in pGEX-2T (Pharmacia, Milwaukee, WI) lokalisiert ist. pGEX-2T ist ein Expressionsvektor für Fusionsprotein, der ein kloniertes Gen als Fusionsprotein mit GST von *Schistosoma japonicum* exprimiert. Das Fusionsgen steht unter der Kontrolle des tac-Promotors. Nach Induktion mit IPTG erfolgt eine Derepression und das GST-Fusionsprotein wird exprimiert.

[0118] Das erhaltene, als pLC11 bezeichnete rekombinante Plasmid wurde in *E. coli* DH5α elektroporiert. Zur Aufreinigung von GST-ZOT-Fusionsprotein wurden 10 ml Luria Bertani-Nährmedium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielten, mit einer einzelnen, pLC11 enthaltenden Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Man verdünnte die Kultur 1:100 in 1,0 ml des gleichen frischen Mediums und ließ sie unter Schütteln bei 37 °C bis zu etwa $1,0 \times 10^8$ Zellen/ml wachsen. Anschließend wurden 0,2 mM IPTG zugegeben, um die GST-ZOT-Expression zu induzieren, und die Kultur wurde weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien pelletiert, in 20 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) resuspendiert und über das „French Press“-Verfahren lysoziert. Das GST-ZOT-Fusionsprotein war unter diesen Bedingungen nicht löslich, da es zusammen mit der Fraktion des Bakterienpellets sedimentierte. Daher wurde das Pellet in Laemli-Lysepuffer resuspendiert, der 0,00625 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,2 M 2-ME, 2,0 % (Gew./Vol.) SDS, 0,025 % (Gew./Vol.) Bromphenolblau und 10 % (Gew./Vol.) Glycerin enthielt, eine Elektrophorese auf einem 8,0 % (Gew./Vol.) PAGE-SDS-Gel durchgeführt, und mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Unter Verwendung einer Elektroseparationskammer (Schleicher & Schuell, Keene, NH) wurde durch Elektroelution aus dem Gel eine Bande von etwa 70 kDa (26 kDa aus GST + 44 kDa aus ZOT) gewonnen, die dem Fusionsprotein entsprach.

[0119] 10 µg des erhaltenen, eluierten Proteins (10-20 µg), das mit einem gleichen Volumen Freund's komplettem Adjuvans gemischt war, wurden in ein Kaninchen injiziert. Vier und acht Wochen später wurden zwei Booster-Dosen mit Freund's unvollständigem Adjuvans verabreicht. Einen Monat später wurde Blut von dem Kaninchen abgenommen.

[0120] Um die Produktion spezifischer Antikörper zu bestimmen, wurden 10^{-10} M ZOT, zusammen mit den zwei Fusionsproteinen MBP-ZOT und GST-ZOT, auf eine Nylon-Membran transferiert und eine 1:5000-Verdünnung des Kaninchenantiseraums unter mäßigem Schütteln über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde der Filter viermal 15 min mit PBS-T gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur mit einer 1:30.000-Verdünnung von Ziege-anti-Kaninchen-IgG inkubiert, das mit Meerrettichperoxidase konjugiert war. Man wusch erneut viermal 15 min mit 0,1 % (Vol./Vol.) Tween enthaltendem PBS und wies die immunreaktiven Banden über verstärkte Chemilumineszenz (Amersham) nach.

[0121] Das Kaninchenantiserum erkannte im Immunblot ZOT ebenso wie MBP-ZOT- und GST-ZOT-Fusionsproteine, nicht dagegen die MBP-Negativkontrolle.

[0122] Um die Produktion geeigneter anti-ZOT-Antikörper zu verifizieren, wurden darüber hinaus Neutralisierungsexperimente in Ussing-Kammern durchgeführt. Bei 60minütiger Präinkubation mit pZ14-Überstand bei 37 °C war das ZOT-spezifische Antiserum (1:100-Verdünnung) in der Lage, die Rt-Abnahme, die durch ZOT bei einem in Ussing-Kammern aufgetragenen Kaninchen-Ileum induziert wurde, vollständig zu neutralisieren.

BEISPIEL 7

Aufreinigung von ZOT-Rezeptoren

A. Bindungsstudien

[0123] Das MBP-Invasin-Fusionsprotein von *Yersinia pseudotuberculosis* ist in der Lage, an den Integrin-Rezeptor von Säugetierzellen zu binden, und verleiht nicht-pathogenen *E. coli*, die das MBP-Invasin-Fusionsprotein produzierende Plasmide tragen, den invasiven Phänotyp (Leong et al, *The EMBO J.*, 9(6):1979-1989 (1990)). Daher wurden Experimente durchgeführt, um zu bestimmen, ob das MBP-ZOT-Fusionsprotein, das in Beispiel 5 oben gewonnen wurde, eine spezifische intestinale Bindungsstelle erkennt und ob es die Fähigkeit zur Erhöhung der Gewebepерmeabilität beibehält.

[0124] Genauer gesagt wurde Kaninchen-Ileum von den Muskel- und Serosaschichten befreit, in Ussing-Kammern aufgetragen und anschließend entweder mit 10^{-10} M gereinigtem MBP-ZOT oder gereinigtem ZOT in Kontakt gebracht, die beide der Mukosa-Seite der Gewebe zugegeben wurden. Als Negativkontrolle wurden 10^{-10} M MBP verwendet. Dann wurden in Intervallen von 10 min Veränderungen des Rt aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt.

