

**Claudin-Targeting durch *Clostridium perfringens*
Enterotoxin-Biologika für die Diagnose und Behandlung
von Tumoren sowie zur Modulation der epidermalen
Barriere**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Laura-Sophie Beier

Berlin, 15. Dezember 2020

Die Dissertation wurde am Institut für Klinische Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in Kooperation mit dem Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie im Zeitraum von Oktober 2017 bis Dezember 2020 unter der Leitung von PD habil. Dr. rer. nat. Jörg Piontek und Dr. rer. nat. Gerd Krause angefertigt.

1. Gutachter: PD habil. Dr. rer. nat. Jörg Piontek
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Oschkinat

Disputation am 04.05.2021

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Hr. PD. Dr. Jörg Piontek für die Vergabe des Themas, die geduldige Begleitung meiner Arbeit und die sehr gute Zusammenarbeit. Sein herausragendes persönliches Engagement, wertvoller Rat und die intensiven Anregungen haben entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich nicht nur gefordert, sondern vor allem gefördert.

Bei Hr. Prof. Dr. Hartmut Oschkinat möchte ich mich herzlich für die freundliche Bereitschaft, die gutachterliche Tätigkeit zu übernehmen, bedanken.

Hr. Dr. Gerd Krause danke ich recht herzlich dafür, dass auch er als Betreuer immer ein offenes Ohr für mein Projekt hatte und mir immer unterstützend zur Seite stand.

Bei Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke und Prof. Dr. Michael Fromm möchte ich mich für die Möglichkeit, am Institut für Klinische Physiologie meine Doktorarbeit anzufertigen, bedanken. Gefördert wurde diese durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 2318.

Fr. Dr. Anna Piontek und Hr. Dr. Jonas Protze danke ich herzlich für die experimentelle Unterstützung sowie die gute Zusammenarbeit beim Verfassen der Publikationen. Bei Hr. Dr. Jonas Protze möchte ich mich auch besonders für die Einführung in die Strukturbiologie und Homologiemodellierung bedanken und dafür, dass er mich auch in allen anderen Angelegenheiten der Dissertation stets unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Kollegen am Institut für Klinische Physiologie für die gute und angenehme Zusammenarbeit. Fr. Prof. Dorothee Günzel und Fr. PD. Dr. Rita Rosenthal danke ich für die hervorragende Organisation und Betreuung im Graduiertenkolleg, Fr. PD. Dr. Susanne Krug für ihre Bereitschaft, als Thesis Committee Mitglied meine Arbeit zu begleiten, und Fr. In-Fah Lee, Fr. Anja Fromm, Fr. Britta Jebautzke und Fr. Claudia Heldt für ihre engagierte und freundliche Unterstützung im Labor. Ein besonderer Dank gilt Carlitos, Line, Fábía, Carolin, Roman, Jakob, Praveen, Debbie, Dani, Franni und Jia-Chen für die vielen Gespräche, gemeinsamen Mittagspausen und Unternehmungen, die immer für Unterhaltung und die nötige Abwechslung gesorgt haben.

Ich danke Fr. Dr. Federica Branchi, Hr. PD Dr. Christian Bojarski und Hr. PD. Dr. Michael Schumann für die Bereitstellung der Biopsien, Hr. Dr. Lukas Ehlen und Fr. Janine Arndt für die Möglichkeit, an ihren Organoidmodellen Experimente durchführen zu können und Fr. Prof. Dr. Johanna Brandner und Fr. Sabine Vidal für die Bereitstellung der Epidermismodelle.

Hr. Dr. Jens Wiehler danke ich herzlich für die sehr hilfreiche Unterstützung als mein Mentor. Bei meinen Freunden möchte mich dafür bedanken, dass sie mir immer zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie dafür, dass sie mich immer und auf jede Art unterstützt hat.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Anh, weil er immer an meiner Seite war, Erfolge mit mir zusammen gefeiert und mich in schwierigen Phasen unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	11
Tabellenverzeichnis.....	13
Abkürzungsverzeichnis.....	14
I. Zusammenfassung.....	18
II. Abstract.....	20
1 Einleitung.....	22
1.1 <i>Clostridium perfringens</i>	22
1.2 <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin.....	23
1.2.1 Struktur und funktionale Domänen von CPE.....	24
1.2.2 Produktion von CPE.....	25
1.2.3 Zellulärer Wirkmechanismus von CPE.....	26
1.3 Die Proteinfamilie der Claudine.....	28
1.3.1 Topologie und Struktur von Claudinen.....	28
1.3.2 Claudine als Bestandteil des apikalen Tight Junction-Komplexes.....	29
1.3.3 Claudin-Deregulierung in der Kanzerogenese.....	32
1.4 Die Interaktion zwischen Claudinen und CPE.....	34
1.4.1 CPE-Rezeptoren bilden eine Untergruppe der Claudine.....	34
1.4.2 Das CPE-Bindungsmotiv in Claudinen.....	35
1.4.3 Die Claudinbindungstasche in CPE.....	36
1.4.4 Änderungen der Claudin-Spezifität durch strukturbasierte Mutagenese von CPE und cCPE.....	38
1.5 Anwendungsmöglichkeiten von CPE und cCPE.....	38
1.5.1 cCPE in der Diagnose prä-kanzeröser Kolonläsionen.....	39
1.5.2 CPE in der Therapie Claudin-überexprimierender Tumore.....	40
1.5.3 Modulierung physiologischer Barrieren durch cCPE.....	41
1.6 Zielsetzung.....	42
2 Material.....	45

2.1	Chemikalien	45
2.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	48
2.3	Kits.....	49
2.4	Enzyme.....	50
2.5	Puffer und Lösungen.....	50
2.5.1	Allgemeine Puffer.....	50
2.5.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	50
2.5.3	Zellulärer Bindungsassay	50
2.5.4	Coomassie-Färbung.....	51
2.5.5	Immunfluoreszenz-Färbung.....	51
2.5.6	MTT-Zytotoxizitätsassay	51
2.5.7	Aufreinigung von GST-cCPE.....	52
2.5.8	Aufreinigung von 6× His-markiertem CPE und YFP-cCPE.....	52
2.5.9	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	52
2.5.10	Western Blots.....	53
2.6	Zellen	53
2.6.1	Prokaryotische Zellen.....	53
2.6.2	Eukaryotische Zellen	53
2.7	Medien	54
2.7.1	Medien für die Bakterienkultivierung.....	54
2.7.2	Medien für die Zellkultur	54
2.8	Antikörper.....	54
2.8.1	Primärantikörper.....	54
2.8.2	Sekundärantikörper	55
2.9	Plasmide	55
2.10	Oligonukleotide	57
2.11	Verwendung menschlicher Proben.....	57
3	Methoden	58
3.1	Molekularbiologische Methoden	58
3.1.1	Klonierung von cCPE in den Vektor pET-28a	58

3.2	Biochemische Methoden	66
3.2.1	Expression und Aufreinigung von GST-cCPE.....	66
3.2.2	Expression and Anreicherung von 6 × His-markiertem CPE and YFP-cCPE ..	67
3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	68
3.2.4	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	69
3.2.5	Detektion von Proteinbanden mit Coomassie-Brillantblau	69
3.2.6	<i>Fast Semi-Dry</i> Western Blot.....	70
3.2.7	Kovalente Markierung von cCPE mit einem Fluorophor	71
3.3	Zellbiologische Methoden.....	71
3.3.1	Standardbedingungen zum Arbeiten mit Zellkulturen	71
3.3.2	Kultivierung und Passagieren von Zellen.....	71
3.3.3	Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen	72
3.3.4	Zelluläre Bindungsassays mit GST-cCPE-Proteinen	73
3.3.5	MTT-Zytotoxizitätsassay mit His-CPE-Proteinen	74
3.3.6	Behandlung von HT-29/B6-Zellen mit cCPE-Proteinen	75
3.3.7	cCPE-Behandlung eines <i>ex vivo</i> entzündeten Kolonmodells.....	75
3.3.8	<i>Ex vivo</i> -cCPE-Behandlung humaner Kolonpolypen.....	76
3.3.9	Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Zellen und <i>whole mount</i> -Präparaten ..	77
3.3.10	cCPE-Behandlung eines humanen Epidermismodells.....	79
3.3.11	YFP-cCPE-Behandlung von Magenkarzinom-Organoiden	80
3.3.12	Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten	80
3.4	Bioinformatische Methoden	81
3.4.1	Homologiemodellierung von Claudinen und Claudin/cCPE-Komplexen	81
3.4.2	Visualisierung.....	82
3.5	Statistik	83
4	Ergebnisse	84
4.1	Untersuchungen zur Interaktion zwischen cCPE und den Claudinen	84
4.1.1	Die Mutation S231R/S313H erweitert das Rezeptorspektrum von cCPE um die Claudine 1, 2 und 5	84

4.1.2	Vergleich der Konformationen des Claudin-cCPE-Komplexes in den Kristallstrukturen.....	87
4.1.3	Interaktionsmodelle der Claudine 1 und 5 mit cCPE-S231R/S313H liefern Hinweise auf eine mögliche Flexibilität der Claudinkonformation.....	89
4.2	Einsatz von CPE-S231R/S313H in der Tumorthherapie.....	92
4.2.1	cCPE-S231R/S313H bindet an Claudin-exprimierende Bronchialkarzinomzellen	92
4.2.2	CPE-S231R/S313H reduziert die Viabilität von Bronchialkarzinomzellen	94
4.3	cCPE-basierte molekulare Sonden für die Tumordiagnostik.....	95
4.3.1	Detektion der cCPE-Bindung in Claudin-exprimierenden Kolonkarzinomzellen	96
4.3.2	cCPE-SSS bindet an Zellen mit veränderten Tight Junctions in einem <i>in vitro</i> -Modell eines entzündeten Kolonepithels	102
4.3.3	cCPE-SSS bindet an Zellen mit delokalisierten Tight Junctions in humanen kolorektalen Polypen.....	104
4.3.4	Magenkarzinome exprimieren Rezeptorclaudine für cCPE-SSS	105
4.3.5	Die Bindung von cCPE-SSS kann in Echtzeit auf der Oberfläche lebender Magenkarzinom-Organoiden detektiert werden	108
4.3.6	cCPE-SSS bindet spezifisch an extrajunktionale Claudine in Magenkarzinom-Organoiden	108
4.4	Modulierung der epidermalen Tight Junction-Barriere durch cCPE-Varianten	109
4.4.1	In rekonstruierter humaner Epidermis werden relevante Claudine exprimiert	109
4.4.2	cCPE-Varianten binden an Claudine in rekonstruierter humaner Epidermis und öffnen die Tight Junction-Barriere.....	110
5	Diskussion.....	114
5.1	Neuartige cCPE-Varianten ermöglichen weitere strukturelle Analysen zur Interaktion zwischen cCPE und Claudinen.....	114
5.1.1	Strukturelle Grundlagen der Interaktion zwischen cCPE-S231R/S313H und den Claudinen 1 bis 7.....	114
5.1.2	Claudin-cCPE-Interaktionsmodelle geben Aufschluss über eine mögliche Flexibilität der Konformation des Heterokomplexes	115
5.2	CPE-Varianten für die Therapie Claudin-überexprimierender Karzinome	118

5.2.1	CPE-S231R/S313H ermöglicht den gezielten Angriff auf Claudin-1-überexprimierende Karzinomzellen	118
5.2.2	Vorteile von CPE-Varianten gegenüber anti-Claudin-Antikörpern in der Tumorthherapie	119
5.2.3	Einschränkungen in der Anwendbarkeit von CPE-Varianten zur Tumorthherapie 120	
5.3	Anwendung von cCPE-basierten molekularer Sonden für die Detektion Claudin-überexprimierender Tumoren.....	121
5.3.1	Generierung Fluorophor-markierter cCPE-Varianten.....	121
5.3.2	Detektion von Claudinen in einem <i>in vitro</i> -Zellmodell mit Fluorophor-markierten cCPE-Varianten.....	122
5.3.3	Die Lokalisation der Claudine ändert sich Verlauf der Differenzierung von HT-29/B6-Zellen.....	123
5.3.4	cCPE bindet nicht an junctionale Claudine	123
5.3.5	Fluorophor-markierte cCPE-Varianten zur Detektion (prä)maligner Kolonläsionen.....	124
5.3.6	Charakterisierung von Magenkarzinomorganoiden mittels YFP-cCPE	127
5.4	Modulierung der epidermalen Barriere durch cCPE-Varianten	130
5.5	Fazit und Ausblick	133
6	Literaturverzeichnis	135
7	Anhang.....	154
7.1	Proteinaufreinigungen	154
7.1.1	Expression und Aufreinigung von GST-cCPE.....	154
7.1.2	Expression und Anreicherung von 6 × His-markierten Proteinen	155
7.2	Durch die Doppelmutation S231R/S313H wird die Affinität von cCPE für die Claudine 1, 2 und 5 erhöht.....	156
7.3	Expression von Claudinen in Bronchialkarzinomzelllinien.....	157
7.4	Histopathologische Klassifizierung der Magenkarzinome	157
7.5	Impedanzspektroskopische Messungen an cCPE-behandelten <i>in vitro</i> -Epidermismodellen	158
8	Verzeichnis der eigenen Publikationen.....	162

9 Lebenslauf.....163

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schema zur Serotypisierung von Clostridium perfringens Stämmen.....	22
Abbildung 2 Struktur von CPE.....	24
Abbildung 3 Zellulärer Wirkmechanismus von CPE.....	26
Abbildung 4 Claudin-Topologie.....	29
Abbildung 5 Tight Junctions bilden eine parazelluläre Barriere.....	30
Abbildung 6 Barrierefunktionen der Tight Junctions.....	31
Abbildung 7 Claudine in der Kanzerogenese.....	33
Abbildung 8 Das CPE-Bindungsmotiv in der EZS2 der Claudine.....	36
Abbildung 9 Die Claudinbindungstasche in cCPE.....	37
Abbildung 10 Interaktionsmodelle für cCPE-S231R/S313H mit den Claudinen 1 bis 7.....	85
Abbildung 11 Konformationen des Claudin-cCPE-Komplexes.....	87
Abbildung 12 Die Konformation der Transmembranhelix 3 der Claudine beeinflusst mögliche Interaktionen mit cCPE-S231R/S313H.....	90
Abbildung 13 cCPE-S231R/S313H bindet an Claudin-exprimierende Bronchialkarzinomzellen.....	93
Abbildung 14 Claudin-bindende CPE-Varianten sind stark zytotoxisch für die NSCLC-Zellen PC-9.....	94
Abbildung 15 Detektion der Bindung von GST-cCPE-Varianten in subkonfluenten HT-29/B6-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	97
Abbildung 16 Detektion der cCPE-Bindung in subkonfluenten HT-29/B6-Zellen mit Fluorophor-gekoppelten cCPE-Varianten.....	98
Abbildung 17 Die Entwicklung der TJ-Barriere in HT-29/B6-Zellen lässt sich mithilfe von CellMask™ und YFP-cCPE visualisieren.....	101
Abbildung 18 Die Bindung von cCPE-SSS an delokalisierte Claudine in einem ex vivo-Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen lässt sich spezifisch über das konjugierte Fluorophor Alexa Fluor 647 nachweisen.....	103
Abbildung 19 cCPE-SSS bindet spezifisch an Zellen mit dysregulierten Tight Junctions in humanen kolorektalen Polypen.....	105
Abbildung 20 Mit YFP-cCPE-SSS können Claudine in lebenden Magenkarzinomorganoiden visualisiert werden.....	107
Abbildung 21 Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen in rekonstruierter humaner Epidermis.....	110
Abbildung 22 cCPE-Varianten binden an Claudine in rekonstruierter humaner Epidermis.....	113
Abbildung 23 Mögliche Flexibilität des Claudin-cCPE-Komplexes.....	118

Abbildung 24 Einsatz von cCPE-basierten molekularen Sonden zur Claudindetektion im Rahmen der Karzinogenese Claudin-überexprimierender Tumoren..	125
Abbildung 25 In vitro-Modulierung der epidermalen TJ-Barriere durch cCPEwt und -SSS..	131
Abbildung 26 Expression und Aufreinigung von GST-cCPE.	154
Abbildung 27 Expression und Anreicherung von 6 × His-CPE.	155
Abbildung 28 Expression und Aufreinigung von 6 × His-eYFP-cCPE.....	155
Abbildung 29 Die Doppelmutation S231R/S313H erweitert das Spektrum von Rezeptorclaudinen für cCPE um die Claudine 1, 2 und 5.	156
Abbildung 30 Claudinexpressionsmuster von Bronchialkarzinomzellen.....	157
Abbildung 31 Hämatoxylin- und Eosinfärbung der primären Magenkarzinome..	158
Abbildung 32 Ersatzschaltkreise für epitheliale Monolayer und rekonstruierte humane Epidermis.	159
Abbildung 33 In vitro-Modulierung der epidermalen Barriere durch Entfernung von Cldn1 und -4 aus den Tight Junctions.....	160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einfacher PCR-Ansatz	59
Tabelle 2 PCR-Programm zum Einfügen von Restriktionsstellen in cCPE.....	60
Tabelle 3 Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau	63
Tabelle 4 Reaktionsansatz für eine Ligation mit T4 DNA Ligase.....	63
Tabelle 5 Verdünnung der Antikörper für den Western Blot.....	70
Tabelle 6 Kultivierungsmedien für Zelllinien.....	72
Tabelle 7 Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorophore im zellulären Bindungsassay.....	74
Tabelle 8 Versuchsablauf, Lösungen und Inkubationszeiten bei der Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von HT-29/B6-Zellen und whole mount-Präparaten (Rattenkolon, humane kolorektale Polypen).	77
Tabelle 9 Übersicht über die verwendeten Antikörper, Fluorophore und ihre Detektion für die Analyse von Zellen und whole mount-Präparaten.....	79
Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Antikörper, Fluorophore und ihre Detektion für die Analyse von Paraffinschnitten.	81
Tabelle 11 Klinische Merkmale der Patienten und ihrer Magenkarzinome.....	106

Abkürzungsverzeichnis

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	MTT
4',6-Diamidin-2-phenylindol	DAPI
Adenin (in Nukleotidsequenzen)	A
Alanin (in Aminosäuresequenzen)	A
Aminosäure	AS
Amino-Terminus	N-Terminal
Ammoniumpersulfat	APS
Ampicillin	Amp
Ampicillinresistenz	AmpR
Anregungswellenlänge	λ_{exc}
apikal	ap
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
basolateral	bl
bidestilliertes Wasser	ddH ₂ O
Carboxy-Terminus	C-terminus
Claudin-#	Cldn#
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>
<i>Clostridium perfringens</i> α -toxin	CPA
<i>Clostridium perfringens</i> β -toxin	CPB
<i>Clostridium perfringens</i> ϵ -toxin	ETX
<i>Clostridium perfringens</i> ι -toxin	ITX
<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin	CPE
<i>cyan fluorescent protein</i> , cyan-fluoreszierendes Protein	CFP
Cystein (in Aminosäuresequenzen)	C
Cytosin (in Nukleotidsequenzen)	C
Desoxyadenosintriphosphat	dATP
Desoxycytidintriphosphat	dCTP
Desoxyguanosintriphosphat	dGTP
Desoxyribonukelinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>	DNA
Desoxyribonukleosidtriphosphat	dNTPs
Desoxythymidintriphosphat	dTTP
Didesoxyribonukleosidtriphosphat	ddNTP

Dimethylsulfoxid	DMSO
Dubecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Emissionswellenlänge	λ_{em}
Endkonzentration, <i>final concentration</i>	f.c.
Ethylendiamintetraessigsäure, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	EDTA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure, <i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>	EGTA
extrazelluläre Helix	EZH
extrazelluläres Segment	EZS
<i>Fast Semi-Dry</i> Transfer	FSDT
fetales Kälberserum, <i>fetal bovine serum</i>	FBS
Fusionsprotein aus GST und cCPE	GST-cCPE
Fusionsprotein aus YFP und cCPE	YFP-cCPE
gelb fluoreszierendes Protein, <i>Yellow Fluorescent Protein</i>	YFP
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glutathion S-Transferase	GST
Glycin	G
grün fluoreszierendes Protein, <i>Green Fluorescent Protein</i>	GFP
Guanin	G
Histidin	H
humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonic kidney 293</i>	HEK-293
Hybrid aus trp and lac Promoter	trc Promoter
intrazellulärer Loop	IZL
Isoleucin	I
Kanamycin	Kana
Kanamycinresistenz	KanaR
Knockdown	KD
Kondensator	C
lebende Zellschichten der Epidermis, <i>viable epidermis</i>	VE
Leucin	L
Lysin	K
<i>lysogeny broth</i>	LB
Matrixvolumen	MV
Methionin	M
Minimal Essential Medium	MEM

Molekulargewicht, <i>molecular weight</i>	MW
Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfat</i>	SDS
Ni ²⁺ -Iminodiessigsäureagarose	Ni-IDA
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin	TEMED
Paraformaldehyd	PFA
parazellulär	para
Penicillin/Streptomycin solution	Pen/Strep
Phenylalanin	F
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF
Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne CaCl ₂ and MgCl ₂	PBS
Phosphat-gepufferte Salzlösung mit CaCl ₂ and MgCl ₂	PBS (+/+)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	PAGE
Poly-L-Lysin	PLL
Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>	PCR
Polyvinylidenfluorid	PVDF
Polyvinylpyrrolidone, mittleres Molekulargewicht 40 000 g/mol	PVP40
Prolin	P
Protease Inhibitor Cocktail	PIC
Protein Data Bank	PDB
Proteinsynthese-inhibierender Faktor, <i>protein synthesis inhibition factor</i>	PSIF
Raumtemperatur	RT
rekonstruierte humane Epidermis	RHE
Resonanzfrequenz	f
Roswell Park Memorial Institute Medium	RPMI-1640
Serin	S
Standardfehler des Mittelwertes, engl. <i>standard error of the mean</i>	SEM
<i>Stratum corneum</i>	SC
<i>Stratum granulosum</i>	SG
Transepithelialer Widerstand, engl. <i>transepithelial resistance</i>	TER
Transmembranhelix	TMH
Threonin (in Aminosäuresequenzen)	T
Thymin (in Nukleotidsequenzen)	T
Tight Junction	TJ
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	TAE-Puffer
TRIS-Borat-EDTA-Puffer	TBE-Puffer

TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween 20	TBS-T
TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS
TRIS-EDTA Citrat Puffer	TEC-Puffer
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V
Widerstand	R
Wildtyp	wt
<i>Zonula Occludens-1</i>	ZO-1

Abkürzungen der Mutationen in CPE und cCPE

N218Q/Y306W/S313H	NQYWSH
S231R/S313H	SRSH
S305P/S307R/S313H	SSS
Y306A/L315A	YALA

I. Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Obwohl es enorme Fortschritte in der Behandlung und Heilung gab, stellen insbesondere schwer zu detektierende und chemotherapieresistente Tumoren noch immer eine große Herausforderung dar.

Bakterielle Toxine werden als neuer Therapieansatz in der Tumorbehandlung erforscht. *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) ist ein β -porenbildendes Toxin, das an Claudine, vor allem Claudin (Cldn-) 3 und 4, auf der Oberfläche von Zellen epithelialen Ursprungs bindet. Für verschiedene Karzinome wurde bereits eine Überexpression von bestimmten Claudinsubtypen beschrieben, was sie zu geeigneten Wirkstoffzielen macht.

Die Claudin-abhängige, CPE-vermittelte Porenbildung und Zytotoxizität kann für die Behandlung von therapieresistenten, Claudin-überexprimierenden Tumoren genutzt werden. Die carboxyterminale Domäne des Proteins (cCPE) bildet keine zytotoxischen Poren, ist jedoch für die Claudinbindung ausreichend. Daher können cCPE-Proteine als Targeting-Moleküle ohne zellschädigende Wirkung bei der Diagnose Claudin-überexprimierender Karzinome oder für die reversible Modulierung der parazellulären Barriere in epi-/endothelialen Geweben eingesetzt werden.

Durch strukturbasierte Mutationen konnte die Claudinsubtypspezifität und -sensitivität von (c)CPE gezielt modifiziert und an verschiedene Karzinomentitäten bzw. physiologisch relevante Barrieren angepasst werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den sich daraus ergebenden Anwendungsmöglichkeiten für (c)CPE-basierte Biologika in der Diagnostik und Behandlung von Tumoren sowie bei der selektiven Modulierung der parazellulären Barriere der Epidermis.

Dazu wurden zunächst Strukturmodelle der Claudine (Cldn) 1 bis 7 im Komplex mit cCPE-Varianten generiert, um die Claudin/cCPE-Interaktion genauer zu analysieren. In Verbindung mit den als Vorlage verwendeten Kristallstrukturen zeigten die neuen Modelle, dass die Konformation der Claudine und des Claudin-cCPE-Komplexes flexibel ist, das extrazelluläre Segment 2 (EZS2) der Claudine jedoch immer auf ähnliche Weise mit der EZS2-Turn-Bindungstasche auf der Oberfläche des cCPE interagiert. Experimentell erhobene Daten zur Bindung der Mutante cCPE-S231R/S313H (cCPE-SRSH) an die Nicht-Rezeptorclaudine 1 und 5 ließen sich damit erklären. Diese mechanistischen Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Anwendung CPE und cCPE-basierter Biologika.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zytotoxische Wirkung von CPE-SRSH auf Bronchialkarzinomzellen, die ein Spektrum an Claudinen exprimieren, *in vitro* untersucht. Durch den Vergleich mit papillären Schilddrüsenkarzinomzellen, welche nur Cldn1 exprimieren, konnte herausgearbeitet werden, dass CPE-SRSH vor allem den Angriff auf solche Karzinomzellen ermöglicht, die hauptsächlich Cldn1 exprimieren.

Claudine und cCPE bilden ein passendes Rezeptor-Liganden-Paar für eine Fluorophor-gekoppelte molekulare Sonde, die spezifisch auf der Oberfläche (prä)kanzeröser Läsionen bindet und diese durch eine spezifische Anreicherung des Fluoreszenzsignals hervorhebt. Für die vorliegende Arbeit wurden Fluorophor-markierte, cCPE-basierte molekulare Sonden generiert und ihre Bindung und deren Spezifität in relevanten Tumormodellen getestet. cCPE-Varianten wurden sowohl als YFP-Fusionsproteine exprimiert als auch posttranslational mit einem Fluorophor gekoppelt. Diese Proteine wurden anschließend für die Claudindetektion in Zelllinien, entzündetem Kolongewebe, Organoiden aus humanen Magenkarzinomen und humanen kolorektalen Polypen eingesetzt. In all diesen *in vitro*- bzw. *ex vivo*- Modellen konnte mittels konfokaler Mikroskopie eine eindeutige Claudindetektion mit den cCPE-basierten molekularen Sonden gezeigt werden. Ein besonderer Vorteil der Fluorophor-markierten cCPE-Proteine zur bisher etablierten Claudindetektion über Immunfluoreszenztechniken besteht in ihrer Anwendbarkeit in lebenden Geweben und somit auch für eine fluoreszenzendoskopische Tumordiagnostik.

Eine weitere potenzielle therapeutische Anwendung von cCPE ist die Öffnung der epidermalen Barriere durch die gezielte, reversible Modulation der Tight Junctions (TJ) in der Epidermis. Dies ist beispielsweise für die nicht-invasive Wirkstoffapplikation von Bedeutung, da viele neuartige Wirkstoffe hydrophile Moleküle sind, die zu einem erheblichen Teil über den parazellulären Weg an ihren Wirkungsort gelangen. In dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und elektrophysiologischen Methoden die spezifische Bindung von cCPE-Varianten an Cldn1 und -4 in lebenden Epidermisschichten und die daraus resultierende Modulation der TJ-Barriere erstmals differenziert von weiteren epidermalen Barrierekomponenten aufgelöst werden. Dabei wurde der größere Beitrag von Cldn1 gegenüber Cldn4 zur Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere bestätigt.

II. Abstract

Cancer is the second-leading cause of death in Germany. Although cancer treatments have progressed tremendously and led to higher cure rates, curing cancers that are hard to detect or chemotherapy-resistant still holds major challenges.

Bacterial toxins have been proposed as alternative cancer treatments. *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) is a β -pore forming toxin that binds to claudins, mainly claudin-3 (Cldn) and -4, on the surface of cells of epithelial origin. Claudins are a promising cancer drug target as they are overexpressed in diverse carcinomas.

Due to its pore-forming properties, native full-length CPE causes claudin-mediated cytotoxic effects, which might be used for the treatment of therapy-resistant, claudin-overexpressing tumors. The carboxy-terminal domain of CPE (cCPE) retains claudin binding properties without being cytotoxic. Thus, cCPE proteins might be promising targeting modules for the diagnosis of claudin-overexpressing carcinomas or could be applied for the reversible modulation of epithelial/endothelial barriers without causing cell damage.

Structure-based mutagenesis enabled changes in the claudin subtype specificity and sensitivity of CPE, adjusting it to the claudin expression profiles of various carcinomas or physiologic barriers. Within the scope of this thesis, potential applications for (c)CPE-based biologics in the diagnosis and treatment of cancers as well as in the selective modulation of the epidermal paracellular barrier were investigated.

For this purpose, homology models of claudins (Cldn) 1 to 7 in complex with cCPE variants were generated to further resolve the interaction between claudins and cCPE mutants. In conjunction with the claudin/cCPE crystal structures, that were used as templates, the new models implied that the conformation of the heterocomplex is flexible, yet the extracellular loop 2 (ECL2) of different claudins always interacts with the ECL2-turn binding pocket on the surface of cCPE in a similar manner. The homology models supported experimental binding data of the mutant cCPE-S231R/S313H (cCPE-SRSH) to the non-CPE receptor claudins Cldn1 and 5. These mechanistic insights provide the basis for the application of (c)CPE-based biologics.

Here, the cytotoxicity of CPE-SRSH on lung cancer cells, expressing a variety of claudins, was investigated in *in vitro* models. These findings were compared to the cytotoxic effects in papillary thyroid carcinoma cells, expressing only Cldn1. Thus, it could be shown that CPE-SRSH enables targeting of carcinoma cells that primarily express Cldn1.

Claudins and cCPE are convenient receptors and ligands, respectively, to design a fluorophore-coupled molecular probe that binds to the surface of (pre-) cancerous lesions and highlights them due to an enriched fluorescence signal. Within this research project, fluorophore-coupled cCPE proteins were generated. Their claudin binding and its specificity

were analyzed in relevant tumor models. cCPE was either expressed as a YFP fusion protein or the purified protein was labelled with a fluorophore. The obtained proteins were applied for claudin detection in cell lines, inflamed colon tissue, organoids of human gastric cancer and human colorectal polyps. A distinct claudin detection using the cCPE-based molecular probes was achieved in all *in vitro* and *ex vivo* models and visualized using confocal laser scanning microscopy. A distinct advantage of the claudin detection via fluorophore-coupled cCPE proteins over the common immunofluorescence staining techniques is its applicability in living tissues and therefore, for a real-time fluorescence detection of tumors.

cCPE could also potentially be administered to open the transepidermal barrier by specifically and reversibly modulating the tight junctions (TJ) in the epidermis. This is of importance for the development of non-invasive drug delivery methods. Many new drugs are hydrophilic molecules. Their main route of delivery is the paracellular pathway. Using immunofluorescence stainings and electrophysiologic methods, the binding of cCPE variants to Cldn1 and -4 in a human epidermis model and the subsequent distinct modulation of the TJ barrier were resolved separately from other epidermal barrier components for the first time in this project. It was also confirmed that Cldn1 has a greater impact on epidermal barrier formation than Cldn4.

1 Einleitung

1.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, endosporenbildendes Bakterium. 1891 wurde es zum ersten Mal von W.H. Welch aus an Gasbrand leidenden Patienten isoliert und als neues Bakterium identifiziert. Obwohl *C. perfringens* als anaerob gilt, kann es auch in Gegenwart von Sauerstoff überleben (Kiu and Hall 2018).

Dementsprechend ist *C. perfringens* ubiquitär in der Natur verbreitet. Zu seinen natürlichen Lebensräumen zählen unter anderem Böden, Abwässer und Lebensmittel, aber es ist auch Teil des gastrointestinalen Mikrobioms sowohl in gesunden als auch in erkrankten Menschen und Tieren (Kiu and Hall 2018).

C. perfringens Stämme sind verbreitete Human- und Tierpathogene, die histotoxische (beispielsweise clostridiale Myonekrose (Gasbrand)) sowie Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes bzw. mit Ursprung in diesem (Enteritis, Enterotoxämie) verursachen können (Ma *et al.* 2014, Freedman, Shrestha, and McClane 2016).

Die Serotypisierung von *C. perfringens* Stämmen erfolgt auf Basis der von ihnen produzierten, wirksamen Proteintoxine. Das bestehende Serotypisierungsschema nach Wilsdon wurde zuletzt im Jahr 2018 durch Rood und Kollegen revidiert und aktualisiert (Abb. 1).

Toxin	CPA	CPB	ETX	ITX	CPE	NetB
	<i>plc</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i> <i>iab</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>
Serotyp A	■					
B	■	■	■			
C	■	■			■	
D	■		■		■	
E	■			■	■	
F	■				■	
G	■					■

■ Toxinproduktion
■ potentielle Toxinproduktion

Abbildung 1 Schema zur Serotypisierung von *Clostridium perfringens* Stämmen. Die Bezeichnung der Serotypen A – E beruht auf der Produktion von CPA, CPB, ETX und ITX durch die Isolate. Isolate des Serotyps F produzieren CPA und CPE. Serotyp G zeichnet sich durch die Produktion von CPA und NetB aus, aber kann nicht CPB, ETX oder ITX produzieren. Die Namen der Proteintoxine sind in schwarzen Großbuchstaben, die der entsprechenden Gene in grauen, kursiven Kleinbuchstaben dargestellt. Rote Quadrate – bestätigte Toxinproduktion, blaue Quadrate – potentielle Toxinproduktion durch die entsprechenden Stämme. Nach (Kiu and Hall 2018).

Die Serotypen A – E beruhen auf der Fähigkeit der Stämme, das α -, β -, ϵ - oder ι -Toxin (CPA, CPB, ETX bzw. ITX) zu produzieren. Als *C. perfringens* Serotyp F werden Stämme klassifiziert,

deren Isolate die Gene zur Produktion des α -Toxins (*plc*) und des *C. perfringens* Enterotoxin (*cpe*) tragen und während der Sporulation *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) freisetzen. Vor der Revision wurde für diese Stämme die Bezeichnung CPE-positive *C. perfringens*-Stämme des Serotyps A verwendet, sodass diese Bezeichnung auch heute noch verbreitet ist. *C. perfringens* Stämme des Serotyps G produzieren laut Definition CPA und *C. perfringens* necrotic enteritis toxin B-like (NetB), aber nicht CPB, ETX und ITX (Rood *et al.* 2018). Insgesamt sind mindestens 16 Toxine bekannt, die zur Pathogenizität von *C. perfringens*-Stämmen beitragen (Uzal *et al.* 2014).

Zu den relevanten Humanpathogenen zählen zum einen Stämme des Serotyps C, welche CPA und CPB produzieren und nekrotisierende Enteritis verursachen, sowie der Versursacher des Gasbrands, CPA-produzierende Stämme des Serotyps A (Uzal *et al.* 2014), und CPE-produzierende Stämme des Serotyps F, welche die *C. perfringens*-vermittelte Lebensmittelvergiftung sowie antibiotikaassoziierte Diarrhö auslösen können (Rood *et al.* 2018).

1.2 *Clostridium perfringens* Enterotoxin

CPE ist ein 319 Aminosäuren (AS) langes und 35 kDa großes Protein (Czeczulin, Hanna, and McClane 1993).

Es verursacht histologische Schäden im Dünndarm aller bisher getesteten Spezies. Die CPE-vermittelten histologischen Veränderungen beinhalten eine Verkürzung der Villi/Zotten, sowie die Nekrose und Abschilferung der Epithelzellen (Freedman, Shrestha, and McClane 2016). Zwei Beobachtungen lassen darauf schließen, dass es sich bei CPE um den wichtigsten Virulenzfaktor bei *C. perfringens* Typ F-bedingten, gastrointestinalen Erkrankungen handelt. Zum einen wurde gezeigt, dass die Inaktivierung des *cpe*-Gens in einem lebensmittelvergiftenden Stamm zum Verlust der Enteropathogenizität führt, welche sich durch Komplementation des *cpe*-Gens wiederherstellen lässt (Sarker, Carman, and McClane 1999). Zum anderen hat die Aufnahme von reinem CPE in freiwilligen Testpersonen dieselben gastrointestinalen Symptome ausgelöst, die für eine Lebensmittelvergiftung mit *C. perfringens* Typ F typisch sind (Skjelkvale and Uemura 1977).

Infektionen mit *C. perfringens* Serotyp F-Stämmen führen im Allgemeinen zu einer milden Form der Lebensmittelvergiftung, bei der Krämpfe im Abdomen sowie Diarrhö auftreten (Freedman, Shrestha, and McClane 2016). Die Symptome treten typischerweise 8 – 24 h nach der Aufnahme kontaminierter Speisen auf und klingen nach weiteren 18 – 24 h wieder ab (Bos *et al.* 2005).

1.2.1 Struktur und funktionale Domänen von CPE

CPE besteht aus zwei funktionellen Domänen: Die Amino-terminale Domäne (nCPE) vermittelt die Zytotoxizität während die Carboxy-terminale Domäne (cCPE) die Claudinbindungstasche enthält (Kokai-Kun and McClane 1997).

Die Struktur des vollständigen CPE-Proteins wurde 2011 von zwei unabhängigen Gruppen publiziert ((Briggs *et al.* 2011), PDB ID 2HX6 und (Kitadokoro *et al.* 2011) PDB ID: 3AM2) (Abb. 2A). Diese Studien zeigten, dass CPE aus drei strukturellen Domänen aufgebaut ist, welche zwei funktionelle Domänen darstellen. Domäne I entspricht der Claudinbindungsdomäne cCPE (Van Itallie *et al.* 2008, Kitadokoro *et al.* 2011), während die Domänen II und III Subdomänen des zytotoxischen nCPE sind (Abb. 2B) (Kitadokoro *et al.* 2011).

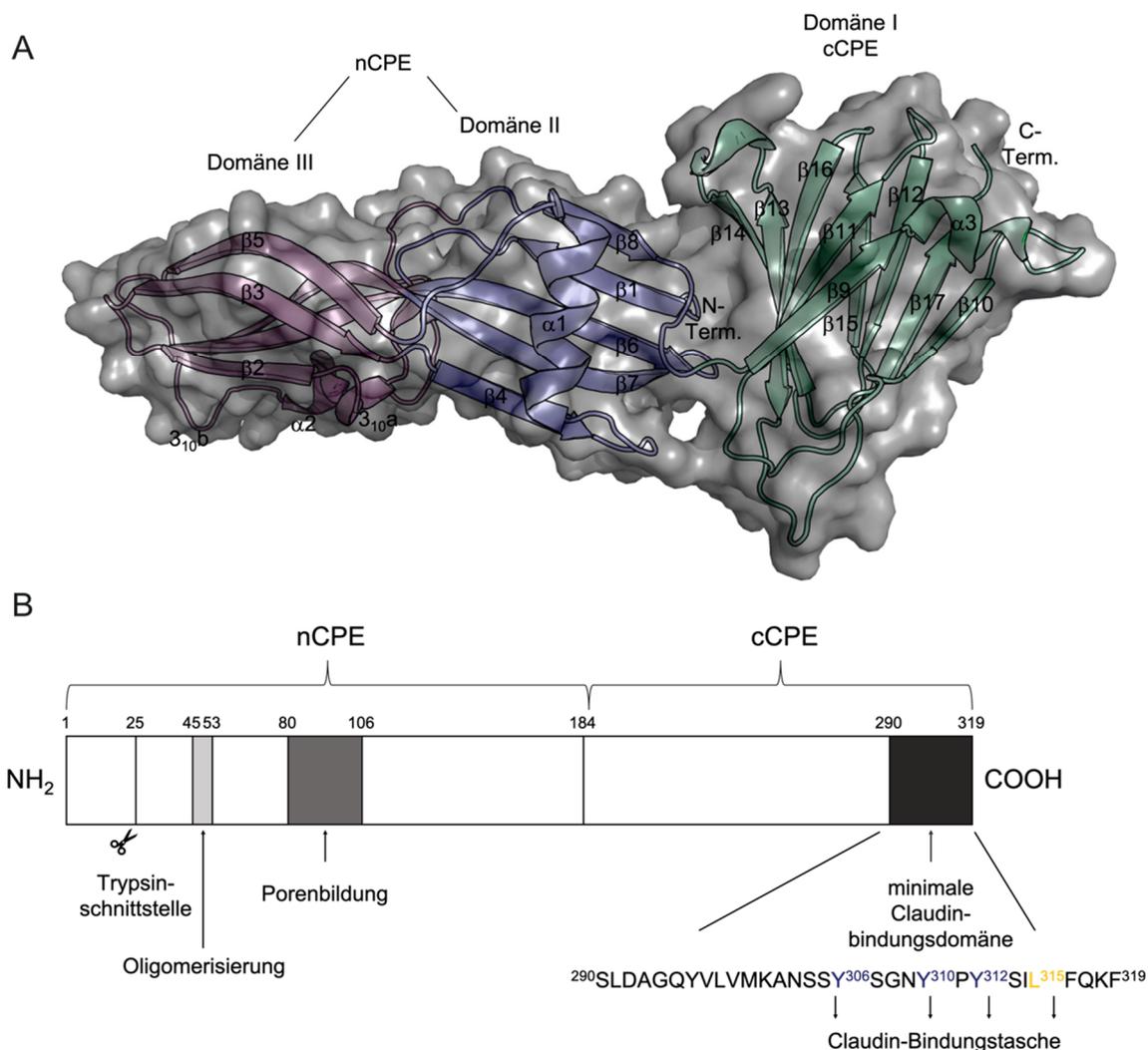


Abbildung 2 Struktur von CPE. (A) Dreidimensionale Struktur des CPE-Monomers als Oberfläche und vereinfachte Cartoondarstellung gefärbt nach strukturellen Domänen. Die C-terminale, Claudin-bindende Domäne I (cCPE) ist in grün dargestellt, die porenbildenden Domänen II und III (nCPE) jeweils in violett und hellrosa (nach Kitadokoro *et al.* 2011), PDB ID: 3AM2). (B) Schematische Darstellung der CPE-Struktur. Das Peptid aus den AS 1 – 25 kann durch Trypsin abgespalten werden, wodurch die Aktivität des Proteins deutlich erhöht wird. Der Bereich

zwischen den AS 45 – 53 ist notwendig für die Oligomerisierung des Proteins. Die AS 80 – 106 bilden eine α -Helix mit alternierenden hydrophilen und hydrophoben AS-Resten. Dieser Bereich kann als Transmembranhelix in die Plasmamembran eindringen und ist entscheidend für die Ausbildung der β -Pore. Die AS 184 – 319 bilden die nicht-toxische Claudin-Bindungsdomäne cCPE, wobei mindestens die AS 290 – 319 für die Claudinbindung notwendig sind. In diesem Bereich befindet sich auch die hydrophobe Claudinbindungstasche des cCPE, welche durch die Reste Y³⁰⁶, Y³¹⁰, Y³¹² und L³¹⁵ gebildet wird. Abbildung bearbeitet nach (Hashimoto, Yagi, and Kondoh 2017).

2008 konnten van Itallie und Kollegen die Kristallstruktur von cCPE mittels Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 1,75 Å aufklären. Es zeigte sich, dass cCPE als neunsträngiges β -Sandwich vorliegt. Die Stränge β 8 und β 9 befinden sich auf der Oberfläche von cCPE und bilden die Claudinbindungstasche (Van Itallie *et al.* 2008).

Insgesamt besteht CPE aus 17 zumeist antiparallelen β -Strängen, 3 α -Helices und zwei kurzen 3_{10} -Helices, die zu einer länglichen Struktur angeordnet sind. In beiden Strukturen sind die ersten 34 bzw. 35 N-terminalen Aminosäuren nicht zu erkennen, da sie keine funktionale Elektronendichte aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Bereich ungeordnet vorliegt (Briggs *et al.* 2011, Kitadokoro *et al.* 2011).

Die Struktur von nCPE ähnelt β -porenformenden Toxinen wie ETX, Aerolysin aus *Aeromonas hydrophilas* oder dem porenbildenden, hämolytischen Lectin aus *Laetiporus sulphureus*. Die Aminosäuren 80 – 106 beinhalten eine α -Helix mit alternierenden hydrophilen und hydrophoben Aminosäureresten. Dieses Muster ist charakteristisch für die membrandurchspannenden Schleifen von β -porenbildenden Toxinen. Somit wurde auch strukturell bestätigt, dass CPE ein β -porenbildendes Toxin ist (Kitadokoro *et al.* 2011).

1.2.2 Produktion von CPE

C. perfringens ist ein endosporenbildendes Bakterium. Im Hungerzustand kommt es zu einer inäquaten Zellteilung, bei der eine Endospore freigesetzt wird. Diese ist metabolisch inaktiv und besitzt eine hohe Resistenz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen.

In kontaminierten Speisen finden sich oft Endosporen von *C. perfringens*, welche ein unzureichendes Kochen der Lebensmittel überleben und in der nährstoffreichen Umgebung in hoher Dichte zu vegetativen Bakterien keimen. Bei der Aufnahme großer Mengen vegetativer Bakterien überleben einige das saure Milieu des Magens und gelangen in den Darm. Dort vermehren sie sich zunächst, gehen hernach aber zur Sporulation über (Freedman, Shrestha, and McClane 2016). Die Signalwege, welche diesen Zustand induzieren, sind noch nicht umfassend geklärt, beinhalten wahrscheinlich aber die Anwesenheit von anorganischem Phosphat (Philippe *et al.* 2006) und Gallensalzen (Heredia *et al.* 1991).

CPE ist ein Sporulations-assoziiertes Virulenzfaktor, denn das *cpe*-Gen wird nur während der Sporulation exprimiert (Kokai-Kun *et al.* 1994). Das Toxin akkumuliert zunächst in Form von kristallinen *inclusion bodies* und wird bei der Bakterienlyse in das Darmlumen freigesetzt (Löffler and Labbe 1986), wo es die unter 1.2 beschriebenen Symptome auslöst.

1.2.3 Zellulärer Wirkmechanismus von CPE

Das Dünndarmepithel, besonders das des Ileums, ist sehr sensitiv gegenüber CPE. Dies konnte nicht nur im Tiermodell (McDonel and Duncan 1977, McDonel and Demers 1982), sondern auch für den Menschen (Fernandez Miyakawa *et al.* 2005) gezeigt werden.

Der erste Schritt nach der Freisetzung von CPE in das Darmlumen beinhaltet die Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche CPE-sensitiver Zellen. Es wurde gezeigt, dass CPE-Rezeptoren zur Proteinfamilie der Claudine gehören. Im Dünndarm sind insbesondere die CPE-Rezeptoren Cldn3 und -4 reichlich an den Villusspitzen lokalisiert (Sonoda *et al.* 1999, Fujita *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2010).

Nach der Bindung von CPE an Rezeptorclaudine bildet sich der sogenannte „kleine Komplex“ (Abb. 3), welcher sensitiv gegenüber Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) ist und ein Molekulargewicht von ~ 90 kDa besitzt. Er besteht aus CPE, Rezeptorclaudinen und weiteren Claudinen (Wieckowski, Wnek, and McClane 1994, Robertson *et al.* 2007). Dieser Komplex ist nicht zytotoxisch.

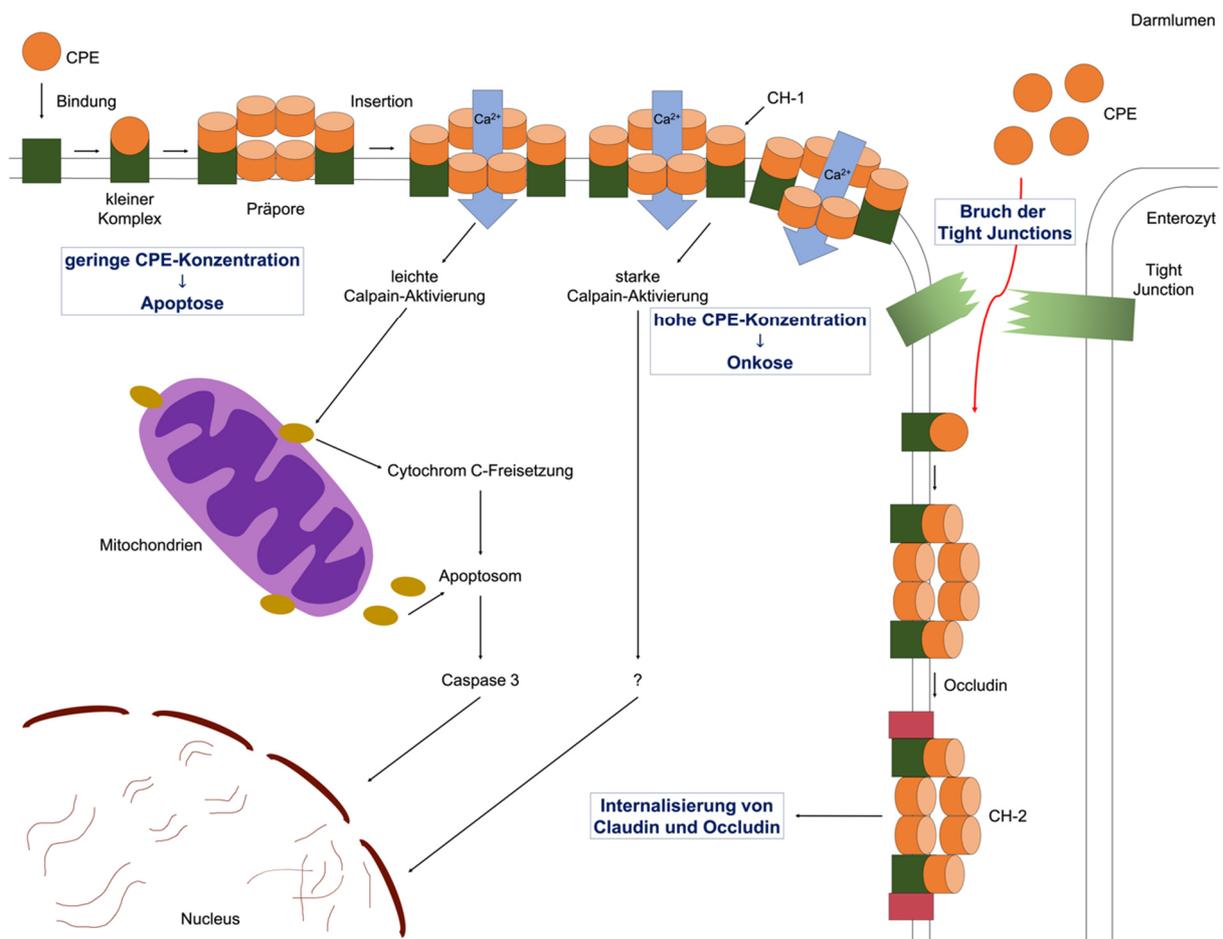


Abbildung 3 Zellulärer Wirkmechanismus von CPE. CPE wird im letzten Stadium der Endosporenbildung, der Lyse, von *C. perfringens* in das Darmlumen freigesetzt. Dort bindet es an Cldn3 und -4 auf der Oberfläche der Enterozyten. Mehrere kleine Komplexe oligomerisieren zu einer Präpore, welche durch Insertion in die Plasmamembran eine Ca²⁺-permeable Pore (CH-1) bildet. Bei niedriger CPE-Konzentration bilden sich wenige Poren. Der geringere Ca²⁺-Einstrom bewirkt eine leichte Calpain-Aktivierung, sodass Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird und sich das Apoptosom bildet. Dieses bewirkt eine Aktivierung von Caspase-3, was

die Auslösung der Apoptose-Signalkaskade im Zellkern vermittelt. Bei hohen CPE-Konzentrationen bilden sich viele Poren auf der Plasmamembran, wodurch viele Ca^{2+} -Ionen in die Zellen einströmen. Dies bewirkt eine starke Calpain-Aktivierung und über noch nicht aufgeklärte Signalwege kommt es zur onkotischen Nekrose der Enterozyten. Durch die Zerstörung der apikalen Tight Junction-Barriere werden zudem extrajunktionale Claudine in der basolateralen Membran für CPE zugänglich. Es bildet sich der sogenannte CH-2-Komplex, welcher neben CPE und Claudinen auch Occludin enthält. Dieser Komplex ermöglicht die Internalisierung von Claudinen und Occludin, was möglicherweise zu einer Verstärkung der CPE-induzierten Diarrhö führt. orangefarbene Kreise – CPE, grüne Rechtecke – Claudine außerhalb der Tight Junctions, gelbe Ovale – Cytochrom C, rote Rechtecke – Occludin. Nach (Smedley, Uzal, and McClane 2007, Freedman, Shrestha, and McClane 2016).

Mehrere kleine Komplexe oligomerisieren und bilden eine Präpore auf der Oberfläche der Plasmamembran (Smedley, Uzal, and McClane 2007). Da wahrscheinlich sechs kleine Komplexe an dieser Oligomersierung beteiligt sind, wird der daraus resultierende, ~ 450 kDa „große Komplex“ auch als „CPE-Hexamer-1“ (CH-1) bezeichnet. Dieser besteht neben dem CPE-Hexamer aus Rezeptor- und Nicht-Rezeptorclaudinen (Robertson *et al.* 2007).

β -Hairpins der Aminosäuren 80 – 106 aus den CPE-Molekülen im CH-1-Komplex bilden zusammen eine β -Fasstruktur, die in die Plasmamembran inseriert und dort eine aktive Pore bildet (Chen *et al.* 2012). Diese Pore ist kationenpermeabel (Hardy *et al.* 1999), sodass Ca^{2+} -Ionen in die Zellen gelangen, was zum CPE-induzierten Zelltod führt (Matsuda and Sugimoto 1979, Chakrabarti and McClane 2005).

Bei niedrigen CPE-Konzentrationen bildet sich eine geringe Anzahl von Poren auf der Plasmamembran. Es kommt zu einem moderaten Ca^{2+} -Einstrom, welcher schlussendlich die Apoptose in den Epithelzellen induziert. Im Gegensatz dazu bilden sich bei hohen CPE-Konzentrationen viele Poren in der Plasmamembran aus, sodass der starke Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen eine onkotische Nekrose der Zellen verursacht (Chakrabarti, Zhou, and McClane 2003, Chakrabarti and McClane 2005).

Eine längere CPE-Exposition führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen, wodurch auch ihre basolaterale Membran für CPE zugänglich wird. Durch die zusätzliche CPE-Bindung bildet sich ein weiterer, größerer Komplex von ~ 650 kDa, welcher vermutlich aus sechs Molekülen CPE, 12 Claudinmolekülen und Occludin besteht und daher auch als CPE-Hexamer 2 (CH-2) bezeichnet wird. Bei der Bildung dieses Komplexes wird die Internalisierung von Claudinen und Occludin beobachtet. Die genaue Funktion von CH-2 bei der Zytotoxizität von CPE ist bisher noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass die Internalisierung von Claudinen und Occludin die parazelluläre Permeabilität weiter erhöht und so die CPE-vermittelte Diarrhö verstärkt wird (Singh *et al.* 2001, Chakrabarti and McClane 2005, Freedman, Shrestha, and McClane 2016).

Nach der Freisetzung von CPE in das Darmlumen wird zunächst die Wasser- und Ionenaufnahme der intestinalen Epithelzellen aufgrund der histologischen Schädigungen inhibiert (Sherman, Klein, and McClane 1994). Wasser, das von den Speicheldrüsen, im Magen oder Pankreas sekretiert wurde, wird größtenteils im Dünndarm resorbiert. Ist dieser Mechanismus durch die histologischen Schädigungen der resorbierenden Enterozyten gestört, kommt es zur Diarrhö. Die Flüssigkeitsakkumulation in CPE-behandelten

Ileummodellen deutet zudem darauf hin, dass in cCPE-geschädigten Darmsegmenten generell Wasser freigesetzt wird (Smedley *et al.* 2008, Garcia *et al.* 2014). Dies kann durch einen Leckfluss-Mechanismus, bei dem sich Wassermoleküle und Ionen aufgrund der CPE-vermittelten Schädigungen passiv durch das geschädigte Gewebe zum Darmlumen bewegen können, verstärkt werden. Je nach Grad der Schädigungen kann die aktive Sekretion in intakten Krypten auch zu einem übermäßigen Wasseraustritt beitragen (Smedley *et al.* 2008, Thiagarajah and Verkman 2013, Eichner, Protze, *et al.* 2017).

1.3 Die Proteinfamilie der Claudine

1997 gelang es der Arbeitsgruppe um Katahira erstmals, einen CPE-Rezeptor in Vero-Zellen zu identifizieren. Das bis dahin unbekannte, 22 kDa große Membranprotein wurde entsprechend seiner neuen Funktion als CPE-Rezeptor (CPE-R) bezeichnet. CPE-R zeigte eine direkte Interaktion mit cCPE und war essenziell für die Vermittlung der zytotoxischen Effekte von CPE (Katahira, Inoue, *et al.* 1997). Über Sequenzanalysen und Screenings wurde noch im selben Jahr das *rat androgen withdrawal apoptosis protein* RVP1 als ein weiterer CPE-Rezeptor identifiziert, welcher entsprechend CPE-R2 genannt wurde (Katahira, Sugiyama, *et al.* 1997). Nachdem 1998 die ersten beiden Claudine, Cldn1 und -2, identifiziert worden waren (Furuse *et al.* 1998), wurden bald darauf auch CPE-R und CPE-R2 als Cldn3 und -4 der neuen Claudin-Proteinfamilie zugeordnet (Morita *et al.* 1999). Diese umfasst mittlerweile 27 Subtypen, welche einander in ihrer Sequenz, Struktur und Expression ähneln (Krause, Protze, and Piontek 2015).

1.3.1 Topologie und Struktur von Claudinen

Claudine sind Tetraspan-Transmembranproteine mit Molekulargewichten von ~ 20 – 27 kDa (Krause *et al.* 2008). 2014 wurde die erste Kristallstruktur eines Claudins, des murinen Cldn15, publiziert (PDB ID: 4P79). Diese bestätigte die vorhergesagte Struktur von Claudinen mit vier transmembranen Helices (TMH), zwei extrazellulären Schleifen (EZS) und einem intrazellulären Loop (IZL) (Suzuki *et al.* 2014) (Abb. 4). Kurz darauf wurde die Kristallstruktur von murinem Cldn19 im Komplex mit cCPE publiziert (PDB ID 3X29), die eine ähnliche Topologie aufweist (Saitoh *et al.* 2015). Mittlerweile existieren zudem Kristallstrukturen von humanem Cldn4 (PDB ID: 5B2G, (Shinoda *et al.* 2016) und PDB ID: 7KP4 (Vecchio *et al.*, Manuskript noch nicht publiziert), murinem Cldn3 (PDB ID: 6AKE, 6AKG, 6AKF, (Nakamura *et al.* 2019)) sowie humanem Cldn9 (PDB ID: 6OV2, 6OV3, (Vecchio and Stroud 2019)) jeweils im Komplex mit cCPE.

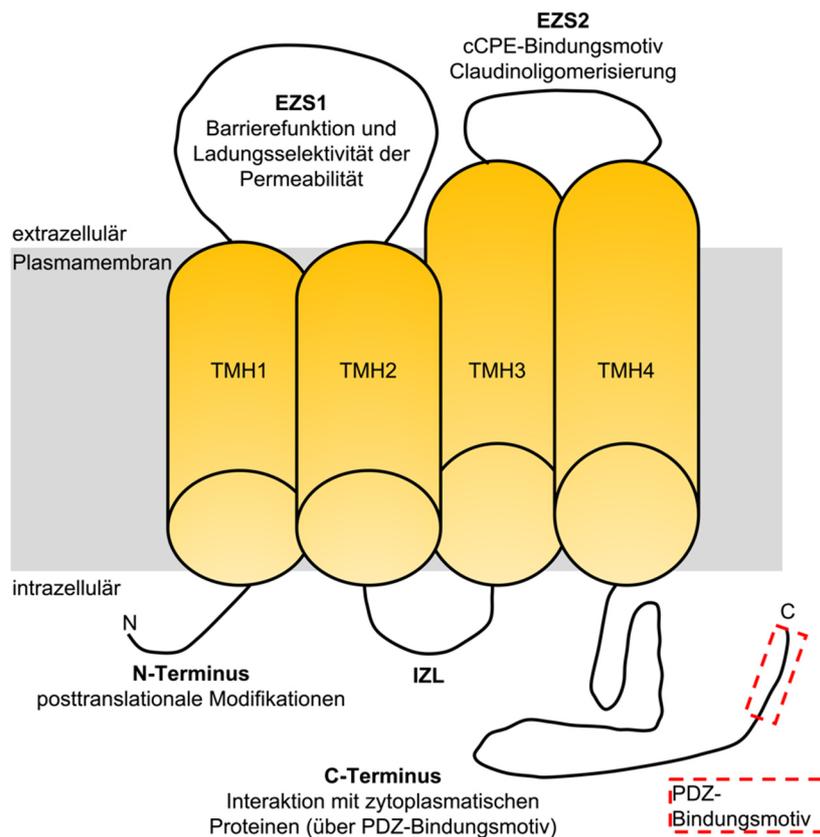


Abbildung 4 Claudin-Topologie. Claudine sind Tetraspan-Transmembranproteine. Der sehr kurze (~ 7 Aminosäuren (AS)) N-Terminus, der IZL (~ 12 AS) und der längere (25 – 55 AS) C-Terminus liegen intrazellulär. Die TMH1 und -2 verbindet die erste, lange EZS (~ 50 AS). Zwischen der TMH3 und 4 befindet sich die zweite, kurze EZS mit ~ 25 AS, welche das cCPE-Bindungsmotiv enthält. Über das PDZ-Bindungsmotiv¹ interagieren Claudine mit TJ-assoziierten Proteinen, die sie mit dem Zytoskelett verbinden (Krause *et al.* 2008) (Abb. nach (Piontek *et al.* 2020)).

