

Pathomechanismus *Clostridium perfringens* Enterotoxin-
vermittelter Schädigung des Kolon-Epithels und
Generierung neuartiger Toxin-Varianten zur Therapie
Claudin überexprimierender Tumoren

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
Miriam Eichner
aus Penzberg

Berlin, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde an der Charité Berlin am Institut für klinische Physiologie und am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin unter der Leitung von Herrn PD Dr. Jörg Piontek im Zeitraum von Juli 2012 bis Januar 2018 angefertigt.

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

Disputation am 04.06.2018

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben etliche Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle gerne bedanken möchte.

Zuvorderst ist hier mein Doktorvater PD Dr. Jörg Piontek zu nennen, der mir die Bearbeitung eines spannenden Themas ermöglicht hat. Herzlichen Dank für die hervorragende und engagierte Begleitung und die ausführlichen, intensiven und für mich sehr wertvollen Diskussionen!

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke. Einerseits für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für klinische Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchzuführen, andererseits für sein in mich gesetztes Vertrauen und seine enorme Hilfsbereitschaft.

Dr. Gerd Krause danke ich, für die gute Zusammenarbeit und die Gelegenheit einen Teil der Arbeiten am Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie durchzuführen.

Prof. Dr. Hartmut Oschkinat danke ich sehr, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die finanzielle Unterstützung, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat, danke ich der Sonnenfeld-Stiftung, der Charité und dem Sonderforschungsbereich 825.

Allen Wegbegleitern und Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders hervorheben möchte ich hier Prof. Dr. Michael Fromm, Prof. Dr. Dorothee Günzel und PD Dr. Roland Bücker, die mir mit fachlichen Anregungen und konstruktiver Kritik stets eine große Hilfe waren. Bei Dr. Anna Piontek und Dr. Jonas Protze möchte ich mich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und die schöne Zeit am Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie bedanken.

PD Dr. Susanne Krug, Anja Fromm und In-Fah Lee sei für die stets freundliche Unterstützung im Laboralltag, PD Dr. Rita Rosenthal für hilfreiche Tipps zur Ca^{2+} -Messung und die gute Schokolade, Christian Augustin für die gute Zusammenarbeit während seiner Masterarbeit und Fábía Lobo de Sá für das Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

Meinen Freunden Grischa, Lenni, Lisa, Flo, Sagie, Maria und Peter danke ich für ihre Freundschaft und die Ablenkung. Ich hoffe auf viele weitere, gemeinsame Stunden!

Ganz besonders danken möchte ich hier meiner Mutter für ihre liebevolle Unterstützung. Danke für Dein bedingungsloses Immer-für-mich-da-Sein und Deinen Glauben an mich!

Und zu guter Letzt: Julius! Danke für das Teilen Deines humorvollen Blicks auf die Welt, Dein Verständnis und das gute Zureden – insbesondere nach meinem Unfall und in der letzten Phase dieser Arbeit.

I ZUSAMMENFASSUNG	1
II SUMMARY	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Clostridium perfringens	5
1.2 Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE)	5
1.2.1 CPE-vermittelte klinische Symptome	6
1.2.2 CPE-Effekte auf die intestinale epitheliale Barriere	6
1.2.3 Funktionelle Domänen und Struktur von CPE	7
1.2.4 Mechanismus der Porenbildung und CPE-vermittelten Zytotoxizität	8
1.3 CPE-Rezeptoren sind Mitglieder der Proteinfamilie der Claudine	11
1.3.1 Topologie und Struktur von Claudinen	11
1.3.2 Claudine sind als Bestandteil von <i>Tight Junctions</i> essentiell für die Aufrechterhaltung epi- und endothelialer Barrieren	12
1.3.3 Nicht alle Claudine sind CPE-Rezeptoren.....	14
1.4 CPE-Claudin-Interaktion	16
1.4.1 Beteiligte Aminosäuren.....	16
1.4.2 Interaktionsmodelle und Kristallstruktur von CPE-Claudin-Komplexen.....	16
1.5 cCPE – Claudin-subtypspezifisches Werkzeug, dessen Subtypspezifität gezielt über Mutationen verändert werden kann.....	17
1.6 Claudine als Zielproteine bei der Tumorthherapie.....	18
1.6.1 Deregulierte Expression und Lokalisation machen Claudine zu vielversprechenden targets in der Tumorthherapie	18
1.6.2 CPE als Tumorthapeutikum.....	20
1.7 Zielstellung der Arbeit	23
2 Materialien und Methoden.....	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3 Geräte	30
2.1.4 Plasmide.....	33
2.1.5 Oligonukleotide.....	33

2.1.6	Enzyme	34
2.1.7	Medien und Zellen	34
2.1.7.1	Prokaryotische Zellen	34
2.1.7.2	Eukaryotische Zellen	35
2.1.7.3	Medien für die Bakterienanzucht.....	37
2.1.7.4	Zellkulturmedien	37
2.1.8	Puffer und Lösungen	38
2.1.9	Antikörper und Fluorophore	39
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1	Umklonierung	41
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)).....	41
2.2.2.1	TA-Klonierungs-PCR	41
2.2.2.2	Kolonie-PCR.....	42
2.2.2.3	Mutagenese-PCR zur ortsgerichteten Mutagenese.....	42
2.2.3	Restriktionsanalyse.....	45
2.2.4	DpnI-Verdau	45
2.2.5	Transformation von Bakterien.....	45
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.7	Plasmid-DNA-Präparation.....	46
2.2.8	Sequenzierung	47
2.3	Biochemische Methoden.....	47
2.3.1	Expression und Aufreinigung von cCPE als GST-Fusionsprotein	47
2.3.2	Expression und Anreicherung von CPE als 6×His-Fusionsproteinen	48
2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	49
2.3.4	Diskontinuierliche Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.3.5	Semi-dry Western-Blot.....	50
2.3.6	Dot-Blot	50
2.4	Zellbiologische Methoden	51
2.4.1	Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen.....	51
2.4.2	Kultivieren von Zellen	51
2.4.2.1	Zellzahlbestimmung.....	52
2.4.2.2	Kultivierung von Zellen auf Zellkulturfilter.....	53
2.4.2.3	Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen	53
2.4.3	Generierung von stabil transfizierten HEK-293-Zellen.....	53
2.4.4	CPE/cCPE und Kontrollbehandlung.....	54
2.4.5	Aufarbeitung von HT-29/B6-Zellen für die biochemische Analyse im <i>Western-</i> und <i>Dot-Blot</i>	55
2.4.5.1	Adhärente, subkonfluente Zellen	55
2.4.5.2	Vereinzelte Zellen in Suspension.....	55
2.4.5.3	Zelllyse	55
2.4.6	CPE-Behandlung humanen Kolon-Gewebes	56
2.4.7	Bestimmung der Dissoziationskonstante (<i>K_d</i>) von cCPE im zellulären Bindungs-Assay.....	56
2.4.8	MTT-Zytotoxizitäts-Assay und Bestimmung der CPE-Dosis mit halbmaximalem toxischen Effekt (<i>EC</i> ₅₀).....	57
2.4.9	LDH-Zytotoxizitäts-Assay.....	59

2.4.10 Paraformaldehydfixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Kolon-Biopsien.	59
2.4.11 Visualisierung des CPE induzierten Ca^{2+} Einstroms in Lebendzellfärbungen	61
2.4.12 Messung intrazellulären Ca^{2+} mittels Fura-2	62
2.4.13 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	63
2.4.14 Gewinnung von CPE aus eukaryotischer Expression	63
2.5 Elektrophysiologische Messungen.....	64
2.5.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)	64
2.5.2 Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) in der Ussing-Kammer.....	64
2.5.3 Messung der Fluoreszeinpermeabilität in der Ussing-Kammer	65
2.6 Berechnung relativer Affinität (<i>relKd</i>) und Toxizität (<i>relEC50</i>).....	66
2.7 Statistik.....	66
3 Ergebnisse	69
3.1 Pathomechanismus CPE-induzierter Schäden des Kolon-Epithels.....	69
3.1.1 Claudin- und Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPE-Sensitivität humaner HT-29/B6 Kolon-Epithelzellen.....	69
3.1.1.1 CPE-Bindung an Zellen und CPE-Oligomerisierung: Inhibition durch Mutation Y306A/L315A in CPE aber nicht durch Zn^{2+}	70
3.1.1.2 CPE-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom: Inhibition durch Mutation Y306A/L315A in CPE und Zn^{2+}	71
3.1.1.3 CPE-vermittelte Zytotoxizität: Inhibition durch Y306A/L315A in CPE und Zn^{2+}	73
3.1.2 Limitierte Störung der transepithelialen Barriere von HT-29/B6-Zellen bei apikaler vs. basaler CPE-Applikation	74
3.1.3 CPE-induzierte fokale Läsionen in HT-29/B6 Kolonzellen.....	75
3.1.3.1 Mikroskopische Analyse zeigte lokale Einschränkung der Schädigung durch CPE bei apikaler nicht aber basaler Applikation.....	75
3.1.3.2 Bildung eines intakten TJ-Netzwerkes durch ZO1 und Cldn4 in CPE-insensitiven Zellen	78
3.1.4 cCPE-Bindung an eine Subpopulation von HT-29/B6-Zellen mit diskontinuierlichem ZO1 und apikal lokalisiertem CPE-Rezeptor Cldn4.....	79
3.1.5 Caco-2-Zellen: Einschränkung CPE-vermittelter Effekt bei apikaler Gabe	83
3.1.6 Erhöhung der CPE-Sensitivität durch Störung der transepithelialen Barriere.....	83
3.1.6.1 Barrierestörung durch EGTA, TNF α und Dedifferenzierung	84
3.1.6.2 Erhöhte cCPE-Bindung bei gestörter Barriere.....	85
3.1.6.3 Erhöhte Schädigung durch CPE bei gestörter Barriere	86
3.1.7 HT-29/B6-Zellen aber nicht HT-29-Zellen weisen einen hohen Differenzierungsgrad mit einer intakten TJ-Barriere auf	90

3.1.8	Einschränkung des CPE-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom, der darauffolgenden Vesikel-Abschnürung und Exfoliation von Zellen durch intakte TJ-Barriere	90
3.1.9	Verifikation der fokalen Begrenzung der CPE-Sensitivität in primärem humanen Kolon-Gewebe	94
3.2	Generierung neuartiger CPE-Varianten für die Therapie Claudin überexprimierender Tumoren.....	95
3.2.1	Gezielte Veränderung der Affinität von cCPE für Claudine durch Mutationen in der Bindungstasche.....	95
3.2.2	Veränderung der Claudin-Bindungseigenschaften von CPE ermöglicht gezielte Beeinflussung der CPE-vermittelten Zytotoxizität	98
3.2.2.1	CPE-Varianten induzieren einen Claudin-subtypspezifischen Ca^{2+} -Einstrom	98
3.2.2.2	Claudin-subtypspezifische Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten	101
3.2.3	Relative Affinität (<i>relKd</i>) und Toxizität (<i>relEC50</i>)	103
3.2.4	Verwendung von CPE-Varianten aus eukaryotischer Expression	104
3.2.5	Toxizität neuartiger CPE-Varianten auf Karzinomzellen.....	105
3.2.5.1	CPE-Toxizität auf Rezeptorclaudin exprimierende Zelllinien	106
3.2.5.2	CPE-Toxizität auf Nicht-Rezeptorclaudin exprimierende Thyroidkarzinomzellen	108
4	Diskussion	111
4.1	Pathomechanismus CPE-vermittelter Schädigung des Kolon Epithels.....	111
4.1.1	HT-29/B6-Zellen als geeignetes Modell zur Untersuchung CPE-vermittelter Effekte auf Enterozyten des Kolons.....	111
4.1.2	Die apikale Seite polarisierter HT-29/B6-Zellen ist gegenüber CPE vergleichsweise insensitive.....	112
4.1.3	Die CPE-Sensitivität hängt von der Zugänglichkeit von Rezeptorclaudinen ab, die durch TJs limitiert wird	113
4.1.4	Bei Verdrängung seneszenten Zellen zugänglich werdende Rezeptorclaudine als möglicher Angriffspunkt für CPE	115
4.1.5	Synergistische Effekte von CPE mit anderen pathologischen Veränderungen der intestinalen Barriere	116
4.2	Neuartige CPE-Varianten für die Therapie Claudin überexprimierender Tumoren	119
4.2.1	Nicht-junktionale Claudine sind Zielproteine CPE-basierter Tumor-Therapeutika.....	119
4.2.2	CPE-Varianten mit verbesserter Claudin-subtypspezifischer Toxizität lassen sich durch claudinselektive Affinitätsveränderungen generieren.....	119
4.2.3	Geringe Affinitätsänderungen bewirken deutliche Unterschiede bei der CPE-vermittelten Toxizität	123
4.2.4	Rezeptorclaudin diskriminierende CPE-Varianten als Tumortherapeutika ...	126
4.2.5	Targeting von Nicht-Rezeptorclaudinen mit CPE-Varianten als Option in der Tumortherapie	127

4.2.6	Aufeinander abgestimmte Applikationsform und Claudinspezifität versprechen den größtmöglichen Erfolg beim Einsatz cCPE/CPE-basierter Biologika	129
4.2.7	Vorteile CPE-basierter Ansätze bei der Entwicklung neuartiger Tumorthapeutika und Diagnostika	130
4.3	Fazit.....	133
5	Literatur	135
6	Publikationsverzeichnis	151
7	Lebenslauf.....	153
8	Anhang	155
8.1	Expression, Anreicherung und Konzentrationsbestimmung von CPE (6×His).....	155
8.2	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{off} der Interaktion von Cldn3 mit CPE-wt und L254A/S256A/I258A/D284A	157
8.3	Übersicht claudinspezifischer K_d und EC_{50} -Werte	158
8.4	Claudin-Expression in verschiedenen Karzinomzelllinien	159
8.5	Cldn4-Expression in stabiler HEK-293-Cldn4-FLAG Zelllinie 159	
8.6	Abkürzungsverzeichnis	161
8.7	Abbildungsverzeichnis	164
8.8	Tabellenverzeichnis	167
	Eigenständigkeitserklärung	169

I ZUSAMMENFASSUNG

Lebensmittelvergiftungen durch *Clostridium perfringens* Typ A sind weit verbreitet. *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) gilt hier als wichtigster Verursacher gastrointestinaler (GI) Symptome und spielt zudem eine Rolle bei Antibiotika-assoziierten Diarrhöen. Das β -Porenformende Toxin schädigt Zellen in Dünndarm und Kolon. Es bindet über die C-terminale Domäne (cCPE) an seine Rezeptoren – einige (z.B. Claudin-3, -4, -7) aber nicht alle (z.B. Claudin-1, -5) Mitglieder der Tight-Junction(TJ)-Proteinfamilie der Claudine (Cldn1-27). Durch CPE-Poren einströmendes Ca^{2+} führt dann zum Zelltod.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Pathomechanismus CPE-vermittelter Schädigungen des Kolon-Epithels sowie die Generierung neuartiger Toxin-Varianten für die Claudin-gerichtete Therapie von Tumoren.

Es zeigte sich, dass nur eine Subpopulation von Enterozyten des Kolon-Epithels CPE-sensitiv ist. Entscheidend ist hierfür die Lokalisation des CPE-Rezeptors Cldn4: Während Cldn4 in CPE-insensitiven Zellen für eine CPE-Bindung unzugänglich in TJs vorlag, ist es bei CPE-sensitiven Zellen im apikalen, dem Darmlumen zugewandten Plasmamembran-Kompartiment lokalisiert, wo es CPE als Angriffspunkt dient. Störung der epithelialen Barriere durch den inflammatorischen Faktor $\text{TNF}\alpha$, EGTA oder Dedifferenzierung erhöhte die Zugänglichkeit von CPE-Rezeptoren und so die CPE-Sensitivität.

Diese mechanistischen Daten erklären, wie CPE in Einzelfällen zu schwerwiegenden Manifestationen wie intestinalen Nekrosen führen kann, wenn die intestinale Barriere – z.B. bei Entzündung – gestört und so der Zugang zu Claudinen erleichtert ist.

Neben seiner Rolle in GI-Pathologien besitzt CPE großes Potential in der Krebsmedizin, denn in vielen Tumoren werden Claudine überexprimiert. Bei Therapie solcher Tumoren wirken allerdings zwei Faktoren limitierend: (i) Da auch in gesundem Gewebe – wie Leber und Niere – CPE-Rezeptoren zugänglich sind, kann es zu Nebenwirkungen kommen. (ii) Nur Tumoren, die CPE-Rezeptoren, nicht aber solche die andere Claudine (Nicht-CPE-Rezeptoren wie Cldn1 und -5) überexprimieren, können angegriffen werden. CPE-Varianten, deren claudinspezifische Toxizität auf das Claudinexpressionsprofil des jeweiligen Tumors zugeschnitten ist, könnten diese Limitierungen überwinden helfen.

Dass sich die claudinspezifische Toxizität gezielt über strukturgeführte Mutationen in CPE verändern lässt, wurde hier gezeigt. Mit CPE-L254A/S256A/I258A/D284A konnte eine CPE-Variante generiert werden, die toxische Effekte bevorzugt über Bindung an Cldn4 und kaum über andere CPE-Rezeptoren vermittelt. Die Mutationen S305P/S307R/S313H und

ZUSAMMENFASSUNG

Y306W/S313H erlauben eine Bindung an die Nicht-CPE-Rezeptoren Cldn1 und -5. Mit entsprechenden CPE-Varianten konnten toxische Effekte, über Nicht-CPE-Rezeptoren wie Cldn1 und -5 vermittelt werden.

Schließlich konnte CPE-S305P/S307R/S313H erfolgreich *in vitro* eingesetzt werden, um Cldn1-exprimierende Thyroidkarzinomzellen (K1) anzugreifen, die aufgrund fehlender CPE-Rezeptorclaudine insensitive gegenüber CPE-wt sind. Dies demonstriert das Potential optimierter CPE-basierter Biologika. Hierauf aufbauend können künftig weitere CPE-basierte Tumorthapeutika und -diagnostika generiert werden.

II SUMMARY

Food poisoning caused by *Clostridium perfringens* type A is common. *C. perfringens* enterotoxin (CPE) is responsible for its gastrointestinal (GI) symptoms and also plays a role in antibiotic-associated diarrhea.

The β -pore-forming toxin damages epithelial cells in the small intestine and the colon. As cellular receptors serve some (e.g. claudin-3, -4, -7) but not all (e.g. claudin-1, -5) claudins – a family of tetraspan membrane proteins (Cldn1-27). Ca^{2+} -influx through CPE-pores leads to cell death.

This study aimed to investigate the mechanism of CPE-induced damage to the colonic epithelium and to generate novel CPE-variants for claudin-targeted cancer therapy.

This work demonstrates that only a subpopulation of colonic enterocytes is sensitive towards CPE. CPE sensitivity depends on localization of CPE receptor Cldn4: In insensitive cells Cldn4 was found inaccessible for CPE binding at the TJ. In CPE-sensitive cells Cldn4 was localized in the apical membrane compartment. Facing the lumen of the gut it here is easily accessible for CPE. If the epithelial barrier was disturbed by inflammatory factor $\text{TNF}\alpha$, EGTA or dedifferentiation, enhanced accessibility of CPE receptors led to enhanced CPE sensitivity. These mechanistic details provide an explanation of how CPE sometimes may lead to severe clinical manifestations like intestinal necrosis if claudin accessibility is facilitated by a disturbed intestinal barrier – e.g. during inflammation.

Besides its role in GI pathologies CPE bears great potential in cancer medicine, as claudins are frequently overexpressed in tumors. However, tumor therapy using CPE has its limitations: (i) as claudins are also expressed in healthy tissue (e.g. liver and kidney) there are side effects. (ii) Only tumors expressing CPE receptors but not those overexpressing other claudins (such as Cldn1 or -5) can be targeted. Novel CPE variants with claudin subtype specific affinities, which are tailored to the claudin expression profiles of distinct tumors could help to overcome these limitations.

Here it is demonstrated that claudin subtype specific toxicity can be altered by structure-based site directed mutagenesis. CPE variant CPE-L254A/S256A/I258A/D284A preferentially mediates toxicity via Cldn4 but barely via other CPE receptors. Mutations S305P/S307R/S313H and Y306W/S313H allow binding to non-CPE receptors Cldn1 und -5. Accordingly, the respective CPE variants allowed to mediate a toxic effect via Cldn1 and -5.

Finally, CPE-S305P/S307R/S313H was successfully used *in vitro* to target Cldn1-expressing thyroid carcinoma cells (K1), which were insensitive towards CPE-wt due to lack

SUMMARY

of high levels of CPE receptor claudins. These results demonstrate the potential of optimized CPE-based biologicals and may serve as foundation for further developments in the field of CPE-based therapeutics and diagnostics.

1 Einleitung

1.1 Clostridium perfringens

Clostridium perfringens-Stämme verursachen verschiedene gastrointestinale (GI) Erkrankungen und anderer Infektionen bei Menschen und Nutztieren. Für die Pathogenität dieser grampositiven, anaeroben und sporenbildenden Bakterien entscheidend ist die Fähigkeit zur Produktion unterschiedlicher Toxine. Mindestens 16 verschiedene Toxine sind bekannt (Uzal *et al.*, 2014), wobei verschiedene *C. perfringens*-Stämme jeweils nur einen Teil dieser Toxine produzieren. Aufgrund der Produktion von α (CPA), β (CPB), ϵ (ETX) und ι (ITX) Toxin werden die Serotypen A, B, C, D oder E unterschieden (Hatheway, 1990; McDonel, 1980). Für diese Klassifizierung irrelevant, aber von großer Bedeutung für die Virulenz, sind weitere Toxine wie das *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) (Chen *et al.*, 2014; Uzal *et al.*, 2014).

Wichtige humanpathogene *C. perfringens*-Stämme sind: (i) Typ C-Stämme, die sich durch die Produktion von CPA und CPB auszeichnen und nekrotisierende Enteritis verursachen (Uzal *et al.*, 2014). (ii) CPA-produzierende Typ A-Stämme – die Erreger des Wundbrandes (Uzal *et al.*, 2014). (iii) Typ A-Stämme, die zusätzlich CPE produzieren. Diese sind einer der häufigsten Verursacher bakterieller Lebensmittelvergiftungen (Olsen *et al.*, 2000), werden aber auch in Zusammenhang mit anderen GI-Erkrankungen – wie Antibiotika-assoziiertes Diarrhö – gebracht (Uzal *et al.*, 2014).

1.2 Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE)

Auch wenn durch *C. perfringens* Typ A-Stämme verursachte GI-Erkrankungen multifaktoriell sind, wurde CPE als Haupt-Virulenzfaktor identifiziert: Ein knock-out von CPE in lebensmittelvergiftenden und nicht-lebensmittelvergiftenden CPE-positiven Typ A-Stämmen inhibierte eine Flüssigkeitsakkumulation und histologische Schädigung des Epithels *in vivo* in Dünndarmsegmenten von Kaninchen (Sarker *et al.*, 1999).

Das 35 kDa große Toxin wird von sporulierenden Bakterien im Verdauungstrakt gebildet und akkumuliert in parakristallinen *inclusion bodies* (Löffler und Labbe, 1986). Mit der Lyse der Bakterien werden Sporen und CPE in das intestinale Lumen freigesetzt (Uzal *et al.*, 2014). Hier schädigt CPE Epithelzellen, wobei es bestimmte Subtypen der Claudin(Cldn)-Proteinfamilie – einer Familie von Membranproteinen – als zelluläre Rezeptoren nutzt (vgl. auch Abschnitt 0), um eine Pore in der Plasmamembran zu bilden (Fujita *et al.*, 2000; Katahira *et al.*, 1997a; Katahira *et al.*, 1997b; Sonoda *et al.*, 1999) (vgl. auch Abschnitt

1.2.4). Durch die Pore einströmendes Ca^{2+} führt dann zum Tod der betroffenen Zellen (Chakrabarti und McClane, 2005; Horiguchi *et al.*, 1986; Matsuda und Sugimoto, 1979). Möglicherweise trägt in *C. perfringens* Typ C Stämmen exprimiertes CPE auch zur nekrotisierender Enteritis bei, die durch diese Stämme verursacht wird (Ma *et al.*, 2014).

1.2.1 CPE-vermittelte klinische Symptome

Durch CPE verursachte klinische Symptome beinhalten typischerweise abdominale Krämpfe und Diarrhö (Freedman *et al.*, 2016).

Es wurde gezeigt, dass sowohl beim Menschen (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005) als auch bei Kaninchen (McDonel und Demers, 1982; McDonel und Duncan, 1977) das Epithel des Dünndarms – insbesondere das des Ileums – hochsensitiv gegenüber CPE ist, während sich das Kolon als vergleichsweise insensitiv darstellte (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005; McDonel und Demers, 1982). Eine 2014 veröffentlichte Studie zeigte allerdings, dass auch das Kaninchen-Kolon sensitiv gegenüber CPE ist (Garcia *et al.*, 2014).

Im Falle der *C. perfringens* Typ A-Lebensmittelvergiftung treten CPE-vermittelte Symptome gewöhnlich 8 bis 24 h nach Aufnahme kontaminierter Speisen auf. Der Verlauf ist zumeist mild und die Symptome nach weiteren 12 bis 18 h abgeklungen (Bos *et al.*, 2005). Als Behandlung genügt häufig das Sicherstellen einer ausreichende Rehydratation und Elektrolytzufuhr. Allerdings sind einige schwerwiegende Fälle der *C. perfringens* Typ A-Lebensmittelvergiftung beschrieben. Auffälligerweise war hier jeweils auch das Kolon stark betroffen (Bos *et al.*, 2005) (Centers for Disease und Prevention, 2012). Eine medikamentös induzierte Konstipation, die eine Diarrhö verhindert und dadurch zu einer verlängerten Exposition des Kolon-Epithels mit CPE führt, wird hier als Ursache für die fatale nekrotisierende Kolitis diskutiert (Bos *et al.*, 2005).

1.2.2 CPE-Effekte auf die intestinale epitheliale Barriere

Die Schädigung intestinaler Epithelien durch CPE wurde *ex vivo* durch die CPE-Behandlung von Biopsaten (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005) oder *in vivo* durch die luminale Inkubation abgebundener Darmsegmente (Kaninchen (Duncan *et al.*, 1968; Garcia *et al.*, 2014; McDonel und Duncan, 1975; Smedley *et al.*, 2008) oder Maus (Caserta *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 1979) mit CPE untersucht.

CPE-Bindung und Schädigung – gekennzeichnet von Nekrosen und Zellabschilferungen in das intestinale Lumen – treten besonders stark und zuerst an den Villus-Spitzen von humanem (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005) und Kaninchen-Dünndarm auf (Smedley *et al.*, 2008). Eine Verkürzung der Villi und – bei langer CPE Exposition – auch eine Schädigung der Krypten wurde beschrieben (Smedley *et al.*, 2008).

Das intestinale Epithel grenzt das Körperinnere vom Darmlumen – also der Außenwelt – ab und bildet eine Barriere, die (i) das Eindringen von Pathogenen und Antigenen verhindert und (ii) den Transport von Wasser und Soluten reguliert (vgl. auch Abschnitt 1.3.2). Charakteristisch für CPE-induzierte Effekte auf intestinale Epithelien ist neben histologischen Befunden vor Allem ein Defekt der intestinalen Barriere. Dieser konnte nachgewiesen werden über eine CPE-induzierte luminale Akkumulation von Flüssigkeit in abgebandenen Darmsegmenten (Duncan *et al.*, 1968; Smedley *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 1979) oder aber über eine Reduktion des transepithelialen Widerstandes (TER; vgl. auch Abschnitt 2.5) (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005), der ein reziprokes Maß für die Permeabilität von Ionen ist. Auch in *in vitro*-Modellen für intestinale Barrieren (Caco-2-Zellen) konnten CPE-induzierte Barrieredefekte über eine Reduktion des transepithelialen Widerstandes bestätigt werden (Hardy *et al.*, 1999).

1.2.3 Funktionelle Domänen und Struktur von CPE

CPE kann funktionell in zwei Domänen unterteilt werden. Die C-terminale Domäne (cCPE) beinhaltet die Claudin-Bindungsdomäne und ist alleine nicht toxisch, wobei die 30 C-terminalen Aminosäuren (290-319) für eine Bindung an Claudine ausreichend sind (Hanna *et al.*, 1991). Darüber hinaus sind allerdings auch weitere Aminosäuren in cCPE an der Interaktion beteiligt (Winkler *et al.*, 2009). Die N-terminale Domäne von CPE (nCPE) ist für die Vermittlung der Toxizität essentiell (Hanna *et al.*, 1991; Kokai-Kun *et al.*, 1999). Für die Toxizität nicht notwendig sind die 37 Aminosäuren am N-Terminus. Nach Abspaltung dieser Aminosäuren durch Chymotrypsin wurde vielmehr eine Erhöhung der Toxizität beschrieben (Kokai-Kun *et al.*, 1999).

Sowohl für cCPE (PDB: 2QUO, C (Van Itallie *et al.*, 2008)) als auch für das Volllängentoxin sind Kristallstrukturen verfügbar (PDB: 2XH6, 2YHJ, (Briggs *et al.*, 2011); PDB: 3AM2, (Kitadokoro *et al.*, 2011)). Strukturell können im Volllängentoxin drei Domänen (Domäne I bis III) unterschieden werden: nCPE beinhaltet Domäne I und II, Domäne III entspricht cCPE (Kitadokoro *et al.*, 2011) (Abbildung 1-1).

Auffällig ist die große strukturelle Ähnlichkeit von CPE zu β -Poren-formenden Toxinen (β -PFT) – insbesondere zu denen der Aerolysin-ähnlichen Familie, zu der neben Aerolysin auch *C. perfringens* Epsilon Toxin und *Laetiporus sulfureus* hämolytisches Porenformendes Lectin gehören (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). Mitglieder dieser Familie unterscheiden sich deutlich in ihrer N-terminalen Rezeptor-Bindungsdomäne, während sie starke strukturelle Ähnlichkeit in der C-terminalen Domäne aufweisen, die an der Oligomerisierung und Porenbildung beteiligt ist (Mancheno *et al.*, 2010). Obwohl keine signifikante Sequenzhomologie vorhanden ist, ist die N-terminale Domäne von CPE der C-terminalen Domäne der Aerolysin-ähnlichen β -PFTs ähnlich (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011).

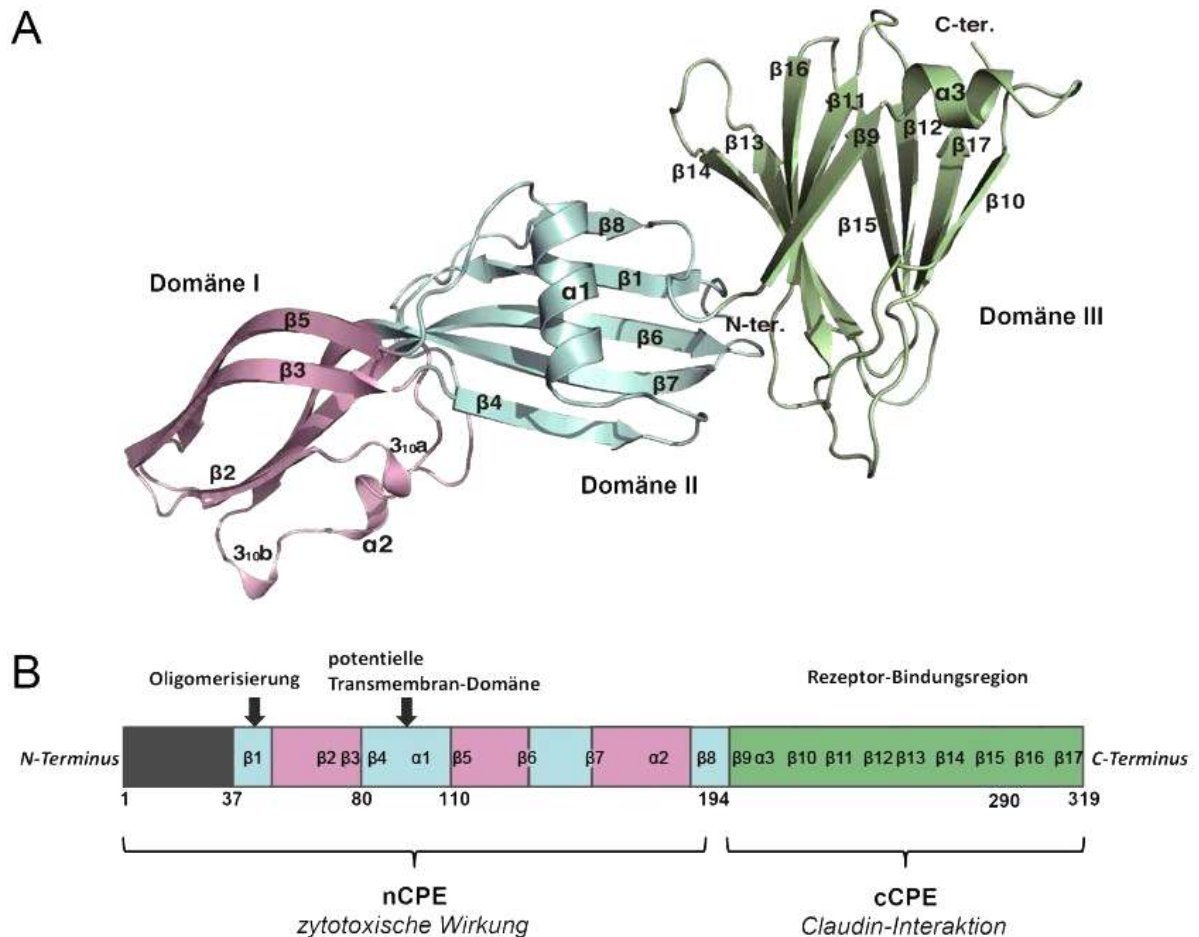


Abbildung 1-1 **CPE-Kristallstruktur (A) und schematische Darstellung funktioneller Domänen (B)**. Strukturell können drei Domänen unterschieden werden (I (rosa), II (blau) und III (grün)). Funktionell werden die den toxischen Effekt vermittelnde N-Terminale Domäne (nCPE) und die C-terminale Rezeptor-Bindungsdomäne (cCPE) unterschieden. In (B) sind die 37 N-terminalen Aminosäuren, die scheinbar keine definierte Sekundärstruktur besitzen (Kitadokoro *et al.*, 2011) und für die toxische Aktivität nicht notwendig sind (Kokai-Kun und McClane, 1997), (grau) dargestellt (modifiziert nach (Kitadokoro *et al.*, 2011)).

1.2.4 Mechanismus der Porenbildung und CPE-vermittelten Zytotoxizität

Die Ausbildung von CPE-Poren in der Plasmamembran der Zielzelle ist ein mehrstufiger Prozess (Abbildung 1-2) und beginnt mit der Bindung von CPE an seine Claudin-Rezeptoren (Abbildung 1-2, I.). Es entsteht ein ~90 kDa SDS-sensitiver Komplexes, der neben einem Toxin ein oder mehrere Claudine enthält (Robertson *et al.*, 2007). Diese CPE-Claudin-Komplexe oligomerisieren (Abbildung 1-2, II.) dann zu einem ~450 kDa SDS-resistenten Komplex (apparentes Molekulargewicht (MW) in der SDS-PAGE ~155 kDa) der vermutlich aus sechs CPE-Molekülen sowie einer nicht genau definierten Anzahl von Rezeptor- und assoziierten Nicht-Rezeptorclaudinen besteht und als CH1-Komplex (für CPE-Hexamer-1) bezeichnet wird (Robertson *et al.*, 2007). Die Assemblierung des CH1-Komplexes geht nicht notwendigerweise mit einer Änderung der Permeabilität der

Plasmamembran einher, was auf die Existenz eines Übergangszustandes als CH1-Präpore hindeutet (Smedley *et al.*, 2007b). Wie andere β -Poren-formende Toxine, besitzt CPE eine Region mit alternierendem Muster hydrophober und polarer Seitenketten (Aminosäuren 81 bis 106 in CPE). Typischerweise bildet diese Region eine amphipatische β -*hairpin* Struktur aus, die Bestandteil einer oligomeren, die Plasmamembran durchspannenden β -Pore ist. Der Durchtritt von Ionen, Wasser oder anderen Soluten durch diese Pore führt schließlich zur Aktivierung des Zelltods bzw. zur Zellyse (Mancheno *et al.*, 2010; Szczesny *et al.*, 2011).

Experimentelle Daten bestätigten, dass es sich bei den Aminosäuren 81 bis 106 vermutlich um den membrandurchspannenden Bereich in CPE handelt: Die entsprechende Deletionsmutante von CPE oligomerisierte zu einem CH1-Komplex der jedoch keine Aktivität / Erhöhung der Membranpermeabilität für ^{86}Rb zeigte (Smedley *et al.*, 2007b). Ähnliche Ergebnisse wurden mit CPE-Varianten erhalten, in welchen Phenylalanin an Position 91 bzw. 95 durch ein Cystein substituiert war. Zudem waren die von diesen CPE-Varianten gebildeten CH1-Komplexe – verglichen mit der aktiven, vom Wildtyp-Toxin gebildeten CH1-Pore – sensitiver gegenüber einem Verdau mit Pronase (Chen *et al.*, 2012); ein Hinweis darauf, dass die entsprechenden Aminosäuren (i) in einer funktionell aktiven Pore in der Plasmamembran und somit unzugänglich für einen Pronase-Verdau lokalisiert sind und (ii) essentiell für Insertion von CPE in die Plasmamembran sind (Chen *et al.*, 2012). Nach längerer Inkubation mit CPE kann ein weiterer SDS-resistenter Komplex von ~600 kDa (apparentes MW in der SDS-PAGE ~200 kDa) nachgewiesen werden. Dieser enthält zusätzlich ein weiteres Tight Junction (TJ)-Protein, das Occludin (Robertson *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2000). Die physiologische Relevanz des CH-2-Komplexes ist allerdings unklar, da dieser bislang nur *in vitro* nicht aber *in vivo* gefunden wurde – obwohl Occludin in den untersuchten Geweben exprimiert war (Caserta *et al.*, 2011).

Die Kristallstruktur zeigte, dass der putative membrandurchspannende Bereich (Aminosäure 81 bis 106) in einer Helix-*turn*- β -*sheet* Struktur ($\alpha 1 \beta 4$) in Domäne II liegt (vgl. Abbildung 1-1) (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). Diese Region des Toxins befindet sich in einiger Entfernung zur Claudinbindungstasche in Domäne I / cCPE. Es scheint daher plausibel, dass zur Membraninsertion (Abbildung 1-2, III.) dieses Bereiches eine größere Konformationsänderung nötig ist. Aufgrund der Strukturhomologie zu PFO – für das einige Details bekannt sind – wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die von Aminosäuren 81 bis 106 gebildete Helix-*turn*- β -*sheet* Struktur durch ein Umklappen der beiden langgestreckten, antiparallelen β -Faltblatt-Stränge $\beta 6$ und -7 in eine Nähe zur Plasmamembran gebracht werden, welche die Insertion erlaubt (Kitadokoro *et al.*, 2011).

Die kürzlich mittels Kryoelektronenmikroskopie bestimmte Struktur einer Aerolysin Pore und konformationeller Zwischenstufen erlaubte neue Einblicke in mechanistische Details der Porenbildung durch Aerolysin-ähnliche Toxine (Iacovache *et al.*, 2016): In einem ersten Schritt bildet sich eine oligomere Präpore mit zwei hochstabilen, konzentrischen β -*barrels*

die von Domäne IV (entspricht Domäne III in CPE) gebildet werden. Der amphipatische, membrandurchspannende Bereich verbleibt dabei zunächst in seiner ursprünglichen Konformation und Lage. Erst in einem weiteren Schritt verlängert sich der innere der zwei konzentrischen β -barrels durch Ausklappen des amphipatischen Bereiches. Zuletzt kommt es zu einem vertikalen Umklappen des Proteins – ähnlich dem für CPE vorgeschlagenen (Kitadokoro *et al.*, 2011) – was zur Insertion des amphipatischen Bereiches in die Plasmamembran und so zur Ausbildung einer aktiven Pore führt (Iacovache *et al.*, 2016). Die CPE-Pore erlaubt die Passage von kleinen Kationen, wobei Kationen die im mittleren geometrischen Durchmesser größer als etwa 6 Å sind nicht passieren können (Hardy *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1986). Eintretendes Ca^{2+} ist wichtig, wenn nicht notwendig für die CPE-vermittelte Zytotoxizität (Chakrabarti und McClane, 2005; Horiguchi *et al.*, 1986; Matsuda und Sugimoto, 1979) (Abbildung 1-2, IV.).

In geringen Dosen kann CPE binnen 1 h Apoptose über einen klassischen Weg – vermittelt über mitochondriale Depolarisation und Caspase3/7 Aktivierung induzieren. Bei hohen CPE-Dosen führt massiver Ca^{2+} -Einstrom zu nekrotischem Zelltod bekannt als Onkose (Chakrabarti *et al.*, 2003). Beide Zelltod-Mechanismen sind abhängig von Calpain- und Calmodulin-Aktivierung (Chakrabarti und McClane, 2005).

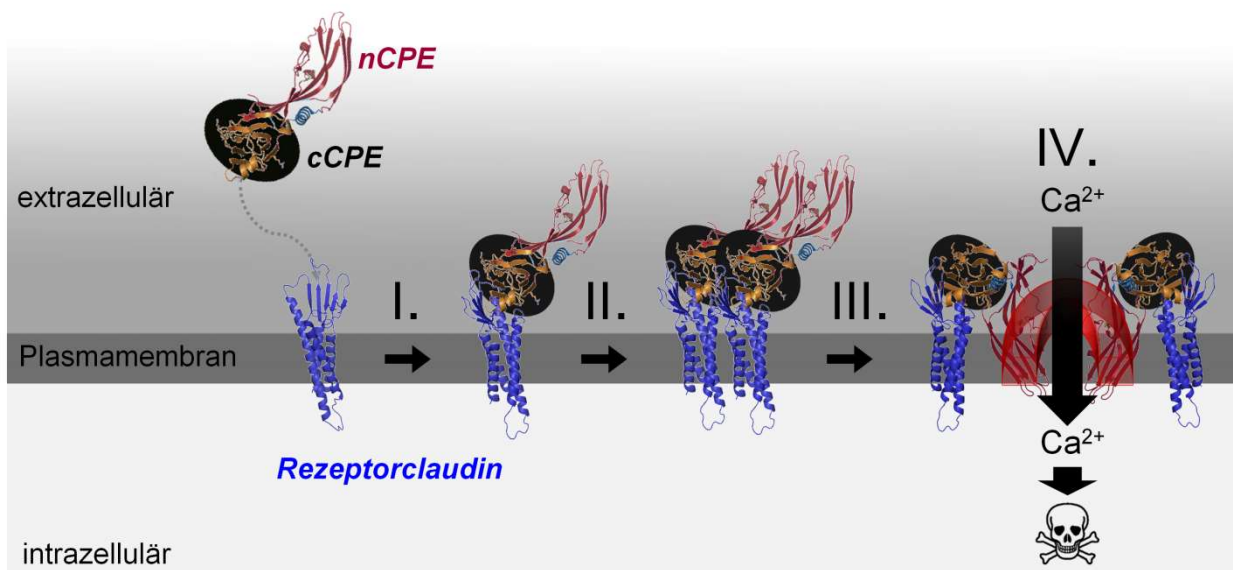


Abbildung 1-2 **Zellulärer Mechanismus CPE-vermittelter Toxizität.** CPE bindet über seine C-terminale Domäne (cCPE) an Rezeptorclaudine in der Plasmamembran der Zielzelle (I.). So entstandene kleine Komplexe oligomerisieren dann (II.) zu größeren Komplexen, die vermutlich 6 CPE-Moleküle enthalten. Schließlich insertiert (III.) die N-Terminale Domäne in die Plasmamembran, sodass es zur Ausbildung einer Pore kommt. Durch diese Pore einströmendes Ca^{2+} (IV.) führt schließlich zum Tod der Zelle. Weitere Details s. Text. Für das Schema wurden folgende Kristallstrukturen verwendet: Claudin-19 cCPE Komplexstruktur (PDB ID: 3X29, (Saitoh *et al.*, 2015)) und CPE (PDB ID: 3AM2,(Kitadokoro *et al.*, 2011)). Beide Strukturen wurden für I. aligned und für II. –IV manuell verändert und angeordnet (Pymol 1.7.4., Schrödinger LLC); Powerpoint, Microsoft).

1.3 CPE-Rezeptoren sind Mitglieder der Proteinfamilie der Claudine

Rezeptoren für CPE waren lange unbekannt. 1997 wurden schließlich zwei strukturell verwandte Membranproteine beschrieben, die CPE als Rezeptoren dienen (Katahira *et al.*, 1997a; Katahira *et al.*, 1997b). Zunächst als CPE-Rezeptor (CPE-R) und CPE-Rezeptor 2 (CPE-R2) benannt, erfolgte später die Zuordnung zu der damals neu entdeckten Proteinfamilie der Claudine (Cldn) (Morita *et al.*, 1999). Mittlerweile sind 27 (Cldn1-27) Mitglieder (Subtypen) dieser Familie von Typ III-Membranproteinen bekannt. Claudine besitzen Molekulargewichte von ca. 20 bis 27 kDa und können anhand von Sequenzhomologien auf Aminosäure-Ebene in zwei Gruppen eingeteilt werden (Krause *et al.*, 2008): Innerhalb der Gruppe der klassischen Claudine ist die Homologie groß. Sie umfasst die Claudine 1-10, 14, 15, 17 und 19. Die übrigen Claudine werden zur Gruppe der nicht-klassischen Claudine zusammengefasst (Krause *et al.*, 2008).

1.3.1 Topologie und Struktur von Claudinen

Über Sequenzdaten und Hydropathie-Plots wurden vier hochkonservierte α -helikale Transmembransegmente (TM1 bis -4) identifiziert, die charakteristisch für die Topologie von Claudinen sind (Hua *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 1999). Verbunden werden diese Transmembransegmente über eine intrazelluläre Schleife (zwischen TM2 und -3 (ca. 20 AS)) sowie zwei extrazelluläre Schleifen (EZS1 (ca. 50 AS) und -2 (ca. 20 AS)) zwischen TM1 und -2 sowie TM3 und -4. Ein meist kurzer N- (typischerweise etwa 7 AS) und ein längerer C-terminaler Bereich (typischerweise 22 bis 55 AS) befinden sich jeweils intrazellulär (Abbildung 1-3, C). Kristallstrukturen von Claudinen waren bis vor kurzem nicht verfügbar. In der Arbeitsgruppe konnte jedoch durch Kombination von Mutagenese Studien und bioinformatischen Methoden ein Homologie-Modell der EZS2 für klassische Claudine generiert werden, das eine Helix-turn-Helix-Struktur voraussagte (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008; Veshnyakova *et al.*, 2012b; Winkler *et al.*, 2009). Außerdem wurde – basierend auf Daten zu evolutionär gekoppelten Sequenz-Variationen innerhalb der Claudin/PMP22/MP20/EMP-Superfamilie – eine Anordnung der Transmembran-Segmente in einem linksgängigen vier-Helix-Bündel vorgeschlagen (Rossa *et al.*, 2014).

Inzwischen sind Kristallstrukturen für einige Claudine (mCldn15 (PDB: 4P79, (Suzuki *et al.*, 2014)); mCldn19 als Komplex mit cCPE-S313A (PDB: 3X29, (Saitoh *et al.*, 2015)); hCldn4 als Komplex mit cCPE-wt (PDB: 5B2G, (Shinoda *et al.*, 2016)) verfügbar. Die Kristallstrukturen bestätigten die Anordnung der Transmembransegmente in einem linksgängigen vier-Helix-Bündel und auch bei einem Vergleich des EZS2-Homologiemodells mit der Struktur von mCldn15, mCldn19 und hCldn4 zeigten sich große Ähnlichkeiten. Lediglich die für die C-terminalen Region nach dem *turn* am Übergang zur TM4 vorhergesagte α -helikale Konformation konnte nicht bestätigt werden. Hier liegt jeweils ein

kurzer β -Strang vor, der zusammen mit β -Strängen der EZS1 eine ausgedehnte β -Faltblatt-Struktur bilden.

1.3.2 Claudine sind als Bestandteil von *Tight Junctions* essentiell für die Aufrechterhaltung epi- und endothelialer Barrieren

Claudine sind essentieller Bestandteil der *Tight Junctions* (TJ) (Furuse *et al.*, 1998a; Furuse *et al.*, 1998b). Diese Zell-Zellverbindungen, die in der deutschsprachigen Literatur auch unter dem Begriff „Schlussleisten“ behandelt werden, sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung epi- und endothelialer Barrieren beteiligt und umschließen Epi- bzw. Endothelzellen an der apikalen Seite der lateralen Plasmamembran (Abbildung 1-3, A). Zuerst wurden TJ in transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen (Farquhar und Palade, 1963) beobachtet. Hier erscheinen sie als Kontaktpunkte zwischen zwei Zellen an welchen die beiden Plasmamembranen miteinander verschmelzen (*kissing points*). Wenn äußere und innere Lipid-Schicht der Plasmamembran mittels Gefrierbruchtechnik voneinander getrennt und elektronenmikroskopisch analysiert (FFEM) werden, sind TJ als komplexes Netzwerk miteinander verknüpfter Stränge sichtbar (Staehein, 1973).

Zu den molekularen Komponenten der TJ gehören neben Claudinen eine Vielzahl weiterer transmembranaler Proteine wie Occludin, Trizellulin, MarvelD3 und die Proteinfamilie der *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) (Aurrand-Lions *et al.*, 2001; Furuse *et al.*, 1993; Ikenouchi *et al.*, 2005; Martin-Padura *et al.*, 1998). Auf zytoplasmatischer Seite assoziierte Proteine wie *Zonula Occludens* 1 bis 3 (ZO1 bis -3) (Gumbiner *et al.*, 1991; Haskins *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1991) und Cingulin (Citi *et al.*, 1988) dienen als Gerüstproteine, verknüpfen TJ-Stränge mit dem Zytoskelett (D'Atri und Citi, 2001; Fanning *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 1999) und regulieren die TJ-Assemblierung (Guillemot und Citi, 2006; Hernandez *et al.*, 2007; McNeil *et al.*, 2006; Umeda *et al.*, 2006). Außerdem wurden weitere zytoplasmatisch assoziierte Proteine beschrieben. Hierunter der Transkriptionsfaktor *ZO-1-associated nucleic acid binding protein* (ZONAB), der regulatorisch auf Zellproliferation und Differenzierung wirkt (Balda und Matter, 2000; Lima *et al.*, 2010) oder die GTPasen *Ras related in brain* 13 und 3b (Rab13 und Rab3b), die an der Regulation der TJ-Assemblierung beteiligt sind (Marzesco *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 1994; Zahraoui *et al.*, 1994).

Claudine werden als das „Rückgrat“ der TJ bezeichnet, denn sie sind essentiell für die Strangbildung. So lassen sich in Zellen wie Fibroblasten oder HEK-293-Zellen, die endogen keine TJ besitzen, TJ-Netzwerke durch Transfektion mit einem einzigen Claudin-Subtyp rekonstituieren (Furuse *et al.*, 1998b; Piontek *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2003). Dass TJ keinesfalls starre Strukturen sind kann mikroskopisch in lebenden Zellen visualisiert werden: Durch Transfektion von Fibroblasten mit (fluoreszenzmarkiertem) Cldn1 (Sasaki *et al.*, 2003) oder Cldn2 (Van Itallie *et al.*, 2017) rekonstituierte TJ-Netzwerke waren

hochdynamisch und gekennzeichnet von kontinuierlichen Strangbrüchen und Neuverknüpfungen.

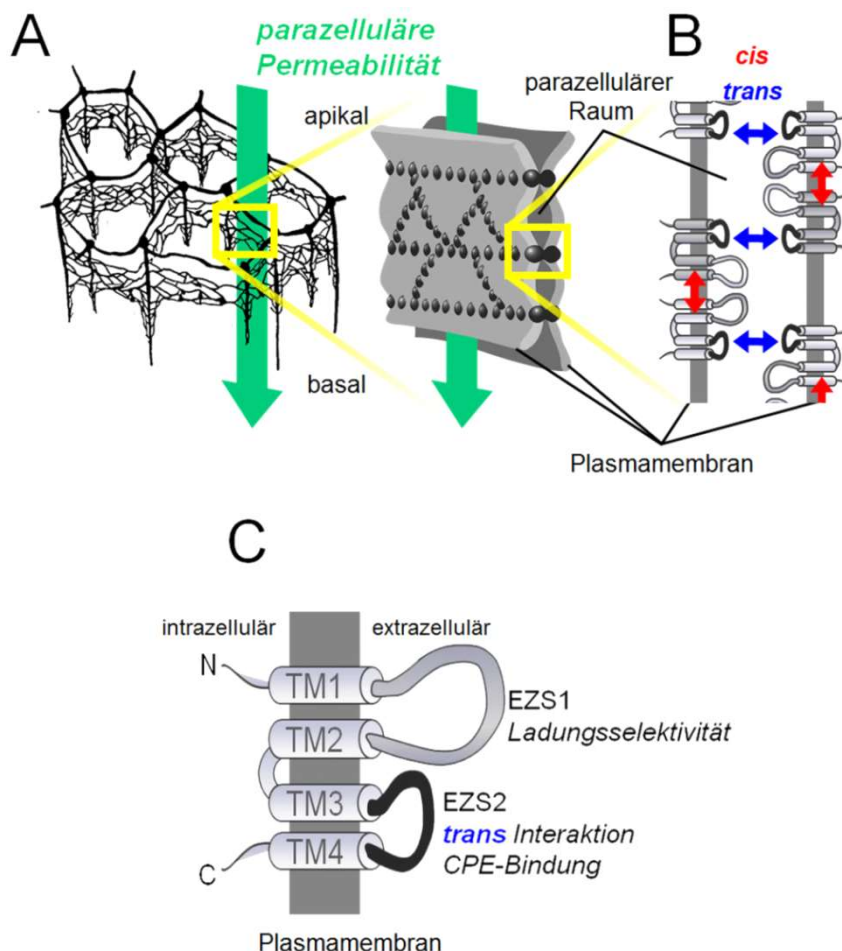


Abbildung 1-3 **Claudine als essentieller Bestandteil von Tight Junctions (TJ) (A,B) und Topologie von Claudinen (C)**. TJ bestehen aus einem Netzwerk von TJ-Strängen, umschließen Epithelzellen auf der apikalen Seite und regulieren die parazelluläre Permeabilität (A, modifiziert nach (Menco, 1988)). Die strukturgebende Komponente sind Claudine, die in *cis* – entlang der Plasmamembran derselben Zelle – und *trans* – über den parazellulären Raum hinweg miteinander interagieren (B, nach (Piontek *et al.*, 2011)). C, EZS1 und EZS2 (Extrazelluläre Schleife 1 und 2) sind an der *trans* Interaktion beteiligt. Die EZS1 kann je nach Claudin-Subtyp abdichtend wirken oder Kanäle bilden und ist daher für die parazelluläre Permeabilität entscheidend. (TM1-4: Transmembrandomänen 1 bis 4) (nach (Krause *et al.*, 2008)).

Epi- und endotheliale Barrieren dienen der Aufrechterhaltung des inneren Milieus von Organen gegenüber der Umgebung. TJ leisten hierzu einen essentiellen Beitrag, indem sie die parazelluläre Permeation kontrollieren (*gate*-Funktion) (Diamond, 1977). Dabei verhindern TJ eine unkontrollierte Diffusion von Substanzen durch den parazellulären Raum und erlauben gleichzeitig eine selektive Passage von Wasser, Ionen und anderen Soluten. Die parazelluläre Permeabilität ist gewebespezifisch und hängt von der gewebetypischen Expression der verschiedenen Claudin-Subtypen ab (Günzel und Yu, 2013; Krause *et al.*, 2008). Durch Expression barrierebildender Claudine wie

beispielsweise Cldn1, -3 und -5 wird die die parazelluläre Permeabilität für Wasser, Ionen und Solute verringert. Andere Claudine bilden parazelluläre Kanäle. Die Expression solcher kanalbildender Claudine erhöht folglich die parazelluläre Permeabilität. Hierbei können Claudine, die kationenselektive Kanäle (Cldn2, -10b, -15, -16 zusammen mit -19) (Amasheh *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2011; Van Itallie *et al.*, 2003; Van Itallie *et al.*, 2006) von solchen die anionenselektive Kanäle bilden (z.B. Cldn10a, -17) (Hou *et al.*, 2010; Krug *et al.*, 2012; Van Itallie *et al.*, 2006) unterschieden werden. Cldn2 erhöht zudem auch die parazelluläre Permeabilität für Wasser (Rosenthal *et al.*, 2010). Aminosäuren in der EZS1 der Claudine sind für die Kanalbildung und Ladungsselektivität der Kanäle entscheidend (Yu *et al.*, 2009).

Über eine Interaktion zwischen Claudinen gleichen (homophile-) oder unterschiedlichen Subtyps (heterophile-Interaktion) kopolymerisieren Claudine zu Heteropolymeren (Furuse *et al.*, 1999). Eine Interaktion kann dabei in *cis* (zwischen Claudinen derselben Plasmamembran) oder in *trans* (zwischen Claudinen in den Zellmembranen benachbarter Zellen) erfolgen (Furuse *et al.*, 1998b; Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2011) (Abbildung 1-3, B). *Cis* Interaktionen alleine sind sehr wahrscheinlich nicht ausreichend für die Ausbildung polymerer TJ-Stränge. Für Cldn5- Mutanten, die zwar in *cis* nicht aber in *trans* interagierten konnten mittels FFEM keine TJ-Stränge nachgewiesen werden (Piontek *et al.*, 2008). Direkt oder indirekt notwendig für die Ausbildung von *trans*-Interaktionen scheinen in klassischen Claudinen konservierte, aromatische Aminosäuren in der EZS2 (z.B. Y147 in murinem-Cld3 und Y148 in murinem-Cld5) zu sein (Krause *et al.*, 2015; Piontek *et al.*, 2011; Piontek *et al.*, 2008).

TJ übernehmen neben der Regulation der parazellulären Permeabilität eine weitere Funktion: Als zellumspannendes Strangsystem teilen sie die Plasmamembran in ein apikales und basolaterales Membrankompartiment. Indem sie so die freie Diffusion von Lipiden und Membranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran verhindern (*fence*-Funktion), sind sie an der Aufrechterhaltung der Polarität epithelialer Zellen (Diamond, 1977) beteiligt.

1.3.3 Nicht alle Claudine sind CPE-Rezeptoren

Cldn3 und -4 waren die ersten bekannten CPE-Rezeptoren (Katahira *et al.*, 1997a; Katahira *et al.*, 1997b; Morita *et al.*, 1999; Sonoda *et al.*, 1999). Auch eine Interaktion von CPE mit den Claudinen 6, -7, -8, und -14 wurde beschrieben: CPE zeigte einen toxischen Effekt (Kimura *et al.*, 2010) auf L-Fibroblasten, wenn sie mit diesen Claudinen transfiziert wurden. Für Cldn1 und -2, konnte zunächst keine Interaktion mit CPE nachgewiesen werden (Fujita *et al.*, 2000; Sonoda *et al.*, 1999). Allerdings berichtet eine spätere Studie von einem geringen toxischen Effekt von CPE auf HEK-293-Zellen bzw. L- Fibroblasten, die mit Cldn1 und -2 transfiziert waren (Kimura *et al.*, 2010). Die EZS2 wurde als der Bereich in Claudinen

identifiziert, der essentiell für die die CPE-Interaktion ist (Fujita *et al.*, 2000). Daher lieferten Peptid-Arrays mit Claudin EZS2-Peptiden (15-20 Aminosäuren), die mit cCPE (als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase, GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉) inkubiert wurden, wichtige Hinweise bezüglich der Interaktion von CPE mit unterschiedlichen Claudinen (Winkler *et al.*, 2009).

So konnte festgestellt werden, dass CPE für die bis dahin nicht analysierten Claudine 10–13, 15, 16, 18–20, und 22 keine oder nur eine geringe Affinität und für Cldn9 eine hohe Affinität besitzt. Und die Ergebnisse für die Interaktion von CPE mit schon zuvor untersuchten Claudin-Subtypen stimmten weitgehend mit Ergebnissen älterer Studien überein. Eine Interaktion der EZS2-Peptide von Cldn4 und -8 mit cCPE konnte allerdings nicht gezeigt werden (Ling *et al.*, 2008b; Winkler *et al.*, 2009). Grund ist möglicherweise eine nicht native Konformation der Peptide.

Obwohl verschiedene Assays – vermutlich aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten und unterschiedlicher CPE- bzw. Claudin-Konstrukte – teilweise leicht abweichende Ergebnisse lieferten, lassen sich die Affinitäten wie folgt zusammenfassen:

Rezeptoren an die CPE/cCPE mit hoher bzw. mittlerer Affinität bindet sind Cldn3, -4, -6, -7 und -9 bzw. Cldn8 und -14. Diese werden im Weiteren auch als Rezeptorclaudine bezeichnet. Die übrigen Claudine interagieren nur schwach (Cldn1, -2, -19) oder gar nicht (Cldn5, Cldn10-13, Cldn15-18 und Cldn20-27) mit CPE (Fujita *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010; Protze *et al.*, 2015; Robertson *et al.*, 2010; Saitoh *et al.*, 2015; Shrestha und McClane, 2013; Sonoda *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 2009). Sie gelten als Nicht-Rezeptorclaudine (Kimura *et al.*, 2010; Veshnyakova *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 2009). Publierte Assoziations- (K_a) und Dissoziationskonstanten (K_d) für die Interaktion von CPE-wt mit Claudinen sind Tabelle 1-1 zu entnehmen.