[0125] Wie in [Fig. 4](#) gezeigt, induzierte gereinigtes MBP-ZOT-Fusionsprotein (Δ) eine Abnahme des Rt im Kaninchen-Ileum, die vergleichbar war mit der Abnahme, die durch gereinigtes ZOT (\square) induziert wurde, sich aber signifikant von den durch die MBP-Negativkontrolle (\blacksquare) induzierten Veränderungen unterschied. Sowohl die Wirkung von aufgereinigtem MBP-ZOT als auch die von aufgereinigtem ZOT auf Rt war innerhalb von 24 h nach Entzug der Einheiten leicht reversibel. Diese Daten zeigen, dass die ZOT-Komponente des MBP-ZOT-Fusionsproteins weiterhin in der Lage ist, den ZOT-Rezeptor zu erkennen und zu binden.

[0126] In zusätzlichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass ZOT seine permeabilisierende Wirkung nur im Jejunum und im Ileum ausübt, während das Colon nicht beeinträchtigt wird. Um zu bestimmen, ob die regionale Wirkung von ZOT mit der Verteilung des ZOT-Rezeptors auf der Oberfläche der intestinalen Enterozyten im Zusammenhang steht, wurden verschiedene intestinale Segmente, einschließlich Jejunum, distales Ileum und Colon in 4,0 % (Vol./Vol.) Paraformaldehyd fixiert, eingeschlossen und im Querschnitt geschnitten. Anschließend wurden die Sektionen 30 min entweder mit MBP-ZOT oder der MBP-Negativkontrolle inkubiert. Die Proben wurden drei Mal mit PBS gewaschen, mit 1,0 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin blockiert und anschließend 1 h mit polyklonalen anti-MBP-Kaninchenantikörpern (New England Biolabs) (Verdünnung 1:500) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (Sigma) (Verdünnung 1:100) 30 min inkubiert und anschließend mit Evans Blau (Verdünnung 1:2000) 10 min inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY) analysiert.

[0127] Die Segmente, die eine Verringerung des Rt zeigten, d. h. Jejunum und distales Ileum, zeigten eine signifikante Anzahl an fluoreszenten Partikeln auf der Oberfläche des Gewebes, während keine Bindung bei den gleichen Abschnitten des Intestinums beobachtet wurde, die mit der Negativkontrolle in Kontakt gewesen waren. Die fluoreszierende Markierung war an der Spitze der Villi maximal und nahm entlang der Achse der Villi ab. In den Colon-Segmenten, die mit ZOT in Kontakt gewesen waren, wurde keine signifikante Färbung beobachtet (Fiore et al, *Gastroenterology*, 110:A323 (1996)).

[0128] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verteilung des ZOT-Rezeptors innerhalb des Intestinums variiert, wobei dieser im Jejunum und im distalen Ileum mehr repräsentiert ist und entlang der Villi-Krypte-Achse abnimmt. Diese Verteilung stimmt mit der regionalen Wirkung von ZOT auf Rt überein, und mit der bevorzugten Umverteilung von F-Actin, die von ZOT in den reifen Zellen der Villi induziert wird, was nahelegt, dass die regionale Verteilung des ZOT-Rezeptors mit der unterschiedlichen permeabilisierenden Wirkung von ZOT auf die verschiedenen getesteten Abschnitte des Intestinums übereinstimmt. Das spärliche Vorhandensein von

ZOT-Rezeptoren im Bereich der Krypten kann die Tatsache widerspiegeln, dass diese Region im Vergleich mit dem reiferen Epithel an der Spitze der Villi bereits durchlässig ist (Marcial et al, J. Membr. Biol., 80:59-70 (1984)) und daher nicht reguliert werden muss.

[0129] Über Veränderungen der Ultrastruktur der intestinalen Mukosa in erwachsenen Menschen, die von Cholera befallen sind, wurde vor kurzem berichtet (Mathan et al, Gastroenterology, 109:422-430 (1995)). Jejunum-Biopsien, die während der akuten Phase der Krankheit entnommen wurden, zeigten eine ausgeprägte Aufweitung der lateralen intrazellulären Räume, die nur im oberen Drittel der Villi vorlag und an den Spitzen der Villi maximal war, wobei sie zur Mitte des Villus hin allmählich abnahm. Eine damit einhergehende perijunktionale Actin-Kondensation um die Zonula adherens herum wurde ebenfalls gefunden. Alle diese morphologischen Modifizierungen waren verglichen mit den Patienten mit moderater Krankheit in den Individuen mit schwerer klinischer Krankheit abnormaler (Mathan et al, supra). In der vorliegenden Erfindung wird somit angenommen, dass die von Mathan et al, supra, beobachteten Veränderungen mit dem Effekt von ZOT vorzugsweise auf reife Enterozyten der Villi in Zusammenhang stehen und somit die Verteilung des ZOT-Rezeptors beim Menschen der für Kaninchen beschriebenen Verteilung ähnelt.