1.3.2 Claudine als Bestandteil des apikalen Tight Junction-Komplexes

Epithelien sind ein- oder mehrlagige Zellschichten, welche die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers auskleiden. Das einschichtige Epithel, das die innerste Wandschicht von Blut- und Lymphgefäßen bildet, ist das sogenannte Endothel. Alle Endo- und Epithelzellen sind polar; sie besitzen eine apikale, dem Lumen zugewandte, und eine basale Seite, die über die Basallamina mit dem darunter liegenden Gewebe verbunden ist (nach (Fromm 2007)).

Epi- und Endothelien bilden eine physikalische und chemische Barriere, um den Körper vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. Dennoch ermöglichen sie auch einen kontrollierten Transport von Wasser und gelösten Substanzen. Die Plasmamembranen bilden hierbei eine Barriere, stellen aber über Transporter und rezeptorvermittelte Endozytose auch Mechanismen zur kontrollierten, selektiven Passage von Wasser und Soluten bereit (sogenannter transzellulärer Transport). Dabei ist es jedoch wichtig, dass kein unkontrolliertes Zurückdiffundieren über den parazellulären Weg stattfinden kann (Günzel and Fromm 2012). Epithelzellen liegen daher oft dicht beeinander und sind an ihren lateralen Membranen über einen Komplex aus interzellulären Kontakten verbunden (Abb. 5 A). Die Tight Junctions (TJ, auch Schlussleisten oder *Zonula occludens* genannt) bilden die apikalsten interzellulären Verbindungen (Günzel and Yu 2013). Sie umschließen die Epithelzellen im apikolateralen

¹ Der Name der PDZ-Domäne leitet sich von den Namen der Proteine ab, in denen diese Domäne zum ersten Mal beschrieben wurde. Diese sind das PSD95/SAP90 (PSD kurz für engl. *postsynaptic density*), das Disc large aus *Drosophila melanogaster*, sowie das TJ-Protein ZO-1 (*Zonula Occludens-1*).

Bereich und verschließen so den parazellulären Raum gegen unkontrollierte Diffusion (Günzel and Fromm 2012) (Abb. 5 B, C). Schon vor der molekularen Identifikation von TJ-Proteinen wurde in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen entdeckt, dass die Plasmamembranen an den Kontaktpunkten zwischen zwei Zellen miteinander zu verschmelzen scheinen (Farquhar and Palade 1963). Einige Jahre darauf konnte mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass TJ ein komplexes Netzwerk miteinander verknüpfter Stränge bilden (Abb. 5 D, E) (Staehein 1973).

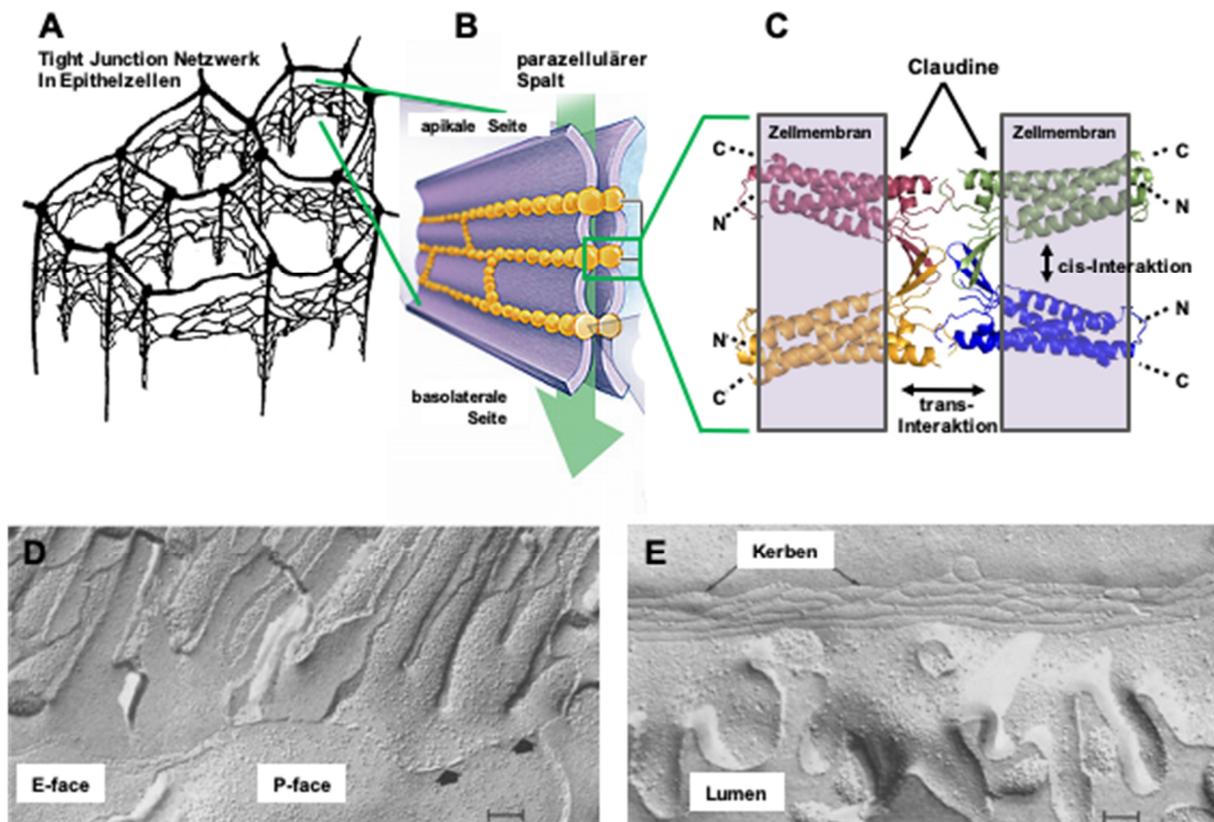


Abbildung 5 Tight Junctions bilden eine parazelluläre Barriere. (A) Ein Netzwerk aus bi- und trizellulärer TJ umschließt die Zellen im apikolateralen Bereich. (B) Detailansicht der TJ-Stränge, die aus verschiedenen Proteinen aufgebaut sind. (C) Detailansicht der Claudine in TJ. Innerhalb derselben Zellmembran interagieren Claudine in cis während Claudine in benachbarten Zellmembranen in trans über ihre extrazellulären Domänen interagieren und so den parazellulären Spalt gegen unkontrollierte Diffusion verschließen. (D, E) Bizelluläre TJ-Replikate mit unterschiedlicher Anzahl an horizontalen Strängen (Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Aufnahme). (D) Proximaler Tubulus aus dem Mausnephron. Die *Zonula occludens* des leaken Epithels besteht hauptsächlich aus einem Strang. (E) Distaler Tubulus aus dem Mausnephron. In dem sehr dichten Epithel ist die *Zonula occludens* tiefer als im proximalen Tubulus. Sie besteht aus vier oder mehr vernetzten Strängen (hier als Kerben im E-face zu erkennen). E-face – exoplasmatische Hälfte der Zellmembran (äußere Hälfte der Plasmamembran mit dem Blick aus dem Inneren der Zelle), P-face – protoplasmatische Hälfte der Zellmembran (inneren Hälfte der Zellmembran mit dem Blick von außen auf die Zelle). (A – C nach (Fromm *et al.* 2017), D, E nach (Claude and Goodenough 1973)).

Die Funktion der TJ lässt sich anschaulich als „Zaun und Tor“ beschreiben (Abb. 6). Als „Zaun“ grenzen die TJ den apikalen vom basolateralen Bereich der Plasmamembran ab. Dadurch verhindern sie die Diffusion von Transmembranproteinen zwischen der apikalen und basolateralen Membran, sodass beispielsweise seitenspezifisch exprimierte Transportmoleküle in ihrer Lokalisation verbleiben (Günzel and Yu 2013). Diese Funktion ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Polarität von Epithelzellen.

Die „Tor“-Funktion beschreibt die Regulation des parazellulären Transports von Wasser und Soluten durch die TJ. Dies umfasst sowohl die Barriere gegen unkontrollierte Diffusion als auch den selektiven Transport von Wasser und Soluten über den parazellulären Weg. Diese entscheidende Eigenschaft wird über die Hauptbestandteile der TJ, die TJ-Proteine, reguliert (Günzel and Yu 2013).

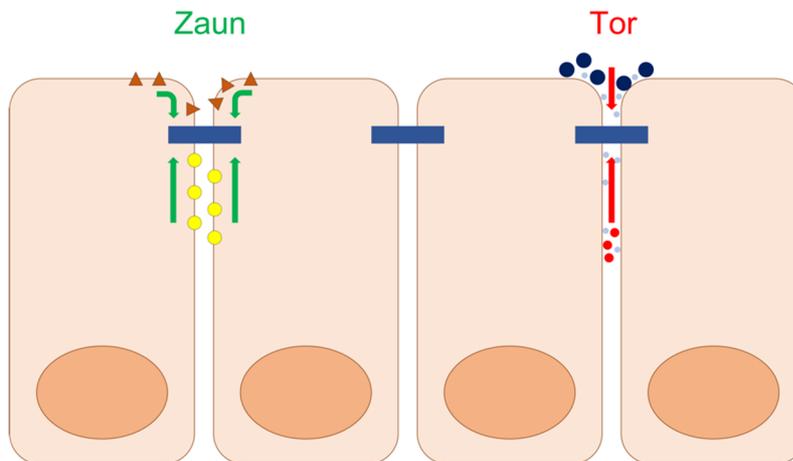


Abbildung 6 Barrierefunktionen der Tight Junctions. Als „Zaun“ trennen TJ den apikalen vom basolateralen Bereich der Membran ab und verhindern so ein Vermischen von Transmembranproteinen, die nur in einem Bereich lokalisiert sein sollen. Als „Tor“ regulieren TJ die Diffusion von Wasser und Soluten durch den parazellulären Spalt (nach (Sawada 2013)).

Die Transmembranproteine der TJ lassen sich in vier Klassen unterteilen: Proteine mit einer Transmembrandomäne, wie JAM (*Junctional Adhesion Molecules*), das Tripelspan-Transmembranprotein Bves (*blood vessel epicardial substance*), die Tetraspan-Transmembranproteine der TAMP-Familie (*tight junction-associated marvel proteins*), zu denen Occludin, Tricellulin und MarvelD3 zählen, sowie die größte Gruppe der TJ-Proteine, die Claudine (Günzel and Yu 2013).

Claudine bilden das „Rückgrat“ der TJ; sie dichten den parazellulären Spalt größen- und ladungsselektiv ab und beeinflussen somit die Permeabilitätseigenschaften der TJ und letztlich der Epi- und Endothelien (Krause *et al.* 2008). In röhrenförmigen Epithelien, wie dem Darm oder dem Nephron, sind die proximalen Segmente eher permeabel (sog. „leckte Epithelien“) und die distalen Segmente impermeabel („dichte Epithelien“). Extrem dichte, sogar undurchlässige Epithelien finden sich in der Harnblase und der Haut (Fromm 2007, Günzel and Fromm 2012). Das Spektrum dieser TJ-Eigenschaften wird über die Art und den Anteil der Claudine in der TJ reguliert. Dabei lassen sich die Claudine funktionell in zwei Gruppen unterscheiden: Zu den barrierebildenden Claudinen zählen Cldn1, -3, -4, -5, -11, -14 und -19, während Cldn2, -10a, -10b, -15 und -17 porenbildende Claudine sind. Die Eigenschaften von Cldn4, -7, -8 und -16 sind noch nicht abschließend geklärt (Günzel and Fromm 2012).

1.3.3 Claudin-Deregulierung in der Kanzerogenese

Die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere durch Claudine ist lebensnotwendig. So ist es nicht überraschend, dass es eine Vielzahl von Erkrankungen gibt, die mit Claudinen im Zusammenhang stehen. Als Transmembranproteine mit extrazellulären Domänen dienen Claudine einerseits als Rezeptoren für zahlreiche Pathogene. Als Beispiel sei hier die Infektion mit dem Hepatitis C Virus genannt, für dessen Eindringen in die Hepatozyten Cldn1 (alternativ auch Cldn6 oder -9) ein essenzieller Co-Rezeptor ist (Meertens *et al.* 2008). Auch bei einigen bakteriellen Infektionen werden Claudine als Rezeptoren genutzt. Die zytotoxische Wirkung von CPE ist abhängig von ihrem Vorhandensein und ihrer Zugänglichkeit in der Plasmamembran (Freedman, Shrestha, and McClane 2016).

Wenn die Barrierefunktion der TJ nicht mehr aufrechterhalten werden kann, resultiert dies ebenfalls in pathologischen Konditionen. So kann eine gestörte epitheliale Barriere in den Gallenwegen zur Gelbsucht, im Gastrointestinaltrakt zur Diarrhö führen. Ödeme können sich beispielsweise aufgrund einer gestörten TJ-Barriere innerhalb der Blutgefäße entwickeln (Sawada 2013).

Die Abgrenzung der apikalen von der basolateralen Membran ist eine weitere wichtige Funktion der Claudine. Die dadurch geschaffene Zellpolarität ermöglicht die vektorielle Funktion von Epithelzellen. Ein Verlust dieser Funktion ist eng mit der Entwicklung von Karzinomen assoziiert (Sawada 2013, Singh and Dhawan 2015).

Der Übergang von polarisierten Epithelzellen zu unpolarierten Zellen mesenchymalen Phänotyps, die sog. epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ist ein zentrales Ereignis der Karzinogenese (Abb. 7) (Singh, Sharma, and Dhawan 2010). Neben dem Verlust der Zell-Zell-Kontakte und der Polarität kommt es auch zu einer Reorganisation des Zytoskellets. All diese Ereignisse stehen im Zusammenhang mit dem Verlust intakter und funktioneller TJ, der in transformierten Zellen beobachtet wird (Gonzalez-Mariscal, Lechuga, and Garay 2007, Lal-Nag and Morin 2009). Im Verlauf der EMT werden die Zellen so motiler und isolierter als Epithelzellen in einem festen Verband (Singh and Dhawan 2015).

Die Deregulierung von Claudinen in der Kanzerogenese wurde bereits mehrfach beschrieben (Kwon 2013, Martin and Jiang 2009, Sawada 2013, Singh and Dhawan 2015, Tabaries and Siegel 2017). Dabei wurden gewebespezifische, funktionell relevante Modifikationen der Claudinproteine beobachtet, die sich innerhalb verschiedener Tumorentitäten stark voneinander unterscheiden können und nicht nur vom Tumor selbst, sondern auch von seiner Umgebung abhängen.

Obwohl Claudine in transformierten Geweben überexprimiert sein können, ist die TJ-Barriere oftmals gestört, da die Claudine delokalisiert in der basolateralen Membran, dem Zytoplasma oder dem Nukleus vorliegen (Abb. 7) (Dhawan *et al.* 2005, Jian *et al.* 2015, Todd *et al.* 2015, Bhat *et al.* 2016). Durch die gestörte TJ-Barriere können vermehrt Antigene in tiefere Schichten

des Gewebes eindringen und dort eine Immunantwort auslösen, sodass ein chronischer Entzündungszustand im Gewebe entsteht. Auch dieser Zustand kann zur Entwicklung von Karzinomen beitragen. So haben Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, bei denen durch die Entzündung des Darmepithels die Barriere geschwächt ist, ein erhöhtes Risiko an kolorektalen Karzinomen zu erkranken. Eine gestörte Claudinregulierung wird in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert (Weber et al. 2008, Pope, Bhat, et al. 2014).

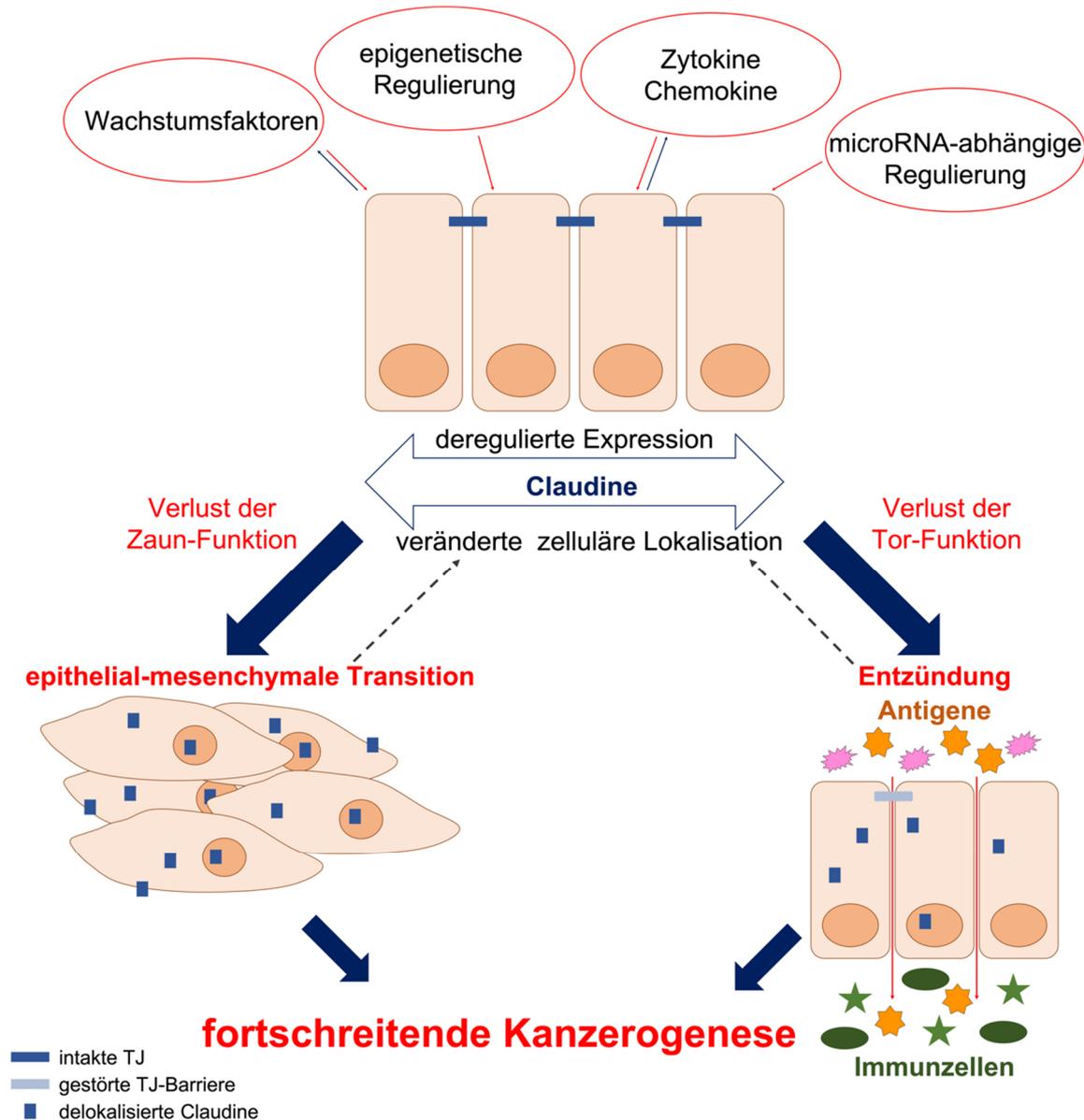


Abbildung 7 Claudine in der Kanzerogenese. Aufgrund von Wachstumsfaktoren, epigenetischen Faktoren, Chemokinen, Zytokinen und posttranslationalen Regulationsmechanismen (microRNAs) kann die Expression und die Lokalisation der Claudine in den Epithelzellen dereguliert sein. Dies wiederum führt zu einem Verlust der Claudin-typischen Zaun- und Torfunktion. Die Epithelzellen verlieren ihre polarisierte Zellarchitektur und nehmen einen unpolarisierten, mesenchymalen Phänotyp an (epithelial-mesenchymale Transition). Durch eine geschwächte parazelluläre Barriere gelangen vermehrt Antigene auf die basolaterale Seite des Epithels, wodurch ein chronischer Entzündungszustand im Gewebe induziert wird. Sowohl der Entzündungszustand als auch der mesenchymale Phänotyp der Zellen tragen zu einem Fortschreiten der Kanzerogenese bei (nach (Singh and Dhawan 2015)).

Da die Heterogenität zwischen verschiedenen Tumorerkrankungen sehr groß ist und zudem ständigen plastischen Veränderungen unterliegt, ist es noch nicht möglich, ein einheitliches Prinzip zum Einfluss der Claudinveränderungen auf das Fortschreiten und die Prognose einer Tumorerkrankung zu formulieren (Singh and Dhawan 2015).

Doch obgleich viele Studien zu diversen, teils widersprüchlichen Ergebnissen kommen, lassen sich auch einige Übereinstimmungen in der Claudineregulierung einzelner Tumorentitäten feststellen. So wurde für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (engl. *non-small-cell lung cancer*, NSCLC) eine Überexpression der Cldn1, -3, -4 und -5 (Jung *et al.* 2009, Sun *et al.* 2016), in kolorektalen Karzinomen eine Überexpression von Cldn1, -3 und -4 (de Oliveira *et al.* 2005, Dhawan *et al.* 2005), in Pankreaskarzinomen eine Überexpression von Cldn4 (Michl *et al.* 2001) und in Magenkarzinomen eine Überexpression von Cldn1, -3, -4, -5, -7 und 18.2 (Johnson *et al.* 2005, Resnick *et al.* 2005, Cunningham *et al.* 2006, Yang, Sun, and Meng 2018, Sahin *et al.* 2008, Singh, Toom, and Huang 2017) beschrieben. Aus diesem Grund werden delokalisierte, überexprimierte Claudine als vielversprechende Wirkstoffziele in der Tumorthherapie erforscht.

1.4 Die Interaktion zwischen Claudinen und CPE

Bevor Cldn3 und -4 der Proteinfamilie der Claudine zugeordnet wurden, wurden sie zunächst in ihrer Eigenschaft als CPE-Rezeptoren beschrieben (Katahira, Sugiyama, *et al.* 1997). Schnell wurden weitere Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie entdeckt (Morita *et al.* 1999), welche in zahlreichen Studien ebenfalls hinsichtlich ihrer CPE-Bindungseigenschaften untersucht wurden (Fujita *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2010, Winkler *et al.* 2009).

1.4.1 CPE-Rezeptoren bilden eine Untergruppe der Claudine

Eine Interaktion von CPE wurde zunächst neben Cldn3 und -4 ebenso für Cldn6, -7, -8 und -14 nachgewiesen (Fujita *et al.* 2000). Dabei zeigten L-Fibroblasten, welche die jeweiligen Claudine exprimierten, eine deutliche Bindung von I^{125} -markiertem CPE sowie die typischen zytotoxischen Effekte, die bereits zuvor durch CPE-Behandlungen beobachtet wurden (Fujita *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2010).

Obwohl für Cldn1 und -2 zunächst keine Bindung an CPE gezeigt werden konnte (Fujita *et al.* 2000, Sonoda *et al.* 1999), ließ sich später sowohl in transfizierten HEK-293-Zellen als auch in L-Fibroblasten für beide Claudine eine schwache Interaktion mit CPE detektieren (Kimura *et al.* 2010).

Nachdem die EZS2 der Claudine als CPE-Bindungsstelle identifiziert wurde, konnten mithilfe von Peptid Arrays die Bindung von CPE an die EZS2 der Claudine untersucht werden, um so Aussagen über die CPE-Affinität zu den verschiedenen Claudinen abzuleiten. In den Arrays wurden 15 -20 AS lange Peptide, deren Sequenz jenen des EZS2 von bestimmten Claudinen

entsprach, mit einem Fusionsprotein aus Glutathion S-Transferase (GST) und den AS 116 – 319 aus CPE inkubiert (Winkler *et al.* 2009). Dabei wurde Cldn9 als ein weiterer CPE-Rezeptor identifiziert. Für die Cldn10 – 13, -15, -16, -18 – -20 und -22, welche zuvor noch nicht untersucht worden waren, konnte keine Bindung an CPE festgestellt werden (Winkler *et al.* 2009).

Die Ergebnisse der Peptid Arrays stimmten größtenteils mit den bisher bekannten Daten älterer Studien überein. Jedoch ließ sich mit ihnen für die bekannten CPE-Rezeptoren Cldn4 und -8 keine Interaktion nachweisen (Ling *et al.* 2008, Winkler *et al.* 2009). Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die EZS2 im Peptid in einer anderen Konformation als im nativen Claudin vorliegt. Weiterhin wurde eine schwache Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cldn5 gezeigt, welche in Studien mit Vollängen-CPE und GST-cCPE₁₉₄₋₃₁₉ nicht reproduzierbar war. Der Grund dafür ist noch ungeklärt (Winkler *et al.* 2009).

Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich drei Gruppen von Claudinen hinsichtlich ihrer Interaktion mit CPE bilden: CPE zeigt eine hohe Affinität für die Cldn3, -4, -6 - -9 und -14 (sogenannte Rezeptorclaudine). Für die Cldn1, -2 und -19 wurde eine geringe Affinität von CPE beschrieben. Zu den Nicht-Rezeptorclaudinen, an die CPE nicht bindet, zählen Cldn5, -10 -13, -15 - -18 und -20 - -27 (Fujita *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2010, Protze *et al.* 2015, Shrestha and McClane 2013, Sonoda *et al.* 1999, Winkler *et al.* 2009).

1.4.2 Das CPE-Bindungsmotiv in Claudinen

Nachdem eine Untergruppe der Claudine als CPE-Rezeptoren identifiziert worden waren, wurden weitere Studien durchgeführt, um zu klären, welcher Teil der Claudine für die CPE-Bindung entscheidend ist. Mithilfe chimärer Claudine aus Cldn1, einem CPE-Rezeptor mit geringer Affinität, und Cldn3, welches eine starke Affinität für CPE aufweist, wurde gezeigt, dass die EZS2 der Claudine für die Affinität zu CPE ausschlaggebend ist (Fujita *et al.* 2000). Mittels Peptidkartierungen und Mutagenesestudien konnten innerhalb der EZS2 Aminosäuren identifiziert werden, welche die Bindung an CPE beeinflussen. Durch den Vergleich des Bindungsmotivs ₁₄₈NPLVP₁₅₂ aus Cldn3 mit den korrespondierenden Sequenzen anderer CPE-bindender Claudine ergab sich die Konsensussequenz N/D^(P-1)S/P^(P)L/M/V/I/S^(P+1)V/T^(P+2)P/A/N/D^(P+3) (Winkler *et al.* 2009, Veshnyakova *et al.* 2010, Veshnyakova *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015) und D/E^(P-4)X^(P-3)X^(P-2)N^(P-1)P^(P)L/M/V^(P+1)V^(P+2)P/A^(P+3) (Eichner, Protze, *et al.* 2017) als stringenteres CPE-Bindungsmotiv in CPE-Rezeptorclaudinen. Charakteristisch für diese Claudine ist das stark konservierte Prolin (Position^(P)) (Krause *et al.* 2008) (Abb. 8).

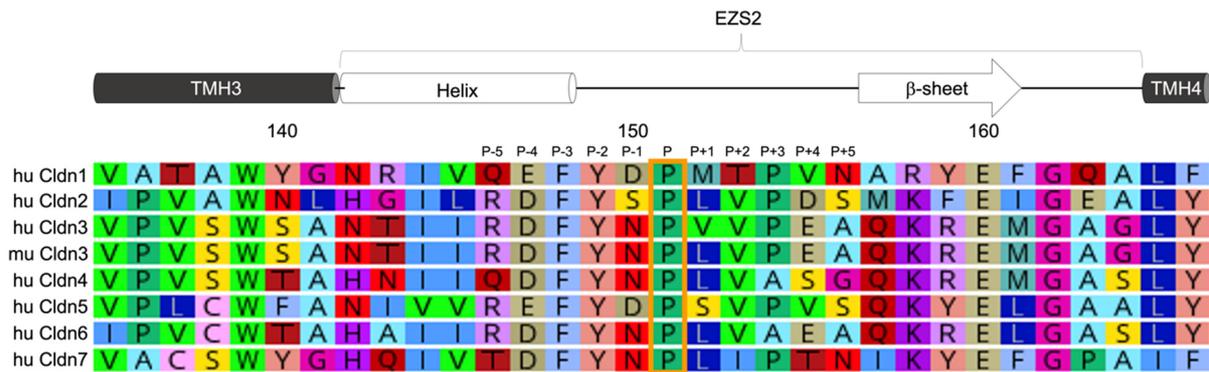


Abbildung 8 Das CPE-Bindungsmotiv in der EZS2 der Claudine. Sequenzalignment von humanem Cldn1 – 7 und murinem Cldn3 mit schematischer Darstellung der EZS2-Topologie. Die Aminosäurepositionen sind zum besseren Verständnis neben der individuellen, vom Claudinsubtyp abhängigen Nummerierung mit einer relativen Nummerierung gekennzeichnet, die sich auf das stark konservierte Prolin (P¹⁵¹ in Cldn1, orangefarbener Kasten) bezieht. Die CPE-Rezeptoren Cldn3, -4 und -6 weisen in der EZS2 das stringente CPE-Bindungsmotiv D/E^(P-4)X^(P-3)X^(P-2)N^(P-1)P^(P)L/M/V^(P+1)V^(P+2)P/A^(P+3) auf.

Substitutionsanalysen zeigten, dass besonders die Positionen (P-1) und (P+1) die Bindung der Claudine an CPE bzw. cCPE stark beeinflussen (Winkler *et al.* 2009, Kimura *et al.* 2010, Robertson, Smedley, and McClane 2010, Protze *et al.* 2015).

1.4.3 Die Claudinbindungstasche in CPE

Mithilfe biochemischer Methoden und rekombinanter DNA-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne des CPE nicht zytotoxisch ist, aber eine starke Rezeptoraffinität aufweist (Horiguchi, Akai, and Sakaguchi 1987, Hanna, Wnek, and McClane 1989). In darauf aufbauenden Studien wurde nachgewiesen, dass die AS 290 – 319 des CPE für die Bindung an die Rezeptorclaudine erforderlich sind (Hanna *et al.* 1991).

Die drei Tyrosinreste des cCPE, Y³⁰⁶, Y³¹⁰ und Y³¹², sind maßgeblich an der Wechselwirkung zwischen cCPE und den Rezeptorclaudinen beteiligt. Alanin-Substitutionen dieser AS führten zu einem Verlust der Bindung und Zytotoxizität von cCPE-PSIF, einem Fusionsprotein aus cCPE und dem *protein synthesis inhibition factor* (PSIF) des *Pseudomonas aeruginosa*-Exotoxin A (Ebihara *et al.* 2007, Harada *et al.* 2007). Auch durch die Mutation von L³¹⁵ zu Alanin wird die Bindung von cCPE an seinen Rezeptor Cldn4 gehemmt (Takahashi *et al.* 2008).

Über ortsgerichtete Mutagenese wurden weiterhin die AS L²²³, R²²⁷ und L²⁵⁴ identifiziert, die an der Claudin-Bindung beteiligt sind (Abb. 9 A) (Harada *et al.* 2007, Veshnyakova *et al.* 2012). Betrachtet man die Kristallstruktur von cCPE (PDB: 2QUO) (Van Itallie *et al.* 2008), wird ersichtlich, dass die drei AS-Reste Y³⁰⁶, Y³¹⁰ und Y³¹² eine stark hydrophobe Vertiefung auf der Oberfläche des cCPE bilden. Daneben wird eine kleinere, weniger hydrophobe Vertiefung von den drei AS L²²³, L²⁵⁴ und L³¹⁵ flankiert (Abb. 9 B). Diese beiden hydrophoben Vertiefungen stellen die EZS2-Turn-bindungstasche auf der cCPE-Oberfläche dar, während R²²⁷ sich am Rand dieser Bindungstasche befindet. Die große, hydrophobe AS L¹⁵¹ des Cldn4, die sich an

der relativen Position (P+1) befindet, interagiert mit der tiefen, stark hydrophoben Tripel-Tyrosin-Bindungstasche (Abb. 9 C) (Veshnyakova *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015).

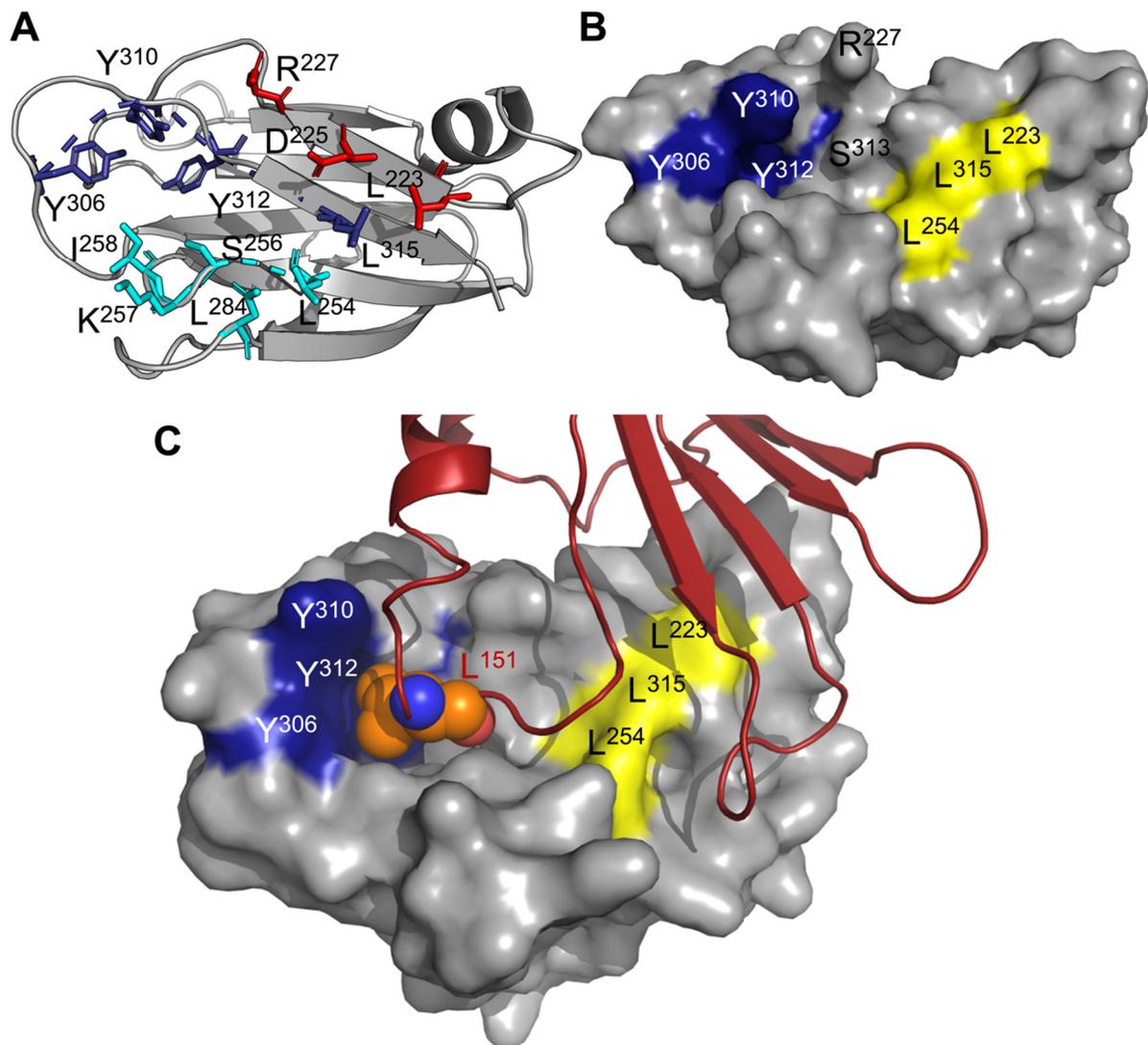


Abbildung 9 Die Claudinbindungstasche in cCPE. (A) Cartoondarstellung von cCPE. Aminosäuren, welche die Bindungstasche umgeben, sind hervorgehoben. In rot sind die Aminosäuren des „oberen“, in türkis die des „unteren“ Randes der Claudinbindungstasche gefärbt. Reste, bei denen eine Alanin-Mutation zu einem Verlust der Claudinbindung führt, sind in blau dargestellt. **(B)** Oberfläche der Claudinbindungstasche in cCPE. Die stark hydrophobe Tripel-Tyrosin-Vertiefung ist in blau, die etwas weniger hydrophobe Tripel-Leucin-Vertiefung in gelb hervorgehoben. Die Aminosäuren R²²⁷ am Rand der Tripel-Tyrosin-Vertiefung und S³¹³ haben ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die Claudinbindungseigenschaften. **(C)** Der große, hydrophobe Rest L¹⁵¹ an Position (P+1) im EZS2 des Cldn4 interagiert mit der stark hydrophoben, tiefen Tripel-Tyrosin-Vertiefung auf der Oberfläche des cCPE (nach (Veshnyakova *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015), PDB ID: 2QUO (A, B) und 5B2G (C)).

Die Kristallstrukturen verschiedener Claudin-cCPE-Heterokomplexe (Shinoda *et al.* 2016, Vecchio and Stroud 2019, Saitoh *et al.* 2015, Nakamura *et al.* 2019) bestätigten den vorhergesagten Bindungsmechanismus der EZS2 in die Tripel-Tyrosin-Tasche des cCPE (Veshnyakova *et al.* 2012) und lieferten zudem Hinweise auf die Beteiligung der EZS1 an der Interaktion.

1.4.4 Änderungen der Claudin-Spezifität durch strukturbasierte Mutagenese von CPE und cCPE

CPE bzw. cCPE binden mit hoher Affinität an ihre Rezeptorclaudine Cldn3, -4, -6, -7 und -9 (s. Abschnitt 1.4.1). Diese spezifische Interaktion kann genutzt werden, um strukturbasierte und funktionelle Untersuchungen zu Claudinen und TJ durchzuführen (Winkler *et al.* 2009, Veshnyakova *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015). Die Bindung von cCPE an Claudine in der Plasmamembran führt zu einer Abschwächung des parazellulären transepithelialen Widerstandes. cCPE lässt sich daher zur Modulierung und Öffnung von Gewebebarrieren einsetzen (Sonoda *et al.* 1999, Kondoh *et al.* 2005). Zytotoxisches CPE könnte direkt zur Behandlung Claudin-überexprimierender Tumoren eingesetzt werden, während cCPE als Targeting-Modul mit einem gekoppelten Chemotherapeutikum zu einer verbesserten Wirkstoffverfügbarkeit in der Tumorthherapie beitragen könnte (Gao and McClane 2012, Pahle *et al.* 2017).

Bei der Verwendung von wildtypischem CPE und cCPE ist die Anwendung allerdings auf die Claudine, welche native CPE-Rezeptoren darstellen, begrenzt. Eine gezielte Veränderung der Bindungseigenschaften von (c)CPE würde die Anwendungsgebiete auch auf nicht native Claudinrezeptoren ausweiten.

Mittels Phagen-Display wurde ein Breitbandbinder selektioniert: die Mutationen S305P/S307R/S313H (cCPE-SSS bzw. CPE-SSS) ermöglichen eine hochaffine Bindung von (c)CPE an die Claudine 1 – 9 (Takahashi *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015).

Aus strukturbasierten Modifikationen, welche über Homologiemodelle identifiziert und mittels Bindungsassays verifiziert wurden, ergaben sich weitere (c)CPE-Varianten mit veränderten Claudin-Bindungseigenschaften. So besitzt cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A eine wesentlich höhere Affinität für Cldn4 als für Cldn3, wodurch eine erhöhte Spezifität der Bindung gewährleistet wird (Veshnyakova *et al.* 2012).

Die Mutationen Y306W/S313H bzw. N218Q/Y306W/S313H ermöglichen eine Bindung von cCPE an Cldn5, welches keine Interaktion mit nativem (c)CPE zeigt (Protze *et al.* 2015, Neuhaus *et al.* 2018).

1.5 Anwendungsmöglichkeiten von CPE und cCPE

Claudine werden in verschiedenen Geweben und Organen differenziell exprimiert und ihre Expression im Rahmen verschiedener Erkrankungen dereguliert. Somit stellen sie geeignete Wirkstoffziele für Arzneimittel dar. Durch die Generierung neuer (c)CPE-Varianten kann die Claudin-Spezifität von (c)CPE so verändert werden, dass auch Nicht-Rezeptorclaudine als Targets genutzt werden können bzw. durch eine Erhöhung der Spezifität die Bindung auf bestimmte Claudinsubtypen beschränkt wird. Daraus ergeben sich zahlreiche

Anwendungsmöglichkeiten für den Einsatz von (c)CPE in der Diagnose und Behandlung verschiedener Erkrankungen.

1.5.1 cCPE in der Diagnose prä-karzinöser Kolonläsionen

Kolorektale Karzinome sind maligne Neoplasien des Dickdarms. Sie zählen zu den häufigsten Todesursachen aufgrund von Tumorerkrankungen (Ferlay *et al.* 2010). Die Entwicklung kolorektaler Karzinome ist gut aufgeklärt und beinhaltet eine Reihe von histologischen, morphologischen und genetischen Veränderungen, welche sich im Verlauf der Kanzerogenese akkumulieren. Dies ermöglicht es, gezielte Vorsorgeuntersuchungen vorzunehmen, um präkanzeröse Polypen möglichst früh zu erkennen und auf diese Weise das Risiko für ein malignes kolorektales Karzinom zu senken (Simon 2016).

Die konventionelle Weißlichtendoskopie ist die Standarduntersuchungsmethode in der Tumörprävention. Dabei werden jedoch bis zu 25% der Polypen übersehen (Rex *et al.* 1997, Heresbach *et al.* 2008). Besonders sessile, vertiefte Adenome sind in der Weißlichtendoskopie schwer erkennbar. Sie stellen bis zu 35% der prämaligen Läsionen dar, sodass durch eine verbesserte Detektion mehr Tumorerkrankungen vorgebeugt werden könnte (le Clercq *et al.* 2014).

Die Echtzeit-Fluoreszenzendoskopie könnte hierbei zur besseren Detektion von Kolonpolypen beitragen. Dazu muss ein geeigneter Ligand identifiziert werden, dessen Rezeptor stark auf der Oberfläche der Kolonpolypen exprimiert wird. Durch eine Kopplung des Liganden mit einem Fluorophor könnten so die Polypen in einer Fluoreszenzendoskopie sichtbar gemacht werden (Rabinsky *et al.* 2016).

Geeignete Rezeptoren stellen hier beispielsweise die Claudine dar. Es wurde mehrfach beschrieben, dass bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen besonders die Cldn1, -3 und -4 überexprimiert und delokalisiert sind (s. Abschnitt 1.3.3, (de Oliveira *et al.* 2005, Dhawan *et al.* 2005). Mithilfe eines Cldn1-bindenden Peptides ist es bereits gelungen, verschiedenartige Kolonläsionen in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, welche in sich in der Weißlichtendoskopie nicht identifizieren ließen (Rabinsky *et al.* 2016).

Durch das gleichzeitige Abzielen auf mehrere Rezeptoren könnten mehrere Läsionen, welche sich in ihrem Claudin-Expressionsprofil unterscheiden, mit einem Mal und bei verbessertem Signal-Hintergrund-Verhältnis detektiert werden. Hier stellt der Multiclaudinbinder cCPE-SSS einen geeigneten Einsatz dar. Ohne vor der Untersuchung genau zu wissen, welche Claudine in den Polypen möglicherweise überexprimiert werden, ließen sich viele Polypen mit cCPE-SSS detektieren, da er mit hoher Sensitivität an ein breites Spektrum von Claudinen (Cldn1-9) bindet.

Dieser diagnostische Ansatz lässt sich auch auf andere Tumorentitäten ausweiten. So könnten Magenkarzinome ebenfalls im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung sichtbar gemacht

werden, während tieferliegende Karzinome durch eine Verbesserung der Kontraste in der Magnetresonanztomographie besser identifiziert werden könnten. Dazu wurde bereits gezeigt, dass ein Kryptophan A-gekoppeltes cCPE spezifisch an Cldn4-überexprimierende Zellen bindet und zuverlässig detektiert werden kann (Piontek *et al.* 2017).

1.5.2 CPE in der Therapie Claudin-überexprimierender Tumore

Eine Vielzahl von malignen Tumoren entsteht aus Neoplasien epithelialen Ursprungs. Obwohl bereits ein breites Spektrum an Therapieformen zur Behandlung von Karzinomen zur Verfügung steht, gibt es dennoch viele Fälle, in denen nach Abschluss der Behandlung entweder der Ursprungsherd oder Metastasen der Karzinome erneut unkontrolliert wachsen. So besteht die Standardtherapie des papillären Schilddrüsenkarzinoms, welches etwa 70% der Schilddrüsenkarzinome ausmacht, aus einer kompletten Entfernung der Schilddrüse und führt im Allgemeinen zu einer guten Prognose für die Patienten. Jedoch entwickeln etwa 20 – 25% der Patienten Metastasen, meist Lungen und Knochenmetastasen, die mit einer schlechten Überlebensprognose einhergehen, da diese Metastasen oft nicht mehr auf die konventionellen Therapien ansprechen (Wartofsky 2010).

Bronchialkarzinome sind die am häufigsten vorkommenden Tumoren (80 – 85%) und verursachen trotz fortgeschrittener Behandlungsmethoden weltweit die meisten Tumor-assoziierten Todesfälle. Zudem treten bei 50 – 70% der Patienten mit einem Lungenadenokarzinom, welches zu den NSCLC zählt, ein Jahr nach der operativen Entfernung chemoresistente Rezidive auf (Ramalingam and Belani 2008).

Pankreaskarzinome sind häufig besonders bösartige Neoplasien und haben eine entsprechend schlechte Prognose für die Patienten. So beträgt die Einjahresüberlebensrate nur 18% (Hidalgo *et al.* 2015).

Eine neuartige Methode zur Behandlung von Karzinomen, welche nicht sensitiv für die etablierten Therapien sind, ist die Behandlung mit bakteriellen Toxinen, welche spezifisch an die Tumorzellen binden (Walther *et al.* 2012). Der Einsatz β -porenformender Toxine, wie CPE, ermöglicht die Kombination aus der starken Zytotoxizität der Toxine zusammen mit der hohen Spezifität für Claudine. Somit würden durch CPE besonders die Zellen geschädigt werden, die viele freie Claudine auf ihrer Oberfläche exprimieren, während die Nebeneffekte auf gesunde Zellen, in welchen Claudine hauptsächlich in TJ vorliegen, gering wären. CPE bietet so einen möglichen Ansatz zur Therapie Claudin-überexprimierender Tumoren, wie beispielsweise Schilddrüsen-, Bronchial-, Pankreas- oder Magenkarzinomen (s. Abschnitt 1.3.3).

Es wurde bereits erfolgreich demonstriert, dass ein Gentransfer mit CPE-cDNA zu einem Absterben Claudin-überexprimierender Mamma- und Kolonkarzinomzellen führt (Walther *et al.* 2012, Pahle *et al.* 2017).

Die Anwendbarkeit von wildtypischem CPE ist jedoch auf solche Karzinome beschränkt, die Cldn3 und -4 überexprimieren. Weiterhin liegen auch in gesundem Gewebe geringe Mengen an Claudinen extrajunktional vor. Daher ist es wichtig, die Bindungseigenschaften von CPE gezielt so zu verändern, dass sie dem Claudin-Expressionprofil der Karzinome entsprechen.

1.5.3 Modulierung physiologischer Barrieren durch cCPE

Obwohl kontinuierlich neuartige Wirkstoffe entwickelt werden, sind einige von ihnen doch in ihrer Anwendbarkeit eingeschränkt, da sie eine unzureichende Pharmakokinetik besitzen. Sie können nicht für die Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, da ihre Penetration durch Gewebesbarrieren behindert wird. Es gibt unterschiedliche Ansätze, um die transzelluläre Wirkstoffaufnahme zu erhöhen. So werden beispielsweise die Nutzung von Influx-Transportern, die Blockierung der Aktivität von Efflux-Transportern und die Rezeptor-vermittelte Transzytose diskutiert (Mizuno *et al.* 2003).

Einen alternativen Ansatz zur Erhöhung der Wirkstoffaufnahme stellt die Erhöhung der parazellulären Permeabilität durch eine transiente Öffnung der TJ-Barriere über sog. *drug enhancers* dar (Lemmer and Hamman 2013, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2016). Hydrophile Wirkstoffe, wie Peptide und Proteine, können die Plasmamembran nicht passiv überwinden, sodass eine Verbesserung der parazellulären Aufnahme erstrebenswert ist (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2016). Ein *drug enhancer* besitzt den Vorteil, dass die Wirkstoffe selbst nicht modifiziert werden müssten. Bisher wurden allerdings hauptsächlich chemische *drug enhancer* beschrieben, die grenzflächenaktiv wirken und somit wenig gewebspezifisch sind und zu starken Nebenwirkungen führen können, wie z.B. zu einer irreversibel gestörten Barrierefunktion durch Exfoliation der Zellen (Hochmann and Artursson 1994, Yamamoto *et al.* 1996, Prausnitz, Mitragotri, and Langer 2004). Demgegenüber stellt die gezielte, reversible Modulierung einzelner Barrierekomponenten eine schonendere und spezifischere Methode dar (Kondoh *et al.* 2006). cCPE, welches mit hoher Spezifität an Claudine bindet, ist ein geeigneter Kandidat für einen TJ-Modulator, da es eine gewebespezifische, dosisabhängige und reversible Erhöhung der parazellulären Permeabilität bewirkt (Kondoh *et al.* 2005, Uchida *et al.* 2010, Neuhaus *et al.* 2018).

Die Blut-Hirn-Schranke verhindert, dass neurotoxische Substanzen in das Gehirn gelangen. Einen wichtigen Beitrag dazu stellt der enge Kontakt zwischen den Endothelzellen der Kapillaren, den Astrozyten und den Perizyten dar, welcher zusätzlich von Neuronen und Mikroglia beeinflusst wird. Die eigentliche Barriere wird jedoch von Effluxtransportern, den metabolischen Enzymen und den TJ der Endothelzellen gebildet (Neuhaus *et al.* 2018). Dabei zählen die TJ in der Blut-Hirn-Schranke zu den dichtesten parazellulären Barrieren des Körpers (Crone and Olesen 1982, Smith and Rapoport 1986). Sie werden hauptsächlich von Cldn5 gebildet (Ohtsuki *et al.* 2008).

Mit cCPE-NQ-YWSH konnte in der Arbeitsgruppe ein Biologikum entwickelt werden, welches spezifisch an Cldn5 bindet und so die Blut-Hirn-Schranke reversibel und dosisabhängig öffnen könnte. Somit ließe sich die Permeation von Medikamenten, z.B. nach einem Schlaganfall oder bei der Therapie von Hirntumoren, deutlich verbessern. In der Studie konnte an primären Endothelzellen gezeigt werden, dass die TJ-Barriere durch cCPE-NQ-YWSH reversibel und konzentrationsabhängig geöffnet wird, sodass Moleküle mit einem Molekulargewicht < 800 Da die parazelluläre Barriere überwinden konnten (Neuhaus *et al.* 2018).

Die transdermale Applikation von Wirkstoffen stellt eine bevorzugte Applikationsart dar. Sie ist nicht-invasiv und führt zu einer besseren Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe im Vergleich zur oralen Applikation, weil der *first pass*-Effekt und der Abbau durch Verdauungsenzyme umgangen werden. Die Wirkstoffkonzentration im Plasma ist konstant und die Patienten-Compliance durch den geringen Aufwand der Applikationsmethode erhöht (Suzuki *et al.* 2011, Iqbal, Ali, and Baboota 2018).

Die transdermale Wirkstoffapplikation wird jedoch durch das sehr dichte, mehrschichtige Epithel der humanen Epidermis limitiert. Dessen Hauptaufgabe besteht darin, den Körper vor Dehydrierung, UV-Strahlung und Eindringen schädlicher Xenobiotika zu schützen (Basler *et al.* 2016). In der humanen Epidermis gibt es zwei physiologische Barrierekomponenten, welche diese Aufgaben erfüllen: das *Stratum corneum*, das aus toten Keratinozyten mit einem hohen Gehalt an Lipiden und Proteinen besteht, und die TJ zwischen den lebenden Zellen des *Stratum granulosum* (SG) (Nakajima *et al.* 2015, Basler *et al.* 2016). Die TJ-Barriere in der Epidermis wird hauptsächlich durch Cldn1 und -4 gebildet (Brandner *et al.* 2002, Furuse *et al.* 2002).

Durch die Applikation von geeigneten cCPE-Varianten ließe sich möglicherweise die TJ-Barriere der Epidermis reversibel öffnen, um so die bessere Penetration von Wirkstoffen zu ermöglichen.

1.6 Zielsetzung

Zur Verbesserung der Tumordiagnostik und Therapie wurden in den letzten Jahren intensiv an neuen Wirkstoffen und Wirkstoffrezeptoren geforscht. Claudine sind oft subtypspezifisch und in unterschiedlichen Tumorentitäten differenziell überexprimiert. Deshalb stellen sie relevante und gut zugängliche Wirkstoffziele dar. Das native CPE ist ein natürlicher Ligand für Cldn3 und -4, jedoch nicht für z.B. Cldn1 und -5. Die Generierung neuartiger CPE-Varianten mit einer veränderten Claudinspezifität ermöglicht es darüber hinaus, solche nicht-nativen CPE-Rezeptoren als Zielmoleküle zu nutzen. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit von nicht-toxischen cCPE- und toxischen CPE-Varianten entsprechend für die Diagnostik und Therapie Claudin-überexprimierender Tumore zu untersuchen.

Dazu ist es zunächst notwendig, die Wechselwirkung zwischen den Claudinen und cCPE besser zu verstehen. In den letzten Jahren wurden mehrere Kristallstrukturen von Claudinen im Komplex mit cCPE veröffentlicht. Diese wurden als Templates zur Generierung von Homologiemodellen für Cldn1 und -5 eingesetzt. Durch eine Verbindung dieser neuen Modelle mit experimentellen Daten zu den Bindungseigenschaften der cCPE-Varianten sollten neue Erkenntnisse über die Konformation des Claudin-cCPE-Komplexes, sowie über die für die Wechselwirkungen relevanten AS-Reste gewonnen werden.

Durch die Doppelmutation S231R/S313H (SRSH) lässt sich die Affinität von CPE und cCPE für Cldn1 und -5 deutlich erhöhen. Dies eröffnet die Möglichkeit, CPE-SRSH auch in der Therapie Cldn1-überexprimierender Tumoren einzusetzen. Um diese Anwendung zu überprüfen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet werden, inwiefern sich Tumorentitäten mit verschiedenen Claudinexpressionsprofilen in der Bindung von cCPE-SRSH und der Zytotoxizität von CPE-SRSH unterscheiden. Daraus sollten sich Anhaltspunkte ergeben, ob CPE-SRSH als Biologikum zur Behandlung Cldn1-überexprimierender Karzinome geeignet ist.

Auch in Magenepithel- und kolorektalen Karzinomen werden Claudine überexprimiert. Diese Karzinome werden zumeist mithilfe endoskopischer Methoden diagnostiziert. Die Anwendung von Echtzeitfluoreszenzendoskopie könnte ein wertvolles Werkzeug für die verbesserte Detektion dieser Tumoren darstellen. Die überexprimierten Claudine dienen dabei als Rezeptoren für cCPE-S305P/S307R/S313H, das eine hohe Affinität für ein breites Spektrum von Claudinen besitzt und so das Fluorophor an die Zielproteine bindet.

Um die Eignung von cCPE-basierten molekularer Sonden zu überprüfen, sollten drei verschiedene Moleküle verwendet werden. Als Standard für die Bindung sollte GST-cCPE verwendet werden, da mit diesem Fusionsprotein auch alle bisher etablierten Bindungsstudien durchgeführt wurden und sich somit unspezifische Interaktionen zwischen cCPE und den Proben leichter erkennen ließen. Um ein Fluorophor-gekoppeltes cCPE zu erhalten, sollten zwei verschiedene Ansätze getestet werden. Zum einen sollte cCPE als Fusionsprotein mit YFP exprimiert werden. In diesem Molekül sind der Ligand und das Fluorophor stabil über eine kovalente Peptidbindung miteinander verbunden. In einem weiteren Ansatz sollte GST-cCPE nach der Expression mit dem Fluorophor Alexa Fluor 647 gekoppelt werden. Mit dieser Methode können an ein Ligandenmolekül mehrere, photostabile Fluorophormoleküle gekoppelt werden, um so das Fluoreszenzsignal zu erhöhen.

