

# Transiente Öffnung der Blut-Hirnschranke für kleine Moleküle durch Claudin-5-Modulatoren

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

Christian Tscheik  
aus Berlin

2014

Die Dissertation wurde in der Zeit vom 15. September 2009 bis zum 31. Dezember 2013 unter der Leitung von PD Dr. Ingolf E. Blasig am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ingolf E. Blasig
2. Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl

Disputation am 29.01.2015

## Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank PD Dr. Ingolf Blasig für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe der Molekularen Zellphysiologie am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie durchführen zu können. Auch für die Teilnahme an diversen internationalen und nationalen Tagungen und dem damit verbundenen wissenschaftlichen Austausch möchte ich mich bedanken.

Bei Prof. Dr. Günther Weindl möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Auch möchte ich mich aufgrund der guten Betreuung während und nach der Arbeit bei Dr. Giovanna Del Vecchio und Dr. Lars Winkler bedanken.

Natürlich gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die gute und motivierende Stimmung, besonders aber Jimmi Cording und Ramona Günther.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Burkhard Wiesner und Jenny Eichhorst für die vielen hilfsbereiten Stunden am Mikroskop.

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich für die Unterstützung und nötige Ablenkung während des Verfassens dieser Arbeit bedanken. Hierbei sei noch Vogel erwähnt, der die Arbeit ohne Sachverstand korrekturgelesen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, ohne die ich nie in die Lage gekommen wäre, diese Arbeit zu verfassen und meinem Bruder der mich soweit er konnte unterstützt hat. Es schmerzt mich sehr, dass mein Vater nach seinem viel zu frühen Tod den Abschluss meiner Arbeit nicht mehr miterleben kann. Danke dir für alles!

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Funktion von Epithelien und Endothelien . . . . .	1
1.2 Notwendigkeit der Auffindung von Modulatoren für die Blut-Hirnschranke	1
1.3 Molekularer Aufbau der <i>tight junctions</i> und die trans- und parazelluläre Abdichtung . . . . .	3
1.3.1 Das Rückgrat der <i>tight junctions</i> : Claudine . . . . .	4
1.3.1.1 Claudin-5 und die Blut-Hirnschranke . . . . .	10
1.3.2 Weitere <i>tight junction</i> und <i>tight junction</i> -assoziierte Proteine . . . .	11
1.3.2.1 Occludin . . . . .	11
1.3.2.2 Trizellulin . . . . .	12
1.3.2.3 <i>Zonula occludens</i> . . . . .	12
1.4 Überwindung von Gewebeschranken . . . . .	13
1.4.1 Absorptionsverstärkende Substanzen . . . . .	14
1.4.1.1 Detergenzien und oberflächenaktive Stoffe . . . . .	14
1.4.1.1.1 Caprat . . . . .	15
1.4.1.2 Peptide und Ribonukleinsäure-Interferenz . . . . .	18
1.5 Hochdurchsatz-Screening: Möglichkeiten und Limitationen . . . . .	19
1.6 Zielstellung . . . . .	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Material . . . . .	22
2.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	30
2.2.1 Transformation von Plasmid DNS . . . . .	30
2.2.2 Plasmid-Isolierung aus Bakterien . . . . .	30
2.2.3 Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentration und -Reinheit . . .	30
2.2.4 Agarosegelelektrophorese . . . . .	30
2.2.5 Isolierung von DNS aus einem Agarosegel . . . . .	30
2.2.6 Klonierung von Claudin-5 in Vektoren mit fluoreszierenden Fusions- proteinen . . . . .	31
2.2.7 <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i> . . . . .	31
2.3 Biochemische Methoden . . . . .	32
2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA . . . . .	32
2.3.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . .	32

2.3.3	Westernblot und Immunodetektion von Proteinen auf Membranen . . .	32
2.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	33
2.4.1	Kultivierung von Zellen . . . . .	33
2.4.2	Test auf Mykoplasmen . . . . .	34
2.4.3	Vitalitätstest eukaryotischen Zellen mittels Neutralrot und MTT . .	34
2.4.4	Transfektion von eukaryontischen Zellen . . . . .	35
2.4.5	Sortieren von stabil transfizierten eukaryontischen Zellen . . . . .	35
2.4.6	Applikation von Testsubstanzen . . . . .	36
2.4.7	Herstellung von Proteinlysaten für SDS-Gelelektrophorese . . . . .	37
2.4.8	TER und Permeabilitätsuntersuchungen eukaryontischer Zellen . . .	37
2.4.9	Präparation von Gehirn-Kapillaren und primären Endothelzellen aus der Maus . . . . .	39
2.4.10	Konfokale Mikroskopie . . . . .	39
2.4.10.1	Immunfluoreszenz . . . . .	39
2.4.10.2	Immunfluoreszenz von Zellen auf Filtern . . . . .	40
2.4.10.3	Lebendzellfärbungen . . . . .	41
2.4.10.4	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) . . . . .	41
2.4.10.5	Bestimmung und Quantifizierung von Claudin-Anreicherung in Zell-Zellkontakten . . . . .	42
2.4.11	Hochdurchsatz-Screening . . . . .	43
2.4.12	Screen mit siRNA . . . . .	44
2.4.13	Messung der Bindung von BO1 zu Claudinen . . . . .	45
2.5	Statistik und Software . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Claudin-5-YFP exprimierende HEK-293 Zellen als Modell der <i>tight</i> <i>junction</i> -Modulation der Blut-Hirnschranke . . . . .	47
3.2	Etablierung von Kontrollsubstanzen und der manuellen Versuchsansätze . .	47
3.2.1	Reduktion der Claudin-5 Proteinmenge mittels einer Claudin-5 spezifischen <i>small interfering RNA</i> . . . . .	48
3.2.2	Reduktion der Claudin-5 <i>trans</i> -Interaktion mit Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	49
3.2.3	Caprat reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 . . . . .	50
3.2.3.1	Charakterisierung der Wirkungsweise von Caprat in dem <i>tight junction</i> -Modell . . . . .	53
3.2.3.2	Charakterisierung der Wirkungsweise von Caprat in endogen <i>tight junction</i> -enthaltenen Zellen . . . . .	56
3.2.3.3	Charakterisierung der Wirkungsweise von Caprat auf endogenes Claudin-5 . . . . .	60
3.3	Hochdurchsatz-Screening . . . . .	63
3.4	Validierung der Hochdurchsatz-Screening <i>hits</i> . . . . .	66

3.4.1	BO1 reduziert konzentrations- und zeitabhängig die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 in dem <i>tight junction</i> -Modell . . . . .	67
3.4.2	BO1 reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 in endogenen <i>tight junction</i> -enthaltenen Zellen . . . . .	68
3.4.3	BO1 reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 in primären Gehirnkapillar-Endothelzellen . . . . .	70
3.4.4	BO1 Untersuchungen <i>in situ</i> . . . . .	71
3.4.5	Charakterisierung von MDCK-I, MDCK-II, MDCK-II FLAG-Claudin-5, Caco-2, IPEC-J2 und bEnd5 Zellen . . . . .	71
3.4.6	Funktionale Untersuchungen zum BO1-Effekt . . . . .	72
3.4.7	BO1 bindet spezifisch an Claudin-5 . . . . .	78
3.4.8	BO1 besitzt in den wirksamen Konzentrationen keine Zytotoxizität	78
3.4.9	Struktur und chemisch-physikalische Eigenschaften von BO1 . . . . .	79
3.4.10	Derivatisierung von BO1 . . . . .	80
3.4.11	Erste Untersuchungen der BO1 Derivate . . . . .	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
4.1	TJ-Modelle zur Untersuchung der Claudin-5-Modulation . . . . .	82
4.2	Auswahl bekannter Barriere-Modulatoren und ihre Wirkung auf Claudin-5	85
4.2.1	Caprat als Modulator von Cld5 . . . . .	85
4.2.1.1	Der Wirkmechanismus von Caprat . . . . .	86
4.2.2	Weitere Absorbtiionsverstärker: Methyl- $\beta$ -cyclodextrin und siRNA .	89
4.3	Auffindung neuer BHS-Modulatoren: Das Hochdurchsatz-Screening . . . . .	91
4.4	BO1, ein neuer Modulator der Claudin-5 <i>trans</i> -Interaktion . . . . .	93
4.5	BO1 und andere Absorptionsverstärker im Vergleich . . . . .	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der eigenen Publikationen</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>129</b>
10.1	Wirkung von Alkylglycerolen, Gamma-Linolensäure, CC-Chemokin-Ligand-2, Dimethylsphingosin und RMP-7 auf Claudin-5 . . . . .	129
10.2	Auf die <i>cis</i> -Interaktion von Claudin-5 hat BO1 keine Wirkung . . . . .	130
10.3	Kikume, ein photoschaltbares Protein . . . . .	130

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Transportwege am Beispiel der Blut-Hirnschranke . . . . .	5
1.2	Schematische Darstellung der Topologie und Interaktionen, sowie die räumliche Struktur von klassischen Claudinen . . . . .	9
1.3	Schematische Darstellung des vorhergesagten parazellulären Wirkmechanismus von Caprat . . . . .	16
2.1	Verwendete Substanzen für die Etablierung der manuellen Versuchsansätze, sowie potentielle Kontrollen für das HDS . . . . .	36
2.2	Bestimmung der Kontaktanreicherung von Claudin-5 . . . . .	42
2.3	Experimenteller Ansatz und das resultierende <i>microscale thermophoresis</i> Signal . . . . .	46
3.1	HEK-293, stabile Expression von Claudin-5-YFP . . . . .	47
3.2	Claudin-5 <i>small interfering RNA</i> reduziert den Claudin-5-YFP Proteingehalt in HEK-293 Zellen . . . . .	48
3.3	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin reduziert den Claudin-5-YFP Gehalt an Zell-Zellkontakten von HEK-293 Zellen . . . . .	49
3.4	Kalziummangel hat keine Auswirkungen auf <i>tight junction</i> -Proteine und Morphologie der HEK-293 Claudin-5-YFP Zellen . . . . .	50
3.5	Caprat reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5-YFP in HEK-293 Zellen . . . . .	51
3.6	Caprat reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5-YFP unabhängig von der basalen zu apikalen Lokalisation in HEK-293 Zellen . . . . .	53
3.7	Caprat reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 in Gegenwart von Kalzium und Magnesium . . . . .	53
3.8	Caprat reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5-mCherry . . . . .	54
3.9	Caprat reduziert die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung . . . . .	54
3.10	Caprat wirkt dem Effekt des Kalziummangels in HEK-293 Zellen entgegen . . . . .	55
3.11	Caprat reduziert die Membranlokalisation von FLAG-Claudin-5 in MDCK-II Zellen . . . . .	57
3.12	Caprat reduziert den membranständigen und zytoplasmatischen Gehalt von F-Aktin in MDCK-II FLAG-Claudin-5 Zellen . . . . .	58
3.13	Caprat reduziert den FLAG-Claudin-5 Gehalt in der zytoskelettalen und membranalen Fraktion von MDCK-II Zellen . . . . .	59
3.14	Caprat erhöht die Permeabilität von kleinen Molekülen in MDCK-II FLAG-Claudin-5 Zellen . . . . .	59
3.15	Caprat stört die membranale Lokalisation von Claudin-5 in bEnd5 Zellen . . . . .	60

3.16	Caprat stört die membranale Lokalisation von Claudin-5 und des Aktin Zytoskeletts in bEnd5 Zellen . . . . .	61
3.17	Schematische Darstellung des Z <sup>i</sup> -Faktors . . . . .	64
3.18	Die Kontaktanreicherung zwischen HEK-293 Claudin-5-YFP und anderen Zelllinien ist limitiert . . . . .	65
3.19	Messung der YFP-Intensitäten für die Bestimmung des Z <sup>i</sup> -Faktors . . . . .	65
3.20	Ausgewählte <i>hits</i> des Hochdurchsatz-Screens . . . . .	66
3.21	BO1 reduziert konzentrationsabhängig die <i>trans</i> -Interaktion von Claudin-5 in HEK-293 Claudin-5-YFP Zellen . . . . .	68
3.22	BO1 reduziert den Claudin-5 Gehalt in der Plasmamembran von MDCK-II FLAG-Claudin-5 Zellen . . . . .	69
3.23	BO1 reduziert den Claudin-5 Gehalt in der Plasmamembran von MDCK-I Zellen . . . . .	70
3.24	BO1 führt zu einer Reduktion von Claudin-5 in der Plasmamembran von primären Gehirn-Kapillar-Endothelzellen . . . . .	70
3.25	BO1 hat keinen Effekt auf Claudin-5 und <i>zonula ccludens-1</i> von Kapillaren	71
3.26	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien . . . . .	72
3.27	BO1 reduziert den elektrischen Widerstand und erhöht die Permeabilität von <i>Lucifer Yellow</i> durch MDCK-II FLAG-Claudin-5 aber nicht in MDCK-II Zellen . . . . .	73
3.28	Charakterisierung des BO1 Effektes in Caco-2 Zellen . . . . .	75
3.29	BO1 erhöht die Permeabilität von IPEC-J2 Zellen und führt zu einer Internalisierung von Claudin-5 . . . . .	76
3.30	Effekt von BO1 auf weitere Zelllinien . . . . .	77
3.31	Spezifische Bindung von BO1 an Claudin-5 . . . . .	78
3.32	BO1 hat keine zytotoxischen Auswirkung . . . . .	78
3.33	Struktur, Formel und weitere chemisch-physikalische Eigenschaften von BO1	79
3.34	Struktur, Formel und weitere chemisch-physikalische Eigenschaften der Derivate von BO1 . . . . .	80
10.1	RMP-7 führt zu einer morphologischen Veränderung der Plasmamembran von HEK-293 Claudin-5 YFP Zellen . . . . .	129
10.2	BO1 hat keine Wirkung auf die <i>cis</i> -Interaktion von Claudin-5 . . . . .	130
10.3	Umschalten von Claudin-5-Kikume . . . . .	131

# Tabellenverzeichnis

1.1	Prävalenzen von ZNS-Erkrankungen Stand 2010 . . . . .	2
1.2	Claudine und ihre Expression . . . . .	6
2.1	Bakterienstämme . . . . .	22
2.2	Verwendete eukaryontische Zellen . . . . .	22
2.3	Größenstandard-Marker für Agarose und SDS-Gele . . . . .	22
2.4	Kits . . . . .	23
2.5	Primärantikörper . . . . .	23
2.6	Sekundärantikörper . . . . .	24
2.7	Fluoreszierende-Farbstoffe . . . . .	24
2.8	Plasmide . . . . .	25
2.9	Enzyme . . . . .	25
2.10	Oligonukleotide . . . . .	26
2.11	Geräte . . . . .	26
2.12	Chemikalien . . . . .	27
2.13	Verbrauchsmaterialien . . . . .	29
2.14	Ansatz für Claudin-5 Amplifikation und PCR-Programm . . . . .	31
2.15	SDS-Proben- und Laufpuffer . . . . .	32
2.16	Transferpuffer und TBS-T . . . . .	33
2.17	Kultivierungsbedingungen eukaryontischer Zellen . . . . .	33
2.18	Extraktions-, Solubilisierungs-Puffer & Benzonase-Mix . . . . .	37
2.19	Bedingungen der Zellen für TER und Permeabilitätsuntersuchungen . . . . .	38
2.20	Bedingungen für Zellen und Kapillaren . . . . .	40
2.21	Fixierungs-, Blockierungs- und Waschpuffer . . . . .	40
2.22	Detektion fluoreszierender Proteinen . . . . .	41
2.23	RIPA-Puffer . . . . .	46
3.1	Zusammenfassung der Effekte von Caprat und Kalzium- und Magnesium- mangel . . . . .	62
3.2	Zusammenfassung der Effekte weiterer Absorptionsverstärker . . . . .	62
4.1	Verschiedene Absorptionsverstärker . . . . .	97

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AV	absorptionsverstärkenden Substanzen
BHS	Blut-Hirnschranke
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C10	Caprat
Cld	Claudine
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Einheiten (Dimensionslos)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZD	extrazelluläre Domäne
F-Aktin	filamentöses Aktin
FD	Fluorescein isothiocyanate-dextran
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer
HBSS <sup>-/-</sup> , <sup>+/+</sup>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> ohne, mit Kalzium und Magnesium
HDS	Hochdurchsatz- <i>Screening</i>
HEK-293	humane embryonale Nierenzelllinie
IF	Immunfluoreszenz
JAM	junktionales Adhensionsmolekül
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin
Marvel	<i>MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link</i>
MDCK	Madin-Darby canine kidney Zellen
MM	molekulare Masse
MST	<i>microscale thermophoresis</i>
MTT	3, (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
NEAA	Non-Essential Amino Acid (Nicht essentielle Aminosäuren)
NRT	Neutralrottest
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1
PEI	Polyethylenimin
pGKEZ	primäre Gehirn-Kapillar-Endothelzellen
P <sub>k</sub>	Permeationskoeffizient
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNS, RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMP(s)	<i>tight junction associated marvel protein(s)</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin

**Abkürzung**

TER

TJ

v/v

WB

w/v

YFP

ZNS

ZO

 $\lambda_{em}$  $\lambda_{ex}$ 

Aminosäuren:

D

C

F

G

L

K

P

W

Y

FLAG

**Bedeutung**

transzellulärer elektrischer Widerstand

*tight junction*

Volumen pro Volumen

Westernblot

Gewicht pro Volumen

gelb fluoreszierendes Protein

zentrales Nervensystems

*zonula occludens*

Emissionswellenlänge

Anregungswellenlänge

Asparaginsäure

Cystein

Phenylalanin

Glycin

Leucin

Lysin

Prolin

Tryptophan

Tyrosin

DYKDDDDK

# 1. Einleitung

## 1.1. Funktion von Epithelien und Endothelien

Die äußerste Zellschicht eines vielzelligen Organismus wird durch Epithelien abgegrenzt, welche Barrieren gegenüber dem umgebenen Milieu bilden. Höhere Organismen besitzen eine Vielzahl solcher Barrieren wie z.B. die Bürstensaumzellen des Darmlumens oder die auskleidenden Zellen des Nierentubulus. Epithelien bestehen aus einer polarisierten, ein- oder mehrlagigen Zellschicht, wobei die apikale Seite dem äußeren Lumen und die basale Seite dem darunter liegendem Gewebe zugewandt ist. Proteine (z.B. Transportproteine, Kanäle und Rezeptoren) innerhalb der apikalen Plasmamembran können nicht zur basolateralen Seite gelangen und umgekehrt. Die Proteinzusammensetzung in diesen Membrankompartimenten ist unterschiedlich und erfüllt verschiedene Funktionen, wie z.B. den gerichteten Transport von Molekülen. Eine besondere Form von Barrieren wird durch Endothelien gebildet, die die Gefäßinnenwände auskleiden und so das umliegende Gewebe von Blut oder Lymphe separieren. Hierzu gehören z.B. die Blut-Hirnschranke (BHS), die Blut-Retinaschranke oder die Blut-Hodenschranke. Die gemeinsame Funktion von Barriere-bildenden Zellen ist die Regulation des einwärts und auswärts gerichteten Transports. Hierdurch wird die Aufrechterhaltung der Homöostase der Organe ermöglicht. Es existieren zwei Transportwege: Der transzelluläre aktive Transport durch die Zelle und damit das Durchqueren von apikaler und basolateraler Plasmamembran und die parazelluläre passive Diffusion durch den Zwischenraum von Zellen (Abb. 1.1; Frömter und Diamond 1972). Die Aufrechterhaltung der Polarisation der Zellen und die Regulation der parazellulären Permeabilität werden durch einen Multiproteinkomplex gewährleistet, den *tight junctions* (TJ). In Epithelien sind die TJ im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran zweier benachbarter Plasmamembranen, in Endothelien zumeist in der gesamten lateralen Plasmamembran lokalisiert (Günzel und Yu, 2013). Sie schließen den parazellulären Raum zwischen Epithel- und Endothelzellen und etablieren somit Gewebeschränken.

## 1.2. Notwendigkeit der Auffindung von Modulatoren für die Blut-Hirnschranke

Begleiterscheinung des geregelten Transports von Stoffen durch Gewebeschränken, insbesondere der stark regulierten BHS, ist die eingeschränkte Permeabilität von toxischen Stoffen. Diese Schutzfunktion stellt jedoch auch eine Barriere für Wirkstoffe dar. Die BHS blockiert den Durchtritt so gut wie aller großen Moleküle und 98 % aller kleinen Moleküle in das zentrale Nervensystem (ZNS), welche eine pharmakologische Wirkung aufweisen und verhindert somit deren Einsatz bei zerebralen Erkrankungen (Pardridge, 2003). So ist die Behandlung von z.B. neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Chorea Huntington), Gehirntumoren, Schlaganfällen, Rückenmarksverletzungen und Schädel-

Hirn-Traumata nicht möglich oder ineffektiv (Pardridge, 2005). Im Fall der Multiplen Sklerose z.B. kann das Fortschreiten der Krankheit im ZNS nicht verhindert werden, da die verabreichten Medikamente lediglich in der Peripherie wirken. Dabei wäre die Behandlung vieler Erkrankungen, die das ZNS betreffen, grundsätzlich möglich, wenn die Medikamente ihren Wirkort erreichen würden (Vykhodtseva *et al.*, 2008). Die Prävalenzen von acht ZNS-assoziierten Krankheiten (Epilepsie, Schizophrenie, Alzheimer, Parkinson, Migräne, Schlafstörung, Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, Depression) in den sieben wichtigsten Pharmamärkten unterstreicht die große Anzahl von Patienten und die dringende Notwendigkeit die BHS zu überwinden (Tab. 1.1). Dementsprechend ist die Öffnung der BHS Gegenstand aktueller Forschung.

**Tab. 1.1:** Prävalenzen von ZNS-Erkrankungen Stand 2010

Land	EP	SH	AH	PA	MG	IN	ADHD	MDD
Deutschland								
Prävalenz (in Tsd.)	441	353	882	266	7.043	12.908	2.968	6.776
Prävalenz (in %)	0,5	0,5	1,1	0,3	10,6	18	4,2	8,3
Frankreich								
Prävalenz (in Tsd.)	350	288	651	183	4.167	9.148	2.215	2.915
Prävalenz (in %)	0,5	0,6	1	0,3	7,9	17	4,2	4,5
Italien								
Prävalenz (in Tsd.)	413	272	710	199	6.072	9.315	2.199	3.584
Prävalenz (in %)	0,7	0,5	1,2	0,3	11,6	18	4,2	5,9
Spanien								
Prävalenz (in Tsd.)	293	115	447	129	4.348	6.783	1.660	6.511
Prävalenz (in %)	0,6	0,3	1	0,3	11	17	4,2	14
UK								
Prävalenz (in Tsd.)	418	103	594	169	5.306	8.554	2.163	9.913
Prävalenz (in %)	0,7	0,2	1	0,3	10,3	17	4,2	15,9
EU5								
Prävalenz (in Tsd.)	1.914	1.131	3.284	945	26.935	46.708	11.206	29.699
Prävalenz (in %)	0,6	0,4	1	0,3	10,3	18	4,2	9,4
US								
Prävalenz (in Tsd.)	2.096	2.561	2.197	692	28.839	41.904	10.846	16.339
Prävalenz (in %)	0,7	1	0,7	0,2	11,7	17	4,4	5,3
Japan								
Prävalenz (in Tsd.)	536	472	978	224	9.243	19.261	4.841	3.700
Prävalenz (in %)	0,4	0,4	0,8	0,2	8,4	18	4,4	2,9
Total								
Prävalenz (in Tsd.)	4.547	4.165	6.459	1.861	65.018	107.873	26.893	49.738
Prävalenz (in %)	0,6	0,7	0,9	0,2	10,5	17	4,3	6,6

Tsd.=Tausend, EP=Epilepsie, SH=Schizophrenie, AK=Alzheimer-Krankheit, PK=Parkinson-Krankheit, MG=Migräne, IN=Insomnie (Schlafstörung), ADHD=Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, MDD=Depression (*Major Depression*). Die Daten zu SH, MG und ADHD basieren auf Patienten > 15-20 Jahre. Quelle: The CNS Market Outlook, SCRIP Business Insights 2011.

Hierbei werden verschiedene Ansätze verfolgt, wie z.B. die Entwicklung von absorptionsverstärkenden Substanzen, welche den Durchtritt für Pharmaka durch die BHS und Gewebeschränken allgemein verstärken sollen. Es sind verschiedene Absorptionsverstärker, mit unterschiedlichen Eigenschaften, experimentell charakterisiert worden, deren Verwendung in der klinischen Praxis jedoch äußerst selten ist. In klinischen Studien oder bereits zuvor scheiterten diverse permeabilitätssteigernde Ansätze, so z.B. das ausgeschiedene Stoffwechselprodukt zahlreicher Pilzarten, Cytochalasin (Madara *et al.*, 1987), der Kalzium-Chelator Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA, Ma *et al.* 2000), die Detergenzien SDS und Triton X-100 (Hochmana und Artursson, 1994), sowie das Bradykinin agonistische Peptid RMP-7 (Gregor *et al.*, 1999; Emerich *et al.*, 2001). Für die BHS existiert eine einzige Substanz, die eine klinische Relevanz besitzt, das hyperosmolare Mannitol. Erstmals wurden Ratten 1980 intraarteriell hyperosmolare Substanzen appliziert, wobei die Osmolarität zu einem Flüssigkeitsverlust der Endothelzellen führte, wodurch Zugkräfte zwischen den Zellen entstanden, welches die BHS unmittelbar und transient öffnete (Rapoport *et al.*, 1980). Diese drastische Prozedur beinhaltet starke Nebenwirkungen, z.B. die Bildung von Ödemen, zudem sind Konzentrationen in molaren Dosen notwendig. In den letzten 40 Jahren ist es nicht gelungen, einen Absorptionsverstärker zu entwickeln, der spezifischer und ohne Nebenwirkung wirkt. Dem gegenüber steht eine wachsende Anzahl von Pharmaka, die eine geringe Bioverfügbarkeit im ZNS aufweisen. Damit diese dennoch zerebral eingesetzt werden können, müssen teilweise sehr invasive Eingriffe vorgenommen werden. So wird z.B. für eine lokale Chemotherapie von Hirntumoren das Ommaya-Reservoir verwendet, wobei ein Katheter in einen Hirnventrikel gelegt wird, um die BHS zu umgehen. Bei dieser Operation besteht neben dem Blutungs- und Narkoserisiko ein relativ hohes Risiko für Infektionen (10-20 %) und die Diffusion der Wirkstoffe ist zumeist begrenzt, sodass nicht alle Hirnareale erreicht werden (Schlegel *et al.*, 2001).

Die Gesamtheit aller Aspekte unterstreicht die dringende Notwendigkeit, Gewebeschränken und besonders die BHS spezifisch, transient und möglichst größenspezifisch zu öffnen, damit die Nebenwirkung so gering wie möglich gehalten werden können. In diesem Zusammenhang besteht die Auffassung, dass die Modulation von TJ ein Potential zur verbesserten Wirkstoffaufnahme besitzt (Deli, 2009).

### 1.3. Molekularer Aufbau der *tight junctions* und die trans- und parazelluläre Abdichtung

TJ werden im wesentlichen durch die transmembranalen TJ-assoziierten Marvel-Proteinen (TAMPs: Occludin, Trizellulin und MarvelD3, Marvel: *MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*), *junctional adhesion molecules* (JAM) und Claudine (Cld) sowie verschiedenen, intrazellulären Gerüstproteinen wie *zonula occludens* Proteine 1-3 (ZO-1-3) gebildet (Furuse *et al.*, 1998a; Furuse, 2010; Steed *et al.*, 2009; Raleigh *et al.*, 2010). Sie polymerisieren durch Protein-Wechselwirkungen innerhalb der Plasma-

membran zu TJ-Strängen. Die TJ-Stränge benachbarter Zellen interagieren im extrazellulären Raum, sodass die TJ die Zellen ringförmig umgeben und den Zwischenraum lückenlos verschließen. In der Gesamtheit bilden die Zellen zusammen mit ihren TJ eine Gewebeschranke, welche den trans- und parazellulären Fluss regulieren. Die transzelluläre Permeabilität ist durch die Lipidoberfläche der Zellen und auswärts oder einwärts gerichteten Transportaktivitäten (z.B. ABC Transporter oder Glut-1) limitiert (Kinne, 1997). Generell werden nur kleine lipophile Moleküle passiv durch die Schranke über den transzellulären Weg absorbiert, wenn sie keine Substrate entsprechender Transporter sind. Große hydrophile Substanzen benötigen einen aktiven Permeationsprozeß, wie z.B. den *Carrier*-vermittelten Transport (Abbott, 2005). Die parazelluläre Permeabilität kann in den verschiedenen Gewebeschranken, abhängig von der Kombination der exprimierten TJ-Proteine und deren Expressionsniveau, stark variieren. In diesem Zusammenhang bietet die Messung des transzellulären elektrischen Widerstands (TER) eine Möglichkeit, die parazelluläre Ionenpermeabilität zu bestimmen (Powell, 1981). Zwischen verschiedenen Zellschichten variiert dieser Wert um den Faktor  $10^5$  (Van Itallie und Anderson, 2006). Somit regulieren die TJ den parazellulären Fluss von kleinen hydrophilen Substanzen, Ionen und Wasser. Insgesamt sind über 40 Transmembran-, Gerüst-, Signal- und Adaptorproteine bekannt, die zur räumlichen Organisation, Formierung und Funktion des TJ-Komplexes beitragen (González-Mariscal *et al.*, 2003; Schneeberger und Lynch, 2004; Schulzke *et al.*, 2012).

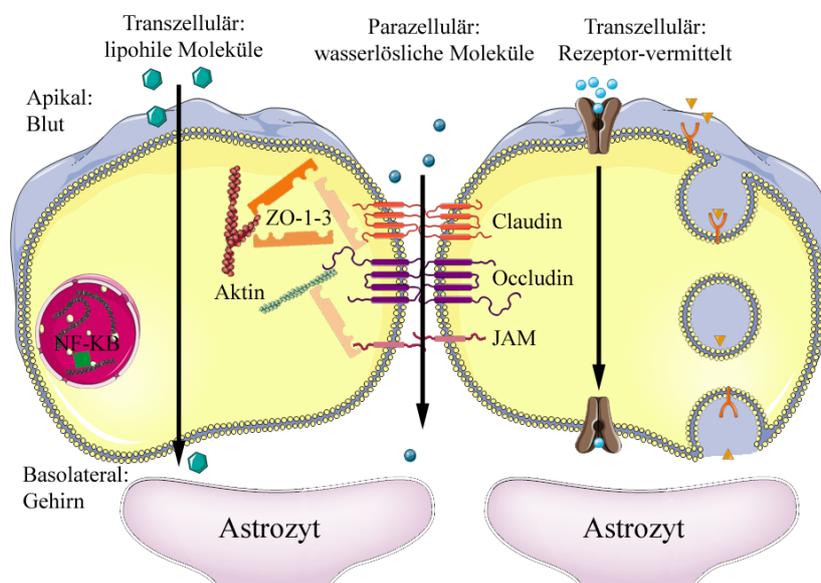
### 1.3.1. Das Rückgrat der *tight junctions*: Claudine

Die Proteinfamilie der Cld besteht bei den *Mammalia* aus 27 Mitgliedern und besitzt eine molekulare Masse von 20-27 kDa (Singh *et al.*, 2010; Mineta *et al.*, 2011). Sie können in TJ-freien Zellen *de novo* nach Transfektion TJ-ähnliche Stränge bilden und lokalisieren an Zell-Zellkontakten (Furuse *et al.*, 1998b; Piontek *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz werden Cld in zwei Gruppen eingeteilt, die klassischen (besitzen eine sehr ähnliche gemeinsame Sequenz; Tab. 1.2 K = ✓) und nicht klassischen (besitzen eine niedrige Sequenz-Übereinstimmung; Tab. 1.2 K = ✗) (Krause *et al.*, 2008). Obwohl die klassischen Cld eine sehr ähnliche Sequenz besitzen, kann deren Expression zu unterschiedlichen TJ-Charakteristika führen. Für Cld2 z.B. ist bekannt, dass es in die Bildung von parazellulären Poren für Kationen und Wasser (Radius 3,25–4 Å) involviert ist, während Cld5 den parazellulären Spalt für kleine Moleküle abdichtet (Van Itallie *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009; Nitta *et al.*, 2003). Somit unterscheiden sich die Cld in ihren Permeabilitätseigenschaften hinsichtlich der Größe und Ladung von Ionen oder kleinen Molekülen (Günzel und Yu, 2013). Cld werden in einer gewebe- und entwicklungsstadiumabhängigen Kombination in allen Epithelien und Endothelien exprimiert und führen zu sehr durchlässigen bis sehr dichten Barrieren, abhängig von den individuellen Eigenschaften der Cld (Tab. 1.2). So werden veränderte Expressionen, Lokalisationen oder Mutationen von Cld mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, die zumeist bestimmte Organe

betreffen, wodurch die Bedeutsamkeit der Cld in den verschiedenen Geweben hervorgehoben wird (Tab. 1.2). Die Gesamtheit der Permeabilitätseigenschaften wird daher im Wesentlichen durch die Kombination der Cld-Subtypen und ihrer Menge bestimmt (Furuse *et al.*, 1998a; Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2011).

Cld bestehen aus zwei extrazellulären Domänen (EZD1 und 2), einer intrazellulären Schleife und vier transmembranalen Domänen, wobei der relativ kurze C- und N-Terminus im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 1.2; Suzuki *et al.* 2014). Der C-Terminus der Cld ist wichtig für den Transport aus dem endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran (Rüffer und Gerke, 2004) und enthält, mit Ausnahme von Cld12, -19a, -21, und -24 bis -27 (Günzel und Yu, 2013), ein PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1)-Bindemotiv, worüber sie mit den PDZ-Domänen von ZO-1-3, MUPP-1 (Multi-PDZ Domäne Protein 1) und MAGI-1-3 (MAGUK invertiertes Protein 1-3, MAGUK: Membran-assoziierte Guanylat-kinase) interagieren können. Durch diese Interaktion werden die Cld mit dem Aktinzytoskelett verbunden, was für die Lokalisation und Dynamik der TJ von Bedeutung ist (Itoh *et al.*, 1999; Ikenouchi *et al.*, 2007; Van Itallie *et al.*, 2009).

Für die Bildung der Stränge interagieren die Cld über *trans* (Interaktion zwischen Cld in zwei benachbarten Zellen) und *cis* (zwischen Cld innerhalb einer Plasmamembran) (Blasig *et al.*, 2006; Piontek *et al.*, 2008, 2011). Der genaue Mechanismus für die Strangbildung ist noch nicht geklärt, jedoch scheinen die beiden EZD und die dritte transmembrane Domäne involviert zu sein (Rossa *et al.*, 2014). Die EZD1 liegt zwischen der ersten und zweiten transmembranalen Domäne, ist 42-56 Aminosäuren lang und ausschlaggebend an der abdichtenden und Poren-bildenden Funktion der Cld beteiligt (Krause *et al.*, 2008). Hierbei sind zwei Cysteine, die in allen Cld konserviert sind und 9-11 Aminosäuren auseinander liegen, essentiell für die Abdichtung, wobei sie wahrscheinlich eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden und die Faltung des gesamten Proteins unterstützen (Wen *et al.*, 2004). Nicht konservierte geladene Aminosäuren sind vermutlich für die Größen- und Ladungsselektivität von Poren-bildenden Cld verantwortlich



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Transportwege am Beispiel der Blut-Hirnschranke**

Transzellulär gelangen lipophile Moleküle und über die Rezeptor-vermittelte Aufnahme größere Moleküle, wie z.B. Glukose in das Gehirn. Parazellulär regulieren die TJ die Permeabilität von wasserlöslichen Molekülen. Die TJ sind über die ZO-Proteine oder direkt mit dem Aktinzytoskelett verbunden.

Tab. 1.2: Claudine und ihre Expression

Cld K	Expression	Funktion	Knock-out Maus, Überexpression	Assoziierte Erkrankungen	Literatur
1	✓ Epidermis, Darm, Luftröhre, Bronchien, Bowman-Kapsel (Niere), Leber (Hepatozyten, Gallengang und -blase), Auge, Speichel- und Brustdrüse, Bauchspeicheldrüse, Cochlea, Ovarium, Prostata, Plexus choroideus und Kapillarendothel (Gehirn)	Kation-Barriere, abdichtend für große Moleküle	Barriereverlust gegenüber Wasser und Makromolekülen (Stratum granulosum), sterben neonatal aufgrund von Dehydration	verminderte Expression in Hautkrankheiten (trockene Haut, Neurodermitis, Schuppenflechte), Ichthyose (Verhornungsstörung der Haut), sklerosierende Cholangitis (chronische Gallengangentzündung), akute akalkulöse und kalkulöse Cholezystitis (Akute Entzündung der Gallenblasenwand ohne und mit Gallenstein)	Furuse <i>et al.</i> 2002; Watson <i>et al.</i> 2007; Hadj-Rabia <i>et al.</i> 2004; Inai <i>et al.</i> 1999; Coyne <i>et al.</i> 2003a; Holmes <i>et al.</i> 2006; Grosse <i>et al.</i> 2012; Laurila <i>et al.</i> 2007; Németh <i>et al.</i> 2009
2	✓ Bowman-Kapsel (Niere), Cochlea, Lieberkühn-Krypten (Schleimhaut des Dün- und Dickdarms), Bronchien, Gallen- und blase, Darm, Proximaler Nierentubulus, Nebenhoden	Kation-Pore	Verminderte Resorption von Natrium, Chlorid und Wasser, führt zu Hyperkalzurie	Erhöhte Expression in akute kalkulöse Cholezystitis und entzündlichen Darmerkrankungen	Amasheh <i>et al.</i> 2002; Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002; Rahner <i>et al.</i> 2001; Kaarteenaho-Wiik und Soini 2009; Laurila <i>et al.</i> 2007; Németh <i>et al.</i> 2009; Holmes <i>et al.</i> 2006; Zeissig <i>et al.</i> 2007; Enck <i>et al.</i> 2001; Muto <i>et al.</i> 2010
3	✓ Lungenbläschen, Bronchien, Luftröhre, Gallengang und blase, Kapillarendothel (Gehirn), choroid plexus, Darm, aufsteigender dünner und dicker Teil der Henle-Schleife, Sammelrohr, Distales Nephron, Magen, Epidermis, Cochlea	Kation-Barriere, abdichtend für große Moleküle		Autoimmune Enzephalomyelitis, Glioblastom, erhöhte Expression in akuter kalkulöser Cholezystitis und diversen Krebsarten, zytosolische Lokalisation bei Schuppenflechte, verminderte Expression in entzündlichen Darmerkrankungen	Milatz <i>et al.</i> 2010; Wolburg <i>et al.</i> 2003; Kaarteenaho-Wiik und Soini 2009; Coyne <i>et al.</i> 2003a; Rahner <i>et al.</i> 2001; Morita <i>et al.</i> 1999a; Laurila <i>et al.</i> 2007; Németh <i>et al.</i> 2009; Meng <i>et al.</i> 2005; Holmes <i>et al.</i> 2006; Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002; Watson <i>et al.</i> 2007
4	✓ Lungenbläschen, Bronchien, Gallenblase, Darm, aufsteigender dünner Teil der Henle-Schleife, Sammelrohr, Distales Nephron, Harnblasenepithel, Magen, Epidermis	Kation-Barriere, mit Cld8 Anionen-Pore		Erhöhte Expression in akuter kalkulöser Cholezystitis und diversen Krebsarten, verminderte Expression in entzündlichen Darmerkrankungen	Michikawa <i>et al.</i> 2008; Hou <i>et al.</i> 2010; Kaarteenaho-Wiik und Soini 2009; Laurila <i>et al.</i> 2007; Németh <i>et al.</i> 2009; Holmes <i>et al.</i> 2006; Rahner <i>et al.</i> 2001; Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002
5	✓ Endothel, Blutgefäßen, Plexus choroideus (Gehirn), Glomerulus (Niere), Lunge, Luftröhre, Leberpfortader (Vena portae), Darm, Podocyten (Nierenkörperchen), Magen, Epidermis, Brust- und Bauchspeicheldrüse, Ovarium, Prostata, Nebenhoden, Hodenkanälchen	Kation-Barriere und gegenüber kleinen Molekülen	BHS permeabel für $\leq 800$ Da, Tod innerhalb von 10 h nach Geburt	Verminderte Expression in entzündlichen Darmerkrankungen, 3 Einzelnukleotid-Polymorphismen in Schizophrenie, Velo-cardio-faziales Syndrom (DiGeorge-Syndrom) führt zum Zusammenbruch der BHS	Nitta <i>et al.</i> 2003; Koda <i>et al.</i> 2011; Sun <i>et al.</i> 2004; Kaarteenaho-Wiik und Soini 2009; Coyne <i>et al.</i> 2003a; Morita <i>et al.</i> 1999a; Rahner <i>et al.</i> 2001; Holmes <i>et al.</i> 2006; Zeissig <i>et al.</i> 2007

Claudine und ihre Expression, Fortsetzung

Cld K	Expression	Funktion	Knock-out Maus, Überexpression	Assoziierte Erkrankungen	Literatur
6	✓ Podozyten (Nierenkörperchen), Darm, Proximaler Nierentubulus (neonatal), Geschmacksknospen	Evtl. Natrium- und Chlorid-Barriere, Expression während epithelialer Differenzierung	Kein Phänotyp, Überexpression führt in Epidermis zum Barriereverlust gegenüber großen Molekülen, Wasserverlust und neonatalem Tod		Sas <i>et al.</i> 2008; Abuazza <i>et al.</i> 2006; Hashizume <i>et al.</i> 2004; Anderson <i>et al.</i> 2008; Turksen und Troy 2002; Zhao <i>et al.</i> 2008; Holmes <i>et al.</i> 2006
7	✓ Distales Nephron, Lungenbläschen, Bronchien, Gallengang und -blase, Darm, Epidermis, Auge, Speichel- und Brustdrüse, Geschmacksknospe, Bauchspeicheldrüse, Prostata, Nebenhoden	Interagiert mit EpCAM, evtl. Rolle in Zelladhäsion sowohl als Barriere als auch als Pore für Anionen beschrieben	Verringerte Resorption von Natrium, Chlorid und Kalium, Dehydration, Wachstumshemmung, Hyperaldosteronismus, Tod 10 Tage nach Geburt, Überexpression führt zu verminderte Permeabilität von Chlorid, Natrium erhöht ( <i>in vitro</i> )	Verminderte Expression in entzündlichen Darmerkrankungen, erhöhte oder verminderte Expression in diversen Krebsarten	Alexandre <i>et al.</i> 2005; Hou <i>et al.</i> 2006; Nübel <i>et al.</i> 2009; Tatum <i>et al.</i> 2010; Li <i>et al.</i> 2004; Morita <i>et al.</i> 1999a; Kaarteenaho-Wiik und Soini 2009; Németh <i>et al.</i> 2009; Jakab <i>et al.</i> 2010; Holmes <i>et al.</i> 2006; Fujita <i>et al.</i> 2006
8	✓ Lunge, Niere, Gallenblase, Darm, Distales Nephron, Distaler Tubulus, aufsteigender dünner Teil der Henle-Schleife, Sammelrohr, Harnblasenepithel, Epidermis, Speichel- und Brustdrüse, Geschmacksknospe	Kation-Barriere, mit Cld4 Anionen-Pore		Verminderte Expression in entzündlichen Darmerkrankungen	Yu <i>et al.</i> 2003; Li <i>et al.</i> 2004; Morita <i>et al.</i> 1999a; Németh <i>et al.</i> 2009; Holmes <i>et al.</i> 2006; Fujita <i>et al.</i> 2006; Zeisig <i>et al.</i> 2007; Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002; Acharya <i>et al.</i> 2004; Hou <i>et al.</i> 2010
9	✓ Cochlea, Darm, Proximaler Nierentubulus (neonatal)	Kation-Barriere, Trennen der Endolymphe (hoher Kaliumgehalt) von Perilymphe (niedriger Kaliumgehalt)		Mutation in Maus führt zu Taubheit, hoher Kaliumgehalt in Perilymphe, Verlust von Haarzellen	Nakano <i>et al.</i> 2009; Kitajiri <i>et al.</i> 2004; Holmes <i>et al.</i> 2006; Abuazza <i>et al.</i> 2006
10	✓ Gallenblase, Nebenhoden, Speicheldrüse, Darm, Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife, retinales Pigmentepithel, Cochlea, Prostata, Nebenhoden	Pore			Németh <i>et al.</i> 2009; Guan <i>et al.</i> 2005; Hashizume <i>et al.</i> 2004; Holmes <i>et al.</i> 2006; Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002
10a	Proximaler Nierentubulus, Sammelrohr	Anionen-Pore			Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002; Van Itallie <i>et al.</i> 2006; Günzel <i>et al.</i> 2009
10b	äußere und inneres Mark des Sammelrohrs	Kation-Pore			Günzel <i>et al.</i> 2009; Inai <i>et al.</i> 2010
11	✗ Oligodendrozyten, Plexus choroideus (Gehirn), Darm, Epidermis, Sertoli Zellen, Basalzellen des Innenohrs	Kation-Barriere, auch Anionen-Pore	verlangsamte Reizweiterleitung, Steril, Taubheit		Gow <i>et al.</i> 1999; Morita <i>et al.</i> 1999b; Holmes <i>et al.</i> 2006

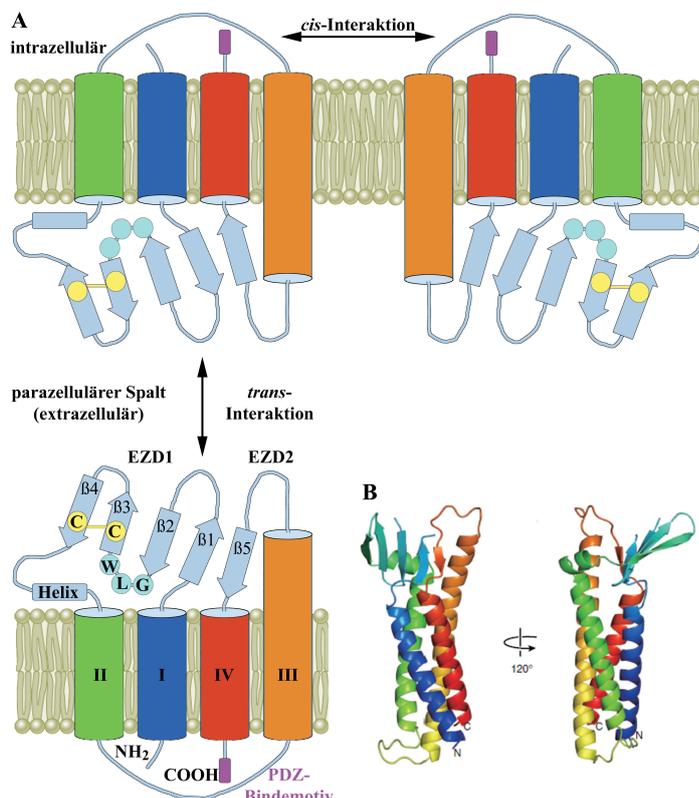
Claudine und ihre Expression, Fortsetzung

Cld K	Expression	Funktion	Knock-out Maus, Überexpression	Assoziierte Erkrankungen	Literatur
12	✗ Endothel Darm, Harnblasenepithel, Magen, Epidermis, Speicheldrüse, Cochlea	Erhöhe Kalziumabsorption im Darm			Fujita <i>et al.</i> 2008; Nitta <i>et al.</i> 2003; Holmes <i>et al.</i> 2006; Fujita <i>et al.</i> 2006; Acharya <i>et al.</i> 2004; Hewitt <i>et al.</i> 2006
13	✗ Im Nagetier, aber nicht im Menschen (Darm, Niere, Harnblase, blutbildendes Gewebe)	Evtl. relevant in der reifungsbedingten Veränderung der parazellulären Permeabilität			Holmes <i>et al.</i> 2006; Fujita <i>et al.</i> 2006; Abuazza <i>et al.</i> 2006; Thompson <i>et al.</i> 2010
14	✓ Cochlea, Darm, Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife	Kation-Barriere	Taubheit und Degeneration der Haarzellen, Hyperkalzurie	Mutation führt zu Taubheit	Ben-Yosef <i>et al.</i> 2003; Wilcox <i>et al.</i> 2001; Holmes <i>et al.</i> 2006; Gong <i>et al.</i> 2012
15	✓ Darm, Brustdrüse	Kation-Pore, Anion-Barriere, evtl. Rolle in der parazellulären Natrium Sekretion	verlängerter Dünndarm		Inai <i>et al.</i> 2010; Tamura <i>et al.</i> 2008; Holmes <i>et al.</i> 2006; Fujita <i>et al.</i> 2006
16	✗ Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife, Speichel- und Brustdrüse, Darm	Kation-Pore (mit Cld19)	Verlust von zweiwertigen Kationen in der Niere (Rückresorption gestört)	familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC)	Will <i>et al.</i> 2010; Simon <i>et al.</i> 1999; Kriegs <i>et al.</i> 2007; Markov <i>et al.</i> 2012; Holmes <i>et al.</i> 2006; Kiuchi-Saishin <i>et al.</i> 2002; Hou <i>et al.</i> 2008, 2009
17	✓ Darm, Proximal Nierentubulus, Epidermis, Gehirn (gering)	Anion-Pore			Krug <i>et al.</i> 2012; Holmes <i>et al.</i> 2006; Kubo <i>et al.</i> 2009
18	✗ Darm, Distales Nephron, Cochlea				Holmes <i>et al.</i> 2006; Jovov <i>et al.</i> 2007
18.1	Lunge				Niimi <i>et al.</i> 2001
18.2	Magen, Knochenzellen (Osteoklasten)	Kation-Barriere, evtl. Schutz vor geringem pH im Magen	chronische atrophische Gastritis Tod drei Tage nach Geburt, Osteoporose		Jovov <i>et al.</i> 2007; Hayashi <i>et al.</i> 2012; Linares <i>et al.</i> 2012; Niimi <i>et al.</i> 2001
19	✓ Darm, Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife, Schwann-Zellen, retinales Pigmentepithel	Anionen und Kationen-Barriere, Kation-Pore mit Cld16	periphere Neuropathie	Sehbehinderung (Aderhautdefekt, Netzhautdegeneration, Augenzittern, Blindheit), familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC)	Konrad <i>et al.</i> 2006; Hou <i>et al.</i> 2008; Angelow <i>et al.</i> 2007; Miyamoto <i>et al.</i> 2005

Des weiteren sind die Cld 20-27 nicht klassisch. Für diese ist eine Expression im Darm (20, 21, 23-25, 27), Magen (21, 23-26), Leber (21, 25, 27), Niere (21, 24, 25), Haut (23), Plazenta (23), Herz (24, 25) und Gehirn (25, 26) beschrieben (Mineta *et al.*, 2011). Eine Dysregulierung von Cld23 wird in Verbindung mit Neurodermitis gebracht (De Benedetto *et al.*, 2011). Weiterhin bestehen Isoformen durch alternatives *spligen* von Cld7, 11 und 19 (Günzel und Yu, 2013). Eine Involvierung von Cld in HIV und Hepatitis ist beschrieben (Li *et al.*, 2012; Cukierman *et al.*, 2009). K = ✓klassisches Cld, K = ✗ nicht klassisches Cld (Krause *et al.*, 2008).

(Colegio *et al.*, 2002, 2003; Veshnyakova *et al.*, 2012). So ist z.B. die Cld10 Isoform 10a (mehr positiv geladene Aminosäuren) selektiv für Anionen und 10b (mehr negativ geladene Aminosäuren) für Kationen. Die Sequenz dieser beiden Isoformen unterscheidet sich hauptsächlich in der EZD1 (Van Itallie *et al.*, 2006). Das konservierte Motiv bestehend aus den Aminosäuren G, L, W besitzt wahrscheinlich eine faltungsunterstützende Funktion und ist für den Transport zur Plasmamembran notwendig (Van Itallie *et al.*, 2011). Die kürzere EZD2 ist in den klassischen Cld hoch konserviert und besteht aus 17-39 Aminosäuren (Krause *et al.*, 2008). Von dieser Domäne wird angenommen, dass sie über *trans*-Interaktion, die Interaktion der TJ-Stränge von gegenüberliegenden Zellen etabliert (Blasig *et al.*, 2006; Piontek *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2008). An der *cis*-Interaktion ist die EZD2 nicht beteiligt. Kürzlich gelang die Proteinkristallisation und Strukturanalyse von Cld15, wodurch nähere Einzelheiten der Struktur verfügbar sind (Abb. 1.2; Suzuki *et al.* 2014). Demnach bilden die vier transmembranalen Domänen vier linksdrehende Helices, wobei die dritte Domäne, im Gegensatz zu den anderen, aus der Plasmamembran in den extrazellulären Raum ragt. Die EZD1 besitzt vier und die EZD2 ein  $\beta$ -Faltblatt, die zusammen eine antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Domäne bilden. Dem vierten  $\beta$ -Faltblatt schließt sich eine kurze extrazelluläre Helix an.

Neben homophilen Cld-Interaktionen bestehen auch heterophile Interaktionen zwischen Cld-Subtypen und zwischen Cld und den TAMPs (Furuse *et al.*, 1999; Cording *et al.*, 2013). Dennoch ist wenig über die spezifischen molekularen Wechselwirkungen und Signalwege bekannt, welche die Struktur der TJ reguliert und aufrechterhält.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Topologie und Interaktionen, sowie die räumliche Struktur von klassischen Claudinen**

A) Cld besitzen vier transmembranale Domänen (blau I, grün II, orange III, rot IV), zwei extrazelluläre Domänen (EZD1, EZD2), sowie einen zytosolischen C- (COOH) und N-Terminus (NH<sub>2</sub>). Die EZD1 ist vermutlich an der Abdichtung und Porenbildung beteiligt, wobei sie zwei Cysteine (C) enthält, die eventuell eine Disulfidbrücke ausbilden (gelb). Von der EZD2 wird angenommen, dass sie verantwortlich für die *trans*-Interaktion ist. Der C-Terminus enthält ein PDZ-Bindemotiv (violett). Die Cld interagieren zwischen zwei benachbarten Zellen (*trans*) und entlang der selben Zelle (*cis*). B) Räumliche Darstellung der Struktur von Cld, mit der selben Farbcodierung wie unter A, verändert nach Suzuki *et al.* 2014.

### 1.3.1.1. Claudin-5 und die Blut-Hirnschranke

Die ersten Hinweise auf die Existenz der BHS entdeckte Paul Ehrlich 1885, als die Injektion eines Farbstoffs den gesamten Organismus eines Versuchstieres mit Ausnahme des ZNS anfärbte. Diese physiologische Schranke ist in allen Tetrapoden vorhanden und wird hauptsächlich von kapillaren Endothelzellen mit ihren TJ gebildet (Abb. 1.1). Die BHS fungiert als Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS und schützt das Gehirn vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen und Botenstoffen. Im Vergleich zu anderen Gewebeendothelien ist die BHS sehr dicht (Reese und Karnovsky, 1967; Karnovsky, 1967). Eine zentrale Rolle in der Abdichtung gegenüber kleinen Molekülen nimmt hierbei Cld5 ein. So zeigten Cld5 *knock-out* Mäuse eine Permeabilität der BHS für Marker-substanzen mit einer molekularen Masse von  $<800$  Da im Gehirn und Rückenmark (Nitta *et al.*, 2003). Die Cld5 defizienten Mäuse verstarben 10 h nach der Geburt aufgrund unbekannter Ursache. Cld5 ist in endothelialen TJ der BHS das am weitaus häufigste Cld (Morita *et al.*, 1999c), aber auch Cld3 (Wolburg *et al.*, 2003) und 12 (Nitta *et al.*, 2003) werden exprimiert. Eine 600-fach höhere Menge an Cld5-mRNS gegenüber der von Cld3 konnte in den Gehirn-Kapillar-Endothelzellen detektiert werden (Ohtsuki *et al.*, 2008). Zudem wurde eine signifikante Menge an Cld10 und 22 gefunden, deren physiologische Bedeutung jedoch unklar ist. Auch ist die Involvierung von Cld1 in der Bildung der BHS nicht eindeutig (Wolburg *et al.*, 2003).

Cld5 gilt als endothelspezifisches Cld, dessen Gensequenz auf Chromosom 22 (22q11) codiert ist (Morita *et al.*, 1999c). Eine Deletion in diesem Bereich führt zum Velo-cardio-fazialen Syndrom, bei dem es unter anderem zum Zusammenbruch der BHS kommt, weshalb Cld5 auch als TMVCF (*transmembrane protein deleted in velo-cardio-facial syndrome*) bezeichnet wird (Sirotkin *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 1999c). Jedoch konnte die Expression von Cld5 auch in epithelialen TJ, wie z.B. in pankreatischen Azinus (Rahner *et al.*, 2001), Lungenalveolar Zellen (Wang *et al.*, 2003) und im Darmepithelien (Zeissig *et al.*, 2007) gezeigt werden, wobei seine physiologische Bedeutung in Epithelien unklar ist.

Die Abdichtung des parazellulären Spalts in der BHS gegenüber Kationen und kleinen Molekülen realisiert Cld5 über homophile und heterophile *cis*- und *trans*-Interaktion (Piehl *et al.*, 2010). Diese Interaktionen werden vermutlich über die EZD vermittelt, da einzelne Mutationen in der EZD2 (aromatische Aminosäuren: F147, Y148, Y158) in TJ-freien Zellen die *trans*-Interaktion von Cld5 (Piontek *et al.*, 2008) und die Barrierefunktion von Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen (Piehl *et al.*, 2010) beeinträchtigen. Die Mutation einer oder beider Cysteine in der EZD1 verhindert die Bildung einer Barriere gegenüber kleinen Ionen, während der Transport zur Plasmamembran davon nicht betroffen ist (Wen *et al.*, 2004).

Durch die homophile Interaktion bildet Cld5 Dimere, die sich bis zu Hexameren aufaddieren können (Blasig *et al.*, 2006; Coyne *et al.*, 2003a). In diesem Zusammenhang konnte für Cld5 eine geringere mobile Fraktion und Halbwertszeit, sowie eine höhere FRET Effizienz

im Vergleich zu Cld3 festgestellt werden, welches auf eine starke *trans*- und *cis*-Interaktion deutet (Piontek *et al.*, 2011). Eine heterophile Interaktion von Cld5 zu Cld1 und Cld3, sowie zu den TAMPs, aber nicht zu Cld4 ist beschrieben (Daugherty *et al.*, 2007; Piontek *et al.*, 2011; Cording *et al.*, 2013).

Auf transkriptioneller Ebene wird Cld5 z.B. durch NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) reguliert. So wird die BHS durch diesen Faktor über die Herabregulation von Cld5 permeabler, während Tanshinone IIA (vermindert die Expression von NF- $\kappa$ B) die Dichtigkeit der BHS verbessert und das Gehirn von Ratten vor fokaler Ischämie schützt (Brown *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2010). Zudem konnte in Endothelzellen gezeigt werden, dass ALK5 (*activin receptor-like kinase 5*), welches durch den *Transforming growth factor  $\beta$*  aktiviert wird, über die Phosphorylierung von SMAD2/3 (*Mothers against decapentaplegic homolog 2/3*) die Expression von Cld5 verminderte (Ota *et al.*, 2002). Weiterhin wird das Threonin an Position 105 von Cld5 über die Proteinkinase A und Rho-Kinase phosphoryliert, wodurch es zwar zu den TJ gelangt, jedoch die Funktion der TJ beeinträchtigt (Ishizaki *et al.*, 2003; Soma *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2008). Aufgrund der Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC)  $\alpha$  und  $\zeta$  wird Cld5 aus der Zellmembran entfernt und die parazelluläre Permeabilität von Endothelzellen wird erhöht (Stamatovic *et al.*, 2006). Die mehrfache Ubiquitinierung des Lysins 199 markiert Cld5 für den Abbau durch das Proteasom (Mandel *et al.*, 2012).