[0130] Bindungsexperimente wurden auch mit mehreren Zelllinien durchgeführt, einschließlich IEC6-Zellen, CaCo2, T84 (Nath et al, supra), MDCK und Rinderendothelzellen. Genauer gesagt wurden $2,0 \times 10^5$ jeder dieser Zellen in verschiedenen Zeitintervallen (5 min, 30 min, 60 min) und Temperaturen (4 °C oder 37 °C) mit entweder 5×10^{-9} M MBP-ZOT oder $5,0 \times 10^{-9}$ M MBP Negativkontrolle inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit kaltem Methanol fixiert, drei Mal mit PBS gewaschen, mit 1,0 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin blockiert und anschließend 1 h mit polyklonalen anti-MBP-Kaninchenantikörpern (New England Biolabs) (Verdünnung 1:500) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (Sigma) (Verdünnung 1:100) 30 min inkubiert und anschließend mit Evans Blau (Verdünnung 1:2000) 10 min inkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY) analysiert.

[0131] Wenn IEC6-, CaCo2- und Rinderendothelzell-Monolayer (bei den verschiedenen getesteten Temperaturen und Zeitintervallen) mit dem MBP-ZOT-Fusionsprotein in Kontakt gebracht wurden, zeigten sie eine signifikant erhöhte Anzahl fluoreszierender Partikel im Vergleich zu Zellen, die mit der MBP-Negativkontrolle in Kontakt gebracht wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei Inkubation mit MBP-ZOT in T84- oder MDCK-Zellen keine signifikante Färbung beobachtet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ZOT mit einem spezifischen Oberflächenrezeptor interagiert, dessen Verteilung zwischen verschiedenen Zelllinien variiert.

[0132] Dieselbe Art von Experimenten wurde wiederholt unter Verwendung von IEC6-Monolayern, die 60 min bei 4 °C mit 10^{-10} M MBP-ZOT Fusionsprotein in Kontakt gebracht und anschließend mit einer 1:500-Verdünnung des anti-ZOT-Antiserums (wie in Beispiel 6 oben beschrieben erhalten) inkubiert wurden. Die Monolayer wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (Sigma) (Verdünnung 1:100) 30 min inkubiert und anschließend mit Evans Blau (Verdünnung 1:2000) 10 min inkubiert. Die Zellen wurden schließlich mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY) analysiert.

[0133] Die Zellen, die (bei den gleichen Zeitintervallen und Temperaturen wie oben beschrieben) mit dem MBP-ZOT-Fusionsprotein in Kontakt gebracht wurden, zeigten wiederum im Vergleich mit der MBP-Negativkontrolle eine signifikante Anzahl an fluoreszenten Partikeln. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Ligand aus dem MBP-ZOT-Fusionsprotein besteht und nicht aus einem Abbauprodukt, das MBP, nicht aber ZOT enthält.

[0134] Bei Verwendung von gereinigtem ZOT, der gleichen Zelllinien und der oben getesteten experimentellen Bedingungen und Inkubation der Zell-Monolayer mit anti-ZOT-Antiserum wie oben beschrieben erhielt man ähnliche Ergebnisse.

[0135] Um die Natur des ZOT-Rezeptors zu charakterisieren, wurden IEC6-Zell-Monolayer mit Proteasen (2,5 µg/ml Protease K oder 1,25 µg/ml Pronase E) 30 min bei 37 °C vorbehandelt, und die Bindungsaffinität für ZOT wie oben beschrieben bestimmt. Darüber hinaus wurden 1,0 µg/ml ZOT 30 min bei 37 °C mit entweder 1,0 mM Saccharose oder 1,0 mM Mannose vorbehandelt, bevor ZOT auf die Oberfläche des IEC6-Monolayers aufgetragen wurde. Die Bindungsaffinität für ZOT wurde erneut wie oben beschrieben bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindung von ZOT an die IEC6-Zellen durch Vorbehandlung der Zell-Monolayer mit jeder der Proteasen und durch Vorbehandlung von ZOT mit Saccharose, jedoch nicht durch Vorbehandlung mit Mannose blockiert wurde (Fiore et al, supra). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse scheint der ZOT-Rezeptor ein Gly-

coprotein zu sein.

B. Aufreinigung des ZOT-Rezeptors unter Verwendung von MBP-ZOT

[0136] Eine MBP-ZOT-Affinitätssäule wurde hergestellt, indem über Nacht bei Raumtemperatur 1,0 mg gereinigtes MBP-ZOT (wie oben in Beispiel 5 beschrieben erhalten) an ein präaktiviertes Gel (Aminolink, Pierce) immobilisiert wurde. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und anschließend mit einem rohen Zelllysate beladen, das entweder von 10^6 IEC6-Zellen (Zellen des Dünndarms der Ratte) (Quaroni et al, In: Methods in Cell Biology, Kapitel 20, 21B:403-426 (1980)) oder von CaCo2-Zellen (menschliche Intestinumzellen) (Nath et al, J. Diarrhoeal Dis., 8:133-142 (1990)) gewonnen wurde. Die Lysate wurden hergestellt, indem die Zellen drei Mal durch eine 25-gauge-Nadel geleitet wurden. Nach 90 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule drei Mal mit jeweils 14 ml PBS gewaschen und das Protein, das an die MBP-ZOT-Säule gebunden war, von der Säule mit 4,0 ml einer Lösung eluiert, die 50 mM Glycin (pH 2,5), 150 mM NaCl und 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100 enthält. Der pH der eluierten 1,0 ml-Fractionen wurde sofort mit 1,0 N NaOH neutralisiert. Anschließend wurde mit den Fractionen eine 8,0 % (Gew./Vol.) SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die SDS-PAGE wurde wie von Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404 (1964) beschrieben durchgeführt und das Gel mit Comassie Blau gefärbt.