Tabelle 1-1 **Assoziationskonstanten (K_a) und daraus berechnete Dissoziationskonstanten (K_d) für die Interaktion von CPE mit Rezeptorclaudinen.** K_a wurde jeweils über die Bindung von I¹²⁵-markiertem CPE an L-Fibroblasten (45 min, 37 °C, Zellen in Suspension), die mit den entsprechenden Claudinen transfiziert waren, ermittelt.

	K_a in M ⁻¹	K_d in nM	Referenz
hCldn3	4,60 x 10 ⁷	21,7	(Katahira <i>et al.</i> , 1997b)
mCldn3	8,4 x 10 ⁷ ;	11,9	(Sonoda <i>et al.</i> , 1999)
hCldn4	7,94 x 10 ⁷	12,6	(Katahira <i>et al.</i> , 1997b)
mCldn4	1,1 x 10 ⁸ ;	9,1	(Sonoda <i>et al.</i> , 1999)
mCldn6	9,7 x 10 ⁷	10	
mCldn7	8,8 x 10 ⁷	11,4	
mCldn8	1,0 x 10 ⁶	1000	(Fujita <i>et al.</i> , 2000)
mCldn14	3,6 x 10 ⁶	277	

1.4 CPE-Claudin-Interaktion

1.4.1 Beteiligte Aminosäuren

Peptidkartierung und Mutagenesestudien in Claudinen (Protze *et al.*, 2015; Veshnyakova *et al.*, 2012b; Winkler *et al.*, 2009) zeigten, dass bestimmte Aminosäuren in der EZS2 von Claudinen für die CPE-Claudin-Interaktion bedeutsam sind. Die Konsensus-Sequenz $N/D^{(P-1)}P/S^{(P)}L/M/V/I/S^{(P+1)}V/T^{(P+2)}P/A/N/D^{(P+3)}$ innerhalb der EZS2 von Claudinen konnte so als CPE-Bindemotiv identifiziert werden. Charakteristisch ist das hochkonservierte Prolin (Position ^(P)) (Krause *et al.*, 2008). Die Interaktion mit CPE/cCPE wird insbesondere durch die Reste an den Positionen (P-1) und (P+1) stark beeinflusst (Kimura *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 2009).

Auf CPE-Seite konnten in Mutagenese Studien die Aminosäuren Y306, Y310, Y312 (Ebihara *et al.*, 2007; Harada *et al.*, 2007) und L315 (Takahashi *et al.*, 2008) als relevant für die CPE-Cldn Interaktion identifiziert werden und die Aminosäuresubstitution Y306A/L315A in cCPE führte zu einer drastischen Reduktion der Bindung an Cldn3- und -4-exprimierende HEK-293-Zellen (Protze *et al.*, 2015). Die genannten Aminosäuren befinden sich auf zwei Seiten einer großen Vertiefung in der Oberfläche von cCPE, die als Bindungstasche für die EZS2 von Claudinen identifiziert wurde (Kimura *et al.*, 2010). Die Bindungstasche weist eine größere, stärker hydrophobe Vertiefung, die von den drei Tyr (Y306, Y310, Y312) flankiert wird, und eine kleinere weniger hydrophobe Vertiefung auf, die von L315 und zwei weiteren Leu (L223 und L254) flankiert wird (Veshnyakova *et al.*, 2012b).

1.4.2 Interaktionsmodelle und Kristallstruktur von CPE-Claudin-Komplexen

Das Docken der EZS2-Homologiemodelle von Cldn3- und -4 auf die Kristallstruktur von cCPE lieferte in Kombination mit Mutagenese Studien ein erstes Modell für die Interaktion klassischer Claudine mit CPE. In dem so generierten Modell ist die EZS2 so in der CPE-Bindungstasche orientiert, das Leucin (P+1) in der tieferen von den drei Tyr (Y306, Y310, Y312) und nicht in der von den drei Leu (L223, L254, L315) gesäumten Vertiefung liegt (Veshnyakova *et al.*, 2012b). Diese Orientierung wurde durch die 2015 veröffentlichte Kristallstruktur für einen mCldn19/cCPEs313A-Komplex (PDB: 3X29, (Saitoh *et al.*, 2015)) und einen hCldn4/cCPE-Komplex (PDB: 5B2G, (Shinoda *et al.*, 2016)) bestätigt. Hier zeigte sich auch, dass die EZS1 ebenfalls an der Interaktion mit cCPE beteiligt ist, u.a. indem sie die hydrophobe Oberfläche für die Interaktion mit cCPE vergrößert.

1.5 cCPE – Claudin-subtypspezifisches Werkzeug, dessen Subtypspezifität gezielt über Mutationen verändert werden kann

Aufgrund seiner hochaffinen Interaktion mit Claudinen (vgl. auch Abschnitt 0), kann cCPE als Werkzeug (i) zur Erforschung struktureller und funktioneller Aspekte von Claudinen und TJs (Protze *et al.*, 2015; Veshnyakova *et al.*, 2012b; Winkler *et al.*, 2009), (ii) zu Modulation und Öffnung von Gewebebarrieren oder (Kondoh *et al.*, 2005; Sonoda *et al.*, 1999) (iii) als Targetingmodul – etwa im Zusammenhang mit claudinexprimierenden Tumoren (Michl *et al.*, 2001; Saeki *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009) (vgl. Abschnitt 1.6) – genutzt werden. In diesem Zusammenhang ist es von großem Interesse die Bindungseigenschaften nativen cCPEs gezielt zugunsten bestimmter Claudin-Subtypen zu verändern, um beispielsweise über eine möglichst gewebespezifische TJ-Modulation die parazelluläre Wirkstoffaufnahme über Gewebebarrieren wie die Bluthirnschranke (Liao *et al.*, 2016; Tscheik *et al.*, 2013) zu verbessern, oder die Detektion- und Behandlung von claudinexprimierenden Tumoren zu optimieren (vgl. Abschnitt 0).

Über mutationsgeführtes Docken der EZS2-Homologiemodelle von Cldn3 bzw. -4 auf die Kristallstruktur von cCPE in Kombination mit Bindungs-Assays wurden Aminosäuren identifiziert, die unterschiedlich stark zur Bindung der Rezeptorclaudine Cldn3 und -4 beitragen. So konnte innerhalb der Arbeitsgruppe eine cCPE-Variante (cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A) generiert werden, die eine Unterscheidung zwischen den Rezeptorclaudinen Cldn3 und -4 erlaubt und bevorzugt an Cldn4 bindet (Veshnyakova *et al.*, 2012b).

In einem alternativen Ansatz wurde mittels Phagen-Display ein Breitbandbinder selektioniert: Die cCPE-Variante cCPE-S304A/S305P/S307R/N309H/S313H bindet wie CPE-wt an das Rezeptorclaudin Cldn4, zusätzlich aber auch an die Nicht-Rezeptorclaudine Cldn1, -2 und -5 (Takahashi *et al.*, 2012). Die entsprechende Tripelmutante (cCPE-S305P/S307R/S313H) zeigte ähnlich Bindungseigenschaften (Protze *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2012).

Eine Bindung an Nicht-Rezeptorclaudin Cldn5 bei gleichzeitig gegenüber dem wildtyp reduzierter Bindung an Rezeptorclaudine konnte durch Einführen der Mutation Y306W/S313H erzielt werden. Zudem reduzierte die Substitution Y306W die Bindung an (das Nicht-Rezeptorclaudin) Cldn1 (Protze *et al.*, 2015).

1.6 Claudine als Zielproteine bei der Tumorthherapie

1.6.1 Deregulierte Expression und Lokalisation machen Claudine zu vielversprechenden targets in der Tumorthherapie

Viele maligne Tumoren sind epithelialen Ursprungs. Der Übergang von epithelialem zu mesenchymalem Phänotyp (Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT) wird als zentrales Ereignis der Karzinogenese auf zellulärer Ebene genannt (Singh *et al.*, 2010) und ist gekennzeichnet von einem Verlust der Zellpolarität und Zell-Zelladhäsion. Es wird angenommen, dass dies zum einen über eine bessere Zugänglichkeit von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren zum Tumorwachstum zum anderen zur Invasivität von Tumoren beiträgt (Singh *et al.*, 2010). Eine Deregulation der Claudinexpression in Tumoren wurde vielfach gezeigt (Kwon, 2013; Morin, 2005; Osanai *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2010; Tabaries und Siegel, 2017). Eine Übersicht ist Tabelle 1-2 zu entnehmen.

Eine verminderte Claudinexpression, die zu einem Verlust der TJ-Integrität führt, kann eine verminderte Zellpolarität und Adhäsion – wie sie im Rahmen der EMT beobachtet wird – erklären. Interessanterweise wurde jedoch in vielen der Studien eine Überexpression verschiedener Claudine beschrieben. Beispielsweise zeigen Brust-, Kolon-, Kolorektal- und Pankreas-Tumoren häufig eine Überexpression von Cldn1, -3 oder -4, (Michl *et al.*, 2001; Nichols *et al.*, 2004)(de Oliveira *et al.*, 2005; Kominsky *et al.*, 2004). Und für die beiden häufigsten malignen Veränderungen der Lunge – Plattenepithel- und Adenokarzinome – wurde eine Überexpression von Cldn1 bzw. -5 beschrieben (Jung *et al.*, 2009; Paschoud *et al.*, 2007). Für papilläre Schilddrüsenkarzinome und deren Lymphknoten Metastasen wurde mehrfach eine hohe Cldn1 Expression gezeigt, die so in nicht-entartetem Schilddrüsen Gewebe oder follikulären Schilddrüsenkarzinomen nicht nachgewiesen werden konnte (Hucz *et al.*, 2006; Nemeth *et al.*, 2010). Cldn1 war dabei zellmembranär lokalisiert (Nemeth *et al.*, 2010; Tzelepi *et al.*, 2008).

Überexprimierte Claudine, die Plasmamembran lokalisiert sind, können – wie für Cldn4 in Magen-Tumorzellen gezeigt – zu einer Verstärkung der TJ-Barriere beitragen und – vermutlich über eine reduzierte Invasivität der Tumorzellen – mit einer günstigen Prognose für Patienten korrelieren (Kwon *et al.*, 2011). Dies ist aber nicht notwendigerweise der Fall. So zeigten beispielsweise humane kolorektale Tumoren mit erhöhter Expression der Barriere bildenden Claudine 1, -3 und -4 in Gefrierbruch-elektronenmikroskopischen-Aufnahmen desorganisierte TJ-Stränge und eine erhöhte parazelluläre Permeabilität für den elektronendichten Farbstoff Ruthenium-Rot (de Oliveira *et al.*, 2005) und, während in normalen Epithelzellen der Prostata Cldn4 vor Allem in der TJ vorliegt, wurde für entartete Prostataepithelzellen eine zellmembranäre Cldn4 Lokalisation außerhalb der TJ beschrieben (Maeda *et al.*, 2012). Darüber hinaus kann eine hohe Expression von Cldn3 in ovarialen Tumoren (Choi *et al.*, 2007) von Cld4 in Lungen-Adenokarzinomen (Chae *et al.*,

2014), Brustkrebs (Lanigan *et al.*, 2009) und Brustkrebsmetastasen der Lymphe (Szasz *et al.*, 2011) mit einer ungünstigen Prognose korrelieren. Eine hohe Claudinexpression kann eine Metastasierung begünstigen, wie für Cldn2-exprimierende Brustkrebszellen, welche in die Leber metastasieren, gezeigt ist (Kimbung *et al.*, 2014; Tabaries *et al.*, 2011).

Insgesamt gibt es etliche Hinweise, dass eine hohe Expression von Claudinen mit einer ungünstigen Prognose für die betroffenen Patienten einher gehen. Diskutiert werden hier (i) die Beteiligung von Claudinen an Signalwegen, die Migration und Invasivität und dadurch eine Metastasierung fördern und (ii) die Idee, dass Claudine zur Metastasierung beitragen, indem sie die Adhäsion von Tumorzellen an gesunde Zellen oder aber an extrazelluläre Matrix des Zielgewebes erleichtern (Tabaries und Siegel, 2017).

Es gibt Hinweise, dass posttranslationale Modifikationen der Claudine zu einer Desorganisation der TJ beitragen könnten. Die Phosphorylierung von Cldn-3 kann in einer ovariellen Adenokarzinomzelllinie (D'Souza *et al.*, 2005), die von Cldn-5 in einer endothelialen Zelllinie zu einer Schwächung der TJ Barriere beitragen (Soma *et al.*, 2004).

Tabelle 1-2 Übersicht über beschriebene Deregulation der Expression der Claudine 1 bis 5 und 7 in Tumoren unterschiedlichen Ursprungs.

Tumor- Ursprung	Claudin						Referenz
	1	2	3	4	5	7	
Brust	↑↓		↑↓	↑↓			↑↓ (Kwon, 2013; Lanigan <i>et al.</i> , 2009; Osanai <i>et al.</i> , 2017; Singh <i>et al.</i> , 2010; Tabaries und Siegel, 2017)
Lunge, Adenokarzinom	↓		↑	↑	↑	↓	(Chae <i>et al.</i> , 2014; Jung <i>et al.</i> , 2009; Osanai <i>et al.</i> , 2017; Paschoud <i>et al.</i> , 2007; Tabaries und Siegel, 2017)
Lunge, Platten- epithelkarzinom	↑		↑↓		↓	↓	(Jung <i>et al.</i> , 2009; Osanai <i>et al.</i> , 2017; Paschoud <i>et al.</i> , 2007; Tabaries und Siegel, 2017)
Magen	↑↓		↑	↑↓	↑	↑	(Kwon, 2013; Singh <i>et al.</i> , 2010) (Osanai <i>et al.</i> , 2017; Tabaries und Siegel, 2017)
Kolorektal	↑↓		↑	↑		↑	(Kwon, 2013; Tabaries und Siegel, 2017)

Einleitung						
Pankreas	↑↓		↑	↑	↑	(Kwon, 2013; Osanai <i>et al.</i> , 2017; Singh <i>et al.</i> , 2010)
Prostata	↑↓		↑	↑	↓	↑↓ (Kwon, 2013; Osanai <i>et al.</i> , 2017; Tabaries und Siegel, 2017)
Ovarien	↑↓		↑↓	↑↓	↑	↑ (Choi <i>et al.</i> , 2007; Kwon, 2013; Osanai <i>et al.</i> , 2017; Singh <i>et al.</i> , 2010; Tabaries und Siegel, 2017)
Uterus	↓	↓	↑	↑↓		↓ (Osanai <i>et al.</i> , 2017)
Melanom	↑			↑		↓ (Kwon, 2013)

1.6.2 CPE als Tumorthapeutikum

Die Statistik der *American Cancer Society* 2016 (Siegel *et al.*, 2016) schätzt, dass jeder 2te zwischen 2010 und 2012 in den USA geborene Junge und jedes 3te Mädchen im Laufe Ihres Lebens an Krebs erkranken wird. Besonders wahrscheinlich sind Brust (jedes 8te Mädchen), Lunge (jeder 14te Junge, jedes 17te Mädchen) und Kolon bzw. Rektum (jeder 21te Junge, jedes 23te Mädchen) betroffen. Etliche Tumortypen werden häufig erst im metastatischen Stadium diagnostiziert. Dies ist beispielsweise bei kolorektalen (bei Diagnose 20 % im metastatischen Stadium), ovarialen (bei Diagnose 60 % im metastatischen Stadium) und Lungen-Tumoren (bei Diagnose 57 % im metastatischen Stadium) der Fall und geht mit einer entsprechend schlechten Prognose (13, 28 bzw. 4 % 5 Jahresüberlebensrate) einher. Andere Tumoren, wie Pankreastumoren werden zwar oft früh erkannt (bei Diagnose 84 % lokal) haben aber dennoch eine schlechte Prognose (insgesamt 7 % 5-Jahresüberlebensrate) (Siegel *et al.*, 2016).

Dies zeigt, dass trotz Fortschritten in Diagnostik und etablierten Tumorthapien, wie Operation, Bestrahlung und Chemotherapie sowie deren ständiger Verbesserung (z.B. durch Kombinationen verschiedener Therapien und den Einsatz monoklonaler Antikörper (z.B. Rituximab, Cetuximab, Bevacizumab, Ipilimumab) die Entwicklung alternativer Therapien und Diagnostika nötig ist.

Aufgrund ihrer Überexpression in Tumoren, gelten Claudine als vielversprechende diagnostische und prognostische Marker sowie als Zielproteine bei der zielgerichteten Tumorthapie.

Dass die claudinspezifische Zytotoxizität von CPE erfolgreich genutzt werden kann, um Rezeptorclaudin exprimierende Tumorzellen zu bekämpfen, wurde *in vitro* und *in vivo* für Tumoren unterschiedlichen Ursprungs gezeigt: Kolon-, Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinomzellen, die Cldn3/4-exprimieren, waren CPE-sensitiv und in entsprechende Xenotransplantat Mausmodellen konnte eine Reduktion des

Tumorwachstums erzielt werden (Kominsky *et al.*, 2007; Kominsky *et al.*, 2004; Michl *et al.*, 2001; Pahle *et al.*, 2017; Santin *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde CPE erfolgreich eingesetzt, um chemotherapieresistente Cldn3/-4-exprimierende ovariale Tumorzellen (Casagrande *et al.*, 2011) und Cldn6-exprimierende, tumorigene pluripotente Stammzellen (Ben-David *et al.*, 2013) anzugreifen.

Eine entscheidende Frage bei der *in vivo* Applikation von CPE sind toxische Effekte auf nicht-entartete Gewebe und damit verbundene Nebenwirkungen. Denn in etlichen nicht-entarteten Geweben – etwa im Gastrointestinaltrakt, Leber, Niere – werden große Mengen CPE-Rezeptorclaudine wie Cldn3 und -4 exprimiert (Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002; Rahner *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2007).

Zur Eindämmung von Nebenwirkungen wird CPE in den meisten *in vivo* Studien lokal und hierbei zumeist durch direkte Injektion in den Tumor appliziert (Casagrande *et al.*, 2011; Kominsky *et al.*, 2007; Kominsky *et al.*, 2004; Michl *et al.*, 2001; Santin *et al.*, 2005). Ein Nachteil bei einer solchen intratumoralen Applikation rekombinanten CPEs ist, dass diese mehrfach in relativ kurzen, Zeitabständen erfolgen muss. Eine Alternative stellt hier die Suizidgentherapie mit CPE dar, deren Potential *in vitro* und *in vivo* demonstriert wurde (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012). Hierbei werden Tumorzellen nur einmalig mit CPE-cDNA transfiziert, die für eine Expression in eukaryontischen Organismen optimiert wurde (optCPE), was ein Absterben Rezeptorclaudin exprimierender Tumorzellen zur Folge hat. Dass es sich hierbei um einen spezifischen, Claudin-vermittelten Effekt handelt, konnte *in vitro* gezeigt werden: Während Claudin-3- bzw. -4-exprimierende Mamma- (MCF-7; (Walther *et al.*, 2012)) und Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2, HTC116; HT-29; SW480; SW629 (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012)) hochsensitiv gegenüber einer Transfektion mit optCPE waren, war dies für die Claudin-negative Melanomzelllinie SK-MEL-5 nicht der Fall / nur der Fall, nachdem sie mit einem CPE-Rezeptorclaudin (hier Cldn3) transfiziert worden war (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012). Darüber hinaus führte der CPE-Gentransfer zu einem reduzierten Tumorwachstum in Mäusen, die aus Karzinomzelllinien (MCF-7 und HTC116;(Walther *et al.*, 2012)) oder Cldn3- und -4-exprimierenden humanen Kolonkarzinomen abgeleitete Xenotransplantate (Pahle *et al.*, 2017) trugen. CPE wirkt hierbei nicht nur auf die transfizierten Zellen selbst, sondern wird Claudin-unabhängig über einen Zeitraum von mindestens 48 h aus den Zellen freigesetzt und kann extrazellulär an weitere Claudin exprimierende Zellen binden, sodass es gleichmäßig und über einen langen Zeitraum an seinem Wirkort präsent ist (Walther *et al.*, 2012).

Ein anderer Ansatz, um Nebenwirkungen zu vermeiden, ist der Einsatz von CPE als Protoxin, das spezifisch und nur lokal an seinem Wirkort in der Nähe des Tumors aktiviert wird. Erst durch das von Prostatatumoren sekretierte Prostataspezifische Antigen wird ein am C-terminus von CPE angehängtes Cldn3 EZS2 Peptid spezifisch abgespalten und kann anschließend an Rezeptorclaudine binden. Hierdurch konnte die toxische Wirkung auf

Zellen beschränkt werden, die sowohl Rezeptorclaudine exprimieren als auch Prostataspezifisches Antigen sekretieren (Romanov *et al.*, 2014).

Eine weitere potenzielle Komplikation beim Einsatz von CPE als Tumorthapeutikum ist eine mögliche Immunantwort, die einerseits zu Nebenwirkungen beitragen (Wallace *et al.*, 1999) andererseits zu einer Abgeschwächten Wirksamkeit führen kann. cCPE scheint eine geringere Immunogenizität zu besitzen als CPE (Sugii, 1994). Deshalb wurde vorgeschlagen cCPE als *targeting* Modul gekoppelt an andere Tumorthapeutika oder Toxindomänen – beispielsweise cCPE-TNF α (Fusionsprotein mit Tumor-Nekrose-Faktor- α) (Yuan *et al.*, 2009) oder cCPE-PSFI (Fusionsprotein mit Proteinsynthese-Inhibitorischer-Faktor aus *Pseudomonas aeruginosa*) (Ebihara *et al.*, 2006; Saeki *et al.*, 2009) – zu verwenden. Außerdem konnte cCPE erfolgreich als TJ-Modulator eingesetzt werden, der die Aufnahme von Chemotherapeutika am Wirkort erleichtert (Gao *et al.*, 2011).

1.7 Zielstellung der Arbeit

Ziel I: Pathomechanismus CPE-induzierter Schädigung des Kolon-Epithels

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Charakterisierung des Pathomechanismus CPE-vermittelter Effekte auf das intestinale Epithel. Hierbei wurde insbesondere das Kolon untersucht, da seit Kurzem bekannt ist, dass es – neben dem Dünndarm – sensitiv gegenüber CPE ist und in Fällen von *C. perfringens* Typ A Lebensmittelvergiftungen mit schwerem Verlauf stark geschädigt ist.

Zunächst sollte die CPE-Sensitivität von HT-29/B6-Zellen – einem Modell für das humane Kolon-Epithel – überprüft werden. Dazu sollte (i) die CPE-Bindung an die Zellen und anschließende Oligomerisierung mittels Immun-*Blot*, (ii) Porenbildung und Ca^{2+} -Einstrom mit dem fluorophoren Ca^{2+} -Chelator fura-2 und (iii) der Zelltod durch Apoptose/Nekrose in MTT-Assays analysiert werden.

CPE verfügt über eine hohe Claudin-abhängige Zytotoxizität und CPE-Rezeptorclaudine werden im intestinalen Epithel stark exprimiert. Dennoch zeigen die meisten *C. perfringens* Typ A Lebensmittelvergiftungen einen milden Verlauf mit rascher Regeneration. Ein Teil der Enterozyten scheint also vor dem CPE-induzierten Zelltod geschützt. Um zu untersuchen inwiefern die epitheliale Ausdifferenzierung und Barriere an diesem Schutz beteiligt ist, sollten die Effekte von CPE auf den epithelialen Zellverband *in vitro* analysiert werden. Hierzu verwendet werden sollten stark ausdifferenzierte HT-29/B6-Zellen ohne und mit induzierter Barriestörung sowie gering differenzierte HT-29-Zellen. Neben einer funktionellen Analyse CPE-induzierter Barrieredefekte über Messung des transepithelialen Widerstandes (TER; vgl. Abschnitt 2.5.1 und 2.5.2) und der parazellulären Permeabilität für Fluoreszein ((niedermolekularer Marker); vgl. Abschnitt 2.5.3), sollten insbesondere mikroskopische Analysen nach Immunfluoreszenzfärbung und Lebendzellsfärbungen im Mittelpunkt stehen, um CPE-Bindung, Lokalisation des CPE-Rezeptors Cldn4, TJ-Integrität und Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen zu visualisieren.

Die physiologische Relevanz der Ergebnisse sollte abschließend durch einen Vergleich mit CPE-Effekten auf humane Kolon-Biopsate überprüft werden.

Ziel II: Generierung und Charakterisierung optimierter CPE-Varianten für die Tumorthherapie

Der Einsatz von CPE-wt bzw. cCPE-wt-basierten Biologika zum zytotoxischen Angriff (Therapie) bzw. zur Detektion (Diagnostik) von claudinexprimierenden Karzinomzellen wird durch zwei Faktoren eingeschränkt:

- (i) Da (a) CPE-wt bzw. (b) cCPE-wt mit hoher Affinität an etliche Claudin-Subtypen (Rezeptorclaudine z.B. Cldn3, -4, -6, -7, -8) bindet, die auch in gesunden Geweben

exprimiert werden, kann (a) auch nicht-entartetes Gewebe geschädigt bzw. (b) das Signal- zu Hintergrundverhältnis der Detektion verschlechtert werden.

(ii) Ist die Affinität von CPE-wt für einige Nicht-Rezeptorclaudine wie Cldn1 und -5) sehr gering. Tumoren – wie bestimmte Thyroid- und Adenokarzinome – die vor Allem solche Nicht-Rezeptorclaudine überexprimieren sind daher mit CPE-wt-basierten Biologika nicht zugänglich.

cCPE/CPE-Varianten, deren Claudin-subtypspezifische Affinität und Toxizität auf die im jeweiligen Tumorkontext zugänglichen Claudine zugeschnitten sind, könnten helfen die Detektion und Therapie unterschiedlicher Claudin exprimierender Tumoren zu verbessern und eine maximale Toxizität auf Tumorzellen bei gleichzeitig minimalen Nebenwirkungen zu erzielen.

Daher sollte gezeigt werden, dass toxisches CPE durch eine gezielte Veränderung der Claudin-subtypspezifischen Affinität für die Therapie claudinexprimierender Tumoren optimiert werden kann. Als Ausgangspunkt dienten Arbeiten zur CPE-Cldn-Interaktion, die gezeigt hatten, dass Mutationen in der Bindungstasche von cCPE eine Veränderung des Claudin-Subtypspezifischen Bindungsverhaltens erlauben (z.B. reduzierte Cldn3-Bindung, verstärkte Cldn1- oder verstärkte Cldn5-Bindung (Protze *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2012; Veshnyakova *et al.*, 2012a).

Das Claudin-subtypspezifische Bindungsverhalten entsprechender cCPE-Varianten sollte in Bindungs-Assays mit HEK-293-Zellen, die jeweils einen Claudin-Subtyp exprimieren, über die Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_d) quantifiziert werden. Anschließend sollten ausgewählte Mutationen in toxisches CPE eingeführt werden und mittels MTT-Assays die Claudin-subtypspezifische Toxizität dieser CPE-Varianten durch Ihre Wirkung auf Claudin exprimierende HEK-293-Zellen gezeigt werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob neuartige CPE-Varianten bei der Bekämpfung von Tumorzellen tatsächlich im Vergleich zu CPE-wt von Vorteil sind. Hierzu sollte die Toxizität der CPE-Varianten auf Karzinomzellen mit unterschiedlicher Claudinexpression *in vitro* verglichen werden.

Insgesamt sollte diese Arbeit (i) das Verständnis mechanistischer Aspekte der Schädigung des Darmepithels durch CPE verbessern (ii) das Potential optimierter CPE-Varianten für die Tumor-Therapie demonstrieren und so einen Beitrag leisten zur Entwicklung neuartiger CPE-basierter Biologika für die Krebsmedizin.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), Lösung 30 % (w/v)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, DE
BCA Assay Kit	Pierce™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Bromphenolblau	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
Carbogen (95 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Linde AG, München, DE
Coomassie Brilliant Blue G-250	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
CPE-Elisa (Ridascreen)	R-Biopharm, Darmstadt, DE
CPE-Standard (10 µg/ml)	R-Biopharm, Darmstadt, DE
D(+)-Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
D(+)-Mannose	Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
DNA-Marker, 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
DNA-Marker, λ/HindIII	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Materialien und Methoden

dNTP Mix (10mM)	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<i>Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)</i>	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Dulbecco's Phosphate buffered Saline mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PBS +/-)</i>	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einbettmedium, <i>ProTaq[®] Mount Flour</i>	BioCyc GmbH & Co. Kg, Luckenwalde, DE
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol, 100 %	J.T.Baker, Deventer, NL
Ethanol, 80 % (v/v)	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, DE
Ethidiumbromid	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, DE
Fluoreszein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Geneticin™ (G418) Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, DE
H ₂ O bidest.	CBF, Destille i.d. Klin. Physiologie, Berlin, DE
H ₂ O Ultrapure	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Imidazol	Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Bernd Kraft GmbH, Duisburg, DE
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Linde AG, München, DE
LDH-Zytotoxizitäts-Assay, <i>Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST</i>	Dojindo Laboratories, Kumamoto, JP

L-Glutamin, 200 mM in Lösung	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
L-Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
<i>Lipofectamin™ 2000</i>	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), 25 mM in Lösung für die PCR	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Methanol	Avantor Performance Materials B.V., Deventer, NL
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
<i>NativePAGE™ SampleBuffer(4X)</i>	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Natriumbisulfid (NaHSO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
n-Dodecyl β-D-Maltoside (DDM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
NiNTA-Agarose	Qiagen GmbH, Hilden, DE
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Para-Formaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Para-Formaldehyd (PFA), 16 % (w/v) in Lösung	Science Service GmbH, München, DE
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phenolrot- freies Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE

Materialien und Methoden

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Plasmidpräparations <i>Kit, Qiagen® Plasmid Plus Midi Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Plasmidpräparations <i>Kit, QuiAmp DNA Mini Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Plasmidpräparations <i>Kit, ZR Plasmid Miniprep™</i>	Classic Zymo Research, Orange, CA, USA
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaureat (Tween 20)	National Diagnostics, Atlanta, GA, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Probenecid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Proteaseinhibitor-Cocktail (bakteriell) (PIC B)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Proteaseinhibitor-Cocktail, <i>Complete, EDTA free</i> , Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Deventer, NL
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris/HCl Trizma®	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Tris-Buffer 1 M, pH 7,5/8,8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ mit Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
<i>Western Blotting</i> Substrat, <i>Lumi-LightPLUS</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
<i>Western Blotting</i> Substrat, <i>Lumi-Light</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE

Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Zinkacetat-Dihydrat (ZnAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen, 12 und 30 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Dialysemembran, <i>ZelluTrans</i> , MWCO 12000-14000	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dialyseschlauch, MWCO 12000-14000	Medicell Membranes Ltd., London, UK
Einmal-Küvetten, Polymethylmethacrylat, 2,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Einmal-Küvetten, Polystyrol, 1,6 ml	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, DE
Elektroporationsküvetten, <i>BTX™ electroporation cuvettes plus, 2 mm gap</i>	BTX, Holliston, MA, USA
Filterpapier, <i>Whatman™ Chromatography Paper</i> , 3 mm	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Handdispenser Combitips, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Kanüle (<i>Sterican</i> Ø 0,45 x 25mm)	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Kryobox, <i>Nalgene® "Mr. Frosty"</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kryoröhrchen, 1,2 ml	Corning Incorporated, Corning, CA, USA
Laborhandschuhe, Nitrile	VWR International bvba, Leuven, BE
Mikro-Dialysierkapsel, <i>QuixSep</i> , 1 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Mikrotiterplatten 96-well, transparent, Rundboden	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Minisäulen, <i>MobiSpin Column „F“</i> , mit Filtern (10 µm Porengröße)	MoBiTec GmbH, Göttingen, DE
Parafilm	American Can Company, Neenah, WI, USA
Pipettenspitzen, 10, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, DE
Polyvinylidendifluorid-Membran, <i>Immun-Blot PVDF Membrane</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE

Materialien und Methoden

Reaktionsgefäß, 15 und 50 ml	Falcon® Corning Incorporated – Life Sciences, Durham, NC, USA
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, DE
Säule (Centrifuge Column, 10 ml)	Pierce™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Serologische Pipetten, 5, 10 und 25 ml	Falcon® Corning Incorporated – Life Sciences, Durham, NC, USA
Sterilfilter, <i>Filter Unit 0,2 µM</i>	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, DE
Zellkulturfilter, <i>Millicell</i> Zellkultureinsatz, 12 mm, Polycarbonat, 0,4 und 3 µm Porengröße	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Zellkulturflaschen, 75 und 25 cm ²	Falcon® Corning Incorporated – Life Sciences, Durham, NC, USA
Zellkulturflaschen, 75 und 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 6-,12-,24-und 96-well, transparent, flacher Boden	Falcon® Corning Incorporated – Life Sciences, Durham, NC, USA
Zellkulturplatten, 96 und 24-well, transparent, flacher Boden	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturplatten, 96-well, schwarze Wand, flacher Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, DE

2.1.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
<i>Dot-Blot</i> Kammer, <i>Bio-Dot</i> ® <i>Mikofiltration Apparatus</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Elektrophoresekammer Agarose-Gele, <i>Mini-Sub</i> ® <i>Cell GT</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Elektrophoresekammer SDS-Gele, <i>Mini-PROTEAN</i> ® <i>tetra cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Elektrophoresekammer SDS-Gele, <i>SE 250 Mighty Small II</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE

Elektroporator, <i>BTX™-Harvard Apparatus ECM™ 399 Exponential Decay Wave Electroporator</i>	BTX, Holliston, MA, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Fluoreszenzimager, <i>Fusion FX7</i>	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
Handdispenser, <i>Multipette Plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Laborpumpe, <i>BVC control</i>	vacubrabd GmbH, Wertheim, DE
<i>Laser-Scanning-Mikroskop, LSM 780</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Lichtmikroskop, <i>Olympus CK2</i>	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
Mikropipetten, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikroplattenleser, <i>Infinite M200</i>	Tecan Switzerland AG, Männedorf, CH
Mikroplattenleser, <i>Safire</i>	Tecan Switzerland AG, Männedorf, CH
Multikanalpipette 50-300 µl	Labsystems Flow Laboratories
<i>NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Nanodrop ND-2000 Spektrometer</i>	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, DE
Objektiv 40 x Wasserimmersion, <i>C-Apochromat 40x/1.2 W Corr M27</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Objektiv 63 x Ölimmersion, <i>Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
PCR-Gerät, <i>Thermal Cycler 2720</i>	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
pH-Meter, <i>Portamess® 913</i>	Knick GmbH & Co. KG, Berlin, DE
pH-Meter, <i>HI 9017 microprocessor pH meter</i>	Hanna Instruments (Kehl)
Pipetboy, <i>Accurpette</i>	VWR International bvba, Leuven, BE
Rotator, <i>Blood Tube Rotator SB1 Stuart Scientific</i>	Stuart, Staffordshire, UK
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, CH
Schüttelinkubator, <i>TH15</i>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Schüttler, <i>Rocking Platform</i>	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Schüttler für Mikrotiterplatten <i>IKA®-Schüttler MTS 4</i>	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE

Materialien und Methoden

Schüttler, Inkubationsmischer Thriller	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Sonifikationsbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Sonifikator, Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Sonifikator, Vibracell 72434	Bioblock Scientific AG, Frenkendorf, DE
Spektrophotometer (Lambda 2 UV/VIS Spectrophotometer)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Spektrophotometer, DU 640 Spectrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Sterilwerkbank, HeraSafe®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Sterilwerkbank, S-1200 BDK	Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, DE
Stromversorgung, <i>PowerPac™ 300</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Tischzentrifuge (mit Kühlung), <i>Perfect</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Tischzentrifuge (mit Kühlung), <i>5145R, 5804R und 5810R</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischzentrifuge, <i>Perfect Spin 24 Plus</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Tischzentrifuge, <i>Universal 320 R</i>	Andreas Hettich GmbH und Co.KG, Tuttlingen, DE
<i>Trans-Blot® Turbo</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie (Berlin)
UV-Transilluminator, <i>Quick Store</i>	MS Laborgeräte, Heidelberg, DE
Vakuumpumpe	Amersham, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, SE
<i>Vortex-Genie® 2</i>	Scientific Industries, Inc, Bohemia, NY, USA
Wasserbäder	Julabo GmbH, Seelbach, DE
Widerstandsmessgerät manuell	Institut für Klinische Physiologie, Berlin, DE
Zellinkubator, <i>CB210</i>	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Zellinkubator, Function Line	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Zentrifuge, <i>Avanti J-20i und Avanti J-25</i>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

2.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Merkmale	Referenz
pCpG-mcs G2-optCPE	4,1 kb, Zeo ^R , R6Ky ori,	(Walther <i>et al.</i> , 2012)
pCpG-mcs G2-optCPE-Y306A/L315A	pE2MK, mCMV enh, pCpG-frei, Codon-	
pCpG-mcs G2-optCPE-L254A/S256A/I258A/D284A	optimierte CPE-cDNA (wildtyp bzw. mit	erhalten von Anna Piontek
pCpG-mcs G2-optCPE-L223A/D225A/R227A	angegebener AS-Substitution) für Translation in humanen Zellen	
pTrcHis-TOPO [®]	4,4 kb, Amp ^R , pBR322 ori, ptac, lacI ^q , 6xHis tag N-terminal	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pTrcHis-optCPE	5,5 kb, Amp ^R , pBR322 ori, ptac, lacI ^q , 6xHis tag	
pTrcHis-optCPE-Y306A/L315A	N-terminal, Codon-	diese Arbeit
pTrcHis-optCPE-L254A/S256A/I258A/D284A	optimierte CPE-cDNA (wildtyp bzw. mit	
pTrcHis-optCPE-YWSH	angegebener AS-	
pTrcHis-optCPE-SSS	Substitution oder in	
pTrcHis-optCPE-antisense (vec)	antisense) für Translation in humanen Zelllinien	
p3×FLAG-CMV-10/huCln4	6,9 kb, Amp ^R /Neo ^R , pBR322 ori, P _{CMV} , 3×FLAG N-terminal, humanes Cln4	diese Arbeit; (Piontek <i>et al.</i> , 2017b)

Amp^R: Ampicillin Resistenzgen; Neo^R: Neomycin Resistenzgen; Zeo^R Zeocin Resistenzgen; pBR322 ori: pBR322 origin; R6Ky ori: R6Ky origin CpG-frei; ptac: induzierbarer "tac"-Promoter; pCMV: *human cytomegalovirus* Promoter ; pE2MK: bakterieller Promotor (CpG-freie Version des EM7-Promotors); pmCMV enh: mamalischer Promoter (CpG-frei, Kombination des *mouse cytomegalovirus enhancer*, des humanen Elongationsfaktors 1 α und eines synthetischen Introns); lacI^q: Gen für lac Repressor.

2.1.5 Oligonukleotide

Primersequenzen für Umklonierung, ortsgerechte Mutagenese und Sequenzierung.

TA-Klonierung in pTrcHisTOPO[®]

optCPEwt f

ATGCTGAGCAACAACCTCAATCCCATGG

optCPEwt r	TCAGAACTTCTGAAAGAGGATGCTGTACG
optCPEL315A r	TCAGAACTTCTGAAAG <u>Ggc</u> GATGCTGTACG

Mutagenese

optCPEY306W f	TGAAGGCCAATAGCTCCT <u>Igg</u> AGCGGGA ACTATCCGTA
optCPEY306W r	TACGGATAGTTCCCGCT <u>cc</u> AGGAGCTATTGGCCTTCA
optCPES313H f	GCGGGA ACTATCCGTAC <u>ca</u> CATCCTCTTTCAGAAGTT
optCPES313H r	AACTTCTGAAAGAGGAT <u>Gtg</u> GTACGGATAGTTCCCGC
optCPES305P/S307R f	GTGATGAAGGCCAATAGC <u>c</u> CTATAG <u>Gg</u> GGGAACTATCC
optCPES305P/S307R r	GGATAGTTCCC <u>c</u> CTATAG <u>Gg</u> GCTATTGGCCTTCATCAC

Sequenzierung

Xpress™ Forward	TATGGCTAGCATGACTGGT
-----------------	---------------------

2.1.6 Enzyme

Enzym	Herkunft
PfuTurbo DNA-Polymerase / Cloned Pfu DNA-Polymerase Puffer (10x)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
AmpliTaq® / AmpliTaq® Buffer I (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA / New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
BamHI / CutSmart Puffer (10x)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Benzonase® Nuclease	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bsp119I / CutSmart Puffer (10x)	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA / New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Dpn I / NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Lysozym	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NcoI /NEBuffer 3.1 (10x)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.1.7 Medien und Zellen

2.1.7.1 Prokaryotische Zellen

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Studier FW Moffatt BA 1986

Rosetta (DE3)	2	F- <i>ompT</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE2 (CamR)	<i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal</i>	Novagen, Merck KGaA Darmstadt, DE
TOP10		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>		invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TOP10F'		F ⁺ { <i>lacI</i> q, Tn10(TetR)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> <i>leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>		invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.1.7.2 Eukaryotische Zellen

Alle im Folgenden aufgelisteten Zelllinien sind humanen Ursprungs. HEK-293-Zellen, Caco-2-Zellen und HT-29/B6-Zellen sowie ggf. davon abgeleitete stabil-transfizierte Zelllinien waren in der Arbeitsgruppe vorhanden, oder wurden in parallelen Projekten generiert. Die Thyroidkarzinomzelllinie K1 wurde von Dr. Denise Zwanziger (Klinik für Endokrinologie & Stoffwechselerkrankungen, Universitätsklinikum Essen), alle übrigen Zelllinien von PD Dr. Wolfgang Walther (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) zu Verfügung gestellt. Ursprünglich bezogen wurden alle (parentalen) Zelllinien von der *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA) oder der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC; Salisbury, UK).

Zelllinie (ggf. ATCC oder ECACC-Nummer, stabil transfiziert mit Plasmid oder Subkloniert)	Herkunftsgewebe (ggf. metastatischer Ursprung)	Referenz
LoVo (ATCC: CCL-229)		(Drewinko <i>et al.</i> , 1978)
LS 174T (ATTC: CL-188)	Adenokarzinom der Mamma	(Tom <i>et al.</i> , 1976)
MCF7 (ATCC: HTB-22)	(Pleuraerguss)	(Soule <i>et al.</i> , 1973)
Caco-2 Cldn3-YFP (Plasmid: pEYFP-N1-mCld3)	Adenokarzinom des Kolons	erhalten von A. Piontek FMP, Berlin
Caco-2 Cldn4-GFP (Plasmid: pEGFP-C1-huCld4)		erhalten von A. Piontek FMP, Berlin

Caco-2 vec-YFP	(Plasmid: pEYFP-N1)			erhalten von A. Piontek FMP, Berlin
HT-29	(ATCC: HTB-38)			(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
HT-29/B6	(Subklon aus: HT-29)			(Kreusel <i>et al.</i> , 1991)
SW480	(ATCC: CCL-228)			(Leibovitz <i>et al.</i> , 1976)
SW620	(ATCC: CCL-227)			(Leibovitz <i>et al.</i> , 1976)
WiDr	(ATCC: CCL-218)			(Chen <i>et al.</i> , 1987)
HEK-293	(ATCC: CRL-1573)			(Graham <i>et al.</i> , 1977)
HEK-293-Cldn1-FLAG	(Plasmid: pcDNA3.1-FLAG-huCldn1)			(Piontek <i>et al.</i> , 2017a)
HEK-293-Cldn3-YFP	(Plasmid: pEYFP-N1-mCld3)			(Piontek <i>et al.</i> , 2011)
HEK-293-Cldn4-FLAG	(Plasmid: pCMV10/huCldn4)	embryonale Nierenzelle		(Piontek <i>et al.</i> , 2017b)/diese Arbeit
HEK-293-Cldn4-GFP	(Plasmid: pEGFP-C1-huCld4)			(Veshnyakova <i>et al.</i> , 2012b)
HEK-293-Cldn5-YFP	(Plasmid: pEYFP-N1-mCld5wt)			(Piontek <i>et al.</i> , 2008)
HEK-293-Cldn6-YFP	(Plasmid: pCMV6-Kan/Neo-mCld6)			(Protze <i>et al.</i> , 2015)
Capan-1	(ATCC: HTB-79)	Pankreas-Adenokarzinom	(Leber-metastase)	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
K1	(ECACC: 92030501)	papilläres Schilddrüsenkarzinom		(Ribeiro <i>et al.</i> , 2008)

				(Schweppe <i>et al.</i> , 2008)
PANC-1	(ATTC: 1469)	CRL- Pankreaskarzinom		(Lieber <i>et al.</i> , 1975)
SK-MEL-5	(ATTC: HTB-70)	malignes Melanom		(Carey <i>et al.</i> , 1976)

2.1.7.3 Medien für die Bakterienanzucht

LB-Medium wurde in Pulverform bezogen, nach Herstellerangaben mit H₂O (bidestilliert) versetzt und autoklaviert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurden 15 g Agar / l LB-Medium verwendet. Nach Bedarf wurde jeweils Antibiotikum entsprechend der Antibiotikaresistenz der Bakterien in einer Endkonzentration von 50 µg/ml bis 100 µg/ml zugegeben.

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

2.1.7.4 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Merkmale	Hersteller
MEM Eagle	mit Earl's Salzen, 2mM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 g/l-Glucose, 26,2 mM Na-Hydrogencarbonat, mit Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
MEM Eagle AQMedia™	mit Earl's Salzen, 2mM L-Glutamin, 1 g/l-Glucose, 26,2 mM Na-Hydrogencarbonat, mit Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
RPMI-1640 AQMedia™	2 mM L-Glutamin, 2 g/l-Glucose, 23,8 mM Na-Hydrogencarbonat, mit Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
DMEM GlutaMAX™	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 1 g/l-Glucose, 1mM Na-Pyruvat, 44 mM Na-Hydrogencarbonat, mit Phenolrot	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RPMI-1640 GlutaMAX™	2mM L-Alanyl-L-Glutamin, 2 g/l-Glucose, 23,8 mM Na-Hydrogencarbonat, mit Phenolrot	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

optiMEM	serumreduziert, mit L-Glutamin, 23,8 mM Na-Hydrogencarbonat, mit Phenolrot	Gibco™, Fisher Waltham, MA, USA	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM ohne Phenolrot	1 g/L-Glucose, 1mM Na-Pyruvat, 23,8 mM Na-Hydrogencarbonat	Gibco™, Fisher Waltham, MA, USA	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.8 Puffer und Lösungen

Agarose Gelelektrophorese

TAE 0,4 M Tris-Base, 0,01 M EDTA, 0,2 M Essigsäure, pH 8,5

Aufreinigung von cCPE als GST-Fusionsprotein

Lysepuffer-GST 1 % (v/v) Triton X-100, 0,4 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 x PIC B in PBS

Elutionspuffer-GST 50 mM Tris-Base, 10 mM reduziertes Glutathion, 1 x PIC B in 18,2Ω H2O

Anreicherung von CPE als 6xHis-Fusionsproteinen

Lysepuffer-His 50 mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 8.0

Waschpuffer-His 50 mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer-His 50 mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 8,0

Diskontinuierliche Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Laufpuffer 25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,1-8,4

SDS-Probenpuffer (5x) 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, 500 mM DTT

Sammelgel 5,1 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,125 M Tris/HCl (aus 1 M Tris/HCl pH 6,8), 1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 %, (w/v) APS

Trenngel (10 bzw. 12 %) 10 bzw. 12 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,35 M Tris (aus 1 M Tris-Buffer pH 8,8), 0,1 % (v/v) SDS, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS

Coomassie-Lösung 0,1 % (w/v) Coomassie G-250, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Western- und Dot-Blot

Fast-Transferpuffer 20 % (v/v) MeOH, 48 mM Tris-Base, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1,3 mM NaHSO₃, 1,3 mM N,N-Dimethylformamid

TBST	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20, pH 7,3
Ponceau-Rot	0,2 % (w/v) Ponceau S, 1 % (v/v) Essigsäure
TBS	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,1 % (v/v), pH 7,3
zellulärer Bindungs-Assay	
Fixierungspuffer-cCPE	3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Ablöschpuffer-cCPE	0,1 M Glycin in PBS
Blockierungspuffer-cCPE	1 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS
MTT-Zytotoxizitäts-Assay	
MTT-Lösung (10x)	12,5 mM in PBS, sterilfiltriert
MTT-Extraktionslösung	5 % (v/v) Triton X-100 in Isopropanol
CPE-Gewinnung aus eukaryotischer Expression	
hypotoner Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, 5mM MgCl ₂ , 5mM CaCl ₂ , 1mM EDTA, 1mM DDT, PIC eukaryotisch, pH 7,5
allgemeine Puffer	
HEPES/Ringerlösung	134,6 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 21 mM NaHCO ₃ , 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,2 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgCl ₂ , 0,6 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 g/l Glucose, 10,6 mM HEPES, mit Carbogen begast, pH 7,4
Ringerlösung	113,6 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 21 mM NaHCO ₃ , 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,2 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgCl ₂ , 0,6 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 g/l D(+)-Glucose, mit Carbogen begast, pH 7,4

2.1.9 Antikörper und Fluorophore

Je nach Anwendung (zellulärer Bindungs-Assay (B, vgl. 2.4.7); Immunfluoreszenzfärbung (IF, vgl. 2.4.10); *Western-* und *Dot-Blot* (WB, vgl. 2.3.5 und 2.3.6); Experimente zur Ca²⁺-Detektion in lebenden Zellen (Ca²⁺, Messung (Abschnitt 2.4.11) bzw. mikroskopische Visualisierung (Abschnitt 2.4.12) des CPE-induzierten Ca²⁺-Einstroms) wurden jeweils unterschiedliche Verdünnungen bzw. Konzentrationen eingesetzt. Für Fluorophor gekoppelte Antikörper und Fluorophore sind jeweils die Wellenlängen der Anregungs-Laserlinien/Filter für die Detektion am Mikroskop und die Detektionswellenlängen (Ex/Em) am Plattenlesegerät in nm angegeben.

	Bezeichnung	Hersteller	B	IF	WB	Ca²⁺	Laser/Filter	Ex/Em	
1.AK	mouse anti-Cldn4	Invitrogen™	-		-	-	-	-	
	mouse anti-human ZO1	BD Transduction Laboratories	-	1:100	-	-	-	-	
	rabbit anti-Clostridium perfringens Enterotoxin A	serotec	-		1:3000	-	-	-	
	Phycolink® anti-GST R-phycoerythrin-conjugated antibody	Europa Bioproducts Ltd.	1:250	1:500	-	-	543/550-692	545±12/578±12	
2.AK	Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG(H+L)	Invitrogen™	-		-	-	488/490-561	-	
	Alexa Fluor®594 goat anti-rabbit		-	1:500	-	-	543/550-692	-	
	Alexa Fluor®647 goat anti-mouse		-		-	-	633/638-755	-	
	Peroxidase goat anti-mouse		Jackson Immuno Research	-	-	1:7000	-	-	-
	Peroxidase goat anti-rabbit			-	-		-	-	-
Fluorphore	Alexa Fluor® 647 Phalloidin	Invitrogen™	-	1:500	-	-	633/638-755	-	
	CellMask™ Deep Red plasma membrane stain		-	-	-	1:1000	633/637-708	-	
	Hoechst 33342		2 µM		-	2 µM	405/410-498	365±12/480±12	
	4',6-Diamidin-2'phenylindol (DAPI)		-	1:1000	-	-	405/410-498	-	
	Fura-2-AM		-	-	-	25 µM	-	340 und 380±10/510±20	
	Fluo-4-AM		-	-	-	4 µM	488/499-561	-	

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Umklonierung

Für die rekombinante Expression von CPE als N-terminales 6xHis Fusionsprotein, wurde die CPE-kodierende Sequenz aus dem Vektor pCpG-optCPE und Varianten davon (s. 2.1.4) in den Vektor pTrcHis-TOPO umkloniert. Die Umklonierung erfolgte mit dem *pTrcHis-TOPO TA expression kit* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben. Hierbei wurde zunächst in einer Polymerase-Kettenreaktion (vgl. Abschnitt 2.2.2.1 TA-Klonierungs-PCR) das gewünschte optCPE-*insert* mit Einzel-Desoxyadenosin(A)-Überhängen am 3'-Ende amplifiziert. Der im *Kit* enthaltene Vektor ist bereits linearisiert und besitzt an seinen Enden komplementäre 3'-Desoxythymidin (T)-Überhänge. Nach Zusammenlagerung von *insert* und Vektor an den Überhängen, erfolgt die Ligation (3 µl Produkt der TA-Klonierungs-PCR, 1 µl pTrcHis-TOPO®, 1 µl H₂O) durch die im Vektor mitenthaltene Topoisomerase I binnen 5 min bei RT. Das Ligationsprodukt wurde anschließend sofort in *E. coli* TOP10 oder TOP10'F transformiert (Abschnitt 2.2.5)

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction* (PCR))

Je nach Anwendung und Zielstellung waren die Bedingungen der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction* (PCR)) und Anforderungen an das Amplifikat leicht unterschiedlich und werden in den folgenden Abschnitten (2.2.2.1 bis 2.2.2.3) beschrieben. Die Ansätze wurden jeweils auf Eis pipettiert und erst zuletzt die DNA-Polymerase zugegeben. Alle PCRs wurden als *hot start* durchgeführt – die PCR-Maschinen also zunächst auf 95 °C vorgeheizt. Als Matrizen verwendete Plasmide sind in Abschnitt 2.1.4, als Primer eingesetzte Oligonukleotide in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt. Die Zusammensetzung der Ansätze sowie das PCR-Programm sind jeweils Tabelle 2–1 und Tabelle 2–2 zu entnehmen.

2.2.2.1 TA-Klonierungs-PCR

Um eine Anlagerung an den Vektor und anschließende Legierung zu ermöglichen (vgl. Abschnitt 2.2.1), muss das Amplifikat Einzel-Desoxyadenosin(A)-Überhängen am 3'-Ende besitzen. Daher wurde mit der AmpliTaq®-DNA-Polymerase (vgl. 2.1.4) eine DNA-Polymerase verwendet, die solche Überhänge synthetisiert.

2.2.2.2 Kolonie-PCR

Nach der Transformation von Bakterien (Abschnitt 2.2.5) mit dem Produkt der TA-Klonierung wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um schnell Kolonien zu identifizieren, die das gewünschte Plasmid samt CPE-*insert* tragen. Hierzu wurden Bakterien aus Einzelkolonien mit der Pipettenspitze abgeschabt und in 0,1 ml LB-Medium (mit Antibiotikum entsprechend der Resistenz des transformierten Plasmides) für 1 h bei 37 °C und 210 rpm geschüttelt. Diese Bakterienkultur wurde dann direkt anstelle einer DNA-Matrize in einer PCR eingesetzt.

Um die richtige Orientierung des CPE-*insertes* in *sense* Richtung sicherzustellen wurde teilweise auch ein Restriktionsverdau des PCR-Produktes angesetzt (Abschnitt 2.2.3). Nach Auftrennung der Produkte der PCR und des Restriktionsverdaus im Agarose Gel (Abschnitt 2.2.6) konnten Kolonien, die Plasmid samt CPE-*insert* in *sense* Richtung tragen, identifiziert werden. Von diesen wurden dann – ebenso wie in 2.2.5 beschrieben – Übernachtskulturen für die Plasmid-Präparation und anschließende Sequenzierung angesetzt.

2.2.2.3 Mutagenese-PCR zur ortsgerichteten Mutagenese

Um definierte Aminosäuren in CPE auszutauschen, wurden einzelne Nukleotide des CPE-Gens gezielt in einer Mutagenese-PCR mutiert. Als Matrize diente hierbei das Plasmid pTrcHis-optCPE.

Zunächst wurde ein komplementäres Primerpaar, das die gewünschte Mutation enthält designt und synthetisiert (Thermo Fisher Scientific). Während der PCR erzeugt die DNA-Polymerase dann eine Kopie der Matrizen-DNA, die sich nur an der zu mutierenden Position von der Matrizen-DNA unterscheidet.

Die Mutagenese-PCR wurde in zwei Teilschritten durchgeführt. In einer ersten PCR wurden die beiden komplementären Primer zunächst getrennt voneinander eingesetzt. So wird verhindert, dass sich die beiden Primer zusammenlagern und gewährleistet, dass eine ausreichende Menge DNA amplifiziert wird. Für eine darauffolgende zweite PCR wurden dann die beiden Ansätze vereint und nochmals 0,75 U DNA-Polymerase zugegeben. Die zweite PCR wurde jeweils parallel bei unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen („*low*“/„*high*“) durchgeführt. Um die Qualität des so erhaltenen Amplifikats zu beurteilen, wurde das PCR-Produkt im Agarosegel (vgl. Abschnitt 2.2.6) aufgetrennt. Im PCR-Produkt vorhandene Matrizen-DNA wurde vor Transformation in *E. coli* entfernt (s. Abschnitt 2.2.4).

Tabelle 2-1 **Zusammensetzung der PCR-Ansätze.**

	Umklonierung		Kolonie-PCR		Mutagenese-PCR	
Template	400-650 ng	pCpG-optCPE und Varianten	1 µl	Bakterienkultur	400-650 ng	pTrcHis-optCPE und Varianten
Primer	0,2 µM	Klonierungsprimer f und r	0,2 µM	Klonierungsprimer f und r	1,27 µM	Mutageneseprimer f oder r
Polymerase	5 U	AmpliTaq®	2,5 U	AmpliTaq®	0,75 U	PfuTurbo
PCR-Puffer	1x	TOPO TA Cloning PCR-Buffer 10 x	1x	AmpliTaq® Buffer 1 10 x	1x	Cloned Pfu Buffer 10 x
MgCl ₂	-		2.5 mM		-	
dNTPs	0,5 mM		0,5 mM		0,2 mM	
H ₂ O (HPLC)	@ Gesamtvolumen		@ Gesamtvolumen		@ Gesamtvolumen	
Gesamtvolumen	50 µl		25 µl		15 µl	

Tabelle 2-2 PCR-Programme.

	Umklonierung			Kolonie-PCR			Mutagenese-PCR		
	Zyklen	Zeit	Temperatur	Zyklen	Zeit min	Temperatur °C	Zyklen	Zeit min	Temperatur °C
<i>Synthese 1</i>									
Denaturierung	1	03:00	95°C	1	05:00	95°C	1	02:00	95°C
Denaturierung		00:45	95°C		00:45	95°C		00:30	95°C
Annealing	28	00:30	60°C	28	00:30	60°C	5	00:45	62,5°C
Elongation		01:20	72°C		01:20	72°C		10:00	72°C
finale Elongation		10:00	72°C		10:00	72°C			
	1	∞	4°C	1	∞	4°C	1	∞	8°C
							Vereinigung der f/r Ansätze, Zugabe von weiteren 0,75 U PfuTurbo		
<i>Synthese 2</i>									
Denaturierung							1	00:30	95°C
Denaturierung								00:30	95°C
Annealing („low“/„high“)							17	01:00	62,5 / 68 °C
Elongation								10:00	68°C
finale Elongation							1	10:00	68°C
							1	∞	4°C

2.2.3 Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme sind bakterieneigene Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA spalten. Wird das Produkt eines Restriktionsverdau in einem Agarosegel aufgetrennt, sind über die Größe der so entstandenen DNA-Fragmente Rückschlüsse auf die als Edukt eingesetzte Plasmid-DNA möglich.

Ein Doppelverdau (mit Bsp119I und BamHI) wurde angesetzt, um das Vorhandensein des für CPE-codierenden *inserts* im Zielvektor (pTrcHis-TOPO) nach Umklonierung nachzuweisen. Ein Einzelverdau mit NcoI wurde angesetzt, um zu überprüfen, ob das CPE-*insert* in *sense* (ein Fragment nach Verdau) oder in *antisense* (zwei Fragmente nach Verdau) im Vektor orientiert ist. Außerdem wurde durch einen Einfachverdau die als Matrize in der Mutagenese-PCR dienende Plasmid-DNA linearisiert, um so das gewünschte – ebenfalls lineare – Produkt der Mutagenese-PCR leichter über sein Laufverhalten im Agarosegel identifizieren zu können.

Der Verdau erfolgte jeweils mit 5 bis 10 U Restriktionsenzym pro 3,5 bis 7 µl einer Plasmidpräparation für 45 min bei 37 °C. Die eingesetzten Restriktionsenzyme sowie Puffer sind Abschnitt 2.1.4 zu entnehmen.

2.2.4 DpnI-Verdau

Um nach der Mutagenese-PCR das als Matrize eingesetzte Ausgangsplasmid möglichst vollständig zu entfernen, wurde das Produkt der Mutagenese-PCR mit der Restriktions-Endonuklease DpnI verdaut. DpnI spaltet methylierte DNA (Vovis und Lacks, 1977). Die neu synthetisierte DNA ist unmethylierte und wird daher nicht gespalten. 7 bis 15 µl des PCR-Produktes wurden bei 37 °C für 5 h mit 6 U DpnI (s. auch Abschnitt 2.1.4) verdaut. 0,5 bis 3 µl des Verdau wurden anschließend für die Transformation kompetenter *E. coli* eingesetzt (Abschnitt 2.2.5).

