

**Claudin-Peptide**  
**zur Modulation der *tight junction*-Dichtheit**

**Dissertation**

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

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

vorgelegt von

**Christian Staat**

aus Potsdam

Juni 2015

Die Dissertation wurde vom 01. März 2010 bis 30. Juni 2015 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter der Leitung von PD Dr. I. Blasig angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ingolf E. Blasig  
Molekulare Zellphysiologie  
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus C. Wahl  
Institut für Chemie und Biochemie  
Strukturbiochemie  
Freie Universität Berlin

Disputation am: 03.11.2015

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ingolf E. Blasig für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine Ratschläge und unsere gewinnbringenden Diskussionen.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Markus C. Wahl für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die Unterstützung danken, die ich durch sie während der Anfertigung meiner Promotion erhalten habe. Heraustellen möchte ich insbesondere Dr. Denise Zwanziger, Dr. Lars Winkler und Ramona Günther. Danken möchte ich auch Dr. Reiner Haseloff und Jessica Schulze. Sie alle haben mit ihren Ideen und ihrem Einsatz die Arbeit bereichert.

Danke auch den Kooperationspartnern und Kollegen Dr. Heike Rittner, Prof. Dr. Britta Engelhardt, Dr. Caroline Coisne, Prof. Dr. Hartwig Wolbug, Dr. Anuska Andjelkovic-Zochowska, Prof. Dr. Michael Beyermann, Dr. Burkhard Wiesner, Jenny Eichhorst und Heike Nikolenko für ihr Engagement.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Sabine und meinem Freund Sebastian für ihre Unterstützung und das Interesse an der Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner lieben Freundin Doreen bedanken, die mir durch ihren Einsatz stets den Rücken freihielt und für mich eine Quelle der Kraft war.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>X</b>
<b>Summary</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epitheliale und endotheliale Barrieren.....	1
1.1.1 Funktion und Aufbau .....	1
1.1.1.1 Das Perineurium.....	2
1.1.1.2 Die Blut-Hirnschranke .....	2
1.1.2 Wirkstoffdurchtritt durch Zellbarrieren .....	3
1.2 Die <i>tight junctions</i> .....	5
1.2.1 Funktion .....	5
1.2.2 Bestandteile und Struktur .....	5
1.2.2.1 Claudine – Grundlage der parazellulären Abdichtung.....	6
1.2.2.2 Occludin und Tricellulin .....	9
1.2.2.3 <i>Zonula occludens</i> .....	10
1.3 Modulation von Zellbarrieren zur Verbesserung des Wirkstoffdurchtritts.....	11
1.3.1 Stand der Forschung.....	11
1.3.2 Claudin-modulierende Peptide .....	13
1.4 Zielstellung.....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Peptidherstellung.....	19
2.2.1.1 Peptiddesign .....	19
2.2.1.2 Peptidsynthese.....	20
2.2.1.3 Peptidreinigung und Charakterisierung.....	21
2.2.2 Zellkultur .....	21
2.2.2.1 Routinezellkultivierung.....	21
2.2.2.2 Kryokonservierung.....	22
2.2.2.3 Zellzahlbestimmung .....	22
2.2.2.4 Transfektion und Herstellung stabil transfizierter Zelllinien.....	22
2.2.2.5 Kultivierung von Zellen auf Deckgläschen und Filtern.....	23
2.2.2.6 Behandlung von Zellen mit Peptiden.....	24
2.2.3 Funktionelle Untersuchungen .....	24
2.2.3.1 Transzellulärer elektrischer Widerstand .....	24
2.2.3.2 Permeationsmessungen .....	24
2.2.3.3 Zellvitalität .....	25
2.2.4 Mikroskopische Untersuchungen.....	26
2.2.4.1 Immunfluoreszenz.....	26

2.2.4.2	Lebendzelluntersuchungen.....	27
2.2.4.3	Gefrierbruch-Analyse.....	29
2.2.5	Untersuchung von Signaltransduktionswegen .....	30
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden .....	30
2.2.6.1	Zellysatherstellung aus eukaryotischen Zellen .....	30
2.2.6.2	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	30
2.2.6.3	Proteinbestimmung .....	30
2.2.6.4	Western Blot.....	31
2.2.6.5	Nachweis von Peptiden in Blutplasma.....	31
2.2.6.6	Expression und Kopräzipitation von Fusionsproteinen .....	32
2.2.6.7	Endosomenisolation und -analyse.....	32
2.2.7	<i>In vivo</i> - und <i>ex vivo</i> -Untersuchungen.....	33
2.2.8	Biophysikalische Methoden .....	33
2.2.8.1	Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	33
2.2.8.2	3D-Strukturvorhersage der Peptide.....	34
2.2.8.3	Massenspektrometrischer Nachweis der Peptide im Blutplasma... 34	
2.2.9	Statistik.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Claudin-Peptidomimetika zur Zellbarrieremodulation .....	36
3.2	Das Claudin-1-Peptidomimetikum mC1C2 erhöht die Zellbarrieredurchlässigkeit.....	36
3.3	<i>In vitro</i> -Wirkung von mC1C2.....	37
3.3.1	Zelltyp-, Konzentrations-, Administrations- und Zeitabhängigkeit .....	37
3.3.1.1	mC1C2 wirkt konzentrations- und administrationsabhängig.....	37
3.3.1.2	Nach 12 h Inkubation öffnet mC1C2 in der minimal effektiven Konzentration epitheliale und endotheliale Barrieren.....	39
3.3.1.3	Die Barriereöffnung ist reversibel.....	40
3.3.1.4	Wirkkonzentrationen von mC1C2 sind nicht zytotoxisch .....	41
3.3.2	Effekt auf die Lokalisation und Expression von <i>tight junction</i> -Proteinen ...	42
3.3.2.1	mC1C2 verringert die Plasmamembranlokalisation von Claudin-1 dosisabhängig.....	42
3.3.2.2	Die Barriereöffnung geht mit der Umverteilung von Claudin-1 einher .....	43
3.3.2.3	mC1C2 verändert die Plasmamembranlokalisation von Claudin-1 bis -5, Occludin und Tricellulin .....	45
3.3.2.4	Die Expression von <i>tight junction</i> -Proteinen wird durch mC1C2 beeinflusst .....	47
3.3.2.5	Claudin-1 und -5 werden direkt, Claudin-2 und -4 indirekt durch mC1C2 moduliert.....	47
3.3.2.6	mC1C2 öffnet interzelluläre Kontakte, verändert die Morphologie der <i>tight junction</i> -Stränge von Claudinen und bindet an Claudin-1 und -5.....	49
3.3.2.7	Die Plasmamembranmobilität von Claudin-1 wird in den ersten 5 h nach mC1C2-Administration nicht erhöht .....	52

3.3.3	Zelluläre mC1C2-Lokalisation und Wirkmechanismus.....	53
3.3.3.1	mC1C2 endozytiert zeitabhängig, zusammen mit Claudin-1 oder allein.....	54
3.3.3.2	Clathrin- und Claudin-1-vermittelte Endozytose von mC1C2.....	56
3.3.3.3	Endozytiertes mC1C2 gelangt in Rezyklosomen und reduziert die Claudinexpression .....	59
3.3.3.4	Wirkung von mC1C2 auf Signaltransduktionswege.....	60
3.4	Strukturanalyse und Wirkoptimierung von mC1C2 .....	62
3.4.1	Struktur- und Funktionsbeziehungen von mC1C2.....	62
3.4.1.1	mC1C2 neigt zur Ausbildung von $\beta$ -Faltblatt- und $\alpha$ -Helixstrukturen .....	62
3.4.1.2	Die mC1C2-Wirkregion umfasst die Aminosäuren 1-23 und formt <i>N</i> -terminal ein $\beta$ -Faltblatt- und <i>C</i> -terminal eine $\alpha$ -Helix .....	63
3.4.1.3	Asparagin in Position 22 ist essentiell für die Wirkung und 3D- Struktur von mC1C2 .....	66
3.4.1.4	Die Wirkung von mC1C2 ist nicht von stereospezifischen Interaktionen abhängig.....	67
3.4.2	Wirkoptimierung von mC1C2.....	68
3.4.2.1	mC1C2 kann ohne Wirkeinbuße <i>C</i> -terminal um 4 Aminosäuren verkürzt, nicht aber <i>N</i> -terminal verlängert werden .....	68
3.4.2.2	Die Palmylierung oder Pegylierung von mC1C2 führt nicht zur Wirkverbesserung .....	69
3.5	<i>In vivo</i> -Wirkung von mC1C2 und Derivaten.....	71
3.5.1	mC1C2 hat eine hohe Stabilität in Blutplasma .....	71
3.5.2	mC1C2 und mC1C2-4aaC öffnen das Perineurium reversibel für hydrophile Wirkstoffe .....	71
3.5.3	mC1C2 und mC1C2-4aaC verringern die perineurale Claudin-1- Expression, erhöhen die Durchlässigkeit für große Moleküle und kolokalisieren mit Claudin-1.....	72
3.5.4	Die Wirkung von mC1C2 kann durch die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3-Aktivität aufgehoben werden.....	74
3.6	Untersuchung eines nicht Claudin-abgeleiteten Peptids.....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1	Design Claudin-abgeleiteter Peptidomimetika und ihre Wirkung auf die Dichtheit von Zellbarrieren <i>in vitro</i> .....	77
4.1.1	Effekt von mC1C2 auf Claudine .....	78
4.1.2	Einfluss von mC1C2 auf die <i>tight junction</i> -Morphologie.....	81
4.1.3	Zelluläre Aufnahme von mC1C2 .....	82
4.1.4	mC1C2-Struktur und -Interaktion mit Claudin-1 .....	85
4.2	Wirkoptimierung von mC1C2 .....	89
4.3	Einfluss von mC1C2 auf Claudin-relevante Signalwege.....	91
4.4	Wirkung von mC1C2 auf die Dichtheit von Zellbarrieren <i>in vivo</i> .....	93