### 1.3.2. Weitere *tight junction* und *tight junction*-assoziierte Proteine

Weitere transmembranale TJ-Proteine sind die TAMPs. TAMPs besitzen eine konservierte MARVEL-Domäne, die vier transmembranale Helices, zwei EZD und eine intrazelluläre Schleife enthält (Sánchez-Pulido *et al.*, 2002). Diese Domäne ist für die Lokalisation in der Plasmamembran und vermutlich für die Lipidorganisation, z.B. von *lipid rafts* und Cholesterin, der Plasmamembran entscheidend, wodurch dessen Stabilität erhöht wird (Sánchez-Pulido *et al.*, 2002; Yaffe *et al.*, 2012; McCaffrey *et al.*, 2008).

#### 1.3.2.1. Occludin

Occludin ist das erste entdeckte transmembranale TJ-Protein (Furuse *et al.*, 1993). Das 65 kDa Protein besitzt eine lange C-terminale und kurze N-terminale zytoplasmatische Domäne. Mit dem C-terminal gelegenen *Coiled-coil*-Motiv interagiert Occludin mit ZO-1 (Furuse *et al.*, 1994), mit dem es vermutlich zusammen zur Plasmamembran transportiert wird (McCarthy *et al.*, 1996), mit der PKC und mit sich selbst, wodurch es dimerisiert (Muller *et al.*, 2005). Weiterhin bindet der C-Terminus an F-Aktin (Wittchen *et al.*, 1999). Der N-Terminus von Occludin interagiert mit der E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch, wodurch der proteasomalen Abbau von Occludin vermittelt wird (Traweger *et al.*, 2002). Die homophile *trans*-Interaktion von Occludin wird über die EZD2 vermittelt (Bellmann *et al.*, 2014). Aufgrund der Tatsache das Occludin *knock-out* Mäuse keinen schwerwiegenden Phänotyp und keine defekte Barrierefunktion aufweisen, ist dessen physiologische Bedeu-

tung unklar und wird als nicht essentiell für die TJ-Strangbildung angesehen (Saitou *et al.*, 2000; Schulzke und Fromm, 2009). Occludin ist jedoch nicht nur ein struktureller Bestandteil der TJ, es vermittelt auch Signale von der Plasmamembran zum Aktin-Zytoskelett. Eine Überexpression von Occludin erhöht den TER in MDCK-II Zellen (Yu *et al.*, 2005; Balda *et al.*, 1996). *In vitro* Untersuchungen von *knock-down* Experimenten zeigten eine Verringerung des TER (Buschmann *et al.*, 2013). Occludin besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen und könnte somit an der redoxabhängigen Regulation von TJ beteiligt sein, welches unter pathologischen Umständen mit reduzierten Bedingungen, von Bedeutung sein könnte (Dörfel und Huber, 2012; Blasig *et al.*, 2011; Bellmann *et al.*, 2014). Weiterhin wird eine adhäsive Funktion benachbarter Zellen für Occludin angenommen (Van Itallie und Anderson, 1997; Miyoshi und Takai, 2005).

### 1.3.2.2. Trizellulin

Das 64 kDa Protein Trizellulin wurde 2005 identifiziert (Ikenouchi *et al.*, 2005). Hauptsächlich ist Trizellulin in Dreizellkontakten lokalisiert und nur im geringen Maße in Zweizellkontakten zu finden. Der C-Terminus weist eine starke Homologie zu Occludin auf (Ikenouchi *et al.*, 2005), vermittelt die Interaktion zu ZO-1 (Riazuddin *et al.*, 2006) und vermutlich den Transport des Proteins zur Plasmamembran. Der N-Terminus bedingt die Lokalisation in den Dreizellkontakten (Westphal *et al.*, 2010). Die Anreicherung von Trizellulin in der Plasmamembran wird durch Cld5 erhöht, welches auf einer heterophilen Interaktion mit dem Cld beruht. Trizellulin selbst ist nicht in der Lage homophil an Zweizellkontakten in *trans* zu interagieren (Cording *et al.*, 2013). In den Dreizellkontakten dichtet Trizellulin gegen Makromoleküle ab, ohne die Ionenpermeabilität zu beeinflussen. Hierbei entsteht eine zentrale Röhre in den Dreizellkontakten, die jedoch gemessen an dem Anteil der Zweizellkontakte so selten ist, dass sie in MDCK-II Zellen lediglich 1 % des elektrischen Leitwerts ausmacht (Krug *et al.*, 2009). Die Überexpression von Trizellulin verstärkt dennoch die Barrierefunktion und dessen *knock-down* bewirkt einen Abfall des transzellulären TER, eine gröÙenselektiv erhöhte Permeabilität und beeinflusst die TJ-Organisation in Zwei- und Dreizellkontakten, sodass z.B. Occludin in der Immunofluoreszenz eine tropfenartige Verteilung annimmt (Krug *et al.*, 2009; Ikenouchi *et al.*, 2005; Mariano *et al.*, 2011). Eine kompensatorische Funktion von Trizellulin gegenüber Occludin wird angenommen (Ikenouchi *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Trizellulin in Endothelzellen des Gehirns und der Retina exprimiert wird (Iwamoto *et al.*, 2014). Dieses führte zu der Annahme, dass die BHS sowohl Dreizellkontakte als auch Trizellulin besitzen.

### 1.3.2.3. Zonula occludens

Die Gerüstproteine ZO-1-3 gehören zu der Familie der MAGUK und besitzen, wie alle Mitglieder dieser Familie, mehrere Protein-bindende Domänen: PDZ1-3, *Src-homology 3* und Guanylat-Kinase-ähnliche Domäne (GUK). Die Hauptfunktion dieser Proteine be-

steht in der Signaltransduktion zur Regulation der TJ, wobei sie die TJ mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden (Fanning *et al.*, 1998; Schneeberger und Lynch, 2004). Das 225 kDa große ZO-1, welches von den drei ZO-Proteinen als erstes entdeckt wurde (Stevenson *et al.*, 1986), bindet über die PDZ1-Domäne an den C-Terminus von Cld (Itoh *et al.*, 1999). Die PDZ2-Domäne interagiert mit ZO-2 und -3, während die GUK-Domäne an den C-Terminus von Occludin bindet (Fanning *et al.*, 1998). Hierbei sind ZO-1 und -2 essentiell für die räumliche Organisation, aber nicht für die Formation von Cld-basierten TJ-Strängen (Umeda *et al.*, 2006).

## 1.4. Überwindung von Gewebeschranken

Die meisten Wirkstoffe, die über die Blutbahn in die Kapillaren des Gehirns gelangen, können die BHS nicht überwinden. Lediglich von kleinen lipophilen Wirkstoffen (<500 Da) mit weniger als 8-10 ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen wird angenommen, dass sie die BHS durchdringen können. So weisen die Wirkstoffe der *Comprehensive Medicinal Chemistry* Datenbank eine Größe zwischen 160 und 480 Da auf (Ghose *et al.*, 1999). Die meisten anderen entwickelten Wirkstoffe werden jedoch aufgrund ihrer Größe oder Hydrophilie schlecht absorbiert. Die Erhöhung des lipophilen Anteils führt zu einer gesteigerten Aufnahme in nicht zerebrale Zellen, wodurch der Wirkstoff unspezifisch im Körper lokalisiert. Zudem verringert sich die Löslichkeit des Pharmakons, welches ein Problem bei der oralen Applikation darstellt, da nur gelöste Stoffe im Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden. Jedoch ist gerade die orale Verabreichung wünschenswert, da sie von Patienten selbständig und relativ angenehm zu bewerkstelligen ist. Bei der oralen und damit systematischen Applikation ergeben sich noch weitere Probleme. So kann der Wirkstoff nach dem passieren des Magen-Darm-Trakts in der Leber chemisch verändert oder in der Lunge zurückgehalten werden. Zudem ist eine höhere Dosis, im Vergleich zur topischen Applikation, notwendig. Am Wirkungsort muss letztendlich, im Gegensatz z.B. zur intrathekalen oder intraventrikulären Wirkstoffapplikation, die BHS überwunden werden.

Um das Problem der geringen Bioverfügbarkeit zu lösen, werden zwei Hauptstrategien in der pharmazeutischen Forschung verfolgt. Der erste Ansatz besteht in der Modifikation des Medikaments, sodass sie Gewebeschranken überqueren können. Dieses wird z.B. durch die Verwendung von Pro-Pharmakon umgesetzt. Zunächst sind diese inaktiv und so modifiziert, dass sie eine erhöhte transzelluläre Permeabilität besitzen, entweder durch eine erhöhte Lipophilie (z.B. Enalapril) oder durch die Bindung zu einem Liganden, welches es dem Wirkstoff erlaubt, einen Transporter zu benutzen (z.B. Valaciclovir via Peptidtransporter 1) (Brandsch *et al.*, 2008). Nach der Aufnahme werden diese Pharmaka aktiviert, z.B. durch eine enzymatische Konversion. Andere Stoffe erreichen eine *Carrier*-vermittelte Aufnahme durch Modifikation, z.B. Nanopartikel welche zu Vitamin B12 Derivaten konjugiert wurden (Petrus *et al.*, 2009). Während diese Strategien auf die transzelluläre Aufnahme abzielen, fokussiert sich die zweite auf den parazellulären Weg. Hierbei besitzen die

TJ eine maßgebliche Relevanz, da sie die Bioverfügbarkeit hydrophiler Wirkstoffe durch die Abdichtung des parazellulären Spalts limitieren. Um diese Abdichtung zu modifizieren werden Absorptionsverstärker eingesetzt.

#### 1.4.1. Absorptionsverstärkende Substanzen

Absorptionsverstärker sind Substanzen welche die Permeabilität von Gewebescheiden erhöhen. Neben synthetisch hergestellten Absorptionsverstärker gibt es auch natürliche, wie z.B. Gewürze, fettreiches Essen, Alkohol und bakterielle Toxine (Maher *et al.*, 2009). Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurde als erster Absorptionsverstärker untersucht und erhöhte die Absorption von Heparin im Gastrointestinaltrakt von Ratten und Hunden (Windsor und Cronheim, 1961). Gefolgt wurde diese Studie von oberflächenaktiven Stoffen (englisch: *surfactants*) und Polymeren. Allerdings zeigten viele der im Labor erfolgreich getestete Absorptionsverstärker eine hohe Toxizität und konnten so nicht für den Menschen eingesetzt werden (Maher *et al.*, 2009). Andere Ansätze, wie z.B. das hyperosmolare Mannitol, perforieren die Gewebescheide. Derartige Substanzen können aufgrund der physiologischen Bedeutung der Barrieren nur bedingt eingesetzt werden.

Für die transiente Modifikation der TJ wurden einige vielversprechende Kandidaten beschrieben: kleine Moleküle (Hussain *et al.*, 2004; Lindmark *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2011), Peptide (Nusrat *et al.*, 2005) und siRNA (*small interfering RNA*) (Campbell *et al.*, 2009). Diese sind spezifisch gegen TJ-Moleküle gerichtet, besonders gegen Cld. Aber auch oberflächenaktive Stoffe als Absorptionsverstärker wurden weiterentwickelt. Einer der effektivsten Vertreter dieser Substanzen ist Natrium-Caprat (Caprat, C10).

##### 1.4.1.1. Detergenzien und oberflächenaktive Stoffe

Verschiedene Stoffe, wie Detergenzien, oberflächenaktive Stoffe, Lipide und Polymere wurden auf ihre Effektivität, systematisch die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, untersucht (Hussain *et al.*, 2004). Hierbei zeigten 2,3-Dihydroxybutandisäure (Weinsäure), Natriumtaurodeoxycholat, Natriumdodecylsulfat (SDS) oder p-tert-Octylphenoxy-polyethoxyethanol (Triton X-100) im Jejunum von Ratten ein permeabilitätssteigerndes Potential nach oraler Applikation von schlecht absorbierbaren hydrophilen Stoffen wie Protein- und Peptid-Pharmaka (Takatsuka *et al.*, 2006). Eine weitere Gruppe der oberflächenaktiven Stoffe sind die kurzkettigen Alkylglycerole (Unger *et al.*, 1985). Intraarterielle Injektion führte zu einer konzentrationsabhängigen Anreicherung koapplizierter Zytostatika und Antibiotika im Gehirn von Ratten (Erdlenbruch *et al.*, 2000). Auch die Penetration von großen Molekülen wie Albumin konnte signifikant erhöht werden (Erdlenbruch *et al.*, 2003a). Die Öffnung der BHS *in vivo* ist reversibel und besteht für wenige Minuten bis zu zwei Stunden, abhängig von der verwendeten Konzentration (Erdlenbruch *et al.*, 2000, 2002). *In vitro* und *in vivo* Analysen zeigten, dass Alkylglycerole nicht toxisch sind (Erdlenbruch *et al.*, 2003b). Jedoch erreichte bisher innerhalb dieser Substanzklasse lediglich Caprinsäure klinische Relevanz.

#### 1.4.1.1.1 Caprat

C10 ist das Natriumsalz der Caprinsäure und gehört mit einer 10-Kohlenstoff-Kette zu den gesättigten, mittelkettigen Fettsäuren (6–12 Kohlenstoffe). Somit ist es eine amphipathische Substanz mit einer hydrophilen Kopfgruppe (Carboxylat-Ion) und einer hydrophoben Schwanzgruppe (aliphatische C10-Kette). C10 ist in Milchprodukten und Ölen vorhanden und wurde von der *US American Food and Drug Administration for use in food* (Sec. 172.863 Salts of fatty acids. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=172&showFR=1>) als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen. Auch die FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) und WHO (*World Health Organization*) sehen keine Gefährdung für den Menschen ([http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_733.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_733.pdf)).

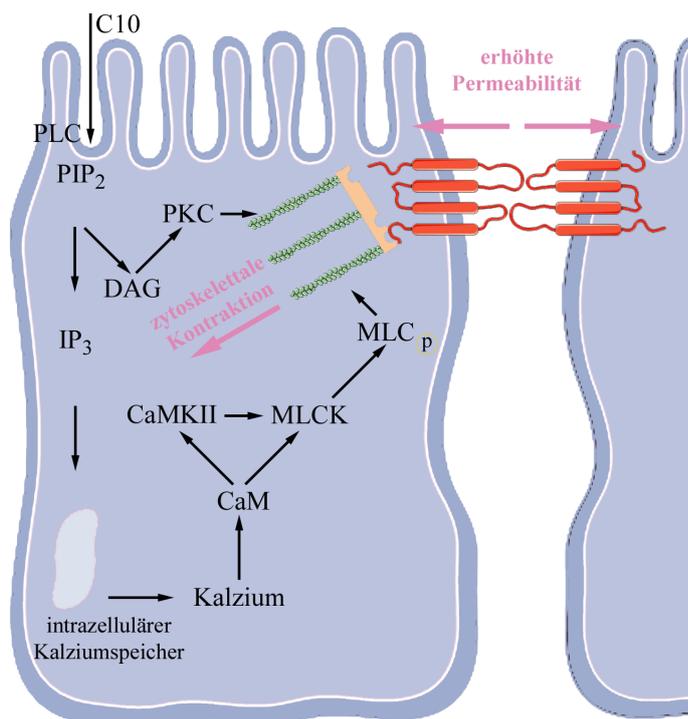
C10 wurde klinisch als Absorptionsverstärker (Japan, Dänemark und Schweden) in Form von rektalen Zäpfchen für die verbesserte Aufnahme des Antibiotikums Ampicillin, Handelsname Doktacillin<sup>®</sup> (Meda, Solna, SWE), getestet (Maher *et al.*, 2009; Lindmark *et al.*, 1995, 1997). Die Gruppe um Lindmark zeigte, dass 50 mg/Person C10 die Ampicillin-Konzentration im Serum von erwachsenen Menschen erhöhte. Zudem wurde eine öffnende Wirkung auf die TJ und somit auf Gewebeschränken nachgewiesen (Lindmark *et al.*, 1997, 1998). Die Absorptionsverstärkung von C10 wurden ebenfalls klinisch für die orale Applikation demonstriert (Leonard *et al.*, 2006).

Die permeabilitätssteigernde Wirkung von C10 auf verschiedene Pharmaka und Marker ist in diversen Zellkulturen (Zelllinien und Biopsien von Mensch und Tier), *in situ* und Tiermodellen näher untersucht worden (zusammengefasst in Tscheik *et al.* 2013; Maher *et al.* 2009). Hierbei machten die Untersuchungen deutlich, dass *in vivo* höhere Konzentrationen von C10 im Vergleich zur Zellkultur notwendig sind. Die durchschnittliche Konzentration in der Zellkultur betrug 15 mM, in isoliertem Gewebe 20 mM und *in vivo* 100 mM (Maher *et al.*, 2009). Eine Wirkung von C10 nach oraler oder rektaler Applikation konnte in Maus, Ratte, Känninchen, Hund, Schwein und Rind beschrieben werden.

Zellkulturexperimente wurden durchgeführt, um den Wirkmechanismus von C10 zu charakterisieren. Hierbei wurden zumeist Zellen aus dem Darm (Chao *et al.*, 1999; Krug *et al.*, 2013; Perera *et al.*, 2011) oder der Niere (Sugibayashi *et al.*, 2009) verwendet. In diesen Experimenten verringerte sich der TER nach der Inkubation mit C10 (Tscheik *et al.*, 2013). Diese Reduktion hing von der Konzentration von C10, der Inkubationszeit und der verwendeten Zelllinie ab. 7,5–10 mM C10 scheinen die optimale Konzentration für MDCK (Hunde-Nierenzelllinie) und HT-29/B6 (Humane kolorektalen Adenokarzinomzelllinie) Zellen zu sein. Geringere Konzentrationen waren weniger effektiv und höhere Konzentrationen verringerten den TER nicht weiter. Der maximale Effekt von C10 auf den TER wurde innerhalb von 5–30 min erreicht (50 % des Kontrollwertes) und hielt für 300 min an. Nach dem Entfernen von C10 erreichte der Wert für den TER den des Kontrollwertes, wenn die initiale Konzentration von C10 unter 30 mM lag (Sugibayashi *et al.*, 2009). In allen Studien erhöhte C10 die Permeation von kleinen Molekülen (bis zu

1 kDa) wesentlich stärker als für große Moleküle (4 bis 20 kDa) (Chao *et al.*, 1999; Krug *et al.*, 2013; Perera *et al.*, 2011). Moleküle mit einer Masse von mehr als 20 kDa zeigten keine erhöhten Permeationsraten nach der C10-Behandlung (Krug *et al.*, 2013).

Anhand von Zellkulturexperimenten wurden zwei hypothetische Modelle für den Wirkmechanismus von C10 beschrieben. Zum einen erhöht C10 die transzelluläre Permeabilität, indem es als Tensid wirkt. Hierdurch wird die Plasmamembran destabilisiert und solubilisiert, welches die transzelluläre Permeation begünstigt (Maher *et al.*, 2009). Dieser Mechanismus wird für hohe millimolare Konzentrationen von C10 angenommen. Unterhalb von ~13 mM bewirkt C10 die Erhöhung der parazellulären Permeabilität durch die Modifikation der TJ (Abb. 1.3). Ergebnisse aus Untersuchungen von Caco2 Zellen, die mit C10 behandelten wurden, führten zu folgendem Modell: Die Phospholipase C (PLC) wird aktiviert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) gespalten wird (Tomita *et al.*, 1995). Hierzu passt die tensidische Natur von C10, da Tenside bei geringen Konzentrationen membranständige Enzyme aktivieren können (Helenius und Simons, 1975). Während DAG die Kontraktion des Zytoskeletts über die PKC vermittelt (Anderberg *et al.*, 1993), führt IP<sub>3</sub> zum Ausstrom von intrazellulären Kalzium-Ionen, welches von Calmodulin (CaM) komplexiert wird und dadurch die CaM-abhängige Proteinkinase (CaMKII) und die *Myosin light-chain kinase* (MLCK) aktiviert (Turner, 2000). Hierdurch wird die regulatorische leichte Kette von Myosin-II phosphoryliert und der apikale Aktin-Myosinring kontrahiert (Feighery *et al.*, 2008). So kommt es zum Auseinanderreißen des TJ-Komplexes, da dieser über ZO-1 an das Aktin-Zytoskelett gebunden ist und dementsprechend zur Öffnung des parazellulären Spalts (Lindmark *et al.*, 1998; Turner, 2000; Anderberg *et al.*, 1993; Suzuki und Hara, 2006).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des vorhergesagten parazellulären Wirkmechanismus von Caprat**

C10 aktiviert die PLC (Phospholipase C) wodurch PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol) gespalten wird. DAG aktiviert die PKC (Proteinkinase C) und das Zytoskelett kontrahiert. IP<sub>3</sub> führt zum intrazellulären Ausstrom von Kalzium, welches von CaM (Calmodulin) komplexiert wird und die CaMKII (CaM-abhängige Proteinkinase), sowie MLCK (*Myosin light-chain kinase*) aktiviert. Die MLC (regulatorische leichte Kette von Myosin-II) wird phosphoryliert und der apikale Aktin-Myosinring kontrahiert, wodurch die TJ (rot), welche über ZO-1 (orange) an das Aktin-Zytoskelett (grün) gebunden sind, umverteilt werden und die parazelluläre Permeabilität erhöht.

Das Verhalten von C10 in Lösung hängt von seiner Konzentration und dem Lösungsmittel ab. Natrium-Salze von Fettsäuren sind wasserlöslich und formen lyotrope Flüssigkristalle, bevor sie in höheren Konzentrationen Mizellen bilden (Small, 1970). Diese Bildung von Strukturen kann lokal zu einer veränderten Konzentration am Wirkungsort führen. Die kritische Mizellbildungskonzentration (KMK) beschreibt die Konzentration, bei der ein Tensid beginnt Mizellen zu formen. Ein allgemeiner KMK-Wert kann nicht angegeben werden, da dieser z.B. von der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke abhängig ist. Im Falle von C10 bedeutet dies unter Umständen, dass seine Wirkungsweise in verschiedenen Organen und -teilabschnitten, wie z.B. im Darm, variiert. So liegt die KMK von C10 in einem Bereich von 5 bis 140 mM (Lapr e *et al.*, 1992; van Hoogdalem *et al.*, 1988), in HBSS<sup>-/-</sup> (*Hank's Balanced Salt Solution* ohne Kalzium und Magnesium) ist dieser zwischen 13-51 mM angesiedelt (Lindmark *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1998b).

Die Untersuchungen hinsichtlich der Zytotoxizität von C10 ergaben *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Resultate. So sind 50 mM C10 für Caco-2 Zellen zytotoxisch, während doppelt so hohe Konzentration *in vivo* keine Veränderungen im Darm hervorrufen (Chao *et al.*, 1999). Dieses könnte eventuell durch den Verdrängungseffekt *in vivo*, durch die sch tzende Darmschleimhaut oder der hohen Regenerationsfähigkeit der Mukosa-Zellen erklärt werden (Lindmark *et al.*, 1997). Doch auch in anderen Organen wurden in *in vivo* Untersuchungen keine toxischen Effekte von C10 gefunden. Ratten, welche C10 in Reis (100 g/kg) mit einer täglichen Aufnahme von ca. 500 mg/kg über 150 Tagen zu sich nahmen, wiesen keine morphologische Veränderung des Magens auf (Mori, 1953). Die mittlere letale Dosis (LD<sub>50</sub>) liegt für Ratten bei 3,7 g/kg (orale Applikation) (Oro und Wretling, 1961; Smyth Jr *et al.*, 1962). Die Injektion von 15-25 mM C10 in die Halsschlagader führte nach 5 min zu einer einstündigen, reversiblen und von der molekularen Masse abhängigen Öffnung der BHS in Ratten (Preston *et al.*, 2008). Weiterhin konnte eine schnelle Aufnahme mit T<sub>max</sub> (Zeit, die benötigt wird, um das Maximum der Plasmakonzentration zu erreichen) <10 min von C10 *in vivo* festgestellt werden, welches zu seiner schnellen und reversiblen Wirkung beiträgt (Raouf *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 1994; Jorgensen *et al.*, 1998).

Zusammenfassendverst rkt C10 die Aufnahme von Pharmaka mit einer molekularen Masse unter 20 kDa. Zellkulturrexperimente deuten bei geringeren Konzentrationen eher auf eine parazelluläre als transzelluläre Modifikation. Um effektivere und sichere Wirkstoffe für die TJ-Modulation zu entwickeln, ist ein besseres Verständnis für den Mechanismus, mit dem die einzelnen TJ-Komponenten reguliert werden, notwendig. Dieses kann unter Umständen durch die Erforschung von bekannten TJ-Modulatoren wie z.B. C10 realisiert werden.

#### 1.4.1.2. Peptide und Ribonukleinsäure-Interferenz

Die spezifische Modulation von TJ-Proteinen kann durch die Verwendung von Peptiden, von denen eine Bindung zu den EZD der TJ angenommen wird, erreicht werden. Occludin war das erste Zielprotein, um Gewebeschränken zu beeinflussen. Ein 22 Aminosäuren-Peptid der EZD1 (Aminosäuren 209-230) des Occludins der Ratte wurde in den Hoden von adulten Ratten injiziert (1,5-10 mg/Testis) und öffnete die Blut-Hodenschranke (Chung *et al.*, 2001). Peptide, die der N-terminalen Hälfte der EZD1 von humanen Occludin nachempfunden wurden, erhöhten die Permeabilität von Luftröhren-Epithelzellen (Everett *et al.*, 2006). Auch Peptide, die auf der Aminosäuresequenz von Cld basieren, besitzen eine TJ-öffnende Wirkung. So reduzierte ein Peptid, welches sich auf die Aminosäuren 53-80 der EZD1 von Maus-Cld1 bezieht den TER einer T84 Zellschicht und erhöhte die Permeabilität von FD3 (Mrsny *et al.*, 2008). Wurden die Aminosäuren 31-54 bzw. 146-160 von Cld1 verwendet, waren diese Peptide wirkungslos. *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass das Peptid<sub>53-80</sub> die parazelluläre Permeabilität im Magen für Saccharose einen Tag nach der oralen Applikation in Ratten erhöhte (0,1 mg/kg Körpergewicht).

Ein im Vergleich zu den Peptiden noch spezifischerer Ansatz um die Funktion von Gewebeschränken zu modulieren, ist die Verwendung der RNS-Interferenz. Diese führt zu einer verminderten der Expression von TJ-Proteinen in Schranken-bildenden Epithel- (Masuda *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011) und Endothelzellen (Kluger *et al.*, 2013). Beeinflusst werden konnten hierdurch ZO-1 (Van Itallie *et al.*, 2009), Occludin (Yu *et al.*, 2005) oder Cld (Hou *et al.*, 2006).

Die Gruppe um Campbell injizierte eine Cld5-spezifische siRNA in Mäuse, um die Cld5-Expression in den Blutgefäßen des Gehirns zu modulieren (Campbell *et al.*, 2012). 20 µg siRNA pro Maus reduzierten die Cld5-mRNS und somit dessen Proteingehalt. Dieses führte zu einer gröÙenselektiven Öffnung (bis zu 1 kDa) der BHS zwischen 24 und 72 h nach der Injektion. In einem Mausmodell eines Schädel-Hirn-Traumas, welches mit der Bildung eines Ödems einhergeht, konnte ein Rückgang der Schwellung im Gehirn gezeigt werden (Campbell *et al.*, 2012). Die siRNA im Komplex mit *in vivo-jetPEI*<sup>™</sup>, einer *in vivo* Transportsubstanz, ist derzeit in Phase I der klinischen Testung (<http://www.polyplus-transfection.com/2009/08/dna-sirna-delivery-in-vivo-jetpei/>).

Der Vorteil von Peptiden und siRNA gegenüber oberflächenaktiven Substanzen hinsichtlich der Modifikation der Permeabilität von Gewebeschränken ist die höhere Spezifität und geringere Zytotoxizität. Peptide, welche direkt gegen bestimmte Cld gerichtet sind, interagieren nur mit den TJ, die entsprechend bindende Cld enthalten. Die Verwendung von siRNA führt zu einer Reduktion des Proteingehalts eines bestimmten Cld. Hierdurch ist der Effekt spezifisch für die entsprechenden Gewebeschränke. Wird z.B. Cld5 moduliert, könnte die Wahrscheinlichkeit, dass ein Pharmakon die BHS passiert, erhöht werden. Jedoch verbleibt die BHS für einige Stunden geöffnet und besitzt somit eine reduzierte Schutzfunktion. Dennoch eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Entwicklung von hoch selektiven Absorptionsverstärker.

## 1.5. Hochdurchsatz-Screening: Möglichkeiten und Limitationen

Die Technik des HDS ermöglicht die automatische Testung der Aktivität oder Affinität einer Vielzahl von Substanzen in unterschiedlichen biologischen Systemen. Abhängig von der Fragestellung können verschiedene Parameter bestimmt werden, bei deren Eintreten eine zugegebene Substanz als wirksam definiert wird. Wird z.B. die Vitalität nach Applikation verschiedener Substanzen untersucht, kann ein messbarer Parameter die Proliferation, Apoptose, Membranintegrität oder mitochondriale Aktivität sein (Shukla *et al.*, 2010). Werden Proteinbindungen oder -funktionen analysiert, wird zumeist eine Fluoreszenz-Markierung bestimmter Proteine (meistens des *targets*) notwendig (Pepperkok und Ellenberg, 2006). Hierdurch können z.B. Informationen über Signalwege und Zellfunktion erlangt, aber auch therapeutisch wirksame Verbindungen oder chemische Sonden identifiziert werden. Dabei besteht das Hauptziel darin, einen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur der Substanzen und der biologischen Aktivität zu erhalten (Giacomotto und Ségalat, 2010).

HDS werden *in vivo* und *in vitro* durchgeführt. Für *in vivo* Untersuchungen werden hauptsächlich Mäuse (*Mus musculus*), Würmer (*Caenorhabditis elegans*), Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) oder Zebrafische (*Danio rerio*) verwendet (Giacomotto und Ségalat, 2010). Zumeist wird eine veränderten Wachstum- oder Laichungsrate sowie morphologische Defekte oder Mortalität nach der Applikation von Substanzen analysiert (Giacomotto und Ségalat, 2010). *In vivo* Untersuchungen bieten den Vorteil, dass ein Screen in einem intakten und vollständigen Tier durchgeführt wird, sodass ein genau definiertes *target* nicht notwendig ist. Hieraus resultiert jedoch auch, dass ein spezifisches *target* aufgrund der Komplexität des Organismus schwierig zu identifizieren ist. Allerdings wird das Problem, dass Substanzen die in zellulären Untersuchungen als wirksam eingestuft wurden, in Tiermodellen keine Aktivität aufweisen, häufig. Doch weisen positiv getestet Substanzen in Tiermodellen nicht zwangsläufig eine Wirkung im Menschen auf. Dieses gilt besonders für die Invertebraten, welche eine wesentlich andere Anatomie, Physiologie und begrenzte genomische Übereinstimmung zum Menschen aufweisen (Giacomotto und Ségalat, 2010). Weitere Nachteile sind die erhöhten Kosten, im Vergleich zu einem *in vitro* HDS und die praktische Umsetzung, da z.B. nicht alle Tiere in flüssigem Medium gehalten werden können. Auch die Konzentration der Substanzen die vom Tier aktiv über die Nahrungsaufnahme oder passiv über die Diffusion in den Organismus gelangt, kann von Substanz zu Substanz variieren und nicht vorhergesagt werden (Giacomotto und Ségalat, 2010).

Für einige Untersuchungen ist die Verwendung von Tieren nicht notwendig oder sogar hinderlich, sodass sich ein HDS *in vitro* besser eignet. So kann z.B. die Toxizität von Substanzen auf die BHS bestimmt (Culot *et al.*, 2008) oder eine veränderte Morphologie, Adhäsion und Ausbreitung von Zellen ermittelt werden (Schmandke *et al.*, 2013). Der größte Vorteil beim Verwenden von zellulären HDS besteht jedoch darin, dass ein spezifisches *target* analysiert werden kann. So wurden die funktionalen Eigenschaften des *glycine receptor chloride channels* nach Applikation verschiedener Substanzen charakterisiert

(Talwar *et al.*, 2013). Hierbei wurde die Intensität der Fluoreszenz des Anion-sensitiven YFP<sub>I152L</sub> gemessen, wodurch der Einstrom von Anionen registriert werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, dass die mittlere effektive Konzentration bekannter Substanzen im HDS publizierten Daten entsprechen und eine 500-fache Steigerung der Anzahl der getesteten Substanzen im gleichen Zeitraum gegenüber der manuellen Testung möglich ist (Talwar *et al.*, 2013). Weiterhin ist die Verwendung von etablierten molekularbiologischen Methoden in fluoreszenz-basierten HDS wie z.B. FRET, *yeast two-hybrid* und RNS-Interferenz möglich (Schallmeyer *et al.*, 2014). Auch die Degradation von Proteinen, sowie deren Expression auf transkription- und translationeller Ebene kann detektiert werden. Mittels FACS und Suspensionszellen können bis zu 40 *wells* pro Minute gescreent werden. Hierbei jedoch ist die räumlich Messung bzw. der einer intakten Zellschicht nicht gegeben (Black *et al.*, 2011). Dieses wird durch Verwendung von adhärennten Zellen und eines Mikroskop-basierten HDS ermöglicht. Durch Färbung spezifischer Kompartimente ist das Mikroskop bzw. dessen Software in der Lage jede einzelne Zelle in mindestens drei Bereiche einzuteilen: Zellkern, Zytoplasma und Plasmamembran. So können subzelluläre Ereignisse ohne Berücksichtigung anderer Bereiche gemessen werden.

Das HDS stellt eine leistungsstarke Technik dar, um eine Vielzahl von Substanzen in einer angemessenen Zeit zu untersuchen. Ein essentieller und limitierender Faktor des HDS besteht jedoch in dem verwendeten Modellsystem. Dieses gilt besonders für *targets* die keine Rezeptoren, Kanäle oder Enzyme sind (Makley und Gestwicki, 2013). Derartige Proteinen besitzen unter Umständen keine natürlichen Liganden oder Bindungsstellen. Ist eine Vorhanden, kann die Interaktion lediglich direkt gemessen werden, da keine enzymatische Reaktion stattfindet. Daher muss eine möglichst geringe Variabilität und ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit sowie Standardisierung gegeben sein, damit mittels HDS verlässliche *hits* aus der hohen Anzahl von Substanzen identifizieren werden können (Blucher und McWeeney, 2014).

## 1.6. Zielstellung

Die Behandlung vieler pathologischer Prozesse im ZNS ist aufgrund der BHS ineffektiv, da sie eine therapeutische Nutzung fast aller großen und 98 % der kleinen Wirkstoffe verhindert. Eine dringende Notwendigkeit, das ZNS für Pharmaka zugänglicher zu machen, ergibt sich aus der Häufigkeit von ZNS-Erkrankungen in den wichtigsten Pharmamärkten und der damit verbundenen Patientenpopulationen (Tab. 1.1).

Versuche die BHS spezifisch und ohne Nebenwirkungen so zu modulieren, dass sie besser durchlässig für Pharmaka wird, erreichten bisher keine klinische Relevanz. So besteht lediglich die Möglichkeit einer direkten Injektion des Wirkstoffes in das ZNS oder die Verwendung von hyperosmolaren Mannitol, welches die BHS kurzfristig zusammenbrechen lässt. Diese drastische Vorgehensweise öffnet die BHS komplett und birgt daher viele Risiken, verursacht Nebenwirkungen und ist schlecht reproduzierbar. Um diese Probleme zu umgehen erscheint die spezifische und transiente Modifikation der parazellulären Permea-

bilität der BHS besonders für kleine Moleküle aussichtsreich. In diesem Zusammenhang bietet Cld5 einen vielversprechenden Ansatzpunkt. Dieses Protein gilt als endotheliales Markerprotein und reguliert die parazelluläre Permeabilität von Molekülen  $<800$  Da durch die BHS. Das Abdichten des parazellulären Spalts vermittelt das Protein über *trans*-Interaktionen, welche im extrazellulären Raum ausgebildet werden. Die Arbeitshypothese ist daher, dass sich die BHS durch eine zeitlich begrenzte Inhibition dieser Interaktion größenspezifisch und transient öffnen lässt. Hierfür ist weder die Aufnahme eines Modulators in die Zelle noch die Degradation von Cld5 notwendig, welches die Verträglichkeit der Öffnersubstanzen erhöhen sollte. Ungeklärt in diesem Zusammenhang ist die fehlende Kenntnis der genauen Regulation der TJ.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation durch die Modifikation der TJ zu leisten und eine spezifische Modulation von Cld5 zu erreichen. Hierfür sollen zum einen Substanzen mit einer direkten inhibitorischen Wirkung auf die *trans*-Interaktion von Cld5 in einem Hochdurchsatz-Screening identifiziert werden und zum anderen bekannte Öffnersubstanzen oder Manipulatoren von Cld5 auf ihre Eignung als Absorptionsverstärker für die BHS untersucht werden. Caprat ist als Absorptionsverstärker klinisch erprobt und dessen TJ-öffnende Wirkung sollte auf verschiedene Bestandteile der TJ in unterschiedlichen Zelllinien (Epithel- und Endothelzellen) analysiert werden. Um dessen Effekt auf die *trans*-Interaktion von Cld5 mit Lebendzellmikroskopie zu untersuchen, wurden epitheliale aber ansonsten TJ-freie Zellen mit Cld5-YFP transfiziert. So kann der Einfluss auf Cld5 unabhängig von anderen TJ-Proteinen untersucht werden. Experimentell wurde die Wirkung von Caprat mittels Fluoreszenzmikroskopie (Effekt auf die TJ-Protein-Lokalisation und Cld5 *trans*-Interaktion), Westernblot (Effekt auf den Proteingehalt in verschiedenen Zell-Fractionen) und Permeabilitätsmessungen (funktionale Relevanz) ermittelt und mit den Ergebnissen an Gehirnendothelzellen verglichen. Hierdurch sollen sich Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von Caprat und damit auf die Modulation von TJ ergeben.

Substanzen, welche im Screening die *trans*-Interaktion von Cld5 inhibieren, werden anhand der zuvor mit Caprat etablierten Versuchsansätze validiert und charakterisiert. Darüber hinaus soll die Wirkung dieser Substanzen in primären Endothelzellen und Kapillaren aus dem Cortex der Maus untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

**Tab. 2.1:** Bakterienstämme

Stamm	genotypische Spezifikation	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math>-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSF<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Studier <i>et al.</i> 1990

**Tab. 2.2:** Verwendete eukaryontische Zellen

Zelltyp	Beschreibung	Herkunft
bEnd5	Murines Endothelioma aus der Hirnrinde	Prof. Engelhardt, Bern, SUI
hCMEC/D3	Humane Gehirn-Endothelzelllinie	Prof. Couraud, Paris, FRA
Caco-2	Humane kolorektalen Karzinomzelllinie	Bayer HealthCare, Berlin, DE
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie	ATCC, Manassas, USA
HT-29/B6	Humane kolorektalen Adenokarzinomzelllinie	Prof. Fromm, Berlin, DE
IPEC-J2	Zellen aus dem Jejunum eines nicht laktierten, neonatalen Schweines	Prof. Brodin, Kopenhagen, DEN
L-Zellen	Murine Fibroblasten aus dem subkutanem Bin- degewebe des Brustwarzenhofes und Fettgewebes	Prof. Furuse, Kobe, JPN
Mäuse Gehirn- Kapillaren	Frisch präparierte murine Kapillaren aus dem Gehirn	Dr. Winkler, Berlin, DE
MDCK-I	Hunde-Nierenzelllinie (frühe Passage, hochohmig)	Prof. Fromm, Berlin, DE
MDCK-II	Hunde-Nierenzelllinie (späte Passage, niederohmig)	Dr. Papsdorf, Berlin, DE
pGKEZ	primäre Gehirn-Kapillar-Endothelzellen, ausgewachsen aus Gehirn-Kapillaren	Dr. Winkler, Berlin, DE

**Tab. 2.3:** Größenstandard-Marker für Agarose und SDS-Gele

Beschreibung	Herkunft
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE

**Tab. 2.4:** Kits

<b>Kit</b>	<b>Herkunft</b>
InviTrap <sup>®</sup> Spin Universal RNA Mini Kit	Stratec Molecular GmbH, Berlin, DE
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics DE GmbH, Mannheim, DE
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
MycoAlert <sup>®</sup> Mycoplasma Detection Kit	Lonza Ltd, Basel, SUI
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Plasmid Mini Kit	Qiagen N.V., Hilden, DE
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen N.V., Hilden, DE
Zymoclean <sup>™</sup> Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE

**Tab. 2.5:** Primärantikörper

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Herkunft</b>
<b>LOT-Nummer/Klon</b>	<b>Kurzform</b>		
Aktin	Maus	1:200 IF,	Calbiochem (Merck KGaA),
JLA20	M $\alpha$ Akt	1:2.000 WB	Darmstadt, DE
FLAG	Kaninchen	1:200 IF,	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
#F7425	K $\alpha$ FLAG	1:1.000 WB	Steinheim, DE
Claudin-1	Kaninchen	1:200, IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#51-9000	K $\alpha$ Cld1	1:1.000 WB	Darmstadt, DE
Claudin-2	Kaninchen	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#51-6100	K $\alpha$ Cld2		Darmstadt, DE
Claudin-3	Kaninchen	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#34-1700	K $\alpha$ Cld3		Darmstadt, DE
Claudin-4	Kaninchen	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#36-4800	K $\alpha$ Cld4		Darmstadt, DE
Claudin-5	Kaninchen	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#34-1600	K $\alpha$ Cld5	1:1.000 WB	Darmstadt, DE
Claudin-5	Maus	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#35-2500	M $\alpha$ Cld5	1:1.000 WB	Darmstadt, DE
Claudin-6	Kaninchen	1:200 IF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
#191-204	K $\alpha$ Cld6		Steinheim, DE
GAPDH	Maus	1:1.000 WB	AbD Serotec (Bio-Rad Labora-
4G5	M $\alpha$ GAPDH		tories GmbH), Düsseldorf, DE
Occludin	Maus	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#33-1500	M $\alpha$ Occ		Darmstadt, DE
Trizellulin	Kaninchen	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#48-8400	K $\alpha$ Tri		Darmstadt, DE
ZO-1	Maus	1:200 IF	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH,
#33-9100	M $\alpha$ ZO-1		Darmstadt, DE

WB = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz

**Tab. 2.6:** Sekundärantikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Wellenlänge (in nm)</b>	<b>Kurzform</b>	<b>LOT-Nummer</b>	
Alexa Fluor 488 $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	1:250 IF	Sigma-Aldrich Chemie
$\lambda_{ex} = 488, \lambda_{em} = 505-530$	488 $\alpha$ K	#SAB4600389	GmbH, Schnelldorf, DE
Alexa Fluor 488 $\alpha$ -Maus	Ziege	1:250 IF	Sigma-Aldrich Chemie
$\lambda_{ex} = 488, \lambda_{em} = 505-530$	488 $\alpha$ M	#SAB4600387	GmbH, Schnelldorf, DE
Alexa Fluor 555 $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	1:250 IF	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 543, \lambda_{em} = 560$	555 $\alpha$ K	#A-21430	GmbH, Darmstadt, DE
Cy3-Konjugat $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	1:250 IF	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 543, \lambda_{em} = 560$	Cy3 $\alpha$ K	#A10520	GmbH, Darmstadt, DE
Cy3-Konjugat $\alpha$ -Maus	Ziege	1:250 IF	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 543, \lambda_{em} = 560$	Cy3 $\alpha$ M	#A10521	GmbH, Darmstadt, DE
Cy5-Konjugat $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	1:250 IF	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 633, \lambda_{em} = 650$	Cy5 $\alpha$ K	#A10523	GmbH, Darmstadt, DE
Cy5-Konjugat $\alpha$ -Maus	Ziege	1:250 IF	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 633, \lambda_{em} = 650$	Cy5 $\alpha$ M	#A10524	GmbH, Darmstadt, DE
HRP-Konjugat $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	1:2.000 WB	Life Technologies™
	K $\alpha$ HRP	#A16096	GmbH, Darmstadt, DE
HRP-Konjugat $\alpha$ -Maus	Ziege	1:2.000 WB	Life Technologies™
	M $\alpha$ HRP	#A16072	GmbH, Darmstadt, DE

WB = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz

**Tab. 2.7:** Fluoreszierende-Farbstoffe

<b>Bezeichnung &amp; Wellenlänge (in nm)</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Herkunft</b>
CellMask™ Deep Red	2 $\mu$ g/ml	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 633, \lambda_{em} = 650$		GmbH, Darmstadt, DE
Fluorescein isothiocyanate–dextran 10	25 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich Chemie
$\lambda_{ex} = 495, \lambda_{em} = 519$		GmbH, Schnelldorf, DE
Hoechst 33342	2 $\mu$ M	Life Technologies™
$\lambda_{ex} = 364, \lambda_{em} = 385-470$		GmbH, Darmstadt, DE
<i>Lucifer Yellow</i>	100 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich Chemie
$\lambda_{ex} = 425, \lambda_{em} = 520$		GmbH, Schnelldorf, DE
Rhodamin-Phalloidin	0,13 $\mu$ M	Life Technologies™ GmbH,
$\lambda_{ex} = 543, \lambda_{em} = 560$		Darmstadt, DE
Trypanblau	0,05 %	Sigma-Aldrich Chemie
$\lambda_{ex} = 543, \lambda_{em} = 560$		GmbH, Schnelldorf, DE

Hierbei dienten CellMask™ und Trypanblau zur Färbung der Plasmamembran, Hoechst 33342 um den Nukleus zu visualisieren und Rhodamin-Phalloidin um das filamentöse Aktin sichtbar zu machen. Fluorescein isothiocyanate–dextran 10 (FD10, 10.000 Da) und *Lucifer Yellow* (LY, 457 Da) dienten als Größenstandards in den Permeationsmessungen (2.4.8).

**Tab. 2.8:** Plasmide

Bezeichnung & Antibiotikaresistenz	RE	Herkunft
Claudin-1 pEYFP-N1 (human, Cld1-YFP) Neomycin/Kanamycin	<i>SalI</i> & <i>BamHI</i>	Dr. Piontek (FMP, Berlin, DE)
Claudin-2 pEYFP-N1 (human, Cld2-YFP) Neomycin/Kanamycin	<i>SalI</i> & <i>BamHI</i>	Dr. Piontek (FMP, Berlin, DE)
Claudin-3 pEYFP-N1 (murin, Cld3-YFP) Neomycin/Kanamycin	<i>SalI</i> & <i>BamHI</i>	Dr. Piontek (FMP, Berlin, DE)
Claudin-4 pEYFP-C1 (human, YFP-Cld4) Neomycin/Kanamycin	<i>SalI</i> & <i>BamHI</i>	Dr. Piontek (FMP, Berlin, DE)
Claudin-5 pEYFP-N1 (murin, Cld5-YFP) Neomycin/Kanamycin	<i>SalI</i> & <i>BamHI</i>	Dr. Piontek (FMP, Berlin, DE)
Claudin-5 pECFP-N1 (murin, Cld5-CFP) Neomycin/Kanamycin	<i>SalI</i> & <i>BamHI</i>	Dr. Piontek (FMP, Berlin, DE)
Claudin-5 (murin, FLAG-Cld5)		Dr. Piehl (FMP, Berlin, DE)
Claudin-5 <i>CoralHue</i> <sup>TM</sup> humanized monomeric Kikume Green-Red (phmKikGR1-MNLinker) (murin, Cld5-Kikume) Neomycin/Kanamycin	<i>EcoRI</i> & <i>NotI</i>	eigene Arbeit Ausgangs- vektor MBL International Corporation, Woburn, MA
Claudin-5 mCherry (murin, GFP gegen mCherry, pEGFP-N3 Vektor) Neomycin/Kanamycin	<i>EcoRI</i> & <i>BamHI</i>	eigene Arbeit

RE: Restriktionsenzyme; ECFP: *Enhanced cyan fluorescent protein gene*; EYFP: *Enhanced yellow fluorescent protein gene*

**Tab. 2.9:** Enzyme

Enzym	Eigenschaft	Herkunft
Benzonase	Abbau von DNS und RNS	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, DE
<i>BamHI</i>	5'-G GATC C-3' Restriktionsenzym 3'-C CTAG G-5'	Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, DE
<i>EcoRI</i>	5'-G AATT C-3' Restriktionsenzym 3'-C TTAA G-5'	Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, DE
<i>NotI</i>	5'-GC GGCC GC-3' Restriktionsenzym 3'-CG CCGG CG-5'	Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, DE
<i>SalI</i>	5'-G TCGA C-3' Restriktionsenzym 3'-C AGCT G-5'	Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, DE
<i>SnaBI</i>	5'-TAC GTA-3' Restriktionsenzym 3'-ATG CAT-5'	Thermo Fisher Scientific Inc., St. Leon-Rot, DE
AccuPOL DNA-Polymerase	relativ sequenzexakte DNS-Amplifikation	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Taq-DNA-Polymerase	fehleranfällig aber schneller als AccuPOL	New England BioLabs GmbH, Frankfurt, DE
Trypsin	spalten von extrazellulären Proteinen	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE

**Tab. 2.10:** Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' ⇒ 3')	Verwendung
sCld5-VP-qRT	CCTGGACCACAACATCGTGA	Cld5 (Schwein)
sCld5-RP-qRT	TCGTACTTCTGCGACATGGG	
sCld1-VP-qRT	ACACCACTTTGCAAGCAACC	Cld1 (Schwein)
sCld1-RP-qRT	TCGTACTTCTGCGACATGGG	
sGAPDH-VP-qRT	GGAGAACGGGAAGCTTGTC A	GAPDH (Schwein)
sGAPDH-RP-qRT	GGTTCACGCCCATCACAAAC	
hCld5-VP-qRT	CTGTTTTCCATAGGCAGAGCG	Cld5 (Human)
hCld5-RP-qRT	AAGCAGATTCTTAGCCTTCC	
hCld1-VP-qRT	TCAGCACTGCCCTGCCCCAGT	Cld1 (Human)
hCld1-RP-qRT	TGGTGTTGGGTAAGAGGTTGT	
Kikume-VP-SQ	AATGACGGTAAATGGCCCC	SQ (vorwärts) für Kikume
Kikume-RP-SQ	TCGATCCTCCTCCTGAACC	SQ (rückwärts) für Kikume
mCld5-VP-Kik-Klo	GGAATTCCACCATGGGGTCTGCAG	Klo (start) Cld5 in Kikume
mCld5-RP-Kik-Klo	GAATGCGGCCGCCACATAGTTCTTCTTGTC	Klo (stop) Cld5 in Kikume
mCld5-VP-mCh-Klo	GGAATTCATGGGGTCTGCAGCGTTGGA	Klo (start) Cld5 in mCherry
mCld5-RP-mCH-Klo	CGGGATCCCACATAGTTCTTCTTGTCGT	Klo (stop) Cld5 in mCherry
Cld5-siRNA	CGUUGGAAAUUCUGGGUCUUU	siRNA für Cld5 (Sense)
	AGACCCAGAAUUCCAACGUU	siRNA für Cld5 (Antisense)

Mit in Bezeichnung: VP = Vorwärts*primer*, RP = Rückwärts*primer*, qRT = quantitative RT-PCR, SQ = Sequenzierungs*primer*, Klo = Klonierungs*primer*. Alle *Primer* wurden von BioTez GmbH (Berlin, DE), mit Ausnahme der Sequenzierungs*primer* und den Klonierungs*primer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) bezogen. Die siRNA (*small interfering RNA*) von Life Technologies™ GmbH, (Darmstadt, DE).

**Tab. 2.11:** Geräte

Bezeichnung	Herkunft
Agarosegelkammer Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Blot Transfer System Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
Cellomics® ArrayScan®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
cellZscope®	nanoAnalytics GmbH, Münster, DE
Elektroporator EquiBio Easyject Prima	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Fluoreszenz Scanner FLA-5000	Fujifilm Holdings K.K, Tokio, JPN
FACSAria™	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
Inkubator Certomat® U	Sartorius AG, Göttingen, DE
Inkubator TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta-FCS	Carl Zeiss AG, Jena, DE

## Geräte Fortsetzung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta-NLO	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta-UV	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Kryocontainer Lumat LB 9507	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad, DE
Monolith™ NT.115	NanoTemper Technologies GmbH, München, DE
Microplate Reader 7520	Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA, USA
Mikroskop (Konfokal) ConfoCor2	Carl Zeiss AG, Jena, DE
NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
PCR Mastercycler® gradient Safire2™	Eppendorf AG, Hamburg, DE Tecan Group AG, Männedorf, SUI
Schüttler HS 260 basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Schüttler MS2 Minishaker	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
SDS-Gelelektrophoresekammer Mighty Small II SE250/SE260 (Hofer)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, DE
Spektrophotometer DU® 440	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Sterilbank	BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, DE
StepOne™ Real-Time PCR-System TeMo™	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE Tecan Group AG, Männedorf, SUI
Transilluminator Lumi-Imager F1T	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, DE
Waage PB1502-S MonoBloc Inside	Mettler-Toledo GmbH, Wien, AUT
Waage MC1 LC 2200 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Sorvall Evolution RC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA

**Tab. 2.12:** Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
1,4-Dithiothreitol	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Acryl-/Bisacrylamid-Mix (30 %/0,8 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Agarose DNA Grade Electran	VWR International GmbH, Dresden, DE
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Ampicillin	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE
Azeton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Coomassie Brilliant Blue G250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE

## Chemikalien Fortsetzung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
(Gibco®) #41966-029	
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
(Gibco®) Glutamax™ #2188-025	
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Ethanol	VWR International GmbH, Dresden, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
G418-Sulfate	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE
Glyzerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Hank's Balanced Salt Solution	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
Immomount mounting solution	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Isopropanol	VWR International GmbH, Dresden, DE
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kanamycin	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE
Labradimil, Labrodil (RMP-7)	Bachem AG, Bubendorf BL, Schweiz
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Luria-Bertani Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Luria-Bertani Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Lipofectamine™ 2000	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
Methanol	VWR International GmbH, Dresden, DE
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Minimum Essential Medium Eagle	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Natrium-Caprat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natrium-Dodecylsulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Natriumpyruvat	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Nicht essentielle Aminosäuren	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
Neutralrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Nonident P-40 Alternative	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, DE
phosphate buffered saline	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Polyethylenimin	Polyscience Inc., Eppelheim, DE
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Protease inhibitor cocktail for eukaryotes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE

## Chemikalien Fortsetzung

Bezeichnung	Herkunft
Opti-Minimum Essential Medium Eagle	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
SYBR® Safe DNA gel stain	Life Technologies™ GmbH, Darmstadt, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris-base)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Trypanblau	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, DE
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE
Trypsin/EDTA (0,25 %/0,02 %)	Biochrom GmbH (Merck KGaA), Berlin, DE
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE

**Tab. 2.13:** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
6-, 12-, 24-, 96- <i>well</i> Platte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, SUI
Corning® CellBIND® 384- <i>well</i> Flat Clear Bottom Black Polystyrene Microplates	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, DE
Deckgläschen(12 mm Ø)	Cotech Vertriebs-GmbH, Berlin, DE
Deckgläschen (30 mm Ø)	Cotech Vertriebs-GmbH, Berlin, DE
Elektroporationsküvette	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Filterpapier (Whatman Papier)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glaskapillaren (standard treated)	NanoTemper Technologies GmbH, München, DE
Hybond-ECL Nitrocellulose membrane	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, DE
Kanüle (Außendurchmesser von 0,7 mm, 22 G)	Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Kryokulturgefäße	Corning® Inc., Tewksbury, MA, USA
Millicell® Cell Culture Inserts (Filter)	Merck Millipore (Merck KGaA), Darmstadt, DE
Objektträger	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, DE
SDS-Gradientengel (4-20 %)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Serologische Pipette 5, 10, 25 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Zellkulturflasche (25, 75 cm <sup>2</sup> )	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, SUI
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, SUI
Zellsiebröhrchen	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Transformation von Plasmid DNS

Für die Elektroporation wurden 50  $\mu\text{l}$  der *E. coli*-Lösung mit 1  $\mu\text{g}$  DNS des jeweiligen Konstruktes in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 0,1 cm) gemischt und eine Spannung von 1,8 kV angelegt (EasyjecT Prima). Die so transformierten Bakterien wurden für 1 h in 500  $\mu\text{l}$  Luria-Bertani (LB-) Flüssigmedium auf einem Schüttelinkubator bei 250  $\text{min}^{-1}$  und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Selektion von positiven Klonen erfolgte mit Hilfe der in den LB-Agarplatten vorhandenen Antibiotika. Dieses war, je nach Resistenzgen des zu transformierenden Plasmids, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin oder 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin (Tab. 2.8). Am nächsten Tag wurden einige der gewachsenen Klone zur Plasmid-Isolierung (2.2.2) angeimpft.

### 2.2.2. Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte nach Herstellerangaben (Qiagen Plasmid Mini Kit bzw. Qiagen Plasmid Plus Midi Kit). Die Eluierung der Plasmide von der Säule erfolgte bei der Mini Präparation mit 10  $\mu\text{l}$  dest. Wasser (wurde für Transfektionen eingesetzt, 2.4.4) und bei der Midi Präparation mit einem Gemisch aus 66  $\mu\text{l}$  EB Puffer + 132  $\mu\text{l}$  Wasser (wurde für Klonierungen eingesetzt, 2.2.6).

### 2.2.3. Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentration und -Reinheit

Die DNS- und RNS-Konzentration, sowie deren Reinheit wurden mit Hilfe des Nanodrops-1000 laut Herstellerangaben und den entsprechenden Werkseinstellungen bestimmt. Der Vorteil des Nanodrops ist das geringe benötigte Volumen der Probe (2  $\mu\text{l}$ ).

### 2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Proben wurden in 6 x DNS-Probenpuffer aufgenommen und in die Taschen des 0,8 - 1,5 % Agarosegels überführt. Dabei war die Agarose in dem Lauffuffer 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Es wurde eine Spannung von 70 V für 1 h angelegt, bis die Proben und der verwendete Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder bzw. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) aufgetrennt waren. Anschließend wurde die DNS in dem Gel durch ein SYBR® Safe-Bad (1:10.000) gefärbt, die dann in einem Fluoreszenz-Scanner (FLA-5000) visualisiert werden konnte.

### 2.2.5. Isolierung von DNS aus einem Agarosegel

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (2.2.4) wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die Extraktion der DNS aus dem

Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Zymoclean<sup>®</sup> Gel DNA Recovery Kit, welches wie vom Hersteller vorgegeben, verwendet wurde.