2.2.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation elektrokompenter *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation (1800 V, Elektroporator *BTX™-Harvard Apparatus ECM™ 399 Exponential Decay Wave Electroporator*) bzw. bei chemokompetenten Zellen mittels Hitzeschock (30 bis 60 s, 42 °C im Wasserbad anschließend 1-2 min auf Eis). 50 µl Aliquots kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit DNA versetzt (0,5 bis 1,5 µl bei elektrokompenten bzw. 1 bis 5 µl bei chemokompetenten Bakterien) und vorsichtig, ohne Pipettieren gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis (5 min bei elektrokompenten bzw. 30 min bei chemokompetenten Bakterien) erfolgte die Transformation und direkt im Anschluss die Aufnahme in 250 µl antibiotikafreiem LB oder SOC-Medium und Inkubation für 1 h bei 37 °C, 210 rpm. Schließlich wurden die Zellen - entsprechend der Antibiotika-Resistenz des transformierten

Plasmides - auf Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltige LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

Während nach der Transformation mit Umklonierungs-Ansätze tags darauf zunächst noch eine Kolonie-PCR und ggf. eine Restriktionsanalyse (s. Abschnitt 2.2.2.2) erfolgte, wurden nach der Transformation mit DpnI-Verdau nach ortsgerichteter-Mutagenese ohne weitere Kontrolle ÜN-Kulturen angesetzt. Hierzu wurden Bakterien aus Einzelkolonien in 5 bis 7 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C, 210 rpm inkubiert. Zur langfristigen Asservierung bei -80 °C wurden 0,5 bis 0,85 ml der ÜN-Kultur mit Glycerol (Endkonzentration 15 bis 25 % (v/v)) versetzt. Aus dem Rest der ÜN-Kultur wurde Plasmid-DNA isoliert (s. Abschnitt 2.2.7), die zur Identifikation positiver Klone sequenziert wurde (s. Abschnitt 2.2.7).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der Umklonierung und der Mutagenese zu überprüfen, wurden je 5 bis 10 µl der Produkte der Kolonie-PCR (vgl. Abschnitt 2.2.2.2) und ggf. des Restriktionsverdaus bzw. der Mutagenese-PCR (vgl. Abschnitt 2.2.2.3) neben einem Marker (1 kb *DNA ladder*, New England Biolabs) sowie 500 bis 650 ng des (linearisierten) als Matrize für die Mutagenese-PCR dienenden Plasmid (jeweils versetzt mit dem entsprechenden Volumen 6 × DNA-Probenpuffer) in einem Agarosegel (1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer, 1:10000) bei 90 V etwa 1 h aufgetrennt (Mini-Sub® Cell GT, BioRad). Die Detektion erfolgte am UV-Transluminator (Quick Store, MS Laborgeräte).

Bei erfolgreicher Umklonierung ist das Amplifikat der Kolonie-PCR um die Länge des CPE-*inserts* (1.1 kb) größer als das leere Plasmid und über die Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau kann das Vorhandensein und die richtige Orientierung des CPE-*inserts* in sense nachgewiesen werden.

Nach der Mutagenese-PCR ist das Amplifikat im Unterschied zu dem als Matrize eingesetzten Plasmid linear und kann so über sein Laufverhalten im Gel identifiziert werden. Produkte unspezifischer Primerbindung erscheinen als distinkte Banden mit geringerer Größe als das Amplifikat oder als „Schmier“.

2.2.7 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde mit kommerziell erhältlichen *Kits* jeweils nach Herstellerangaben isoliert. Kleine Mengen Plasmid-DNA für die Sequenzierung wurden mit dem *Kit ZR Plasmid Miniprep™ - Classic* (Zymo Research) oder *QuiAmp DNA Mini Kit* (QIAGEN) isoliert. Um größere Mengen Plasmid-DNA für die Asservierung bzw. Transfektion eukaryotischer Zellen zu gewinnen, wurde das *QIAGEN® Plasmid Plus Midiprep Kit* (QIAGEN) verwendet. DNA-Konzentration und Reinheit wurden spektrometrisch am NanoDrop ND-2000

Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die Firma Source BioScience imaGenes (Berlin) bzw. LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Die für die Sequenzierung als Primer eingesetzten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt. Durch Abgleich der Sequenzierungsdaten mit der Sequenz der optCPE-Matrizen-DNA und der des Vektors wurden positive Klone identifiziert (Blast 2 Sequences, NCBI).

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Aufreinigung von cCPE als GST-Fusionsprotein

Die nicht toxische Bindungsdomäne cCPE (Aminosäuren 194-319) wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* LB21(DE3) exprimiert, die entsprechende Varianten des Expressionsplasmides pGEX-4T1/CPE194-319 trugen.

Im Folgenden beschrieben wird die Expression und Aufreinigung von cCPE im kleinen Maßstab (50 ml Kulturvolumen). Bei Bedarf wurde in größerem Maßstab (500 ml Kulturvolumen) gearbeitet, wobei die Volumina entsprechend angepasst wurden.

50 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) wurden mit 5 ml einer ÜN-Kultur aus Glycerolstocks angeimpft (37 °C, 210 rpm). Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 wurde die Expression der cCPE-Konstrukte durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach 3 Stunden (37 °C, 210 rpm) wurden die Bakterien geerntet (30 min, 4000 × g, 4 °C) und bei -80 °C bis zur Protein-Aufreinigung gelagert.

Sedimente einer 50 ml Kultur wurden in 1,5 ml Lysepuffer-GST resuspendiert und 15 Mal je 1 sec bei 20 kHz sonifiziert (Vibracell 72434, Bioblock Scientific AG). Anschließend wurde PMSF in einer Endkonzentration von 80 µM zugegeben, gevortext und zur Entfernung von Zell-Debris zentrifugiert (30 min, 20000 × g, 4 °C). Aus dem Überstand erfolgte dann die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie. Alle Schritte wurden dabei bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

Je 400 µl Glutathion-Agarose (Pierce™, Thermo Fisher Scientific, 50 % (v/v), 400 µl entspricht also einem Matrixvolumen (MV) von 200 µl) wurden in eine Säule überführt, dreimal mit Lysepuffer-GST (2,5 × MV) gewaschen und je 700 µl des geklärten Zelllysates auf die Säule geladen. Nach 2-stündiger Inkubation auf einem Rotor bei 4 °C wurde der Durchfluss gesammelt und die Säulen dreimal mit 3 × MV 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS sowie einmal mit 3 × MV PBS gewaschen. Zur Elution wurden 2,5 × MV frisch angesetztem Elutionspuffer-GST eingesetzt und 30 min auf dem Rotor inkubiert. Das erhaltene Eluat

wurde gegen 625 bis 1250 × MV PBS in einer Dialysekammer über Nacht dialysiert. Die Dialysemembran (MWCO 12000 bis 14000 Da) wurde vor dem Befüllen 2 × mit H₂O (bidestilliert) und 1 × mit PBS für jeweils 5 min gespült. Eine Stunde nach Start der Dialyse wurde das PBS durch frisches ersetzt. Die Reinheit der Präparationen wurde in einer SDS-PAGE kontrolliert, und die Proteinkonzentration bestimmt.

Bei der Aufreinigung im kleinen Maßstab wurden mit Mini-Säulen gearbeitet. Hier erfolgte eine Trennung der Säulenmatrix und der Flüssigphase ausschließlich durch Zentrifugation (5 bzw. bei Waschschritten 2 min, 500 × g). Bei der Aufreinigung im großen Maßstab wurden mit größeren Säulen gearbeitet. Säulenmatrix und Flüssigphase ebenfalls durch Zentrifugation (5 min, 250 × g) oder alternativ durch Gravitation getrennt.

2.3.2 Expression und Anreicherung von CPE als 6×His-Fusionsproteinen

Das Volllängen-Toxin CPE und Varianten davon wurde als 6×His-Fusionsprotein in *E. coli* TOP10 oder TOP10^F exprimiert, die entsprechende Varianten des Expressionsplasmides pTrcHis-optCPE (s.2.1.4) trugen.

Standardmäßig wurden 300 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 30 ml einer ÜN-Kultur aus Glycerolstocks angeimpft. Nach Bedarf wurden jedoch auch größere Kulturen angesetzt. Dann wurden die im Folgenden genannten Mengen entsprechend angepasst. Die Expression wurde bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach 3 Stunden wurden die Bakterien geerntet (30 min, 4000 × g, 4 °C), in 5 ml Lysepuffer-His aufgenommen und bei -80 °C bis zur Protein-Aufreinigung gelagert.

Alle Schritte der Proteinaufreinigung erfolgten auf Eis bzw. bei 4 °C und mit vorgekühlten Lösungen. Sedimente einer 330 ml Kultur wurden in einem Gesamtvolumen von 10 ml Lysepuffer-His mit 0,75 mg/ml Lysozym 45 min resuspendiert und 45 min inkubiert. Anschließend wurde EDTA-freier Proteinaseinhibitorcocktail (Roche) zugeben in fünf Durchgängen á 10 mal (Cycle 1, Amplitude 100 %) sonifiziert (Ultraschallprozessor *UP50H*, Hielscher Ultrasonics GmbH) zwischenzeitlich wurden das Lysat jeweils für mindestens 10 s auf Eis gestellt. Nach weiterer 30 min-Inkubation mit 2 U/ml Benzonase, wurde zur Entfernung von Zell-Debris zentrifugiert (30 min, 10000 × g). Die Aufreinigung der 6×His-Fusionsproteine aus dem Überstand erfolgte mittels Affinitätschromatographie.

Je 3,3 ml NiNTA-Agarose (QIAGEN, 50 % (v/v), 3,3 ml entspricht also einem Matrixvolumen (MV) von 1,65 ml) wurden in eine Säule überführt, zweimal mit dem 4-fachen Volumen der Säulenmatrix (4 × MV) mit Lysepuffer-His gewaschen und jeweils das gesamte geklärte Zellysate auf die Säule geladen. Nach 1,5 stündiger Inkubation auf einem Rotor wurden die Säulen zweimal mit 4 × MV Lysepuffer-His sowie zweimal mit 4 × MV Waschpuffer-His gewaschen. Zur Elution wurden die Säulen mit 1 × MV Elutionspuffer-His mit EDTA-freiem Proteinaseinhibitorcocktail jeweils 3 mal 15 min auf dem Rotor inkubiert. Die Eluatfraktionen

wurden jeweils gesammelt, vereinigt und das erhaltene Eluat gegen Lysepuffer-His (3000 x Volumen des Eluats) über Nacht in Dialyseschläuchen (MWCO 12000 bis 14000 Da) dialysiert. Die Dialyseschläuche wurde vor dem Befüllen 2 x mit H₂O (bidestilliert) und 1 x mit Lysepuffer-His für jeweils 5 min gespült. Eine Stunde nach Start der Dialyse wurde der Lysepuffer-His durch frischen ersetzt.

Die Trennung der Säulenmatrix und der Flüssigphase erfolgte durch Gravitation oder Zentrifugation (2 min, 250 x g).

2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur schnellen und unkomplizierten Messung der Proteinkonzentration von cCPE-Aufreinigungen wurde die Absorption der Probe bei 280 nm am *NanoDrop Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) gemessen (Gill & von Hippel, 1989). Die genauere Bestimmung, erfolgte durch Messen der Absorption bei 562 nm nach Biuret-Reaktion und anschließender Komplexierung der Cu¹⁺-Ionen durch 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure, BCA) (Smith *et al.*, 1985). Verwendet wurde hierfür ein *Kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce™, Thermo Fisher Scientific)*, wie vom Hersteller angegeben.

Da CPE nicht den Hauptanteil des in den Eluaten der NiNTA-Affinitätschromatographie enthaltenen Proteins darstellt, wurde die CPE-Konzentration mittels Immundetektion und nicht über eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Hierzu wurden definierte Mengen erworbenen rekombinanten CPEs mit bekannter Konzentration neben Verdünnungen einer CPE-Präparation in einer SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.4) eingesetzt und anschließend im *Western-Blot* (Abschnitt 2.3.5) immunreaktive-Banden detektiert. Die Intensitäten der immunreaktiven Banden wurden ermittelt, um über eine Eichgerade die CPE-Konzentration der CPE-Präparation zu berechnen (vgl. Anhang 8.1).

2.3.4 Diskontinuierliche Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Das anionische SDS lagert sich an Polypeptidketten an, und überdeckt so die Eigenladung der Proteine. Erfolgt zusätzlich eine Hitzedenaturierung in Anwesenheit von reduzierenden Agenzien, liegen Proteine komplett entfaltet und linearisiert vor. Die Menge des angelagerten SDS und damit auch die Ladung ist dann dem Molekulargewicht proportional. So kann über die Geschwindigkeit mit der sich ein Protein im elektrischen Feld bewegt – d.h. über die in einer gegebenen Zeit zurückgelegte Strecke – eine näherungsweise Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgen. Die SDS-PAGE wurde in

Elektrophoresekammern der Firma Hoefer (*SE 250 Mighty Small II*) oder Bio-Rad (*Mini-PROTEAN® tetra cell*) durchgeführt.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (1x) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden Sammel-Gele mit 10 oder 12 % Polyacrylamid mit jeweils einem 5 % igem Trenngel verwendet. Bis zum Einlaufen der Bromphenolblaufront in das Trenngel betrug die angelegte Spannung 80 V anschließend wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht. Nach etwa 1,5 h – vor Austritt der Bromphenolblaufront – wurde der Gel-Lauf beendet. Die Gele wurden dann entweder in Coomassie-Lösung gefärbt und der Hintergrund in Wasser (ca. 24 h bei RT oder wiederholtes kurzes Erhitzen in der Mikrowelle) entfärbt, oder aber direkt für den *Western-Blot* eingesetzt.

2.3.5 Semi-dry Western-Blot

Um Proteine spezifisch über Ihre Immunreaktivität mit einem Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteinproben zunächst elektrophoretisch aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert.

Der Transfer erfolgte in der Elektroblo-Einheit (*Trans-Blot® Turbo*) im *Semi-Dry* Verfahren. Die PVDF-Membran (7,5 x 9,5 cm²) wurde kurz in Methanol voräquiliibriert und anschließend ebenso wie Filterpapiere und SDS-Gel ca. 5 min in Fast-Transferpuffer äquiliibriert. Von der Anode ausgehend wurden dann drei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und weitere drei Filterpapier luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Transfer erfolgte für 18 min bei 0,5 A 25 V und wurde ggf. durch reversible Färbung von Proteinen mit Ponceau-Rot überprüft. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen anschließend bei Raumtemperatur (RT) mindestens 1 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörper (in TBST) erfolgte nach Waschen (3 x 10 min mit TBST) für mindestens 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min mit TBST) erfolgte die Inkubation (1,5 h, RT) mit entsprechendem Horse-Radish-Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (in TBST mit 1 % (w/v) Magermilchpulver). Nach abschließendem Waschen (3 x 10 min mit TBST) wurden die Membranen 1 bis 2 min mit Lumineszenz-Lösung (*Western-Blotting Substrate Lumi-Light* oder *Lumi-LightPLUS*) inkubiert. Die Dokumentation erfolgte an einem Fluoreszenzimager (*Fusion FX7*), die Quantifizierung mit der Software *MultiGauge 2.0* (Fujifilm). Für Antikörper und Verdünnungen siehe 2.1.9.

2.3.6 Dot-Blot

Die Analyse der Gesamtmenge des an Zellen gebundenen CPEs ist durch eine Immundetektion nach einer SDS-PAGE nur eingeschränkt möglich. Denn verschiedenen

CPE-haltigen Komplexe werden hier der Größe nach aufgetrennt, sodass einzelne, nur in geringen Mengen vorliegende Komplexe, die unter das Detektionslimit fallen, nicht erfasst werden und dadurch die Gesamtbindung zu gering bestimmt werden könnte. Daher wurde zur Analyse der Gesamtmenge des an Zellen gebundenen CPEs eine Immundetektion nach einem *Dot-Blot* durchgeführt. Hierbei werden die Proteine der Probe nicht aufgetrennt, sondern auf einem relativ kleinen Bereich der Membran konzentriert.

Eine kurz mit Methanol aktivierte PVDF-Membran wurde nach Äquilibration in TBS- (5 min, RT) in eine Mikrofiltrationsapparatur (96-well Format, *Bio-Dot*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) eingespannt. Um für die Bindung von Proteinen eine gleichmäßige Befeuchtung der Membran im Bereich der 96-wells zu gewährleisten, wurden unmittelbar vor Probenauftrag 100 µl TBS / 96-well zugegeben und durch Anlegen eines Vakuums entfernt. Anschließend wurden je 5 µl Zelllysate (Abschnitt 2.4.5.3) aus vereinzelter Zellen (Abschnitt 2.4.5.2) in einem Gesamtvolumen von 50 µl TBS / 96-well aufgetragen und durch Gravitation entleert. Nach einmaligem Waschen mit 100 µl TBS (Entleerung durch Gravitation), wurde die Membran aus der Mikrofiltrationsapparatur entnommen und für mindestens 1 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST blockiert. Anschließende Waschschrte und die Immundetektion erfolgten wie für den *Semi-Dry Western-Blot* (Abschnitt 2.3.5).

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in einem CO₂-begasteten Zellinkubator bei 5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.4.2 Kultivieren von Zellen

Die Zellen wurden in 75 oder 25 cm²-Zellkulturflaschen oder -schalen (10 cm² Durchmesser) kultiviert. Passagiert und für Experimente ausgesät wurden die Zellen entweder beim Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 100 % oder 12 bis 14 Tage nach Aussaat (HT-29/B6-Zellen). Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte in der Regel alle 3-5 Tage. Wie Tabelle 2-3 zu entnehmen, wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Zellkulturmedien mit unterschiedlichen Zusätzen verwendet. Vor der Passage der Zellen wurde verbrauchtes Medium abgenommen und anschließend die Zellen einmal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺), stark adhärenente Zellen (HT-29/B6) zusätzlich durch einmaliges Überschichten mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) gewaschen. Zum proteolytischen Ablösen der adhärenenten Zellen wurden diese anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und

bei 37 °C inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen vom Zellkulturplastik dauerte dabei – abhängig von der Zelllinie – etwa 3 bis 60 min. Abgelöste Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Für die Subkultivierung wurden die Zellen in einer 1:3 bis 1:10 Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt.

Tabelle 2-3 **Zusammensetzung der Kulturmedien für die verschiedenen Zelllinien.** (FKS) Fötales Kälberserum, (P/S) Penicillin/Streptomycin-Lösung, Prozentangaben in (v/v).

Medium	Zusätze	Zelllinie
DMEM GlutaMAX™	10 % FKS, 1 % P/S	K1
		Caco-2
MEM AQMedia™	15 % FKS, 1 % P/S, 0,5 mg/ml G418	Caco-2 Cldn3-YFP
		Caco-2 Cldn4-GFP
		Caco-2 vec-YFP
MEM Eagle	10 % FKS, 1 % P/S	HT-29
		LS 174T
		MCF7
		WiDr
MEM Eagle oder DMEM Glutamax™	10 % FKS, 1 % P/S, 0,5 mg/ml G418	HEK-293
		HEK-293-Cldn1-FLAG
		HEK-293-Cldn3-YFP
		HEK-293-Cldn4-FLAG
		HEK-293-Cldn4-GFP
		HEK-293-Cldn5-YFP
		HEK-293-Cldn6-YFP
RPMI-1640 AQMedia™	10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) P/S	HT-29/B6
		LoVo
		SW480
		SW620
		Capan-1
RPMI-1640 GlutaMAX™	10 % (v/v) FKS, 1 % (v/v) P/S	SK-MEL-5

2.4.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmungen wurde nach proteolytischem Ablösen durch auszählen vitaler Zellen in einer Neubauer Zählkammer. Vitale Zellen wurden dabei durch Trypanblau-Ausschluss (0,05 % (w/v) in Standardmedium) identifiziert.

2.4.2.2 Kultivierung von Zellen auf Zellkulturfilter.

Um ausdifferenzierte, polarisierten Zellen zu erhalten, die einen Layer bilden, der als Modell-Epithel geeignet ist, wurden epitheliale Zellen auf Zellkulturfiltern (0,6 cm², für die Mikroskopie 0,4 µm Porengröße; für elektrophysiologische Experimente 0,4 oder 3 µm Porengröße) ausgesät. Die Zellen wachsen hierbei auf dem für Lösungen permeablen Filtern und trennen so ein apikales von einem basalen Lösungskompartiment.

Standartmäßig wurde das Äquivalent von 0,5 bis 0,8 cm² eines konfluent bewachsenen Zellkulturgefäßes in die Vertiefung eines Zellkulturfilters ausgesät. Dabei wurden bis zu 6 Filter in einer Zellkulturschale (6 cm Durchmesser) gemeinsam kultiviert. Für die Lebendzellfärbung (Abschnitt 2.4.11) wurde das Äquivalent von 1,6 cm² eines konfluent bewachsenen Zellkulturgefäßes auf den Boden eines invertierten Zellkulturfilters in 12-well-Zellkulturplatten ausgesät. Das Medium wurde jeweils alle 2 bis 3 Tage gewechselt, Experimente an Tag 7 bis 11 nach Aussaat durchgeführt. Bei HT-29/B6-Zellen bzw. Caco-2-Zellen lag der transepitheliale Widerstand (TER) zu Beginn des Experiments bei 300 bis 800 bzw. 240 bis 410 Ω × cm².

2.4.2.3 Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte nach Gefrierkonservierung in Stickstofftanks. Hierzu wurden die Zellen nach der Passage in Kulturmedium aufgenommen, sedimentiert (5 min, 300 bis 500 × g, 4 °C). Das Medium wurde abgenommen, das Zellpellet sofort in 1 bis 1,5 ml / 25 cm² Zellen Gefriermedium (60% Standardkulturmedium, 30 % FBS, 10 % DMSO) resuspendiert und je 0,5 oder 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden zur langsamen Herunterkühlung in vorgekühlte (4 °C), mit Isopropanol gefüllte Kryo-Container überführt und innerhalb von 30 min in den Gefrierschrank (-80 °C) verbracht. Tags darauf erfolgte die Überführung in den Stickstofftank.

Zur erneuten Kultivierung kryokonservierter Zellen wurden diese unmittelbar nach dem Auftauen in Kulturmedium aufgenommen und in ein frisches, ggf. (HEK-293-Zelllinien) zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtetes (1 h Inkubation mit 25 µg/ml PLL in PBS) Zellkulturgefäß überführt. Die Fläche des Zellkulturgefäßes wurde dabei so gewählt, dass etwa eine 1:3 Verdünnung bezogen auf die Ausgangskultur vor Konservierung resultierte. Reste von DMSO aus dem Gefriermedium wurden entweder direkt nach dem Auftauen durch Zentrifugation (5 min, 300 bis 500 × g, RT) oder durch einen Mediumwechsel am darauffolgenden Tag entfernt.

2.4.3 Generierung von stabil transfizierten HEK-293-Zellen

Zur Generierung der stabil transfizierten Zelllinie HEK-293-Cldn4-FLAG wurden HEK-293-Zellen in PLL-beschichtete (1 h Inkubation mit 25 µg/ml PLL in PBS) 10 cm² Kulturschalen

ausgesät, in HEK-Standardmedium bis zu einer Zelldichte von ~90 % kultiviert und mittels Lipofectamin 2000 als Transfektionsreagenz mit p3×FLAG-CMV-10/huCldn4 transfiziert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen HEK-Standardmedium ohne Antibiotikum (2 ml /10 cm² Kulturschale) ausgetauscht. Für die Transfektion wurden die DNA (4 µg / Ansatz) und das Transfektionsreagenz (10 µl / Ansatz) jeweils in serumfreien OptiMEM (je 2 × 250 µl / Ansatz) verdünnt und nach 5-minütiger Inkubation bei RT vereinigt. Nach weiteren 20 min Inkubation wurde das Gemisch das DNA und Transfektionsreagenz enthielt, zu den Zellen pipettiert.

Tags darauf wurde das Medium gegen neues Medium getauscht, dem zur Selektion 0,5 mg/ml G418 zugesetzt und das Medium alle 2 bis 3 Tage erneuert. In dieser Phase setzt ein massives Zellsterben ein. Nach etwa 2 Wochen Selektion sichtbare Einzelkolonien wurden schließlich gepickt. Dazu wurden die Kolonien einzeln, nach aufsetzen eines Cloning-Hohlzylinder, dessen unterer Rand zur Abdichtung mit Vaseline beschichtet wurde, trypsiniert (50 µl Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) pro Zylinder). Anschließend wurden die Klone in 6-well Platten replattiert und zwischenzeitlich in HEK-Standardmedium ohne Antibiotika kultiviert. Die Beurteilung der Klone erfolgte nach Aussaat auf PLL beschichtete Glasplättchen und entsprechender Immfluoreszenzfärbung mittels konfokaler LSM.

2.4.4 CPE/cCPE und Kontrollbehandlung

Als Vektorkontrolle (vec) beim Einsatz toxischen CPEs diente eine parallel zur Aufreinigung anderer CPE Varianten durchgeführte Präparation aus *E. coli* TOP10, die das Plasmid pTrcHis-optCPE-*antisense* (vgl. 2.1.4) enthielten und daher kein CPE-Genprodukt exprimieren. Da der Anteil von CPE an der Gesamtproteinmenge nach Aufreinigung vergleichsweise gering war (vgl. Anhang 8.1), wurde stets diese Vektorkontrolle mitgeführt. Beim direkten Vergleich unterschiedlicher CPE-Varianten entsprach dabei die Verdünnung (v/v) jeweils der Verdünnung, die für die CPE-Präparation mit der geringsten CPE-Konzentration eingesetzt wurde.

Die cCPE bzw. CPE-Behandlung (standardmäßig 30 nM 1 h) von Modell-Epithelien (HT-29, HT-29/B6, Caco-2 auf Zellkulturfiltern) für die mikroskopische Analyse, Messungen und Visualisierung des Ca²⁺-Einstromes sowie den LDH-Zytotoxizitäts-Assay erfolgten HEPES/Ringerlösung (1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung ggf. mit zusätzlich 2 mM Probenecid). Eine Vorbehandlung dieser Zellen mit EGTA (10 mM, 4 h) erfolgte ebenfalls in HEPES/Ringerlösung (1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung). Die Vorbehandlung mit TNF α (10 000 U/ml ÜN) hingegen erfolgte in Zellkulturmedium.

Die Behandlung von HEK-293-Zellen und Karzinomzellen mit cCPE bzw. CPE erfolgte standardmäßig in Vollmedium (Ausnahme hiervon ist die Messung des CPE-induzierten Ca²⁺-Einstroms in HEK-293-Zellen).

2.4.5 Aufarbeitung von HT-29/B6-Zellen für die biochemische Analyse im *Western-* und *Dot-Blot*

Für die biochemische Analyse im *Western* oder *Dot-Blot* wurden adhärente, subkonfluente und nicht voll ausdifferenzierte, auf Zellkulturplastik wachsende Zellen oder vereinzelte Zellen verwendet. So sollte der Einfluss von TJ auf CPE-Vermittelte Effekte minimiert und die Zugänglichkeit von Rezeptorclaudinen außerhalb von TJ erhöht werden.

2.4.5.1 *Adhärenzte, subkonfluente Zellen*

Am Tag nach der Aussaat ($1,5 \times 10^5$ Zellen/12-well) wurden HT-29/B6-Zellen mit 30 nM CPE in Standardmedium behandelt (1 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂). Anschließend wurden die Kulturgefäße für die Ernte auf Eis überführt. Das Medium wurde abgenommen und samt der darin sich befindenden abgelösten Zellen gesammelt. Die adhärenzten Zellen wurden in eiskaltem PBS Ca²⁺/Mg²⁺ mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt und mit dem abgenommenen Medium vereint. Restliche in dem Kulturgefäß verbliebene Zellen wurden durch nochmaliges Spülen mit PBS Ca²⁺/Mg²⁺ möglichst vollständig gesammelt. Durch Zentrifugation (10 min, 300 × g, 4 °C) wurden die Zellen pelletiert, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.5.2 *Vereinzelte Zellen in Suspension*

Zellen aus der laufenden Kultur wurden nach dem trypsinieren zunächst vereinzelt, in Ansätze zu je 5×10^6 Zellen aufgeteilt und nach Zentrifugation (5 min, 1000 × g, RT) einmal mit PBS gewaschen. Nach entfernen des PBS (Zentrifugation 5 min, 1000 × g, RT) wurden die Zellen in CPE-haltigem Medium bzw. Medium das entsprechende Kontrollen enthielt (vgl. Abschnitt 2.4.4) resuspendiert, 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler (350 rpm) unter gelegentlich Invertieren von Hand inkubiert. Das CPE-haltige Medium wurde am Ende der Inkubationszeit durch Zentrifugation (5 min, 1000 × g, RT) entfernt und die Zellen einmalig mit 1 ml PBS Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen (Zentrifugation 5 min, 1000 × g, RT). Anschließend wurden die Zellen entweder direkt lysiert oder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bis zur Lyse bei -80 °C asserviert.

2.4.5.3 *Zelllyse*

Die Zelllyse erfolgte auf Eis. Zellpellets aus der Zellernte wurden in Lysepuffer (1 % n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM) in *NativePAGE™ SampleBuffer* (1x) resuspendiert. Dabei wurden für adhärenzte, subkonfluente Zellen 25 µl für vereinzelte Zellen 62,5 µl pro Pellet verwendet. Nach Behandlung im Ultraschallbad (1 min, auf Eis) folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einer Zentrifugation zur Entfernung von Zelldebris (20 min, 17800 × g, 4 °C). Je 20 µl des Überstandes der Zentrifugation (geklärtes Lysat) wurde für die SDS-Page mit anschließendem *Western-Blot* je 5 µl für den *Dot-Blot* verwendet.

2.4.6 CPE-Behandlung humanen Kolon-Gewebes

Biopsien gesunden Kolon-Gewebes wurden Patienten während einer Koloskopie entnommen. Die so erhaltenen Proben wurden innerhalb von 30 min zunächst in Plexiglasringe und anschließend in Ussing-Kammern bzw. aus Zellkulturfiltern improvisierte Kammern eingespannt, sodass eine gezielte mukosale Inkubation (1 h, 37 °C, 5 % CO₂) mit CPE (1800 nM in Ringer-Lösung mit 2,5 mM L-Glutamin, 0,5 mM β -Hydroxybutyrat, 10 mM D(+)-Mannose, 50 mg/l Piperacillin, 4 mg/l Zienam) möglich war. Anschließend wurden die Präparate – wie unter 2.4.10 beschrieben – für die mikroskopische Analyse gefärbt.

2.4.7 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) von cCPE im zellulären Bindungs-Assay

HEK-293-Zellen, die verschiedene Claudin-Konstrukte stabil exprimierten (s. 2.1.7.2), wurden mit GST fusionierten cCPE-Varianten inkubiert und gebundenes cCPE mit dem R-Phycoerythrin gekoppelten anti-GST Antikörper detektiert. Um das Bindungssignal auf die Zellzahl normieren zu können wurde außerdem eine Färbung der Nuclei mit Hoechst 33342 durchgeführt. Über die Messung der emittieren Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei den für die Fluorophore charakteristischen Wellenlängen (vgl. Abschnitt 2.1.9) am Mikroplattenleser (Safire, Tecan) erfolgte schließlich die Quantifizierung.

Nach der Passage wurden die Zellen in PLL beschichtete 24-well Platten (25 μ g/ml PLL in PBS, 0,5 ml/well, 1 h bei RT, Waschen 1 Mal mit PBS) mit einer Konfluenz von 60 % ausgesät und der Assay wurde am Folgetag bei einer Konfluenz von etwa 90 bis 100 % durchgeführt. Variable Konzentrationen von cCPE (1 bis 4600 nM) wurden in Zellkulturmedium angesetzt und verbrauchtes Medium durch diese cCPE-Verdünnungen (je 0,5 ml pro 24 well) ersetzt. Nach 30 min (bzw. bei kinetischen Experimenten nach angegebenen Zeiten) bei 37 °C, 5 % CO₂ wurde cCPE abgenommen und die Zellen direkt – ohne einen Waschschriff – 10 min mit Paraformaldehyd fixiert (Fixierungspuffer-CPE). Anschließend wurde restliches Paraformaldehyd 20 min mit Glycin abgelöscht (Ablöschpuffer-CPE). Zur Reduzierung unspezifischer Bindung des Antikörpers wurde 10 min mit Blockierlösung-cCPE blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation (1 h) mit dem Antikörper und Hoechst (Verdünnung s. 2.1.9) in Blockierlösung. Ab der Fixierung der Zellen wurden alle Schritte bei RT durchgeführt. Zwischen allen Schritten – außer nach dem Blockieren – wurde je einmal gewaschen. Waschschriffe erfolgten mit 0,5 ml PBS pro 24 well. Alle übrigen Schritten mit je 0,25 ml Volumen der entsprechenden Lösungen. Schließlich wurde drei Mal gewaschen und das PBS nach dem letzten Waschschriff auf den Zellen belassen. Die Messung erfolgte entweder sofort oder tags darauf – dann wurden die Platten lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Das auf das Hoechst 33342-Signal normalisierte Phycoerythrin-Signal (GST/hoe) wurde gegen die cCPE-Konzentration aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde jeweils

parallel durch Inkubation von nicht-transfizierten HEK-293-Zellen mit cCPE (1–4600 nM) ermittelt und von der spezifischen Bindung subtrahiert.

Die Dissoziationskonstante K_d wurde dann mittels GraphPad Prism 6 in einer nichtlinearen Regressionsanalyse (Modell: *Saturation binding*, Gleichung: *One site - Specific binding*) berechnet. Dabei wird der Zusammenhang $B/B_{max} = B_{max} \cdot [L]/(K_d + [L])$ genutzt, mit dem sich der K_d als diejenige Liganden-Konzentration $[L]$ (entspricht der cCPE-Konzentration) ergibt, bei der die halbmaximale Bindung ($B/B_{max}=0,5$) erzielt wird.

Alternativ wurden exemplarisch kinetische Experimente zur Ermittlung der K_d durchgeführt. Hierzu wurde die Bindung von cCPE an Cldn-exprimierende HEK-293-Zellen über die Zeit für zwei oder mehr cCPE-Konzentrationen gemessen. Die K_d wurde dann mit GraphPad Prism 6 (Modell: *Kinetics*, Gleichung: *Association kinetics (two ligand concentrations)*) bestimmt. Dabei werden mithilfe der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{obs}) und der eingesetzten cCPE-Konzentration die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) und hieraus die Dissoziationskonstante ($K_d = k_{off}/k_{on}$) ermittelt. Folgender Zusammenhang wird dabei genutzt: Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Assoziation ($k_{obs} = k_{on} \cdot [L] + k_{off}$) steigt linear mit der Ligandkonzentration $[L]$. Wird die Assoziationskinetik für zwei oder mehrere Ligandkonzentrationen bestimmt und k_{obs} als Funktion von $[L]$ geplottet kann über die Steigung der Geraden k_{on} , über den y-Schnittpunkt k_{off} bestimmt werden. Die Dissoziationskonstante ergibt sich dann als $K_d = k_{off}/k_{on}$.

2.4.8 MTT-Zytotoxizitäts-Assay und Bestimmung der CPE-Dosis mit halbmaximalem toxischen Effekt (EC_{50})

Metabolisch aktive Zellen setzen das zellpermeable, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) unter oxidativer Aufspaltung des Tetrazolringes zu einem wasserunlöslichen, blau-violetten Formazan um, das in den Zellen akkumuliert. Die Menge des gebildeten Formazans ist hierbei proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen und kann nach Lösen der Formazankristalle in alkoholischer Lösung photometrisch über die Messung der Absorption bei 560 bis 590 nm bestimmt werden.

Die Zellen wurden auf 96-well Platten ausgesät und der Assay bei etwa 95 % Konfluenz durchgeführt. Die Kulturbedingungen variierten für die unterschiedlichen Zelllinien und sind Tabelle 2-4 zu entnehmen.

Am Tag des Assays wurde verbrauchtes Medium durch 100 μ l Zellkulturmedium, welches variable Konzentrationen CPE und ggf. 100 μ M Zinkacetat (ZnAc) enthielt, ersetzt. Nach 1 bzw. 24 oder 48 h (bei 37 °C, 5 % CO₂) wurde das CPE-haltige Medium abgenommen und durch 100 μ l DMEM ohne Phenolrot (1 mg/ml P/S, L-Glutamin und FKS entsprechend des Bedarfs der jeweiligen Zelllinie) mit 10 % (v/v) MTT-Lösung ersetzt. Nach 2 h bzw. 3 h (bei

HEK-293-Zellen) Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Medium abgenommen. Die Lyse der Zellen und der Formazan-Kristalle erfolgte in MTT-Extraktionspuffer (100 µl pro 96-well) für 10 bis 30 min auf dem Schüttler. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des blau-violetten Formazans mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 560 bis 590 nm. Die Vitalität der Zellen wurde jeweils ausgedrückt als % der Absorption bezogen auf die Absorption nach Behandlung mit der Vektor-Präparation (vgl. auch 2.4.4). Aus diesen Vitalitätsdaten wurden jeweils die EC_{50} -Werte als CPE-Dosis mit halbmaximalem toxischen Effekt ermittelt. Dazu wurden mit GraphPad Prism 6 (Modell: *log(agonist) vs. response*, Hill-Koeffizient = 1) $logEC_{50}$ -Werte berechnet. Für alle unabhängigen Experimente/CPE-Varianten einer Zelllinie wurden die Werte jeweils gleichzeitig berechnet wobei je eine Kurve für jedes unabhängige Experiment/CPE-Variante gefittet wurde. Die maximale Viabilität ("bottom" in der Software) wurde auf 100 % (bzw. bei Karzinomzelllinien für alle Datensätze einer Zelllinie als gleichgroß) festgesetzt, der maximale Effekt wurde für alle Experimente/CPE-Varianten einer Zelllinie als gleich angenommen. So konnte auch für CPE-Varianten bzw. Kombinationen aus CPE-Varianten und exprimiertem Claudin, bei welchen nur bei sehr hohen CPE-Konzentrationen ein toxischer Effekt erkennbar war eine näherungsweise Ermittlung des $logEC_{50}$ und EC_{50} erfolgen. Die statistische Auswertung erfolgte mit den $logEC_{50}$ Werten. Diese wurden für die graphische Darstellung in EC_{50} -Werte transformiert.

Tabelle 2-4 **Kulturbedingungen für die verschiedenen Zelllinien für den MTT-Zytotoxizitäts-Assay.** Vor Aussaat erfolgte ggf. eine Beschichtung der Testplatten mit Poly-L-Lysin (PLL). Hierzu wurden die Platten 1 h bei RT mit 25 µg/ml PLL in PBS inkubiert, und mit PBS gewaschen.

Zelllinien	ausgesäte Zellen/cm ²	ausgesäte Zellen/ 96- well	PLL- Beschichtung	Kulturtag nach Aussaat
HEK-293	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HEK-293-Cldn1- FLAG	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HEK-293-Cldn3-YFP	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HEK-293-Cldn4- FLAG	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HEK-293-Cldn4-GFP	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HEK-293-Cldn5-YFP	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HEK-293-Cldn6-YFP	1,25·10 ⁵	4·10 ⁴	+	1
HT-29	7,81·10 ⁴	2,5·10 ⁴	-	3
HT-29/B6	7,81·10 ⁴	2,5·10 ⁴	-	3

K1	-	50 % konfluent	+	2
LoVo	$9,38 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	-	3
LS 174T	$1,56 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	-	3
MCF-7	$7,81 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	-	3
MDA-MB-435	$7,81 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	-	3
SW480	$1,56 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	-	3
SW620	$1,56 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	-	3
WiDr	$7,81 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	-	3

2.4.9 LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von CPE auf Zellen, die auf Filtern kultiviert wurden, wurde der LDH-Assay *Kit* der Firma Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) verwendet. Nach einer Stunde Inkubation (37 °C ohne CO₂-Begasung) der Zellen mit CPE (30 nM in HEPES/Ringer-Lösung mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung) bzw. 10 % (v/v) Lyse-Puffer (*Kit*), wurde die HEPES/Ringerlösung apikal und basal abgenommen. Die Zellen und Zell-Debris wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 × g entfernt. Anschließend wurden 20 µl des Überstandes mit 20 µl HEPES/Ringer-Lösung mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung und nach Zugabe von 40 µl *Working Solution (Kit)* für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit *Stop Solution (Kit)* und die Messung der Absorption bei 480 nm im Mikrolattenleser. Als Hintergrund wurde ein Ansatz der statt Zellkulturüberstand nur HEPES/Ringer Puffer + P/S enthielt abgezogen. Die LDH Freisetzung wurde als % maximale LDH Freisetzung – nach Behandlung mit Lysepuffer – ausgedrückt.

2.4.10 Paraformaldehydfixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Kolon-Biopsien.

Der Ablauf der Paraformaldehydfixierung und Immunfärbung von Zellen (auf Filtern oder Glasplättchen) und Kolon-Biopsien ähnelte sich jeweils. Der detaillierte Versuchsablauf, Inkubationszeiten, Lösungen und eingesetzte Volumina unterscheiden sich teilweise und sind Tabelle 2-5 zu entnehmen.

Nach CPE oder cCPE-Behandlung wurden das Medium vorsichtig abgenommen, die Proben ohne einen weiteren Waschschrift direkt mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend die Reaktion mit Glycin abgelöscht. Anschließend wurden die Proben zur Permeabilisierung der Zellmembranen mit geringen Konzentrationen des Detergenz Triton X-100 behandelt und zur Reduzierung späterer unspezifischer Antikörperbindung mit Lösungen, die Ziegen-Serum und Bovines-Serum-Albumin (BSA) enthielten, blockiert.

Wurden auf Zellkulturfiltern wachsende Zellen gefärbt, wurden zu diesem Zeitpunkt die Filter mit dem Skalpell von dem Plastikzylinder, der das apikale Flüssigkeitsreservoir bildet, getrennt und bei parallellaufenden Färbungen ggf. geteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem primär-Antikörper (1.AK). Zumeist wurden Doppelfärbungen durchgeführt, sodass anschließend ein weiterer 1.AK eingesetzt wurde bevor schließlich ein Fluorophor-gekoppelter sekundär Antikörper (2.AK) zugegeben und eine Kernfärbung mit DAPI und ggf. eine Färbung von f-Aktin mit Phalloidin durchgeführt wurde.

Alle längeren Inkubationszeiten erfolgten zum Schutz vor Austrocknung in einer Feuchtekammer. Zum Schluss wurden die Präparate in Einbettmedium eingebettet.

Tabelle 2-5 **Versuchsablauf, Inkubationszeiten, Lösungen und Volumina bei der Paraformaldehydfixierung und Färbung von Zellen und Kolon-Biopsien.** Alle Lösungen angesetzt in PBS +/+. Verdünnungen der primär (1.AK) und sekundär (2.AK) Antikörper sowie Fluorophore s. Abschnitt 2.1.9. Zumeist wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Hier wurde zunächst eine Inkubation mit einem ersten 1.AK durchgeführt und nach Waschen ein zweiter 1.AK zugegeben. Die weiteren Schritte (Waschen, 2.AK, etc.) erfolgten dann so wie unten angegeben. BSA: Bovines-Serum-Albumin

		Zellen	Biopsien	
Versuchsablauf				
Fixieren	20 min	2 % (w/v) Paraformaldehyd	120 min	2 % (w/v) Paraformaldehyd
Ablöschen	5 min	25 mM Glycin	ÜN 4 °C	125 mM Glycin
Permeabilisieren	5 min	0,5 % (v/v) Triton X-100	2 h	1 % (v/v) Triton X-100
Waschen	2 x 2 min	0,5% (v/v) Ziegen Serum	-	-
Blockieren	1 h	Blockierlösung	3 h	Blockierlösung
1. AK-Färbung	1 h, 37 °C oder ÜN 4 °C	in Blockierlösung	ÜN 4 °C	in Blockierlösung
Waschen	3 x 2 min	Waschpuffer	1 x 1 min 1 x 30 min 2 x 1 h	Blockierlösung
2. AK-Färbung	1 h, 37 °C oder ÜN 4 °C	in Blockierlösung, zusätzlich mit DAPI	ÜN 4 °C	in Blockierlösung
Waschen	3 x 2 min	Waschpuffer	1 x 1 min	Blockierlösung

			1 x 30 min 2 x 1 h	
Färbung	-	-	1 h	DAPI und Phalloidin in Blockierlösung
Waschen	1 x 2 min	H ₂ O	2 x 15 min 1 x 15 min	PBS +/- H ₂ O
Lösungen				
Blockierlösung	6 % (v/v) Ziegen-Serum, 1 % (w/v) BSA		10 % (v/v) Ziegen-Serum, 1 % (w/v) BSA, 0,8 % (v/v) Triton X-100	
Waschpuffer	0,5 % (v/v) Ziegen-Serum			-
Volumina				
Fixierung, Ablöschen, Permeabilisieren Waschen	je 500 µl apikal und basal bzw. 250 µl pro ausgeschnittenem Filter			1 ml
Färbung	100 µl pro Zellkulturfilter bzw 70 µl pro halbem Zellkulturfilter			0,4 ml

2.4.11 Visualisierung des CPE induzierten Ca²⁺ Einstroms in Lebendzellfärbungen

Um den CPE-Induzierten Ca²⁺-Einstrom und morphologische Veränderungen von Zellen zu visualisieren, wurden Lebendzellfärbungen durchgeführt. Intrazelluläres Ca²⁺ wurde hierbei über den Ca²⁺-chelatierenden Fluorophor Fluo-4 detektiert (Excitationsmaximum 494, Emissionsmaximum 506 nm). Nach der Bindung von Ca²⁺ steigt die Excitationsfähigkeit um einen Faktor von etwa 100, sodass der Ca²⁺ Einstrom in mit dem Fluorophor beladene Zellen über eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann.

HT-29/B6 oder HT-29-Zellen wurden auf dem Boden eines invertierten Zellkulturfilters kultiviert (Abschnitt 2.4.2.2). Am Versuchstag wurden die Zellen zunächst einmal mit HEPES/Ringerlösung (mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung) gewaschen. Anschließend wurden zur Beladung der Zellen beidseitig (im apikalen und basalen Flüssigkeitskompartiment) 4 µM Fluo-4-Acetoxymethylester (Fluo-4-AM) sowie zur Visualisierung der Nuclei 1,25 bis 2 µM Hoechst 33342 (s. auch Abschnitt 2.1.9 Antikörper und Fluorophore) in HEPES/Ringerlösung (2 mM Probenecid, 1 % (v/v)

Penicillin/Streptomycin-Lösung) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dabei gelangt das membranpermeable Fluorophor Fluo-4-AM in die Zelle und reichert sich dort – nach der Umsetzung durch zelleigene Esterasen in membranimpermeables Fluo-4 – an. 15 bis 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurde zusätzlich der Membranfarbstoff CellMask™ Deep Red in einer Endverdünnung von 1:1000 zugegeben (s. auch Abschnitt 2.1.9 Antikörper und Fluorophore). Die Zellen wurden 3 x 5 min mit HEPES/Ringerlösung (2 mM Probenecid, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung) gewaschen (8 ml apikal, 0,4 ml basal) und nach entfernen der Füße der Zellkulturfilter vorsichtig in die auf 37 °C geheizte Inkubationskammer des Mikroskops (LSM780 (Zeiss, Jena)) überführt. Das Flüssigkeitsvolumen (HEPES/Ringerlösung, 2 mM Probenecid, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung) betrug 0,5 bis 1 ml apikal und 0,25 bis 0,4 ml basal. Nach einer ersten Aufnahme (0 min) wurden 30 nM CPE – apikal oder basal zugegeben. Hierzu wurde die Hälfte des vorhandenen Volumens durch 60 nM CPE in HEPES/Ringerlösung (2 mM Probenecid, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung) ausgetauscht und durch vorsichtiges auf und abpipettieren durchmischt. Bei apikaler CPE-Zugabe musste der Filter hierzu angehoben und anschließend neu fokussiert werden. Die Aufnahmen erfolgten dann alle 1 bis 5 min mit einem 40 x Wasser-Immersionsobjektiv.

2.4.12 Messung intrazellulären Ca^{2+} mittels Fura-2

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach CPE-Gabe (und dessen Inhibition durch Zinkacetat (ZnAc)) wurde mithilfe des Ca^{2+} -chelatierenden Fluoreszenz-Farbstoffes Fura-2 untersucht. Fura-2 zeigt ein Emissionsmaximum bei 510 nm, das Anregungsmaximum liegt bei 380 nm und verschiebt sich nach Bindung von Ca^{2+} zu 340 nm. Als Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dient daher das Verhältnis der bei 510 nm emittierten Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 340 bzw 380 nm (340/380). HT-29/B6-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 , HEK-293-Zellen in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro well auf Poly-L-Lysin (PLL) beschichtete 96-well Platten (1 h Inkubation mit PLL in PBS) ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte der Assay. Die Beladung erfolgte nach einmaligem Waschen (HEPES/Ringerlösung, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung, 100 µl/well) durch eine 1 stündige Inkubation (37 °C, ohne CO_2 -Begasung) mit dem membranpermeablen Acetomethylester Fura-2-AM (25 µM in HEPES/Ringerlösung, 2 mM Probenecid, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung, 100 µl/well). In der Zelle erfolgt die Abspaltung des Esters durch Esterasen. So entstehendes Fura-2 ist membranimpermeabel und reichert sich daher in der Zelle an. Nach Beladung wurde restliches, extrazelluläres Fura-2-AM durch gründliches waschen (2 x 2,5, 2 x 5 min bei 37 °C mit jeweils 200 µl HEPES/Ringerlösung (2 mM Probenecid, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung)) entfernt. Die Messung erfolgte in je 100 µl Volumen pro well in einem Platten Lesegerät (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA) bei 37 °C in Abständen von je 1 bis 5 min. Für

die Zugabe von CPE wurde jeweils der Puffer abgenommen und durch frische HEPES/Ringerlösung (2 mM Probenecid, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung), die CPE (30 nM) und ggf. ZnAc (100 µM) enthielt, ersetzt.

2.4.13 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mikroskopische Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM, LSM780, Carl Zeiss Microscopy GmbH) mit einem 40x Wasser- oder 63x Ölimmersionsobjektiv. Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie handelt es sich um ein lichtmikroskopisches Verfahren, bei welchem ein fokussierter Laserstrahl definierter Wellenlänge ein Präparat Punkt für Punkt zeilenweise (x- und y-Dimension) abrastert. Streulicht aus Ebenen über und unterhalb der Fokusebene wird über eine Lochblende (variablen Durchmessers) deutlich reduziert, was bei der Auflösung einen entscheidenden Vorteil gegenüber einfacher Fluoreszenzmikroskopie darstellt. Für die Visualisierung immunfluoreszenzgefärbter Proben (s. Abschnitt 2.4.10), werden Fluorophore mit einem Laser passender Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht anschließend detektiert. Exzitations- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluorophore sowie zur Anregung genutzte Laser und zur Detektion genutzte Filter sind Abschnitt 2.1.9 zu entnehmen. Um ein Präparat in z-Dimension zu visualisieren, werden mehrere Bilder verschiedener Fokusebenen (x- und y-Dimension) nacheinander aufgenommen. Hierzu wird der Abstand des Präparates zum Objektiv verschoben.

Da die Aufnahme in 3-Dimensionen vergleichsweise zeitaufwendig ist, wurde bei zeitaufgelösten mikroskopischen Experimenten, bei welchen insbesondere die z-Dimension relevant war (Lebendzellfärbung vgl. Abschnitt 2.4.11), zumeist ein *linescan* (d.h. eine Linie in x- y-Dimension über einen großen Bereich in z) aufgenommen.

2.4.14 Gewinnung von CPE aus eukaryotischer Expression

Alternativ zur Expression in Bakterien, wurde CPE auch in der humanen Zelllinie SK-MEL-5 exprimiert und aus Zelllysaten gewonnen. Aufgrund der Abwesenheit von Claudinen ist diese Zelllinie insensitiv gegenüber einer CPE-Behandlung und auch einer Transfektion mit optCPE (Walther *et al.*, 2012).

SK-MEL-5-Zellen wurden in 6-well Platten kultiviert (3×10^5) und direkt nach Aussaat mit 2 µg DNA (pCpG-mcs G2-optCPE und Varianten davon (s. 2.1.4)) und 3 µl Fugene HD nach Herstellerangaben transfiziert. 48 h nach Transfektion, wurden das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen geerntet und in hypotonem Lysepuffer (50 µl / 6 well) durch 3-maliges einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes 10-maliges aufziehen in einer Ø 0,45 mm Kanüle aufgeschlossen. Zelldebris wurde durch Zentrifugation (10 min, 10000 × g, 4 °C) entfernt und die CPE-Konzentration im Überstand mittels eines CPE-Elisa *Kits*

(*Ridascreen*, R-Biopharm) über eine Eichgerade (vom Hersteller des *Kits* zur Verfügung gestellter CPE-Standard) bestimmt. Anschließend wurde die Toxizität enthaltenen CPEs auf Cldn-exprimierende HEK-293-Zellen in MTT-Assays getestet. Als Kontrolle diente eine Präparation aus untransfizierten SK-MEL-5-Zellen.

2.5 Elektrophysiologische Messungen

Um die Barriereigenschaften von Modell-Epithelien und den Einfluss von CPE auf diese charakterisieren zu können, wurden humane Zelllinien (HT-29/B6, HT-29 und Caco-2) auf Zellkulturfiltern (vgl. Abschnitt 2.4.2.2) kultiviert. So können der Stoff- und Ionenaustausch über das Epithel gemessen werden.

Der transepitheliale Widerstand (TER) ist ein reziprokes Maß für den Netto-Ladungsfluss über das Epithel und gibt Auskunft über die Dichtigkeit eines Epithels gegenüber Ionen. Während der TER eine para- und eine transzelluläre Komponente besitzt, kann über die Permeabilität des Epithels für nicht zellgängigen Markermolekülen eine parazelluläre Komponente isoliert betrachtet werden. Die Messung des TER erfolgte entweder manuell mittels eines halb-automatisierten Widerstandsmessgeräts (Abschnitt 2.5.1) oder aber – um gleichzeitig TER und Permeabilität über den Zelllayer zu messen – in der Ussing-Kammer (vgl. Abschnitt 2.5.2 und 2.5.3).

2.5.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)

Bei der einfachen manuellen Messung in einer halbautomatischen Messvorrichtung (Ing. grad. Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF) werden gleichzeitig je eine Elektroden in den Zellkulturfilter auf apikaler Seite und in das Medium der Zellkulturschale auf basolateraler Seite getaucht. Ein definierter Strom (I) wird appliziert und aus der resultierenden Spannungsänderung (U) der ohmsche Widerstand $R = U/I$ berechnet. Von den so gemessenen Widerständen wurde der Widerstand eines leeren Zellkulturfilters abgezogen und durch Multiplikation mit der Zellkulturfilterfläche der TER in $\Omega \times \text{cm}^2$ erhalten.

2.5.2 Messung des transepithelialen Widerstandes (TER) in der Ussing-Kammer

Das zu vermessende Epithel wird so in der Ussing-Kammer (angefertigt in Kolaboration des Instituts für klinische Physiologie Charité mit Firma Haake, Berlin) eingespannt, dass ein Stoffaustausch zwischen den beiden Kammerhälften ausschließlich über das Epithel erfolgen kann. Stoffkonzentration (mit Ausnahme eines zu vermessenden Tracers (vgl. Abschnitt 2.5.3)) und Volumen der Flüssigkeitssäule in beiden Kammern sind identisch um den Einfluss von Konzentrationsgradienten und hydrostatischen Kräften auf den transepithelialen Transport auszuschalten. Als Puffer verwendet wird eine Ringerlösung

deren physiologischer pH von 7,4 einerseits über ein Konstanthalten der Temperatur bei 37 °C, andererseits über eine Carbogen-Begasung (95 % O₂, 5 % CO₂) sichergestellt wird. Außerdem sorgt das kontinuierliche Einleiten des Gasgemisches für eine ausreichende Sauerstoffversorgung und die konstante Durchmischung der Lösung.

Die beiden Hälften der Ussing-Kammer sind über Agarbrücken (3 % (w/v) Agar in 1,8 % (w/v) NaCl) mit einer in Kaliumchloridlösung (3 M KCl) stehenden epithelnahen Spannungs- und einer epithelfernen Stromelektrode verbunden. Die Potentialdifferenz zwischen den beiden Spannungselektroden (KCl/Kalomel) wird mit einem Voltmeter gemessen. Die Stromelektroden (Ag/AgCl) sind mit einem Amperemeter und einer variablen Gleichstromquelle verbunden. Ähnlich wie beim Gerät zu r manuellen Messung wird hier der TER als ohmscher Widerstand ($R = U/I$) ermittelt.

Vor der Vermessung von epithelialen Zell Layern, wurden jeweils zunächst Leerwerte der mit Ringerlösung gefüllten Kammern ohne Epithel gemessen. Diese wurden später von den für die Zelllayer ermittelten Werte abgezogen. Anschließend wurden die Zellkulturfilter mit HT-29/B6-Zellen eingespannt und beide Kammern vorsichtig zeitgleich mit 5 ml Ringerlösung befüllt. Vor dem Start des Experiments wurde bis zum Erreichen konstanter Widerstandswerte etwa 30 bis 45 min gewartet.

2.5.3 Messung der Fluoreszeinpermeabilität in der Ussing-Kammer

Als Maß für die Integrität der parazellulären Barriere wurde die Permeabilität für das Markermolekül Fluoreszein (332 Da) ermittelt. Die Messung erfolgte parallel zur Messung des TER in Ussing-Kammern (Abschnitt 2.5.2), die hier einen entscheidenden Vorteil gegenüber der einfachen manuellen Messung bieten: Aufgrund der kontinuierlichen Durchmischung der Lösung wird verhindert, dass sich im Verlauf des Experimentes Konzentrationsgradienten bilden, die die Messung beeinflussen könnten.

Da Fluoreszein eine Eigenladung besitzt, muss bei der parallelen Messung des TER die transepitheliale Potentialdifferenz auf 0 mV gesetzt werden um zu verhindern, dass Fluoreszein spannungsgetrieben über das Epithel fließt.

Um die Fluoreszeinpermeabilität zu bestimmen wird zunächst die Konzentrationsänderung von Fluoreszein im basalen Kompartiment nach apikaler Zugabe des Markers bestimmt. Hierzu erfolgt zu definierten Zeitpunkten eine Abnahme von Proben (2 x 100 µl Lösung (Doppelbestimmung)) aus dem basalen Kompartiment, wobei die Volumendifferenz von 200 µl stets direkt im Anschluss durch frische Ringerlösung ersetzt wird. Nach Aktivierung der Spannungsklemme erfolgte die erste Abnahme (Hintergrund). Anschließend wurde apikal Fluoreszein zu einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben. Im Abstand von 10 min erfolgten weitere Abnahmen. Frühestens nach der dritten Abnahme wurden 30 nM CPE (apikal oder basal) zugegeben und anschließend weitere sechs Abnahmen im Abstand von 10 min gemacht. Die Fluoreszeinkonzentration in den Proben wurde schließlich

spektrometrisch über eine Messung der Fluoreszenz (Anregung bei 490 ± 9 nm, Detektion bei 525 ± 20 nm; Mikroplattenleser (Infinite M200, Tecan)) und Abgleich mit einer Standardgeraden bestimmt.