Die Detektion von Claudinen mit diesen cCPE-basierten Biosonden sollte in verschiedenen Modellen getestet werden. Als ein *in vitro*-Zellkulturmodell wurde die etablierte Zelllinie HT-29/B6 gewählt, da diese Kolonepithel Eigenschaften besitzt, verschiedene relevante Claudine exprimiert und funktionelle TJ bildet. Um ein eher natives Gewebe zu analysieren, wurden ein Modell eines *ex vivo*-entzündeten Rattenkolons und Organoide, die aus humanen

Magentumoren generiert wurden, verwendet. Biopsien von humanen kolorektalen Polypen, die *ex vivo* mit cCPE inkubiert wurden, wurden als Modell gewählt, welches am ehesten den Einsatz von Fluorophor-gekoppeltem cCPE während einer Endoskopie widerspiegelt.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit der Einfluss von cCPE-Varianten auf die epidermale Barriere untersucht werden. Dazu sollten humane Epidermismodelle verwendet werden, in denen es hauptsächlich Cldn1- und Cldn4-haltige TJ gibt. Über eine neuartige impedanzspektroskopische Methode, die von R. Mannweiler entwickelt wurde, sollte in Kooperation gemessen werden, welchen Einfluss verschiedene cCPE-Varianten auf die epidermale TJ-Barriere haben. Anschließend sollten Paraffinschnitte dieser Modelle mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert werden, um so Aussagen über das Eindringen von cCPE in die Epidermis und den Effekt der cCPE-Behandlung auf die Claudinverteilung im Modell treffen zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreithol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (TRIS-Base)	Merck KgaA, Darmstadt, DE
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Albumin, Rind, Fraktion V	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Ammoniumpersulfat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, DE
Antikörper-Verdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Zusätzen	Dako, North America, Inc., Carpinteria, CA, US
Bromphenolblau	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde AG, München, DE
CellMask™ Deep Red Plasma membrane stain	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
cOmplete™, Mini, EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Coomassie Brilliant-Blue G-250	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Desoxyribonukleosidtriphosphat-(dNTP-)mix zu je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Dimethylsulfoxid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KgaA, Darmstadt, DE
DNA-Marker, 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs®, Inc., Ipswich, MA, USA
DNA-Probenpuffer, gel loading dye, purple (6 ×)	New England Biolabs®, Inc., Ipswich, MA, USA
Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium, ohne Phenolrot	Merck KgaA, Darmstadt, DE

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Calcium, Magnesium	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Eindeckmedium, ProTaq Mount Fluor	BioCyc GmbH + Co. KG, Luckenwalde, DE
Essigsäure	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Ethanol absolut, 99.9%	Avantor J.T. Baker®, Radnor, PA, US
Ethanol, 80% (v/v)	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, DE
Ethidiumbromidlösung, UltraPure™ Ethidium bromide, 10 mg/ml	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Glycerol	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Glycin	Merck KgaA, Darmstadt, DE
His60 Ni Superflow Resin	Takara Bio Inc., Kusatsu, JPSHG
Hoechst 33342	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Imidazol	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Interferon- γ	Pepro Tech GmbH, Hamburg, DE
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Kohlenstoffdioxid	Linde AG, München, DE
LB Medium, Pulver	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, DE
L-Glutathion, reduziert	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Magermilchpulver	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Methanol	Avantor Performance Materials B.V., Radnor, PA, US
Natriumdodecylsulfat	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, US
Paraformaldehyd, 16% (w/v), wässrige Lösung	Science Service GmbH, München, DE
Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Pierce™ Glutathion Agarose	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Plasmocin™ (bei Mykoplasmen-Kontaminationen der Zellkultur)	Lonza, Basel, CH
Poly-L-Lysin	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	National Diagnostics, Atlanta, GA, US
Propan-2-ol	Bernd Kraft GmbH, Duisburg, DE
Proteinmarker, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
PVP 40	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Richard-Allen Scientific™ HistoGel™	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Sab Simplex®, Wirkstoff Simeticon	Pfizer Consumer Healthcare, Berlin, DE
Salzsäure	Avantor J.T. Baker®, Radnor, PA, US
TRIS-Puffer, 1 M, pH 8.8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Trypsin/EDTA solution, 0.25%	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Tumornekrosefaktor- α	Pepro Tech GmbH, Hamburg, DE
Wasser, bidestilliert	arium® pro Reinstwasser System, Sartorius, Göttingen, DE (Institute of Clinical Physiology)
Wasser für die Molekularbiologie	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH
Ziegenserum	Merck KgaA, Darmstadt, DE

Zienam®	500 mg/	500 mg	
(Kombinationspräparat aus Imipenem und Cilastatin)		MSD Sharp Dohme GmbH, Haar, DE	

2.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterial/Gerät	Hersteller
Adhäsionsobjektträger SuperFrost®	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Chemilumineszenz Imaging System, Fusion FX7 Spectra	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
CO ₂ Inkubator, CB210	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Dialyseschlauch, MWCO 12000 – 14000	Medicell Membranes Ltd., London, GB
Einkanalpipette, variabel	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Elektroporator, ECM 399	BTX Molecular Delivery Systems, Holliston, MA, US
Filterpapier, Whatman™ Chromatography Paper, 3 mm	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, GB
Gefrierbehälter, Nalgene® Mr. Frosty™	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Kryoröhrchen, 1,2 ml	Corning Inc., Corning, NY, US
Laser Scanning Mikroskop, LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Mikroplattenlesegerät, Infinite® M200	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Multipette® M4, Einkanal	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Multiwell-Zellkulturplatten, 6, 24 und 96 Well, flacher Boden, transparent	Falcon®, Corning Inc., Corning, NY, US
Multiwell-Zellkulturplatten, 96 Well, runder Boden, transparent	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Objektiv, Plan-Apochromat 63 ×/1.40 Oil DIC	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Parafilm™	Beemis Company Inc., Neenah, WI, US
pH/Ionen Messgerät, SevenCompact pH meter S220	Mettler-Toledo, Columbus, OH, US
pH Messgerät, HI9017 Labor-pH-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, US
Pipettierhelfer, accu-jet® pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
Pipettenspitzen, 10, 200 and 1000 µl	Sarstedt AG + Co. KG, Nümbrecht, DE
Polyvinylidenfluorid Membran	PolyScreen, PerkinElmer, Waltham, MA, US
Reaktionsgefäß, 15 and 50 ml	Falcon®, Corning Inc., Corning, NY, US

Reaktionsgefäß, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß, 1,5 and 2 ml	Sarstedt AG + Co. KG, Nümbrecht, DE
Reinstwasseranlage, arium® pro	Sartorius, Göttingen, DE (Standort: Institut für Klinische Physiologie)
Schlittenmikrotom	Leica, Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Serologische Pipetten, 5, 10 and 25 ml	Falcon®, Corning Inc., Corning, NY, US
Sicherheitswerksbank, HeraSafe®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Spektralphotometer, NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Sterilfilter, Filter Unit 0.2 µM	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, GB
Thermocycler, peqSTAR 2X	Peqlab® Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Untersuchungshandschuhe, Vasco Nitril light	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Western Blot System, Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Zellkultureinsatz „Millicell®“, 0,4 µm PCF, 12 mm	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Zellkulturflasche, 25 und 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AT

2.3 Kits

Kit	Hersteller
Alexa Fluor® 647 Protein Labeling Kit	Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, US
NucleoSpin® Plasmid, Plasmid-DNA-Reinigung im kleinen Maßstab	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
QIAquick® Gel Extractrion Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit, Plasmid-DNA-Reinigung im mittleren Maßstab	Qiagen, Hilden, DE

2.4 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkalische Phosphatase, calf intestinal	New England Biolabs®, Inc., Ipswich, MA, USA
NotI-HF® Restriktionsendonuklease	
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	
Sall-HF® Restriktionsendonuklease	
T4 DNA Ligase	
Lysozym	Merck KgaA, Darmstadt, DE
Benzonase® Nuklease	Merck KgaA, Darmstadt, DE

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Allgemeine Puffer

HEPES/Ringer-Lösung für Lebendzellmikroskopie	für die	134,6 mM NaCl, 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,6 mM NaH ₂ PO ₄ , 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ , 10 mM HEPES, 10 mM D-(+)-Glukose, begast mit Carbogengas, pH 7,4
modifizierte Ringer-Lösung für die <i>ex vivo</i> cCPE-Inkubation		134,6 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 21 mM NaHCO ₃ , 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,2 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgCl ₂ , 0,6 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 g/l Glukose, 10,6 mM HEPES, begast mit Carbogengas, pH 7,4, frisch zugegebene Substrate: 2,5 mM L-Glutamin, 0,5 mM β-Hydroxybutyrat, 10 mM D(+)-Mannose, 50 mg/l Piperacillin, 4 mg/l Zienam

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

TRIS-Acetat-EDTA Puffer	0,4 M Tris, 0,01 M EDTA
-------------------------	-------------------------

2.5.3 Zellulärer Bindungsassay

Fixierungspuffer	3,7% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS
Ablöschpuffer	0,1 M Glycin in PBS
Puffer "B"	1% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA), 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

2.5.4 Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie 250, 10% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig in ddH ₂ O

2.5.5 Immunfluoreszenz-Färbung

2.5.5.1 Paraffinschnitte

20 × TRIS-EDTA-Citrat (TEC)-Puffer	41 mM Tris, 34 mM EDTA, 23 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇
Trypsinlösung	0,001% (w/v) Trypsin in 1 × TEC-Puffer
TBS-T	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,3

2.5.5.2 *Whole mount*-Färbungen (Polypenbiopsien, Rattenkolon)

Fixierungspuffer	2% (w/v) PFA in PBS
Ablöschpuffer	0,125 M Glycin in ddH ₂ O
Blockierungslösung	10% (v/v) Ziegen Serum, 1% (w/v) BSA, 0,8% Triton X-100 in PBS (+/+)

2.5.5.3 Zellen, Kryoschnitte

Fixierungspuffer	2% (w/v) PFA in PBS
Puffer "B"	1% (w/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

2.5.6 MTT-Zytotoxizitätsassay

10 × MTT-Lösung	12,5 mM MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in PBS, sterilfiltriert
MTT Extraktionspuffer	5% (v/v) Triton X-100 in 2-Propanol

2.5.7 Aufreinigung von GST-cCPE

Lysepuffer-GST	1% (v/v) Triton X-100, 0,4 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 × PIC (f.c.) in PBS
Elutionspuffer-GST	50 mM Tris-Base, 10 mM Glutathion (reduziert), 1 × PIC (f.c.) in ddH ₂ O, pH 8,5

2.5.8 Aufreinigung von 6× His-markiertem CPE und YFP-cCPE

His60 Ni Lyse/Äquilibriumspuffer (6 × His CPE)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, in ddH ₂ O, pH 7,4
His60 Ni Lyse/Äquilibriumspuffer (6 × His YFP-cCPE)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1% (v/v) Triton X-100 in ddH ₂ O, pH 7,4
His60 Ni Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, in ddH ₂ O, pH 7,4
His60 Ni Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 1 × PIC (f.c.), in ddH ₂ O, pH 7,4

2.5.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

5 × Laemmli Probenpuffer	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 500 mM DTT in ddH ₂ O
Laufpuffer	25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, in ddH ₂ O, pH 8,1 – 8,4
Sammelgel	5,1% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1), 0,125 M Tris (aus 1 M Tris/HCl, pH 6,8), 1% (w/v) SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED in ddH ₂ O
Trenngel	12,5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1), 0,35 M Tris (aus 1 M Tris-Puffer, pH 8,8), 0,1% (v/v) SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED in ddH ₂ O

2.5.10 Western Blots

Blockierungslösung	1% (w/v) PVP-40, 0,05% (v/v) Tween 20 in ddH ₂ O
Fast Semi-Dry Transfer Puffer	20% (v/v) Methanol, 48 mM Tris-Base, 20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1,3 mM NaHSO ₃ , 1,3 mM N,N-dimethylformamid in ddH ₂ O
TBS-T	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20 in ddH ₂ O, pH 7,3

2.6 Zellen

2.6.1 Prokaryotische Zellen

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Hersteller
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ(DE3) [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>] [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)	(Studier <i>et al.</i> 1990)
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> , λ ⁻	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US

2.6.2 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	ATCC/ ECACC	Ursprung	Referenz bzw. Hersteller
HT-29/B6	-	kolorektales Adenokarzinom (Subklon der Zelllinie HT-29)	(Kreusel <i>et al.</i> 1991), Institute of Clinical Physiology
PC-9	ECACC: 90071810	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, metastatisches Lymphknotengewebe	(Lee <i>et al.</i> 1985), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
SK-MES-1	ATCC: HTB-58	Plattenepithelkarzinom Lunge, metastatische Zellen aus Pleuraerguss	der (Fogh and Trempe 1975), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

2.7 Medien

2.7.1 Medien für die Bakterienkultivierung

LB-Medium	MP Biomedicals, LLC, Santa Anna, CA, US
Agar, Bacto Agar™	BD Life Sciences, Heidelberg, DE
SOC-Medium	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US

2.7.2 Medien für die Zellkultur

DMEM GlutaMAX™	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
DMEM, ohne Phenolrot	
RPMI-1640 AQMedia™	
DermaLife Basal Medium	Lifeline® Cell Technology, Frederick, MD, US
MEM Eagle	Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Beschreibung	Ursprung	Produktnummer	Hersteller
anti-Cldn4, monoklonal	Maus	32-9400	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
anti-humanes ZO1		610967	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
anti-GST, monoklonal		SAB5300159	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, US
anti-GFP, JL-8, monoklonal		632381	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, US
anti-Cldn1, polyklonal	Kaninchen	51-9000	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
anti-Cldn4, polyklonal		PA5-16875	
anti-Occludin, polyklonal		71-1500	
anti-ZO1, polyklonal		61-7300	
anti- <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin A, polyklonal		2120-0130G	

anti-GST, PhycLink® R-Phycoerythrin-Konjugat)	Ziege	PJ312p1	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, US
--	-------	---------	--

2.8.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Ursprung	Produktnummer	Hersteller
anti-Maus IgG, Alexa Fluor® 594 Konjugat		A-11032	
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor® 488 Konjugat		A-11034	
anti-Maus IgG, Alexa Fluor® Plus 488 Konjugat		A-32723	
anti-Maus IgG, Alexa Fluor® Plus 594 Konjugat		A-32742	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor® Plus 488 Konjugat	Ziege	A-32731	
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor® Plus 594 Konjugat		A-32540	
anti-Kaninchen IgG, Cy5 Konjugat		A-10523	
anti-mouse IgG, Meerrettichperoxidase- konjugat, polyklonal		115-035-003	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, US
anti-rabbit IgG, Meerrettichperoxidase- konjugat, polyklonal		111-005-045	

2.9 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenzen
pET28a	5.4 kb, KanaR, pBR322 ori, lacI Promoter, lac Operator, lacI Repressor, 6 × His tag und Thrombinschnittstelle N- terminal, 6 × His tag C-terminal	Merck KGaA, Darmstadt, DE
pET28a-eYFP-cCPEwt	6.5 kb KanaR, pBR322 ori, lacI	Dr. L. Winkler (FMP, Berlin)
pET28a-eYFP- S305P/S307R/S313H	Promoter, lac Operator, lacI Repressor, 6 × His tag und	

pET28a-eYFP-cCPE-Y306A/L315A	Thrombinschnittstelle N-terminal, Yellow Fluorescent Protein, CPE ₁₉₄₋₃₁₉ (wildtyp oder Aminosäuresubstitutionen wie angegeben)	Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und verwendet.
pGEX-4T1	5.0 kb, AmpR, pBR322 ori, tac Promoter, lac Operator, lacIq Repressor, GST und Thrombinschnittstelle N-terminal	Merck KGaA, Darmstadt, DE
pGEX-4T1-cCPEwt		(Winkler <i>et al.</i> 2009)
pGEX-4T1-cCPE-Y3306A/L315A	5.9 kb, AmpR, pBR322 ori, tac Promoter, lac Operator, lacIq Repressor, GST und Thrombinschnittstelle N-terminal, CPE ₁₉₄₋₃₁₉ (Wildtyp oder Aminosäuresubstitutionen wie angegeben)	(Protze <i>et al.</i> 2015)
pGEX-4T1-cCPE-Y306W/S313H		(Takahashi <i>et al.</i> 2012), (Protze <i>et al.</i> 2015)
pGEX-4T1-cCPE-S305P/S307R/S313H		
pGEX-4T1-cCPE-N218Q/Y306W/S313H		(Neuhaus <i>et al.</i> 2018)
pTrc-His-TOPO®	4.4 kb, AmpR, pBR322 ori, trc Promoter, lac Operator, lacIq Repressor, 6 × His tag N-terminal	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
pTrc-His-TOPO-optCPEwt	5.5 kb, AmpR, pBR322 ori, trc Promoter, lac Operator, lacIq Repressor, 6 × His tag N-terminal, Codon-optimidiert zur Expression in eukaryotischen Zellen (Wildtyp oder Aminosäuresubstitutionen wie angegeben)	(Eichner, Augustin, <i>et al.</i> 2017)
pTrc-His-TOPO-optCPE-Y306A/L315A		
pTrc-His-TOPO-optCPE-S231R/S313H		(Piontek <i>et al.</i> 2019)

2.10 Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz 3` - 5`	T _m [°C]
EGFP1 fw	Vorwärts-Primer EGFP	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	64.0
cCPE- Sall fw	Vorwärts-Primer zum Einfügen einer N- terminalen Sall- Schnittstelle in cCPE	AAAGTCGACGATATAGAAAAAGAAATCCTTGATTTAGCTGC	67.4
cCPE- YALA- NotI rv	Rückwärts-Primer zum Einfügen einer C-terminalen NotI- Schnittstelle in cCPE- Mutanten	AAAGCGGCCGCTTAAAATTTTTGAAATGCTATTGAATAAGG	67.4
cCPE- SSS- NotI rv		AAAGCGGCCGCTTAAAATTTTTGAAATAATATGTGATAAGG	66.4
Myco forward	Mykoplasmen- spezifische Primer	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	63
Myco reverse	zur Analyse von Zellkulturüberständen	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	65

2.11 Verwendung menschlicher Proben

Die Verwendung menschlicher Proben erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Das Studienprotokoll wurde vor Studienbeginn zur Erwägung, Stellungnahme, Beratung und Zustimmung der Ethikkommission am Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin vorgelegt und zustimmend bewertet (Antragsnummern EA4/044/19 und EA4/093/17). Alle Patienten wurden vor der Studienteilnahme durch einen Arzt aufgeklärt und haben die Einverständniserklärung unterschrieben. Personen unter 18 Jahren wurden von der Studie ausgeschlossen.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Klonierung von cCPE in den Vektor pET-28a

Der Vektor pET-28a-YFP-cCPEwt wurde von Dr. Lars Winkler (Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin) zur Verfügung gestellt. Um weitere cCPE-Varianten als YFP-Fusionsprotein mit einem N-terminalen 6 × His Tag rekombinant exprimieren zu können, wurde die DNA-Sequenz der entsprechenden cCPE-Mutanten in einem pET-28a-Vektor, welcher zudem die DNA-Sequenz für YFP enthielt, subkloniert.

Um die cCPE-Sequenzen aus den pGEX-4T1-Vektoren in den pET-28a-YFP-Vektor klonieren zu können, mussten zunächst die Restriktionssequenzen für die Enzyme Sall und NotI in die Sequenzen inseriert werden. Dazu wurden pGEX-4T1-cCPE-Plasmide extrahiert und als Template in einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. In dieser PCR wurden durch Vorwärtsprimer die Restriktionsschnittstelle für Sall 5' und durch den Rückwärtsprimer die Schnittstelle für NotI 3' der cCPE-kodierenden Sequenz eingefügt. Die PCR-Fragmente sowie der pET-28a-YFP-cCPE-Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurde die jeweilige Sequenz der cCPE-Mutanten 5' der YFP-Sequenz in den pET-28a-Vektor ligiert. Zur heterologen, rekombinanten Expression wurde ein geeigneter *E. coli*-Stamm mit den Plasmiden transformiert.

3.1.1.1 Plasmidpräparation

Bakterien, welche die entsprechenden Plasmide trugen, wurden in Glycerol bei –80 °C kryokonserviert. Zur Extraktion kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurden 5 ml *lysogeny broth* (LB-Medium), das 50 µg/ml Kanamycin enthielt (LB + Kana), mit einer kleinen Menge der kryokonservierten Bakterien angeimpft und unter Schütteln (230 rpm) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Extraktion größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dieser Übernachtskultur 50 ml LB + Kana inokuliert und unter denselben Bedingungen für eine weitere Nacht inkubiert. Das NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) wurde für die Plasmidaufreinigung im kleinen, das QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen, Hilden) für die Aufreinigung im größeren Maßstab verwendet. Die Aufreinigung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

Dazu wurden die Bakterien zunächst geerntet und unter alkalischen Bedingungen lysiert. Nach dem Abscheiden der Zelltrümmer, welche die genomische DNA, Proteine und andere unlösliche Substanzen enthielten, wurde der Überstand auf eine Silikamembran aufgetragen, an welche die Plasmid-DNA bindet. Durch das Waschen mit einem ethanolischen Puffer mit

hoher Ionenstärke wurden Kontaminationen, wie beispielsweise Salze, Metabolite und weiteres lösliches Zellmaterial, entfernt. Die reine Plasmid-DNA wurde bei niedriger Ionenstärke mit Reinstwasser oder dem mitgelieferten, leicht alkalischen Elutionspuffer eluiert. Die Plasmidkonzentration und -reinheit wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop™ 2000 Microvolume Spectralphotometer (Thermo Scientific™) bestimmt. Die Plasmidkonzentration ist direct proportional zur Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}). Um die Verunreinigung durch Proteine zu bestimmen, wurde zudem die Absorption bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Der Quotient A_{280}/A_{260} sollte größer als 1 sein, um eine ausreichende Reinheit der Plasmidpräparation zu gewährleisten.

3.1.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Über PCR wurden die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme Sall und NotI 5' bzw. 3' der cCPE-kodierenden Sequenz eingeführt und das gewünschte DNA-Fragment in derselben Reaktion amplifiziert.

Folgender Reaktionsansatz wurde für diese PCR verwendet:

Tabelle 1 Einfacher PCR-Ansatz

Komponente	CStammlösung	Beschreibung	Volumen [µl]
Template	10 ng/µl	pGEX-4T1-cCPE-YALA oder pGEX-4T1-cCPE-SSS	1
Vorwärtsprimer	10 µM	cCPE-Sall fw	2.5
Rückwärtsprimer	10 µM	cCPE-YALA-NotI rev oder cCPE-SSS-NotI rev	2.5
dNTPs	10 mM	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US	1
Puffer	5 ×	Phusion HF buffer (New England Biolabs®)	10
DNA-Polymerase	2000 units/ml	Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs®)	0.5
Wasser		Reinstwasser (Biochrom GmbH)	32.5

Um zu vermeiden, dass es bereits beim Ansetzen der Reaktion zu unerwünschten Nebenreaktionen kommt, wurden auf Eis gearbeitet, bis die Reaktion im Thermocycler gestartet wurde. Für die PCR wurde im Thermocycler peqSTAR 2X (Peqlab Biotechnologie GmbH) das in Tab. 2 aufgeführte Programm verwendet.

Tabelle 2 PCR-Programm zum Einfügen von Restriktionsstellen in cCPE

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Vorheizen			
Deckel	110	∞	
Heizblock	98		
Initiale Denaturierung	98	30	
Denaturierung	98	5	
Primerhybridisierung	54	10	30
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	600	
Pause/Kühlung	4	∞	

Im ersten Schritt der PCR wurde die doppelsträngige DNA bei einer hohen Temperatur denaturiert. Anschließend lagerten sich die Primer bei einer mittleren Temperatur an die einzelsträngige DNA an. Die DNA-Polymerase konnte an das Primer-Template-Hybrid binden und den Einzelstrang vom 3'Ende des Primers an auffüllen. Um eine hohe Ausbeute des Zielfragments zu erreichen, wurden mehrere Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation durchgeführt. Währenddessen wurde die Menge des PCR-Fragment exponentiell amplifiziert.

Nach der PCR wurden die Proben mit einem 6 × DNA-Probenpuffer (New England Biolabs®) versetzt. In diesem Puffer ist EDTA vorhanden, um die weitere Reaktion der enthaltenen Enzyme zu inhibieren. Die Proben wurden entweder direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt oder bei – 20 °C gelagert.

3.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wandern aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. In einem Agarosegel, an welches ein elektrisches Feld angelegt wird, lassen sich DNA-Fragmente so entsprechend ihrer Größe auftrennen. Nach dem Erhitzen in Lösung bilden die kettenförmigen Moleküle der Agarose Wasserstoffbrücken aus, sodass Quervernetzungen entstehen. DNA-Fragmente werden durch die polymerisierte Agarose ähnlich wie durch ein Sieb zurückgehalten, sodass sich kleine DNA-Fragmente schneller als größere durch das Gel bewegen können. Das Laufverhalten der DNA im Agarose-Gel wird dabei von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Zum einen hat die Größe der DNA einen entscheidenden Einfluss auf das Laufverhalten. Lineare DNA bewegen sich mit einer zum Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportionalen Geschwindigkeit durch das Gel. Kleinere DNA-Fragmente durchlaufen das Gel also schneller als größere.

Besonders bei Plasmiden ist auch die Konformation der DNA entscheidend für ihr Laufverhalten. Ringförmige, superhelikale DNA bewegt sich schneller durch das elektrische Feld als ringförmige, relaxierte DNA mit derselben Größe. Lineare DNA gleicher Größe hat eine Geschwindigkeit, welche zwischen den beiden Konformationen, superhelikal und relaxiert, liegt. Werden ganze, unverdaute Plasmide auf einem Agarosegel aufgetragen, ergibt sich immer ein Muster mit drei distinkten Banden: die oberste entspricht dem ringförmigen, relaxierten Plasmid, die mittlere Bande kommt durch die teilweise linearisierten Plasmide zustande, während die unterste Bande, die am weitesten durch das Gel gewandert ist, den geschlossenen Plasmiden entspricht, die in superhelikaler Konformation vorliegen.

Ein weiterer entscheidender Faktor, der die Laufgeschwindigkeit der DNA-Proben im Agarosegel beeinflusst, ist die Konzentration von Agarose im Gel. Je höher die Agarose-Konzentration ist, desto kleiner sind die Poren. Die DNA-Fragmente werden dadurch stärker im Gel zurückgehalten und durchqueren höherprozentige Gele langsamer als solche mit niedriger Agarosekonzentration. Standardmäßig werden Agarosegele mit einer Konzentration zwischen 0,5 bis 3% (m/v) verwendet, um DNA-Proben zwischen 50 bp bis 10 kb aufzutrennen.

Damit sich die DNA-Proben im Agarosegel bewegen, muss an dieses ein elektrisches Feld angelegt werden. Dabei hat auch die elektrische Spannung einen entscheidenden Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der Proben. Je höher die Spannung ist, desto schneller wandern die DNA-Fragmente zur Anode.

Letztlich ist auch die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers entscheidend für das Laufverhalten der Proben. Dies lässt sich auf das Vorhandensein verschiedener Ionen, sowie den pH-Wert und dessen Pufferung zurückführen. Für Agarose-Gelelektrophoresen werden hauptsächlich Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) oder Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) verwendet. TAE hat eine geringere Pufferkapazität als TBE, allerdings ermöglicht sie doppelsträngiger, linearer DNA ein ~ 10% schnelleres Durchlaufen des Gels ohne dabei Auflösungsvermögen einzubüßen. Bei superhelikalen Plasmiden bietet TAE-Puffer zudem eine bessere Auflösung als TBE-Puffer.

Für die Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge an Agarose solange in TAE-Puffer aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Erreichte diese Lösung eine handwarme Temperatur, wurden 0,001% (v/v) einer Ethidiumbromidlösung (New England Biolabs®, Inc., Ipswich, MA, USA) zugesetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA der PCR-Proben und macht sie unter UV-Licht sichtbar. Die flüssige Agarose-TAE-Lösung wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen, wo sie auspolymerisierte. Nach dem Gelieren des Gels wurden die horizontalen Begrenzungen von dem Gelschlitten entfernt und dieser in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Die PCR-Proben wurden im Allgemeinen auf ein 2% (m/v) Agarosegel mit 0,001% (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen. Der DNA-Probenpuffer, mit dem die PCR-Proben versetzt wurden, enthält zwei anionische Farbstoffe. Deren Lauffront dient zur Abschätzung dafür, wie weit sich die DNA-Fragmente bereits im Gel bewegt haben. Das Ethidiumbromid im Gel interkaliert in die doppelsträngige DNA der PCR-Produkte und macht sie unter UV-Licht sichtbar. Als Referenz für die Größe der DNA-Fragmente wurde ein 100 bp-Marker (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs) verwendet. Um die DNA-Fragmente und weitere Reaktionskomponenten elektrophoretisch der Größe nach aufzutrennen, wurde eine Spannung von 80 V an das Gel angelegt. Die Auftrennung erfolgte solange bis die Bromphenolbande des Probenpuffers das untere Fünftel des Agarosegels erreichte. Das Gel wurde unter UV-Licht analysiert. Die korrekten DNA-Fragmente sollten eine Größe von 400 bp besitzen. Banden mit der richtigen Größe wurden für die weitere Verarbeitung aus dem Gel ausgeschnitten.

3.1.1.4 Gelextraktion

Die DNA-Fragmente wurden mithilfe des the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

Nachdem die Gelstücke in einem chaotropen Puffer aufgelöst worden waren, wurde die Lösung auf Säulen mit einer Silikamembran geladen. Salze und andere Verunreinigungen wurden durch Verwendung ethanolischer Puffer ausgewaschen. Die DNA wurde in einem kleinen Volumen Reinstwasser eluiert. Der mitgelieferte Elutionspuffer wurde nicht verwendet, um die Ionenkonzentration des Puffers für den Restriktionsverdau im nächsten Schritt nicht zu verändern.

3.1.1.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen, allgemein auch Restriktionsenzyme genannt, schneiden doppelsträngige DNA in oder nahe bei ihren spezifischen Erkennungssequenzen. Für die Umklonierung wurden die beiden Restriktionsenzyme Sall und NotI verwendet. Sie schneiden die beiden DNA-Stränge versetzt, sodass einer der beiden Einzelstränge wenige Basen über das Ende hinausragt (sogenanntes Klebeende oder *sticky ends*). Dadurch wird die Vektor-Religation verringert und die korrekte Insertion des DNA-Fragments bei der Ligation sichergestellt.

Es wurden sowohl der pET-28a-YFP als auch die PCR-Fragmente mit Sall und NotI verdaut. Ein Restriktionsansatz setzte sich dabei wie in Tab. 3 beschrieben zusammen:

Tabelle 3 Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau

a) Restriktionsverdau des Vektors		b) Restriktionsverdau der PCR-Produkte	
Komponente	Volumen [μ l]	Komponente	Volumen [μ l]
Vektor pET-28a-YFP	5 μ g gesamt	PCR-Produkt	25
CutSmart® Puffer, 10 \times	5	CutSmart® Puffer, 10 \times	5
Sall-HF	2	Sall-HF	1
NotI-HF	2	NotI-HF	1
Reinstwasser	ad 50 μ l	Reinstwasser	18

Die Reaktionsansätze wurden für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Um die Vektorreligation zu minimieren, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende mithilfe einer alkalischen Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP), New England Biolabs®) hydrolysiert. Dazu wurde 1 l des Enzyms zu dem Reaktionsansatz gegeben und dieser für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Um den Restriktionsverdau zu beurteilen und ungewollte DNA-Fragmente sowie Enzyme zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Größe des verdauten Vektors wurde bei 5.4 kb erwartet; dieser Ansatz wurde daher in einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Die PCR-Produkte sollten eine Größe von ~ 400 bp besitzen. Für die Auftrennung dieser Proben wurde deshalb ein 2% Agarosegel gewählt. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde wie unter 3.1.1.3 beschrieben durchgeführt. Fragmente, die die erwartete Größe besaßen, wurden, wie unter 3.1.1.4 beschrieben, aus dem Gel aufgereinigt.

3.1.1.6 Ligation

Um geschlossene, zirkuläre Plasmide für die Expression von YFP-cCPE zu erhalten, mussten die cCPE-Fragmente in den pET-28a-YFP-Vektor eingefügt werden. Die T4-DNA-Ligase erzeugt eine Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten DNA-Sequenzen in DNA-Doppelsträngen. Somit konnten der pET-28a-Vektor und die cCPE-Fragmente kovalent miteinander verbunden werden, um zirkuläre Plasmide zu erhalten.

Die Ligationsreaktion wurde wie in Tab. 4 beschrieben angesetzt:

Tabelle 4 Reaktionsansatz für eine Ligation mit T4 DNA Ligase

Komponente	Volumen [μ l]
10 \times T4 Ligasepuffer	1
Geschnittenes PCR-Produkt	7
Geschnittener, dephosphorylierter Vektor	1
T4-DNA-Ligase	1

Um den Grad der Vektor-Religation abzuschätzen, wurde in einer Kontrollreaktion das geschnittene PCR-Produkt durch dasselbe Volumen an Reinstwasser ersetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 14 °C oder für mehrere Tage bei 4 °C inkubiert.

3.1.1.7 Transformation chemisch kompetenter DH5 α

Nach der Ligation wurden die zirkulären Plasmide in kompetente Bakterien transformiert, welche große Menge der Plasmid-DNA produzieren, um die korrekte Insertion des Fragments sowie die Plasmidsequenz zu überprüfen.

Unter einer Transformation versteht man den nicht-viralen Transfer freier DNA in kompetente Bakterien. Chemisch kompetente Bakterien sind mit CaCl₂ vorbehandelt, sodass sich die Plasmide gut an ihre Zellwand anlagern. Durch einen Hitzeschock wird diese permeabel, sodass die Plasmide in die Bakterien gelangen.

DH5 α ist ein *E. coli*-Stamm mit einer hohen Transformationseffizienz. Durch die *recA* und *endA*-Mutationen in seinem Genom, sind in diesem Stamm die heterologe Rekombination und die Endonukleaseaktivität vermindert. Somit ist DH5 α gut für Subklonierungen geeignet.

Chemisch kompetente DH5 α wurden bei – 80 °C gelagert. Vor der Transformation wurden sie langsam auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Bakterien wurden 3 μ l des Ligationsansatzes bzw. der Kontrolle pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert, um ein Anlagern der Plasmid-DNA an die bakterielle Zellwand zu ermöglichen. Die Öffnung der Plasmamembran wurden durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 s induziert. Anschließend wurden die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt, bevor sie mit 250 μ l an vorgewärmtem, nährstoffreichem SOC-Medium versetzt wurden. Darin wurden die Bakterien bei 225 rpm für 1 h inkubiert, sodass das Selektionsgen für die Kanamycin-Resistenz exprimiert werden kann. Für die Selektionierung der transformierten Bakterien wurden zwischen 20 und 200 μ l des Transformationsansatzes steril auf LB-Agarplatten mit 25 μ g/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.1.8 Sequenzanalyse der Plasmide

Nach der Inkubation über Nacht wurden Bakterien aus Einzelkolonien verwendet, um 5 ml LB-Medium mit Kanamycin für eine Plasmidisolierung (s. Abschnitt 3.1.1.1) zu inokulieren. Auf der Platte, auf welcher der Transformationsansatz mit der Vektor-Religationskontrolle ausgestrichen wurde, sollte keine oder nur sehr wenige Kolonien gewachsen sein.

Zur Sequenzanalyse wurden jeweils 10 μ l der isolierten Plasmide mit 4 μ l des EGFP1 Vorwärtsprimers gemischt. Die Sequenzanalyse wurde bei der LGC Genomics GmbH (Berlin, DE) mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977) durchgeführt. Diese Methode erfordert einzelsträngige DNA-Templates (durch Hitzedenaturierung des Reaktionsansatzes), einen passenden DNA-Primer, eine DNA-

Polymerase, dNTPs sowie fluorophormarkierte Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Die ddNTPs sind entsprechend der vier Nukleinbasen mit verschiedenen Fluorophoren markiert. Durch einen Einbau der ddNTPs in den DNA-Strang kommt es zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs keine 3'OH-Gruppe besitzen, kann die Phosphodiesterbrücke zum nächsten Nukleotid nicht gebildet werden. Mit dieser Kettenabbruch-Methode werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert, welche alle mit einem Fluorophormarkierten ddNTP enden. Über Kapillarelektrophorese werden diese Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Sequenz lässt sich über die Reihenfolge der Fluoreszenzsignale auslesen.

3.1.1.9 Kryokonservierung transformierter Bakterien

Zur langfristigen Lagerung der Plasmide wurden die Bakterien, die das korrekte Plasmid aufgenommen hatten, kryokonserviert. Dabei wird dem Medium Glycerol zugesetzt, um zu verhindern, dass sich Eiskristalle in der Lösung ausbilden, welche die Bakterien schädigen könnten. Zur Kryokonservierung wurden 750 µl der Übernachtskulturen mit 250 µl sterilem Glycerol in einem Kryoröhrchen (Corning) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

3.1.1.10 Transformation elektrokompetenter BL21(DE3)

Bei der Transformation elektrokompetenter Bakterien werden mithilfe von elektrischen Impulsen Poren in der bakteriellen Zellwand erzeugt, durch welche Plasmide in die Bakterien gelangen können.

BL21(DE3) ist ein kompetenter *E. coli*-Stamm, welcher für die Expression von Genen unter der Kontrolle eines T7-Promoters geeignet ist. Da dieser Stamm Protease-defizient ist, findet er vor allem bei der Expression großer Proteinmengen Anwendung.

Die Bakterien wurden bei – 80 °C gelagert und vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Ihnen wurde 1 ng des Plasmids zugefügt und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Küvette überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen bildeten und der Boden der Küvette vollständig bedeckt war. Zur Transformation wurde der ECM 399 Elektroporator (BTX Molecular Delivery Systems) verwendet. Die Elektroporation wurde bei 2,1 kV, 100 Ω and 25 µF durchgeführt. Anschließend wurden direkt 975 µl vorgewärmtes SOC-Medium in die Küvette gegeben. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Während der einstündigen Inkubation bei 37 °C und 250 rpm konnten transformierte Bakterien das Kanamycin-Resistenzgen exprimieren. Zwischen 100 und 500 µl der Bakteriensuspension wurden steril auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation, wurden 5 ml-Übernachtskulturen von einzelnen Kolonien in LB-Medium eingesetzt. Aus diesen Kulturen wurde die Plasmid-DNA zur

Sequenzanalyse isoliert (s. Abschnitt 3.1.1.8). Bakterien, welche das korrekte Plasmid trugen, wurden für die weitere Lagerung und Verwendung kryokonserviert (s. Abschnitt 3.1.1.9).

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Expression und Aufreinigung von GST-cCPE

Die nicht toxische Claudinbindungsdomäne cCPE (AS 194 – 319 aus CPE) und die entsprechenden Varianten wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3), die das Plasmid pGEX-4T1-cCPE trugen, exprimiert (Winkler *et al.* 2009).

Zur Proteinexpression wurde zunächst eine Übernachtskultur von 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin (LB + Amp) mit einer kleinen Menge der kryokonservierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in 400 ml LB + Amp überführt und unter denselben Bedingungen weiter inkubiert, wobei das Wachstum der Bakterien photometrisch überwacht wurde. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,6 – 0,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hatte, wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach einer weiteren Inkubation für 3 h bei 37 °C und 230 rpm wurden die Bakterien durch Zentrifugieren (4000 × g, 4 °C, 30 min) geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

Zur Überprüfung der heterologen Proteinexpression wurden jeweils 200 µl der Bakteriensuspension vor der IPTG-Induktion und der Bakterienernte abgenommen. Diese wurden sedimentiert, in SDS-Probenpuffer resuspendiert und über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung (s. Abschnitt 3.2.5) analysiert. Während vor der Induktion der Expression keine oder nur eine leichte Bande für GST-cCPE (ca. 41 kDa) auf dem Gel sichtbar sein sollte, sollte nach der Proteinexpression die entsprechende Bande stark sein (s. Anhang Abb. 26).

Die Sedimente der 400 ml-Kulturen wurden in 15 ml Lysepuffer-GST resuspendiert und auf Eis durch Ultraschallbehandlung (15 Pulse zu je 1 s pro Puls, 20 kHz) aufgeschlossen. Zur Verminderung von Proteinabbau wurde der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid in einer Konzentration von 0,8 mM zugesetzt und die Suspension kräftig gemischt. Bakterientrümmen wurden durch Zentrifugieren (20000 × g, 4 °C, 30 min) entfernt. Der Überstand enthielt das lösliche GST-cCPE, welches anschließend über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden sollte.

Die einzelnen Schritte der Aufreinigung wurden entweder auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt (Coomassie-Gel einer GST-cCPE-Aufreinigung beispielhaft im Anhang, Abb. 26 gezeigt).

3 ml Glutathion-Agarose (Pierce™, Thermo Fisher Scientific, 50% (v/v), entspricht einem Matrixvolumen (MV) von 1,5 ml) wurden in eine 20 ml-Zentrifugensäule (Pierce™, Thermo

Fisher Scientific) überführt und äquilibriert, indem sie zweimal mit $10 \times$ MV ddH₂O und einmal mit $10 \times$ MV PBS gewaschen wurde.

15 ml des geklärten Bakterienlysats (Überstand nach dem Zentrifugieren) wurden auf die Säule geladen und rotierend bei 4 °C für 2 h inkubiert, um eine Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Agarose zu ermöglichen. Der Durchfluss wurde durch das Schwerkraftprinzip abgetrennt und in einem separaten Reaktionsgefäß für weitere Analysen gesammelt. Zur gründlichen Entfernung von ungebundenem Protein und Kontaminationen wurden die Säulen dreimal mit je $10 \times$ MV PBS mit 1% (v/v) Triton x-100 und einmal mit $10 \times$ MV PBS gewaschen. Um kein GST-cCPE zu verlieren, wurden die Abflussventile der Säulen vor der Elution verschlossen. Zur Elution wurden 10 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und diese rotierend bei 4 °C für 30 min inkubiert. Im Elutionspuffer war reduziertes Glutathion vorhanden, welches unter oxidativen Bedingungen mit hoher Affinität an das Glutathion des Säulenmaterials bindet. Somit wurde das GST-Fusionsprotein von der Säule verdrängt und mit dem Puffer eluiert. Das Eluat mit dem GST-cCPE wurde in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen.

Ungebundenes Glutathion wurde mittels Dialyse aus dem Eluat entfernt. Dazu wurde dieses in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 12000 – 14000, Medicell Membranes Ltd.) überführt und das 500-fache Volumen an PBS bei 4 °C unter Rühren dialysiert. Nach einer Stunde wurde der Dialysepuffer durch einen frischen ersetzt und die Dialyse unter gleichen Bedingungen über Nacht fortgesetzt. Das dialysierte Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Assay (Pierce™ BCA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) bestimmt (s. Abschnitt 3.2.3).

3.2.2 Expression and Anreicherung von $6 \times$ His-markiertem CPE and YFP-cCPE

Vollständiges CPE wurde als $6 \times$ His-markiertes Fusionsprotein in *E. coli* TOP10F, die Varianten des Plasmids pTrcHis-TOPO/CPE (Eichner, Augustin, *et al.* 2017) trugen, und YFP-cCPE Fusionsproteine als $6 \times$ His-markiertes Konstrukt in *E. coli* BL21(DE3) mit entsprechenden Varianten des pET-28a/YFP-cCPE Plasmids exprimiert.

Für die Expression von CPE wurden 60 ml LB+Amp und für die Expression von YFP-cCPE 10 ml LB+Amp mit den entsprechenden Glycerolstocks angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Für die Expression wurden im Fall von CPE 270 ml LB+Amp mit 30 ml der Übernachtskultur, für YFP-cCPE 50 ml LB+Amp mit je 3 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden weiterhin bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und das Bakterienwachstum photometrisch überwacht. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 37 °C unter Schütteln für 3 h. Die Bakterien wurden durch

Zentrifugation geerntet ($4000 \times g$, 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand wurde abdekantiert und das Sediment in 5 ml (CPE) bzw. 1,5 ml (YFP-cCPE) His60 Ni Lyse/Äquilibriumspuffer mit PIC ($1 \times$) aufgenommen.

Der enzymatische Zellaufschluss erfolgte mit $0,75 \text{ mg/ml}$ Lysozym und 15 units/ml Benzonase® Endonuklease (Merck, zum Abbau der Zellwände und Nukleinsäuren) auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien durch Beschallung mit 5×10 Pulsen von 20 kHz aufgeschlossen und zur Entfernung von Zelltrümmern wurde für 30 min bei $10000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert.

Zur Aufreinigung von CPE wurden $1,4 \text{ ml}$, zur Aufreinigung von YFP-cCPE 1 ml Matrixvolumen an His60 Ni Superflow Resin (Takara Bio Inc., Kusatsu, JPSHG) verwendet (exemplarische Coomassie-gefärbte Poylacrylamidgele und Western Blots der Aufreinigungen s. Anhang, Abb. 27 und Abb. 28). Das Polyhistidin-Tag der Fusionsproteine bindet mit hoher Affinität an das Ni^{2+} -Ion der Ni^{2+} -Iminodiessigsäureagarose (Ni-IDA). Zunächst wurde das Säulenmaterial als 50% (v/v) Lösung in 20 ml Zentrifugationssäulen überführt und mit $10 \times \text{MV}$ an His60 Ni Lyse/Äquilibriumspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Säule von unten verschlossen und das gesamte geklärte Lysat aufgeladen. Das geklärte Lysat wurde für 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ rotierend inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule einmal mit $10 \times \text{MV}$ Lyse/Äquilibriumspuffer und einmal mit $10 \times \text{MV}$ Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit $5 \times \text{MV}$ an Elutionspuffer. Dieser enthielt eine hohe Konzentration an Imidazol, welches an das Ni^{2+} -Ions des Säulenmaterials bindet und so das rekombinante Protein verdrängt. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen, die über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung qualitativ hinsichtlich ihres Proteingehalts beurteilt wurden. Fraktionen mit einem deutlichen Anteil an aufgereinigtem Protein wurden vereinigt und zweimal gegen das 500-fache Volumen an PBS dialysiert, um das Imidazol für die Downstream-Anwendungen zu Entfernen. Zunächst erfolgte die Dialyse für 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Rühren. Anschließend wurde der Dialysepuffer gewechselt und über Nacht bei den gleichen Konditionen dialysiert.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde kolorimetrisch mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™) nach Vorgaben des Herstellers bestimmt. Der Test baut auf dem Prinzip auf, dass Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu durch Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert werden, was sich kolorimetrisch durch Zugabe von Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) beobachten lässt.

Im ersten Schritt des Tests, auch bekannt als Biuret-Reaktion, bildet sich in alkalischer Umgebung ein hellblauer Chelatkomplex zwischen den Cu^{2+} -Ionen und dem Protein in Anwesenheit von Seignettesalz. Im zweiten Schritt der Farbreaktion reagiert BCA mit den nun

zu Cu^+ reduzierten Kupferionen. Es bildet sich dabei ein Chelatkomplex zwischen zwei Molekülen BCA und einem Cu^+ -Ion aus, der eine intensive violette Farbe aufweist. Dieser wasserlösliche Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die relative Intensität bei 562 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Probe.

3.2.4 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld (Laemmli 1970). Bei dieser Art der Gelelektrophorese dient ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel als Trennmatrix. Die Proteinproben werden mit einem Probenpuffer versetzt, welcher das anionische Tensid SDS enthält. SDS lagert sich proportional zum Molekulargewicht der Proteine an die Polypeptidketten an und überlagert ihre Eigenladung, sodass die Proteine eine konstant negative Ladung aufweisen. Durch die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen SDS und die Denaturierung durch Aufkochen der Proben kommt es zur Linearisierung der Polypeptidketten. Somit ist eine Auftrennung nach der Kettenlänge, die sich proportional zur Molekülmasse verhält, möglich. Bei Anlegen des elektrischen Feldes werden größere Moleküle stärker in der Gelmatrix zurückgehalten als kleinere, und legen daher in demselben Zeitraum eine kürzere Laufsrecke zurück.

Die Proben aus den Proteinaufreinigungsschritten wurden in einem Verhältnis von 1:400 in PBS verdünnt, mit 5 × Laemmli Probenpuffer (f.c. 1 ×) versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf die SDS-Gele aufgetragen. Dabei wurden Trenngelle mit 5% und Sammelgele mit 12,5% Polyacrylamid verwendet. Die SDS-PAGE wurde in Mini-Protean® tetra cell Elektrophorekammern (Bio-Rad) durchgeführt. Zum Durchqueren des Sammelgels wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die bei Eintritt in das Trenngel auf 100 V erhöht wurde. Der Gellauf wurde beendet, wenn sich die Lauffront des Bromphenolblaus im unteren Fünftel des Trenngels befand. Die Gele wurden anschließend für Coomassie-Färbung oder für Western Blots verwendet.

3.2.5 Detektion von Proteinbanden mit Coomassie-Brillantblau

Coomassie-Brillantblau G-250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff, welcher sich an basische Seitenketten der Aminosäuren anlagert und so zu einer sequenzunspezifischen Proteinfärbung führt. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um die Banden der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben zu visualisieren.

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele einmal mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 1 h bei RT unter Schütteln in der Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel schüttelnd bei RT in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt bis die Banden sich klar vom Hintergrund abzeichneten.

3.2.6 Fast Semi-Dry Western Blot

Der sog. Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen in Proteingemischen. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proben werden aus dem Gel in eine Trägermembran transferiert, an deren Oberfläche die Proteine aufgrund der Ladungswechselwirkungen im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften bleiben. Somit sind sie für eine Detektion mit Antikörpern zugänglich.

Für den Transfer wurde das *fast semi-dry* Blotverfahren verwendet. Die Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran (PolyScreen, PerkinElmer) wurden in Methanol aktiviert, um die Hydrophobie der Membran zu reduzieren und einen Kontakt mit dem FSDT-Puffer zu gewährleisten. Die Membran, das Gel sowie die benötigten Filterpapiere wurden vor dem Transfer in FSDT-Puffer äquilibriert. Ausgehend von der Anode der Elektroblo-Einheit (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) wurden drei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Gel und weitere drei Filterpapiere luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Transfer erfolgte bei 0,5 A und 25 V für 18 min.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 90 min bei RT in Western Blot Blockierlösung auf Grundlage eines chemischen Polymers (s. Abschnitt 2.5.10) inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einer verdünnten Lösung des primären Antikörpers (s. Tab. 5 für die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen) inkubiert. Schwach haftende, unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für je 5 min entfernt. Nach Inkubation mit einem Meerrettichperoxidasegekoppelten Sekundärantikörper in 1% Magermilchpulver in TBS-T und erneutem Waschen erfolgte die Detektion mit Lumineszenzlösung (Western Blotting Substrate LumiLight, Roche Diagnostics GmbH oder Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Scientific™) mittels Chemilumineszenz Imaging (Fusion FX7, Vilber Lourmat).

Tabelle 5 Verdünnung der Antikörper für den Western Blot

Bezeichnung	Verdünnung	verdünnt in
Primärantikörper		
anti- <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin A	1:3000	5% BSA
anti-6 × His tag	1:2000	
anti-GFP	1:10000	TBS-T
Sekundärantikörper		
anti-mouse IgG, Meerrettichperoxidase-Konjugat	1:10000	TBS-T

Die Auswertung der Western Blots erfolgte densitometrisch mithilfe der Software AIDA (Version 3.21.001, Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, DE). Zur Bestimmung der Konzentration von His-CPE wurde eine Standardreihe mit bekannter CPE-Konzentration

ebenfalls mittels Western Blot analysiert, sodass sich die Konzentration der aufgereinigten CPE-Proben über die Bandenintensität berechnen ließ.

3.2.7 Kovalente Markierung von cCPE mit einem Fluorophor

Zur Markierung von GST-cCPE mit dem Fluorophor Alexa Fluor 647 wurde das Alexa Fluor®647 Protein Labeling Kit (Molecular Probes) nach Herstellerangaben verwendet. Alexa Fluor 647 ist ein heller Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptions- und Emmissionsmaxima jeweils bei 650 bzw. 668 nm liegen. Das reaktive Alexa Fluor 647 besitzt einen N-Hydroxysuccinimidester-Rest. Dieser kann mit primären Aminen eines Proteins reagieren, sodass sich unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid eine Amidbindung zwischen dem Farbstoff und dem Protein ausbildet.

0,5 ml der GST-cCPE-Fusionsproteine mit einer Konzentration von ~ 2 mg/ml (± 24 nmol) wurden mit 50 μ l einer 1 M Bicarbonat-Lösung (pH 8,3) gemischt, sodass sich ein pH-Wert von zwischen 7,5 – 8,5 einstellte. Dieser Ansatz wurde zu einem im Kit enthaltenen Reaktionsgefäß mit reaktivem Alexa Fluor 647 gegeben. Genaue Stoffmengenangaben sind an dieser Stelle nicht möglich, da sie vom Hersteller nicht bereitgestellt werden. Der Ansatz aus reaktivem Fluorophor und dem GST-cCPE wurde für 1 h bei RT unter Rühren inkubiert. Über Größenausschlusschromatographie wurde das markierte GST-cCPE von ungebundenem Alexa Fluor 647 getrennt. Als Elutionspuffer wurde PBS und nicht der mitgelieferte Puffer verwendet, da dieser zur Konservierung Natriumazid enthält, welches jedoch ungewollte, zytotoxische Effekte in lebenden Zellen auslösen könnte.

Am Spectralphotometer NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) wurde über Absorptionsmessungen die Proteinkonzentration sowie die Effizienz der Markierung gemessen und nach Herstellerangaben berechnet. Alle Proben waren mit 3 – 4 Molekülen Alexa Fluor 647 je Molekül GST-cCPE markiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Standardbedingungen zum Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 5% (v/v) CO₂, 37 °C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator (CB210, Fa. Binder GmbH) kultiviert. Alle Verfahren wurden unter sterilen Bedingungen in einer biologischen Sicherheitswerkbank (HeraSafe®, Heraeus Holding GmbH) durchgeführt.

3.3.2 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden adhärent in sterilen Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25 oder 75 cm² (Greiner Bio-One GmbH) kultiviert. PC-9- und SK-MES-1-Zellen wurden passagiert

oder für Experimente ausgesät, wenn sie eine Konfluenz von 80 – 100% erreicht hatten. HT-29/B6-Zellen wurden für 12 -14 d kultiviert, ehe sie für Experimente verwendet wurden. Die Kultivierungsmedien wurden dreimal pro Woche ausgetauscht. In Tab. 6 sind für jede Zelllinie die Zellkulturmedien mit den notwendigen Zusätzen aufgelistet.

Tabelle 6 Kultivierungsmedien für Zelllinien. FBS – fetales Rinderserum, Pen/Strep – Penicillin-/Streptomycinlösung. Alle Medien wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt und verwendet.

Zelllinie	Medium	Zusätze
SK-MES-1	MEM Eagle (Merck KGaA)	10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% nicht essenzielle AS
HT-29/B6	RPMI-1640	10% FBS, 1% Pen/Strep
PC-9	AQMedia™ (Gibco™)	10% FBS, 1% Pen/Strep

Vor der Passage der Zellen wurde das alte Medium dekantiert und die Zellen kurz mit vorgewärmten PBS gewaschen. HT-29/B6 haften sehr stark an der Zellkulturflasche an und wurden daher zusätzlich mit Trypsin/EDTA-Lösung (Merck KGaA) (0,05%/0,02%) für 5 min bei 37 °C gewaschen. Um die Zellen proteolytisch aus den Zellkulturflaschen zu lösen und zu vereinzeln, wurden sie mit 1 ml Trypsin/EDTA pro 25 cm² Kultivierungsfläche bei 37 °C inkubiert bis alle Zellen abgelöst waren. Je nach Zelllinie geschah dies nach 5 min (HEK-293) bis 60 min (HT-29/B6). Die abgelösten Zellen wurden in 10 bzw. 30 ml frischem Kultivierungsmedium aufgenommen. Das FBS im Medium enthält Trypsin-Inhibitoren, welche die proteolytische Reaktion abstoppen. Für die weitere Kultivierung wurden die HT-29/B6-Zellen 1:7 (1,5 ml Zellsuspension in 5,5 ml frischem Kultivierungsmedium) ausgesät. Die übrigen Zelllinien wurden je nach Wachstumsrate und Experimenten in Verdünnungen zwischen 1:3 und 1:40 ausgesät und weiter unter den genannten Bedingungen kultiviert.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmenkontaminationen getestet. Dazu wurde der Zellkulturüberstand als Template in einer PCR (s. Abschnitt 3.1.1.2) eingesetzt, in welcher Mykoplasmen-spezifische Primer verwendet wurden (Myco forward, Myco reverse). Die PCR-Produkte wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert (s. Abschnitt 3.1.1.3). Mykoplasmen-positive Zellkulturen wiesen eine Bande bei 270 bp auf. Diese Kulturen wurden entweder verworfen oder zur Beseitigung der Kontamination mit 50 mg/ml Plasmocin™ im Medium behandelt.

3.3.3 Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen

Zellen lassen sich für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff lagern. Um die Zellen zu kryokonservieren, wurden die abgelösten Zellen während der Passage in Zellkulturmedium resuspendiert und sedimentiert (200 × g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen sofort in ein Einfriermedium (Standardkultivierungsmedium mit 7,5% (v/v)

Dimethylsulfoxid) aufgenommen und zu 1 ml in Kryoröhrchen (Corning) aliquotiert. Um ein langsames, konstantes Abkühlen zu gewährleisten, wurden die Kryokulturen in vorgekühlte Kryobehälter (Nalgene Mr. Frosty™, Thermo Scientific™) überführt. Diese Behälter sind mit 2-Propanol gefüllt und erzielen konstante Kühlraten von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Die Kulturen wurden in den Kryobehältern über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und am nächsten Tag in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung der eingefrorenen Zellen wurden diese schnell aufgetaut, indem das Kryoröhrchen in ein Wasserbad mit $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gestellt wurde. Zur Kultivierung von HEK-293, SK-MES-1 und PC-9-Zellen wurden die frischen Zellkulturflaschen mit Poly-L-Lysin (PLL, Merck KGaA) beschichtet (1 h Inkubation mit $25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ PLL in PBS bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, anschließendes Waschen mit PBS). Die Kultivierungsfläche der neuen Zellkulturflaschen wurde so gewählt, dass die Zellen bezogen auf die Kultivierung vor dem Einfrieren 1:3 verdünnt wurden. Dadurch wurde das im Gefriermedium enthaltende DMSO so stark verdünnt, dass es nicht durch Sedimentieren der Zellen entfernt werden musste, um die Zellen neben dem Auftauen keinem zusätzlichen Stress auszusetzen. Das restliche DMSO in der Kultur wurde über einen Mediumswechsel am nächsten Tag entfernt.

3.3.4 Zelluläre Bindungsassays mit GST-cCPE-Proteinen

Die Bindungseigenschaften der aufgereinigten GST-cCPE-Proteine und die Bindung unterschiedlicher GST-cCPE-Varianten an Bronchialkarzinomzellen wurden in zellulären Bindungsassays untersucht.

Dazu wurden die Zellen, HT-29/B6-Zellen für die qualitative Untersuchung der aufgereinigten Proteine und SK-MES-1 bzw. PC-9-Zellen als Modelle für Bronchialkarzinomzellen, mit einer Konfluenz von 80% in 24 *well*-Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 mit $0,5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ der jeweiligen GST-cCPE-Konstrukte (bzw. einem entsprechenden Volumen an PBS als unbehandelte Negativkontrolle) inkubiert. Ungebundenes GST-cCPE wurde durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS (+/+) (je $500\text{ }\mu\text{l}$) entfernt, die Zellen mit Fixierungspuffer (3,7% (w/v) PFA in PBS, $250\text{ }\mu\text{l}$ je *well*) für 10 min fixiert, nochmals mit PBS gewaschen und überschüssiges PFA durch 125 mM Glycin (in ddH₂O) abgelöscht. Nach einem weiteren Waschschrift mit $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Zellen durch Inkubation mit $250\text{ }\mu\text{l}$ Puffer B (10 min, RT) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Phycoerythrin-gekoppelten anti-GST-Antikörper (1:250 und $2\text{ }\mu\text{M}$ Hoechst 33342 in Puffer B, $250\text{ }\mu\text{l}$ je *well*) abgedunkelt für eine Stunde bei RT. Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. $500\text{ }\mu\text{l}$ frisches PBS wurde zur Vermessung der Fluoreszenzsignale in die *wells* gegeben.

Die Fluoreszenzintensitäten wurden am Mikroplattenlesegerät Infinite® M200 (Tecan Trading AG) vermessen. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen (λ_{exc} , λ_{em}) sind Tab. 7 zu entnehmen. Die GST-cCPE-Bindung wurde bestimmt, indem das Signal des Phycoerythrin-gekoppelten anti-GST-Antikörpers auf das Signal für Hoechst 33342, welches die Zellzahl reflektiert, normiert wurde.

Tabelle 7 Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorophore im zellulären Bindungsassay.

	R-Phycoerythrin	Hoechst 33342
λ_{exc} [nm]	539 - 551	359 - 371
λ_{em} [nm]	572 - 584	474 - 486

3.3.5 MTT-Zytotoxizitätsassay mit His-CPE-Proteinen

Das wasserlösliche, zellpermeable Tetrazoliumsalz MTT wird von metabolisch aktiven Zellen unter oxidativer Aufspaltung des Tetrazolrings zu einem wasserunlöslichem, blau-violettem Formazan umgesetzt, welches in den Zellen akkumuliert. Dabei ist die Menge des gebildeten Formazans direkt proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Nach Lösen der Formazankristalle in einer alkoholischen Lösung kann über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 580 nm die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen bestimmt werden. Dadurch lassen sich auch Rückschlüsse über die zytotoxischen Effekte von Substanzen ziehen, da diese den Anteil der viablen Zellen und somit das Absorptionssignal bei 580 nm verringern.

Um die Zytotoxizität der aufgereinigten His-CPE-Proteine sicherzustellen, wurden sie in MTT-Assays mit HT-29/B6 Zellen getestet. Die Analyse der zytotoxischen Effekte verschiedener CPE-Varianten auf Bronchialkarzinomzellen wurde in SK-MES-1- und PC-9-Zellen untersucht. Die jeweiligen Zellen wurden so in 96 *well*-Platten ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 95% erreicht hatten.

Am Tag des Assays wurde das verbrauchte Medium abgenommen und durch 100 μ l Medium mit verschiedenen Konzentrationen an CPE ersetzt. Als Positivkontrolle wurde ein Medium mit 0,1% (v/v) Triton X-100 verwendet, als unbehandelte Negativkontrolle diente Medium mit PBS. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ mit dem CPE-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch ein CPE-freies Medium ohne Phenolrot (supplementiert mit 1 mg/ml P/S und 10% (v/v) FBS) ersetzt. Nach drei weiteren Stunden, in denen die Zellen weiter unter den Standardbedingungen inkubiert wurden, wurde auch dieses Medium abgenommen. Die akkumulierten Formazankristalle wurden durch MTT-Extraktionspuffer (100 μ l pro *well*) für 30 min unter Schütteln lysiert. Die Absorption wurde anschließend am Mikroplattenlesegerät (Infinite® M200, Tecan Trading AG) vermessen.

Die Viabilität der Zellen ist als % der Absorption bezogen auf die Absorption der Negativkontrolle ausgedrückt. Zur graphischen Darstellung (Abb. 14) wurde das Modell „*log(agonist) vs. response*“ (Hill-Koeffizient = 1) in GraphPad Prism 6 verwendet.

3.3.6 Behandlung von HT-29/B6-Zellen mit cCPE-Proteinen

Für mikroskopische Analysen von cCPE-behandelten HT-29/B6-Zellen wurden diese mit etwa 60% Konfluenz auf Deckgläser ausgesät. Für Lebendzellanalysen wurden Deckgläser mit einem Durchmesser von 32 mm, für eine anschließende Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung 12 mm verwendet.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium über den Zellen abgenommen und durch Medium mit 10 µg/ml der jeweiligen cCPE-Proteine (GST-cCPE, Alexa Fluor 647-gekoppeltes GST-cCPE, YFP-cCPE) ersetzt.

Für die Lebendzellmikroskopie bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Deckgläser zuvor in eine spezielle Kammer eingebaut, sodass die Bindung des cCPE in Echtzeit verfolgt werden konnte. Hierbei wurde kein Zellkulturmedium, sondern HEPES-Ringer-Lösung verwendet. Bereits nach wenigen Minuten konnten spezifische Bindungssignale detektiert werden, welche nach ca. 30-minütiger Inkubation stabil waren.

Sollten die Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung weiterverwendet werden, wurden sie nach 30-minütiger Inkubation mit dem cCPE-haltigem Medium fixiert (2% (w/v) PFA, 20 min, RT) und anschließend nach dem Protokoll unter Abschnitt 3.3.9 weiterverarbeitet.