### 2.2.6. Klonierung von Claudin-5 in Vektoren mit fluoreszierenden Fusionsproteinen

Die Maus Cld5 DNS-Sequenz wurde in ein rot-fluoreszierendes Fusionsprotein (mCherry) und ein photoumschaltbares Fusionsprotein (Kikume), welche C-Terminal lokalisiert sind, kloniert (Tab. 2.8). Die Cld5 DNS-Sequenz wurde mittels spezifischer *Primer* aus dem Cld5-YFP Vektor (Tab. 2.8) amplifiziert (PCR Mastercycler<sup>®</sup> gradient) die zusätzlich mit den in Tabelle 2.8 aufgeführten Restriktionsschnittstellen versehen sind. Für die Amplifikation von Cld5 für den mCherry Vektor wurden der mCld5-VP-mCh-Klo und mCld5-RP-mCH-Klo *Primer*, für Kikume mCld5-VP-Kik-Klo und mCld5-RP-Kik-Klo *Primer* verwendet (Tab. 2.10). Das enthaltende PCR-Fragment wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4) vom *Template* getrennt und gereinigt (2.2.5). Gleichmaßen wurden die Vektoren verdaut und gereinigt. Die PCR- und Vektorfragmente wurden nach Herstellerangaben durch T4-DNS-Ligase in einem Verhältnis von Vektor zu *Insert* von 1:3 ligiert. Nach der Transformation (2.2.1) wurden die Plasmide isoliert (2.2.2) und sequenziert (Source Bioscience GmbH, Berlin, DE).

**Tab. 2.14:** Ansatz für Claudin-5 Ampifikation und PCR-Programm

Ansatz (Stammlösung)		PCR-Programm
0,5 $\mu$ l AccuPOL-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l dNTPs (10 mM)	95 °C 1,5 min
1,11 $\mu$ l Cld5-YFP Plasmid (352,6 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l je <i>Primer</i> (10 $\mu$ M)	95 °C 1 min
	21,39 $\mu$ l HPLC Wasser	56 °C 1,5 min
4 $\mu$ l 10x Puffer, 25 mM MgCl <sub>2</sub>	30 $\mu$ l Totalvolumen	72 °C 1,5 min
		72 °C 10 min

} x25

### 2.2.7. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

Um das Expressionsniveau von Cld1 und Cld5, sowie von GAPDH zu bestimmen, wurde eine *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) durchgeführt. Zunächst wurde die RNS aus Caco-2 und IPEC-J2 Zellen mit Hilfe des InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit isoliert. Anschließend wurde die RNS in cDNS unter der Verwendung de Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR umgeschrieben. Für die qRT-PCR wurden die unter Tab. 2.10 angegebenen *Primer* verwendet und mittels des StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR-System analysiert. Die erhaltenen ct-Werte wurden auf GAPDH normalisiert.

## 2.3. Biochemische Methoden

### 2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit laut Herstellerangaben verwendet. Die Messung der Probe erfolgte mit Hilfe des Nanodrops bei einer Wellenlänge von 562 nm (Werkseinstellung: Protein BCA). Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA: 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/ml) erstellt und gemessen. Der Bereich der Bestimmung der Proteinkonzentration umfasst 20 bis 2.000  $\mu\text{g/ml}$ .

### 2.3.2. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zusammen mit dem Westernblot (2.3.3) zur Quantifizierung von Proteinmengen verwendet. Hierzu wurden die Lysate aus der Zellkultur (2.4.7) mit 4 x SDS-Probenpuffer (Tab. 2.15) versetzt und Proben der Triton X-100 löslichen Fraktion für 15 min bei 37 °C und der unlöslichen Fraktion für 1 h bei 37 °C erhitzt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gradientengel (4-20 %) geladen und zuerst eine konstante elektrische Spannung von 70 V (30 min, Sammelgel) und dann 90 V (3 h, Trenngel) im Kühlraum angelegt. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Westernblot und Immunodetektion (2.3.3).

**Tab. 2.15:** SDS-Proben- und Laufpuffer

<b>4 x SDS-Probenpuffer</b>	250 mM Tris/HCl pH 6,8	<b>SDS-Laufpuffer</b>	192 mM Glycerol
	40 % Glycerol (v/v)		25 mM Tris
	6 % SDS (w/v)		0,1 % SDS
	0,05 % Bromphenolblau		
	20 % $\beta$ -Mercaptoethanol		

### 2.3.3. Westernblot und Immunodetektion von Proteinen auf Membranen

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran kurz in Wasser geschwenkt und anschließend, wie auch das SDS-Gel (2.3.2), für 10 min im Transferpuffer äquilibriert. Zwei Filterpapiere, welche als Pufferreservoir während des Blotvorganges dienten, wurden mit Transferpuffer getränkt und auf die Anode gelegt. Darauf wurden die Nitrozellulosemembran, dann das Gel und anschließend wieder zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere luftblasenfrei geschichtet. Die Kathode wurde oben aufgelegt und eine konstante elektrische Spannung von 15 V für 15 min und anschließend 20 V für 35 min angelegt. Die unspezifischen Bindungsstellen der Membran wurde durch 1 h Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBS-T blockiert (Tab. 2.16). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (in TBS-T) über Nacht im Kühlraum. Nach mehrmaligem waschen mit TBS-T wurden die Membranen mit einem Peroxidase gekoppelten (*horseradish peroxidase*, HRP) Sekundärantikörper (in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Mehrfaches Waschen der Membran mit TBS-T reduzierte ungewünschte Hintergrundsignale. Für die

Visualisierung wurde das Lumi-Light Western Blotting Substrate verwendet und die Chemilumineszenz mittels Lumi-Imager F1™ detektiert.

**Tab. 2.16:** Transferpuffer und TBS-T

Transferpuffer		TBS-T	
	192 mM Glycerol		20 mM Tris
	25 mM Tris		150 mM NaCl
	20 % Methanol		0,05 % (v/v)
			Tween-20

## 2.4. Zellbiologische Methoden

### 2.4.1. Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zellen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt und deren Kultivierungsbedingungen unter Tabelle 2.17 aufgelistet. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage, bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Hierfür wurden zunächst die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> (*phosphate buffered saline* ohne Kalzium und Magnesium) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des entsprechenden Mediums abgestoppt und die Zellen zentrifugiert (4 min, 150 x g). Das resultierende Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen an Medium aufgenommen und die Zellen verdünnt ausgesät.

Das Standardmedium 1 g (Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax™) bzw. 4,5 g (Dulbecco's Modified Eagle Medium) setzt sich aus 1 g/L bzw. 4,5 g/L Glukose, 10 % fötales Kälberserum (FKS), 100 U Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zusammen. Zu stabil transfizierten Zellen wurde 0,5 mg/ml Geneticin (G418) zugegeben, welches die Proteinsynthese von eukaryontischen Zellen hemmt. Durch das, auf dem Plasmid der stabil transfizierten Zellen enthaltene Neomycin-Geneticin-Resistenzgen, wird die Wirkung von G418 unterdrückt, wodurch es zur Selektion der transfizierten Zellen kommt.

**Tab. 2.17:** Kultivierungsbedingungen eukaryontischer Zellen

Zelltyp	Medium	Kultivierungsbedingungen
bEnd5	Standardmedium 4,5 g 1 % Natrium Pyruvate 1 % nicht essentielle Aminosäuren 2 % L-Glutamin 5 µM β-Mercaptoethanol	Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % 5 % CO <sub>2</sub>
Caco-2	Standardmedium 1 g 20 % FKS 1 % nicht essentielle Aminosäuren	Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % 10 % CO <sub>2</sub>
HEK-293	Standardmedium 1 g	Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % 10 % CO <sub>2</sub>
HT-29/B6	RPMI 1640	Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 %

## Kultivierungsbedingungen eukaryontischer Zellen Fortsetzung

Zelltyp	Medium	Kultivierungsbedingungen
	5 % FKS 100 U Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	5 % CO <sub>2</sub>
IPEC-J2	DMEM/F-12 (1:1) 5 % FKS 100 U Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,5 % Natriumpyruvat 0,12 % Natriumhydrogencarbonat	Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % 10 % CO <sub>2</sub>
L-Fibroblasten	Standardmedium 1 g	Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % 10 % CO <sub>2</sub>
Mäuse Gehirn- Kapillaren	Standardmedium 4,5 g	5 % CO <sub>2</sub>
MDCK-I	Minimum Essential Medium Eagle 10 % FKS 100 U Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM Glutamin	Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % 10 % CO <sub>2</sub>
MDCK-II	Standardmedium 1 g	Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % 10 % CO <sub>2</sub>
pGKEZ	Standardmedium 4,5 g 0,5 % Mäuseserum 10 % basic fibroblast growthfactor	5 % CO <sub>2</sub>

**2.4.2. Test auf Mykoplasmen**

Die routinemäßige Testung in Kultur befindlicher eukaryontischer Zellen auf Mykoplasmen erfolgte alle zwei Monate mit Hilfe des auf Lumineszenz basierenden MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit. Das Kit wurde gemäß Anleitung verwendet und die Lumineszenz am Lumat LB 9507 gemessen.

**2.4.3. Vitalitätstest eukaryotischen Zellen mittels Neutralrot und MTT**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 24-well Platten kultiviert, bis sie eine konfluente Zellschicht aufwiesen. Nachdem die Zellen mit HBSS<sup>-/-</sup> (*Hank's Balanced Salt Solution* ohne Kalzium und Magnesium) gewaschen wurden, erfolgte die Applikation der zu testenden Substanz bzw. der Kontrolle. Nach einer definierten Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen gewaschen und Nährmedium (ohne Phenolrot) mit 0,005 % Neutralrot bzw. 0,5 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zugesetzt. Nach einer Färbezeit von 3 h im Brutschrank wurden die Zellen gewaschen

und mit Hilfe der Neutralrot-Extraktionslösung (1 % Eisessig; 50 % Ethanol) bzw. MTT-Extraktionslösung (5 % Triton; 0,04 N HCl; 93 % Isopropanol) sowohl fixiert, als auch der Farbstoff eluiert. Nach 15 min auf dem Schüttler wurde die Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm (NRT) bzw. 570 nm (MTT) bestimmt (Microplate Reader 7520).

#### 2.4.4. Transfektion von eukaryontischen Zellen

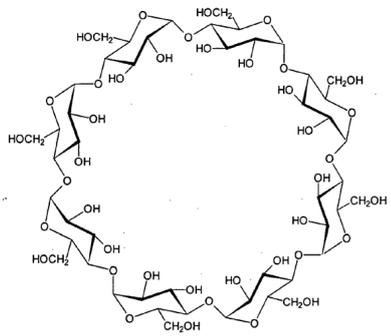
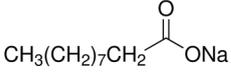
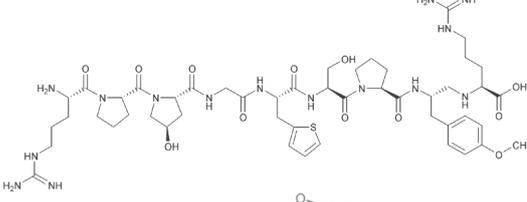
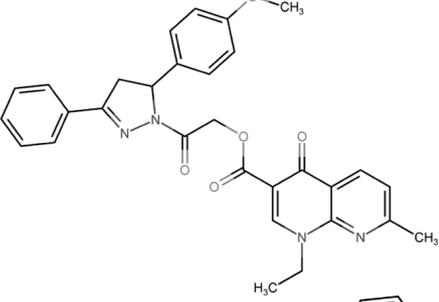
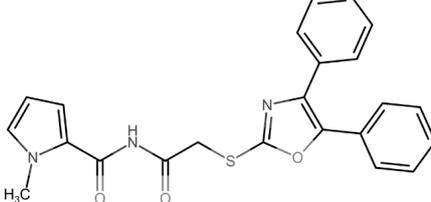
Für die Transfektion von eukaryontischen Zellen mit Plasmid DNS wurden 6-*well* Gefäße für 15 min bei 37 °C mit Poly-L-Lysin (PLL, 25 µg/ml) beschichtet. Anschließend wurden die *wells* mit PBS gewaschen und die zu transfizierenden Zellen ausgesät (70 %ige Konfluenz) und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Zellen erreichten eine Konfluenz von ca. 90 %, das Medium wurde abgenommen und 1,5 ml neues zugegeben. Für jede Transfektion wurden 2 µg der DNS (bei Kotransfektion je 2 µg) in 250 µl Opti-Minimum Essential Medium Eagle aufgenommen. In einem weiteren Ansatz wurden 10 µl Polyethylenimin (PEI) mit 250 µl Opti-Minimum Essential Medium Eagle gemischt. Nach 5 min Inkubation beider Ansätze, wurden diese vereint, gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zu den Zellen pipettiert und am nächsten Tag Medium gewechselt, sodass das PEI entfernt wurde. Zellen für die konfokale Mikroskopie (2.4.10) wurden 24 h nach Transfektionsbeginn auf je zwei mit PLL beschichtete Deckgläschen ausgesät und waren am darauffolgenden Tag für die Experimente zu verwenden. Sollte eine stabile Expression des transfizierten Proteins in den Zellen erreicht werden, wurde den Zellen 48 h nach Transfektionsbeginn G418 zugesetzt. Da es sich bei den Transfektionen um fluoreszenzaktive Proteine handelte, konnte die Expressionsrate und Lokalisation des Proteins mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt werden. Nach dieser Evaluierung wurden die stabil transfizierten Zellen sortiert (2.4.5).

#### 2.4.5. Sortieren von stabil transfizierten eukaryontischen Zellen

Nachdem eine Ziellinie mit einem fluoreszenzmarkierten Protein stabil transfiziert wurde (2.4.4), wurde diese mit Hilfe der Durchflusszytometrie sortiert. Es wurde das *fluorescence-activated cell sorting* (FACS, AriaI™) verwendet, um exprimierenden Zellen anzureichern. Die, in einer 75 cm<sup>2</sup> konfluent gewachsenen Zellen, wurden abgelöst, in 10 ml Medium mit 5 mM EDTA (4 °C) aufgenommen und bei 4 °C für 5 min, 1.200 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS<sup>-/-</sup> mit 5 mM EDTA (4 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Aufnahme in 5 ml PBS<sup>-/-</sup> mit 5 mM EDTA (4 °C) und anschließendem resuspendieren, wurde dieses in ein auf Eis befindliches Zellsiebröhrchen überführt. Die so erhaltene Einzel-Zellsuspension wurde für das FACS verwendet. Nach dem Sortiervorgang wurden die Zellen wie unter 2.4.1 beschrieben kultiviert.

### 2.4.6. Applikation von Testsubstanzen

Alle aufgeführten Substanzen wurden als Pulver bzw. Lyophilisat geliefert und mussten für die Experimente gelöst werden. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) ist die methylierte Form eines zyklischen Oligosaccharids mit 7 Glukosemolekülen ( $\beta$ ,  $\alpha=6$ ,  $\gamma=8$ ), welche über  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpft sind und eine toroidale Struktur bilden. Aufgrund seiner relativ hohen molekularen Masse, war eine Verdünnung der Substanz nach dem Abwiegen nicht notwendig, sodass die entsprechende Menge direkt in Medium gelöst werden konnte. Caprat ist das Natriumsalz einer 10-kettigen (C10) Fettsäure und somit ein Tensid, welches in der Gegenwart von Kalzium präzipitiert. Aus diesem Grund wurde es in einer Stammlösung von 100 mM in HBSS<sup>-/-</sup> gelöst und für die Experimente in HBSS<sup>-/-</sup> weiter

Substanz	Molekulare Masse Formel	Stammlösung Applikation	Struktur
M $\beta$ CD	1320 g/mol C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> O <sub>35</sub>	Direktes abwiegen Medium ohne Phenolrot	
Caprat	194,25 g/mol C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> Na	100 mM in HBSS <sup>-/-</sup> HBSS <sup>-/-</sup>	
RMP-7	1098,29 g/mol C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>15</sub> O <sub>12</sub> S	1 $\mu$ M in HBSS <sup>+/+</sup> Medium ohne Phenolrot	
BO1	524,6 g/mol C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	10 mM in 100 % DMSO Medium	
PD1	417,5 g/mol C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	10 mM in 100 % DMSO Medium	

**Abb. 2.1: Verwendete Substanzen für die Etablierung der manuellen Versuchsansätze, sowie potentielle Kontrollen für das HDS**

M $\beta$ CD besteht aus einem Cyclodextran mit Methylgruppen und besitzt eine molekulare Masse von 1320 g/mol. Caprat ist das Natriumsalz einer 10er-Kohlenstoffkette (daher C10) einer Fettsäure und damit ein Tensid. RMP-7 besitzt eine molekulare Masse von 1098 g/mol und fällt im Gegensatz zu Caprat nicht in der Gegenwart von Kalzium aus. BO1 und PD1 sind Substanzen, welche in dem HDS für wirksam befunden wurden und werden unter Ergebnisse näher erläutert.

verdünnt. RMP-7 wurde in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in HBSS<sup>+/+</sup> (*Hank's Balanced Salt Solution* mit Kalzium und Magnesium) und für die Versuche in Medium weiter verdünnt. BO1 (Barriere-Öffner 1) und PD1 (Plasmamembran-*Disrupter* 1) sind Substanzen, welche im HDS für wirksam befunden wurden und werden im Abschnitt Ergebnisse weiter vorgestellt. Weiterhin wurde eine Cld5 spezifische siRNA als potentielle Kontrolle für das HDS getestet. Dessen Sequenz ist in Tab. 2.10 aufgeführt.

#### 2.4.7. Herstellung von Proteinlysaten für SDS-Gelelektrophorese

Zellen, welche das zu untersuchende Protein exprimierten, wurden auf Petrischalen (100 x 20 mm) kultiviert, bis sie eine konfluente Zellschicht aufwiesen. Wurde die Wirkung einer Substanz auf das entsprechende Protein untersucht, wurde diese nach Waschen der Zellen appliziert (2.4.6) und die Zellen für eine definierte Zeitspanne im Brutschrank kultiviert. Zur Lyse wurden die Zellen auf Eis mit HBSS<sup>-/-</sup> gewaschen, für 20 min mit 1,5 ml Extraktions-Puffer inkubiert und mit einem Zellscharber geerntet. Das Zelllysate wurde für 1 min bei RT bei 13.000  $\text{min}^{-1}$  zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (Triton X-100 lösliche Fraktion) in ein neues Gefäß überführt und 166  $\mu\text{l}$  Solubilisierungs-Puffer hinzugegeben. Vor dem schockgefrieren der Probe in flüssigem Stickstoff wurden 5  $\mu\text{l}$  für die spätere Proteinkonzentrationsbestimmung abgenommen. Das Pellet (Triton X-100 unlösliche Fraktion) wurde mit 50  $\mu\text{l}$  Benzonase-Mix für 10 min bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden 166  $\mu\text{l}$  Solubilisierungs-Puffer hinzugegeben, die Probe bei 95 °C für 3 min erhitzt und mehrmals durch eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,7 mm gezogen. Wiederum wurden 5  $\mu\text{l}$  für die spätere Proteinkonzentrationsbestimmung abgenommen und die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Beide Proben wurden bei -80 °C gelagert.

**Tab. 2.18:** Extraktions-, Solubilisierungs-Puffer & Benzonase-Mix

<b>Extraktions-Puffer</b>	25 mM Hepes pH 7,4 150 mM NaCl 1 % Triton-X100 Protease-Inhibitor ( <i>cocktail for eukaryotes</i> )	<b>Solubilisierungs-Puffer</b>	50 mM Tris pH 8,8 5 mM EDTA 1 % SDS
<b>Benzonase-Mix</b>	50 mM Tris pH 8,8 2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 U Benzonase		

#### 2.4.8. TER und Permeabilitätsuntersuchungen eukaryontischer Zellen

Epithel- und Endothelzellen sind Barriere-bildene Zellen, die die Permeabilität von Stoffen einschränken. Die para- und transzellulärer Permeabilität sind messbare Größen, welche die Dichtigkeit einer Zellschicht beschreiben. Die Wirksamkeit einer Substanz auf die Dichtigkeit lässt sich daher durch messen des transzellulären elektrischen Widerstands (TER), sowie der Permeabilität untersuchen. Bei der TER Messung wird der durch die Zellen hervorgerufene elektrische Widerstand ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) gemessen und beschreibt somit die Per-

meabilität von Ionen. Bei den Permeabilitätsuntersuchungen wurde die Permeabilität von Größenstandards (LY, 457 Da bzw. FD10, 10 kDa) durch eine Zellschicht analysiert. Je nach verwendeter Zelllinie wurden unterschiedliche Bedingungen gewählt, die in Tabelle 2.19 aufgelistet sind. Die Filter (Millicell<sup>®</sup> Cell Culture Inserts) wurden in einer 24-*well* Platte über Nacht beschichtet, anschließend mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und apikal mit 400  $\mu\text{l}$  sowie basolateral mit 600  $\mu\text{l}$  Medium (Tab. 2.17) für 5 h im Brutschrank äquilibriert. Das Medium wurde abgenommen und die entsprechende Zellzahl pro Filter in 400  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. Basolateral wurden 600  $\mu\text{l}$  Medium zugegeben. Um die Permeabilität bzw. den Widerstand des Filters zu bestimmen, wurde in diese keine Zellen ausgesät. In den folgenden Tagen wurde alle 24 h der TER gemessen, bei Verwendung von bEnd5 und Caco-2 Zellen alle 48 h das Medium gewechselt, bis ein entsprechende Plateauwert erreicht war. Anschließend erfolgte die Applikation von Substanzen im apikalen Kompartiment, wobei mit Ausnahme von IPEC-J2 Zellen, basolateral das Medium erneuert wurde. Für eine Versuchsreihe wurden je Konzentration drei Filter, sowie drei unbehandelte Kontrollen verwendet. Nach Substanzinkubation wurde erneut der TER und anschließend die Permeabilität bestimmt. Hierzu wurde das Medium apikal und basolateral abgenommen und die Filter zweimal mit HBSS<sup>+/+</sup> gewaschen. Anschließend wurden die Filter in eine mit HBSS<sup>+/+</sup> (600  $\mu\text{l}$ , 37 °C) gefüllte 24-*well* Platte überführt und apikal 400  $\mu\text{l}$  LY (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. FD10 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in HBSS<sup>+/+</sup> appliziert. Nach 10 min Inkubation im Brutschrank wurden 200  $\mu\text{l}$  aus dem basolateralen Kompartiment in eine 96-*well* Platte pipettiert. Die Filter wurden in eine neue, mit vorgewärmten HBSS<sup>+/+</sup> befüllte 24-*well* Platte überführt. Diese Prozedur wurde bis zu 40 min nach Zugabe des Größenstandards wiederholt. Zur Konzentrationsbestimmung, wurde auf der Platte eine Standardreihe pipettiert (Verdünnungen von 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:1.000; 1:10.000, sowie HBSS<sup>+/+</sup>, in 3 Wiederholungen). Die Intensitäten der Fluoreszenz des Größenstandards in den Proben und der Standardreihe, wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts (Safire2,  $\lambda_{ex} = 425 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ , Verstärkung = 68) ermittelt. Der Permeationskoeffizient ( $P_K$ ) der unbehandelten Zellen (einfacher Mediumtausch anstatt der Inkubation mit einer Substanz) wurde wie nach Nag beschrieben (Nag, 2003), bestimmt. Aus dem berechneten ( $P_K$ ), wurde für die prozentuale Veränderung in jedem Experiment, der Mittelwert der drei Filter des Medium- $P_K$  ermittelt und die Proben anhand dieses Mittelwerts als prozentuale Veränderung dargestellt.

Für die ersten Charakterisierungen des Verhaltens der verschiedenen Zelllinien, hinsichtlich deren Aufbau des TER und Erreichen des Plateauwertes, sowie die Kultivierungsbedingungen auf den Filtern wurde das cellZscope<sup>®</sup> wie vom Hersteller angegeben verwendet.

**Tab. 2.19:** Bedingungen der Zellen für TER und Permeabilitätsuntersuchungen

Zelllinie	Zellzahl	Filtertyp und Beschichtung	Plateauwert
bEnd5	90*10 <sup>3</sup>	PCF, 150 $\mu\text{l}$ Laminin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	nicht bestimmt, 120 h
Caco-2	81*10 <sup>3</sup>	CM, 150 $\mu\text{l}$ RSK (333 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	~240 $\Omega \times \text{cm}^2$ , 144 h
MDCK-II	180*10 <sup>3</sup>	CM, 150 $\mu\text{l}$ RSK (333 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	~80 $\Omega \times \text{cm}^2$ , 48 h
MDCK-II FLAG-Cld5	180*10 <sup>3</sup>	CM, 150 $\mu\text{l}$ RSK (333 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	~100 $\Omega \times \text{cm}^2$ , 48 h
IPEC-J2	150*10 <sup>3</sup>	PCF, 150 $\mu\text{l}$ RSK (333 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	~5.000 $\Omega \times \text{cm}^2$ , 144 h

RSK = Rattenschwanzkollagen

### 2.4.9. Präparation von Gehirn-Kapillaren und primären Endothelzellen aus der Maus

Für die Kapillarpräparation wurden C57BL/6 Mäuse beider Geschlechter und mit einem Alter zwischen 8 und 54 Wochen verwendet. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend dekapitiert. Die Haut über dem Schädel wurde geöffnet und das Schädeldach entfernt. Nach Herausnahme des Gehirns wurde der Cortex von den übrigen Teilen des Gehirns befreit und auf einem Filterpapier, das sich auf einer Glaspetrischale auf Eis befand, gerollt, um die Meningen zu entfernen. Der so präparierte Cortex wurde in 2,5 ml DMEM überführt und mittels eines Potters (7 ml) auf Eis homogenisiert. Dabei führte die Verwendung eines groben und eines feinen Pistills zu einer feinen Homogenisation des Gewebes durch jeweils fünf langsame auf und ab Bewegungen der Pistill. Das Homogenisat wurde mit 2,5 ml 32 % Dextranlösung in DMEM gemischt und bei 4.500 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die obenauf schwimmende Myelinschicht und der Überstand wurden entfernt, das Pellet wurde in 5 ml DMEM resuspendiert und erneut zentrifugiert bei 1.500 x g für 10 min. Schließlich wurde das Pellet in 3 ml DMEM resuspendiert und durch einen 40 µm Nylonfilter filtriert. Auf dem Filter verbleibende Kapillaren wurden mit DMEM gewaschen und in ein sauberes Gefäß gespült. Zur eventuellen Anreicherung der Kapillaren wurden die Kapillarfraktion bei 1.000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet im gewünschten Volumen aufgenommen. Die Präparation erfolgte durch Dr. Lars Winkler (FMP, Berlin, DE). Für die Isolierung der primären Endothelzellen wurden die Kapillaren in 0,1 % Kollagenase/Dispase für 1 h bei 37 °C und 1 h auf Eis resuspendiert. Nach Zentrifugation (1.500 g, 15 min, 4 °C) wurde die pGKEZ in 4 ml DMEM resuspendiert und wie unter 2.17 beschrieben kultiviert.

### 2.4.10. Konfokale Mikroskopie

#### 2.4.10.1. Immunfluoreszenz

Die Bedingungen und die Anzahl der ausgesäten Zellen (transfizierte und untransfizierte) sind in Tabelle 2.20 aufgelistet. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer und gegebenenfalls der Inkubationszeit mit Substanzen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Hierzu wurden die Deckgläschen (12 mm Ø) in eine Einhängeapparatur überführt, für 5 min in ein eiskaltes Aceton-Bad, danach für 1 min in ein eiskaltes Ethanol-Bad und abschließend für 2 min in ein PBS<sup>+/+</sup>-Bad auf Eis gestellt.

Im Fall der Kapillaren wurde 1/8 des Maushirns pro Deckgläschen benötigt. Die mit PLL beschichteten Deckgläschen wurden auf Parafilm gelegt und mit 100-200 µl Kapillarlösung betropft. Nach maximal 30 min im Inkubator bei 37 °C waren die Kapillaren angeheftet. Anschließend wurden diese für 15 min bei RT mit dem Fixierungspuffer (Tab. 2.21) inkubiert und mit HBSS<sup>+/+</sup> gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben auf Parafilm gelegt und mit 90 µl Blockierungspuffer für 1 h bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 2 h mit dem primären Antikörper (in 60 µl Waschpuffer, bei mehreren Antikörpern wurden

**Tab. 2.20:** Bedingungen für Zellen und Kapillaren

Zelltyp	Zellzahl	Beschichtung	Kultivierungsdauer
bEnd5	30*10 <sup>3</sup>	RSK (333 µg/ml)	240 h
HEK-293	150*10 <sup>3</sup>	PLL (25 µg/ml)	48 h
Kapillaren	siehe Text	PLL (25 µg/ml)	15-30 min
MDCK-I	150*10 <sup>3</sup>	PLL (25 µg/ml)	48 h
MDCK-II	150*10 <sup>3</sup>	PLL (25 µg/ml)	48 h
pGKEZ	konfluent	RSK (333 µg/ml)	2 Wochen

RSK = Rattenschwanzkollagen

diese zusammen appliziert) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper (in 60 µl Waschpuffer, bei mehreren Antikörpern wurden diese zusammen appliziert) für 1 h bei RT inkubiert und zum Schutz der Fluorophore abgedeckt. Danach wurden die Zellen mehrfach mit dem Waschpuffer gewaschen. Ein Tropfen Immunomount wurde auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Die Trocknung und Lagerung der Proben erfolgt bei 4 °C.

**Tab. 2.21:** Fixierungs-, Blockierungs- und Waschpuffer

<b>Fixierungspuffer</b> (Kapillaren)	4 % PFA 0,2 % Triton X-100 in PBS	<b>Blockierungspuffer</b> (Kapillaren)	0,1 % Tween-20 2 % BSA in PBS
<b>Waschpuffer</b> (Kapillaren)	HBSS <sup>+/+</sup>	<b>Blockierungspuffer</b> (Zellen)	5 % Milchpulver 0,05 % Tween-20 in PBS
<b>Waschpuffer</b> (Zellen)	0,25 % Milchpulver in PBS		

#### 2.4.10.2. Immunfluoreszenz von Zellen auf Filtern

Die Filter wurden nach der Permeationsmessung mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen. Anschließend wurden 400 µl apikal und 600 µl basolateral 99 % unvergähtes Ethanol (-20 °C) appliziert und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach waschen mit PBS<sup>+/+</sup> wurde die Membran des Filters isoliert und mit der Zellseite nach oben auf Parafilm gelegt. Für die Permeabilisierung wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 0,1 %igem Triton X-100 in PBS<sup>+/+</sup> inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 5 % BSA (PBS<sup>+/+</sup>) für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte in einem Volumen von 70 µl über Nacht im Kühlraum. Die Zellen wurden mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und mit dem sekundären Antikörper in einem Volumen von 70 µl 1 h bei RT inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Filter wurden diese mit der Zellseite nach oben auf einen mit Immunomount benetzten Objektträger überführt und mit einem mit Immunomount versehenen Deckgläschen bedeckt.

### 2.4.10.3. Lebendzellfärbungen

Wurden transient transfizierte Zellen für die Untersuchungen verwendet, wurden diese wie unter 2.4.4 beschrieben vorbereitet. Handelte es sich um stabil transfizierte Zellen (HEK-293 und MDCK-II) wurde die Deckgläschen (30 mm  $\emptyset$ ) 48 h vor der Mikroskopie für 1 h bei 37 °C mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PLL beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und  $850 \cdot 10^3$  Zellen ausgesät. Für die Mikroskopie wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen in eine Deckgläschenhalterung eingespannt und wie unter 2.4.6 beschrieben, behandelt. Für die Visualisierung der Plasmamembran wurde zuvor, je nach Versuchsaufbau entweder Trypanblau oder CellMask™ (Tab. 2.7), verwendet. Trypanblau wirkt nach einiger Zeit toxisch auf die Zellen (Herstellerangaben) und ist somit nur für kurzzeitige Untersuchungen verwendet worden. Für die Färbung wurde Trypanblau direkt in die Lösung gegeben. CellMask™ hingegen verbleibt über 1 h stabil in der Plasmamembran und wurde für Langzeituntersuchungen verwendet. Für die Visualisierung wurden die Zellen für 5 min mit CellMask™ bei 37 °C inkubiert. Während dieser Langzeituntersuchungen befanden sich die Zellen in einer Kammer, sodass die Temperatur konstant bei 37 °C gehalten wurde. Die Detektion der Farbstoffe erfolgte wie unter Tabelle 2.7, die der markierten, transfizierten Proteine wie unter Tabelle 2.22 beschrieben. Die Zellen wurden am LSM510-META (UV, FCS oder NLO) mit einem PlanNeofluar 100x/1.3 Öl-Objektiv analysiert. Eine Ausnahme bildete die Untersuchung der mit Kikume assoziierten Proteine, diese wurden mittels eines 63x/1.4 Objektiv analysiert, da das Umschalten des Proteins (ultravioletten Licht 350–410 nm) Wasser anstatt des Immersionsöls benötigte.

**Tab. 2.22:** Detektion fluoreszierender Proteinen

ECFP	$\lambda_{ex} = 458 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 463\text{-}494 \text{ nm}$	EYFP	$\lambda_{ex} = 514 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 527\text{-}634 \text{ nm}$
Kikume grün	$\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 490\text{-}545 \text{ nm}$	Kikume rot	$\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 565\text{-}613 \text{ nm}$
mCherry	$\lambda_{ex} = 543 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 610 \text{ nm}$		

### 2.4.10.4. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

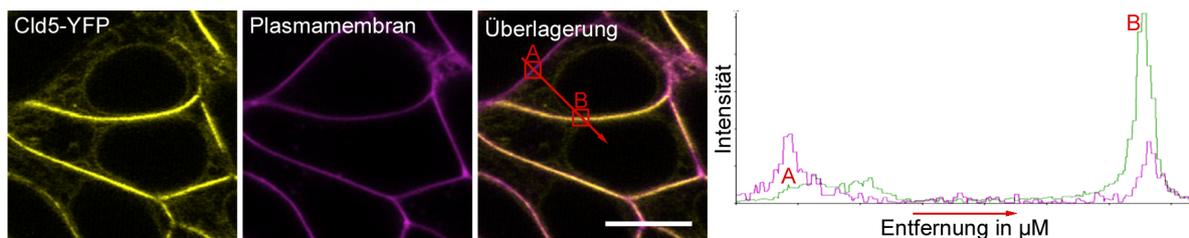
Bei dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) dient die Energie der ausgesendeten Photonen eines Fluorophores (Donor) zur Anregung eines anderen Fluorophors (Akzeptor). Hierfür muss zum einen der Abstand der beiden Fluorophore  $<10 \text{ nm}$  betragen und zum anderen die Wellenlänge des emittierten Lichtes des Donors der Anregungswellenlänge des Akzeptors entsprechen. Aufgrund der notwendigen Nähe der beiden, je mit einem der Fluorophore versehenes Protein, wird von einer Interaktion beider Proteine ausgegangen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik verwendet um Interaktionen von Cld (Cld5-CFP + Cld5-YFP) in lebenden Zellen nach der Behandlung mit Substanzen zu untersuchen. In den Experimenten wurde die Akzeptor-Fotobleich-Methode verwendet. Hierbei wird das Fluorophor des Akzeptors (YFP) durch einen energiereichen Laserstrahl der korrespondieren Anregungswellenlänge des Akzeptors photochemisch geblichen. Nach

dem Bleichen kann keine Energie mehr vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden, sodass die messbare Donor-Fluoreszenzintensität steigt.

Zur Durchführung wurden Zellen wie unter 2.4.4 beschrieben mit Cld5-CFP und Cld5-YFP kotransfiziert. Am Tag der Messung wurden die Deckgläschen in eine Deckgläschenhalterung überführt und mit HBSS<sup>+/+</sup> überschichtet. Die Zellen wurden am LSM 510 NLO untersucht. Bei Zellen die eine Kollokalisierung beider Fluorophore in der Plasmamembran aufwiesen, wurde dieser Bereich mittels eines ROI (*region of interest*) markiert. In diesem Bereich wurde eine Zeitserie von vier Zyklen, die jeweils drei Einzelschritte umfassten, aufgenommen. Im ersten Schritt wurde die CFP-Intensität gemessen, im zweiten die YFP-Intensität und im dritten Schritt wurde das YFP-Fluorophor bei 514 nm und 100 % Laserintensität gebleicht. Nach der Zeitserie wurde der anfängliche CFP-Intensitätswert mit dem höchsten CFP-Intensitätswert in Beziehung gesetzt. Hierbei gilt folgende Formel: relatives FRET-Signal =  $(CFP_{max} - CFP_{start}/CFP_{start}) * 100$ . Um auch ein eventuell schwaches FRET messen zu können, wurde die Ausgangssignalstärke des CFPs relativ niedrig gehalten und die des YFPs höher. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis der Ausgangssignalstärke von YFP:CFP mindestens 5:1 und höchstens 23:1 betrug. Für die Quantifikation der relativen FRET-Effizienzen wurden Laser- und Detektoreinstellungen konstant gehalten (YFP: Laserintensität 1 %, Pinhole 400  $\mu\text{m}$ , Detector Gain 700; CFP: Laserintensität 10 %, Pinhole 400  $\mu\text{m}$ , Detector Gain 700). Die Detektion der emittierten Fluoreszenzen ist in Tab. 2.22 dargestellt.

#### 2.4.10.5. Bestimmung und Quantifizierung von Claudin-Anreicherung in Zell-Zellkontakten

Um eine Anreicherung von Cld-YFP an Zell-Zellkontakten zwischen zwei exprimierenden Zellen zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzintensitätsprofile von lebenden Zellen analysiert (Abb. 2.4.10.5). Hierbei wurde die Lokalisation der Plasmamembran über dessen Färbung und dem entsprechenden Fluoreszenzintensitätspeak bestimmt. Die dieser Lokalisation entsprechenden YFP-Fluoreszenzintensität des zu untersuchenden Cld, zum einen zwischen zwei Cld-exprimierenden (B), sowie einer Cld-exprimierenden und einer nicht exprimierenden Zelle (A), wurde gemessen. Eine Anreicherung lag vor, wenn folgende Bedingung erfüllt war:  $(B/2)/A > 1,5$ . Um eine Anreicherung aufgrund doppelter Cld5-



**Abb. 2.2: Bestimmung der Kontaktanreicherung von Claudin-5**

Die Plasmamembran der HEK-293 Cld5 Zellen wurde mittels CellMask<sup>TM</sup> visualisiert. Eine Anreicherung von Cld5 am Kontakt lag vor, wenn die Hälfte der YFP-Intensität im Kontakt (B) zweier Cld5 exprimierender Zellen geteilt durch die YFP-Intensität im Kontakt einer Cld5 exprimierender Zelle und einer nicht exprimierender Zelle  $>1,5$  war. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

enthaltender Membranen (B) gegenüber einer Membran (A) auszuschließen, wurde der Wert B durch 2 geteilt. Voraussetzung für diese Methode der Bestimmung der Cld-Anreicherung, war eine konstante YFP-Fluoreszenz über den kompletten Zell-Zellkontakt in xy-Richtung. Für die Quantifizierung der Cld-Anreicherung bzw. dessen Veränderung über die Zeit, wurde ein kompletter Zell-Zellkontakt oder sämtliche Zell-Zellkontakte einer Zelle mittels ROI analysiert (Abb. 3.5) um lokale Unterschiede in der Plasmamembran zu mitteln.

Aufgrund der verlängerten Inkubationszeit mit BO1, im Vergleich zu der Inkubation mit C10, musste der etablierte Versuchsansatz abgewandelt werden. Die Zellkontakte konnten nicht über die ganze Zeit analysiert werden, wodurch eine genaue zeitlich Bestimmung der Reduzierung der YFP-Intensität nicht möglich war. So wurden die Zellen nach der Inkubation mikroskopiert und die Anzahl der Cld5-positiven Zell-Zellkontakte mit einer relativen Intensität über 1.500 quantifiziert.

#### 2.4.11. Hochdurchsatz-Screening

Mit Hilfe des HDS können eine Vielzahl von Substanzen und deren Wirkung auf Zellen in kurzer Zeit getestet werden. Hierbei verläuft der Hauptteil des Versuchs automatisch. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete HDS basierte auf der Detektion der veränderten Intensität des Fluoreszenzsignals des in HEK-293 Zellen stabil exprimiertem Cld5-YFPs. Der Ablauf des durchgeführten Screens gliederte sich in folgende Abschnitte:

1. 384-*well* Platten (Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> 384-*well* Flat Clear Bottom Black Polystyrene Microplates) wurden mit 25  $\mu\text{l}$  PLL (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) pro *well* für 1 h bei 37 °C beschichtet
2. Das *well* wurde zweimal mit 50  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen, 5.000 HEK-293 Zellen, welche Cld5-YFP stabil exprimierten, in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  Medium pro *well* ausgesät und im Brutschrank kultiviert
3. 24 h später wurden 25  $\mu\text{l}$  des Mediums abgenommen und durch 25  $\mu\text{l}$  Medium ohne FKS und G418 ausgetauscht (Halbierung des FKS-Gehaltes war notwendig, um Komplikationen mit dem automatischen Pipettierroboter zu beheben; Verstopfung der Pipetten und aufschäumen des Mediums)
4. Aus einer weiteren 384-*well* Platte, gefüllt mit Stocklösungen verschiedener Substanzen (1 mM in 100 % DMSO, ChemBioNet Collection), wurden 0,2  $\mu\text{l}$  jeder Substanz und anschließend 5  $\mu\text{l}$  Medium aus der Versuchsplatte entnommen und in einer weiteren 384-*well* Platte gemischt
5. Zugabe dieser Substanzen zu der Versuchsplatte (Endkonzentration: 4  $\mu\text{M}$  der Substanz und 0,4 % DMSO in Medium)
6. 17 h Inkubation im Brutschrank, anschließend entfernen der Lösung und Zugabe von Hoechst (2  $\mu\text{M}$ )

7. Inkubation von 30 min im Brutschrank, entfernen der Lösung und zweimal mit PBS<sup>+/+</sup> waschen
8. Zugabe von 40  $\mu$ l PBS<sup>+/+</sup> und die Intensität der YFP-Fluoreszenz, sowie der Hoechstfärbung wurde in den einzelnen *wells* mittels des HDS kompatiblen Safire2<sup>™</sup> Mikrotiterplattenlesegerät gemessen
9. Entfernen von PBS<sup>+/+</sup> und die Zellen wurden durch die Zugabe von 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei 4 °C fixiert
10. Entfernen der Lösung, Zugabe von 40  $\mu$ l PBS<sup>+/+</sup> und Lagerung bei 4 °C bis zu konfokalen Analyse

Ab Schritt 4 wurde die TeMo<sup>™</sup> (Tecan Group AG) Pipettierungsarbeitsstation für Pipettierungs- und Waschschrte verwendet.

Die ChemBioNet Collection, welche am FMP zusammengestellt wurde, umfasste zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung mehr als 16.000 Substanzen (>60.000, stand 12.05.2014) und beinhaltet zumeist typische pharmakophorische Basisstrukturen, die anhand des *World Drug Index* (WDI) ausgewählt wurden. Hierbei wurde eine maximale Diversität angestrebt, um eine geringe Überlappung von Substanzen hinsichtlich ihrer Struktur und Oberflächenladung zu erlangen. Die Bibliothek befindet sich in 384-*well* Platten mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO, wobei die letzten beiden *wells* jeder Platte lediglich DMSO enthalten, um diese für Kontrollen während des Screens nutzen zu können.

Während des Screens wurden HEK-293 Zellen, welche nicht transfiziert waren, als positiv Kontrolle (Abnahme der YFP-Fluoreszenz) und Cld5-YFP stabil exprimierende HEK-293 als negativ Kontrolle (keine Abnahme der Fluoreszenz, bzw. dessen Zunahme) verwendet. Diese Zellen wurden in je eine Spalte der 384-*well* Platte (23 bzw. 24) ausgesät und anstatt mit Substanzen mit 0,4 % DMSO inkubiert. Der HDS erfolgte in Kooperation mit Screening Unit des FMP, Berlin (Dr. von Kries).

#### 2.4.12. Screen mit siRNA

Die 384-*well* Platten wurden wie unter 2.4.11 beschrieben vorbereitet. 3.500 HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden pro *well* in Medium ohne Antibiotika ausplattiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch DMEM Glutamax mit 5 % FKS ersetzt. Für die Transfektion wurden pro *well* 1,65  $\mu$ l Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 in 5,35  $\mu$ l Opti-Minimum Essential Medium Eagle und in einem weiteren Ansatz 0,33  $\mu$ g (3,5 pmol) siRNA (Tabelle 2.10) in 7  $\mu$ l Opti-Minimum Essential Medium Eagle gelöst. Nach 5 min Inkubation wurden die Ansätze vermischt und für weitere 20 min inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend zu den Zellen gegeben. Nach 5 h wurde der Transfektionsmix entfernt und durch 70  $\mu$ l DMEM Glutamax mit 5 % FKS ersetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und eine 2  $\mu$ M Hoechstlösung (in HBSS<sup>+/+</sup>) appliziert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde diese Lösung abgenommen und die Zellen mit

HBSS<sup>+/+</sup> gewaschen. Die Zellen wurden mit 50  $\mu\text{l}$  einer 4 %igen Paraformaldehydlösung (in Sorensen-Puffer, 180 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 70 mM Dinatriumhydrogenphosphat) für 20 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und abermals 50  $\mu\text{l}$  PBS<sup>-/-</sup> pipettiert. Für die Analyse der Proben wurde ein Mikrotiterplattenlesegerät (Safire2), als auch die Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

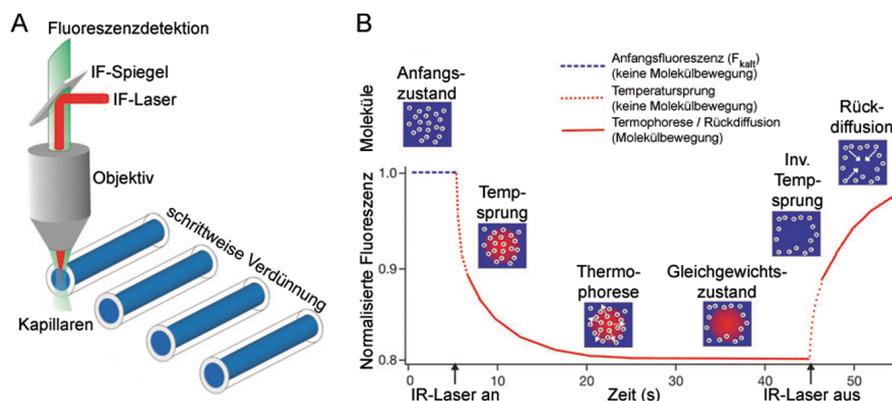
#### 2.4.13. Messung der Bindung von BO1 zu Claudinen

Die Affinität, oder viel mehr dessen reziproker Wert, die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ), von BO1 zu den Cld1-5 wurde mit der *microscale thermophoresis* (MST) Methode mittels des Monolith<sup>™</sup> NT.115 bestimmt.

Bei der MST Methode wird unter relativ nativen Bedingungen die Veränderung der Mobilität der zu untersuchenden Moleküle entlang eines minimalen Temperaturgradienten gemessen. Dieses Verhalten der Moleküle wird als Thermophorese bezeichnet und hängt von der Molekülgröße, -ladung und Hydrationsentropie ab (Duhr und Braun, 2006; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011). Aufgrund der unterschiedlichen Bewegung der Moleküle, kommt es zu einer lokalen Konzentrationsveränderung. Nachvollziehbar ist, dass sich die Moleküle von warmen zu kalten Regionen bewegen, da sie aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung eine schnellere Bewegung in wärmerer Umgebung besitzen und es somit zu einem Netto-Fluss zu kalten Regionen kommt. Allerdings können sich die Moleküle auch von kalten zu warmen Regionen bewegen. Dieses Phänomen ist nicht eindeutig geklärt. Für die Messung kommt es aber nur auf eine Veränderung der Konzentration der Moleküle im Koeffizienten von warm/kalt aufgrund der Temperaturveränderung an. Dieses kann anhand des Soret-Koeffizient ( $S_T$ ) beschrieben werden (Baaske *et al.*, 2010):

$$S_T = \frac{C_{warm}}{C_{kalt}} = e^{-S_T \Delta T} \quad (2.1)$$

Durch eine Änderung der Molekülgröße oder -struktur aufgrund einer Bindung zu einem weiteren Molekül, kommt es zu einer Änderung der Thermophorese. Eine beispielhafte Messung ist in Abbildung 2.3 B dargestellt. Diese Veränderung des Moleküls, in Abhängigkeit der Gegenwart eines Bindungspartners, kann zur Bestimmung des  $K_d$  genutzt werden. Eine detaillierte Beschreibung ist in der Literatur (Duhr und Braun, 2006; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011) zu finden. Für die Messung der  $K_d$  Werte von BO1, sowie dessen Derivate, zu Cld1-5 wurden HEK-293 Zellen, welche mit dem entsprechenden Cld-YFP stabil transfiziert waren, in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert, bis sie eine konfluente Zellschicht aufwiesen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend in PBS<sup>-/-</sup> mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden bei 4 °C für 10 min bei 1.500 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit 250  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer versetzt. Nach dem Auftauen wurde das Zell-Pellet resuspendiert und bei 4 °C für 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Die Konzentration des YFP-haltigen Überstands wurde anhand einer Standardreihe mit YFP



**Abb. 2.3:** Experimenteller Ansatz und das resultierende *microscale thermophoresis* Signal

(A) Das MST Signal wird in Kapillaren gemessen. Hierbei wird eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Konzentration des fluoreszenzmarkierte Moleküls konstant bleibt und die des unmarkierte Interaktionspartner schrittweise verdünnt wird. Ein IR-Laser erwärmt lokal das fluoreszenzdetektierte Areal. (B) Ein beispielhaftes MST Signal einer vermessenen Kapillare. Hierbei wird die normalisierte Fluoreszenz gegen die Zeit dargestellt. 5 s nach dem Anfangszustand ( $F_{kalt}$ ), wird der IR-Laser eingeschaltet, es kommt zu einem Temperatursprung, gefolgt von der thermophoretischen Bewegung der Moleküle. Die Abnahme der Fluoreszenz wird bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustand nach 30 s gemessen ( $F_{warm}$ ). Nach dem abschalten des IR-Lasers findet ein inverser Temperatursprung statt, der von einer Rückdiffusion der Moleküle gefolgt wird. Verändert nach Jerabek-Willemsen *et al.* 2011.

bestimmt. Für die Messung wurden 30 nM des YFP-markierten Cld, sowie eine Verdünnungsreihe von 25.000 bis 0,76 nM BO1, in der die Konzentration bei jeder Probe halbiert und der DMSO-Gehalt konstant bei 0,9 % gehalten wurde, eingesetzt. Insgesamt wurden pro Messreihe 16 Kapillaren vermessen, wobei die Leistung der LED 30 % und die des IR-Lasers 80 % betrug. In der Messung wurde der IR-Laser nach 5 s für 35 s eingeschaltet.

**Tab. 2.23:** RIPA-Puffer

<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,5	150 mM NaCl	1 mM EDTA
	1 % (v/v) Nonoxinol 40	0,5 % (w/v) DOC	0,1 % (w/v) SDS

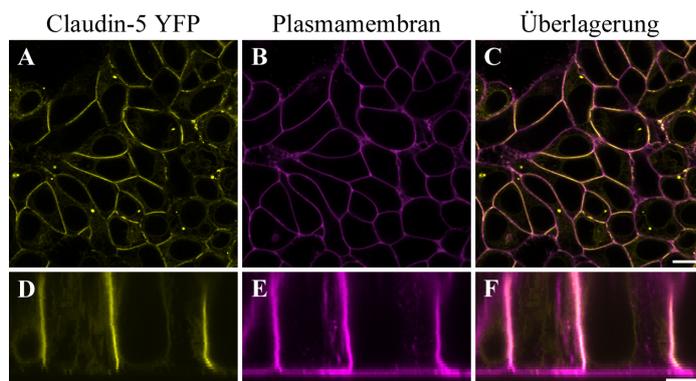
## 2.5. Statistik und Software

Die Aufnahmen der konfokalen Bilder und deren Auswertung erfolgte mit Zeiss LSM Image Browser Version 4,2,0,121; Carl Zeiss ZEN 2009 Light Edition sowie ImageJ 1.48. Für die densitometrische Analysen der Westernblots wurde ImageJ 1.48 verwendet. Die Zusammenstellung der Bilder wurde mit Adobe® Photoshop® 6.0 realisiert. Für die Erstellung der Diagramme und die Statistik wurde GraphPad Prism 5 Version 5.01 verwendet. Für die Berechnung der Permeationskonstanten wurde Microsoft Excel 2007 benutzt. Für die Auswertung der Bindungskonstante wurde NT Analysis 1.2.229 eingesetzt. Die Erstellung der Dissertation erfolgte mit  $\text{L}^{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ (TeXnic 2.02).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Claudin-5-YFP exprimierende HEK-293 Zellen als Modell der *tight junction*-Modulation der Blut-Hirnschranke

Für die durchzuführenden Substanztestungen wurde zunächst ein geeignetes Zellmodell benötigt. Dazu wurde ein Reportersystem entwickelt, in dem TJ-freie HEK-293 Zellen stabil Claudin-5-YFP (Cld5-YFP) exprimierten, das über *trans*-Interaktion membrana- le Stränge und damit TJ-Strukturen, vergleichbar zu denen in Epithelien, ausbildeten (Piontek *et al.*, 2008). Hierdurch war der Effekt verschiedener Substanzen auf Cld5 und dessen homophilen *trans*-Interaktion in den Zell-Zellkontakten selektiv und direkt über die veränderte YFP-Intensität zu erfassen. Cld5-YFP war in der Plasmamembran von zwei benachbarten, exprimierenden Zellen angereichert (Abb. 3.1), welches anhand der Kolo- kalisation mit dem Plasmamembranmarker CellMask™ zu erkennen ist. Im Gegensatz zu Epithelzellen ist die Lokalisation von Cld5-YFP in den nicht polarisierten HEK-293 Zel- len nicht auf den apikalen Bereich beschränkt, sondern zeigte eine gleichmäßige Verteilung von basal zu apikal.



**Abb. 3.1: HEK-293, stabile Expression von Claudin-5-YFP**

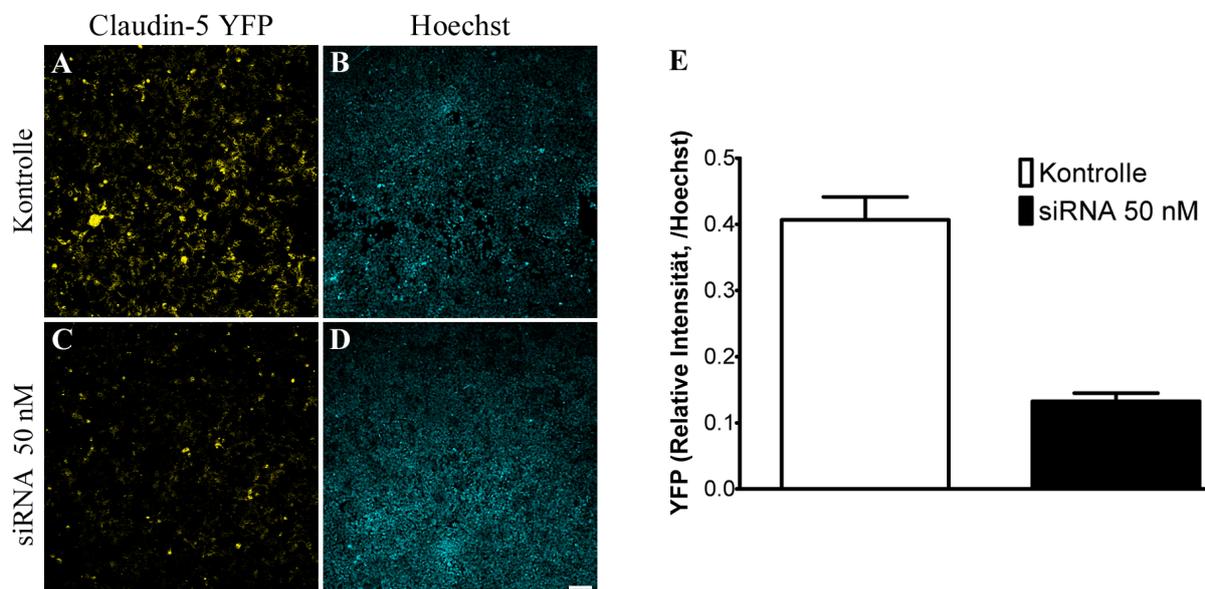
Cld5-YFP (A, D) lokalisiert an Zell-Zellkontakten zwischen zwei Cld5-YFP-exprimierenden Zellen. Zudem befindet sich das Protein vorwiegend in der Plasmamembran, welches Anhand der Kolo- kalisation mit CellMask™ (B und E, bzw. C und F), zu erkennen ist. Cld5 ist nicht auf den apikalen Bereich beschränkt, sondern verteilt sich gleichmäßig im lateralen Bereich (D). Maßbalken A-C entspricht 10 µm, D-F 5 µm.

#### 3.2. Etablierung von Kontrollsubstanzen und der manuellen Versuchsansätze

Ziel dieser Arbeit war es, ein Hochdurchsatz-Screening (HDS) zu entwickeln und die resultierenden wirksamen Substanzen in manuellen Versuchsansätzen zu validieren und verifizieren. Hierfür mussten zum einen Kontrollsubstanzen, welche Cld5 bzw. dessen *trans*-Interaktion modifizierten, ermittelt und die manuellen Versuchsansätze etabliert werden. Für die Modifikation von Cld5 wurden verschiedene Versuchsansätze mit mehreren Substanzen durchgeführt, die sich in der Wirkungsart und dem Zeitpunkt des Wirkungseintritts und -dauer unterschieden. Nachfolgend werden die Ergebnisse ausgewählter Substanzen vorgestellt.

### 3.2.1. Reduktion der Claudin-5 Proteinmenge mittels einer Claudin-5 spezifischen *small interfering RNA*

Für die gezielte Reduktion von Cld5 in HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurde eine Cld5 spezifische siRNA (*small interfering RNA*) eingesetzt. Die Sequenz ist bereits an der Maus validiert (Campbell *et al.*, 2008). Die Wirkung dieser Methode tritt relativ spät ein. Hierzu wurden HEK-293 Cld5-YFP Zellen mittels Lipofectamine™ 2000 mit oder ohne Cld5 siRNA in verschiedenen Konzentrationen (30, 50, 100 nM) transfiziert. Die Effekte wurden 24, 48 und 72 h nach Transfektion bewertet. Die quantitative Auswertung der Cld5-YFP-Intensität wurde mittels eines konfokalen Mikroskops und Mikrotiterplattenlesegerät (Safire2™) anhand von lebenden und fixierten Zellen durchgeführt. In den Messungen wurde die Cld5 Expression spezifisch durch die Cld5 siRNA unterdrückt gefunden (Abb. 3.2). Der maximale Effekt wurde mit 50 nM nach 48 h Inkubation erreicht (YFP/Hoechst: Kontrolle  $0,40 \pm 0,03$  E, siRNA 50 nM  $0,13 \pm 0,01$  E). Hierbei wurde die Morphologie der Nuklei und die Färbung durch Hoechst, sowie dessen Intensität nicht beeinflusst. So diente die Hoechst-Intensität zur Normalisierung der YFP-Intensität auf die Zellzahl, wobei zuvor die Linearität der Intensität der Hoechst-Fluoreszenz mit steigender Zellzahl überprüft wurde. Dieser Effekt ließ sich nicht durch eine Cld1 spezifische siRNA hervorrufen (Daten nicht gezeigt).