Die Fluoreszeinpermeabilität ($P_{fluoreszein}$) ergibt sich dann mit der Konzentrationsdifferenz in einem gegebenen Zeitintervall (Δc), der Ausgangskonzentration (c_a), dem Zeitintervall (Δt) dem Volumen auf apikaler (V_{ap}) und basolateraler (V_{bl}) Seite und der Fläche der Epithels (A) nach folgender Gleichung:

$$P_{fluoreszein} = \frac{\Delta c \cdot V_{ap}}{\Delta t \cdot A \cdot \left(\frac{V_{ap}}{V_{bl}}\right) \cdot c_a}$$

2.6 Berechnung relativer Affinität ($relK_d$) und Toxizität ($relEC_{50}$)

Um den Effekt von Mutationen auf die gemessene Affinität und Toxizität zu vergleichen, wurden relative Affinitäten ($relK_d$) bzw. Toxizitäten ($relEC_{50}$) berechnet. Die experimentell (vgl. Abschnitt 2.4.7 und 2.4.8) für verschiedene cCPE bzw. CPE/CInd-Kombinationen ermittelten K_d bzw. EC_{50} wurden hierzu auf entsprechende experimentell ermittelte Werte für den Wildtyp (K_dwt bzw. EC_{50wt}) normiert:

$$relK_d = K_d / K_dwt$$

$$relEC_{50} = EC_{50} / EC_{50wt}$$

Die Fehler ($\Delta relK_d$ und $\Delta relEC_{50}$) wurden nach Gauss aus den Fehlern der experimentellen Daten berechnet. Da Fehler von EC_{50} -Werten nicht aber von $logEC_{50}$ -Werten in - und + unterschiedlich groß sind, wurden EC_{50} -Werte durch $10^{logEC_{50}}$ substituiert ($relEC_{50} = 10^{logEC_{50}} / 10^{logEC_{50wt}} = 10^{logEC_{50} - logEC_{50wt}}$). Die partielle Ableitung nach den Messwerten K_d bzw. K_dwt und $logEC_{50}$ bzw. $logEC_{50wt}$ wurden jeweils mit den SEM des jeweiligen Messwertes (ΔK_d bzw. ΔK_dwt und $\Delta logEC_{50}$ bzw. $\Delta logEC_{50wt}$; SEM) multipliziert und die Wurzel des Summenquadrats gebildet:

$$\Delta relK_d = \sqrt{\left(\frac{\partial relK_d}{\partial K_d} \times \Delta K_d\right)^2 + \left(\frac{\partial relK_d}{\partial K_dwt} \times \Delta K_dwt\right)^2} =$$

$$\sqrt{\left(\frac{1}{K_dwt} \times \Delta K_d\right)^2 + \left(-\frac{K_d}{K_dwt^2} \times \Delta K_dwt\right)^2}$$

und:

$$\Delta relEC_{50} = \sqrt{\left(\frac{\partial relEC_{50}}{\partial logEC_{50}} \times \Delta logEC_{50}\right)^2 + \left(\frac{\partial relEC_{50}}{\partial logEC_{50wt}} \times \Delta logEC_{50wt}\right)^2} =$$

$$\sqrt{(\ln(10) \times 10^{logEC_{50} - logEC_{50wt}} \times \Delta logEC_{50})^2 + (-\ln(10) \times 10^{logEC_{50} - logEC_{50wt}} \times \Delta logEC_{50wt})^2}$$

2.7 Statistik

Experimente wurden n-fach durchgeführt. Zu statistischen Auswertung wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Messwerte wurden als arithmetisches Mittel \pm SEM (engl.: *standard error of mean*) dargestellt. Ein Test auf Normalverteilung erfolgte nach Komolgorov-

Smirnov. Bei $n < 5$ wurde von Normalverteilung ausgegangen, sofern für Wertegruppen mit höherem n bei vergleichbaren Experimenten eine Normalverteilung festgestellt wurde. Normalverteilte Wertegruppen wurden mittels Grubbs Test im Hinblick auf Ausreißer getestet und diese ggf. eliminiert. Sofern nicht anders angegeben, wurde bei normalverteilten Daten ein zweiseitiger, gepaarter oder ungepaarter t-Test, bei nicht normalverteilten ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Bei Mehrfachtestungen wurde nach Bonferroni-Holm korrigiert.



3 Ergebnisse

3.1 Pathomechanismus CPE-induzierter Schäden des Kolon-Epithels

Um mechanistische Details der CPE-Wirkung auf den Zellverband im intestinalen Epithel zu untersuchen wurden HT-29/B6-Zellen verwendet, die auf Zellkulturfiltern ausgesät in polarisierte Zellen mit einer dichten epithelialen Barriere ausdifferenzieren und als ein Modell für die intestinale Barriere des Kolons gelten (Kreusel *et al.*, 1991). Zudem wurden humane Kolon-Biopsate verwendet, um die Ergebnisse der Zelllinien-basierten Analysen zu bestätigen.

3.1.1 Claudin- und Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPE-Sensitivität humaner HT-29/B6 Kolon-Epithelzellen

Zunächst wurde die generelle Sensitivität von HT-29/B6 Kolonzellen gegenüber CPE und der beteiligte Mechanismus untersucht.

Um spezifische, Claudin-vermittelte Effekte von unspezifischen unterscheiden zu können, sollte eine CPE-Variante mit inhibierter Claudinbindung verwendet werden. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die Aminosäuren Y306 und L315 essentiell für die CPE-Cldn-Interaktion sind (Veshnyakova *et al.*, 2012b) und die entsprechende Variante der C-terminalen Domäne cCPE-Y306A/L315A zeigte eine drastisch inhibierte Claudinbindung (Protze *et al.*, 2015). Die entsprechenden Aminosäuresubstitutionen Y306A/L315A wurden daher in toxischem Vollängen-CPE vorgenommen und dessen inhibitorische Wirksamkeit untersucht.

Als weiterer CPE-Inhibitor wurde Zn^{2+} verwendet. Es wurde beschrieben, dass Zn^{2+} CPE-induzierte Kurzschlussströme in Caco-2-Zellen (Hardy *et al.*, 1999) und Ca^{2+} -abhängigen ^{51}Cr Austritt aus Vero-Zellen (Horiguchi *et al.*, 1986) inhibiert und es ist bekannt, dass manche zweiwertige Kationen Kationenporen blockieren können (Pasternak *et al.*, 1992). Daher sollte mittels Zn^{2+} bestätigt werden, dass ein Ca^{2+} -Einstrom durch eine CPE-Pore die CPE-induzierte Zytotoxizität vermittelt.

Die einzelnen Schritte der CPE-vermittelten Zytotoxizität von (i) CPE-Bindung an die zellulären Rezeptoren über (ii) Oligomerisierung und (iii) Ca^{2+} Einstrom hin zum (iv) Tod der Zellen wurden untersucht und ihre Inhibierbarkeit durch die Mutation Y306A/L315A in CPE sowie Zn^{2+} getestet. Hierfür wurden unvollständig differenzierte Zellen oder Zellen in Suspension verwendet, um eine Einschränkung der Claudinzugänglichkeit durch eine intakte TJ zu vermeiden (vgl. auch Abschnitte 3.1.4, 3.1.6, 3.1.8 und 4.1.3).

3.1.1.1 CPE-Bindung an Zellen und CPE-Oligomerisierung: Inhibition durch Mutation Y306A/L315A in CPE aber nicht durch Zn²⁺

Die Bindung von CPE an HT-29/B6-Zellen wurde mittels *Dot-Blot* untersucht (Abbildung 3-1, A). So sollte gewährleistet werden, dass die Gesamtbindung quantitativ erfasst wird. Denn in initialen *Western-Blots* nach SDS-PAGE wurde festgestellt, dass Veränderungen im Verhältnis verschiedener SDS-resistenter CPE-Oligomere den quantitativen Vergleich verschiedener Bedingungen erschweren.

Während CPE-wt nach 1 h an HT-29/B6-Zellen band, war dies für CPE-Y306A/L315A nicht der Fall. Ein schwaches, für CPE-Y306A/L315A detektiertes Signal lag im Bereich des Hintergrundes – wie über einen Vergleich mit dem Signal nach Inkubation der Zellen mit einer Kontroll-Präparation ohne CPE (vec, Details s. Abschnitt 2.4.4) sichergestellt wurde. Vor der Inkubation mit Zellen (Abbildung 3-1, B, (ctrl)) lag CPE nicht als SDS-resistentes Oligomer vor. Nach Bindung an HT-29/B6-Zellen oligomerisierte CPE-wt zu großen (>170kDa), SDS-resistenten Komplexen (10 % SDS-PAGE, (Abbildung 3-1, B). Zn²⁺ hatte keinen Einfluss auf die Bindung von CPE-wt an HT-29/B6-Zellen (Abbildung 3-1, A) und lediglich einen leicht inhibierenden Effekt auf die Oligomerisierung (Abbildung 3-1, B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die gezielte Inhibition der Claudinbindung (Mutation Y306A/L315A in CPE), nicht aber die Anwesenheit von Zn²⁺ die Bindung von CPE an HT-29/B6-Zellen und die nachfolgende Ausbildung von CPE-Oligomeren unterbindet.

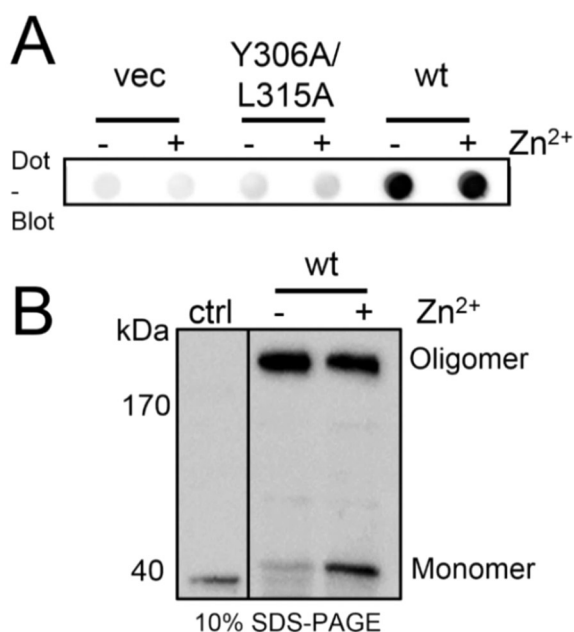


Abbildung 3-1 Die Bindung von CPE an HT-29/B6-Zellen wird durch Mutation Y306A/L315 in CPE nicht aber die Anwesenheit von Zn²⁺ inhibiert und induziert die Bildung von SDS-resistenten CPE-Oligomeren. HT-29/B6-Zellen ((A) vereinzelte Zellen in Suspension oder (B) adhärenente, subkonfluente Zellen) wurden 1 h mit 30 nM CPE-wt (wt), CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) oder einer Vektor Kontrolle (vec, Details s. Abschnitt 2.4.4) in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von Zn²⁺ (100 µM ZnAc) inkubiert und

gebundenes CPE nach Lyse der Zellen (geklärtes Lysat 10000 × g Überstand) analysiert. Die Mutation Y306A/L315A in CPE nicht aber die Anwesenheit von Zn²⁺ inhibiert die Bindung an HT-29/B6-Zellen (**A**, Immundetektion nach einem *Dot-Blot*). Während CPE in Lösung ((ctrl) 5 ng CPE) nicht als SDS-resistentes Oligomer vorlag und im Immunblot nach 10 % SDS-PAGE (**B**) ausschließlich als Monomer detektiert wurde, kam es nach Bindung an HT-29/B6-Zellen zur Ausbildung SDS-resistenter Oligomere. Hier zeigte Zn²⁺ einen leicht inhibitorischen Effekt.

3.1.1.2 CPE-vermittelter Ca²⁺-Einstrom: Inhibition durch Mutation Y306A/L315A in CPE und Zn²⁺

Um den Ca²⁺-Einstrom durch eine CPE-Pore als Mechanismus der CPE-vermittelten Zytotoxizität zu bestätigen, wurde der CPE-vermittelte Ca²⁺-Einstrom in HT-29/B6-Zellen analysiert

Nach Zugabe von CPE-wt aber nicht der CPE-Variante CPE-Y306A/L315A (inhibierte Claudinbindung) konnte im Verlauf einer Stunde ein massiver Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gemessen werden, der bei gleichzeitiger Gabe des Porenblockers Zn²⁺ (100 µM ZnAc) vollständig inhibiert war (Abbildung 3-2, A, B). Wurde Zn²⁺ nicht zeitgleich mit CPE-wt sondern später – zu einem Zeitpunkt bei welchem der Ca²⁺-Einstrom groß war (also bereits Poren assembliert sind) – gegeben, kam dieser sofort zum Erliegen (Abbildung 3-2, B). Nach Entfernen ungebundenen CPEs zum selben Zeitpunkt kam es – entweder durch weitere Neuassemblierung von Poren oder durch weiteren Ca²⁺-Einstrom durch bereits vorhandene Poren – zu einem weiteren Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Niveaus. Wenn hier mit der Entfernung ungebundenen CPEs zeitgleich Zn²⁺ zugegeben wurde, war nicht nur ein Abstoppen des Ca²⁺-Einstroms, sondern – im Vergleich zu der entsprechenden Kondition bei der nur eine Zugabe von Zn²⁺ (ohne Entfernung ungebundenen CPEs) – ein Abfall des intrazellulären Ca²⁺-Niveaus zu sehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der CPE-vermittelte Ca²⁺-Einstrom in HT-29/B6-Zellen über eine Inhibierung der Claudinbindung (Mutation Y306A/L315A) und über eine Zugabe von Zn²⁺ (100 µM ZnAc) inhibierbar ist.

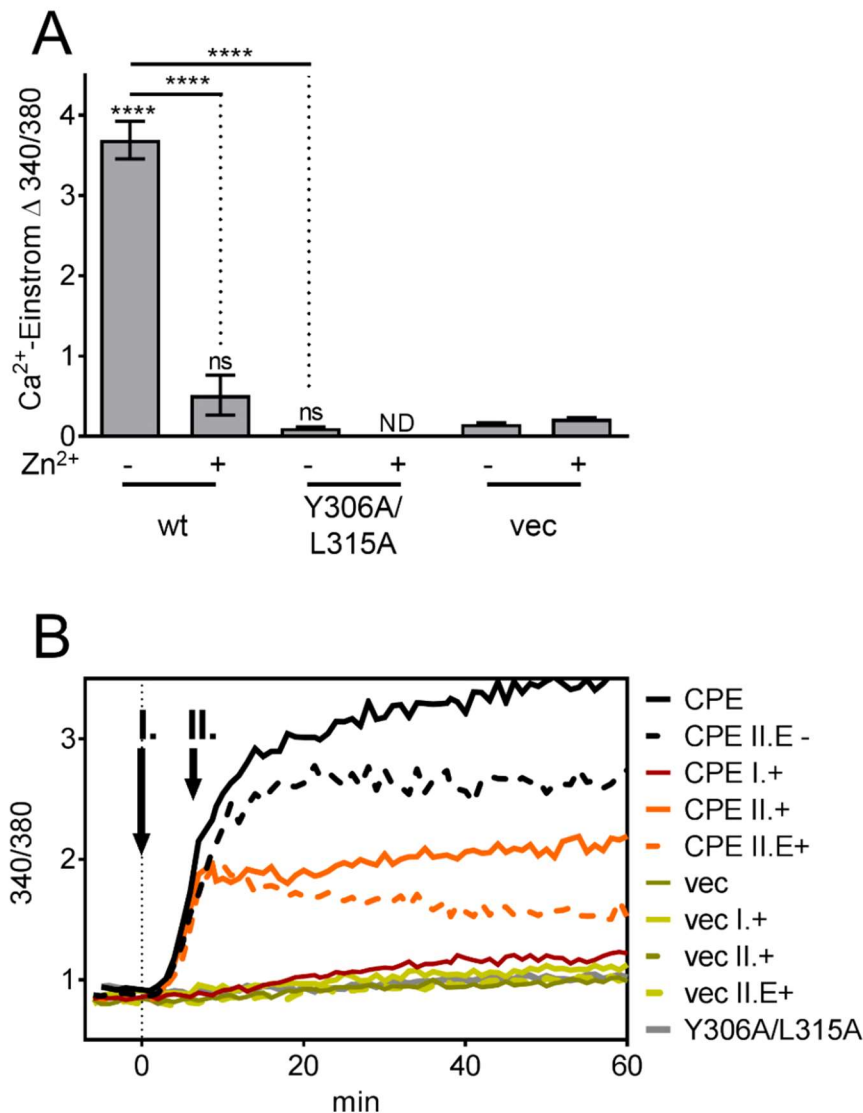


Abbildung 3-2 **Inhibition CPE-vermittelten Ca²⁺-Einstroms in HT-29/B6-Zellen durch Mutation Y306A/L315A in CPE (Inhibition der Claudinbindung) und in Gegenwart von Zn²⁺.** Zu HT-29/B6-Zellen (96-well Platte) wurden 30 nM CPE-wt (wt), CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) oder eine Vektorkontrolle (vec, Details s. Abschnitt 2.4.4) zugegeben. Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in An- (+) oder Abwesenheit (-) von Zn²⁺ (100 μM ZnAc) wurden mit dem Ca²⁺-chelatierenden Fluorophor Fura-2 gemessen. Das Verhältnis der Emission bei 510 nm nach Anregung bei 340 und 380 nm (340/380) spiegelt das intrazelluläre Ca²⁺-Niveau wieder. **(A)** CPE-wt aber nicht CPE-Y306A/L315A induzierte einen Ca²⁺-Einstrom. Dieser war in Gegenwart von Zn²⁺ (gleichzeitig mit CPE zugegeben) inhibiert. Angegeben ist die Differenz Δ340/380 des Verhältnisses 340/380 vor und 60 min nach CPE-Zugabe. n ≥ 6 außer CPE-Y306A/L315A n = 4. Signifikanz – sofern nicht angegeben – gegen die entsprechende (+/-) Behandlung mit Vektorkontrolle. One-way ANOVA, Bonferroni-Holm Anpassung. ns = nicht signifikant, **** = p < 0.0001, ND = nicht bestimmt. **(B)** Zeitverlauf eines repräsentativen Einzelexperiments. Zum Zeitpunkt I (0 min) wurden CPE oder Kontrollen (vec) zugegeben. Zn²⁺ wurde zeitgleich (I.+), oder später (Zeitpunkt II ~5 min) zugegeben (II.+). Alternativ wurde zu diesem Zeitpunkt der Puffer ausgetauscht gegen Puffer mit (II.E+) oder ohne (II.E-) Zn²⁺.

3.1.1.3 CPE-vermittelte Zytotoxizität: Inhibition durch Y306A/L315A in CPE und Zn^{2+}

Mittels MTT-Assays wurde die toxische Wirkung von CPE auf HT-29/B6-Zellen untersucht. Die CPE-Variante CPE-Y306A/L315A, die weder eine Bindung an HT-29/B6-Zellen (vgl. , A) gezeigt noch einen Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 3-2) verursacht hatte, zeigte auch hier – anders als CPE-wt – keinen Effekt (Abbildung 3-3, A).

Zudem war die Zytotoxizität von CPE-wt in Anwesenheit von Zn^{2+} (100 μ M ZnAc) deutlich reduziert. Dies zeigte sich nicht nur bei der in anderen Experimenten verwendeten Standardkonzentration von 30 nM CPE (in Abbildung 3-3, B gekennzeichnet durch gestrichelte Linie) sondern über einen großen Konzentrationsbereich. In Gegenwart von Zn^{2+} erzielten auch hohe CPE-wt Konzentrationen nicht den maximal toxischen Effekt, der in Abwesenheit von Zn^{2+} erzielt wurde. Die CPE-Konzentration des halbmaximalen zytotoxischen Effektes (EC_{50} Abbildung 3-3, C) war in Gegenwart von Zn^{2+} von 4,00 - 0,84/+1,06 auf 78 -34/+61 nM erhöht (Abbildung 3-3, C).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass CPE toxisch auf HT-29/B6-Zellen wirkt. Eine Inhibition der CPE-vermittelten Toxizität war auf Ebene der Claudinbindung durch Mutation Y306A/L315A in CPE, oder – nach bereits erfolgter Claudinbindung – durch eine Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms mit Zn^{2+} möglich. So wurde zum einen sichergestellt, dass CPE-vermittelte Effekte spezifisch über eine Bindung an Claudine erfolgt und mit CPE-Y306A/L315A eine CPE-Variante mit inhibierter Claudinbindung als Negativkontrolle für weitere Experimente etabliert. Zum anderen wurde die Ca^{2+} -Abhängigkeit der CPE-vermittelte Zytoxizität bestätigt.

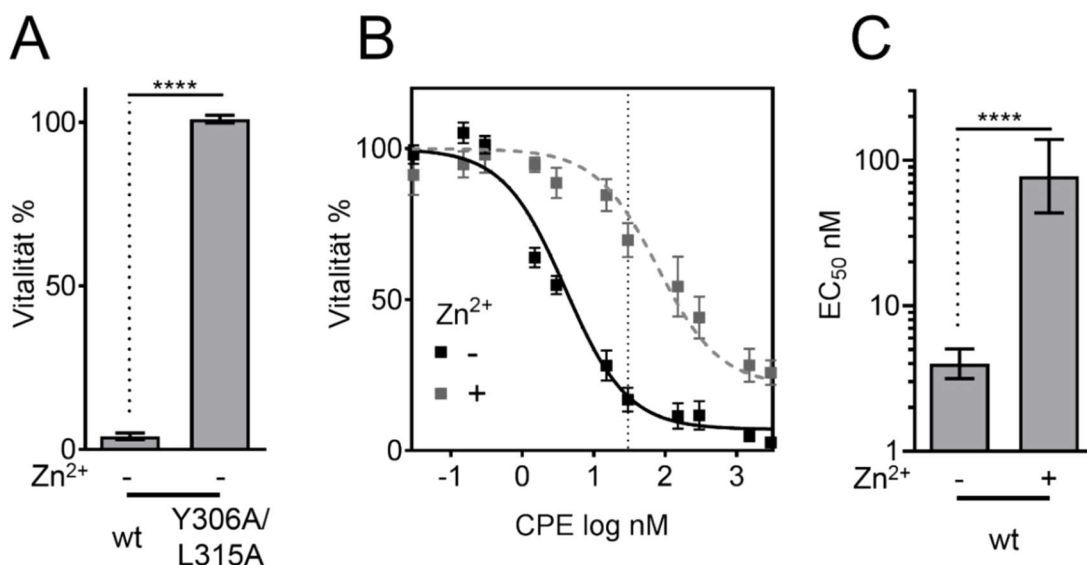


Abbildung 3-3 Inhibition CPE-vermittelte Zytotoxizität auf HT-29/B6-Zellen durch Mutation Y306A/L315A in CPE (Inhibition der Claudinbindung) und in Gegenwart von Zn^{2+} (Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms). HT-29/B6-Zellen wurden 1 h mit 30 nM CPE-wt (wt), CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) (A) oder variablen Konzentrationen von CPE-wt (B, C)

in Ab- (-) oder Anwesenheit (+) von Zn^{2+} (100 μ M ZnAc) inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend in MTT-Assays (**A**, **B**) gemessen und als % der Vitalität nach Inkubation mit entsprechender Verdünnung einer Kontrollpräparation (Vektor, Details s. Abschnitt 2.4.4) ausgedrückt. CPE-wt nicht aber CPE-Y306A/L315A wirkt toxisch auf HT-29/B6-Zellen (**A**). Zn^{2+} inhibiert die CPE-vermittelte Zytotoxizität (**B**). Aus den Vitalitätsdaten wurden jeweils die EC_{50} -Werte als CPE-Dosis mit halbmaximalem toxischen Effekt ermittelt (**C**). Hierzu wurden zunächst $logEC_{50}$ -Werte berechnet (Details s. Abschnitt 2.4.8). Mittelwerte der $logEC_{50}$ -Werte wurden statistisch ausgewertet und für die graphische Darstellung in EC_{50} -Werte transformiert. Dosis-Wirkungskurven wurden in GraphPad Prism 6 dem Modell $log(agonist)$ vs. $response$ und dem ermittelten EC_{50} folgend geplottet. **A**, $n \geq 8$, t-Test zweiseitig. **B**, $n \geq 5$, gestrichelte Linie markiert die als Standardkonzentration verwendete CPE-Konzentration von 30 nM. **C**, $n \geq 5$, t-Test zweiseitig, **** = $p < 0.0001$

3.1.2 Limitierte Störung der transepithelialen Barriere von HT-29/B6-Zellen bei apikaler vs. basaler CPE-Applikation

Um den Effekt von CPE auf die Barriere-Eigenschaften des Kolon-Epithels zu untersuchen, wurden voll ausdifferenzierte HT-29/B6-Zellen als *in vitro* Modell verwendet. Die CPE-vermittelte Änderungen des transepithelialen Widerstandes (TER) und der Permeabilität des Zelllayers gegenüber Fluoreszein (332 Da) – einem Marker für die parazelluläre Permeabilität kleiner Moleküle – wurde gemessen (Abbildung 3-4).

In vivo wird CPE luminal im Verdauungstrakt von sporulierenden Clostridien freigesetzt. *In vitro* entspricht dem eine CPE-Behandlung von apikaler Seite. Eine einstündige Behandlung von HT-29/B6-Zellen mit apikal zugegebenem CPE-wt führte zu einer Reduktion des TER auf 76 ± 7 % des Ausgangswertes (Abbildung 3-4, A) und einer geringen jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Fluoreszeinpermeabilität (Abbildung 3-4, B). Die Kontrollbehandlung (CPE-Y306A/L315A, apikal) hatte jeweils keinen Effekt.

Da für andere epitheliale Zellen berichtet wurde, dass die basale Seite sensitiver gegenüber CPE ist (Singh *et al.*, 2001), wurde auch eine basale Applikation getestet. *In vivo* könnte die basale Seite nach einer massiven Vorschädigung des Epithels teilweise für CPE zugänglich sein. Im Unterschied zur apikalen hatte die basale Applikation von CPE-wt einen drastischen Abfall des TER auf 26 ± 9 % des Ausgangswertes sowie eine deutliche Erhöhung der Fluoreszeinpermeabilität zur Folge. Die entsprechende Kontrolle (CPE-Y306A/L315A basal) hatte keine Effekte.

Somit konnte gezeigt werden, dass die CPE-induzierte Störung der transepithelialen Barriere humaner Kolon-Epithelzellen bei apikaler gegenüber basaler Applikation deutlich eingeschränkt ist.

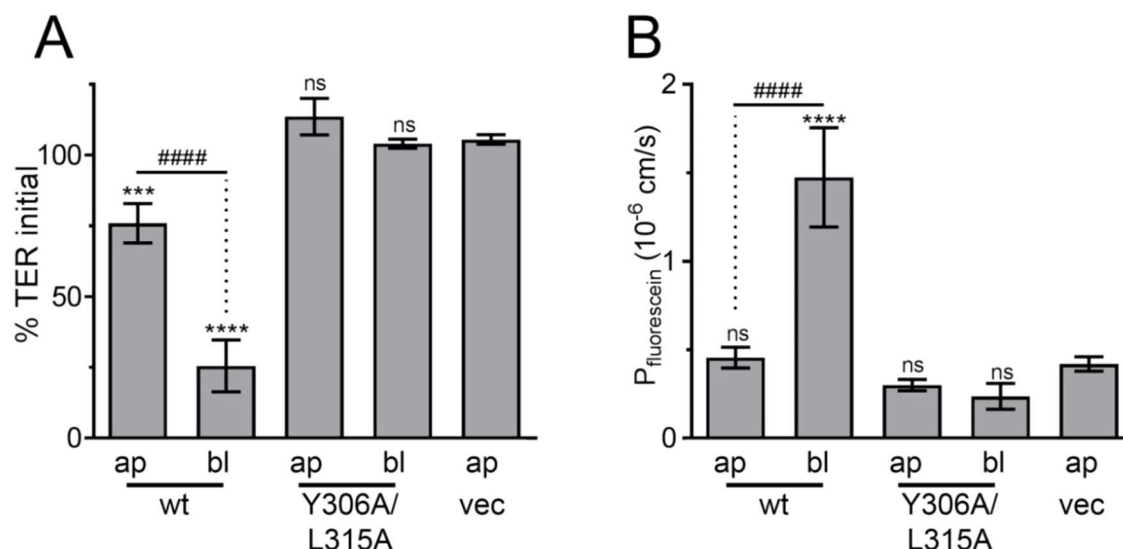


Abbildung 3-4 **Die CPE-induzierte Barrierestörung voll differenzierter HT-29/B6-Zellen ist bei apikaler gegenüber basaler CPE-Applikation eingeschränkt.** Auf Zellkulturfiltern kultivierte HT-29/B6-Zellen wurden in Ussing-Kammern eingespannt und 1 h mit 30 nM CPE-wt (wt), CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) oder eine Vektorkontrolle (vec, Details s. Abschnitt 2.4.4) apikal (ap) oder basal (bl) inkubiert. CPE-wt – insbesondere bei basaler Applikation – nicht aber CPE-Y306A/L315A reduzierte den transepithelialen Widerstand (**A**) bezogen auf den Ausgangswiderstand (% TER initial) und erhöhte die Permeabilität gegenüber Fluorescein (**B**, $P_{\text{Fluorescein}}$). $n \geq 7$ außer Y306A/L315A $n=4$. Signifikanzen gegen vec oder wie angegeben. One-way ANOVA, Bonferroni Anpassung, ns = nicht signifikant verschieden, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

3.1.3 CPE-induzierte fokale Läsionen in HT-29/B6 Kolonzellen

Um zu klären, warum CPE nach apikaler gegenüber basaler Gabe einen eingeschränkten Effekt auf die epitheliale Barriere hatte (vgl. Abschnitt 3.1.2), wurden die CPE-Bindung und die Integrität polarisierter HT-29/B6 Zellschichten nach Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.

3.1.3.1 Mikroskopische Analyse zeigte lokale Einschränkung der Schädigung durch CPE bei apikaler nicht aber basaler Applikation

Nach 1 h Behandlung mit 30 nM CPE-wt apikal, war eine stark lokal begrenzte Schädigung des Zellrasens in Form fokaler, von einem CPE-Signal umgebenen Läsionen erkennbar (Abbildung 3-5, A). Der prozentuale Flächenanteil war mit 3,9 % gering. Nach Behandlung mit CPE-Y306A/L315A (inhibierte Claudinbindung) waren weder Schäden im Zellrasen noch CPE-positive Bereiche erkennbar (Abbildung 3-5, B).

Ein anderes Bild ergab sich nach basaler Applikation von CPE-wt. Statt fokaler CPE-positiver Läsionen war hier ein relativ schwaches, vor allem basales CPE-Signal zu erkennen, welches alle Zellen des gesamten Zellrasens betrifft (Abbildung 3-5, C). Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Signal, da für die Negativkontrolle (basale Gabe von

CPE-Y306A/L315A, inhibierte Claudinbindung, Abbildung 3-5, D) kein basales CPE-Signal detektiert wurde.

Die mikroskopische Analyse zeigte, dass nach apikaler nicht aber nach basaler Applikation die durch CPE-wt-induzierte Schädigung von HT-29/B6-Zellen lokal stark eingeschränkt ist.

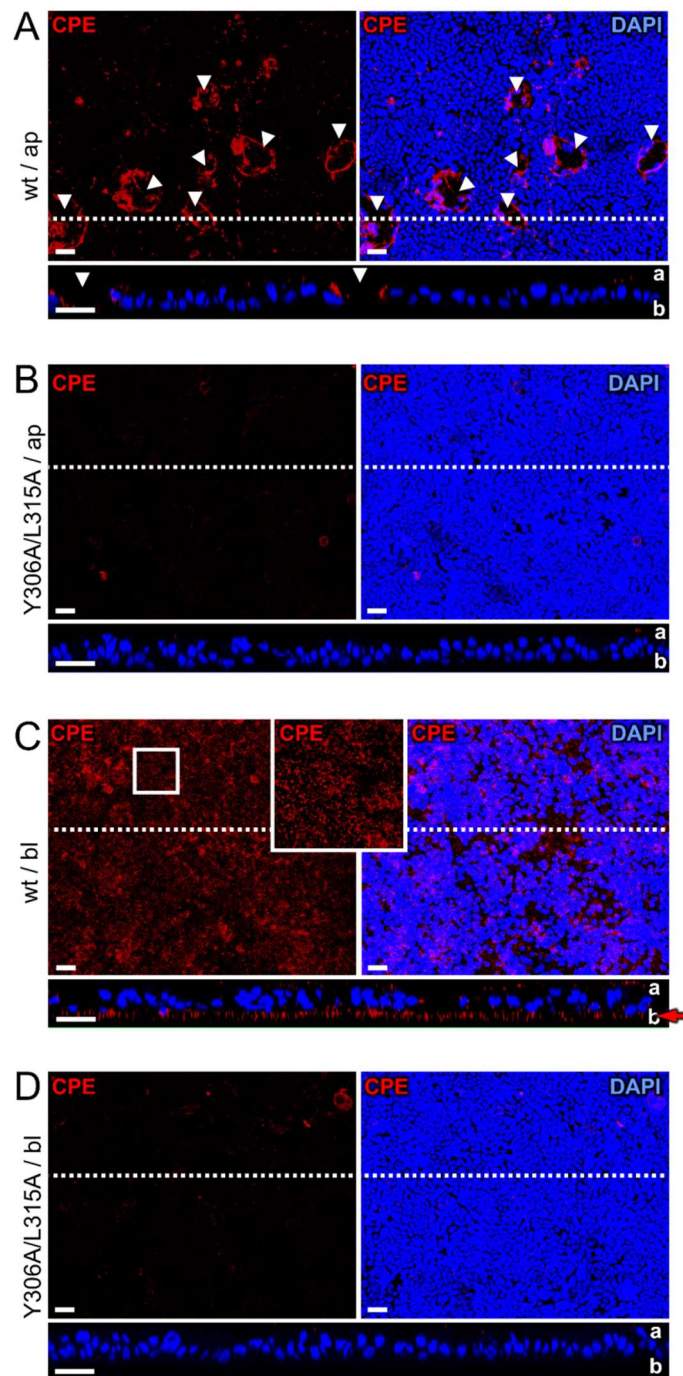


Abbildung 3-5 **Nur fokale Schädigung von HT-29/B6-Zellen nach apikaler Gabe von CPE.** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von HT-29/B6-Zellen nach Behandlung mit CPE (30 nM CPE-wt (wt) oder Negativkontrolle CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) apikal (ap) oder basal (bl) zugegeben, 1 h, 37 °C). Übersichtsaufnahmen dargestellt als Maximumprojektionen von z-stacks. Gestrichelte Linien zeigen an, wo der jeweils unten gezeigte Schnitt in z-Richtung erfolgte. Apikale (a) und basale (b) Seite im z-Schnitt sind jeweils weiß markiert. CPE-positive Läsionen (Bereiche ohne Nuclei umgeben von CPE-positivem Signal, weiße Dreiecke) waren nach apikaler Behandlung mit dem Wildtyp (**A**), nicht aber mit Y306A/L315A (**B**) erkennbar. Keine solche eindeutig fokale begrenzte Schädigung, sondern ein insgesamt weniger dichter Zellrasen und ein homogenes CPE-Signal auf basaler Seite (rote Pfeile) war nach basaler Behandlung mit CPE-wt erkennbar (**C**). In den basal Kontroll-behandelten Zellen (**D**) ist kein CPE-Signal sichtbar. Balken 20 µm.

3.1.3.2 *Bildung eines intakten TJ-Netzwerkes durch ZO1 und Cldn4 in CPE-insensitiven Zellen*

Nach apikaler Behandlung von HT-29/B6-Zellen mit CPE-wt (30 nM, 1 h 37 °C) zeigte sich in konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine partielle Kollokalisierung von CPE mit den TJ-Proteinen ZO1 und Cldn4 an den Rändern der CPE-verursachten fokalen Läsionen (Abbildung 3-6, A). In CPE-negativen Zellen außerhalb der fokalen Läsionen waren ZO1 und das Rezeptorclaudin Cldn4 jeweils – wie in der entsprechenden Kontrolle (CPEY306A/L315A, inhibierte Claudinbindung) – in der TJ lokalisiert (Abbildung 3-6, B). Demgegenüber waren nach basaler Gabe von CPE-wt neben einer homogenen Bindung von CPE-wt an alle Zellen auch eher homogene Effekte auf die Lokalisation der beiden untersuchten TJ-Proteine (ZO1, Cldn4) zu beobachten (Abbildung 3-6, C, D). An den Zell-Zell Kontakten (junktional) waren das ZO1-Signal (Abbildung 3-6, C) zum größten Teil und das Cldn4-Signal (Abbildung 3-6, D) massiv diskontinuierlich lokalisiert.

Insgesamt stellten sich die TJs in CPE-negativen Zellen, wie sie nach apikaler CPE-Applikation außerhalb von fokalen Läsionen zu finden sind, intakt dar: Für den TJ Marker ZO1 und das CPE-Rezeptorclaudin Cldn4 war die für die TJ-typische, kontinuierliche Netzstruktur auf der apikalen Seite der Zellen sichtbar.

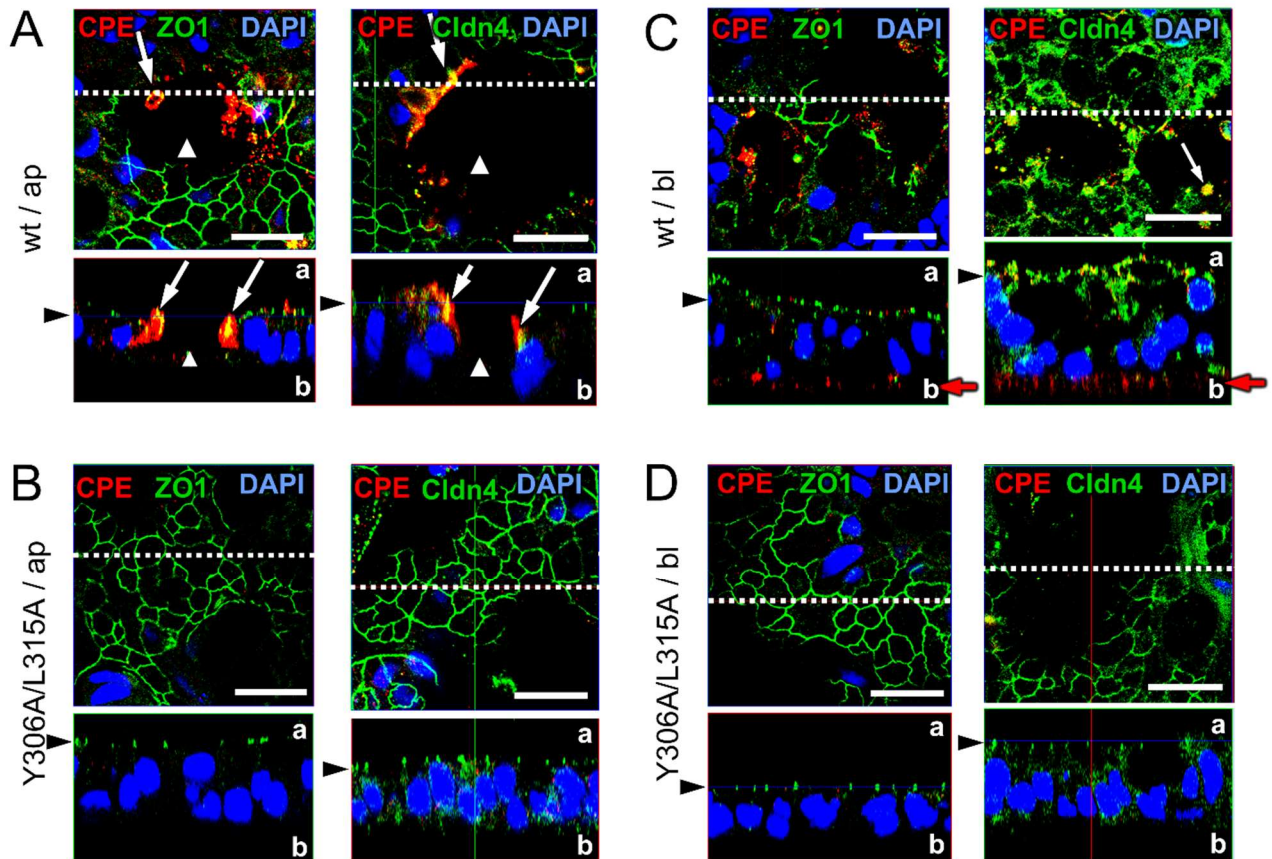


Abbildung 3-6 **Intakte TJ in CPE-negativen Zellen außerhalb fokaler Läsionen.** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von HT-29/B6-Zellen nach Behandlung mit CPE (30 nM CPE-wt (wt) oder Negativkontrolle CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A), 1 h, 37 °C). Detailaufnahmen; dargestellt ist jeweils eine xy-Ebene, deren z-Position in dem darunterliegenden Schnitt jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert ist. Gestrichelte Linien in der xy-Ebene zeigen an, wo jeweils der unten gezeigte Schnitt in z-Richtung erfolgte. Apikale (a) und basale (b) Seite im z-Schnitt sind jeweils weiß markiert. Am Rande der CPE-positive Läsionen nach apikaler (ap) CPE-wt Behandlung, kolokalisierte CPE mit den TJ-Proteinen ZO1 und Cldn4 (gelbe Färbung in der Überlagerung des gelben und roten Kanals, weiße Pfeile (A)). Zellen außerhalb der Läsionen zeigten – wie die kontrollbehandelten Zellen (B) – ein junctionales ZO1 und Cldn4-Signal. Nach basaler (bl) CPE-wt Behandlung hingegen, war keine Fokalität erkennbar (C). Das junctionale Cldn4-Signal war komplett, das junctionale ZO1-Signal größtenteils verloren. In basal kontrollbehandelten Zellen (D) war kein basales CPE-Signal und keine Veränderung der junctionalen Lokalisation von ZO1 und Cldn4 erkennbar. Balken 20 µm.

3.1.4 cCPE-Bindung an eine Subpopulation von HT-29/B6-Zellen mit diskontinuierlichem ZO1 und apikal lokalisiertem CPE-Rezeptor Cldn4

Um die Bindung von CPE an HT-29/B6-Zellen isoliert und unabhängig von nachfolgenden toxischen Effekten zu untersuchen, wurde die nicht-toxische C-terminale Bindungsdomäne cCPE-wt und – als Negativkontrolle mit inhibierter Claudinbindung – cCPE-Y306A/L315A verwendet.

Während ein Großteil der Zellen nach apikaler cCPE-wt-Behandlung cCPE-negativ waren, zeigt eine kleine Subpopulation von Zellen eine starke, apikale Bindung von cCPE-wt (Abbildung 3-7). Die cCPE-positiven unterschieden sich von den cCPE-negativen Zellen im Hinblick auf die Lokalisation des TJ-Markers ZO1 (Abbildung 3-7, A) und des CPE-Rezeptors Cldn4 (Abbildung 3-7, B): Während in den cCPE-negativen Zellen die Expression von ZO1 und Cldn4 für alle Zellen in etwa vergleichbar und jeweils ein kontinuierliches Signal an der TJ erkennbar war, zeigten cCPE-positive Zellen (i) ein unterbrochenes oder fehlendes ZO1 Signal sowie (ii) ein erhöhtes, nicht junctionales Cldn4-Signal, das auf apikaler Seite mit cCPE-kolokalisierte. Die Nuclei cCPE-positiver Zellen waren zudem in einer höheren, mehr apikalen z-Ebene zu finden, als die der übrigen Zellen. Interessanterweise war auch unter Kontrollbedingungen (cCPE-Y306A/L315A), eine Zellpopulation mit unterbrochenem ZO1, nicht junctionalem Cldn4 und apikal lokalisierten Nuclei zu finden, obgleich keinerlei cCPE-Bindung zu erkennen war.

Anders als nach apikaler Gabe war nach basaler Gabe von cCPE-wt das cCPE-Signal nicht fokal auf eine Subpopulation von Zellen beschränkt (Abbildung 3-8). Vielmehr war auf basaler Seite für alle Zellen gleichermaßen eine cCPE-Bindung zu beobachten, die nicht homogen an der gesamten basalen Plasmamembran stattfand, sondern lokale Maxima erkennen ließ. Anders als ZO1 war CPE-Rezeptor Cldn4 nicht ausschließlich an der apikalsten Stelle der lateralen Membran zu detektieren. Auffällig war ein schwaches Cldn4 Signal auf der basalen Seite, welches ein ähnliches Muster lokaler Maxima erkennen ließ wie das cCPE-Signal mit welchem es teilweise kolokalisierte. Um auszuschließen, dass es sich bei den detektierten cCPE-Signalen um unspezifisch an den Zellkulturfilter gebundenes cCPE handelt, wurde cCPE-Y306A/L315A mit inhibierter Claudinbindung als Kontrolle eingesetzt. Basal mit cCPE-Y306A/L315A behandelte Zellen zeigten keine cCPE-Bindung (Abbildung 3-8, B).

Durch die Verwendung nicht-toxischer cCPEs konnte gezeigt werden, dass nicht-junctionale CPE-Rezeptoren auf der apikalen Seite einer Subpopulation von Zellen mit diskontinuierlicher TJ Organisation vorliegen. Diese Daten sprechen dafür, dass das limitierte Vorhandensein dieser CPE-Rezeptoren in der apikalen Plasmamembran der Grund für die fokale Wirkung von CPE ist.

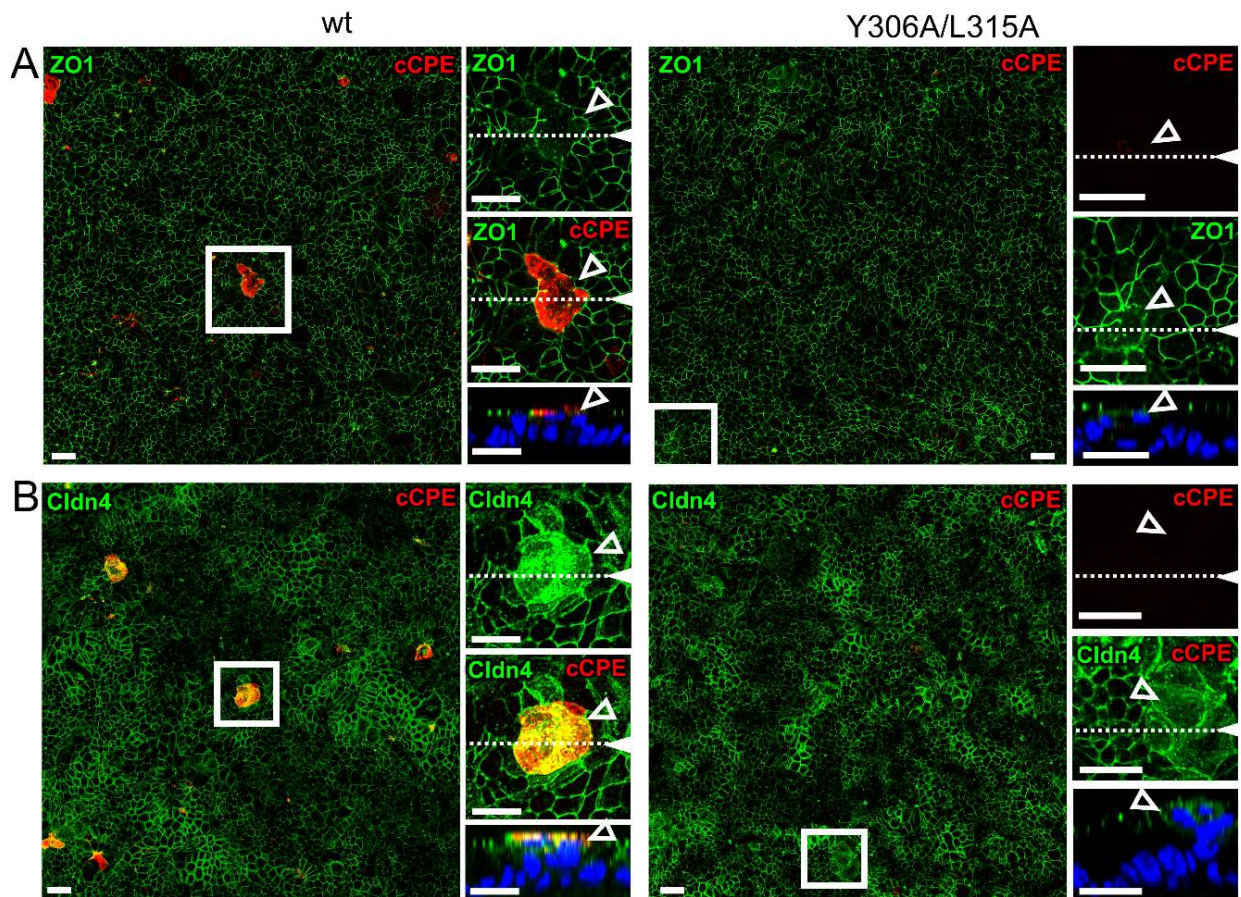


Abbildung 3-7 **cCPE-Bindung an eine Subpopulation von HT-29/B6-Zellen mit diskontinuierlichen TJ**. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit der nicht-toxischen Bindungsdomäne cCPE (30nM cCPE-wt (wt) oder negative Kontrolle CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) apikal, 1 h, 37 °C). Um das TJ-Netzwerk zu visualisieren sind Maximumprojektionen von z-stacks als Übersichtsaufnahmen (jeweils links) und als Details (jeweils rechts) gezeigt. Die gestrichelten Linien in den Details zeigen an wo jeweils ein Schnitt in z-Richtung (jeweils direkt darunter gezeigt) vorgenommen wurde. Die meisten Zellen zeigten keine cCPE-Bindung und ein junctionales ZO1 (**A**) sowie Cldn4-Signal (**B**). cCPE konnte nur nach cCPE-wt Behandlung auf der apikalen Seite ((a) im z-Anschnitt) einer kleinen Subpopulation von Zellen mit unterbrochenem ZO1 zwischen benachbarten Zellen (ungefüllte Dreiecke in **A**) und erhöhtem nicht-junctionalem Cldn4 Signal (ungefüllte Dreiecke in **B**) beobachtet werden. cCPE-wt kolokalisierte dabei apikal mit Cldn4 (gelb in der Überlagerung des roten und grünen Kanals). Auch in den Kontroll-behandelten Zellen (cCPE- Y306A/L315A) war eine kleine Subpopulation von Zellen mit nicht junctionalem ZO1 und Cldn4 zu finden (ungefüllte Dreiecke in **A**, **B**). Balken:20 µm.

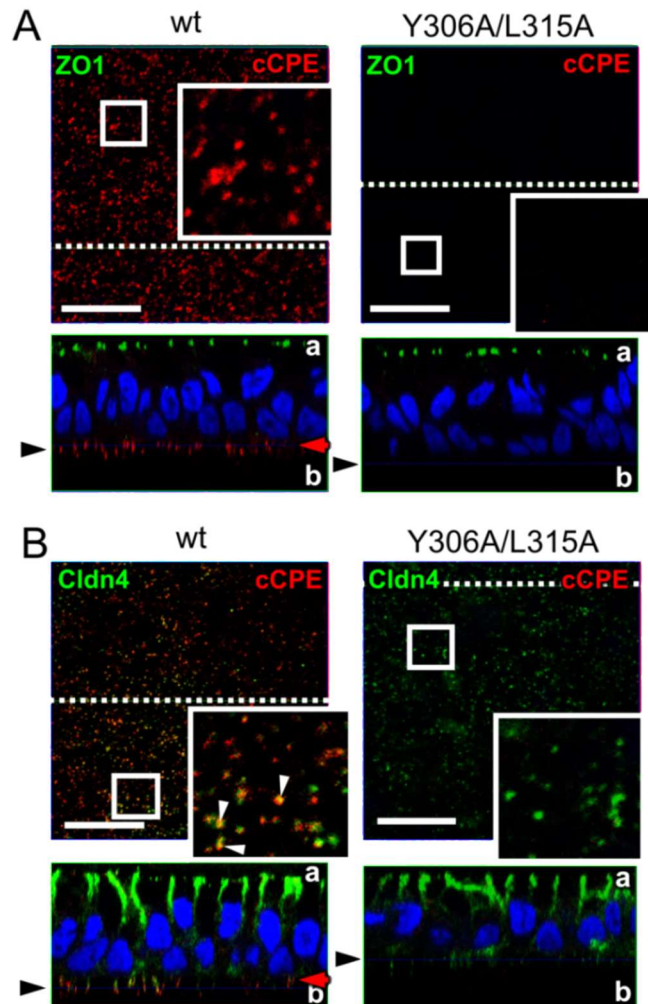


Abbildung 3-8 **Nach basaler Gabe bindet cCPE auf der basalen Seite aller HT-29/B6-Zellen.** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit der nicht-toxischen Bindungsdomäne cCPE (30nM CPE-wt (wt) oder negative Kontrolle CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) basal, 1 h, 37 °C). Es ist jeweils eine xy-Ebene (oben) gezeigt, die – wie in dem unten gezeigten z-Anschnitt durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet – weit basal liegt. Die Position des z-Anschnittes in xy ist jeweils durch die weiße, gestrichelte Linie angegeben. (a) und (b) markieren jeweils apikale bzw. basale Seite. Anders als nach apikaler Gabe von cCPE-wt (vgl. Abbildung 3-7) war kein eindeutig fokal begrenztes, sondern ein alle Zellen gleichermaßen betreffendes cCPE-Signal auf basaler Seite (rote Pfeile) erkennbar. In den basal Kontroll-behandelten Zellen (Y306A/L315A) war kein cCPE detektierbar. ZO1 war ausschließlich an der apikalsten Stelle der lateralen Membran detektierbar (**A**). CPE-Rezeptor Cldn4 hingegen war auch weiter lateral und basal erkennbar, wo es teilweise mit cCPE kolokalisierte (weiße Pfeile in **B**). Balken: 20 μm

3.1.5 Caco-2-Zellen: Einschränkung CPE-vermittelter Effekt bei apikaler Gabe

Bei HT-29/B6-Zellen war die CPE induzierte Schädigung nach apikaler CPE-Gabe fokal limitiert.

Für Caco-2-Zellen, mit welchen in den meisten *in vitro* Studien zum Wirkmechanismus von CPE gearbeitet wurde (Chakrabarti und McClane, 2005; Robertson *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2001), konnten vergleichbares Ergebnisse erzielt werden. In konfokalmikroskopischen Aufnahmen ausdifferenzierter Caco-2-Zellen zeigten sich nach apikaler CPE-wt Behandlung nur fokal Läsionen im Zellrasen, während der Großteil der Zellen sich vergleichbar darstellte wie die kontrollbehandelten Zellen (Abbildung 3-9, A). Auch der Effekt auf den TER war bei apikaler CPE-Gabe, nicht jedoch bei basaler CPE-Gabe limitiert (Abbildung 3-9, B).

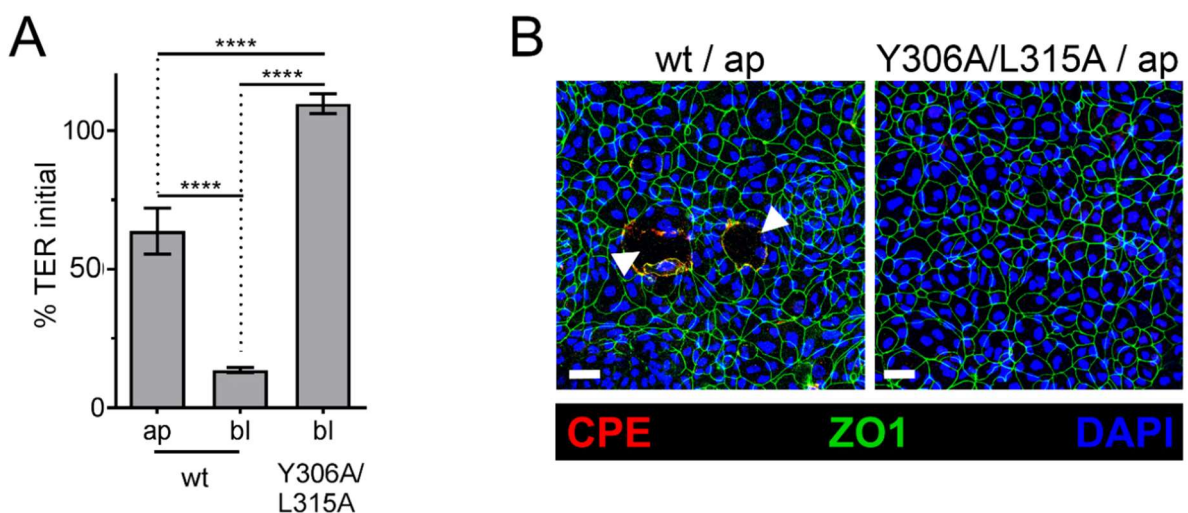


Abbildung 3-9 **Nur limitierte und lokal eingeschränkte Schädigung epithelialer Caco-2 Zellschichten nach apikaler CPE-Gabe.** 30 nM CPE-wt oder CPE-Y306A/L315A (Negativkontrolle, inhibierte Cldn-Bindung) wurden apikal (ap) oder basal (bl) zu polarisierten, auf Zellkulturfiltern wachsenden klonalen Caco-2-Zellen gegeben. **(A)** Fokale Läsionen (weiße Dreiecke) waren in apikal mit CPE-wt behandelten klonalen Caco-2-Zellen (Caco-2-pEYFP-N1) aber nicht in kontrollbehandelten Zellen sichtbar. Maximumprojektion von z-stacks. Balken: 20 μ m. **(B)** Veränderungen des TER (als % initialer TER) waren weniger ausgeprägter nach apikaler (ap) als nach basaler (bl) CPE-wt Applikation. n=9, Signifikanzen wie angegeben. One-way ANOVA, Bonferroni Anpassung, **** = $p < 0.0001$.

3.1.6 Erhöhung der CPE-Sensitivität durch Störung der transepithelialen Barriere

Die mikroskopische Analyse von CPE- und cCPE-behandelten Zellen hatte gezeigt, dass eine Bindung vor Allem an nicht-junktionale Claudine erfolgt. Dies deutete darauf hin, dass

eine intakte parazelluläre TJ-Barriere protektiv gegenüber einer Schädigung durch CPE wirkt.

Um dies zu überprüfen, wurden HT-29/B6-Zellen vor der CPE-Gabe mit Barriere-störenden Agenzien vorbehandelt (EGTA und TNF α) und die Bindung von cCPE an diese Zellen sowie ihre Sensitivität gegenüber CPE mit der Sensitivität nicht-vorbehandelter Zellen verglichen. Der Ca²⁺-Chelator EGTA reduziert frei verfügbares Ca²⁺ und moduliert so die parazelluläre Barriere (Krug *et al.*, 2009). Neben einer Reduktion des TER (Krug *et al.*, 2009) wurde nach EGTA-Behandlung von HT-29/B6-Zellen eine fokal erhöhte parazelluläre Zugänglichkeit für BSA beschrieben (Richter *et al.*, 2016). Zusätzlich zu EGTA wurde das proinflammatorische Zytokin TNF α verwendet, dessen Barriere-störende Effekte auf HT-29/B6-Zellen gut beschrieben sind (Schmitz *et al.*, 1999) und für das eine fokal erhöhte parazelluläre Permeabilität für ein 10 kDa Dextran *Tracer*-Molekül (Richter *et al.*, 2016) gezeigt wurde. Weiterhin wurde getestet, ob die parentale Zelllinie HT-29, die anders als der Subklon HT-29/B6 nicht ausdifferenziert und keine Barriere ausbildet (Kreusel *et al.*, 1991), empfindlicher gegenüber CPE ist.

3.1.6.1 *Barrierestörung durch EGTA, TNF α und Dedifferenzierung*

Die Vorbehandlung mit 10 mM EGTA für 4 h (Abbildung 3-10, A) oder mit 10 000 U/ml TNF α ÜN (Abbildung 3-10, B) reduzierte den TER von HT-29/B6-Zellen stärker als für die Kontroll-behandelten Zellen. Unter vergleichbaren Kulturbedingungen (ausgesäte Zelldichte, Kultur-Dauer) bilden undifferenzierte HT-29-Zellen anders als der Subklon HT-29/B6 nur eine schwache Barriere mit geringem transepithelialen Widerstand aus (Abbildung 3-10, C).

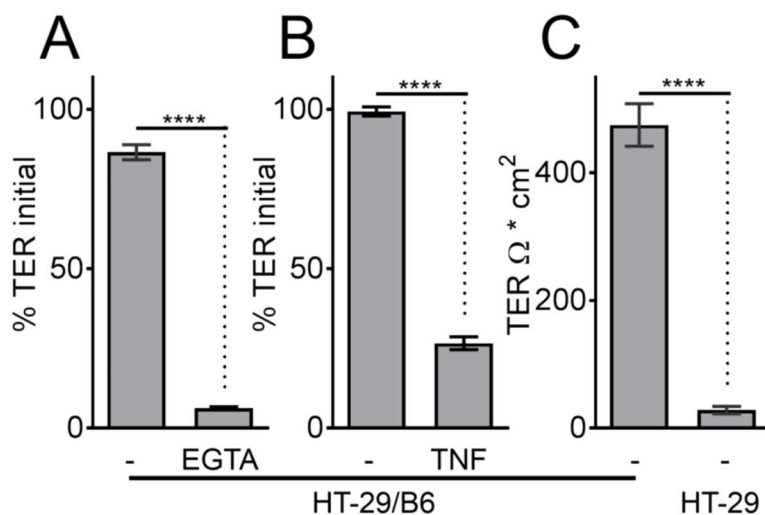


Abbildung 3-10 **Barrierestörung durch EGTA, proinflammatorisches Zytokin TNF α und Dedifferenzierung.** HT-29/B6-Zellen, die mit (A) EGTA (10 mM 4 h) oder (B) TNF α (10 000 U/ml ÜN) vorbehandelt wurden sowie die undifferenzierte parentale Zelllinie HT-29 (C) zeigten im Vergleich zu unbehandelten HT-29/B6-Zellen (-) einen stark reduzierten TER. Werte in (A) und (B) sind jeweils als % des TER zum Zeitpunkt der Substanzzugabe (TER initial) dargestellt. $n \geq 8$. t-Test zweiseitig, **** = $p < 0.0001$.