3.3.7 cCPE-Behandlung eines *ex vivo* entzündeten Kolonmodells

Männliche Wistar-Ratten (m = 250 – 300 g), welche Standardfutter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung hatten, wurden durch CO₂-Exposition betäubt und mit einem Schnitt in das Herz getötet. Das distale Kolon (ca. 15 cm ab dem Rektum) wurde sofort präpariert, mit modifizierter Ringerlösung gespült und die *Tunica serosa*, *Muscularis propria* und die *Tunica submucosa* entfernt. Die Mukosa (bestehend aus der *Lamina epithelialis mucosae*, der *Lamina propria mucosae* und der *Lamina muscularis mucosae*) wurde weiterverwendet. Auf den geöffneten, aufgespannten Darmabschnitt wurden von der serosalen Seite mit Histoacrylkleber Ringe geklebt, sodass kleine Biopsien aufgespannt in Ussing-Kammern eingesetzt werden konnten. 0,54 cm² des Darmepithels konnten so pro Ussing-Kammer behandelt werden (Fromm, Schulzke, and Hegel 1993, Epple *et al.* 2000). Auf der mukosalen und der serosalen Seite der Ussing-Kammer wurden zunächst 10 ml Carbogen-begaste und auf 37 °C vorgewärmte modifizierte Ringer-Lösung mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FBS gefüllt. Weiterhin befand sich in der Badlösung zur Entschäumung eine geringe Menge an Simeticon in Form des Arzneimittels Sab Simplex® (Pfizer Consumer Healthcare). Nach ca. 30-minütiger Inkubation bei 37 °C und unter ständiger Begasung befand sich das System wieder im Gleichgewicht.

Daraufhin wurde der transepitheliale Widerstand (TER von engl. *transepithelial resistance*) gemessen, um eine Unversehrtheit des Gewebes sicherzustellen. Intaktes Gewebe besaß dabei einen Widerstand im Bereich von 100 – 300 Ω .

Anschließend wurden auf der serosale Seite die Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interferon- γ (IFN γ) (beides Pepro Tech) mit einer finalen Konzentration von 10⁴ U/ml (TNF α) bzw. 10³ U/ml (IFN γ) zugegeben. Die Gewebestücken wurden unter den genannten Bedingungen für 20 h mit den Zytokinen auf der serosalen Seite inkubiert. Durch Überprüfen des TER wurde sichergestellt, dass das Gewebe während der langen Inkubationsdauer keinen Schaden genommen hatte (Amasheh *et al.* 2009).

Die Badlösung wurde vorsichtig entfernt. Für die cCPE-Inkubation wurde auf die mukosale Seite 500 μ l vorgewärmte, Carbogen-begaste modifizierte Ringer-Lösung, welche die jeweiligen cCPE-Varianten (cCPE-SSS oder -YALA) in einer Konzentration von 10 μ g/ml enthielt, gegeben. Auf der serosalen Seite befand sich dabei nur die modifizierte Ringer-Lösung. Die Gewebestücken wurden für 1 h bei 37 °C mit den cCPE-Proteinen inkubiert.

Nachdem die Proben vorsichtig aus den Ussing-Kammern entnommen wurden, wurden sie mit 2% PFA für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Nicht abreagiertes PFA wurde mit 125 mM Glycin über Nacht bei 4 °C abgelöscht. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde als *whole mount*-Färbung nach der unter 3.3.9 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt.

3.3.8 *Ex vivo*-cCPE-Behandlung humaner Kolonpolypen

Biopsien humaner Kolonpolypen wurden durch PD Dr. med C. Bojarski im Rahmen von anderweitig unauffälligen Koloskopien in der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie am Campus Benjamin Franklin mit Zustimmung der Patienten entnommen. Nach der Entnahme wurden die Biopsien direkt in eine Standardsalzlösung (0,9% (w/v) NaCl) gegeben und gekühlt. Zwischen der Entnahme der Biopsien und der weiteren Verarbeitung am Institut für Klinische Physiologie/Arbeitsbereich Ernährungsmedizin sind maximal 30 min vergangen.

Die Biopsien wurden, falls nötig, mithilfe eines Skalpells zerkleinert und in vorgewärmte, Carbogen-begaste modifizierte Ringerlösung mit 15 μ g/ml cCPE überführt. Bei 37 °C wurden die Biopsien für 30 min unter regelmäßigem, vorsichtigem Invertieren mit den cCPE-Proteinen inkubiert.

Die Biopsien wurden in 2% (w/v) PFA-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Überschüssiges PFA wurde mit 125 mM Glycin über Nacht bei 4 °C abgelöscht. Die Biopsien wurden als *whole mount*-Präparate nach dem unter Abschnitt 3.3.8 beschriebenen Verfahren für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt.

3.3.9 Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Zellen und *whole mount*-Präparaten

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen lassen sich Proteine in Zellen, Gewebeschnitten oder *whole mount*-Präparaten visualisieren und somit lokalisieren. Bei dieser Methode werden in zwei Schritten spezifische Antikörper gebunden. Der Primärantikörper richtet sich dabei gegen das zu untersuchende Protein, während der Sekundärantikörper gegen den Ursprungsorganismus des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz anregen lässt. Bei Verwendung von Primärantikörpern aus zwei verschiedenen Spezies und Sekundärantikörpern mit Fluorophoren unterschiedlicher Anregungs- und Emissionswellenlängen lassen sich gleichzeitig zwei Proteine im Präparat visualisieren.

Die Fluoreszenzfärbungen von fixierten Zellen und *whole mount*-Präparaten ähneln sich in ihrem Ablauf und werden aus diesem Grund gemeinsam erläutert. Der genaue Versuchsablauf mit den eingesetzten Lösungen und Inkubationszeiten ist in Tab. 8 dargestellt.

Tabelle 8 Versuchsablauf, Lösungen und Inkubationszeiten bei der Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von HT-29/B6-Zellen und *whole mount*-Präparaten (Rattenkolon, humane kolorektale Polypen). Die Zusammensetzungen der jeweiligen Lösungen sind in Tab. 2.5.5.2 und 2.5.5.3 angegeben. Für Zellen auf 12 mm-Deckgläsern wurde mit einem Volumen von 60 – 100 µl je Deckglas gearbeitet. Das Volumen für die Färbung der *whole mount*-Präparate richtete sich nach der Größe der Gewebestücken. Diese sollten zu jeder Zeit vollständig bedeckt sein.

Arbeitsschritte	Zellen		<i>whole mount</i> -Präparate	
	Lösung	Inkubation	Lösung	Inkubation
Fixierung	2% (w/v) PFA	20 min	2% (w/v) PFA	20 min
Ablöschen	125 mM Glycin	5 min	125 mM Glycin	ÜN
Permeabilisieren	0,5% (v/v) Triton X-100	5 min	1% (v/v) Triton X-100	2 h
Waschen	PBS	2 × 1 min	-	
Blockieren	Puffer B	10 min	Blockierlösung	3 h
1. Primärantikörper	Puffer B	1 h bei RT	Blockierlösung	ÜN bei 4 °C
Waschen	Puffer B	1 ×	Blockierlösung	1 × 1 min, 1 × 10 min, 2 × 1 h
2. Primärantikörper	Puffer B	1 h bei RT	Blockierlösung	ÜN bei 4 °C

Waschen	Puffer B	5 × 2 min	Blockierlösung	1 × 1 min, 1 × 10 min, 2 × 1 h
Sekundärantikörper	Puffer B mit DAPI (1:500)	30 min bei RT	Blockierlösung	ÜN bei 4 °C
Waschen	Puffer B	5 × 2 min	Blockierlösung	1 × 1 min, 1 × 10 min, 2 × 1 h
Färbung	-		Blockierlösung mit DAPI (1:500 – 1:1000)	1 h bei RT
Waschen	-		PBS ddH ₂ O	2 × 15 min 1 × 15 min

Die *whole mount*-Präparate wurden nach dem Ablöschen des überschüssigen PFAs mit Glycin mit 1% (v/v) Triton X-100-Lösung behandelt. Dies führt zu einer Permeabilisierung der Zellmembranen, sodass die recht großen Antikörper auch an Proteine im Inneren der Zellen, bspw. ZO-1 (von lat. *Zonula Occludens-1*) und Occludin, binden können. Um das Hintergrundsignal aufgrund unspezifischer Interaktionen zwischen den Antikörpern und Protein-Bindungsstellen zu minimieren, wurden die Präparate in der jeweiligen Blockierlösung (s. Tab. 2.5.5.2 und 2.5.5.3) inkubiert.

Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (die entsprechenden Verdünnungen sind Tab. 9 zu entnehmen). Ungebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen entfernt. Anschließend wurde das Präparat mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert und gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern, welche gleichzeitig zu dem Präparat gegeben werden konnten. Ungebundene Sekundärantikörper wurden ebenfalls durch Waschen entfernt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch die Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Objektträger mit den fixierten und gefärbten HT-29/B6-Zellen wurden direkt mit Eindeckmedium (ProTaq Mount Fluor, BioCyc GmbH + Co. KG) auf Objektträger aufgebracht. Die Ringe auf der serosalen Seite der Präparate des Rattenkolons wurden entfernt und diese auf Objektträger überführt, sodass die serosale Seite zum Objektträger gerichtet war, und ebenfalls mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingebettet. Die Polypenbiopsien wurden nicht eingebettet, sondern in PBS am LSM analysiert.

Tabelle 9 Übersicht über die verwendeten Antikörper, Fluorophore und ihre Detektion für die Analyse von Zellen und *whole mount*-Präparaten. Verdünnungen wurden in Blockierlösung angesetzt. λ_{exc} – Anregungswellenlänge, λ_{em} – Emissionswellenlänge. Wellenlängen sind als der Bereich angeben, welcher zur Anregung bzw. Detektion am LSM verwendet wurde.

Primär-antikörper	Verdünnung	Sekundär-antikörper	Fluorophor	Verdünnung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]
Maus anti-GST	1:100	Ziege anti-Maus	Alexa Fluor 594	1:250	543	587 - 694
Kanninchen anti-ZO1		Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488		488	498 - 561
				Cy5	1:400	633
			DAPI	1:400	405	416 - 489

3.3.10 cCPE-Behandlung eines humanen Epidermismodells

Die Modelle der rekonstruierten humanen Epidermis (RHE) wurden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durch Fr. S. Vidal-y-Sy angelegt und in Kooperation mit Hr. R. Mannweiler am Institut für Klinische Physiologie analysiert.

Die RHE-Modelle wurden aus primären humanen Keratinozyten nach einem etablierten Protokoll generiert (Basler *et al.* 2017). Dazu wurden 3×10^5 Zellen in 500 μ l DermaLife Basal Medium (Lifeline Cell Technology) mit 1,5 mM CaCl_2 aufgenommen und in Zellkultureinsätze (Merck) überführt. In das basale Kompartiment wurden 2,5 ml Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden für 30 h bei 37 °C, 5% (v/v) CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Daraufhin wurde das Medium aus dem apikalen Kompartiment entfernt und das basale Medium durch 1,5 ml EpiLife mit 1,5 mM CaCl_2 , 92 μ g/ml Ascorbinsäure (Sigma) und 10 ng/ml rekombinatem, humanem Keratinozyten-Wachstumsfaktor (R&D Systems) ersetzt. Die Zellen befanden sich somit an der Grenzfläche zwischen Luft und flüssigem Zellkulturmedium. Dieser Zustand bewirkt, dass die Zellen mehrschichtig wachsen und sich verschiedene Lagen, die denen einer humanen Epidermis entsprechen, ausbilden (Basler *et al.* 2017).

Drei bzw. vier Tage nach dem Übergang zur Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche wurden 50 μ g/ml der entsprechenden GST-cCPE-Varianten zu dem basalen Medium gegeben. Die Inkubation mit GST-cCPE erfolgte entweder für 24 oder für 48 h. Bei 48-stündiger Inkubation wurde das Medium nach 24 h durch frisches cCPE-haltiges Medium ausgetauscht. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Impedanz der Modelle gemessen. Anschließend wurden sie für 30 min mit 4% (w/v) PFA fixiert. Die fixierten Modelle wurden aus den Plastikhalterungen der Zellkultureinsätze entfernt und am Institut für Pathologie am Campus Benjamin Franklin entwässert. Die entwässerten Modelle wurden in flüssiges Paraffin eingebettet und mit einem Schlittenmikrotom (Leica, Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE) in 3 μ m dicke Schnitte

geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost®, R. Langenbrick GmbH) aufgebracht.

3.3.11 YFP-cCPE-Behandlung von Magenkarzinom-Organoiden

Magenkarzinome wurden in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie am Campus Benjamin Franklin operativ entfernt. Die Untersuchung des Gewebes zu Forschungszwecken erfolgte nach Zustimmung der Patienten. Die Organoiden wurden durch Fr. J. Arndt in der Arbeitsgruppe für experimentelle und klinisch-chirurgische Forschung kultiviert (Ehlen *et al.* 2020) und für Experimente zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in 8 *well*-Kammerobjektträgern.

Nach etwa dreiwöchiger Kultivierung wurden die lebenden Organoiden mit YFP-cCPE behandelt. Dazu wurde der Kulturüberstand über der 95%-igen Matrigelschicht durch frisches RPMI-Medium mit 30 µg/ml YFP-cCPE-SSS bzw. -YALA ersetzt. Die Organoiden wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und die Bindung von YFP-cCPE an die Organoiden über das YFP-Signal am LSM 780 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) verfolgt. War das Signal über einen Zeitraum von mindestens 60 min konstant, wurden das Medium über den Organoiden vollständig abgenommen und 2 × mit je 350 µl vortemperiertem (RT) PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4% (w/v) PFA/0,5% (w/v) Glutaraldehyd (in PBS) für 2 h bei RT. Anschließend wurde die Fixierungslösung abgenommen und 3 × mit je 350 µl bidestilliertem Wasser gewaschen. In einer Kryoeinbettform wurden 150 – 200 µl flüssiges Richard-Allen Scientific™ HistoGel™ (Thermo Scientific™) vorgelegt und ausgehärtet. Das Matrigel mit den Organoiden wurde aus den Kammern entfernt und je zwei identisch behandelte Kammern vereinigt. Das Matrigel wurde auf das ausgehärtete HistoGel™ in der Kryoeinbettform gegeben und mit weiterem flüssigen HistoGel™ überschichtet. Nach ca. 1 h war der Block vollständig ausgehärtet, wurde aus der Form entfernt und über Nacht in 4% Formalinlösung (in PBS) nochmals fixiert. Die Blöcke wurden entweder in 70% Ethanol gelagert oder direkt am Institut für Pathologie entwässert und in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom (Rotationsmikrotom Leica Biosystems Nussloch GmbH) wurden 4 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken angefertigt, welche anschließend auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost®, R. Langenbrick GmbH) aufgebracht, entparaffiniert und sodann für die Immunfluoreszenzfärbung (s. Abschnitt 3.3.12) verwendet wurden.

3.3.12 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten

Vor der Immunfluoreszenzfärbung mussten die Paraffinschnitte zunächst rehydriert werden. Dazu wurden sie 3 × 20 min in Xylol, anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100% - 2 min, 100% - 5 min, 90%, 80%, 70% jeweils 1 min) und in destilliertem Wasser (5 min) inkubiert. Die Schnitte wurden in TEC-Puffer in der Mikrowelle gekocht (3 10 min,

360 W), für 30 min auf RT abgekühlt, 2 × 3 min in TBS-T gewaschen und für 10 min bei 37 °C in 0,001% Trypsinlösung inkubiert. Anschließend wurden sie nochmals kurz mit destilliertem Wasser und 2 × 3 min mit TBS-T gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungstellen wurde für 30 min bei RT die Antikörper-Verdünnungslösung mit Hintergrund-reduzierenden Zusätzen „DAKO-Block“ auf die Schnitte gegeben. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit den Primärantikörpern, welche gleichzeitig auf die Zellen gegeben wurden (die entsprechenden Verdünnungen sind Tab. 10 zu entnehmen). Am nächsten Tag wurden die Primärantikörper abgenommen und die Schnitte 3 × 3 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte für 90 min bei 37 °C. Danach wurden die Schnitte 2 × 5 min mit TBS-T und 2 × 3 min mit destilliertem Wasser gewaschen und mit dem Eindeckmedium ProTaq Mount Fluor eingebettet. Die gefärbeten Schnitte wurden am LSM 780 analysiert.

Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Antikörper, Fluorophore und ihre Detektion für die Analyse von Paraffinschnitten. Verdünnungen wurden in PBS angesetzt. λ_{ex} – Anregungswellenlänge, λ_{em} – Emissionswellenlänge. Wellenlängen sind als der Bereich angeben, welcher zur Anregung bzw. Detektion am LSM verwendet wurde.

Primär-antikörper	Verdünnung	Sekundär-antikörper	Fluorophor	Verdünnung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]
Maus anti-Cldn4		Ziege anti-Maus	Alexa Fluor Plus 488		488	498 - 561
Maus anti-GST						
Kanichen anti-Cldn1	1:100			1:250		
Kaninchen anti-ZO1		Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor Plus 594		594	596 - 694
Kaninchen anti-Cldn4						
			DAPI	1:400	405	416 - 489

3.4 Bioinformatische Methoden

3.4.1 Homologiemodellierung von Claudinen und Claudin/cCPE-Komplexen

Die Homologiemodellierung ist eine *in silico*-Methode, mit deren Hilfe sich die Tertiärstruktur einer Proteinsequenz auf Basis einer experimentell bestimmten, homologen Struktur vorhersagen lässt. Die Grundannahme dieser Methode besteht darin, dass eine Ähnlichkeit in der Primärstruktur, also der AS-Sequenz, eine Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur mit sich bringt.

Homologe Proteine werden identifiziert, indem die AS-Sequenz des Proteins mit unbekannter Struktur mit den Sequenzen von Proteinen mit bekannter Tertiärstruktur abgeglichen wird. Eine geeignete Plattform dafür bietet die „*Protein Data Bank*“ (PDB) (Burley *et al.* 2017). Das Proteinrückgrat dieser sogenannten „Template-Proteine“ wird für die Modellierung der unbekanntes Proteinstruktur verwendet. Dabei werden einzelne AS des Templates gegen die entsprechenden AS aus der Zielsequenz ausgetauscht, während das Proteinrückgrat unverändert bleibt. Anschließend wird das erstellte Modell energetisch minimiert.

Die Qualität des generierten Modells hängt stark von der Qualität des Template-Proteins sowie der Identität zwischen den beiden AS-Sequenzen ab. Dabei sollte die Auflösung der als Template verwendeten Kristallstruktur im Idealfall nicht weniger als 3 Å und die Sequenzidentität nicht weniger als 30% betragen. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften in der Proteinstruktur sollten Cysteine und Proline im Template- und Zielprotein an derselben Position liegen.

Für diese Arbeit wurden die Homologie-Modelle mit der Software Maestro (Version 12.0, Schrödinger, LLC, New York, US) erstellt. Für die Modellierungen wurden die veröffentlichten Kristallstrukturen 3X29 (murines Cldn19 mit cCPE (Saitoh *et al.* 2015)), 5B2G (humanes Cldn4 mit cCPE (Shinoda *et al.* 2016)) und 6OV2 (humanes Cldn9 mit cCPE (Vecchio and Stroud 2019)) verwendet. Die Templates für eine Homologie-Modellierung wurden entweder nach der höchsten Übereinstimmung der Primärstruktur oder nach den bekannten cCPE-Bindungseigenschaften des Zielproteins ausgewählt. Energetisch ungünstige Schleifen im Modell wurden über eine energetische Vorabminimierung in energetisch günstigere Konformationen gebracht. Die erhaltenen Tertiärstrukturmodelle wurden anschließend insgesamt energetisch minimiert. Dazu wurde der Membranbereich für die vorhergesagten TMHs (Suzuki *et al.* 2014, Saitoh *et al.* 2015, Nakamura *et al.* 2019) manuell definiert. Für die intra- und extrazellulären Segmente wurde ein wässriges Milieu angenommen und daher das Kraftfeld OPLS (*optimized potentials for liquid simulations*) mit dem Solvatisierungsmodell VSGB verwendet. Als RMS-Gradient (engl. *root mean square*, quadratisches Mittel) wurden 0,1 kcal/mol/Å angewendet.

Polare Interaktionen zwischen AS-Resten wurden über entsprechende Funktionen in Maestro oder PyMol 2.3 (Schrödinger, LLC) ermittelt. Teilweise wurden polare Interaktionen auch zwischen AS-Resten passender Ladungen angenommen, wenn ihr Abstand weniger als 4 Å betrug.

3.4.2 Visualisierung

Für diese Arbeit wurden die Darstellungen von Proteinstrukturen mit PyMol 2.3 erstellt. Die gezeigten Alignments wurden in Geneious Prime 2020.2 (Biomatters, Auckland, NZ) erarbeitet und für die Darstellung aufbereitet. Zur Finalisierung von Abbildungen und der Erstellung von

schematischen Abbildungen wurden Corel Draw X5 (Corel Corporation, Ottawa, CA, 2010) und Microsoft PowerPoint 2016 (Microsoft, Redmont, WA, US, 2016) verwendet.

3.5 Statistik

Die Experimente wurden mehrfach durchgeführt. Dies ist durch „n“, die Anzahl der Replikate, gekennzeichnet. Zur statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, US) verwendet. Messwerte sind als arithmetisches Mittel \pm SEM (engl. *standard error of the mean*) dargestellt. Wertegruppen wurden nach D'Agostino-Pearson auf Normalverteilung getestet. Sofern nicht anders angegeben, wurde bei normalverteilten Datensätzen eine einseitige, einfaktorielle Varianzanalyse (kurz ANOVA von engl. *analysis of variance*) mit anschließendem Sidak-Test durchgeführt. Nicht normalverteilte Daten wurden mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und des Post-hoc-Tests nach Dunn ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen cCPE und den Claudinen

CPE bietet einen neuen Ansatz, um Claudin-überexprimierende Karzinome zu behandeln. Mit dem wildtypischen CPE ist die Anwendbarkeit jedoch auf solche Karzinome beschränkt, welche Rezeptorclaudine (vorallem Cldn3 und -4) exprimieren. Um das Spektrum an CPE-Rezeptorclaudinen auszuweiten und die am häufigsten in Karzinomen überexprimierten Claudine mit einzuschließen, wurde in der Arbeitsgruppe (Dr. A. Piontek, Dr. J. Protze, FMP, Berlin) bereits zuvor eine (c)CPE-Variante generiert, welche zusätzlich zu den klassischen Rezeptorclaudinen auch Cldn1, -2 und -5 bindet (Piontek *et al.* 2019).

Durch neue Homologiemodelle sollten einerseits die Interaktionen zwischen dieser neuen Variante cCPE-S231R/S313H und den Claudinen 1 bis 7 genauer untersucht werden, und andererseits mögliche Hinweise auf die Konformation der Claudine 1 und 5, für die bisher noch keine Kristallstrukturen veröffentlicht wurden, gefunden werden.

4.1.1 Die Mutation S231R/S313H erweitert das Rezeptorspektrum von cCPE um die Claudine 1, 2 und 5

Nach Generierung der cCPE-Varianten S213R, S313H und S231R/S313H (SRSH) wurde deren Bindung an die Claudine (Cldn) 1 bis 7 in zellulären Bindungsassays mit stabil transfizierten HEK-293-Zellen untersucht (Dr. A. Piontek, FMP, Berlin). Diese Bindungsassays zeigten, dass cCPE-SRSH im Vergleich zu cCPE^{wt} stärker an Cldn1, -2 und -5 und schwächer an Cldn4 und 6 bindet. Die Bindung an Cldn3 und -7 blieb unverändert (s. Anhang, Abb. 29). Weitere Homologiemodelle der Komplexe von Cldn1-7 mit cCPE-SRSH sollten Aufschluss darüber geben, welche Interaktionen durch die Substitutionen die Bindung beeinflussen könnten (Abb. 10). Als Template wurde wie in einer vorhergehenden Arbeit (Neuhaus *et al.* 2018) die Kristallstruktur des Cldn4-cCPE^{wt}-Komplexes (PDB ID: 5B2G (Shinoda *et al.* 2016)) verwendet, sofern kein anderes Template eine deutlich höhere Sequenzhomologie aufwies. Die Übersichtsabbildung (Abb. 10 A) gibt Hinweise darauf, welche Interaktionen durch die Doppelmutation möglich sein könnten. Durch die Mutation S313H wurde innerhalb der Claudinbindungstasche des cCPE ein kleiner, polarer AS-Rest durch einen größeren AS-Rest mit basischem Imidazolring ersetzt. Für diese Mutation war bereits bekannt, dass sie die Bindung an Cldn1 verbessert und an Cldn5 ermöglicht (Protze *et al.* 2015, Takahashi *et al.* 2012). Die Mutation S231R hingegen befindet sich außerhalb der EZS2-Turn-Bindungstasche. Das positiv geladene Arginin könnte an dieser Stelle ionische bzw. elektrostatische Wechselwirkungen mit AS-Resten in der TMH3 oder am Übergang zwischen der TMH2 und der extrazellulären Helix (EZH) eingehen.

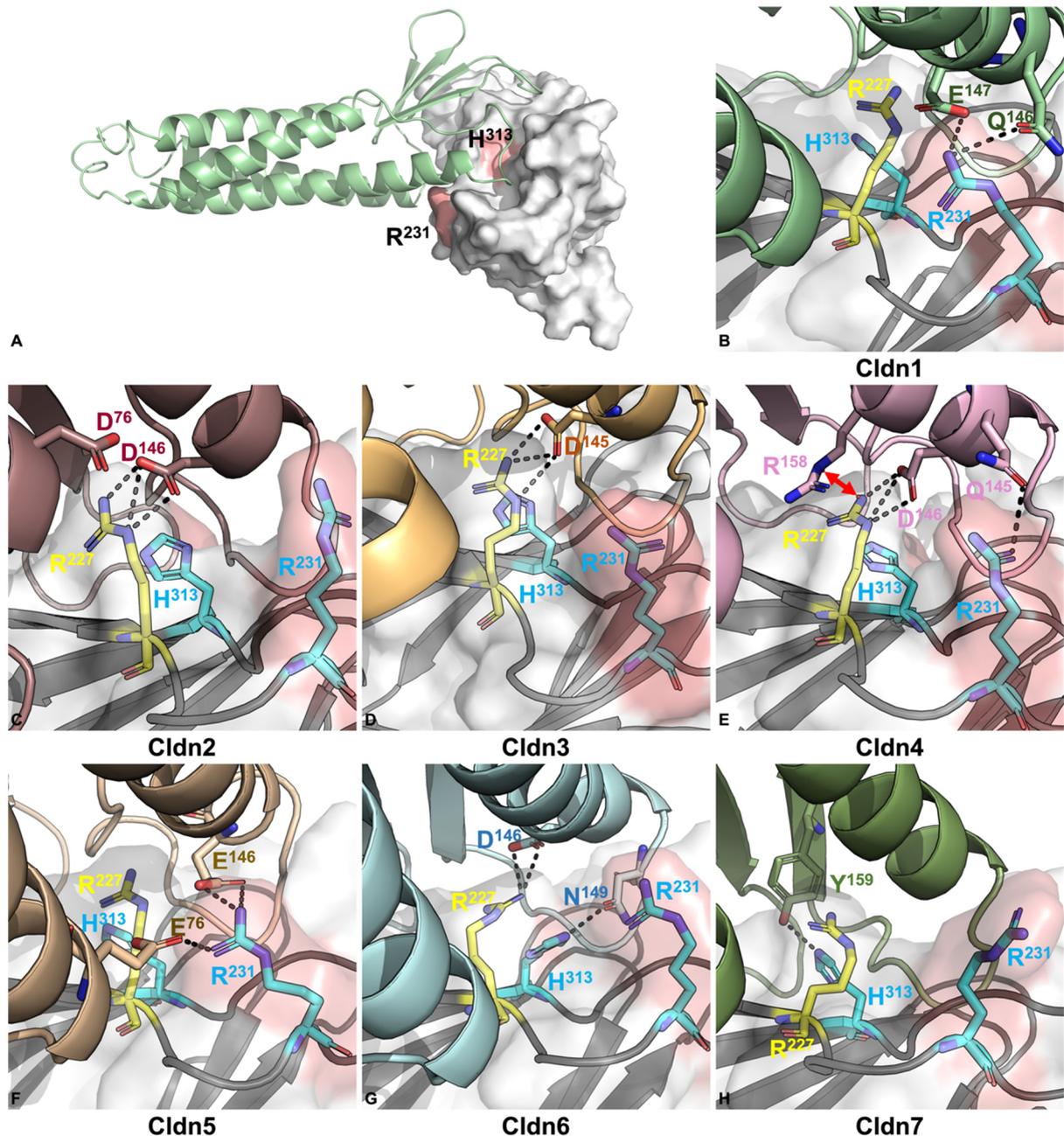


Abbildung 10 Interaktionsmodelle für cCPE-S231R/S313H mit den Claudinen 1 bis 7. Claudine als Cartoon, cCPE als Oberfläche und Cartoon gezeigt. Mutierte Reste sind in hellrot hervorgehoben. (A) Homologiemodell der Struktur des Cldn1-cCPE-SRSH-Komplexes. (B – H) Detailansicht der Wechselwirkungen zwischen cCPE-SRSH und den entsprechenden Claudinen. Relevante AS-Reste in Stabdarstellung gezeigt. In Doppelmutante cCPE-SRSH sind AS R²³¹ und H³¹³ in cyan, der Rest R²²⁷ in gelb hervorgehoben. Mögliche polare Interaktionen gekennzeichnet (schwarze gestrichelte Linie – anziehend, roter Doppelpfeil – abstoßend, polare Interaktion entweder mittels entsprechender Funktionen in PyMol oder Maestro bestimmt oder aufgrund räumlicher Nähe (Abstand zwischen den AS-Resten < 4 Å) angenommen). Die Interaktionsmodelle für Cldn1, -2 und -5 beruhen auf einem Cldn4-Interaktionsmodell (PDB ID: 5B2G, (Shinoda *et al.* 2016)), für Cldn6 auf dem Cldn9- (PDB ID: 6OV2, (Vecchio and Stroud 2019)) und für Cldn7 auf dem Cldn19-Interaktionsmodell (PDB ID: 3X29, (Saitoh *et al.* 2015)). Für die Modelle mit Cldn3 und -4 wurden die jeweiligen veröffentlichten Kristallstrukturen verwendet (Cldn3: PDB ID: 6AKE (Nakamura *et al.* 2019), Cldn4: PDB ID: 5B2G, (Shinoda *et al.* 2016)).

Das Interaktionsmodell für Cldn1 zeigt ionische bzw. elektrostatische Wechselwirkungen zwischen R²³¹ im cCPE-SRSH und den Resten Q¹⁴⁶ bzw. E¹⁴⁷ im Cldn1 (Abb. 10 B). Diese Wechselwirkung kann mit cCPEwt, das an Position 231 ein kleineres, polares, ungeladenes Serin besitzt, nicht ausgebildet werden.

In Cldn5 können E⁷⁶ und E¹⁴⁶, welche negative Ladungen besitzen, ionische Wechselwirkungen mit dem positiv geladenem R²³¹ der cCPE-Mutante eingehen, sodass es zu einer gesteigerten Bindung von cCPE-SRSH im Vergleich zu cCPEwt kommt (Abb. 10 F). Ähnliche Wechselwirkungen wären auch zwischen R²³¹ und D⁷⁶ bzw. D¹⁴⁶ in Cldn2 möglich, werden aber im Interaktionsmodell nicht beobachtet (Abb. 10 C). Die ionische Wechselwirkung zwischen D¹⁴⁶ (Cldn2) und R²²⁷ (cCPE) wird auch mit cCPEwt ausgebildet. Sie wird nicht durch die Mutation S313H begünstigt und ist daher wahrscheinlich nicht für die gesteigerte Bindung von cCPE-SRSH an Cldn2 verantwortlich. Die Mutation S313H allein steigert die Bindung an Cldn2 im Vergleich zu cCPEwt etwas. Die Einzelmutteration S231R hat keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten (s. Anhang, Abb. 29 B). Die deutlich gesteigerte Bindung, welche mit cCPE-SRSH beobachtet wurde, ist möglicherweise auf eine Veränderung der Oberfläche des cCPE, die besser zur Konformation des Cldn2 passt, zurückzuführen.

Die Mutante cCPE-SRSH zeigte eine verminderte Bindung an Cldn4 (s. Anhang, Abb. 29 D), obgleich durch die Mutation S231R eine ionische Wechselwirkung zwischen ebendiesem Rest des cCPE und Q¹⁴⁵ im Cldn4 ausgebildet werden könnte (Abb. 10 E). Die verminderte Bindung von cCPE-SRSH an Cldn4 könnte durch eine elektrostatische Abstoßung zwischen den zwei positiv geladenen Resten R²²⁷ (cCPE-SRSH) und R¹⁵⁸ (Cldn4) bedingt sein (roter Doppelpfeil in Abb. 10 E). Diese Reste liegen im Komplex aus Cldn4 und cCPE-SRSH näher zusammen als in dem entsprechenden Komplex mit cCPEwt. Gleichzeitig werden die Reste R²²⁷ (cCPE) und D¹⁴⁶ (Cldn4), zwischen denen sich eine ionische Wechselwirkung ausbilden könnte, durch die Mutation S313H weiter voneinander entfernt (Abb. 10 E).

Für Cldn6 führt die Mutation S231R zu einem Verlust der polaren Interaktion zwischen S²³¹ (cCPE) und R¹⁴⁵ (Cldn6). Die Auswirkung dieser Mutation allein scheint nicht stark genug zu sein, um die Bindung an Cldn6 zu beeinträchtigen. Vielmehr steigert sie trotz des Verlusts der polaren Interaktion die Bindung an Cldn6 leicht. Obwohl die Mutation S313H zu einer elektrostatischen Wechselwirkung mit N¹⁴⁹ führen könnte (Abb. 10 G), vermindert sie die Bindung an Cldn6 (s. Anhang, Abb. 29 F). Eventuell verändern die Mutationen die Konformation der Claudinbindungstasche auf eine Weise, welche insgesamt ungünstig für die Bindung an Cldn6 ist.

Für Cldn3 und Cldn7 wurden keine Wechselwirkungen gefunden, die in der Doppelmutterante cCPE-SRSH die Bindung im Vergleich zu cCPEwt verändern könnten (Abb. 10 D, H).

Die Interaktionsmodelle liefern Hinweise darauf, wie die experimentell gemessenen Bindungsdaten von cCPE-SRSH an die Claudine 1 – 7 mechanistisch erklärt werden könnten. Für das mutierte R²³¹ konnten vor allem mit relevanten AS-Resten der Cldn1 und -5, aber auch -2, mögliche Wechselwirkungen gefunden werden, welche die gesteigerte Bindung von cCPE-SRSH an diese Claudine auf molekularer Ebene begründen.

4.1.2 Vergleich der Konformationen des Claudin-cCPE-Komplexes in den Kristallstrukturen

In den letzten Jahren wurden Kristallstrukturen von verschiedenen Claudinen im Komplex mit cCPE veröffentlicht. So liegen Strukturen für die Komplexe aus murinem Cldn3 (PDB ID: 6AKE, 6AKF und 6AKG (Nakamura *et al.* 2019)), humanem Cldn4 (PDB ID: 5B2G (Shinoda *et al.* 2016)), humanem Cldn9 (PDB ID: 6OV2, 6OV3 (Vecchio and Stroud 2019)) und murinem Cldn19 (PDB ID: 3X29 (Saitoh *et al.* 2015)) jeweils im Komplex mit cCPE vor.

Ein Alignment aller verfügbaren Claudin-cCPE-Kristallstrukturen auf cCPE zeigte Unterschiede zwischen den Konformationen der einzelnen Komplexe auf (Abb. 11 A).

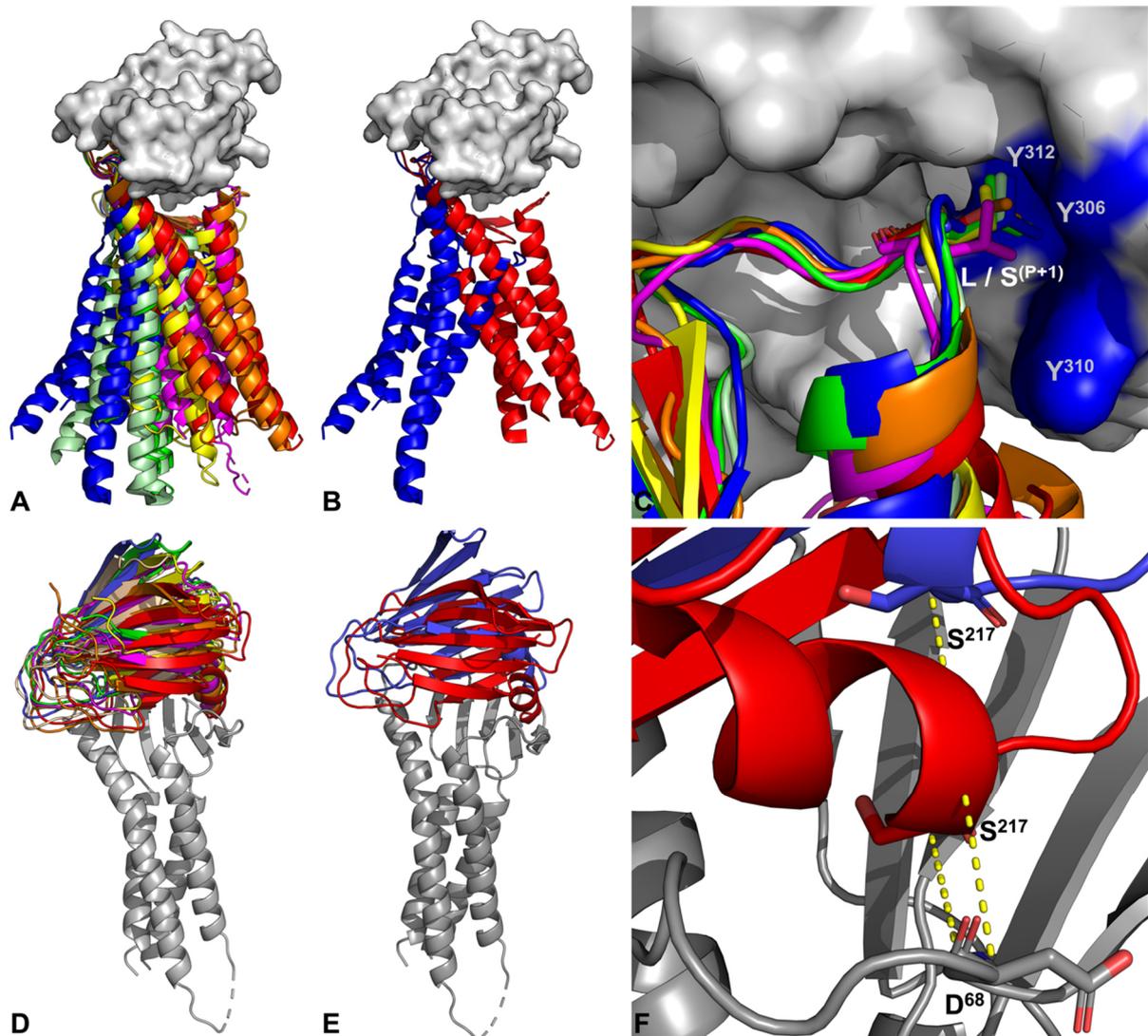


Abbildung 11 Konformationen des Claudin-cCPE-Komplexes. Cartoondarstellung der Claudine, cCPE entweder als Oberfläche (A – C) oder ebenfalls als Cartoon (D – F) dargestellt, Stabdarstellung ausgewählter AS-Reste. (A – C) Kristallstrukturen ausgerichtet auf cCPE. (A) Die TMH3 weist in den unterschiedlichen Kristallstrukturen verschiedene Winkel zur cCPE-Oberfläche auf. (B) Durch die unterschiedliche Biegung der TMH3 ist diese in Cldn19 (PDB ID: 3X29) am weitesten zur EZS2-Turn-Bindungstasche des cCPE hingeneigt, während sie in murinem Cldn3 (PDB ID: 6AKE) am weitesten von ihr weg zeigt. (C) Trotzdem liegt die EZS2 aller Claudin-Kristallstrukturen auf fast identische Weise in der EZS2-Turn-Bindungstasche. Zur besseren Übersicht ist nur das cCPE der Kristallstruktur 5B2G gezeigt. (D – F) Kristallstrukturen ausgerichtet auf die TMH der Claudine. (D) Durch die unterschiedliche Neigung von cCPE über die TMH3 verändert sich der Abstand zwischen cCPE und der EZH

der Claudine. Beispielfür alle Claudine ist hier Cldn4 (PDB ID: 5B2G) gezeigt. **(E)** Während in der Struktur 6AKE cCPE am weitesten über die TMH3 geneigt ist, ist es in der Struktur 3X29 am nächsten an der EZH des Claudins. **(F)** Detailansicht der EZH der Claudine und $\alpha 3$ des cCPE. In der Kristallstruktur 3X29 beträgt der Abstand zwischen dem Claudinbackbone (D⁶⁸) und S²¹⁷ (cCPE) 5,7 Å. In der Struktur 6AKE, in welcher cCPE am weitesten über die TMH3 gekippt es, vergrößert sich der Abstand auf 11,6 Å. rot – murines Cldn19 (PDB ID: 3X29), magenta – humanes Cldn4 (PDB ID: 5B2G), blau: murines Cldn3 (PDB ID: 6AKE), hellgrün: murines Cldn3-P134A (PDB ID: 6AKF), grün – murines Cldn3-P134G (PDB ID: 6AKG), orange – humanes Cldn9 in geschlossener Konformation (PDB ID: 6OV2), gelb – humanes Cldn9 in offener Konformation (PDB ID: 6OV3), grau – Oberfläche von cCPE (PDB ID: 5B2G)

Inbesondere wurde deutlich, dass die TMH3 der einzelnen Claudine unterschiedlich stark geneigt ist. Der extrazelluläre Teil der TMH3 steht dadurch in verschiedenen Winkeln zur Claudinbindungstasche des cCPE. Für die Kristallstruktur von murinem Cldn19 (PDB ID: 3X29, rot in Abb. 11 A, B) ist die TMH3 am weitesten zur cCPE-Oberfläche hingeneigt, während sie in der Kristallstruktur von murinem Cldn3 (PDB ID: 6AKE, blau in Abb. 11 A, B) am weitesten von ihr weggeneigt ist. Dennoch wurde deutlich, dass die EZS2 in allen vorhandenen Kristallstrukturen auf ähnliche Weise mit der EZS2-Turn-Bindungstasche interagieren. Der Rest der AS an Position P + 1 (L in Cldn3, -4 und -9, S in Cldn19) zeigt in allen Kristallstrukturen auf die gleiche Weise in die hydrophobe Tripel-Tyr-Tasche (Abb. 11 C). Ein Alignment aller vorhandenen Kristallstrukturen auf die TMHs der Claudine verdeutlichte, dass cCPE in den Kristallstrukturen unterschiedlich weit über die TMH3 geneigt und somit $\alpha 3$ des cCPE verschieden weit von der EZH entfernt ist (Abb. 11 D). So ist cCPE in der Kristallstruktur 6AKE am weitesten über die TMH3 geneigt und hat daher den größten Abstand zur EZH, während es in der Struktur 3X29 am wenigsten über die TMH3 kippt und so am nächsten zur EZH steht (Abb. 11 E). Dieser Unterschied ist in Abb. 11 F noch einmal im Detail dargestellt. Während der Abstand zwischen dem Backbone am AS-Rest D⁶⁸, welches sich am Übergang der EZH und des $\beta 4$ -Strangs im EZS1 des Claudins befindet, und S²¹⁷ aus der $\alpha 3$ des cCPE aus 3X29 ~ 5,7 Å beträgt, so ist er für denselben Rest in der Struktur 6AKE mit ~ 11,6 Å etwa doppelt so groß.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Claudin-cCPE-Komplex in unterschiedlichen Konformationen vorliegt. In diesen ist cCPE unterschiedlich weit über die TMH3 gekippt, was zumindest teilweise auf eine unterschiedliche Stellung der TMH3 zurückgeführt werden kann. Je weiter das cCPE gekippt ist, desto weiter entfernt es sich von der EZH, was mögliche Interaktionen mit der EZH und anderen EZS1-Bereichen beeinflussen könnte. Die EZS2 hingegen liegt trotz der konformellen Unterschiede in allen Kristallstrukturen auf fast identischer Weise in der Claudinbindungstasche des cCPE.

4.1.3 Interaktionsmodelle der Claudine 1 und 5 mit cCPE-S231R/S313H liefern Hinweise auf eine mögliche Flexibilität der Claudinkonformation

Auf Grundlage der Claudin-cCPE-Kristallstrukturen und der experimentell erhobenen Bindungsdaten der Claudine an cCPE-SRSH sollte untersucht werden, ob sich Aussagen über die Konformationsunterschiede der TMH3 der Claudine treffen lassen.

Bisher wurden weder für Cldn1 noch für Cldn5 Kristallstrukturen veröffentlicht. Sequenzvergleiche lassen erste Hypothesen über die Konformation der TMH3 der beiden Claudine zu. So besitzt Cldn1 wie Cldn19 an Position 136 ein Alanin, welches zu einer eher geraden TMH3 führen könnte. In der TMH3 von Cldn5 befindet sich an der entsprechenden Position ein Prolinrest (P¹³⁴), wie er auch in murinem Cldn3 vorkommt. Dieser kann zu einer Abweichung der regelmäßigen Struktur einer α -Helix führen, sodass eine Biegung entstehen kann, wie sie in der Kristallstruktur 6AKE beobachtet wird (Abb. 11 A, B).

Die Mutante cCPE-SRSH bindet mit hoher Affinität sowohl an Cldn1 als auch an Cldn5 (s. Anhang, Abb. 29 A, E). Mithilfe von Homologiemodellen für diese beiden Claudine, die jeweils auf 6AKE (Cldn3 mit gebeugter TMH3) und 3X29 (Cldn19 mit gerader TMH3) basieren, sollte untersucht werden, ob die Konformation der TMH3 einen Einfluss auf die Interaktionen zwischen den Claudinen und cCPE-SRSH hat (Abb. 12).

Das Homologiemodell für Cldn1, welches auf der Struktur von Cldn19 (PDB ID: 3X29) beruht, besitzt eine fast gerade TMH3 (Abb. 12 A, dunkelgrün), sodass diese nah zur Claudin-Interaktionsfläche des cCPE gerichtet ist. In diesem Modell kann der Rest E¹⁴⁷ des Cldn1 elektrostatische Wechselwirkungen mit den Resten R²²⁷ und H³¹³ des cCPE-SRSH eingehen (Abb. 12 B). Jedoch führt die Mutation S231R im cCPE in diesem Modell zu keiner neuen elektrostatischen Wechselwirkung, welche die erhöhte Bindung erklären könnte, die experimentell gemessen wurde (s. Anhang, Abb. 29 A). Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen der TMH3 zu dem Rest R²³¹ des cCPE, die durch die gerade TMH3 zustande kommen sollte, ist es dennoch möglich, dass polare Wechselwirkungen zwischen Cldn1 und R²³¹ ausgebildet werden könnten. Verwendet man für den Rest R²³¹ das Rotamer, welches in der Struktur basierend auf 5B2G (Abb. 10 F) zu bindungsteigernden Wechselwirkungen führt, so kann eine polare Wechselwirkung zwischen R²³¹ und Q¹⁴⁶ (Cldn1) ausgebildet werden (Abb. 12 C). Diese kann die deutlich erhöhte Affinität von cCPE-SRSH an Cldn1 erklären.

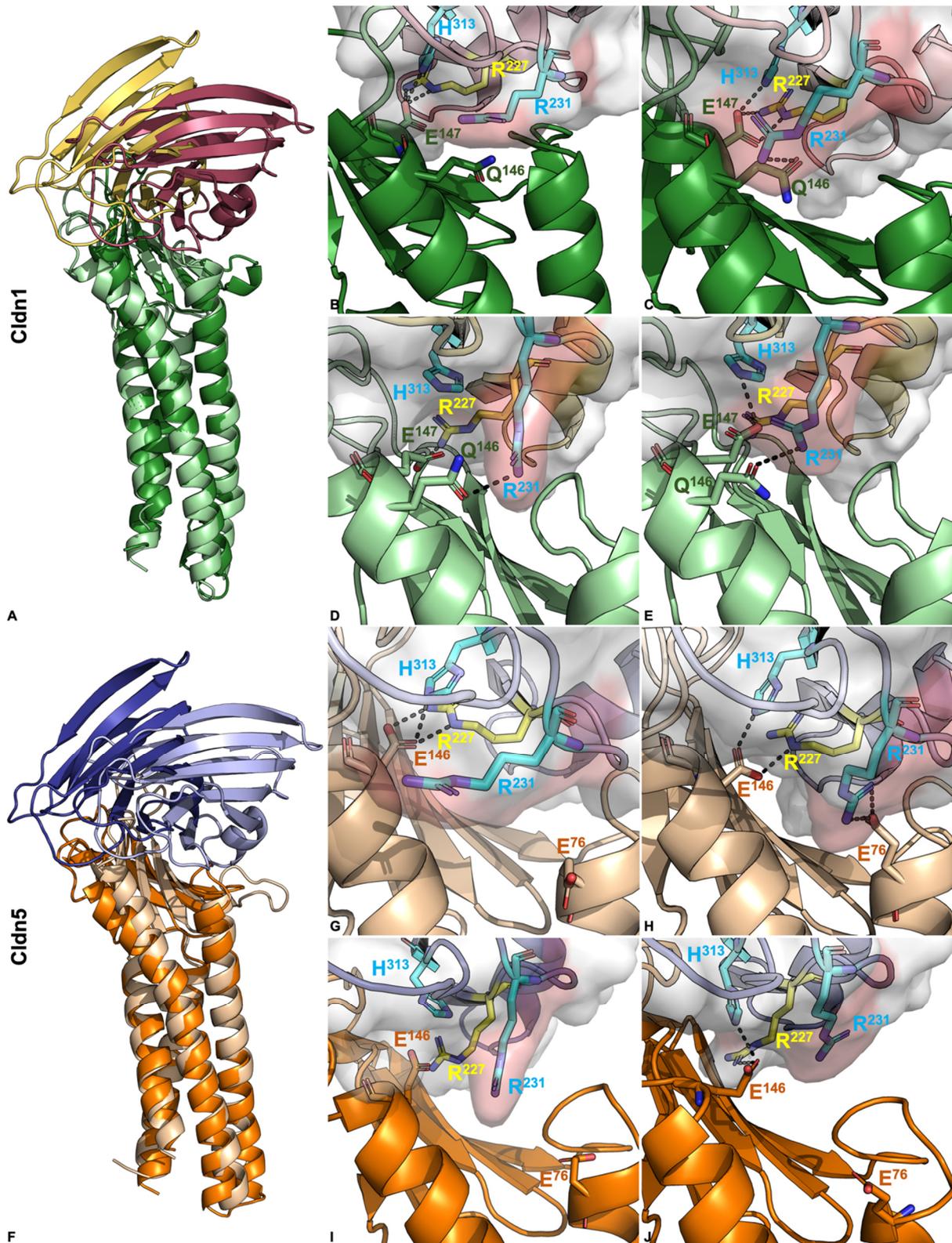


Abbildung 12 Die Konformation der Transmembranhelix 3 der Claudine beeinflusst mögliche Interaktionen mit cCPE-S231R/S313H. Cartoondarstellung der Homologiemodelle mit Oberfläche des cCPE und Stabdarstellung ausgewählter AS-Reste in den Detailsichten. (A – E) Homologiemodelle für Cldn1 basierend auf 3X29 (A – brillantgrün, Detailsicht B, C) und 6AKE (A – blassgrün, Detailsicht D, E). (A) Entsprechend der Templates weisen die Cldn1-Homologiemodelle Unterschiede in der Konformation der TMH3 auf. (B) Für das Homologiemodell mit der geraden TMH3 (basierend auf 3X29) ergeben sich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Rest E¹⁴⁷ (Cldn1) und R²²⁷ bzw. H³¹³ (cCPE-SRSRSH). R²³¹ kann in diesem Modell keine Wechselwirkungen eingehen, welche die gesteigerte Affinität der Mutante für Cldn1 erklären könnten. (C) Durch Verwendung des Rotamers des auf 5B2G-basierten Modells für R²³¹ wird dieser Rest in eine Position gebracht, in der er eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Rest Q¹⁴⁶ des Cldn1 eingehen kann. (D) In dem

Homologiemodell mit einer gebeugten TMH3 (basierend auf 6AKE) bleiben die bindungssteigernden Wechselwirkungen zwischen E¹⁴⁷ (Cldn1) und R²²⁷ (cCPE) sowie zwischen Q¹⁴⁶ (Cldn1) und R²³¹ (cCPE) bestehen. **(E)** Durch Einführen der Rotamere aus der auf 5B2G-basierenden Struktur kann sich eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung zwischen E¹⁴⁷ (Cldn1) und H³¹³ (cCPE) ausbilden. **(F – J)** Homologiemodelle für Cldn5 basierend auf 3X29 (F – beige, Detailansicht G, H) und 6AKE (F – orange, Detailansicht I, J). **(F)** Das 3X29-basierte Modell besitzt eine gerade TMH3 und einen geringen Abstand zwischen cCPE und der EZH-TMH2-Region des Cldn5. Durch die Beugung der TMH3 in dem Modell basierend auf 6AKE wird dieser Abstand vergrößert. **(G)** Obwohl in dem Modell basierend auf der Struktur 3X29 der Abstand zwischen cCPE und dem Übergang zwischen EZH und TMH2 des Cldn5 am geringsten ist, werden in diesem Modell keine bindungssteigernden Wechselwirkungen durch den Rest R²³¹ (cCPE) ausgebildet. Der Rest E¹⁴⁶ (Cldn5) kann mit R²²⁷ und H³¹³ (cCPE) ionische bzw. elektrostatische Wechselwirkungen eingehen. **(H)** Wird für den Rest R²³¹ das Rotamer aus dem Modell basierend auf 5B2G verwendet, kommt er in die Nähe des Restes E⁷⁶ (Cldn5), sodass eine ionische Wechselwirkung zwischen diesen beiden Resten möglich wäre (Abstand < 4 Å). **(I)** In dem Modell basierend auf der Struktur 6AKE könnte eine ionische Wechselwirkung zwischen E¹⁴⁶ (Cldn5) und R²²⁷ (cCPE) ausgebildet werden (Abstand < 4 Å). Durch die Biegung der TMH3 ist das cCPE jedoch so weit von der EZH und der TMH2 entfernt, dass der Rest R²³¹ (cCPE) nicht in die Nähe des Restes E⁷⁶ (Cldn5) kommen kann. **(J)** Werden die Rotamere aus der 5B2G-basierten Struktur verwendet, kann eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung zwischen E¹⁴⁶ (Cldn5) und H³¹³ (cCPE) ausgebildet werden. Der Abstand zwischen R²³¹ (cCPE) und E⁷⁶ (Cldn5) ist jedoch zu groß, als dass diese beiden Reste in diesem Modell miteinander interagieren könnten. Schwarze gestrichelte Linie - mögliche polare Wechselwirkungen (in PyMol bestimmt oder Abstand < 4 Å).

Anders als in murinem Cldn3 sollte die TMH3 in Cldn1 eher gerade sein. In dem Modell, welches auf der Struktur von Cldn3 (PDB ID: 6AKE) beruht und eine gebogene TMH3 besitzt, sodass die TMH3 eher von der Claudin-Interaktionsfläche weggeneigt ist, kann der Rest R²³¹ des cCPE-SRSH trotzdem eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Rest Q¹⁴⁶ aus Cldn1 ausbilden, was zur Bindungssteigerung dieser Mutante an Cldn1 beitragen könnte. Wie auch in dem Homologiemodell mit der geraden TMH3 kann eine ionische Wechselwirkung zwischen E¹⁴⁷ (Cldn1) und R²²⁷ (cCPE-SRSH) ausgebildet werden (Abb. 12 D). Durch Einführen der Rotamere aus dem Homologiemodell beruhend auf der Struktur 5B2G bleibt die polare Wechselwirkung zwischen R²³¹ und Q¹⁴⁶ bestehen. Der Rest E¹⁴⁷ kann in diesem Modell zusätzlich zur ionischen Wechselwirkung mit R²²⁷ eine elektrostatische Wechselwirkung mit H³¹³ eingehen (Abb. 12 E).

Auch die beiden Homologiemodelle für Cldn5 zeigen deutliche Unterschiede in der Biegung der TMH3 (Abb. 12 F). Cldn5 besitzt in der TMH3 an Position 134 wie murines Cldn3 einen Prolinrest. Dies deutet daraufhin, dass Cldn5 ebenfalls eine leicht geknickte TMH3 haben könnte. Eine gebogene TMH3 würde dazu führen, dass das cCPE-SRSH weiter von der EZH und TMH2 entfernt ist. Dieser Abstand ist jedoch relevant für eine mögliche Interaktion zwischen dem R²³¹ des cCPE und dem E⁷⁶ in der TMH2 von Cldn5.

Obwohl in der Kristallstruktur 3X29 der Abstand zwischen cCPE und der EZH und TMH2 der Claudine am geringsten ist, ergeben sich in dem Cldn5-Homologiemodell basierend auf 3X29 keine Wechselwirkungen zwischen R²³¹ und E⁷⁶, da der Argininrest von der TMH2 weggerichtet ist (Abb. 12 G). Verwendet man jedoch die Rotamere aus dem auf 5B2G-basierenden Modell, in der eine ionische Wechselwirkung beobachtet wird, beträgt der Abstand zwischen den beiden Resten R²³¹ und E⁷⁶ weniger als 4 Å, sodass sie potenziell eine ionische Wechselwirkung ausbilden könnten (Abb. 12 H).

Aufgrund der Biegung der TMH3, die in dem Homologiemodell beruhend auf der Kristallstruktur 6AKE beobachtet wird, ist das cCPE über die TMH3 gekippt, sodass sich die

Claudinbindungstasche und der Rest R²³¹ von der EZH und der TMH2 entfernen (Abb. 12 F). In diesem Modell ist der Abstand zwischen dem Rest E¹⁴⁶ (Cldn5) und R²²⁷ (cCPE-SRSH) kleiner als 4 Å, sodass sich zwischen diesen Resten möglicherweise eine ionische Wechselwirkung ausbilden könnte. Der Rest R²³¹ ist jedoch soweit von den TMH2 und -3 entfernt, dass er keine bindungssteigernden Wechselwirkungen eingehen kann (Abb. 12 I). Auch durch Ausrichten der Aminosäurereste entsprechend der Rotamere aus dem Homologiemodell, das auf der Struktur 5B2G basiert, kann wegen des großen Abstands keine Wechselwirkung erzielt werden. Zusätzlich zur ionischen Wechselwirkung zwischen E¹⁴⁶ (Cldn5) und R²²⁷ (cCPE-SRSH) ist in diesem Modell jedoch auch eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen E¹⁴⁶ und H³¹³ möglich, welche die Bindungssteigerung an Cldn5 durch die Doppelmutation von cCPE weiter untermauert (Abb. 12 J).

Allein aufgrund der Sequenz der TMH3 ist es nicht möglich, Rückschlüsse auf deren Konformation zu ziehen. So wurden für Cldn1 sowohl in dem Homologiemodell mit der geraden als auch in dem mit der gebogenen TMH3 Wechselwirkungen gefunden, welche die Bindungssteigerung der Doppelmutante cCPE-SRSH an dieses Claudin erklären können. Jedoch ist der Abstand zwischen dem mutierten R²³¹ und dem E⁷⁶ in der TMH2 in Cldn5 zu groß, wenn die TMH3 zu weit gebogen ist. In Modellen mit einer weniger gebogenen TMH3, welche auf den Kristallstrukturen 5B2G und 3X29 basieren, kommen diese beiden Reste einander nah genug, um eine potenzielle ionische Wechselwirkung auszubilden. Diese Wechselwirkung ist wahrscheinlich notwendig, um die gesteigerte Bindung von cCPE-SRSH an Cldn5 auf struktureller Ebene zu begründen. Es scheint daher möglich, dass die TMH3 der Claudine zu einem gewissen Grad flexibel ist und deren Konformation nicht nur durch die An- bzw. Abwesenheit eines Prolins bestimmt wird.

4.2 Einsatz von CPE-S231R/S313H in der Tumorthherapie

Die claudinvermittelte Zytotoxizität des CPE könnte für therapeutische Zwecke bei der Behandlung Claudin-überexprimierender Karzinome genutzt werden. Die Variante CPE-SRSH erweitert das Rezeptorspektrum um die Claudine 1, 2 und 5, welche in relevanten Karzinomentitäten häufig überexprimiert sind.

4.2.1 cCPE-S231R/S313H bindet an Claudin-exprimierende Bronchialkarzinomzellen

Nachdem der Mechanismus der Bindung von cCPE-SRSH an Cldn1 charakterisiert worden war, wurde die Eignung von CPE-SRSH für die Behandlung von Cldn1-überexprimierenden Zellen evaluiert. Hierfür wurden verschiedene Tumorentitäten getestet. Auf Schilddrüsenkarzinomzellen, die ausschließlich Cldn1 exprimieren, zeigten cCPE-SRSH bzw. CPE-SRSH im Gegensatz zu den entsprechenden Wildtyp-Proteinen eine starke Bindung

bzw. Zytotoxizität (Dr. A. Piontek, FMP, Berlin (Piontek *et al.* 2019)). Zusätzlich sollte getestet werden, wie sich die gleichzeitige Expression weiterer Claudine auf die Wirkung der (c)CPE-Varianten auswirkt. Daher wurde die Bindung von cCPE-SRSH an Bronchialkarzinomzellen, die mehrere Claudine exprimieren, analysiert. Es wurden dafür die Zelllinien PC-9 und SK-MES-1 ausgewählt. PC-9-Zellen stammen aus einem metastatischen Lymphknoten eines NSCLC, während SK-MES-1-Zellen aus dem Pleuraerguss eines Plattenepithelbronchialkarzinoms isoliert wurden.