[0137] Die eluierten Fractionen sowohl der IEC6- als auch der CaCo2-Zelllysate, mit denen die MBP-ZOT-Affinitätssäule beladen war und mit denen eine SDS-PAGE durchgeführt wurde, lieferten eine einzelne Proteinbande mit einem M_r von 66 kDa unter reduzierenden Bedingungen. Die einzelne Proteinbande jeder Zelllinie wurde anschließend auf einen Nitrozellulosefilter übertragen, wobei CAPS-Puffer verwendet wurde, der 100 ml (3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure) $10 \times$, 100 ml Methanol und 800 ml destilliertes Wasser enthält. Anschließend wurde die einzelne Proteinbande jeder Zelllinie aus dem Filter ausgeschnitten und damit eine N-terminale Sequenzierung wie von Hunkapiller, In: Methods of Protein Microcharacterization, Hrsg. Shibley, Kapitel 11-12, Humana Press, Seiten 315-334 (1985) beschrieben durchgeführt, wobei ein Perkin-Elmer Applied Biosystems Gerät „Model 494“ verwendet wurde, und als Ergebnis die folgenden N-terminalen Sequenzen erhalten:

CaCo2-Zellen – menschlicher ZOT-Rezeptor:

Xaa Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gln Glu (SEQ ID NO:10);

IEC6-Zellen – ZOT-Rezeptor der Ratte:

Ala His Lys Ser Glu Ile (SEQ ID NO:11).

[0138] Ein Vergleich der N-terminalen Sequenz des erhaltenen ZOT-Rezeptors aus CaCo2-Zellen mit der NCBI-Sequenzdatenbank unter Verwendung von BLAST zeigte Ähnlichkeiten mit der N-terminalen Region des menschlichen Serumalbumins (85 % Identität, 85 % Ähnlichkeit) und mit der N-terminalen Region des menschlichen α -1-Chimaerins (46 % Identität, 69 % Ähnlichkeit) (siehe Tabelle 2 unten).

Tabelle II

CaCo2-ZOT-Rezeptor Aminosäuren 2 – 14	Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp Leu (SEQ ID NO: 12)
Menschliches Serumalbumin Aminosäuren 20 – 31	Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu (SEQ ID NO: 13) o o o o o o o o o o o
α-1-Chimaerin Aminosäuren 17 – 29	Val His Lys Ser Lys Gln Glu Gly Arg Gln Gln Asp Leu (SEQ ID NO:14) o o o + o + o o
ZOT-Rezeptor der Ratte Aminosäuren 2 -7	Ala His Lys Ser Glu Ile (SEQ ID NO: 11) o o o o o

o zeigt Identität an; + zeigt Ähnlichkeit an

[0139] α-1-Chimaerin ist ein Neuronen-spezifisches GTPase-aktivierendes Protein für p21 rac, einem Angehörigen der Ras-Verwandten rho-Unterfamilie (Dong, Eur. J. Biochem. 227:636-646 (1994). Dieses kleine GTP-bindende Protein ist an der Regulierung von Actin-Filamenten und an der Organisation des Zytoskeletts in Säugetierzellen als Antwort auf mehrere Reize beteiligt (Ridley, Cell, 70:389-399 (1992)).

C. Aufreinigung des ZOT-Rezeptors unter Verwendung von 6 × His-ZOT

[0140] Eine 6×His-ZOT-Affinitätssäule wurde hergestellt, in dem 1,0 mg gereinigtes 6×His-ZOT (wie oben in Beispiel 5 beschrieben erhalten) bei Raumtemperatur über Nacht an ein präaktiviertes Gel (Aminolink, Pierce) immobilisiert wurde. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und anschließend mit einem rohen Zelllysate beladen, das aus 15 g Gewebe aus menschlichem Intestinum, Herz oder Gehirn gewonnen wurde. Die Lysate wurden hergestellt, indem das Gewebe drei Mal durch eine 25-gauge-Nadel geleitet wurde. Nach 90-minütiger In-

kubation bei Raumtemperatur wurde die Säule drei Mal jeweils mit 14 ml PBS gewaschen, und das Protein, das an die 6×His-ZOT-Säule band, wurde mit 4,0 ml einer Lösung eluiert, die 50 mM Glycin (pH 2,5), 150 mM NaCl und 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100 enthielt. Der pH der eluierten 1,0 ml-Fraktionen wurde sofort mit 1,0 N NaOH neutralisiert. Anschließend wurde mit den Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen eine 8,0 % (Gew./Vol.) SDS-PAGE durchgeführt. Die SDS-PAGE wurde durchgeführt wie von Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404 (1964) beschrieben, und das Gel mit Comassie-Blau gefärbt.