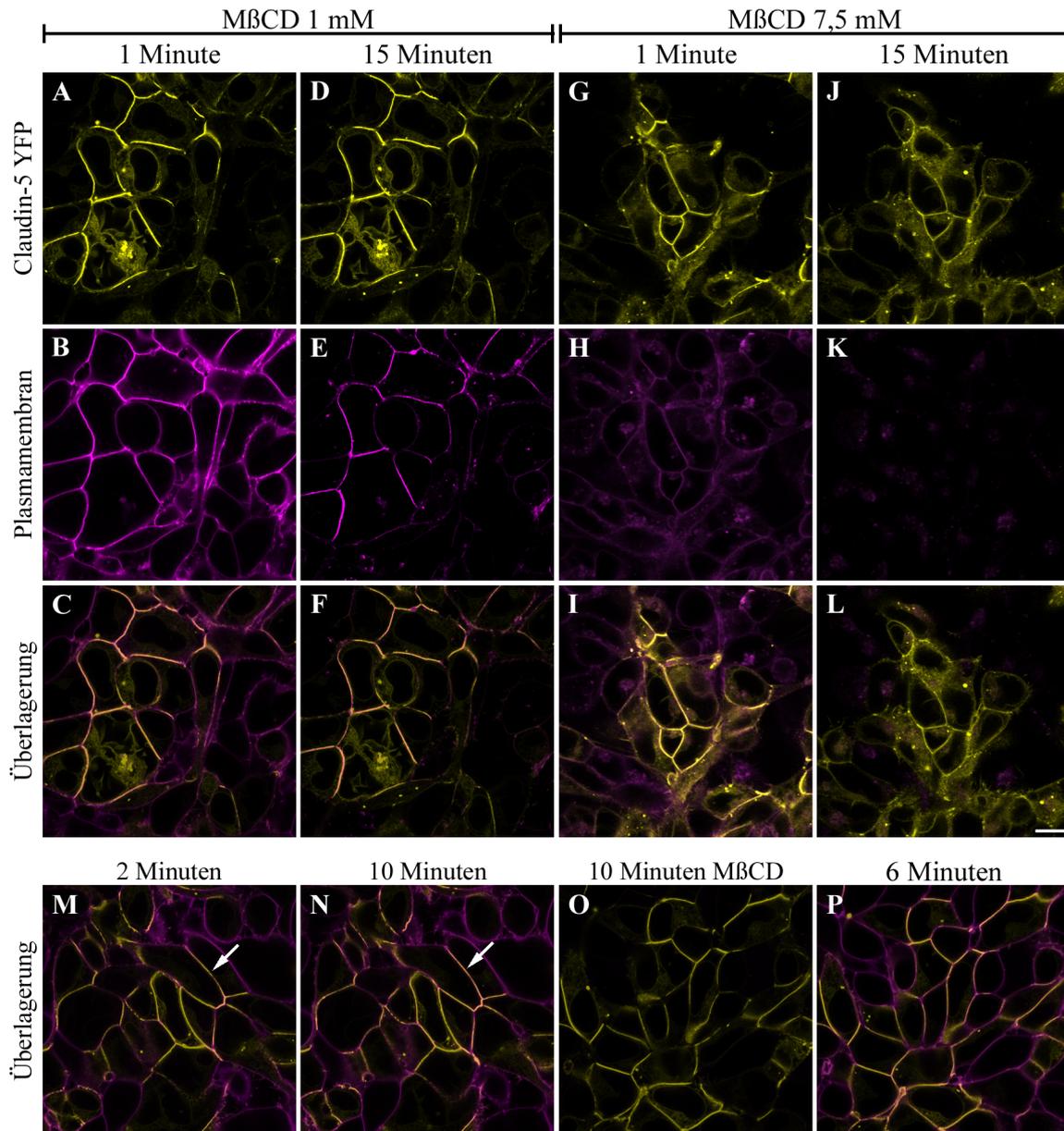


**Abb. 3.2: Claudin-5 *small interfering RNA* reduziert den Claudin-5-YFP Proteingehalt in HEK-293 Zellen**

Cld5-YFP (A, C) wurde zusammen mit dem Nukleusmarker Hoechst (B, D) in lebenden HEK-293 Zellen, welche stabil Cld5-YFP exprimierten, 48 h nach Zugabe der Kontrollbedingung (Lipofectamine™ 2000, A, B) und 50 nM siRNA mit Lipofectamine™ 2000 (C, D) analysiert. Die Expression von Cld5-YFP wurde durch die Zugabe der siRNA (C, E) reduziert, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (A, E). Maßbalken entspricht 100  $\mu$ m.

### 3.2.2. Reduktion der Claudin-5 *trans*-Interaktion mit Methyl- $\beta$ -cyclodextrin

Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) wurde hinsichtlich der Auswirkungen auf Cld5 in HEK-293 Cld5-YFP Zellen untersucht. Es ist beschrieben, dass diese Substanz Cholesterin, ein Hauptbestandteil der *lipid rafts*, aus der Membran entziehen kann (Hansen *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2001; Vial und Evans, 2005). M $\beta$ CD ist deshalb auch als *lipid raft disrupter*



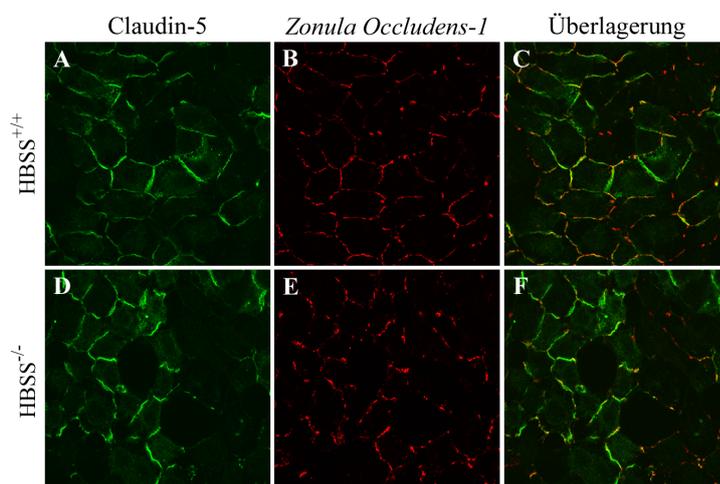
**Abb. 3.3: Methyl- $\beta$ -cyclodextrin reduziert den Claudin-5-YFP Gehalt an den Zell-Zellkontakten von HEK-293 Zellen**

Cld5-YFP (A, D, G, J) wurde zusammen mit CellMask™ (B, E, H, K) in lebenden HEK-293 Zellen, welche stabil Cld5-YFP exprimierten, zu Beginn (A, B, C, G, H, I) und während der mindestens 15 min andauernden M $\beta$ CD-Behandlung (D, E, F, J, K, L) analysiert. Während dieser Inkubationszeit führten 7,5 mM zu einer Reduktion der YFP-Intensität (J). Die Plasmamembranfärbung wurde durch beide Behandlungen (E, K) reduziert. 2 min nach der Zugabe von CellMask™ wurden hauptsächlich Cld5-YFP-freie Plasmamembranen gefärbt (M, Pfeil), nach 10 min (N, Pfeil) sämtliche. Wurden die Zellen zusammen mit 1 mM M $\beta$ CD und CellMask™ für 10 min inkubiert (O), blieb die Färbung der Plasmamembran aus. Nach Entfernen der Lösung und erneuter Applikation von CellMask™ wurden die Plasmamembranen wieder gefärbt (P). Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

bekannt, dessen Wirkung im Vergleich zu der siRNA wesentlich früher eintritt. HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden mit 1 und 7,5 mM M $\beta$ CD behandelt und für mindestens 15 min mikroskopisch untersucht. Ein Abfall der Cld5-YFP-Intensität an den Zell-Zellkontakten wurde bei einer Konzentration von 7,5 mM M $\beta$ CD (Abb. 3.3 G, J) gefunden. 1 mM M $\beta$ CD führte bereits zu einer Reduktion der Plasmamembranfärbung durch CellMask™, dessen Färbung bei einer Konzentration von 7,5 mM komplett entfernt wurde (Abb. 3.3 E, K). Dieser Effekt ist durch Mediumwechsel reversibel (Abb. 3.3). HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden zusammen mit CellMask™ und 1 mM M $\beta$ CD inkubiert. Aufgrund der Gegenwart von M $\beta$ CD blieb die Färbung der Plasmamembran aus und wurde auch nach 10 min nicht sichtbar (Abb. 3.3 O). Nach Entfernen dieser Lösung und erneuter Applikation von CellMask™, wurden die Plasmamembranen gefärbt (Abb. 3.3 P). Weiterhin konnte für CellMask™ beobachtet werden, dass zunächst Cld5-negative Plasmamembranen visualisiert wurden (Abb. 3.3 M). Wurde die Inkubationszeit verlängert, waren sämtliche Plasmamembranen einheitlich gefärbt (Abb. 3.3 N).

### 3.2.3. Caprat reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5

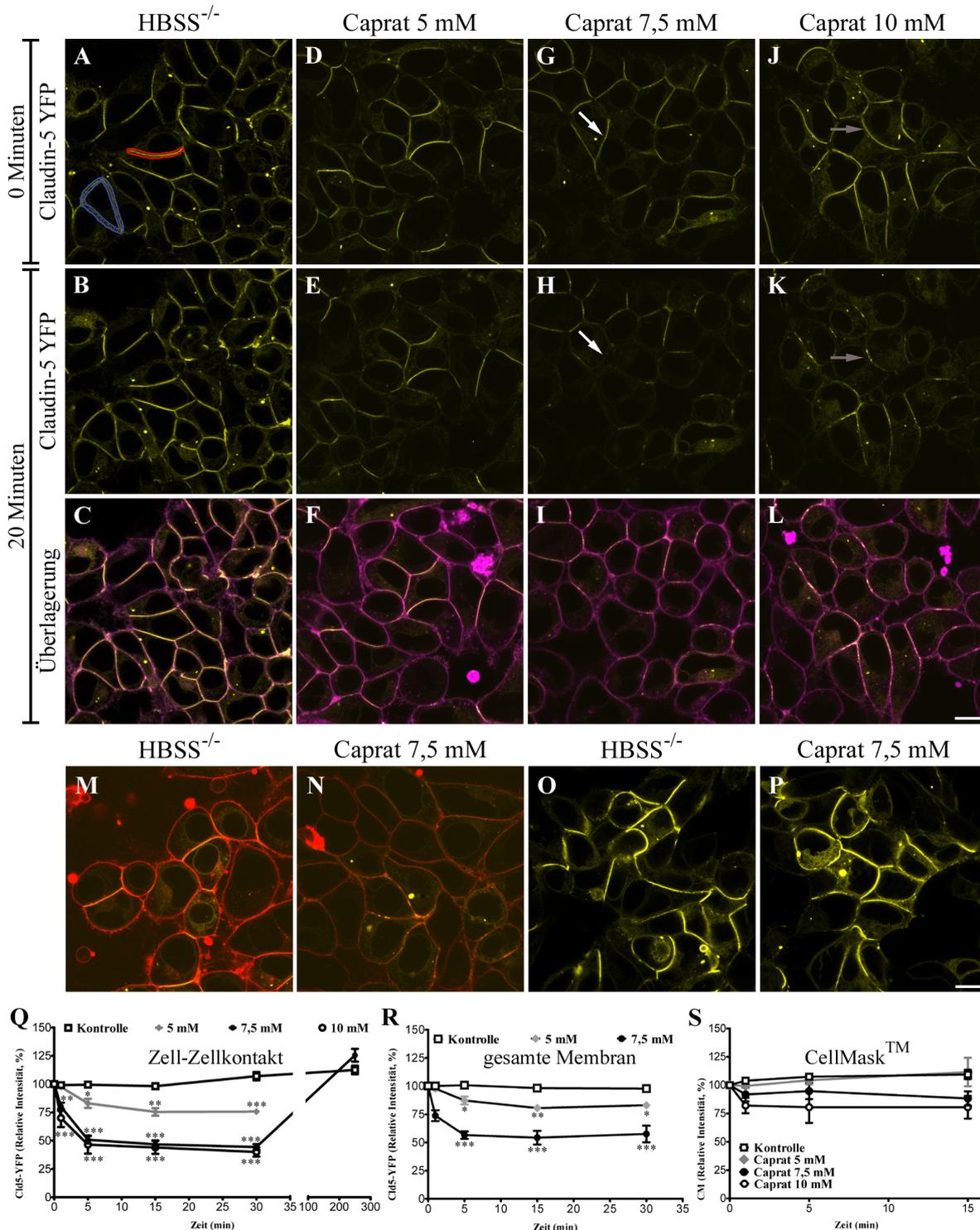
Eine weitere Substanz die unter dem Aspekt der Kontrolle für das HDS getestet wurde, war Caprat (C10), für das eine öffnende Wirkung auf TJ beschrieben ist (Lindmark *et al.*, 1998). Aufgrund der Tatsache, dass C10 in Gegenwart von Kalzium und Magnesium ausfällt, wurde die Applikation von C10 in kalziumhaltigen Medien oder Puffern vermieden. Da diese Ionen jedoch eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion einnehmen, wurden die Auswirkungen auf die Morphologie und Lokalisation von TJ-Proteinen in den HEK-293 Cld5-YFP Zellen unter Kalzium- und Magnesiummangel analysiert. Hierzu wurden die Zellen für 30 min mit HBSS<sup>+/+</sup> (*Hank's balanced salt solution*, mit Kalzium und Magnesium) oder HBSS<sup>-/-</sup> (*Hank's balanced salt solution*, ohne Kalzium und Magnesium) inkubiert, fixiert und mit Cld5 und ZO-1 Antikörpern behandelt (Abb. 3.4). Die 30 min Inkubation der Zellen mit HBSS<sup>+/+</sup> oder HBSS<sup>-/-</sup> zeigten keine Unterschiede in der Intensität oder Quantität der Cld5- und ZO-1-Fluoreszenz, welche unverändert in der Plasmamembran lokalisierte.



**Abb. 3.4: Kalziummangel hat keine Auswirkungen auf *tight junction*-Proteine und Morphologie der HEK-293 Claudin-5-YFP Zellen**

HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden für 30 min mit HBSS<sup>+/+</sup> (A-C) oder HBSS<sup>-/-</sup> (D-F) inkubiert, fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 (K $\alpha$ Cld5 und 488 $\alpha$ K) und ZO-1 (M $\alpha$ ZO-1 und Cy3 $\alpha$ M) gefärbt. Die Expression und Lokalisation von Cld5 (A, D) und ZO-1 (B, E) sowie die Morphologie der Zellen war unter beiden Bedingungen unverändert. Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

Da keine Auswirkungen auf die zu untersuchenden Aspekte der Zellen nach der Inkubation mit HBSS<sup>-/-</sup> auftraten, konnte C10 in der Lebendzellmikroskopie kalzium- und magnesiumfrei appliziert werden. Hierfür wurden die Zellen mit HBSS<sup>-/-</sup> allein und zusammen mit C10-behandelt und mikroskopiert. Nach 20 min Inkubation der Zellen mit



**Abb. 3.5:** Caprat reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5-YFP in HEK-293 Zellen

Cld5-YFP (A, B, D, E, G, H, J, K) wurde zusammen mit CellMask™ (C, F, I, L) in lebenden HEK-293 Zellen, welche stabil Cld5-YFP exprimierten, vor (A, D, G, J) und während der mindestens 20 min andauernden Kontroll- (B, C) bzw. C10-Behandlung (E, F, H, I, K, L) analysiert. Die YFP-Fluoreszenz wurde an Zell-Zellkontakten (A, rote Linie) und in der gesamten Plasmamembran quantifiziert (A, blaue Linie). Die sukzessive Erhöhung der C10-Konzentration führte zu einer Reduktion (H, weißer Pfeil) sowie

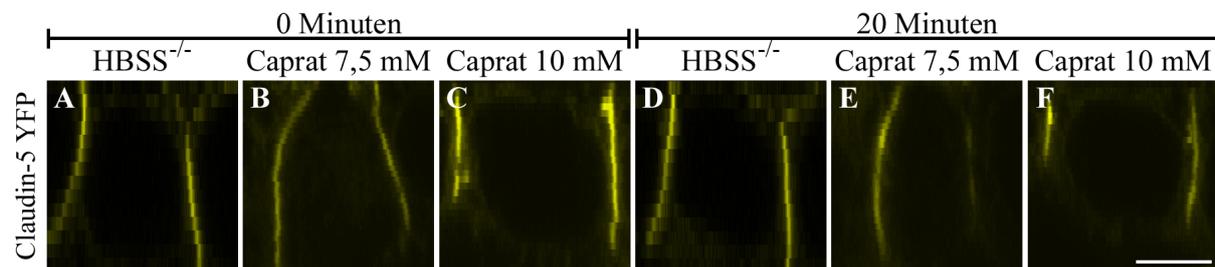
einer diskontinuierlichen YFP-Fluoreszenz (K, grauer Pfeil) an den Zell-Zellkontakten, ohne die Plasmamembranfärbung zu verändern. In weiteren Experimenten wurden HEK-293 Cld5-YFP Zellen für 30 min unter Kontrollbedingungen (M, O) oder mit 7,5 mM C10 (N, P) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen direkt mit Trypanblau (M, N) gefärbt oder zuvor die Lösung gegen Medium getauscht und die Zellen für 220 min im Brutschrank kultiviert (O, P). 7,5 mM C10 führten zu einer Reduktion von Cld5 in den Zell-Zellkontakten (N), jedoch war die Membranintegrität nicht betroffen, da kein Trypanblau in die Zelle drang. Nach einer Erholungszeit von 220 min entsprach die Intensität der YFP-Fluoreszenz der behandelten Zellen (O), derer der unbehandelten Zellen (P). (Q) Die Quantifizierung von Cld5 in den Zell-Zellkontakten ergab eine Reduktion der Anreicherung von Cld5 durch die C10-Behandlung. Wurde diese Behandlung nach 30 min durch Medium ersetzt, erholte sich diese vollständig innerhalb von 220 min. (R) Die Cld5-YFP-Intensität in der gesamten Plasmamembran von C10 behandelten Zellen war ebenfalls reduziert, während die Färbung durch CellMask™ (S) nicht verändert wurde. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes (SEM),  $n \geq 4$ , einfacher ANOVA mit Bonferroni Korrektur (*Multiple Comparison*), \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$  verglichen mit der Kontrolle dargestellt.

5, 7,5 und 10 mM C10 zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung bzw. Fragmentierung der Cld5-YFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran (Abb. 3.5). In der gleichen Zeitspanne wiesen die unbehandelten Zellen bzw. deren Cld5-YFP keinerlei Veränderung der Intensität im Vergleich zum Beginn des Experiments auf. Die Intensität der Plasmamembranfärbung blieb unter allen Bedingungen unverändert (Abb. 3.5 S). Die Reduktion der Cld5 *trans*-Interaktion wurde anhand von einzelnen angereicherten Zell-Zellkontakten bzw. anhand der gesamten Plasmamembran von exprimierenden Zellen quantifiziert. Hierbei zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 15 min mit 5, 7,5 und 10 mM C10 eine signifikante Reduktion der Cld5-YFP-Intensität in den einzelnen Zell-Zellkontakten auf  $75,4 \pm 3,4$ ;  $46,7 \pm 3,5$  und  $44,0 \pm 5,6$  % im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 3.5 Q). Unter Kontrollbedingungen betrug dieser Wert  $98,2 \pm 2,5$  %. Wurde die 7,5 mM C10-Lösung nach 30 min Inkubation durch Medium ersetzt, kam es zu einer kompletten Wiederherstellung der Cld5-YFP-Intensität und Lokalisation nach 220 min ( $125,5 \pm 5,6$  % des initialen Wertes), unter Kontrollbedingungen betrug dieser Wert  $112,5 \pm 3,8$  %. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der gesamten Plasmamembran von behandelten Zellen wies die selben Ergebnisse auf (5 mM  $80,5 \pm 1,3$  %; 7,5 mM  $55,6 \pm 3,9$  %; Abb. 3.5 R), während die Cld5-YFP-Intensität un behandelter Zellen wiederum keinen Unterschied zeigte ( $98,2 \pm 1,6$  %). Weiterhin wurde die Membranintegrität der behandelten HEK-293 Cld5-YFP Zellen mittels Trypanblau-Färbung überprüft (Abb. 3.5 M, N). Für Trypanblau ist beschrieben, dass apoptotische bzw. nekrotische Zellen oder Zellen mit defekter Plasmamembran dieses aufnehmen und somit vitale von toten Zellen unterschieden werden können (Herstellerangaben). Die für 30 min mit 7,5 mM C10 behandelten Zellen wiesen zwar eine starke Reduktion der membranalen Cld5-Fluoreszenz auf, aber, wie die mit HBSS<sup>-/-</sup> behandelten Zellen, keine Internalisierung des Farbstoffes. In diesem Fall färbte das Trypanblau unter beiden Bedingungen lediglich die Plasmamembran. Somit besitzt C10 einen konzentrations- und zeitabhängigen, sowie reversiblen Effekt auf die Lokalisation von Cld5 durch die Modifikation dessen *trans*-Interaktion.

Aufgrund dieser ersten erfolgreichen Untersuchungen der Wirkung von C10 auf die *trans*-Interaktion von Cld5 wurde die Wirkungsweise von C10 näher untersucht.

### 3.2.3.1. Charakterisierung der Wirkungsweise von Caprat in dem *tight junction*-Modell

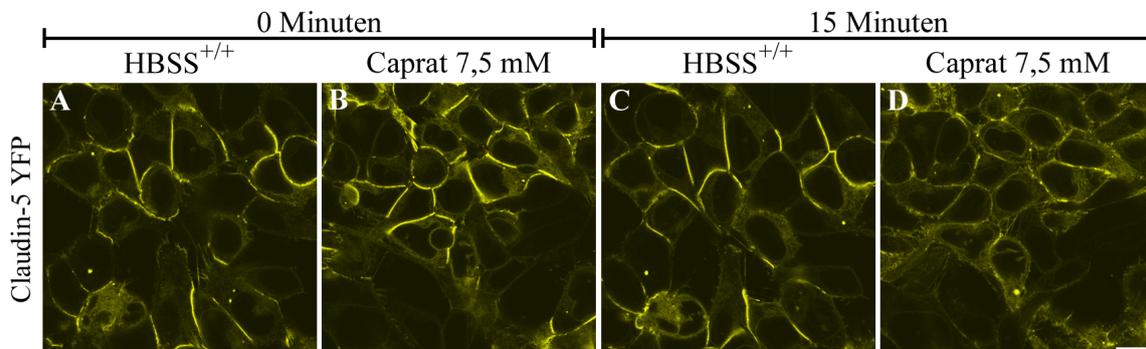
Da die Zugabe der Substanz im apikalen Bereich der Zellschicht erfolgte, sollte geklärt werden, ob die Inkubation mit C10 und dessen Wirkung abhängig von der Lokalisation von Cld5 hinsichtlich des apikalen zu basalen Bereiches ist (Abb. 3.6). In den Untersuchungen zeigte sich wiederholt eine konzentrationsabhängige, aber lokal unabhängige Verringerung der Cld5-YFP-Intensität. So lokalisierte Cld5 unter Kontrollbedingungen einheitlich im apikalen zu basalen Bereich, während die Inkubation der Zellen mit C10 zu einer gleichmäßigen Reduktion der Fluoreszenzintensität im gleichen Bereich führte.



**Abb. 3.6:** Caprat reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5-YFP unabhängig von der basalen zu apikalen Lokalisation in HEK-293 Zellen

Cld5-YFP (A-F) wurde in lebenden HEK-293 Zellen, welche stabil Cld5-YFP exprimierten, vor (A-C) und während der mindestens 20 min andauernden Kontroll- (D) bzw. C10-Behandlung (E, F) in der Z-Achse beobachtet. Unter Kontrollbedingungen (A, D) lokalisierte Cld5-YFP über die Zeit gleichmäßig von basal zu apikal. C10 führte zu einer konzentrationsabhängigen und lokal gleichmäßigen Abschwächung der Cld5 *trans*-Interaktion. Maßbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

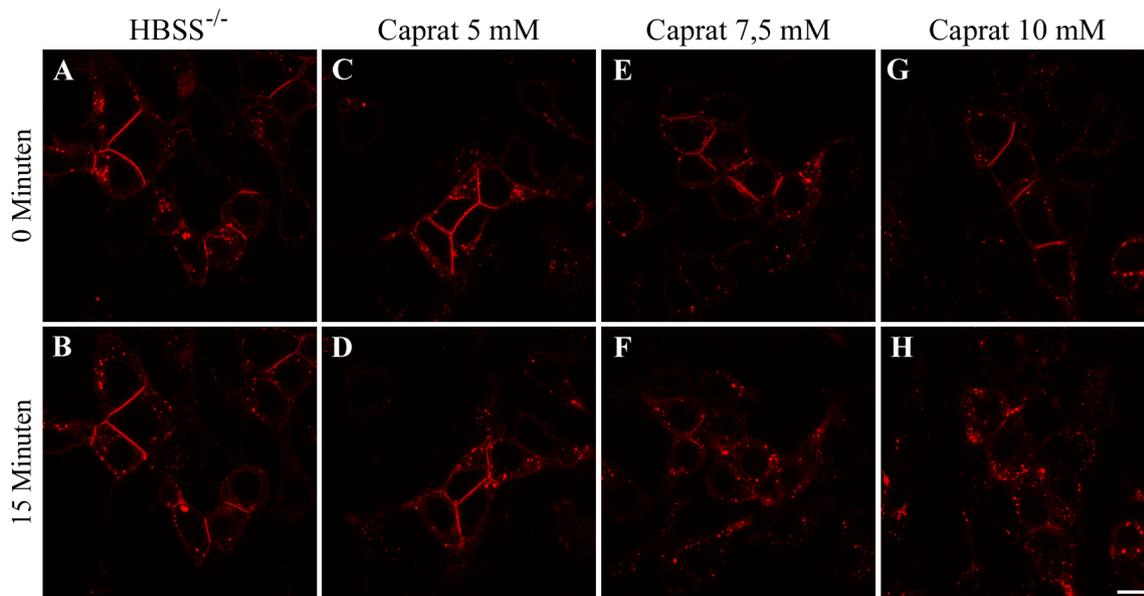
Um zu untersuchen, ob der Kalzium- und Magnesiummangel bzw. dessen Anwesenheit Auswirkungen auf die Ergebnisse hatten, wurden diese mit HBSS<sup>+/+</sup> wiederholt (Abb. 3.7). Hierdurch präzipitierte C10 unmittelbar und bereits bei 5 mM. Allerdings wurde der Effekt von C10, die Reduktion der *trans*-Interaktion von Cld5, nicht beeinträchtigt. Auch in Lösung mit HBSS<sup>+/+</sup> reduzierte 7,5 mM C10 die Cld5-YFP-Intensität in den Zell-Zellkontakten.



**Abb. 3.7:** Caprat reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5 in Gegenwart von Kalzium und Magnesium

Cld5-YFP wurde in lebenden HEK-293 Zellen, welche stabil Cld5-YFP exprimierten, vor (A, B) und während der mindestens 15 min andauernden Kontroll- (C) bzw. C10-Behandlung (D) in HBSS<sup>+/+</sup> beobachtet. Unter Kontrollbedingungen lokalisiert Cld5-YFP in der Plasmamembran von Zell-Zellkontakten, während 7,5 mM C10 die *trans*-Interaktion von Cld5 reduzierte. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

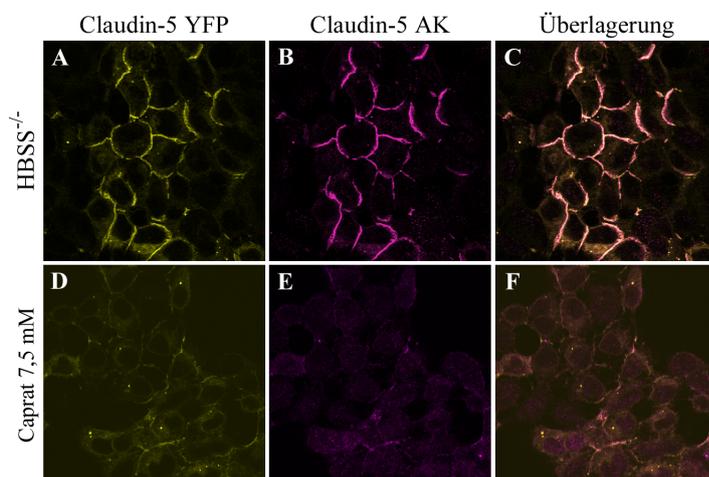
Um einen Effekt von C10 auf das verwendete Fluorophor auszuschließen wurden zum einen HEK-293 Zellen anstatt mit Cld5-YFP mit Cld5-mCherry stabil transfiziert (Abb. 3.8) und zum anderen C10-behandelte HEK-293 Cld5-YFP Zellen fixiert und zusätzlich mit einem Cld5-Antikörper inkubiert (Abb. 3.9). 5, 7,5 und 10 mM C10 wiesen in den HEK-293 Cld5-mCherry Zellen vergleichbare Effekte, wie die mit C10 behandelten HEK-293 Cld5-YFP Zellen, auf. Wiederum kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der *trans*-Interaktion von Cld5.



**Abb. 3.8: Caprat reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5-mCherry**

HEK-293 Cld5-mCherry Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (A, B) bzw. mit 5 mM (C, D), 7,5 mM (E, F) oder 10 mM (G, H) C10 für 15 min kultiviert. Unter Kontrollbedingungen besaß Cld5-mCherry nach der Inkubationszeit (B) eine unveränderte Lokalisation in der Plasmamembran von Zell-Zellkontakten. C10 führte konzentrationsabhängig zu einer Reduzierung der Intensität von Cld5 in der Plasmamembran (D, F, H). Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

Die Detektion von Cld5-YFP mittels eines Cld5-Antikörpers zeigte eine spezifische Bindung des Antikörpers zu seinem Antigen, wie anhand der Überlagerung der direkten YFP-Fluoreszenz und des Antikörpers zu erkennen ist, beide waren deckungsgleich (Abb. 3.9 C). Auch hier konnte eine Lokalisation von Cld5 in der Plasmamembran unter Kontroll-



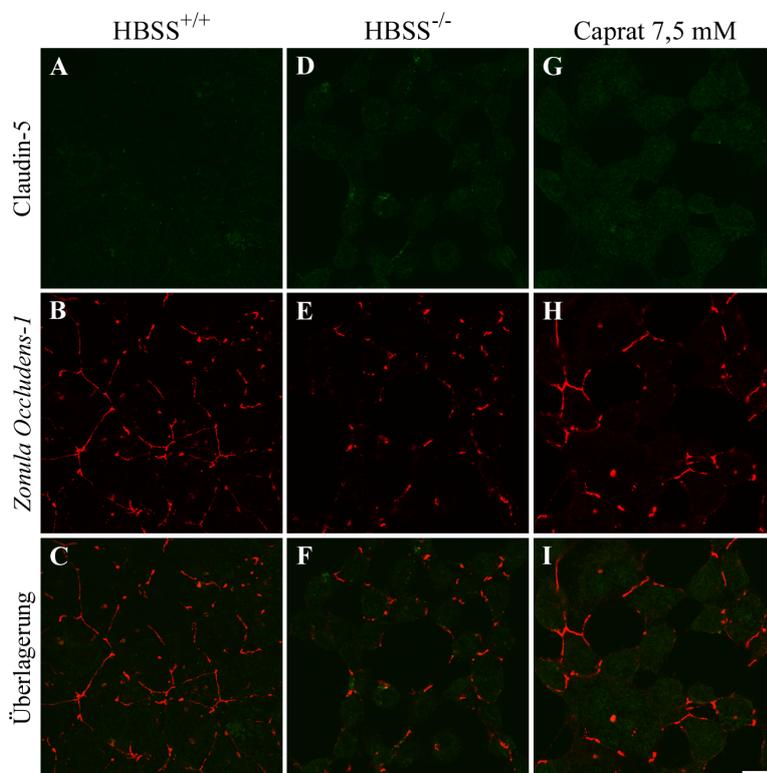
**Abb. 3.9: Caprat reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5 unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung**

HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden für 30 min unter Kontrollbedingungen (A-C) oder mit 7,5 mM C10 inkubiert, fixiert und mittels Cld5-Antikörper (M $\alpha$ Cld5 und Cy5 $\alpha$ M) gefärbt (AK: B, E). Die Färbung des Antikörpers deckt sich mit der YFP-Fluoreszenz (C, F). Cld5 besitzt unter Kontrollbedingungen eine Kontaktanreicherung (A, B), welche nach Behandlung mit C10 stark reduziert war (D, E). Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

bedingungen festgestellt werden, welche nach Behandlung mit 7,5 mM C10 stark reduziert war.

Da Cld5 die Fähigkeit zur *trans*-Interaktion besitzt und somit Potential hat, die Zell-Zellkontakte zu stärken, wurde dessen Einfluss bzw. dessen Fehlen auf die Morphologie der Zellen nach der Inkubation mit HBSS<sup>+/+</sup>, HBSS<sup>-/-</sup> bzw. C10 in HBSS<sup>-/-</sup> untersucht. HEK-293 Zellen (Abb. 3.10) wurden unter den genannten Bedingungen für 30 min kultiviert. Sie wiesen keine Expression von Cld5 auf (Abb. 3.10 A, D, G), während ZO-1 nahe der Plasmamembran lokalisierte und somit die Visualisierung der Umrise der Zellen ermöglichte (Abb. 3.10 B, E, H). Eine 30 min Inkubation der Zellen mit HBSS<sup>-/-</sup> führte zu einem abrunden der Zellen, wodurch sich die Zell-Zellkontakte in ihrer Anzahl und Länge verringert hatten (Abb. 3.10 F). ZO-1 lokalisierte lediglich in diesen Zell-Zellkontakten, wodurch es zu einer Reduktion des ZO-1 Gehalts, im Vergleich zu den mit HBSS<sup>+/+</sup> behandelten Zellen, kam. C10 in HBSS<sup>-/-</sup> verhinderte diese morphologische Veränderung, sodass die Zellen längere Zell-Zellkontakte aufwiesen, wodurch die Färbung von ZO-1 mit der von HBSS<sup>+/+</sup> behandelten Zellen zu vergleichen ist (Abb. 3.10 I).

Somit konnte gezeigt werden, dass C10 die *trans*-Interaktion von Cld5 in HEK-293 Cld5-YFP reduziert und in HEK-293 Zellen den morphologischen Veränderung der Zellen unter Kalziummangel entgegen wirkt. Um zu überprüfen ob es sich um eine Zelllinien spezifischen Effekt handelte, wurden weitere Zelllinien untersucht.



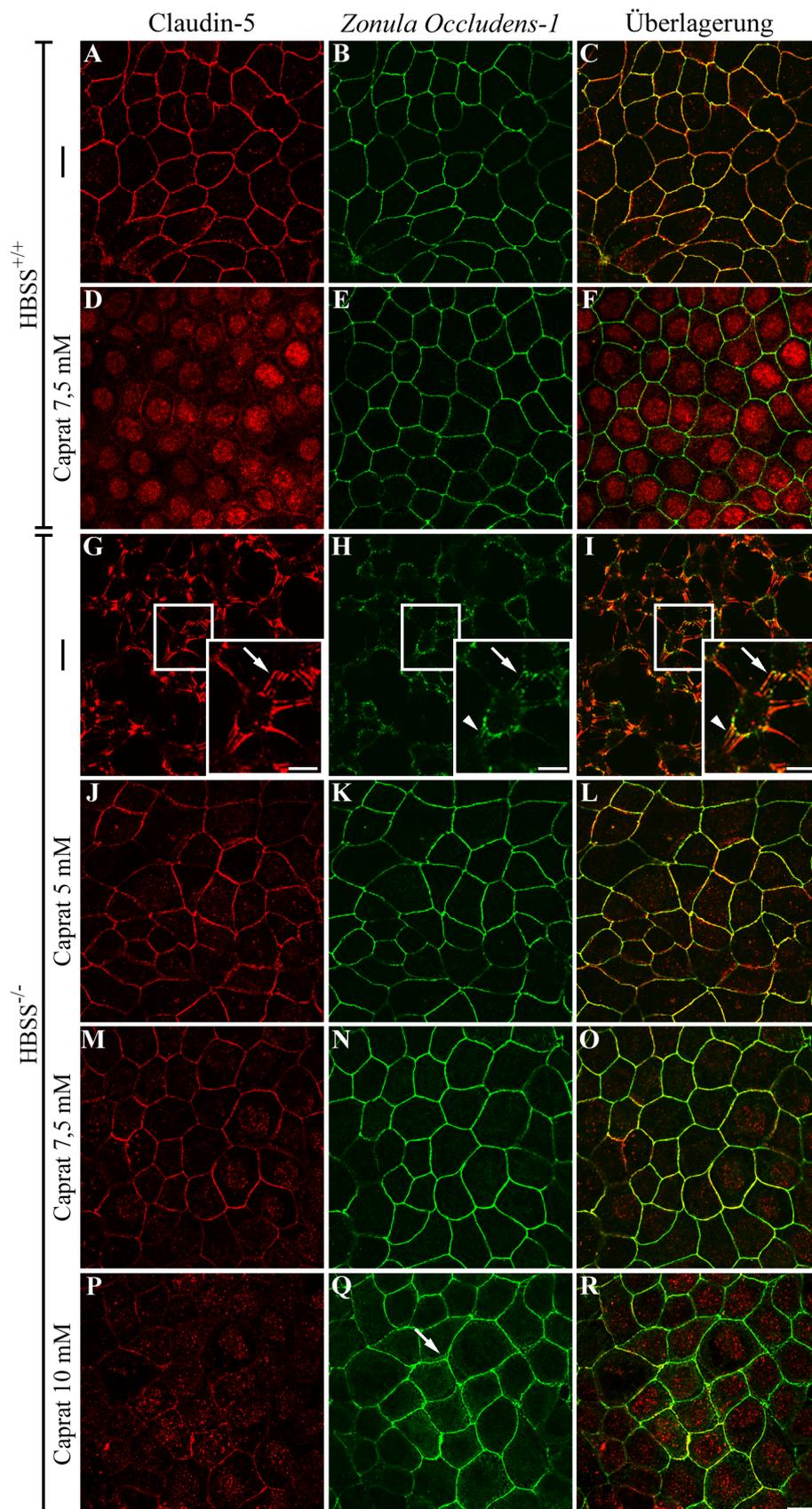
**Abb. 3.10: Caprat wirkt dem Effekt des Kalziummangels in HEK-293 Zellen entgegen**  
HEK-293 Zellen wurden für 30 min mit HBSS<sup>+/+</sup> (A-C), HBSS<sup>-/-</sup> (D-F) bzw. C10 in HBSS<sup>-/-</sup> (G-I) inkubiert, fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 (K $\alpha$ Cld5 und 488 $\alpha$ K) und ZO-1 (M $\alpha$ ZO-1 und Cy3 $\alpha$ M) gefärbt. Diese Zellen exprimieren kein Cld5 (A, D, G). HBSS<sup>+/+</sup> besaß keine Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen, ZO-1 (B) wies eine lineare Färbung an den Zell-Zellkontakten auf und umspannte die Zelle. HBSS<sup>-/-</sup> führte zum Abrunden der Zellen und ZO-1 (E) trat vermindert auf. 7,5 mM C10 in HBSS<sup>-/-</sup> wirkten diesem Effekt entgegen, die Zellen waren nicht abgerundet und ZO-1 (H) umspannte weite Teile der Zelle. Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

### 3.2.3.2. Charakterisierung der Wirkungsweise von Caprat in endogenen *tight junction*-enthaltenen Zellen

Um die Wirkung von C10 auf Cld mit einem endogenen TJ-Hintergrund zu untersuchen, wurden Epithelzellen aus der Niere verwendet. In der Niere werden verschiedene Cld exprimiert, deren Zusammensetzung von proximal nach distal variiert. Die hier verwendeten MDCK-II Zellen entstammen dem distalen Tubulus bzw. Sammelrohr und verfügen über keine Expression von Cld5, weshalb diese mit FLAG-Claudin-5 (FLAG-Cld5) transfiziert und so kultiviert wurden, dass eine homogene Expression des Proteins gewährleistet war. Die modifizierten MDCK-II Zellen wurden mit C10 behandelt und TJ-relevante Proteine in der Immunfluoreszenz, sowie der strukturelle Zusammenhang zwischen ZO-1, F-Aktin und Cld5 analysiert. Da Kalziummangel einen Effekt auf die Zellschicht von HEK-293, nicht jedoch von HEK-293 Cld5-YFP hatte, wurde die 30 min C10-Inkubation in HBSS<sup>+/+</sup> und HBSS<sup>-/-</sup> durchgeführt. Die so behandelten Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern bzw. Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Sowohl Cld5 als auch ZO-1 waren nahezu ausschließlich in der Plasmamembran zu detektieren (Abb. 3.11). 7,5 mM C10 zeigte eine vergleichbare Reduktion der Immunreaktion für Cld5 in den HBSS<sup>+/+</sup> und HBSS<sup>-/-</sup> Ansätzen (Abb. 3.11 D, J, M, P). Hierbei wirkte C10 in einer konzentrationsabhängigen Weise, mit steigender C10-Konzentration verstärkte sich die Reduktion der Cld5-Intensität. Dabei blieb ZO-1, mit Ausnahme der höchsten untersuchten Konzentration von 10 mM C10 (geringfügige zytoplasmatische Lokalisation), unverändert (Abb. 3.11 E, K, N, Q).

F-Aktin und ZO-1 kolokalisierten in der Plasmamembran (Abb. 3.12). Konzentrationsabhängig bewirkte C10 eine Verringerung der Intensität der F-Aktin-bedingten Fluoreszenz in der Plasmamembran und in den intrazellulären Kompartimenten (Abb. 3.12 J, M), sodass eine Verringerung der Kolokalisation mit ZO-1 die Folge war (Abb. 3.12 F, L, O). Diese Effekte waren in HBSS<sup>+/+</sup> und HBSS<sup>-/-</sup> vergleichbar. HBSS<sup>-/-</sup> allein veränderte die Morphologie der MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen, sie bildeten Cld5-, ZO-1- und Aktin-positive Zellausläufer, welche benachbarte Zellen verbanden (Abb. 3.11 I und 3.12 I). Weiterhin erschien ZO-1 diskontinuierlich und zytoplasmatisch, während der Effekt auf Aktin vermutlich durch ein Zurückziehen der Plasmamembran bzw. der Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringkomplexes zu erklären ist (Abb. 3.12 I). Wiederum verhinderte die gleichzeitige Inkubation mit C10 diesen Phänotyp. Durch die Verwendung eines FLAG-Antikörpers (K $\alpha$ FLAG) anstatt des Cld5-Antikörpers konnten diese Ergebnisse validiert werden (Daten nicht gezeigt).

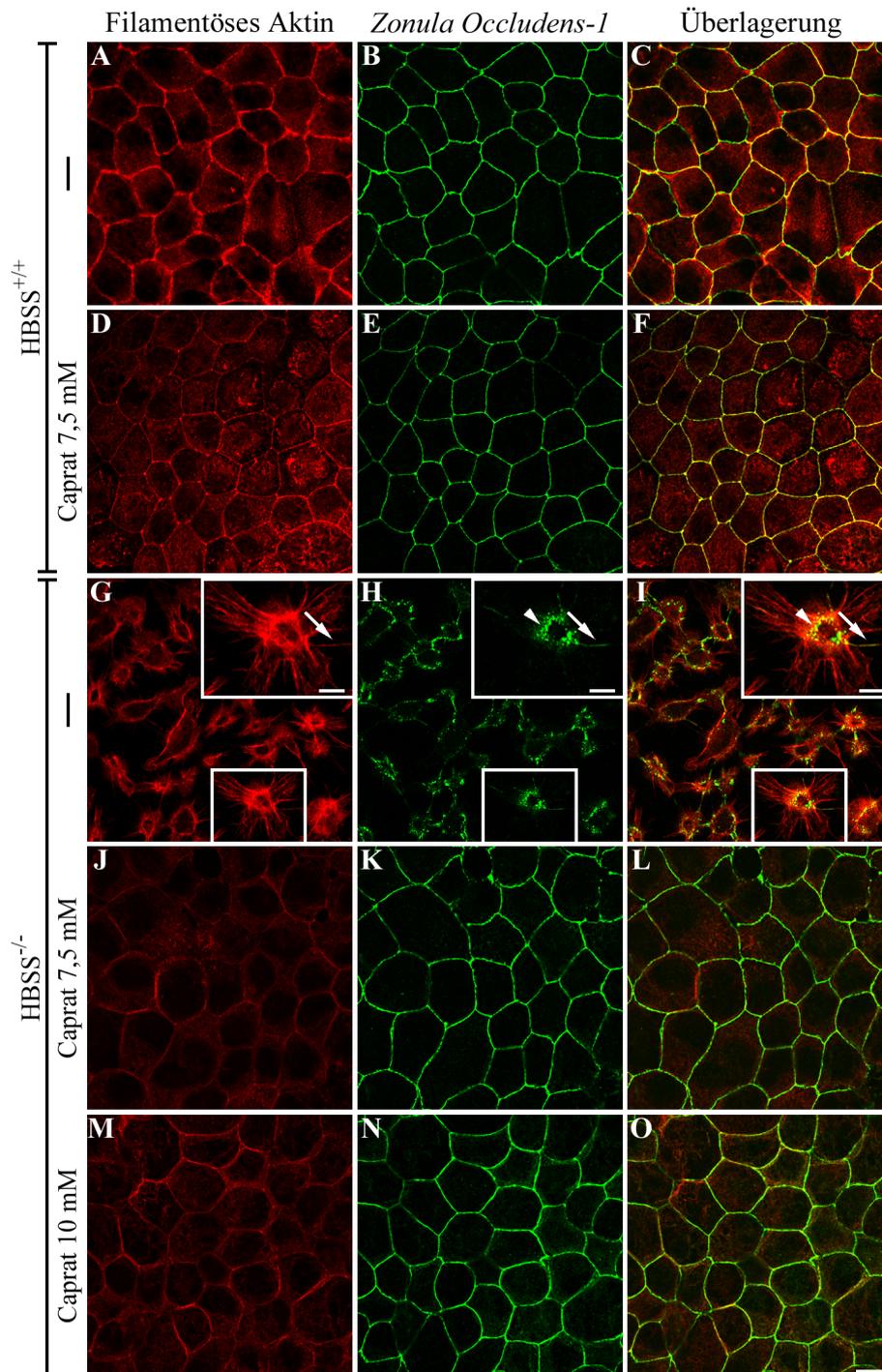
Um die Wirkungsweise von C10 auf Cld5 näher zu charakterisieren wurde der Gehalt an Cld5 in C10 behandelten und unbehandelten Zellen mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.13). Hierbei wurde in zytosolische (Triton X-100 löslich) und zytoskelettale bzw. membranale (Triton X-100 unlöslich) Fraktion unterschieden. MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen wurden für 30 min mit 7,5 mM C10 (HBSS<sup>-/-</sup>) behandelt. Verglichen zu der HBSS<sup>-/-</sup> Inkubation führte C10 zu einer Reduktion des Cld5-Gehalts in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion, während die Menge in der löslichen Fraktion unverändert blieb. Die



**Abb. 3.11: Caprat reduziert die Membranlokalisation von FLAG-Claudin-5 in MDCK-II Zellen**

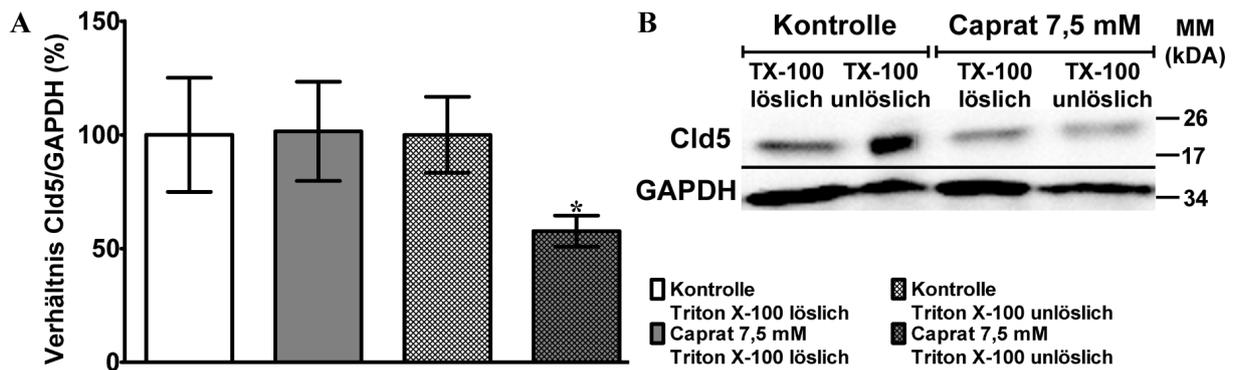
MDCK-II FLAG-Cld5 wurden nach 30 min Inkubation mit HBSS<sup>+/+</sup> (A-C), HBSS<sup>-/-</sup> ohne (G-I) und mit 5 (J-L), 7,5 (M-O) und 10 mM (P-R) C10 fixiert sowie immunzytochemisch gegen Cld5 (A, D, G, J, M, P; K $\alpha$ Cld5 und 555 $\alpha$ K) und ZO-1 (B, E, H, K, N, Q; M $\alpha$ ZO-1 und 488 $\alpha$ M) gefärbt. C10 in HBSS<sup>-/-</sup> reduzierte die Cld5-Immunoreaktivität in der Membran (J, M, P) im Vergleich zu HBSS<sup>+/+</sup> (A), während es die Zellkontraktion und die Bildung von Zellausläufern verhinderte, welche durch den Mangel

an Kalzium und Magnesium hervorgerufen wurde (G, Pfeil). Die Lokalisation von ZO-1 wurde durch die C10-Behandlung nicht verändert, mit Ausnahme der höchsten Konzentration (Q, Pfeil), im Vergleich zu HBSS<sup>+/+</sup> (B). Cld5 und ZO-1 wurden durch HBSS<sup>-/-</sup> umverteilt (H). Die Vergrößerung zeigt, dass ZO-1 in Zellausläufern (H, Pfeil) und diskontinuierlich (H, Pfeilkopf) lokalisierte. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.12: Caprat reduziert den membranständigen und zytoplasmatischen Gehalt von F-Aktin in MDCK-II FLAG-Claudin-5 Zellen**

MDCK-II FLAG-Cld5 wurden nach 30 min Inkubation mit HBSS<sup>+/+</sup> (A-C), HBSS<sup>-/-</sup> ohne (G-I) und mit (G-O) C10 fixiert sowie F-Aktin mit Rhodamine-Phalloidin (A, D, G, J, M) und ZO-1 immunzytochemisch (B, E, H, K, N;  $\text{M}\alpha\text{ZO-1}$  und 488 $\alpha\text{M}$ ) gefärbt. C10 in HBSS<sup>-/-</sup> unterbrach die Fluoreszenz des perimembranal sowie intrazellulären F-Aktin (J, M) und verhinderte die Kontraktion der Zellen, sowie die Bildung von Zellausläufern, welche durch HBSS<sup>-/-</sup> (G, Pfeil) hervorgerufen wurde. HBSS<sup>-/-</sup> alleine induzierte die Kontraktion von Zellen, wobei ZO-1 intrazellulär (H, Pfeilkopf) oder in den Zellausläufern (H, Pfeil) mit F-Aktin kolokalisierte (I, Pfeil). Effekte waren in HBSS<sup>+/+</sup> (D-F) und HBSS<sup>-/-</sup> (J-L) vergleichbar. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

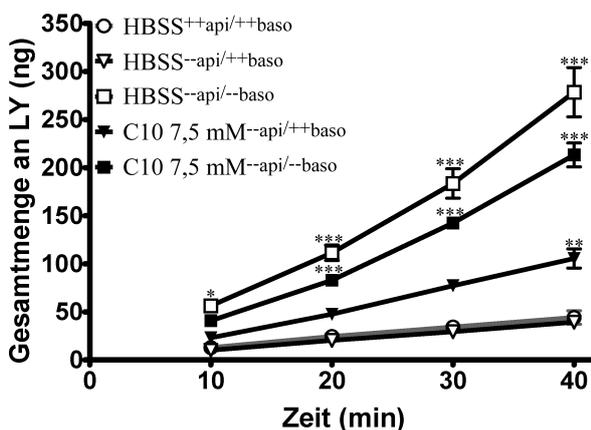


**Abb. 3.13: Caprat reduziert den FLAG-Claudin-5 Gehalt in der zytoskelettalen und membranalen Fraktion von MDCK-II Zellen**

MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen wurden für 30 min mit HBSS<sup>-/-</sup> oder C10 in HBSS<sup>-/-</sup> inkubiert und das Zelllysate mittels Westernblot analysiert (B, Cld5  $\alpha$ Cld5 und  $\alpha$ HRP, GAPDH  $\alpha$ GAPDH und  $\alpha$ HRP). Die densitometrische Auswertung (A) ergab eine Reduktion des Cld5-Gehalts nach C10-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Die Intensität der Cld5-Banden wurden auf die der GAPDH normalisiert. Daten sind mit Mittelwert $\pm$ SEM, n=4, zweiseitiger t-Test, \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05 verglichen mit der Kontrolle dargestellt.

densitometrische Auswertung der Cld5-Banden (23 kDa), normalisiert auf den GAPDH-Gehalt (34 kDa) der jeweiligen Fraktion, ergab eine Reduktion von Cld5 in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion um 39 % (von 100 $\pm$ 19,3 % zu 60,9 $\pm$ 13,7 %, p<0,05). Ein vergleichbarer Effekt wurde in der Gegenwart von HBSS<sup>+/+</sup> (Reduktion um 53 %, Daten nicht gezeigt) festgestellt. Ein linearer Anstieg der Banden-Intensität mit steigender Proteinkonzentration (Cld5 und GAPDH) konnte zuvor bestätigt werden.

Weiterhin wurde die Wirkung von C10 auf die Permeabilität der Zellschicht analysiert (Abb. 3.14). Hierfür wurden stabil transfizierte MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen verwendet. Da C10 in Gegenwart von Kalzium und Magnesium präzipitiert, wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt: bilaterale Applikation von HBSS<sup>+/+</sup> (HBSS<sup>++api/++baso</sup>), apikale Behandlung mit HBSS<sup>-/-</sup> und basolateral mit HBSS<sup>+/+</sup> ohne (HBSS<sup>--api/++baso</sup>) oder mit C10 (C10 7,5 mM<sup>--api/++baso</sup>) oder beidseitige Applikation mit HBSS<sup>-/-</sup> ohne (HBSS<sup>--api/--baso</sup>) oder mit C10 (C10 7,5 mM<sup>--api/--baso</sup>) für 30 min. Nach der Behandlung der Zellen auf den Filtern (Millicell<sup>®</sup> Cell Culture Inserts) wurde der Durchtritt von Lucifer Yellow (LY, 457 Da) bestimmt. Hierbei erhöhte C10 signifikant die Permeabilität



**Abb. 3.14: Caprat erhöht die Permeabilität von kleinen Molekülen in MDCK-II FLAG-Claudin-5 Zellen**

MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen wurden auf Filtern kultiviert und für 30 min behandelt. Die apikale Inkubation mit C10 in HBSS<sup>-/-</sup> (C10 7,5 mM<sup>--api/--baso</sup>) erhöht den Gehalt von LY durch die Zellschicht, im Vergleich zu den Kontrollgruppen (HBSS<sup>++api/++baso</sup>, bilateral HBSS<sup>+/+</sup> und HBSS<sup>--api/++baso</sup>, apikal HBSS<sup>-/-</sup> und basolateral HBSS<sup>+/+</sup>). Daten sind mit Mittelwert $\pm$ SEM, n $\geq$ 6, einfacher ANOVA mit Bonferroni Korrektur (*Multiple Comparison*), \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05 verglichen mit HBSS<sup>++api/++baso</sup> dargestellt.

der Zellschicht gegenüber LY im Vergleich zu den Kontrollgruppen (HBSS<sup>- -api/+ +baso</sup> und HBSS<sup>+ +api/+ +baso</sup>). Hingegen verringerte C10 7,5 mM<sup>- -api/- -baso</sup> die durch den bilateralen Kalzium- und Magnesiummangel (HBSS<sup>- -api/- -baso</sup>) hervorgerufene Durchlässigkeit der MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen für LY.