Beide Zelllinien exprimieren Rezeptorclaudine für cCPEwt und cCPE-SRSH, weisen aber unterschiedliche Expressionsmuster auf. PC-9-Zellen zeigen hohe Expressionsniveaus für Cldn1, -3, -4 und -7. Dahingegen werden in SK-MES-1-Zellen nur Cldn1 und -3 schwach exprimiert. (s. Anhang, Abb. 30).

Mit beiden Zelllinien wurden zelluläre Bindungsassays mit 0,5 µg/ml cCPEwt, cCPE-SRSH und der nichtbindenden Variante cCPE-Y306A/L315A (YALA) als Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde die Bindung von GST-cCPE an lebende Zellen nach deren Fixierung mittels Fluorophor-gekoppelter anti-GST-Antikörper detektiert. Die Bindungssignale aus unbehandelten Zellen wurden als unspezifischer Hintergrundwert für die jeweilige Zelllinie substrahiert. Als Referenzwert wurde die Bindungsstärke von cCPEwt in claudinreichen PC-9-Zellen verwendet (Abb. 13).

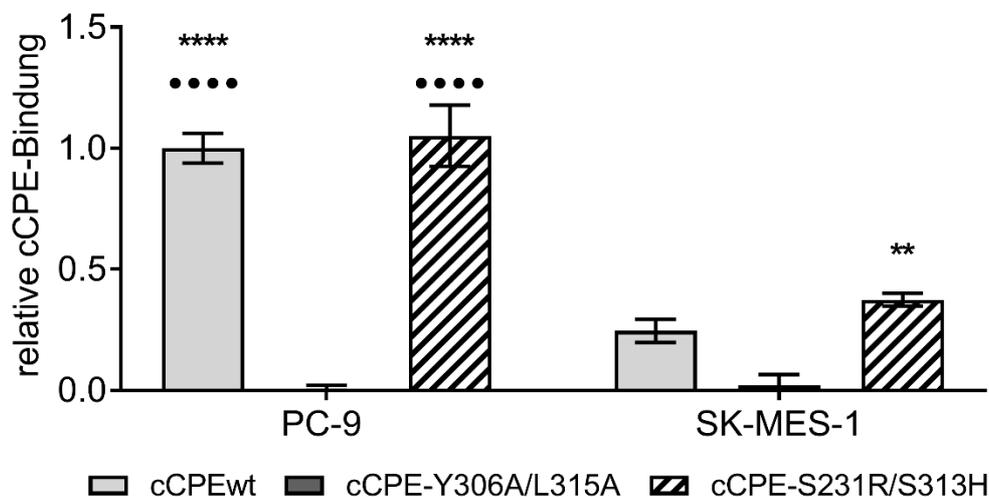


Abbildung 13 cCPE-S231R/S313H bindet an Claudin-exprimierende Bronchialkarzinomzellen. Claudin-exprimierende Bronchialkarzinomzellen PC-9 und SK-MES-1 mit 0,5 µg/ml der GST-cCPE-Varianten inkubiert (30 min, 37 °C), ungebundenes GST-cCPE durch Waschschrte entfernt, anschließend fixiert. Gebundenes GST-cCPE über Fluoreszenzsignal des Phycoerythrin-gekoppelten anti-GST Antikörper detektiert, Normalisierung auf Anzahl der Zellen (Zellkerne mit Hoechst 33342 gefärbt). Signal für unbehandelte Zellen wurde von jeweiliger Zelllinie als unspezifischer Hintergrund substrahiert. Mittelwerte ± SEM des Quotienten aus Phycoerythrin- und Hoechst-Signal bezogen auf Signal für Bindung von cCPEwt an PC-9-Zellen. Einseitige ANOVA mit Sidak-Test. * vs. cCPE-YALA, • vs. SK-MES-1, ** p < 0,001, ****, ••• p < 0,0001, n = 9.

Für die nicht-bindende Kontrolle cCPE-YALA wurde in beiden Zelllinien fast keine Bindung detektiert (PC-9: 0,01 ± 0,02, SK-MES-1: 0,02 ± 0,04). In PC-9-Zellen ist die Bindung von cCPEwt und -SRSH fast gleich stark (cCPEwt: 1 ± 0,06, cCPE-SRSH: 1,05 ± 0,11) und

deutlich stärker als für cCPE-YALA (einseitiger ANOVA: $p < 0,0001$). Für cCPE-SRSH konnte in SK-MES-1-Zellen eine etwas stärkere Bindung als für cCPEwt detektiert werden (cCPEwt: $0,25 \pm 0,04$, cCPE-SRSH: $0,37 \pm 0,02$). Auch wenn die Bindung für cCPEwt tendenziell stärker als die von cCPE-YALA war, war nur für cCPE-SRSH der Mittelwert der Wertegruppe deutlich von jenem der cCPE-YALA-behandelten Zellen unterschiedlich (einseitiger ANOVA: $p = 0,003$).

Für die beiden claudinbindenden Varianten cCPEwt und -SRSH liegen die Bindungssignale in claudinreichen PC-9-Zellen deutlich über denen in claudinarmen SK-MES-1-Zellen (einseitiger ANOVA: $p < 0,0001$).

Insgesamt hatte in den Bronchialkarzinomzellen das Claudinexpressionsniveau einen stärkeren Einfluss auf die cCPE-Bindung als dessen Claudinsubtyppräferenz.

4.2.2 CPE-S231R/S313H reduziert die Viabilität von Bronchialkarzinomzellen

Die zytotoxischen Effekte der CPE-Varianten auf Claudin-exprimierende Bronchialkarzinomzellen und deren Konzentrationsabhängigkeit wurden in MTT-Assays untersucht (Abb. 14).

In PC-9-Zellen verursachten CPEwt und -SRSH bereits bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ deutliche zytotoxische Effekte. Ab einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ reduzierten sie die Zellviabilität auf ein Niveau, das in etwa dem der Positivkontrolle durch Zelllyse ($0,1\%$ (v/v) Triton X-100) von $\sim 20\%$ entspricht. Die Negativkontrolle CPE-YALA hat auch bei hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität gezeigt (Abb. 14 A).

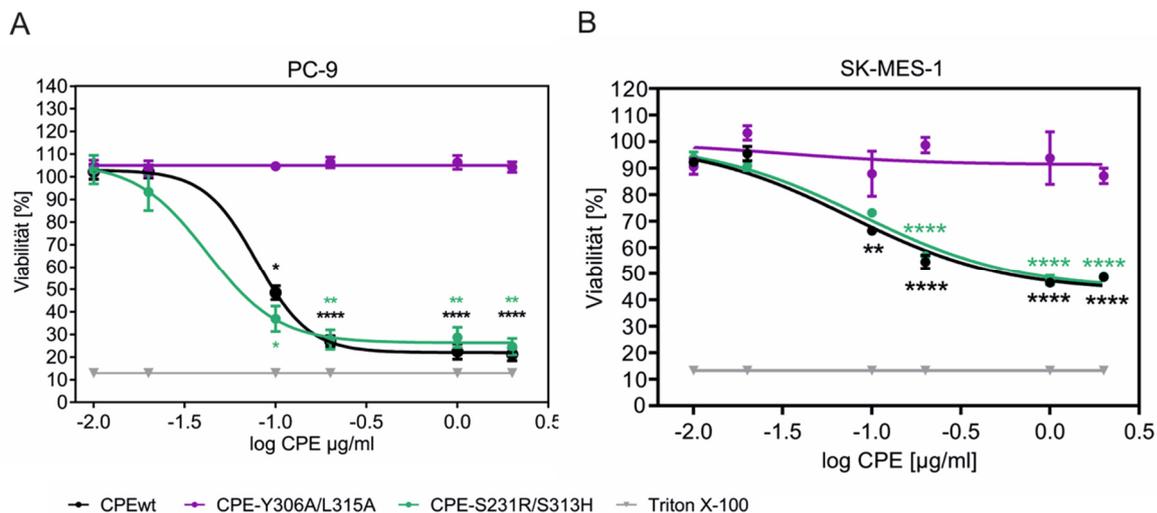


Abbildung 14 Claudin-bindende CPE-Varianten sind stark zytotoxisch für die NSCLC-Zellen PC-9. Viabilität von PC-9-Zellen (A) und SK-MES-1-Zellen (B) nach CPE-Behandlung (1 h, 37°C). Anschließende Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay mit $0,1\%$ (v/v) Triton X-100 als Positivkontrolle für vollständigen Verlust der Viabilität. **(A)** Viabilität von claudinreichen PC-9-Zellen durch CPEwt und CPE-SRSH deutlich vermindert. Bereits bei $0,2 \mu\text{g/ml}$ CPEwt und -SRSH war Viabilität der Zellen teilweise eingeschränkt. Ab $0,1 \mu\text{g/ml}$ war Behandlung mit CPEwt und -SRSH so zytotoxisch wie Behandlung mit $0,1\%$ (v/v) Triton X-100. CPE-YALA (Negativkontrolle) wirkte sich in keiner Konzentration negativ auf Viabilität der PC-9-Zellen aus. **(B)** In claudinarmen SK-MES-1-Zellen wurde Zellviabilität auch bei hohen Konzentrationen von CPEwt und -SRSH auf maximal 50% reduziert. Behandlung mit Triton X-100 konnte Zellviabilität effektiv inhibieren, während CPE-YALA keinen zytotoxischen

Effekt hatte. Mittelwerte \pm SEM. Einseitige ANOVA mit Bonferroni-Korrektur gegen Behandlung mit cCPE-YALA bei gleicher Konzentration. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. $n = 3 - 11$.

In SK-MES-1-Zellen haben CPEwt und -SRSH ab einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ die Zellviabilität reduziert. Auch bei hohen Konzentrationen wurde die Zellviabilität jedoch um maximal 50% verringert. Das Niveau der Positivkontrolle konnte bei keiner Konzentration an CPEwt und -SRSH erreicht werden. Die Negativkontrolle CPE-YALA hatte bei keiner Konzentration einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen (Abb. 14 B).

Die claudinbindenden Varianten CPEwt und -SRSH waren für PC-9-Zellen zytotoxischer als für SK-MES-1-Zellen. Damit korreliert die zytotoxische Wirkung, die CPE auf die beiden Zelllinien hat, mit den Claudinexpressionsniveaus der beiden Zelllinien (s. Anhang, Abb. 30) und dem Ausmaß der cCPE-Bindung (Abb. 13). In der Summe zeigte CPE-SRSH auf die Bronchialkarzinomzellen mit einem breiten Claudinexpressionsmuster keine stärkere Wirkung als CPEwt.

4.3 cCPE-basierte molekulare Sonden für die Tumordiagnostik

Die Claudineregulierung und -delokalisation sind ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese. Überexprimierte, extrajunktionale Claudine in der Plasmamembran könnten als mögliche Rezeptoren dienen, um entartete Zellen schon frühzeitig zu erkennen. Dafür stellt cCPE einen geeigneten Liganden dar: Es bindet mit hoher Spezifität an Claudine und seine Bindungseigenschaften lassen sich an verschiedene Claudinsubtypen anpassen.

Durch Kopplung von cCPE an Fluorophore lassen sich die delokalisierten Claudine visualisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene modulare cCPE-basierte molekulare Sonden generiert und getestet. Als Referenz für die Spezifität der Bindung wurde unmarkiertes GST-cCPE in fixierten Proben über Immunfluoreszfärbungen visualisiert, da mit diesen Varianten die meisten der bisher etablierten Bindungsstudien durchgeführt wurden. Fluorophor-gekoppeltes cCPE wurde mit zwei verschiedenen Verfahren erzeugt: Zum einen wurde GST-cCPE nach der Proteinaufreinigung mit dem Fluorophor Alexa Fluor 647 gekoppelt, zum anderen wurde ein YFP-markiertes cCPE als Fusionsprotein exprimiert.

Die Claudindetektion mit diesem cCPE-basierten Sonden wurde in verschiedenen Modellen untersucht. Die intestinalen HT-29/B6-Zellen, die von Zellen eines Adenokarzinoms des Kolons abstammen, dienten als etabliertes *in vitro*-Kolonepithelmodell. Ein *ex vivo*-Entzündungsmodell des Rattenkolon wurde genutzt, um unter definierten Bedingungen die Claudindelokalisation in pathologisch verändertem Kolongewebe zu untersuchen. Unauffällige kolorektale Polypen (Adenome) und Organoiden aus Magenkarzinomen, die beide aus humanen Biopsien gewonnen worden, dienten als humane *ex vivo*-Modelle in verschiedenen Stadien der Kanzerogenese.

4.3.1 Detektion der cCPE-Bindung in Claudin-exprimierenden Kolonkarzinomzellen

HT-29/B6-Zellen sind stark ausdifferenzierte Epithelzellen, die durch Subklonierung aus der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 generiert wurden. Aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrads dienen sie als Modell für das humane Kolonepithel (Kreusel *et al.* 1991), in dem relevante Claudine (u.a. Cldn1 – 5), welche als Rezeptoren für cCPEwt bzw. für cCPE-Varianten dienen und funktionelle TJ bilden, exprimiert werden (Nielsen *et al.* 2011). Je nach Kultivierungsbedingungen können unterschiedliche Differenzierungsgrade der Zellen erreicht werden. So bilden die Zellen auf Zellkulturfiltern eine starke parazelluläre Barriere aus und die Claudine sind in diesen Zellen zu einem Großteil in den TJ lokalisiert (Eichner, Augustin, *et al.* 2017). Werden die Zellen hingegen subkonfluent und ohne Unterscheidung zwischen apikalem und basalem Kompartiment, z.B. auf Deckgläsern, kultiviert, sind sie eher undifferenziert und verfügen über viele extrajunktionale Claudine auf ihrer Oberfläche (Abb. 15).

Die Bindung von cCPEwt und dem Multiclaudinbinder cCPE-S305P/S307R/S313H (cCPE-SSS) an subkonfluente, undifferenzierte HT-29/B6-Zellen wurde mithilfe verschiedener Fluorophore visualisiert (Abb. 15, Abb. 16). Als Referenz wurde dabei eine Immunfluoreszenzfärbung von GST-cCPE auf diesen Zellen verwendet, in denen zudem das Rezeptorclaudin Cldn4 sowie der TJ-Marker ZO1 gefärbt wurden (Abb. 15).

Für cCPEwt (Abb. 15 A, B) und -SSS (Abb. 15 C, D) wurde in subkonfluenten HT-29/B6-Zellen ein deutliches Signal für eine Bindung detektiert, welche insbesondere im Randbereich und auf der Oberfläche der Zellinseln sehr stark war. Der TJ-Marker ZO1 zeigte in diesen Bereichen nur ein schwaches, diffuses Signal, während ein deutliches Signal für Cldn4 detektiert werden konnte. Obwohl fast alle Zell-Zell-Kontakte Cldn4-positiv waren, war ZO1 nicht an jedem Kontakt angereichert. Dies deutet darauf hin, dass in den subkonfluenten HT-29/B6 noch nicht überall funktionale TJ ausgebildet wurden und extrajunktionales Cldn4 als Rezeptor für cCPE vorlag. An Zell-Zell-Kontakten mit starker ZO1-Anreicherung wurde keine Bindung von den claudinbindenden cCPE-Varianten detektiert (Abb. 15 A, C). Die cCPE-Bindung an Cldn4-positive Bereiche ist im Inneren der Zellinseln deutlich geringer als in den Randbereichen (Abb. 15 B, D). Über eine Immunfluoreszenzfärbung lässt sich nicht eindeutig bestimmen, ob die Claudine polymerisiert in TJ vorliegen und cCPE daher nicht binden kann oder ob die Zugänglichkeit der primären und sekundären Antikörper an diesen Stellen limitierend war (Abb. 15 A – D). Für die nicht-bindende Variante cCPE-YALA wurde an einigen Stellen ein schwaches Signal detektiert, welches aber in keiner Weise die starke spezifische Bindung von cCPEwt und -SSS an Cldn4-positive Zellen widerspiegelt, sondern eher auf eine unspezifische Bindung der Antikörper zurückzuführen ist (Abb. 15 E, F).

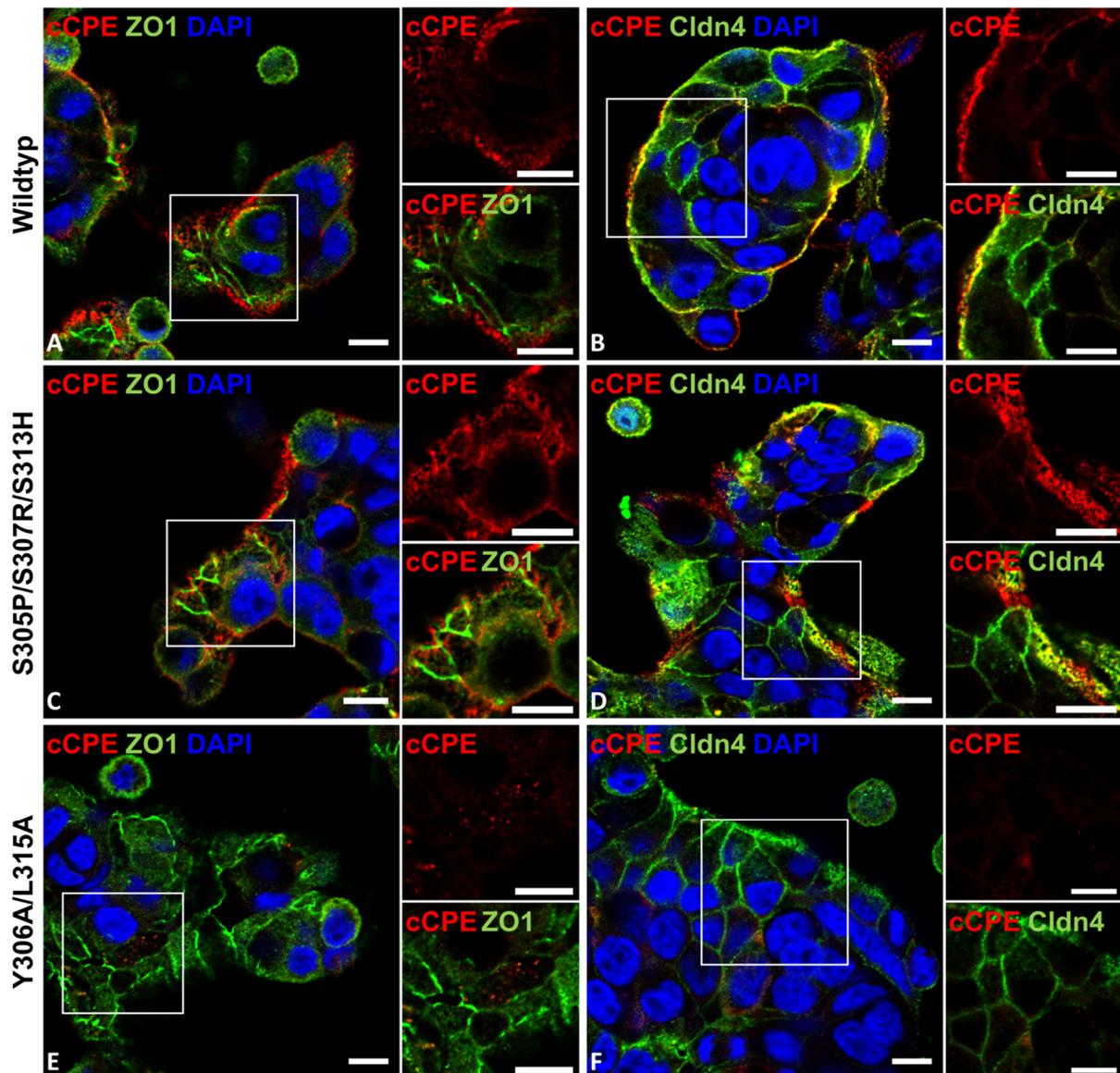


Abbildung 15 Detektion der Bindung von GST-cCPE-Varianten in subkonfluenten HT-29/B6-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen. HT-29/B6-Zellen subkonfluent auf Deckgläser ausgesät, Kultivierung für 24 h, Inkubation mit 10 µg/ml der jeweiligen cCPE-Variante (30 min, 37 °C). Anschließend Fixierung, Immunfluoreszenzfärbung. Detektion des gebundenen GST-cCPE über anti-GST-Antikörpers (Maus), ZO1 und Cldn4 über jeweilige Antikörper (Kaninchen). (A, C, E) ZO1 wurde an einigen Zell-Zell-Kontakten stark angereichert, wo es auf intakte TJ hindeutet. (B, D, F) Demgegenüber konnte Cldn4 sowohl an den Rändern der Zellinseln als auch in allen Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden. Zusammen mit dem ZO1-Signal lässt sich daraus schließen, dass unpolymersiertes Cldn4 in der Plasmamembran subkonfluenten HT-29/B6-Zellen vorliegt, welches nicht in funktionelle TJ inkorporiert ist. (B, D) Claudin-bindenden Varianten cCPEwt (B) und -SSS (D) zeigten deutliche Bindung am Rand der Zellinseln, wo sie mit Cldn4 kolokalisierten (Kokalisation in Überlagerung gelb). An Cldn4-positiven Zell-Zell-Kontakten im Inneren der Zellgruppen konnte kein oder nur schwaches cCPE-Signal detektiert werden. (A, C) An ZO1-positiven Zell-Zell-Kontakten wurde keine Bindung von cCPEwt (A) oder -SSS (C) detektiert. (E, F) Für cCPE-YALA (Negativkontrolle) wurde nur schwaches Hintergrundsignal detektiert. Signal kokalisiert nicht mit Rezeptor Cldn4. Maßstäbsbalken 10 µm.

Die Bindung der Fluorophor-gekoppelten cCPE-Varianten wurde an lebenden, subkonfluenten HT-29/B6-Zellen untersucht (Abb. 16).

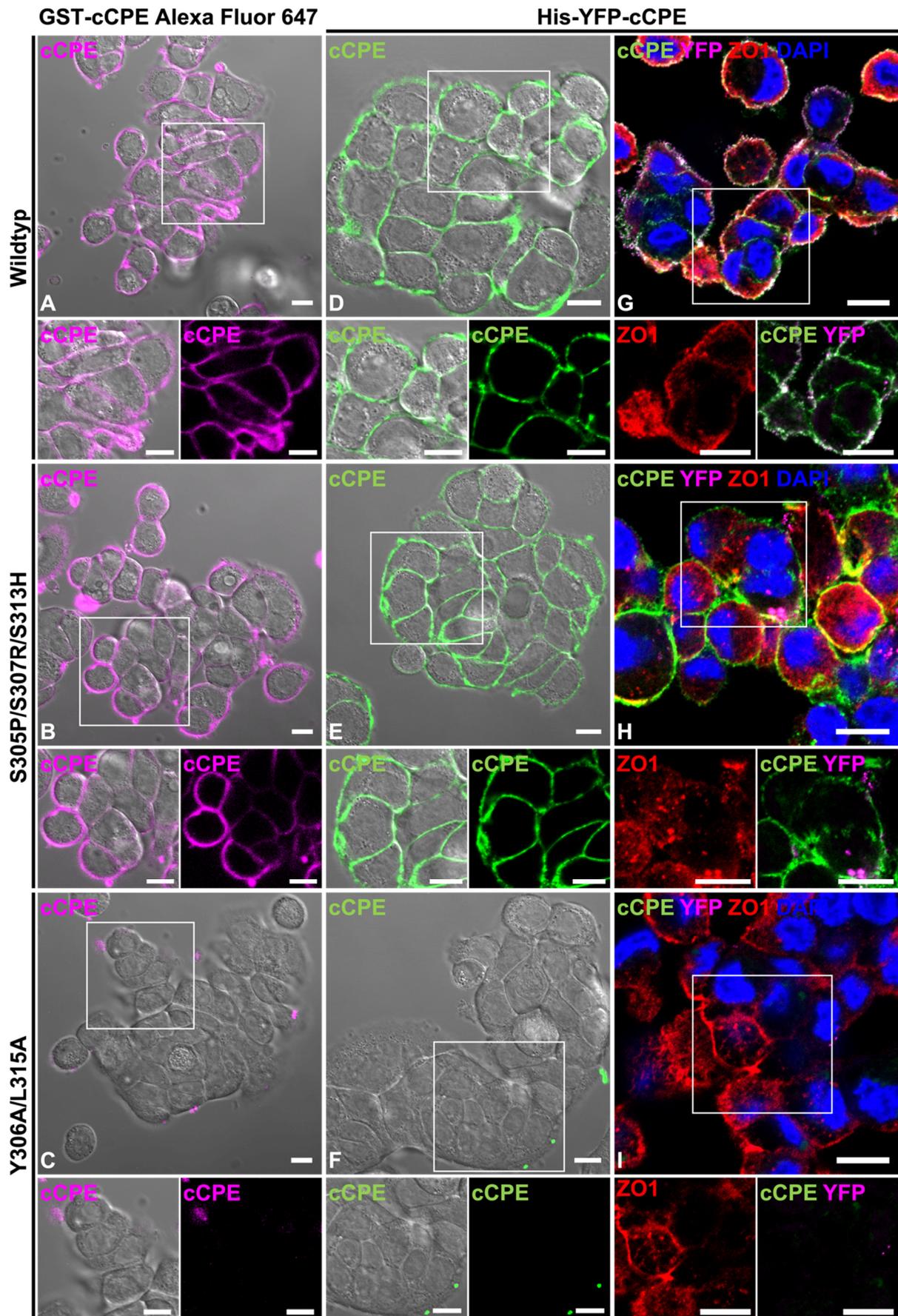


Abbildung 16 Detektion der cCPE-Bindung in subkonfluenten HT-29/B6-Zellen mit Fluorophor-gekoppelten cCPE-Varianten. Repräsentative Aufnahmen lebender (A – F) und fixierter (G – I) HT-29/B6-Zellen. Oben jeweils

Übersichtsaufnahmen, darunter Detailansichten (**A – F**) HT-29/B6-Zellen subkonfluent auf Deckgläsern kultiviert, Behandlung für 30–45 min mit 10 µg/ml des fluorophormarkierten cCPE. Ausgewählte Aufnahmen der Überlagerungen mit dem differenziellen Interferenzkontrastbild (**A – C**) Gebundenes cCPE über konjugiertes Alexa Fluor 647 detektiert (**A**) Wildtyp und (**B**) Mutante cCPE-SSS binden auf der Oberfläche der Zellen. (**C**) cCPE-YALA zeigt kein deutliches Signal auf der Zelloberfläche; aggregiertes cCPE-YALA ist erkennbar. (**D – F**) Direkte Visualisierung des gebundenen Fusionsprotein YFP-cCPE über YFP-Signal. Detektion der Bindung der Varianten YFP-cCPEwt (**D**) und -SSS (**E**) auf Oberfläche der Zellen. (**F**) YFP-cCPE-YALA (Negativkontrolle) zeigt schwaches Hintergrundsignal, dass sich nicht auf Plasmamembran befindet. (**G – I**) Behandlung der Zellen mit jeweils 10 µg/ml YFP-cCPE, Fixierung, Immunfluoreszenzfärbung. Gebundenes YFP-cCPE sowohl über YFP-Fluoreszenz als auch über anti-YFP-Antikörper (Maus) nachgewiesen. (**G, H**) Detektion der Claudin-bindenden Varianten YFP-cCPEwt (**G**) und -SSS (**H**) über YFP-Signal an allen Zell-Zell-Kontakten. Anti-YFP-Antikörper zeigte nur im Randbereich der Zellgruppen bzw. unspezifisch intrazellulär ein Signal (weiß in Überlagerung mit YFP-Signal). (**I**) Für Negativkontrolle YFP-cCPE-YALA konnte Bindung weder über YFP-Fluoreszenz noch über anti-YFP-Antikörper nachgewiesen werden. Maßstabsbalken 10 µm.

Für die Claudin-bindenden Varianten cCPEwt und -SSS konnten sowohl für das Alexa Fluor 647-Konjugat (Abb. 16 A, B) als auch für das YFP-cCPE-Fusionsprotein (Abb. 16 D, E) deutliche Signale auf der Plasmamembran der Zellen detektiert werden. Weder die Alexa Fluor 647-gekoppelte Kontrolle (Abb. 16 C) noch das Fusionsprotein YFP-cCPE-YALA (Abb. 16 F) zeigten ein Signal auf der Oberfläche der Zellen. Für beide Proteine wurden aber unspezifische Signale aufgrund von Aggregaten detektiert.

In den lebenden Zellen konnte, anders als in den fixierten Proben (Abb. 15), auch ein deutliches Signal für die Claudin-bindenden, Fluorophor-markierten cCPE-Varianten an den Zell-Zell-Kontakten im Inneren der Zellinseln nachgewiesen werden. Um die Antikörper-Zugänglichkeit in diesen Bereichen zu überprüfen, wurden YFP-cCPE-behandelte HT-29/B6-Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen YFP und ZO1 gefärbt (Abb. 16 G – I). Wie bereits in den vorgehenden Proben beobachtet wurde, gab es nicht an allen Zell-Zell-Kontakten eine deutliche ZO1-Anreicherung. Dies spricht dafür, dass die HT-29/B6-Zellen noch nicht vollständig differenziert waren und somit nicht überall funktionelle TJ ausgebildet hatten. Über das eigene YFP-Fluoreszenzsignal des YFP-cCPE konnte für cCPEwt und -SSS eine deutliche Bindung an allen Zell-Zell-Kontakten gezeigt werden. Dementgegen konnte das Signal des anti-YFP-Antikörpers nur an gut zugänglichen Stellen am Rand der Zellinseln, nicht aber in der Mitte, detektiert werden (Abb. 16 G, H). Die Spezifität dieser Signale wurde mithilfe der Negativkontrolle YFP-cCPE-YALA sichergestellt. Für dieses konnte weder eine YFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins noch ein Signal für die Antikörperfärbung detektiert werden (Abb. 16 I). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass eine cCPE-Bindung in fixierten Proben mittels Antikörperbindung nicht aufgrund fehlender cCPE-Rezeptoren, sondern wegen einer unzureichenden Zugänglichkeit nicht detektiert werden konnte.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass sich die Bindung der Varianten cCPEwt und -SSS an Claudin-exprimierende Zellen in lebenden Zellen sowohl über ein posttranslational konjugiertes Alexa Fluor 647 als über ein YFP-cCPE-Fusionsprotein detektiert lässt. Diese Bindung ist spezifisch und weist nur sehr geringe Hintergrundsignale auf. Außerdem ist durch die geringere Größe der Fluorophor-markierten Proteine im Vergleich zu einer Antikörper-Kopplung auch eine Detektion an schwer zugänglichen Stellen innerhalb der Zellen möglich.

Mithilfe von YFP-cCPE ließen sich außerdem die Entwicklung funktioneller Tight Junctions sowie mögliche Veränderungen der Claudinlokalisierung in lebenden HT-29/B6-Zellen untersuchen. Dazu wurden die Zellen subkonfluent auf Deckgläser ausgesät und die parazelluläre Barriere nach 24- bzw. 48-stündiger Kultivierung indirekt über CellMask™ visualisiert. CellMask™ bindet an die Plasmamembran der Zellen, wird aber durch funktionelle TJ daran gehindert, von der apikalen in die basolaterale Membran zu diffundieren. Sind diese noch nicht in den Zellen ausgebildet, so kann es innerhalb kurzer Zeit an die gesamte Plasmamembran binden. YFP-cCPE-SSS wurde für die Detektion der Claudine sowie als weiterer funktioneller Marker für die TJ-Barriere gewählt. Es sollte an Claudine binden, die nicht in TJ-Stränge inkorporiert sind, da die extrazelluläre Bindungsstelle möglicherweise durch die trans-Interaktion mit anderen Claudinen blockiert wird (Krause, Protze, and Piontek 2015, Eichner, Augustin, *et al.* 2017) (Abb. 17).

An HT-29/B6-Zellen, die für einen Tag auf Deckgläsern kultiviert wurden, zeigten sowohl CellMask™ als auch YFP-cCPE-SSS bereits nach 10-minütiger Inkubation eine deutliche Bindung, die besonders stark am Randbereich der Zellinseln war und zur Mitte hin abnahm (Abb. 17 A). Nach 60-minütiger Inkubationszeit war jedoch auch in der Mitte der Zellinseln eine starke Bindung von YFP-cCPE-SSS und eine etwas schwächere Bindung von CellMask™ eindeutig zu detektieren (Abb. 17 B). In der orthogonalen Ansicht wird deutlich, dass YFP-cCPE-SSS sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Zellmembran bindet (Abb. 17 C).

Wurden die HT-29/B6-Zellen für zwei Tage kultiviert, konnte nach 15-minütiger Inkubation mit CellMask™ und YFP-cCPE-SSS deren Bindung nur am äußersten Rand der Zellinsel detektiert werden (Abb. 17 D). Auch wenn die Inkubationszeit auf 60 min verlängert wurde, sind die beiden Marker nur in die Randbereiche der Zellinsel eingedrungen. In der Mitte der Zellinsel wurde weder für CellMask™ noch für YFP-cCPE-SSS ein Bindungssignal detektiert (Abb. 17 E). Die Kolo-kalisation der YFP-cCPE-SSS-Bindung und des CellMask™-Signales ist in der apikalen Membran der Zellen in den Randbereichen deutlich stärker als im Inneren der Zellgruppe (Abb. 17 F). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass in den stärker differenzierten Zellen weniger extrajunktionale Claudine in der apikalen Membran als cCPE-Rezeptoren zur Verfügung stehen als es in eher undifferenzierten Zellen der Fall ist.

Neben der veränderten Claudinlokalisierung zeigen diese Daten, dass die parazelluläre Barriere in HT-29/B6-Zellen nach zweitägiger Kultivierung stärker ausgebildet ist als nach nur einem Tag, auch wenn die Zellen noch subkonfluent sind. Am zweiten Tag wurde CellMask™ durch funktionelle TJ daran gehindert, in das Innere der Zellinseln zu diffundieren.

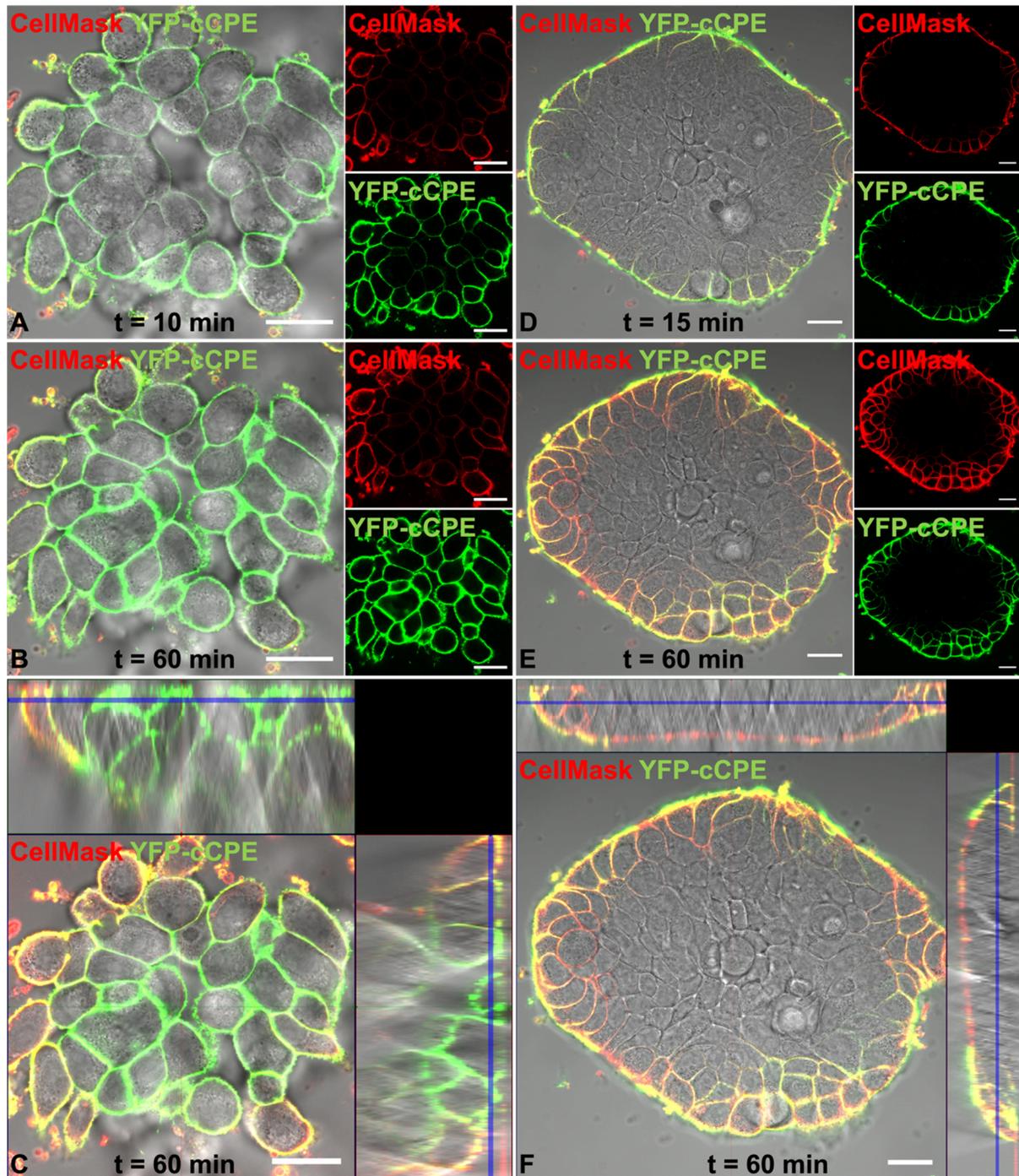


Abbildung 17 Die Entwicklung der TJ-Barriere in HT-29/B6-Zellen lässt sich mithilfe von CellMask™ und YFP-cCPE visualisieren. Repräsentative Aufnahmen subkonfluenter HT-29/B6 mit YFP-cCPE-SSS (grün) und CellMask™ (rot) als Überlagerungen mit differenziellem Interferenzkontrastbild. HT-29/B6-Zellen subkonfluent auf Deckgläser ausgesät. (C, D) Orthogonale Ansicht (xy, xz und yz). (A - C) Einen bzw. (D - F) zwei Tage nach Aussäen Inkubation der Zellen mit 5 µg/ml YFP-cCPE-SSS und CellMask™ (Verdünnung 1:15000 in Hesper-Ringer), Bindung in Echtzeit am LSM verfolgt. (A) Zellen, die für einen Tag kultiviert wurden, zeigten nach 10 min Bindungssignal für CellMask™ und YFP-cCPE-SSS an äußeren Zell-Zell-Kontakten. (B) Nach 60 min wiesen alle Zell-Zell-Kontakte deutliches Signal für YFP-cCPE-SSS auf. Plasmamembran aller Zellen durch CellMask™ angefärbt, Gradient von äußeren zu inneren Zellen. (C) Anreicherung von YFP-cCPE nicht nur in apikaler, sondern auch in basolateraler Plasmamembran. (D) Zellen, die für zwei Tage kultiviert wurden, besaßen ausgeprägte parazelluläre Barriere. Bindung von YFP-cCPE-SSS und CellMask™ 15 min nach Zugabe nur an äußere Plasmamembran von Zellen am Rand der Gruppe. (E) YFP-cCPE-SSS und CellMask™ nach 60 min über parazellulären Weg in äußere Schichten der Zellgruppe eingedrungen. Zwischen äußeren und inneren Zellen wies eingeschränkte Diffusion von CellMask™ auf ausgeprägte parazelluläre Barriere und funktionelle TJ hin. Claudine, die polymerisiert in TJ-Strängen vorlagen, standen nicht als Rezeptoren für YFP-cCPE-SSS zur Verfügung. (F) Geringe Kolokalisation von YFP-cCPE-SSS und CellMask™ in apikaler Membran im Inneren der Zellgruppe als im

Randbereich deutet darauf hin, dass in stärker differenzierten Zellen weniger Rezeptorclaudine in der apikalen Membran vorliegen. Maßstabsbalken 20 μm .

4.3.2 cCPE-SSS bindet an Zellen mit veränderten Tight Junctions in einem *in vitro*-Modell eines entzündeten Kolonepithels

In einem *in vitro*-Modell für entzündliche Darmerkrankungen wurde die Detektion der Bindung von cCPE an ein Kolonepithel mit gestörter Barrierefunktion untersucht.

Eine 20-stündige *ex vivo*-Inkubation der distalen Rattenkolonmukosa mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ verändert die Morphologie der Kolonmukosa zu einem Phänotyp mit verkürzten Krypten und führt zu einer erhöhten Expression des porenbildenden *Cldn2* und einer verringerten Expression der barrierebildenden *Cldn1*, -5 und -7 (Amasheh *et al.* 2009).

Nach der Inkubation mit den Zytokinen wurden 15 $\mu\text{g/ml}$ Alexa Fluor 647-markiertes GST-cCPE-SSS bzw. -YALA von der mukosalen Seite des Kolonepithels appliziert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe fixiert und mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation des TJ-Markers ZO1 und die Bindung der cCPE-Proteine analysiert (Abb. 18).

Morphologisch ließen sich keine Unterschiede zwischen der unbehandelten (- Zytokine) und der Zytokin-behandelten Kolonmukosa feststellen. Die Mukosa besaß, unabhängig von der Behandlung, die typische Kolonstruktur mit deutlich erkennbaren Krypten. Die Enterozyten zeigten ein weitgehend intaktes ZO1-Signal im apikolateralen Bereich der Zellen. Dies indiziert eine intakte TJ-Barriere, bei der die meisten Claudine junctional vorliegen.

Für cCPE-SSS konnte sowohl im unbehandelten als auch im Zytokin-behandelten Kolonepithel ein Signal des Fluorophors Alexa Fluor 647 detektiert werden. Die Bindung von cCPE-SSS wurde eher auf der mukosalen Oberfläche des Epithels an Stellen mit einem delokalisierten ZO1-Signal beobachtet (Abb. 18 A, B, Detailansicht in A1, B1). Dies deutet auf delokalisierte, extrajunktionale Claudine in der Plasmamembran hin, deren extrazelluläre Segmente zugänglich für eine cCPE-Bindung sind.

Für cCPE-YALA wurde auch an Stellen mit einem delokalisierten ZO1-Signal keine Bindung detektiert (Abb. 18 C, D, Detailansicht C1, D1). Das detektierte Alexa Fluor 647-Signal in Proben mit cCPE-SSS-Inkubation ist somit auf eine spezifische Bindung von cCPE-SSS an delokalisierte Claudine im Epithel und nicht auf eine unspezifische Aggregation des Proteins zurückzuführen.

Die Bindung von Alexa-Fluor 647-markiertem cCPE-SSS bzw. -YALA wurde bezogen auf die Zellzahl (DAPI) quantifiziert und auf das Signal der Negativkontrolle cCPE-YALA im unbehandelten Kolonepithel normiert (Abb. 18 E). Sowohl im unbehandelten als auch im Zytokin-behandelten Modell bindet cCPE-SSS deutlich stärker an das Epithel als die Negativkontrolle cCPE-YALA (unbehandeltes Kolon: cCPE-YALA: $1 \pm 0,29$, cCPE-SSS: $8,51 \pm 2,14$, Zytokinbehandlung: cCPE-YALA: $0,53 \pm 0,08$, cCPE-SSS: $7,37 \pm 1,73$). Die

Behandlung mit Zytokinen führte jedoch nicht zu einer stärkeren Bindung von cCPE-SSS im Vergleich zum unbehandelten Epithel.

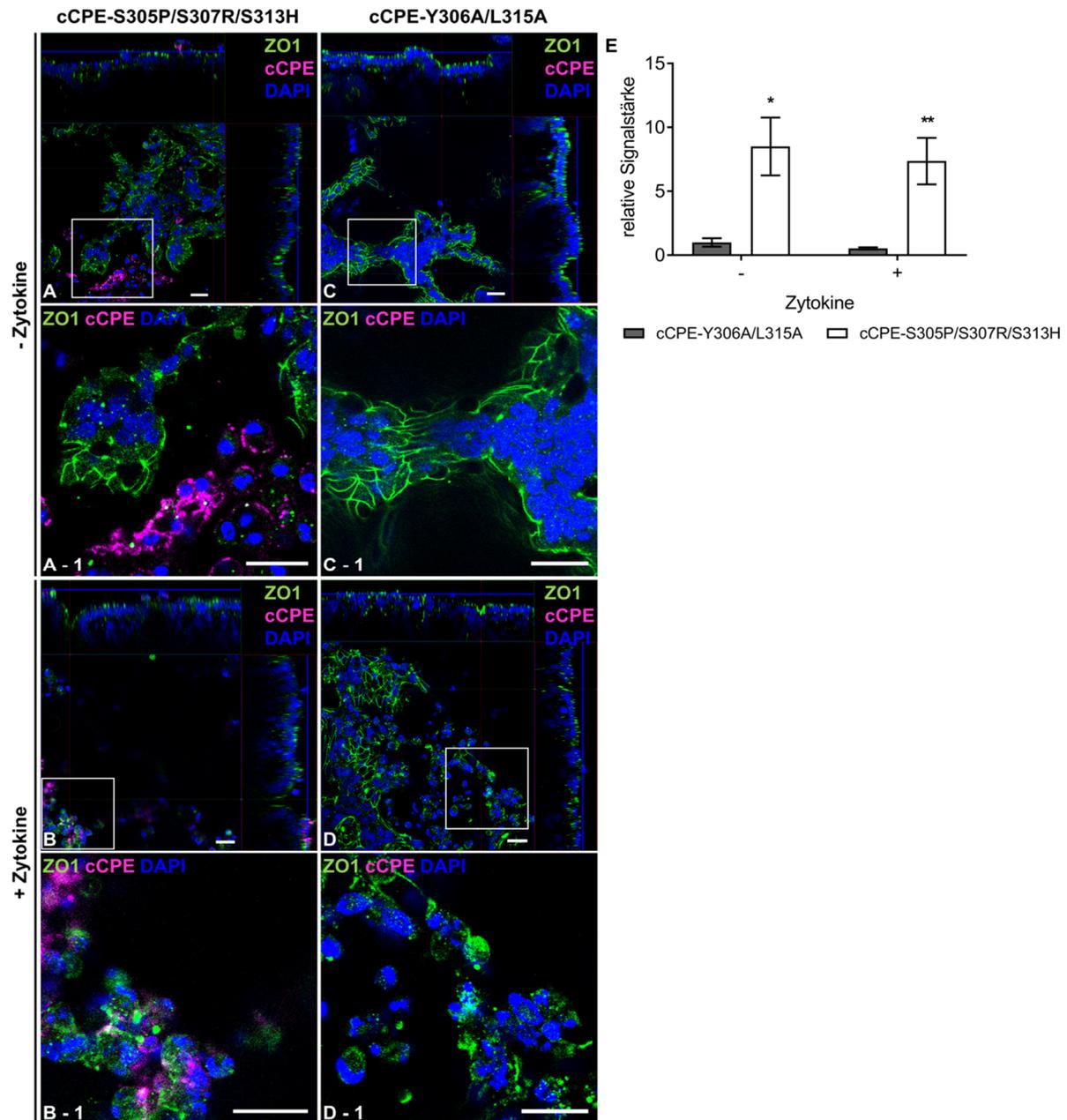


Abbildung 18 Die Bindung von cCPE-SSS an delokalisierte Claudine in einem *ex vivo*-Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen lässt sich spezifisch über das konjugierte Fluorophor Alexa Fluor 647 nachweisen. Gewebeprobe distales Rattenkolon *ex vivo* in Ussing-Kammer von serosaler Seite mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ behandelt (20 h, 37 °C). Anschließende Inkubation mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Alexa Fluor 647-GST-cCPE-SSS bzw -YALA (30 min, 37 °C), Fixierung, Immunfluoreszenzfärbung. (A – D) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen des fixierten Kolongewebes nach 20-stündiger Inkubation mit Zytokinen (B, D) bzw. des Kontrollgewebes (A, C) und 30-minütiger Inkubation mit Alexa Fluor 647-GST-cCPE. Übersichtsaufnahmen in orthogonaler Ansicht (xy, xz und yz), sowie vergrößerte Detailabbildungen. (A, B) cCPE-SSS bindet dort an Kolonepithel, wo delokalisiertes ZO1-Signal auf extrajunktionale Claudine hindeutet. (C, D) Für die cCPE-YALA (Negativkontrolle) wurde an diesen Stellen keine Bindung detektiert. Maßstabsbalken 20 μm . (E) Quantifizierung der Bindung von Alexa Fluor 647-markierten cCPE-Varianten an entzündetes Kolonepithel. Relative Signalstärke (Signal für Alexa Fluor 647 bezogen auf Zellzahl (DAPI) in Maximumprojektionen der aufgenommenen Fokus *stacks* (z-Ebene)). Normierung der Signale auf Negativkontrolle cCPE-YALA im unbehandelten Kolon. Mittelwerte \pm SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc Dunn-Test: * $p = 0,034$, ** $p = 0,003$. Biopsien aus zwei Rattenkolo. $n = 2$ für cCPE-SSS, $n = 1$ für cCPE-YALA. Insgesamt wurden für Behandlung mit ccPE-SSS 10 und mit cCPE-YALA 5 Aufnahmen ausgewertet.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Bindung von fluorophormarkiertem cCPE-SSS an delokalisierte Claudine in einem entzündlichen Kolonmodell mithilfe des Alexa Fluor 647-Signals spezifisch detektiert werden kann. Durch die Zytokinbehandlung wurden im Vergleich zu der Kontrollbehandlung jedoch nicht mehr Claudine auf der Oberfläche der Enterozyten zugänglich, sodass es für cCPE-SSS keine Unterschiede in der Signalstärke zwischen unbehandeltem und Zytokin-behandeltem Kolonepithel gab.

4.3.3 cCPE-SSS bindet an Zellen mit delokalisierten Tight Junctions in humanen kolorektalen Polypen

Darmpolypen sind gutartige Neoplasien des intestinalen Epithels, auf deren Oberfläche delokalisierte Claudine über cCPE-SSS detektiert werden sollten. Nach der *ex vivo*-Inkubation der Polypen mit dem Multi-Claudinbinder cCPE-SSS bzw. cCPE-YALA als Negativkontrolle wurde die Bindung von cCPE mittels Immunfluoreszenz analysiert. ZO1 wurde dabei als TJ-Marker verwendet, um die Integrität des Kolonepithels in den Polypen abzuschätzen (Abb. 19). Die Polypen zeigten zumeist ein durchgehendes ZO1-Signal im apikolateralen Bereich der Plasmamembran der Enterozyten (Abb. 19 A – D). Dies deutet auf ein größtenteils intaktes Kolonepithel mit funktionellem TJ-Netzwerk hin, in dem die Claudine hauptsächlich polymerisiert in TJ-Strängen vorliegen.

An einigen Stellen wurde kein kontinuierliches junctionales, sondern ein delokalisiertes ZO1-Signal in der apikalen Membran der Enterozyten beobachtet. Die Bindung von cCPE-SSS wurde nur auf der Oberfläche von Zellen detektiert, welche ein delokalisiertes ZO1-Signal aufwiesen (Abb. 19 A, B). Sowohl das delokalisierte ZO1-Signal als auch die Bindung von cCPE-SSS sind Hinweise auf extrajunktionale, unpolymersierte Rezeptoclaudine, die auf der Oberfläche der Enterozyten vorliegen. Für die Negativkontrolle cCPE-YALA wurde auch auf Zellen mit delokalisiertem ZO1-Signal keine Bindung beobachtet (Abb. 19 C, D). Somit wurde auch in einem nativen Gewebe die Spezifität der Bindung von cCPE-Varianten sichergestellt. Um die Eignung von cCPE-SSS für die Detektion delokalisierter Claudine in Kolonpolypen zu überprüfen, wurde die Bindung der beiden cCPE-Proteine an die Kolonpolypen quantifiziert und auf die Zellzahl (DAPI-Signal) normiert (Abb. 19 E). Dabei war das Signal für die Bindung des Multiclaudinbinders cCPE-SSS an humane Kolonpolypen durchschnittlich zwölfmal stärker als das entsprechende Signal für die Negativkontrolle cCPE-YALA (cCPE-SSS: $12,06 \pm 2,71$, cCPE-YALA: $1 \pm 0,05$, Mann-Whitney-Test: $p < 0,0001$).

Aus dem apikolateralen, junctionalen ZO1-Signal in der Plasmamembran der Enterozyten kann abgeleitet werden, dass die untersuchten Kolonpolypen noch gut differenziert waren, wie es für Adenome in sehr frühen Stadien der Tumorentwicklung zu erwarten ist. Die Ergebnisse zeigten, dass sich delokalisierte Claudine in prä-kanzerösen Kolonläsionen spezifisch mithilfe von cCPE-SSS detektieren lassen.

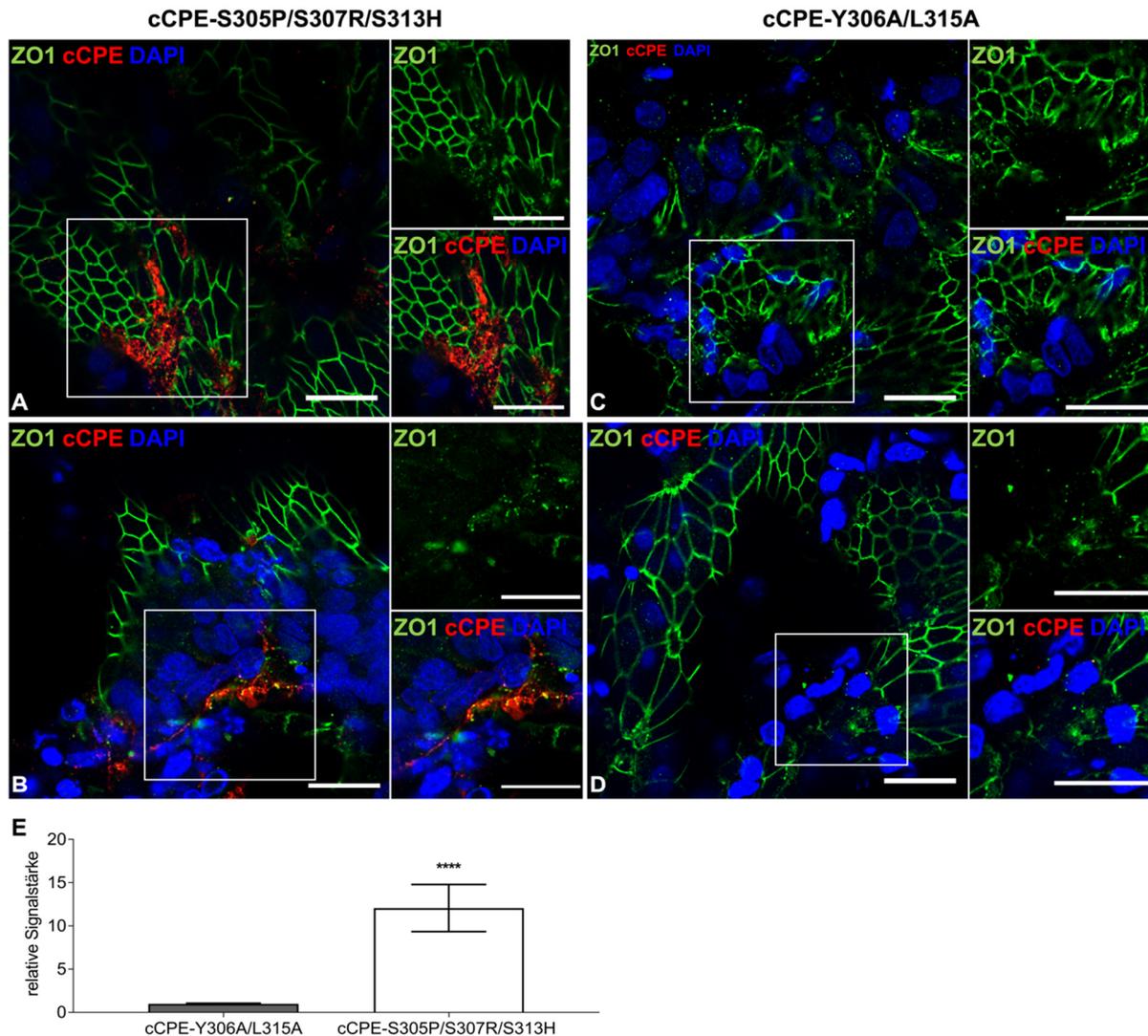


Abbildung 19 cCPE-SSS bindet spezifisch an Zellen mit dysregulierten Tight Junctions in humanen kolorektalen Polypen. Humane Kolonpolypen *ex vivo* mit 15 µg/ml der jeweiligen GST-cCPE-Proteine inkubiert (30 min, 37 °C, regelmäßiges Invertieren der Probe), Fixierung und Färbung von ZO1 (Kaninchen anti-ZO1) und GST-cCPE (Maus anti-GST). Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen. Kolonpolypen zeigten größtenteils durchgehendes ZO1-Signal in Plasmamembran. (A, B) cCPE-SSS hat nur dort an Polypen gebunden, wo das ZO1-Signal delokalisiert war und auf extrajunktionale Claudine in der Plasmamembran hindeutete. (C, D) Für cCPE-YALA wurde keine Bindung an Kolonpolypen beobachtet. Maßstabsbalken 20 µm. (E) Quantifizierung der Bindung von GST-cCPE-SSS und -YALA. Relative Signalstärke in Maximumprojektionen der aufgenommenen Fokus *stacks* errechnet aus Signal für GST-cCPE bezogen auf Zellzahl (DAPI). Normierung auf Signal von cCPE-YALA in einzelnen Polypen. Mittelwerte ± SEM. Mann-Whitney-Test: $p < 0,0001$. Polypen von 5 Patienten. Insgesamt für Behandlung mit cCPE-SSS 58 und für cCPE-YALA 54 Aufnahmen ausgewertet.

4.3.4 Magenkarzinome exprimieren Rezeptorclaudine für cCPE-SSS

Magenkarzinome von zwei Patienten wurden von Dr. Philip Bischoff (Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) auf Grundlage von Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Paraffinschnitten (J. Arndt, Arbeitsgruppe für experimentelle und klinisch-chirurgische Forschung) klassifiziert (s. Anhang, Abb. 31). Die Klassifizierung ist in Tab. 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Klinische Merkmale der Patienten und ihrer Magenkarzinome. Die histopathologische Einordnung erfolgte nach Laurén und WHO-Standards.

Patient	Geschlecht	Lokalisation	Histologie	Subtyp ²
1	männlich	Corpus ventriculi	Adenokarzinom	diffus
2	weiblich	Corpus ventriculi	Adenokarzinom	muzinös

Zunächst wurde die Expression und Lokalisation relevanter Rezeptorclaudine im Tumorgewebe untersucht (Abb. 20 A, B), um Vergleiche zwischen der Claudinexpression und -lokalisierung in Zellen des Primärkarzinoms und der Organoide zu ermöglichen. Dazu wurden Paraffinschnitte der beiden primären Magenkarzinome (angefertigt von J. Arndt) mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Cldn1 und Cldn4 gefärbt.

In beiden Tumoren waren anhand der Claudinsignale unterschiedliche Zellpopulationen erkennbar. Einige Zellen im Schnitt von Patient 1 schienen noch in einer geordneten, drüsenähnlichen Struktur vorzuliegen. In diesen Zellen waren Cldn1 und -4 in der Plasmamembran lokalisiert. Eine zweite Zellpopulation lag eher ungeordnet vor und zeigte intrazelluläre Cldn1- und -4-Signale. Weiterhin gab es Zellen, die weder Cldn1 noch Cldn4 exprimieren (Abb. 20 A).

Die meisten Zellen im Tumorschnitt von Patient 2 lagen in einer geordneten Drüsenstruktur vor. In diesen Zellen war Cldn4 deutlich in der Plasmamembran lokalisiert. Cldn1 lag sowohl in der Plasmamembran als auch intrazellulär vor. Eine kleine Zellpopulation zeigte einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp mit intrazellulär lokalisiertem Cldn4. In diesen Zellen gab es entweder kein oder nur wenig, intrazelluläres Cldn1 (Abb. 20 B).

Die histologische Klassifizierung der Tumore schien sich in ihrer Claudinexpression und -lokalisierung widerzuspiegeln. Der höhere Dedifferenzierungsgrad des diffusen Magenkarzinoms ging mit einem intrazellulär delokalisierten oder fehlendem Claudinsignal einher. Viele Zellen in dem eher gut differenzierten muzinösen Magenkarzinom von Patient 2 lagen noch in der geordneten, drüsenähnlichen Struktur des Magenepithels vor. In diesen Zellen war ein Großteil des Cldn1 und -4 in der Plasmamembran lokalisiert.

Zellen in den Magenkarzinomen beider Patienten exprimierten Cldn1 und -4, die als Rezeptorclaudine für cCPE-SSS dienen können.

² Als Adenokarzinome werden solche Magenkarzinome bezeichnet, deren Zellen sich von den Drüsenzellen ableiten. Ein diffuses Adenokarzinom ist nicht scharf abgegrenzt und zeigt infiltratives Wachstum in die Magenwand. Muzinöse Adenokarzinome sind durch azelluläre Schleimablagerungen gekennzeichnet.