[0141] Die eluierten Fraktionen der Intestinum-, der Herz- und der Hirngewebelysate, mit denen die 6×His-ZOT-Affinitätssäule beladen war und mit denen eine SDS-PAGE durchgeführt wurde, lieferten alle eine einzelne Proteinbande mit einem M_r von 45 kDA unter reduzierenden Bedingungen. Die einzelne Proteinbande jedes Gewebes wurde anschließend auf eine PVDF-Membran (Biorad) übertragen, wobei CAPS-Puffer verwendet wurde, der 100 ml (3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure) 10 ×, 100 ml Methanol und 800 ml destilliertes Wasser enthielt. Anschließend wurde die einzelne Proteinbande jedes Gewebes aus dem Filter ausgeschnitten und damit eine N-terminale Sequenzierung wie von Hunkapiller, In: Methods of Protein Microcharacterization, Hrsg. Shibley, Kapitel 11-12, Humana Press, Seiten 315-334 (1985) beschrieben durchgeführt, wobei ein Perkin-Elmer Applied Biosystems Gerät „Model 494“ verwendet wurde, und dabei wurden die folgenden N-terminalen Sequenzen erhalten:

ZOT-Rezeptor des menschlichen Gehirns:

Xaa Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly Gly Val Gly His Lys Tyr (SEQ ID NO: 1);

ZOT-Rezeptor des menschlichen Intestins:

Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile Gly (SEQ ID NO: 2).

ZOT-Rezeptor aus dem menschlichen Herz:

Xaa Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg Arg Gln (SEQ ID NO: 3).

[0142] Ein Vergleich der N-terminalen Sequenz des erhaltenen ZOT-Rezeptors aus menschlichem Gehirn mit der NCB1-Sequenzdatenbank unter Verwendung von BLAST zeigte Ähnlichkeiten mit der N-terminalen Region von Calprotectin (72 % Identität, 72 % Ähnlichkeit) (siehe Tabelle 3 unten).

Tabelle III

Menschliches Gehirn Aminosäuren 2 – 19 (SEQ ID NO: 15)	Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly Gly Val Gly His Lys Tyr
Calprotectin Aminosäuren 2 – 19 (SEQ ID NO: 16)	Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr His Lys Tyr
	o o o o o o o o o o o o o o o o

o zeigt Identität an; + zeigt Ähnlichkeit an

[0143] Calprotectin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 8-14 KDa und bindet an Calcium (Odink et al, Nature, 330:80-82(1987); Lemarchard et al, J. Biol. Chem., 267:19379-19382 (1992); und Schafer et al, Biol. Chem. Hoppe, Seyler, 372:1-4 (1991)).

[0144] Ein Vergleich der N-terminalen Sequenz des erhaltenen ZOT-Rezeptors aus menschlichem Intestinum mit der NBCI-Sequenzdatenbank unter Verwendung von BLAST zeigte Ähnlichkeiten mit einer internen Region eines Proteolipid-Proteins (Lipophilan) (92 % Identität, 92 % Ähnlichkeit) (siehe Tabelle IV unten).

Tabelle IV

Menschliches Intestinum Aminosäuren 1– 13	Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile Gly (SEQ ID NO: 2)
Proteolipid-Protein Aminosäuren 186 -198	Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly (SEQ ID NO: 17)
	o o o o o o o o o o o o o o o

o zeigt Identität an; + zeigt Ähnlichkeit an

[0145] Das Proteolipid-Protein (PLP) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30,5 kDA und stellt ein integrales Membranprotein dar, das eine wichtige Rolle bei der Bildung oder der Aufrechterhaltung der multi-laminaren Struktur von Myelin spielt (Diehl et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:9807-9811 (1986)).

[0146] Ein Vergleich der N-terminalen Sequenz des erhaltenen ZOT-Rezeptors aus dem menschlichen Herz mit der NCBI-Sequenzdatenbank unter Verwendung von BLAST zeigte Ähnlichkeiten mit der Cardilipin-bindenden Domäne von Creatinkinase (100 % Identität) (siehe Tabelle V unten).

Tabelle V

Menschliches Herz Aminosäuren 2 - 15	Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala Asp Tyr (SEQ ID NO: 18)
Menschliche Creatinkinase, sarkomer-mitochondrial Aminosäuren 41 - 54	Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala Asp Tyr o o o o o o o o o o o o o o o

o zeigt Identität an; + zeigt Ähnlichkeit an

[0147] Das menschliche Creatinkinase sarkomer-mitochondriale Protein ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 46 kDA und spielt eine zentrale Rolle bei der Energieübertragung in Geweben mit großem, fluktuierendem Energiebedarf.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: FASANO, Alessio

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: ZONULA OCCLUDENS-TOXINREZEPTOR

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: SUGHRUE, MION, ZINN, MACPEAK & SEAS

(B) STRASSE: 2100 Pennsylvania Avenue, N.W. ,
Suite 800

(C) STADT: Washington, D.C.

(D) STAAT: D.C.

(E) LAND: U.S.A.

(F) POSTLEITZAHL: 20037

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy-Disk

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) EINREICHUNGSDATUM: 18 FEB 1998

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vi) ANGABEN ZU FRÜHERER ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER. 09/024,198

(B) EINREICHUNGSDATUM: 17 FEB 1998

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) ANGABEN ZU FRÜHERER ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: 08/803,364

(B) EINREICHUNGSDATUM: 20 FEB 1997

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) ANGABEN ZU ANWALT/ VERTRETER:

(A) NAME: KIT, GORDON

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30,764

(C) REFERENZ/ AKTENZEICHEN: F-121122

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

(A) TELEFON: (202) 293-7060

(B) TELEFAX: (202) 293-7860

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

Xaa Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly

1 5 10

Gly Gly Val Gly His Lys Tyr

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile

1 5 10

Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

Xaa Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser
 1 5 10
 Ala Asp Tyr
 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg
 1 5 10
 Arg Gln