<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>112</b>

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Interzelluläre Kontakte von Epithel- und Endothelzellen. ....	1
Abb. 2	Aufbau der Blut-Hirnschranke und der perineuralen Barriere. ....	3
Abb. 3	Möglichkeiten der Wirkstoffpassage über Zellbarrieren. ....	4
Abb. 4	Aufbau der <i>tight junctions</i> . ....	6
Abb. 5	Struktur von Claudinen und Möglichkeiten der Interaktion. ....	6
Abb. 6	Sequenzvergleich der extrazellulären Schleifen der klassischen Claudine. ....	7
Abb. 7	Nomenklatur der Peptidomimetika am Beispiel der Claudin-1-Peptide mC1C2 und hC1C3. ....	19
Abb. 8	Caco-2-Zellen als Testsystem zur Untersuchung des Einflusses von Claudin- Peptidomimetika auf die parazelluläre Dichtheit. ....	36
Abb. 9	Das Claudin-1-Peptidomimetikum mC1C2 erhöht die parazelluläre Durchlässigkeit administrations- und konzentrationsabhängig. ....	38
Abb. 10	mC1C2 steigert die Permeation epi- und endothelialer Barrieren ab 12 h Inkubation. ....	40
Abb. 11	Die Barriereöffnung durch mC1C2 ist reversibel. ....	41
Abb. 12	mC1C2 ist in den Öffnerkonzentrationen nicht zytotoxisch. ....	42
Abb. 13	Die Umverteilung von Claudin-1 durch mC1C2 ist konzentrationsabhängig. ....	43
Abb. 14	Die mC1C2-vermittelte Umverteilung von Claudin-1 beginnt nach 6-12 h Inkubation. ....	44
Abb. 15	Die Umverteilung von Claudin-1 ist reversibel. ....	44
Abb. 16	Das Claudin-1-Peptid mC1C2 führt zur Umverteilung von Claudin-1 bis -5, Occludin und Tricellulin. ....	46
Abb. 17	Expression von <i>tight junction</i> -Proteinen nach Peptidbehandlung. ....	47
Abb. 18	Expression und Lokalisation von <i>tight junction</i> -Proteinen in HEK-293 Zellen. ..	48
Abb. 19	mC1C2 verändert die Plasmamembranlokalisation von Claudin-1 und -5 in Claudin-monotransfizierten HEK-293 Zellen. ....	49
Abb. 20	mC1C2 öffnet die interendothelialen Kontakte in primären Rattengehirnendothelzellen. ....	50
Abb. 21	mC1C2 verringert die Kontinuität von Claudin-1-Strangnetzwerken und verändert die Größe, Parallelität und Form der Claudin-1-Maschen. ....	51
Abb. 22	mC1C2 ändert die Morphologie von Claudin-5-Strangnetzwerken. ....	51
Abb. 23	mC1C2 bindet an die erste extrazelluläre Schleife von Claudin-5. ....	52



---

Abb. 24	mC1C2 erhöht nicht die Plasmamembranmobilität von Claudin-1 in den ersten 5 h nach der Applikation. ....	53
Abb. 25	5,6-Carboxytetramethylrhodamin beeinflusst die mC1C2-Wirkung nicht. ....	53
Abb. 26	mC1C2 reichert sich zeitabhängig, zusammen mit Claudin-1 oder allein, intrazellulär und plasmamembranständig in Claudin-1-transfizierten Zellen an. .	54
Abb. 27	mC1C2 reichert sich in Zellen mit endogener Claudinexpression intrazellulär und membranständig an.....	55
Abb. 28	Die Internalisierung von mC1C2 findet verstärkt in Gegenwart von Claudin-1 statt.....	56
Abb. 29	Die zelluläre Aufnahme von mC1C2 ist temperatursensitiv.....	57
Abb. 30	mC1C2 wird spezifisch über die Clathrin-vermittelte Endozytose, zusammen mit Claudin-1, aufgenommen.....	58
Abb. 31	In höheren Konzentrationen wird mC1C2 vor allem über die Clathrin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose aufgenommen. ....	58
Abb. 32	Nach der Aufnahme in die Zellen verbleibt mC1C2 $\geq 2$ h in Rezyklosomen, bewirkt die Internalisierung und den Abbau von Claudin-1. ....	59
Abb. 33	Einfluss von Inhibitoren des NF $\kappa$ B-Signaltweges auf die mC1C2-Wirkung. ....	61
Abb. 34	Die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3 verstärkt die barriereöffnende Wirkung von mC1C2. ....	62
Abb. 35	mC1C2 hat eine starke Neigung zur $\beta$ -Faltblatt- und $\alpha$ -Helixbildung.....	63
Abb. 36	Die Wirkregion von mC1C2 erstreckt sich über die Aminosäuren 1-23 des Peptids, wobei der N-Terminus eine $\beta$ -Faltblatt und der C-Terminus eine $\alpha$ -helikale Neigung besitzt. ....	64
Abb. 37	Einfluss von N- oder C-terminalen Verkürzungen auf die mC1C2-Tertiärstruktur.....	65
Abb. 38	Die N22-Substitution in mC1C2 führt zum Wirkungsverlust und einer veränderten Tertiärstruktur.....	66
Abb. 39	Die Wirkung von mC1C2 ist nicht von stereospezifischen Wechselwirkungen abhängig. ....	68
Abb. 40	Die C-terminale Verkürzung von mC1C2 um 4 Aminosäuren verringert die Öffnerwirkung nicht, wohingegen die N-terminale Verlängerung zum Wirkverlust führt. ....	69
Abb. 41	Pegylierung oder Palmitoylierung von mC1C2 resultieren nicht in der Verringerung der minimalen Wirkkonzentration.....	70

---

---

Abb. 42	Stabilität und Abbauprodukte von mC1C2 in Blutplasma.....	72
Abb. 43	mC1C2 erhöht reversibel die Durchlässigkeit des Perineuriums vom <i>N. ischiadicus</i> bei Ratten für nicht-perineuriumgängige Analgetika.....	73
Abb. 44	Das wirkoptimierte Peptid mC1C2-4aaC erhöht die Durchlässigkeit des Perineuriums vom <i>N. ischiadicus</i> von Ratten für nicht-perineuriumgängige Analgetika. ....	73
Abb. 45	mC1C2 und mC1C2-4aaC verringern die perineurale Claudin-1-Expression und erhöhen dessen Durchlässigkeit für <i>Evan's blue albumin</i> .....	74
Abb. 46	Die Blockierung der Glykogensynthase-Kinase-3 hebt die mC1C2-vermittelte Öffnung der Perineuriums auf.....	75
Abb. 47	Struktur- und Funktionsuntersuchung eines nicht Claudin-abgeleiteten Peptids..	75
Abb. 48	Strukturüberlagerung von Claudin-15 mit mC1C2.....	86
Abb. 49	Modell der Interaktion zwischen mC1C2 und Cld1.....	88
Abb. A50	mC1C2 verändert die Parallelität und Form von Claudin-1-basierten Strangnetzwerken. ....	112
Abb. A51	Anreicherung von TAMRA-mC1C2 in Caco-2-Zellen.....	112
Abb. A52	Der siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von Rab5, -4 und -7 beeinflusst die Endozytose von mC1C2.....	113
Abb. A53	Die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3 führt in Caco-2-Zellen zur veränderten Expression von <i>tight junction</i> -Proteinen nach mC1C2-Behandlung.	113
Abb. A54	Claudin-1 zeigt in Caco-2-Zellen auch eine Anreicherung in Bereichen außerhalb der <i>tight junctions</i> . ....	114
Abb. A55	mC1C2 initiiert die Öffnung der <i>tight junctions</i> . ....	114
Abb. A56	Sequenzvergleich der Peptide mC1C2, mC2C2, mC3C2, hC4C2, mC5C2 und Bestimmung der Wirkregion von mC1C2.....	114

---

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Chemikalien.....	15
Tab. 2	Geräte .....	16
Tab. 3	Verbrauchsmittel .....	16
Tab. 4	Kommerzielle Reaktionsansätze .....	16
Tab. 5	Plasmide und siRNAs.....	17
Tab. 6	Antikörper.....	17
Tab. 7	Eukaryotische Zellen, Bakterienstämme und Versuchstiere.....	17
Tab. 8	Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Marker .....	18
Tab. 9	Software.....	18
Tab. 10	Hergestellte Peptidomimetika zur Zellbarrieremodulierung.....	19
Tab. 11	Kultivierungsbedingungen für die Routinekultivierung eukaryotischen Zellen ...	22
Tab. 12	Kultivierungsbedingungen der Zellen auf Filtern .....	23
Tab. 13	Verwendete Endozytoseinhibitoren und -marker.....	28
Tab. 14	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	31
Tab. A15	Sekundärstruktureigenschaften von mC1C2 in verschiedenen Puffern.....	115
Tab. A16	Sekundärstrukturvergleich von mC1C2 und mC2C2.....	115
Tab. A17	Sekundärstruktureigenschaften von verkürzten mC1C2-Varianten.....	115
Tab. A18	Sekundärstrukturvergleich von mC1C2 und mC1C2(N22S).....	116
Tab. A19	Sekundärstrukturvergleich von mC1C2, Invers-mC1C2 und D-AS-mC1C2 .....	116
Tab. A20	Sekundärstrukturvergleich von mC1C2 und mC1C2+1aaN-4aaC .....	116
Tab. A21	Pfotendruckschwelle vor Behandlungsbeginn .....	116