3.1.6.2 Erhöhte cCPE-Bindung bei gestörter Barriere

Die Bindung von cCPE-wt an EGTA- (10mM EGTA, 4 h) oder TNF α - (10 000 U/ml, ÜN) vorbehandelte Zellen wurde nach Immunfärbung mikroskopisch untersucht (Abbildung 3-11). Ähnlich wie bei den nicht-vorbehandelten Zellen (vgl. Abbildung 3-7) waren nach cCPE-wt Behandlung eine große cCPE-negative und eine kleinere cCPE-positive Subpopulation zu erkennen (Abbildung 3-11, B-E). Die cCPE-positive Fläche (Abbildung 3-11, A; quantifiziert aus mikroskopischen Aufnahmen wie den in , B-E und Abbildung 3-7 gezeigten) war allerdings gegenüber den nicht-vorbehandelten Zellen um etwa das 4-Fache erhöht (Abbildung 3-11, A). Hinsichtlich der Lokalisation von ZO1 und Cldn4 sowie cCPE zeigte sich insbesondere nach EGTA-Vorbehandlung (Abbildung 3-11, A) ein ähnliches Bild wie für die nicht-vorbehandelten Zellen (Abbildung 3-7). Während cCPE-negative Zellen unauffällige, junctionale Signale zeigten, zeichneten sich cCPE-positive Zellen durch diskontinuierliches ZO1, nicht junctionales Cldn4 sowie weit apikal liegende Nuclei aus. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass nach den barrierestörenden Vorbehandlungen eine erhöhte cCPE-wt-Bindung zu beobachten war.

3.1.6.3 Erhöhte Schädigung durch CPE bei gestörter Barriere

Die CPE-Sensitivität von HT-29/B6-Zellen mit und ohne Barriere-modulierender Vorbehandlung (EGTA, 10mM, 4h oder TNF α , 10 000 U/ml, ÜN vgl. Abbildung 3-10, A, B) bzw. bei basaler CPE-Applikation und undifferenzierten HT-29-Zellen (vgl. Abbildung 3-10, C) wurde anhand konfokal mikroskopischer Aufnahmen (Abbildung 3-12, A-C) und LDH-Zytotoxizitäts-Assay (Abbildung 3-12, D) analysiert.

Keine klar abgegrenzte einzelne fokale Läsionen sondern größere Bereiche mit einer reduzierten Anzahl von Nuclei sind bei den vorbehandelten Zellen und auch nach basaler Applikation von CPE-wt erkennbar (Abbildung 3-12, A). Dies war besonders stark ausgeprägt nach EGTA, weniger stark ausgeprägt bei TNF α Vorbehandlung. Der Zellverlust wurde anhand des DAPI-Signals in mikroskopische Aufnahmen – wie den in Abbildung 3-12, A, B gezeigten – quantifiziert (Abbildung 3-12, C). Unter allen getesteten Bedingungen war der Zellverlust im Vergleich zu den Standard-Bedingungen ($5,8 \pm 2,0$ %) erhöht. Dies war nach basaler Applikation ($49,3 \pm 16,2$ %) bzw. bei undifferenzierten HT-29-Zellen ($49,6 \pm 12,8$ %) am stärksten ausgeprägt und nach EGTA-Vorbehandlung ($34, \pm 5,7$ %) und TNF α -Vorbehandlung ($14,4 \pm 2,4$ %) weniger stark.

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Zytotoxizität (Abbildung 3-12, D). Der CPE-induzierte LDH-Ausstrom aus HT-29-Zellen war am stärksten nach basaler CPE-wt Gabe, am geringsten unter den Standardbedingungen ohne Vorbehandlung.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Barriere-Störung (Abbildung 3-10), wie sie nach EGTA-Behandlung, unter inflammatorischen Bedingungen (TNF α -Behandlung) oder Dedifferenzierung (HT-29-Zellen) vorliegt zu einer verstärkten Bindung von cCPE-wt (Abbildung 3-11) und einer verstärkt schädigenden Wirksamkeit (Abbildung 3-12) von CPE-wt führt.

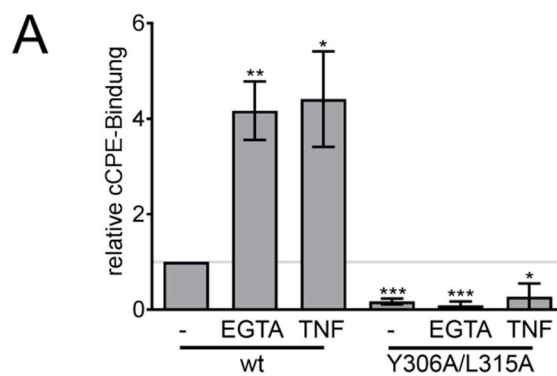
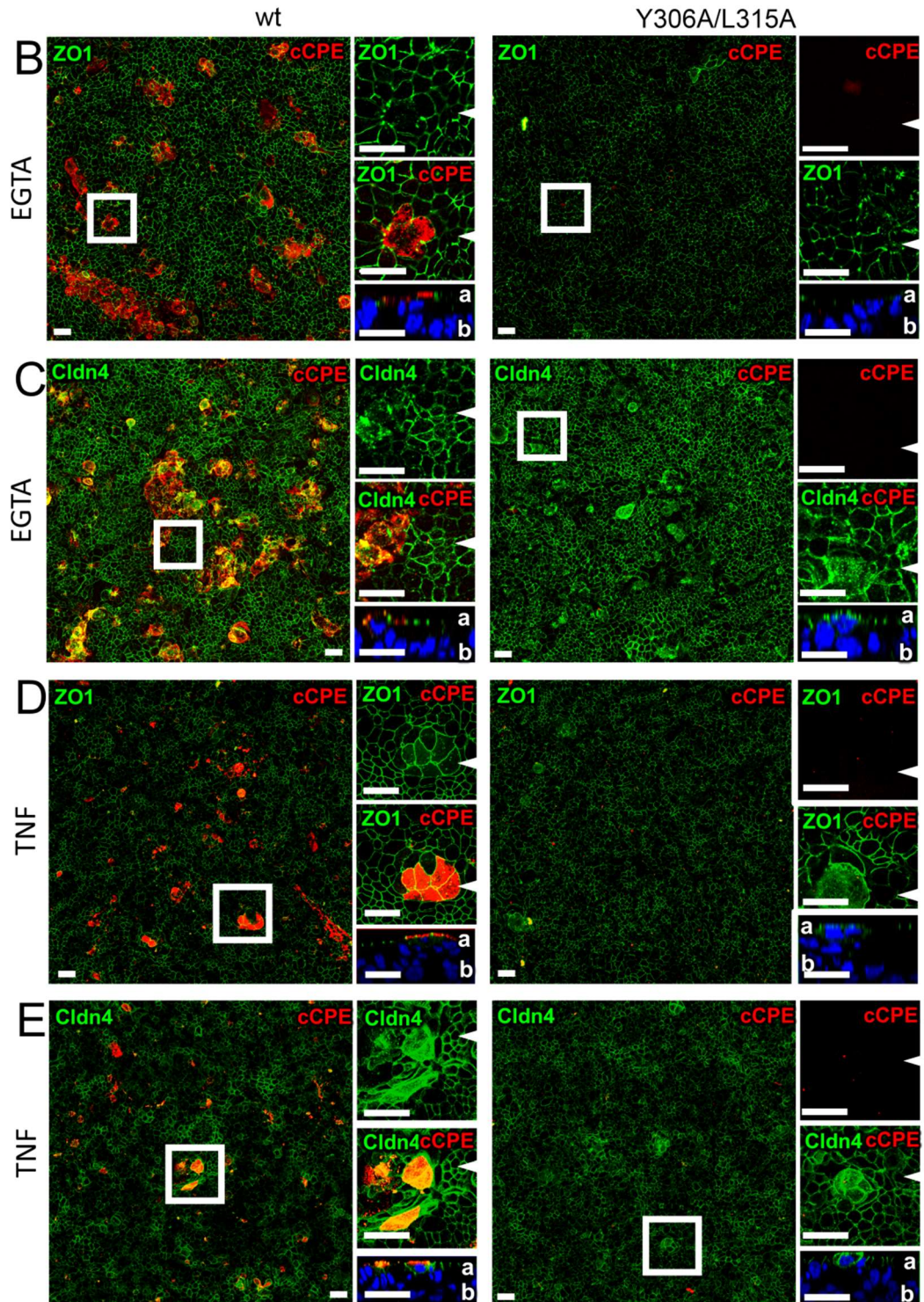


Abbildung 3-11 **CPE-Bindung an HT-29/B6-Zellen nach Vorbehandlung mit EGTA oder TNF α** . Wurden HT-29/B6-Zellen vor Inkubation mit der nicht-toxischen Bindungsdomäne cCPE (30 nM cCPE-wt (wt) oder Kontrolle cCPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) apikal, 1 h, 37 °C) mit EGTA (10 mM, 4h) oder TNF α (10 000 U/ml, ÜN) vorinkubiert konnte mehr gebundenes cCPE-wt detektiert werden als für nicht-vorbehandelte Zellen (-). Für die Berechnung der relative cCPE-Bindung (**A**) wurden mikroskopische Aufnahmen (wie in Abbildung 3-7 und diese Abbildung **B-E**) quantifiziert und die cCPE-positive Fläche unter den verschiedenen Bedingungen jeweils als Vielfaches der cCPE-positive Fläche ohne Vorbehandlung ausgedrückt. $n \geq 4$. Signifikanzen gegen (wt), (-). One-sample t-test, * =



$p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$. **B, C**, Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von GTA (**B, C**) bzw. $\text{TNF}\alpha$ (**D, E**) vorbehandelten HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit cCPE. Um das TJ Netzwerk zu visualisieren, sind Maximumprojektionen von z-stacks gezeigt. Jeweils links: Übersichtsaufnahme; jeweils rechts: herausvergrößerte Details. Weiße Dreiecke am rechten Rand markieren, wo der Schnitt in z-Richtung vorgenommen wurde, der jeweils unten gezeigt ist. Apikale (a) und basale (b) Seite sind hier jeweils gekennzeichnet. Ähnlich wie in den nicht-vorbehandelten Zellen (vgl. Abbildung 3-7) band cCPE an apikales Cldn4 einer Subpopulation von Zellen. Insgesamt waren jedoch mehr Zellen cCPE positiv. Balken: 20 μm .

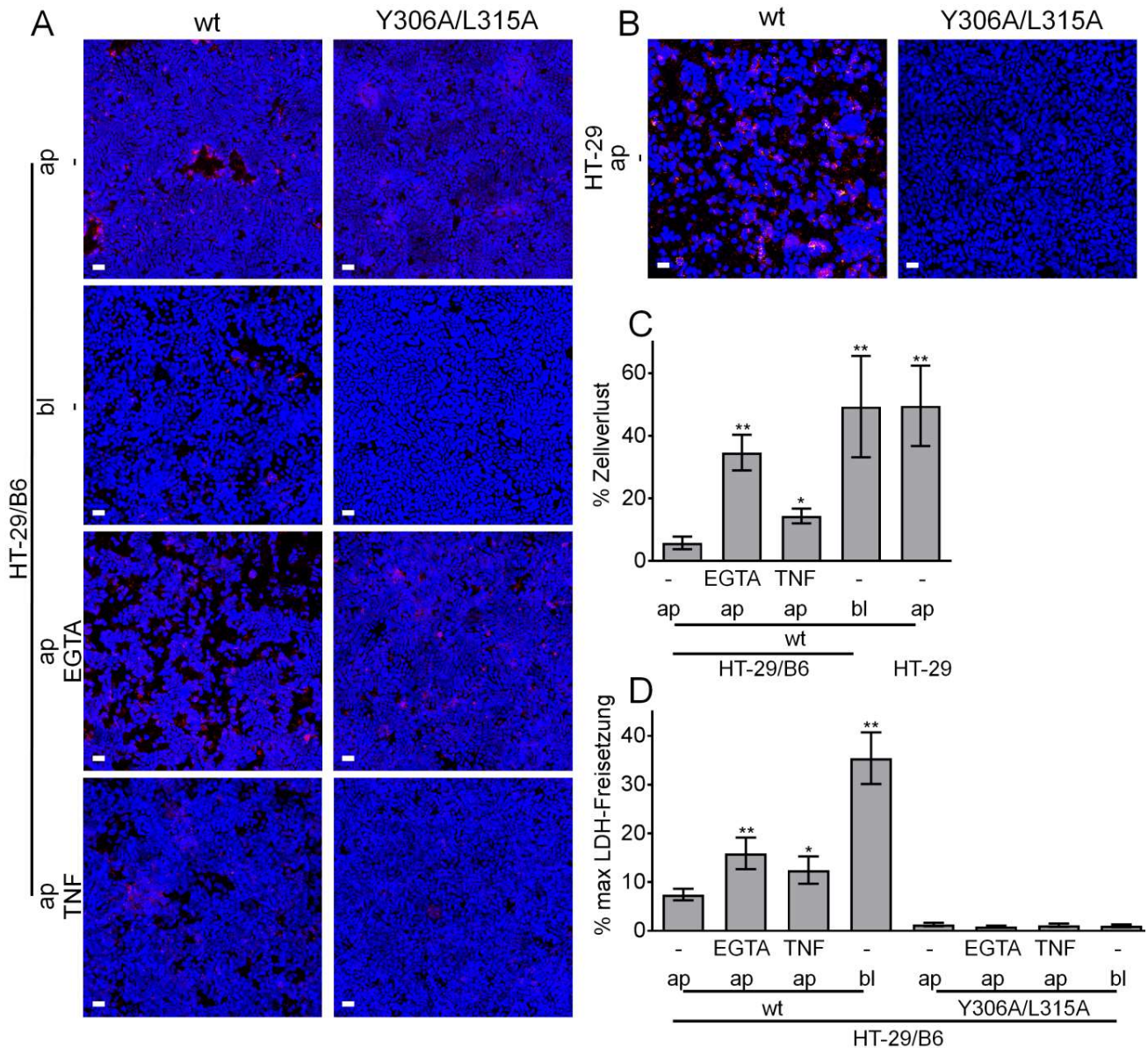


Abbildung 3-12 **CPE-Sensitivität mit EGTA oder TNF α vorbehandelter HT-29/B6-Zellen bzw. dedifferenzierter HT-29-Zellen.** HT-29/B6 bzw. HT-29-Zellen wurden ohne Vorbehandlung (-) bzw. nach Vorbehandlung mit EGTA (10 mM, 4h) oder TNF α (10 000 U/ml ÜN) mit CPE (30 nM CPE-wt (wt) oder Kontrolle CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A), 1 h, 37 °C) inkubiert. **(A, B)** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen. Im Vergleich zu nicht-vorbehandelten HT-29/B6-Zellen bei apikaler Gabe (ap) war die CPE-induzierte Reduzierung DAPI-gefärbter Zellen stärker nach basaler Applikation (bl) oder Vorbehandlung mit den Barriere-störenden Agenzien EGTA und TNF α . In ähnlicher Weise war auch die Schädigung von HT-29-Zellen stärker **(B)**. Rot: CPE; blau: Nuclei. Maximumprojektionen von z-stacks, Balken: 20 μ m. **(C)** Der Zellverlust wurde anhand mikroskopischer Bilder wie in **(A, B)** quantifiziert. Dabei wurde das DAPI Signal für die jeweilige Negativkontrolle (CPE-Y306A/L315A) der verschiedenen Bedingungen jeweils als 100 % Konfluenz - also 0 % Zellverlust - gesetzt. **(D)** Der CPE-induzierte LDH-Ausstrom war nach Vorbehandlung bzw. bei basaler Applikation erhöht. LDH-Ausstrom angegeben als % des maximalen LDH-Ausstroms erzielt durch Zell-Lyse. **C, D** $n \geq 4$. Signifikanzen gegen nicht-vorbehandelte, apikal mit CPE-wt behandelte HT-29/B6-Zellen. t-Test zweiseitig, Bonferroni-Holm Anpassung * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$

3.1.7 HT-29/B6-Zellen aber nicht HT-29-Zellen weisen einen hohen Differenzierungsgrad mit einer intakten TJ-Barriere auf

CellMask™ Deep Red ist ein Membranfarbstoff, der nicht toxisch für lebende Zellen ist. Bereits einfache, rekonstituierte TJ (durch Claudin-Transfektion in endogen Claudin-freien HEK-293-Zellen) stellen eine Diffusions-Barriere gegenüber CellMask™ Deep Red dar (Piontek *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte CellMask™ Deep Red zur Visualisierung der TJ-Integrität endogener TJ in HT-29/B6 und HT-29-Zellen eingesetzt werden.

Nach Markierung/Färbung der Zellmembran von lebenden ausdifferenzierten HT-29/B6-Zellen mit CellMask™ Deep Red, wurde – je nach Seite der Zugabe von CellMask™ Deep Red – ausschließlich eine Färbung der apikalen (Abbildung 3-13, A) bzw. basolateralen Zellmembran (Abbildung 3-13 11, B) detektiert. Anders war dies bei der parentalen Zelllinie HT-29. Sie unterscheidet sich vom Subklon HT-29/B6 durch einen geringeren Differenzierungs- und Polarisierungsgrad und bildet keine dichte transepitheliale Barriere aus (siehe Abbildung 3-10, C). Hier färbte apikal zugegebenes CellMask™ Deep Red nicht ausschließlich die apikale Membran, sondern war zum Teil auch in der lateralen Membran sichtbar (Abbildung 3-13, B). CellMask™ Deep Red eignet sich daher zur Visualisierung und Beurteilung der TJ-Barriere, die (i) die parazelluläre Passage von Molekülen, die mindestens die Größe von CellMask™ (ca. 1-2 kDa¹) bzw. CellMask™-Mizellen (wenige nm Durchmesser²) besitzen (*gate function*) und (ii) die laterale Diffusion von Proteinen und Lipiden entlang der Zellmembran von apikal nach basolateral (*fence function*) verhindert.

3.1.8 Einschränkung des CPE-vermittelten Ca²⁺-Einstrom, der darauffolgenden Vesikel-Abschnürung und Exfoliation von Zellen durch intakte TJ-Barriere

Um nicht nur CPE-induzierte Veränderungen der Zell-Morphologie, sondern auch den Ca²⁺-Einstrom in Lebendzellfärbungen von HT-29/B6 und HT-29-Zellen zu visualisieren, wurde zusätzlich zu einer Membranfärbung mit CellMask™ Deep Red und einer Kernfärbung mit Hoechst 33324 der Ca²⁺-chelatierende Fluorophor Fluo-4 verwendet (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15). Etwa 20 bis 30 Minuten nach apikaler Zugabe von CPE-wt zu HT-29/B6-Zellen, war eine Abschnürung von großen Vesikeln mit erhöhtem intrazellulären Ca²⁺-Niveau und eine Exfoliation einzelne Zellen sichtbar (Abbildung 3-13, C). Diese CPE-vermittelten Effekte waren – ähnlich wie die cCPE-wt Bindung (Abbildung 3-7) und CPE-positiven Läsionen (Abbildung 3-5; Abbildung 3-6) – nur fokal sichtbar. Bei den übrigen Zellen zeigte sich ein Bild, das vergleichbar mit den kontrollbehandelten Zellen (CPE-

¹ Abgeschätzte Größenangabe unter der Annahme, dass es sich bei CellMask™ um ein Lipid (max. ca 1 kDa) und einen AlexaFluor Fluorophor (ca. 1 kDa) handelt.

² typische Größe für eine Mizelle.

Y306A/L315A, Abbildung 3-14, A) war. Weder eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Niveaus noch Veränderungen der Membranfärbung mit CellMask™ oder andere morphologische Veränderungen konnte beobachtet werden.

Effekte nach basaler Zugabe von CPE (Abbildung 3-14, D) waren schneller, stärker und homogener als nach apikaler Zugabe. Bereits 5 Minuten nach Applikation von CPE-wt war in etlichen Zellen ein erhöhtes Ca^{2+} -Niveau zu erkennen. Abschnürungen der apikalen Membran waren etwa ab Minute 7 und eine Exfoliation einzelner Zellen ab Minute 15 zu sehen. Etwa ab Minute 20 begann sich der gesamte Zellrasen abzulösen. Ebenfalls vergleichsweise schnell und etliche Zellen betreffend war der Effekt von CPE-wt auf HT-29-Zellen (geringer Differenzierungsgrad; vgl. auch Abbildung 3-13, B) nach apikaler Zugabe (Abbildung 3-15, B). Bereits 10 min nach Zugabe von 30 nM CPE-wt konnte hier ein Anstieg intrazellulären Ca^{2+} , Membranvesikelabschnürung und Exfoliation einzelner Zellen beobachtet werden. Diese Effekte waren insbesondere dort zu beobachten, wo CellMask™ Deep Red nicht nur apikal, sondern auch lateral detektiert wurde. In Bereichen mit ausschließlich apikalem CellMask™ Deep Red-Signal hingegen waren die CPE-wt-vermittelten Effekte weniger ausgeprägt.

Zusammengenommen konnte in den Lebendzellfärbungen bestätigt werden, dass eine intakte parazelluläre Barriere, wie sie über eine CellMask™ Deep Red Färbung visualisiert werden kann, CPE-vermittelte Effekte bei apikaler Gabe stark einschränkt.

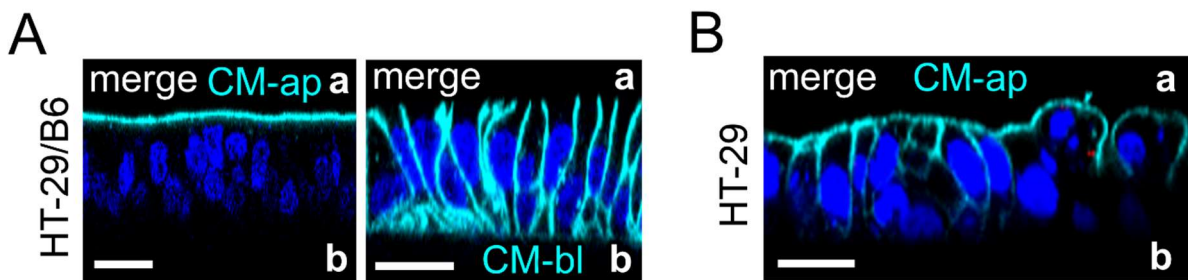


Abbildung 3-13 **HT-29/B6-Zellen nicht aber HT-29-Zellen weisen einen hohen Differenzierungsgrad mit einer intakten TJ-Barriere auf, die über eine CellMask™ Deep Red Membranfärbung visualisiert werden konnte.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen lebender HT-29/B6 (A) und HT-29-Zellen (B), die auf Zellkulturfiltern kultiviert wurden. Die Nuclei wurden mit Hoechst 33324 (blau) gefärbt. CellMask™ Deep Red Membranfärbung (cyan) wurde apikal (CM-ap) oder basal (CM-bl) zugegeben. Bei HT-29/B6-Zellen (A) blieb die Membranfärbung – je nachdem von welcher Seite CellMask™ Deep Red appliziert wurde – beschränkt auf die apikale bzw. basolaterale Membran. Anders war dies bei der parentalen Zelllinie HT-29 (B), die im Unterschied zur Tochterzelllinie HT-29/B6 einen geringen Differenzierungsgrad aufweist. Nach apikaler Zugabe von CellMask™ Deep Red blieb das Signal nicht auf die apikale Membran beschränkt, sondern war z.T. auch lateral sichtbar. So wurden Bereiche visualisiert in welchen eine intakte TJ-Barriere fehlt, die einen freien parazellulären Stoffaustausch und/oder eine laterale Diffusion entlang der Membran einschränkt. a apikale, b basale Seite des Zelllayers; merge: Überlagerung der Hoechst 33324 und CellMask™ Deep Red-Färbung. Balken 20 µm.

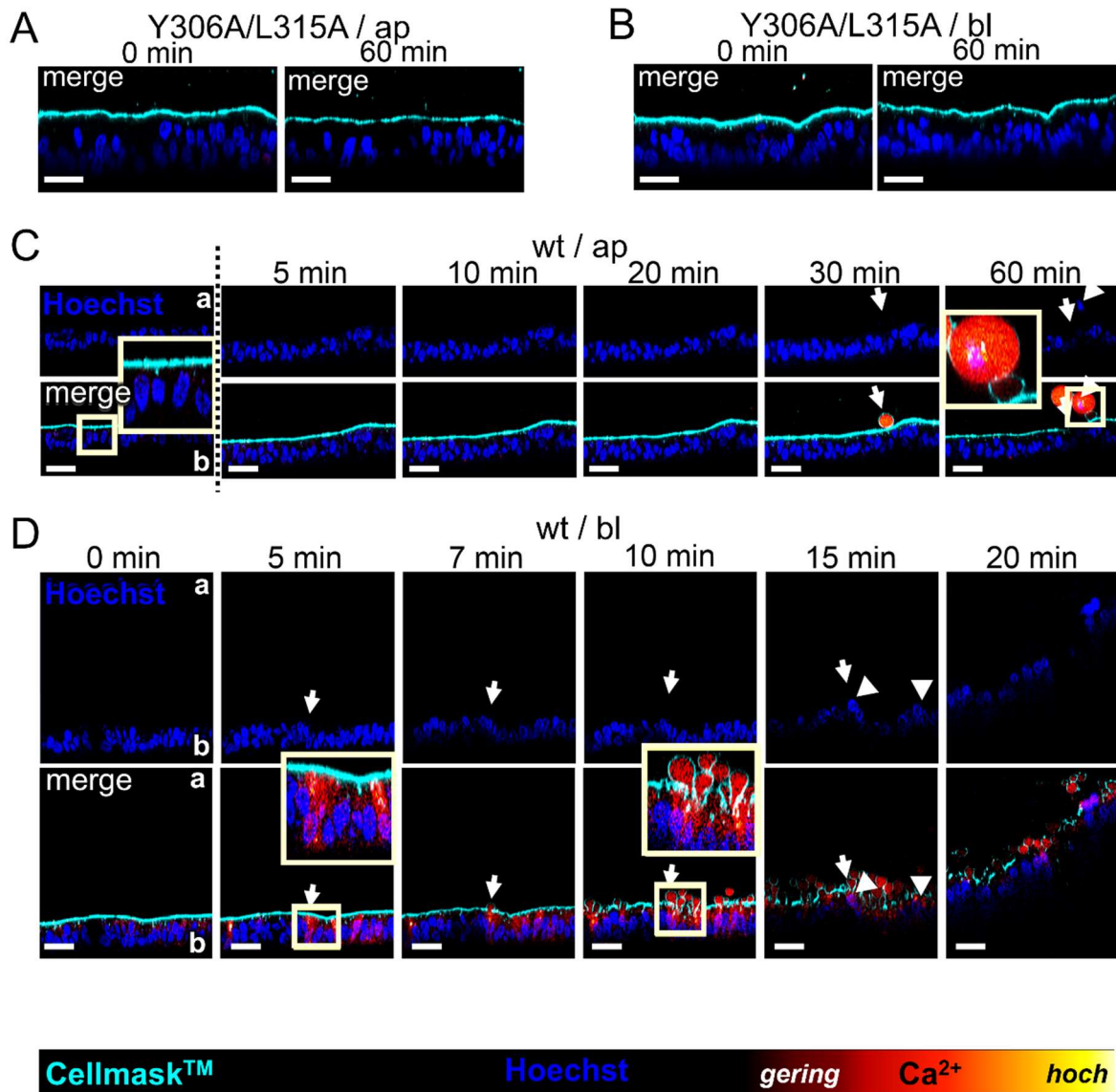


Abbildung 3-14 **Lokale Einschränkung von Ca²⁺-Einstrom, Membranvesikel-Abschnürung und Exfoliation einzelner Zellen bei apikaler CPE-Behandlung von HT-29/B6-Zellen.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen lebender HT-29/B6 die auf Zellkulturfiltern kultiviert wurden. Zur Visualisierung von Änderungen des intrazellulären Ca²⁺-Niveaus wurden die Zellen vor Beginn des Experimentes mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluorophor Fluo-4 beladen. Die Nuclei wurden mit Hoechst 33324 gefärbt und der Membranfarbstoff CellMask™ Deep Red wurde – zur Visualisierung der TJ-Integrität – apikal vor Beginn des Experiments zugegeben.

Die apikale (ap) (A) oder basale (bl) (B) Zugabe von 30 nM CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A, inhibierte Claudinbindung) zeigte keine Effekte. Bei apikaler Gabe von 30 nM CPE-wt (wt) (C) war beginnend mit Minute 30 fokal eine Membranvesikel-abschnürung (weiße Pfeile) und eine Exfoliation einzelner Zellen (weiße Dreiecke) sichtbar. Bei basaler Gabe von CPE-wt (D) war bereits ab Minute 5 ein starker Ca²⁺-Einstrom und eine Membranvesikel-Abschnürung bei etlichen Zellen zu sehen. Bereits 20 min nach CPE-wt Gabe löste sich der gesamte Zellrasen ab. Bei apikaler Gabe von CPE zeigten die Aufnahmen, die vor CPE-Zugabe (0 min) und zu späteren Zeitpunkten gemacht wurden nicht die gleichen Zellen (angedeutet durch gestrichelte Linie), da die Zellkulturfilter für eine Applikation bewegt werden müssen. Ein Ablösen von Zellen erscheint als Bewegung der Zellen zum oberen Bildrand, da im experimentellen Aufbau die apikale Seite der Zellen unten war. a apikale, b basale Seite des Zelllayers; merge: Überlagerung von Hoechst 33324, CellMask™ Deep Red-Färbung und Fluo-4-Signal. Balken: 20 µm.

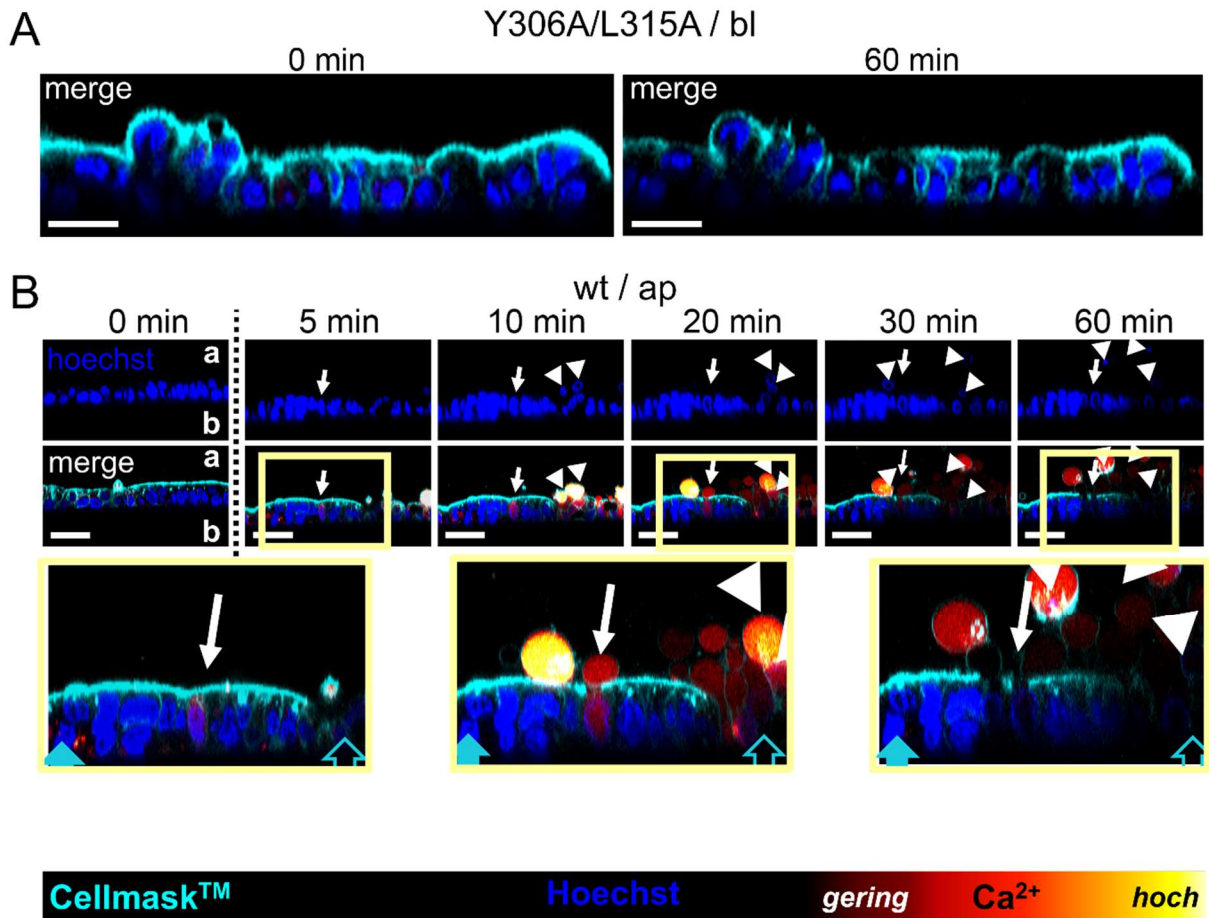


Abbildung 3-15 **Stärkere Ausprägung CPE-vermittelter Effekte auf HT-29-Zellen in Bereichen mit eingeschränkter TJ-Barriere.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen lebender HT-29-Zellen, die auf Zellkulturfiltern kultiviert wurden. Änderungen des intrazellulären Ca²⁺-Niveaus wurden mit Fluo-4 visualisiert und die Nuclei mit Hoechst 33324 gefärbt. Der Membranfarbstoff CellMask™ Deep Red (CM, cyan) wurde – zur Visualisierung der TJ-Integrität – apikal vor Beginn des Experiments zugegeben. **(A)** Die Zugabe von 30 nM CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A, inhibierte Claudinbindung, apikal (ap)) zeigte keine Effekte. **(B)** Nach Gabe von 30 nM CPE-wt (apikal) war bereits ab Minute 10 ein deutlich erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺-Niveau, Membran-Abschnürungen (weißer Pfeil) und die Exfoliation einzelner Zellen (weiße Dreiecke) sichtbar. Die Effekte waren insbesondere dort stark ausgeprägt, wo CellMask™ Deep Red vermehrt in der lateralen Membran vorlag (unausgefüllte Pfeile, cyan). Zellen in Bereichen mit hauptsächlich apikalem CellMask™ Deep Red-Signal (ausgefüllte Pfeile, cyan) blieben morphologisch weitgehend unverändert. Aufnahmen, vor CPE-Zugabe (0 min) und zu späteren Zeitpunkten zeigen nicht die gleichen Zellen (angedeutet durch gestrichelte Linie), da die Zellkulturfilter für eine apikale Applikation bewegt werden müssen. Ein Ablösen von Zellen erscheint als Bewegung der Zellen zum oberen Bildrand, da im experimentellen Aufbau die apikale Seite der Zellen unten ist. a apikale, b basale Seite des Zelllayers; merge: Überlagerung von Hoechst 33324, CellMask™ Deep Red-Färbung und Fluo-4-Signal. Balken: 20 µm.

3.1.9 Verifikation der fokalen Begrenzung der CPE-Sensitivität in primärem humanem Kolon-Gewebe

Nach mukosaler Inkubation von humanem Kolon-Gewebe (Biopsien) mit CPE-wt (1800 nM, 1 h, 37 °C), war eine jeweils fokal begrenzte CPE-Bindung, Schädigung von Enterozyten und ein diskontinuierliches ZO1-Signal sichtbar (Abbildung 3-16). Demgegenüber zeigte der Großteil der Zellen keine CPE-Bindung, ein junktionales ZO1-Signal sowie ein F-Aktin-Signal, das vergleichbar mit dem der Negativkontrolle (CPE-Y306A/L315A) war.

Demnach war die *in vitro* für HT-29/B6-Zellen beobachtete Fokalität der CPE-Wirkung auch in humanem Gewebe zu beobachten.

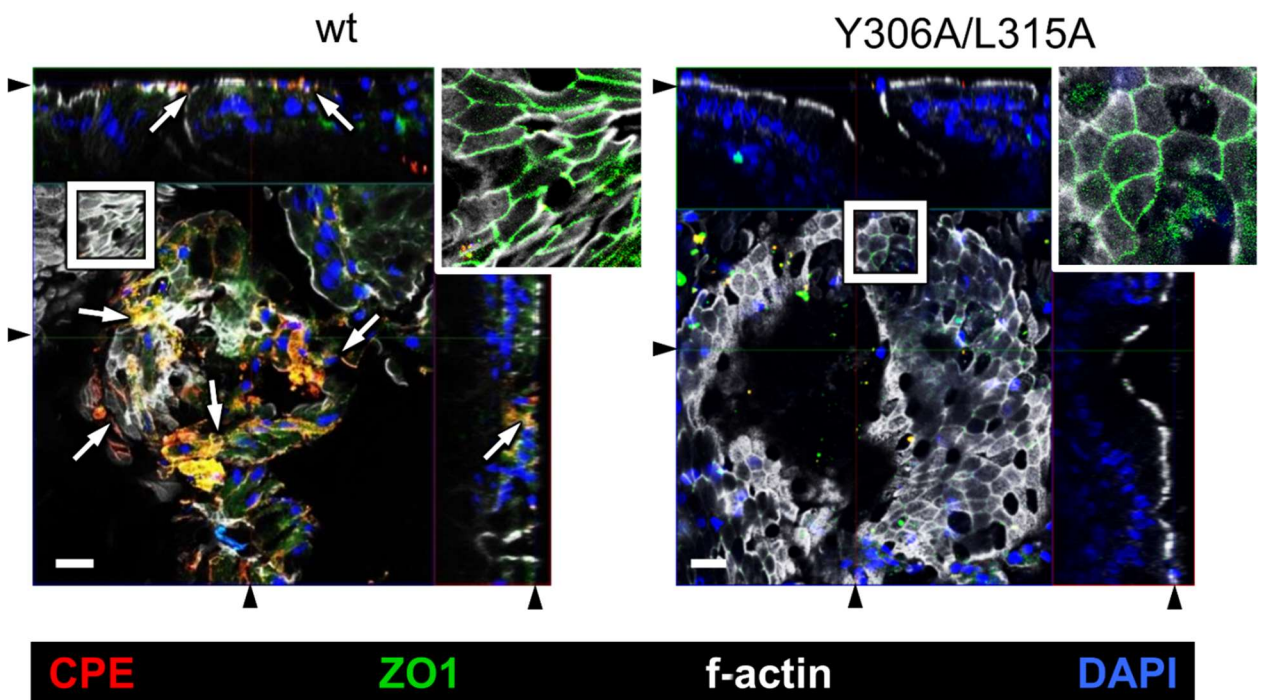


Abbildung 3-16 **Bindung von CPE an natives humanes Kolongewebe.** Nach Inkubation mit CPE-wt (wt, 1800 nM, 1 h, 37 °C) zeigte sich nur bei einer Subpopulation von Enterozyten in nativem humanem Kolon (Biopsien) eine CPE-Bindung. Auch nach Behandlung mit CPE-wt war der Großteil der Zellen CPE-negativ und zeigte ein junktionales ZO1-Signal (vergrößerter Bereich, ZO1-Signal für bessere Darstellung verstärkt). CPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A) wurde als Negativkontrolle verwendet. Weiße Pfeile: Bereiche mit geschädigten Zellen. Hier kolokalisiert CPE verstärkt mit nicht-junktionalem vorliegendem ZO1 (Kokalisation erscheint in der Überlagerung des roten und grünen Kanals gelb). Balken: 20 µm.

3.2 Generierung neuartiger CPE-Varianten für die Therapie Claudin überexprimierender Tumoren

Dass CPE prinzipiell aufgrund seiner claudinspezifisch vermittelten zytotoxischen Wirkung mit Erfolg zur Bekämpfung Claudin überexprimierender Tumoren eingesetzt werden kann, wurde vielfach beschrieben (siehe Abschnitt 1.6.2).

Um zu zeigen, dass CPE für den Angriff von Claudin überexprimierender Tumoren optimiert werden kann indem die claudinspezifische Toxizität dem Claudinprofil verschiedener Tumoren angepasst wird, sollten CPE-Varianten mit veränderter claudinspezifischer Toxizität generiert und *in vitro* auf Tumorzellen getestet werden.

3.2.1 Gezielte Veränderung der Affinität von cCPE für Claudine durch Mutationen in der Bindungstasche

Auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Protze *et al.*, 2015; Veshnyakova *et al.*, 2012b) und einer anderen Studie (Takahashi *et al.*, 2012) aufbauend, wurde die Auswirkung ausgewählter Aminosäuresubstitutionen im Bereich der Bindungstasche von cCPE auf die Affinität für tumorrelevante Claudine im Detail untersucht.

In Bindungssättigungs-Experimenten (Abbildung 3-17, A, exemplarisches Einzelerperiment) wurde die konzentrationsabhängige Bindung an HEK-293-Zellen, die ein definiertes Claudin (Cldn1-FLAG, Cldn3-, -4-, -5-, -6-YFP oder Cldn4-GFP) exprimieren, gemessen und daraus K_d als die cCPE-Konzentration bei halbmaximaler Bindung bestimmt (Abbildung 3-17, A, B).

Die Werte, die für die Interaktion von cCPE-wt mit den Rezeptorclaudinen Cldn3, -4 und -6 ermittelt wurden (K_d : $13,7 \pm 2,9$, $11,4 \pm 1,9$ und $12,6 \pm 2,1$, Abbildung 3-17, B) stimmen mit publizierten Werten für Vollängen-CPE (Fujita *et al.*, 2000; Katahira *et al.*, 1997b; Sonoda *et al.*, 1999) überein (vgl. Tabelle 1-1).

Die Affinität für das Nicht-Rezeptorclaudin Cldn1 (cCPE-wt-Cldn1 K_d : 304 ± 126 nM), wird durch die Mutation S305P/S307R/S313H etwa um das 30-Fache erhöht (cCPE-S305P/S307R/S313H-Cldn1 K_d : $10,4 \pm 2,3$ nM). Die Bindung von cCPE-wt an Cldn5-exprimierende Zellen war zu schwach, um eine definierte K_d zu bestimmen. Denn ein Plateau maximaler Bindung (Bindungssättigung), wie es zur Bestimmung der K_d als Konzentration halbmaximaler Bindung nötig wäre, konnte trotz vergleichsweise hoher cCPE-wt Konzentrationen nicht erzielt werden (bedingt durch die Konzentration der cCPE-wt Präparationen war die maximal eingesetzte cCPE-Konzentration 4600 nM). Davon ausgehend, dass die maximal erzielte Bindung jeweils gerade eben in der Sättigung liegt, konnte allerdings abgeschätzt werden, dass cCPE-wt-Cldn5 $K_d \gg 1000$ nM ist.

Die Mutation Y306W/S313H in cCPE erlaubt eine Bindung an das Nicht-Rezeptorclaudin Cldn5, deren Affinität mit einer K_d von $24,1 \pm 6,7$ nM in derselben Größenordnung liegt wie

die der Interaktion von CPE-wt mit seinen Claudin-Rezeptoren (Abbildung 3-17, B). Die Affinitäten von cCPE-Y306W/S313H für die anderen getesteten Claudine (Cldn1, -3, -4) blieb im Vergleich zum cCPE- wt nahezu unverändert.

Die Mutation L254A/S256A/I258A/D284A in cCPE führte zu einer selektiv für das Rezeptorclaudin Cldn3 erniedrigten Affinität. Die K_d für die Interaktion von cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A und Cldn3 beträgt 226 ± 59 nM, wohingegen die Affinität für das Rezeptor Claudin Cldn4 mit $9,4 \pm 1,7$ nM ähnlich hoch ist wie die von CPE-wt (Abbildung 3-17, B).

Alternativ zu den Bindungssättigungs-Experimenten (Abbildung 3-17, A, B) wurde exemplarisch für die Interaktion von cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A mit Cldn3, -4 die K_d auch über ein kinetisches Experiment bestimmt (Abbildung 3-17, C). Die hier ermittelten Werte lagen mit 110 ± 23 (Cldn3) und $2,8 \pm 0,7$ (Cldn4) nM etwa in der gleichen Größenordnung wie die in den Bindungssättigungs-Experimenten ermittelten.

Die K_d -Bestimmungen zeigen in quantitativer Weise, dass durch Mutationen innerhalb der Claudin-Bindungstasche von cCPE die Affinität der CPE-Claudin-Interaktion gezielt beeinflusst werden kann. Es konnten Mutationen identifiziert werden, die eine Bindung an die Nicht-Rezeptorclaudine Cldn1 und -5 ermöglichen (Y306W/S313H, S305P/S307R/S313H) sowie eine Mutation (L254A/S256A/I258A/D284A), die zu einer präferenziellen Bindung des Rezeptorclaudins Cldn4 gegenüber -3 führt.

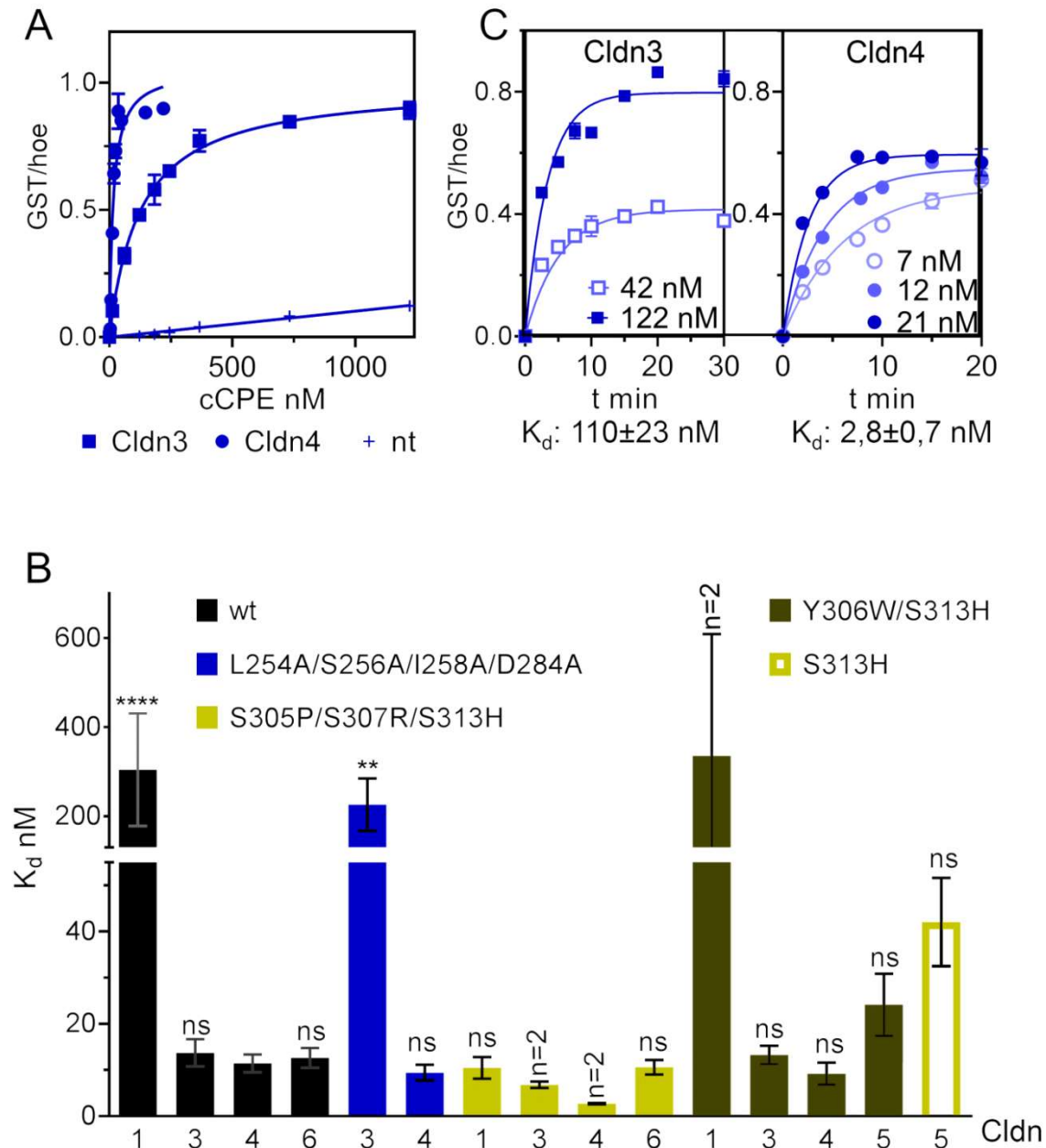


Abbildung 3-17 **Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) verschiedener cCPE-Varianten für die Rezeptorclaudine 3, 4 und 6 sowie die Nicht-Rezeptorclaudine 1 und 5.** Cldn1-FLAG- (Cldn1), Cldn3-YFP- (Cldn3), B, Cldn4-GFP- (Cldn4) und C, Cldn5-YFP(Cldn5)-exprimierende sowie native, nicht-transfizierte, Claudin-freie HEK-293-Zellen (nt) wurden 30 min (Bindungs-Sättigungsexperimente (A, B)) bzw. für die angegebenen Zeiten (Assoziations-Kinetik (C)) mit variablen Konzentrationen der cCPE-Varianten (GST-Fusionsprotein; wt, L254A/S256A/I258A/D284A, Y306W/S313H, S305P/S307R/S313H, S313H) inkubiert. Die cCPE-Bindung wurde mit einem R-Phycoerythrin gekoppelten anti-GST Antikörper detektiert und – über eine Kern-Färbung mit Hoechst 33342 – auf die Zellzahl normiert (GST/hoec) (Details s. Abschnitt 2.4.7). (A) Exemplarisches Bindungs-Sättigungsexperiment (Inkubationszeit: 30 min) zur Ermittlung der K_d für die Interaktion von Cldn3 und -4 mit cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A. Von den Bindungsdaten (Doppelbestimmung) wurde die unspezifische Bindung – bestimmt über die Bindung an native, Claudin-freie HEK-293-Zellen (nt, linearer Verlauf) – abgezogen. Die K_d wurde dann über die cCPE-Konzentration bei halbmaximaler Bindung ermittelt. (B) Mittelwerte der so (A) bestimmten K_d für die Interaktion der verschiedenen cCPE-Varianten und Claudine. Anzahl der Experimente ≥ 3 , für Cldn1 und cCPE-Y306W/S313H, Cldn3, -4, -6 und cCPE-S305P/S307R/S313H =2. Statistische Signifikanz: One-Way ANOVA gegen cCPE-wt

Bindung an HEK-293-Zellen, die das typische Rezeptorclaudin Cldn4 exprimieren. Bonferroni-Holm-Anpassung. Werte die nur in zwei Experimenten bestimmt wurden, wurden statistisch nicht ausgewertet. (C) Alternativ zum Bindungs-Sättigungsexperiment wurde exemplarisch auch in einem kinetischen Experiment die K_d für die Interaktion von cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A mit Cldn3 und -4 bestimmt. Hierzu wurde die Bindung von cCPE an Cldn3- bzw -4-exprimierende HEK-293-Zellen über die Zeit für zwei oder mehr cCPE-Konzentrationen gemessen (Doppelbestimmung).

3.2.2 Veränderung der Claudin-Bindungseigenschaften von CPE ermöglicht gezielte Beeinflussung der CPE-vermittelten Zytotoxizität

Es sollten Varianten von Volllängen-CPE identifiziert werden, die über eine für die Tumor-Anwendung optimierte Claudin-subtypspezifische Zytotoxizität verfügen.

Dazu wurden Mutationen, die zu einer Veränderung der Claudin-subtypspezifischen Bindung von cCPE führten (s. Abbildung 3-17), in Volllängen-CPE eingeführt, die Proteine rekombinant exprimiert (Abbildung 8-1) und aufgereinigt (Abbildung 8-2) oder alternativ durch Expression in Claudin-freien Melanomzellen gewonnen (vgl. Abschnitt 3.2.4). Die verschiedenen CPE-Varianten wurden dann im Hinblick auf ihre claudinspezifische Zytotoxizität analysiert. Hierzu wurden endogen Claudin-freie HEK-293-Zellen verwendet (Piontek *et al.*, 2008), die jeweils mit einem Claudin (Rezeptorclaudine 3, -4, oder -6 oder aber Nicht-Rezeptorclaudin 1 oder -5) transfiziert wurden.

3.2.2.1 CPE-Varianten induzieren einen Claudin-subtypspezifischen Ca^{2+} -Einstrom

Ein – wenn nicht der – entscheidende Schritt bei der CPE-vermittelten Zytotoxizität ist der Einstrom von Ca^{2+} durch die CPE-Pore (Chakrabarti und McClane, 2005). Um die Claudin-Subtypspezifität der verschiedenen Volllängen-CPE-Varianten zu untersuchen, wurde daher mittels Fura-2 der durch CPE-wt und Varianten davon induzierte Ca^{2+} -Einstrom in HEK-293-Zellen gemessen, die die Rezeptorclaudine Cldn3, bzw. -4 sowie das Nicht-Rezeptorclaudin Cldn5 exprimieren (Abbildung 3-18):

Während CPE-wt bereits ab Konzentrationen von 1 nM (ca. 0,04 $\mu\text{g/ml}$) einen Ca^{2+} -Einstrom in Cldn3- und -4-exprimierende HEK-293-Zellen induziert, war auch beim Einsatz von 100 nM (ca. 4 $\mu\text{g/ml}$) kein CPE-wt-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Cldn5-exprimierende Zellen zu messen. Anders verhielt sich dies bei den CPE-Varianten mit den Aminosäuresubstitutionen S305P/S307R/S313H und Y306W/S313H. Hier wurde durch CPE-Konzentrationen > 50 nM (ca. 2 $\mu\text{g/ml}$) ein deutlicher Ca^{2+} -Einstrom in Cldn5-exprimierende Zellen induziert. Der durch CPE-S305P/S307R/S313H induzierte Ca^{2+} -Einstrom in Cldn3 und -4-exprimierende Zellen war im Vergleich zum CPE-wt induzierten Ca^{2+} -Einstrom nicht reduziert. Anders für die Variante CPE-Y306W/S313H: Bei den getesteten Konzentrationen (bis 10 nM bzw. 5 nM) konnte für Cldn3-exprimierende Zellen

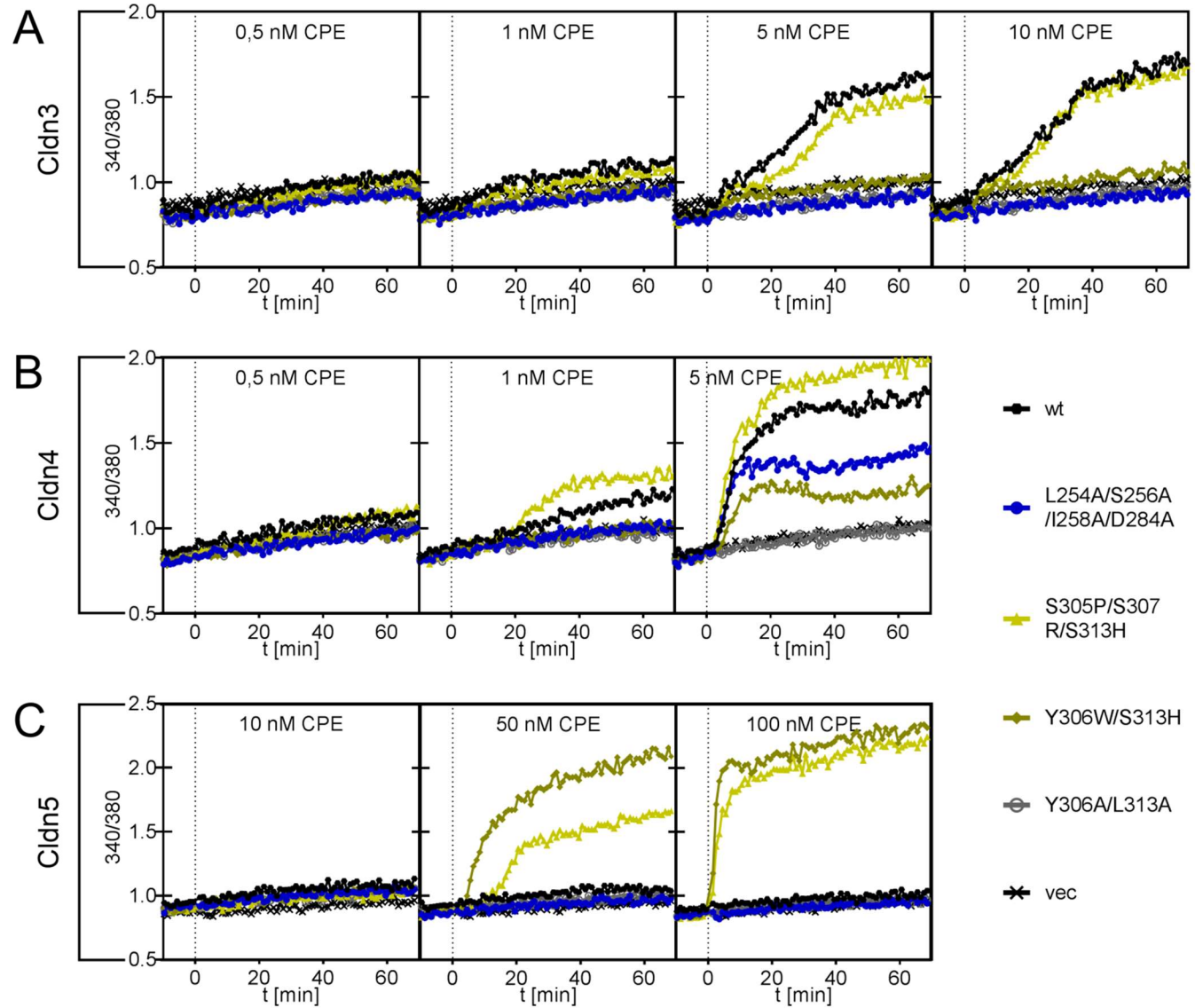
kein und für Cldn4-exprimierende Zellen ein im Vergleich zu CPE-wt nur geringer Ca^{2+} -Einstrom gemessen werden.

Die Mutation Y306A/L313A inhibiert die Bindung von cCPE an Claudine (Protze *et al.*, 2015). Die entsprechende Vollängen-CPE-Variante CPE-Y306A/L315A induzierte bei keiner der getesteten Konzentrationen / Zellen einen Ca^{2+} -Einstrom.

Die Mutation L254A/S256A/I258A/D284A, die die Cldn3-Bindung jedoch nicht die Cldn4-Bindung in cCPE inhibiert (Abbildung 3-17), führte zu einer CPE-Variante, die bei den getesteten Konzentrationen zu keinem Ca^{2+} -Einstrom in Cldn3-, aber zu einem in Cldn4-exprimierende Zellen führte.

Es konnte gezeigt werden, dass Vollängen-CPE-Varianten mit Mutationen, die in cCPE zu einer Veränderung der claudinspezifischen Affinität führten, einen Claudin-subtypspezifischen Ca^{2+} -Einstrom induzieren.

Abbildung 3-18 **Ca²⁺-Einstrom in Cldn3-YFP- (Cldn3), Cldn4-FLAG- (Cldn4) und Cldn5-YFP(Cldn5)-exprimierende HEK-293-Zellen.** (A) Cldn3-YFP- (Cldn3), (B) Cldn4-FLAG- (Cldn4) und (C) Cldn5-YFP- (Cldn5)-exprimierende HEK-293-Zellen wurden mit variablen Konzentrationen (0,5 bis 100 nM) unterschiedlicher CPE-Varianten inkubiert. Der CPE-vermittelte Ca²⁺-Einstrom wurde mittels des Ca²⁺-chelatierenden Fluorophores Fura-2 gemessen. Das Verhältnis der Emission bei 510 nm nach Anregung bei 340 und 380 nm (340/380) spiegelt das intrazelluläre Ca²⁺-Niveau wieder. Zum Zeitpunkt 0 min erfolgte die Zugabe der CPE-Varianten in den angegebenen Konzentrationen bzw. einer Präparation des Vektors (vec, Details s. Abschnitt 2.4.4). Als zusätzliche Negativkontrolle diente cCPE-Y306A/L315A (Y306A/L315A), mit stark inhibierter Claudinbindung. Daten eines repräsentativen Experimentes (n=2).



3.2.2.2 Claudin-subtypspezifische Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten

In MTT-Assays wurde über eine Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität die Konzentration des halbmaximalen toxischen Effektes (EC_{50}) der CPE-Varianten für HEK-293-Zellen bestimmt, welche die Rezeptorclaudine Cldn3 oder -4, (Abbildung 3-19, A, B) oder aber Nicht-Rezeptorclaudin Cldn5 (Abbildung 3-19, C) exprimieren.

Für einige CPE-Varianten bzw. Kombinationen aus CPE-Varianten und exprimiertem Claudin war nur bei sehr hohen CPE-Konzentrationen ein toxischer Effekt erkennbar. Da hier der maximale zytotoxische Effekt nicht eindeutig über das Erreichen einer Sättigung zu ermitteln war, konnte der EC_{50} nur näherungsweise berechnet werden. Dazu wurde angenommen, dass der maximal erzielbare zytotoxische Effekt charakteristisch für die jeweilige Zelllinie ist (s. Fußnote zu Abbildung 3-19).

CPE-Y306A/L315A (inhibierte Claudinbindung (Protze *et al.*, 2015)) zeigte über einen weiten Konzentrationsbereich keinen toxischen Effekt auf die getesteten Claudin exprimierende HEK-293-Zellen. Nur bei hohen Konzentrationen von CPE-Y306A/L315A (> 100 nM) konnten toxische Effekte (Abbildung 3-19, A, B) detektiert werden.