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

Lys Gly Phe Ser Tyr Phe Gly Glu Asp Leu Met Pro
 1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

CGGGATCCCG TATGAGTATC TTT

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Nukleinsäuren

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

CCCAAGCTTG GGTCAAATA TACT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

TCATCACGGC GCGCCAGG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

GGAGGTCTAG AATCTGCCCCG AT

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

Xaa Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys

1

5

10

Asp Leu Gln Glu

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

Ala His Lys Ser Glu Ile

1

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp

1

5

10

Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp

1

5

10

Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

Val His Lys Ser Lys Gln Glu Gly Arg Gln Gln Asp

1

5

10

Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly

1 5 10

Gly Val Gly His Lys Tyr

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile

1 5 10

Asp Val Tyr His Lys Tyr

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile

1 5 10

Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:18

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala

1

5

10

Asp Tyr

Patentansprüche

1. Gereinigter Rezeptor für das Zonula-Occludens-Toxin aus *Vibrio cholera*, entweder mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3, oder mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10.

2. Gereinigter Rezeptor für das Zonula-Occludens-Toxin aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 1, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 ist.

3. Gereinigter Rezeptor für das Zonula-Occludens-Toxin aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 1, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 ist.

4. Gereinigter Rezeptor für das Zonula-Occludens-Toxin aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 1, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 ist.

5. Gereinigter Rezeptor für das Zonula-Occludens-Toxin aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 1, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:10 ist.

6. Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera*, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Durchführung eines Affinitätsbindungsassays für eine Testsubstanz, wobei als Einfang-Ligand entweder ein gereinigter Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3, oder ein gereinigter Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10, verwendet wird; und

(b) Durchführung eines Assays für diese Testverbindung, um zu bestimmen, ob die Testverbindung die biologische Aktivität von ZOT besitzt, wobei die biologische Aktivität von ZOT die Fähigkeit ist, in reversibler Weise durch Modulation der Struktur interzellulärer „tight junctions“ die Epitheldurchlässigkeit zu erhöhen, wobei die Testsubstanz, wenn sie spezifisch an den Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* bindet, aber keine biologische ZOT-Aktivität besitzt, ein Antagonist des ZOT aus *Vibrio cholera* ist.

7. Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 6, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 ist.

8. Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 6, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 ist.

9. Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 6, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 ist.

10. Verfahren zum Screening auf einen Antagonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera* nach Anspruch 6, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:10 ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, das weiterhin den Schritt der Herstellung des Antagonisten umfasst.

12. Verfahren zum Screening auf einen Agonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera*, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Durchführung eines Affinitätsbindungsassays für eine Testsubstanz, wobei als Einfang-Ligand entweder ein gereinigter Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3, oder ein gereinigter Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und mit einer N-terminalen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:10, verwendet wird; und

(b) Durchführung eines Assays für diese Testverbindung, um zu bestimmen, ob die Testverbindung die biologische Aktivität von ZOT besitzt, wobei die biologische Aktivität von ZOT die Fähigkeit ist, in reversibler Weise durch Modulation der Struktur interzellulärer „tight junctions“ die Epitheldurchlässigkeit zu erhöhen, wobei die Testsubstanz, wenn sie spezifisch an den Rezeptor für ZOT aus *Vibrio cholera* bindet und biologische ZOT-Aktivität besitzt, ein Agonist des ZOT aus *Vibrio cholera* ist.

13. Verfahren zum Screening auf einen Agonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera*, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 ist.

14. Verfahren zum Screening auf einen Agonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera*, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 ist.

15. Verfahren zum Screening auf einen Agonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera*, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 ist.

16. Verfahren zum Screening auf einen Agonisten des Zonula-Occludens-Toxins (ZOT) aus *Vibrio cholera*, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz SEQ ID NO:10 ist.

17. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, das weiterhin den Schritt der Herstellung des Agonisten umfasst.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