## Abkürzungsverzeichnis

	<b>A</b>		
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	PDZ	<i>postsynaptic density protein 95/Drosophila disc large tumor suppressor/zonula occludens protein-1</i>
AD3	Alexa Fluor 680-3 kDa Dextran	PEG	Polyethylenglykol
	<b>B</b>	PF	mit der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran assoziiert
bEnd5	<i>mouse brain endothelioma cell line 5</i>	P <sub>K</sub>	Permeationskoeffizient
bFGF	<i>bovine fibroblast growth factor</i>	PLL	Poly-L-Lysin
BHS	Blut-Hirnschranke	PM	Plasmamembran
BSA	bovines Serumalbumin	pMBMEC	<i>primary mouse brain microvascular endothelial cells</i>
	<b>C</b>	PNS	peripheres Nervensystem
C16	Palmitinsäure	PP	Phosphatpuffer
C-CPE	Cld-bindender Teil vom CPE ( <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin)	pRBMEC	<i>primary rat brain microvascular endothelial cells</i>
Caco-2	<i>human caucasian colon adenocarcinoma cell line 2</i>		<b>Q</b>
Cdx2	<i>caudal-related homeobox 2</i>	QNZ	N4-[2-(4-Phenoxyphenyl)ethyl]-4,6-quinazolindiamin
CD	Zirkulardichroismus		<b>R</b>
Cld	Claudin	Rab	<i>Ras-related protein</i>
	<b>D</b>		<b>S</b>
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly <sup>5</sup> -ol]-Enkephalin	SD	Standardabweichung
D-AS	D-Aminosäure	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid		<b>T</b>
DPBS-/- bzw. +/-	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline, ohne/mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup></i>	TAMP	<i>TJ-associated MARVEL protein</i>
	<b>E</b>	TAMRA	5,6-Carboxytetramethylrhodamin
EBA	<i>Evan's blue albumin</i>	TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TER	transzellulärer elektrischer Widerstand
EF	mit der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran assoziiert	TFA	Trifluoressigsäure
EZS1/2	extrazelluläre Schleifen 1/2	TFE	Trifluoethanol
	<b>F</b>	TJ	<i>tight junction</i>
FD10	Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran	TM	Transmembrandomäne
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	Tric	Tricellulin
FKS	fetales Kälberserum	Tris-HCl	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
FRAP	<i>fluorescence recovery after photo bleaching</i>	TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
	<b>G</b>	TTX	Tetrodotoxin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase-3		<b>Z</b>
	<b>H</b>	ZNS	zentrales Nervensystem
HBSS-/- bzw. - +/-	<i>Hank's balanced salt solution, ohne/mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup></i>	ZO-1	<i>zonula occludens protein-1</i>
HEK-293	<i>human embryonic kidney cell line 293</i>		
	<b>J</b>		
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie		
HT29/B6	<i>human tumor cell line 29/B6</i>		
	<b>J</b>		
JAM	<i>junction adhesion molecule</i>		
	<b>L</b>		
LogP	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient		
LSM	<i>laser scanning microscope</i>		
LY	<i>Lucifer yellow</i>		
	<b>M</b>		
MARVEL	<i>myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link</i>		
MBP	Maltose-Bindeprotein		
MDCK-II	<i>Madin-Darby canine kidney cell line II</i>		
MTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid		
	<b>N</b>		
NEA	nicht essentielle Aminosäuren		
	<b>O</b>		
Occ	Occludin		
	<b>P</b>		
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat		

## Zusammenfassung

Epitheliale und endotheliale Zellen bilden pharmakologische Barrieren in vielen Teilen des Organismus. Zum Beispiel wird das periphere Nervensystem durch das Perineurium und das zentrale Nervensystem durch die Blut-Hirnschranke gegenüber den meisten hydrophilen Wirkstoffen abgeschirmt. Diese Barrieren erschweren dadurch die Therapie z.B. von neurodegenerativen Erkrankungen oder eine spezifische Schmerzbehandlung im Perineurium. Bisherige Strategien zur verbesserten Wirkstoffzuführung basieren auf der unspezifischen Öffnung von Zellbarrieren mit zum Teil molaren Dosierungen, sind durch hohe Risiken und Nebenwirkungen und eingeschränkte Effizienz gekennzeichnet oder benötigen aufwändige galenische Modifikationen. Klinische Anwendungen sind deshalb bisher sehr begrenzt.

Maßgebend für die parazelluläre Barriereabdichtung sind bestimmte Claudin (Cld)-Subtypen. Diese Transmembranproteine dichten mit ihren extrazellulären Schleifen (EZS) den parazellulären Spalt ab und begrenzen damit die Stoffdiffusion zwischen den Zellen. Die Kombination der Cld-Subtypen ist gewebespezifisch. Ihre Modulation durch EZS-Peptidomimetika stellt daher eine vielversprechende Strategie dar, um die Durchlässigkeit einer Barriere spezifisch und sicher zu erhöhen.

Zur Modulation von Cld-Interaktionen für die parazelluläre Öffnung wurden Peptidomimetika der EZS1 und -2 von Cld1 bis -5 hergestellt und ihre molekularen, strukturellen und Bindungseigenschaften untersucht. Schwerpunkt der Arbeit war das Cld1-Peptid mC1C2. Es führte in Zellkulturbarrieren mit unterschiedlicher Cld-Ausstattung zur Umverteilung von Cld1-5 von der Zellmembran ins Zytosol und dadurch zur Beeinträchtigung der Barrierefunktion. mC1C2 internalisierte in Minuten, interagierte direkt mit Cld1 und -5 und indirekt mit Cld2-4, modulierte die Cld-Strangstruktur und erhöhte ab 6 h konzentrationsabhängig und reversibel die Permeation hydrophiler, ansonsten nicht barrieregängiger Substanzen. Diese Befunde bestätigten sich *in vivo*: mC1C2 führte durch Cld1-Bindung und über den Transkriptionsfaktor Cdx2 zur Cld1-Downregulation im Cld1-dominierten Perineurium. Es kam zur zeit-, dosisabhängigen, nebenwirkungsfreien Öffnung für hydrophile, nicht-perineuriumgängige Wirkstoffe für bis zu 48 h. Mit Struktur-/Funktionsuntersuchungen wurden die mC1C2-Wirkregion ermittelt, optimierte Derivate hergestellt und die Peptidaktivität auf ein  $\beta$ -Faltblatt, das von einer  $\alpha$ -Helix flankiert wird, eingeeignet. Auf dieser Grundlage wurde ein Modell zur Interaktion zwischen mC1C2 und Cld1 entwickelt. Insgesamt wird das Verständnis über die molekulare Struktur, Funktion und Regulation von Claudinen als Barrierebildner und als Ziel für pharmakologische Interventionen erweitert und die peptidbasierte Permeationsverstärkung als eine aussichtsreiche Strategie für die spezifische, transiente, nebenwirkungsfreie Öffnung von Zellbarrieren identifiziert.

## Summary

Epithelial and endothelial cells constitute pharmacological barriers in organs such as the perineurium and the blood-brain barrier, which efficiently limit the delivery of hydrophilic drugs into the peripheral and central nervous system, respectively. As a consequence, specific treatment of pain via the perineurium or therapy of e.g. neurodegenerative diseases is hampered. Current strategies to improve drug penetration include unspecific opening of cell barriers using high doses, produce side-effects or need specific drug formulation which limits their clinical application.

The paracellular tightening is mediated by specific claudin (Cld) subtypes. The extracellular loops (ECL) of these transmembrane proteins close the paracellular gap against uncontrolled diffusion. As different barriers show tissue specific Cld subtype patterns, their modulation is a promising strategy to improve drug release and to enable safe and reliable drug access through cell barriers.

Aimed at paracellular opening, peptidomimetics derived from ECL1 and -2 of Cld1-5 were developed to modulate Cld interactions. Focusing on the Cld1 peptide mC1C2, their molecular, structural and binding properties were examined. In cell culture models exerting different Cld compositions, mC1C2 application led to a redistribution of Cld1 to -5 from the plasma membrane to the cytosol, thereby compromising the barrier tightness. mC1C2 was internalized within minutes, it interacted directly with Cld1 and -5 and indirectly with Cld2-4. mC1C2 modulated the Cld strand morphology and, starting 6 h after administration, reversibly increased the permeability for hydrophilic, usually barrier-impermeable molecules in a concentration dependent manner. These findings were confirmed *in vivo* in the Cld1-dominated perineurium, where mC1C2 induced Cld1 down-regulation by binding to Cld1 and suppressing the transcription factor Cdx2. For up to 48 h, a time- and dose depended opening of the perineurium was observed for hydrophilic compounds being perineurium-impermeable under normal conditions. Using a structure-/function approach, the active region of mC1C2 was elucidated, an optimized derivative was developed and the activity of mC1C2 was attributed to a  $\beta$ -sheet, flanked by an  $\alpha$ -helix. These results provided the basis for the development of a model describing the spatial interaction of mC1C2 and Cld1.

The knowledge about the molecular structure, function and regulation of claudins is extended in the light of their barrier-forming properties and as a target for pharmacological intervention. Furthermore, the data indicate that a peptide-based strategy to enhance drug permeation is promising to specifically, transiently and safely open cellular barriers for drug delivery.

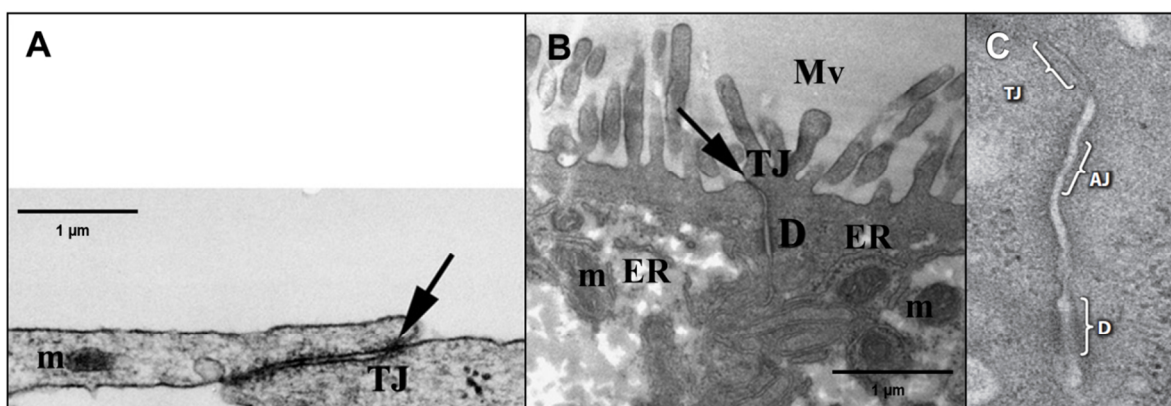
# 1 Einleitung

## 1.1 Epitheliale und endotheliale Barrieren

Epithelgewebe bilden innere und äußere Oberflächen von Organen [1]. Während durch Epithelzellen z.B. der Gastrointestinaltrakt ausgekleidet oder die Epidermis der Haut gebildet wird, kleiden die ebenfalls zum Epithel gehörenden Endothelzellen das Blut- und Lymphgefäßsystem aus. Epitheliale und endotheliale Zellen sind somit wichtige Barrieren gegenüber inneren und äußeren Einflüssen. Gleichzeitig können Barriereigenschaften der genannten Zellen den Durchtritt von pharmakologischen Substanzen zum Wirkort verhindern, wodurch Diagnose und Behandlung erschwert werden.