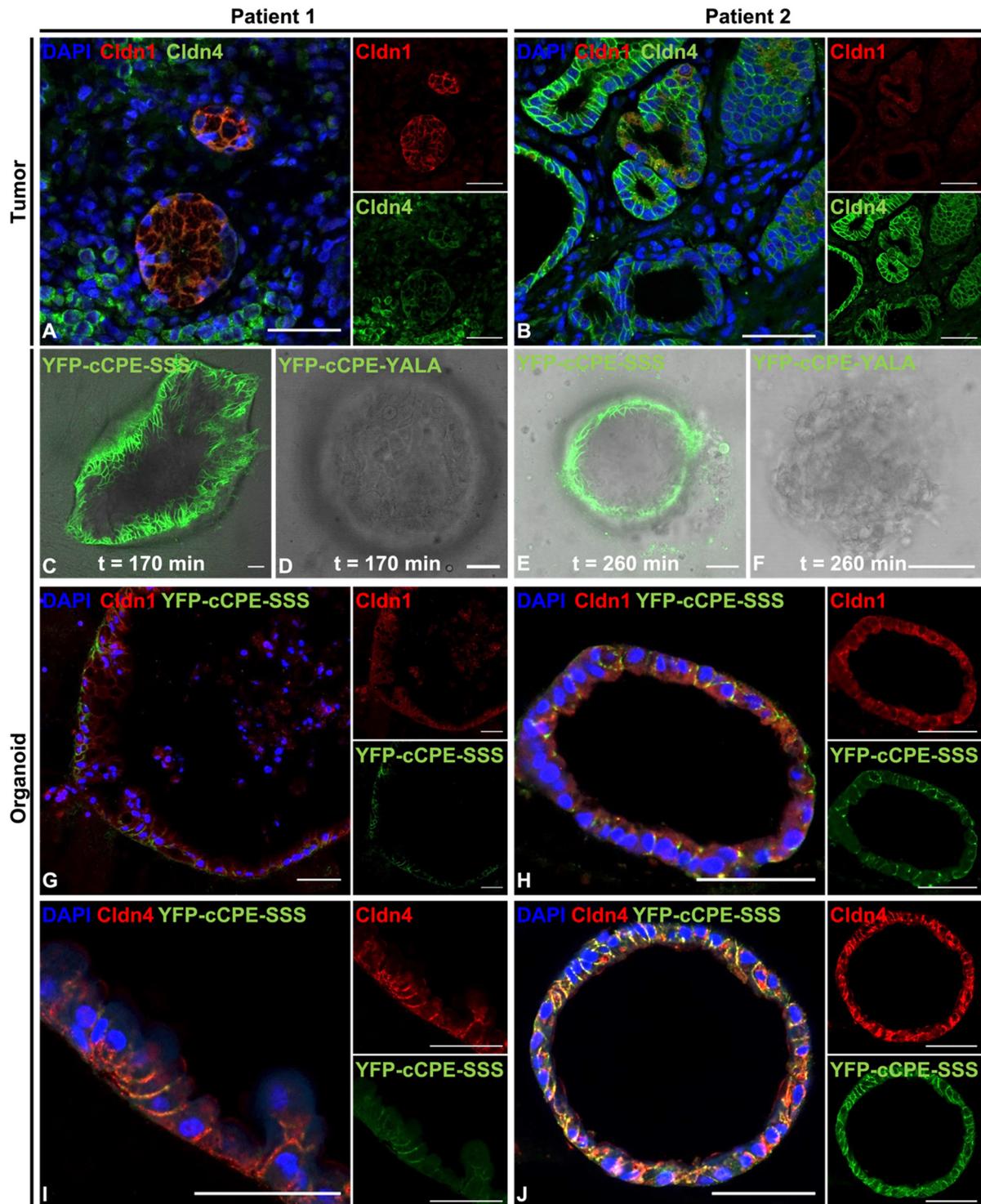


Abbildung 20 Mit YFP-cCPE-SSS können Claudine in lebenden Magenkarzinomorganoiden visualisiert werden. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen (A, B, G – J) und Überlagerungen mit differenziell Interferenzkontrastbild (C, D). (A, B) Immunfluoreszenzfärbung des fixierten Tumorgewebes von Patient 1 (A) und 2 (B) gegen Cldn1 und -4 (Kaninchen anti-Cldn1, Maus anti-Cldn4) zeigten, dass primäre Karzinomzellen Cldn1 und -4, welche als Rezeptoren für YFP-cCPE-SSS dienen können, exprimierten. (C – F) Lebende Organoiden der Magenkarzinome von Patient 1 und 2 nach dreiwöchiger Kultivierung mit YFP-cCPE-Varianten inkubiert (37 °C, 5% CO₂). (C, E) YFP-cCPE-SSS hat an Zellkontakten auf der Oberfläche lebender Organoiden gebunden und visualisierte so die Claudine in der Plasmamembran der Organoidzellen. (D, F) YFP-cCPE-YALA (Negativkontrolle) zeigte kein Signal. Fixierung der Organoiden, wenn YFP-cCPE-Signal für mindestens 1 h konstant war (Patient 1: 170 min, Patient 2: 260 min). Immunfluoreszenzfärbung gegen gebundenes YFP-cCPE-SSS sowie dessen Rezeptorclaudine (Maus anti-GFP, Kaninchen anti-Cldn1 bzw. anti-Cldn4). (G – J). Unterschiedliche Phänotypen der Organoiden entsprechen verschiedenen Zelltypen und deren Differenzierungsgrad aus Karzinomgewebe. Während Cldn1-Signale sowohl intrazellulär als auch in Plasmamembran detektiert werden konnten, gab es in

drüsenähnlichen Organoiden mit ausgeprägtem Lumen prominentes Cldn4-Signal an Zellkontakten. Deutlich schwächeres Claudinsignal in apikalen Membranen deutete auf funktionelle TJ-Diffusionsbarriere hin. YFP-cCPE-SSS kolokalisierte mit Claudinen in der Plasmamembran (gelb in Überlagerung). Maßstabsbalken 50 µm.

4.3.5 Die Bindung von cCPE-SSS kann in Echtzeit auf der Oberfläche lebender Magenkarzinom-Organoiden detektiert werden

YFP-cCPE wurde verwendet, um Claudine auf den Oberflächen lebender Magenkarzinomorganoiden zu detektieren. Nach 2 - 3 h ließ sich die Bindung von YFP-cCPE-SSS an die Organoiden von den Patienten 1 und 2 spezifisch detektieren (Abb. 20 C, E). Die nicht-bindende Mutante YFP-cCPE-YALA zeigte kein Signal (Abb. 20 D, F). Phänotypische Veränderungen der Organoiden, die auf eine ungewünschte Wirkung des YFP-cCPE zurückzuführen wären, wurden während der gesamten Inkubationszeit nicht beobachtet.

YFP-cCPE-SSS eignet sich somit für die spezifische Echtzeit-Detektion von Cldn1 - 9 in lebenden Magenkarzinom-Modellen.

4.3.6 cCPE-SSS bindet spezifisch an extrajunktionale Claudine in Magenkarzinom-Organoiden

Nach der Inkubation der Magenkarzinomorganoiden mit YFP-cCPE und der Echtzeitaufnahme des Bindungssignals wurden die Organoiden fixiert, um mittels Immunfluoreszenz die Expression und Lokalisation der Claudine 1 und 4 zu analysieren. Die YFP-cCPE-Bindung wurde zudem über eine anti-YFP-Färbung verifiziert.

Aus den Karzinomen beider Patienten entwickelten sich Organoiden unterschiedlicher Phänotypen, was die Heterogenität der Zellen im Tumor reflektiert. Für die folgende Analyse wurden drüsenähnliche Organoiden mit ausgeprägtem Lumen verwendet, da diese eher einem epithelialen Phänotyp entsprechen und eine stärkere Bindung von YFP-cCPE-SSS zeigten als solide Organoiden ohne Lumen.

Die Organoiden beider Patienten exprimierten Cldn1 und -4 (Abb. 20 G – J). Bei Patient 1 war das Cldn1 eher intrazellulär lokalisiert; Cldn4 hingegen zeigte starke Signale an den Zellkontakten (Abb. 20 G, I).

In den Organoiden von Patient 2 gab es sowohl für Cldn1 als auch für Cldn4 ein deutlich vermehrtes Signal an den Zellkontakten.

In den apikalen Membranen aller Organoiden waren die Claudinsignale nur sehr schwach.

Die Bindung von YFP-cCPE-SSS kolokalisierte stark mit den Claudinen in der Plasmamembran der Organoidenzellen (die Kolokalisation ist in der überlagerten Abbildung aller Kanäle als gelbes Signal erkennbar). cCPE kann jedoch nur an Claudine binden, die keine trans-Interaktion eingehen (Abschnitt 4.3.1, Abb. 17 und (Krause, Protze, and Piontek 2015)). Somit sollten die meisten der detektierten Claudine extrajunktionale und nicht zu TJ

polymerisiert vorliegen. Demgegenüber ist das Fehlen einer cCPE-Bindung in der apikalen Membran der Organoidzellen ein Hinweis auf eine intakte TJ-Barriere.

Insgesamt spricht die Claudinexpression und -lokalisierung für den epithelialen Ursprung der Organoide, jedoch auch für einen gewissen Dedifferenzierungsgrad der Zellen. So gibt es zwar deutliche Hinweise auf das Vorhandensein intakter TJ, welche einen epithelialen Phänotyp der Organoide indizieren. Jedoch ist das Claudinsignal stark über die basolaterale Membran ausgebreitet, was auf eine epithelial-mesenchymalen Transition hinweisen könnte.

4.4 Modulierung der epidermalen Tight Junction-Barriere durch cCPE-Varianten

Die epidermale Barriere der menschlichen Haut setzt sich aus den verhornten, abgestorbenen Corneozyten und den darunter liegenden TJ zwischen den Keratinozyten des *Stratum granulosum* (SG) zusammen. Die TJ der Epidermis enthalten vorrangig Cldn1 und Cldn4. Diese stellen Rezeptoren für cCPEwt (Cldn4) und den Multiclaudinbinder cCPE-SSS (Cldn1 und -4) dar.

Modelle rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) wurden für 24 bzw. 48 h mit cCPE-Varianten inkubiert. Die spezifische Öffnung der TJ-Barriere wurde durch R.Mannweiler über eine neue impedanzspektroskopische Methode für mehrschichtige Epithelien gemessen (Mannweiler *et al.*, Direct assessment of individual skin barrier components by electrical impedance spectroscopy. Manuskript in Revision).

4.4.1 In rekonstruierter humaner Epidermis werden relevante Claudine exprimiert

Die Expression und die Lokalisation ausgewählter TJ-Proteinen wurden in den vorliegenden RHE-Modellen untersucht. Die Untersuchung wurde mittels Immunfluoreszenz in Modellen durchgeführt, die bis zum 5. Tag nach Umstellung auf das Air-Liquid-Interface (ALI) kultiviert worden waren (Abb. 21).

Occludin wurde als Marker für intakte TJ in der Epidermis verwendet. In den konfokalmikroskopischen Aufnahmen gab es ein ausgeprägtes Hintergrundsignal für die Occludinfärbung (Abb. 21 A). Dennoch ließen sich auch Occludin-positive Bereiche erkennen, welche in der Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnet sind. Occludin umgab die oberen Keratinozyten des SG im apikalen Bereich und war daher in den Paraffinschnitten als punktförmiges Signal in der Plasmamembran erkennbar. Occludin-positive Bereiche, an denen das Cldn4-Signal stoppte, zeigten möglicherweise intakte TJ.

Cldn1 wurde in allen Schichten des Epidermismodells exprimiert, Cldn4 hingegen nur in den oberen Schichten lebender Zellen, welche dem SG entsprechen (Abb. 21 B). Beide Claudine waren stark extrajunktional lokalisiert und zeigten Signale in der gesamten Plasmamembran.

Eine Kolokalisation von Cldn1 und -4 in der basolateralen Membran mit einem fehlenden oder nur sehr schwachen Signal in der apikalen Membran könnte ein Hinweis auf TJ sein (Abb. 21 B, Pfeile).

In den konfokalmikroskopischen Aufnahmen lassen sich intakte TJ nur sehr schwer erkennen. Die Cldn1 und -4 liegen mehrheitlich extrajunktional in der Plasmamembran vor, sodass sie dort als Rezeptoren für cCPEwt und -SSS dienen können.

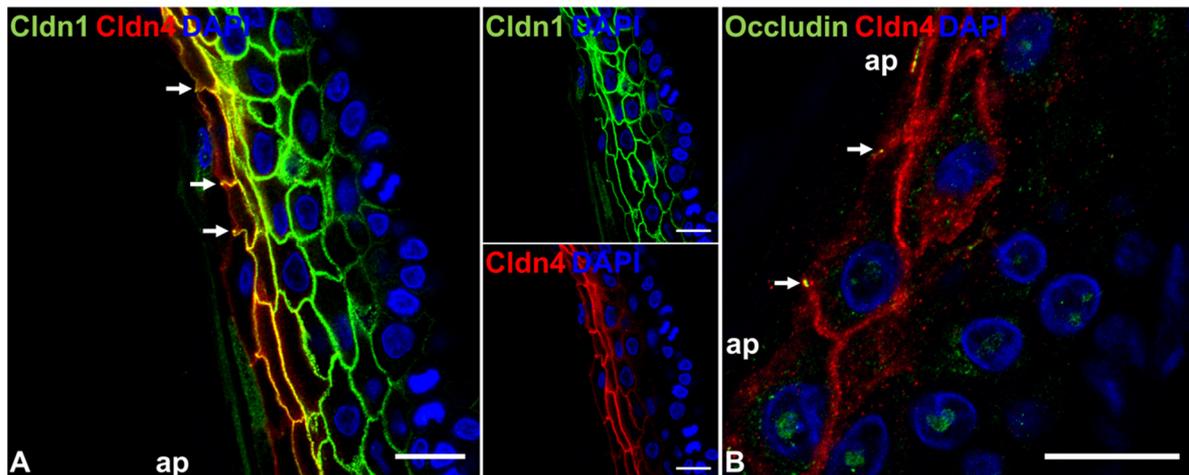


Abbildung 21 Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen in rekonstruierter humaner Epidermis. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen nach Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von am 5. Tag nach Umstellung auf ALI. **(A)** Expression von Cldn1 in allen lebenden Zellen der RHE, von Cldn4 in oberen lebenden Zellschichten. Beide Claudine hauptsächlich extrajunktional in gesamter Plasmamembran lokalisiert. Kolokalisation von Cldn1 und Cldn4 (gelbes Signal der Überlagerung) in basolateraler Membran mit fehlendem oder schwachem Claudinsignal in apikaler Membran könnte intakte TJ in oberster Schicht des SG indizieren (Pfeile). **(B)** Occludin lokalisierte im apikalen Bereich der lateralen Membran der Keratinozyten des SG oberhalb des Cldn4-Signals (Pfeile), wurde aber auch extrajunktional detektiert (Zytoplasma, Nukleus). Kolokalisation von Occludin und Cldn4 mit fehlendem Cldn4-Signal in apikaler Membran als Indikator für funktionelle TJ. ap – apikale Seite der RHE. Maßstabsbalken 20 µm.

4.4.2 cCPE-Varianten binden an Claudine in rekonstruierter humaner Epidermis und öffnen die Tight Junction-Barriere

RHE-Modelle wurden ab dem 3. Tag nach Umstellung auf ALI von der basalen Seite mit 50 µg/ml der cCPE-Varianten inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Öffnung der TJ-Barriere mittels Impedanzspektroskopie (R. Mannweiler) gemessen. Die TJ-Barriere wurde sowohl durch cCPEwt als auch durch cCPE-SSS geöffnet. Obwohl cCPEwt stärker an Cldn4 und nur schwach an Cldn1 bindet, öffnete es die TJ gleichermaßen. Die Negativkontrolle cCPE-YALA hatte keinen Einfluss auf die TJ-Funktion. Die Barriere des *Stratum corneum* wurde durch die Inkubation mit den cCPE-Proteinen nicht beeinflusst (s. Anhang, Abb. 33).

Nach der Impedanzmessung bzw. nach 48-stündiger Inkubation mit 50 µg/ml GST-cCPE wurden die Modelle fixiert und Paraffinschnitte angefertigt, welche für eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die TJ-Proteine Occludin und Cldn1 sowie GST-cCPE verwendet wurden (Abb. 22).

Bereits nach 24-stündiger Inkubation wurde für cCPEwt und -SSS ein klares Signal an den Zellkontakten in allen Schichten der RHE erhalten; die Negativkontrolle cCPE-YALA zeigte kein Signal. (Abb. 22 A – F). Occludin-positive Zellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. An diesen Stellen stoppte das Signal für cCPEwt und -SSS häufig, was auf funktionelle TJ an diesen Stellen hinweisen könnte (Basler *et al.* 2017, Bergmann *et al.* 2020). Sowohl cCPEwt als auch cCPE-SSS kolokalisierten in allen Schichten der RHE mit Cldn1.

Auch nach 48 -stündiger Inkubation mit den cCPE-Proteinen wurde eine Bindung von cCPEwt und -SSS an den Zellkontakten in allen Schichten der RHE beobachtet. Schwache Signale wurden auch für die Negativkontrolle cCPE-YALA detektiert. Diese waren jedoch sehr diffus und wurden daher als unspezifische Bindung aufgrund der langen Inkubationszeit klassifiziert (Abb. 22 G – L). Trotz der langen Inkubationszeit wurden noch Occludinsignale detektiert, an denen die Signale für cCPEwt und -SSS stoppten (Abb. 22 G – I, Pfeile). An diesen Stellen könnten funktionale TJ vorliegen. cCPEwt und -SSS kolokalisierten mit Cldn1; dies wurde für cCPE-YALA nicht beobachtet (Abb. 22 J – L).

Die Morphologie der RHE unterschied sich nach der längeren Inkubations- und somit auch Kultivierungszeit nicht von den Modellen, welche für 24 h mit den cCPE-Varianten inkubiert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass auch in Anwesenheit von claudinbindenden cCPE-Varianten ein funktionelles, mehrschichtiges Epithel aufrechterhalten werden konnte und cCPE keinen toxischen Effekt auf die Keratinozyten hatte.

Zusammen zeigten die impedanzspektroskopischen Messungen (s. Anhang, Abb. 33) und die Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 22), dass die epidermale TJ-Barriere gezielt durch claudinbindende cCPE-Varianten moduliert werden kann.

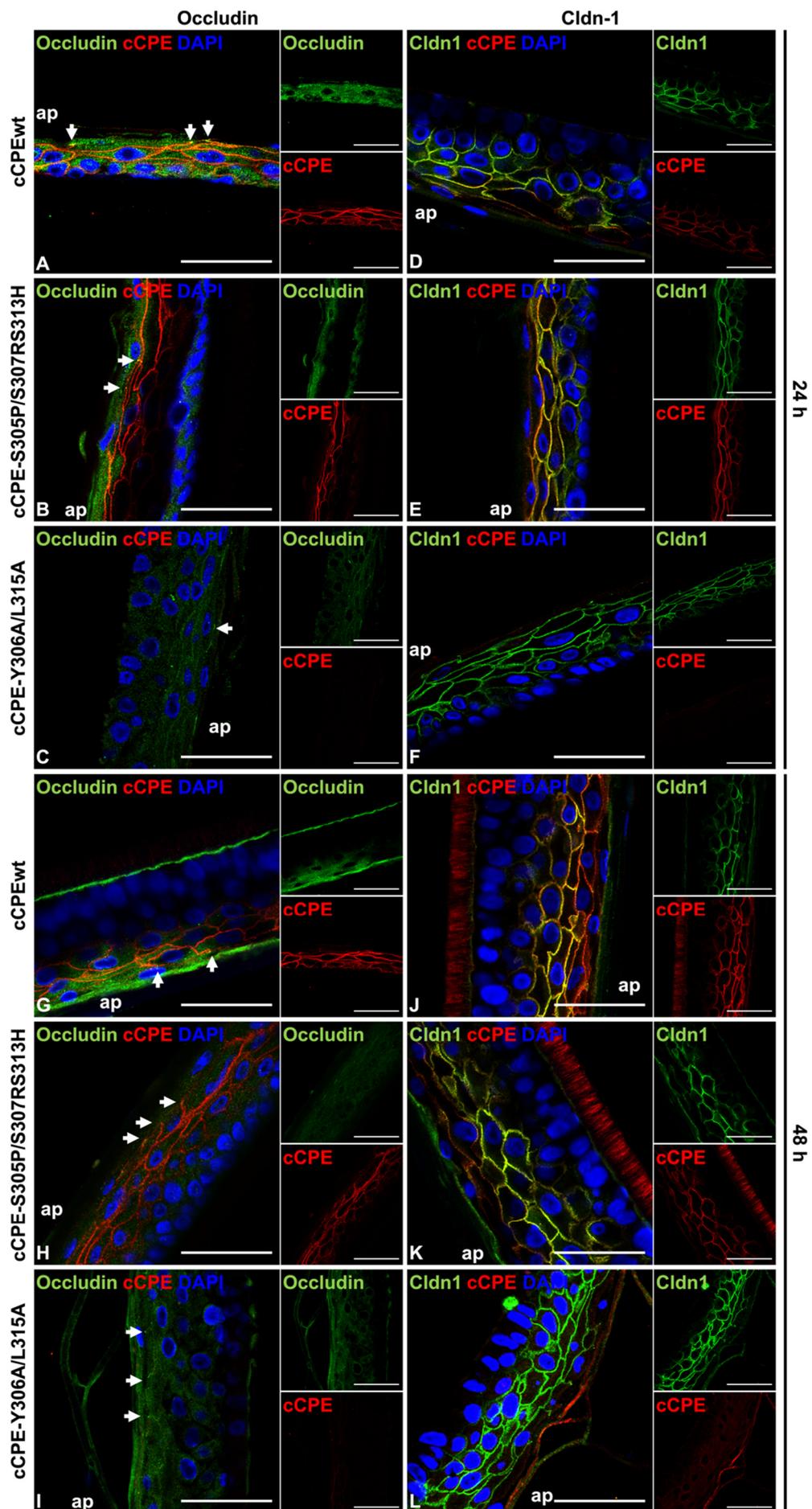


Abbildung 22 cCPE-Varianten binden an Claudine in rekonstruierter humaner Epidermis. Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen. Inkubation der RHE am 3. Tag nach Umstellung auf ALI mit 50 µg/ml GST-cCPE von basaler Seite für 24 (**A – F**) bzw. 48 h (**G – L**). Fixierung der Modelle nach Impedanzmessung und Einbettung in Paraffin. Paraffinschnitte mittels Immunfluoreszenz gefärbt und am LSM analysiert. (**A – C, G - I**) Occludin-positive Zellen mit Pfeilen gekennzeichnet. cCPEwt (**A, G**) und -SSS (**B, H**) banden in allen Schichten der RHE. An Occludin-positiven Stellen drang cCPE zum Teil nicht weiter in RHE ein. An diesen Stellen lagen möglicherweise intakte TJ vor. (**D – F, J – L**) Cldn1 wurde in allen Schichten der RHE exprimiert und war in der gesamten Plasmamembran der Keratinozyten lokalisiert. Die Bindung von cCPEwt (**D, J**) und -SSS (**E, K**) kolokalisierte mit dem Signal für Cldn1. (**C, F, I, L**) cCPE-YALA band nicht an den Zellkontakten in der RHE. (**J, K**) Zellkulturfilter auf der basalen Seite der RHE zeigten eine deutliche Färbung für cCPEwt bzw. -SSS. ap – apikale Seite der RHE. Maßstabsbalken 50 µm.

5 Diskussion

Claudine sind nicht nur maßgeblich an der Ausbildung von Gewebebarrieren beteiligt, sondern besitzen auch weitreichende, zellbiologische Funktionen bspw. in der Tumorentwicklung und epithelial-mesenchymalen Transition.

Durch die umfassende Charakterisierung der Struktur und Funktion von (c)CPE und den Claudinen konnte das molekulare Verständnis der cCPE-Claudin-Interaktion genutzt werden, um die Claudinsubtypspezifität von (c)CPE gezielt durch strukturbasierte, molekulare Modifikationen zu verändern (Neuhaus *et al.* 2018, Protze *et al.* 2015, Piontek *et al.* 2019).

In dieser Arbeit wurden mithilfe der Variante cCPE-S231R/S313H (-SRSH) strukturbioologische Untersuchungen zur Claudin-cCPE-Interaktion sowie zur Konformation der Claudine durchgeführt. Die Eignung von CPE-SRSH für die Behandlung Claudin-überexprimierender Karzinome wurde in *in vitro*-Untersuchungen evaluiert. Der Multiclaudinbinder cCPE-S305P/S307R/S313H diente als Targetingmodul für eine Fluorophor-gekoppelte molekulare Sonde zur Detektion extrajunktionaler Claudine. Weiterhin konnte mithilfe claudinbindender Varianten die Rolle der Claudine 1 und -4 in der epidermalen Barriere genauer analysiert werden.

5.1 Neuartige cCPE-Varianten ermöglichen weitere strukturbioologische Analysen zur Interaktion zwischen cCPE und Claudinen

Durch die Verbindung von experimentellen Bindungsdaten mit strukturbioologischen Analysen konnten weitere Einblicke in das Bindungsverhalten der Variante cCPE-SRSH an die Claudine 1 – 7 gewonnen werden. Dieses Wissen wurde genutzt, um zusätzliche Untersuchungen zur Struktur der Claudine 1 und 5 durchzuführen.

5.1.1 Strukturbioologische Grundlagen der Interaktion zwischen cCPE-S231R/S313H und den Claudinen 1 bis 7

Mithilfe von Homologiemodellen für die Komplexe aus Cldn1 – 7 und cCPE-SRSH (Abb. 10) sollten die strukturbioologischen Grundlagen für die experimentell bestimmten Affinitäten (s. Anhang, Abb. 29, (Piontek *et al.* 2019)) untersucht werden.

In den Homologiemodellen für Cldn1, -2 und -5 wird deutlich, dass der Rest R²³¹ in der cCPE-Doppelmutante elektrostatische Wechselwirkungen eingehen kann, welche zu einer erhöhten Affinität von cCPE für diese Claudine beitragen kann. So sind Wechselwirkungen zwischen R²³¹ des cCPE und Q¹⁴⁶ bzw. E¹⁴⁷ in Cldn1 und E⁷⁶ sowie E¹⁴⁶ in Cldn5 möglich. Auf ähnliche Weise könnte R²³¹ potenziell ionische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen D⁷⁶ und D¹⁴⁶ im Cldn2 eingehen. In dem entsprechenden Homologiemodell war der Abstand zwischen den AS-Resten jedoch zu groß für eine solche Wechselwirkung. Das könnte auf die geringere

Größe des Aspartat im Vergleich zu Glutamat, das in Cldn5 vorliegt, und den damit verbundenen größeren Abstand zu R²³¹ zurückzuführen sein. Weiterführende Modellierungen könnten darüber Aufschluss geben, ob durch die Mutation S231R eine leichte Konformationsänderung von Cldn2 bewirkt wird, welche zu einer verstärkten Interaktion mit cCPE-SRSH führen könnte. Dafür könnten z.B. in Minimierungen die Abstände zwischen den Resten R²³¹ bzw. R²²⁷ im cCPE und D⁷⁶ und D¹⁴⁶ in Cldn2 auf eine bestimmte Länge eingeschränkt werden. Molekulardynamik-Simulationen wären besonders gut geeignet, um Konformations- und Interaktionsänderungen sowie deren Stabilität in Abhängigkeit von AS-Substitutionen zu analysieren.

Mithilfe der erstellten Homologiemodelle (Abschnitt 4.1.1) konnten die in zellulären Bindungsassays ermittelten Bindungseigenschaften von cCPE-SRSH für die Cldn1 - 7 auch auf struktureller Ebene verifiziert werden.

Vor Kurzem wurde eine neue Kristallstruktur für den Heterokomplex aus Cldn4 und cCPE veröffentlicht (PDB ID: 7KP4, Vecchio *et al.*, Structural basis for Clostridium perfringens enterotoxin targeting of claudins at tight junctions in mammalian gut. Manuskript in der Veröffentlichung). Die neue Struktur ähnelt im Wesentlichen der bereits veröffentlichten und für die Homologiemodelle in dieser Arbeit verwendeten Struktur für den Cldn4-cCPE-Komplex (PDB ID: 5B2G, (Shinoda *et al.* 2016)). Die wichtige Interaktion zwischen dem AS-Rest L¹⁵⁰ des Cldn4 und der Tripel-Tyrosin-Tasche auf der Oberfläche des cCPE wird auch in der neuen Kristallstruktur beobachtet. Es gibt jedoch Unterschiede in der Ausrichtung einzelnen AS-Reste. So ist Q¹⁵⁶ im Cldn4 in den beiden Kristallstrukturen unterschiedlich zueinander ausgerichtet. Während in der Struktur 5B2G dieser Rest keine polaren Interaktionen eingehen kann, werden in der neuen Struktur 7KP4 polare Wechselwirkungen zwischen Q¹⁵⁶ und R²²⁷ sowie S³¹³ des cCPE beobachtet. Dementsprechend könnte die Ausrichtung dieses AS-Restes einen Einfluss auf die Interaktion zwischen cCPE und Cldn4 haben. Weiterhin sind auch die geladenen AS-Reste D⁷⁶ und Q⁷⁸ unterschiedlich in den beiden Kristallstrukturen ausgerichtet. Dadurch könnte über elektrostatische Wechselwirkungen die Interaktion mit der Variante cCPE-SRSH beeinflusst werden. Über Molekulardynamik-Simulationen ließen sich die Auswirkungen der genannten Unterschiede auf die Interaktion von Cldn4 mit verschiedenen cCPE-Varianten genauer untersuchen.

5.1.2 Claudin-cCPE-Interaktionsmodelle geben Aufschluss über eine mögliche Flexibilität der Konformation des Heterokomplexes

Die Wechselwirkungen zwischen cCPE und verschiedenen Claudinsubtypen wurde bereits vielfach analysiert. So konnten die Claudine nicht nur als CPE-Rezeptoren mit hoher, geringer oder gar keiner Affinität für cCPEwt eingeteilt werden (Fujita *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2010, Protze *et al.* 2015, Shrestha and McClane 2013, Sonoda *et al.* 1999, Winkler *et al.* 2009).

Vielmehr ist es auch gelungen, einzelne Aminosäurenreste zu identifizieren, welche sich positiv oder negativ auf die cCPE-Claudin-Interaktion auswirken können (Winkler *et al.* 2009, Veshnyakova *et al.* 2010, Veshnyakova *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015, Kimura *et al.* 2010, Robertson, Smedley, and McClane 2010). Zudem lieferten die Kristallstrukturen verschiedener Claudin-cCPE-Heterokomplexe wertvolle Einblicke in den Interaktionsmechanismus (Shinoda *et al.* 2016, Vecchio and Stroud 2019, Saitoh *et al.* 2015, Nakamura *et al.* 2019).

Während das veränderte Claudinbindungsverhalten der Varianten cCPE-SSS und cCPE-Y306W/S313H vor allem dadurch erklärt werden konnte, dass durch eine Formänderung der EZS2-Turn-Bindungstasche im cCPE eine bessere Interaktion mit der EZS2 der Claudine ermöglicht wurde (Protze *et al.* 2015), besitzt die Variante cCPE-SRSH durch die Mutation S231R einen positiv geladenen Rest, der möglicherweise auch mit negativ geladenen Resten am extrazellulären Ende der TMH2 oder -3 der Claudine interagieren kann (Abb. 10, Abb. 12, (Piontek *et al.* 2019)).

Richtet man alle bisher veröffentlichten Claudin-cCPE-Kristallstrukturen auf cCPE aus (Abb. 11 A – C), wird deutlich, dass zwar die EZS2 der einzelnen Claudine immer auf die gleiche Weise mit der EZS2-Turn-Bindungstasche interagieren, aber die N-terminal davon gelegenen TMH3 in unterschiedlichen Richtungen auf ebendiese treffen. Besonders gut ersichtlich wird dies, wenn man nur die beiden Claudine betrachtet, die jeweils am weitesten zur cCPE-Oberfläche hin und von ihr weg zeigen, murines Cldn3 (PDB ID: 6AKE) und humanes Cldn19 (PDB ID: 3X29). Ein Vergleich der beiden TMH3 dieser Claudine zeigt, dass die TMH3 von murinem Cldn3 ab der Position 134, an welcher sich ein Prolin befindet, deutlich gebogen ist, während die TMH3 von humanem Cldn19, die an entsprechender Stelle ein Alanin besitzt, gerade ist. Es wurde gezeigt, dass die Biegung der TMH3 verändert werden kann, indem das Prolin, welches die regelmäßige Helixkonformation stört, durch ein Glycin oder Alanin substituiert wird, sodass sich eine geraden Konformation ergibt. Diese Substitution hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bindung von cCPE (cCPE-S313A, eine Wildtyp-ähnliche Mutante) an Cldn3 (Nakamura *et al.* 2019).

cCPE-SRSH bindet mit einer hohen Affinität sowohl an Cldn1 als auch an Cldn5 (s. Anhang, Abb. 29). Für keines der beiden Claudine wurde bisher eine Kristallstruktur veröffentlicht. Sequenzanalysen der TMH3 suggerieren Konformationsunterschiede zwischen Cldn1 und -5. So sollte Cldn1 eher eine gerade TMH3 wie humanes Cldn19 besitzen (A¹³⁶), während diese in Cldn5 aufgrund des P¹³⁴ ähnlich wie in murinem Cldn3 gebogen sein könnte.

Mithilfe von Homologiemodellen für Cldn1 und -5, die jeweils auf Grundlage der Strukturen 3X29 und 6AKE erstellt wurden, sollte untersucht werden, ob die Krümmung der TMH3 einen Einfluss auf die Interaktion zwischen den beiden Claudinen und cCPE-SRSH hat (Abb. 12).

In den Homologiemodellen für Cldn1 wurden sowohl mit gerader als auch mit gebogener TMH3 bindungssteigernde Wechselwirkungen durch die Substitution S231R gefunden

(Abb. 12 A – E). Hingegen wird in den Interaktionsmodellen für cCPE-SRSH und Cldn5 nur in denen, die eine gerade oder nur leicht gebogene TMH3 aufweisen, eine Interaktion zwischen dem Rest R²³¹ und geladenen Resten am Ende der TMH2 (E⁷⁶) und -3 (E¹⁴⁶) beobachtet (Abb. 10 F, Abb. 12 F - J).

Anhand der erhaltenen Daten können keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die Konformation der TMH3 von Cldn1 bzw. -5 gezogen werden. So sollte Cldn1 laut der AS-Sequenz eher eine gerade TMH3 besitzen, aber in den Homologiemodellen konnten sowohl mit gerader als auch mit gebeugter TMH3 bindungssteigernde Interaktionen gefunden werden. Durch den unterschiedlichen Neigungswinkel des cCPE wurden die Abstände zu den entsprechenden Resten in der TMH3 kaum beeinflusst. Diese Abstände sind für die gesteigerte Bindung von cCPE-SRSH an Cldn5 jedoch relevant: sind sie durch eine gebogene TMH3 zu groß, kann keine Wechselwirkung zwischen R²³¹ und E⁷⁶ ausgebildet werden. Obwohl Cldn5 anhand der AS-Sequenz eher eine gebeugte TMH3 besitzen sollte, wird an dieser Stelle deutlich, dass eine eher gerade TMH3 diese Interaktionen deutlich begünstigt.

Um die Konformation der TMH3 der Claudine zu bestimmen, sind letztlich zuverlässige und genaue Strukturen, z. B. Kristallstrukturen, notwendig. Wie auch die veröffentlichten Kristallstrukturen für die verschiedenen Claudin-cCPE-Komplexe nahelegen, scheinen die Biegung der TMH3 und somit die Neigung eher von untergeordneter Bedeutung für die Bindung von cCPE an die Claudine zu sein. Vielmehr scheint die Konformation der Claudine generell eine gewisse Flexibilität und Dynamik im Bereich der TMH3 und extrazellulären Segmente aufzuweisen. So konnten auch für humanes Claudin-9 zwei Claudin-cCPE-Komplexe kristallographisch differenziert werden, die sich trotz identischer AS-Sequenzen in der Neigung der TMH3 und dem Abstand zwischen cCPE und dem C-terminalen Teil der EZS2 unterscheiden (sog. „offene“ und „geschlossene“ Konformation“) (Vecchio and Stroud 2019). Es scheint möglich, dass durch Wechselwirkungen zwischen cCPE und AS-Resten am Ende der TMH2 oder -3 der Claudine bestimmte Konformationen favorisiert werden, wie anhand der Homologiemodelle für Cldn1 und -5 gezeigt werden konnte (Abb. 12, Abb. 23). Mithilfe von Molekulardynamik-Simulationen ließe sich diese Hypothese und auch die Claudin-cCPE-Interaktion genauer untersuchen. Neben den verfügbaren Kristallstrukturen liefern die in dieser Arbeit generierten Homologiemodelle eine wichtige Grundlage dafür. Entsprechende Molekulardynamik-Simulationen werden zurzeit in der Arbeitsgruppe etabliert, sodass sie in naher Zukunft systematisch durchgeführt werden können.

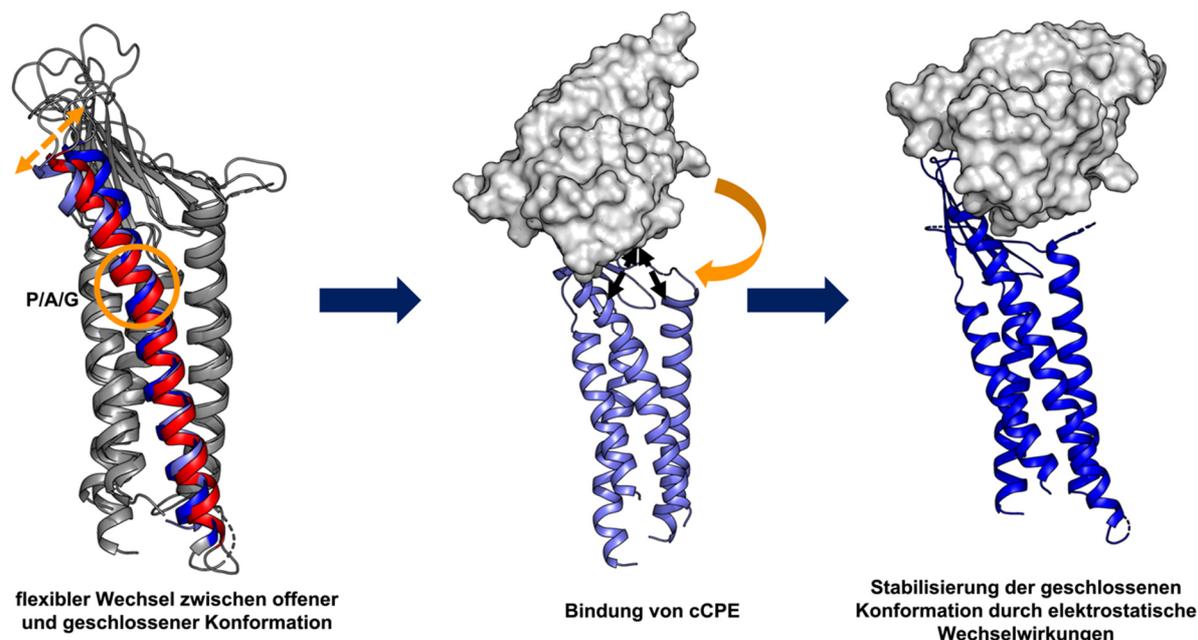


Abbildung 23 Mögliche Flexibilität des Claudin-cCPE-Komplexes. Cartoondarstellung der Claudine, Oberflächendarstellung für cCPE, Alignment auf TMHs. Veröffentlichte Kristallstrukturen der Claudin-cCPE-Komplexe suggerieren, dass die Struktur der Claudine vor allem im Bereich der TMH3 flexibel ist (Vecchio and Stroud 2019). Möglicherweise wird Biegung der TMH3 durch AS an Position 134 bzw. 136 (orangefarbener Kreis) beeinflusst. (Nakamura *et al.* 2019). Durch Bindung von cCPE könnte die geschlossene Form der Claudine mit einer eher geraden TMH3 über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Resten auf der Oberfläche des cCPE und im Bereich der EZS1/TMH2-Region bzw. TMH3 der Claudine (angedeutet durch schwarze Doppelpfeile) stabilisiert werden. hellblau – murines Cldn3 (PDB ID: 6AKE), rot - humanes Cldn9 in offener Konformation (PDB ID: 6OV3), dunkelblau – murines Cldn19 (PDB ID: 3X29), TMH1, -2, -4 in Überlagerung grau dargestellt.

5.2 CPE-Varianten für die Therapie Claudin-überexprimierender Karzinome

Mit CPEwt ist die Anwendbarkeit von CPE in der Tumorthherapie auf solche Tumoren beschränkt, welche die klassischen CPE-Rezeptorclaudine, hauptsächlich Cldn3 und -4, exprimieren. Jedoch wurde beispielsweise für Schilddrüsenkarzinome eine Überexpression von Cldn1 (Zwanziger *et al.* 2015) und für Bronchialkarzinome eine Überexpression mehrerer Claudine, u.a. Cldn1 und -5 (Paschoud *et al.* 2007, Jung *et al.* 2009, Sun *et al.* 2016) beschrieben, sodass diese als mögliche Rezeptoren für den Einsatz von CPE-Varianten in der Tumorthherapie dienen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit CPE-SRSH gearbeitet. Sowohl die theoretisch als auch die experimentell ermittelten Bindungseigenschaften von CPE-SRSH für Cldn1 und -5 machen es zu einem potenziellen Wirkstoff zur Behandlung der genannten Tumorerkrankungen.

5.2.1 CPE-S231R/S313H ermöglicht den gezielten Angriff auf Claudin-1-überexprimierende Karzinomzellen

Die Anwendbarkeit von CPE-SRSH für eine mögliche Behandlung Claudin-überexprimierender Bronchialkarzinome wurde zunächst in *in vitro*-NSCLC-Modellen mit starker Expression der Cldn1, -3, -4 und -7 (PC-9-Zellen) und bronchialen

Plattenepithelkarzinomzellen mit schwacher Expression von Cldn1 und -3 (SK-MES-1-Zellen) verglichen (s. Anhang, Abb. 30).

Die Bindung der cCPE-Varianten an die beiden Zelllinien sowie die Zytotoxizität der CPE-Proteine korrelierten direkt mit der Claudinexpression der Zellen (Abb. 13, Abb. 14). Allerdings bot die Variante CPE-SRSH in keiner der beiden Zelllinien einen entscheidenden Vorteil für die Zytotoxizität gegenüber dem Wildtyp.

In einem Modell für das papilläre Schilddrüsenkarzinom, in dem nur Cldn1 stark exprimiert wird, konnte jedoch gezeigt werden, dass CPE-SRSH eine deutlich stärkere zytotoxische und antitumorale Wirkung auf die Zellen hat als der Wildtyp (Piontek *et al.* 2019). Somit ist die neuartige Variante CPE-SRSH besonders zur Behandlung solcher Karzinome geeignet, welche vorrangig Cldn1 exprimieren.

5.2.2 Vorteile von CPE-Varianten gegenüber anti-Claudin-Antikörpern in der Tumorthherapie

Ein vergleichsweise neuer Therapieansatz bei der Behandlung von Tumoren ist der Einsatz von Antikörpern gegen spezielle Oberflächenproteine der Tumoren. Besonders bekannt ist der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Handelsname Herceptin®) gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor HER-2, welcher zur Behandlung von Mammakarzinomen verwendet wird (Piccart-Gebhart *et al.* 2005). Mittlerweile sind in der Europäischen Union und den Vereinigten Staaten 13 monoklonale Antikörper für die Tumorthherapie zugelassen (Adler and Dimitrov 2012).

In mehreren Studien wurden bereits anti-Claudinantikörper zur Tumorthherapie getestet (Cldn1: (Yoda *et al.* 2014), Cldn4: (Silva *et al.* 2017), Cldn5: (Hashimoto *et al.* 2017), Cldn18.2: (Singh, Toom, and Huang 2017)). Doch rekombinante CPE-Varianten besitzen einige Vorteile gegenüber monoklonalen anti-Claudin-Antikörpern. Anders als Antikörper, die eine notwendige posttranslationale Modifikation besitzen, können CPE-Proteine kostengünstig rekombinant in Bakterien produziert werden. Während monoklonale anti-Claudinantikörper nur gegen ein spezielles Claudin gerichtet sind, können CPE-Varianten mit einer auf das Karzinom abgestimmten Claudinspezifität entwickelt werden, welche verschiedene Claudine als Rezeptoren nutzen. Somit könnten gleichzeitig mehrere Claudine als Wirkstofftargets genutzt werden, was zu einem schnelleren und rigoroseren Therapieeffekt führen könnte. Weiterhin sind in CPE die Rezeptor-bindende und die zytotoxische Domäne bereits nativ kombiniert, sodass eine Bindung von CPE auch den gewünschten zytotoxischen Effekt nach sich zieht. Für immuntoxin- oder antikörperbasierte Therapien muss dagegen die Zytotoxizität unabhängig von der Bindung vermittelt werden, wodurch sich die Effizienz der Therapie deutlich verringern kann.

CPE wurde bereits in mehreren tierexperimentellen Studien erfolgreich als Tumorthapeutikum getestet. In Ovarialkarzinomem werden unter anderem die CPE-Rezeptorclaudine Cldn3 und -4 häufig überexprimiert. In Studien, in denen Mäusen mit Patientenxenografts aus chemotherapieresistenten Ovarialkarzinomzellen intraperitoneal mit CPEwt ($8 \times 7,5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $8,5 \mu\text{g/ml}$ CPE) behandelt wurden, wurde das Fortschreiten der Tumorentwicklung erfolgreich unterdrückt (Santin *et al.* 2005, Casagrande *et al.* 2011). Auch in subkutanen Patientenxenografts von Claudin-exprimierenden Mammakarzinomen in Mäusen wurde durch intratumorale Gabe von CPEwt (7×2 bzw. $10 \mu\text{g}$ CPE) ein zytolytischer Effekt auf die Karzinomzellen beobachtet (Kominsky *et al.* 2004). Wir konnten zeigen, dass das Tumorwachstum von Cldn1-überexprimierenden, subkutanen Zelllinien-Xenografts des papillären Schilddrüsenkarzinoms (abgeleitet aus der K1-Zelllinie) durch die intratumorale Applikation von $10 \times 0,04 \mu\text{g/ml}$ CPE-SRSH deutlich verringert wird (Piontek *et al.* 2019). Weiterhin ist es möglich, CPE mit einem *in vivo*-Gentransfer zu applizieren. Das CPE wird daraufhin von den Zellen exprimiert und vermittelt eine claudinabhängige Zytotoxizität. Dieser kosten- und arbeitsgünstige Ansatz zeigt in Kolon- und papillären Schilddrüsenkarzinommodellen eine ähnliche Effizienz wie die Gabe von rekombinanten CPE (Walther *et al.* 2012, Pahle *et al.* 2017, Piontek *et al.* 2019).

5.2.3 Einschränkungen in der Anwendbarkeit von CPE-Varianten zur Tumorthherapie

Da CPE-Rezeptorclaudine auch in gesundem Gewebe exprimiert werden, besitzt CPE eine hohe systemische Toxizität. Dadurch werden der Applikationsweg und die CPE-Dosis stark eingeschränkt. Bei lokal begrenzter Gabe, z.B. intratumoral oder intraperitoneal, wurden in keiner der genannten Studien negative, systemische Effekte beobachtet. Um die systemische Toxizität weiter zu minimieren, könnten CPE-Varianten mit einem noch passgenaueren Bindungsverhalten oder Protoxine, welche erst in der Nähe der Tumorzellen aktiviert werden, einen vielversprechenden Ansatz zur Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen bieten. Ein solches Protoxin wurde bereits erfolgreich in einem Modell für Cldn3- und -4-überexprimierende Prostatakarzinome getestet (Romanov *et al.* 2014).

Als bakterielles Protein kann CPE auch eine Immunantwort auslösen. Durch eine Antikörpervermittelte Immunantwort können sich das pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkprofil deutlich verändern, sodass die Wirksamkeit der CPE-Proteine nicht gut vorausgesagt werden kann. Zudem kann eine mögliche Hypersensibilität gegenüber CPE zu schweren Nebenwirkungen führen (Leach *et al.* 2014). Eine Domainmapping-Analyse von CPE hat die Bereiche der AS 16 – 65, 91 – 170 und 286 – 305 als mögliche antigene Determinanten bestimmt. Jedoch hat cCPE, das die AS 290 – 319 umfasst, eine eher geringe Antigenizität. Modulare Biologika, in denen cCPE-Varianten zur Vermittlung der

claudinspezifischen Wirkung eingesetzt werden, stellen daher eine Alternative zum Einsatz von zytotoxischem Vollängen-CPE dar (Saeki *et al.* 2010). Zudem könnte versucht werden, die Immunogenität von (c)CPE durch gezielte Veränderung von Proteinoberflächenarealen, die nicht für die Claudinbindung und Porenbildung notwendig sind, zu verringern.

5.3 Anwendung von cCPE-basierten molekularer Sonden für die Detektion Claudin-überexprimierender Tumoren

Die Entstehung von kolorektalen Karzinomen ist gut erforscht. Die Entwicklung von unauffälligen Polypen über benigne Adenome zu malignen Karzinomen ist oft beschrieben worden und das anerkannte Modell zur Tumorentstehung von kolorektalen Karzinomen (Pandurangan *et al.* 2018). Im Rahmen der Tumorgenese von Darmkrebs können auch schon Polypen frühzeitig eine Claudineregulierung aufweisen (Pope, Ahmad, *et al.* 2014, Oleinikova *et al.* 2017). In ähnlicher Weise wurde auch für Magenkarzinome eine Claudineregulierung beschrieben (Kwon 2013). Mithilfe der Variante cCPE-SSS könnte ein breites Spektrum an Claudinen (Cldn1 – 9) als Rezeptoren zur Detektion solcher Neoplasien genutzt werden (Takahashi *et al.* 2012, Protze *et al.* 2015), sodass Fluorophor-markiertes cCPE-SSS spezifisch an die überexprimierten Claudine auf der Oberfläche von (prä)-malignen Läsionen binden und sie gleichzeitig über eine Anreicherung des Fluoreszenzsignals sichtbar machen könnte.

5.3.1 Generierung Fluorophor-markierter cCPE-Varianten

Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Generierung von Fluorophor-markierten cCPE-Varianten verfolgt.

Über die posttranslationale Kopplung von GST-cCPE an das Alexa Fluor 647 wurden cCPE-Varianten erhalten, deren Bindung im tiefroten bzw. nahinfraroten Wellenlängenbereich detektiert werden kann. Dieser Wellenlängenbereich kann besonders gut in lebenden Geweben detektiert werden, auch wenn mehrere Fluorophore gleichzeitig eingesetzt werden (Shcherbo *et al.* 2009). Das Fluorophor Alexa Fluor 647 ist an einen Succinimidylester gekoppelt, welcher mit freien Aminogruppen reagieren kann. Im GST-cCPE liegen sieben Lysinreste auf der Proteinoberfläche, sodass bei maximaler Reaktionseffizienz sieben Farbstoffmoleküle an ein GST-cCPE-Molekül binden könnten. Experimentell wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Bindungseffizienzen von drei bis vier Molekülen Alexa Fluor 647 je Molekül GST-cCPE beobachtet. Jedoch ist dies nur ein Durchschnittswert, sodass auch stärker oder gar nicht markierte Moleküle vorliegen können. Letztere sind besonders nachteilig, da sie zwar an Claudine binden und diese so für markierte cCPE-Moleküle blockieren, aber nicht über das Fluoreszenzsignal detektiert werden können.

Alternativ dazu wurde ein Fusionsprotein aus eYFP mit N-terminalem 6 × His-Tag und cCPE generiert (bezeichnet als YFP-cCPE). Wenn ein YFP-cCPE-Molekül an ein Claudin bindet, so kann diese Bindung immer über das YFP-Signal detektiert werden.

Während in Lösungen von Alexa Fluor 647-gekoppeltem cCPE das Protein nach mehrmonatiger Lagerung ausfiel, wurde dies bei YFP-cCPE-Varianten nur in einem wesentlich geringeren Umfang beobachtet. Im kurzen Wellenlängenbereich des YFP kann eher eine Autofluoreszenz des Gewebes auftreten, welche wiederum die Detektion der cCPE-Bindung stören könnte. Dies stellte jedoch in in den meisten der untersuchten Proben ein Problem dar. Zudem ist eYFP im Gegensatz zu Alexa Fluor 647 mit einer 488 nm-Laserlinie anregbar, welche in dem Konfokaleidoskop, das für zukünftige *in vivo*-Experimente verwendet werden soll, vorhanden ist.

Es wurden unterschiedlich Fluorophor-markierte cCPE-Proteine hergestellt, deren Fluoreszenzen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen und mit unterschiedlicher Helligkeit detektiert werden können. Die diagnostische Claudindetektion über Fluorophor-gekoppelte cCPE-Proteine ließe sich somit an die verschiedenen Gegebenheiten der Gewebe und der technischen Ausstattung angepasst werden. Nach den beschriebenen Prinzipien könnten auch weitere cCPE-basierte Biosonden generiert werden, um zusätzliche spektrale Bereiche für die Detektion abzudecken.

5.3.2 Detektion von Claudinen in einem *in vitro*-Zellmodell mit Fluorophor-markierten cCPE-Varianten

Zunächst wurde die Bindung und Detektion der Fluorophor-markierten cCPE-Varianten in einem etablierten Zellsystem, der Kolonepithelzelllinie HT-29/B6, getestet und mit der Bindung von unmarkiertem GST-cCPE, welche über eine Immunfluoreszenzfärbung detektiert wurde, verglichen (Abb. 15, Abb. 16).

Durch den Vergleich von anti-GST-, Alexa Fluor 647-, YFP- und anti-YFP-Signalen konnte gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Kontakte im Inneren von Zellinseln nicht gut für Antikörper zugänglich sind. Demgegenüber konnten die Claudine auch an sterisch schlechter zugänglichen, jedoch nicht vollständig ausdifferenzierten, Zell-Zell-Kontakten durch die kleineren Fluorophor-markierten cCPE-Varianten zumindest teilweise nachgewiesen werden. Dies und die Verwendbarkeit für die Echtzeitfluoreszenzdetektion in lebenden Zellen und Geweben eingesetzt werden, sind deutliche Vorteile gegenüber der Claudindetektion mit Antikörpern.

5.3.3 Die Lokalisation der Claudine ändert sich Verlauf der Differenzierung von HT-29/B6-Zellen

Die unter Abschnitt 5.3.2 genannten Eigenschaften ermöglichten zudem die Analyse der Zeitabhängigkeit der Zugänglichkeit von Claudinen auf der Zelloberfläche subkonfluenter HT-29/B6-Zellen. Durch den Vergleich der YFP-cCPE-Bindung an unterschiedlich stark differenzierter HT-29/B6-Zellen wurde deutlich, dass sich die Lokalisation der Rezeptorclaudine im Verlauf der Differenzierung ändert. In den undifferenzierten Zellen zeigte eine starke Bindung von YFP-cCPE-SSS in der apikalen Zellmembran, dass viele extrajunktionale Claudine in diesem Membrankompartiment vorliegen müssen (Abb. 17 C). Hingegen war in den stärker ausdifferenzierten Zellen die Bindung von YFP-cCPE-SSS in der apikalen Plasmamembran deutlich geringer (Abb. 17 F). Daraus lässt sich schließen, dass in den ausdifferenzierten Zellen die meisten Claudine junctional bzw. basolateral unterhalb der intakten TJ vorliegen. Diese Claudine stehen nicht mehr als Rezeptoren für cCPE zur Verfügung. Noch deutlicher wird dieser Befund, wenn man diese Daten mit der cCPE-Bindung in vollständig differenzierten HT-29/B6-Zellen, die auf Zellkulturfilern kultiviert wurden und daher eine deutliche Polarisierung aufweisen, vergleicht. Apikal appliziertes cCPE konnte in diesen Zellen nur bei einer kleinen Population, in der die Claudine in der apikalen Membran vorlagen, binden. In der basolateralen Membran differenzierter Zellen war die cCPE-Bindung nicht unterhalb der intakten TJ-Barriere in der basolateralen Membran zu detektieren. Hingegen wurde eine deutliche cCPE-Bindung nach basaler Gabe detektiert, was zeigt, dass extrajunktionale Claudine in der basolateralen Membran zwar vorliegen, aber nicht als cCPE-Rezeptoren nach apikaler Applikation dienen (Eichner, Augustin, *et al.* 2017).

5.3.4 cCPE bindet nicht an junctionale Claudine

Bisher herrscht Unstimmigkeit darüber, ob cCPE nur an extrajunktionale Claudine bindet (Krause, Protze, and Piontek 2015) oder ob auch Claudine in TJ-Strängen als Rezeptoren dienen können (Vecchio and Stroud 2019). Die Kofärbungen mit den TJ-Proteinen ZO1 und Cldn4 zeigten, dass cCPE nur an Bereiche der Zellen gebunden hat, an denen durch das ZO1-Signal keine ausdifferenzierte TJ angezeigt wurde. Hingegen wurde in Bereichen mit deutlicher ZO1-Anreicherung an den Zell-Zell-Kontakten, wie sie für funktionelle TJ erwartet werden, keine Kolo-kalisation mit cCPE beobachtet. (Abb. 15, Abb. 16 G – I). Dies deutet darauf hin, dass cCPE nicht oder nur zu einem geringen Grad an junctionale Claudine bindet. In Verbindung mit einer über CellMask™ detektierten Diffusionsbarriere (Abb. 17) konnte bestätigt werden, dass YFP-cCPE-SSS hauptsächlich an extrajunktionale Claudine bindet. Apikal appliziertes YFP-cCPE-SSS zeigte eine deutliche Bindung in der gesamten Plasmamembran von Zellen mit einer weniger dichten parazellulären Barriere (Abb. 17 A – C).

Hingegen wurde keine Bindung hinter der intakten TJ-Barriere, welche in stärker differenzierten Zellen die Diffusion von CellMask™ in die basolaterale Membran und in das Innere des Zellverbandes stoppte, detektiert (Abb. 17 D – F). Würde YFP-cCPE-SSS auch an junctionale Claudine binden, so wäre zum einen die parazelluläre Diffusionsbarriere für CellMask™ gestört gewesen und zum anderen hätte die YFP-cCPE-Bindung auch im Inneren der Zellgruppe detektiert werden müssen. Die gewonnenen Daten liefern deutliche Hinweise dafür, dass eine parazelluläre TJ-Barriere auch in Anwesenheit claudinbindender cCPE-Varianten zumindest für einige Zeit (z.B. 1 h in subkonfluenten HT-29/B6-Zellen) aufrechterhalten wird. cCPE kann die parazelluläre Barriere während dieser Zeit nicht überwinden und bindet nur an extrajunktional lokalisierte Claudine.

5.3.5 Fluorophor-markierte cCPE-Varianten zur Detektion (prä)maligner Kolonläsionen

Die mögliche cCPE-Bindung an prä-maligne Kolonläsionen wurde mithilfe von zwei Modellen getestet. In einem *in vitro*-Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Amasheh *et al.* 2009) wurde zunächst versucht, die Claudineregulierung in einem weitgehend intakten Kolonepithel, wie es bei einem milden Verlauf chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen oder auch in einem sehr frühen Stadium der Kolonkarzinomentstehung der Fall sein könnte, zu simulieren (Abb. 18). Sowohl die Messung des TER als auch die mikroskopische Gewebearchitektur und das ZO1-Signal zeigten keine Veränderung durch die Zytokinbehandlung. Ein Effekt durch die Zytokine konnte somit nicht reproduziert werden. Im Kolonepithel gab es jedoch einige lokal begrenzte Bereiche, welche durch ein delokalisiertes/nicht junctionales ZO1-Signal gekennzeichnet waren. In diesen Bereichen sollten auch Claudine vermehrt extrajunktional auf der Oberfläche der Enterozyten vorliegen, wo sie als Rezeptoren für claudinbindende cCPE-Varianten zur Verfügung stehen könnten. Dafür spricht auch, dass in diesen Bereichen eine spezifische Bindung und Detektion von Alexa Fluor 647-gekoppeltem cCPE-SSS nachgewiesen werden konnte. Ergebnisse aus früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass auch intaktes Kolonepithel gegenüber CPE lokal begrenzt sensitiv ist (Eichner, Augustin, *et al.* 2017), konnten somit untermauert werden. Außerdem wurden klinisch unauffällige, humane Kolonpolypen, die zuvor im Rahmen von routinemäßig durchgeführten Koloskopien entfernt worden waren, *ex vivo* mit GST-cCPE inkubiert. Da in diesem Fall das Material stark begrenzt war und zu Beginn des Projektes die Behandlung mit Fluorophor-markiertem cCPE noch nicht etabliert war, wurden diese Proben mit unmarkiertem GST-cCPE behandelt und anschließend über eine Immunfluoreszenzfärbung analysiert (Abb. 19). Somit konnte zeitgleich auch die Integrität des Epithels über eine Färbung des TJ-Markers ZO1 analysiert werden. Aufgrund der geringen Größe der Proben war dies über TER-Messungen nicht möglich. Die Bindung von cCPE-SSS

an die kolorektalen Polypen war dabei spezifisch und auf delokalisierte, extrajunktionale Claudine beschränkt.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das Ausmaß der cCPE-Bindung an prämaligen Kolonläsionen im Vergleich zu gesundem Gewebe, aber auch zu weiter fortgeschrittenen Neoplasien einordnen zu können. Ein limitierender Faktor war hierbei bisher die Verfügbarkeit von Polypenbiopsien und adäquaten Kontrollen. Entsprechend der Hypothese, dass die Claudineregulierung und -delokalisation im Verlauf der Kanzerogenese zunimmt, sollte die cCPE-Bindung in gesundem Gewebe geringer, in fortgeschrittenen Adenomen/Karzinomen hingegen größer sein (Abb. 24). Von großem Interesse wären aufgrund des hohen Malignitätsrisikos und der bisher schlechten Detektierbarkeit insbesondere Biopsien, bei denen der Verdacht auf ein sessiles, serratiertes Adenom besteht.