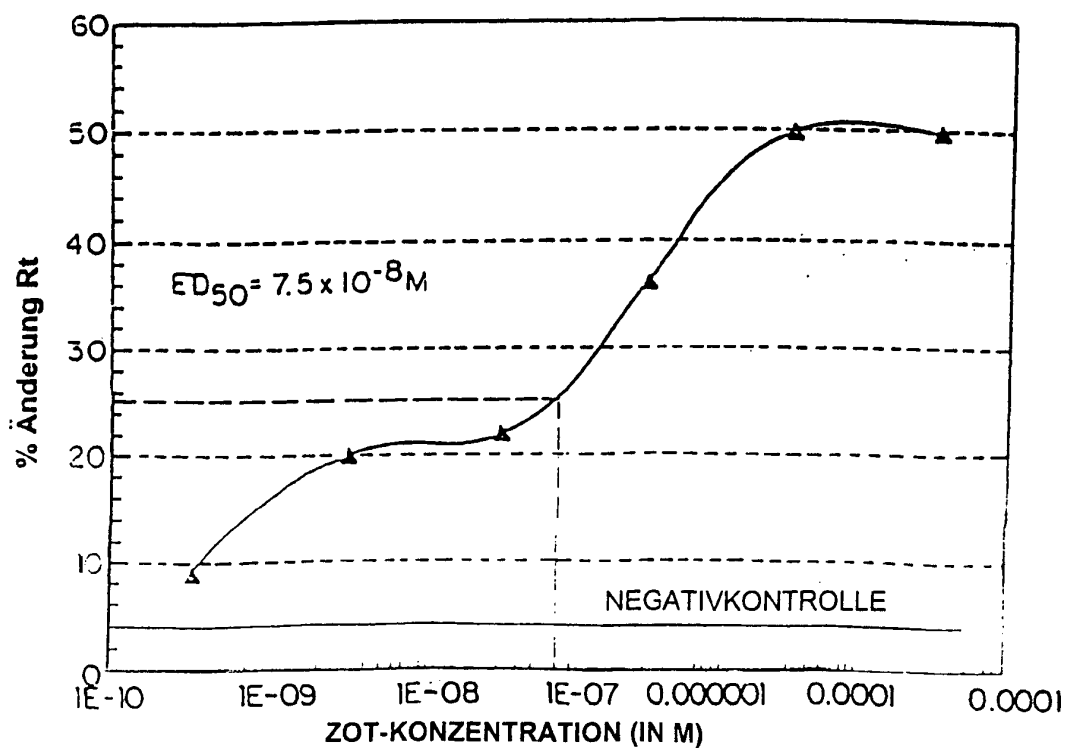
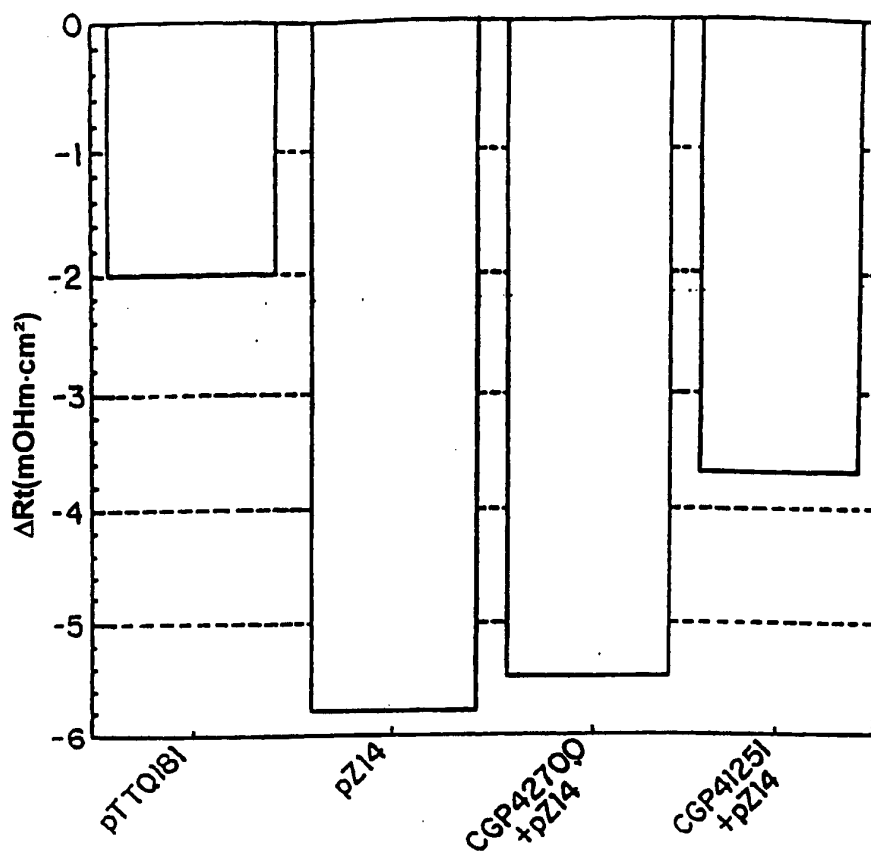