### 1.1.1 Funktion und Aufbau

Epitheliale und endotheliale Barrieren sind entscheidend für die Aufrechterhaltung stabiler physiologischer Bedingungen im Organismus. Wesentlich hierfür ist ihre Fähigkeit, den Stofftransport zu kontrollieren, wodurch sie Kompartimentierung und regulierten Stoffaustausch zwischen Geweben ermöglichen [2]. Epithelzellen wachsen ein- bis mehrschichtig, während Endothelzellen stets einschichtig vorliegen [1]. Beide Zelltypen finden sich an einer Basalmembran, durch die sie mit darunterliegenden Bindegewebschichten verbunden sind. Sowohl Epithel- als auch Endothelzellen sind polarisiert, d.h. sie besitzen eine apikale (luminale) Zellseite und eine basale (abluminale) Zellseite [3]. Die Zellen stehen über die Zell-Zell-Kontakte der *tight junctions* (TJs), *adherens junctions*, *macula adherens* (Desmosom, nur in Epithelzellen) und *gap junctions* miteinander in Verbindung (Abb. 1) [4, 5]. Die TJs enthalten transmembranale Proteine und umrunden die gesamte Zelle.



**Abb. 1 Interzelluläre Kontakte von Epithel- und Endothelzellen.** (A-C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von (A) Rattengehirnkapillarendothelzellen, (B) humanen Kolonepithelzellen (Caco-2) und (C) Saumzellen (Dünndarmepithel). Die *tight junctions* (TJs, Pfeil) sind der apikalste Zell-Zell-Kontakt und verschließen den parazellulären Spalt gröbenselektiv gegenüber der interzellulären Diffusion von Stoffen. AJ, *adherens junctions*, D, *macula adherens* (Desmosom); ER, endoplasmatisches Retikulum; m, Mitochondrium; Mv, Mikrovilli. (A, B) verändert nach [6]; (C) nach [2].

Dadurch wird die Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Bereich mit unterschiedlichem Proteinbesatz unterteilt [7, 8]. Abhängig von ihrer Funktion unterscheiden sich epitheliale und endotheliale Barrieren in ihrer Dichtigkeit. Diese wird wesentlich durch ihre transzellulären Transporteigenschaften und die Zell-Zell-Kontakte der TJs, die die parazelluläre Stoffdurchlässigkeit regulieren, bestimmt (Abb. 1) [4, 5]. Während z.B. die auf Stoffresorption spezialisierten Epithelien des Dünndarms eine hohe parazelluläre Durchlässigkeit aufweisen [9], sind andere Bereiche des Körpers von besonders dichten Zellbarrieren umgeben. Hierzu zählen u.a. das zentrale und periphere Nervensystem (ZNS/PNS), die durch die Blut-Hirnschranke (BHS) und das Perineurium geschützt werden [10]. Die Dichtigkeit der Barrieren spiegelt sich in ihrem transzellulären elektrischen Widerstand (TER) wider, der z.B. in der BHS  $>1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  [11] und im Dünndarm  $<100 \Omega \cdot \text{cm}^2$  beträgt [9].

#### 1.1.1.1 Das Perineurium

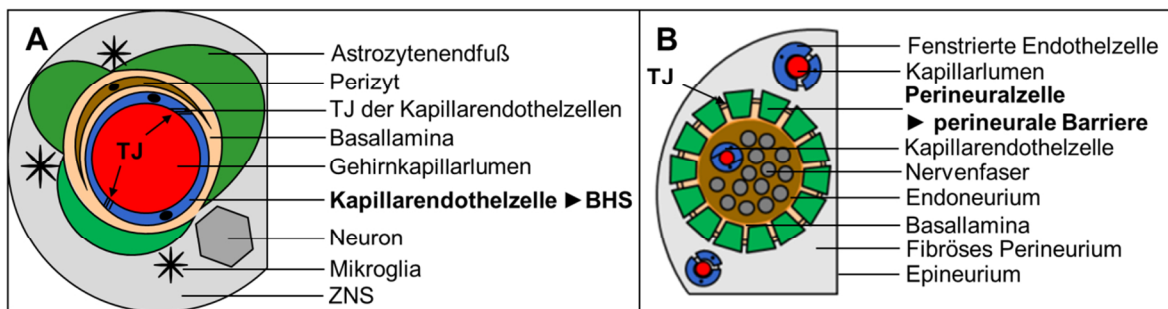
Die epithelioiden Zellen des Perineuriums bilden eine Barriere (Abb. 2B) und ermöglichen dadurch die Homöostase des PNS [12]. Das Perineurium besteht aus bis zu 15 Zellschichten, die sich konzentrisch um das Endoneurium, in dem die Nervenfasern verlaufen, lagern. Jede Perineuralzellschicht ist dabei durch eine Basalmembran von der anderen getrennt [13]. Maßgeblich für die Barrierebildung sind die TJs der Perineuralzellen [14, 15]. Neben der Regulation der Passage von Ionen, Nährstoffen und dem Schutz vor neurotoxischen Substanzen [16], unterbindet das Perineurium auch effizient die Permeation von hydrophilen Arzneistoffen ins PNS [17, 18].

#### 1.1.1.2 Die Blut-Hirnschranke

Die BHS ist eine selektive Zellbarriere, die den Stoffaustausch zwischen Blut und ZNS kontrolliert und dadurch für stabile physiologische Bedingungen im ZNS sorgt [19]. Durch sie wird der Austausch von Ionen, Nährstoffen und Stoffwechselendprodukten reguliert und das Vordringen von z.B. Neurotoxinen ins ZNS unterbunden [20]. Die BHS wird von Gehirnkapillarendothelzellen, die die Wand der Gehirnkapillaren auskleiden, gebildet (Abb. 2A) [21]. Ihre Barriereigenschaften hängen vom Vorhandensein der TJs ab [22] und sind nicht starr, sondern können den jeweiligen physiologischen Notwendigkeiten angepasst werden. Dies geschieht in Wechselwirkung mit Perizyten, Astrozyten, Nervenzellen und Mikroglia, die zusammen mit den Gehirnkapillarendothelzellen die „Neurovasku-



läre Einheit“ bilden [23]. Aufgrund ihrer Barriereigenschaften verhindert die BHS das Vordringen von >98% aller niedermolekularen Wirkstoffe ins ZNS [24].



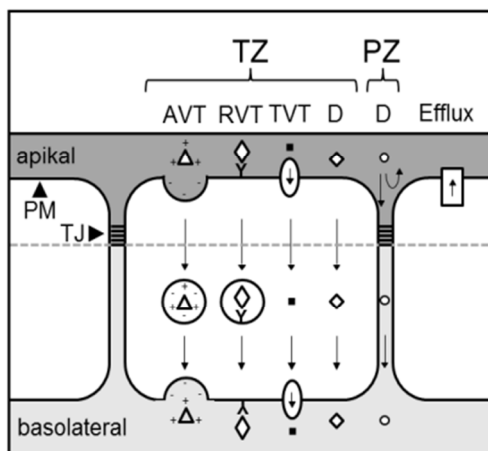
**Abb. 2 Aufbau der Blut-Hirnschranke und der perineuralen Barriere.** Schematische Darstellung der Blut-Hirnschranke (BHS) und der perineuralen Barriere. (A) Die BHS wird aus Gehirnkapillarendothelzellen (blau) gebildet, die die Wand von Gehirnkapillaren (rot) auskleiden und mit ihren abdichtenden *tight junctions* (TJs, Pfeil) den parazellulären Spalt verschließen; zusammen mit Astrozyten, Perizyten, Neuronen und Gliazellen bilden sie die „Neurovaskuläre Einheit“ und regulieren die Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS). (B) Die perineurale Barriere wird aus den epithelioiden Zellen des Perineuriums (Perineuralzellen, grün) gebildet, die durch ihre abdichtenden TJs die parazelluläre Diffusion von Stoffen ins Endoneurium kontrollieren und so die Homöostase des peripheren Nervensystems aufrechterhalten.

### 1.1.2 Wirkstoffdurchtritt durch Zellbarrieren

Der Wirkstoffdurchtritt durch Epithel- und Endothelzellschichten wird durch die Barriereigenschaften der Zellen und die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs bestimmt. Die Wirkstoffpassage durch Zellen kann parazellulär oder transzellulär erfolgen (Abb. 3) [9, 25]. Die Fähigkeit zur transzellulären Diffusion eines Wirkstoffes hängt stark von seiner Lipophilie ab. Sehr lipophile Wirkstoffe (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient,  $\text{LogP}$ , >5) neigen dazu, sich lediglich in der Plasmamembran anzureichern, wohingegen hydrophile Stoffe ( $\text{LogP}$  <0) nur sehr begrenzt in diese eindringen. Im Gegensatz dazu können Wirkstoffe mit einem  $\text{LogP}$  zwischen >1 und  $\leq 5$  transzellulär durch die Plasmamembran diffundieren [26-28]. Allerdings werden diese zum Teil dabei durch Mitglieder der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporterfamilie und anderen Effluxtransportern aus der Zelle geschleust (Abb. 3) [29, 30] oder durch Enzyme abgebaut [31]. Da die transzelluläre Diffusion hydrophiler Wirkstoffe durch die Plasmamembran unterbunden wird, steht für diese Verbindungen, wenn sie nicht durch Transporter erkannt oder durch receptor-/adsorptionsvermittelte Transzytose die Plasmamembran überwinden, nur der parazelluläre Weg zur Verfügung [9, 28]. Die parazelluläre Diffusion von Wirkstoffen wird in Epithel- und Endothelzellen allerdings durch die TJs limitiert (Abb. 3) [5, 7].

Aufgrund der genannten Aspekte ist die Zahl zellbarrieregängiger Wirkstoffe relativ gering und beschränkt sich auf Moleküle mit sehr spezifischen physikochemischen Eigenschaften. So zeigen 90% der oral verabreichten Wirkstoffe, die die klinische Phase II erreicht ha-

ben, ein Molekulargewicht  $\leq 500$  Da, einen  $\text{LogP} \leq 5$ ,  $\leq 5$   $\text{H}^+$ -Donatoren und  $\leq 10$   $\text{H}^+$ -Akzeptoren [28]. BHS-gängige Wirkstoffe sind durch noch stringenteren Eigenschaften charakterisiert: Molekulargewicht  $< 450$  Da, berechneter  $\text{LogP} < 5$ ,  $< 3$   $\text{H}^+$ -Donatoren und  $< 7$   $\text{H}^+$ -Akzeptoren [32]. Dadurch unterbindet die BHS das Vordringen von  $> 98\%$  aller niedermolekularen und nahezu 100% der höhermolekularen (Antikörper, Peptide, rekombinante Proteine) Wirkstoffe in das ZNS [24]. Auch das Perineurium verhindert das Eindringen von hoch- und niedermolekularen Verbindungen [33, 34], inklusive hydrophiler Wirkstoffe [17, 18], ins PNS. Dies führt dazu, dass z.B. für die lokale Schmerzbehandlung (z.B. Patientenmobilisierung nach orthopädischen Operationen) überwiegend lipophile, unspezifisch wirkende Lokalanästhetika wie Lidocain oder Ropivacain verwendet werden [18, 35]. Diese blockieren neben der Schmerzweiterleitung z.B. auch Motoneuronen und erschweren dadurch die aktive Teilnahme von Patienten an physiotherapeutischen Behandlungen. Spezifisch auf Schmerzrezeptoren wirkende Arzneistoffe wie der  $\mu$ -Opioid Rezeptor-Agonist [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO) können aufgrund ihrer hydrophilen Natur und der damit verbundenen geringen parazellulären Diffusion durch das Perineurium, nicht eingesetzt werden [18].