HEK-293-Zellen, die Nicht-Rezeptorclaudin Cldn5 exprimieren, waren auch bei sehr hohen Konzentrationen (bis 2120 nM) nicht sensitiv gegenüber CPE-wt. Es konnte abgeschätzt³ werden, dass EC_{50} mindestens 17000 nM betragen muss. Nach Einführen der Mutationen S305P/S307R/S313H und Y306W/S313H konnte bereits mit geringen CPE-Konzentrationen ein toxischer Effekt auf diese Cldn5-exprimierenden Zellen erzielt werden (EC_{50} S305P/S307R/S313H :44,4 -7,5/+8,8 nM, Y306W/S313H: 33,6 -7,5/+9,6 nM). Während CPE-S305P/S307R/S313H weder auf Cldn3- noch auf Cldn4-exprimierende HEK-293-Zellen einen geringeren zytotoxischen Effekt als der Wildtyp hatte, zeigte CPE-Y306W/S313H eine tendenziell reduzierte Zytotoxizität auf diese Zellen.

Mutation L254A/S256A/I258A/D284A, die die Cldn3- aber nicht die Cldn4-Bindung in cCPE inhibierte (Abbildung 3-17), führte zu einer starken Inhibierung des toxischen Effekts auf HEK-293-Zellen, die das Rezeptorclaudin Cldn3 exprimieren. EC_{50} von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A für Cldn3-exprimierende HEK-293-Zellen lag mit 364 -98/+133 nM etwa dreihundertdreißigmal höher als von CPE-wt (1,08 -0,32/+0,46 nM). Auf Cldn4-exprimierende Zellen hingegen war der toxische Effekt durch Mutation L254A/S256A/I258A/D284A kaum reduziert. EC_{50} war hier mit 1,94 -0,57/+0,79 nM nur etwa 3,5-mal höher als für den Wildtyp (0,54 -0,15/+0,22 nM).

³ Hierzu wurde angenommen, dass: (i) mit höheren CPE-Konzentrationen kann auch hier ein toxischer Effekt, mit zelltypspezifischem Maximum erzielt werden. (ii) die höchste eingesetzte Konzentration 2120 nM ist die höchste CPE-Konzentration ohne toxischen Effekt. Die Abschätzung erfolgte dann mit GraphPad Prism 6 – analog zur Ermittlung der EC_{50} -Werte nach dem Modell *log(agonist) vs. response*.

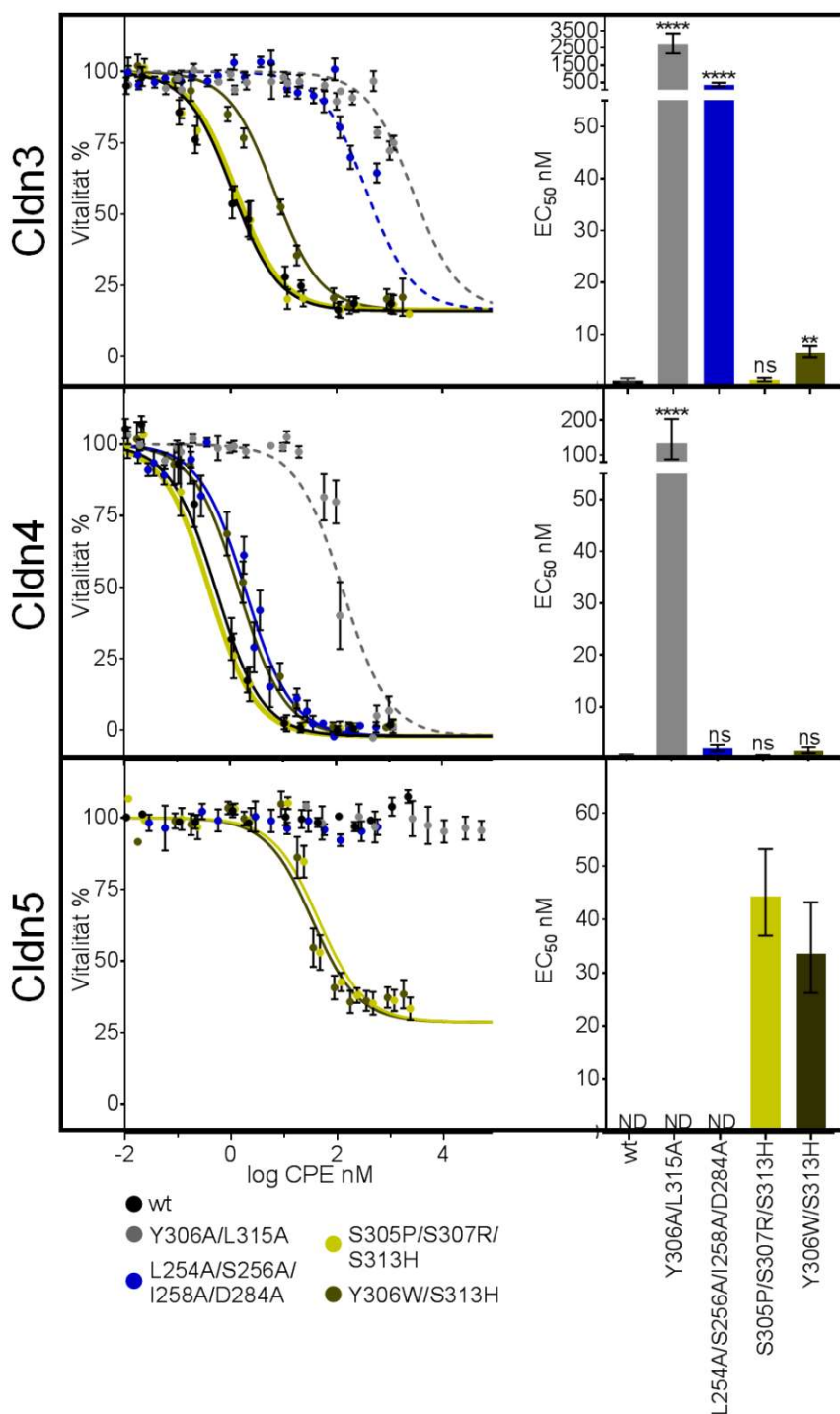


Abbildung 3-19
claudinspezifische Toxizität verschiedener CPE-Varianten. (A) Cldn3-YFP-(Cldn3), (B) Cldn4-FLAG-(Cldn4) und (C) Cldn5-YFP-(Cldn5)-exprimierende HEK-293-Zellen wurden mit variablen Konzentrationen (0,01 bis maximal 51050 nM) von CPE-Varianten (wt, Y306A/L315A, L254A/S256A/I258A/D284A, S305P/S307R/S313H, Y306W/S313H) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde in MTT-Assays die Vitalität ermittelt (links) und daraus EC_{50} -Werte bestimmt (rechte Seite). Details s. Abschnitt 2.4.8). Mittelwerte der $\log EC_{50}$ -Werte wurden statistisch ausgewertet (One-way ANOVA, Bonferroni Anpassung jeweils gegen $\log EC_{50}$ für CPE-wt bei der entsprechenden Zelllinie) und für die graphische Darstellung in EC_{50} -Werte transformiert. Dosis-Wirkungskurven wurden in GraphPad Prism 6 dem Modell $\log(\text{agonist})$ vs. response und dem ermittelten EC_{50} folgend geplottet. Teilweise war aufgrund geringer Toxizität (Kurven links jeweils gestrichelt) nur eine näherungsweise⁴ Ermittlung des EC_{50} möglich. $n \geq 5$, ns = nicht signifikant verschieden, ** = $p \leq 0,01$, **** = $p \leq 0,0001$. ND = nicht bestimmt, da keine Toxizität detektierbar.

⁴ Um EC_{50} zu bestimmen, ist das Erreichen eines Plateaus maximal toxischen Effektes nötig, was in diesen Fällen nicht gegeben war. Um dennoch näherungsweise EC_{50} zu bestimmen, wurde jeweils angenommen, dass auch mit den fraglichen CPE-Varianten ein toxischer Effekt mit zelllinientypischem Maximum erzielt werden könnte, wenn die CPE-Konzentration entsprechend gesteigert würde. Die Abschätzung von EC_{50} erfolgte dann ebenfalls mit GraphPad Prism 6 unter Nutzung des Modells $\log(\text{agonist})$ vs. response .

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich über Mutationen in der Claudin-Bindungstasche der C-terminalen Domäne von CPE die Claudin-subtypspezifische Zytotoxizität gezielt verändern lässt. Es konnten CPE-Varianten (Y306W/S313H, S305P/S307R/S313H) generiert werden, deren zytotoxische Wirkung auch über die Nicht-Rezeptorclaudine 1 und -5 vermittelt wird sowie eine Variante (L254A/S256A/I258A/D284A), deren zytotoxische Wirkung präferenziell über das Rezeptorclaudin Cldn4 aber nicht über das Rezeptorclaudin Cldn3 vermittelt wird.

3.2.3 Relative Affinität ($relK_d$) und Toxizität ($relEC_{50}$)

Um den Einfluss von Mutationen auf die ermittelte Affinität und Toxizität zu vergleichen, wurden für die verschiedenen cCPE/Cldn- bzw. CPE/Cldn-Kombinationen relative Werte für K_d bzw. EC_{50} berechnet. Hierzu wurde jeweils auf entsprechende Werte für den Wildtyp⁵ normiert ($relK_d = K_d/K_d^{wt}$; $relEC_{50} = EC_{50}/EC_{50}^{wt}$, Abbildung 3-20).

Auch wenn wie bei cCPE-L254A/L256A/L258A/D284A / Cldn4, cCPE-Y306W/S313H / Cldn3 und -4 die ermittelten Affinitäten mit der von cCPE-wt vergleichbar waren ($relK_d \approx 1$), reduzierte die entsprechende Mutation in CPE die Toxizität ($relEC_{50} > 1$).

Insgesamt hatten Mutationen meist deutlichere Effekte auf die für CPE bestimmte Toxizität als auf die für cCPE bestimmte Bindungsaffinität ($relEC_{50} \neq relK_d$).

⁵ Cldn5 fehlt in dieser Betrachtung, da für die Kombination cCPE bzw. CPE-wt/Cldn5 nur grob abgeschätzte Werte als Referenz vorlagen.

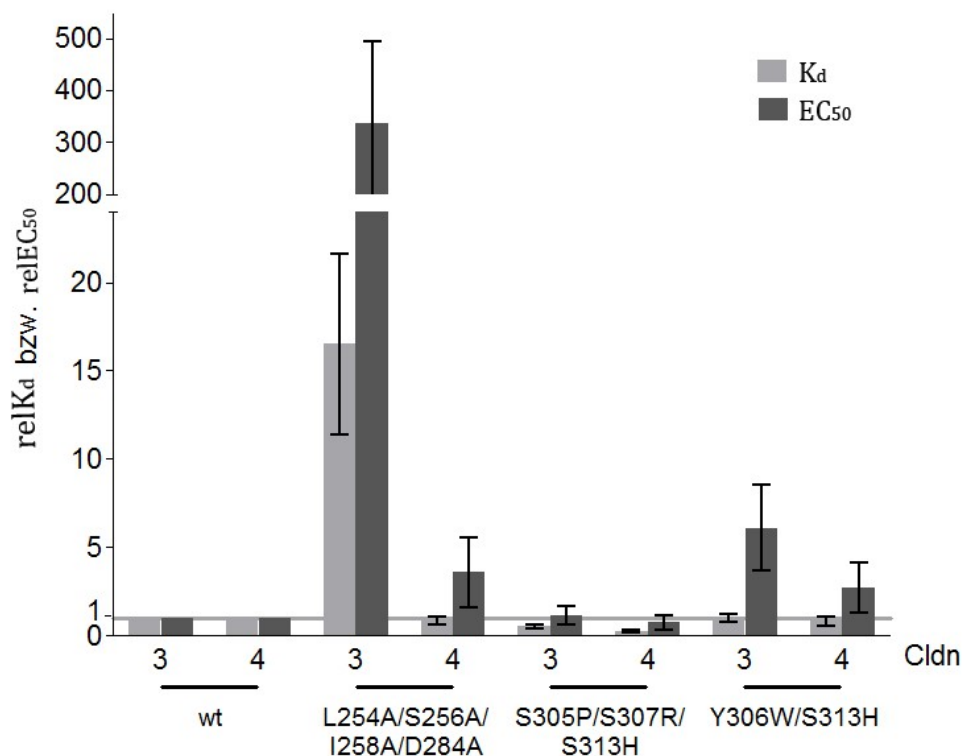


Abbildung 3-20 **Einfluss von Mutationen auf die für cCPE ermittelten Affinitäten (K_d) und für CPE ermittelten Toxizitäten (EC_{50}) im Vergleich.** Die experimentell für K_d und EC_{50} ermittelten Daten (s. auch Abbildung 3-17, Abbildung 3-19 und auch Anhang 8.3) wurden jeweils auf die für den Wildtyp erhaltenen Werte normiert ($relK_d = K_d/K_d^{wt}$ bzw. $relEC_{50} = EC_{50}/EC_{50}^{wt}$). Für die Berechnung der Fehler s. Abschnitt 2.6 . $n \geq 3$; außer K_d cCPE-S305P/S307R/S313H $n = 2$

3.2.4 Verwendung von CPE-Varianten aus eukaryotischer Expression

Abgesehen von einer Applikation rekombinanten CPEs, konnte die Wirksamkeit einer Suizidgentherapie mit CPE auf Claudin exprimierenden Tumoren gezeigt werden (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012). Der Vorteil hierbei ist, dass bereits nach nur einmaliger Transfektion CPE direkt in den Zellen am Wirkort exprimiert wird und so konstant über einen längeren Zeitraum wirken kann (vgl. Abschnitt 1.6.2).

Um zu überprüfen, ob die neuartigen CPE-Varianten auch für die Strategie der Suizidgentherapie zum Einsatz kommen könnten, wurden die Claudin-subtypspezifische Zytotoxizität ausgewählter CPE-Varianten aus eukaryotischer Expression (optCPE) exemplarisch getestet (Abbildung 3-21). Claudin-freie SK-MEL-5-Zellen (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012) wurden mit optCPE-wt und Varianten davon transfiziert und die Zytotoxizität des aus Zelllysaten erhaltenen optCPEs auf Cldn3- bzw. -4-exprimierende HEK-293-Zellen getestet. Während optCPE-wt auf Cldn3- und Cldn4-exprimierende Zellen einen deutlichen toxischen Effekt zeigt, reduziert optCPE-Y306A/L315A (Inhibition der Cldn Bindung, vgl. auch Abschnitte 1.4.1 und 3.2.2.2) die Vitalität der Zellen nicht. Die Mutation

L254A/S256A/I258A/D284A, die spezifisch die Bindung von cCPE an Cldn3 nicht aber Cldn4 inhibierte (Abbildung 3-17) (Veshnyakova *et al.*, 2012b)), führt in optCPE zu einer Variante die einen toxischen Effekt auf Cldn4- nicht aber Cldn3-exprimierende Zellen hat. Demnach zeigen auch aus eukaryotischer Expression erhaltene CPE-Varianten eine Claudin-subtypspezifische Zytotoxizität und eignen sich daher für die Strategie der Suzidgentherapie.

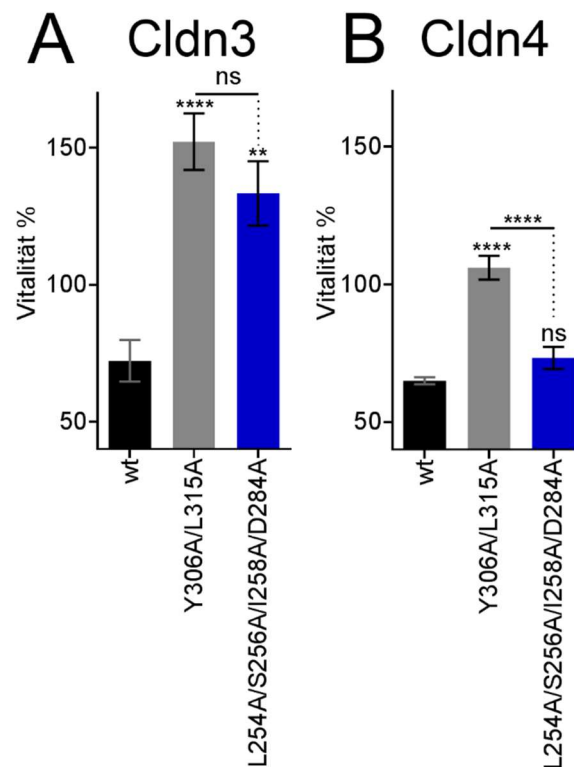


Abbildung 3-21 **Claudinspezifische Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten (optCPE) aus eukaryotischer Expression.** (A) Cldn3-YFP- (Cldn3), (B) Cldn4-GFP- (Cldn4)-exprimierende HEK-293-Zellen wurden für 72 h mit 0,85 nM (30 ng/ml) unterschiedlicher CPE-Varianten (wt, Y306A/L315A, L254A/S256A/I258A/D284A) aus eukaryotischer Expression (Zellysate von SK-MEL-5-Zellen, transfiziert mit optCPE-Varianten) inkubiert. Anschließend wurde mittels MTT-Assays die Vitalität (angegeben als % bezogen auf die Kontrollpräparation aus untransfizierten SK-MEL-5-Zellen) bestimmt. $n \geq 5$. One-way ANOVA, Bonferroni-Holm Anpassung, statistische Signifikanz jeweils getestet gegen den wt oder wie angegeben. ns = nicht signifikant verschieden, ** = $p \leq 0,01$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.2.5 Toxizität neuartiger CPE-Varianten auf Karzinomzellen

Die Toxizitäten der verschiedenen CPE-Varianten auf humane Kolon- (HT-29, HT-29/B6, LoVo, LS-174T, SW480, SW620, WiDr), Mamma- (MCF-7), Thyroid- (K1) Karzinomzelllinien mit stark unterschiedlichen Claudin-Expressionsprofilen (Vorarbeiten vgl. Anhang Abbildung 8-5) wurden mittels MTT-Assay untersucht (Abbildung 3-22,

Abbildung 3-23). So sollten die CPE-Varianten im Hinblick auf ihr Potential bei der Therapie Claudin exprimierender Tumoren untersucht werden und getestet werden, in wie fern unterschiedliche CPE-Varianten eine zelltypspezifische Zytotoxizität auf unterschiedliche Karzinomzelllinien ausüben können.

3.2.5.1 CPE-Toxizität auf Rezeptorclaudin exprimierende Zelllinien

Alle getesteten Zelllinien, die eines oder mehrere Rezeptorclaudine (Cldn3, -4, 7, -8) exprimieren (LoVo, LS174, MCF7, SW480, SW620, WiDr, HT-29, HT-29/B6; Anhang Abbildung 8-5), waren hochsensitiv gegenüber CPE-wt (Abbildung 3-22). Die Konzentration des halbmaximalen zytotoxischen Effekts (EC_{50}) lag für alle diese Zelllinien in der gleichen Größenordnung und betrug im Mittel 2,1 nM, wobei LS174T-Zellen (Abbildung 3-22, B) mit einem EC_{50} von 0,804 -0,069/+0,075 nM am sensitivsten, MCF7-Zellen (Abbildung 3-22, C) mit einem EC_{50} von 4,60 -0,65/+0,76 nM am insensitivesten waren.

Die Toxizität von CPE-S305P/S307R/S313H für die Rezeptorclaudin exprimierenden Zelllinien war im Vergleich zum Wildtyp-Toxin jeweils weitgehend unverändert oder geringfügig reduziert.

Verglichen mit CPE-wt zeigten die Varianten CPE-Y306W/S313H und CPE-L254A/S256A/I258A/D284A eine geringere Toxizität für alle getesteten Zelllinien. Besonders schwach ausgeprägt war dies bei der Zelllinie LS174T (Abbildung 3-22, B). Hier betrug die EC_{50} von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A und CPE-Y306W/S313H mit 3,03 - 0,49/+0,59 und 3,35 -0,43/+0,49 nM jeweils etwa das 4-Fache der EC_{50} von CPE-wt. Besonders stark ausgeprägt war dies für CPE-L254A/S256A/I258A/D284A bei den Zelllinien SW480 (Abbildung 3-22, D) bzw. SW620 (Abbildung 3-22, E) – hier betrug die EC_{50} das etwa 20- (SW480) bzw. 8-Fache (SW60) der EC_{50} für CPE-wt.

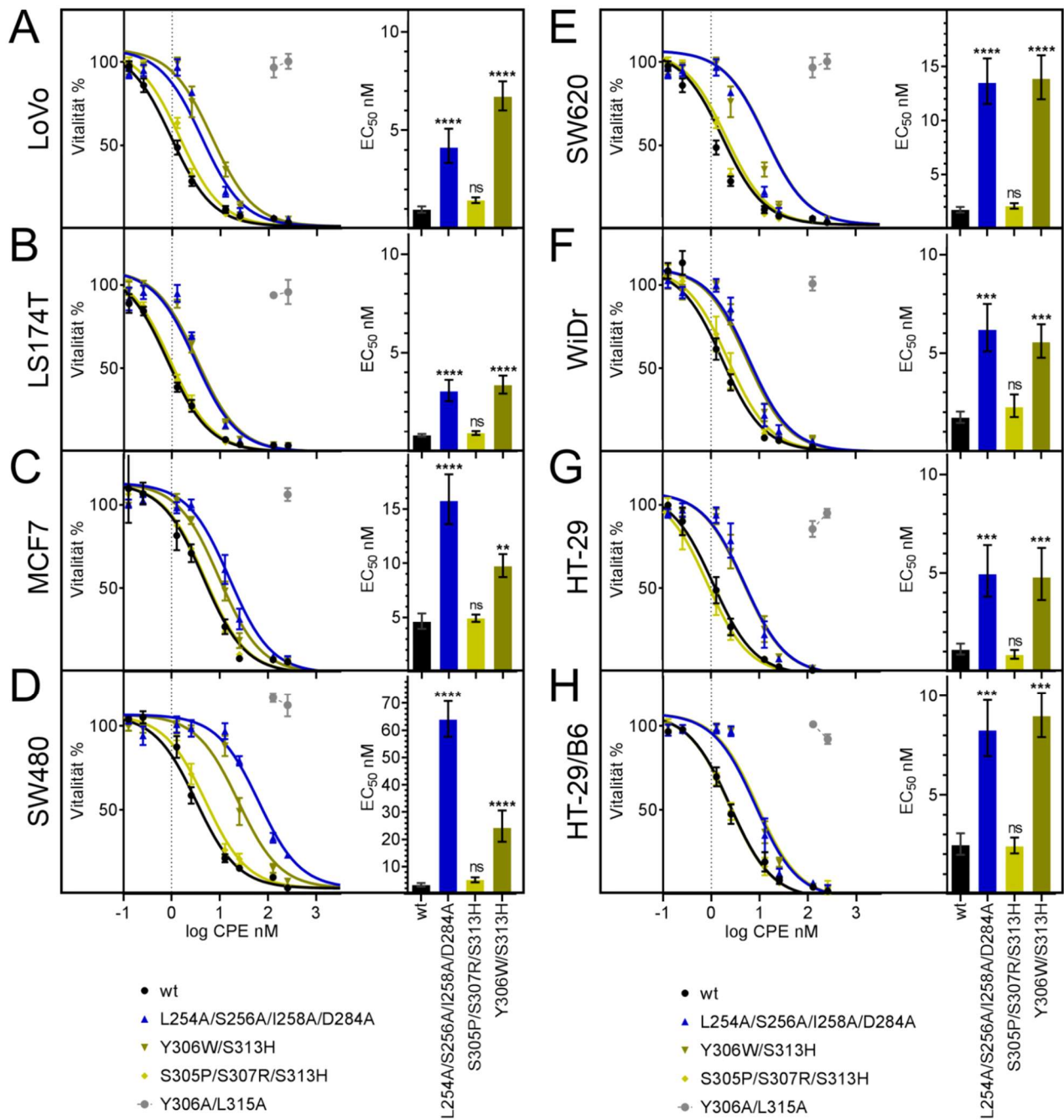


Abbildung 3-22 **Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten auf Rezeptorclaudin exprimierende Karzinomzellen.** LoVo (A), LS174 (B), MCF7 (C), SW480 (D), SW620 (E), WiDr (F), HT-29 (G), HT-29/B6 (H) wurden mit variablen Konzentrationen (0,13 bis maximal 255 nM) unterschiedlicher CPE-Varianten (CPE-wt, -Y306A/L315A, -L254A/S256A/I258A/D284A, -S305P/S307R/S313H, -Y306W/S313H) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität in MTT-Assays bestimmt (links). Aus diesen Daten wurden EC_{50} -Werte als CPE-Dosis mit halbmaximaler Toxizität ermittelt (rechte Seite), (vgl. Abschnitt 2.4.8). Mittelwerte der $\log EC_{50}$ -Werte wurden statistisch ausgewertet (One-way ANOVA, Bonferroni Anpassung jeweils gegen $\log EC_{50}$ für CPE-wt bei der entsprechenden Zelllinie) und für die graphische Darstellung in EC_{50} -Werte transformiert. Dosis-Wirkungskurven wurden in GraphPad Prism 6 dem Modell $\log(\text{agonist})$ vs. response und dem ermittelten EC_{50} - folgend geplottet. $n \geq 5$. ns = nicht signifikant verschieden, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.2.5.2 CPE-Toxizität auf Nicht-Rezeptorclaudin exprimierende Thyroidkarzinomzellen

Die Thyroidkarzinomzelllinie K1 wurde exemplarisch untersucht, da sie im Gegensatz zu den oben erwähnten Zelllinien kein bzw. kaum Rezeptorclaudine, dafür aber das Nicht-Rezeptorclaudin Cldn1 (vgl. Anhang Abbildung 8-5) exprimiert. Auf diese Zelllinie war auch bei sehr hohen Konzentrationen (bis 511 nM, 1 h) und langen Inkubationszeiten (51 nM, 48 h) kein toxischer Effekt von CPE-wt zu detektieren (Abbildung 3-23, A, B).

Anders als CPE-wt hatte die Breitband-bindende Variante CPE-S305P/S307R/S313H auf K1-Zellen (getestet in Zusammenarbeit mit Anna Piontek und Gerd Krause, FMP, Berlin Buch) einen toxischen Effekt. Innerhalb einer Stunde ließ sich der Anteil lebender Zellen auf 55 ± 15 bzw. $64,6 \pm 1,8$ % reduzieren (Abbildung 3-23, A), wobei die eingesetzte CPE-Konzentration vergleichsweise hoch (255 bzw. 510 nM) war. Daher wurde hier die Inkubationszeit auf 48 h verlängert. So konnte mit niedrigeren Konzentrationen (25,5 bzw. 51 nM) CPE-S305P/S307R/S313H die Viabilität der K1-Zellen noch weiter (auf $33,3 \pm 5,4$ bzw. $16,9 \pm 3,2$ %) reduziert werden (Abbildung 3-23, B). Ein Plateau der maximal toxischen Wirksamkeit konnte jedoch jeweils nicht erreicht werden, sodass keine EC_{50} bestimmt wurden ⁶.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Cldn1-bindende CPE-Variante im Gegensatz zu CPE-wt Karzinomzellen angreifen kann, die hauptsächlich ein Nicht-Rezeptorclaudin exprimieren.

⁶ In Experimenten mit HEK-293-Zellen (s. Abbildung 3–19) wurde für einige CPE-Varianten trotz Nichterreichens eines Plateaus maximal toxischen Effektes ein EC_{50} berechnet. Dort war allerdings jeweils – aus Daten mit anderen CPE-Varianten – der zelltypspezifische maximal toxische Effekt bekannt.

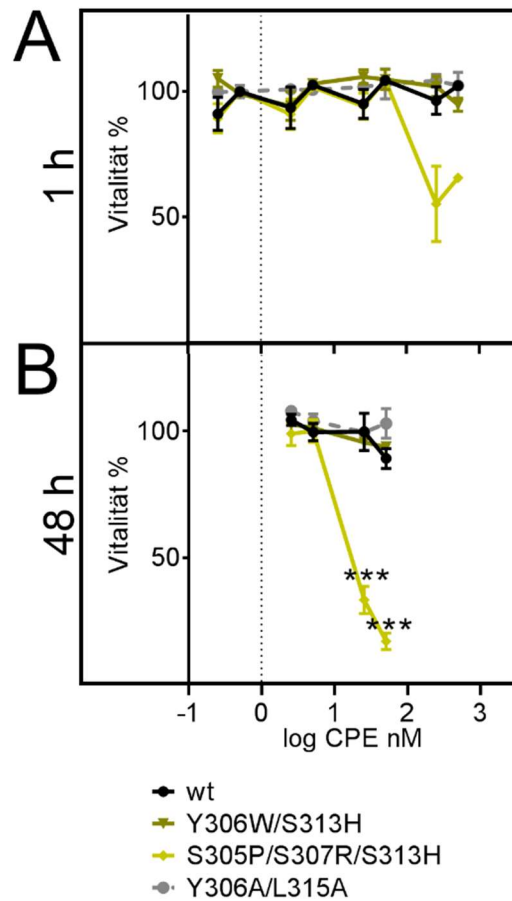


Abbildung 3-23 **Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten auf Thyroidkarzinomzellen.** K1 Thyroidkarzinomzellen wurden mit variablen Konzentrationen (0,26 bis maximal 510 nM) unterschiedlicher CPE-Varianten (wt, Y306A/L315A, S305P/S307R/S313H, Y306W/S313H) für 1 h (**A**) oder 48 h (**B**) inkubiert. Anschließend wurde mittels MTT-Assays die Vitalität ermittelt. **A**, $n \geq 2$; **B**, $n=4$ außer Y306A/L315A $n=2$. Sofern $n > 2$ t-test zweiseitig jeweils gegen den wt bei entsprechender Bedingung, Bonferroni-Holm Anpassung. *** = $p \leq 0,001$, ohne Angaben: nicht signifikant verschieden.



4 Diskussion

4.1 Pathomechanismus CPE-vermittelter Schädigung des Kolon Epithels

4.1.1 HT-29/B6-Zellen als geeignetes Modell zur Untersuchung CPE-vermittelter Effekte auf Enterozyten des Kolons

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die CPE-Sensitivität des Kolons im Vergleich zu der des Dünndarms vernachlässigbar ist (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005; McDonel und Demers, 1982). Daher konzentrierten sich die meisten Studien auf die Wirkung von CPE im Dünndarm. *In vivo* wurde hierbei vor Allem mit Ilealen-Schleifen-Modellen (McDonel und Demers, 1982; Sarker *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2008), *in vitro* mit Caco-2-Zellen gearbeitet (Chakrabarti und McClane, 2005; Robertson *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2001; Smedley *et al.*, 2007a), die – obgleich aus einem humanen Kolonkarzinom hervorgehend – als Modell für das Dünndarmepithel gelten (Hidalgo *et al.*, 1989).

Inzwischen wurde gezeigt, dass auch das Kolon CPE-sensitiv ist (Garcia *et al.*, 2014). Insbesondere in zwar seltenen, aber schweren und teilweise tödlich verlaufenden Fällen von *C. perfringens* Typ A Lebensmittelvergiftungen ist das Kolon stark betroffen und oftmals nekrotisch (Bos *et al.*, 2005; Centers for Disease and Prevention, 2012). Um CPE-Effekte in einem humanen Kolon-Modell *in vitro* unter definierten Bedingungen zu untersuchen, wurden HT-29/B6-Zellen verwendet. Diese Zellen differenzieren auf Zellkulturfiltern in voll polarisierte Zellschichten mit einer dichten epithelialen Barriere (Kreusel *et al.*, 1991).

Zunächst wurde die CPE-Sensitivität von HT-29/B6-Zellen sichergestellt und der Mechanismus der CPE-vermittelten Zytotoxizität untersucht. Hierbei wurde mit nicht (vollständig) polarisierten Zellen (in Suspension vereinzelt (Abbildung 3-1, A)) oder subkonfluent auf Zellkulturplastik wachsenden Zellen (Abbildung 3-2, Abbildung 3-3)) gearbeitet. So sollten Effekte – wie etwa der protektive Effekt von intakten TJ (vgl. auch Abschnitt 4.1.3) – reduziert werden, die aufgrund des Zellverbandes im ausdifferenzierten Epithel zustande kommen.

Es konnte gezeigt werden, dass der generelle Mechanismus der Zytotoxizität dem entspricht, der für Caco-2-Zellen beschrieben wurde (Chakrabarti und McClane, 2005; Robertson *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2001; Smedley *et al.*, 2007b): (i) Eine einstündige Inkubation mit 30 nM CPE (1,2 µg/ml) führt zur Bildung von CPE-Oligomeren (Abbildung 3-1, B), die mit einem apparenten Molekulargewicht von >170 kDa vergleichbar groß sind, wie der für Caco-2-Zellen beschriebene CH-2-Komplex (Robertson *et al.*, 2007). (ii) Die CPE-vermittelten Effekte sind Claudin-abhängig, da die Claudin-bindungsdefiziente CPE-

Variante CPE-Y306A/L315A die Bindung von CPE an HT-29/B6-Zellen (Abbildung 3-1, A) und nachfolgende Effekte (Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 3-2) und Toxizität (Abbildung 3-3)) inhibierte. (iii) Der Einstrom von Ca^{2+} durch eine CPE-Pore ist Auslöser des Zelltodes, da der Porenblocker Zn^{2+} den Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 3-2) und die Zytotoxizität inhibierte (Abbildung 3-3).

Nachdem so die CPE-Sensitivität von HT-29/B6-Zellen sichergestellt und der beteiligte Mechanismus auf zellulärer Ebene charakterisiert war, wurden CPE-vermittelte Effekte auf den ausdifferenzierten Zellverband von HT-29/B6-Zellen untersucht, der als ein etabliertes Modell für das Kolon-Epithel gilt (Kreusel *et al.*, 1991).

4.1.2 Die apikale Seite polarisierter HT-29/B6-Zellen ist gegenüber CPE vergleichsweise insensitiv

Zur Ausdifferenzierung in einen epithelialen Zellverband wurden HT-29/B6-Zellen auf für Flüssigkeit permeablen Zellkulturfiltern kultiviert. Hier bildet der Zellrasen schließlich eine epitheliale Barriere, die ein apikales – der luminalen Seite entsprechendes – Flüssigkeitsreservoir von einem basalen – der serosalen Seite entsprechenden – trennt.

Die CPE-vermittelte Zytotoxizität (Abbildung 3-12, D), Zell-Verlust (Abbildung 3-12, A, C), Ca^{2+} -Einstrom und Zellablösung (Abbildung 3-14) sowie die durch einen Abfall des TER (Abbildung 3-4, A) und Anstieg der parazellulären Fluoreszeinpermeabilität (322 Da) (Abbildung 3-4, B) charakterisierte Störung der intestinalen Barriere, war nach basaler CPE-Gabe im Vergleich zu apikaler CPE-Gabe stärker ausgeprägt.

Ähnliches wurde für andere Zelllinien berichtet: Die morphologische Schädigung polarisierter Caco-2-Zellen sowie der Ausstrom von ^{86}Rb – einem Marker für die Integrität der Plasmamembran – war bei basaler versus apikaler CPE-Behandlung (Singh *et al.*, 2001) deutlich verstärkt und der TER von MDCK-Zellen wurde durch > 4 stündige basale jedoch nicht durch apikale Behandlung mit cCPE-wt reduziert (Sonoda *et al.*, 1999). In diesen früheren Studien blieb unklar, warum polarisierte Epithelzellen eine geringere Sensitivität gegenüber apikaler CPE-Gabe zeigten. Dies ist allerdings von pathophysiologischer Relevanz, denn CPE wird aus im Verdauungstrakt sporulierenden Bakterien in das Darmlumen freigesetzt und wirkt daher dort – zumindest initial – von apikaler Seite auf die Enterozyten.

Die mikroskopische Analyse zeigte, dass – nach apikaler Gabe – die Bindung der nicht-toxischen Bindungsdomäne cCPE-wt (Abbildung 3-7), ebenso wie die Bindung toxischen CPE-wt (Abbildung 3-5, A, B; Abbildung 3-6 A, B) und nachfolgender Ca^{2+} -Einstrom und Zell-Exfoliation (Abbildung 3-14, C) auf eine kleine Subpopulation von HT-29/B6-Zellen beschränkt bleiben. In ähnlicher Weise war die Schädigung von Enterozyten in humanen

Kolon Biopsien durch physiologische Konzentrationen⁷ von CPE-wt (1800 nM) lokal eingeschränkt (Abbildung 3-16). Eine solche lokale Beschränkung der Bindung bzw. Zellschädigung durch cCPE-wt und CPE-wt war nach basaler Gabe nicht zu beobachten. Hier war vielmehr homogen bei allen Zellen des Zell-Layers ein cCPE- (Abbildung 3-8) bzw. CPE-Signal (Abbildung 3-5, C, D; Abbildung 3-6, C, D), eine CPE-induzierte Erhöhung intrazellulären Ca²⁺ (Abbildung 3-14, D) und daraus resultierend eine Ablösung und Schädigung (Abbildung 3-14, D, Abbildung 3-12, A, C, D) zu erkennen.

4.1.3 Die CPE-Sensitivität hängt von der Zugänglichkeit von Rezeptorclaudinen ab, die durch TJs limitiert wird

Als limitierenden Faktor für die CPE-vermittelte Schädigung des Zelllayers konnte die Zugänglichkeit von Rezeptorclaudinen für CPE identifiziert werden. Trotz der Anwesenheit von CPE-Rezeptor Cldn4 in allen Zellen war eine cCPE-wt Bindung an HT-29/B6-Zellen nach apikaler Applikation ausschließlich dort zu beobachten, wo Cldn4 nicht in der TJ sondern apikal zugänglich vorlag (Abbildung 3-7, A) und die TJ – visualisiert mithilfe des TJ-Markers ZO1 – diskontinuierlich war (Abbildung 3-7, B). Dass die beobachtete apikale Lokalisation von Cldn4 und die TJ-Diskontinuität Effekt der cCPE-Bindung während der einstündigen Inkubation und nicht Ursache ist, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings scheint dies unwahrscheinlich, da auch in den kontrollbehandelten Zellen (cCPE-Y306A/L315A) eine Subpopulation mit ähnlich apikal lokalisiertem Cldn4-Signal bzw. unterbrochenem ZO1-Netzwerk zu erkennen war (Abbildung 3-7).

Außerhalb der beim Einsatz von toxischem Volllängen-CPE entstehenden CPE-positiven fokalen Läsionen, bleibt ein morphologisch unbeschädigter Zellrasen zurück, der keine Umverteilung von junctionalem Cldn4 oder ZO1 erkennen lässt, sodass die hier entstandenen Läsionen offenbar durch eine Exfoliation CPE-sensitiver Zellen mit diskontinuierlicher TJ und apikal zugänglichem Rezeptorclaudin Cldn4 zustande kamen.

Nach basaler Behandlung konnte CPE-wt (Abbildung 3-5, C, D; Abbildung 3-6, C, D) vor Allem bzw. cCPE-wt (Abbildung 3-8) ausschließlich basal detektiert werden. Toxisches CPE-wt führte hierbei zu einem nahezu vollständigen Verlust des junctionalen Cldn4-Signals (Abbildung 3-6, C). Das junctionale ZO1 Signal hingegen war vergleichsweise geringfügig verändert (Abbildung 3-6, C). Ebenso wie die CPE-wt / cCPE-wt Bindung waren diese Effekte weitgehend homogen für den gesamten Zell-Layer.

Die laterale Membran von basal cCPE-wt behandelten Zellen zeigte kein bzw. nur ein schwaches cCPE-Signal und basal konnte z.T. eine Kolo-kalisation mit dem Rezeptorclaudin Cldn4 beobachtet werden. Auch für Cldn7 und -8 – ebenfalls CPE-

⁷ In einer Studie von 1985 (Bartholomew *et al.* 1985) wurde in 37 % humaner Fäcesproben nach akutem Ausbruch einer *C. perfringens* Typ A Lebensmittelvergiftung 1 bis 100 µg/g CPE gefunden. Davon ausgehend, dass 1 g Fäces einem Volumen von 1 ml entspricht, entspricht dies etwa 28 bis 2800 nM. Bei 10 % der Fäcesproben war die CPE-Konzentration sogar noch höher.

Rezeporclaudine – wurde eine Lokalisation in der basolateralen Membran von Kolonzellen beschrieben (Fujita *et al.*, 2006). Daher wären Cldn7 und -8 neben Cldn4 weitere mögliche Interaktionspartner bei basaler Applikation. Dass nach basaler Applikation cCPE kaum lateral, sondern hauptsächlich basal detektiert wurde, könnte dadurch bedingt sein, dass es vor allem dort bindet, wo es als erstes auf Claudine trifft.

HT-29/B6-Zellen – sezernieren wie die Enterozyten des Kolons – Mukus (Kreusel *et al.*, 1991). Eine protektive Mukus-Schicht auf dem Epithel, die nur Stellenweise so dünn ist, dass CPE sie durchdringen kann, scheint jedoch unwahrscheinlich als Erklärung für die beobachtete Fokalität der CPE-Effekte bei apikaler CPE-Gabe denn: (i) passieren Dextrane mit einer molekularen Masse von 40 - 50 kDa die Mukusschicht des Kolons schnell (binnen 15 min) (Johansson *et al.*, 2014). Weshalb davon auszugehen ist, dass von Bakterien freigesetzte Toxine, wie CPE (natives 35 kDa, in dieser Arbeit verwendete His-CPE 39 kDa), anders als bakterielle Mutterzellen die Mukusschicht (des humanen Kolons) innerhalb der Inkubationszeit von einer Stunde durchdringen. (ii) Waren auch bei Caco-2-Zellen, die kaum Mukus produzieren (Beduneau *et al.*, 2014) nach einstündiger apikaler Inkubation mit CPE-wt (30 nM) ausschließlich lokale Effekte in Form von fokalen, CPE-positiven Läsionen sichtbar (Abbildung 3-9).

Außerhalb der fokalen Schäden blieb auch bei Caco-2-Zellen der Großteil des Zellrasens mit klar kontinuierlichem, charakteristisch junctionalem ZO1-Signal durch CPE-wt unbeschädigt zurück. Das belegt, dass eine Protektion der Zellen durch intakte TJ nicht zelltypspezifisch für HT-29/B6-Zellen ist, sondern auf andere polarisierte epitheliale Zelltypen übertragbar ist.

Eine ältere Studie mit Caco-2-Zellen scheint dem zu widersprechen, denn dort wurde keine klare Fokalität CPE-induzierter Effekte nach apikaler Gabe gezeigt: Entweder wurde – unter vergleichbaren Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit (1 h, 1 µg/ml ca. 30 nM CPE-wt) – keine morphologische Veränderung beschrieben (Singh *et al.*, 2001). Oder aber es wurden – mit zunehmender Inkubationszeit (2 h) bzw. bei basaler Inkubation (1 und 2 h) – deutliche Effekte (Ablösung von Zellen, Dislokation von Occludin und F-Aktin aber nicht ZO1 in zurückbleibenden Zellen) beschrieben, ohne jedoch eine lokale Einschränkung bei apikaler Gabe festzustellen. Diese Unterschiede liegen möglicherweise darin begründet, dass (i) in der erwähnten Studie nicht gegen CPE gefärbt wurde und so die bei einstündiger apikaler Inkubation vergleichsweise selten auftretenden, fokalen, CPE-positiven Läsionen – insbesondere bei der Betrachtung kleiner Ausschnitte des Zell-Layers – leicht zu übersehen sind (ii) bei zweistündiger apikaler Inkubation bereits einiges an CPE durch Läsionen auf die basale Seite gelangt war und dort homogen auf alle Zellen wirken konnte, sodass nicht nur lokal begrenzte Effekte in der unmittelbaren Nachbarschaft von Läsionen, sondern homogene Effekte beobachtet wurden.

4.1.4 Bei Verdrängung seneszenten Zellen zugänglich werdende Rezeptorclaudine als möglicher Angriffspunkt für CPE

Nicht-toxisches cCPE-wt und toxisches CPE-wt konnte jeweils nicht im Bereich intakter TJ (mit junctionalem Cld4 kolokalisierend) detektiert werden. Dies stützt die Annahme, dass cCPE (Krause *et al.*, 2015) und CPE aufgrund sterischer Hinderung nicht an Claudine in TJs bindet, deren EZSs in trans-Interaktionen involviert sind, sondern an nicht-polymerisierte Claudine, die sich außerhalb der TJs befinden. Zusammen mit der Beobachtung, dass cCPE-/CPE-Bindung und Effekte bei apikaler nicht aber bei basaler Gabe stark eingeschränkt sind und nur lokal bei einer kleinen Subpopulation von Zellen auftreten, kann dies als Hinweis gewertet werden, dass ein wesentlicher Anteil von Claudinen nach der Translation bzw. Recycling nach Endozytose zum basolateralen aber nicht oder kaum zum apikalen Membrankompartiment transportiert wird. Und in der Tat war für Rezeptorclaudine wie Cldn3 und -4 im Rattendarm fast ausschließlich eine basale oder junctionale aber keine apikale Lokalisation zu erkennen (Rahner *et al.*, 2001). In das Darmlumen freigesetztes CPE kann also nur eine Subpopulation von Zellen angreifen, bei der Rezeptorclaudine – etwa aufgrund starker Umstrukturierungen der TJ – auf der dem Lumen zugewandten apikalen Seite vorliegen.

Insbesondere die Enterozyten an den Spitzen der Darmzotten des Dünndarms (Fernandez Miyakawa *et al.*, 2005; Smedley *et al.*, 2008) werden durch CPE geschädigt. Möglicherweise kann von sporulierenden *C. perfringens* Mutterzellen im Darmlumen freigesetztes CPE diese Zellen leicht erreichen, während es kaum zu den in den Krypten liegenden Enterozyten vordringt, die daher unbeschädigt bleiben. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Bedeutung der apikalen Zugänglichkeit von Rezeptorclaudinen für die CPE-Sensitivität bietet einen weiteren Erklärungsansatz. Denn interessanterweise befindet sich an den Spitzen der Dünndarmzotten eine Zone extensiver Zell-Verdrängung im Rahmen der epithelialen Zellerneuerung. Bei diesem hochregulierten Prozess, werden senescente Zellen in das intestinale Lumen ausgestoßen und – ohne eine Lücke zu hinterlassen – durch von der Krypte her nachrückende Zellen ersetzt (Guan *et al.*, 2011; Marchiando *et al.*, 2011). Dabei kommt es zu einer starken Umorganisation der TJ. Im Rahmen dieser epithelialen Zell-Verdrängung könnte es so auch zu einer apikalen Lokalisation von Rezeptorclaudinen kommen.

Dass Pathogene Zonen der Zell-Verdrängung an den Spitzen der Darmzotten nutzen, um Zugang zu ansonsten basolateral und daher unzugänglich vorliegenden Rezeptoren zu erhalten wurde beispielsweise für *Listeria monocytogenes* gezeigt, die E-Cadherin als Rezeptor benötigen, um in die Epithelzellen einzudringen (Pentecost *et al.*, 2006). In ähnlicher Weise nutzt auch *Pseudomonas aeruginosa* Zonen der Zell-Verdrängung, um über die epitheliale Barriere zu transmigrieren (Golovkine *et al.*, 2016).

Zwei leicht unterschiedliche Szenarien könnten zum beobachteten CPE-induzierten massiven Zellverlust, beginnend an den Spitzen der Dünndarmzotten (Smedley *et al.*, 2008), führen: (i) Könnte CPE auf Zellen wirken, die im Begriff sind, in das Darmlumen ausgestoßen zu werden, und würde so den Prozess derart beschleunigen, dass eine Läsion entsteht und wiederum Rezeptorclaudine der Nachbarzellen zugänglich werden. (ii) Könnten nachdem eine Zelle ausgestoßen wurde bei den Nachbarzellen Rezeptorclaudine apikal zurückbleiben, die dann als Angriffspunkt für CPE dienen.

4.1.5 Synergistische Effekte von CPE mit anderen pathologischen Veränderungen der intestinalen Barriere

TNF α -induzierte Zell-Verdrängung wurde als pathophysiologisch relevantes Modell für eine beschleunigte Zellerneuerung, wie sie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftritt (Blander, 2016), vorgeschlagen (Marchiando *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit TNF α die cCPE-wt-Bindung (Abbildung 3-11) und damit einhergehend die Sensitivität von HT-29/B6-Zellen gegenüber CPE (Abbildung 3-12) erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt wenn die Zellen mit EGTA vorbehandelt wurden oder die weniger differenzierte parentale Zelllinie HT-29 verwendet wurde (Abbildung 3-11, Abbildung 3-12).

Barrieredefekte wie sie durch eine erhöhte Zellverdrängungsrate oder Destabilisierung der TJ – beispielweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen – vorkommen, könnten die Sensitivität gegenüber CPE erhöhen und so die Schädigung der Barriere verstärken. Dies könnte zu einem vermehrten Eindringen von Antigenen oder Pathogenen führen und so im Gegenzug Entzündungsvorgänge vorantreiben. Ein solcher Effekt wurde für α -Haemolysin induzierte fokale Läsionen beschrieben (Bücker *et al.*, 2014).

Andersherum könnten CPE-produzierende *C. perfringens* Typ A Stämme, die auch in gesunden, symptomfreien Personen nachgewiesen wurden (Heikinheimo *et al.*, 2006) und während Antibiotika-assoziiierter Diarrhö eine Rolle spielen (Carman, 1997), die Pathogenese intestinaler Entzündungen durch initiale fokale Barrierestörungen fördern.

Ein Zusammenwirken von CPE und entzündlichen Prozessen oder aber Medikation könnte zu einer deutlichen Verstärkung klinischer Symptome unter Beteiligung des Kolons beitragen. Ein Beispiel hierfür ist das Zusammenwirken von CPE und cholinergem Medikation, das während zweier CPE-verursachter Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen in psychiatrischen Kliniken zu Komplikationen geführt hat. Hier wurden mehrere Fälle mit fatalem Ausgang beschrieben, wobei jeweils das Kolon stark betroffen und nekrotisch war (Bos *et al.*, 2005; Centers for Disease and Prevention, 2012). Ähnlich fatale Fälle wurden im Tiermodell für Mäuse berichtet (Caserta *et al.*, 2011). Hier konnte ein Durchtritt von CPE durch die intestinale Barriere nachgewiesen werden. CPE fand sich im Blutserum, Niere und Leber. Todesursache war hier scheinbar systemisch

vorhandenes CPE, und nicht die massive intestinale Nekrose. Denn die Tiere konnten durch intravenöse Gabe von CPE-Antikörpern gerettet werden, ohne dass die Schädigung des Darmes eingedämmt wurde. Ein Durchtritt von CPE durch stark geschädigtes Epithel in die Zirkulation kann offenbar fatale Folgen haben.

4.2 Neuartige CPE-Varianten für die Therapie Claudin überexprimierender Tumoren

4.2.1 Nicht-junktionale Claudine sind Zielproteine CPE-basierter Tumor-Therapeutika

Für CPE als Tumorthapeutikum kann die gezeigte Korrelation zwischen CPE-Sensitivität und Zugänglichkeit von Claudinen außerhalb von TJ einen therapeutischen Nutzen bedeuten: Denn in Tumoren kommt es nicht nur zu einer Überexpression von Claudinen, sondern im Rahmen der Karzinogenese oftmals auch zu einem Verlust der epithelialen Differenzierung und der TJ-Integrität (de Oliveira *et al.*, 2005; Tabaries und Siegel, 2017). Viele nicht-junktionale Claudine, die CPE-basierten Therapeutika als Rezeptoren dienen können, versprechen so eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zu nicht-entartetem differenziertem Epithel mit intakten TJs. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine deutlich erhöhte CPE-Sensitivität für die stark dedifferenzierte Kolonkarzinomzelllinie HT-29 im Vergleich zu ihrem differenzierten Subklon HT-29/B6 festgestellt werden (Abbildung 3-12, Abbildung 3-13, Abbildung 3-14, Abbildung 3-15).

4.2.2 CPE-Varianten mit verbesserter Claudin-subtypspezifischer Toxizität lassen sich durch claudinselektive Affinitätsveränderungen generieren

Neuartige CPE-Varianten, deren Affinitäten möglichst gut auf tumorrelevante Claudine zugeschnitten sind, könnten bestehende Limitierungen der Claudin-gerichteten Tumorthherapie mit CPE-wt – wie Nebenwirkungen und eine Beschränkung der therapierbaren Tumoren auf solche, die CPE-Rezeptorclaudine exprimieren (vgl. Abschnitt 0 und auch Abbildung 4-1) – überwinden helfen.

Dass die Interaktion der nicht-toxischen C-terminalen Domäne von CPE (cCPE) mit Claudinen durch Mutationen in der Claudin-Bindungstasche von cCPE gezielt verändert werden kann, wurde bereits gezeigt (Protze *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2012; Veshnyakova *et al.*, 2012b) (vgl. auch Abschnitt 1.5).

In diesen Vorarbeiten (Protze *et al.*, 2015; Veshnyakova *et al.*, 2012b) erfolgte eine Charakterisierung neuer cCPE-Varianten indem bei einer gegebenen cCPE-Konzentration (0,5 µg/ml entspricht ca. 12 nM) die Bindung an HEK-293-Zellen, die ein definiertes Claudin exprimieren relativ zur Bindung des cCPE-Wildtyps ermittelt wurde. So können Aussagen getroffen werden, wie sich unterschiedliche Mutationen auf die cCPE-Bindung an ein bestimmtes Claudin auswirken. Die Affinitäten verschiedener cCPE-Varianten für unterschiedliche Claudine können so allerdings nicht direkt verglichen werden. Einen

Vergleich der Bindungseigenschaften von cCPE-Varianten – auch zwischen Claudinen – ist über Dissoziationskonstanten (K_d) möglich. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die K_d für die Interaktion ausgewählter cCPE-Varianten mit tumorrelevanten Claudinen (Cldn1, -3, -4, -5, -6) bestimmt. Gängige Methoden zur Bestimmung der K_d wie die isothermale Titrationskalorimetrie oder die analytische Ultrazentrifugation erfordern, dass beide Interaktionspartner solubilisiert vorliegen (Rajaratnam und Rosgen, 2014; Zhao *et al.*, 2013). Allerdings ist die Solubilisierung von Membranproteine in nativer Konformation durch die Anwesenheit milder Detergenzien nicht trivial. Und auch wenn mittels Oberflächenplasmonresonanz die Untersuchung der Interaktion eines in nativer Form auf dem Sensorchip immobilisierten Membranproteins mit einem solubilisierten Liganden gelingen kann, ist dies methodisch deutlich herausfordernder als die Untersuchung zweier leicht solubilisierbarer Interaktionspartner (Patching, 2014).

Die Analyse der Affinität von cCPE für native, transmembranale Claudine gestaltet sich also mit diesen Methoden als schwierig und Versuche die mit solubilisierten EZS2-Peptiden von Claudinen durchgeführt wurden, lieferten teilweise andere Ergebnisse als Versuche bei welchen Claudine in der Plasmamembran vorlagen (Ling *et al.*, 2008a; Winkler *et al.*, 2009) (vgl. Abschnitt 0). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die K_d unter möglichst nativen Bedingungen in zellulären Bindungs-Assays (vgl. Abschnitt 2.4.7) bestimmt und die Bindung von cCPE GST-Fusionsproteine über einen Fluorophor gekoppelten anti-GST Antikörper detektiert.

Publizierte K_d für Cldn3, -4 und -6, die über die Bindung 251 I-markierten Vollängen-CPEs an Claudin-transfizierten L-Fibroblasten erhalten wurden (Tabelle 1-1) konnten so in einem immunfluoreszenzbasierten Assay mit nicht-toxischem cCPE-wt und Claudin-transfizierten HEK-293-Zellen reproduziert werden (Abbildung 3-17). Neben der Validierung des genutzten Assays, konnte so ein Hinweis erhalten werden, dass sich die Claudinaffinität von CPE und cCPE nicht wesentlich unterscheiden. Auf Grundlage von Bindungsdaten, die mit cCPE-Varianten erhalten wurden, kann also auch auf das Bindungsverhalten entsprechender CPE-Konstrukte geschlossen werden.

Die Mutationen (L254A/S256A/I258A/D284A, Y306W/S313H und S305P/S307R/S313H), die eine starke Veränderung der Claudin-subtypspezifischen K_d zeigten (Abbildung 3-17) wurden daher in das Vollängen-Toxin eingeführt. So konnten CPE-Varianten mit entsprechend veränderten Claudin-subtypspezifischen Toxizitäten generiert werden (Abbildung 3-19, Abbildung 3-21). Mutation L254A/S256A/I258A/D284A erlaubt eine Unterscheidung der Rezeptorclaudine Cldn3 und -4: cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A bindet etwa 20-mal schwächer an Cldn3 als an Cldn4 (Abbildung 3-17). Entsprechend induziert Vollängen-CPE-L254A/S256A/I258A/D284A bei Cldn4 aber nicht bei Cldn3-exprimierende HEK-293-Zellen bereits in geringen Konzentrationen einen Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 3-18) und eine toxische Wirkung (Abbildung 3-19). cCPE-wt zeigt keine Bindung

an die Nicht-Rezeptorclaudine Cldn1 und -5 (Abbildung 3-17). Entsprechend bewirkt CPE-wt keinen Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 3-18) in Cldn5-exprimierenden HEK-293-Zellen und ist auch nicht toxisch (Abbildung 3-19). Hier wurde über die Mutationen S313H bzw. S305P/S307R/S313H und Y306W/S313H eine hochaffine Bindung (Abbildung 3-17) und hierrüber eine Ca^{2+} -vermittelte (Abbildung 3-18) toxische Wirkung erzielt (Abbildung 3-19). Exemplarisch wurde für CPE-L254A/S256A/I258A/D284A und CPE-Y306A/L315A gezeigt, dass sich auch in einem eukaryotischen Expressionssystem, wie es für eine Suizidgentherapie Cldn-exprimierender Tumoren vorgeschlagen wird (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012), CPE-Varianten mit entsprechend veränderter Claudin-Subtypspezifität generieren lassen (Abbildung 3-21).

Eine Veränderung der Claudin-subtypspezifischen Toxizität von CPE ist auf unterschiedliche Weise gelungen: (i) über eine selektive Reduktion der Affinität für einzelne Rezeptorclaudine (Cldn4-Binder CPE-L254A/S256A/I258A/D284A), (ii) über eine selektive Erhöhung der Affinität für Nicht-Rezeptorclaudine (Breitband-Binder CPE-S305P/S307R/S313H), (iii) über eine Kombination aus (i) und (ii) – eine selektive Reduktion der Affinität für einzelne Rezeptorclaudine bei gleichzeitiger Erhöhung der Affinität für Nicht-Rezeptorclaudine (Cldn5-Binder Y306W/S313H). Abbildung 4-1 stellt dies schematisch dar und illustriert, dass sich dies bei Vorliegen komplexer Claudinzusammensetzungen in nativem Gewebe unterschiedlich auswirken kann.

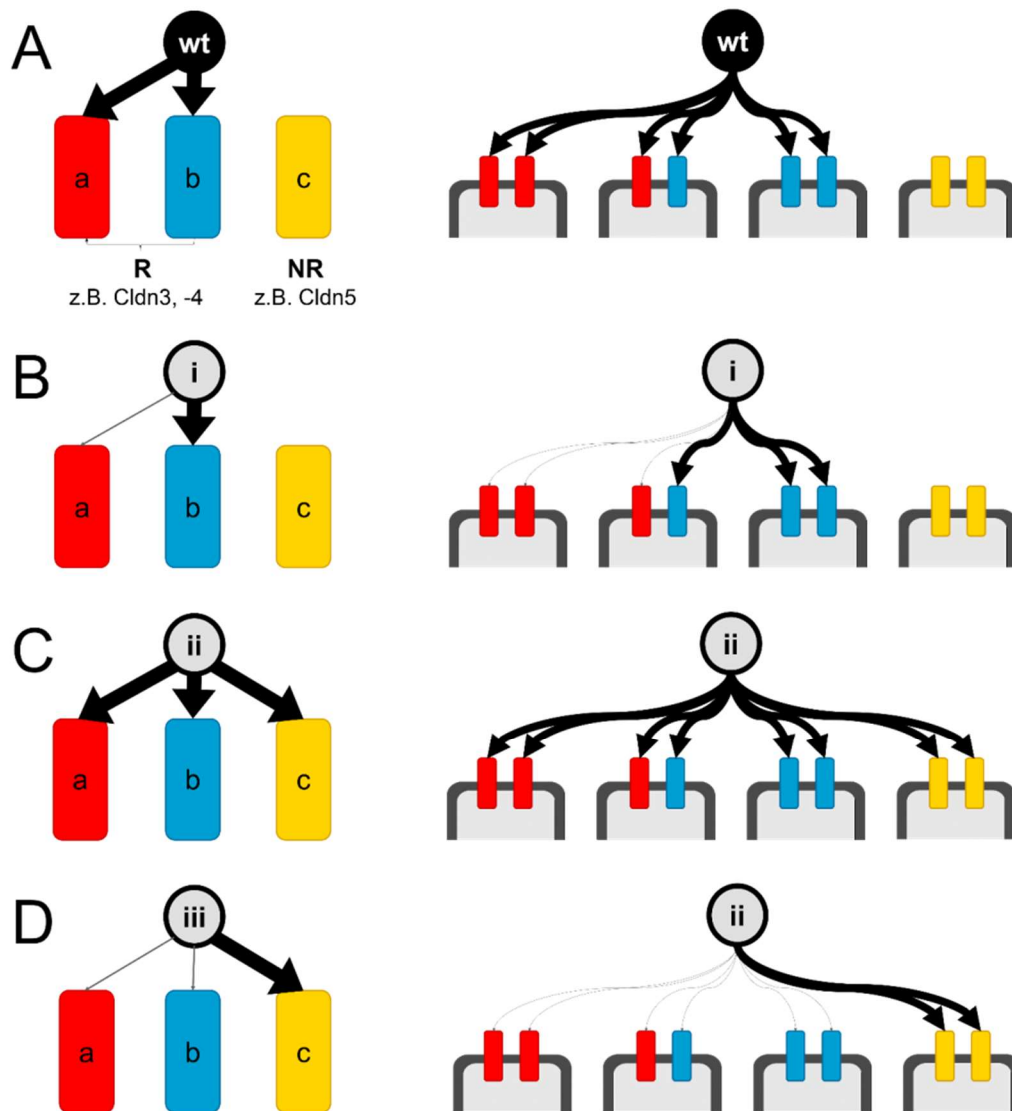


Abbildung 4-1 Im Vergleich zu nativem CPE (A, wt), zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generierten CPE-Varianten eine veränderter Claudinspezifität und können in drei Typen (B-D, Typen i-iii) unterteilt werden:

(i) Kann eine Erhöhung der Claudin-Subtypspezifität einer CPE-Variante für ein Rezeptorclaudin (b) durch Reduktion der Affinität für andere Rezeptorclaudine (a) bei gleichbleibender Affinität für (b) erzielt werden (B, links). Effekte solcher CPE-Varianten können maximal so groß sein, wie Effekte nativen CPEs (B, rechts). Dies ist für Zellen/Gewebe der Fall, bei welchen hauptsächlich Rezeptorclaudin b zur Verfügung steht. CPE-L254A/S256A/I258A/D284A, das präferenziell mit Cldn4 interagiert, fällt in diese Kategorie.