FIG. 3

FIG. 2A

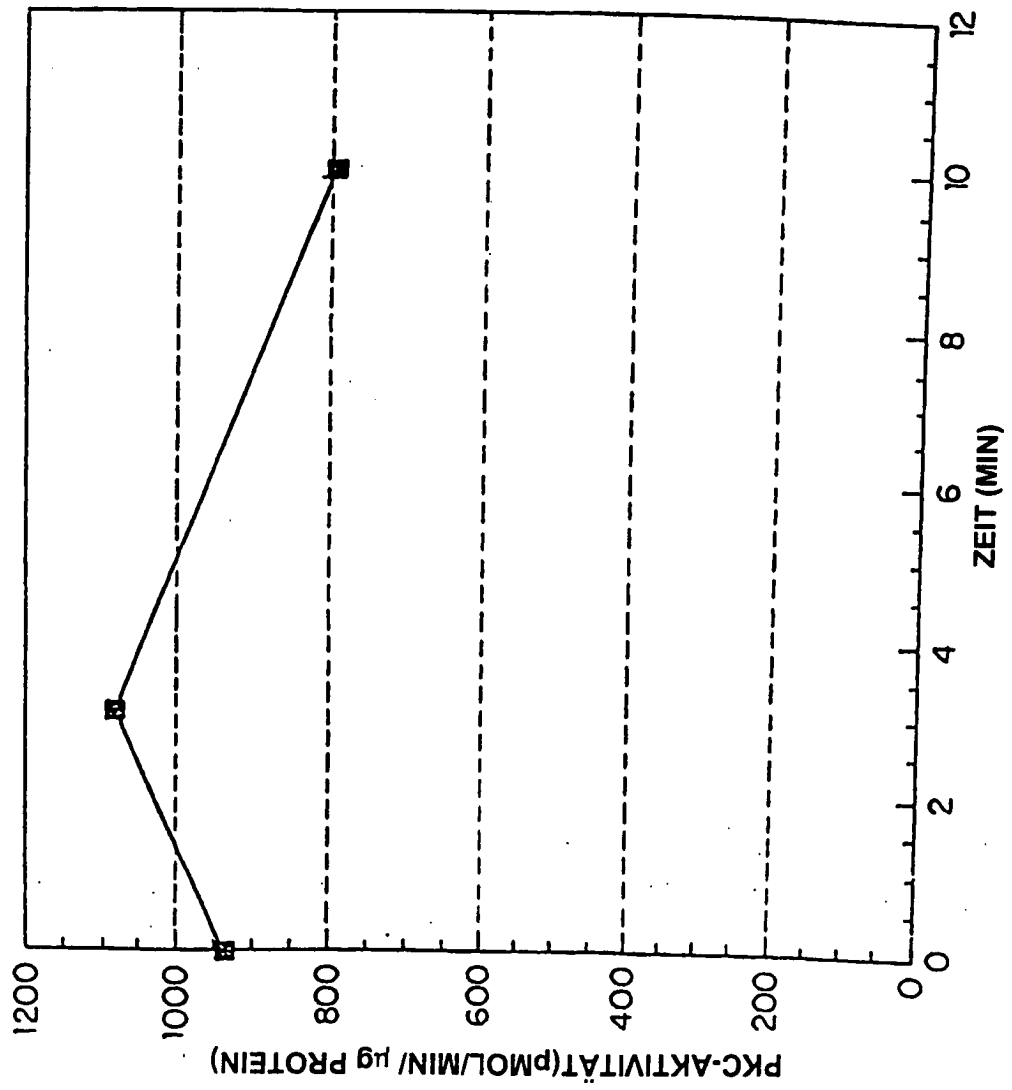


FIG. 2B

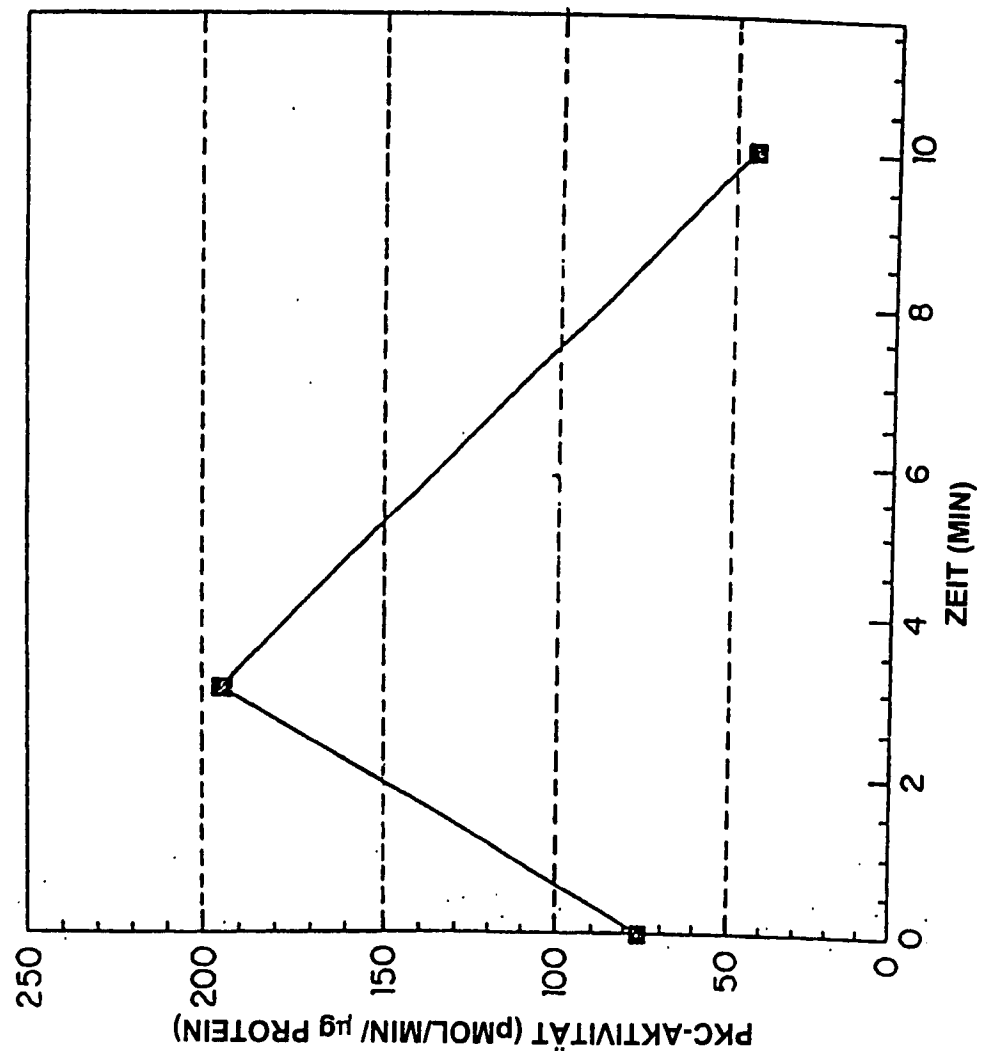


FIG. 4