**Abb. 3 Möglichkeiten der Wirkstoffpassage über Zellbarrieren.** Lipophile Wirkstoffe können transzellulär (TZ) durch die Plasmamembran (PM) diffundieren (D). Die Diffusion hydrophiler Wirkstoffe unterbindet die PM, so dass diese die Zellbarriere transzellulär nur über die transporter-vermittelte Transzytose (TVT, z.B. Glukose Transporter-1), rezeptorvermittelte Transzytose (RVT, z.B. *low density lipoprotein*-Rezeptor) oder adsorptionsvermittelte Transzytose (AVT) überwinden können. Alternativ können hydrophile Wirkstoffe Zellbarrieren auch parazellulär (PZ) überwinden. Das Ausmaß variiert allerdings gewebeabhängig aufgrund der *tight junction* (TJ)-Komposition stark und findet z.B. im Perineurium nur sehr begrenzt und in der Blut-Hirnschranke faktisch nicht statt. Alle Stoffe können einem Rücktransport durch ABC-Transporter (Efflux) unterliegen.

Insgesamt führen die Barriereigenschaften von Epithel- und Endothelzellen zur Aufrechterhaltung von Kompartimentierung und Homöostase. Parallel erschweren sie jedoch erheblichen die Diagnostik und Behandlung von ZNS-Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Schlaganfall, Gehirntumoren [24] oder die lokale Schmerztherapie [18, 36], da sie, bedingt durch die TJs, die parazelluläre Diffusion von hydrophilen Wirkstoffen zum Zielort stark limitieren.

## 1.2 Die *tight junctions*

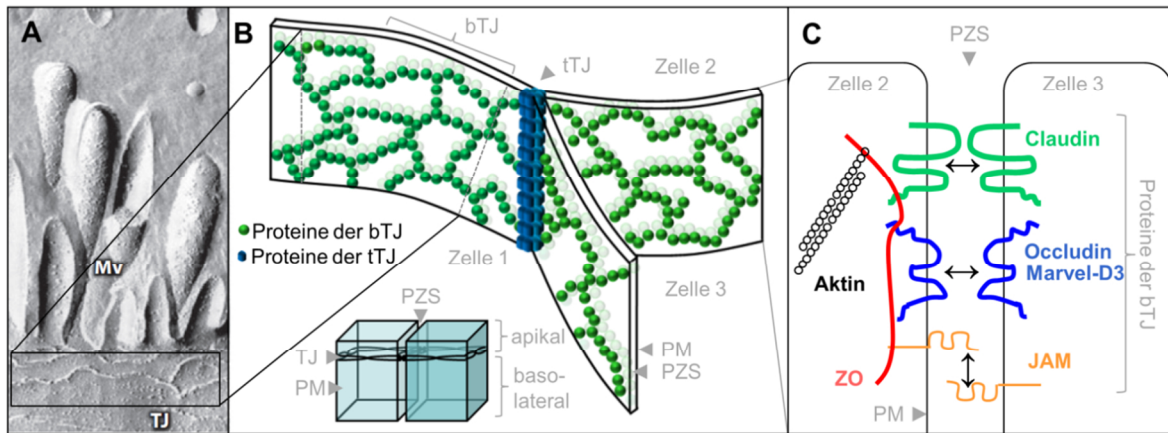
In Epithelzellen bilden die TJs die Grenze zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran (Abb. 3) und stellen den apikalsten Zell-Zell-Kontakt dar (Abb. 1) [4]. In Endothelzellen liegen die TJs lateral vor, jedoch nicht separat, sondern in sehr enger räumlicher Nähe zu den *adherens junctions* [37].

### 1.2.1 Funktion

Die TJs dichten den parazellulären Spalt zwischen Epithel- bzw. Endothelzellen ab und bilden damit eine Barriere gegenüber dem parazellulären Durchtritt hydrophiler Stoffe [38-40]. Abhängig von der gewebespezifischen, molekularen Proteinzusammensetzung der TJs variiert die parazelluläre Abdichtung hinsichtlich Größe und Ladung [41]. Neben der Abdichtung der Zellzwischenräume trennen die TJs apikale (luminale) von basolateralen (ab-luminalen) Plasmamembranbestandteilen [7, 8], wodurch sie an der Ausbildung und dem Erhalt der Zellpolarität beteiligt sind [42]. Letzteres ermöglicht u.a. die polare Verteilung von Transportern zur Nährstoffaufnahme und Entgiftung des ZNS [43]. Durch die polare Verteilung von z.B. ABC-Transportern (Abb. 3) können wiederum Wirkstoffe gerichtet aus Zellen geschleust werden [29, 30]. Darüber hinaus bilden die TJs eine Signalplattform und sind dadurch in Prozessen wie Zelldifferenzierung und Proliferation [44] involviert.

### 1.2.2 Bestandteile und Struktur

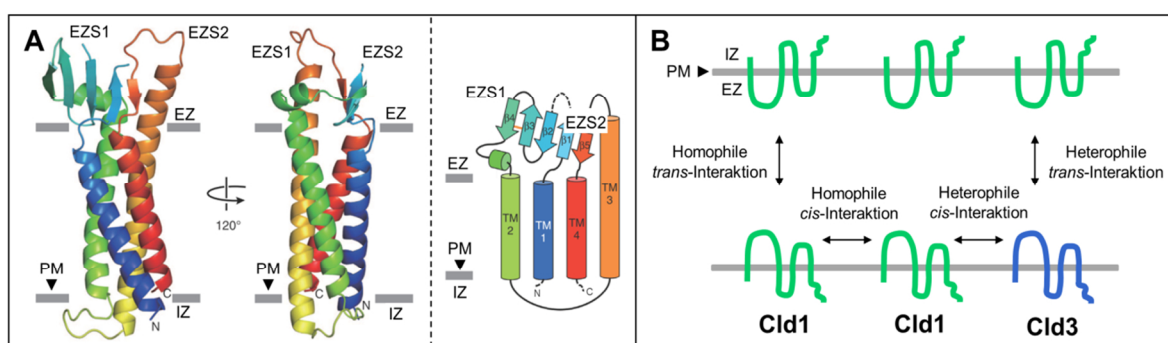
Die TJs sind ein Multiproteinkomplex der aus Transmembranproteinen und membranassoziierten Proteinen besteht. Zu den wichtigsten Transmembranproteinen gehören die Claudin (Cld)-Familie [45] und die *TJ-associated (myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link, MARVEL) proteins* (TAMPs) [46] Occludin (Occ) [47], Tricellulin (Tric) [48] und MarvelD3 [49]. Darüber hinaus lokalisieren in den TJs u.a. die *junction adhesion molecules* (JAMs) [50] und der *coxsackie adenovirus receptor* [51] (Abb. 4). Zur Gruppe der Membran-assoziierten TJ-Proteine gehören z.B. das *zonula occludens protein* (ZO) [52] und Cingulin [53] (Abb. 4). Mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die TJs einen die Zelle umschließenden Ring (Abschlussleiste) bilden, an dem die Plasmamembranen benachbarter, barrierebildender Zellen nahezu miteinander zu fusionieren scheinen [4] (Abb. 4). In Gefrierbruch-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass dieser Ring aus einem Strangnetzwerk aus kontinuierlichen und diskontinuierlichen Partikeln aufgebaut ist [38, 54].



**Abb. 4 Aufbau der tight junctions.** (A) Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Aufnahme von intestinalen Epithelzellen; die tight junctions (TJs) sind als Abschlussleiste in Form eines Netzwerkes aus intermembranalen Strängen sichtbar; Mv, Mikrovilli; verändert nach [2]. (B, C) Schematische Darstellung des TJ-Kontaktbereiches dreier Zellen; der parazelluläre Spalt (PZS) zwischen zwei Zellen wird durch ein die Zelle umschließendes Netzwerk von TJ-Proteinen (Claudine, junction adhesion molecules (JAMs), Occludin, MarvelD3) verschlossen, wobei die Claudine die Strangbildung und maßgeblich die Abdichtungsfunktion vermitteln; der PZS im Drei-Zell-Kontakt wird von Tricellulin abgedichtet; nicht TJ-spezifische zonula occludens proteins (ZO) stellen den Kontakt der transmembranen TJ-Proteine mit dem Aktinzytoskelett her; PM, Plasmamembran; bTJ, bizelluläre TJ; tTJ, trizelluläre TJ; verändert nach [55].

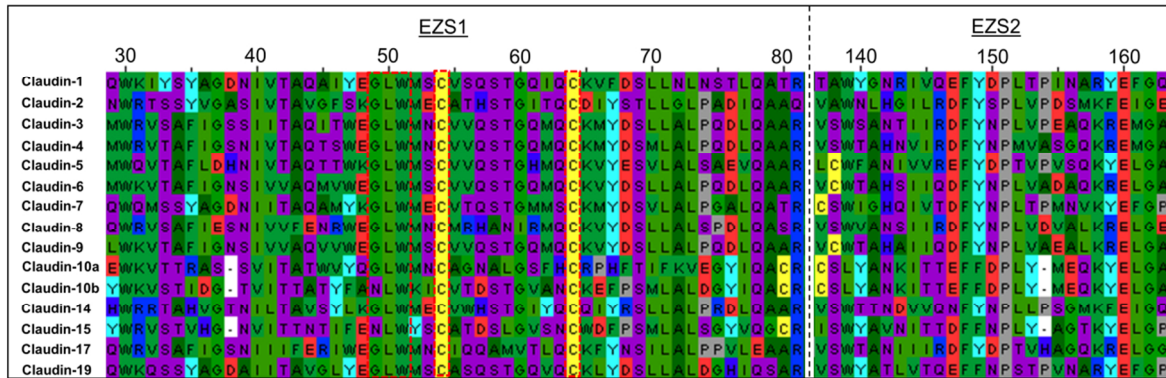
### 1.2.2.1 Claudine – Grundlage der parazellulären Abdichtung

In Säugetieren umfasst die Familie der Claudine aktuell 27 Mitglieder [56], wobei die Cld-Zugehörigkeit der zuletzt entdeckten Cld25-27 [57] umstritten ist [58]. Claudine gehören zur pfam00822 Superfamilie [59] und sind durch zwei extrazelluläre Schleifen (EZS1/2), eine intrazelluläre Schleife, vier Transmembrandomänen sowie zytosolische  $NH_2$ - und  $COOH$ -Termini ( $N$ -/ $C$ -Termini) charakterisiert (Abb. 5A) [60].