### 3.2.3.3. Charakterisierung der Wirkungsweise von Caprat auf endogenes Claudin-5

Um zu klären ob, diese Effekte eine funktionale Relevanz bezüglich der BHS besitzen, wurden endotheliale bEnd5 Zellen für weitere Experimente verwendet. Diese Linie wurde aus Gehirndothelzellen einer Balb/c Maus präpariert und stellt ein *in vitro* BHS-Modell dar, welches unter anderem die TJ-Proteine ZO-1, Cld1 und Occludin exprimiert (Yang *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Cld5 in der Immunfluoreszenz (Abb. 3.15) und mittels Westernblot (Abb. 3.26) bestätigt. Somit wurden diese Zellen für die weitere Analyse des C10-Effektes auf endogene, vollständige und Cld5-enhaltene TJ

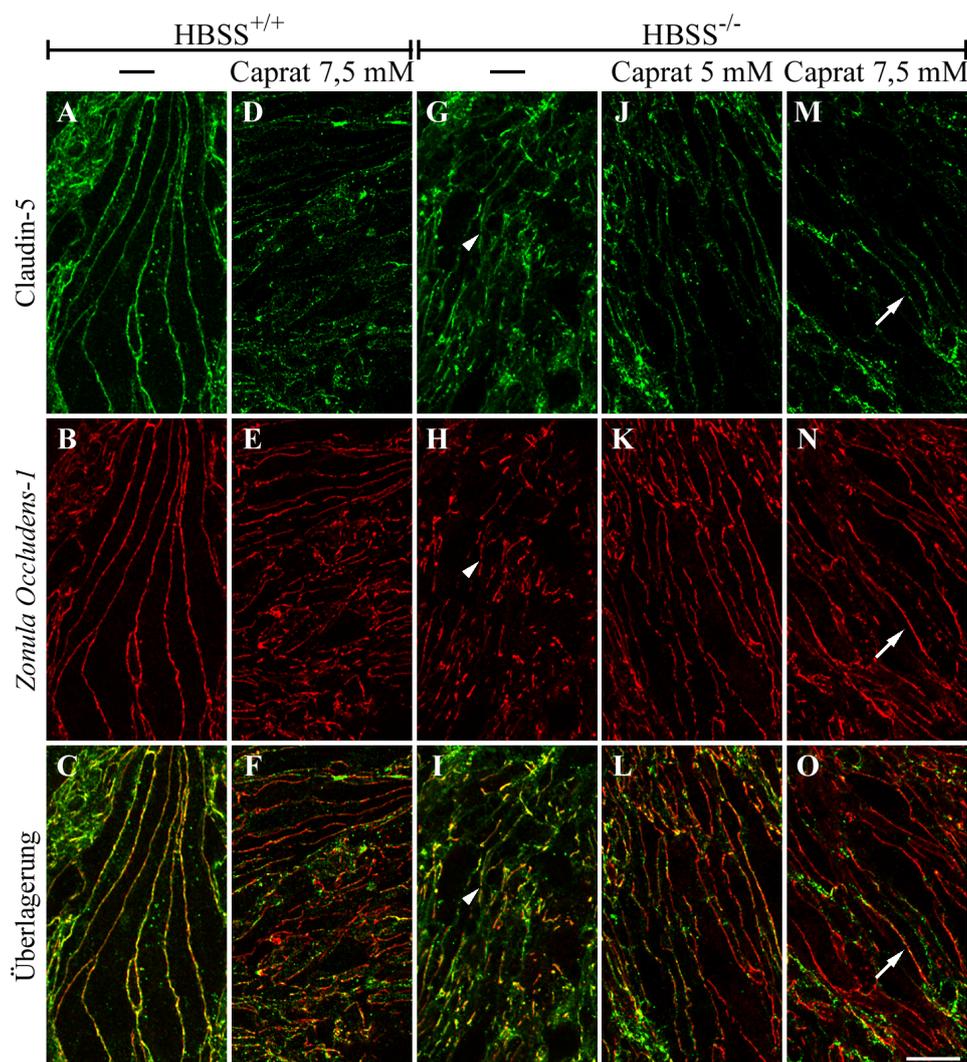
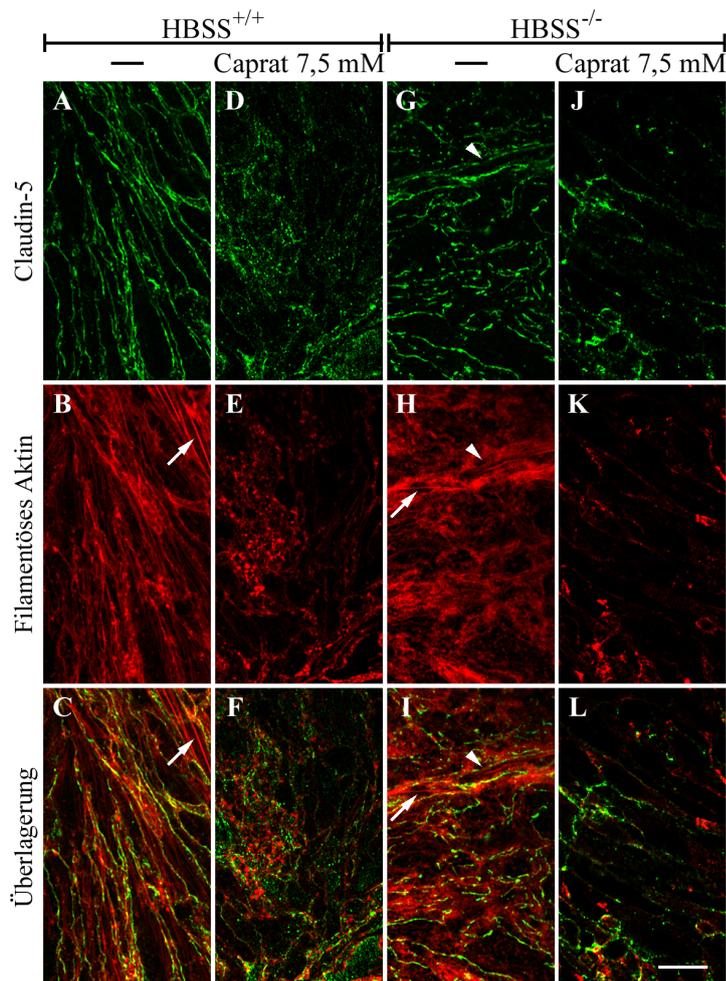


Abb. 3.15: Caprat stört die membranale Lokalisation von Claudin-5 in bEnd5 Zellen

Cld5 (A, D, G, J, M) und ZO-1 (B, E, H, K, N) wurden nach 30 min Inkubation mit HBSS<sup>+/+</sup> (A-C),

HBSS<sup>-/-</sup> (G-H) oder C10 in HBSS<sup>+/+</sup> (D-F) und in HBSS<sup>-/-</sup> (J-O) in bEnd5 Zellen analysiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 (K $\alpha$ Cld5 und 555 $\alpha$ K) und ZO-1 (M $\alpha$ ZO-1 und 488 $\alpha$ M) gefärbt. HBSS<sup>-/-</sup> führte zu einer Desorganisation beider Proteine in der Plasmamembran und zu einer fragmentierten Erscheinung (G, H, Pfeilkopf) im Vergleich zu der HBSS<sup>+/+</sup> Kontrolle (A, B). C10 reduzierte die Cld5-Immunoreaktivität in der Membran (J, Pfeil) im Vergleich zu der HBSS<sup>+/+</sup> (A) und HBSS<sup>-/-</sup> (G) Kontrolle. Die Färbung von ZO-1 wurde durch die Inkubation mit C10 nicht beeinträchtigt, vielmehr wurde dessen Fragmentierung (K, Pfeil) im Vergleich zu den HBSS<sup>-/-</sup>-behandelten Zellen verhindert. Ähnliche Effekte von C10 auf Cld5 traten in der Gegenwart von HBSS<sup>+/+</sup> (D-F) oder HBSS<sup>-/-</sup> (J-O) auf. Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

verwendet. Unter Kontrollbedingungen kolokalisierten endogenes Cld5 und ZO-1 in der Plasmamembran an Zell-Zellkontakten (Abb. 3.15 C). 7,5 mM C10 führte zu einer Reduktion und diffusen Verteilung von Cld5 (Abb. 3.15 D, J, M), während ZO-1 keine Veränderung aufwies (Abb. 3.15 E, K, N). F-Aktin zeigte unter Kontrollbedingungen hauptsächlich eine zytoplasmatische, filamentöse Färbung, wodurch es nur partiell zu einer Kollokalisierung mit Cld5 kam (Abb. 3.16 C). In der Gegenwart von HBSS<sup>+/+</sup> oder HBSS<sup>-/-</sup> führten 7,5 mM C10 zu einem nahezu kompletten Ausbleiben der F-Aktin-Fluoreszenz (Abb. 3.16 E, K). Wiederum führte der Mangel an Kalzium und Magnesium zu einer veränderten Zellmorphologie. Cld5 und ZO-1 waren fragmentiert (Abb. 3.15 G, H), während F-Aktin eine diffuse und ungeordnete Färbung aufwies (Abb. 3.16 H). Dementsprechend wirkte auch in diesem Zellsystem die Zugabe von C10 dem HBSS<sup>-/-</sup> Effekt entgegen.



**Abb. 3.16: Caprat stört die membranale Lokalisation von Claudin-5 und des Aktin Zytoskeletts in bEnd5 Zellen**

Die Immunofärbung von Cld5 (A, D, G, J, K $\alpha$ Cld5 und 555 $\alpha$ K) und Rhodamin-Phalloidin Färbung von F-Aktin (B, E, H, K) wurde nach 30 min Inkubation mit HBSS<sup>+/+</sup> (A-C), C10 in HBSS<sup>+/+</sup> (D-F), HBSS<sup>-/-</sup> (G-I) oder C10 in HBSS<sup>-/-</sup> (J-L) in bEnd5 Zellen analysiert. In den HBSS<sup>+/+</sup> Kontrollzellen (A-C) befand sich Cld5 in der Plasmamembran (A), während F-Aktin eine zytoplasmatische Lokalisation, zu meist in filamentöser Form (B, Pfeil), aufwies. HBSS<sup>-/-</sup> induzierte eine morphologische Veränderung der Zellen, sowie eine Fragmentierung von Cld5 (G, Pfeilkopf). F-Aktin erschien diffus, obgleich einige filamentöse Strukturen erhalten blieben (H, Pfeil). C10 reduzierte die Cld5-Immunoreaktivität in der Plasmamembran (J) und führte zu einem nahezu kompletten Verlust der F-Aktin-Fluoreszenz (K) im Vergleich zu den HBSS<sup>+/+</sup> (A, B) und HBSS<sup>-/-</sup> behandelten Kontrollzellen (G, H). Vergleichbare Effekte durch C10 wurden in HBSS<sup>+/+</sup> (D-F) und HBSS<sup>-/-</sup> (J-L) beobachtet. Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m.

Somit konnte in sämtlichen untersuchten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cld5 *trans*-Interaktion durch C10 festgestellt werden. Es war unerheblich, ob das Protein exogen oder endogen exprimiert wurde und ob es in vollständigen TJ integriert war. Dieser Effekt konnte in Epithel- und Endothelzellen nachgewiesen werden. Auf direkte Interaktionspartner wie z.B. ZO-1 bestanden keine Auswirkungen, während der F-Aktin-Gehalt reduziert war. Nachfolgend sind die Ergebnisse der C10-Inkubation und des Kalzium- und Magnesiummangels (Tab. 3.1) sowie anderer untersuchter Absorptionsverstärker (Tab. 3.2) tabellarisch zusammengefasst.

**Tab. 3.1:** Zusammenfassung der Effekte von Caprat und Kalzium- und Magnesiummangel

Caprat ohne Kalzium- und Magnesium	Kalzium- und Magnesiummangel
<b>HEK-293</b>	
kein Effekt auf ZO-1 verhindert Zellabrundung	Proteingehalt von ZO-1 reduziert Abrunden der Zellen
<b>HEK-293 Cld5-YFP</b>	
konzentrationsabhängige Reduktion von Cld5 kein Effekt auf ZO-1	kein Effekt auf Cld5 kein Effekt auf ZO-1
<b>MDCK-II FLAG-Cld5</b>	
konzentrationsabhängige Reduktion von Cld5 konzentrationsabhängige Reduktion von Aktin kein Effekt auf ZO-1 (Ausnahme 10 mM C10) verhindert Bildung von Zellausläufer Permeabilität von LY gesteigert	Cld5 lokalisiert in Zellausläufern Aktin lokalisiert in Zellausläufern ZO-1 lokalisiert in Zellausläufern Bildung von Zellausläufern Permeabilität von LY gesteigert
<b>bEnd5</b>	
konzentrationsabhängige Reduktion von Cld5 konzentrationsabhängige Reduktion von Aktin kein Effekt auf ZO-1 verhindert Bildung von Zellausläufer	fragmentierte Erscheinung von Cld5 diffuse Erscheinung von Aktin fragmentierte Erscheinung von ZO-1 keine Aussage möglich

**Tab. 3.2:** Zusammenfassung der Effekte weiterer Absorptionsverstärker

Substanzbezeichnung	Effekte	Kapitel
Alkylglycerole	kein Effekt auf Cld5	10.1
CC-Chemokin-Ligand-2	kein Effekt auf Cld5	10.1
Dimethylsphingosin	Reduktion von Cld5, Aktin und ZO-1	10.1
Gamma-Linolensäure	kein Effekt auf Cld5	10.1
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	Reduktion von Cld5 und CellMask <sup>TM</sup> -Färbung	3.2.2
RMP-7	morphologische Veränderung der Plasmamembran	10.1
<i>small interfering RNA</i>	Reduktion von Cld5	3.2.1

### 3.3. Hochdurchsatz-Screening

Für die Etablierung des HDS wurden zwei Kontrollen benötigt, um die Rahmenbedingungen des Screens festzulegen. Eine Kontrolle bestand hierbei aus den unbehandelten HEK-293 Cld5-YFP Zellen und die zweite aus solchen, deren *trans*-Interaktion und somit YFP-Fluoreszenz reduziert war. Das ursprüngliche Design des HDS sah die Verwendung eines automatischen Mikroskops (Cellomics® ArrayScan®) vor, mit dem die Cld5-YFP-Intensität in der Membran gemessen werden sollte. Somit musste sich die lokale Fluoreszenz der beiden Kontrollen signifikant unterscheiden. Um dieses zu bestimmen ist die Kalkulation des Z'-Faktor notwendig (Abb. 3.17). Dieser Faktor beschreibt die Wahrscheinlichkeit, einen *hit* auf Grundlage der Kontrollen zu detektieren (Zhang *et al.*, 1999; Malo *et al.*, 2006):

$$Z' - Faktor = 1 - \frac{3(S_{pos} + S_{neg})}{|MW_{pos} - MW_{neg}|} \quad (3.1)$$

Mit  $S_{pos}$  = Standardabweichung der Positivkontrolle,  $S_{neg}$  = Standardabweichung der Negativkontrolle,  $MW_{pos}$  = Mittelwert der Positivkontrolle und  $MW_{neg}$  = Mittelwert der Negativkontrolle.

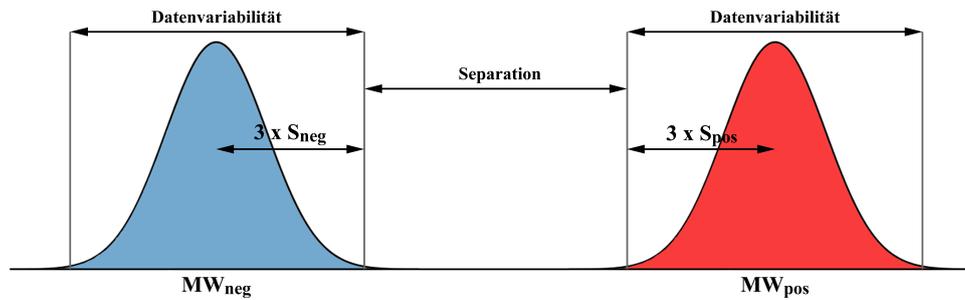
Hierbei wird  $|MW_{pos} - MW_{neg}|$  als dynamischer Bereich bezeichnet. Je größer der dynamische Bereich und damit der Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle ist, umso verlässlichere Daten bietet der Screen. Gleiches gilt für eine kleine Standardabweichung, da hier selbst eng aneinander liegende Werte unterschieden werden können. Umso näher der Z'-Faktor dem Maximalwert 1 kommt, umso höher sind die Erfolgchancen bei dem HDS effektive Substanzen zu detektieren. Bei einem Wert von  $<0,5$  wird es zunehmend seltener zwischen aktiven und inaktiven Substanzen unterscheiden zu können, weshalb ein Z'-Faktor  $\geq 0,5$  erreicht werden sollte. Ist der Screen etabliert und durchgeführt, basiert die Bewertung der Ergebnisse auf dem *Z-score*. Dieser Wert beschreibt die Signifikanz, mit der sich eine einzelne Messung von dem Durchschnittswert der Platte abhebt:

$$Z - score = 1 - \frac{X - M}{S} \quad (3.2)$$

Mit X = Messwert der Fluoreszenz der Probe, M = Median der Fluoreszenz der gesamten Platte, S = Standardabweichung der Fluoreszenz der gesamten Platte.

Erreicht die Probe einen *Z-score* von  $\leq -3$  wird es als Barriere-öffnend (Inhibitor), bei  $\geq 3$  als Barriere-verstärkend (Aktivator) klassifiziert.

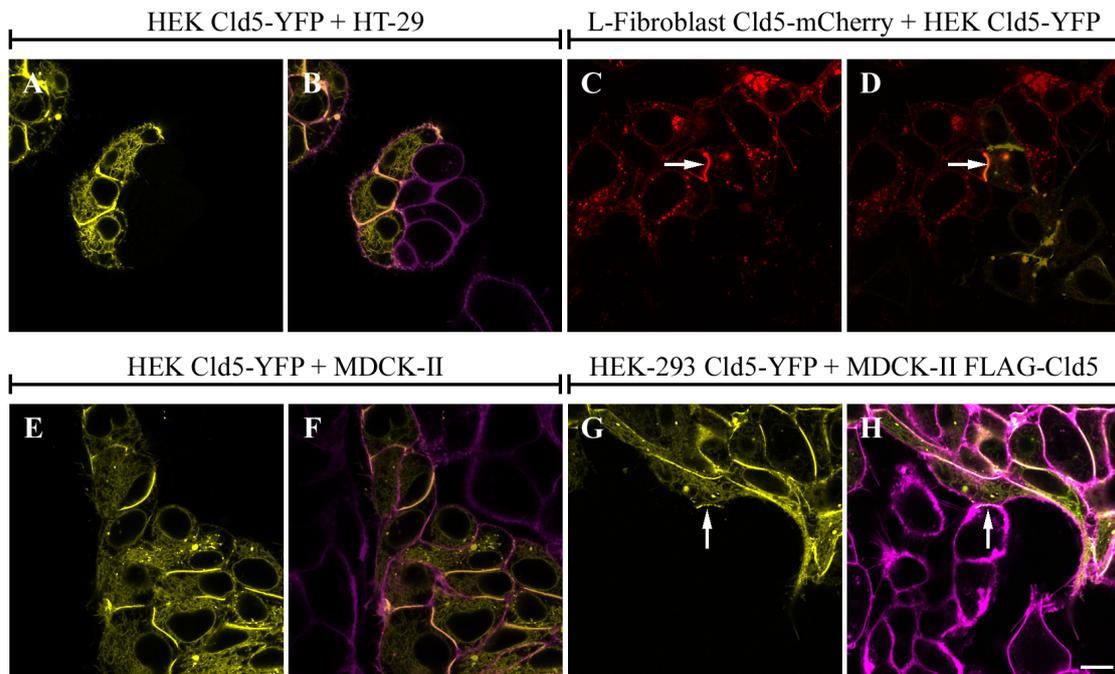
Auf der Suche nach schnell wirkenden und anhaltenden Modulatoren für Cld5 erwies sich C10 als geeignetster von allen getesteten Ansätzen. Hierbei war eine hohe Reproduzierbarkeit, eine praktikable Applikation (im Vergleich z.B. zu der der siRNA) sowie ein relativ spezifischer und deutlicher Effekt ausschlaggebend. Dementsprechend wurden unbehandelte und mit C10-behandelte HEK-293 Cld5-YFP Zellen als Kontrollen für die Kalkulation des Z'-Faktors verwendet.



**Abb. 3.17: Schematische Darstellung des Z'-Faktors**

Die Berechnung des Z'-Faktor  $= 1 - 3 (S_{pos} + S_{neg}) / (|MW_{pos} - MW_{neg}|)$  basiert auf der Normalverteilung der Daten mit einem Konfidenzintervall 99,73 %. Bildlich gesehen, resultiert der Z'-Faktor aus der in der Abb. mit Separation gekennzeichneten Bereich. Dieser sollte einen Wert von  $\geq 0,5$  erreichen, damit die im HDS erhaltenen Daten verlässlich als negativ oder positiv (*hit*) klassifizierte werden können.  $S_{pos}$  = Standardabweichung der Positivkontrolle,  $S_{neg}$  = Standardabweichung der Negativkontrolle,  $MW_{pos}$  = Mittelwert der Positivkontrolle und  $MW_{neg}$  = Mittelwert der Negativkontrolle.

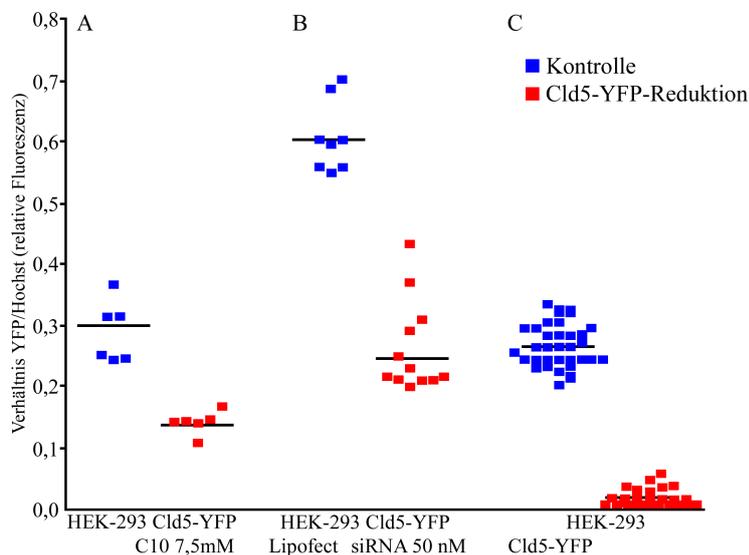
Die Verwendung von C10 barg einige Komplikationen. So präzipitierte C10 in Gegenwart von Kalzium und Magnesium, weshalb vor der Zugabe der Substanzen das Medium durch HBSS<sup>-/-</sup> ersetzt wurde. Hierdurch und aus der vom Mikroskop zur Messung der gesamten Platte benötigten Zeit von über 60 min, kam es zu Membranveränderungen der Zellen, welche vom Mikroskop nicht erfassbar waren. Zusätzlich rundeten sich die Zellen in dem C10-Ansatz leicht ab, was eine erhöhte Internalisierung von CellMask<sup>™</sup> sowie eine intensivere Färbung der Zellkerne zur Folge hatte. Die spezifische Färbung der Plasmamembran durch CellMask<sup>™</sup> war nötig, damit das Mikroskop automatisch die zu messenden Bereiche detektieren konnte; die Färbung der Zellkerne sollte eine Normierung auf die Zellzahl ermöglichen. Um die Veränderung der Morphologie während des HDS zu vermeiden, wurde zum einen die Möglichkeit einer Kokultur der HEK-293 Cld5-YFP Zellen mit HT-29, L-Fibroblasten, sowie MDCK-II Zellen untersucht, da diese über eine stärkere Adhärenz verfügten. Zum anderen wurden die HEK-293 Cld5-YFP Zellen nach der Inkubation mit den Substanzen fixiert. Die Kokultivierung mit HT-29 Zellen führte zu einer gemeinsamen Zellschicht, doch eine Kontaktanreicherung von Cld5 blieb aus (Abb. 3.18 B). In der Immunfluoreszenz und in Westernblot-Analysen konnte die Expression von Cld5 in HT-29 Zellen nicht zweifelsfrei festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Wuchsen die HEK-293 Cld5-YFP Zellen zusammen mit stabil transfizierten Cld5-mCherry L-Fibroblasten, kam es zu einer Anreicherung von Cld5 in den Zell-Zellkontakten, die jedoch in den L-Fibroblasten untereinander limitiert war (Abb. 3.18 D). MDCK-II Zellen mieden den Kontakt zu HEK-293 Cld5-YFP Zellen. So führte die Kokultivierung beider zu Zellkolonien der jeweiligen Zelllinie (Abb. 3.18 F). Exprimierten die MDCK-II Zellen FLAG-Cld5 war ein Zellkontakt beider Zelllinien über die Cld5-Anreicherung möglich (Abb. 3.18 H). Dieser Kontakt beider Zelllinien war jedoch in ihrer Quantität beschränkt. Somit konnte in den Kokultivierungen nur selten eine Anreicherung von Cld5 in den Zell-Zellkontakten gezeigt werden, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.



**Abb. 3.18: Die Kontaktanreicherung zwischen HEK-293 Claudin-5-YFP und anderen Zelllinien ist limitiert**

HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden zusammen mit HT-29 (A, B), L-Fibroblasten Cld5-mCherry (C, D), MDCK-II (E, F) und MDCK-II FLAG-Cld5 (G, H) Zellen kultiviert. HEK und HT-29 Zellen bildeten zusammen eine Zellschicht, eine Anreicherung von Cld5 in den Zell-Zellkontakten blieb aber aus. Die stabile Transfektion von Cld5-mCherry in L-Fibroblasten führte nur selten zu einer Kontaktanreicherung. Diese Anreicherung war an den Zell-Zellkontakten zu HEK-293 Cld5-YFP Zellen stärker ausgeprägt (C, D, Pfeil). Die Kokultivierung mit MDCK-II Zellen führte nicht zu einer Bildung einer gemeinsamen Zellschicht. Die Zellen mieden den Kontakt mit der anderen Zelllinie, sodass einzelne Zellkolonien entstanden. Exprimierten die MDCK-II Zellen FLAG-Cld5, so bestand die Möglichkeit eines Kontaktes zwischen den beiden Zelllinien (G, H, Pfeil). Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Die Fixierung der behandelten HEK-293 Cld5-YFP Zellen führte zu morphologischen Veränderungen der Plasmamembran, sodass die YFP-Fluoreszenz leicht diffus erschien (Daten nicht gezeigt). Die Kalkulation des  $Z'$ -Faktor der so aufbereiteten Zellen ergab einen Wert von 0,25 und erreichte somit nicht den erforderlichen Mindestwert von 0,5 (Abb. 3.19 A). Auch die Verwendung der Cld5 spezifischen siRNA führte lediglich zu einem  $Z'$ -Faktor von 0,1-0,3 (Abb. 3.19 B).



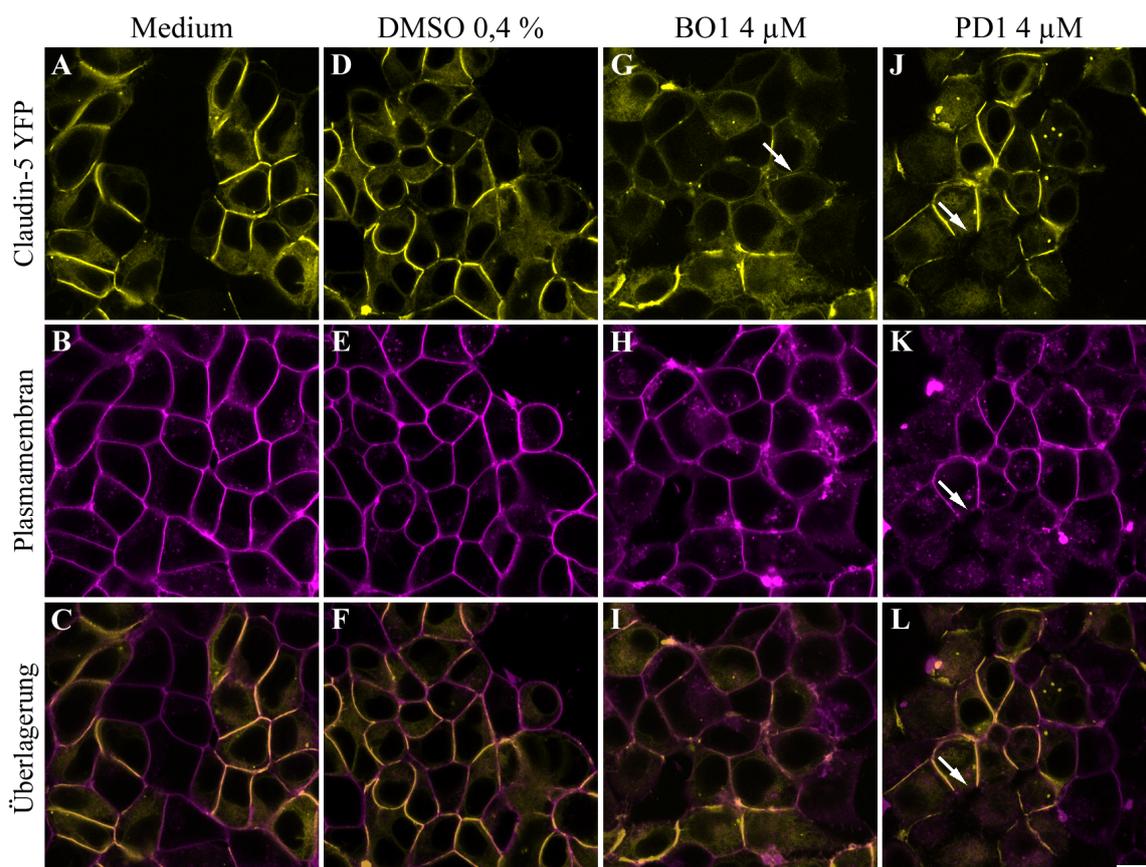
**Abb. 3.19: Messung der YFP-Intensitäten für die Bestimmung des  $Z'$ -Faktors**

Exemplarische Messwerte zur Bestimmung des  $Z'$ -Faktors von HEK-293 Cld5-YFP Zellen nach der Inkubation mit 7,5 mM C10 (A), 50 nM siRNA (B) bzw. der untransfizierten HEK-293 Zellen sind dargestellt. Als Referenz dienten unbehandelte HEK-293 Cld5-YFP (A, C) bzw. mit Lipofectamine™ 2000 behandelte (B) Zellen. Die YFP-Fluoreszenz wurde gemessen und der  $Z'$ -Faktor mittels der Gleichung 3.1 kalkuliert. Lipofect = Lipofectamine™ 2000.

Als Folge wurde das Design des HDS verändert: Anstatt die Zellen mit C10 zu behandeln, wurden HEK-293 und HEK-293 Cld5-YFP Zellen verwendet und die Gesamtintensität der YFP-Fluoreszenz mittels Plattenlesers gemessen, sodass das HDS wie unter 2.4.11 beschrieben durchgeführt wurde. Der Z'-Faktor (reichte von 0,483 bis 0,758 und erfüllte somit die Vorgabe von  $\geq 0,5$ ; Abb. 3.19 C) wurde für jede Platte anhand der YFP-Intensitäten von HEK-293 und HEK-293 Cld5-YFP kalkuliert. In dem anschließend durchgeführten HDS konnten 42 Substanzen ermittelt, welche die YFP-Fluoreszenz erhöhten ( $Z\text{-score} > 3$ ) und somit als Aktivatoren eingestuft wurden. 19 Substanzen senkten die Fluoreszenz ( $Z\text{-score} < -3$ ) und galten somit als Inhibitoren. Diese Substanzen wurden nachfolgend validiert.

### 3.4. Validierung der Hochdurchsatz-Screening *hits*

Nachdem in dem durchgeführten HDS erfolgreich Substanzen bestimmt werden konnten, welche die YFP-Fluoreszenz modifizierten, wurden diese in verschiedenen manuellen Zellversuchsansätzen näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die ermittelten Aktivatoren hauptsächlich eine Autofluoreszenz aufwiesen und somit nicht weiter analysiert



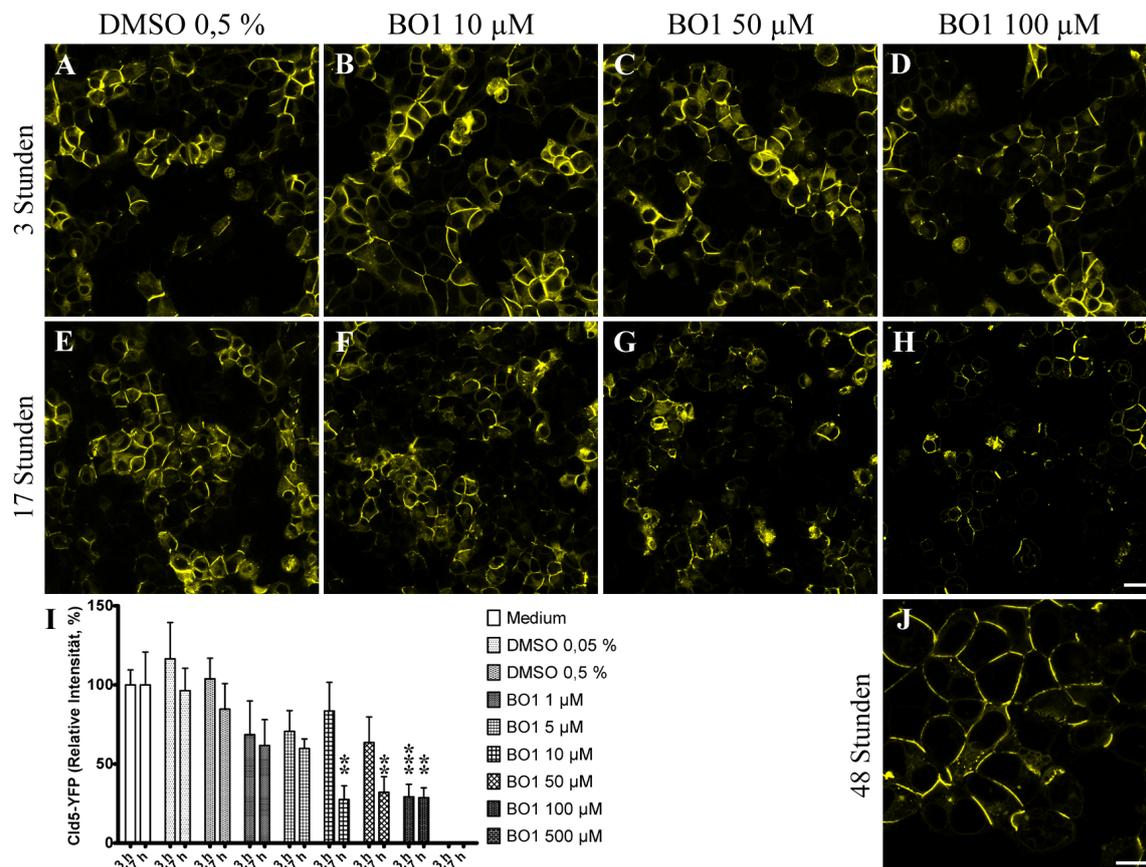
**Abb. 3.20: Ausgewählte *hits* des Hochdurchsatz-Screens**

HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden 17 h mit Medium (A-C), 4  $\mu\text{M}$  BO1 (G-I), 4  $\mu\text{M}$  PD1 (J-L) und der entsprechenden DMSO-Konzentration von 0,4 % (D-F) inkubiert. Beide Kontrollen wiesen keinen Effekt auf die Zellen und Cld5-YFP auf (A-F). BO1 führte zu einer Reduktion der Intensität der Cld5-Fluoreszenz in der Plasmamembran (G, Pfeil), während die Färbung mit CellMask™ unverändert blieb. PD1 schien keinen Effekt auf Cld5 zu haben, aber die Färbung Cld5 negativer Plasmamembranen oder solcher mit geringen Mengen an Cld5 durch CellMask™ blieb aus. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

wurden (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich der Inhibitoren erwies sich eine Substanz, BO1 (Barriere-Öffner 1), im manuellen Versuchsansatz als wirksam. HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden für 17 h unter Kontrollbedingungen (in Medium, sowie mit 0,4 % DMSO), 4  $\mu\text{M}$  BO1 und 4  $\mu\text{M}$  PD1 (Plasmamembran-*Disrupter* 1) kultiviert. Die Zellen unter Kontrollbedingungen wiesen keine Effekte auf, sodass die DMSO-Konzentration in den Proben als unbedenklich eingestuft wurde. Zellen, welche mit BO1 inkubiert wurden, zeigten eine deutliche Reduktion von Cld5 in den Plasmamembranen, während die Färbung mit CellMask™ und die Zellmorphologie unauffällig war (Abb. 3.20 G, H). PD1 schien, obwohl im HDS als Inhibitor klassifiziert, keinen Effekt auf die Cld5-Lokalisation zu haben (Abb. 3.20 J). Nach der Inkubation der Zellen mit dieser Substanz wurden Plasmamembranen, welche keine oder nur geringe Mengen an Cld5 aufwiesen, nicht durch CellMask™ visualisiert. Somit wurden die chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften von BO1 näher analysiert.

#### 3.4.1. BO1 reduziert konzentrations- und zeitabhängig die *trans*-Interaktion von Claudin-5 in dem *tight junction*-Modell

Konzentrationsabhängige (1, 5, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{M}$ ) Effekte von BO1 (3 h und 17 h Inkubation) auf die *trans*-Interaktion von Cld5 wurden im Vergleich zu der Inkubation mit 0,05 und 0,5 % DMSO (0,1 % DMSO pro 10  $\mu\text{M}$  BO1) und Medium in HEK-293 Cld5-YFP Zellen analysiert (Abb. 3.21). Weiterhin wurden Zellen 48 h nach der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  BO1 untersucht. Hierbei zeigte sich nach 3 h Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  BO1 eine quantitativ signifikante Reduktion der Cld5-Kontaktanreicherungen (von  $100 \pm 9,5$  % auf  $29,3 \pm 7,9$  %), während geringere Konzentrationen keine signifikanten Effekte aufwiesen (Abb. 3.21 I). Wurde die Inkubationszeit auf 17 h verlängert, waren Konzentrationen  $\geq 10$   $\mu\text{M}$  BO1 (von  $100 \pm 20,8$  % auf  $27,6 \pm 8,6$  %; 50  $\mu\text{M}$  auf  $32,2 \pm 9,92$  %; 100  $\mu\text{M}$  auf  $28,8 \pm 6,21$  %) wirksam. Beim Vergleich der beiden Inkubationszeiten zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von BO1 auf die *trans*-Interaktion von Cld5. Hierbei stellt sich die Zeitabhängigkeit als Zeitfenster dar, denn 48 h nach der Zugabe von BO1 auf die HEK-293 Cld5-YFP Zellen ist die Cld5-Kontaktanreicherung reversibel (Abb. 3.21 J). Somit besitzt BO1 einen definierten Wirkungszeitraum.



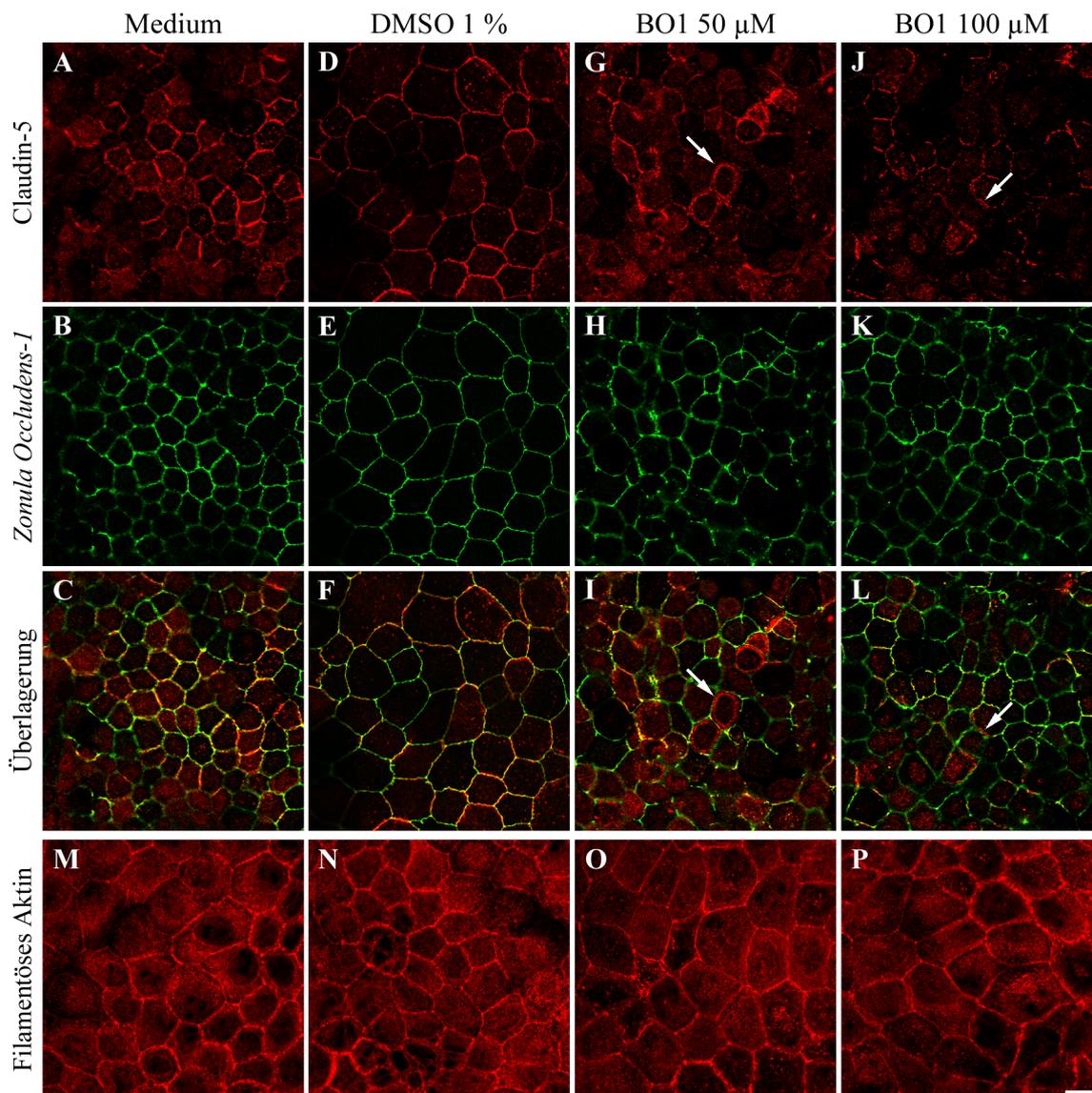
**Abb. 3.21: BO1 reduziert konzentrationsabhängig die *trans*-Interaktion von Claudin-5 in HEK-293 Claudin-5-YFP Zellen**

HEK-293 Cld5-YFP Zellen wurden für 3 h (A-D) und 17 h (E-H) mit 0,5 % DMSO (A, E), 10 (B, F), 50 (C, G) und 100 (D, H), sowie für 48 h mit 100 (J)  $\mu$ M BO1 inkubiert. (I) Die Quantifizierung von Cld5 in den Zell-Zellkontakten ergab eine Reduktion der Häufigkeit der Kontakthanreicherungen von Cld5 3 h nach der Inkubation mit 100  $\mu$ M BO1. Nach 17 h führten  $\geq 10$   $\mu$ M BO1 zu einer Reduzierung der Anzahl der Cld5-Kontakthanreicherungen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit 100  $\mu$ M BO1 war dieser Effekt reversibel. Maßbalken entspricht 20  $\mu$ m (A-H) bzw. 10  $\mu$ m (J). Daten sind mit Mittelwert $\pm$ SEM,  $n \geq 6$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$  verglichen mit der Mediumkontrolle dargestellt.

### 3.4.2. BO1 reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5 in endogen *tight junction*-enthaltenen Zellen

Um die Wirkung von BO1 auf Cld5 im endogen TJ-Kontext zu validieren, wurden MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen verwendet und in der Immunfluoreszenz analysiert. Die MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen wurden für 17 h mit 50 bzw. 100  $\mu$ M BO1 inkubiert (Abb. 3.22). Unter Kontrollbedingungen kolokalisierten Cld5 und ZO-1 in der Plasmamembran von Zell-Zellkontakten (Abb. 3.22 C). Mit steigender Konzentration an BO1 lokalisierte Cld5 zunehmend zytoplasmatisch, wobei eine Lokalisation nahe der Plasmamembran dominierte und die Immunoreaktivität und damit die Cld5-Menge abnahm (Abb. 3.22 G, J, Pfeil). Auf ZO-1 und F-Aktin hatte BO1 keinen Effekt (Abb. 3.22 H, K und O, P). 1 % DMSO zeigte keinen Unterschied gegenüber den Zellen, welche in Medium kultiviert wurden (Abb. 3.22 D-F, N).

Um zu ermitteln ob, sich endogenes Cld5 ebenfalls konzentrationsabhängig durch BO1 in den Kontakten verringert, wurden MDCK-I Zellen für 17 h mit 50 und 100  $\mu$ M BO1 inkubiert (Abb. 3.23). MDCK-I Zellen entstammen, wie die MDCK-II Zelllinien, aus

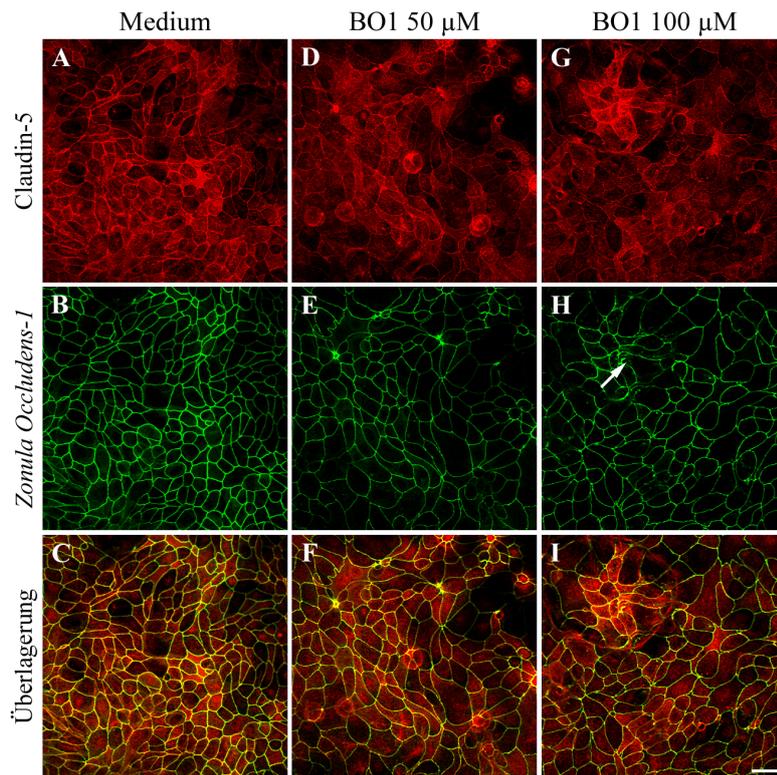


**Abb. 3.22: BO1 reduziert den Claudin-5 Gehalt in der Plasmamembran von MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen**

MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen wurden 17 h unter Kontrollbedingungen (A-C, M) bzw. mit 1 % DMSO (D-F, N), 50 (G-I, O) oder 100 (J-L, P)  $\mu\text{M}$  BO1 kultiviert, fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 (K $\alpha$ Cld5 und Cy3 $\alpha$ K), ZO-1 (M $\alpha$ ZO-1 und 488 $\alpha$ M) und mit Rhodamin-Phalloidin F-Aktin gefärbt. 50  $\mu\text{M}$  BO1 führten zu einer Umverteilung von Cld5, sodass dieses im Zytoplasma nahe der Plasmamembran (G, Pfeil) lokalisierte, welches anhand der Überlagerung mit ZO-1 (I), mit dem Cld5 nicht mehr kolokalisierte, zu erkennen ist. 100  $\mu\text{M}$  BO1 führten zu einer vergleichbaren Lokalisation von Cld5 (J, Pfeil), zudem ist die Intensität der Fluoreszenz von Cld5 reduziert. Die Inkubationen waren auf ZO-1 (B, E, H, K) und F-Aktin (M-P) wirkungslos. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

der Niere eines Cockerspaniel, sind jedoch im Vergleich zu den MDCK-II seltener passagiert, wodurch sich die Cld-Expression der beiden MDCK Zellen unterscheidet (Dukes *et al.*, 2011) und die MDCK-I Zellen eine wesentlich dichtere Zellschicht bilden (3.4.5). Die zuvor erlangten Ergebnisse konnten bestätigt werden. 50  $\mu\text{M}$  BO1 verringerten die Cld5-Kontaktanreicherung hinsichtlich ihrer Häufigkeit und Intensität im Vergleich zu den Zellen, welche in Medium kultiviert wurden (Abb. 3.23 D). Die Erhöhung der Konzentration auf 100  $\mu\text{M}$  verstärkte diesen Effekt (Abb. 3.23 G). Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  BO1 konnte zudem selten eine zytoplasmatische Lokalisation des an den C-Terminus von Cld-bindende ZO-1 an den Zell-Zellkontakten beobachtet werden (Abb.

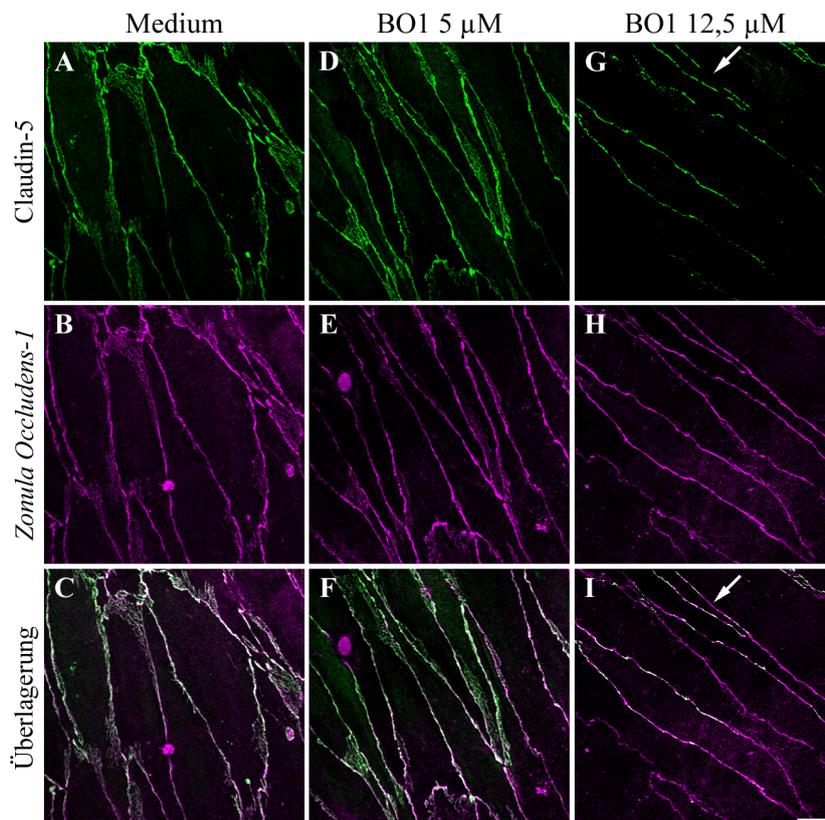
3.23 H, Pfeil).



**Abb. 3.23: BO1 reduziert den Claudin-5 Gehalt in der Plasmamembran von MDCK-I Zellen**

MDCK-I Zellen wurden 17 h unter Kontrollbedingungen (A-C) bzw. mit 50 (D-F) oder 100 (G-I)  $\mu\text{M}$  BO1 kultiviert, fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 ( $\text{K}\alpha\text{Cld5}$  und  $\text{Cy3}\alpha\text{K}$ ) und ZO-1 ( $\text{M}\alpha\text{ZO-1}$  und  $488\alpha\text{M}$ ) gefärbt. Unter Kontrollbedingungen lokalisierte Cld5 (A) in der Plasmamembran an Zell-Zellkontakten und kolokalisierte mit ZO-1 (B bzw. C). 50  $\mu\text{M}$  BO1 führten zu einer Reduktion der Intensität der Cld5-Fluoreszenz (D), während ZO-1 unverändert blieb (E). Dieser Effekt war nach der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  noch stärker ausgeprägt, ZO-1 lokalisierte teilweise zytoplasmatisch (H, Pfeil). Maßbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.3. BO1 reduziert die *trans*-Interaktion von Claudin-5 in primären Gehirnkapillar-Endothelzellen



**Abb. 3.24: BO1 führt zu einer Reduktion von Claudin-5 in der Plasmamembran von primären Gehirnkapillar-Endothelzellen**

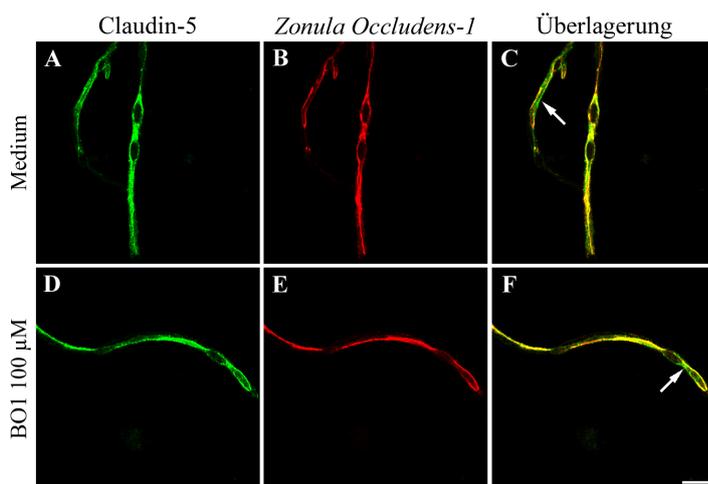
pGKEZ wurden für 17 h unter Kontrollbedingungen (A-C) bzw. mit 5 (D-F) oder 12,5 (G-I)  $\mu\text{M}$  BO1 kultiviert, fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 ( $\text{K}\alpha\text{Cld5}$  und  $488\alpha\text{K}$ ) und ZO-1 ( $\text{M}\alpha\text{ZO-1}$  und  $\text{Cy5}\alpha\text{M}$ ) gefärbt. Cld5 befand sich in der Plasmamembran (A, D, G) und kolokalisierte mit ZO-1 (B, E, H bzw. C, F, I). 12,5  $\mu\text{M}$  BO1 führten zu einer deutlichen Abschwächung und Fragmentierung der Cld5-Fluoreszenz (G, Pfeil), ohne ZO-1 zu beeinträchtigen. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Primäre Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (pGKEZ) können als Hauptbestandteil der BHS aus Gehirn-Kapillaren isoliert und kultiviert werden. Diese Zellen besitzen charakteristische Eigenschaften der BHS *in vivo*, wie z.B. die Ausbildung von endogenen TJ mit Cld5 als dessen Bestandteil (Abb. 3.24). In diesem BHS-relevanten Modell waren nach 17 h Stunden bereits  $12,5 \mu\text{M}$  BO1 wirksam (Abb. 3.24 G). Unter Kontrollbedingungen kolokalisierten endogenes Cld5 und ZO-1 in der Plasmamembran. Wiederum zeigte sich zwischen 5 und  $12,5 \mu\text{M}$  BO1 ein konzentrationsabhängiger Effekt. Während die Inkubation mit der niedrigeren Konzentration zu einer vermehrten zytoplasmatischen Lokalisation von Cld5 führte, nahm die Immunreaktivität bei  $12,5 \mu\text{M}$  BO1 ab und wies in der Überlagerung mit ZO-1 ein fragmentiertes Muster innerhalb der Plasmamembran auf (Abb. 3.24 I, Pfeil). Auf ZO-1 hatte diese Inkubation keine Auswirkung.

#### 3.4.4. BO1 Untersuchungen *in situ*

Isolierte Kapillaren sind im Vergleich zu Zellkulturen näher an der *in vivo* Situation, jedoch kann es zur Schädigung der Kapillaren während der Präparation kommen, z.B. der metabolischen Aktivität (Lasbennes und Gayet, 1984).

Die aus dem Gehirn von Mäusen präparierten Kapillaren wurden mit  $100 \mu\text{M}$  BO1 inkubiert und Cld5 sowie ZO-1 mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. 3.25). Hierbei zeigte sich eine verstärkte Immunreaktion beider Proteine, wodurch die Intensität der Fluoreszenz im Vergleich zu den Zelllinien erhöht war (Abb. 3.25 A, B). Cld5 kolokalisierte mit ZO-1, welches sich auch nach der Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  BO1 nicht veränderte. Auch die Intensitäten beider Fluoreszenzen blieb unverändert, sodass keine signifikanten Effekte detektiert werden konnten (Abb. 3.25 C, F).



**Abb. 3.25: BO1 hat keinen Effekt auf Claudin-5 und Zonula Occludens-1 von Kapillaren**

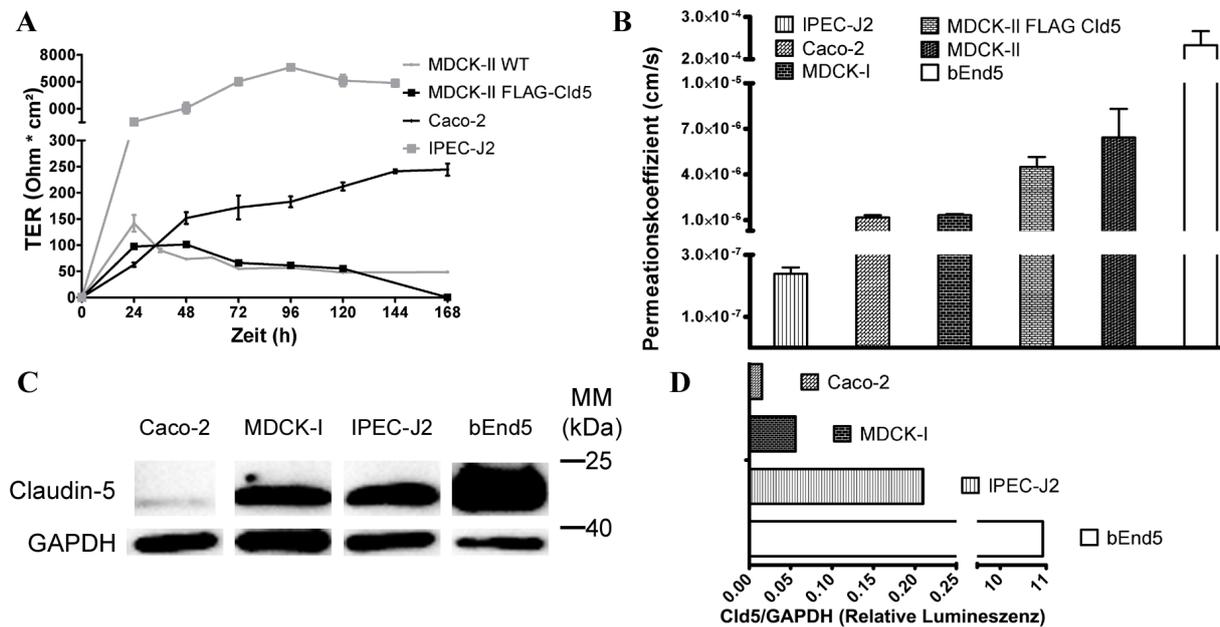
Präparierte Kapillaren wurden für 17 h in Medium (A-C) bzw.  $100 \mu\text{M}$  BO1 (D-F) inkubiert, fixiert und immunzytochemisch gegen Cld5 (A, D; K $\alpha$ Cld5 und 488 $\alpha$ K) und ZO-1 (B, E; M $\alpha$ ZO-1 und Cy3 $\alpha$ M) gefärbt. Beide Proteine wiesen nach der Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  BO1 keinen Unterschied zu den Kontrollbedingungen auf. Cld5 kolokalisierte mit ZO-1 (C, F), jedoch waren auch zytoplasmatische Bereiche positiv für Cld5 (C, F, Pfeil). Maßbalken entspricht  $10 \mu\text{m}$ .

#### 3.4.5. Charakterisierung von MDCK-I, MDCK-II, MDCK-II FLAG-Claudin-5, Caco-2, IPEC-J2 und bEnd5 Zellen

Um zu überprüfen ob mit der Reduzierung der Cld5 *trans*-Interaktion auch eine permeabilitätsteigernde Wirkung einhergeht, wurden transzellulärer elektrische Widerstands-

(TER) und Permeationsmessungen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der TER, die Dichtigkeit der Zellschicht gegenüber LY und die Cld5 Expression in MDCK-I, MDCK-II, MDCK-II FLAG-Cld5, bEnd5, Caco-2 und IPEC-J2 Zellen (beschrieben unter 3.4.6) bestimmt.