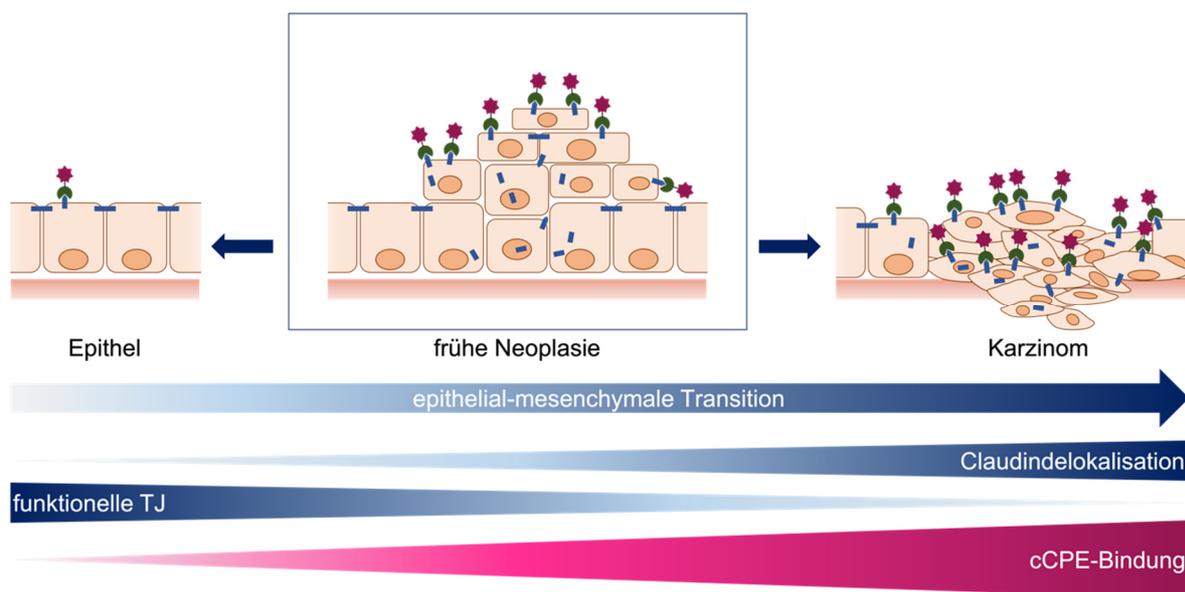


Abbildung 24 Einsatz von cCPE-basierten molekularen Sonden zur Claudindetektion im Rahmen der Karzinogenese Claudin-überexprimierender Tumoren. Im Verlauf der Karzinogenese werden aus Epithelzellen unpolarierte Zellen mit mesenchyalem Phänotyp (epithelial-mesenchymale Transition). Dies geht mit einem Verlust funktioneller TJ und einer Delokalisation der Claudine einher. In der Plasmamembran der Tumorzellen können vermehrt extrajunktionale Claudine vorliegen, welche als Rezeptoren für cCPE dienen können. In humanen kolorektalen Polypen konnte nach *ex vivo*-Inkubation mit cCPE-S305P/S307R/S313H eine spezifische, claudinabhängige Bindung gezeigt werden. In gesundem Gewebe sollten weniger, in fortgeschrittenen Karzinomen hingegen mehr extrajunktionale Claudine als Rezeptoren für cCPE zur Verfügung stehen. Diese könnte bei Verwendung von Fluorophor-markiertem cCPE in Echtzeit visualisiert werden.

Die derzeitigen Methoden zur Detektion von kolorektalen (prä-)malignen Läsionen lassen sich in nicht-invasive und invasive Untersuchungen unterteilen. Zu den nicht-invasiven Methoden zählen neben radiologischen Untersuchungen auch Analysen des Bluts und Stuhls. Bei letzterem werden die Proben auf Blut und Zellfragmente von vaskularisierten Polypen, Adenomen und Karzinomen analysiert. Die entsprechenden Laboranalysen können vergleichsweise kostengünstig durchgeführt werden. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass besonders die frühen Neoplasien kontinuierlich bluten. Zudem kann das Blut im Stuhl auch andere pathologische (entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes,

Einnahme von Aspirin oder nichtsteroidaler Antirheumatika) und nicht-pathologische (z.B. Verzehr von rotem Fleisch) haben, sodass die Analyse der Stuhlproben leicht verfälscht werden kann (Carroll, Seaman, and Halloran 2014). Die radiologischen Untersuchungen beinhalten die Kapselendoskopie, bei der eine kleine Kapsel mit einer Kamera und einem Sender geschluckt wird und anschließend Aufnahmen des Gastrointestinaltrakts macht, und die Computertomographie-Koloskopie, die über Röntgenaufnahmen vor allem größere Polypen und Karzinome visualisiert und identifiziert (Plumb *et al.* 2014, Hassan *et al.* 2008). Ein Nachteil aller nicht-invasiven Methoden besteht darin, dass sie zwar positive Befunde liefern können, die Läsionen aber anschließend dennoch in invasiven Eingriffen behandelt werden müssen. Zu den invasiven Untersuchungen zählen die Sigmoidoskopie und die Koloskopie. Neben der direkten Visualisierung und Detektion möglicher Neoplasien bieten diese Eingriffe den Vorteil, dass Biopsien für eine genauere pathologische Beurteilung abgenommen werden können. Generell gilt die Koloskopie als die zuverlässigste Methode zur Detektion von kolorektalen Läsionen (Brenner, Altenhofen, and Hoffmeister 2010).

Im Rahmen einer Weißlichtendoskopie werden Kolonläsionen bzw. Läsionen in weiteren Teilen des Gastrointestinaltrakts auf Grundlage struktureller und makroskopisch sichtbarer Veränderungen detektiert. Jedoch sind im Kolon vor allem flache und sessile Läsionen schwer zu detektieren und werden daher eher übersehen (Wang *et al.* 2020). Man geht davon aus, dass solche flachen Adenome bis zu 35% aller prämaligen Läsionen ausmachen und daher ein vermeidbares Krebsrisiko darstellen, wenn sie rechtzeitig entdeckt werden (Rembacken *et al.* 2000, le Clercq *et al.* 2014).

Einen alternativen Ansatz zur konventionellen Weißlichtendoskopie stellt die Echtzeitfluoreszenzendoskopie dar, bei der fluoreszierende Liganden an Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche binden und Strukturen so über ein erhöhtes Fluoreszenzsignal hervorheben (Rabinsky *et al.* 2016). In prämaligen Läsionen werden Tumormarker oft schon überexprimiert, bevor morphologische Veränderungen erkennbar sind (Wang *et al.* 2020). Zu diesen Markerproteinen zählen u.a. Claudine, welche sich aufgrund ihrer extrazellulären Domänen gut als Rezeptoren für fluoreszierende Liganden eignen. Für verschiedene Tumoren, welche routinemäßig endoskopisch detektiert werden, wurde bereits eine Überexpression relevanter Claudine beschrieben. So sind in Magenkarzinomen oftmals Cldn1, -3, -4, -5 und -7 überexprimiert (Johnson *et al.* 2005, Resnick *et al.* 2005, Cunningham *et al.* 2006, Yang, Sun, and Meng 2018), während in kolorektalen Karzinomen vor allem eine Überexpression von Cldn1, -3 und -4 beobachtet wurde (de Oliveira *et al.* 2005, Dhawan *et al.* 2005).

In den durchgeführten *in vitro*- und *ex vivo*-Versuchen konnte eine spezifische Claudinbindung von cCPE-SSS und deren Detektion gezeigt werden. Somit wäre cCPE-SSS ein geeignetes Targetingmodul für eine cCPE-basierte molekulare Sonde für die Fluoreszenzendoskopie,

welche gerichtet an einen möglichen Biomarker der (prä)kanzerösen Läsionen binden würde. In einer vorgehenden Studie wurde ein ähnlicher Ansatz verfolgt, indem überexprimiertes Cldn1 in Kolonläsionen über ein für Cldn1-spezifisches, Fluorophor-gekoppeltes Peptid in einer Echtzeit-Fluoreszenzendoskopie visualisiert wurde (Rabinsky *et al.* 2016). Allerdings war das Signal-Hintergrund-Verhältnis bei Verwendung dieses Peptids verbesserungswürdig und es konnte nur Cldn1 detektiert werden, wohingegen mit cCPE-SSS ein Ligand zur Verfügung steht, der an ein breites Claudinspektrum, nämlich Cldn1 – 9, bindet. Dieser könnte Kolonläsionen bzw. gastrointestinale Läsionen im Allgemeinen schon frühzeitig markieren, ohne dass das genaue Claudinexpressionsmuster bekannt sein muss.

Ein Nachteil der Fluoreszenzendoskopie besteht allerdings darin, dass das gemessene Signal der Sonde meist mit der Autofluoreszenz des Gewebes gemischt ist. Dieses Problem könnte durch die Anwendung von Fluoreszenzlebenszeitmessungen oder die Auswertung multispektraler Bilddaten verbessert werden. Beide Ansätze sind jedoch sehr teuer (Bae *et al.* 2019). Ein gerichtetes Kontrastmittel für die klinische Anwendung bei der Fluoreszenzendoskopie ist bisher noch nicht zugelassen. Neben dem hohen Kostenaufwand muss dabei auch sichergestellt werden, dass die molekulare Sonde auch verträglich ist. Bisher wird neben Fluorophor-markierten Antikörpern zur Tumordetektion auch an dem Tracermolekülen geforscht, die nur in einer Tumorumgebung fluoreszieren. Dazu zählen beispielsweise γ -Glutamylhydroxymethylrhodamingrün, das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase auf der Oberfläche von Tumorzellen zu einem aktiven Fluorophor gespalten wird (Mitsunaga *et al.* 2013), und das sogenannte BMV109, das durch die enzymatische Spaltung von Cathepsin H, das als Modulatoren der Extrazellulärmatrix in die Tumorumgebung sekretiert wird, aktiviert wird (Verdoes *et al.* 2013).

Auch wenn die Fluoreszenzendoskopie bisher noch nicht in größerem Umfang eingesetzt wird, so zeigen diese Arbeiten doch, dass sie eine aussichtsreiche Ergänzung zur Weißlichtendoskopie darstellt, welche besonders die Detektion früher und flacher Neoplasien verbessern könnte. Fluorophorgekoppeltes cCPE ist dabei eine weitere molekulare Sonde, für die gezeigt wurde, dass durch sie relevante Tumormarker detektiert werden können.

5.3.6 Charakterisierung von Magenkarzinomorganoiden mittels YFP-cCPE

Als weiteres Modell für Karzinome, bei denen eine Claudinüberexpression beschrieben ist, wurden Magenkarzinome bzw. aus ihnen abgeleitete Organoide verwendet.

Die Organoidkulturen wurden aus primären Magenkarzinomzellen von Tumorpatienten abgeleitet. Sowohl durch morphologische Untersuchungen als auch durch Immunfluoreszenzfärbung spezifischer Tumormarker wie p53, *Cancer Antigen 72* und dem carcinoembryonalen Antigen konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Organoide aus den jeweiligen Primärtumoren abgeleitet worden waren. Weiterhin konnte über Färbung des

Antigens Ki-67 die proliferative Aktivität in den Organoidkulturen nachgewiesen werden. (Ehlen *et al.*, Patient-derived organoids recapitulate individual properties of gastric and gastroesophageal junction cancer *in vitro*). Da in einem primären Karzinom jedoch eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, wie unterschiedlich dedifferenzierter Epithelzellen, aber auch Fibroblasten, vorliegen, sind die kultivierten Organoide entsprechend heterogen. So wurden neben Organoiden mit deutlichem Lumen auch solche beobachtet, welche eher wie ein unorganisiertes Zellaggregat aussahen. Für die initiale Analyse wurden vor allem lumenbildende Organoide gewählt, da auf ihnen eine stärkere Bindung von YFP-cCPE-SSS detektiert wurde (Abb. 20).

Die kultivierten Organoide stammen aus zwei unterschiedlichen Magenkarzinomentitäten. Während in dem primären Tumor von Patient 1, einem diffusen Magenadenokarzinom, Cldn1 und Cldn4 sowohl an Zell-Zell-Kontakten als auch intrazellulär vorliegen, liegen im Karzinom von Patient 2, einem muzinösen Magenadenokarzinom, diese beiden Claudine fast nur an Zell-Zell-Kontakten vor (Abb. 20 A, B). Die Claudinlokalisierung spiegelt daher teilweise auch jene Dedifferenzierung wider, die in den Karzinomen beobachtet wurde. In beiden Organoidkulturen gab es jedoch Organoide unterschiedlichster Morphologie. Dies war ein Grund dafür, dass anhand der Tumorklassifizierung noch keine Aussage über den Differenzierungsgrad der heterogenen Organoidkulturen getroffen werden konnten.

In der Lebendzell-Mikroskopie konnte die spezifische Bindung von YFP-cCPE-SSS an die Oberfläche der Magenkarzinomorganoide eindeutig detektiert werden (Abb. 20 C – F). Dies war zum einen ein erster Anhaltspunkt dafür, dass extrajunktionale Claudine auf der Oberfläche der Organoide vorliegen; andererseits untermauert es noch einmal die mögliche Anwendbarkeit von YFP-cCPE zur Detektion delokalisierter Claudine im Rahmen bildgebender Verfahren zur Tumordiagnostik.

In den lumenbildenden Organoiden wurden Cldn1 und -4 besonders in der basolateralen Membran und an Zell-Zell-Kontakten, jedoch nicht in der apikalen Membran detektiert (Abb. 20 G – J). Dies deutet auf eine ausgeprägte Zellpolarität, wie sie für Epithelzellen charakteristisch ist, hin. Gleichzeitig ist dies ein Hinweis auf das Vorhandensein intakter TJ im apikalen Bereich der lateralen Membran, die ein unkontrolliertes Diffundieren von Claudinen in der Plasmamembran verhindern. Weiterhin ist auch die Ausbildung eines Lumens in Organoiden zumindest teilweise von der TJ-vermittelten Regulierung der Permeabilität gegenüber verschiedenen Soluten abhängig (Bardenbacher *et al.* 2019).

Es ist zu beachten, dass YFP-cCPE-SSS von außen und somit der basalen Seite der Organoide zugegeben wurde. Auch bei ausdifferenzierten, polaren intestinalen Epithelzellen wurde eine wesentlich stärkere Bindung des GST-cCPE nach basaler als nach apikaler Zugabe nachgewiesen (Eichner, Augustin, *et al.* 2017). Daher ist noch unklar, ob die

Rezeptorclaudine in den Tumororganoiden im Zuge einer Dedifferenzierung in einem stärkeren Maße basolateral extrajunktional vorliegen.

Desweiteren weisen die intrazellulär detektierten Claudine auf eine Dedifferenzierung der Epithelzellen hin. Das Ausmaß der Dedifferenzierung könnte durch zukünftige, detaillierte Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und TJ-Integration verschiedener Claudine in Magenkarzinom-Organoiden mittels cCPE-Behandlung und Immunfärbungen analysiert werden. So könnten extrajunktionale Claudine weiterhin über YFP-cCPE-SSS visualisiert werden, während eine intakte TJ-Barriere als Diffusionsbarriere für einen niedermolekularen Marker (bspw. CellMask™ oder Fluorescein, Vgl. Abschnitt 4.3.1) erkennbar wäre. Wichtig wäre außerdem, die Organoidkulturen aus Tumoren mit denen aus gesundem, gastrointestinalem Gewebe zu vergleichen und zu testen, inwiefern die cCPE-Bindung, Claudin-Verteilung und TJ-Barriere mit der morphologischen Heterogenität der Organoide und weiterer Marker der EMT korreliert.

Sowohl über die morphologischen Analysen als auch über die Immunfluoreszenzfärbung von Tumormarkern und Claudinen konnte gezeigt werden, dass die kultivierten Organoide gute *in vitro*-Modelle der Magenkarzinome darstellen, welche die spezifischen Eigenschaften der primären Tumoren zuverlässig reflektieren. Somit stellen sie ein geeignetes *in vitro*-System dar, in denen Antikrebsmedikamente mit einem hohen Durchsatz patientenindividuell getestet werden können und mit dessen Hilfe nach der zell- und molekularbiologischen Charakterisierung personalisierte Behandlungsstrategien für die weitere Therapie der Tumoren ausgewählt werden können, wie es bereits für weitere Organoidkulturen beschrieben worden ist (Vlachogiannis *et al.* 2018, Steele *et al.* 2019, Li *et al.* 2018, Li *et al.* 2019).

Mit YFP-cCPE-SSS steht ein Molekül zur Verfügung, dass die im Rahmen der Karzinogenese delokalisierten Claudine nicht nur im Rahmen einer Gastroskopie visualisieren könnte, sondern über dessen Bindung sich auch Hinweise über den Verlauf der Erkrankung ergeben könnten. So wurde beschrieben, dass die Expression von Cldn6, einem weiteren Rezeptor von cCPE-SSS, mit einer schlechteren Prognose des Krankheitsverlaufes korreliert (Kohmoto *et al.* 2020). Eine Überexpression von Cldn4 ist hingegen eher mit einer positiven Prognose für den Patienten assoziiert (Kwon *et al.* 2011). Weiterhin könnte über die *ex vivo*-Bindung von YFP-cCPE-Proteinen die Expression und Lokalisation der Claudine auch im nativen Gewebe analysiert werden, wie es bereits für Pankreaskarzinommodelle beschrieben worden ist (Torres *et al.* 2018). Ein besseres Verständnis der Rolle der Claudine in der Progression von Magenkarzinomen könnte so die Wahl der bestmöglichen Therapie für den Patienten beeinflussen. Wie die Ergebnisse zeigen, sollte hierbei nicht nur das Expressionsniveau, sondern auch die subzelluläre Lokalisation der Claudine miteinbezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte in mehreren *proof-of-principle*-Ansätzen gezeigt werden, dass cCPE-SSS bereits in frühen Stadien der Karzinomentwicklung spezifisch an die

extrajunktionalen Claudine auf der Oberfläche verschiedener Modellsysteme für die Karzinogenese bindet und diese Bindung zuverlässig detektiert werden kann. Die Detektion der Überexpression von Claudinen auf der Oberfläche von Karzinomen wurde auch schon in früheren Studien angewendet. So konnte überexprimiertes Cldn4 in Pankreaskarzinomen sowohl mittels Cy5.5-gekoppeltem GST-cCPEwt (Neesse *et al.* 2013) als auch über einen radioaktiv-markierten monoklonalen anti-Cldn4-Antikörper (Torres *et al.* 2018) zur spezifischen Detektion von (prä)kanzerösen Läsionen des Pankreas eingesetzt werden. In einem weiteren Ansatz konnte zudem gezeigt werden, dass eine cCPE-basierter molekulare Sonde für die Magnetresonanztomographie spezifisch an Cldn4-exprimierende HEK-293-Zellen bindet und detektiert werden kann (Piontek *et al.* 2017). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass überexprimierte Claudine nicht nur relevante Wirkstofftargets auf der Oberfläche von Karzinomzellen sind, sondern ihre Expression auch im Rahmen diagnostischer Verfahren durch die Bindung cCPE-basierter Biologika visualisiert werden können.

5.4 Modulierung der epidermalen Barriere durch cCPE-Varianten

Lange Zeit wurde ein funktioneller Beitrag der TJ zur transepidermalen Barriere angezweifelt. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten wurde gezeigt, dass intakte TJ für das Aufrechterhalten der transepidermalen Barriere entscheidend sind (Furuse *et al.* 2002). Mithilfe einer neuen impedanzspektroskopischen Methode, die von R. Mannweiler am Institut für Klinische Physiologie entwickelt wurde, ist es erstmals möglich, den Gesamtwiderstand eines Epidermismodells auf den Beitrag des *Stratum corneums* (SC) und der lebenden Zellen, also der TJ im *Stratum granulosum* (SG), aufzuteilen (Mannweiler *et al.*, Direct assessment of individual skin barrier components by electrical impedance spectroscopy. z. Zt. in Revision). In der RHE werden relevante TJ-Proteine exprimiert und intakte TJ ausgebildet (Abb. 21, Abb. 22). In einem ersten Schritt konnte mittels Messung des TER und der Lucifer Yellow Permeabilität im RHE-Modell gezeigt werden, dass cCPE-Varianten die Hautbarriere öffnen können (Beier *et al.* 2019). In einem zweiten Schritt zeigten impedanzspektroskopische Messungen, dass gezielt die TJ-Barriere durch die claudinbinden Varianten cCPEwt und -SSS geöffnet werden kann, ohne dabei die Barriere, die durch das SC gebildet wird, zu beeinflussen (s. Anhang, Abb. 33 A - D). In den TJ der RHE liegen hauptsächlich Cldn1 und -4 vor. In Knockdown-Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einfluss von Cldn1 auf den transepidermalen Widerstand deutlich größer ist als der von Cldn4 (s. Anhang, Abb. 33 E). Nichtsdestotrotz spricht die charakteristische Koexpression von Cldn1 und Cldn4 in der TJ-ausbildenden Zellschicht der Haut, dem SG, dafür, dass Cldn4 die Ausbildung funktioneller TJs unterstützt.

Anders als erwartet hatte cCPEwt einen ähnlich starken Effekt auf die epidermale Barriere wie cCPE-SSS, obwohl es eine geringe Affinität für Cldn1 besitzt (s. Anhang, Abb. 33 A). Mithilfe

von Knockdown-Experimenten sollte untersucht werden, ob der Einfluss von cCPEwt und -SSS auf die TJ in der RHE weiter differenziert werden kann. Durch den Verlust von Cldn1 in den TJ der RHE wurde die parazelluläre epidermale Barriere so gestört, dass keine der cCPE-Varianten mehr einen messbaren Einfluss hatten. Hingegen konnte in den RHE-Modellen, in denen Cldn4 herunterreguliert war, eine dichtere TJ-Barriere aufrechterhalten werden. Obwohl in diesem Modell keine cCPEwt-Rezeptorclaudine mehr zu dieser Barriere beitragen konnten, wurde sie durch cCPEwt deutlich geöffnet (s. Anhang, Abb. 33 B - D).

Die sehr hohe eingesetzte Konzentration von 50 µg/ml cCPE und die lange Inkubationszeit der RHE mit diesem könnten jedoch dazu führen, dass die Bindung von cCPEwt ausreicht, um genug Cldn1 zur Schwächung der epidermalen Barriere zu binden. cCPEwt schwächte die Barriere in nativer RHE tendenziell stärker als cCPE-SSS. Dies könnte damit zusammenhängen, dass cCPE-SSS durch seine im Vergleich zu cCPEwt höhere Affinität für Cldn1 kompetitionsbedingt etwas weniger Cldn4 blockiert und somit das Zusammenwirken von Cldn1 und -4 bei der TJ-Barriere weniger effektiv hemmt (Abb. 25). Diese Interpretation wird durch den Befund gestützt, dass cCPE-SSS in dem RHE-Modell, in dem die Cldn4-Menge durch Knockdown stark reduziert und die Barriere somit fast ausschließlich durch Cldn1 gebildet wurde, entsprechend seiner höheren Affinität zu Cldn1 einen etwas stärkeren Einfluss auf die Barriere als cCPEwt hatte (Abb. 33 C).

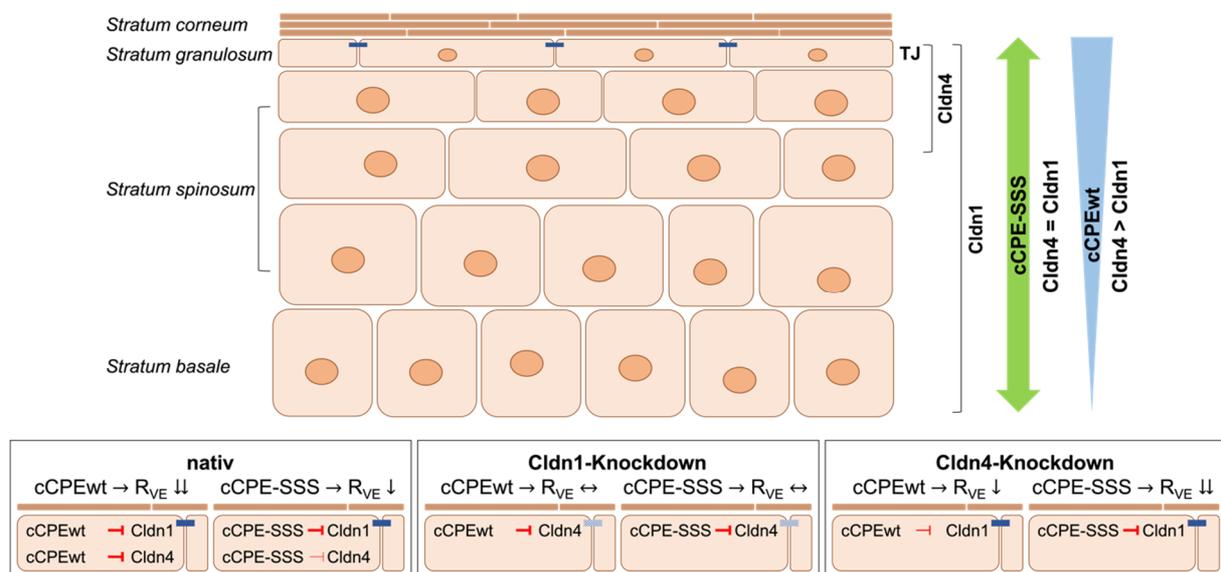


Abbildung 25 In vitro-Modulierung der epidermalen TJ-Barriere durch cCPEwt und -SSS. Modelle rekonstituierter humaner Epidermis sind mehrschichtige Modelle, deren Zellschichten spezifischen Schichten der Epidermis entsprechen. TJ befinden sich zwischen obersten lebenden Zellen. TJ der Epidermis enthalten hauptsächlich Cldn1 und -4. Cldn1 wird in allen Schichten der RHE exprimiert, Cldn4 nur in oberen Schichten (SG). cCPE-SSS bindet mit hoher Affinität an Cldn1 und -4, für cCPEwt ist Affinität für Cldn4 deutlich größer als für Cldn1. In nativer RHE wird parazelluläre Barriere stärker durch cCPEwt als durch cCPE-SSS geschwächt. Bei hohen eingesetzten Konzentrationen bindet cCPEwt sowohl an Cldn4 als auch an Cldn1. Kompetitionsbedingt blockiert cCPE-SSS Cldn1 jedoch stärker als Cldn4, sodass TJ-Barriere weniger effektiv beeinflusst wird. Durch Cldn1-Knockdown wird Ausbildung einer dichten parazellulären Barriere verhindert. Dies überlagert möglichen Effekt, den Blockierung von Cldn4 haben könnte. In Cldn4-Knockdown-Modellen kann dichte TJ-Barriere ausgebildet werden. Da cCPE-SSS mit höherer Affinität an Cldn1 bindet als cCPEwt, kann es die parazelluläre Barriere stärker öffnen.

In vorhergehenden Studien konnte die Lucifer Yellow Permeabilität von humanen Epidermismodellen auch durch die Inkubation mit 10 und 50 µg/ml cCPEwt über einen langen Zeitraum von vier Tagen erhöht werden (Yuki *et al.* 2013). In den RHE-Modellen wurde der Einfluss von cCPE-Varianten auf die epidermale Barriere auch über den TER und die Permeabilität für Lucifer Yellow gemessen. Hierbei wurde die Barriere gegen Lucifer Yellow durch cCPE-SSS stärker geschwächt als durch cCPEwt (Beier *et al.* 2019). Die Befunde deuten darauf hin, dass sich Cldn1 und Cldn4 in ihrem Beitrag zu einer Barriere gegen kleine Ionen und einer Barriere gegen etwas größere Solute unterscheiden könnten.

Auch die Immunfluoreszenzfärbungen von cCPE-behandelter RHE zeigen keine deutlichen Unterschiede zwischen der Bindung von cCPEwt und -SSS. Obwohl Cldn4, der klassische Rezeptor für cCPEwt, nur in den oberen Schichten des SG lokalisiert ist, bindet cCPEwt, wie auch cCPE-SSS, in allen Schichten der RHE und kolokalisiert mit Cldn1 (Abb. 22).

Zusammen deuten die Ergebnisse daraufhin, dass cCPEwt unter den gegebenen Bedingungen tatsächlich in ausreichender Weise an Cldn1 in der RHE binden konnte, um die TJ-Barriere zu beeinträchtigen.

Um die Eignung von cCPE-Varianten für die Modulierung der epidermalen Barriere besser abschätzen zu können, sind zunächst weitere Versuche notwendig. So sollten geringere Konzentrationen von cCPE sowie kürzere Inkubationszeiten getestet werden, um die höhere Affinität von cCPE-SSS an Cldn1 besser nutzen zu können. Dieses sollte schneller oder in geringeren Konzentrationen als cCPEwt die epidermalen TJ öffnen können. Die TJ-Integrität könnte zusätzlich zur Impedanzmessung auch über Fluoreszein- und Biotinpermeabilitätsmessungen beurteilt werden. So wird durch die Impedanzmessung zwar die Barriere für Ionen, nicht aber für kleine Moleküle gemessen. Bei diesen könnte sich durchaus noch ein Unterschied zwischen den eingesetzten cCPE-Varianten ergeben. Die Varianten cCPE-SRSH und cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A, welche preferenziell an Cldn1 bzw. Cldn4 binden, könnten zudem neue Erkenntnisse über den Beitrag der einzelnen Claudine zur TJ-Barriere in der Epidermis liefern. Weiterhin sollte auch die Reversibilität der Öffnung der transepidermalen Barriere getestet werden. Dies ließe sich mit wenig Aufwand durch eine anschließende Inkubation in cCPE-freiem Medium und entsprechende Impedanzmessungen realisieren.

In der Summe konnte gezeigt werden, dass durch cCPE-Varianten die TJ-Barriere in Epidermismodellen gezielt ohne Beeinflussung des SC moduliert werden kann. Ein deutlicher Beitrag der TJs, die vor allem durch Cldn1 und in geringerem Maße von Cldn4 gebildet werden, zur Hautbarriere konnte untermauert werden.

5.5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten cCPE- und CPE-basierter Biologika für die Diagnose und Therapie Claudin-überexprimierender Tumoren sowie zur Modulation der epidermalen Barriere untersucht.

Claudin-cCPE-Komplexe wurden zunächst mittels bioinformatischer Methoden auf struktureller Ebene analysiert. Auf diese Weise konnten nicht nur die experimentell gemessenen Daten zur Bindung von cCPE-SRSH an Cldn1 – 7 auch mechanistisch untermauert werden, sondern es wurden auch konkrete Hinweise auf eine Flexibilität der Claudinkonformation gefunden, die durch Interaktionen mit claudinbindenden cCPE-Proteinen beeinflusst werden könnte (Absatz 4.1).

Claudine, die auf der Oberfläche von Karzinomen oder präkanzerösen Läsionen überexprimiert werden, sind geeignete Wirkstoffziele für neuartige Tumorthérapien. In dieser Arbeit konnte der deutliche Vorteil der Variante CPE-SRSH gegenüber CPE_{wt} bei der Eliminierung von Karzinomen, die hauptsächlich Cldn1 exprimieren, in *in vitro*-Modellen für Bronchial- und Schilddrüsenkarzinome hervorgehoben werden (Abschnitt 4.2).

Claudine können nicht nur für die Tumorbehandlung, sondern auch für die Tumordiagnose eingesetzt werden. Nicht-toxisches cCPE kann dabei als Targetingmodul für cCPE-basierte molekulare Biosonden dienen (Abschnitt 4.3). Der Fokus dieser Arbeit lag dabei auf Sonden für fluoreszenzendoskopische Methoden. So konnten mit zwei verschiedenen Ansätzen neue Fluorophor-markierte cCPE-Proteine entwickelt werden. Diese besitzen dieselben Claudinbindungseigenschaften wie unmarkiertes GST-cCPE. Ihr entscheidender Vorteil liegt in dem Einsatz bei der Lebendanalyse von Claudin-exprimierenden Modellen (Abschnitte 4.3.1, 4.3.5). Zudem ist für die Claudindetektion mit Fluorophor-markierten cCPE-Proteinen keine weitere Antikörperfärbung notwendig. Dies erhöhte die Sensitivität der Claudindetektion deutlich, da auch schwerer zugängliche, extrajunktionale Claudine in der Plasmamembran detektiert werden können (Abschnitt 4.3.1).

Die Bindung von cCPE an delokalisierte Claudine wurde in verschiedenen, relevanten Modellen der Kanzerogenese gezeigt. So wurden einerseits die Claudindelokalisation im Rahmen der Entstehung von kolorektalen Karzinomen über cCPE-Bindung detektiert (Abschnitte 4.3.2, 4.3.3) und andererseits die Bindung von YFP-cCPE für die Charakterisierung eines neuartigen Magenkarzinomorganoidmodells (Abschnitte 4.3.5, 4.3.6) verwendet. In allen Modellen war die Bindung von cCPE-SSS spezifisch und besaß ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von cCPE-Varianten auf die epidermale Barriere untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die claudinbindenden Varianten cCPE_{wt} und cCPE-SSS spezifisch an die Claudine in der Epidermis binden und somit die TJ-Barriere öffnen, aber keinen Einfluss auf weitere Barrierekomponenten in der Epidermis haben.

Weiterhin konnte der jeweilige Beitrag von Cldn1 und -4 zur epidermalen Barriere erstmals differenziert und unabhängig von der Barriere des SC betrachtet werden (Abschnitt 4.4).

Diese dargestellten Ergebnisse sprechen für die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von CPE und cCPE. Durch weitere Anpassung der Bindungseigenschaften von CPE an die Claudinexpressionsmuster bestimmter Karzinome können diese gezielt eliminiert werden, während die Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe durch Reduzierung der Immunogenität und gezielte Applikation möglichst geringgehalten werden.

Die Anwendung von Fluorophor-markierten cCPE-Proteinen in der Tumordiagnose ist ebenfalls vielversprechend. Im Rahmen weiterer Experimente sollte hier unbedingt die Bindung und Detektion von Fluorophor-markiertem cCPE *ex vivo* in humanen Proben lebend und fixiert untersucht werden. Weiterhin ist es notwendig, auch die Bindung in gesundem Kontrollgewebe zu analysieren. Diese sollte möglichst gering sein, um (prä)kanzeröse Läsionen zuverlässig detektieren zu können. Ein weiterer Schritt für die Etablierung einer cCPE-basierten molekularen Biosonde ist die *in vivo*-Analyse. Hier könnten ein beispielsweise Vergleich von Weißlicht- und Fluoreszenzendoskopie in einem geeigneten Modellorganismus wie *CPC;Apc* Mäusen, die spontan flache und gestielte Kolonläsionen bilden (Hinoi *et al.* 2007), angestrebt werden.

Mithilfe von YFP-cCPE können auch die Magenkarzinomorganoide ausführlicher charakterisiert werden. Beispielsweise ließe sich über Diffusionsmarker die funktionelle TJ-Barriere visuell darstellen. Durch Behandlung mit zytotoxischem CPE könnten gezielt Claudin-exprimierende Zellen in den Organoiden eliminiert, um deren Beitrag zur proliferierenden Zellpopulation der Organoiden genauer zu analysieren. Durch ein besseres Verständnis der Organoideneigenschaften ließen sich evtl. Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Primärtumors ziehen. Diese könnten für die Tumorthherapie von entscheidendem Vorteil sein.

Neben der epidermalen Barriere ist auch besitzt auch die endotheliale Blut-Hirn-Schranke eine sehr dichte parazelluläre Barriere, die vorallem durch Cldn5 gebildet wird. Ähnlich wie es für die Epidermismodelle beschrieben worden ist, könnte mithilfe Cldn5-bindender cCPE-Varianten (Protze *et al.* 2015, Neuhaus *et al.* 2018) in *in vitro*- und tierexperimentellen Studien versucht werden, die Blut-Hirn-Schranke gezielt zu modulieren, um bspw. eine mögliche Wirkstoffgabe über diese Barriere zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Adler, M. J., and D. S. Dimitrov. 2012. "Therapeutic antibodies against cancer." *Hematol Oncol Clin North Am* 26 (3):447-81, vii. doi: 10.1016/j.hoc.2012.02.013.
- Amasheh, M., I. Grotjohann, S. Amasheh, A. Fromm, J. D. Soderholm, M. Zeitz, M. Fromm, and J. D. Schulzke. 2009. "Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines." *Scand J Gastroenterol* 44 (10):1226-35. doi: 10.1080/00365520903131973.
- Bae, S. M., D. J. Bae, E. J. Do, G. Oh, S. W. Yoo, G. J. Lee, J. S. Chae, Y. Yun, S. Kim, K. H. Kim, E. Chung, J. K. Kim, S. W. Hwang, S. H. Park, D. H. Yang, B. D. Ye, J. S. Byeon, S. K. Yang, J. Joo, S. Y. Kim, and S. J. Myung. 2019. "Multi-Spectral Fluorescence Imaging of Colon Dysplasia InVivo Using a Multi-Spectral Endoscopy System." *Transl Oncol* 12 (2):226-235. doi: 10.1016/j.tranon.2018.10.006.
- Bardenbacher, M., B. Ruder, N. Britzen-Laurent, B. Schmid, M. Waldner, E. Naschberger, M. Scharl, W. Muller, C. Gunther, C. Becker, M. Sturzl, and P. Tripal. 2019. "Permeability analyses and three dimensional imaging of interferon gamma-induced barrier disintegration in intestinal organoids." *Stem Cell Res* 35:101383. doi: 10.1016/j.scr.2019.101383.
- Basler, K., S. Bergmann, M. Heisig, A. Naegel, M. Zorn-Kruppa, and J. M. Brandner. 2016. "The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption." *J Control Release* 242:105-118. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.08.007.
- Basler, K., M. F. Galliano, S. Bergmann, H. Rohde, E. Wladykowski, Y. Sy S. Vidal, B. Guiraud, P. Houdek, G. Schuring, T. Volksdorf, A. Caruana, S. Bessou-Touya, S. W. Schneider, H. Duplan, and J. M. Brandner. 2017. "Biphasic influence of Staphylococcus aureus on human epidermal tight junctions." *Ann N Y Acad Sci* 1405 (1):53-70. doi: 10.1111/nyas.13418.
- Beier, L. S., J. Rossa, S. Woodhouse, S. Bergmann, H. B. Kramer, J. Protze, M. Eichner, A. Piontek, Y. Sy S. Vidal, J. M. Brandner, G. Krause, N. Zitzmann, and J. Piontek. 2019. "Use of Modified Clostridium perfringens Enterotoxin Fragments for Claudin Targeting in Liver and Skin Cells." *Int J Mol Sci* 20 (19). doi: 10.3390/ijms20194774.
- Bergmann, S., B. von Buenau, Y. Sy S. Vidal, M. Haftek, E. Wladykowski, P. Houdek, S. Lezius, H. Duplan, K. Basler, S. Dahnhardt-Pfeiffer, C. Gorzelanny, S. W. Schneider, E. Rodriguez, D. Stolzl, S. Weidinger, and J. M. Brandner. 2020. "Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently." *Sci Rep* 10 (1):2024. doi: 10.1038/s41598-020-58718-9.

- Bhat, A. A., R. Ahmad, S. B. Uppada, A. B. Singh, and P. Dhawan. 2016. "Claudin-1 promotes TNF-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells." *Exp Cell Res* 349 (1):119-127. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.005.
- Bos, J., L. Smithee, B. McClane, R. F. Distefano, F. Uzal, J. G. Songer, S. Mallonee, and J. M. Crutcher. 2005. "Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection." *Clin Infect Dis* 40 (10):e78-83. doi: 10.1086/429829.
- Brandner, J. M., S. Kief, C. Grund, M. Rendl, P. Houdek, C. Kuhn, E. Tschachler, W. W. Franke, and I. Moll. 2002. "Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes." *Eur J Cell Biol* 81 (5):253-63. doi: 10.1078/0171-9335-00244.
- Brenner, H., L. Altenhofen, and M. Hoffmeister. 2010. "Eight years of colonoscopic bowel cancer screening in Germany: initial findings and projections." *Dtsch Arztebl Int* 107 (43):753-9. doi: 10.3238/arztebl.2010.0753.
- Briggs, D. C., C. E. Naylor, J. G. Smedley, 3rd, N. Lukoyanova, S. Robertson, D. S. Moss, B. A. McClane, and A. K. Basak. 2011. "Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins." *J Mol Biol* 413 (1):138-49. doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.066.
- Burley, S. K., H. M. Berman, G. J. Kleywegt, J. L. Markley, H. Nakamura, and S. Velankar. 2017. "Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive." *Methods Mol Biol* 1607:627-641. doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_26.
- Carroll, M. R., H. E. Seaman, and S. P. Halloran. 2014. "Tests and investigations for colorectal cancer screening." *Clin Biochem* 47 (10-11):921-39. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.04.019.
- Casagrande, F., E. Cocco, S. Bellone, C. E. Richter, M. Bellone, P. Todeschini, E. Siegel, J. Varughese, D. Arin-Silasi, M. Azodi, T. J. Rutherford, S. Pecorelli, P. E. Schwartz, and A. D. Santin. 2011. "Eradication of chemotherapy-resistant CD44+ human ovarian cancer stem cells in mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Cancer* 117 (24):5519-28. doi: 10.1002/cncr.26215.
- Chakrabarti, G., and B. A. McClane. 2005. "The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Cell Microbiol* 7 (1):129-46. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00442.x.
- Chakrabarti, G., X. Zhou, and B. A. McClane. 2003. "Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Infect Immun* 71 (8):4260-70. doi: 10.1128/iai.71.8.4260-4270.2003.

- Chen, J., J. R. Theoret, A. Shrestha, J. G. Smedley, 3rd, and B. A. McClane. 2012. "Cysteine-scanning mutagenesis supports the importance of Clostridium perfringens enterotoxin amino acids 80 to 106 for membrane insertion and pore formation." *Infect Immun* 80 (12):4078-88. doi: 10.1128/IAI.00069-12.
- Claude, P., and D. A. Goodenough. 1973. "Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia." *J Cell Biol* 58 (2):390-400. doi: 10.1083/jcb.58.2.390.
- Crone, C., and S. P. Olesen. 1982. "Electrical resistance of brain microvascular endothelium." *Brain Res* 241 (1):49-55. doi: 10.1016/0006-8993(82)91227-6.
- Cunningham, S. C., F. Kamangar, M. P. Kim, S. Hammoud, R. Haque, C. A. Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, R. Ashfaq, S. Hustinx, R. E. Heitmiller, M. A. Choti, K. D. Lillemoe, J. L. Cameron, C. J. Yeo, R. D. Schulick, and E. Montgomery. 2006. "Claudin-4, mitogen-activated protein kinase kinase 4, and stratifin are markers of gastric adenocarcinoma precursor lesions." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (2):281-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0539.
- Czeczulin, J. R., P. C. Hanna, and B. A. McClane. 1993. "Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the Clostridium perfringens enterotoxin gene in Escherichia coli." *Infect Immun* 61 (8):3429-39.
- de Oliveira, S. S., I. M. de Oliveira, W. De Souza, and J. A. Morgado-Diaz. 2005. "Claudins upregulation in human colorectal cancer." *FEBS Lett* 579 (27):6179-85. doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.091.
- Dhawan, P., A. B. Singh, N. G. Deane, Y. No, S. R. Shiou, C. Schmidt, J. Neff, M. K. Washington, and R. D. Beauchamp. 2005. "Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer." *J Clin Invest* 115 (7):1765-76. doi: 10.1172/JCI24543.
- Ebihara, C., M. Kondoh, M. Harada, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. "Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin for modulation of tight junction." *Biochem Pharmacol* 73 (6):824-30. doi: 10.1016/j.bcp.2006.11.013.
- Ehlen, L., J. Arndt, D. Treue, P. Bischoff, F. N. Loch, E. M. Hahn, K. Kotsch, F. Klauschen, K. Beyer, G. A. Margonis, M. E. Kreis, and C. Kamphues. 2020. "Novel methods for in vitro modeling of pancreatic cancer reveal important aspects for successful primary cell culture." *BMC Cancer* 20 (1):417. doi: 10.1186/s12885-020-06929-8.
- Eichner, M., C. Augustin, A. Fromm, A. Piontek, W. Walther, R. Bucker, M. Fromm, G. Krause, J. D. Schulzke, D. Gunzel, and J. Piontek. 2017. "In Colon Epithelia, Clostridium perfringens Enterotoxin Causes Focal Leaks by Targeting Claudins Which are Apically Accessible Due to Tight Junction Derangement." *J Infect Dis* 217 (1):147-157. doi: 10.1093/infdis/jix485.

- Eichner, M., J. Protze, A. Piontek, G. Krause, and J. Piontek. 2017. "Targeting and alteration of tight junctions by bacteria and their virulence factors such as *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Pflugers Arch* 469 (1):77-90. doi: 10.1007/s00424-016-1902-x.
- Epple, H. J., S. Amasheh, J. Mankertz, M. Goltz, J. D. Schulzke, and M. Fromm. 2000. "Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278 (5):G718-24. doi: 10.1152/ajpgi.2000.278.5.G718.
- Farquhar, M. G., and G. E. Palade. 1963. "Junctional complexes in various epithelia." *J Cell Biol* 17:375-412. doi: 10.1083/jcb.17.2.375.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin. 2010. "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *Int J Cancer* 127 (12):2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516.
- Fernandez Miyakawa, M. E., V. Pistone Creydt, F. A. Uzal, B. A. McClane, and C. Ibarra. 2005. "Clostridium perfringens enterotoxin damages the human intestine in vitro." *Infect Immun* 73 (12):8407-10. doi: 10.1128/IAI.73.12.8407-8410.2005.
- Fogh, Jorgen, and Germain Trempe. 1975. "New Human Tumor Cell Lines." In *Human Tumor Cells in Vitro*, edited by Jorgen Fogh. Boston, MA: Springer Science+Business Media New York 1975.
- Freedman, J. C., A. Shrestha, and B. A. McClane. 2016. "Clostridium perfringens Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications." *Toxins (Basel)* 8 (3). doi: 10.3390/toxins8030073.
- Fromm, M. 2007. "Transport in Membranen und Epithelien." In *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, edited by R.F. Schmidt and F. Lang, 41-54
971-973. Heidelberg: Springer Medizin.
- Fromm, M., S. M. Krug, S. Zeissig, J. F. Richter, R. Rosenthal, J. D. Schulzke, and D. Gunzel. 2009. "High-resolution analysis of barrier function." *Ann N Y Acad Sci* 1165:74-81. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04047.x.
- Fromm, M., J. Piontek, R. Rosenthal, D. Gunzel, and S. M. Krug. 2017. "Tight junctions of the proximal tubule and their channel proteins." *Pflugers Arch* 469 (7-8):877-887. doi: 10.1007/s00424-017-2001-3.
- Fromm, M., J. D. Schulzke, and U. Hegel. 1993. "Control of electrogenic Na⁺ absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone added in vitro." *Am J Physiol* 264 (1 Pt 1):E68-73. doi: 10.1152/ajpendo.1993.264.1.E68.
- Fujita, K., J. Katahira, Y. Horiguchi, N. Sonoda, M. Furuse, and S. Tsukita. 2000. "Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein." *FEBS Lett* 476 (3):258-61. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01744-0.

- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." *J Cell Biol* 156 (6):1099-111. doi: 10.1083/jcb.200110122.
- Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." *J Cell Biol* 143 (2):391-401. doi: 10.1083/jcb.143.2.391.
- Gao, Z., and B. A. McClane. 2012. "Use of Clostridium perfringens Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges." *J Toxicol* 2012:981626. doi: 10.1155/2012/981626.
- Garcia, J. P., J. Li, A. Shrestha, J. C. Freedman, J. Beingesser, B. A. McClane, and F. A. Uzal. 2014. "Clostridium perfringens type A enterotoxin damages the rabbit colon." *Infect Immun* 82 (6):2211-8. doi: 10.1128/IAI.01659-14.
- Gonzalez-Mariscal, L., S. Lechuga, and E. Garay. 2007. "Role of tight junctions in cell proliferation and cancer." *Prog Histochem Cytochem* 42 (1):1-57. doi: 10.1016/j.proghi.2007.01.001.
- Gonzalez-Mariscal, L., Y. Posadas, J. Miranda, P. Y. Uc, J. M. Ortega-Olvera, and S. Hernandez. 2016. "Strategies that Target Tight Junctions for Enhanced Drug Delivery." *Curr Pharm Des* 22 (35):5313-5346. doi: 10.2174/1381612822666160720163656.
- Günzel, D., and M. Fromm. 2012. "Claudins and other tight junction proteins." *Compr Physiol* 2 (3):1819-52. doi: 10.1002/cphy.c110045.
- Günzel, D., and A. S. Yu. 2013. "Claudins and the modulation of tight junction permeability." *Physiol Rev* 93 (2):525-69. doi: 10.1152/physrev.00019.2012.
- Hanna, P. C., T. A. Mietzner, G. K. Schoolnik, and B. A. McClane. 1991. "Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region." *J Biol Chem* 266 (17):11037-43.
- Hanna, P. C., A. P. Wnek, and B. A. McClane. 1989. "Molecular cloning of the 3' half of the Clostridium perfringens enterotoxin gene and demonstration that this region encodes receptor-binding activity." *J Bacteriol* 171 (12):6815-20. doi: 10.1128/jb.171.12.6815-6820.1989.
- Harada, M., M. Kondoh, C. Ebihara, A. Takahashi, E. Komiya, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. "Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin." *Biochem Pharmacol* 73 (2):206-14. doi: 10.1016/j.bcp.2006.10.002.

- Hardy, S. P., M. Denmead, N. Parekh, and P. E. Granum. 1999. "Cationic currents induced by Clostridium perfringens type A enterotoxin in human intestinal CaCO-2 cells." *J Med Microbiol* 48 (3):235-243. doi: 10.1099/00222615-48-3-235.
- Hashimoto, Y., K. Shirakura, Y. Okada, H. Takeda, K. Endo, M. Tamura, A. Watari, Y. Sadamura, T. Sawasaki, T. Doi, K. Yagi, and M. Kondoh. 2017. "Claudin-5-Binders Enhance Permeation of Solutes across the Blood-Brain Barrier in a Mammalian Model." *J Pharmacol Exp Ther* 363 (2):275-283. doi: 10.1124/jpet.117.243014.
- Hashimoto, Y., K. Yagi, and M. Kondoh. 2017. "Roles of the first-generation claudin binder, Clostridium perfringens enterotoxin, in the diagnosis and claudin-targeted treatment of epithelium-derived cancers." *Pflugers Arch* 469 (1):45-53. doi: 10.1007/s00424-016-1878-6.
- Hassan, C., A. Zullo, S. Winn, and S. Morini. 2008. "Cost-effectiveness of capsule endoscopy in screening for colorectal cancer." *Endoscopy* 40 (5):414-21. doi: 10.1055/s-2007-995565.
- Heredia, N. L., R. G. Labbe, M. A. Rodriguez, and J. S. Garcia-Alvarado. 1991. "Growth, sporulation and enterotoxin production by Clostridium perfringens type A in the presence of human bile salts." *FEMS Microbiol Lett* 68 (1):15-21. doi: 10.1016/0378-1097(91)90387-p.
- Heresbach, D., T. Barrioz, M. G. Lapalus, D. Coumaros, P. Bauret, P. Potier, D. Sautereau, C. Boustiere, J. C. Grimaud, C. Barthelemy, J. See, I. Serraj, P. N. D'Halluin, B. Branger, and T. Ponchon. 2008. "Miss rate for colorectal neoplastic polyps: a prospective multicenter study of back-to-back video colonoscopies." *Endoscopy* 40 (4):284-90. doi: 10.1055/s-2007-995618.
- Hidalgo, M., S. Cascinu, J. Kleeff, R. Labianca, J. M. Lohr, J. Neoptolemos, F. X. Real, J. L. Van Laethem, and V. Heinemann. 2015. "Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes." *Pancreatology* 15 (1):8-18. doi: 10.1016/j.pan.2014.10.001.
- Hinoi, T., A. Akyol, B. K. Theisen, D. O. Ferguson, J. K. Greenson, B. O. Williams, K. R. Cho, and E. R. Fearon. 2007. "Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation." *Cancer Res* 67 (20):9721-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2735.
- Hochmann, Jerome, and Per Artursson. 1994. "Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation." *Journal of Controlled Release* 29:253-267. doi: 10.1016/0168-3659(94)90072-8.
- Horiguchi, Y., T. Akai, and G. Sakaguchi. 1987. "Isolation and function of a Clostridium perfringens enterotoxin fragment." *Infect Immun* 55 (12):2912-5.

- Iqbal, B., J. Ali, and S. Baboota. 2018. "Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology." *Int J Dermatol* 57 (6):646-660. doi: 10.1111/ijd.13902.
- Jian, Y., C. Chen, B. Li, and X. Tian. 2015. "Delocalized Claudin-1 promotes metastasis of human osteosarcoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 466 (3):356-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.028.
- Johnson, A. H., H. F. Frierson, A. Zaika, S. M. Powell, J. Roche, S. Crowe, C. A. Moskaluk, and W. El-Rifai. 2005. "Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis." *Am J Pathol* 167 (2):577-84. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62999-9.
- Jung, J. H., C. K. Jung, H. J. Choi, K. H. Jun, J. Yoo, S. J. Kang, and K. Y. Lee. 2009. "Diagnostic utility of expression of claudins in non-small cell lung cancer: different expression profiles in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas." *Pathol Res Pract* 205 (6):409-16. doi: 10.1016/j.prp.2008.12.015.
- Katahira, J., N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda, and N. Sugimoto. 1997. "Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin." *J Cell Biol* 136 (6):1239-47. doi: 10.1083/jcb.136.6.1239.
- Katahira, J., H. Sugiyama, N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda, and N. Sugimoto. 1997. "Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo." *J Biol Chem* 272 (42):26652-8. doi: 10.1074/jbc.272.42.26652.
- Kimura, J., H. Abe, S. Kamitani, H. Toshima, A. Fukui, M. Miyake, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, and Y. Horiguchi. 2010. "Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction." *J Biol Chem* 285 (1):401-8. doi: 10.1074/jbc.M109.051417.
- Kitadokoro, K., K. Nishimura, S. Kamitani, A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, H. Abe, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, H. Karatani, and Y. Horiguchi. 2011. "Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins." *J Biol Chem* 286 (22):19549-55. doi: 10.1074/jbc.M111.228478.
- Kiu, R., and L. J. Hall. 2018. "An update on the human and animal enteric pathogen Clostridium perfringens." *Emerg Microbes Infect* 7 (1):141. doi: 10.1038/s41426-018-0144-8.
- Kohmoto, T., K. Masuda, K. Shoda, R. Takahashi, S. Ujira, S. Tange, D. Ichikawa, E. Otsuji, and I. Imoto. 2020. "Claudin-6 is a single prognostic marker and functions as a tumor-promoting gene in a subgroup of intestinal type gastric cancer." *Gastric Cancer* 23 (3):403-417. doi: 10.1007/s10120-019-01014-x.

- Kokai-Kun, J. F., and B. A. McClane. 1997. "Determination of functional regions of *Clostridium perfringens* enterotoxin through deletion analysis." *Clin Infect Dis* 25 Suppl 2:S165-7. doi: 10.1086/516246.
- Kokai-Kun, J. F., J. G. Songer, J. R. Czeczulin, F. Chen, and B. A. McClane. 1994. "Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*." *J Clin Microbiol* 32 (10):2533-9.
- Kominsky, S. L., M. Vali, D. Korz, T. G. Gabig, S. A. Weitzman, P. Argani, and S. Sukumar. 2004. "Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4." *Am J Pathol* 164 (5):1627-33. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63721-2.
- Kondoh, M., A. Masuyama, A. Takahashi, N. Asano, H. Mizuguchi, N. Koizumi, M. Fujii, T. Hayakawa, Y. Horiguchi, and Y. Watanabe. 2005. "A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator." *Mol Pharmacol* 67 (3):749-56. doi: 10.1124/mol.104.008375.
- Kondoh, M., A. Takahashi, M. Fujii, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2006. "A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator." *Biol Pharm Bull* 29 (9):1783-9. doi: 10.1248/bpb.29.1783.
- Krause, G., J. Protze, and J. Piontek. 2015. "Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures." *Semin Cell Dev Biol* 42:3-12. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.04.010.
- Krause, G., L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek, and I. E. Blasig. 2008. "Structure and function of claudins." *Biochim Biophys Acta* 1778 (3):631-45. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.
- Kreusel, K. M., M. Fromm, J. D. Schulzke, and U. Hegel. 1991. "Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)." *Am J Physiol* 261 (4 Pt 1):C574-82. doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.4.C574.
- Krug, S. M., M. Fromm, and D. Gunzel. 2009. "Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance." *Biophys J* 97 (8):2202-11. doi: 10.1016/j.bpj.2009.08.003.
- Kwon, M. J. 2013. "Emerging roles of claudins in human cancer." *Int J Mol Sci* 14 (9):18148-80. doi: 10.3390/ijms140918148.
- Kwon, M. J., S. H. Kim, H. M. Jeong, H. S. Jung, S. S. Kim, J. E. Lee, M. C. Gye, O. C. Erkin, S. S. Koh, Y. L. Choi, C. K. Park, and Y. K. Shin. 2011. "Claudin-4 overexpression is associated with epigenetic derepression in gastric carcinoma." *Lab Invest* 91 (11):1652-67. doi: 10.1038/labinvest.2011.117.

- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
- Lal-Nag, M., and P. J. Morin. 2009. "The claudins." *Genome Biol* 10 (8):235. doi: 10.1186/gb-2009-10-8-235.
- le Clercq, C. M., M. W. Bouwens, E. J. Rondagh, C. M. Bakker, E. T. Keulen, R. J. de Ridder, B. Winkens, A. A. Masclee, and S. Sanduleanu. 2014. "Postcolonoscopy colorectal cancers are preventable: a population-based study." *Gut* 63 (6):957-63. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304880.
- Leach, M. W., J. B. Rottman, M. B. Hock, D. Finco, J. L. Rojko, and J. C. Beyer. 2014. "Immunogenicity/hypersensitivity of biologics." *Toxicol Pathol* 42 (1):293-300. doi: 10.1177/0192623313510987.
- Lee, Y. C., N. Saijo, Y. Sasaki, H. Takahashi, M. Sakurai, J. Ishihara, A. Hoshi, K. M. Chen, and A. W. Hamburger. 1985. "Clonogenic patterns of human pulmonary adenocarcinoma cell lines (PC-9, PC-13 and PC-14) and how they influence the results of test for chemosensitivity to cisplatin in the human tumor clonogenic assay." *Jpn J Clin Oncol* 15 (4):637-44.
- Lemmer, H. J., and J. H. Hamman. 2013. "Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation." *Expert Opin Drug Deliv* 10 (1):103-14. doi: 10.1517/17425247.2013.745509.
- Li, J., H. Xu, L. Zhang, L. Song, D. Feng, X. Peng, M. Wu, Y. Zou, B. Wang, L. Zhan, G. Hua, and X. Zhan. 2019. "Malignant ascites-derived organoid (MADO) cultures for gastric cancer in vitro modelling and drug screening." *J Cancer Res Clin Oncol* 145 (11):2637-2647. doi: 10.1007/s00432-019-03004-z.
- Li, X., H. E. Francies, M. Secrier, J. Perner, A. Miremadi, N. Galeano-Dalmau, W. J. Barendt, L. Letchford, G. M. Leyden, E. K. Goffin, A. Barthorpe, H. Lightfoot, E. Chen, J. Gilbert, A. Noorani, G. Devonshire, L. Bower, A. Grantham, S. MacRae, N. Grehan, D. C. Wedge, R. C. Fitzgerald, and M. J. Garnett. 2018. "Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics." *Nat Commun* 9 (1):2983. doi: 10.1038/s41467-018-05190-9.
- Ling, J., H. Liao, R. Clark, M. S. Wong, and D. D. Lo. 2008. "Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance." *J Biol Chem* 283 (45):30585-95. doi: 10.1074/jbc.M803548200.
- Loffler, A., and R. Labbe. 1986. "Characterization of a parasporal inclusion body from sporulating, enterotoxin-positive *Clostridium perfringens* type A." *J Bacteriol* 165 (2):542-8. doi: 10.1128/jb.165.2.542-548.1986.
- Ma, M., A. Gurjar, J. R. Theoret, J. P. Garcia, J. Beingesser, J. C. Freedman, D. J. Fisher, B. A. McClane, and F. A. Uzal. 2014. "Synergistic effects of *Clostridium perfringens*

- enterotoxin and beta toxin in rabbit small intestinal loops." *Infect Immun* 82 (7):2958-70. doi: 10.1128/IAI.01848-14.
- Martin, T. A., and W. G. Jiang. 2009. "Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis." *Biochim Biophys Acta* 1788 (4):872-91. doi: 10.1016/j.bbame.2008.11.005.
- Matsuda, M., and N. Sugimoto. 1979. "Calcium-independent and dependent steps in action of Clostridium perfringens enterotoxin on HeLa and Vero cells." *Biochem Biophys Res Commun* 91 (2):629-36. doi: 10.1016/0006-291x(79)91568-7.
- McDonel, J. L., and G. W. Demers. 1982. "In vivo effects of enterotoxin from Clostridium perfringens type A in the rabbit colon: binding vs. biologic activity." *J Infect Dis* 145 (4):490-4. doi: 10.1093/infdis/145.4.490.
- McDonel, J. L., and C. L. Duncan. 1977. "Regional localization of activity of Clostridium perfringens type A enterotoxin in the rabbit ileum, jejunum, and duodenum." *J Infect Dis* 136 (5):661-6. doi: 10.1093/infdis/136.5.661.
- Meertens, L., C. Bertaux, L. Cukierman, E. Cormier, D. Lavillette, F. L. Cosset, and T. Dragic. 2008. "The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus." *J Virol* 82 (7):3555-60. doi: 10.1128/JVI.01977-07.
- Michl, P., M. Buchholz, M. Rolke, S. Kunsch, M. Lohr, B. McClane, S. Tsukita, G. Leder, G. Adler, and T. M. Gress. 2001. "Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin." *Gastroenterology* 121 (3):678-84. doi: 10.1053/gast.2001.27124.
- Mitsunaga, M., N. Kosaka, P. L. Choyke, M. R. Young, C. R. Dextras, S. M. Saud, N. H. Colburn, M. Sakabe, T. Nagano, D. Asanuma, Y. Urano, and H. Kobayashi. 2013. "Fluorescence endoscopic detection of murine colitis-associated colon cancer by topically applied enzymatically rapid-activatable probe." *Gut* 62 (8):1179-86. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301795.
- Mizuno, N., T. Niwa, Y. Yotsumoto, and Y. Sugiyama. 2003. "Impact of drug transporter studies on drug discovery and development." *Pharmacol Rev* 55 (3):425-61. doi: 10.1124/pr.55.3.1.
- Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1999. "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (2):511-6. doi: 10.1073/pnas.96.2.511.
- Nakajima, M., S. Nagase, M. Iida, S. Takeda, M. Yamashita, A. Watari, Y. Shirasago, M. Fukasawa, H. Takeda, T. Sawasaki, K. Yagi, and M. Kondoh. 2015. "Claudin-1 Binder Enhances Epidermal Permeability in a Human Keratinocyte Model." *J Pharmacol Exp Ther* 354 (3):440-7. doi: 10.1124/jpet.115.225391.