**Abb. 5 Struktur von Claudinen und Möglichkeiten der Interaktion.** (A) Darstellung der Claudin-15 (Cld15)-Proteinstruktur; die vier Transmembrandomänen (TM) sind  $\alpha$ -helikal, die erste extrazelluläre Schleife (EZS1) besteht aus vier antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ 1-4), die EZS2 enthält ein  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 5) und große unstrukturierte Anteile; die EZS1 und -2 interagieren über  $\beta$ 1 und  $\beta$ 5; in der EZS1 besteht zwischen  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 eine intramolekulare Disulfidbrücke (A, rechts; orange); verändert nach [61]. (B) Möglichkeiten homophiler (zwischen einem Subtyp, grün) und heterophiler (zwischen zwei Subtypen, grün/blau) Cld-Interaktion innerhalb der Plasmamembran (PM) einer Zelle (cis) und zwischen zwei Zellen (trans). EZ, extrazellulär; IZ, intrazellulär; N,  $NH_2$ -Terminus; C,  $COOH$ -Terminus; der C-Terminus ist in A verkürzt dargestellt.

Mit Ausnahme von z.B. Cld23 oder -25, die ein Molekulargewicht  $>30$  kDa haben, ist die Mehrzahl der Claudine  $\sim 23$  kDa groß [56]. Auf Basis von Sequenzhomologien lassen sich die Claudine in klassische (Cld1-10, -14, -15, -17, -19) und nicht klassische Subtypen (Cld11-13, -16, -18, -20-24/(-25-27)) unterteilen [41, 57]. Abb. 6 zeigt einen Sequenzvergleich zwischen der EZS1 und -2 der klassischen Claudine.



**Abb. 6 Sequenzvergleich der extrazellulären Schleifen der klassischen Claudine.** Sequenzvergleich zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife (EZS1/2) von murinem Claudin-1 (NP\_057883.1), -2 (NP\_057884.1), -3 (NP\_034032.1), -4 (NP\_034033.1), -5 (NP\_038833.2), -6 (NP\_061247.1), -7 (NP\_001180548.1), -8 (NP\_061248.1), -9 (NP\_064689.2), -10a (NP\_076367.2), -10b (NP\_067361.2), -14 (NP\_001159397.1), -15 (NP\_068365.1), -17 (NP\_852467.1), -19 (NP\_694745.1). Eigenschaften der Aminosäuren: violett, polar; grün, unpolar; rot, sauer; blau, basisch; gelb, Cystein; türkis, Tyrosin; grau, Prolin; ---, konserviertes Sequenzmotiv der EZS1 aller Claudine (G-L-W-x-x-C[9 Aminosäuren]-C); Sequenzanordnung, ClustalW2 [62]; Darstellung, Jalview [63].

Die klassischen, aber auch einige nicht klassische Claudine [56] lokalisieren bizellulär im apikalen Kontaktbereich der Plasmamembran zweier Cld-exprimierender Zellen (Abb. 4B, C). Die Mitglieder der Cld-Familie können zudem in abdichtende und porenbildende Subtypen untergliedert werden. Zu den abdichtenden Typen gehören u.a. Cld1 [64], -3 [65], und -5 [66]. Bei den Porenbildnern existieren anionen- (u.a. Cld10a [67]) und kationenselektive (u.a. Cld2 [68], -10b [67], -16 [69]) Typen. Eine Sonderstellung nimmt möglicherweise Cld4 ein, das in Abhängigkeit des untersuchten Zelltyps und dessen Cld-Musters als Barriere- oder Porenbildner auftritt [70-72]. Die Kombination verschiedener Cld-Subtypen führt zur gewebespezifischen, größen- und ladungsselektiven, parazellulären Abdichtung und damit zu den unterschiedlichen Barriereigenschaften [41, 70]. Die Ladungsselektivität der Claudine wurde eindrucksvoll durch Li et al. (2013) gezeigt: Die canine Nierenzelllinie MDCK-I exprimiert kein Cld2 und weist daher eine sehr geringe parazelluläre Durchlässigkeit für  $\text{Na}^+$  auf; das künstliche Einbringen des kationenselektiven Porenbildners Cld2 erhöhte deren parazelluläre  $\text{Na}^+$ -Durchlässigkeit signifikant um den Faktor 9 [73], wobei die Durchlässigkeit für Moleküle  $\geq 4$  kDa unverändert blieb [74].

In der BHS konnten u.a. Cld1, -3, -5, und -12 nachgewiesen werden [75]. Die hohe Dichtigkeit der BHS basiert u.a. auf der starken parazellulären Abdichtung für kleine Moleküle durch Cld5, das am stärksten exprimierte Cld der Gehirnkapillarendothelzellen [75]. So resultiert das Fehlen von Cld5 in einer verstärkten ZNS-Penetration von Molekülen <800 Da [76]. Perineuralzellen des PNS exprimieren Cld1, -3 und -19 [15, 77]. Dabei ist Cld1 entscheidend für die Barriereigenschaften, da das Fehlen von Cld1 die Durchlässigkeit des Perineuriums für u.a. hydrophile Wirkstoffe signifikant erhöht [14].

Die Claudine interagieren untereinander innerhalb der Plasmamembran einer Zelle (*cis*) und zwischen Plasmamembranen benachbarter Zellen (*trans*); entweder mit dem gleichen Subtyp (homophil) oder mit anderen Subtypen (heterophil) (Abb. 5B) [41]. Das Ergebnis dieser Interaktion ist die in Abb. 4 dargestellte Strangbildung. Cld1, -3 und -5 können homophil in *cis* oder *trans* interagieren (Cld1/Cld1; Cld3/Cld3; Cld5/Cld5) [78, 79]. Heterophile *trans*-Interaktionen sind für Cld1/Cld3, Cld1/Cld5 und Cld3/Cld5, heterophile *cis*-Interaktionen für Cld1/5, Cld1/3 und Cld3/5 gezeigt worden [79]. Die Wechselwirkung der Claudine untereinander erfolgt über ihre EZS1 und -2 (EZS1, ~50 Aminosäuren, EZS2, ~25 Aminosäuren) sowie über ihre Transmembrandomänen [41, 80]. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die EZS1 für die parazelluläre Abdichtung bzw. Porenbildung verantwortlich ist. Zum Beispiel kann die Kationen- oder Anionenselektivität von Porenbildnern wie Cld2 oder -10 durch Aminosäuresubstitutionen in der EZS1 geändert werden [67, 81]. Charakteristisch für die EZS1 aller Claudine ist das konservierte Sequenzmotiv G-L-W-x-x-C-[7-9 Aminosäuren]-C, das zwei Cysteine enthält (Abb. 6) [82]. Diese bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke [61, 83] (Abb. 5A). Die Relevanz der Cysteine für die Abdichtungsfunktion zeigt sich in Mutationsexperimenten, wonach die Barrierefunktion der Claudine von der Intaktheit der Disulfidbrücke abhängt [66, 73]. Auf Basis von Sequenzanalysen wurde für die EZS1 ein starker  $\beta$ -Faltblattcharakter vorhergesagt [41]. Vor Kurzem wurden die ersten Kristallstrukturen von Cld15 bzw. -19 publiziert [61, 84]. Diese bestätigen u.a. den  $\beta$ -Faltblattcharakter der EZS1 und deren Disulfidbrücke (Abb. 5). Neben der EZS1 ist vermutlich auch die EZS2 für die Cld-Cld-Interaktion zwischen benachbarten Zellen verantwortlich. So kann die EZS2 von Cld5 dimerisieren [85] und Punktmutationen resultieren in einer reduzierten *trans*-Interaktion [80]. Weiterhin wurde gezeigt, dass reduzierte *trans*-Interaktionen der EZS2 die parazelluläre Abdichtung vermindern [86]. Die beschriebenen Cld-Cld-Wechselwirkungen sind jedoch nicht statisch. Während z.B. Endzündungsprozessen [87, 88] oder der Migration von Zellen [89] kann es zur reversiblen Endozytose der Claudine kommen, wodurch die Barriereedichte von Epithel- und

Endothelzellen moduliert wird. Dabei unterscheidet sich der Mechanismus je nach Stimulus und Cld-Subtyp. Cld5 wird z.B. in CCL2 (Chemokin (C-C Motiv) Ligand-2) behandelten Endothelzellen Caveolae-vermittelt endozytiert [88]; Cld1 kann u.a. in Epithelzellen nach Interferon- $\gamma$ -Stimulation via Makropinozytose [87] oder nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug Clathrin-abhängig aufgenommen werden [90].

Mikroskopische Studien mit TJ-freien Zellen zeigen, dass – nach rekombinanter Expression – Claudine die einzigen Proteine der TJs sind, die *de novo* TJ-artige Stränge ausbilden können [45]. Dabei unterscheidet sich die Strangarchitektur zwischen den Cld-Subtypen. Cld1 bildet in TJ-freien Zellen nach Transfektion kontinuierliche, mit der protoplasmatischen Seite der Plasmamembran (PF) assoziierte Stränge [45]. Cld5 bildet in TJ-freien Zellen nach Transfektion diskontinuierliche, mit der exoplasmatischen Seite der Plasmamembran (EF) assoziierte Stränge [91]. Neben den genannten Cld-Cld Interaktionen wechselwirken Claudine z.B. auch mit den Mitgliedern der TAMP-Familie. *Cis*-Interaktionen sind z.B. für Cld1/Occ oder Cld1/Tric beschrieben und führen zu Modifikationen der Cld1-Strangmorphologie [92]. Darüber hinaus verfügt die Mehrzahl der Claudine über ein C-terminales PDZ-Bindemotiv (*postsynaptic density protein 95/Drosophila disc large tumor suppressor/zonula occludens protein-1* [56]), wodurch sie mit ZO interagieren können und der Kontakt mit dem Aktinzytoskelett hergestellt wird [93]. Der zytosolische C-terminale Teil von Claudinen ist ~25-55 Aminosäuren lang [41] und kann neben dem PDZ-Bindemotiv über Palmylierungs- und Phosphorylierungsstellen verfügen [94]. Durch Palmylierung [95] oder Phosphorylierung [96] von Claudinen kann deren Transport zu den TJs und deren Lokalisation innerhalb der TJs reguliert werden. Potentielle Phosphorylierungsstellen an der C-terminalen Sequenz, z.B. für die Proteinkinase A, -C oder die Myosin-Leichte-Kette-Kinase C werden für die Mehrzahl der Claudine postuliert [94].