In Abbildung 3.26 sind die Charakterisierungen zusammengefasst. Anhand der untersuchten physiologischen Parameter von TER und Permeabilität lassen sich die Zelllinien in drei Gruppen einteilen (Abb. 3.26 A, B). MDCK-II und MDCK-II FLAG-Cld5 stellen mit einem TER-Plateauwert von 80 bzw. 100  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  die Gruppe des niedrigsten, Caco-2 Zellen mit 240  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  die des mittleren und IPEC-J2 mit 5.000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  die des höchsten TER dar. Der von den bEnd5 Zellen war unwesentlich höher als die Leerfilterkontrolle. Der Permeationskoeffizient der Zellen gegenüber LY ist umgekehrt proportional zu deren TER-Wert, mit IPEC-J2  $2,38 \cdot 10^{-7}$ , Caco-2  $1,17 \cdot 10^{-6}$ , MDCK-I  $1,32 \cdot 10^{-6}$ , MDCK-II FLAG-Cld5  $4,50 \cdot 10^{-6}$ , MDCK-II  $6,43 \cdot 10^{-6}$  und bEnd5  $2,23 \cdot 10^{-4}$  cm/s (Abb. 3.26 B). Da die Expression von Cld5 in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung ist, wurde diese anhand eines Westernblots analysiert. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression von Cld5 mit relativen Lumineszenzwerten (Cld5 normiert auf GAPDH) von Caco-2 mit 0,01, MDCK-I mit 0,05, IPEC-J2 mit 0,2 und bEnd5 mit 10 (Abb. 3.26 C, D).



**Abb. 3.26: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien wurden anhand ihres TERs in drei Klassen eingeteilt. MDCK-II und MDCK-II FLAG-Cld5 besitzen einen TER-Wert von 80 bzw. 100, Caco-2 von 240 und IPEC-J2 von 5.000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (A). Entsprechend verhält sich der Permeationskoeffizient gegenüber LY umgekehrt proportional (B). (C, D) Die Expression von Cld5 variiert in den Zellen mit Caco-2 < MDCK-I < IPEC-J2 < bEnd5.

### 3.4.6. Funktionale Untersuchungen zum BO1-Effekt

Um die Variabilität in den Messungen durch Einfluss eines steigenden oder fallenden TER der Zellen per se zu reduzieren, wurden die Zellen nach Erreichen ihres jeweiligen Plateauwertes mit BO1 bzw. den Kontrollen für 17 h behandelt. Der Einfluss auf den TER derart

behandelter MDCK-II FLAG-Cld5 ist in Abbildung 3.27 A dargestellt. Hierbei war eine konzentrationsabhängige Reduktion des TER-Werts, welche mit Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und höher signifikant war, zu beobachten. Demnach wurde der TER-Wert der Zellen durch 50  $\mu\text{M}$  auf  $73,0 \pm 5,0$  % und mit 100  $\mu\text{M}$  BO1 auf  $58,9 \pm 7,2$  % im Vergleich zu ihren Ausgangswerten und der hinsichtlich der Entwicklung des TERs unbeeinflussten Medium-Kontrolle ( $106,3 \pm 6,0$  %) und 1 % DMSO-Kontrolle ( $105,6 \pm 4,7$  %) gesenkt. Die im Anschluss durchgeführten Permeationsmessungen bestätigten die zuvor erhaltenen Daten (Abb. 3.27 B). Wiederum hatte 1 % DMSO keine Auswirkung auf die Dichtigkeit der Zellen ( $100,4 \pm 7,1$  %), während BO1 den Durchtritt von LY durch die Zellschicht in einer konzentrationsabhängigen Weise signifikant erhöhte. So steigerten 10  $\mu\text{M}$  BO1 die Durchlässigkeit auf  $130,1 \pm 7,2$  %, 50  $\mu\text{M}$  auf  $227,5 \pm 17,5$  % und 100  $\mu\text{M}$  auf  $316,8 \pm 31,8$  %. Um zu überprüfen, ob diese mehr als dreifach erhöhte Permeabilität auf die Expression von Cld5 in den stabil transfizierten MDCK-II Zellen zurückzuführen ist, wurden Vergleichsexperimente mit MDCK-II Zellen, welche Cld5 nicht exprimieren, durchgeführt

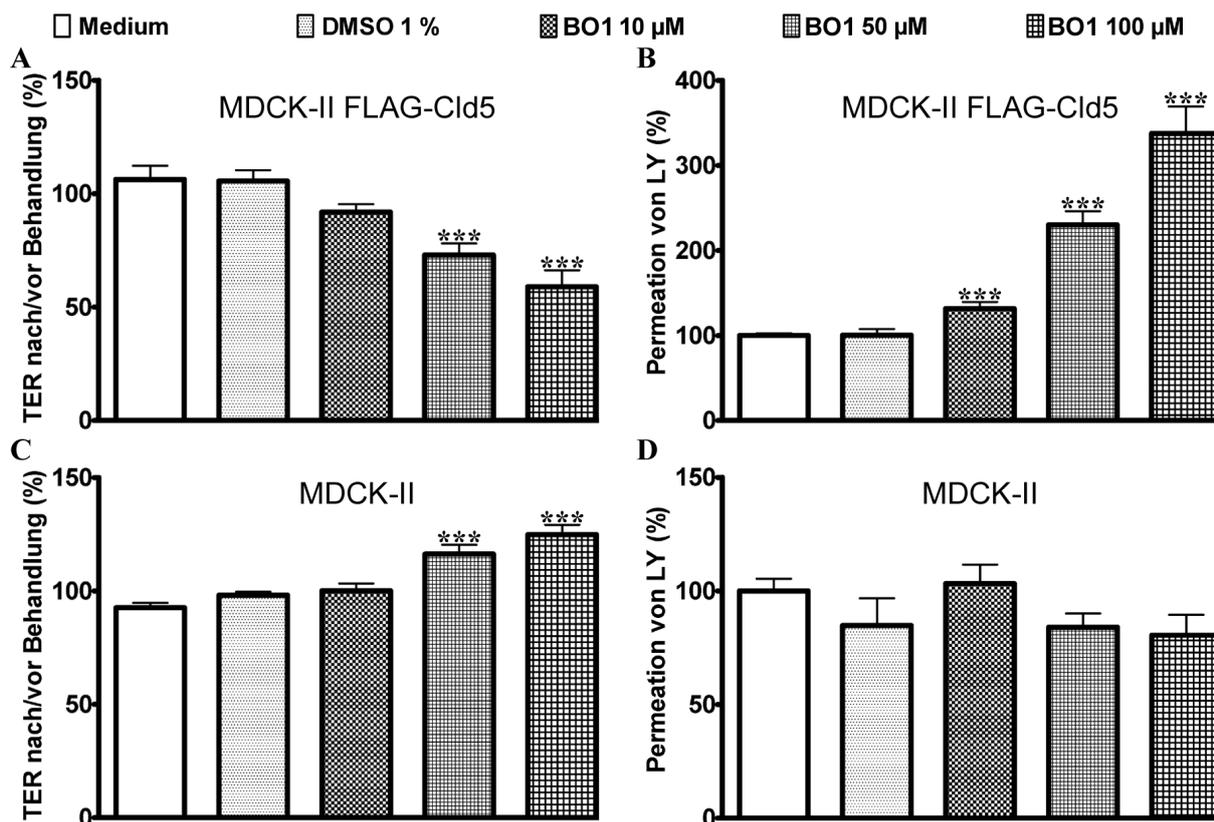


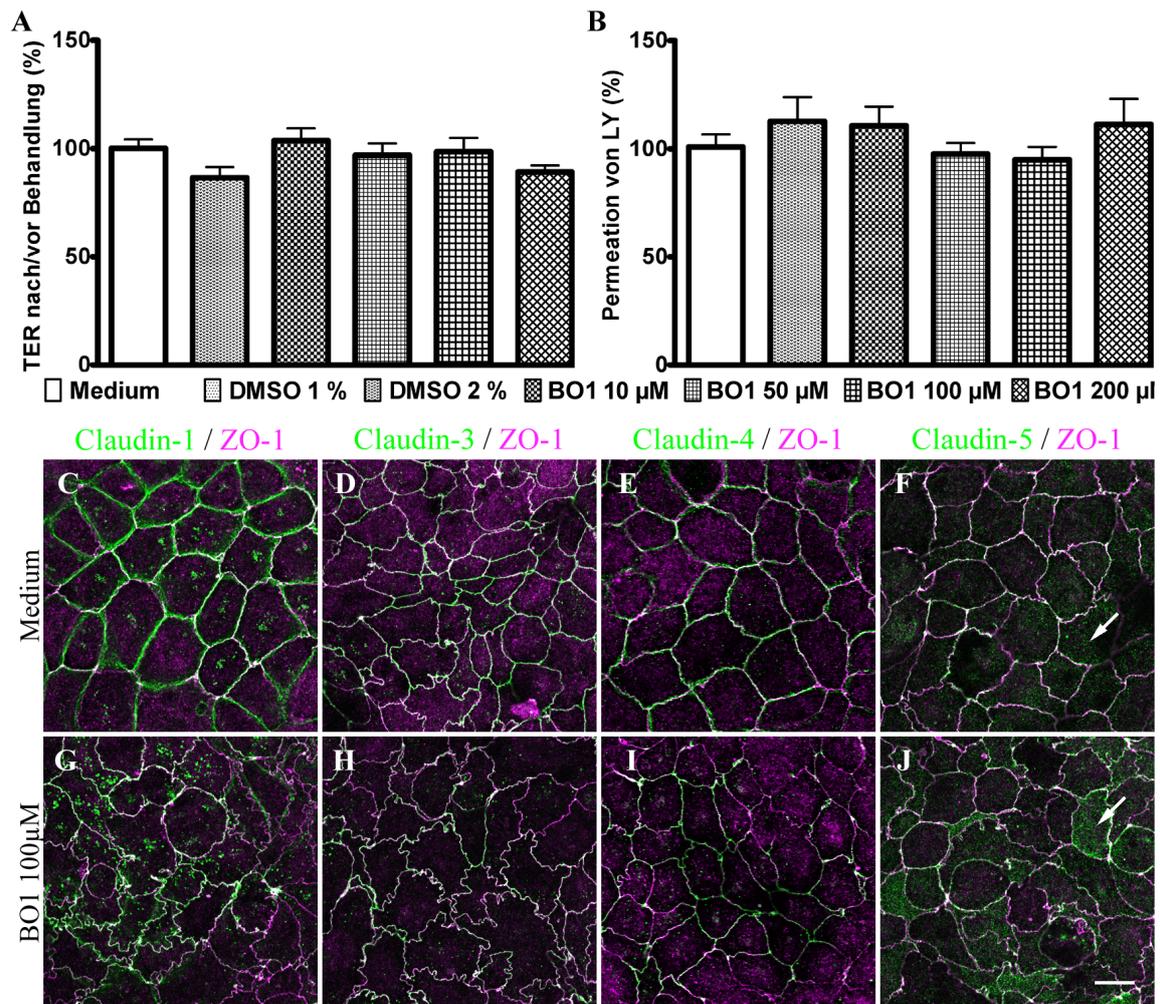
Abb. 3.27: BO1 reduziert den elektrischen Widerstand und erhöht die Permeabilität von *Lucifer Yellow* durch MDCK-II FLAG-Claudin-5 aber nicht in MDCK-II Zellen

Nach Erreichen des TER-Plateauwertes von MDCK-II FLAG-Cld5 und MDCK-II Zellen wurden die Zellen für 17 h mit Medium, 1 % DMSO, 10, 50 oder 100  $\mu\text{M}$  BO1 inkubiert. Der Quotient von nach zu vor Behandlung wurde bestimmt (A, C) und anschließend die Permeabilität der Zellen gegenüber LY analysiert (B, D). 50 und 100  $\mu\text{M}$  BO1 führten zu einem signifikanten Abfall des TERs im Vergleich zu der Medium- und DMSO-Kontrolle in MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen (A). Die sukzessive Erhöhung der BO1 Konzentration erhöhte die Permeabilität von LY in MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen (B). In MDCK-II Zellen bewirkt BO1 keine Reduktion des TERs, vielmehr steigt dieser mit zunehmender Konzentration an (C). Die Permeabilität von LY in MDCK-II wird durch BO1 nicht erhöht (D). Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n \geq 5$ , zweiseitiger t-Test, \*\*\*,  $p < 0,001$ , verglichen mit der Mediumbehandlung dargestellt.

(Abb. 3.27 C). Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen, wurde eine signifikante Erhöhung des TER-Werts auf  $125,0 \pm 4,34$  % ( $100 \mu\text{M}$ ) beobachtet, während die beiden Kontrollen keine Modulation der Zellbarriere aufwiesen (Medium  $92,6 \pm 2,1$  %,  $1$  % DMSO  $98,1 \pm 1,5$  %). Die Untersuchung der Permeabilität der behandelten Zellen zeigten keine Effekte (Abb. 3.27 D). Hierbei führten selbst  $100 \mu\text{M}$  zu keiner Veränderung ( $80,5 \pm 9,0$  %). Zudem war weder der Unterschied in der Permeabilität der Kontrollen untereinander (Medium  $100 \pm 5,3$  %;  $1$  % DMSO  $84,7 \pm 12$  %) noch der Unterschied von  $1$  % DMSO zu  $50 \mu\text{M}$  ( $84,1 \pm 5,9$  %) signifikant. Somit führt BO1 zu einem verringerten TER und erhöht die Permeabilität eines  $457$  Da kleinen Moleküls in einer Cld5- und konzentrationsabhängigen Weise.

Caco-2 sind Epithelzellen, die aus einem Dickdarmtumors eines Menschen explantiert wurden. Diese Zelllinie polarisiert in Kultur und bildet einen morphologisch und funktional vergleichbaren Phänotyp von Enterozyten (Saumzellen) aus. Sie etablieren TJ, wobei die Expression von Cld1, 2, 3, 4 und 8 beschrieben ist, die von Cld5 aber in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Amasheh *et al.*, 2005; Al-Sadi *et al.*, 2014). Im Westernblot (Abb. 3.26 C, D) konnte, wenn überhaupt vorhanden, lediglich eine geringe Expression von Cld5 in den Caco-2 Zellen nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Tendenz wurde mittels qRT-PCR, in der IPEC-J2 Zellen als Kontrolle mitgeführt wurden, bestätigt (Daten nicht gezeigt).

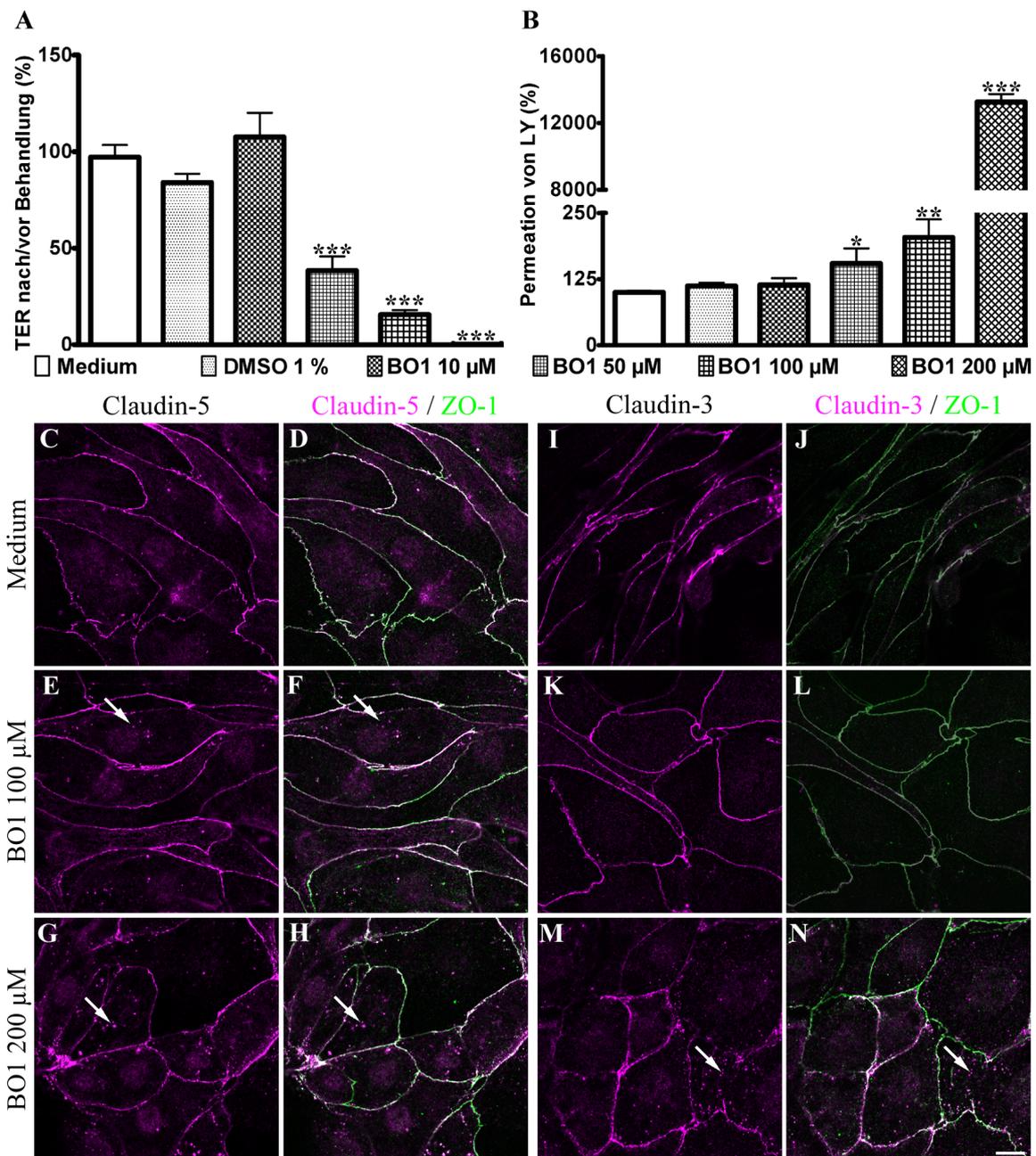
Da diesen Zellen einen vergleichsweise moderaten TER und Permeationskoeffizienten gegenüber LY ausbilden (Abb. 3.26 A, B) und die Permeabilität durch diese Zellschicht in der pharmazeutischen Industrie als *in vitro* Modell verwendet wird, um die *in vivo* Absorption von oral verabreichten Pharmaka vorherzusagen (Artursson und Karlsson, 1991), wurden Caco-2 Zellen bis zum Erreichen ihres TER-Plateauwerts auf Filtern kultiviert und für  $17$  h mit  $10$ ,  $50$ ,  $100$  oder  $200 \mu\text{M}$  BO1 inkubiert. BO1 hatte keinen Effekt auf den TER von Caco-2 Zellen (Abb. 3.28 A). Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Permeabilität von LY auf die behandelten Zellen bestätigten diese Ergebnisse. Auch hier wurde kein Effekt der Substanz auf die Dichtigkeit der Zellen gemessen (Abb. 3.28 B). Nach diesen Untersuchungen wurden die Zellen auf den Filtern fixiert und die Lokalisation von Cld1-5 und ZO-1 analysiert. Die behandelten Caco-2 Zellen bzw. deren Cld zeigten keine signifikanten Veränderungen. So wiesen die mit  $100 \mu\text{M}$  BO1 inkubierten Zellen eine hohe zytoplasmatische Färbung von Cld1 auf, dieses war jedoch auch unter Kontrollbedingungen der Fall (Abb. 3.28 G, C). Ähnliches wurde für Cld2 (nicht gezeigt) und Cld5 gefunden (Abb. 3.28 F, J). Die Intensität von Cld5 war im Vergleich zu den anderen Cld unter Kontrollbedingungen deutlich reduziert und im zytoplasmatischen Bereich stark diffus (Abb. 3.28 F, Pfeil), sodass eine spezifische Bindung des Antikörpers nicht zweifelsfrei angenommen werden konnte. Dieses und die Ergebnisse aus der Westernblot-Analyse von Cld5 (Abb. 3.26 C, D), lassen dessen Expression in Caco-2 Zellen fraglich erscheinen. Zusammengefasst konnte in den Caco-2 Zellen kein signifikanter Unterschied der Cld1-5 und ZO-1 nach der Behandlung mit  $100 \mu\text{M}$  BO1 gefunden werden.



**Abb. 3.28: Charakterisierung des BO1 Effektes in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden bis zum Erreichen ihres TER-Plateauwerts kultiviert und anschließend für 17 h mit Medium, 1 bzw. 2 % DMSO, 10, 50, 100 oder 200  $\mu$ M BO1 inkubiert. Der Quotient von nach zu vor Behandlung wurde bestimmt (A) und anschließend die Permeabilität der Zellen gegenüber LY analysiert (B). BO1 führte in den Caco-2 Zellen zu keinen Veränderungen im TER oder der Permeabilität gegenüber LY. Anschließend wurden die Zellen der Mediumbehandlung (C-F) und die der 100  $\mu$ M BO1-Inkubation (G-J) auf den Filtern fixiert und mit Antikörpern (K $\alpha$ Cld1, K $\alpha$ Cld3, K $\alpha$ Cld4, K $\alpha$ Cld5 und 488 $\alpha$ K, grün) inkubiert. Um die Nähe zur Plasmamembran darzustellen wurde ZO-1 (M $\alpha$ ZO-1 und Cy5 $\alpha$ M, violett) visualisiert, mit dem alle untersuchten Cld kolokalisierten. Zusätzlich wiesen Cld1 und Cld5 eine zytosolische Lokalisation auf. Cld5 besaß die geringste Intensität im Vergleich mit den anderen Cld. 100  $\mu$ M BO1 führten nicht zu einer Reduktion der Proteine in der Plasmamembran. Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m. Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  SEM, n $\geq$ 4, zweiseitiger t-Test, \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05 verglichen mit der Mediumbehandlung dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden daher die hochohmigen, Cld5-exprimierenden IPEC-J2 Zellen in gleicher Weise untersucht. Diese Zelllinie entstammt dem Jejunum eines neonatalen Schweins und ist wenig beschrieben, weshalb die Expression von TJ-relevanten Proteinen in den IPEC-J2 zunächst verifiziert wurde. In diesen Zusammenhang konnte die Expression von Cld1, Cld3, Cld4, Cld5, Cld6, ZO-1, Occludin und Trizellulin, aber nicht von Cld2 und Cld12 in der Immunfluoreszenz bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Expression von Cld5 sowie einem hohen TER und geringen Permeationskoeffizienten gegenüber LY aus (Abb. 3.26). Für die Analyse des Effektes von BO1 auf die IPEC-J2 Zellen wurde wiederum die Auswirkung auf den TER

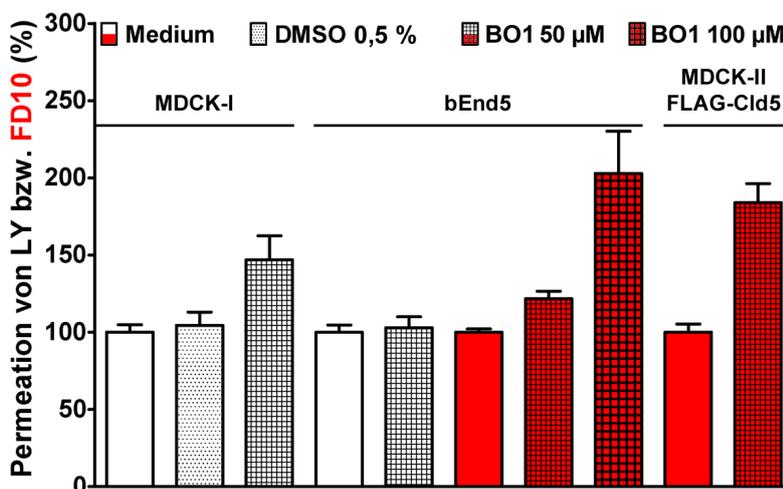


**Abb. 3.29: BO1 erhöht die Permeabilität von IPEC-J2 Zellen und führt zu einer Internalisierung von Claudin-5**

IPEC-J2 Zellen wurden bis zum Erreichen ihres TER-Plateauwertes kultiviert und anschließend für 17 h mit Medium, 1 bzw. 2 % DMSO, 10, 50, 100 oder 200  $\mu$ M BO1 inkubiert. Der Quotient von nach zu vor Behandlung wurde bestimmt (A). Anschließend wurde die Permeabilität der Zellen gegenüber LY analysiert (B). Der TER von IPEC-J2 Zellen reduzierte sich durch 50  $\mu$ M BO1 und fiel mit steigender Konzentration weiter ab. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam die Untersuchung der Permeabilität gegenüber LY. Hierbei stieg diese ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M und erhöhte sich weiter mit zunehmender BO1-Konzentration. Anschließend wurde die Zellen der Mediumbehandlung (C, D, I, J), die der 100 (E, F, K, L) und 200  $\mu$ M (G, H, M, N) BO1 Inkubation auf den Filtern fixiert und mit Antikörpern ( $\alpha$ Cld3,  $\alpha$ Cld5 und Cy5 $\alpha$ K, violett) inkubiert. Um die Nähe zur Plasmamembran darzustellen wurde ZO-1 ( $\alpha$ ZO-1 und 488 $\alpha$ M, grün) visualisiert, mit dem alle untersuchten Cld unter Kontrollbedingung kolokalisierten (D bzw. J). Die sukzessive Erhöhung von BO1 führte zunehmend zu Cld5-positiven und ZO-1-negativen Vesikeln im Zytoplasma (E-H, Pfeil). Während 100  $\mu$ M BO1 keinen Effekt auf Cld3 hatte (K, L), führten 200  $\mu$ M zur Internalisierung (M, N). Auf ZO-1 hatte BO1 keinen Effekt. Maßbalken entspricht 10  $\mu$ m. Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n \geq 4$ , zweiseitiger t-Test, \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$  verglichen mit der Mediumbehandlung dargestellt.

untersucht (Abb. 3.29 A). Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion auf  $38,4 \pm 7,3$  % ( $50 \mu\text{M}$ ) bzw. auf  $25,6 \pm 2,3$  % ( $100 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu der Mediumbehandlung.  $200 \mu\text{M}$  BO1 führten zu einer Reduktion auf  $0,3 \pm 0,05$  % im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Behandlung, während  $10 \mu\text{M}$  ( $108 \pm 12,5$  %) wirkungslos waren.  $1$  % DMSO ( $84 \pm 4,5$  %) hatte keine Auswirkungen auf den TER.  $50$  ( $154 \pm 28,5$  %),  $100$  ( $204 \pm 34,2$  %) und  $200 \mu\text{M}$  ( $13.300 \pm 475$  %) BO1 erhöhten die Permeabilität von LY, während die Kontrollen ( $1$  % DMSO  $112 \pm 6,1$  %), sowie  $10 \mu\text{M}$  BO1 ( $114 \pm 12,6$  %) ohne Wirkung blieben (Abb. 3.29 B). Im Anschluss an diese Experimente wurde die Zellen auf den Filtern fixiert und die Lokalisation von Cld3 und 5 untersucht. Unter Kontrollbedingungen kolokalisierten endogenes Cld5 und ZO-1 in der Plasmamembran von Zell-Zellkontakten (Abb. 3.29 C).  $100 \mu\text{M}$  BO1 führten zu Cld5-positiven und ZO-1-negativen Vesikeln im Zytoplasma (Abb. 3.29 F, Pfeil). Die Vesikelbildung nahm mit erhöhter Konzentration von BO1 zu und erreichte ein Maximum bei  $200 \mu\text{M}$  BO1 (Abb. 3.29 H, Pfeil). Zudem nahm die Intensität von Cld5 in der Plasmamembran ab. Auf Cld3 hatten  $100 \mu\text{M}$  BO1 keinen Effekt,  $200 \mu\text{M}$  führten auch hier zu der Bildung von Vesikeln (Abb. 3.29 K, M, Pfeil). Die Inkubation der Zellen mit bis zu  $2$  % DMSO zeigte keine Toxizität. Somit besitzt BO1 eine Wirkung auf die Permeabilität und der Lokalisation von Cld5 in Cld5 stark exprimierenden Zellen.

Weitere Permeationsmessungen wurden mit MDCK-I, bEnd5 und MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen durchgeführt (Abb. 3.30).  $50 \mu\text{M}$  BO1 erhöhten die Permeabilität von LY in MDCK-I Zellen auf  $147 \pm 15,7$  %. Da die Anzahl der Experimente jedoch für eine statistische Auswertung zu gering ist, gibt dieses Ergebnis lediglich eine Tendenz an. Die Permeation der bEnd5 Zellen wurde durch  $50 \mu\text{M}$  BO1 nicht verändert ( $103 \pm 7,1$  %). Weiterhin wurde ein  $10$  kDa Marker (FD10) verwendet. In bEnd5 Zellen erhöhten  $50$  ( $122 \pm 4,8$  %) und  $100$  ( $203 \pm 27,2$  %)  $\mu\text{M}$  BO1 die Permeation von FD10. In MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen erhöhte sich diese auf  $183$  % ( $50 \mu\text{M}$  BO1). Wiederum war die Anzahl der Experimente zu gering um eine statistische Auswertung vorzunehmen.

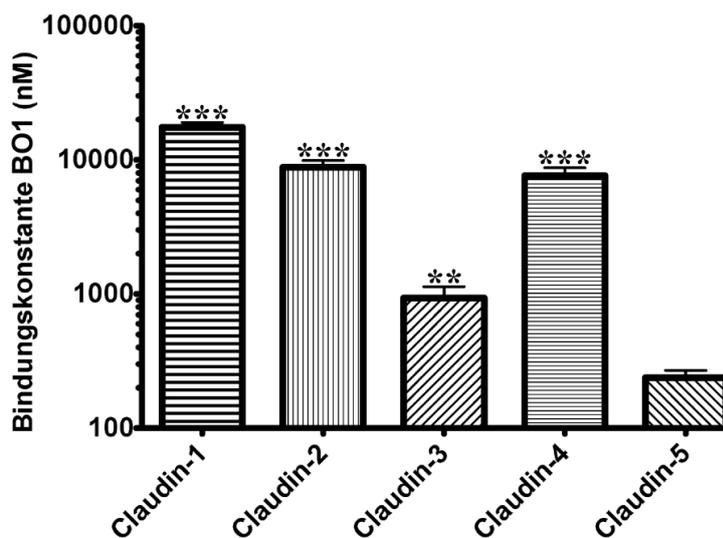


**Abb. 3.30: Effekt von BO1 auf weitere Zelllinien**

Der Effekt von BO1 auf die Permeabilität von LY und FD10 (rot) wurde in MDCK-I, bEnd5 und MDCK-II FLAG-Cld5 untersucht. Die geringe Anzahl der Experimente lässt keine gesicherte Aussage zu, tendenziell erhöht sich die Permeabilität von LY in MDCK-I Zellen durch BO1 und auch die von FD10 in bEnd5 und MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen. Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n \geq 2$  dargestellt.

### 3.4.7. BO1 bindet spezifisch an Claudin-5

Um eine Aussage über die Spezifität und Affinität von BO1 treffen zu können, wurde dessen Bindung zu Cld1-5 mittels der *microscale thermophoresis* gemessen (Abb. 3.31). Von den untersuchten Cld wies BO1 die signifikant höchste Bindungskonstante zu Cld5 auf ( $238 \pm 31,7$  nM). Eine ebenfalls starke Bindung konnte zu Cld3, dennoch signifikant schwächer als zu Cld5, festgestellt werden ( $935 \pm 200$  nM). Mit einer Bindungskonstante von mehr als 7.500 nM wiesen Cld4 ( $7.630 \pm 1.120$  nM), Cld2 ( $8.800 \pm 1.100$  nM) und Cld1 ( $17.500 \pm 1.560$  nM) eine wesentlich geringere Affinität auf.

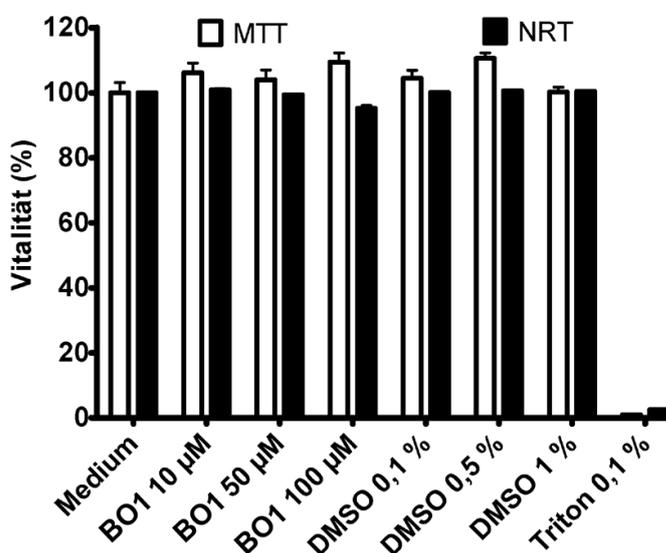


**Abb. 3.31: Spezifische Bindung von BO1 an Claudin-5**

Mit Hilfe der *microscale thermophoresis* wurden die Bindungskonstanten von BO1 zu den Cld1-5 bestimmt. BO1 besaß die signifikant höchste Bindung zu Cld5 (238 nM). Während auch eine hohe Bindung zu Cld3 (935 nM) gemessen werden konnte, war diese für Cld1, 2 und 4 signifikant schwächer. Daten sind mit Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n \geq 6$ , zweiseitiger t-Test \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; verglichen mit der Cld5-Bindungskonstante.

### 3.4.8. BO1 besitzt in den wirksamen Konzentrationen keine Zytotoxizität

Um zu untersuchen, ob BO1 oder DMSO eine Auswirkung auf die Zellvitalität hat, wurde sowohl der Neutralrot- (NRT) als auch MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) durchgeführt (Abb. 3.32). Exemplarisch ist dies an MDCK II FLAG-Cld5 Zellen dargestellt. Die Graphik zeigt, dass die Inkubation mit verschiedenen



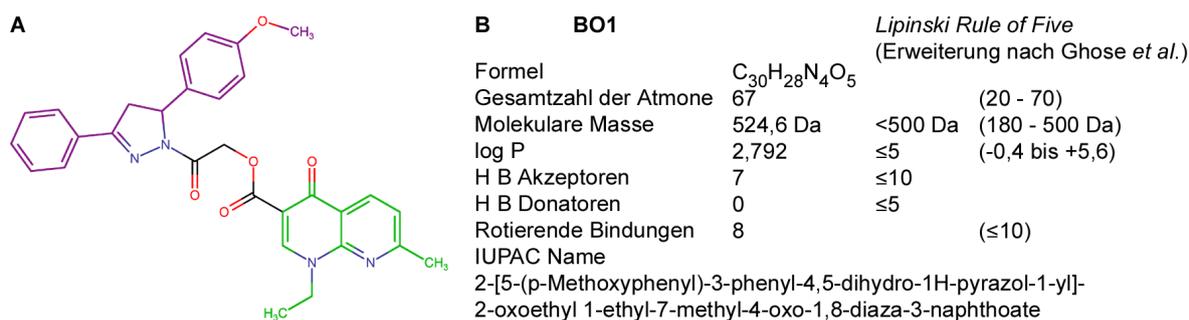
**Abb. 3.32: BO1 hat keine zytotoxischen Auswirkung**

MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen wurden für 17 h mit den entsprechenden BO1-Konzentrationen inkubiert und die Vitalität durch den NRT bzw. MTT Test validiert. Unbehandelte Zellen, DMSO-Kontrollen sowie eine Triton X-100 Kontrolle wurden mitgeführt. BO1 bis 100 µM und DMSO bis 1 % zeigen im NRT- als auch im MTT-Test keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Eine Ausnahme stellt 0,1 % Triton X-100 dar.

DMSO und BO1 Konzentrationen keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen in beiden Methoden hatte. Lediglich 0,1 % Triton X-100, welche als zytotoxische Kontrolle mitgeführt worden ist, führte zu einer verringerten Vitalität.

### 3.4.9. Struktur und chemisch-physikalische Eigenschaften von BO1

BO1 besteht aus mehreren Heterozyklen, die über eine Esterbindung verknüpft sind. Ein Bereich des Moleküls besteht aus zwei Phenylresten, die an ein Pyrazolgerüst angeknüpft sind (Abb. 3.33 A, violett). Dieses Pyrazolsystem ist über eine Esterbindung an ein Bi-zyklus, bestehend aus einem Pyridinon und Pyridin, verbunden (Abb. 3.33 A, grün). Die Daten zu den vorhergesagten Eigenschaften von BO1 wurden von <https://www.enaminestore.com/catalog> bezogen. Diese wurden aufgrund der potentiellen Verwendung als Pharmakon mit den Vorgaben für eine orale Bioverfügbarkeit nach Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), sowie dessen Erweiterung nach Ghose (Ghose *et al.*, 1999), gegenübergestellt, welche BO1 fast alle erfüllt (Abb. 3.33 B). So ist der log P-Wert (Oktanoll-Wasser-Verteilungskoeffizient, beschreibt das Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie) mit 2,792 (Lipinski:  $\leq 5$ , Ghose: -0,4 bis +5,6), die Anzahl der Atome mit 67 (Ghose: 20-70), die der Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen mit 7 (Lipinski:  $\leq 10$ ), die der Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen mit 0 (Lipinski:  $\leq 5$ ) und die der rotierende Bindungen mit 8 (Ghose:  $\leq 10$ ) im Bereich der Empfehlung. Lediglich die molekulare Masse ist mit 524,6 Da geringfügig höher als die Vorgabe (Lipinski:  $\leq 500$  Da, Ghose: 180-500 Da). Die Korrekte Masse von 524,6 Da wurde in jeder Produktserie mittels Massenspektrometrie bestimmt. Weiterhin wurde vom Lieferanten eine Reinheit  $\geq 95$  % gewährleistet.

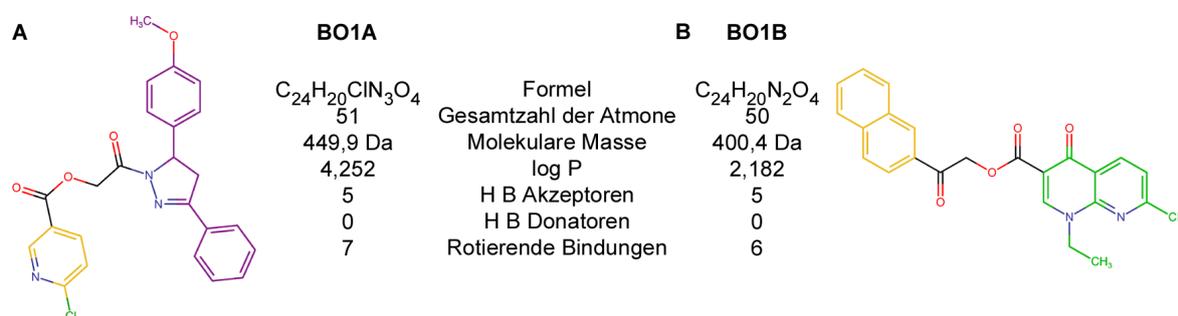


**Abb. 3.33: Struktur, Formel und weitere chemisch-physikalische Eigenschaften von BO1**

BO1 besteht aus zwei Ringsystemen, welche in der Mitte durch eine Esterbindung verknüpft werden (A). Die Summenformel sowie chemisch-physikalische Eigenschaften und deren Bedeutung für eine orale Bioverfügbarkeit nach Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001) und Ghose (Ghose *et al.*, 1999) sind in (B) dargestellt. Demnach erfüllt BO1 fast alle Vorgabe. So ist die Anzahl der Atome ( $\leq 70$ ), der log P-Wert ( $\leq 5$ ), Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen ( $\leq 10$ ), Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen ( $\leq 5$ ) und rotierende Bindungen ( $\leq 10$ ) im Rahmen der Vorgaben. Lediglich die molekulare Masse ist mit 524,6 Da geringfügig höher als die Empfehlung ( $\leq 500$  Da). Herkunft der Daten für BO1: <https://www.enaminestore.com/catalog>.

### 3.4.10. Derivatisierung von BO1

Nach der Auffindung einer wirksamen Substanz sollte die aktive Region bestimmt und auf die wesentliche Struktur reduziert werden. Hierzu wurden zwei Derivate so ausgewählt, dass je ein identischer Bereich sowie die Esterbindung beibehalten wurde (Abb. 3.34). Baustein für das erste Derivat (BO1A) war der Phenylring, Pyrazol und Methoxyphenol (Abb. 3.34 A, violett) von BO1, welches über das Oxoethylester an ein Chlorpyridin (orange) gebunden war. Der log P-Wert ist mit 4,252 leicht erhöht (im Vergleich zu BO1), erfüllt aber die Vorgaben nach Lipinski und Ghose (Lipinski *et al.*, 2001; Ghose *et al.*, 1999), wie auch die anderen Eigenschaften. Die Anzahl der Atome wurde auf 51 reduziert, wodurch die molare Masse 449,9 Da betrug, die Anzahl der Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen wurde auf 5 gesenkt, die der Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen verblieb bei 0 und die der rotierende Bindungen wurde auf 7 vermindert. Das zweite Derivat orientierte sich an dem Molekülbereich bestehend aus dem Pyridinon und Pyridingerüst (Abb. 3.34 B, grün), welches über die Esterbindung an ein Naphthalin (orange) geknüpft war. Auch dieses Derivat erfüllte die Vorgaben nach Lipinski und Ghose (Lipinski *et al.*, 2001; Ghose *et al.*, 1999), mit 50 Atomen, einer molekularen Masse von 400,4 Da, 5 Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen, 0 Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen und 6 rotierende Bindungen.



**Abb. 3.34: Struktur, Formel und weitere chemisch-physikalische Eigenschaften der Derivate von BO1**

(A) Bei dem ersten Derivat (BO1A) wurde der Phenylring, Pyrazol und Methoxyphenol beibehalten (violett), welches über eine Esterbindung an ein Chlorpyridin (orange) gebunden ist. Die Anzahl der Atome wurde reduziert, wodurch auch die molare Masse unter 500 Da liegt. Im Vergleich zu BO1, befindet sich der log P-Wert höher (4,252) während die anderen Eigenschaften ähnlich blieben. (B) Bei dem zweiten Derivat (BO1B) wurde das Pyridinon und Pyridingerüst (grün) beibehalten, welches über eine Esterbindung an ein Naphthalin (orange) geknüpft ist. Die molare Masse wurde auf 400 Da reduziert, während die Eigenschaften mit denen von BO1 vergleichbar blieben. Herkunft der Daten: <https://www.enaminestore.com/catalog>.

### 3.4.11. Erste Untersuchungen der BO1 Derivate

Aufgrund der limitierten Anzahl an Experimenten wird auf die graphische Darstellung und die statistische Auswertung verzichtet. Vorläufige Ergebnisse deuten auf eine reduzierte Dichtheit von MDCK-II FLAG-Cld5 nach der Behandlung mit den BO1 Derivaten. So wurde die Permeabilität von LY durch 100  $\mu$ M BO1A auf  $380 \pm 37,2$  % erhöht. Mit 100  $\mu$ M BO1B stieg diese auf  $215 \pm 41,6$  %. Die gemessenen TER-Werte konnten dies nur teilweise

bestätigen. Die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  BO1A veränderte den TER nicht ( $101 \pm 17,2$  %), 100  $\mu\text{M}$  BO1B senkte ihn auf  $70 \pm 6,0$  %. In IPEC-J2 Zellen konnte diese Tendenz nicht bestätigt werden. Die Permeationmessungen ergaben kaum eine Wirkung. So belief sich der prozentuale Anteil von LY nach der 100  $\mu\text{M}$  BO1A-Behandlung auf  $87 \pm 8,0$  %, bei 100  $\mu\text{M}$  BO1B auf  $115 \pm 13,4$  %. Der TER betrug nach der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  BO1A  $90 \pm 6,5$  %, nach 100  $\mu\text{M}$  BO1B  $78 \pm 17,4$  %. Abschließend wurden noch zu verifizierende Bindungskonstanten zu Cld5 von  $1.246 \pm 319$  nM (BO1A) bzw.  $1.050 \pm 257$  nM (BO1B) gemessen.

## 4. Diskussion

Die BHS ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS, die das Gehirn vor im Blut zirkulierenden toxischen Stoffen schützt. Diese Schutzfunktion verhindert jedoch auch die medikamentöse Behandlung einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen, da die meisten Wirkstoffe diese nicht passieren können. So wird klinisch eine intrathekale Applikation von Medikamenten vorgenommen, welches ein hohes Infektionsrisiko birgt und zudem einen kleinen Wirkungsbereich, aufgrund der begrenzten Diffusion des Wirkstoffs, aufweist. Des Weiteren wird in Ausnahmefällen hyperosmolares Mannitol verwendet, wodurch die BHS komplett geöffnet wird und somit seine Schutzfunktion verliert. Weitere Versuche die BHS zu öffnen erreichten keine klinisch Relevanz. Neuere Ansätze diese Barriere zu modifizieren, basieren häufig auf dessen molekularen Aufbau. So wird die BHS hauptsächlich von Endothelzellen mit ihren TJ gebildet. Das funktionale Rückgrat der TJ sind die Cld, welche die parazelluläre Diffusion regulieren. Hierbei ist Cld5 das weitaus dominanteste Cld, welche die BHS für Moleküle  $<800$  Da abdichtet (Morita *et al.*, 1999c; Nitta *et al.*, 2003). Die Reduktion der Cld5-Expression führte in Mäusen zu einer größenselektiven Öffnung der BHS (Campbell *et al.*, 2012). Somit ist das Einschleusen von Wirkstoffen in das ZNS über die Modulation von Cld5 möglich. Da Cld5 über interzelluläre Interaktionen den parazellulären Raum verschließt, sollte die transiente Inhibition dieser Interaktionen die BHS wesentlich spezifischer öffnen, als die derzeit klinisch verwendeten Ansätze. Aufgrund der größen-spezifischen Öffnung bliebe die Schutzfunktion partiell erhalten.

### 4.1. TJ-Modelle zur Untersuchung der Claudin-5-Modulation

Für die Identifizierung direkter Modulatoren von Cld5 und dessen *trans*-Interaktion wurde ein Zellmodell benötigt, in dem Cld5 isoliert von heterophilen Interaktionen TJ-Strukturen bildet. Die endogenen TJ von Epithel- und Endothelzellen bestehen aus verschiedenen Cld, welche homo- und heterophil interagieren sowie mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Hierbei sind durch Modulatoren ausgelöste Effekte nicht einem bestimmten Cld zu zuordnen, da dieses auch sekundäre vermittelt sein könnten. In epithelialen HEK-293 Zellen finden sich keine TJ-Stränge und die Cld1-6 werden nicht exprimiert (Winkler, 2007; Turksen und Troy, 2001). Jedoch konnte für diese Zelllinie gezeigt werden, dass die alleinige Expression von Cld ausreicht um TJ-ähnliche Stränge zu bilden (Piontek *et al.*, 2008). Somit kann nach Transfektion von Cld5, die spezifische Wirkung der Modulatoren auf Cld5, ohne Einfluss des gesamten Multiproteinkomplexes der TJ, in diesen Zellen untersucht werden. Die homophile *trans*-Interaktion von YFP-markierten Cld5 lässt sich über die Anreicherung an den Zell-Zellkontakten quantifizieren (Piontek *et al.*, 2008). Die Interaktion von Cld5 über seinen C-Terminus mit ZO-1, dessen Expression in HEK-293 Zellen beschrieben wurde und die Cld mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (Itoh *et al.*, 1999; Toyofuku *et al.*, 1998), ist sehr wahrscheinlich durch die Markierung mit YFP blockiert. Daher wurden HEK-293 Zellen welche stabil Cld5-YFP exprimierten für die ersten

Analysen der homophilen Interaktion von Cld5 nach Modulatorbehandlung verwendet. Neben der Spezifität der möglichen BHS-Modulatoren für Cld5, war deren Barriere-öffnendes Potential ein wichtiger Parameter. Hierfür wurden epitheliale Zellen verwendet und TER- sowie Permeabilitätsmessungen durchgeführt. Mittels TER können molekularer Veränderungen in den TJ und damit der Einfluss auf deren Funktionalität untersucht werden. So führt eine veränderte Expression von TJ-Proteinen zu veränderten TER-Werten (Günzel und Yu, 2013). Vorteil der Bestimmung des TERs gegenüber der Messung der Permeabilität ist, dass die Werte direkt ermittelt werden und nicht über die Fluoreszenz eines Größenmarkers. Andererseits ermöglicht die Permeabilitätsmessung, im Gegensatz zum TER, eine Aussage über eine größenspezifische Durchlässigkeit der Zellschicht. Dementsprechend erlaubt die Messung beider Parameter die Bestimmung der Dichte einer Zellschicht. Für diese Untersuchungen wurden, wie auch schon zuvor von anderen, MDCK Zellen verwendet (Sugibayashi *et al.*, 2009). MDCK II Zellen verfügen über vollständige TJ, welche eine eher durchlässige Barriere aufbauen. Dieses basiert unter anderem auf der Expression des Poren-bildenden Cld2 und der fehlenden Expression von Cld5 (Angelow *et al.*, 2007). So konnte durch die stabilen Expression von FLAG-Cld5 in den MDCK II Zellen eine geringere Durchlässigkeit gegenüber LY, im Vergleich zu MDCK-II Zellen welche Cld5 nicht exprimierten, gemessen werden. LY wurde als Marker in den Permeabilitätsmessungen verwendet, da es eine molekulare Masse von 457 Da besitzt und somit dem größenselektiven Bereich entspricht, deren Permeabilität von Cld5 reguliert wird. In der Immunfluoreszenz konnte eine Lokalisation von FLAG-Cld5 in der Plasmamembran detektiert werden. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass das ekto-pisch exprimierte Cld5 funktional in die TJ integriert wurde. Somit standen zwei Zellsysteme zur Verfügung (MDCK-II und MDCK-II FLAG-Cld5), welche sich ausschließlich in der Expression von Cld5 unterschieden. Weitere funktionale Untersuchungen wurden mit Caco-2 und IPEC-J2 Zellen durchgeführt. Caco-2 Zellen werden häufig für Permeabilitätsstudien eingesetzt und die Permeabilität von Stoffen durch diese Zellschicht wird in der pharmazeutischen Industrie als *in vitro* Modell verwendet um die *in vivo* Absorption von oral verabreichten Pharmaka vorherzusagen (Artursson und Karlsson, 1991). Die endogenen TJ dieser Zellen enthalten Cld1, 2, 3, 4 und 8 (Amasheh *et al.*, 2005; Al-Sadi *et al.*, 2014). Die Expression von Cld5 ist in der Literatur kontrovers diskutiert. So führt die Transfektion von Cld5 in Caco-2 Zellen zu einer signifikant verminderten Permeabilität eines 182,2 Da Markers (Amasheh *et al.*, 2005). Auch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen die Expression von Cld5 fraglich erscheinen. Sowohl im Westernblot, als auch in der Immunfluoreszenz sowie mittels qRT-PCR erhaltene Daten deuten auf eine fehlende oder sehr geringe Expression von Cld5. Im Gegensatz dazu konnte für die in der Literatur wenig beschriebenen IPEC-J2 Zellen eine relativ starke Expression von Cld5 im Westernblot im Vergleich zu den anderen hier verwendeten Zelllinien detektiert werden. Weiterhin konnte mittels Immunfluoreszenz die Expression von Cld1, Cld3, Cld4, Cld5, Cld6, ZO-1, Occludin und Trizellulin detektiert werden, während diese für Cld2

und 12 ausblieb. Somit unterscheidet sich die Zusammensetzung der TJ der IPEC-J2 und Caco-2 Zellen in den Cld2, 5 und 6. Die Funktion von Cld6 ist in der Literatur unklar und dessen *knock-out* in der Maus führt zu keinem Phänotyp (Anderson *et al.*, 2008). Die fehlende Expression des Kation-Poren-bildenden Cld2 könnte somit in den IPEC-J2 Zellen für den mehr als 20-fach höheren TER und die relativ hohe Expression von Cld5 für die 10-fach niedrigere Permeabilität gegenüber LY im Vergleich zu den Caco-2 Zellen sein. Jedoch wurde eine unterschiedliche Expression von weiteren Proteinen, wie die von anderen Kanälen und Transportern, nicht analysiert.

Um zu untersuchen, ob die im Rahmen dieser Arbeit aufgefundenen Modulatoren von Cld5 eine Relevanz für die BHS haben wurden endotheliale Zellen und BHS-Modelle verwendet. Die bEnd5 Zellen wiesen die weitaus höchste Expression von Cld5 in Westernblot-Analysen im Vergleich zu allen anderen Zellen auf. In der Immunfluoreszenz zeigten die untersuchten Kapillaren eine wesentlich höhere Intensität der Fluoreszenz von Cld5 im Vergleich zu den verwendeten Zelllinien. Die Analyse der Effekte der Modulatoren auf die BHS-Modelle beschränkte sich hauptsächlich auf immunzytochemische Analysen, da funktionale Untersuchungen wie TER und Permeabilitätsmessungen aufgrund der in dieser Arbeit gemessenen geringen Dichte der endothelialen Zellen, wenig aufschlussreich wäre. So weisen viele charakterisierte immortalisierte und primären Zellen der BHS eine durchlässige parazelluläre Barriere auf, wodurch deren Nutzen für Permeabilitätsstudien von Wirkstoffen begrenzt ist (Yang *et al.*, 2007; Deli *et al.*, 2005). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in dem Fehlen der funktionalen Einheit und der Botenstoffe. So kann durch die Kokultivierung der isolierten Zellen mit Astrozyten, Neuronen oder Mesenchymzellen oder durch die Applikation von konditioniertem Medium, Serumbestandteilen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren der TER von BHS-Zellen gesteigert und die Permeabilität gesenkt werden (Deli *et al.*, 2005). Der Einfluss auf derart kultivierte BHS-Zellen ist jedoch teilweise marginal. So erreichte der TER von bEnd5 Zellen selbst mit der Verwendung von Astrozyten-konditioniertem Medium nach 7 Tagen lediglich einen Wert von  $121 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Yang *et al.*, 2007). In dieser Studie konnte anhand von kleinen Molekülen und dem permeablen Propranolol (ein transzellulärer Marker für die BHS) gezeigt werden, dass bEnd5 Zellen eine vergleichbare para- und transzelluläre Permeabilität aufweisen (Yang *et al.*, 2007), welches das Fehlen einer strikten Barriere in diesen Zellen unterstreicht. Der Permeabilitätskoeffizient der bEnd5 Zellen gegenüber 3 kDa Dextran ist mit  $4 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$  19 mal höher als in pGKEZ (Steiner *et al.*, 2011). Die bEnd5 Zellen sind immortalisiert, entdifferenziert und weisen eine veränderte Morphologie auf (Steiner *et al.*, 2011). Dennoch zeigen sie eine zu pGKEZ vergleichbare Expression von einigen TJ-Proteinen einschließlich Cld5, während Occludin eine zytoplasmatische Lokalisation einnimmt (Steiner *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2007). Unter den genannten Bedingungen weisen primäre Zellen zumeist höhere TER- und niedrigere Permeabilitäts-Werte im Vergleich zu BHS-Zelllinien auf (Deli *et al.*, 2005). Trotz der Einschränkungen von *in vitro* Modellen gegenüber der *in vivo* Situation, bieten diese einige Vorteile. So sind die Untersuchungen wesentlich schneller,

mit weniger Aufwand sowie kostengünstiger durchzuführen und es besteht die Möglichkeit den Mechanismus von Wirkstoffen auf molekularer Ebene zu analysieren. Zudem ist die Quantität der Untersuchungen höher. Die Verwendung von Zelllinien gegenüber primären Zellen hat den Vorteil, dass diese nicht zeitaufwendig isoliert werden müssen, eine geringere Variabilität zwischen den Experimenten aufweisen und die Zelllinie wesentlich länger kultivierbar ist, während primäre Zellen nach relativ kurzer Zeit absterben oder ihre Charakteristika verlieren (Yang *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bEnd5 Zellen, pGKEZ und isolierte Kapillaren auf den Gehalt von relevanten TJ-Proteinen und deren veränderte Lokalisation sowie Expression nach Applikation der BHS-Modulatoren mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Alle analysierten Zellen wiesen eine Expression von Cld5 und ZO-1 auf, welche in der Plasmamembran kolokalisierten.

## 4.2. Auswahl bekannter Barriere-Modulatoren und ihre Wirkung auf Claudin-5

### 4.2.1. Caprat als Modulator von Cld5

C10 ist ein bekannter Barriere-Modulator und im Vergleich zu anderen Absorptionsverstärkern hoch wirksam mit wenig Nebenwirkungen (zusammengefasst in Tscheik *et al.* 2013). Es wurde in klinische Studien für die rektale Applikation zur Absorptionsverstärkung von Ampicillin eingesetzt (Lindmark *et al.*, 1995). Hierbei konnte gezeigt werden, dass C10 die epithelialen TJ des Darms durchlässiger macht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde C10 als potentieller BHS-Modulator geprüft.

Die Untersuchungen C10-behandelter, exogen Cld5-exprimierender HEK-293 und MDCK-II sowie endogen Cld5-exprimierender bEnd5 Zellen ergaben in dieser Arbeit eine direkte Hemmung der Cld5 *trans*-Interaktion, wodurch es zu einer partiellen Öffnung des parazellulären Raums kam. Eine Begleiterscheinung war die Reduktion von Aktin in Epithel- und Endothelzellen, während ZO-1 durch die Behandlung unbeeinflusst blieb.

Die Untersuchung von stabil transfizierten HEK-293 Cld5-YFP Zellen ermöglicht eine selektive Untersuchung und Quantifizierung der homophilen Cld5 Interaktion ohne einen interferierenden Einfluss anderer Cld (Piontek *et al.*, 2008). Mit diesem TJ-Modellsystem wurde ein zeit- und konzentrationsabhängiger sowie reversibler Effekt von C10 auf die Cld5 *trans*-Interaktion bestimmt. Bereits nach 5 min war der Cld5-Gehalt in der Plasmamembran aufgrund der Inkubation mit 5-10 mM C10 signifikant reduziert. Interessanterweise beginnt ein Abfall des TERs nach 10 mM C10-Behandlung in MDCK-I Zellen zum gleichen Zeitpunkt (Sugibayashi *et al.*, 2009). Auch in HT-29/B6 Zellen induziert diese C10-Konzentration einen Abfall des parazellulären TERs, der nach Mediumwechsel wieder den initialen Wert erreicht (Krug *et al.*, 2013). Eine vergleichbare Regeneration wurde in dieser Arbeit beobachtet, bei dem eine signifikante, C10-bedingte, Reduktion von Cld5 in der Triton-unlöslichen Fraktion von MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen eintrat. In MDCK-I

Zellen wurde ebenfalls eine Verschiebung von Cld5 nach der Behandlung mit C10 von der Triton-unlöslichen in die Triton-lösliche Fraktion beschrieben (Sugibayashi *et al.*, 2009). Der Effekt beruht auf der Unlöslichkeit TJ-integrierter Proteine in nicht-ionischen Detergenzien, die zusammen mit dem Zytoskelett und Membranen in der Triton-unlöslichen Fraktion lokalisieren (Andreeva *et al.*, 2006). Dieses korreliert mit den Untersuchungen zur Kontaktanreicherung von FLAG-Cld5 in MDCK-II und endogenen Cld5 in bEnd5 Zellen. Demnach wird Cld5 durch C10 in den Zell-Zellkontakten reduziert und aus der Plasmamembran entfernt. In der Folge kommt es zur Öffnung der Zellbarriere und zu einer gesteigerten Permeabilität von kleinen Molekülen. So erhöhte sich die Durchlässigkeit von LY in MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen nach C10 Applikation.