- Nakamura, S., K. Irie, H. Tanaka, K. Nishikawa, H. Suzuki, Y. Saitoh, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. 2019. "Morphologic determinant of tight junctions revealed by claudin-3 structures." *Nat Commun* 10 (1):816. doi: 10.1038/s41467-019-08760-7.
- Neesse, A., A. Hahnenkamp, H. Griesmann, M. Buchholz, S. A. Hahn, A. Maghnouj, V. Fendrich, J. Ring, B. Sipos, D. A. Tuveson, C. Bremer, T. M. Gress, and P. Michl. 2013. "Claudin-4-targeted optical imaging detects pancreatic cancer and its precursor lesions." *Gut* 62 (7):1034-43. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302577.
- Neuhaus, W., A. Piontek, J. Protze, M. Eichner, A. Mahringer, E. A. Subileau, I. M. Lee, J. D. Schulzke, G. Krause, and J. Piontek. 2018. "Reversible opening of the blood-brain barrier by claudin-5-binding variants of Clostridium perfringens enterotoxin's claudin-binding domain." *Biomaterials* 161:129-143. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.028.
- Nielsen, H. L., H. Nielsen, T. Ejlersen, J. Engberg, D. Gunzel, M. Zeitz, N. A. Hering, M. Fromm, J. D. Schulzke, and R. Bucker. 2011. "Oral and fecal Campylobacter concisus strains perturb barrier function by apoptosis induction in HT-29/B6 intestinal epithelial cells." *PLoS One* 6 (8):e23858. doi: 10.1371/journal.pone.0023858.
- Ohtsuki, S., H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, and T. Terasaki. 2008. "mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting." *J Neurochem* 104 (1):147-54. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x.
- Oleinikova, N. A., O. A. Kharlova, P. G. Mal'kov, and N. V. Danilova. 2017. "[The expression of claudins in colonic neoplasms]." *Arkh Patol* 79 (1):28-35. doi: 10.17116/patol201779128-35.
- Pahle, J., L. Menzel, N. Niesler, D. Kobelt, J. Aumann, M. Rivera, and W. Walther. 2017. "Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy." *BMC Cancer* 17 (1):129. doi: 10.1186/s12885-017-3123-x.
- Pandurangan, A. K., T. Divya, K. Kumar, V. Dineshbabu, B. Velavan, and G. Sudhandiran. 2018. "Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review." *World J Gastrointest Oncol* 10 (9):244-259. doi: 10.4251/wjgo.v10.i9.244.
- Paschoud, S., M. Bongiovanni, J. C. Pache, and S. Citi. 2007. "Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas." *Mod Pathol* 20 (9):947-54. doi: 10.1038/modpathol.3800835.
- Philippe, V. A., M. B. Mendez, I. H. Huang, L. M. Orsaria, M. R. Sarker, and R. R. Grau. 2006. "Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen Clostridium perfringens." *Infect Immun* 74 (6):3651-6. doi: 10.1128/IAI.02090-05.

- Piccart-Gebhart, M. J., M. Procter, B. Leyland-Jones, A. Goldhirsch, M. Untch, I. Smith, L. Gianni, J. Baselga, R. Bell, C. Jackisch, D. Cameron, M. Dowsett, C. H. Barrios, G. Steger, C. S. Huang, M. Andersson, M. Inbar, M. Lichinitser, I. Lang, U. Nitz, H. Iwata, C. Thomssen, C. Lohrisch, T. M. Suter, J. Ruschoff, T. Suto, V. Greatorex, C. Ward, C. Straehle, E. McFadden, M. S. Dolci, R. D. Gelber, and Team Herceptin Adjuvant Trial Study. 2005. "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer." *N Engl J Med* 353 (16):1659-72. doi: 10.1056/NEJMoa052306.
- Piontek, A., M. Eichner, D. Zwanziger, L. S. Beier, J. Protze, W. Walther, S. Theurer, K. W. Schmid, D. Fuhrer-Sakel, J. Piontek, and G. Krause. 2019. "Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Mol Oncol* 14 (2):261-276. doi: 10.1002/1878-0261.12615.
- Piontek, A., C. Witte, H. May Rose, M. Eichner, J. Protze, G. Krause, J. Piontek, and L. Schroder. 2017. "A cCPE-based xenon biosensor for magnetic resonance imaging of claudin-expressing cells." *Ann N Y Acad Sci* 1397 (1):195-208. doi: 10.1111/nyas.13363.
- Piontek, J., S. M. Krug, J. Protze, G. Krause, and M. Fromm. 2020. "Molecular architecture and assembly of the tight junction backbone." *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862 (7):183279. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183279.
- Plumb, A. A., S. Halligan, C. Nickerson, P. Bassett, A. F. Goddard, S. A. Taylor, J. Patnick, and D. Burling. 2014. "Use of CT colonography in the English Bowel Cancer Screening Programme." *Gut* 63 (6):964-73. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304697.
- Pope, J. L., R. Ahmad, A. A. Bhat, M. K. Washington, A. B. Singh, and P. Dhawan. 2014. "Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis." *Mol Cancer* 13:167. doi: 10.1186/1476-4598-13-167.
- Pope, J. L., A. A. Bhat, A. Sharma, R. Ahmad, M. Krishnan, M. K. Washington, R. D. Beauchamp, A. B. Singh, and P. Dhawan. 2014. "Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling." *Gut* 63 (4):622-34. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304241.
- Prausnitz, M. R., S. Mitragotri, and R. Langer. 2004. "Current status and future potential of transdermal drug delivery." *Nat Rev Drug Discov* 3 (2):115-24. doi: 10.1038/nrd1304.
- Protze, J., M. Eichner, A. Piontek, S. Dinter, J. Rossa, K. G. Blecharz, P. Vajkoczy, J. Piontek, and G. Krause. 2015. "Directed structural modification of *Clostridium perfringens* enterotoxin to enhance binding to claudin-5." *Cell Mol Life Sci* 72 (7):1417-32. doi: 10.1007/s00018-014-1761-6.
- Rabinsky, E. F., B. P. Joshi, A. Pant, J. Zhou, X. Duan, A. Smith, R. Kuick, S. Fan, A. Nusrat, S. R. Owens, H. D. Appelman, and T. D. Wang. 2016. "Overexpressed Claudin-1 Can

- Be Visualized Endoscopically in Colonic Adenomas In Vivo." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2 (2):222-237. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.12.001.
- Ramalingam, S., and C. Belani. 2008. "Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions." *Oncologist* 13 Suppl 1:5-13. doi: 10.1634/theoncologist.13-S1-5.
- Rembacken, B. J., T. Fujii, A. Cairns, M. F. Dixon, S. Yoshida, D. M. Chalmers, and A. T. Axon. 2000. "Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK." *Lancet* 355 (9211):1211-4. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02086-9.
- Resnick, M. B., M. Gavilanez, E. Newton, T. Konkin, B. Bhattacharya, D. E. Britt, E. Sabo, and S. F. Moss. 2005. "Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation." *Hum Pathol* 36 (8):886-92. doi: 10.1016/j.humpath.2005.05.019.
- Rex, D. K., C. S. Cutler, G. T. Lemmel, E. Y. Rahmani, D. W. Clark, D. J. Helper, G. A. Lehman, and D. G. Mark. 1997. "Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies." *Gastroenterology* 112 (1):24-8. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70214-2.
- Robertson, S. L., J. G. Smedley, 3rd, and B. A. McClane. 2010. "Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Infect Immun* 78 (1):505-17. doi: 10.1128/IAI.00778-09.
- Robertson, S. L., J. G. Smedley, 3rd, U. Singh, G. Chakrabarti, C. M. Van Itallie, J. M. Anderson, and B. A. McClane. 2007. "Compositional and stoichiometric analysis of *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants." *Cell Microbiol* 9 (11):2734-55. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00994.x.
- Romanov, V., T. C. Whyard, W. C. Waltzer, and T. G. Gabig. 2014. "A claudin 3 and claudin 4-targeted *Clostridium perfringens* protoxin is selectively cytotoxic to PSA-producing prostate cancer cells." *Cancer Lett* 351 (2):260-4. doi: 10.1016/j.canlet.2014.06.009.
- Rood, J. I., V. Adams, J. Lacey, D. Lyras, B. A. McClane, S. B. Melville, R. J. Moore, M. R. Popoff, M. R. Sarker, J. G. Songer, F. A. Uzal, and F. Van Immerseel. 2018. "Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme." *Anaerobe* 53:5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
- Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, K. Matsuhisa, A. Takahashi, H. Suzuki, Y. Kakamu, A. Watari, and K. Yagi. 2010. "A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis." *J Pharmacol Exp Ther* 334 (2):576-82. doi: 10.1124/jpet.110.168070.
- Sahin, U., M. Koslowski, K. Dhaene, D. Usener, G. Brandenburg, G. Seitz, C. Huber, and O. Tureci. 2008. "Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic

- antibody development." *Clin Cancer Res* 14 (23):7624-34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1547.
- Saitoh, Y., H. Suzuki, K. Tani, K. Nishikawa, K. Irie, Y. Ogura, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. 2015. "Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Science* 347 (6223):775-8. doi: 10.1126/science.1261833.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Santin, A. D., S. Cane, S. Bellone, M. Palmieri, E. R. Siegel, M. Thomas, J. J. Roman, A. Burnett, M. J. Cannon, and S. Pecorelli. 2005. "Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin." *Cancer Res* 65 (10):4334-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3472.
- Sarker, M. R., R. J. Carman, and B. A. McClane. 1999. "Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops." *Mol Microbiol* 33 (5):946-58. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01534.x.
- Sawada, N. 2013. "Tight junction-related human diseases." *Pathol Int* 63 (1):1-12. doi: 10.1111/pin.12021.
- Shcherbo, D., C. S. Murphy, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, T. V. Chepurnykh, A. S. Shcheglov, V. V. Verkhusha, V. Z. Pletnev, K. L. Hazelwood, P. M. Roche, S. Lukyanov, A. G. Zaraisky, M. W. Davidson, and D. M. Chudakov. 2009. "Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues." *Biochem J* 418 (3):567-74. doi: 10.1042/BJ20081949.
- Sherman, S., E. Klein, and B. A. McClane. 1994. "*Clostridium perfringens* type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum." *J Diarrhoeal Dis Res* 12 (3):200-7.
- Shinoda, T., N. Shinya, K. Ito, N. Ohsawa, T. Terada, K. Hirata, Y. Kawano, M. Yamamoto, T. Kimura-Someya, S. Yokoyama, and M. Shirouzu. 2016. "Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin." *Sci Rep* 6:33632. doi: 10.1038/srep33632.
- Shrestha, A., and B. A. McClane. 2013. "Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin." *mBio* 4 (1). doi: 10.1128/mBio.00594-12.
- Silva, A. P., P. V. Coelho, M. Anazetti, and P. U. Simioni. 2017. "Targeted therapies for the treatment of non-small-cell lung cancer: Monoclonal antibodies and biological

- inhibitors." *Hum Vaccin Immunother* 13 (4):843-853. doi: 10.1080/21645515.2016.1249551.
- Simon, K. 2016. "Colorectal cancer development and advances in screening." *Clin Interv Aging* 11:967-76. doi: 10.2147/CIA.S109285.
- Singh, A. B., and P. Dhawan. 2015. "Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact." *Semin Cell Dev Biol* 42:58-65. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.05.001.
- Singh, A. B., A. Sharma, and P. Dhawan. 2010. "Claudin family of proteins and cancer: an overview." *J Oncol* 2010:541957. doi: 10.1155/2010/541957.
- Singh, P., S. Toom, and Y. Huang. 2017. "Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer." *J Hematol Oncol* 10 (1):105. doi: 10.1186/s13045-017-0473-4.
- Singh, U., L. L. Mitic, E. U. Wieckowski, J. M. Anderson, and B. A. McClane. 2001. "Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of Clostridium perfringens enterotoxin on polarized CaCo-2 cells versus Vero cells." *J Biol Chem* 276 (36):33402-12. doi: 10.1074/jbc.M104200200.
- Skjelkvale, R., and T. Uemura. 1977. "Experimental Diarrhoea in human volunteers following oral administration of Clostridium perfringens enterotoxin." *J Appl Bacteriol* 43 (2):281-6. doi: 10.1111/j.1365-2672.1977.tb00752.x.
- Smedley, J. G., 3rd, J. Saputo, J. C. Parker, M. E. Fernandez-Miyakawa, S. L. Robertson, B. A. McClane, and F. A. Uzal. 2008. "Noncytotoxic Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) variants localize CPE intestinal binding and demonstrate a relationship between CPE-induced cytotoxicity and enterotoxicity." *Infect Immun* 76 (8):3793-800. doi: 10.1128/IAI.00460-08.
- Smedley, J. G., 3rd, F. A. Uzal, and B. A. McClane. 2007. "Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of Clostridium perfringens enterotoxin." *Infect Immun* 75 (5):2381-90. doi: 10.1128/IAI.01737-06.
- Smith, Q. R., and S. I. Rapoport. 1986. "Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride." *J Neurochem* 46 (6):1732-42. doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb08491.x.
- Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi, and S. Tsukita. 1999. "Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier." *J Cell Biol* 147 (1):195-204. doi: 10.1083/jcb.147.1.195.
- Staehelin, L. A. 1973. "Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions." *J Cell Sci* 13 (3):763-86.

- Steele, N. G., J. Chakrabarti, J. Wang, J. Biesiada, L. Holokai, J. Chang, L. M. Nowacki, J. Hawkins, M. Mahe, N. Sundaram, N. Shroyer, M. Medvedovic, M. Helmrath, S. Ahmad, and Y. Zavros. 2019. "An Organoid-Based Preclinical Model of Human Gastric Cancer." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7 (1):161-184. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.09.008.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff. 1990. "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185:60-89. doi: 10.1016/0076-6879(90)85008-c.
- Sun, B. S., Y. Q. Yao, B. X. Pei, Z. F. Zhang, and C. L. Wang. 2016. "Claudin-1 correlates with poor prognosis in lung adenocarcinoma." *Thorac Cancer* 7 (5):556-563. doi: 10.1111/1759-7714.12368.
- Suzuki, H., M. Kondoh, X. Li, A. Takahashi, K. Matsuhisa, K. Matsushita, Y. Kakamu, S. Yamane, M. Kodaka, K. Isoda, and K. Yagi. 2011. "A toxicological evaluation of a claudin modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice." *Pharmazie* 66 (7):543-6.
- Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, and Y. Fujiyoshi. 2014. "Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions." *Science* 344 (6181):304-7. doi: 10.1126/science.1248571.
- Tabaries, S., and P. M. Siegel. 2017. "The role of claudins in cancer metastasis." *Oncogene* 36 (9):1176-1190. doi: 10.1038/onc.2016.289.
- Takahashi, A., E. Komiya, H. Kakutani, T. Yoshida, M. Fujii, Y. Horiguchi, H. Mizuguchi, Y. Tsutsumi, S. Tsunoda, N. Koizumi, K. Isoda, K. Yagi, Y. Watanabe, and M. Kondoh. 2008. "Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis." *Biochem Pharmacol* 75 (8):1639-48. doi: 10.1016/j.bcp.2007.12.016.
- Takahashi, A., Y. Saito, M. Kondoh, K. Matsushita, S. M. Krug, H. Suzuki, H. Tsujino, X. Li, H. Aoyama, K. Matsuhisa, T. Uno, M. Fromm, T. Hamakubo, and K. Yagi. 2012. "Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder." *Biomaterials* 33 (12):3464-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.017.
- Thiagarajah, J. R., and A. S. Verkman. 2013. "Chloride channel-targeted therapy for secretory diarrheas." *Curr Opin Pharmacol* 13 (6):888-94. doi: 10.1016/j.coph.2013.08.005.
- Todd, M. C., H. M. Petty, J. M. King, B. N. Piana Marshall, R. A. Sheller, and M. E. Cuevas. 2015. "Overexpression and delocalization of claudin-3 protein in MCF-7 and MDA-MB-415 breast cancer cell lines." *Oncol Lett* 10 (1):156-162. doi: 10.3892/ol.2015.3160.
- Torres, J. B., J. C. Knight, M. J. Mosley, V. Kersemans, S. Koustoulidou, D. Allen, P. Kinchesh, S. Smart, and B. Cornelissen. 2018. "Imaging of Claudin-4 in Pancreatic Ductal

- Adenocarcinoma Using a Radiolabelled Anti-Claudin-4 Monoclonal Antibody." *Mol Imaging Biol* 20 (2):292-299. doi: 10.1007/s11307-017-1112-8.
- Uchida, H., M. Kondoh, T. Hanada, A. Takahashi, T. Hamakubo, and K. Yagi. 2010. "A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide." *Biochem Pharmacol* 79 (10):1437-44. doi: 10.1016/j.bcp.2010.01.010.
- Uzal, F. A., J. C. Freedman, A. Shrestha, J. R. Theoret, J. Garcia, M. M. Awad, V. Adams, R. J. Moore, J. I. Rood, and B. A. McClane. 2014. "Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease." *Future Microbiol* 9 (3):361-77. doi: 10.2217/fmb.13.168.
- Van Itallie, C. M., L. Betts, J. G. Smedley, 3rd, B. A. McClane, and J. M. Anderson. 2008. "Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin." *J Biol Chem* 283 (1):268-74. doi: 10.1074/jbc.M708066200.
- Vecchio, A. J., and R. M. Stroud. 2019. "Claudin-9 structures reveal mechanism for toxin-induced gut barrier breakdown." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (36):17817-17824. doi: 10.1073/pnas.1908929116.
- Verdoes, M., K. Oresic Bender, E. Segal, W. A. van der Linden, S. Syed, N. P. Withana, L. E. Sanman, and M. Bogyo. 2013. "Improved quenched fluorescent probe for imaging of cysteine cathepsin activity." *J Am Chem Soc* 135 (39):14726-30. doi: 10.1021/ja4056068.
- Veshnyakova, A., J. Piontek, J. Protze, N. Waziri, I. Heise, and G. Krause. 2012. "Mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins." *J Biol Chem* 287 (3):1698-708. doi: 10.1074/jbc.M111.312165.
- Veshnyakova, A., J. Protze, J. Rossa, I. E. Blasig, G. Krause, and J. Piontek. 2010. "On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins." *Toxins (Basel)* 2 (6):1336-56. doi: 10.3390/toxins2061336.
- Vlachogiannis, G., S. Hedayat, A. Vatsiou, Y. Jamin, J. Fernandez-Mateos, K. Khan, A. Lampis, K. Eason, I. Huntingford, R. Burke, M. Rata, D. M. Koh, N. Tunariu, D. Collins, S. Hulkki-Wilson, C. Ragulan, I. Spiteri, S. Y. Moorcraft, I. Chau, S. Rao, D. Watkins, N. Fotiadis, M. Bali, M. Darvish-Damavandi, H. Lote, Z. Eltahir, E. C. Smyth, R. Begum, P. A. Clarke, J. C. Hahne, M. Dowsett, J. de Bono, P. Workman, A. Sadanandam, M. Fassan, O. J. Sansom, S. Eccles, N. Starling, C. Braconi, A. Sottoriva, S. P. Robinson, D. Cunningham, and N. Valeri. 2018. "Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers." *Science* 359 (6378):920-926. doi: 10.1126/science.aao2774.
- Walther, W., S. Petkov, O. N. Kuvardina, J. Aumann, D. Kobelt, I. Fichtner, M. Lemm, J. Piontek, I. E. Blasig, U. Stein, and P. M. Schlag. 2012. "Novel *Clostridium perfringens*

- enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors." *Gene Ther* 19 (5):494-503. doi: 10.1038/gt.2011.136.
- Wang, F., X. Duan, J. Chen, Z. Gao, J. Zhou, X. Wu, T. S. Chang, M. Lee, G. Li, A. Nusrat, R. Kuick, H. D. Appelman, and T. D. Wang. 2020. "Integrated Imaging Methodology Detects Claudin-1 Expression in Premalignant Nonpolypoid and Polypoid Colonic Epithelium in Mice." *Clin Transl Gastroenterol* 11 (1):e00089. doi: 10.14309/ctg.0000000000000089.
- Wartofsky, L. 2010. "Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure?" *Hormones (Athens)* 9 (2):103-8. doi: 10.14310/horm.2002.1260.
- Weber, C. R., S. C. Nalle, M. Tretiakova, D. T. Rubin, and J. R. Turner. 2008. "Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation." *Lab Invest* 88 (10):1110-20. doi: 10.1038/labinvest.2008.78.
- Wieckowski, E. U., A. P. Wnek, and B. A. McClane. 1994. "Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin." *J Biol Chem* 269 (14):10838-48.
- Winkler, L., C. Gehring, A. Wenzel, S. L. Muller, C. Piehl, G. Krause, I. E. Blasig, and J. Piontek. 2009. "Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3." *J Biol Chem* 284 (28):18863-72. doi: 10.1074/jbc.M109.008623.
- Yamamoto, A., T. Uchiyama, R. Nishikawa, T. Fujita, and S. Muranishi. 1996. "Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the rat small intestine: effects of absorption enhancers on the intestinal absorption of phenol red and the release of protein and phospholipids from the intestinal membrane." *J Pharm Pharmacol* 48 (12):1285-9. doi: 10.1111/j.2042-7158.1996.tb03937.x.
- Yang, L., X. Sun, and X. Meng. 2018. "Differences in the expression profiles of claudin proteins in human gastric carcinoma compared with nonneoplastic mucosa." *Mol Med Rep* 18 (2):1271-1278. doi: 10.3892/mmr.2018.9122.
- Yoda, S., K. Soejima, J. Hamamoto, H. Yasuda, S. Nakayama, R. Satomi, H. Terai, S. Ikemura, T. Sato, K. Naoki, and T. Betsuyaku. 2014. "Claudin-1 is a novel target of miR-375 in non-small-cell lung cancer." *Lung Cancer* 85 (3):366-72. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.06.009.
- Yuki, T., A. Komiya, A. Kusaka, T. Kuze, Y. Sugiyama, and S. Inoue. 2013. "Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing." *J Dermatol Sci* 69 (2):148-58. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.11.595.

Zwanziger, D., J. Badziong, S. Ting, L. C. Moeller, K. W. Schmid, U. Siebolts, C. Wickenhauser, H. Dralle, and D. Fuehrer. 2015. "The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness." *Endocr Relat Cancer* 22 (5):819-30. doi: 10.1530/ERC-14-0502.

7 Anhang

7.1 Proteinaufreinigungen

Im Folgenden werden beispielhaft Fraktionen der Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine 6 × His-CPE, 6 × His-eYFP-cCPE und GST-cCPE in Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgelen oder als Western Blots gezeigt.

7.1.1 Expression und Aufreinigung von GST-cCPE

GST-cCPE wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und über eine Affinitätschromatographie mit Glutathion-Agarose als Matrixmaterial aufgereinigt. Abb. 26 zeigt exemplarisch die Proteinfractionen der einzelnen Expression- und Reinigungsschritte nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (hier für GST-cCPE-Y306A/L315A).

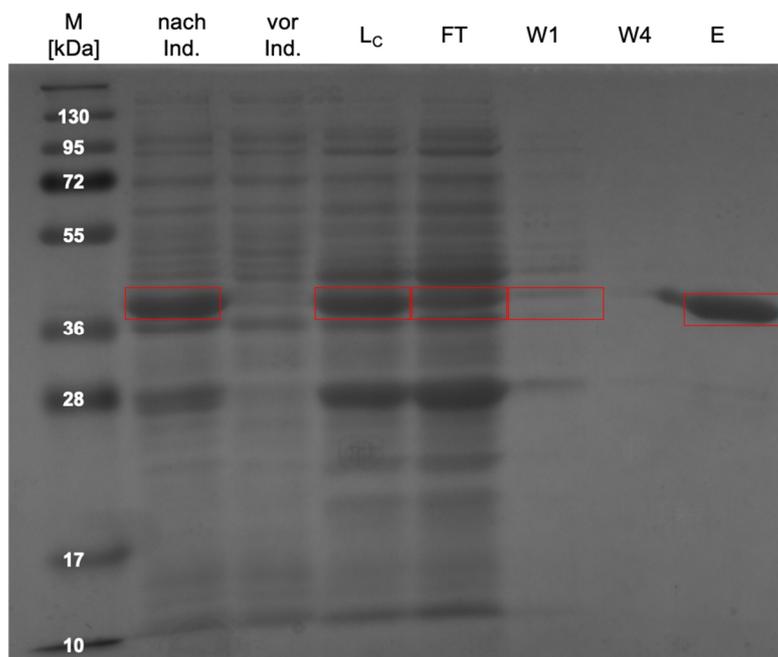


Abbildung 26 Expression und Aufreinigung von GST-cCPE. Exemplarisches Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben. Erwartete Größe GST-cCPE 41 kDa. Endogene *E. coli*-Proteine und kaum Proteinexpression vor Induktion (vor Ind.) der *E. coli* BL21(DE3) zu erkennen, deutliche Band auf entsprechender Höhe nach Induktion (nach Ind.) mit 1 mM IPTG. Kein Proteinverlust durch Zellaufschluss (L_c – geklärtes Lysat). Unerwünschte endogene Proteine der *E. coli* und etwas GST-cCPE im Durchfluss (FT), der nicht an Glutathion-Agarose gebunden hat. Progressive Reinheit der Waschfraktionen (hier W1 und W4 gezeigt). Prominente Bande entsprechender Größe in Eluat (E), fast keine Verunreinigungen durch endogene Proteine der *E. coli*. Banden von GST-cCPE durch rote Kästen hervorgehoben.

7.1.2 Expression und Anreicherung von 6 × His-markierten Proteinen

CPE und YFP-cCPE wurden als 6 × His-markierte Proteine in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und über Affinitätschromatographie mit Ni-IDA (His60 Ni Superflow Resin, Takara Bio Inc) aufgereinigt. Exemplarische Aufreinigungen sind in Abb. 27 (6 × His-CPE) und Abb. 28 (6 × His-YFP-cCPE) gezeigt.

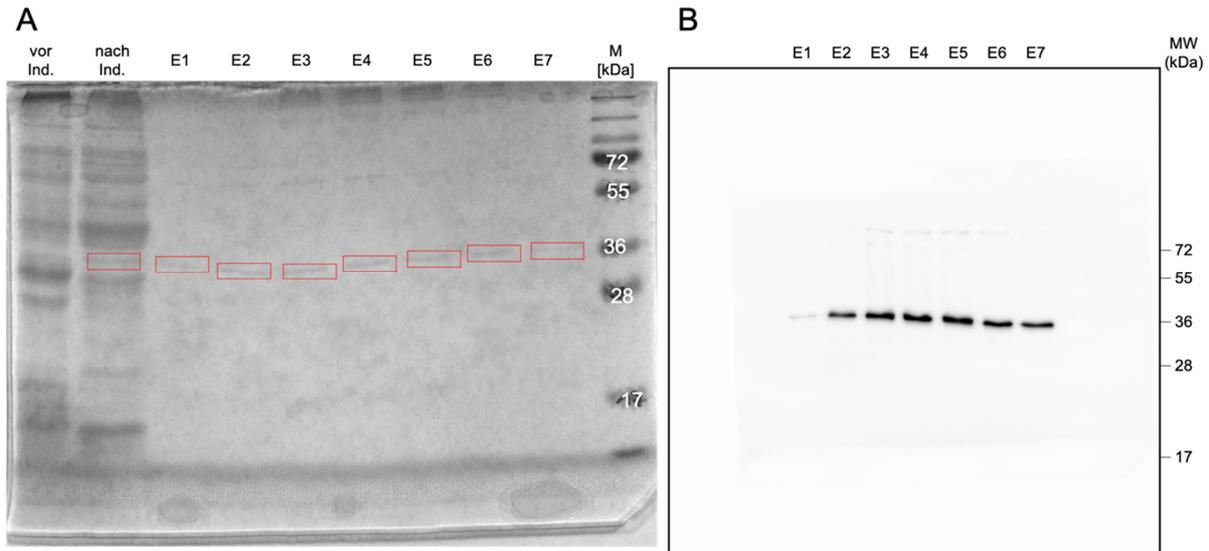


Abbildung 27 Expression und Anreicherung von 6 × His-CPE. (A) Exemplarisches Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel nach SDS-Page. Erwartete Größe des rekombinanten Proteins ca. 35 kDa. Vor Induktion (vor Ind.) endogene *E. coli*-Proteine aufgetrennt. Nach Induktion zusätzliche Bande bei 35 kDa für 6 × His-CPE. Alle Eluate zeigten erwartete Bande für rekombinantes 6 × His-CPE (hervorgehoben durch rote Kästen), aber auch Verunreinigungen durch endogene Proteine. (B) Western Blot für Eluatfraktionen (E1 – E7) visualisiert über anti-CPE-Antikörper (Kaninchen). Gleiche Volumina für alle Eluatfraktionen aufgetragen. Prominente Bande bei ca. 35 kDa, die rekombinantes Protein entspricht. E1 niedrigere Konzentration als übrige Eluate, daher nicht weiter verwendet.

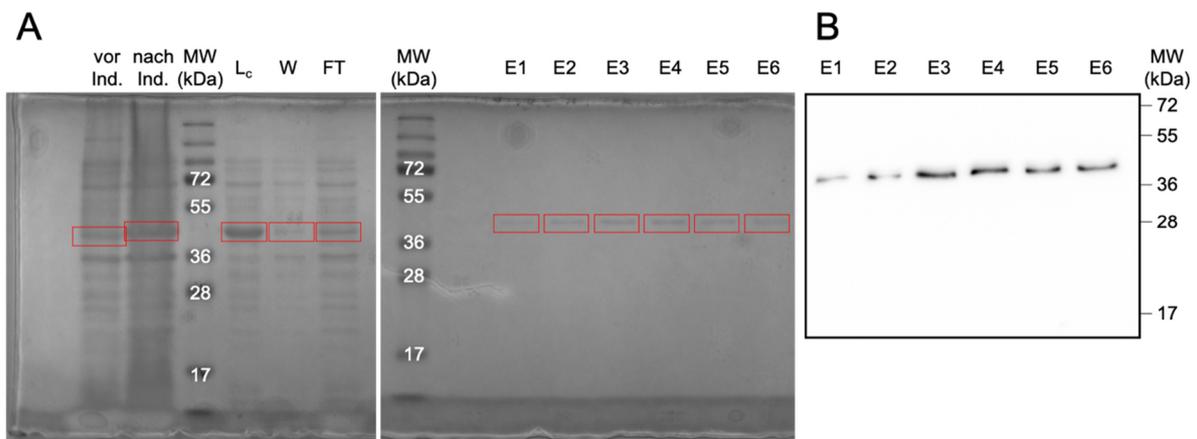


Abbildung 28 Expression und Aufreinigung von 6 × His-eYFP-cCPE. (A) Exemplarisches Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel nach SDS-PAGE. Erwartete Größe des rekombinanten Proteins ca. 40 kDa. Leichte Expression schon vor Induktion. Deutliche Steigerung nach Induktion der Expression mit 1 mM IPTG. Rekombinantes Protein und endogene Proteine im geklärten Lysat (Lc). Durchfluss (FT) enthält rekombinantes Protein. Entfernung unerwünschter, endogener Proteine durch Waschschritte (W). Alle Eluatfraktionen enthielten YFP-cCPE. Banden für rekombinantes Protein durch rote Kästen hervorgehoben. (B) Western Blot für Eluatfraktionen visualisiert über anti-GFP-Antikörper (Maus). Gleiche Volumina für alle Fraktionen aufgetragen.

7.2 Durch die Doppelmutation S231R/S313H wird die Affinität von cCPE für die Claudine 1, 2 und 5 erhöht

Die Einzelmutationen S231R und S313H und die Doppelmutation S231R/S313H wurden in cCPE kloniert. Mit den aufgereinigten GST-cCPE-Proteinen wurden zelluläre Bindungsassays in stabil Claudin-transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt (Dr. A. Piontek, FMP, Berlin).

Die beiden Einzelmutationen erhöhen die Bindung an Cldn1 bereits deutlich. Dieser Effekt wird in der Doppelmutante nochmals verstärkt (Abb. 29 A). Auch an Cldn2 bindet die Mutante cCPE-S313H deutlich besser als cCPEwt. Die Einzelmutation S231R allein hat keinen Einfluss auf die Bindung an Cldn2, jedoch wird durch die Doppelmutation die Bindung noch einmal erhöht (Abb. 29 B). Dieser Effekt wird ebenfalls für Cldn5 beobachtet, allerdings bindet die Doppelmutante deutlich stärker an Cldn5 als es für die Einzelmutante cCPE-S313H beobachtet wird (Abb. 29 E). Für die Affinität an Cldn3 und -7 wurden durch die Mutationen keine Veränderungen beobachtet (Abb. 29 C, G). Die Varianten cCPE-S313H und -SRSH binden mit leicht verringerter Affinität an Cldn4 und -6 (Abb. 29 D, F).

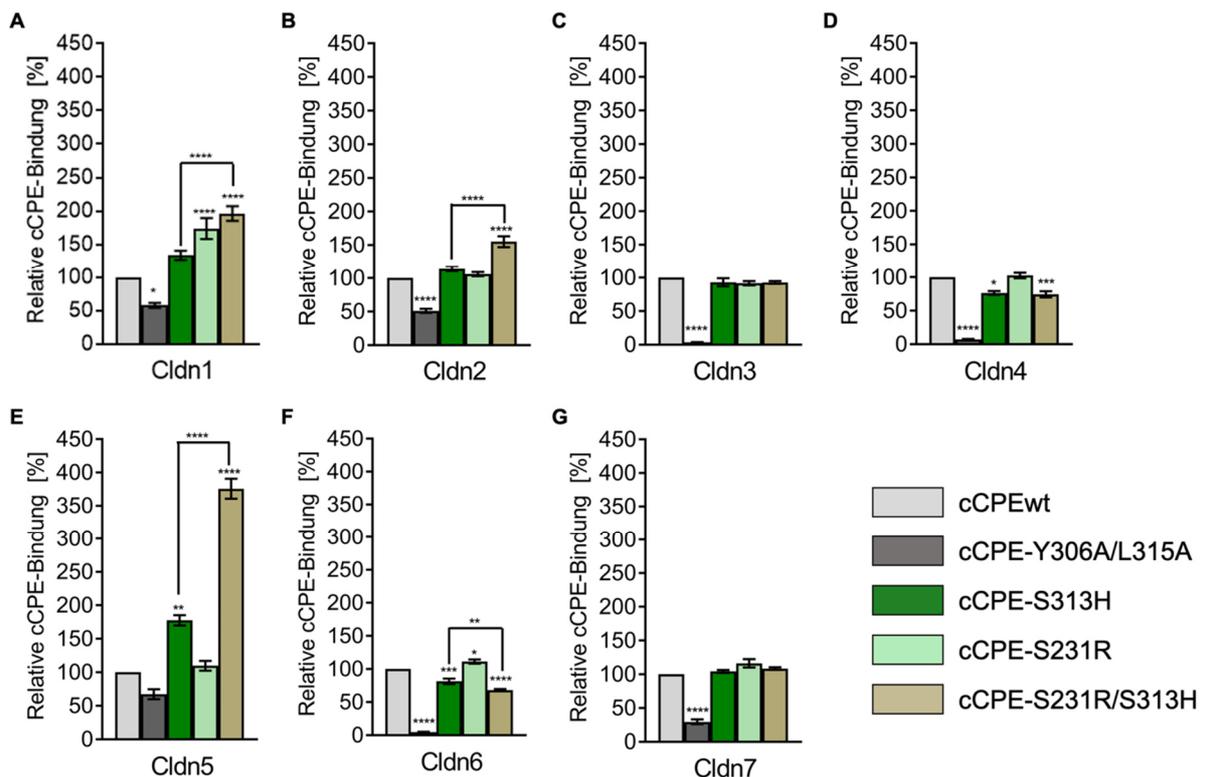


Abbildung 29 Die Doppelmutation S231R/S313H erweitert das Spektrum von Rezeptorclaudinen für cCPE um die Claudine 1, 2 und 5. Relative cCPE-Bindung in zellulären Bindungsassays mit stabil Claudin-transfizierten HEK-293 ((A) – Cldn1-YFP, (B) – Cldn2-YFP, (C) – Cldn3-YFP, (D) – Cldn4-GFP, (E) – Cldn5-YFP, (F) – Cldn6-YFP, (G) – Cldn7-YFP) bestimmt. 24 h nachdem die Zellen ausplattiert worden waren, wurden sie mit 0,5 µg/ml des jeweiligen GST-cCPE-Proteins inkubiert (30 min, 37 °C), Fixierung, Detektion des gebundenen GST-cCPE über Phycoerythrin-gekoppelten anti-GST Antikörper. Berechnung der Bindung relativ zum Claudinexpressionsniveau (YFP- bzw. GFP-Signal). cCPE-S231R/S313H band deutlich stärker als cCPEwt an Cldn1, -2 und -5, während die Bindung an Cldn3 und -7 unverändert blieb und für Cldn4 und -6 leicht sank. Mittelwerte ± SEM. Einseitige ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. * vs. cCPEwt oder wie angegeben. n ≥ 3. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 (Piontek *et al.* 2019).

Über Homologiemodelle für die entsprechenden Claudine im Komplex mit cCPE-SRSH konnten die experimentellen Bindungsdaten auch mechanistisch verifiziert werden (s. Abschnitt 4.1.1).

7.3 Expression von Claudinen in Bronchialkarzinomzelllinien

In den Bronchialkarzinomzelllinien PC-9 (NSCLC) und SK-MES-1 (bronchiales Plattenepithelkarzinom) wurde die Expression der Claudine 1 – 9 mittels Western Blot analysiert (Abb. 30). Die Western Blots wurden von Dr. A. Piontek angefertigt und ausgewertet. Die Zelllinie PC-9 exprimiert die Cldn1, -3, -4 und -7 stark. In SK-MES-1-Zellen werden schwach Cldn1 und -3 exprimiert.

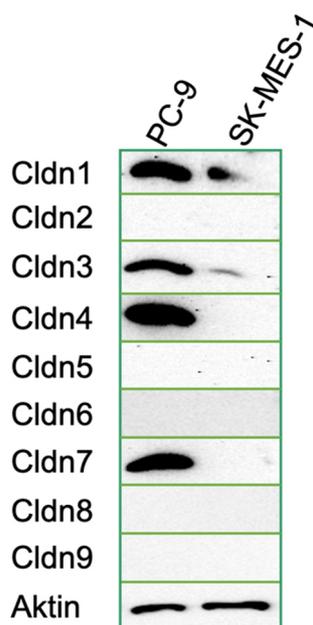


Abbildung 30 Claudinexpressionsmuster von Bronchialkarzinomzellen. Analyse der Expression von endogenem Cldn1 – 9 in NSCLC (PC-9) und bronchialen Plattenepithelkarzinomzellen (SK-MES-1) mittels Western Blot. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Repräsentative Abbildung aus n = 3. (aus (Piontek *et al.* 2019).

7.4 Histopathologische Klassifizierung der Magenkarzinome

Nach der operativen Entfernung wurden aus den Magenkarzinomen Biopsien zu Forschungszwecken entnommen und teilweise fixiert. Mit dem fixierten Gewebe wurden Paraffinschnitte angefertigt, die mittels Hämatoxylin- und Eosinfärbung für die histopathologische Analyse aufgearbeitet wurden (Arbeitsgruppe für experimentelle und klinisch-chirurgische Forschung). Das Magenkarzinom von Patient 1 (Abb. 31 A) wurde als diffuses Adenokarzinom klassifiziert, welches stark dedifferenziert ist und invasiv wächst. Bei Patient 2 (Abb. 31 B) lag ein muzinöses Adenokarzinom vor. Zwar gibt es dysplastisches Wachstum, die drüsenähnliche Struktur des Magenepithels lässt sich dennoch gut erkennen und deutet auf eine gute Differenzierung der Zellen hin.

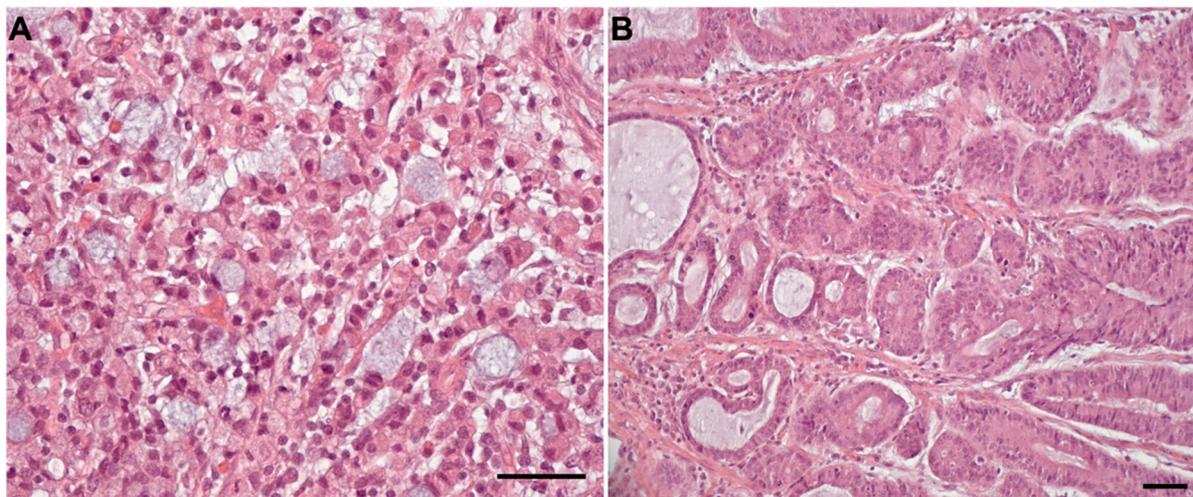


Abbildung 31 Hämatoxylin- und Eosinfärbung der primären Magenkarzinome. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des gefärbten Tumorgewebes der Patienten 1 (A) und 2 (B). A – diffuses Magenadenokarzinom, B – muzinöses Magenadenokarzinom. Die Abbildungen wurden von der Arbeitsgruppe für experimentelle und klinisch-chirurgische Forschung zur Verfügung gestellt (noch nicht publiziert). Maßstabsbalken 50 μm .

7.5 Impedanzspektroskopische Messungen an cCPE-behandelten *in vitro*-Epidermismodellen

Der Transport von Soluten erfolgt in Epithelien über zwei Wege. Während auf dem transzellulären Weg die apikale und basolaterale Zellmembran überwunden werden müssen, führt der parazelluläre Weg über die TJ. Die Durchlässigkeit eines Epithels für Ionen kann durch TER-Messungen bestimmt werden. In diesen Messungen wird der elektrische Gesamt Widerstand, der über einem Gewebe liegt, gemessen. Mithilfe der Impedanzspektroskopie kann der elektrische Widerstand eines Gewebes in den subepithelialen Widerstand (bspw. Bindegewebe und Muskulatur im nativen Gewebe) und den epithelialen Widerstand differenziert werden (Krug, Fromm, and Gunzel 2009).

Durch Messung der transepithelialen Impedanz eines mehrschichtigen Epithels über einen Frequenzbereich erhält man eine Kurve, deren Maxima den Resonanzfrequenzen des Epithels entsprechen. Die Position und die Höhe der Resonanzfrequenzen werden durch die zelltypspezifischen Widerstands- und Kondensatoreigenschaften bestimmt. Für die Auswertung der Impedanzspektren kann ein Ersatzschaltkreis verwendet werden. Dieser besteht in einem epithelialen Monolayer aus sechs elektrischen Komponenten: dem Widerstand und der Kapazität der apikalen und basalen Membran, sowie den Widerständen der TJ und des Subepithels (Abb. 32) (Mannweiler *et al.*, in Revision).

In der Arbeitsgruppe wurde von R. Mannweiler, aufbauend auf etablierten Messverfahren zur Impedanzmessung (Fromm *et al.* 2009), eine impedanzspektroskopische Methode entwickelt, um die Barriereigenschaften von mehrschichtigen Epidermismodellen genauer zu betrachten. Mit dieser Messmethode ist es möglich, zwischen den Beiträgen des *Stratum*

corneum (SC) und der lebenden Zellen zum Gesamtwiderstand der Epidermis zu unterscheiden. Der Hauptwiderstand der lebenden Epidermisschichten wird hauptsächlich durch die TJ im *Stratum granulosum* (SG) gebildet (Mannweiler *et al.*, in Revision).

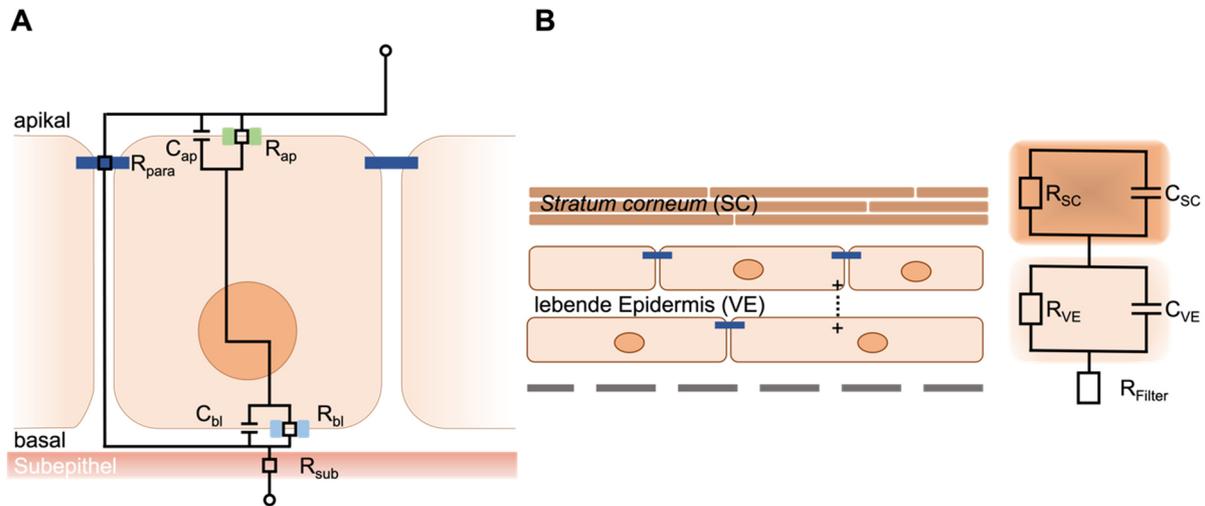


Abbildung 32 Ersatzschaltkreise für epitheliale Monolayer und rekonstruierte humane Epidermis. (A) Schematische Darstellung eines einschichtigen Epithels mit entsprechenden elektrischen Komponenten. Ionentransportvorgänge stellen Widerstände dar, Lipidmembranen verhalten sich wie Kondensatoren. TJ als R_{para} bezeichnet; sie stellt den größten Widerstand des parazellulären Ionentransports dar. R_{ap} , C_{ap} , R_{bl} und C_{bl} sind Widerstände bzw. Kondensatoren der apikalen und basolateralen Plasmamembran, R_{sub} ist Widerstand des subepithelialen Gewebes bzw. der Zellkultureinsätze. **(B)** Schema der rekonstruierten humanen Epidermis mit Model für deren elektrische Komponenten. ap – apikal, bl – basal, C – Kondensator, para – parazellulär, R – Widerstand, SC – *Stratum corneum*, sub – Subepithel, VE – lebende Epidermis (*viable epidermis*) (nach Mannweiler *et al.*, in Revision).

Mithilfe dieser neuen Impedanzmessung sollte untersucht werden, ob sich ein claudinspezifischer Effekt von cCPE-Varianten auf die TJ in *in vitro*-Epidermismodellen nachweisen lässt. TJ in der Epidermis enthalten vorrangig Cldn1 und -4. Daher sollte die Barrieremodulierung mit den Varianten cCPEwt und -SSS untersucht werden. Dabei sollte cCPEwt vor allem auf Cldn4 und cCPE-SSS sowohl auf Cldn4 als auch auf Cldn1 einen Effekt zeitigen. Um diese genauer zu analysieren, wurden neben nativen RHE-Modellen, in denen beide Claudine exprimiert werden, auch Knockdown-Modelle verwendet, in denen jeweils Cldn1 oder -4 herunterreguliert waren. In den Messungen wurde jeweils zwischen dem Widerstand aufgrund der TJ-Barriere (Resonanzfrequenz f_{ve} , von engl. *viable epidermis*) und aufgrund des SC (Resonanzfrequenz f_{sc}) unterschieden (Abb. 33).

Dabei wurde deutlich, dass die Inkubation mit cCPE in keinem der Modelle einen Einfluss auf die Barriere des SC hatte, sondern seine Wirkung auf die TJ in den lebenden Zellschichten begrenzt war (Abb. 33 A - D).

In dem nativen RHE-Modell wurde die TJ-Barriere sowohl durch cCPEwt als auch -SSS geschwächt (unbehandelt: $1,43 \pm 0,05$, cCPEwt: $2,13 \pm 0,12$, $p < 0,0001$ vs. unbehandelt, cCPE-SSS: $1,90 \pm 0,07$, $p = 0,002$ vs. unbehandelt), der Nichtbinder cCPE-YALA hatte jedoch keinen Einfluss auf die Barriere ($1,54 \pm 0,04$) (Abb. 33 A). Die Behandlung mit der Kontroll-siRNA scheint die parazelluläre Barriere insgesamt etwas geschwächt zu haben, sodass der

Einfluss der cCPE-Varianten evtl. überlagert wurde (Abb. 33 B). Durch den Knockdown von Cldn1 wurde die parazelluläre Barriere ebenfalls so stark beeinträchtigt, dass die TJ-Modulierung über cCPE-Varianten keinen Einfluss mehr hatte (Abb. 33 C). In dem Cldn4-Knockdownmodell wurde die TJ-Barriere hingegen durch cCPEwt ($1,90 \pm 0,04$, $p = 0,002$) und cCPE-SSS ($2,04 \pm 0,06$, $p < 0,0001$) geschwächt. Die Negativkontrolle cCPE-YALA zeigte auch in diesem Modell keinen Einfluss auf die parazelluläre Barriere (unbehandelt: $1,56 \pm 0,03$, cCPE-YALA: $1,61 \pm 0,02$) (Abb. 33 D).

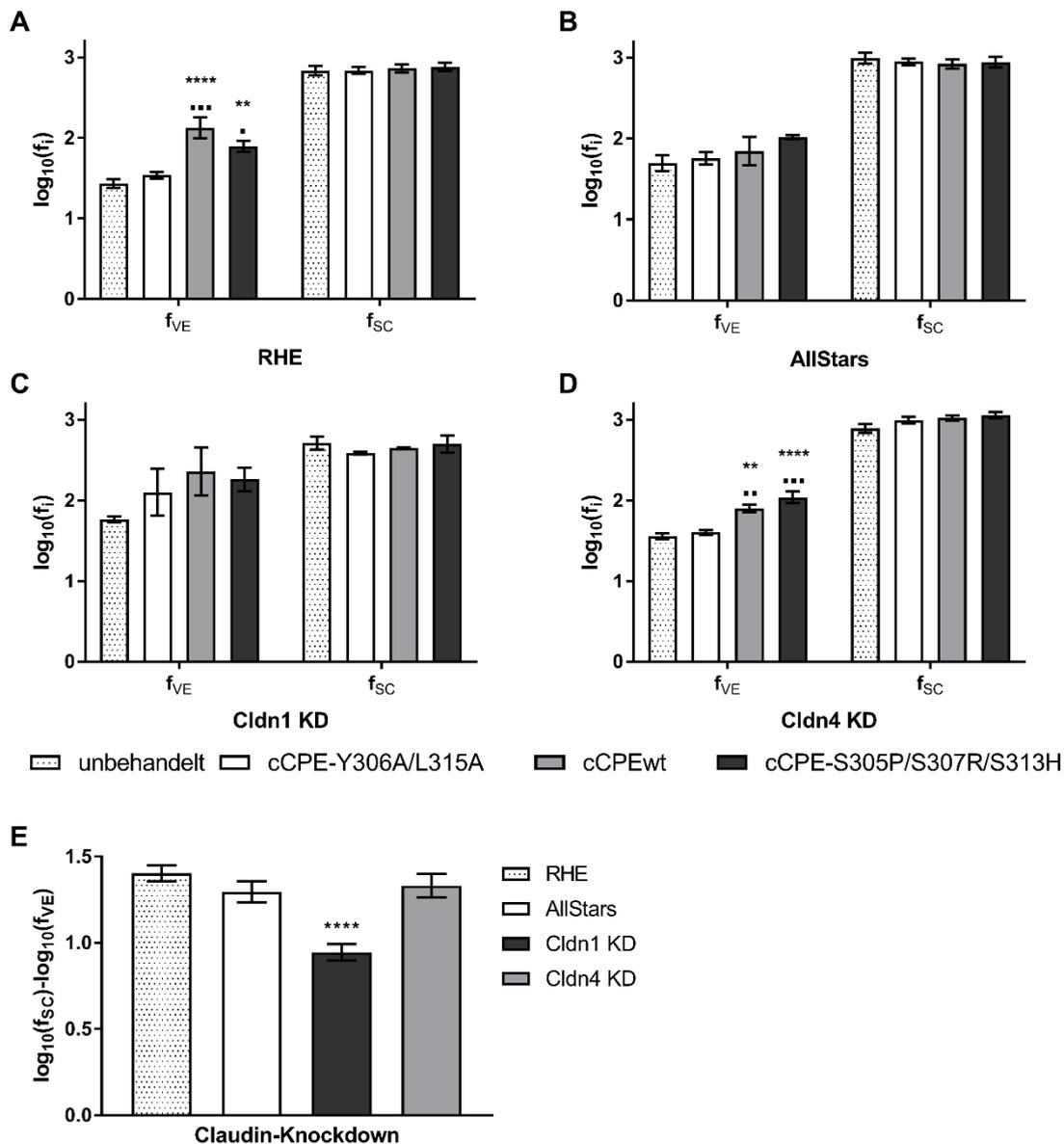


Abbildung 33 *In vitro*-Modulierung der epidermalen Barriere durch Entfernung von Cldn1 und -4 aus den Tight Junctions. Impedanzmessung an RHE-Modellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 µg/ml der jeweiligen GST-cCPE-Varianten im basalen Mediumkompartiment. Mithilfe der Impedanzmessung können die Beiträge des SC (f_{SC}) und des parazellulären Widerstandes durch die TJ im SG (f_{VE}) zum gesamten transepidermalen Widerstand unterschieden werden. Mittelwerte der Resonanzfrequenzen (f) \pm SEM. **(A – D)** Claudinbindende cCPE-Varianten haben einen Einfluss auf die TJ-Barriere, aber nicht auf die Barriere des SC. **(A)** cCPEwt und -SSS öffneten TJ in RHE. **(B)** Schwacher, barriereöffnender Effekt in der RHE durch AllStars siRNA (Negativkontrolle des Knockdowns). Dieser wurde durch cCPEwt und -SSS leicht verstärkt. **(C)** Claudinbindende cCPE-Varianten hatten nur geringen Effekt auf TJ-Barriere in Cldn1-Knockdownmodell der RHE. **(D)** Nach Cldn4-

Knockdown wurde epidermale Barriere durch Bindung von cCPEwt und -SSS an Cldn1 geschwächt. **(E)** Einfluss der Claudine 1 und -4 auf epidermale TJ-Barriere. Cldn1-Knockdown in der RHE führte zu deutlicher Verminderung der parazellulären Barriere, während Knockdown von Cldn4 keinen Einfluss auf diese hatte. Mittelwerte \pm SEM. (A) n = 8, (B – E) n = 4. Einseitige ANOVA mit Post-hoc Tukey-Test. * vs. unbehandelt (A – D) bzw. vs. RHE (E), ■ vs. cCPE-YALA. ■ p < 0,05, ** p < 0,01, ■■■ p < 0,001, ****, ■■■■ p < 0,0001.

Ein Vergleich der unbehandelten RHE-Modelle zeigte, dass durch einen Cldn1-Knockdown die TJ-Barriere deutlich verringert wird, wohingegen sich ein Cldn4-Knockdown nicht auf diese auswirkt (Abb. 33 E).

Anhand dieser Messungen konnte gezeigt werden, dass sowohl cCPEwt als auch cCPE-SSS die TJ-Barriere in der Epidermis öffnen können.

8 Verzeichnis der eigenen Publikationen

Journal

Beier LS, Rossa J, Woodhouse S, Bergmann S, Kramer HB, Protze J, Eichner M, Piontek A, Vidal-y-Sy S, Brandner JM, Krause G, Zitzmann N, Piontek J (2019) **Use of modified *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments for claudin targeting in liver and skin cells**. Int. J. Mol. Sci. 20(19): 4774

Piontek A, Eichner M, Zwanziger D, **Beier LS**, Protze J, Walter W, Theurer S, Schmid KW, Führer-Sakel D, Piontek J*, Krause G* (*shared last authorship) (2019) **Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin**. Mol. Oncol.14(2) :261-276

Ein weiteres Manuskript, welches Ergebnisse dieser Arbeit beinhaltet, befindet sich in Revision (Ehlen L, Arndt J, Bischoff P, **Beier LS**, Piontek J, Loch FN, Winkler L, Treue D, Beyer K, Schineis C, Lasucher JC, Kreis ME, Kamphues C **Patient-derived organoids recapitulate individual properties of gastric and gastroesophageal junction cancer in vitro**).

Konferenzbeiträge

Beier, LS. „Structure-based modification of *Clostridium perfringens* enterotoxin to target claudins” GRK 2318 Winter School 2017, 07./08. Dezember 2017, Berlin, Deutschland (Vortrag)

Beier, LS., Piontek, A., Protze, J., Fromm, A., Lee, IM., Krause, G., Piontek, J. „Targeting of claudins by CPE-based modular biologicals” GRK 2318 Summer School 2018, 17. – 19. September 2018, Templin, Deutschland (Poster/Vortrag)

Beier, LS., Piontek, A., Protze, J., Fromm, A., Lee, IM., Bojarski, C., Schumann, M., Rossa, J., Krause, G., Piontek, J. „Targeting of claudins by CPE-based modular biologicals” GRK 2318 Summer School 2019, 20./21. September 2019, Berlin, Deutschland (Poster/Vortrag)

Beier, LS., Piontek, A., Eichner, M., Protzem J., Zwanziger, D., Rossa, J., Bergmann, S., Brandner, JM., Zitzmann, N., Krause, G., Piontek, J. „Claudin targeting by modular biologicals based on *Clostridium perfringens* enterotoxin“ ASCB/EMBO 2019 Meeting, 07. – 11. Dezember 2019, Washington, DC, USA (Poster)

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.