#### 1.2.2.2 Occludin und Tricellulin

Die TAMPs besitzen ebenfalls vier Transmembrandomänen, eine EZS1 und -2 sowie zytosolische N- und C-Termini [46]. Occ ist das erste transmembranale TJ-Protein, das entdeckt wurde. Es lokalisiert in Zwei-Zell-Kontakten und ist ~60 kDa groß (Abb. 4B, C) [47]. Neben den homophilen Interaktionen in *cis* und *trans*, kann Occ auch heterophil, u.a. mit Claudinen [92] und ZO [97], wechselwirken. Occ bildet keine TJ-Stränge, beeinflusst aber die Morphologie Cld-basierter Stränge. Beispielsweise resultiert die Co-Expression von Cld1 und Occ in einer gesteigerten Parallelität und Diskontinuität von Cld1-Strängen [98] sowie einer verstärkten *trans*-Interaktion von Occ [92]. Die Modulation von Occ, z.B.

durch Aminosäuresubstitution [99], führt zur Verringerung der parazellulären Dichtigkeit. Der *knockout* von Occ hat keinen Einfluss auf die TJ-Bildung, -Morphologie [100] oder die Barriereigenschaften des intestinalen Epitheliums [101]. Allerdings zeigen Mäuse u.a. chronische Entzündungen des gastrointestinalen Epithels, Unfruchtbarkeit der Männchen [100] und Gehörlosigkeit [102]. Ferner wurde Occ als Modulator der TJ-Struktur und -Funktion unter reduzierenden Bedingungen identifiziert [98]. Occ beeinflusst also möglicherweise die Barriereigenschaften der TJs ohne direkt an der Barrierebildung beteiligt zu sein und/oder kann in seiner Funktion zum Teil durch andere TAMPs kompensiert werden [46]. So resultiert der *knockdown* von Occ in Epithelzellen in einer Umverteilung von Tric aus trizellulären in die bizellulären TJs; Tric kompensiert also möglicherweise zumindest teilweise die Occ-Funktion [103].

Tric kann in vier verschiedenen Isoformen vorliegen (Tric-a [48], -a1, -b und -c [104]). Diese Arbeit bezieht sich auf Tric-a, das im Weiteren als Tric bezeichnet wird. Tric hat ein Molekulargewicht von ~65 kDa und ist normalerweise an Drei-Zell-Kontakten lokalisiert (Abb. 4B) [48]. Der *knockdown* resultiert in strukturellen Änderungen der bizellulären TJs und einer Öffnung der parazellulären Barriere [48]. Darüber hinaus verändert Tric die Cld1-Strangmorphologie hin zu mehr rechteckigen Netzen mit reduzierter Maschengröße [92]. Tric selbst dichtet die Drei-Zell-Kontakte gegenüber Makromolekülen zwischen 4-10 kDa ab [105] (Abb. 4B). Die Relevanz der Tric-vermittelten Abdichtung wird durch Mutationen im *TRIC*-Gen verdeutlicht, bei der vier Mutationen im direkten Zusammenhang mit dem Auftreten von Gehörlosigkeit beim Menschen stehen [104]. Neben der Abdichtungsfunktion fungiert Tric als Redoxsensor in den TJs [106]. Sowohl Tric [48] als auch Occ [93] interagieren direkt mit ZO-1. Und obwohl Tric und Occ mit Cld1 wechselwirken, gibt es keine Hinweise auf eine Occ-Tric-Interaktion in der Plasmamembran [92].

### 1.2.2.3 *Zonula occludens*

ZO untergliedern sich in drei Isoformen (ZO-1[52], -2 [107], -3 [108]) und gehören zur Familie der *membrane-associated guanylate kinase homologs* [109]. ZO-1 ist ~225 kDa groß [52], vermittelt die Organisation von Transmembranproteinen wie z.B. Cld, Occ oder Tric, interagiert mit dem Aktinzytoskelett (Abb. 4C) [110] und bildet eine Plattform, über die TJ-beeinflussende Signalkaskaden initiiert werden [111]. ZO-1 verfügt über PDZ-, *Src-homology 3*- und Guanylat-Kinase Proteinbindungsdomänen [109]. Occ-ZO-1-Interaktionen finden über die *Src-homology 3*- und Guanylat-Kinase Proteindomäne von ZO-1 statt [112]. Claudine wechselwirken mit ihrem PDZ-Bindemotiv mit der PDZ-1 Do-



mäne von ZO-1 [93]. Tric interagiert mit ZO-1 über eine konservierte Domäne seines C-Terminus [104]. Die ZO-Proteine sind allerdings nicht TJ-spezifisch, sondern interagieren auch mit Proteinen anderer *junctions* [113].

## 1.3 Modulation von Zellbarrieren zur Verbesserung des Wirkstoffdurchtritts

### 1.3.1 Stand der Forschung

Die Verbesserung des Wirkstoffdurchtritts durch Zellbarrieren kann durch die Steigerung der transzellulären oder der parazellulären Wirkstoffpermeation erfolgen. Eine Zunahme der transzellulären Passage von Wirkstoffen kann durch die Erhöhung der Lipophilie (Steigerung der Plasmamembrangängigkeit [114]), die Kopplung an einen Rezeptorliganden (rezeptorvermittelte Permeation [115]) oder die Wirkstoffoptimierung zum Transporter substrat [116]) erfolgen. Nachteile der genannten Modifikationen sind u.a., dass die Erhöhung der Lipophilie von Wirkstoffen zur Erhöhung des Molekulargewichtes [117] und verstärktem metabolischen Abbau führen kann [27]. Die Wirkstoffmodifikationen für die transportervermittelte oder rezeptorvermittelte Aufnahme können einen Wirkverlust verursachen. Ferner muss der Wirkstoff nach Aufnahme in die Zelle unter Umständen in einem zweiten Schritt basolateral ausgeschleust werden [115]. Vor allem die Kapillarendothelzellen der BHS weisen eine stark verminderte Pinozytose [118] und eine hohe Expression von Effluxtransportern auf [30]. Daneben existieren Ansätze zu Kombinationstherapien. Für die lokale Schmerzbehandlung kann beispielsweise die gemeinsame Gabe des hydrophilen Lokalanästhetikums QX-314 mit Agonisten des TRPV1 Ionenkanals (*transient receptor potential vanilloid 1*) erfolgen. QX-314 ist ein Lidocain-Derivat mit einem Molekulargewicht von 263 Da, das neuronale Natriumkanäle nach intrazellulärer Applikation blockiert [119]. TRPV1 wird ausschließlich auf sensorischen Nervenendigungen, die auf Schmerz Wahrnehmung spezialisiert sind, exprimiert [120]. Nach der Capsaicin-vermittelten TRPV1 Stimulation öffnet sich der Ionenkanal, wodurch der neuronale Einstrom von QX-314 möglich ist [35] und die Reizweiterleitung schmerzsensitiver Nervenendigungen blockiert werden kann. Der Nachteil der beschriebenen Kombinationstherapie ist eine starke temporäre Schmerzüberempfindlichkeit am Injektionsort.

Eine alternative Strategie zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme ist die Erhöhung des parazellulären Stoffdurchtritts mit indirekt auf die TJs wirkenden Permeations-/Absorptionsverstärkern [121]: hyperosmolare Mannitollösung wird als BHS-

Öffnersubstanz für die Behandlung bestimmter Gehirntumore verwendet [122], die Fettsäure Caprat kommt als gastrointestinaler Absorptionsverstärker für Ampicillin zur Anwendung [123] und die Carotisinjektion von Caprat in Ratten öffnet die BHS konzentrationsabhängig und reversibel [124]. Mit hypertoner Kochsalzlösung konnte im Tierversuch die perineurale Barriere für hydrophile Wirkstoffe geöffnet werden [14]. Daneben wurde mit fokussiertem Ultraschall die BHS von Mäusen reversibel, lokal geöffnet und die ZNS-Penetration von Antikörpern nachgewiesen [125]. Allerdings kann die unspezifische, nicht gröbenselektive, parazelluläre Öffnung einer Zellbarriere zu erheblichen Nebenwirkungen führen. Die intraarterielle Carotisinjektion hyperosmolarer Mannitollösung führt zum Aufreißen der BHS durch Schrumpfung des Endothels. Dieses Verfahren birgt das Risiko von neurologischen und renalen Begleiterscheinungen [126, 127], z.B. durch die Aufnahme von Albumin oder Glutamat im ZNS. Die klinische Zulassung als BHS-Öffner beschränkt sich daher auf die Behandlung einiger Krebsarten wie z.B. Lymphome [122] und Schädelhirntrauma [127]. Die BHS-Öffnung durch Caprat kann neurologische und kardiologische Nebenwirkungen hervorrufen [124] und wird beim Menschen nicht angewendet. Nachteile der Ultraschall-vermittelten, aber auch der trans-cranialen Zuführung von Wirkstoffen sind u.a. die begrenzte Diffusion der Arzneistoffe [24, 128]. Die Injektion von hypertoner Kochsalzlösung für die lokale Schmerzbehandlung führt zu einer Schmerzüberempfindlichkeit am Injektionsort und wird u.a. beim Menschen als experimentelles Modell für Schmerzuntersuchungen genutzt [129].

Die aufgeführten Strategien zur Verbesserung der transzellulären und parazellulären Permeation zeigen, dass gegenwärtig keine effektiven Therapien für die erleichterte Wirkstoffzuführung zur Verfügung stehen. Unter anderem verhindern die Risiken für den Patienten oder der große Aufwand der Wirkstoffmodifikation die breite Anwendung für z.B. neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson.