(ii) Wird bei gleichbleibender Affinität für Rezeptorclaudine (a und b) die Affinität gegenüber einem Nichtrezeptorclaudin(c) erhöht (C, links). Solche Breitband-Binder zeigen auf Gewebe bei welchen vor Allem Rezeptorclaudine (a und b) zur Verfügung stehen einen vergleichbaren, auf Gewebe, bei welchen vor allem Nicht-Rezeptorclaudine (c) zur Verfügung stehen einen stärkeren Effekt als natives CPE (C, rechts). CPE-S305P/S307R/S313H und CPE-S313H sind Beispiele hierfür.

(iii) Kann die Affinität für Rezeptorclaudine (a und b) reduziert und gleichzeitig die Affinität für Nicht-Rezeptorclaudine (c) erhöht werden (D, links). Diese CPE-Varianten zeigen reduzierte Effekte auf Zellen und Gewebe, bei welchen vor Allem Rezeptorclaudine (a und b) vorliegen, und einen verstärkten Effekt auf Zellen und Gewebe, bei welchen Nicht-Rezeptorclaudine (c) dominieren (D, rechts).

4.2.3 Geringe Affinitätsänderungen bewirken deutliche Unterschiede bei der CPE-vermittelten Toxizität

Mutationen in der Claudin-Bindungstasche zeigten meist einen größeren Effekt bei der für CPE bestimmten Toxizität als bei der für cCPE bestimmten Bindungsaffinität (Abbildung 3-20; $relEC_{50} \neq relK_d$). Und auch wenn die ermittelte claudinspezifische Affinität einer cCPE-Variante nicht geringer war als die des cCPE-Wildtyps ($relK_d \approx 1$), zeigte sich bei der entsprechenden Mutation in CPE teilweise eine Reduktion der claudinspezifischen Toxizität ($relEC_{50} > 1$).

Dass sich die Claudin-Bindungsaffinitäten von cCPE- und jeweils entsprechenden CPE-Varianten unterscheiden, kann als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass eine K_d -Bestimmung für cCPE-Varianten eine sehr gute Abschätzung der Affinität entsprechender CPE-Varianten erlaubt (vgl. Abschnitt 4.2.2). Ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass Mutationen in der Claudin-Bindungsdomäne die Toxizitätsvermittlung nach erfolgter Bindung direkt inhibieren und beispielsweise durch leichte Unterschiede im Bindungsmodus und Stellung zur Membran, die Porenbildung erschweren.

Insgesamt scheint als Ursache für die unterschiedlich starken Effekte der Mutationen auf die ermittelten Bindungsaffinitäten und Toxizitäten jedoch wahrscheinlicher, dass die EC_{50} -Bestimmung sensitiver gegenüber Affinitätsänderungen ist als die K_d -Bestimmung.

Ist – wie bei den meisten getesteten cCPE/Cldn- bzw. CPE/Cldn-Kombinationen – EC_{50} deutlich kleiner als der K_d muss nur ein vergleichsweise geringer Anteil an Bindungsstellen besetzt sein, um deutliche toxische Effekte zu hervorzurufen (Abbildung 3-20, A, B). Hier führen bereits geringe Unterschiede beim Anteil besetzter Bindungsstellen zu deutlich unterschiedlichen Toxizitäten (illustriert in Abbildung 3-20 B, Kreisdiagramme). Scheinbar werden kleine Unterschiede bei den Affinitäten in der K_d -Bestimmung nicht detektiert. Da aber bei der Toxizitätsvermittlung kleine Unterschiede bei der Bindung verstärkt werden (Abbildung 3-20, B), sind kleine Affinitätsunterschiede über MTT-Assays als Veränderung im EC_{50} nachweisbar.

Auffällig bei der Interaktion cCPE- bzw. CPE- L254A/S256A/I258A/D284A / Cldn3 ist, dass EC_{50} und K_d ähnlich groß bestimmt wurden ($EC_{50} = 364 -98/+133$ nM; $K_d = 226 \pm 59$ nM). Geht man davon aus, dass die bestimmten Werte zumindest in der richtigen Größenordnung liegen, muss eine vergleichsweise hohe Bindungssättigung vorliegen, um deutliche toxische Effekte zu erzielen (Abbildung 3-20, C, D).

Als Ursache ausgeschlossen werden kann eine geringe Verfügbarkeit von Cldn3 als Rezeptor – diese hätte sich auch bei anderen cCPE bzw. CPE/Cldn3-Kombinationen bemerkbar gemacht.⁸ Ebenfalls unwahrscheinlich scheint, dass die Mutation

⁸ Im Vergleich zu Cldn3 und -4 zeigt Cldn5 eine geringe Verfügbarkeit in der Plasmamembran (Rossa et al., 2014, JBC 289:7641-53). Dies ist als Ursache für die hohe Bindungssättigung (K_d und EC_{50})

L254A/S256A/I258A/D284A Oligomerisierung und Porenbildung generell inhibiert, denn auf Cldn4 exprimierende Zellen vermittelte CPE-L254A/S256A/I258A/D284A effektiv einen toxischen Effekt.

Eine Erklärung berücksichtigt, wie Mutationen in CPE zu einer Veränderung der Affinität führen. Zwar können Veränderungen der K_d ($K_d = k_{off}/k_{on}$) prinzipiell sowohl durch eine Veränderung der Geschwindigkeitsrate der Assoziation (k_{on}) als auch der Dissoziation (k_{off}) bedingt sein, allerdings ist k_{on} meist durch die Diffusionsrate der Interaktionspartner im jeweiligen Medium gegeben und damit unveränderbar. k_{off} hingegen ist ausschließlich von der spezifischen Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand – also von hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindung und Van-der-Waals-Kräften – abhängig ((Copeland *et al.*, 2006)). Eben diese intermolekularen Wechselwirkungen werden durch Mutationen innerhalb der Claudin-Bindungstasche von CPE beeinflusst. Dies ist in detaillierten Interaktionsmodellen der EZS2 von Claudinen mit unterschiedlichen CPE-Varianten, die in der Arbeitsgruppe erstellt wurden (Eichner *et al.*, 2017; Protze *et al.*, 2015; Veshnyakova *et al.*, 2012b), gut nachvollziehbar. Mutationen in CPE sollten also vor Allem über eine Veränderung der k_{off} zu einer Veränderung der Bindungsaffinität führen. Hierfür existiert ein experimenteller Hinweis⁹. Bei deutlich reduzierter Affinität kann so über eine vergleichsweise hohe CPE-Konzentration zwar eine hohe fraktionelle Sättigung der Claudinrezeptoren erzielt werden, allerdings ist die Fluktuation von CPE am einzelnen Rezeptor dabei groß. Die Verweildauer des Toxins könnte also aufgrund des erhöhten k_{off} zu kurz für eine effektive Oligomerisierung und Vermittlung des toxischen Effektes sein. Insgesamt scheinen geringe Unterschiede bei den Affinitäten zu deutlich stärkeren Unterschieden bei der Toxizität zu führen, sodass die EC_{50} -Bestimmung sensitiver gegenüber Affinitätsänderungen ist als die K_d -Bestimmung.

ähnlich) von Cldn5, die für die toxische Wirkung von CPE-Y306W/S313H nötig ist, durchaus denkbar.

⁹ In initialen Experimenten, war die für die Interaktion CPE-L254A/S256A/I258A/D284A/Cldn3 ermittelte k_{off} deutlich größer als die für CPE-wt/Cldn3 ermittelte (s. Anhang Abbildung 8-4).

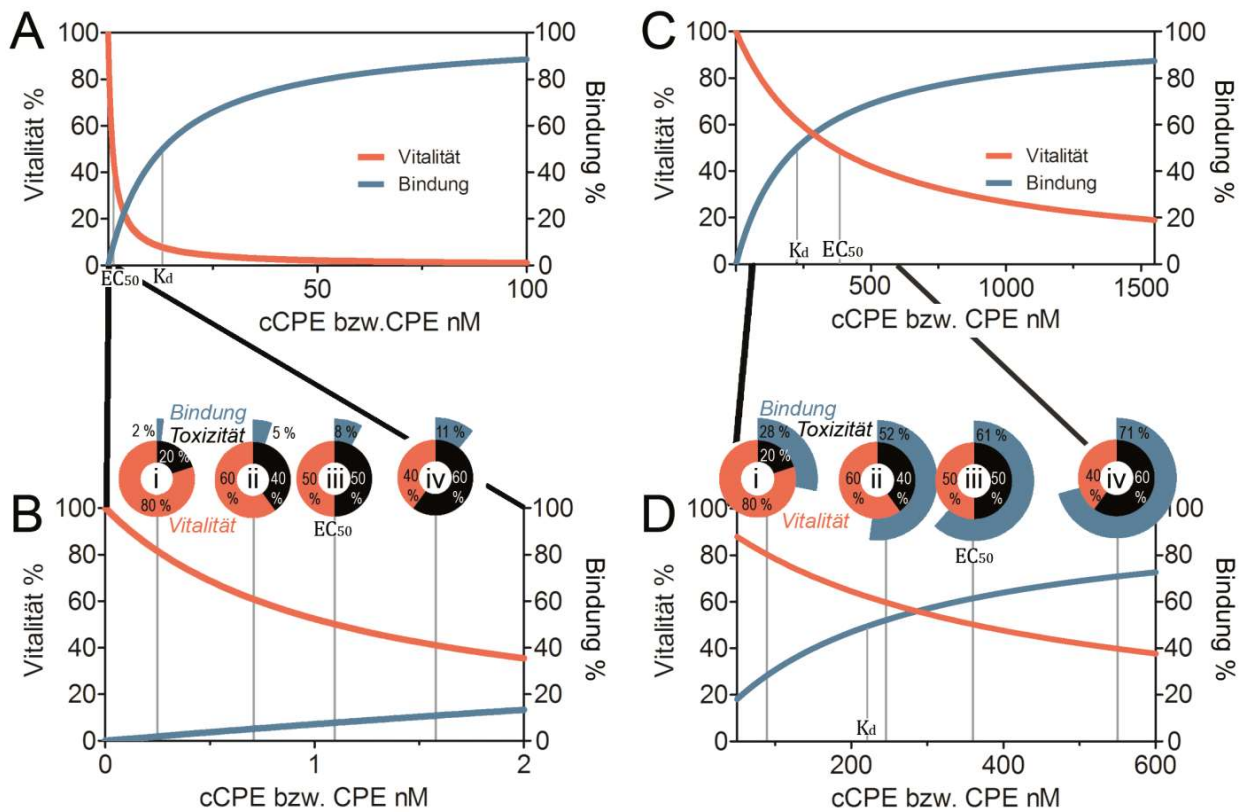


Abbildung 4-2 **Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität und Bindung bei $EC_{50} \ll K_d$ (A, B) und $EC_{50} \approx K_d$ (C, D)**. Simulation. Ist $EC_{50} \ll K_d$ (A, B) kann bereits eine geringe Bindung (% maximaler Bindung) zur deutlichen Reduktion der Vitalität (% maximaler Vitalität) führen. Im Konzentrationsbereich nahe EC_{50} (herausvergrößert in B) fällt die Vitalität stärker (hier etwas mehr als 60 % pro 2 nM) als die Bindung steigt (knapp 20 % im gleichen Konzentrationsbereich). Die Kreisdiagramme über dem Graph veranschaulichen, wie – absolut gesehen – bereits geringe Veränderungen bei der Bindung zu großen Veränderungen bei Vitalität und Toxizität führen. So führen beim Vergleich von i & ii in B 3 % Änderung der Bindung zu 20 % Unterschied bei der Toxizität. Ist $EC_{50} \approx K_d$ (C, D) ist zum Erreichen derselben toxischen Effekte eine deutlich höhere Bindung nötig. Außerdem ziehen Veränderungen bei der Bindung ähnlich große Änderungen bei der Toxizität nach sich. So führen beim Vergleich von i & ii in D 24 % Unterschied bei der Bindung zu 20 % Unterschied bei der Toxizität. Der Simulation zugrunde gelegt wurden im Rahmen der Arbeit ermittelte Werte für cCPE-wt bzw. CPE-wt/Cldn3 ($K_d = 13,7$ nM bzw. $EC_{50} = 1,1$ nM) (A, B) und cCPE bzw. CPE-L254A/S256A/I258A/D284A / Cldn3 ($K_d = 226$ nM bzw. $EC_{50} = 364$ nM) (C, D). Die Vitalität bei einer gegebenen CPE-Konzentration wurde mit den EC_{50} Werten mittels GraphPadPrism (Modell *log(agonist) vs response*) unter der Annahme eines maximal toxischen Effektes (Vitalität = 0 %) berechnet. Die Bindung wurde mit den K_d -Werten mittels GraphPadPrism (Modell *one site specific binding*) geplottet.

4.2.4 Rezeptorclaudin diskriminierende CPE-Varianten als Tumorthapeutika

CPE-Varianten, die zwischen Rezeptorclaudinen differenzieren, könnten helfen Nebenwirkungen einer CPE-basierten Tumorthherapie zu reduzieren.

Bei den bislang charakterisierten Mutationen in CPE (L254A/S256A/I258A/D284A, diese Arbeit) und cCPE (L254A/S256A/I258A/D284A reduzierte Cldn3-Bindung, L223A/D225A/R227A reduzierte Cldn4-Bindung (Veshnyakova *et al.*, 2012b)), D225A und S313H reduzierte Cldn8-Bindung (Protze, 2015; Protze *et al.*, 2015)), die zwischen Rezeptorclaudinen differenzieren, wird die Verschiebung der Claudin-Subtypspezifität stets über eine unterschiedlich starke Reduktion der Affinität für bestimmte Claudine und nicht über eine Erhöhung der Affinität erzielt (vgl. Abbildung 4-1 B, Typ i). So ist bei CPE-L254A/S256A/I258A/D284A die Affinität für das Rezeptorclaudin Cldn3 stark, die für andere getestete Rezeptorclaudine (Cldn4 aber auch Cldn6) nicht oder nur geringfügig reduziert (Abbildung 3-17). Der maximal mit einer gegebenen Konzentration CPE-L254A/S256A/I258A/D284A erzielbare toxische Effekt kann daher nie stärker als der des Wildtyps sein.

Idealerweise würde mit dieser CPE-Variante der über Cldn3-vermittelte Anteil an Nebenwirkungen wegfallen, ohne dass es zu einer Reduktion der Toxizität für hauptsächlich Cldn4-exprimierende Tumoren kommt. Tatsächlich zeigt sich allerdings bereits bei der Claudin-subtypspezifischen Toxizität auf Cldn4-exprimierende HEK-293-Zellen tendenziell ein reduzierter toxischer Effekt dieses Cldn4-Binders (etwa 4 mal höhere EC_{50} als für CPE-wt (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20). Entsprechend zeigt sich dann auch bei den *in vitro* Daten zur toxischen Wirksamkeit von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A auf die verschiedenen Karzinomzelllinien stets eine im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Toxizität. Ähnlich wie bei Cldn4-exprimierenden HEK-293-Zellen (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20) ist die EC_{50} von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A für die unterschiedlichen Karzinomzelllinien zwischen ca. 3 (LS174T-Zellen) und 14 (SW620-Zellen) bzw. 16 (SW480-Zellen) mal höher als die von CPE-wt (Abbildung 3-22).

Während bei einer für einige Zelllinien erhöhten oder gleichbleibenden toxischen Wirksamkeit klar beurteilbar wäre, ob CPE-L254A/S256A/I258A/D284A gegenüber CPE-wt vorteilhaft sein kann, ist hier die Beurteilung erschwert. Es scheint möglich, dass in bestimmten Tumor-Kontexten die gewonnene Spezifität trotz generell erniedrigter Toxizität einen Vorteil (reduzierte Nebenwirkungen) gegenüber nativem CPE darstellt. Anhand der vorliegenden Daten kann allerdings kein vielversprechender Tumor-Kontext identifiziert werden, sodass der potentielle Nutzen von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A als Tumorthapeutikum bislang als fraglich beurteilt werden muss.

Allerdings zeigt die zelltypspezifisch unterschiedlich stark reduzierte Toxizität von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A und der erfolgreiche Einsatz der entsprechenden cCPE-

Variante als analytisches Werkzeug, mit dem die Rolle von Cldn4 bei der Neuralrohrbildung in Hühnerembryonen unabhängig von Cldn3 charakterisiert werden konnte (Baumholtz *et al.*, 2017), dass CPE-Varianten mit der Mutation L254A/S256A/I258A/D284A generell erfolgreich zur Diskriminierung von Zellen eingesetzt werden können, die endogen Rezeptorclaudine exprimieren.

Um zukünftig das Potential zur Reduktion von Nebenwirkungen von CPE-Varianten die zwischen Rezeptorclaudinen diskriminieren, besser einschätzen zu können, wäre es sinnvoll mögliche Applikationsformen (z.B. systemisch oder intratumoral vgl. auch Abschnitt 4.2.6) von CPE mitzubedenken und entsprechend die Wirksamkeit auf Tumor- und nicht-entartetes Gewebe, mit dem CPE bei der gewählten Applikationsform in Kontakt kommt parallel zu testen. So könnte beispielsweise im Tiermodell getestet werden, ob die Mutation L254A/S256A/I258A/D284A ggf. die systemische Toxizität von CPE nach i.v. Gabe reduzieren kann, indem die cCPE/CPE-L254A/S256A/I258A/D284A-Anreicherung in der Leber mit der des Wildtyps verglichen wird. Vielversprechend könnte u.U. auch die intratumorale Applikation bzw. der Gentransfer von CPE-L254A/S256A/I258A/D284A im Zusammenhang mit Prostata Tumoren sein. Hier wurde Cldn4 als Tumormarker identifiziert (Landers *et al.*, 2008) wobei die Rezeptorclaudine Cldn3 und Cldn4 auch in nicht-entartetem Prostatagewebe exprimiert werden (Long *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2012). Nebenwirkungen auf nicht-entartetes Prostatagewebe und antitumorale Effektivität könnten nach intratumoraler Applikation (Shikanov *et al.*, 2009) von CPE-wt bzw. CPE-L254A/S256A/I258A/D284A in orthotropisch wachsenden, Cldn4 überexprimierenden Prostata Tumoren Xenograften (z.B. abgeleitet von PC3- oder LNCaP-Zellen (Landers *et al.*, 2008; Martikainen *et al.*, 2017; Tuomela *et al.*, 2009)) verglichen werden.

4.2.5 Targeting von Nicht-Rezeptorclaudinen mit CPE-Varianten als Option in der Tumorthherapie

Während die Mutation L254A/S256A/I258A/D284A die Claudinspezifität ausschließlich über eine selektive Affinitätsreduktion für ein Rezeptorclaudin erzielt, ist dies für die Mutationen S305P/S307R/S313H und Y306W/S313H nicht der Fall (vgl. Abbildung 4-1 C, Typ (ii) und (iii)). Sie bewirken eine Verschiebung der Claudin-Subtypspezifität indem die Affinität für bestimmte Nicht-Rezeptorclaudine (S305P/S307R/S313H: Cldn1 und -5 bzw. Y306W/S313H: Cldn5) im Vergleich zu nativem CPE/cCPE erhöhen (diese Arbeit Abbildung 3-17 und (Protze *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2012)). Daraus ergibt sich, dass ein potentieller Vorteil gegenüber CPE-wt eindeutig – über eine deutlich erhöhte Toxizität auf Nicht-Rezeptorclaudin exprimierende Zellen – beurteilt werden kann. In der Tat konnte *in vitro* gezeigt werden, dass entsprechende CPE-Varianten einen Angriff von Nicht-Rezeptorclaudin exprimierenden Tumoren erlauben, die so nicht mit nativem CPE möglich ist.

Die aus einem papillären Schilddrüsenkarzinom abgeleitete Zelllinie K1 (Challeton *et al.*, 1997), exprimiert hauptsächlich das Nicht-Rezeptorclaudin Cldn1 (vgl. Anhang Abbildung 8-5) und war insensitiv gegenüber CPE-wt. Hier konnte mit Cldn1 bindenden Varianten (S305P/S307R/S313H) bereits nach einer Stunde ein zytotoxischer Effekt erzielt werden. Allerdings waren dazu hohe Konzentrationen (≥ 255 nM) nötig. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h konnte die Konzentration deutlich reduziert werden (25,5 nM). Auf diesen Experimenten aufbauend, werden derzeit in Kooperation mit Anna Piontek *in vivo* Experimente an Mäusen durchgeführt. In ersten vielversprechenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass von K1-Zellen abgeleitete Xenotransplantate durch intratumorale Injektion Cldn1-bindender CPE-Varianten effektiv im Wachstum eingeschränkt wurden, was mit CPE-wt nicht gelungen ist. Hinweise auf Nebenwirkungen – wie beispielsweise die Schädigung umliegenden gesunden Gewebes – konnten bislang nicht festgestellt werden. Eine im Vergleich zu nativem CPE verstärkte Wirkung auf gesundes, benachbartes Gewebe auszuschließen ist wichtig, denn die bislang verfügbaren Nicht-Rezeptorclaudin-bindenden CPE-Varianten zeigen zwar eine erhöhte Affinität für Cldn1 und -5 reduzieren aber die über Rezeptorclaudine vermittelte Toxizität nicht (S305P/S307R/S313H) oder nur zum Teil (Y306W/S313H).

Eine hohe Expression von (größtenteils zellmembranär vorliegendem) Nicht-Rezeptorclaudin Cldn1 ist keine Besonderheit der K1-Zelllinie, sondern ist charakteristisch für papilläre Schilddrüsenkarzinome. Cldn1 wird in diesem Zusammenhang als Tumormarker gehandelt (Hucz *et al.*, 2006; Nemeth *et al.*, 2010; Tzelepi *et al.*, 2008), sodass Cldn1 angreifende CPE-Varianten bei der Bekämpfung papilläre Schilddrüsenkarzinome eingesetzt werden könnten. Zudem könnten Cldn1-bindende cCPE/CPE-basierte Therapeutika auch für die Detektion und Behandlung von Kolonadenomen, Kolonkarzinome und Metastasen davon verwendet werden. Denn auch hier konnte eine Überexpression von Cldn1 festgestellt werden (Broussard *et al.*, 2013; Dhawan *et al.*, 2005; Huo *et al.*, 2009; Rabinsky *et al.*, 2016).

Insbesondere solche CPE-Varianten, die Nicht-Rezeptorclaudine angreifen versprechen einen hohen therapeutischen Nutzen: die Angreifbarkeit ansonsten nicht mit CPE therapierbarer Tumoren. Dies konnte exemplarisch über die Angreifbarkeit der papilläre Thyroidkarzinomzelllinie K1 (hauptsächlich Nicht-Rezeptorclaudin Cldn1) und daraus abgeleiteten Xenotransplantaten in Mäusen (laufende Experimente in Kooperation mit Anna Piontek, Daten nicht gezeigt) mit Cldn1-bindenden CPE-Varianten gezeigt werden.

4.2.6 Aufeinander abgestimmte Applikationsform und Claudinspezifität versprechen den größtmöglichen Erfolg beim Einsatz cCPE/CPE-basierter Biologika

Versuche toxische cCPE/CPE-Varianten als Tumorthapeutika *in vivo* systemisch zu verabreichen scheitern an der systemischen Toxizität.

Bei Mäusen reicherte sich die nicht toxische Bindungsdomäne cCPE (etwa¹⁰ 0,07 mg/kg) nach intravenöser (i.v.) Gabe in Claudin exprimierenden Geweben – insbesondere Niere und Leber – an und bewirkte konjugiert mit dem Proteinsynthese-Inhibitor-Faktor (cCPE-PSIF) aus *Pseudomonas aeruginosa* bereits in geringen Dosen (0,01 mg/kg) Leberschäden und Gewichtsverlust (Li *et al.*, 2014). Eine weitere Studie zeigte, dass bei Anwesenheit von nativem CPE im Blutplasma die Leber massiv angegriffen wird (Caserta *et al.*, 2011).

Ebenfalls als problematisch erwies sich der Ansatz, hohe CPE-Dosen mit dem Ziel einer Resorption in die Zirkulation – also einer systemischen Wirksamkeit – in die Bauchhöhle (intraperitoneal (i.p.)) von Mäusen zu injizieren: 0,5 mg/ml CPE i.p. bewirkten starke Vergiftungssymptome (Kominsky *et al.*, 2004; Wallace *et al.*, 1999), ohne jedoch einen Einfluss auf die Größenzunahme subkutan wachsender Xenograft-Mammakarzinome zu zeigen (Kominsky *et al.*, 2004). Im selben Modell zeigte sich deutlich der Vorteil einer lokalen Applikation. Intratumoral appliziert führte die gleiche CPE-Dosis (0,5 mg/kg) zu einem deutlich reduzierten Tumorstadium ohne erkennbare Nebenwirkungen (Kominsky *et al.*, 2004).

Vor diesem Hintergrund wird CPE *in vivo* nicht systemisch, sondern zumeist lokal verabreicht. Dabei wird CPE direkt in subkutan oder intercranial wachsende Tumoren injiziert (Kominsky *et al.*, 2007; Kominsky *et al.*, 2004; Michl *et al.*, 2001), durch Suizidtherapie im Tumor selbst exprimiert und freigesetzt (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012) oder in geringeren Dosen (0,17 bis 0,28 mg/kg¹¹) i.p. injiziert, wodurch – wie im Mausmodell für chemotherapieresistente Ovarialtumoren gezeigt (Casagrande *et al.*, 2011; Santin *et al.*, 2005) – intraperitoneal wachsende/zugängliche Tumoren bekämpft werden können.

Wenn die Lokalisation des Tumors oder ggf. Metastasen unbekannt sind, ist eine lokale Applikation jedoch keine Alternative zur systemischen. Darüber hinaus stößt sie an ihre Grenzen, wenn in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tumor Rezeptorclaudin exprimierendes gesundes Gewebe vorliegt. Dies ist beispielweise bei Prostatatumoren der Fall, wo Cldn4 als ein wichtiger Tumormarker gilt (Landers *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2012). Hier könnte der Einsatz von möglichst spezifischen CPE-Varianten – wie die präferenziell Cldn4 bindende Variante CPE-L254A/S256A/I258A/D284A – vorteilhaft sein (vgl. auch Abschnitt 4.2.4)

¹⁰ 2 µg pro Maus (Li *et al.*, 2014) angenommenes Gewicht pro Maus 30 g.

¹¹ 5 bis 8,5 (Santin *et al.*, 2005) bzw. 7,5 µg (Casagrande *et al.*, 2011) pro Maus; angenommenes Gewicht pro Maus 30 g.

Darüber hinaus könnte eine lokale Applikation von CPE-Varianten im Rahmen endoskopischer Untersuchungen sinnvoll sein. Bestimmte Adenome gelten als Vorläufer von Karzinomen, die aufgrund einer unauffälligen flachen Wuchsform oft übersehen werden. Sie sind damit ein wichtiges Ziel bei der Früherkennung (Rabinsky *et al.*, 2016). Cldn1 wurde in diesem Zusammenhang als wichtiger Marker beschrieben (Broussard *et al.*, 2013; Dhawan *et al.*, 2005; Huo *et al.*, 2009; Rabinsky *et al.*, 2016) und ein Cldn1-bindendes Fluorophor(Cy5.5) gekoppeltes Peptid, das während der Endoskopie lokal appliziert wurde, konnte erfolgreich zur endoskopischen Detektion Cldn1 überexprimierender Adenome in Mäusen eingesetzt werden (Rabinsky *et al.*, 2016). In ähnlicher Weise könnten Cldn1-bindenden cCPE-Varianten – wie cCPE-S305P/S307R/S313H – zur Detektion und entsprechende toxische CPE-Varianten zur Bekämpfung / Unterstützung der Bekämpfung von Adenomen und Karzinomen endoskopisch appliziert werden.

Insgesamt könnten CPE-Varianten mit einer möglichst gut auf den jeweiligen Tumor und die jeweilige Applikation zugeschnittene Spezifität sowohl bei systemischer als auch bei lokaler Applikation vorteilhaft eingesetzt werden.

4.2.7 Vorteile CPE-basierter Ansätze bei der Entwicklung neuartiger Tumortheraeutika und Diagnostika

Wichtige Ansätze zur Entwicklung neuer Tumortheraeutika sind (i) Immuntherapie und Immunisierung gegen Tumorantigene, (ii) Gentherapie und (iii) Ansätzen, die – wie CPE-basierte Strategien – darauf abzielen Tumoren direkt über die spezifische molekulare Interaktion mit Zielproteinen in der Plasmamembran des Tumors anzugreifen. Besonders großes Potential haben CPE-basierte Strategien aufgrund ihrer vielfältigen Einsetzbarkeit, die für CPE-wt- bzw. cCPE-wt-basierte Varianten bereits gezeigt wurde. So können CPE-basierte Chemotherapeutika als Vollängen-CPE (Kominsky *et al.*, 2007; Michl *et al.*, 2001) oder Fusionsproteine aus cCPE und unterschiedlichen – möglicherweise für verschiedene Anwendungen optimierten – zytotoxischen Domänen (Ebihara *et al.*, 2006; Saeki *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009) eingesetzt werden. Auch eine Erhöhung der Tumorspezifität durch den Einsatz von CPE als tumorspezifisch, proteolytisch aktiviertes Protoxin (Romanov *et al.*, 2014) wurde gezeigt. Außerdem ist die Möglichkeit einer Suizidgentherapie (Pahle *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2012) (vgl. auch Abschnitt 1.6.2) und der Einsatz markierten cCPEs als Diagnostikum gegeben. Cy5.5 bzw. FITC oder Nah-Infrarot markiertes cCPE konnte eingesetzt werden, um Rezeptorclaudin exprimierende, subkutan wachsende Pankreaskarzinom (Neesse *et al.*, 2013) bzw. intraperitoneal wachsende Ovarialkarzinom Xenografte (Cocco *et al.*, 2015) in Mäusen zu detektieren. Bei optischer basierter Detektion ist allerdings die Detektionstiefe grundsätzlich limitiert durch die Penetrationstiefe von Licht in Gewebe. Radioaktiv (¹¹¹In) markiertes cCPE stellt hier eine Alternative dar und wurde erfolgreich zur Detektion von Mammakarzinomen in einem Mausmodell eingesetzt (Mosley

et al., 2015). Eine hohe Eindringtiefe ohne radioaktive Belastung wäre mit cCPE als Biosensor für die Magnetresonanztomographie (MRT) möglich. Hier konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Leif Schröder (Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Berlin, DE) ein cCPE-basierter Xenon Biosensor generiert werden, der selektiv an Cldn4-exprimierende HEK-293-Zellen bindet (Piontek *et al.*, 2017b). Darüber hinaus kann cCPE aufgrund der Rolle von Claudinen bei der Abdichtung von Gewebearbarrieren auch genutzt werden, um die Sensitivität von Tumoren gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika zu erhöhen (Gao *et al.*, 2011).

Alternativ zu CPE-basierten Therapeutika und Diagnostika könnten Antikörper, die gegen die extrazellulär zugänglichen Bereiche von Claudinen (EZS1 und 2) gerichtet sind, für den Angriff und die Detektion Claudin exprimierender Tumoren eingesetzt werden.

Bereits erfolgreich in klinischen Studien bei Patienten mit Magenkrebs getestet, wurde Claudiximab – ein Antikörper (murin IgG; humanisiert für therapeutische Zwecke), der gegen Isoform 2 von Cldn18 (Cldn18.2) gerichtet ist (Singh *et al.*, 2017). Zielprotein Cldn18.2 ist in den Zellen primärer und metastatischer Magenkarzinome, aber nicht in Zellen der Magen-Stammzellzone exprimiert. Darüber hinaus ist Cldn18.2 auch in Pankreas-, Ösophagus-, Ovarial- und Lungenkarzinomen aber kaum in normalen Geweben exprimiert, sodass Claudiximab bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen Anwendung finden könnte (Sahin *et al.*, 2008). Auch Claudin-subtypspezifische Antikörper (IgG) gegen die extrazellulären Schleifen von Cldn3 (Ando *et al.*, 2015) und -4 wurden beschrieben und deren antitumorale Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* in Xenograft Maus-Modellen nachgewiesen (Hashimoto *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2009). Anders als bei den bislang mit CPE-basierten Therapeutika durchgeführten *in vivo* Studien, waren bei systemischer Gabe von Antikörpern keine starken systemischen Nebenwirkungen erkennbar (Hashimoto *et al.*, 2016; Kato-Nakano *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2009). Die Aktivierung der antikörperabhängigen zellvermittelten und auch der komplementabhängigen Zytotoxizität durch diese anti-Cldn Antikörper (Kato-Nakano *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2009) scheint die Tumor-inhibierende Wirksamkeit zu vermitteln, sodass eine Kopplung des Antikörpers an weitere toxische Module nicht nötig ist.

Auch Biosensoren, die auf anti-Cldn Antikörpern basieren, wurden beschrieben. Kommerziell erhältliche anti-Cldn4 Antikörper (IgG) konnten nach Radioisotopenmarkierung in Mäusen i.v. zur Detektion subkutan (Foss *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2017) oder orthotropisch (Foss *et al.*, 2007) wachsender Xenotransplantate von Cldn4-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen eingesetzt werden. Allerdings zeigte sich jeweils ein eher geringes Tumor-zu-Hintergrund Signal mit unspezifischer Anreicherung des Antikörpers in Leber und Milz (Foss *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2017). Der Einsatz kleinerer Antikörperfragmente könnte hier vorteilhaft sein, da die Blut-Clearance und renale Elimination schneller vonstattengehen (Holliger und Hudson, 2005).

Zwar sind diese Studien zum Einsatz von anti-Cldn-EZS Antikörpern als Tumorthapeutika und Biosensoren vielversprechend. Allerdings ist die Generierung weiterer neuer anti-Cldn-EZS Antikörper mittels klassischer Hybridoma-Technik aufgrund der hohen Hydrophobizität (Membranprotein) und geringen Immunogenizität (kurze extrazelluläre Domänen und hohe Sequenzähnlichkeit zwischen Spezies (Mineta *et al.*, 2011)) nicht trivial. Auf CPE-basierende Therapeutika können hingegen entweder durch Selektion im Phagen-Display oder durch gezielte strukturelle Modifikation im Hinblick auf ihre Claudin-Subtypspezifität optimiert werden. Und ein zunehmend detaillierteres Verständnis zur CPE-Cldn Interaktion verspricht die strukturgeleitete Optimierung von CPE-Varianten zukünftig weiter verbessern zu können. Ein weiterer entscheidender Vorteil CPE-basierter Tumorthapeutika ist der vergleichsweise geringe und kostengünstige Produktionsaufwand. Denn während CPE-Varianten bakteriell exprimiert werden können, müssen Antikörper zumeist aufwendig in Säugerzellen produziert werden.

Allerdings konnten Claudin-bindende scFv-Fragmente, die über ein Phagen-Display gegen ein Cldn3-EZS2 Peptid selektioniert wurden, in großem Maßstab in *E. coli* exprimiert werden und erfolgreich für die zielgerichtete Bindung an Cldn3-exprimierende Karzinomzellen verwendet werden (Romani *et al.*, 2009). Möglicherweise könnten solche scFv-Fragmente – ähnlich wie cCPE – nicht nur gegen EZS2-Peptide, sondern auch gegen ganze Claudin exprimierende Zellen (*whole cell panning* (Jones *et al.*, 2016; Molek *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2008)) selektioniert und die Claudin-Subtypspezifität mittels negativer Selektion sichergestellt werden. Aufgrund der Expression in *E. coli* wären die Produktionskosten konkurrenzfähig und der Einsatz der anti-Cldn scFv-Fragmente als Bindungsmodul konjugiert mit Chemotherapeutika, Toxinen oder Biosensoren in der Tumorthherapie und Diagnostik möglich. Gegenüber cCPE hätten sie zusätzlich den Vorteil einer geringeren Immunogenizität.

Aufgrund der gegebenen Sequenz- und Strukturähnlichkeit vieler Claudine in dem Bereich, der mit CPE interagiert (Eichner *et al.*, 2017; Krause *et al.*, 2015; Shinoda *et al.*, 2016) kann über Antikörper wahrscheinlich eine höhere Claudin-Subtypspezifität erzielt werden, Ob dies allerdings tatsächlich vorteilhaft, d.h. gleichbedeutend mit einer erhöhten Tumorspezifität ist, bleibt fraglich. Möglicherweise könnte es sogar von Vorteil sein, dass CPE-Varianten über ein relativ breites Claudin-Spektrum wirken. Denn wenn eine CPE-Variante und das durch sie abgedeckte Claudin-Spektrum optimal auf die Claudin-Expression eines gegebenen Tumors abgestimmt ist, könnte über eine optimale Ausnutzung der im Zielgewebe zur Verfügung stehenden Rezeptoren der toxische Effekt auf den Tumor maximiert werden ohne dabei in gleichem Maße die Wirkung auf gesundes Gewebe zu erhöhen. Idealerweise stünden hierfür etliche CPE-Varianten mit breiten aber jeweils charakteristischen und gut charakterisierten Claudinbindungs- und Toxizitätsspektren zur Verfügung.

4.3 Fazit

Diese Arbeit zeigt, dass eine intakte TJ, wie sie in ausdifferenzierten intestinalen Epithelien vorliegt, vor einer CPE-bedingten Schädigung schützt. Die toxische Wirkung von CPE vermittelt sich nicht über CPE-Rezeptorclaudine (wie Cldn4), die in die TJ inkorporiert sind. Hierdurch wird die CPE-Sensitivität im epithelialen Zellverband auf eine (kleine) Subpopulation von Zellen beschränkt (vgl. Abschnitt 3.1.3.1 und 3.1.9), die sich durch apikal in der Plasmamembran vorliegendes Claudin-4 auszeichnet (vgl. Abschnitt 3.1.4 und 4.1.3). Möglicherweise handelt es sich dabei um Zonen der Zell-Verdrängung im Rahmen epithelialer Zellerneuerungsprozesse, die CPE nutzt, um Zugang zu seinen ansonsten unzugänglich in den Zell-Zellkontakten bzw. basal vorliegenden Rezeptoren zu erhalten (vgl. Abschnitt 4.1.4). Hierbei könnte es sich um einen allgemein von Pathogenen genutzten Mechanismus handeln, denn für *Listeria monocytogenes* (Pentecost *et al.*, 2006) und *Pseudomonas aeruginosa* (Golovkine *et al.*, 2016) wurde Ähnliches berichtet.

Im Zusammenhang mit chronisch entzündliche Darmerkrankungen und anderen GI-Pathologien, die durch eine erhöhte Zellerneuerungsrate bzw. Barrieredefekte gekennzeichnet sind, könnte eine erhöhte Zugänglichkeit von CPE-Rezeptoren außerhalb der TJ zu einer Manifestation des klinischen Erscheinungsbildes beitragen (vgl. Abschnitt 4.1.5).

Andererseits kann der Zusammenhang von erhöhter Claudin-Zugänglichkeit und CPE-Sensitivität auch von Nutzen in der Krebstherapie und -diagnostik sein. Am Beispiel dedifferenzierter HT-29- und stark differenzierter HT-29/B6-Zellen wurde hier gezeigt, dass eine Dedifferenzierung – wie sie häufig im Rahmen der Karzinogenese erfolgt – mit einer erhöhten Sensitivität für die Claudin-vermittelte Toxizität von CPE einhergeht (vgl. Abschnitt 3.1.6.1 und 3.1.7). Neben vorhandenem Claudin-Expressionsprofil und -niveau bestimmt so auch der Dedifferenzierungsgrad über die CPE-Sensitivität des Zieltumors. Während diese Faktoren durch den jeweiligen Tumor vorgegeben und nicht beeinflussbar sind, konnte hier gezeigt werden, dass die claudinspezifische Toxizität von CPE gezielt über Mutationen in der Claudin-Bindungstasche verändert und optimiert werden kann (vgl. Abschnitt 3.2.2 und 4.2.2). So könnten einerseits Nebenwirkungen reduziert werden, andererseits ist es erstmals gelungen, Tumorzellen, die vor Allem Nicht-Rezeptorclaudine exprimieren und daher insensitiv gegenüber CPE-wt sind, durch eine CPE-Variante anzugreifen (vgl. Abschnitt 3.2.5.2 und 4.2.5). Die hierzu erhaltenen *in vitro*-Daten werden derzeit durch *in vivo*-Experimente ergänzt, die bislang vielversprechend sind.

Kurz- und mittelfristig scheint besonders eine Verwendung von cCPE/CPE-Varianten zur Detektion und Bekämpfung von Tumoren über Nicht-Rezeptorclaudine vielversprechend. Insbesondere wenn – wie zur Detektion und Bekämpfung Cldn1 überexprimierender Kolonadenome (Broussard *et al.*, 2013; Dhawan *et al.*, 2005; Huo *et al.*, 2009; Rabinsky *et*

al., 2016) im Rahmen einer Koloskopie (vgl. Abschnitt 4.2.5 und 4.2.6) – eine lokale Applikation möglich ist.

Eine systemische Applikation CPE-basierter Ansätze scheint zum derzeitigen Zeitpunkt nur sinnvoll, wenn es gelingt, die Spezifität für Tumoren weiter zu erhöhen (vgl. Abschnitt 4.2.6). Dies ist nicht zwingend gleichbedeutend mit der Erhöhung der Spezifität für einzelne Claudin-Subtypen, wie sie möglicherweise einfacher mit Antikörpern zu erzielen wäre. Vielmehr sind Strategien, bei welchen Tumoren über mehr Faktoren als die Zugänglichkeit eines einzigen Claudin-Subtyps identifiziert werden, sinnvoll. Vor diesem Hintergrund ist die Eigenschaft der bislang charakterisierten CPE-Varianten stets über ein charakteristisches Claudin-Spektrum – bestehend aus mehreren Subtypen – zu wirken, vorteilhaft. Um die Tumorspezifität noch weiter zu erhöhen, könnten zusätzlich weitere Charakteristika von Tumorzellen miteinbezogen werden. So könnte die Bindungsspezifität der CPE-Varianten mit einer toxischen Aktivität die durch tumorspezifischen Proteasen aktiviert wird, kombiniert werden; CPE-Varianten also als Protoxine mit entsprechender Schnittstelle (Romanov *et al.*, 2014) eingesetzt werden. Möglicherweise wäre diese Strategie nicht nur zu therapeutischen Zwecken, sondern auch zur Reduktion des Hintergrundes bei der Verwendung CPE-basierter Diagnostika einsetzbar, denn entsprechende proteaseaktivierte Fluoreszenzfarbstoffe sind beschrieben (Kobayashi und Choyke, 2011). Für eine möglichst effektive und nebenwirkungsarme CPE-basierte Therapie könnten in Zukunft idealerweise die Applikationsformen (systemisch, lokal, Gentransfer), der toxische Mechanismus und die Claudinspezifität des verwendeten Toxins aufeinander abgestimmt werden. Dabei können – je nach Claudinprofil des Tumors und bei der gewählten Applikationsform für CPE zugänglichen Claudinen im gesunden Gewebe – CPE-Varianten mit ganz unterschiedlichen Claudin-Bindungsspektren ideal sein.

5 Literatur

- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2002). **Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells.** *J Cell Sci* 115, 4969-4976.
- Ando, H., Suzuki, M., Kato-Nakano, M., Kawamoto, S., Misaka, H., Kimoto, N., Furuya, A. und Nakamura, K. (2015). **Generation of specific monoclonal antibodies against the extracellular loops of human claudin-3 by immunizing mice with target-expressing cells.** *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 1272-1279.
- Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C. und Imhof, B. A. (2001). **JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells.** *J Biol Chem* 276, 2733-2741.
- Balda, M. S. und Matter, K. (2000). **The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression.** *EMBO J* 19, 2024-2033.
- Baumholtz, A. I., Simard, A., Nikolopoulou, E., Oosenbrug, M., Collins, M. M., Piontek, A., Krause, G., Piontek, J., Greene, N. D. E. und Ryan, A. K. (2017). **Claudins are essential for cell shape changes and convergent extension movements during neural tube closure.** *Dev Biol* 428, 25-38.
- Beduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F. und Lamprecht, A. (2014). **A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure.** *Eur J Pharm Biopharm* 87, 290-298.
- Ben-David, U., Nudel, N. und Benvenisty, N. (2013). **Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells.** *Nat Commun* 4, 1992.
- Blander, J. M. (2016). **Death in the intestinal epithelium-basic biology and implications for inflammatory bowel disease.** *FEBS J* 283, 2720-2730.
- Bos, J., Smithee, L., McClane, B., Distefano, R. F., Uzal, F., Songer, J. G., Mallonee, S. und Crutcher, J. M. (2005). **Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection.** *Clin Infect Dis* 40, E78-E83.
- Briggs, D. C., Naylor, C. E., Smedley, J. G., III, Lukoyanova, N., Robertson, S., Moss, D. S., McClane, B. A. und Basak, A. K. (2011). **Structure of the Food-Poisoning *Clostridium perfringens* Enterotoxin Reveals Similarity to the Aerolysin-Like Pore-Forming Toxins.** *J.Mol.Biol.* 413, 138-149.
- Broussard, E. K., Kim, R., Wiley, J. C., Marquez, J. P., Annis, J. E., Pritchard, D. und Disis, M. L. (2013). **Identification of putative immunologic targets for colon cancer prevention based on conserved gene upregulation from preinvasive to malignant lesions.** *Cancer Prev Res (Phila)* 6, 666-674.
- Bücker, R., Schulz, E., Günzel, D., Bojarski, C., Lee, I. F., John, L. J., Wiegand, S., Janssen, T., Wieler, L. H., Dobrindt, U., Beutin, L., Ewers, C., Fromm, M., Siegmund, B., Troeger, H. und Schulzke, J. D. (2014). **alpha-Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon.** *Gut* 63, 1893-1901.
- Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F. und Old, L. J. (1976). **Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3278-3282.
- Carman, R. J. (1997). ***Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals.** *Rev Med Microbiol* 8, S43-S45.

- Casagrande, F., Cocco, E., Bellone, S., Richter, C. E., Bellone, M., Todeschini, P., Siegel, E., Varughese, J., Arin-Silasi, D., Azodi, M., Rutherford, T. J., Pecorelli, S., Schwartz, P. E. und Santin, A. D. (2011). **Eradication of chemotherapy-resistant CD44+ human ovarian cancer stem cells in mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin.** *Cancer* 117, 5519-5528.
- Caserta, J. A., Robertson, S. L., Saputo, J., Shrestha, A., McClane, B. A. und Uzal, F. A. (2011). **Development and application of a mouse intestinal loop model to study the in vivo action of Clostridium perfringens enterotoxin.** *Infect Immun* 79, 3020-3027.
- Centers for Disease, C. und Prevention (2012). **Fatal foodborne Clostridium perfringens illness at a state psychiatric hospital--Louisiana, 2010.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 61, 605-608.
- Chae, M. C., Park, C. K., Keum, D. Y., Hwang, I., Kwon, K. Y. und Jang, B. C. (2014). **Prognostic significance of claudin 4 in completely resected adenocarcinoma of the lung.** *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 47, 262-268.
- Chakrabarti, G. und McClane, B. A. (2005). **The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by Clostridium perfringens enterotoxin.** *Cell Microbiol* 7, 129-146.
- Chakrabarti, G., Zhou, X. und McClane, B. A. (2003). **Death pathways activated in CaCo-2 cells by Clostridium perfringens enterotoxin.** *Infect Immun* 71, 4260-4270.
- Chen, J., Ma, M., Uzal, F. A. und McClane, B. A. (2014). **Host cell-induced signaling causes Clostridium perfringens to upregulate production of toxins important for intestinal infections.** *Gut Microbes* 5, 96-107.
- Chen, J., Theoret, J. R., Shrestha, A., Smedley, J. G., 3rd und McClane, B. A. (2012). **Cysteine-scanning mutagenesis supports the importance of Clostridium perfringens enterotoxin amino acids 80 to 106 for membrane insertion and pore formation.** *Infect Immun* 80, 4078-4088.
- Chen, W., Tabor, S. und Struhl, K. (1987). **Distinguishing between mechanisms of eukaryotic transcriptional activation with bacteriophage T7 RNA polymerase.** *Cell* 50, 1047-1055.
- Choi, Y. L., Kim, J., Kwon, M. J., Choi, J. S., Kim, T. J., Bae, D. S., Koh, S. S., In, Y. H., Park, Y. W., Kim, S. H., Ahn, G. und Shin, Y. K. (2007). **Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic correlation.** *Histol Histopathol* 22, 1185-1195.
- Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B. und Kendrick-Jones, J. (1988). **Cingulin, a new peripheral component of tight junctions.** *Nature* 333, 272-276.
- Cocco, E., Shapiro, E. M., Gasparrini, S., Lopez, S., Schwab, C. L., Bellone, S., Bortolomai, I., Sumi, N. J., Bonazzoli, E., Nicoletti, R., Deng, Y., Saltzman, W. M., Zeiss, C. J., Centritto, F., Black, J. D., Silasi, D. A., Ratner, E., Azodi, M., Rutherford, T. J., Schwartz, P. E., Pecorelli, S. und Santin, A. D. (2015). **Clostridium perfringens enterotoxin C-terminal domain labeled to fluorescent dyes for in vivo visualization of micrometastatic chemotherapy-resistant ovarian cancer.** *Int J Cancer* 137, 2618-2629.
- Copeland, R. A., Pompliano, D. L. und Meek, T. D. (2006). **Drug-target residence time and its implications for lead optimization.** *Nat Rev Drug Discov* 5, 730-739.
- D'Atri, F. und Citi, S. (2001). **Cingulin interacts with F-actin in vitro.** *FEBS Lett* 507, 21-24.
- D'Souza, T., Agarwal, R. und Morin, P. J. (2005). **Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells.** *J Biol Chem* 280, 26233-26240.
- de Oliveira, S. S., de Oliveira, I. M., De Souza, W. und Morgado-Diaz, J. A. (2005). **Claudins upregulation in human colorectal cancer.** *FEBS Lett* 579, 6179-6185.

- Dhawan, P., Singh, A. B., Deane, N. G., No, Y., Shiou, S. R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M. K. und Beauchamp, R. D. (2005). **Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer.** *J Clin Invest* 115, 1765-1776.
- Diamond, J. M. (1977). **Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence.** *Physiologist* 20, 10-18.
- Drewinko, B., Yang, L. Y., Barlogie, B., Romsdahl, M., Meistrich, M., Malahy, M. A. und Giovanella, B. (1978). **Further biologic characteristics of a human carcinoembryonic antigen-producing colon carcinoma cell line.** *J Natl Cancer Inst* 61, 75-83.
- Duncan, C. L., Sugiyama, H. und Strong, D. H. (1968). **Rabbit Ileal Loop Response to Strains of Clostridium Perfringens.** *J Bacteriol* 95, 1560-&.
- Ebihara, C., Kondoh, M., Harada, M., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S., Horiguchi, Y., Yagi, K. und Watanabe, Y. (2007). **Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin for modulation of tight junction.** *Biochem Pharmacol* 73, 824-830.
- Ebihara, C., Kondoh, M., Hasuike, N., Harada, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y., Fujii, M. und Watanabe, Y. (2006). **Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin.** *J Pharmacol Exp Ther* 316, 255-260.
- Eichner, M., Protze, J., Piontek, A., Krause, G. und Piontek, J. (2017). **Targeting and alteration of tight junctions by bacteria and their virulence factors such as Clostridium perfringens enterotoxin.** *Pflugers Arch* 469, 77-90.
- Fanning, A. S., Ma, T. Y. und Anderson, J. M. (2002). **Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1.** *FASEB J* 16, 1835-1837.
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E. (1963). **Junctional complexes in various epithelia.** *J Cell Biol* 17, 375-412.
- Fernandez Miyakawa, M. E., Pistone Creydt, V., Uzal, F. A., McClane, B. A. und Ibarra, C. (2005). **Clostridium perfringens enterotoxin damages the human intestine in vitro.** *Infect Immun* 73, 8407-8410.
- Fogh, J., Wright, W. C. und Loveless, J. D. (1977). **Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.** *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- Foss, C. A., Fox, J. J., Feldmann, G., Maitra, A., Iacobuzio-Donohue, C., Kern, S. E., Hruban, R. und Pomper, M. G. (2007). **Radiolabeled anti-claudin 4 and anti-prostate stem cell antigen: initial imaging in experimental models of pancreatic cancer.** *Mol Imaging* 6, 131-139.
- Freedman, J. C., Shrestha, A. und McClane, B. A. (2016). **Clostridium perfringens Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications.** *Toxins (Basel)* 8.
- 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, 933-944.
- Fujita, K., Katahira, J., Horiguchi, Y., Sonoda, N., Furuse, M. und Tsukita, S. (2000). **Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein.** *FEBS Lett* 476, 258-261.
- 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, 1539-1550.
- 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, 1777-1788.

- 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.
- Gao, Z., Xu, X., McClane, B., Zeng, Q., Litkouhi, B., Welch, W. R., Berkowitz, R. S., Mok, S. C. und Garner, E. I. (2011). **C terminus of Clostridium perfringens enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin.** *Clin Cancer Res* 17, 1065-1074.
- Garcia, J. P., Li, J., Shrestha, A., Freedman, J. C., Beingesser, J., McClane, B. A. und Uzal, F. A. (2014). **Clostridium perfringens type A enterotoxin damages the rabbit colon.** *Infect Immun* 82, 2211-2218.
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Elsen, S., Attree, I. und Huber, P. (2016). **Pseudomonas aeruginosa Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion.** *PLoS Pathog* 12, e1005377.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977). **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Guan, Y., Watson, A. J., Marchiando, A. M., Bradford, E., Shen, L., Turner, J. R. und Montrose, M. H. (2011). **Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C1404-1414.
- Guillemot, L. und Citi, S. (2006). **Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA.** *Mol Biol Cell* 17, 3569-3577.
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T. und Apatira, D. (1991). **Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3460-3464.
- Günzel, D. und Yu, A. S. (2013). **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** *Physiol Rev* 93, 525-569.
- Hanna, P. C., Mietzner, T. A., Schoolnik, G. K. und McClane, B. A. (1991). **Localization of the Receptor-Binding Region of Clostridium-Perfringens Enterotoxin Utilizing Cloned Toxin Fragments and Synthetic Peptides - the 30 C-Terminal Amino-Acids Define A Functional Binding Region.** *J Biol Chem* 266, 11037-11043.
- Harada, M., Kondoh, M., Ebihara, C., Takahashi, A., Komiya, E., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S., Horiguchi, Y., Yagi, K. und Watanabe, Y. (2007). **Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin.** *Biochem Pharmacol* 73, 206-214.
- Hardy, S. P., Denmead, M., Parekh, N. und Granum, P. E. (1999). **Cationic currents induced by Clostridium perfringens type A enterotoxin in human intestinal CaCO-2 cells.** *J Med Microbiol* 48, 235-243.
- Hashimoto, Y., Kawahigashi, Y., Hata, T., Li, X., Watari, A., Tada, M., Ishii-Watabe, A., Okada, Y., Doi, T., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K. und Kondoh, M. (2016). **Efficacy and safety evaluation of claudin-4-targeted antitumor therapy using a human and mouse cross-reactive monoclonal antibody.** *Pharmacol Res Perspect* 4, e00266.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. und Stevenson, B. R. (1998). **ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin.** *J Cell Biol* 141, 199-208.
- Hatheway, C. L. (1990). **Toxicogenic clostridia.** *Clin Microbiol Rev* 3, 66-98.
- Heikinheimo, A., Lindstrom, M., Granum, P. E. und Korkeala, H. (2006). **Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying Clostridium perfringens type A.** *Emerg Infect Dis* 12, 1724-1729.

- Hernandez, S., Chavez Munguia, B. und Gonzalez-Mariscal, L. (2007). **ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture.** *Exp Cell Res* 313, 1533-1547.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J. und Borchardt, R. T. (1989). **Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.** *Gastroenterology* 96, 736-749.
- Holliger, P. und Hudson, P. J. (2005). **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** *Nat Biotechnol* 23, 1126.
- Horiguchi, Y., Uemura, T., Kozaki, S. und Sakaguchi, G. (1986). **Effects of Ca-2+ and Other Cations on the Action of Clostridium-Perfringens Enterotoxin.** *Biochim Biophys Acta* 889, 65-71.
- Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., Waldegger, S. und Goodenough, D. A. (2008). **Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex.** *J Clin Invest* 118, 619-628.
- 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 USA* 107, 18010-18015.
- Hua, V. B., Chang, A. B., Tchieu, J. H., Kumar, N. M., Nielsen, P. A. und Saier, M. H. (2003). **Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: Connexins, innexins, claudins and occludins.** *J Membr Biol* 194, 59-76.
- Hucz, J., Kowalska, M., Jarzab, M. und Wiench, M. (2006). **Gene expression of metalloproteinase 11, claudin 1 and selected adhesion related genes in papillary thyroid cancer.** *Endokrynol Pol* 57 Suppl A, 18-25.
- Huo, Q., Kinugasa, T., Wang, L., Huang, J., Zhao, J., Shibaguchi, H., Kuroki, M., Tanaka, T., Yamashita, Y., Nabeshima, K., Iwasaki, H. und Kuroki, M. (2009). **Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer.** *Anticancer Res* 29, 851-857.
- Iacovache, I., De Carlo, S., Cirauqui, N., Dal Peraro, M., van der Goot, F. G. und Zuber, B. (2016). **Cryo-EM structure of aerolysin variants reveals a novel protein fold and the pore-formation process.** *Nat Commun* 7, 12062.
- 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* 171, 939-945.
- 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, 1351-1363.
- Itoh, M., Yonemura, S., Nagafuchi, A., Tsukita, S. und Tsukita, S. (1991). **A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites.** *J Cell Biol* 115, 1449-1462.
- Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Holmen-Larsson, J., Jabbar, K. S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F. K., Carvalho, F. A., Gewirtz, A. T., Sjovall, H. und Hansson, G. C. (2014). **Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis.** *Gut* 63, 281-291.
- Jones, M. L., Alfaleh, M. A., Kumble, S., Zhang, S., Osborne, G. W., Yeh, M., Arora, N., Hou, J. J., Howard, C. B., Chin, D. Y. und Mahler, S. M. (2016). **Targeting membrane proteins for antibody discovery using phage display.** *Sci Rep* 6, 26240.
- Jung, J. H., Jung, C. K., Choi, H. J., Jun, K. H., Yoo, J., Kang, S. J. und Lee, K. Y. (2009). **Diagnostic utility of expression of claudins in non-small cell lung cancer: Different expression**

- profiles in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas.** *Pathol Res Pract* 205, 409-416.
- Katahira, J., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1997a). **Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin.** *J Cell Biol* 136, 1239-1247.
- Katahira, J., Sugiyama, H., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1997b). **Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo.** *J Biol Chem* 272, 26652-26658.
- Kato-Nakano, M., Suzuki, M., Kawamoto, S., Furuya, A., Ohta, S., Nakamura, K. und Ando, H. (2010). **Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4.** *Anticancer Res* 30, 4555-4562.
- Kimbung, S., Kovacs, A., Bendahl, P. O., Malmstrom, P., Ferno, M., Hatschek, T. und Hedenfalk, I. (2014). **Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences.** *Mol Oncol* 8, 119-128.
- Kimura, J., Abe, H., Kamitani, S., Toshima, H., Fukui, A., Miyake, M., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S. und Horiguchi, Y. (2010). **Clostridium perfringens Enterotoxin Interacts with Claudins via Electrostatic Attraction.** *J Biol Chem* 285, 401-408.
- Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S., Karatani, H. und Horiguchi, Y. (2011). **Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of {beta}-pore-forming toxins.** *J Biol Chem* 286, 19549-19555.
- 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, 875-886.
- Kobayashi, H. und Choyke, P. L. (2011). **Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications.** *Acc Chem Res* 44, 83-90.
- Kokai-Kun, J. F., Benton, K., Wieckowski, E. U. und McClane, B. A. (1999). **Identification of a Clostridium perfringens enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis.** *Infect Immun* 67, 5634-5641.
- Kokai-Kun, J. F. und McClane, B. A. (1997). **Deletion analysis of the Clostridium perfringens enterotoxin.** *Infect Immun* 65, 1014-1022.
- Kominsky, S. L., Tyler, B., Sosnowski, J., Brady, K., Doucet, M., Nell, D., Smedley, J. G., III, McClane, B., Brem, H. und Sukumar, S. (2007). **Clostridium perfringens enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis.** *Cancer Res* 67, 7977-7982.
- Kominsky, S. L., Vali, M., Korz, D., Gabig, T. G., Weitzman, S. A., Argani, P. und Sukumar, S. (2004). **Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4.** *Am J Pathol* 164, 1627-1633.
- Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., Asano, N., Mizuguchi, H., Koizumi, N., Fujii, M., Hayakawa, T., Horiguchi, Y. und Watanbe, Y. (2005). **A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator.** *Mol Pharmacol* 67, 749-756.
- Krause, G., Protze, J. und Piontek, J. (2015). **Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures.** *Semin Cell Dev Biol* 42, 3-12.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J. und Blasig, I. E. (2008). **Structure and function of claudins** *Biochim Biophys Acta* 1778, 631-645.