Neben der Regeneration der Cld5-YFP-Fluoreszenz nach dem Auswaschen von C10, deuten auch die Untersuchungen mit den Plasmamembranmarkern auf einen nicht toxischen Effekt. So wurde Trypanblau von den Zellen nicht aufgenommen und die Intensität von CellMask™ blieb unverändert, wodurch eine Auswirkung von C10 auf die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran ausgeschlossen werden kann. Mittels des LDH-Vitalitätstest (L-Lactatdehydrogenase) wurde in HT-29/B6 Zellen kein toxischer Effekt von 10 mM C10, selbst nach 2 h Inkubation gemessen (Krug *et al.*, 2013). Auch in Caco-2 Zellen konnten keine Auffälligkeiten mit 13 mM C10 gezeigt werden (Chao *et al.*, 1999).

#### 4.2.1.1. Der Wirkmechanismus von Caprat

Für C10 ist ein Wirkmechanismus postuliert worden, der sich auf Daten die in Caco-2 Zellen generiert wurden bezieht. Demnach beschränkt sich die Wirkung von C10 hauptsächlich auf Aktin, während Effekte auf Cld und TJ sekundär sind (Tomita *et al.*, 1995; Shimazaki *et al.*, 1998; Lindmark *et al.*, 1998). Laut Modell wird die Dilatation des parazellulären Raums durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und CaM-Komplexe vermittelt. Die aktivierte MLCK phosphoryliert die regulatorischen leichte Kette von Myosin II und induziert die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringkomplexes (Feighery *et al.*, 2008). Die TJ-Proteine sind direkt oder indirekt mit Gerüstproteinen (z.B. ZO-1) und Zytoskelett-Proteinen (z.B. F-Aktin) verbunden (Van Itallie *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2011; Shen und Turner, 2005). Eine Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringkomplexes müsste zu einer Internalisierung der *junctionalen* Komplexe führen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und anderer Arbeiten scheint dieser Wirkmechanismus nicht universell anwendbar. In allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien konnte zwar eine Reduktion von Cld5 nach der Inkubation mit C10 festgestellt werden, aber nicht alle *junctionalen* Proteine werden durch C10 beeinflusst, sodass die generelle Internalisierung des TJ-Komplexes fraglich erscheint. So wurde z.B. in humanen Luftröhren-Epithelzellen keine veränderte Lokalisation von ZO-1 beobachtet, obwohl Cld1, Cld4, JAM und  $\beta$ -Catenin nach C10-Behandlung reduziert waren (Coyne *et al.*, 2000, 2003b). In MDCK Zellen waren Cld4, -5 und Occludin aus den *Lipid Rafts* in löslichere Mikrodomänen mit höherer Fluidität verschoben, während Cld1, -2 und -3 unverändert blieben (Sugibayashi *et al.*,

2009). In Hautepithelzellen konnte eine teilweise Entfernung von Occludin und Cld1 an den TJ beobachtet werden (Kurasawa *et al.*, 2009). Jedoch ist die durch C10 hervorgerufene Reduktion der *trans*-Interaktion von Cld1 nicht so stark wie bei Cld5 (Del Vecchio *et al.*, 2012). Davon leicht abweichende Ergebnisse wurden mit HT-29/B6 Zellen erzielt. Während kein Unterschied für Cld1 bis -5, -8, Occludin und Trizellulin im Gesamtlysat oder der Membranfraktion gefunden wurde, kam es zu einer selektiven und reversiblen Reduktion von Trizellulin und Cld5 in Dreizell- bzw. Zweizellkontakten (Krug *et al.*, 2013). In dieser und anderen Arbeiten konnte keine Veränderung oder sogar eine erhöhte Immunoreaktivität von ZO-1 beobachtet werden (Lindmark *et al.*, 1998; Suzuki und Hara, 2006; Coyne *et al.*, 2000). Zudem konnte die Kontraktion des Aktinzytoskeletts nach C10-Behandlung nicht repliziert werden. So wurde z.B. in HT-29/B6 Zellen keine Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringkomplexes erreicht. Weiterhin war der Effekt von C10 nicht durch die Inhibition der Aktin-Myosin-Interaktion, PLC, Rho-Kinase oder durch Kalzium-Chelatoren zu blockieren. Die Inhibition der PKC erhöhte sogar die C10 vermittelte Permeabilität (Krug *et al.*, 2013; Lindmark *et al.*, 1998). In humanen primären Lufttröhrenzellen (Coyne *et al.*, 2003b) und der Mukosa des Krummdarms (Soderholm *et al.*, 2002) wurde ein vermindertes F-Aktin Signal nach C10-Behandlung detektiert. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Reduktion des kortikalen F-Aktins an den TJ in den bEnd5 und MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen beobachtet werden. Ein vergleichbarer Abfall des F-Aktin Gehalts wurde in Latrunculin A (Polymerisations-Inhibitor) behandelten MDCK Zellen beschrieben und in Zusammenhang mit der Spaltung und Depolymerisation von F-Aktin gebracht (Shen und Turner, 2005). Die Arbeitsgruppe um Sakai interpretierten die C10-abhängige Aktinveränderung als Aktindepolymerisation (Sakai *et al.*, 1998a). Auch in dieser Arbeit konnten Hinweise gefunden werden, dass C10 eine Aktindepolymerisation und verminderte Assoziation des Aktinzytoskelett zur Plasmamembran und den TJ-Regionen hervorruft. Konsistent in allen Arbeiten ist zumindest eine Wirkung von C10 auf Cld5. Für die Reduktion von Cld5 an den Zell-Zellkontakten ist eine Internalisierung anzunehmen. Internalisierung, Abbau und/oder Recycling sind typische Mechanismen zur Regulation von *junctionalen* Membranproteinen (Shen und Turner, 2005; Zwanziger *et al.*, 2012b). Eine Internalisierung von Cld5 ist z.B. nach der Behandlung mit CCL2 in bEnd3 Zellen beschrieben, welches über Caveolae/*lipid rafts* und Caveolin-1 vermittelt wird (Stamatovic *et al.*, 2009). Hierbei wird das Protein in frühen und Recycling, aber nicht in späten Endosomen gespeichert, wodurch ein Rücktransport zur Plasmamembran möglich ist. Um zu untersuchen ob C10 einen ähnlichen Effekt auf Cld5 hat, bietet sich z.B. das unter 10.3 vorgestellte Kikume an. Durch Umschalten einzelner Cld5-positiver Areale innerhalb der Plasmamembran könnte zwischen vor der C10-Behandlung exprimierten und neu translatierten Cld5 unterschieden werden. Findet sich während der Behandlung von der Plasmamembran stammendes Cld5 im Zytoplasma und nach Behandlung wieder in der Plasmamembran, kann von einer intrazellulären "Speicherung" ausgegangen werden. Ist dies nicht der Fall, liegt ein Abbau des Proteins nahe.

Die Internalisierung von Cld5 erklärt auch die erhöhte Permeabilität von kleinen Molekülen, da Cld5 die TJ gegen Moleküle mit  $<800$  Da abdichtet. Weiterhin konnte nach der C10-Behandlung beobachtet werden, dass Marker mit einer geringeren molekularen Masse wesentlich schneller als solche mit einer hohen molekularen Masse permeabilisieren (Tscheik *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu führt z.B. die Inkubation mit dem unspezifischen Absorptionsverstärker EGTA, der einen Kalzium- und Magnesiumentzug bewirkt, zum Verlust der TJ und der größen-spezifischen Abdichtung (Watson *et al.*, 2001). So erhöhte dieser die Permeabilität von FD10 um das 21-fache, während C10 nur das 1,9-fache erreichte. Die Autoren erklärten die größenabhängige gesteigerte Permeabilität durch C10 mit einer Erhöhung der Aktivität von größen-selektiven Poren (Watson *et al.*, 2001). Andererseits ist für Trizellulin eine Barrierefunktion gegenüber Makromolekülen (bis 10 kDa) beschrieben (Krug *et al.*, 2009). Somit scheint die zweiphasig gesteigerte Permeabilität durch eine direkte Verminderung von Cld5 und Trizellulin bedingt. In diesem Szenario würden kleine Moleküle über Zweizellkontakte schneller diffundieren und größere Moleküle über Dreizellkontakte langsamer.

Der Verbleib von ZO-1 an den Zell-Zellkontakten trotz Internalisierung von Cld5, mit dessen C-Terminus ein Teil der intrazellulären ZO-1-Menge verbunden ist, erklärt sich anhand der multiplen Interaktionsmöglichkeiten von ZO-1 mit weiteren TJ aber auch *adherence junction*-Proteinen (Muller *et al.*, 2005). Dieser Zusammenhang wird insbesondere unter Kalzium- und Magnesiummangel sichtbar, wobei sich auch die subzelluläre Lokalisation von ZO-1 verändert. Kalzium ist unter anderem als Kofaktor für die aktive Form der Cadherine der *adherens junctions* notwendig und ein Mangel bewirkt daher deren Internalisierung und vermutlich auch den von TJ, sodass es zu einer Öffnung des parazellulären Spalts kommt (Brown und Davis, 2002). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich durch die beschriebene Aktivierung der PKC durch C10 in Caco-2 Zellen (Lindmark *et al.*, 1998) sowie die Inhibierung der MLCK-abhängige Aktinmyosin Kontraktion durch eine PKC Aktivierung (Turner *et al.*, 1999). Die Inhibition der MLCK erhöht die Stabilität von ZO-1 an den TJ (Yu *et al.*, 2010). Somit könnte der membranale Verbleib von ZO-1 nach der Applikation von C10 durch die PKC Aktivierung begünstigt werden (Lindmark *et al.*, 1998). Für Cld5 wird eine Reduzierung seines Proteingehalts durch die Aktivierung verschiedener PKC Isoformen und der damit verbundenen Phosphorylierungen an dem C-Terminus von Cld5 für *in vivo* (Willis *et al.*, 2010) und *in vitro* (Stamatovic *et al.*, 2006) BHS-Modelle angenommen. Allerdings wird der generelle Einfluss der PKC auf die TJ- und Barrierefunktion in der Literatur kontrovers diskutiert (Turner *et al.*, 1999; Stamatovic *et al.*, 2006).

Interessanterweise hatte der Entzug beider Ionen auf die Lokalisation von Cld5 und auf die Morphologie der hier untersuchten HEK-293 Cld5-YFP Zellen keinen Effekt. In diesem TJ-Modellsystem besteht keine Interaktion zwischen ZO-1 und Cld5, sodass Cld5 vermutlich außerhalb der natürlichen TJ-Umgebung keinen regulatorischen Einflüssen unterworfen ist. Um so überraschender war das Ausbleiben der Kontraktion des apikalen

Aktin-Myosinrings unter Kalzium- und Magnesiumentzug in den MDCK-II FLAG-Cld5 und bEnd5 Zellen, wenn gleichzeitig C10 appliziert wurde. Umgekehrt verhindert die Inhibition der MLCK die Kontraktion unter Kalziumentzug, nicht jedoch die C10-bedingte Wirkung auf die TJ (Ma *et al.*, 2000; Krug *et al.*, 2013). Dementsprechend könnte der extrazelluläre Mangel von Kalzium und Magnesium den Abbau der *adherens junctions* und die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringkomplexes bedingen, welches zu den starken morphologischen Veränderungen führt, die für die MDCK-II FLAG-Cld5 und bEnd5 Zellen beobachtet wurden. Diese Zellen verfügen über ein komplexes TJ-Netzwerk und eine Interaktion von FLAG-Cld5 mit ZO-1 ist gegeben, da die FLAG-Markierung N-terminal ist. Die gleichzeitige Inkubation mit C10 führt zu einem starken und schnellen Ausstrom von intrazellulärem Kalzium, welches möglicherweise über Ionenkanäle in den extrazellulären Raum gelangt und somit die *adherens junctions* und Zellmorphologie stabilisiert. Unter diesen Bedingungen ist die C10-Wirkung entgegen gesetzt und weist eine protektive Funktion auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Regulation von Cld5 über ZO-1 und Aktin nicht notwendig ist, um die Cld5 *trans*-Interaktion zu manipulieren. Der exakte Mechanismus hinter der Modulation von speziellen Membranproteinen bleibt unklar, dennoch zeigen die Ergebnisse eine spezifische Modulation der TJ-Proteine und stellen die alleinige Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringkomplexes durch in C10 in Frage. Da die beschriebenen Effekte in der Literatur auf die einzelnen Proteine uneinheitlich sind, könnte die Art der Zelllinie und deren Expressionsmuster von TJ-Proteinen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

#### 4.2.2. Weitere Absorbtiionsverstärker: Methyl- $\beta$ -cyclodextrin und siRNA

M $\beta$ CD wurde auf die Fähigkeit untersucht Cld5 und dessen *trans*-Interaktion zu modifizieren. Für das HDS wurde ein Effektor auf die Cld5-Interaktionen benötigt um die zu screenen Substanzen in ihrer Wirkung beurteilen zu können. M $\beta$ CD ist die methylierte Form eines zyklischen Oligosaccharids mit 7 Glukosemolekülen. Es entzieht der Plasmamembran Cholesterin, ein Hauptbestandteil der *lipid rafts*, weshalb M $\beta$ CD als *lipid raft disrupter* bezeichnet wird (Hansen *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2001; Vial und Evans, 2005).

Generell ist die Existenz von *lipid rafts* umstritten (Munro, 2003). Dem Modell nach, besteht die Plasmamembran aus geordneten (*liquid-ordered*) und ungeordneten (*liquid-disordered*) Mikrodomänen. Ein Typ der geordnete Domäne enthält hauptsächlich Cholesterin, Sphingolipide und verschiedene Proteine (Brown und London, 1998). Diese interagieren miteinander und bilden die *lipid rafts* bzw. Detergens-resistente Membranen. Demnach entstehen Gruppen von Proteinen, abhängig von der Lokalisation in geordneten oder ungeordneten Domänen, wodurch deren Interaktion reguliert wird. Eine funktionale Relevanz wird den *lipid rafts* in der Sortierung von Proteinen in polarisierten Zellen, der

Zellmigration und diverser Signalwege wie z.B. in der Endo- und Exozytose zugeschrieben (Korade und Kenworthy, 2008). So enthalten die *lipid rafts* Caveolae und dementsprechend Caveolin (Fielding, 2001). Einer Hypothese nach, sind die TJ-Proteine in den *lipid rafts* der Plasmamembran organisiert (Nusrat *et al.*, 2000). Dementsprechend würde eine Veränderung der Zusammensetzung dieser Mikrodomänen zu einer Umverteilung der Proteine führen.

In den Untersuchungen von M $\beta$ CD-behandelten HEK-293 Cld5-YFP Zellen konnte in dieser Arbeit eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cld5 *trans*-Interaktion detektiert werden. Dieses lässt sich mit den Daten aus der Literatur in Einklang bringen, wonach in MDCK Zellen Cld5 sowie Cld1, 2, 3, und 4 aus der Plasmamembran umverteilt werden (Sugibayashi *et al.*, 2009). Da das Modell der *lipid rafts* hypothetisch ist (Munro, 2003), kann lediglich darüber spekuliert werden, ob die nicht polarisierten HEK-293 Zellen über derart ausgebildete Mikrodomänen verfügen oder ob diese lediglich für polarisierte Zellen charakteristisch sind. In Caco-2 Zellen führte das Herauslösen von Cholesterin aus Detergens-resistenten Membranen zu einer Reduktion der Interaktion zwischen TJ-Proteinen und zu einer Umverteilung von Cld3, 4, 7 sowie JAM-A und Occludin (Lambert *et al.*, 2007). Hieraus schlossen die Autoren, dass Cholesterin in der Membran entscheiden für den Erhalt der Assoziation von integralen Membranproteinen mit den entsprechenden Mikrodomänen und damit für den von TJ ist (Lambert *et al.*, 2007). Hierdurch ließe sich die Permeabilität von Gewebeschränken über den Gehalt an Cholesterin in den entsprechenden Epithel- und Endothelzellen regulieren.

Weiterhin ging den hier mit M $\beta$ CD-behandelten HEK-293 Cld5-YFP Zellen eine Reduktion der Intensität der Plasmamembranfärbung voraus. Wurden die Zellen vor Beginn des Experiments mit CellMask<sup>™</sup> inkubiert, konnte die Plasmamembran visualisiert werden, dessen Färbung nach 15 min Inkubation mit 7,5 mM M $\beta$ CD verschwand. Erfolgte die Applikation beider Substanzen gleichzeitig, blieb die Färbung der Plasmamembran aus. Dieses deuten zum einen an, dass das Entfernen von Cholesterin aus der Plasmamembran der Zellen unmittelbar erfolgt und zum anderen, dass CellMask<sup>™</sup> an dieses bindet. Eine Stellungnahme des Herstellers hierzu blieb aus. Jedoch war dieser Effekt farbstoffspezifisch und mit Trypanblau nicht nachzustellen. Trypanblau bindet durch freie, saure Reste an positive Ladungen von Proteinen der Zelloberfläche (Dr. Wiesner, persönliche Mitteilung) und ist somit in seiner Wirkung durch die Extraktion von Cholesterin nicht beeinträchtigt. Weiterhin ist der Effekt auf CellMask<sup>™</sup> reversibel, sodass nach Entfernen der M $\beta$ CD-Lösung und erneuter Applikation von CellMask<sup>™</sup> die Plasmamembran zu visualisieren war. Eine Regeneration der Zellen nach M $\beta$ CD-Behandlung konnte auch in TER Untersuchungen festgestellt werden. Hierbei führten 10 mM M $\beta$ CD zu einem Abfall TER-Werts auf nahezu 0 nach 2 h Inkubation (Lynch *et al.*, 2007). Nach Entfernen von M $\beta$ CD erreichte der Wert wieder den der Kontrollzellen (nach 12-24 h). Dieses zeigt, dass selbst der Entzug von 80 % des gesamten Cholesterin (Casas *et al.*, 2010) keinen toxischen Effekt zu haben scheint und die Zellen in der Lage sind, das fehlende Cholesterin

zu ersetzen.

Aufgrund der Wirkung auf CellMask™ konnte M $\beta$ CD als Kontrollsubstanz für das HDS nicht berücksichtigt werden. Dieser Farbstoff sollte für die Visualisierung der Plasmamembran während des HDS eingesetzt werden. CellMask™ besitzt im Gegensatz zu Trypanblau keine zytotoxische Wirkung und wurde unter anderem für derartige Applikationen entwickelt (Herstellerangaben).

Als weitere Kontrolle für das HDS wurde die Verwendung einer Cld5 spezifischen siRNA geprüft. Diese reduzierte den Gehalt des ektopisch exprimierten Cld5 in den HEK-293 Zellen. *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass die Öffnung der Blut-Retina und auch der BHS mittels RNS-Interferenz möglich ist (Campbell *et al.*, 2008, 2009, 2012). So konnte die Menge an GTP (523 Da), dessen Gehalt bei der Retinopathia pigmentosa aufgrund einer Mutation der *inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 1* reduziert ist, in der äußeren Zellschicht der Retina nach Suppression der Cld5 mRNS signifikant erhöht werden. Moleküle mit einer molekularen Masse von über 1 kDa passierten keine der beiden Schranken. Dementsprechend ist es möglich, die Expression einzelner Cld in Gewebeschränken zu reduzieren und dieses für therapeutische Zwecke zu nutzen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Reduktion von Cld5 in dem verwendeten TJ-Modell erfolgreich war. So wurde die Intensität der YFP-Fluoreszenz von Cld5 um das ca. dreifache gesenkt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber z.B. der Applikation von C10 ist die wesentlich geringere Konzentration (Faktor 150.000). Der Nachteil ist der vergleichsweise hohe Aufwand, da eine Transfektion der Zellen und eine 48 h Inkubation notwendig sind. Weiterhin entspricht die direkte Modifikation von Cld5 durch C10 und nicht dessen mRNS, der im HDS bevorzugten Wirkungsweise einer Substanz. Somit wurde C10 als Kontrollsubstanz für das primäre HDS gewählt.

### 4.3. Auffindung neuer BHS-Modulatoren: Das Hochdurchsatz-Screening

Hauptbestandteil dieser Arbeit war, neben der Charakterisierung bekannter Absorptionsverstärker, die Auffindung neuer und spezifischer BHS-Modulatoren. Hierzu wurde das HDS verwendet, da mit dessen Hilfe eine Vielzahl von Substanzen automatisch getestet werden können. Für den durchgeführten Screen wurden unbehandelte HEK-293 als Positivkontrollen und HEK-293 Cld5-YFP Zellen als Negativkontrollen eingesetzt. Es wurde die *ChemBioNet Collection* verwendet, aus der eine Substanz als Inhibitor der Cld5 *trans*-Interaktion in den weiterführenden Untersuchungen klassifiziert wurde. Dieses ist das erste Mal, dass ein HDS mit einer derartigen Zielstellung durchgeführt wurde und somit zunächst etabliert werden musste. Übliche *targets* sind Rezeptoren, Kanäle oder Enzyme, jedoch nicht Strukturproteine (Blucher und McWeeney, 2014).

Für die Durchführung eines Mikroskopie-basierten HDS ist eine optische Markierung des Zielproteins essentiell. Zudem ist eine hohe Anzahl von Zellen notwendig, welche eine ho-

mogene Expression dieses Proteins und eine gleichartige Zellmorphologie aufweisen. Die stabil transfizierten HEK-293 Cld5-YFP Zellen wiesen diesbezügliche eine hohe quantitative Expression von Cld5 auf und konnten in ausreichender Menge kultiviert werden. Bereits zuvor wurde mit YFP transfizierten HEK-293 Zellen erfolgreich ein HDS durchgeführt (Talwar *et al.*, 2013). Ziel des primären HDS war die Quantifizierung der Cld5-YFP-Intensität in der Plasmamembran von behandelten Zellen. Der Zellkern wurde mit Hoechst und die Plasmamembran mit CellMask™ markiert, wodurch die Software in der Lage war die Bereiche der Zelle in Zellkern, Zytoplasma und Plasmamembran einzuteilen. Hierdurch sollte erreicht werden, dass Substanzen die zu einer Internalisierung von fluoreszierenden Cld5 führten, nicht als wirkungslos eingestuft wurden, wenn die Gesamtintensität des YFPs unverändert bleibt. Anhand der Anzahl der Zellkerne und deren Morphologie kann eine Aussage über eventuelle toxische Effekte der applizierten Substanzen getroffen werden, weshalb die Färbung der Zellkerne auch in anderen HDS durchgeführt wurde (Martin *et al.*, 2014). Somit liegen die Vorteile des Mikroskopie-basierten HDS von lebenden Zellen in der guten räumlichen Auflösung sowie der direkten Beobachtung des *targets*. Zudem ist dies keine Endpunktmessung, sodass temporäre Informationen gesammelt werden können (Pepperkok und Ellenberg, 2006).

Für die Bewertung der Effekte der im HDS applizierten Substanzen auf Cld5 war eine Positivkontrolle notwendig, welche eine vergleichbare Wirkung hat. Hierfür wurden C10-behandelte HEK-293 Cld5-YFP verwendet. Da die Dauer, die das automatische Mikroskop benötigte um die gesamte 384-well-Platte zu vermessen länger als 60 min betrug, kam es zu morphologischen Veränderungen der lebenden Zellen. Vergleichbare Komplikationen sind in der Literatur beschrieben, weshalb die Zellen fixiert wurden (Pepperkok und Ellenberg, 2006). Außerdem muss aufgrund der automatisierten Messmethode und Analyse das Zellsystem und die gemessenen Daten ein hohes Maß an statistischer Robustheit und Reproduzierbarkeit aufweisen, damit die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven oder negativen Ergebnissen reduziert wird (Blucher und McWeeney, 2014). Hierauf haben die Kontrollen einen starken Einfluss, da sie als Maßstab für die zu untersuchenden Substanzen dienen. Um die Eignung der Kontrollen für einen HDS zu überprüfen bietet sich die Kalkulation des  $Z'$ -Faktors an, der zuvor anhand der Positiv- und Negativkontrolle berechnet wird. Im Prinzip legt der  $Z'$ -Faktor einen Schwellenwert fest der erreicht werden muss, damit die beiden Kontrollen ausreichend signifikante Unterschiede im *read-out* aufweisen (Zhang *et al.*, 1999). Als Voraussetzung für die Durchführung eines HDS gilt ein Wert von  $\geq 0,5$ . Niedrigere Werte deuten auf eine hohe Variabilität der Daten oder einen zu geringen Unterschied in der Wirkung von Positiv- und Negativkontrolle. Ein entsprechender Wert des  $Z'$ -Faktors erhöht auch die Wahrscheinlichkeit das ein *hit* während des HDS richtig zugeordnet wird, zumal die Substanzen nur einmal appliziert und bewertet werden. Somit wurde der  $Z'$ -Faktor von fixierten unbehandelten und C10-behandelten HEK-293 Zellen berechnet. Der ermittelte Wert lag mit 0,25 zu niedrig für die Durchführung des Screens. Dieses zeigt die strengen Kriterien, die für eine automa-

tische Durchführung gelten. So konnte in den manuellen Untersuchungen eine mehr als 50 % Reduktion der Cld5-YFP-Fluoreszenz nach der Applikation von 7,5 mM C10 gezeigt werden. Diese Reduktion erwies sich für einen ausreichenden  $Z'$ -Faktor als ungenügend. In der Literatur sind ähnliche Ergebnisse beschrieben. In einem HDS zur Bestimmung der Wirkung toxischer Substanzen wurde eine 6,9-fache Erhöhung beginnender Apoptose in Zellen nach der Behandlung mit Taxol (induziert Zelltod und inhibiert die Zellproliferation) gegenüber der DMSO-Kontrolle gemessen (Martin *et al.*, 2014). Wurde die Anzahl der Zellen als *read-out* gewählt, betrug der  $Z'$ -Faktor lediglich 0,32. Dennoch wurde der HDS durchgeführt, wobei der  $Z$ -score (beschreibt die Signifikanz, mit der sich eine einzelne Messung von dem Durchschnittswert der Platte abhebt) von drei auf zwei gesenkt wurde. Weitere Beispiele für eine Anpassung statistischer Parameter sind publiziert (Di *et al.*, 2012). Für den hier durchgeführten HDS wurde jedoch nach alternativen Kontrollen gesucht. Aber auch die Verwendung der Cld5-spezifischen siRNA erreichte keinen adäquaten  $Z'$ -Faktor. Letztendlich wurden untransfizierte HEK-293 Zellen als Positivkontrollen verwendet und die gesamte YFP-Fluoreszenz gemessen. Die Variabilität der gemessenen YFP-Fluoreszenzen in den Kontroll-*wells* war wesentlich geringer als zuvor, wodurch ein guter  $Z'$ -Faktor erreicht wurde. Transfizierte und nicht transfizierte Zellen dienten bereits in anderen durchgeführten HDS als Kontrollen (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Dieses unterstreicht die Anforderungen an das Zellsystem und die verwendeten Kontrollen für die Etablierung eines HDS. Ansätze die in manuellen Experimente eine signifikante Reduktion des *read-out* aufweisen, konnten für die automatische Analyse nicht verwendet werden. Lediglich die Über- und die fehlende Expression des Proteins führte zu einem durchführbaren HDS.

#### 4.4. BO1, ein neuer Modulator der Claudin-5 *trans*-Interaktion

Von den 1.760 applizierten Substanzen, die im HDS untersucht wurden, reduzierte nur eine, BO1, die *trans*-Interaktion von Cld5 in HEK-293 Zellen und wurde somit als *hit* detektiert.

Zunächst wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie der Effekt von BO1 auf HEK-293 Cld5-YFP exprimierende Zellen näher charakterisiert. In diesen Experimenten zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cld5 *trans*-Interaktion. So verringerten Konzentrationen von  $\geq 10 \mu\text{M}$  die Anzahl der Cld5-angereicherten Zell-Zellkontakte. Im HDS waren bereits  $4 \mu\text{M}$  BO1 wirksam. Konzentrationen von  $50\text{-}100 \mu\text{M}$  führten zu einer verminderten Cld5 *trans*-Interaktion in stabil FLAG-Cld5 exprimierenden MDCK-II Zellen sowie zu einer zytoplasmatischen Lokalisation von Cld5 in der Peripherie der Zelle. Um einen Bezug zur BHS herzustellen, wurden nachfolgend primäre Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (pGKEZ), welche aus Gehirn-Kapillaren des Kortex der Maus ausgewachsen waren, untersucht. Konsistent zu den Wirkkonzentrationen aus dem HDS, bewirkten  $5 \mu\text{M}$  BO1 eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation von Cld5.  $12,5 \mu\text{M}$  BO1 verringerten die insgesamt detektierbare Fluoreszenz des immunfluoreszenz-markierten,

endogen exprimierten Cld5 und sorgten für ein fragmentiertes Muster von Cld5 in der Plasmamembran. In allen Zelllinien war die Reduktion der Cld5 *trans*-Interaktion nach spätestens 17 h detektierbar, wobei ZO-1 unbeeinflusst blieb. Im Gegensatz dazu konnte bis zu diesem Zeitpunkt *in situ* kein Effekt von BO1 auf die Cld5 *trans*-Interaktion der mit 100  $\mu$ M behandelten Gehirn-Kapillaren festgestellt werden. Ähnliches wurde allerdings zuvor auch in C10-behandelten Kapillaren beobachtet (Del Vecchio *et al.*, 2012). Hier waren, im Vergleich zu Experimenten mit verschiedenen Zelllinien, 5-6-fach höhere C10-Konzentrationen nötig, um eine Wirkung auf die Cld5 *trans*-Interaktion zu erzielen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre der intakte Gewebeverband isolierter Gerhine-Kapillaren, der zumindest aus den Endothelzellen, der extrazellulären Matrix und den Perizyten besteht (Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Analysen, persönliche Mitteilung Dr. Lars Winkler), welche einen wesentlichen Teil der intakten BHS ausmacht (Abbott, 2005). Es ist daher möglich, dass die TJ der Kapillaren kompakter und damit unzugänglicher für BO1 sind. In diesem Zusammenhang konnte in dieser und anderen Arbeiten gezeigt werden, dass Plasmamembranen zweier benachbarter Cld5-positiver Zellen wesentlich später durch Plasmamembranmarkern gefärbt wurden als Cld5-negative (Piontek *et al.*, 2011). Dieses zeigt die Dichtigkeit des Zellkontakts und damit dessen geringere Erreichbarkeit für Substanzen. Vergleichbares wurde für die C-terminale Sequenz des *clostridium perfringens enterotoxin* gezeigt. Dieses war in der Lage an Cld zu binden, welche sich an der Zelloberfläche befanden, jedoch nicht an jene, die in Zell-Zellkontakten lokalisierten (Winkler *et al.*, 2009). Dieser Umstand könnte auch dadurch verstärkt werden, dass die Kapillaren aufgrund des fehlenden Blutdrucks kollabiert sind und der Zugang in das Kapillarlumen erschwert ist. Zudem ist im direkten Vergleich die Expression aller detektierten TJ-Proteine in den isolierten Kapillaren höher als in den pGKEZ (Berndt *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Insbesondere die Cld5-Expression ist in den Gehirn-Kapillaren sehr hoch (Ohtsuki *et al.*, 2008; Daneman *et al.*, 2010). Damit stehen eventuell mehr Bindungspartner als in den übrigen untersuchten TJ-Modellen zur Verfügung. Aufgrund des limitierten Zugangs an Kapillaren bleibt in dieser Arbeit die genaue Ursache für das Ausbleiben des BO1-Effektes ungeklärt. Weitere Versuche mit höheren Konzentrationen von BO1 müssen diese Frage in Zukunft klären. Auch Experimente mit der direkten Applikation von BO1 in das Kapillarlumen isolierter Kapillaren könnten das Problem der kollabierten Kapillaren beheben (He *et al.*, 2000; Neal und Bates, 2002; Michel und Curry, 1999).

Für eine funktionelle Analyse wurden zunächst MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen im Vergleich mit untransfizierten Zellen, die kein Cld5 exprimierten verwendet. Nahezu eine Halbierung der Permeabilität des kleinen Moleküls LY (457 Da) durch MDCK-II Zellschicht wurde durch die alleinige Expression von Cld5 verursacht. Diese Reduktion wurde durch BO1 wieder aufgehoben. So konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Durchlässigkeit für LY in den MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen beobachtet werden. 100  $\mu$ M BO1 erhöhten die Permeabilität um das Dreifache. Dieses führte zu der Annahme, dass BO1 spezifisch

Cld5 moduliert. Trifft das zu, dann würde die BO1-Behandlung von Cld5-freien Zellen, keine Auswirkungen auf die Permeabilität von LY haben. In solchen MDCK-II Zellen hatten 100  $\mu\text{M}$  BO1 keinen signifikanten Einfluss auf die Permeabilität. Tendenziell wurde diese eher gesenkt. Dieses Phänomen wurde auch in der Messung des TER-Werts beobachtet. So wurde in den MDCK-II Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung des TERs gemessen. Die Ursache hierfür wurde nicht genauer analysiert, aber eine Wirkung von BO1 auf andere Cld kann nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere die EZD der Cld weisen eine große Homologie auf (Krause *et al.*, 2008). Wenn die Wirkung von BO1 durch eine Bindung an Cld verursacht wird, ist das Bindungsepitop vermutlich an eine dieser beiden Domänen zu suchen. Auch cCPE und TJ-Peptide binden hier (Nusrat *et al.*, 2005; Winkler *et al.*, 2009; Sauer *et al.*, 2014). MDCK-II Zellen exprimieren zumindest Cld1, 2, 3, 4 und 7 (Angelow *et al.*, 2007). Cld2 führt zu der Bildung von Kation-Poren, Cld4 zusammen mit Cld8 zu Anion-Poren und Cld7 wird sowohl in Zusammenhang mit der Bildung einer Barriere als auch Pore für Anionen beschrieben (Amasheh *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2010, 2006; Alexandre *et al.*, 2005). Bei der Untersuchung der Bindungskonstanten von BO1 war diese zu Cld5 mit  $238 \pm 31,7$  nM signifikant am höchsten. Auch für Cld3 konnte mit  $935 \pm 200$  nM eine hohe Affinität nachgewiesen werden. Die Cld1, 2 und 4 wiesen eine wesentlich niedrigere Affinität auf. Somit besteht eine selektive Bindung zu den Cld der BHS. Da eine Bindung von BO1 zu Cld7 und 8 nicht untersucht wurde, könnten diese parazellulären Poren-bildenden Cld durch BO1 internalisiert werden. Jedoch scheint dieser Nebeneffekt vernachlässigbar zu sein, da der TER der MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen durch 100  $\mu\text{M}$  BO1 halbiert wurde. Eine weitere Reduktion war aufgrund des relativ niedrigen Ausgangswertes nicht möglich, sodass der TER nahezu auf den Wert der Leerfilterkontrollen fiel. Aus diesem Grund wurden für weitere Analysen Zellen gewählt, welchen einen höheren TER-Plateauwert aufweisen.

Die IPEC-J2 Zellen besitzen die höchste Cld5 Expression aller hier untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der von bEnd5 Zellen. In IPEC-J2 Zellen wurden Cld5-positive Vesikel nach der Inkubation mit BO1 detektiert, welches die Annahme, dass Cld5 internalisiert wird, verstärkt. Ebenfalls vergleichbar zu den Ergebnissen der Untersuchungen mit MDCK-II FLAG-Cld5 Zellen, konnte eine BO1-bedingte Reduktion des TERs und eine erhöhte Permeabilität für LY detektiert werden. Hierbei sind jedoch die prozentualen Veränderungen in beiden Messungen in den IPEC-J2 Zellen wesentlich deutlicher. Diese ist aufgrund des relativ hohen TER und geringen Permeabilität gegenüber LY möglich und zeigt das Potential von BO1. Im Gegensatz dazu beeinflusste BO1 die Zellbarriere der ebenfalls relativ dichten Caco-2 Zellen nicht. In diesen Zellen ist die Expression von Cld5, wie in dieser Arbeit gezeigt, bestenfalls gering.

Im Vergleich zu C10 sind damit bedeutend geringere Konzentrationen von BO1 (100-1.000-fach) wirksam. Die Wirkung setzt auch nicht nach Minuten ein, wie im Fall von C10, sondern erst nach Stunden. Zudem muss BO1 im Gegensatz zu C10 nicht ausgewaschen werden, um die Regeneration der TJ einzuleiten. Vielmehr relokalisiert Cld5 48 h

nach Beginn der Behandlung der Zellen in den Zell-Zellkontakten. Wie C10 ist auch BO1 nicht toxisch, welches anhand der MTT und NRT-Test gezeigt werden konnte. Zusammenfassend reduziert BO1 spezifisch die Cld5 *trans*-Interaktion in einer konzentrations- und zeitabhängigen sowie reversiblen Weise. Hierbei werden weder Aktin noch ZO-1 beeinflusst. BO1 bindet mit hoher Affinität an Cld5. Befindet sich dieses Bindungsepitop in den EZD, wird der BO1 Effekt zudem extrazellulär vermittelt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Mutation von bestimmten Aminosäuren in der EZD2 zu einer fehlenden *trans*-Interaktion führt (Piontek *et al.*, 2008). Die Mutanten Cld5<sub>F147A</sub> und Cld5<sub>Y148A</sub> lokalisierten in der Plasmamembran, eine Anreicherung war hier aber nicht mehr zu messen. Die *cis*-Interaktion war jedoch nicht gestört. Der Proteinkristallation von Cld15 nach, beginnt die EZD2 mit P<sub>149</sub>, in Cld5 äquivalent mit P<sub>150</sub> (Suzuki *et al.*, 2014). Weiterhin zeigte diese Strukturanalyse das die linksdrehende Helix, der dritte transmembranalen Domäne, im Gegensatz zu den anderen transmembranalen Domänen, aus der Plasmamembran in den extrazellulären Raum ragt. In diesem extrazellulären Bereich befinden sich die aromatischen Aminosäuren F<sub>147</sub> und Y<sub>148</sub>. Auch die Struktur von BO1 weist mehrere Aromaten auf und könnte somit über elektrostatische Interaktionen, wie  $\pi$ -stacking, Kation/ $\pi$  oder X-H/ $\pi$ , an F<sub>147</sub> und Y<sub>148</sub> von Cld5 binden und somit für die Internalisierung von Cld5 sorgen (Wheeler und Bloom, 2014). Für z.B. den vier transmembranalen ELIC (*Erwinia Chrysanthemi ligand-gated ion channel*) wurde eine Kation- $\pi$ -Interaktion zwischen der CH<sub>3</sub>-Gruppe seines Liganden Acetylcholin und verschiedenen Phenylalaninen und Tyrosinen vorgeschlagen (Pan *et al.*, 2012). Wie BO1, verfügen auch die beiden verwendeten Derivate über zwei aromatische Systeme, welche über eine Esterbindung verknüpft sind. Erste Untersuchungen zeigten, dass diese Derivate ebenfalls in der Lage sind die Cld5 *trans*-Interaktion zu inhibieren. Somit könnte die Gesamtstruktur funktional von Bedeutung sein. Um dieses zu überprüfen bietet sich die Verwendung von Derivaten an, welchen einer der beiden aromatischen Strukturen fehlt. Um das Bindungsepitop von Cld5 einzugrenzen, könnten verkürzten Mutanten von Cld5 oder Chimären von Cld5 und Cld1 (wies die niedrigste Bindung zu BO1 auf) untersucht werden. Die Eingrenzung der genauen Bindungsstelle in Cld5 würde sowohl für die Optimierung von BO1-Derivaten nützlich sein sowie ein Teil zur Aufklärung des Wirkmechanismus beitragen. So könnte z.B. die Spezifität für Cld5 und die Löslichkeit weiter gesteigert werden. Für die Lösung von BO1 wird DMSO verwendet. Untersuchung von Caco-2 Zellen zeigten, dass Mengen von >20 % DMSO eine toxische Wirkung haben (Da Violante *et al.*, 2002). Jedoch wäre zum einen mit dieser Menge an DMSO die Lösung von 2 mM BO1 theoretisch möglich und zum anderen wurden Patienten mit intrakraniellen Druck erfolgreich eine 28 % DMSO-Lösung intravenös verabreicht (Jacob und de la Torre, 2009). Derzeit werden die ersten Versuche mit Mäusen durchgeführt (persönliche Mitteilung Dr. Lars Winkler). Hierbei wird analysiert, ob es verschieden Markersubstanzen möglich ist, in das ansonsten geschlossene ZNS zu penetrieren und wie verträglich die Applikation für das Tier ist.

## 4.5. BO1 und andere Absorptionsverstärker im Vergleich

**Tab. 4.1:** Verschiedene Absorptionsverstärker

Absorptions- verstärker	größenspezifische Öffnung	Wirkkonzentration	Wirkdauer
Mannitol	keine Selektivität	Molarer-Bereich	direkt bis zu 8 h
Alkyglycerole	bis zu 40 kDa	Millimolar-Bereich	direkt bis zu 2 h
Peptide	abhängig von Peptid	Mikromolarer-Bereich	abhängig von Peptid
Cld5-siRNA	bis zu 1 kDa	im Mikrogramm/ Pikomol-Bereich	24-72 h
Caprat	größenselektiv, bis zu 20 kDa	Millimolarer-Bereich	5 min bis zu 2 h (nach auswaschen)
BO1	bis 457 Da signifikant untersucht	Mikromolarer-Bereich	nach 17 h (konzentration- abhängig nach 3 h)

Für Referenzen und Erklärungen siehe Text

In der Literatur sind zwei Hauptgründe zu finden, weshalb die BHS überwunden werden sollte. Dieses sind zum einen die verschiedensten Erkrankungen des ZNS und zum anderen Gehirntumore. In beiden Fällen kann die Dichtigkeit der BHS beeinflusst sein (Weiss *et al.*, 2009). Im Falle von Gehirntumoren, welche sich Nahe der BHS befinden, ist eine erhöhte Aufnahme der Zytostatika in den Tumor, jedoch nicht in das umliegende gesunde Gewebe wünschenswert. Jedoch zeigt die Injektion von hyperosmolares Mannitol in die Halsschlagader von Ratten eine erhöhte Permeabilität von 68, 40 und 0,13 kDa Markern in gesunde Bereiche des Gehirns, während keine veränderten Mengen im Tumor zu detektieren sind (Inoue *et al.*, 1987). Die Steigerung der Konzentration von Mannitol auf 1,6 M führt auch zu einer erhöhten Permeabilität von Tumoren (Hiesiger *et al.*, 1986). Weitere Studien deutet darauf, dass die BHS in beiden Hemisphären transient aufgerissen wird, wobei jedoch eine erhebliche interindividuelle Variabilität besteht (Erdlenbruch *et al.*, 2003b). Die BHS des Menschen ist nach der Gabe von hyperosmolaren Mannitol für 6-8 h geöffnet (Siegal *et al.*, 2000). Dieses zeigt zum einen, dass extrem hohe Konzentrationen von Mannitol notwendig sind um eine Wirkung zu erreichen und zum anderen eine größenunspezifische Öffnung der BHS. Hierdurch kann ein neurotoxischer Effekt nicht ausgeschlossen werden, zudem wird der kortikale Blutfluss gesenkt (Hiesiger *et al.*, 1986). Ein alternativer Ansatz hierzu ist die Verwendung von Alkyglycerolen, die abhängig von ihrer Alkyl-Kettenlänge die BHS von Ratten und Mäusen zeit- und konzentationsabhängig öffnen (Erdlenbruch *et al.*, 2003a,b). Die Injektion von 75-300 mM in die Halsschlagader

erhöht die Permeabilität der ipsilateralen Hemisphären stärker als die der kontralateralen und hält für bis zu 2 h an. Hierbei kann keine Präferenz der Penetration von Methotrexat (Zytostatikum in der Chemotherapie) in den Gehirntumor oder des Tumor-freien Gehirngewebes detektiert werden (Erdlenbruch *et al.*, 2000). Allerdings ist auch durch die Applikation von Alkylglycerolen keine größenspezifische Öffnung (0.4-40 kDa) zu erreichen. Eine Toxizität konnte in einer Vielzahl von Studien nicht gezeigt werden. Die Autoren schlugen eine erhöhte parazelluläre Permeabilität aufgrund der Modifikation der TJ vor (Erdlenbruch *et al.*, 2003a). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass keine direkte Modifikation von Cld5 erfolgt.

Die Applikation eines 9 Aminosäuren langen Bradykinin Agonist Peptid (RMP-7, alternative Bezeichnungen: Cereport, Labradimil) führt in Ratten zu einer selektiv erhöhten Aufnahme verschiedener Marker und Wirkstoffe (0,1-70 kDa) in Gehirntumore (Inamura *et al.*, 1994). Die Permeabilität in gesunden Bereichen des Gehirns ist lediglich für kleine Moleküle gegeben und diese entspricht nur 1/10 der Menge im Tumor (Emerich *et al.*, 2001). Die Wirkung konnte sowohl in Tiermodellen, als auch im Menschen nachgewiesen, wobei eine Konzentration von 0,1-1 $\mu$ g/kg intraarteriell oder intravenös verabreicht wurde. Nach einmaliger Applikation ist die erhöhte Permeabilität lediglich für 2 bis 5 min gegeben, das koapplizierte Chemotherapeutikum ist bis zu 90 min nach Injektion erhöht. Hierbei wird von einer Auflösung der TJ ausgegangen (Emerich *et al.*, 2001). Keine Toxizität konnte nachgewiesen werden, sodass dieses Peptid bis zur klinischen Stufe II getestet wurde. Jedoch begrenzt sich die Verwendung dieses Peptids, wie auch die Ansätze der Alkylglycerole und des Mannitols, auf die Behandlung von Gehirntumoren. So konnte auch in dieser Arbeit kein spezifischer Effekt von RMP-7 auf Cld5 gefunden werden. Es wurden eine Reihe von Peptiden synthetisiert und getestet, deren Aminosäuresequenz auf der der TJ-Proteine basiert, wodurch deren Spezifität erhöht werden soll (Nusrat *et al.*, 2005; Mrsny *et al.*, 2008). Das Peptid C1C2 besteht aus 29 Aminosäuren, dessen der Sequenz der EZD1 von Cld1 nachempfunden ist (Zwanziger *et al.*, 2012a). Die Applikation von 300  $\mu$ M dieses Peptides verringerte nach 24 h den TER und erhöhte die Permeabilität gegenüber FD10 und LY in Caco-2 Zellen. In Ratten führte die perineuronale Injektion von 400  $\mu$ M nach 48 h zu einem verbesserten Effekt von hydrophilen Opioid-Rezeptor-Agonisten oder Natriumkanal-Inhibitoren. Durch diese Substanzen wurde die Reizschwelle des Schmerzsinnese erhöht, welches eine gesteigerte Permeabilität der Perineuralschranke belegt. Dementsprechend könnten Sequenzen von TJ-Proteinen der BHS zu dessen Öffnung führen.

Eine Möglichkeit die BHS größenspezifisch zu öffnen wurde mit der Verwendung einer Cld5 spezifischen siRNA erreicht (Campbell *et al.*, 2008). Hierbei gelang es, Moleküle bis zu einer Masse von 1 kDa in das ZNS von Mäuse einzuschleusen (Campbell *et al.*, 2012). Die Injektion von 20  $\mu$ g siRNA komplexiert mit dem kationischen Polymer *in vivo-jetPEI*<sup>TM</sup> (Gesamtvolumen 400  $\mu$ l) in die Schwanzvene der Maus führte zu einer Transfektion der mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns, der Leber und Lunge. In der Folge wurde

die BHS 24-72 h nach der siRNA Applikation geöffnet. Toxische Effekte wurden nicht beobachtet, vielmehr konnte ein Rückgang der Schwellung im Gehirn eines Mausmodells des Schädel-Hirn-Traumas beobachtet werden (Campbell *et al.*, 2012). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine signifikante Reduktion der Cld5 Expression detektiert.

Die Applikation von 15 mM C10 führte innerhalb von 5-35 min zur Öffnung der BHS von Ratten (Preston *et al.*, 2008). Nach 1 h konnten erste Anzeichen der Wiederherstellung der Abdichtungsfunktion festgestellt werden. Somit wirkt C10 wesentlich schneller und zeitlich begrenzter als die siRNA. C10 erhöhte die Permeabilität von Molekülen bis 900 Da stärker als die von größeren Molekülen (Ohnishi *et al.*, 1999). Die Größenspezifität von C10 ist mit der, der siRNA vergleichbar. Jedoch ist eine Injektion in die Halsschlagader (Gesamtvolumen 2 ml in 1 min) so wie die Verwendung von Konzentrationen, die die Konzentration der siRNA um zwei Potenzen übersteigt, notwendig (Preston *et al.*, 2008). Die Rahmen dieser Arbeit dokumentierten Effekte von C10, besonders auf die von Cld5, wurden bereits hinreichend diskutiert (siehe oben). Insgesamt ist eine permeabilitätssteigernde Wirkung von C10 auf die BHS unstrittig, sodass dessen klinische Verwendung hinsichtlich der Verträglichkeit zu prüfen wäre.

Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten oder diskutierten Absorptionsverstärkern, ist BO1 weder tierexperimentell noch klinisch getestet. Jedoch konnte eine hohe Selektivität für Cld5 und eine damit einhergehende Öffnung von Zellbarrieren mit Konzentrationen von 50-100  $\mu$ M gezeigt werden. Für *in vivo* Applikationen müssen diese vermutlich erhöht werden. So ist z.B. eine durchschnittliche Steigerung der Mengen von C10 um das 10-20-fache von *in vitro* zu *in vivo* notwendig (Maher *et al.*, 2009). Im Fall von BO1 entspräche dies Konzentrationen von ca. 1 mM. Im Vergleich zu hyperosmolaren Mannitol wäre dies eine 1.000-fach und zu Alkyglycerolen sowie C10 100-fach niedrigere Konzentration. BO1 erfüllt außerdem die meisten Vorgaben der Lipinski *rule of five*, welches die Eignung einer Substanz für die orale Bioverfügbarkeit vorhersagt (Lipinski *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang ist zu untersuchen, ob BO1 vom Gastrointestinaltrakt in die Blutbahn gelangt. In den Kapillaren des Gehirns kann BO1 vermutlich aufgrund seiner hohen Affinität zu Cld5 und auch Cld3 relativ schnell an die BHS binden. Dieses ist von Vorteil, da die mittlere Passagezeit (zerebrales Blutvolumen/zerebraler Blutfluss) in den Regionen des zerebralen Kortex 3-4 s beträgt (Ibaraki *et al.*, 2007). Gegenüber der siRNA besitzt BO1 den Vorteil, dass die Zellen nicht transfiziert werden müssen. Eine Aufnahme von BO1 ist zwar nicht auszuschließen, aber aufgrund der Bindung zu dem transmembranen Cld5 ist von einer extrazellulären Wirkung auszugehen. Weiterhin ist für siRNA-Applikationen *in vivo* die Aktivierung des Immunsystems und eine Induktion der Produktion von Zytokinen beschrieben (Marques und Williams, 2005). Letztendlich degradiert die siRNA die mRNS von Cld5 und damit dessen Proteingehalt. Für BO1 konnte in den *in vitro* Untersuchungen Anhaltspunkte für eine Internalisierung von Cld5 gefunden werden, sodass dessen Menge nicht reduziert wird. Dieses bietet die Möglichkeit einer schnelleren Regeneration der BHS mit weniger Nebenwirkungen.

## 5. Zusammenfassung

Die Therapie vieler ZNS-Erkrankungen wird durch die schlechte Zugänglichkeit des Gehirngewebes für die meisten Wirkstoffe stark eingeschränkt. Verantwortlich dafür ist die Blut-Hirnschranke (BHS), die durch Endothelzellen der Gehirnkapillaren gebildet wird und die Transportwege streng reguliert, sodass nur ausgewählte Substanzen aus dem Blut in das ZNS gelangen. Andere Substanzen, darunter die meisten Pharmaka, können die BHS nur stark eingeschränkt passieren. Die freie Diffusion durch den parazellulären Spalt wird durch die TJ, einem Multiproteinkomplex, blockiert. Rückgrat dieser TJ sind Cld, wobei Cld5 dominiert. Dieses Protein interagiert mit Cld benachbarter Zellen (*trans*-Interaktion) und dichtet den parazellulären Spalt für Moleküle  $<800$  Da ab. Dieser Größenbereich entspricht den meisten Pharmaka. Hypothese dieser Arbeit ist daher, dass die kurzzeitige Aufhebung der *trans*-Interaktion von Cld5 zu einer gesteigerten sowie größen-spezifischen und transienten Durchlässigkeit der BHS für Wirkstoffe führt.

Dazu wurden Effektoren, welche die Dichtigkeit der BHS manipulieren, gesucht und charakterisiert. So wurde die barriere-öffnende Wirkung von Caprat auf die TJ detailliert untersucht, um dessen Eignung als BHS-Modulator zu prüfen. Für die Auffindung neuer Modulatoren wurde ein Hochdurchsatz-*Screening* (HDS) etabliert und durchgeführt.

Die Versuche wurden initial an TJ-freien HEK-293 Zellen, die stabil mit Cld5-YFP transfiziert waren, durchgeführt. Die Modifikation der Cld5 *trans*-Interaktion konnte somit frei von Interferenzen anderer TJ-Proteine in lebenden Zellen mittels konfokaler Mikroskopie analysiert werden. Für die Wirkung im Kontext funktioneller TJs wurden epitheliale Barriere-Modelle, wie MDCK-II oder Caco-2 Zellen, verwendet, welche entweder stabil mit Cld5 transfiziert waren bzw. endogen Cld5 exprimieren. Um eine Wirkung der Substanzen auf die BHS zu untersuchen, wurden die endotheliale BHS-Modelle bEnd5-Zellen, primäre Gehirn-Kapillar-Endothelzellen und isolierte Kapillaren aus dem Gehirn der Maus verwendet.

Die Untersuchungen ergaben, dass die bisher bestehende Vorstellung zum Wirkmechanismus von Caprat erweitert werden muss. Es konnte gezeigt werden, dass Caprat die *trans*-Interaktion von Cld5 und dessen subzelluläre Lokalisation, sowie den Gehalt von F-Aktin über einen unabhängigen Wirkmechanismus in MDCK-II-Cld5 und bEnd5 Zellen reduzierte. Die Wirkung auf Cld5 war reversibel sowie zeit- und konzentrationsabhängig. Das Gerüstprotein ZO-1, welches Cld5 mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet, verblieb in den epi- und endothelialen Zellen an den Zell-Zellkontakten. Die parazelluläre Permeabilität eines Modellmoleküls (*Lucifer Yellow*, 457 Da) war in MDCK-II-Cld5 Zellen nach der Inkubation mit Caprat erhöht. Somit wirkte Caprat in einem Konzentrationsbereich von 5-10 mM direkt auf Cld5 und führte so zu einer erhöhten Permeabilität gegenüber kleinen Molekülen. Interessanterweise wirkte Caprat der Kontraktion des apikalen Aktinrings nach extrazellulären Kalzium- und Magnesiumentzug entgegen. Somit schien Caprat unter bestimmten Bedingungen auch eine protektive Wirkung auf Barrieren auszuüben. Mittels HDS konnte eine weitere Substanz (BO1) identifiziert werden, welche die *trans*-Interaktion von Cld5 in allen untersuchten Zelllinien hemmte. Die Substanz wirkte im  $\mu\text{M}$

Konzentrationsbereich nach 3-17 h. Sie verringerte den TER und erhöhte die Permeabilität von LY. Diese Effekte waren konzentrations- und zeitabhängig, sowie spezifisch für Cld5 exprimierende Zellen. Zytotoxische Effekte konnten nicht beobachtet werden, vielmehr war die Wirkung reversibel. Aufgrund der Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie wurde eine Internalisierung von Cld5 nach Inkubation angenommen.

Zusammenfassend sind sowohl Caprat als auch BO1 geeignete Kandidaten für die Manipulation von Cld5 und folglich der BHS *in vivo*. Zu diesem Zweck wurden Versuche aufgenommen, um die Wirkung von Caprat und BO1 auf die BHS tierexperimentell zu prüfen.

## 6. Summary

The effective therapy and treatment of many cerebral diseases is often hindered by the blood-brain barrier (BBB) which is formed by cerebral capillar endothelial cells and is essential for the homeostasis of the central nervous system. Both the transcellular transport as well as the paracellular permeability are controlled by the BBB so that only very few substances are taken up. Most pharmaceuticals can only pass through the BBB in limited amounts. The free diffusion through the paracellular space is regulated through a multi-protein complex, the TJ. The backbone of the TJ are Clds, whereby Cld5 is dominating. This specific protein interacts with other Cld molecules expressed in neighboring cells (*trans*-interaction) and closes the paracellular space for molecules <800 Da. This is the range of the majority of pharmaceuticals. The hypothesis of this work is to explore the possibility of short-term suspension of the *trans*-interaction of Cld5 and therefore of a larger, size-specific and transient permeability of the BBB for pharmaceuticals.

Therefore various molecules which affect the permeability of the BBB were investigated and characterized. Known molecules like caprate were explored to open cellular barriers via the TJ and its suitability as a BBB modulator. For the discovery of new modulators, a HTS (high throughput screening) was established and implemented.

In order to investigate the modification of Cld5 *trans*-interactions without the interference of other TJ-proteins in living cells the TJ-free HEK-293 cells stably expressing Cld5-YFP were analyzed confocal microscopically. For the effectiveness of the investigated molecules in the context of TJs, cell barrier models, such as Caco-2 and MDCK-II, were used expressing endogenous Cld5 and stably transfected with Cld5, respectively. In order to explore the effectiveness of a substance on the BBB, endothelial BBB models, bEnd5, primary brain capillary endothelial cells and isolated capillary from mice brains were used.

The results showed that the previously proposed mode of action of caprate is not applicable to all cell lines overall. It was now shown that caprate reduced the *trans*-interaction of Cld5 and the junctional localization, as well as the concentration of F-actin via an independent mode of action in MDCK-II-Cld5 and bEnd5 cells. The effect on Cld5 was time- and concentration-dependent, and fully reversible. The scaffold protein ZO-1, which connects Cld5 with the actin cytoskeleton, remained at the cell junctions in the epithelial and endothelial cells. However, caprate increased the permeability of lucifer yellow (LY, 457 Da) in MDCK-II-Cld5 cells. Consequently, as a result of the effect on Cld5 *trans*-interaction and actin cytoskeleton, caprate led to an increase of permeability with respect to small molecules, in a concentration range of 5-10 mM. Interestingly, caprate counteracted the contraction of apical actin-rings after extra-cellular extraction of calcium and magnesium. Thus, caprate also appears to have a protective function on barriers under certain circumstances.

A further substance (BO1) was identified which inhibited the *trans*-interaction of Cld5 in all cell lines investigated. The substance was active in  $\mu\text{M}$  concentration after 3-15 h. It lowered the trans-epithelial resistance and increased the permeability of LY. These effects were concentration and time dependent as well as Cld5 specific. No cytotoxic effects was

observed and the effect was reversible. Based on the results, internalization of Cld5 after incubation has been assumed.

It can be concluded that caprate, as well as BO1, are both promising candidates for the manipulation of Cld5 and, as a result, the BBB *in vivo*. For this purpose, further studies on the effectiveness of caprate and BO1 on animals have been initiated.