- Kreusel, K. M., Fromm, M., Schulzke, J. D. und Hegel, U. (1991). **Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)**. *Am J Physiol* 261, C574-582.
- Krug, S. M., Fromm, M. und Günzel, D. (2009). **Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance**. *Biophys J* 97, 2202-2211.
- Krug, S. M., Günzel, D., Conrad, M. P., Rosenthal, R., Fromm, A., Amasheh, S., Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2012). **Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity**. *Cell Mol Life Sci* 69, 2765-2778.
- Kwon, M. J. (2013). **Emerging roles of claudins in human cancer**. *Int J Mol Sci* 14, 18148-18180.
- Kwon, M. J., Kim, S. H., Jeong, H. M., Jung, H. S., Kim, S. S., Lee, J. E., Gye, M. C., Erkin, O. C., Koh, S. S., Choi, Y. L., Park, C. K. und Shin, Y. K. (2011). **Claudin-4 overexpression is associated with epigenetic derepression in gastric carcinoma**. *Lab Invest* 91, 1652-1667.
- Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227, 680-685.
- Landers, K. A., Samaratinga, H., Teng, L., Buck, M., Burger, M. J., Scells, B., Lavin, M. F. und Gardiner, R. A. (2008). **Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer**. *Br J Cancer* 99, 491-501.
- Lanigan, F., McKiernan, E., Brennan, D. J., Hegarty, S., Millikan, R. C., McBryan, J., Jirstrom, K., Landberg, G., Martin, F., Duffy, M. J. und Gallagher, W. M. (2009). **Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer**. *Int J Cancer* 124, 2088-2097.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C. und Mabry, N. D. (1976). **Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines**. *Cancer Res* 36, 4562-4569.
- Li, X., Saeki, R., Watari, A., Yagi, K. und Kondoh, M. (2014). **Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin**. *Eur J Pharm Sci* 52, 132-137.
- Liao, Z., Yang, Z., Piontek, A., Eichner, M., Krause, G., Li, L., Piontek, J. und Zhang, J. (2016). **Specific binding of a mutated fragment of Clostridium perfringens enterotoxin to endothelial claudin-5 and its modulation of cerebral vascular permeability**. *Neuroscience* 327, 53-63.
- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M. und Todaro, G. (1975). **Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas**. *Int J Cancer* 15, 741-747.
- Lima, W. R., Parreira, K. S., Devuyst, O., Caplanusi, A., N'Kuli, F., Marien, B., Van Der Smissen, P., Alves, P. M., Verroust, P., Christensen, E. I., Terzi, F., Matter, K., Balda, M. S., Pierreux, C. E. und Courtoy, P. J. (2010). **ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells**. *J Am Soc Nephrol* 21, 478-488.
- Ling, J., Liao, H., Clark, R., Wong, M. S. und Lo, D. D. (2008a). **Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance**. *J Biol Chem*.
- Ling, J., Liao, H. L., Clark, R., Wong, M. S. M. und Lo, D. D. (2008b). **Structural Constraints for the Binding of Short Peptides to Claudin-4 Revealed by Surface Plasmon Resonance**. *J Biol Chem* 283, 30585-30595.
- Löffler, A. und Labbe, R. (1986). **Characterization of A Parasporal Inclusion Body from Sporulating, Enterotoxin-Positive Clostridium-Perfringens Type-A**. *J Bacteriol* 165, 542-548.

- Long, H. Y., Crean, C. D., Lee, W. H., Cummings, O. W. und Gabig, T. G. (2001). **Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium.** *Cancer Res* 61, 7878-7881.
- Ma, M., Gurjar, A., Theoret, J. R., Garcia, J. P., Beingesser, J., Freedman, J. C., Fisher, D. J., McClane, B. A. und Uzal, F. A. (2014). **Synergistic effects of Clostridium perfringens enterotoxin and beta toxin in rabbit small intestinal loops.** *Infect Immun* 82, 2958-2970.
- Maeda, T., Murata, M., Chiba, H., Takasawa, A., Tanaka, S., Kojima, T., Masumori, N., Tsukamoto, T. und Sawada, N. (2012). **Claudin-4-targeted therapy using Clostridium perfringens enterotoxin for prostate cancer.** *Prostate* 72, 351-360.
- Mancheno, J. M., Tateno, H., Sher, D. und Goldstein, I. J. (2010). **Laetiporus sulphureus lectin and aerolysin protein family.** *Adv Exp Med Biol* 677, 67-80.
- Marchiando, A. M., Shen, L., Graham, W. V., Edelblum, K. L., Duckworth, C. A., Guan, Y., Montrose, M. H., Turner, J. R. und Watson, A. J. (2011). **The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding.** *Gastroenterology* 140, 1208-1218 e1201-1202.
- Martikainen, M., Ruotsalainen, J., Tuomela, J., Harkonen, P., Essand, M., Heikkila, J. und Hinkkanen, A. (2017). **Oncolytic alphavirus SFV-VA7 efficiently eradicates subcutaneous and orthotopic human prostate tumours in mice.** *Br J Cancer* 117, 51-55.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. und Dejana, E. (1998). **Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration.** *J Cell Biol* 142, 117-127.
- Marzesco, A. M., Dunia, I., Pandjaitan, R., Recouvreur, M., Dauzonne, D., Benedetti, E. L., Louvard, D. und Zahraoui, A. (2002). **The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells.** *Mol Biol Cell* 13, 1819-1831.
- Matsuda, M., Ozutsumi, K., Iwahashi, H. und Sugimoto, N. (1986). **Primary Action of Clostridium-Perfringens Type-A Enterotoxin on Hela and Vero Cells in the Absence of Extracellular Calcium - Rapid and Characteristic Changes in Membrane-Permeability.** *Biochem Biophys Res Commun* 141, 704-710.
- Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1979). **Calcium-Independent and Dependent Steps in Action of Clostridium-Perfringens Enterotoxin on Hela and Vero Cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 91, 629-636.
- McDonel, J. L. (1980). **Clostridium perfringens toxins (type A, B, C, D, E).** *Pharmacol Ther* 10, 617-655.
- McDonel, J. L. und Demers, G. W. (1982). **In vivo effects of enterotoxin from Clostridium perfringens type A in the rabbit colon: binding vs. biologic activity.** *J Infect Dis* 145, 490-494.
- McDonel, J. L. und Duncan, C. L. (1975). **Histopathological Effect of Clostridium-Perfringens Enterotoxin in Rabbit Ileum.** *Infect Immun* 12, 1214-1218.
- McDonel, J. L. und Duncan, C. L. (1977). **Regional Localization of Activity of Clostridium-Perfringens Type-A Enterotoxin in Rabbit Ileum, Jejunum, and Duodenum.** *J Infect Dis* 136, 661-666.
- McNeil, E., Capaldo, C. T. und Macara, I. G. (2006). **Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells.** *Mol Biol Cell* 17, 1922-1932.

- Menco, B. P. (1988). **Tight-junctional strands first appear in regions where three cells meet in differentiating olfactory epithelium: a freeze-fracture study.** *J Cell Sci* 89 (Pt 4), 495-505.
- Michl, P., Buchholz, M., Rolke, M., Kunsch, S., Lohr, M., McClane, B., Tsukita, S., Leder, G., Adler, G. und Gress, T. M. (2001). **Claudin-4: A new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin.** *Gastroenterology* 121, 678-684.
- 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, doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.028.
- Molek, P., Strukelj, B. und Bratkovic, T. (2011). **Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors.** *Molecules* 16, 857-887.
- Morin, P. J. (2005). **Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy.** *Cancer Res* 65, 9603-9606.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1999). **Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands** *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 511-516.
- Mosley, M., Knight, J., Neesse, A., Michl, P., Iezzi, M., Kersemans, V. und Cornelissen, B. (2015). **Claudin-4 SPECT Imaging Allows Detection of Aplastic Lesions in a Mouse Model of Breast Cancer.** *J Nucl Med* 56, 745-751.
- Neesse, A., Hahnenkamp, A., Griesmann, H., Buchholz, M., Hahn, S. A., Maghnoouj, A., Fendrich, V., Ring, J., Sipos, B., Tuveson, D. A., Bremer, C., Gress, T. M. und Michl, P. (2013). **Claudin-4-targeted optical imaging detects pancreatic cancer and its precursor lesions.** *Gut* 62, 1034-1043.
- Nemeth, J., Nemeth, Z., Tatrai, P., Peter, I., Somoracz, A., Szasz, A. M., Kiss, A. und Schaff, Z. (2010). **High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis.** *Pathol Oncol Res* 16, 19-27.
- Nichols, L. S., Ashfaq, R. und Iacobuzio-Donahue, C. A. (2004). **Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target.** *Am J Clin Pathol* 121, 226-230.
- Olsen, S. J., MacKinnon, L. C., Goulding, J. S., Bean, N. H. und Slutsker, L. (2000). **Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1993-1997.** *MMWR CDC Surveill Summ* 49, 1-62.
- Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M. und Sawada, N. (2017). **Claudins in cancer: bench to bedside.** *Pflugers Arch* 469, 55-67.
- Pahle, J., Menzel, L., Niesler, N., Kobelt, D., Aumann, J., Rivera, M. und Walther, W. (2017). **Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy.** *BMC Cancer* 17, 129.
- Paschoud, S., Bongiovanni, M., Pache, J. C. und Citi, S. (2007). **Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas.** *Mod Pathol* 20, 947-954.
- Pasternak, C. A., Alder, G. M., Bashford, C. L., Korchev, Y. E., Pederzolli, C. und Rostovtseva, T. K. (1992). **Membrane damage: common mechanisms of induction and prevention.** *FEMS Microbiol Immunol* 5, 83-92.
- Patching, S. G. (2014). **Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery.** *Biochim Biophys Acta* 1838, 43-55.
- Pentecost, M., Otto, G., Theriot, J. A. und Amieva, M. R. (2006). **Listeria monocytogenes invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion.** *PLoS Pathog* 2, e3.

- Piontek, A., Rossa, J., Protze, J., Wolburg, H., Hempel, C., Günzel, D., Krause, G. und Piontek, J. (2017a). **Polar and charged extracellular residues conserved among barrier-forming claudins contribute to tight junction strand formation.** *Ann N Y Acad Sci* 1397, 143-156.
- Piontek, A., Witte, C., May Rose, H., Eichner, M., Protze, J., Krause, G., Piontek, J. und Schroder, L. (2017b). **A cCPE-based xenon biosensor for magnetic resonance imaging of claudin-expressing cells.** *Ann N Y Acad Sci* 1397, 195-208.
- Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J. R., Gehring, C., Rahn, H. P., Wolburg, H. und Blasig, I. E. (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. L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G. und Blasig, I. E. (2008). **Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins.** *FASEB J* 22, 146-158.
- Protze, J. (2015) **Molekulare Analyse der Interaktion zwischen Clostridium perfringens Enterotoxin und Claudinen** Freie Universität Berlin
- Protze, J., Eichner, M., Piontek, A., Dinter, S., Rossa, J., Blecharz, K. G., Vajkoczy, P., Piontek, J. und Krause, G. (2015). **Directed structural modification of Clostridium perfringens enterotoxin to enhance binding to claudin-5.** *Cell Mol Life Sci* 72, 1417-1432.
- Rabinsky, E. F., Joshi, B. P., Pant, A., Zhou, J., Duan, X., Smith, A., Kuick, R., Fan, S., Nusrat, A., Owens, S. R., Appelman, H. D. und Wang, T. D. (2016). **Overexpressed Claudin-1 Can Be Visualized Endoscopically in Colonic Adenomas In Vivo.** *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2, 222-237.
- Rahner, C., Mitic, L. L. und Anderson, J. M. (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.
- Rajaratnam, K. und Rosgen, J. (2014). **Isothermal titration calorimetry of membrane proteins - progress and challenges.** *Biochim Biophys Acta* 1838, 69-77.
- Ribeiro, F. R., Meireles, A. M., Rocha, A. S. und Teixeira, M. R. (2008). **Conventional and molecular cytogenetics of human non-medullary thyroid carcinoma: characterization of eight cell line models and review of the literature on clinical samples.** *BMC Cancer* 8, 371.
- Richter, J. F., Schmauder, R., Krug, S. M., Gebert, A. und Schumann, M. (2016). **A novel method for imaging sites of paracellular passage of macromolecules in epithelial sheets.** *J Control Release* 229, 70-79.
- Robertson, S. L., Smedley, J. G., III, Singh, U., Chakrabarti, G., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M. und McClane, B. A. (2007). **Compositional and stoichiometric analysis of Clostridium perfringens enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants.** *Cell Microbiol* 9, 2734-2755.
- Robertson, S. L., Smedley, J. G. und McClane, B. A. (2010). **Identification of a Claudin-4 Residue Important for Mediating the Host Cell Binding and Action of Clostridium perfringens Enterotoxin.** *Infect Immun* 78, 505-517.
- Romani, C., Comper, F., Bandiera, E., Ravaggi, A., Bignotti, E., Tassi, R. A., Pecorelli, S. und Santin, A. D. (2009). **Development and characterization of a human single-chain antibody fragment against claudin-3: a novel therapeutic target in ovarian and uterine carcinomas.** *Am J Obstet Gynecol* 201, 70 e71-79, doi: 10.1016/j.ajog.2009.02.010.
- Romanov, V., Whyard, T. C., Waltzer, W. C. und Gabig, T. G. (2014). **A claudin 3 and claudin 4-targeted Clostridium perfringens protoxin is selectively cytotoxic to PSA-producing prostate cancer cells.** *Cancer Lett* 351, 260-264.

- Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J. D., Amasheh, S., Günzel, D. und Fromm, M. (2010). **Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel.** *J Cell Sci* 123, 1913-1921.
- Rossa, J., Protze, J., Kern, C., Piontek, A., Günzel, D., Krause, G. und Piontek, J. (2014). **Molecular and structural transmembrane determinants critical for embedding claudin-5 into tight junctions reveal a distinct four-helix bundle arrangement.** *Biochem J* 464, 49-60.
- Saeki, R., Kondoh, M., Kakutani, H., Tsunoda, S., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Tsutsumi, Y., Horiguchi, Y. und Yagi, K. (2009). **A Novel Tumor-Targeted Therapy Using a Claudin-4-Targeting Molecule.** *Mol Pharmacol* 76, 918-926.
- Sahin, U., Koslowski, M., Dhaene, K., Usener, D., Brandenburg, G., Seitz, G., Huber, C. und Tureci, O. (2008). **Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development.** *Clin Cancer Res* 14, 7624-7634.
- Saitoh, Y., Suzuki, H., Tani, K., Nishikawa, K., Irie, K., Ogura, Y., Tamura, A., Tsukita, S. und Fujiyoshi, Y. (2015). **Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin.** *Science* 347, 775-778.
- Sakai, N., Chiba, H., Fujita, H., Akashi, Y., Osanai, M., Kojima, T. und Sawada, N. (2007). **Expression patterns of claudin family of tight-junction proteins in the mouse prostate.** *Histochem Cell Biol* 127, 457-462.
- Santin, A. D., Cane, S., Bellone, S., Palmieri, M., Siegel, E. R., Thomas, M., Roman, J. J., Burnett, A., Cannon, M. J. und Pecorelli, S. (2005). **Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of clostridium perfringens enterotoxin.** *Cancer Res* 65, 4334-4342.
- Sarker, M. R., Carman, R. J. und McClane, B. A. (1999). **Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive C-perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops.** *Mol Microbiol* 33, 946-958.
- Sasaki, H., Matsui, C., Furuse, K., Mimori-Kiyosue, Y., Furuse, M. und Tsukita, S. (2003). **Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3971-3976.
- Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., Bode, H., Epple, H. J., Riecken, E. O. und Schulzke, J. D. (1999). **Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6.** *J Cell Sci* 112 (Pt 1), 137-146.
- Schweppe, R. E., Klopper, J. P., Korch, C., Pugazhenth, U., Benezra, M., Knauf, J. A., Fagin, J. A., Marlow, L. A., Copland, J. A., Smallridge, R. C. und Haugen, B. R. (2008). **Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification.** *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4331-4341.
- Shikanov, S., Shikanov, A., Gofrit, O., Nyska, A., Corn, B. und Domb, A. J. (2009). **Intratumoral delivery of paclitaxel for treatment of orthotopic prostate cancer.** *J Pharm Sci* 98, 1005-1014.
- Shinoda, T., Shinya, N., Ito, K., Ohsawa, N., Terada, T., Hirata, K., Kawano, Y., Yamamoto, M., Kimura-Someya, T., Yokoyama, S. und Shirouzu, M. (2016). **Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin.** *Sci Rep* 6, 33632.
- Shrestha, A. und McClane, B. A. (2013). **Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of Clostridium perfringens enterotoxin.** *MBio* 4.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. und Jemal, A. (2016). **Cancer statistics, 2016.** *CA Cancer J Clin* 66, 7-30.

- Singh, A. B., Sharma, A. und Dhawan, P. (2010). **Claudin family of proteins and cancer: an overview**. *J Oncol* 2010, 541957.
- Singh, P., Toom, S. und Huang, Y. (2017). **Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer**. *J Hematol Oncol* 10, 105.
- Singh, U., Mitic, L. L., Wieckowski, E. U., Anderson, J. M. und McClane, B. A. (2001). **Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of Clostridium perfringens enterotoxin on polarized CaCo-2 cells versus Vero cells**. *J Biol Chem* 276, 33402-33412.
- Singh, U., Van Itallie, C. M., Mitic, L. L., Anderson, J. M. und McClane, B. A. (2000). **CaCo-2 cells treated with Clostridium perfringens enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin**. *J Biol Chem* 275, 18407-18417.
- Smedley, J. G., 3rd, Uzal, F. A. und McClane, B. A. (2007a). **Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of Clostridium perfringens enterotoxin**. *Infect Immun* 75, 2381-2390, doi: 10.1128/IAI.01737-06.
- Smedley, J. G., Saputo, J., Parker, J. C., Fernandez-Miyakawa, M. E., Robertson, S. L., McClane, B. A. und Uzal, F. A. (2008). **Noncytotoxic Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) variants localize CPE intestinal binding and demonstrate a relationship between CPE-induced cytotoxicity and enterotoxicity**. *Infect Immun* 76, 3793-3800.
- Smedley, J. G., Uzal, F. A. und McClane, B. A. (2007b). **Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of Clostridium perfringens enterotoxin**. *Infect Immun* 75, 2381-2390.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). **Measurement of protein using bicinchoninic acid**. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- 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, 202-212.
- Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y. und Tsukita, S. (1999). **Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier**. *J Cell Biol* 147, 195-204.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M. (1973). **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma**. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- Staehelin, L. A. (1973). **Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions**. *J Cell Sci* 13, 763-786.
- Sugii, S. (1994). **Analysis of Multiple Antigenic Determinants of Clostridium-Perfringens Enterotoxin As Revealed by Use of Different Synthetic Peptides**. *J Vet Med Sci* 56, 1047-1050.
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O. und Fujiyoshi, Y. (2014). **Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions**. *Science* 344, 304-307.
- Suzuki, M., Kato-Nakano, M., Kawamoto, S., Furuya, A., Abe, Y., Misaka, H., Kimoto, N., Nakamura, K., Ohta, S. und Ando, H. (2009). **Therapeutic antitumor efficacy of monoclonal antibody against Claudin-4 for pancreatic and ovarian cancers**. *Cancer Sci* 100, 1623-1630.
- Szasz, A. M., Tokes, A. M., Micsinai, M., Krenacs, T., Jakab, C., Lukacs, L., Nemeth, Z., Baranyai, Z., Dede, K., Madaras, L. und Kulka, J. (2011). **Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis**. *Clin Exp Metastasis* 28, 55-63.

- Szczesny, P., Iacovache, I., Muszewska, A., Ginalska, K., van der Goot, F. G. und Grynberg, M. (2011). **Extending the aerolysin family: from bacteria to vertebrates**. *PLoS One* 6, e20349.
- Tabaries, S., Dong, Z., Annis, M. G., Omeroglu, A., Pepin, F., Ouellet, V., Russo, C., Hassanain, M., Metrakos, P., Diaz, Z., Basik, M., Bertos, N., Park, M., Guettier, C., Adam, R., Hallett, M. und Siegel, P. M. (2011). **Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes**. *Oncogene* 30, 1318-1328.
- Tabaries, S. und Siegel, P. M. (2017). **The role of claudins in cancer metastasis**. *Oncogene* 36, 1176-1190.
- Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuuchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S. I., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. und Kondoh, M. (2008). **Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis**. *Biochem Pharmacol* 75, 1639-1648.
- Takahashi, A., Saito, Y., Kondoh, M., Matsushita, K., Krug, S. M., Suzuki, H., Tsujino, H., Li, X., Aoyama, H., Matsuhisa, K., Uno, T., Fromm, M., Hamakubo, T. und Yagi, K. (2012). **Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder**. *Biomaterials* 33, 3464-3474.
- Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y. und Tsukita, S. (2011). **Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine**. *Gastroenterology* 140, 913-923.
- Tom, B. H., Rutzky, L. P., Jakstys, M. M., Oyasu, R., Kaye, C. I. und Kahan, B. D. (1976). **Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line**. *In Vitro* 12, 180-191.
- Torres, J. B., Knight, J. C., Mosley, M. J., Kersemans, V., Koustoulidou, S., Allen, D., Kinches, P., Smart, S. und Cornelissen, B. (2017). **Imaging of Claudin-4 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using a Radiolabelled Anti-Claudin-4 Monoclonal Antibody**. *Mol Imaging Biol*.
- Tscheik, C., Blasig, I. E. und Winkler, L. (2013). **Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions**. *Tissue Barriers* 1, e24565.
- Tuomela, J., Valta, M., Seppanen, J., Tarkkonen, K., Vaananen, H. K. und Harkonen, P. (2009). **Overexpression of vascular endothelial growth factor C increases growth and alters the metastatic pattern of orthotopic PC-3 prostate tumors**. *BMC Cancer* 9, 362.
- Tzelepi, V. N., Tsamandas, A. C., Vlotinou, H. D., Vagianos, C. E. und Scopa, C. D. (2008). **Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms** *Mod Pathol* 21, 22-30.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. und Tsukita, S. (2006). **ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation** *Cell* 126, 741-754.
- Uzal, F. A., Freedman, J. C., Shrestha, A., Theoret, J. R., Garcia, J., Awad, M. M., Adams, V., Moore, R. J., Rood, J. I. und McClane, B. A. (2014). **Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease**. *Future Microbiol* 9, 361-377.
- Van Itallie, C. M., Betts, L., Smedley, J. G., McClane, B. A. und Anderson, J. M. (2008). **Structure of the claudin-binding domain of Clostridium perfringens enterotoxin**. *J Biol Chem* 283, 268-274.

- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2003). **Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins** *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F1078-F1084.
- Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J. und Anderson, J. M. (2006). **Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities**. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F1288-F1299.
- Van Itallie, C. M., Tietgens, A. J. und Anderson, J. M. (2017). **Visualizing the dynamic coupling of claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1**. *Mol Biol Cell* 28, 524-534.
- Veshnyakova, A., Krug, S. M., Mueller, S. L., Piontek, J., Protze, J., Fromm, M. und Krause, G. (2012a). **Determinants contributing to claudin ion channel formation**. *Ann N Y Acad Sci* 1257, 45-53.
- Veshnyakova, A., Piontek, J., Protze, J., Waziri, N., Heise, I. und Krause, G. (2012b). **Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins**. *J Biol Chem* 287, 1698-1708.
- Veshnyakova, A., Protze, J., Rossa, J., Blasig, I., Krause, G. und Piontek, J. (2010). **On the Interaction of Clostridium perfringens Enterotoxin with Claudins**. *Toxins* 2, 1336-1356.
- Vovis, G. F. und Lacks, S. (1977). **Complementary action of restriction enzymes endo R-DpnI and Endo R-DpnII on bacteriophage f1 DNA**. *J Mol Biol* 115, 525-538.
- Wallace, F. M., Mach, A. S., Keller, A. M. und Lindsay, J. A. (1999). **Evidence for Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) inducing a mitogenic and cytokine response in vitro and a cytokine response in vivo**. *Curr Microbiol* 38, 96-100.
- Walther, W., Petkov, S., Kuvardina, O. N., Aumann, J., Kobelt, D., Fichtner, I., Lemm, M., Piontek, J., Blasig, I. E., Stein, U. und Schlag, P. M. (2012). **Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors**. *Gene Ther* 19, 494-503.
- Weber, E., Berta, G., Tousson, A., St John, P., Green, M. W., Gopalakrishnan, U., Jilling, T., Sorscher, E. J., Elton, T. S., Abrahamson, D. R. und et al. (1994). **Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells**. *J Cell Biol* 125, 583-594.
- Winkler, L., Gehring, C., Wenzel, A., Muller, S. L., Piehl, C., Krause, G., Blasig, I. E. und Piontek, J. (2009). **Molecular Determinants of the Interaction between Clostridium perfringens Enterotoxin Fragments and Claudin-3**. *J Biol Chem* 284, 18863-18872.
- Yamamoto, K., Ohishi, I. und Sakaguchi, G. (1979). **Fluid Accumulation in Mouse Ligated Intestine Inoculated with Clostridium-Perfringens Enterotoxin**. *Appl Environ Microbiol* 37, 181-186.
- Yu, A. S., Cheng, M. H., Angelow, S., Günzel, D., Kanzawa, S. A., Schneeberger, E. E., Fromm, M. und Coalson, R. D. (2009). **Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site**. *J Gen Physiol* 133, 111-127.
- Yuan, Q. A., Robinson, M. K., Simmons, H. H., Russeva, M. und Adams, G. P. (2008). **Isolation of anti-MISIIR scFv molecules from a phage display library by cell sorter biopanning**. *Cancer Immunol Immunother* 57, 367-378.
- Yuan, X. Q., Lin, X. J., Manorek, G., Kanatani, I., Cheung, L. H., Rosenblum, M. G. und Howell, S. B. (2009). **Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors**. *Mol Cancer Ther* 8, 1906-1915.
- Zahraoui, A., Joberty, G., Arpin, M., Fontaine, J. J., Hellio, R., Tavitian, A. und Louvard, D. (1994). **A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but**

colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 124, 101-115.

Zhao, H., Brautigam, C. A., Ghirlando, R. und Schuck, P. (2013). **Overview of current methods in sedimentation velocity and sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation.** *Curr Protoc Protein Sci Chapter 20*, Unit20 12.

6 Publikationsverzeichnis

In dieser Arbeit erhaltene, generierte oder etablierte Ergebnisse, Materialien oder Methoden und Inhalte wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht bzw. auf einer Tagung vorgestellt. Ein weiteres Manuskript, welches Ergebnisse dieser Arbeit enthält befindet sich in Vorbereitung (Piontek A, Eichner M, *et al.* Targeting Claudin-overexpressing lung and thyroid cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin)

JOURNAL

Eichner, M., Augustin, C., Fromm, A., Piontek, A., Walther, W., Bücken, R., Fromm, M., Krause, G., Schulzke, J. D., Günzel, D., Piontek, J. (2017). **In colon epithelia, *Clostridium perfringens* enterotoxin causes focal leaks by targeting claudins which are apically accessible due to tight junction derangement.** J. Infect. Dis. doi: 10.1093/infdis/jix485. [Epub ahead of print 15.09.2017]

Piontek, A.*, Witte, C.* (*shared first authorship), Rose, H., **Eichner, M.**, Protze, J., Krause, G. (corresponding author), Piontek, J.*, Schröder, L.* (*shared last authorship) (2017). **A cCPE-based xenon biosensor for magnetic resonance imaging of claudin-expressing cells.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 1397(1): 195-208

Wiegand, S., Zakrzewski, S. S., **Eichner, M.**, Schulz, E., Günzel, D., Pieper, R., Rosenthal, R., Barmeyer, C., Bleich, A., Dobrindt, U., Schulzke, J. D.*, Bücken, R.* (*shared last authorship) (2017). **Zinc treatment is efficient against *Escherichia coli* α haemolysin-induced intestinal leakage in mice.** Sci. Rep. 7: 45649: 1-13

Eichner, M., Protze, J., Piontek, A., Krause, G., Piontek, J. (2017). **Targeting and alteration of tight junctions by bacteria and their virulence factors such as *Clostridium perfringens* enterotoxin.** Pflügers Arch. 469(1): 77-90 (Invited Review)

Liao, Z., Yang, Z., Piontek, A., **Eichner, M.**, Krause, G., Chen, B., Li, L., Piontek, J., Zhang, J. (2016). **Specific binding of a mutated fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin to endothelial claudin-5 and its modulation of cerebral vascular permeability.** Neuroscience 327: 53-63

Protze, J., **Eichner, M.**, Piontek, A., Dinter, S., Rossa, J., Blecharz, K. G., Vajkoczy, P., Piontek, J.*, Krause, G.* (*shared last authorship). (2014). **Directed structural modification of *Clostridium perfringens* enterotoxin to enhance binding to claudin-5.** Cell. Mol. Life Sci. 72(7): 1417-1432

KONFERENZBEITRÄGE

Eichner, M., Augustin, C., Piontek, A., Protze, J., Schulzke, J., Günzel, D., Walther, W., Krause, G., Piontek, J. "The Yin and Yang of *Clostridium perfringens* enterotoxin: Pathomechanism and use for targeting claudin-overexpressing tumors" International conference Tight junctions and their proteins, 8 – 10. September 2016, Berlin, Deutschland (Poster/Kurzvortrag)

SONSTIGE

Eichner, M. (2012). **Charakterisierung von *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Varianten als tumorrelevante Claudin-Modulatoren.** Diplomarbeit im Fach Biochemie, Freie Universität Berlin (angefertigt am Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Berlin, DE)

7 Lebenslauf

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

8 Anhang

8.1 Expression, Anreicherung und Konzentrationsbestimmung von CPE (6×His)

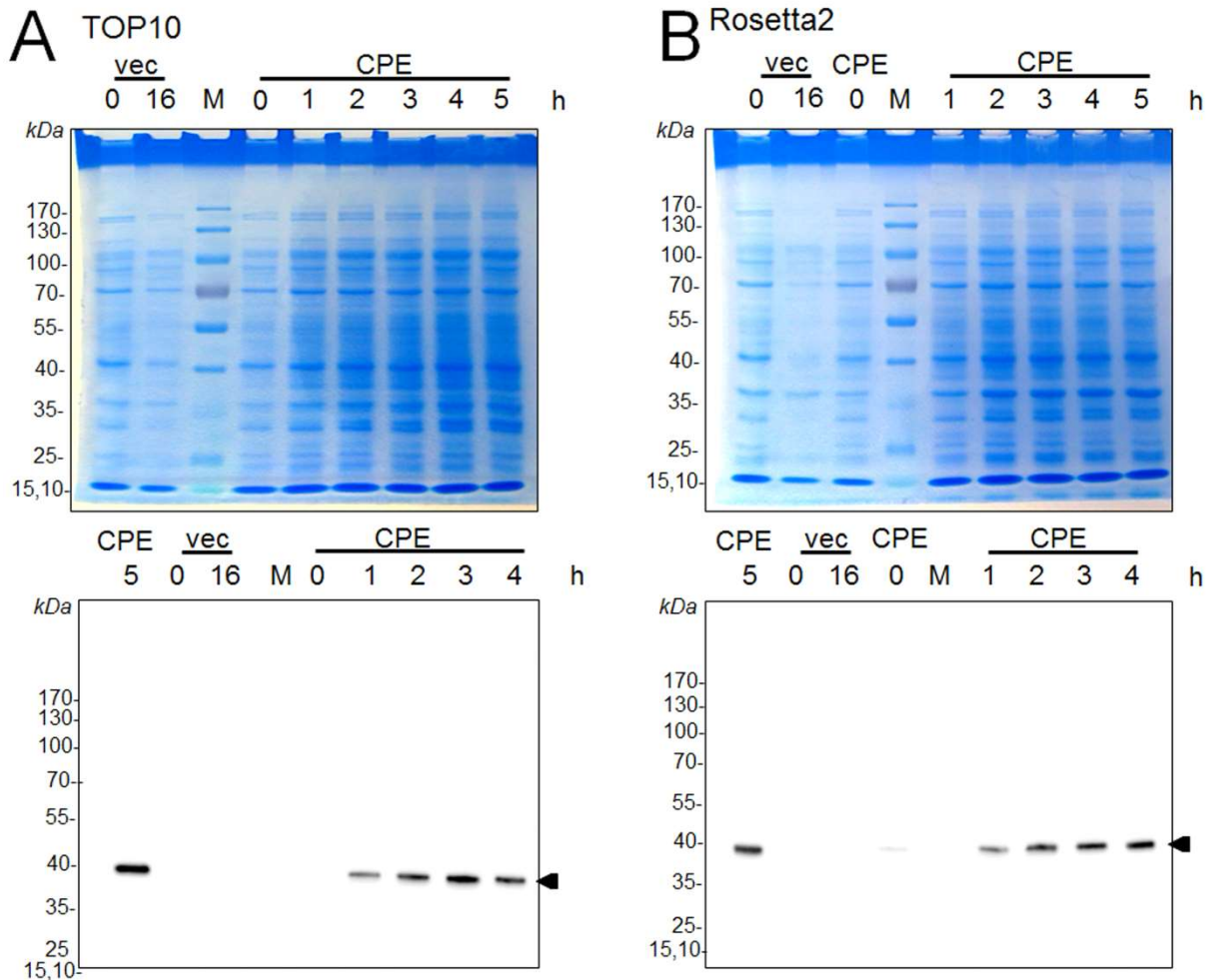


Abbildung 8-1 **Expression von CPE (6xHis) in *E. coli* TOP10 (A) Rosetta2 (B) (exemplarisch)**. Es sollte eine geeignete Expressionsdauer nach Induktion mit 1mM IPTG ermittelt werden. Da die CPE (6×His)-Konstrukte auf dem Konstrukt optCPE mit optimierter Kodon-Verwendung für die eukaryotische Expression basieren, wurde darüber hinaus getestet ob der *E. coli*-Stamm Rosetta 2, der für die Expression eukaryotischer Proteine optimiert ist einen Vorteil gegenüber dem Stamm TOP10 bietet. Bakterien aus 150 (Coomassie-Färbung, jeweils oben) bzw. 5 µl (Immunblot, jeweils unten) Kulturvolumen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h = vor Induktion; 1 bis 5 und 16 h = entsprechende Zeit nach Induktion) geerntet wurden, wurden mittels 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Im Coomassie gefärbten Gel ist nach Induktion unter keiner Bedingung eine prominent zunehmende Bande zu identifizieren. Im Immunblot kann allerdings eine spezifische Bande für CPE nachgewiesen werden (◄), die bis zu 3 h nach Induktion an Intensität zunimmt. Vor Induktion war kaum, in der mitgeführten Vektorkontrolle (vec, Details s. Abschnitt 2.4.4) kein CPE zu detektieren. Ein Unterschied zwischen der Expression in den beiden Bakterienstämmen ist nicht zu erkennen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde Standardmäßig für 3 h in *E. coli* TOP10 exprimiert.

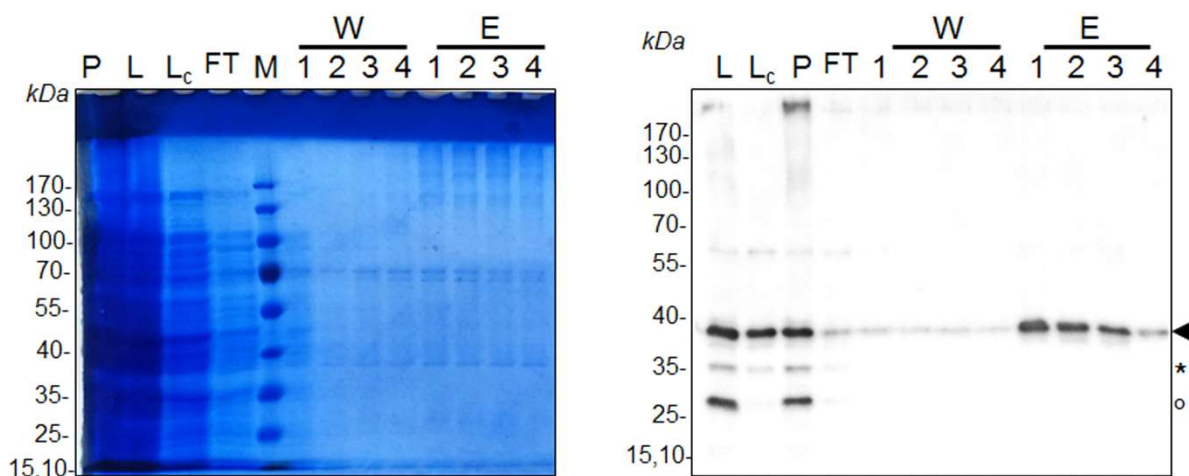


Abbildung 8-2 **Anreicherung von CPE (6×His) mittels NiNTA-Affinitätschromatographie (exemplarisch)**. 6×His CPE wurde nach Proteinexpression aus Bakterien-Lysaten (L) aufgereinigt. Zunächst wurde das Lysat durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 30 min, 4°C) geklärt. Das Pellet (P) verworfen und das geklärte Lysat (L_c) mit NiNTA-Agarose inkubiert. Der Durchfluss (FT) und Waschschrte (W 1 bis 4) wurden verworfen. Eluiert wurde wiederholt durch 300 mM Imidazol (E 1 bis 4). Weitere Details vgl. Methoden 2.3.2. Im Coomassie-Blau gefärbten Gel(links) ist in keiner der Fraktionen eine prominente CPE zuzuordnende Bande, sondern jeweils etliche Banden zu sehen. Anders ist dies im Immunblot (rechts). Hier konnte 6×His CPE (►), CPE (*) und ein mögliches Abbauprodukt (°) detektiert werden. Im Durchfluss und den Waschfraktionen ist jeweils kaum CPE zu detektieren. In den Eluatfraktionen 1 bis 3 konnte jeweils etwa gleichviel CPE detektiert werden. Sie wurden daher vor Dialyse gegen Imidazol-freien Puffer vereinigt. Aufgetragen wurden jeweils 825te (Coomassie-Färbung oben) bzw. 66000te Teil (Immunblot) der Fraktionen.

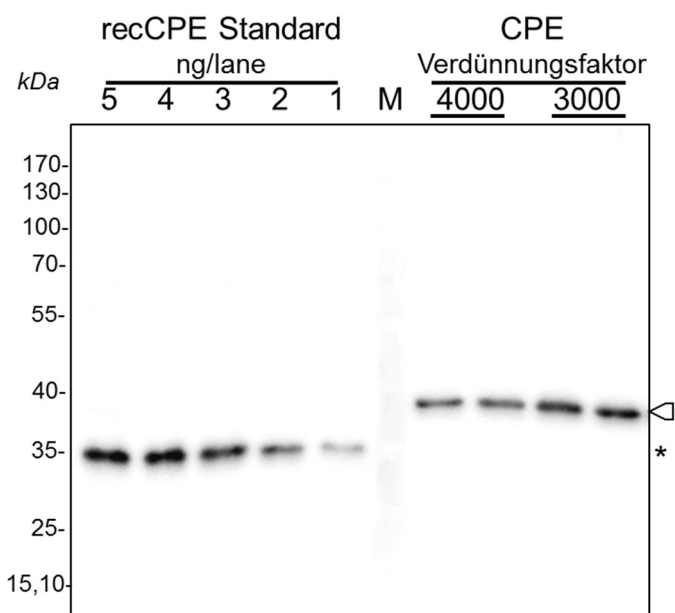


Abbildung 8-3 **Exemplarischer Blot zur Konzentrationsbestimmung einer CPE(6×His)-Präparation mittels Immunblot**. Definierte Mengen (5 bis 1 ng/lane) erworbenen rekombinanten CPEs mit bekannter Konzentration (recCPE Standard *) wurden neben $10 \mu\text{l}$ von Verdünnungen (Verdünnungsfaktoren im Bereich von etwa 1000 bis 5000; Mehrfachbestimmung) einer CPE-Präparation (◁) aufgetragen. Über die Intensitäten der Immunreaktiven Banden wurden mithilfe einer Standardgerade die CPE-Konzentration der CPE-Präparation berechnet.

8.2 Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{off} der Interaktion von Cldn3 mit CPE-wt und L254A/S256A/I258A/D284A

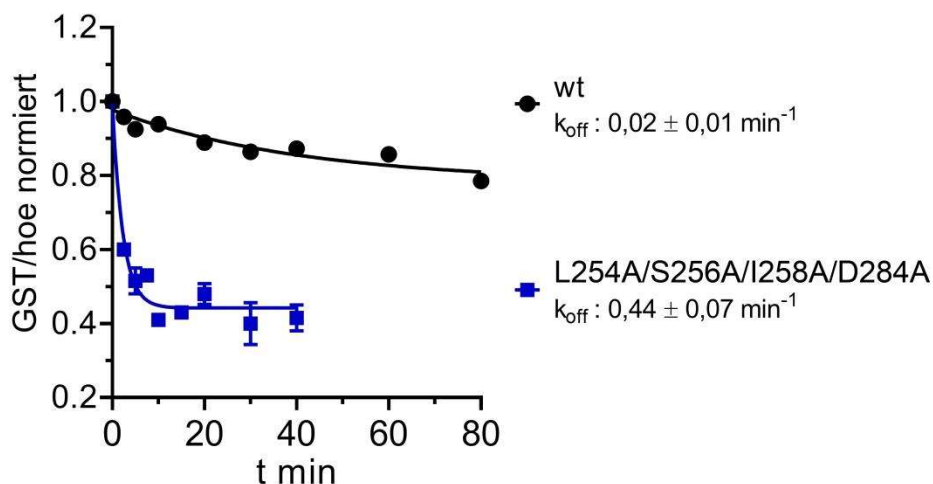


Abbildung 8-4 **Dissoziation von cCPE-wt und -L254A/S256A/I258A/D284A von Cldn3.** Cldn3-YFP(Cldn3)-exprimierende HEK-293-Zellen wurden zunächst 15 min mit 15 nM cCPE-wt (wt) bzw. 122 nM cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A (L254A/S256A/I258A/D284A) (jeweils als GST-Fusionsprotein) vorinkubiert (Konzentrationen jeweils etwa in der Größenordnung des für die Interaktion ermittelten K_d s. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde cCPE-haltiges Medium gegen cCPE-freies Medium ausgetauscht (2 ml pro 24 well) und in Zeitabständen von 1 bis 20 min das Medium abgenommen, die Zellen direkt wie unter 2.4.7 angegeben fixiert und die cCPE-Bindung detektiert. Das ermittelte cCPE-Signal (GST/ho) wurde auf den Ausgangswert bei $t=0$ normiert. (exemplarisches Experiment, Doppelbestimmung)

8.3 Übersicht claudinspezifischer K_d und EC_{50} -Werte

Tabelle 8-1 Übersicht über alle im Rahmen der Arbeit ermittelten claudinspezifischen K_d (vgl. Abschnitt 3.2.1) und EC_{50} -Werte (3.2.2.2). *Kursiv*: Näherungsweise ermittelte Werte; *kursiv**: abgeschätzte Werte. N.D. nicht bestimmt.

CPE	Cldn	K_d nM			EC_{50}			
		\pm	n		-	+	n	
Wt	1	304	126	3	N. D.			
	3	13,7	2,3	5	1,08	0,46	0,32	6
	4	11,4	1,9	5	0,55	0,22	0,16	5
	5	>> 1000*	-	-3	> 17000*	-	-	5
	6	12,6	2,1	5	N. D.			
Y306A/L315A	3	N. D.			2704	648	523	10
	4	N. D.			134	69	46	10
L254A/S256A/I258A/D284A	3	226	59	5	364	133	97	13
	4	9,4	1,7	5	1,94	0,80	0,56	12
S305P/S307R/S313H	1	10,5	2,3	3	N. D.			
	3	6,8	0,7	2	1,25	0,40	0,30	6
	4	2,7	0,2	2	0,41	0,21	0,14	5
	5	N. D.			44,4	8,8	7,4	6
	6	10,6	1,6	6	N. D.			
Y306W/S313H	1	335	273	2	N. D.			
	3	13,3	2,0	3	6,6	1,3	1,1	6
	4	9,2	2,4	3	1,47	0,70	0,47	7
	5	24,1	6,7	9	33,7	9,6	7,5	6
S313H	5	42	9,5	7	N. D.			

8.4 Claudin-Expression in verschiedenen Karzinomzelllinien

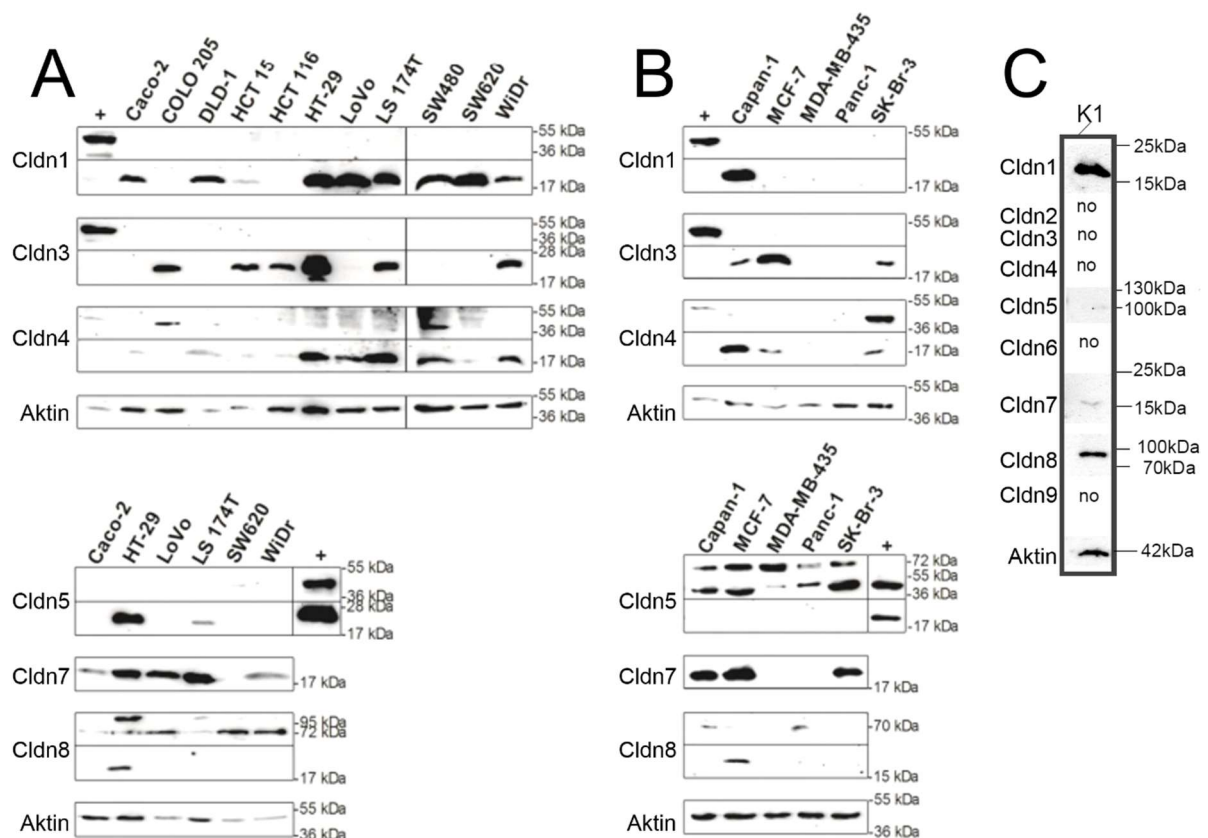


Abbildung 8-5 **Immun-Blots** zur **semi-quantitativen Bestimmung des Expressionslevels** von Cld1,-3,-4,-5,-7,-8 in verschiedenen **Kolon- (A), Mamma-, Pankreas- (B) und Thyroid- (C) Karzinomzelllinien**. Ausschnitte derselben Membran bzw. parallel erfolgten Antikörperdetektion sind jeweils unmittelbar benachbart dargestellt. (+) Positivkontrolle (HEK-293-Zellen mit Cldn1, -3-YFP bzw. Cld-4-GFP und MDCK-II-Zellen mit Cldn5 transfiziert). In C no: keine Immunreaktive Bande. (A, B, Daten aus der Diplomarbeit. Eichner M. 2012; C, Daten zur Verfügung gestellt von Anna Piontek)

8.5 Cldn4-Expression in stabiler HEK-293-Cldn4-FLAG Zelllinie

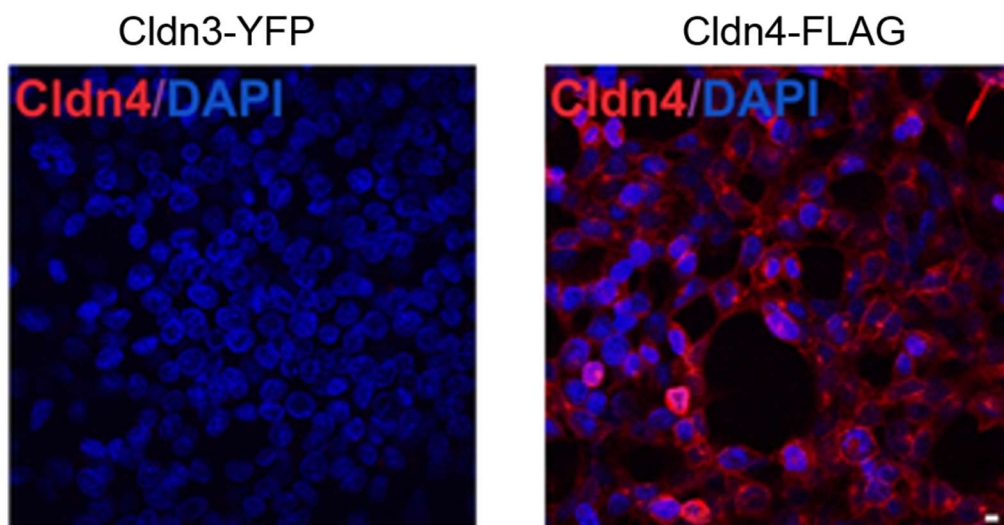


Abbildung 8-6 **Cldn4-Expression** in klonalen **HEK-293-Cldn4-FLAG-Zellen**. Zur Beurteilung der Cldn4 Expression in der im Rahmen dieser Arbeit generierten HEK-293-

Cldn4-FLAG-Zelllinie erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Cldn4. Anders als die Kontroll-Zellen (HEK-293-Cldn3-YFP, links) zeigen HEK-293-Cldn4-FLAG-Zellen (rechts) eindeutig eine Cldn4 Immunreaktivität.

8.6 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ap	apikal
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCA	<i>bicinic acid</i> (Bicinchoninsäure)
bl	basal
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
cCPE	<i>C. perfringens</i> Enterotoxin; C-terminaler Bereich
CH-1	CPE-Hexamer 1
CH-2	CPE-Hexamer 2
Cldn	Claudin
CPA	<i>C. perfringens</i> α -Toxin
CPB	<i>C. perfringens</i> β -Toxin
CPE	<i>C. perfringens</i> Enterotoxin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotid
DTT	1,4 Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC50	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EGFP e	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (optimiertes grün fluoreszierendes Protein)
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i>
ETX	ϵ -Toxin
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i> (verstärkt gelb fluoreszierendes Protein)
EZS1 bzw.2	extrazelluläre Schleife 1 bzw. 2 in Claudinen

Anhang

FFEM	<i>Freeze Fracture Electron Microscopy</i> (Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GI	gastrointestinal
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
ITX	ι-Toxin
K _a	Assoziationskonstante
K _b	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani Medium</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
mA	Milliampere
MDC	Max Delbrück Zentrum, Berlin Buch
MTT	(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)
MW	Molekulargewicht
N	Anzahl unabhängiger Experimente
nCPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin; N-terminaler Bereich
optCPE	für eukaryotische Translation optimierte CPE cDNA
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDB	<i>Protein Database</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pfluorescein	Fluoresceinpermeabilität
PIC B	Proteaseinhibitor-Cocktail (bakteriell)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIM	<i>structure illumination microscopy</i>
β-PFT	β-Poren Formendes Toxin
T	Zeit
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEA	Tetraethylammonium
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	<i>Transepithelial Resistance</i> (Transepithelialer Widerstand)
TJ	Tight Junction
TM1-4	Transmembransegmente 1 bis 4 in Claudinen
TNFα	Tumor Nekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymmenge, die 1 μMol Substrat/min umsetzt)
ÜN	über Nacht
V	Volt
Wt	Wildtyp
× g	Zentrifugalkraft als Vielfaches der Fallbeschleunigung der Erde (g = 9,81 m/s ²)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)
ZnAc	Zinkacetat
ZO1	Zonula Occludens 1
β-PFT	<i>β-pore forming toxin</i> (β-Poren-formendes Toxin)

8.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 CPE-Kristallstruktur (A) und schematische Darstellung funktioneller Domänen (B)	8
Abbildung 1-2 Zellulärer Mechanismus CPE-vermittelter Toxizität	10
Abbildung 1-3 Claudine als essentieller Bestandteil von Tight Junctions (TJ) (A,B) und Topologie von Claudinen (C)	13
Abbildung 3-1 Die Bindung von CPE an HT-29/B6-Zellen wird durch Mutation Y306A/L315 in CPE nicht aber die Anwesenheit von Zn²⁺ inhibiert und induziert die Bildung von SDS-resistenten CPE-Oligomeren	70
Abbildung 3-2 Inhibition CPE-vermittelten Ca²⁺-Einstroms in HT-29/B6-Zellen durch Mutation Y306A/L315A in CPE (Inhibition der Claudinbindung) und in Gegenwart von Zn²⁺ ..	72
Abbildung 3-3 Inhibition CPE-vermittelte Zytotoxizität auf HT-29/B6-Zellen durch Mutation Y306A/L315A in CPE (Inhibition der Claudinbindung) und in Gegenwart von Zn²⁺ (Inhibition des Ca²⁺-Einstroms)	73
Abbildung 3-4 Die CPE-induzierte Barrierestörung voll differenzierter HT-29/B6-Zellen ist bei apikaler gegenüber basaler CPE-Applikation eingeschränkt	75
Abbildung 3-5 Nur fokale Schädigung von HT-29/B6-Zellen nach apikaler Gabe von CPE	77
Abbildung 3-6 Intakte TJ in CPE-negativen Zellen außerhalb fokaler Läsionen	79
Abbildung 3-7 cCPE-Bindung an eine Subpopulation von HT-29/B6-Zellen mit diskontinuierlichen TJ	81
Abbildung 3-8 Nach basaler Gabe bindet cCPE auf der basalen Seite aller HT-29/B6-Zellen	82
Abbildung 3-9 Nur limitierte und lokal eingeschränkte Schädigung epithelialer Caco-2 Zellschichten nach apikaler CPE-Gabe	83

Abbildung 3-10 Barrierestörung durch EGTA, proinflammatorisches Zytokin TNFα und Dedifferenzierung.	85
Abbildung 3-11 CPE-Bindung an HT-29/B6-Zellen nach Vorbehandlung mit EGTA oder TNFα.	87
Abbildung 8-7 CPE-Sensitivität mit EGTA oder TNFα vorbehandelter HT-29/B6-Zellen bzw. dedifferenzierter HT-29-Zellen.	89
Abbildung 3-13 HT-29/B6-Zellen nicht aber HT-29-Zellen weisen einen hohen Differenzierungsgrad mit einer intakten TJ-Barriere auf, die über eine CellMask™ Deep Red Membranfärbung visualisiert werden konnte.	91
Abbildung 3-14 Lokale Einschränkung von Ca²⁺-Einstrom, Membranvesikel-Abschnürung und Exfoliation einzelner Zellen bei apikaler CPE-Behandlung von HT-29/B6-Zellen.	92
Abbildung 3-15 Stärkere Ausprägung CPE-vermittelter Effekte auf HT-29-Zellen in Bereichen mit eingeschränkter TJ-Barriere.	93
Abbildung 3-16 Bindung von CPE an natives humanes Kolongewebe.	94
Abbildung 3-17 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (<i>K_d</i>) verschiedener cCPE-Varianten für die Rezeptorclaudine 3, 4 und 6 sowie die Nicht-Rezeptorclaudine 1 und 5.	97
Abbildung 3-18 Ca²⁺-Einstrom in Cldn3-YFP- (Cldn3), Cldn4-FLAG- (Cldn4) und Cldn5-YFP(Cldn5)-exprimierende HEK-293-Zellen.	100
Abbildung 3-19 Claudinspezifische Toxizität verschiedener CPE-Varianten.	102
Abbildung 3-20 Einfluss von Mutationen auf die für cCPE ermittelten Affinitäten (<i>K_d</i>) und für CPE ermittelten Toxizitäten (<i>EC</i>₅₀) im Vergleich.	104
Abbildung 3-21 Claudinspezifische Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten (optCPE) aus eukaryotischer Expression.	105
Abbildung 3-22 Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten auf Rezeptorclaudin exprimierende Karzinomzellen.	107

Abbildung 3-23 Zytotoxizität verschiedener CPE-Varianten auf Thyroidkarzinomzellen.	109
Abbildung 4-1 Im Vergleich zu nativem CPE (A, wt), zeigen die im Rahmen dieser Arbeit generierten CPE-Varianten eine veränderter Claudinspezifität und können in drei Typen (B-D, Typen i-iii) unterteilt werden.	122
Abbildung 4-2 Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität und Bindung bei $EC_{50} \ll K_d$ (A, B) und $EC_{50} \approx K_d$ (C, D).	125
Abbildung 8-1 Expression von CPE (6xHis) in <i>E. coli</i> TOP10 (A) Rosetta2 (B) (exemplarisch).	155
Abbildung 8-2 Anreicherung von CPE (6xHis) mittels NiNTA-Affinitätschromatographie (exemplarisch).	156
Abbildung 8-3 Exemplarischer Blot zur Konzentrationsbestimmung einer CPE(6xHis)-Präparation mittels Immunblot.	156
Abbildung 8-4 Dissoziation von cCPE-wt und -L254A/S256A/I258A/D284A von Cldn3.	157
Abbildung 8-5 Immun-Blots zur semi-quantitativen Bestimmung des Expressionslevels von Cld1,-3,-4,-5,-7,-8 in verschiedenen Kolon- (A), Mamma-, Pankreas- (B) und Thyroid- (C) Karzinomzelllinien.	159
Abbildung 8-6 Cldn4-Expression in klonalen HEK-293-Cldn4-FLAG-Zellen.	159

8.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Assoziationskonstanten (K_a) und daraus berechnete Dissoziationskonstanten (K_d) für die Interaktion von CPE mit Rezeptorclaudinen..	15
Tabelle 1-2 Übersicht über beschriebene Deregulation der Expression der Claudine 1 bis 5 und 7 in Tumoren unterschiedlichen Ursprungs.....	19
Tabelle 2-1 Zusammensetzung der PCR-Ansätze.	43
Tabelle 2-2 PCR-Programme.	44
Tabelle 2-3 Zusammensetzung der Kulturmedien für die verschiedenen Zelllinien..	52
Tabelle 2-4 Kulturbedingungen für die verschiedenen Zelllinien für den MTT-Zytotoxizitäts-Assay.....	58
Tabelle 2-5 Versuchsablauf, Inkubationszeiten, Lösungen und Volumina bei der Paraformaldehydfixierung und Färbung von Zellen und Kolon-Biopsien.	60
Tabelle 8-1 Übersicht über alle im Rahmen der Arbeit ermittelten Claudinspezifischen K_d (vgl. Abschnitt 3.2.1) und EC_{50}-Werte (3.2.2.).....	158

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, den 08.01.2018

Miriam Eichner