## Literaturverzeichnis

- Abbott, N. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol. Neurobiol.*, 25:5–23.
- Abuazza, G., Becker, A., Williams, S., Chakravarty, S., Truong, H., Lin, F., und Baum, M. (2006). Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 291:F1132–41.
- Acharya, P., Beckel, J., Ruiz, W., Wang, E., Rojas, R., Birder, L., und Apodaca, G. (2004). Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 287:F305–18.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Boivin, M., Guo, S., Hashimi, M., Ereifej, L., und Ma, T. (2014). Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One.*, 9:e85345.
- Alexandre, M., Lu, Q., und Chen, Y. (2005). Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells. *J. Cell Sci.*, 118:2683–93.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J., und Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 15:4969–76.
- Amasheh, S., Schmidt, T., Mahn, M., Florian, P., Mankertz, J., Tavalali, S., Gitter, A., Schulzke, J., und Fromm, M. (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.*, 321:89–96.
- Anderberg, E., Lindmark, T., und Artursson, P. (1993). Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharm. Res.*, 10:857–64.
- Anderson, W., Zhou, Q., Alcalde, V., Kaneko, O., Blank, L., Sherwood, R., Guseh, J., Rajagopal, J., und Melton, D. (2008). Genetic targeting of the endoderm with claudin-6CreER. *Dev. Dyn.*, 237:504–12.
- Andreeva, A., Piontek, J., Blasig, I., und Utepbergenov, D. (2006). Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38:222–233.
- Angelow, S., El-Husseini, R., Kanzawa, S., und Yu, A. (2007). Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 293:F166–77.
- Artursson, P. und Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175:880–5.
- Baaske, P., Wienken, C., Reineck, P., Duhr, S., und Braun, D. (2010). Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 49:2238–41.
- Balda, M., Whitney, J., Flores, C., González, S., Cerejido, M., und Matter, K. (1996).

- Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.*, 134:1031–49.
- Bandyopadhyay, S., Ni, J., Ruggiero, A., Walshe, K., Rogers, M., Chattopadhyay, N., Glicksman, M., und Rogers, J. (2006). Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. *J. Biomol. Screen.*, 11:469–80.
- Bellmann, C., Schreivogel, S., Günther, R., Dabrowski, S., Schümann, M., Wolburg, H., und Blasig, I. (2014). Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin-redox dependency of the second extracellular loop. *Antioxid Redox Signal.*, 20:855–67.
- Ben-Yosef, T., Belyantseva, I., Saunders, T., Hughes, E., Kawamoto, K., Van Itallie, C., Beyer, L., Halsey, K., Gardner, D., Wilcox, E., Rasmussen, J., Anderson, J., Dolan, D., Forge, A., Raphael, Y., Camper, S., und Friedman, T. (2003). Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, 12:2049–61.
- Black, C., Duensing, T., Trinkle, L., und Dunlay, R. (2011). Cell-based screening using high-throughput flow cytometry. *Assay Drug Dev. Technol.*, 9:13–20.
- Blasig, I., Bellmann, C., Cording, J., Del Vecchio, G., Zwanziger, D., Huber, O., und Haseloff, R. (2011). Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxid. Redox Signaling*, 15:1195–219.
- Blasig, I., Winkler, L., Lassowski, B., Mueller, S., Zuleger, N., Krause, E., Krause, G., Gast, K., Kolb, M., und Piontek, J. (2006). On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63:505–514.
- Blucher, A. und McWeeney, S. (2014). Challenges in secondary analysis of high throughput screening data. *Pac. Symp. Biocomput.*, x:114–24.
- Brandsch, M., Knütter, I., und Bosse-Doenecke, E. (2008). Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. *J. Pharm. Pharmacol.*, 60:543–85.
- Brown, D. und London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14:111–36.
- Brown, R. und Davis, T. (2002). Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*, 33:1706–11.
- Brown, R., Mark, K., Egleton, R., Huber, J., Burroughs, A., und Davis, T. (2003). Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFkappaB. *J. Cell Sci.*, 116:693–700.
- Buschmann, M., Shen, L., Rajapakse, H., Raleigh, D., Wang, Y., Wang, Y., Lingaraju, A., Zha, J., Abbott, E., McAuley, E., Breskin, L., Wu, L., Anderson, K., Turner, J., und Weber, C. (2013). Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol. Biol. Cell.*, 24:3056–68.

- Campbell, M., Hanrahan, F., Gobbo, O., Kelly, M., Kiang, A., Humphries, M., Nguyen, A., Ozaki, E., Keaney, J., Blau, C., Kerskens, C., Cahalan, S., Callanan, J., Wallace, E., Grant, G., Doherty, C., und Humphries, P. (2012). Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. *Nat. Commun.*, 3:849.
- Campbell, M., Kiang, A., Kenna, P., Kerskens, C., Blau, C., O'Dwyer, L., Tivnan, A., Kelly, J., Brankin, B., Farrar, G., und Humphries, P. (2008). RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *J Gene Med.*, 10:930–47.
- Campbell, M., Nguyen, A., Kiang, A., Tam, L., Gobbo, O., Kerskens, C., Ni Dhubghaill, S., Humphries, M., Farrar, G., Kenna, P., und Humphries, P. (2009). An experimental platform for systemic drug delivery to the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 106:17817–22.
- Casas, E., Barron, C., Francis, S., McCormack, J., McCarthy, K., und Schneeberger, E.E. Lynch, R. (2010). Cholesterol efflux stimulates metalloproteinase-mediated cleavage of occludin and release of extracellular membrane particles containing its C-terminal fragments. *Exp. Cell Res.*, 316:353–65.
- Chao, A., Nguyen, J., Broughall, M., Griffin, A., Fix, J., und Daddona, P. (1999). In vitro and in vivo evaluation of effects of sodium caprate on enteral peptide absorption and on mucosal morphology. *Int. J. Pharm.*, 191:15–24.
- Chung, N., Mruk, D., Mo, M., Lee, W., und Cheng, C. (2001). A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. *Biol. Reprod.*, 65:1340–51.
- Colegio, O., Van Itallie, C., McCrea, H., Rahner, C., und Anderson, J. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283:142–7.
- Colegio, O., Van Itallie, C., Rahner, C., und Anderson, J. (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 284:C1346–54.
- Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J., Milatz, S., Günzel, D., Wolburg, H., Piontek, J., Huber, O., und Blasig, I. (2013). In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J. Cell Sci.*, 126:554–64.
- Coyne, C., Gambling, T., Boucher, R., Carson, J., und Johnson, L. (2003a). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 285:L1166–78.
- Coyne, C., Kelly, M., Boucher, R., und Johnson, L. (2000). Enhanced epithelial gene transfer by modulation of tight junctions with sodium caprate. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 23:602–609.
- Coyne, C., Ribeiro, C., Boucher, R., und Johnson, L. (2003b). Acute mechanism of medium chain fatty acid-induced enhancement of airway epithelial permeability. *J.*

- Pharmacol. Exp. Ther.*, 305:440–450.
- Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F., und Dragic, T. (2009). Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *J. Virol.*, 83:5477–84.
- Culot, M., Lundquist, S., Vanuxeem, D., Nion, S., Landry, C., Delplace, Y., Dehouck, M., Berezowski, V., Fenart, L., und Cecchelli, R. (2008). An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro.*, 2:799–811.
- Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J., und Arnaud, P. (2002). Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.*, 25:1600–3.
- Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J., Kaushal, A., und Barres, B. (2010). The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One.*, 5:e13741.
- Daugherty, B., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J., und Koval, M. (2007). Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem.*, 282:30005–13.
- De Benedetto, A., Rafaels, N., McGirt, L., Ivanov, A., Georas, S., Cheadle, C., Berger, A., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L., Hanifin, J., Gallo, R., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T., Leung, D., Barnes, K., und Beck, L. (2011). Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 127:773–86.
- Del Vecchio, G., Tscheik, C., Tenz, K., Helms, H., Winkler, L., Blasig, R., und Blasig, I. (2012). Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Mol. Pharm.*, 9:2523–33.
- Deli, M. (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1788:892–910.
- Deli, M., Abrahám, C., Kataoka, Y., und Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol. Neurobiol.*, 25:59–127.
- Di, Z., Herpers, B., Fredriksson, L., Yan, K., van de Water, B., Verbeek, F., und Meerman, J. (2012). Automated analysis of NF- $\kappa$ B nuclear translocation kinetics in high-throughput screening. *PLoS One.*, 7:e52337.
- Dörfel, M. und Huber, O. (2012). Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012:2012:807356.
- Duhr, S. und Braun, D. (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103:19678–82.
- Dukes, J., Whitley, P., und Chalmers, A. (2011). The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.*, 12:1471–2121–12–43.
- Emerich, D., Dean, R., Osborn, C., und Bartus, R. (2001). The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-

- brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin. Pharmacokinet.*, 40:105–23.
- Enck, A., Berger, U., und Yu, A. (2001). Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281:F966–74.
- Erdlenbruch, B., Alipour, M., Fricker, G., Miller, D., Kugler, W., Eibl, H., und Lakomek, M. (2003a). Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br. J. Pharmacol.*, 140:1201–10.
- Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Eibl, H., und Lakomek, M. (2000). Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. *Exp. Brain Res.*, 135:417–22.
- Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Kugler, W., Eibl, H., und Lakomek, M. (2002). Increased delivery of erucylphosphocholine to C6 gliomas by chemical opening of the blood-brain barrier using intracarotid pentylglycerol in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 50:299–304.
- Erdlenbruch, B., Schinkhof, C., Kugler, W., Heinemann, D., Herms, J., Eibl, H., und Lakomek, M. (2003b). Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *Br J Pharmacol.*, 139:685–94.
- Everett, R., Vanhook, M., Barozzi, N., Toth, I., und Johnson, L. (2006). Specific modulation of airway epithelial tight junctions by apical application of an occludin peptide. *Mol Pharmacol.*, 69:492–500.
- Fanning, A., Jameson, B., Jesaitis, L., und Anderson, J. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 273:29745–53.
- Feighery, L., Cochrane, S., Quinn, T., Baird, A., O’Toole, D., Owens, S., O’Donoghue, D., Mrsny, R., und Brayden, D. (2008). Myosin light chain kinase inhibition: correction of increased intestinal epithelial permeability *in vitro*. *Pharm. Res.*, 25:1377–1386.
- Fielding, C. (2001). Caveolae and signaling. *Curr. Opin. Lipidol.*, 12:281–7.
- Frömter, E. und Diamond, J. (1972). Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat. New Biol.*, 235:9–13.
- Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., Kojima, T., Yamashita, T., und Sawada, N. (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J. Histochem. Cytochem.*, 54:933–44.
- Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N., und Chiba, H. (2008). Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes. *Mol. Biol. Cell.*, 19:1912–2.
- Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2:a002907.

- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., und Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, 141:1539–50.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., und Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 156:1099–111.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., und Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, 123:1777–88.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., und Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.*, 127:1617–26.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., und Tsukita, S. (1998b). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 143:391–401.
- Furuse, M., Sasaki, H., und Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.*, 147:891–903.
- Ghose, A., Viswanadhan, V., und Wendoloski, J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.*, 1:55–68.
- Giacomotto, J. und Ségalat, L. (2010). High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br. J. Pharmacol.*, 160:204–16.
- Günzel, D., Stuver, M., Kausalya, P., Haisch, L., Krug, S., Rosenthal, R., Meij, I., Hunziker, W., Fromm, M., und Müller, D. (2009). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J. Cell Sci.*, 122:1507–17.
- Günzel, D. und Yu, A. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.*, 93:525–69.
- Gong, Y., Renigunta, V., Himmerkus, N., Zhang, J., Renigunta, A., Bleich, M., und Hou, J. (2012). Claudin-14 regulates renal Ca<sup>2+</sup> transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J.*, 31:1999–2012.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., und Jaramillo, B. (2003). Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 81:1–44.
- Gow, A., Southwood, C., Li, J., Pariali, M., Riordan, G., Brodie, S., Danias, J., Bronstein, J., Kachar, B., und Lazzarini, R. (1999). CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell.*, 99:649–59.
- Gregor, A., Lind, M., Newman, H., Grant, R., Hadley, D., Barton, T., und Osborn, C. (1999). Phase II studies of RMP-7 and carboplatin in the treatment of recurrent high grade glioma. RMP-7 European Study Group. *J. Neurooncol.*, 44:137–45.

- Grosse, B., Cassio, D., Yousef, N., Bernardo, C., Jacquemin, E., und Gonzales, E. (2012). Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology.*, 55:1249–59.
- Guan, X., Inai, T., und Shibata, Y. (2005). Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch. Histol. Cytol.*, 68:213–25.
- Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M., und Smahi, A. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology.*, 127:1386–90.
- Hansen, G., Niels-Christiansen, L., Thorsen, E., Immerdal, L., und Danielsen, E. (2000). Cholesterol depletion of enterocytes. Effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking. *J. Biol. Chem.*, 18:5136–42.
- Hashizume, A., Ueno, T., Furuse, M., Tsukita, S., Nakanishi, Y., und Hieda, Y. (2004). Expression patterns of claudin family of tight junction membrane proteins in developing mouse submandibular gland. *Dev. Dyn.*, 231:425–31.
- Hayashi, D., Tamura, A., Tanaka, H., Yamazaki, Y., Watanabe, S., Suzuki, K., Suzuki, K., Sentani, K., Yasui, W., Rakugi, H., Isaka, Y., und Tsukita, S. (2012). Deficiency of claudin-18 causes paracellular H<sup>+</sup> leakage, up-regulation of interleukin-1?, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology.*, 142:292–304.
- He, P., Zeng, M., und Curry, F. (2000). Dominant role of cAMP in regulation of microvessel permeability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 278:H1124–33.
- Helenius, A. und Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta.*, 415:29–79.
- Hewitt, K., Agarwal, R., und Morin, P. (2006). The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer.*, 6:186.
- Hiesiger, E., Voorhies, R., Basler, G., Lipschutz, L., Posner, J., und Shapiro, W. (1986). Opening the blood-brain and blood-tumor barriers in experimental rat brain tumors: the effect of intracarotid hyperosmolar mannitol on capillary permeability and blood flow. *BMC Cancer.*, 19:50–9.
- Hochmana, J. und Artursson, P. (1994). Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. Control. Release.*, 29:253–267.
- Holmes, J., Van Itallie, C., Rasmussen, J., und Anderson, J. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr. Patterns.*, 6:581–8.
- Hou, J., Gomes, A., Paul, D., und Goodenough, D. (2006). Study of claudin function by RNA interference. *J. Biol. Chem.*, 281:36117–23.
- Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A., Hou, M., Paul, D., Waldegger, S., und Goodenough, D. (2009). Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S*

- A., 106:15350–5.
- Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A., Schneeberger, E., Paul, D., Waldegger, S., und Goodenough, D. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J. Clin. Invest.*, 118:619–28.
- Hou, J., Renigunta, A., Yang, J., und Waldegger, S. (2010). Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107:18010–5.
- Hussain, A., Arnold, J., Khan, M., und Ahsan, F. (2004). Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J. Control Release.*, 94:15–24.
- Ibaraki, M., Ito, H., Shimosegawa, E., Toyoshima, H., Ishigame, K., Takahashi, K., Kanno, I., und Miura, S. (2007). Cerebral vascular mean transit time in healthy humans: a comparative study with PET and dynamic susceptibility contrast-enhanced MRI. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 27:404–13.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., und Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 117:939–45.
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M., und Tsukita, S. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol. Biol. Cell.*, 19:4687–93.
- Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., und Tsukita, S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J. Cell Biol.*, 176:779–86.
- Inai, T., Kamimura, T., Hirose, E., Iida, H., und Shibata, Y. (2010). The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. *Eur. J. Cell Biol.*, 89:547–56.
- Inai, T., Kobayashi, J., und Shibata, Y. (1999). Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 78:849–55.
- Inamura, T., Nomura, T., Bartus, R., und Black, K. (1994). Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors. *J. Neurosurg.*, 81:752–8.
- Inoue, T., Fukui, M., Nishio, S., Kitamura, K., und Nagara, H. (1987). Hyperosmotic blood-brain barrier disruption in brains of rats with an intracerebrally transplanted RG-C6 tumor. *J. Neurosurg.*, 66:256–63.
- Ishizaki, T., Chiba, H., Kojima, T., Fujibe, M., Soma, T., Miyajima, H., Nagasawa, K., Wada, I., und Sawada, N. (2003). Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp. Cell Res.*, 290:275–88.
- Itagaki, K., Zhang, Q., und Hauser, C. (2010). Sphingosine kinase inhibition alleviates endothelial permeability induced by thrombin and activated neutrophils. *Shock.*, 33:381–6.

- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., und Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.*, 147:1351–63.
- Iwamoto, N., Higashi, T., und Furuse, M. (2014). Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell Struct. Funct.*, 39:1–8.
- Jacob, S. und de la Torre, J. (2009). Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacol. Rep.*, 61:225–35.
- Jakab, C., Kiss, A., Schaff, Z., Szabó, Z., Rusvai, M., Gálfi, P., Szabára, A., Sterczer, A., und Kulka, J. (2010). Claudin-7 protein differentiates canine cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *Histol. Histopathol.*, 25:857–64.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C., Braun, D., Baaske, P., und Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.*, 9:342–53.
- Jiang, W., Bryce, R., Horrobin, D., und Mansel, R. (1998). Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244:414–20.
- Jorgensen, J., Holtug, K., Jeppesen, P., und Mortensen, P. (1998). Human rectal absorption of short- and medium-chain C2-C10 fatty acids. *Scand. J. Gastroenterol.*, 33:590–4.
- Jovov, B., Van Itallie, C., Shaheen, N., Carson, J., Gambling, T., Anderson, J., und Orlando, R. (2007). Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett’s esophagus and likely contributor to its acid resistance. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293:G1106–13.
- Kaarteenaho-Wiik, R. und Soini, Y. (2009). Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J. Histochem. Cytochem.*, 57:187–95.
- Karnovsky, M. (1967). The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.*, 35:213–36.
- Kinne, R. (1997). Endothelial and epithelial cells: general principles of selective vectorial transport. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 17:223–30.
- Kitajiri, S., Furuse, M., Morita, K., Saishin-Kiuchi, Y., Kido, H., Ito, J., und Tsukita, S. (2004). Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res.*, 187:25–34.
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., und Tsukita, S. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13:875–86.
- Kluger, M., Clark, P., Tellides, G., Gerke, V., und J.S., P. (2013). Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 33:489–500.
- Koda, R., Zhao, L., Yaoita, E., Yoshida, Y., Tsukita, S., Tamura, A., Nameta, M., Zhang,

- Y., Fujinaka, H., Magdeldin, S., Xu, B., Narita, I., und Yamamoto, T. (2011). Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res.*, 343:637–48.
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J., Becker, C., Schlingmann, K., M., S., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakkaloglu, S., Hediger, M., Gallati, S., Neuhauss, S., Nurnberg, P., und Weber, S. (2006). Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am. J. Hum. Genet.*, 79:949–57.
- Korade, Z. und Kenworthy, A. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology.*, 55:1265–73.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S., Haseloff, R., Piontek, J., und Blasig, I. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778:631–645.
- Kriegs, J., Homann, V., Kinne-Saffran, E., und Kinne, R. (2007). Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands. *Histochem. Cell Biol.*, 128:45–53.
- Krug, S., Amasheh, M., Dittmann, I., Christoffel, I., Fromm, M., und Amasheh, S. (2013). Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials.*, 34:275–82.
- Krug, S., Amasheh, S., Richter, J., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J., Huber, O., Schulzke, J., und Fromm, M. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell.*, 20:3713–24.
- Krug, S., Günzel, D., Conrad, M., Rosenthal, R., Fromm, A., Amasheh, S., Schulzke, J., und Fromm, M. (2012). Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol. Life Sci.*, 69:2765–78.
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., und Amagai, M. (2009). External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.*, 206:2937–46.
- Kurasawa, M., Kuroda, S., Kida, N., Murata, M., Oba, A., Yamamoto, T., und Sasaki, H. (2009). Regulation of tight junction permeability by sodium caprate in human keratinocytes and reconstructed epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381:171–5.
- Lambert, D., O'Neill, C., und Padfield, P. (2007). Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. *Cell Physiol. Biochem.*, 16:4992–5003.
- Lapré, J., Termont, D., Groen, A., und Van der Meer, R. (1992). Lytic effects of mixed micelles of fatty acids and bile acids. *Am. J. Physiol.*, 236:G333–7.
- Lasbennes, F. und Gayet, J. (1984). Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. *Neurochem. Res.*, 9:1–10.
- Laurila, J., Karttunen, T., Koivukangas, V., Laurila, P., Syrjälä, H., Saarnio, J., Soini, Y., und Ala-Kokko, T. (2007). Tight junction proteins in gallbladder epithelium: different

- expression in acute acalculous and calculous cholecystitis. *J. Histochem. Cytochem.*, 55:567–73.
- Leonard, T., Lynch, J., McKenna, M., und Brayden, D. (2006). Promoting absorption of drugs in humans using medium-chain fatty acid-based solid dosage forms: GIPET. *xpert Opin. Drug Delivery*, 3:685–692.
- Li, H., Singh, S., Potula, R., Persidsky, Y., und Kanmogne, G. (2012). Dysregulation of Claudin-5 in HIV-induced Interstitial Pneumonitis and Lung Vascular Injury: Protective Role of PPAR-gamma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 3:DOI: 10.1164/rccm.2011106–1151OC.
- Li, W., Huey, C., und Yu, A. (2004). Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 286:F1063–71.
- Linares, G., Brommage, R., Powell, D., Xing, W., Chen, S., Alshbool, F., Lau, K., Wergedal, J., und Mohan, S. (2012). Claudin 18 is a novel negative regulator of bone resorption and osteoclast differentiation. *J. Bone Miner Res.*, 27:1553–65.
- Lindmark, T., Kimura, Y., und Artursson, P. (1998). Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284:362–369.
- Lindmark, T., Nikkila, T., und Artursson, P. (1995). Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275:958–964.
- Lindmark, T., Söderholm, J., Olaison, G., Alván, G., Ocklind, G., und Artursson, P. (1997). Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate. *Pharm Res.*, 14:930–5.
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., und Feeney, P. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46:3–26.
- Lynch, R., Francis, S., McCarthy, K., Casas, E., Thiele, C., und Schneeberger, E. (2007). Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Exp. Cell Res.*, 313:2597–610.
- Ma, T., Tran, D., Hoa, N., Nguyen, D., Merryfield, M., und Tarnawski, A. (2000). Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc. Res. Tech.*, 51:156–68.
- Madara, J., Moore, R., und Carlson, S. (1987). Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am. J. Physiol.*, 253:C854–61.
- Maher, S., Leonard, T., Jacobsen, J., und Brayden, D. (2009). Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from in vitro to the clinic. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 61:1427–1449.
- Makley, L. und Gestwicki, J. (2013). Expanding the number of 'druggable' targets: non-enzymes and protein-protein interactions. *Chem. Biol. Drug Des.*, 81:22–32.

- Malo, N., Hanley, J., Cerquozzi, S., Pelletier, J., und Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat. Biotechnol.*, 24:167–75.
- Mandel, I., Paperna, T., Volkowich, A., Merhav, M., Glass-Marmor, L., und Miller, A. (2012). The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation. *J. Cell Biochem.*, 113:2415–23.
- Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D., und Brito, M. (2011). A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol.*, 90:787–96.
- Markov, A., Kruglova, N., Fomina, Y., Fromm, M., und Amasheh, S. (2012). Altered expression of tight junction proteins in mammary epithelium after discontinued suckling in mice. *Pflugers Arch.*, 463:391–8.
- Marques, J. und Williams, B. (2005). Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotechnol.*, 23:1399–405.
- Martin, H., Adams, M., Higgins, J., Bond, J., Morrison, E., Bell, S., Warriner, S., Nelson, A., und Tomlinson, D. (2014). High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers. *PLoS One.*, 9:e88338.
- Martin, T., Das, T., Mansel, R., und Jiang, W. (2006). Synergistic regulation of endothelial tight junctions by antioxidant (Se) and polyunsaturated lipid (GLA) via Claudin-5 modulation. *J. Cell Biochem.*, 98:1308–19.
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., und Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 124:548–55.
- McCaffrey, G., Seelbach, M., Staatz, W., Nametz, N., Quigley, C., Campos, C., Brooks, T., und Davis, T. (2008). Occludin oligomeric assembly at tight junctions of the blood-brain barrier is disrupted by peripheral inflammatory hyperalgesia. *J. Neurochem.*, 106:2395–409.
- McCarthy, K., Skare, I., Stankewich, M., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R., Lynch, R., und Schneeberger, E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell. Sci.*, 109:2287–98.
- Mehta, D. und Malik, A. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.*, 86:279–367.
- Meng, J., Holdcraft, R., Shima, J., Griswold, M., und Braun, R. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102:16696–700.
- Michel, C. und Curry, F. (1999). Microvascular permeability. *Physiol. Rev.*, 79:703–61.
- Michikawa, H., Fujita-Yoshigaki, J., und Sugiyama, H. (2008). Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res.*, 334:255–64.
- Milatz, S., Krug, S., Rosenthal, R., Günzel, D., Müller, D., Schulzke, J., Amasheh, S.,

- und Fromm, M. (2010). Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1798:2048–57.
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., und Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.*, 585:606–612.
- Miyamoto, T., Morita, K., Takemoto, D., Takeuchi, K., Kitano, Y., Miyakawa, T., Nakayama, K., Okamura, Y., Sasaki, H., Miyachi, Y., Furuse, M., und Tsukita, S. (2005). Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 169:527–38.
- Miyoshi, J. und Takai, Y. (2005). Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57:815–55.
- Mori, K. (1953). Production of gastric lesions in the rat by the diet containing fatty acids. *Gan.*, 44:421–7.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., und Tsukita, S. (1999a). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 96:511–6.
- Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M., und Tsukita, S. (1999b). Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J. Cell Biol.*, 145:579–88.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., und Tsukita, S. (1999c). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 147:185–94.
- Mrsny, R., Brown, G., Gerner-Smidt, K., Buret, A., Meddings, J., Quan, C., Koval, M., und Nusrat, A. (2008). A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *Am. J. Pathol.*, 172:905–15.
- Muller, S., Portwich, M., Schmidt, A., Utepbergenov, D., Huber, O., Blasig, I., und Krause, G. (2005). The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J. Biol. Chem.*, 280:3747–3756.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115:377–88.
- Muto, S., Hata, M., Taniguchi, J., Tsuruoka, S., Moriwaki, K., Saitou, M., Furuse, K., Sasaki, H., Fujimura, A., Imai, M., Kusano, E., Tsukita, S., und Furuse, M. (2010). Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107:8011–6.
- Nag, S. (2003). The Blood-brain Barrier: Biology and Research Protocols. *Methods in molecular medicine*.
- Nakano, Y., Kim, S., Kim, H., Sanneman, J., Zhang, Y., Smith, R., Marcus, D., Wangemann, P., Nessler, R., und Bánfi, B. (2009). A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet.*, 5:e1000610.

- Nübel, T., Preobraschenski, J., Tuncay, H., Weiss, T., Kuhn, S., Ladwein, M., Langbein, L., und Zöller, M. (2009). Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol. Cancer Res.*, 7:285–99.
- Neal, C. und Bates, D. (2002). Measurement of hydraulic conductivity of single perfused *Rana* mesenteric microvessels between periods of controlled shear stress. *J. Physiol.*, 543:947–57.
- Newton, R. und Vaddi, K. (1997). Biological responses to C-C chemokines1. *Methods Enzymol.*, 287:174–86.
- Niimi, T., Nagashima, K., Ward, J., Minoo, P., Zimonjic, D., Popescu, N., und Kimura, S. (2001). claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol. Cell Biol.*, 21:7380–90.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., und Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 161:653–660.
- Németh, Z., Szász, A., Tátrai, P., Németh, J., Gyorffy, H., Somorácz, A., Szjártó, A., Kupcsulik, P., Kiss, A., und Schaff, Z. (2009). Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers. *J. Histochem. Cytochem.*, 57:113–21.
- Nusrat, A., Brown, G., Tom, J., Drake, A., Bui, T., Quan, C., und Mrsny, R. (2005). Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin. *Mol. Biol. Cell.*, 16:1725–34.
- Nusrat, A., Parkos, C., Verkade, P., Foley, C., Liang, T., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K., und Madara, J. (2000). Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.*, 113:1771–81.
- Ohnishi, T., Aida, K., und Awazu, S. (1999). Enhancement of blood-brain barrier permeability by sodium caprate. *Pharm. Pharmacol.*, 51:1015–1018.
- Ohtsuki, S., Yamaguchi, H., Katsukura, Y., Asashima, T., und Terasaki, T. (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J. Neurochem.*, 104:147–54.
- Oro, L. und Wretling, A. (1961). Pharmacological effects of fatty acids, triolein and cottonseed oil. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, 18:141–52.
- Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H., und Miyazono, K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, 193:299–318.
- Pan, J., Chen, Q., Willenbring, D., Yoshida, K., Tillman, T., Kashlan, O., Cohen, A., Kong, X., Xu, Y., und Tang, P. (2012). Structure of the pentameric ligand-gated ion channel ELIC cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine. *Nat Commun.*, 3:714.
- Pardridge, W. (2003). Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development.

- Mol. Interv.*, 3:90–105.
- Pardridge, W. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2:3–14.
- Pepperkok, R. und Ellenberg, J. (2006). High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7:690–6.
- Perera, G., Barthelmes, J., Vetter, A., Krieg, C., Uhlschmied, C., Bonn, G., und Bernkop-Schnürch, A. (2011). Thiolated polycarbophil/glutathione: defining its potential as a permeation enhancer for oral drug administration in comparison to sodium caprate. *Drug Deliv.*, 18:415–23.
- Petrus, A., Allis, D., Smith, R., Fairchild, T., und Doyle, R. (2009). Exploring the implications of vitamin B12 conjugation to insulin on insulin receptor binding. *ChemMedChem.*, 4:421–6.
- Piehl, C., Piontek, J., Cording, J., Wolburg, H., und Blasig, I. (2010). Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell Mol. Life Sci.*, 67:2131–2140.
- Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J., Gehring, C., Rahn, H., Wolburg, H., und Blasig, I. (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68:3903–3918.
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Muller, S., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., und Blasig, I. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.*, 22:146–158.
- Powell, D. (1981). Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.*, 241:G275–88.
- Preston, E., Slinn, J., Vinokourov, I., und Stanimirovic, D. (2008). Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *J. Neurosci. Methods*, 168:443–449.
- Rahner, C., Mitic, L., und Anderson, J. (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120:411–422.
- Raleigh, D., Marchiando, A., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., und Turner, J. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell.*, 21:1200–13.
- Raof, A., Ramtoola, Z., McKenna, B., Yu, R., Hardee, G., und Geary, R. (2002). Effect of sodium caprate on the intestinal absorption of two modified antisense oligonucleotides in pigs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 17:131–8.
- Rapoport, S., Fredericks, W., Ohno, K., und Pettigrew, K. (1980). Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.*, 238:R421–31.
- Reese, T. und Karnovsky, M. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 34:207–17.

- Rüffer, C. und Gerke, V. (2004). The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur. J. Cell Biol.*, 83:135–44.
- Riazuddin, S., Ahmed, Z., Fanning, A., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Khan, S., Chattaraj, P., Friedman, P., Anderson, J., Belyantseva, I., Forge, A., Riazuddin, S., und Friedman, T. (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am. J. Hum. Genet.*, 79:1040–51.
- Rossa, J., Ploeger, C., Vorreiter, F., Saleh, T., Protze, J., Günzel, D., Wolburg, H., Krause, G., und Piontek, J. (2014). Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments. *J. Biol. Chem.*, 289:7641–53.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., und Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.*, 11:4131–42.
- Sakai, M., Imai, T., Ohtake, H., Azuma, H., und Otagiri, M. (1998a). Effects of absorption enhancers on cytoskeletal actin filaments in Caco-2 cell monolayers. *Life Sci.*, 63:45–54.
- Sakai, M., Imai, T., Ohtake, H., und Otagiri, M. (1998b). Cytotoxicity of absorption enhancers in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Pharmacol.*, 50:1101–8.
- Samuel, B., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M., und Haldar, K. (2001). The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J. Biol. Chem.*, 3:29319–29.
- Sas, D., Hu, M., Moe, O., und Baum, M. (2008). Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295:R1713–9.
- Sauer, R., Krug, S., Hackel, D., Staat, C., Konasin, N., Yang, S., Niedermirtl, B., Bosten, J., Günther, R., Dabrowski, S., Doppler, K., Sommer, C., Blasig, I., Brack, A., und Rittner, H. (2014). Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J. Control Release.*, 185:88–98.
- Schallmeyer, M., Frunzke, J., Eggeling, L., und Marienhagen, J. (2014). Looking for the pick of the bunch: high-throughput screening of producing microorganisms with biosensors. *Curr. Opin Biotechnol.*, 26:148–54.
- Schlegel, U., Pels, H., Glasmacher, A., Kleinschmidt, R., Schmidt-Wolf, I., Helmstaedter, C., Fliessbach, K., Deckert, M., Van Roost, D., Fimmers, R., Bode, U., und Klockgether, T. (2001). Combined systemic and intraventricular chemotherapy in primary CNS lymphoma: a pilot study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 71:118–22.
- Schmandke, A., Schmandke, A., Pietro, M., und Schwab, M. (2013). An open source based high content screening method for cell biology laboratories investigating cell spreading and adhesion. *PLoS One.*, 8:e78212.
- Schneeberger, E. und Lynch, R. (2004). The tight junction: a multifunctional complex.

- Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 286:C1213–28.
- Schulzke, J. und Fromm, M. (2009). Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1165:1–6.
- Schulzke, J., Günzel, D., John, L., und Fromm, M. (2012). Perspectives on tight junction research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1257:1–19.
- Shen, L. und Turner, J. (2005). Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 16:3919–3936.
- Shimazaki, T., Tomita, M., Sadahiro, S., Hayashi, M., und Awazu, S. (1998). Absorption-enhancing effects of sodium caprate and palmitoyl carnitine in rat and human colons. *Dig. Dis. Sci.*, 43:641–645.
- Shukla, S., Huang, R., Austin, C., und Xia, M. (2010). The future of toxicity testing: a focus on in vitro methods using a quantitative high-throughput screening platform. *Drug Discov. Today.*, 15:997–1007.
- Siegel, T., Rubinstein, R., Bokstein, F., Schwartz, A., Lossos, A., Shalom, E., Chisin, R., und Gomori, J. (2000). In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans. *J. Neurosurg.*, 92:599–605.
- Simon, D., Lu, Y., Choate, K., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., und Lifton, R. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science.*, 285:103–6.
- Singh, A., Sharma, A., und Dhawan, P. (2010). Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J. Oncol.*, 2010:541957.
- Sirotkin, H., Morrow, B., Saint-Jore, B., Puech, A., Das Gupta, R., Patanjali, S., Skoultchi, A., Weissman, S., und Kucherlapati, R. (1997). Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics.* , 42:245–51.
- Small, D. (1970). Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. *Fed. Proc.*, 29:1320–6.
- Smyth Jr, H., Cqrpenter, C., Weil, C., Pozzani, U., und Striegel, J. (1962). Range-finding toxicity data: List VI. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 23:95–107.
- Sánchez-Pulido, L., Martín-Belmonte, F., Valencia, A., und Alonso, M. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.*, 27:599–601.
- Soderholm, J., Olaison, G., Peterson, K., Franzen, L., Lindmark, T., Wiren, M., Tagesson, C., und Sjudahl, R. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*, 50:307–313.
- Soma, T., Chiba, H., Kato-Mori, Y., Wada, T., Yamashita, T., Kojima, T., und Sawada, N. (2004). Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp. Cell Res.*, 300:202–12.

- Stamatovic, S., Dimitrijevic, O., Keep, R., und Andjelkovic, A. (2006). Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. *J. Biol. Chem.*, 281:8379–8388.
- Stamatovic, S., Keep, R., Wang, M., Jankovic, I., und Andjelkovic, A. (2009). Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 284:19053–66.
- Steed, E., Rodrigues, N., Balda, M., und Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.*, 10:95.
- Steiner, O., Coisne, C., Engelhardt, B., und Lyck, R. (2011). Comparison of immortalized bEnd5 and primary mouse brain microvascular endothelial cells as in vitro blood-brain barrier models for the study of T cell extravasation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 31:315–327.
- Stevenson, B., Siliciano, J., Mooseker, M., und Goodenough, D. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.*, 103:755–66.
- Studier, F., Rosenberg, A., Dunn, J., und Dubendorff, J. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185:60–89.
- Sugibayashi, K., Onuki, Y., und Takayama, K. (2009). Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 36:246–53.
- Sun, Z., Wei, J., Xie, L., Shen, Y., Liu, S., Ju, G., Shi, J., Yu, Y., Zhang, X., Xu, Q., und Hemmings, G. (2004). The CLDN5 locus may be involved in the vulnerability to schizophrenia. *Eur. Psychiatry.*, 19:354–7.
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., ans Tsukita, S., Nureki, O., und Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.*, 344:304–7.
- Suzuki, T. und Hara, H. (2006). Difuctose anhydride III and sodium caprate activate paracellular transport via different intracellular events in Caco-2 cells. *Life Sci.*, 79:401–410.
- Takahashi, K., Murakami, T., Yumoto, R., Hattori, T., Higashi, Y., und Yata, N. (1994). Decanoic acid induced enhancement of rectal absorption of hydrophilic compounds in rats. *Pharm. Res.*, 11:1401–4.
- Takatsuka, S., Kitazawa, T., Morita, T., Horikiri, Y., und Yoshino, H. (2006). Enhancement of intestinal absorption of poorly absorbed hydrophilic compounds by simultaneous use of mucolytic agent and non-ionic surfactant. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62:52–58.
- Talwar, S., Lynch, J., und Gilbert, D. (2013). Fluorescence-based high-throughput functional profiling of ligand-gated ion channels at the level of single cells. *PLoS One.*, 8:e58479.

- Tamura, A., Kitano, Y., Hata, M., Katsuno, T., Moriwaki, K., Sasaki, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Furuse, M., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2008). Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology.*, 134:523–34.
- Tatum, R., Zhang, Y., Salleng, K., Lu, Z., Lin, J., Lu, Q., Jeansonne, B., Ding, L., and Chen, Y. (2010). Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 298:F24–34.
- Thompson, P., Tipney, H., Brass, A., Noyes, H., Kemp, S., Naessens, J., and Tassabehji, M. (2010). Claudin 13, a member of the claudin family regulated in mouse stress induced erythropoiesis. *PLoS One.*, 5:e12667.
- Tomita, M., Hayashi, M., and Awazu, S. (1995). Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272:739–743.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 273:12725–31.
- Traweger, A., Fang, D., Liu, Y., Stelzhammer, W., Krizbai, I., Fresser, F., Bauer, H., and Bauer, H. (2002). The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J. Biol. Chem.*, 277:10201–8.
- Tscheik, C., Blasig, I., and Winkler, L. (2013). Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers.*, 1:e24565.
- Turksen, K. und Troy, T. (2001). Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev. Dyn.*, 222:292–300.
- Turksen, K. und Troy, T. (2002). Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development.*, 129:1775–84.
- Turner, J. (2000). 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol.*, 11:301–8.
- Turner, J., Angle, J., Black, E., Joyal, J., Sacks, D., and Madara, J. (1999). PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am. J. Physiol.*, 277:C554–C562.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126:741–54.
- Unger, C., Eibl, H., von Heyden, H., Krisch, B., and Nagel, G. (1985). Blood-brain barrier and the penetration of cytostatic drugs. *Klin Wochenschr.*, 63:565–71.
- Usami, M., Komurasaki, T., Hanada, A., Kinoshita, K., and Ohata, A. (2003). Effect of gamma-linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition*, 19:150–6.

- van Hoogdalem, E., Hardens, M., de Boer, A., und Breimer, D. (1988). Absorption enhancement of rectally infused cefoxitin sodium by medium-chain fatty acids in conscious rats: concentration-effect relationship. *Pharm. Res.*, 5:453–6.
- Van Itallie, C. und Anderson, J. (1997). Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 110:1113–21.
- Van Itallie, C. und Anderson, J. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.*, 68:403–29.
- Van Itallie, C., Fanning, A., Bridges, A., und Anderson, J. (2009). ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*, 20:3930–3940.
- Van Itallie, C., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J., Coccaro, M., Proctor, W., Colegio, O., und Anderson, J. (2008). The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell Sci.*, 121:298–305.
- Van Itallie, C., Mitic, L., und Anderson, J. (2011). Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J. Biol. Chem.*, 286:3442–50.
- Van Itallie, C., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L., Holmes, J., und Anderson, J. (2006). Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 291:F1288–99.
- Veshnyakova, A., Krug, S., Mueller, S., Piontek, J., Protze, J., Fromm, M., und Krause, G. (2012). Determinants contributing to claudin ion channel formation. *Ann N Y Acad Sci.*, 1257:45–53.
- Vial, C. und Evans, R. (2005). Disruption of lipid rafts inhibits P2X1 receptor-mediated currents and arterial vasoconstriction. *J. Biol. Chem.*, 2:30705–11.
- Vykhodtseva, N., McDannold, N., und Hynynen, K. (2008). Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics.*, 48:279–96.
- Walsh, E., Adamczyk, B., Chalasani, K., Maher, S., O’Toole, E., Fox, J., Leonard, T., und Brayden, D. (2011). Oral delivery of macromolecules: rationale underpinning Gastrointestinal Permeation Enhancement Technology (GIPET). *Ther Deliv.*, 2:1595–610.
- Wang, F., Daugherty, B., Keise, L., Wei, Z., Foley, J., Savani, R., und Koval, M. (2003). Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 29:62–70.
- Wang, L., Zhang, X., Liu, L., L., C., Yang, R., Li, M., und Du, W. (2010). Tanshinone II A down-regulates HMGB1, RAGE, TLR4, NF-kappaB expression, ameliorates BBB permeability and endothelial cell function, and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res.*, 1321:143–51.
- Watson, C., Rowland, M., und Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 281:388–97.

- Watson, R., Poddar, R., Walker, J., McGuill, I., Hoare, L., Griffiths, C., und O'neill, C. (2007). Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J. Pathol.*, 212:450–8.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., und Couraud, P. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1788:842–57.
- Wen, H., Watry, D., Marcondes, M., und Fox, H. (2004). Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol. Cell Biol.*, 24:8408–17.
- Westphal, J., Dörfel, M., Krug, S., Cording, J., Piontek, J., Blasig, I., Tauber, R., Fromm, M., und Huber, O. (2010). Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol. Life Sci.*, 67:2057–68.
- Wheeler, S. und Bloom, J. (2014). Toward a More Complete Understanding of Noncovalent Interactions Involving Aromatic Rings. *J. Phys. Chem. A.*, 16:XXX.
- Wilcox, E., Burton, Q., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N., Morell, R., Kachar, B., Wu, D., Griffith, A., Riazuddin, S., und Friedman, T. (2001). Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell.*, 104:165–72.
- Will, C., Breiderhoff, T., Thumfart, J., Stuiver, M., Kopplin, K., Sommer, K., Günzel, D., Querfeld, U., Meij, I., Shan, Q., Bleich, M., Willnow, T., und Müller, D. (2010). Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> wasting. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 298:F1152–6.
- Willis, C., Meske, D., und Davis, T. (2010). Protein kinase C activation modulates reversible increase in cortical blood-brain barrier permeability and tight junction protein expression during hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 30:1847–1859.
- Windsor, E. und Cronheim, G. (1961). Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids. *Nature.*, 190:263–4.
- Winkler, L. (2007). Die Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und Claudin-5 für Claudin-Interaktionen und Tight junction-Strangbildung. *Dissertation.*
- Winkler, L., Gehring, C., Wenzel, A., Müller, S., Piehl, C., Krause, G., Blasig, I., und Piontek, J. (2009). Molecular determinants of the interaction between Clostridium perfringens enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.*, 284:18863–72.
- Wittchen, E., Haskins, J., und Stevenson, B. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J. Biol. Chem.*, 274:35179–85.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E., Risau, W., und Engelhardt, B. (2003). Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.*, 105:586–92.

- Yaffe, Y., Shepshelovitch, J., Nevo-Yassaf, I., Yeheskel, A., Shmerling, H., Kwiatek, J., Gaus, K., Pasmanik-Chor, M., und Hirschberg, K. (2012). The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *J. Cell. Sci.*, 125:3545–56.
- Yamamoto, M., Ramirez, S., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R., Kaibuchi, K., Persidsky, Y., und Ikezu, T. (2008). Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, 172:521–33.
- Yamamoto, S., Nakase, H., Matsuura, M., Masuda, S., Inui, K., und Chiba, T. (2011). Tacrolimus therapy as an alternative to thiopurines for maintaining remission in patients with refractory ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 45:526–30.
- Yang, T., Roder, K., und Abbruscato, T. (2007). Evaluation of bEnd5 cell line as an in vitro model for the blood-brain barrier under normal and hypoxic/aglycemic conditions. *E. J. Pharm. Sci.*, 96:3196–3213.
- Yu, A., Cheng, M., Angelow, S., Günzel, D., Kanzawa, S., Schneeberger, E., Fromm, M., und Coalson, R. (2009). Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J. Gen. Physiol.*, 133:111–27.
- Yu, A., Enck, A., Lencer, W., und Schneeberger, E. (2003). Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J. Biol. Chem.*, 278:17350–9.
- Yu, A., McCarthy, K., Francis, S., McCormack, J., Lai, J., Rogers, R., Lynch, R., und Schneeberger, E. (2005). Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288:1231–41.
- Yu, D., Marchiando, A., Weber, C., Raleigh, D., Wang, Y., Shen, L., und Turner, J. (2010). MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107:8237–8241.
- Zeissig, S., Burgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A., Zeitz, M., Fromm, M., und Schulzke, J. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56:61–72.
- Zhang, J., Chung, T., und Oldenburg, K. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.*, 4:67–73.
- Zhao, L., Yaoita, E., Nameta, M., Zhang, Y., Cuellar, L., Fujinaka, H., Xu, B., Yoshida, Y., Hatakeyama, K., und Yamamoto, T. (2008). Claudin-6 localized in tight junctions of rat podocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294:R1856–62.
- Zwanziger, D., Hackel, D., Staat, C., Böcker, A., Brack, A., Beyermann, M., Rittner, H., und Blasig, I. (2012a). A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Mol. Pharm.*, 9:1785–94.

Zwanziger, D., Staat, C., Andjelkovic, A., und Blasig, I. (2012b). Claudin-derived peptides are internalized via specific endocytosis pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1257:29–37.

## 8. Verzeichnis der eigenen Publikationen

Teile dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen enthalten:

**Del Vecchio<sup>1</sup>, G., Tscheik<sup>1</sup>, C., Tenz, K., Helms, H.C., Winkler, L., Blasig, R., und Blasig, I.E. (2012):** Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Mol. Pharm.* 9:2523-33

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

**Tscheik, C., Blasig, I.E., und Winkler, L. (2013):** Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers.* 1:e24565

Weitere Publikationen:

**Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J.K., Milatz, S., Günzel, D., Wolburg, H., Piontek, J., Huber, O., und Blasig, I.E. (2013):** In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J. Cell Sci.* 126:554-64

**Cording, J., Tscheik, C., Winkler, L., Günther, R., Breitzkreuz-Kroff, O., Schlattner, I., Lorenz, D., Wolburg, H., und Blasig, I.E. (2014):** Redox sensitive cysteine sites of tricellulin determine bi- and tri-cellular tissue barriers.

In Erstellung.

## 9. Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterzeichnung erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den von mir im Verzeichnis aufgeführten Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

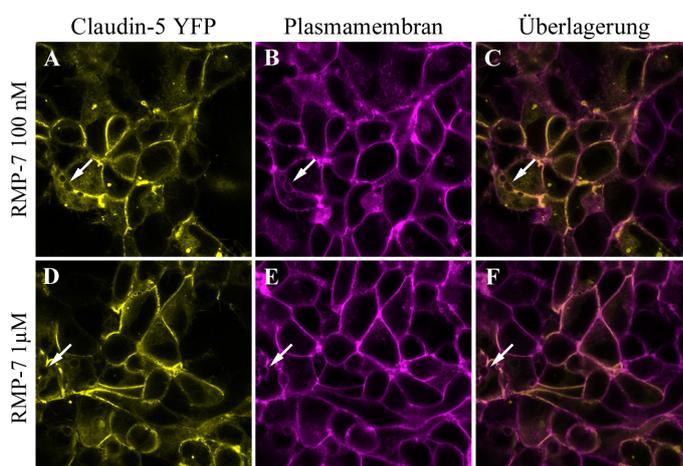
Berlin, den 12.08.2014

Christian Tscheik

## 10. Anhang

### 10.1. Wirkung von Alkylglycerolen, Gamma-Linolensäure, CC-Chemokin-Ligand-2, Dimethylsphingosin und RMP-7 auf Claudin-5

Für alle zusätzlichen Experimente wurden Konzentration der entsprechenden Substanzen verwendet, die in der Literatur für wirksam befunden wurden. Die Versuche mit Alkylglycerolen (O-Hexyldiglycerol und 1-O-Pentyl-glycerol), von denen gezeigt werden konnte, dass sie die BHS von Ratten öffnen können (Erdlenbruch *et al.*, 2000), blieben ohne nennenswerte Resultate. Dieses gilt auch für Gamma-Linolensäure, welche für die potentielle Modulation von Cld5 eingesetzt wurde. Die Wirkung der mehrfach ungesättigten Fettsäure auf die TJ ist nicht eindeutig geklärt. Es konnte vermehrt ein erhöhter TER und eine verringerte Permeabilität sowie die Relokalisation von den TJ-Proteinen Cld5, Occludin und ZO-1 in Endothelzellen gezeigt werden (Martin *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 1998). Jedoch sind auch gegenteilige Effekte beschrieben, die Reduktion des TER und eine erhöhte Permeabilität (Usami *et al.*, 2003). Für den CC-Chemokin-Ligand-2 (Synonym: Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1) konnte gezeigt werden, dass er die Permeabilität der BHS erhöht (Newton und Vaddi, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein direkter Effekt auf Cld5 bestimmt werden. Dimethylsphingosin ist ein Inhibitor der Sphingosin Kinase und damit von Sphingosin 1-Phosphat, dessen Effekte auf Zellbarrieren als protektiv oder permeabilisierend beschrieben sind (Mehta und Malik, 2006; Itagaki *et al.*, 2010). Eine Reduktion von Cld5 in MDCK-II FLAG-Cld5 und bEnd5 Zellen konnte detektiert werden, jedoch auch von Aktin und ZO-1. Aufgrund der unspezifischen und indirekten (über die Reduktion von Sphingosin 1-Phosphat) Wirkung von Dimethylsphingosin wurde davon abgesehen, es als Kontrolle für den HDS zu verwenden. Die Wirkung von RMP-7, ein Bradykinin Agonist Peptid (alternative Bezeichnungen: Cereport, Labradimil), auf Cld5 wurde ebenfalls untersucht, um es als HDS-Kontrolle zu verwenden. Tierexperimentell konnte bereits gezeigt, dass es die BHS öffnet, wodurch es bis zur klinischen Phase II getestet wurde (Gregor *et al.*, 1999; Emerich *et al.*, 2001).



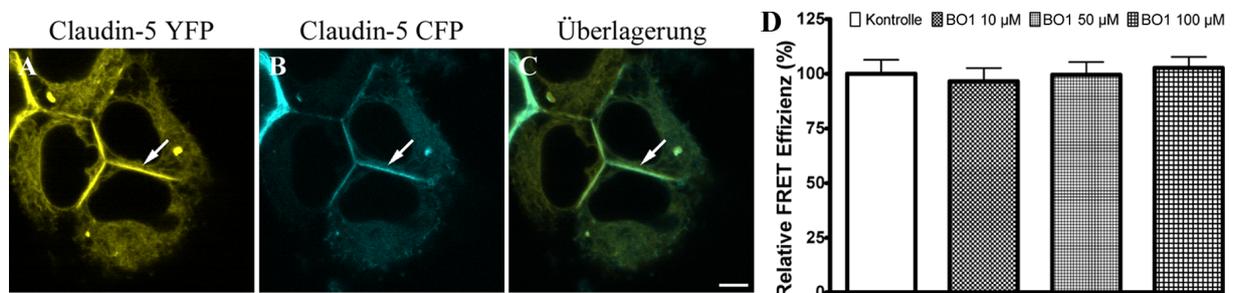
**Abb. 10.1: RMP-7 führt zu einer morphologischen Veränderung der Plasmamembran von HEK-293 Claudin-5 YFP Zellen**

Cld5-YFP (A, D) wurde zusammen mit CellMask™ (B, E) in lebenden HEK-293 Zellen (Überlagerung C, F), welche stabil Cld5-YFP exprimierten, 24 h nach Inkubation mit 100 nM (A-C) und 1 µM (D-E) RMP-7 analysiert. RMP-7 führte zu ringförmigen morphologischen Veränderungen innerhalb der Plasmamembran, in denen eine Cld5-YFP-Anreicherung ausblieb (Pfeil). Maßbalken entspricht 10 µm.

Hierzu wurden HEK-293 Cld5-YFP Zellen für 24 h mit bis zu 1  $\mu\text{M}$  RMP-7 inkubiert (Abb. 10.1). Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben keinen Abbau oder Delokalisation von Cld5. Die Applikation dieser Substanz führte zu morphologischen Veränderungen der Zell-Zellkontakte. Sie wurden lokal aufgetrennt, wodurch Cld5-YFP und CellMask™ negative Areale in der Plasmamembran auftraten. Aufgrund dieser Resultate wurde der Versuchsansatz nicht weitergeführt.

## 10.2. Auf die *cis*-Interaktion von Claudin-5 hat BO1 keine Wirkung

Anhand des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) lassen sich Protein-Protein-Interaktionen messen. Da sowohl der C- als auch der N-Terminus von Cld5 intrazellulär lokalisiert, befinden sich auch die Fluoreszenzproteine CFP und YFP intrazellulär. Weiterhin ergibt sich aufgrund der notwendigen Nähe für einen FRET der beiden Proteine zueinander die Möglichkeit, ausschließlich die *cis*-Interaktion von Cld5 zu messen, während die *trans*-Interaktion hierbei keine Rolle spielt. So wurde mit dieser Methode und HEK-293 Zellen, welche Cld5-YFP (Abb. 10.2 A) und -CFP (Abb. 10.2 B) exprimierten, die potentielle Veränderung der homogenen *cis*-Interaktion von Cld5 nach der Inkubation mit BO1 untersucht. Hierbei konnte keine Modifikation dieser Interaktion durch BO1 festgestellt werden. Selbst 100  $\mu\text{M}$  BO1 führten zu gleichen FRET-Effizienzen wie die unbehandelte Kontrolle.



**Abb. 10.2: BO1 hat keine Wirkung auf die *cis*-Interaktion von Claudin-5**

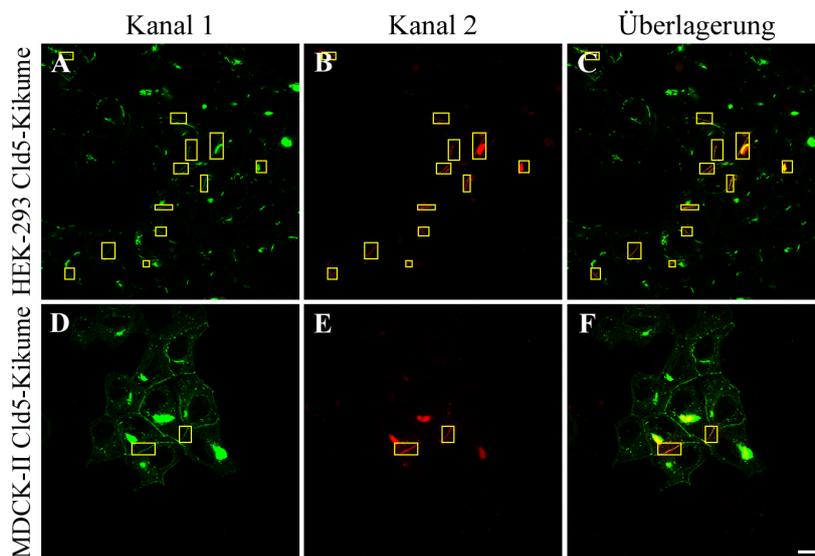
HEK-293 Zellen wurden mit Cld5-YFP und Cld5-CFP transfiziert. 31 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit BO1 behandelt und nach weiteren 17 h in der konfokalen Mikroskopie analysiert. Für die FRET-Analyse wurden Zell-Zellkontakte der lebenden Zellen ausgewählt, welche eine Expression beider Konstrukte in der selben Zelle aufwiesen (A-C, Pfeil). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen gefunden (D). Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ . Daten sind mit Mittelwert $\pm$ SEM,  $n \geq 37$ , zweiseitiger t-Test.

## 10.3. Kikume, ein photoschaltbares Protein

Für die weitere Analyse der Auswirkung von Substanzen wie C10 oder BO1 wurde Cld5 mit Kikume kloniert. Anschließend wurde dieses in HEK-293 und MDCK-II Zellen transfiziert. Mit Hilfe von Kikume war es möglich, das exprimierte Fusionsprotein in zwei Populationen zu unterscheiden. So konnte z.B. Cld5, welches in einem Bereich der Plas-

mamembran lokalisierte, von anderen Bereichen unterschieden werden (Abb. 10.3).

Zunächst wurde Cld5-Kikume in HEK-293 Zellen transfiziert und dessen Expression mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Hierbei zeigte sich, dass das Protein lediglich in kurzen Abschnitten der Plasmamembranen lokalisierte und nicht entlang des ganzen Zell-Zellkontaktes. Hiervon war die photoschaltbare Fähigkeit von Kikume nicht beeinträchtigt. Durch Markieren bestimmter Cld5-Kikume enthaltener Bereiche (*ROI*, *region of interest*) konnten diese mittels ultravioletten Lichts (350–410 nm) von  $\lambda_{em} = 490\text{--}545\text{ nm}$  (Abb. 10.3 A) zu  $\lambda_{em} = 565\text{--}613\text{ nm}$  (Abb. 10.3 B) umgeschaltet werden. Hierbei zeigte sich allerdings, dass dieses Umschalten nicht vollständig erfolgte und somit die Fluoreszenz in beiden Kanälen vorhanden war (Abb. 10.3 C). Um dieses zu verbessern wurden die flacher wachsenden MDCK-II Zellen mit Cld5-Kikume transfiziert. In diesen Zellen lokalisierte das Protein wie erwartet entlang des gesamten Zell-Zellkontakts. Doch auch in diesen Zellen erfolgte die Umschaltung nicht komplett. Weitere Probleme ergaben sich hinsichtlich der Dynamik von Cld5. So verblieb das umgeschaltete Protein für mindestens 24 h in der Plasmamembran. Somit modifizierte die Fusion von Kikume an Cld5 die Fluktuationsrate von Cld5. Dementsprechend blieb die Inkubation mit C10 in HEK-293 und MDCK-II Cld5-Kikume Zellen nahezu wirkungslos. Aufgrund der starken Wirkung von Kikume auf die Lokalisation und Dynamik von Cld5, wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.



**Abb. 10.3: Umschalten von Claudin-5-Kikume**  
HEK-293 (A-C) und MDCK-II (D-E) wurden mit Cld5-Kikume transfiziert. Nachdem markieren bestimmte Areale der Zellen mit einem *ROI* (gelbes Rechteck), wurden diese Bereiche umgeschaltet, sodass sich die Emission von 490–545 nm (A, D) auf 565–613 nm (B, E) verschob. So konnte Cld5 in verschiedenen Bereichen unterschieden werden, wie in der Überlagerung beider Kanäle (C, F) dargestellt. Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{M}$ .