Im Gegensatz zu den oben genannten Verfahren würde es die spezifische Modulation der TJs erlauben, Wirkstoffe ohne weitere Modifikation einzusetzen. Ein ideales Ziel für die temporäre, gröbenselektive Öffnung des interzellulären Spalts stellen Claudine dar, da sie den parazellulären Spalt gröbenselektiv abdichten und eine gewebespezifische Claudin-Kombination aufweisen [41]. Cld5 ist das dominierende Cld der BHS [75] und dichtet diese gegenüber Molekülen  $<800$  Da ab [76]. Auch ohne Cld5 in der BHS kommt es nicht zur Ödembildung, der Anreicherung von Albumin oder dem gänzlichen Verschwinden der TJs [76]. Die temporäre Modulation von Cld5 in der BHS könnte demnach eine Wirkstoffpermeation ohne stärkere Nebenwirkungen ermöglichen. Im Gegensatz

zur BHS werden die Barriereigenschaften des Perineuriums maßgeblich durch Cld1 bestimmt [14]. In Übereinkunft mit dieser Abdichtungsfunktion resultiert die temporäre Entfernung von Cld1 in der reversiblen Erhöhung der parazellulären Permeation von hydrophilen, ansonsten nicht perineuriumgängigen Wirkstoffen ins Endoneurium [14]. Beide Beispiele verdeutlichen, dass die direkte Modulation von Claudinen für die gewebspezifische und gröbenselektive Öffnung von Zellbarrieren zielführend ist.

### 1.3.2 Claudin-modulierende Peptide

Es ist davon auszugehen, dass die Interaktion der EZS1 [130] und -2 [131] von Claudinen gegenüberliegender Zellen (*trans*-Interaktion) die selektive Abdichtung des interzellulären Spalts vermittelt [132]. Die spezifische Blockade der EZS-Interaktionen eines Cld-Subtyps könnte daher dessen Abdichtungsfunktion verringern und somit zur gröbenselektiven, gewebespezifischen Barriereöffnung führen. Ein Beispiel für die Erhöhung des parazellulären Stoffdurchtritts auf Basis von peptidbasierten Cld-Modulatoren ist C-CPE. C-CPE repräsentiert den C-terminalen, Cld-bindenden, nicht zytotoxischen Teil vom CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) [133]. C-CPE bindet u.a. an die EZS2 von Cld3 [133] und Cld4 [134] und erhöht im Tiermodell die intestinale Absorption von 4 kDa-Dextran 400-fach stärker als der klinisch verwendete Absorptionsverstärker Caprat [135]. Dabei ist die Peptidwirkung gröbenselektiv, nicht zytotoxisch und spezifisch für das *Jejunum*, d.h. selektiv für Gewebe mit einer bestimmten Cld-Kombination [135]. Die C-CPE-Wirkung kann durch ein von der EZS2 von Cld4 abgeleitetes Peptid blockiert werden, nicht aber durch ein EZS2-Peptid von Cld1 [134]. Das erste von einem TJ-Protein abgeleitete Peptid, für das eine barriermulierende Wirkung gezeigt werden konnte, stammt von der EZS2 von Occ. Das Peptid verringert die Dichtigkeit von Nierenepithelzellen reversibel, zeit- und konzentrationsabhängig [136]. Mittlerweile wurden weitere Occ oder auch JAM-abgeleitete Peptide gefunden, die die parazelluläre Abdichtungsfunktion [121] beeinflussen. Im Gegensatz zu Claudinen weisen Occ und JAMs kein gewebespezifisches Expressionsmuster [50, 137] oder eine subtypenspezifische Gröbenselektivität auf. Ihr Potential für die gröbenselektive, gewebespezifische Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit ist daher sehr eingeschränkt.

## 1.4 Zielstellung

Die bisherigen Ansätze zur Verbesserung der Wirkstoffpenetration durch die unspezifische Öffnung von Zellbarrieren sind mit großen Risiken und Nebenwirkungen verbunden. Die Modifikation von Arzneistoffen zur verbesserten transzellulären Passage birgt die Gefahr des Aktivitätsverlustes. Die Entwicklung von Strategien zur Modulation der TJ-Proteine und der damit bezweckten Erhöhung der parazellulären Permeabilität sind daher das Ziel dieser Arbeit.

Die maßgebliche TJ-Komponente für die parazelluläre Abdichtung sind die gewebespezifisch exprimierten Claudinmuster. Ihre Barrierefunktion basiert auf Interaktionen ihrer EZS1 und -2. Als Arbeitshypothese wird deshalb angenommen, dass die Interaktionen der EZS durch EZS-Peptidomimetika zielgerichtet blockiert und dadurch die parazelluläre Permeation hydrophiler Wirkstoffe reversibel und nebenwirkungsfrei erhöht werden kann. Es sollen Peptidomimetika der EZS1 und -2 der Cld-Subtypen 1, -2, -3, -4 und -5 hergestellt und deren Fähigkeit zur parazellulären Öffnung von Barrieren ermittelt werden. Inwieweit Cld-abgeleitete Peptide eine Cld-Subtyp- und Zelltypspezifität aufweisen ist bisher nicht bekannt und soll mit epithelialen und endothelialen Zellmodellen unterschiedlicher Cld-Ausstattung untersucht werden. Daneben soll eine Charakterisierung der permeationssteigernden Eigenschaften der als wirksam identifizierten Peptide erfolgen (Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit, Reversibilität). Da die EZS miteinander interagieren, wird angenommen, dass permeationssteigernde Peptide ebenfalls mit den Cld-EZS assoziieren. Um die Interaktion zu quantifizieren, werden Bindungsstudien mit markierten Peptiden durchgeführt. Außerdem sollen Struktur- und Wirkungsuntersuchungen erfolgen, um die Wirkregion der Peptidomimetika herauszufinden und Erkenntnisse über die molekulare Struktur der Peptide, aber auch des entsprechenden Cld-Segments zu erlangen. So ist nicht bekannt, ob EZS-abgeleitete Peptide die selbe Struktur wie die EZS annehmen können und wenn dies der Fall ist, inwieweit diese relevant für die Wirksamkeit der Peptide ist. Daneben sollen Aminosäuren identifiziert werden, die für die Barrierefunktion der Claudine von besonderer Bedeutung sind. Nach der *in vitro*-Charakterisierung aktiver Peptide sollen diese auch *in vivo* validiert werden.

Insgesamt zielt die Arbeit darauf ab, die Möglichkeiten der peptidbasierten Cld-Modulation zu untersuchen, Claudine als Target zur Verbesserung der Wirkstoffpermeation zu charakterisieren und darüber hinaus das Grundlagenwissen zur Struktur, Funktion und Regulation von Claudinen zu erweitern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Wenn nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Materialien von Sigma-Aldrich, Steinheim, DE.

**Tab. 1 Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
5-Hexadecanoylaminofluorescein	Life Technologies, Darmstadt, DE
9-Fluorenylmethoxycarbonyl	Orpegon, Heidelberg, DE
Acrylamid/Bisacrylamid Mischung 40%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Alexa Fluor 680-3kDa Dextran	Life Technologies, Darmstadt, DE
Alexa Fluor 680-Transferrin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München, DE
Amylose Matrix	NewEngland BioLabs, Ipswich, GB
<i>Bovine fibroblast growth factor</i>	Life Technologies, Darmstadt, DE
Deochycolat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Diamidinphenylindol	Life Technologies, Darmstadt, DE
Diethylether	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i>	Life Technologies, Darmstadt, DE
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>	Biochrom, Berlin, DE
Essigsäure	J.T. Backer, Deventur, NL
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fetales Kälberserum	Life Technologies, Darmstadt, DE
Geneticin	Biochrom, Berlin, DE
Gentamycin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>Hank's balanced salt solution</i>	Life Technologies, Darmstadt, DE
Hoechst 33342	Life Technologies, Darmstadt, DE
Isopropanol	VWR, Darmstadt, DE
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
<i>Lysogeny broth-Medium</i>	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Methanol	VWR, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
N4-[2-(4-Phenoxyphenyl)ethyl]-4,6-quinazolindiamin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg, DE
Nicht essenzielle Aminosäuren	Life Technologies, Darmstadt, DE
Nonidet P-40 alternative	Calbiochem, Merck, Darmstadt, DE
<i>Opti-minimal essential-Medium</i>	Life Technologies, Darmstadt, DE
Phenol	Honeywell, Seelze, DE
Polyethylenimin	Polyscience, Eppelheim, DE
Rattenschwanzkollagen	Roche, Mannheim, DE
<i>Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium</i>	Life Technologies, Darmstadt, DE
Salzsäure	Merck, Darmstadt, DE
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tricin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trifluoressigsäure	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Ziegenserum	Vector Laboratory, Burlingame, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

**Tab. 2 Geräte**

<b>Bezeichnung, Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage, AT21 Comparator	Metler Toledo, Gießen, DE
cellZscope	nanoAnalytics, München, DE
Durchflusszytometer, FACSAria	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Fluoreszenz Scanner, FLA-5000	Fujifilm, Tokio, JP
Gefriertrockner, Alpha 2-4 LSC	Martin Christ, Osterode, DE
Geldokumentationssystem, E.A.S.Y.	Herolab, Wiesloch, DE
Gelelektrophorese-Kammer, SE 250	Hoefler, Holliston, USA
Handelektrode, EVOM Voltometer	WPI, Sarasota, USA
Heizplatte, PZ 28-2 T	Harry Gestigkeit, Düsseldorf, DE
Inkubationshaube, TH 15	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Inkubator, CB 210	Binder, Tuttlingen, DE
Massenspektrometer, AB SCIEX TOF/TOF 5800	Applied Biosystems, Foster City, USA
Massenspektrometer, Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography/Micromass LCT Premier Mass Spectrometer	Waters, Massachusetts, USA
Mikroskop, 510 META-NLO <i>laser scanning microscope</i>	Carl Zeiss, Jena, DE
Mikroskop, Eclipse E600	Nikon, Egg, CH
Mikroskop, Inverses Phasenkontrastmikroskop, IMT-2	Olympus, Hamburg, DE
Mikroskop, Inverted SP5 X <i>laser scanning microscope</i>	Leica, Buffalo Grove
Peptidsyntheseautomat, ABI 433A	Applied Biosystems, Foster City, USA
Plattenmessgerät, Safire	Tecan, Männedorf, CH
Rotations-Vakuum-Konzentrator, SPD1010	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Rotationsverdampfer, IKA RV 10 basic	VWR, Darmstadt, DE
SemiDry Blot, Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad, München, DE
Sonifikator, Vibra Cell 72434	Bioblock Scientific, Illkirch, FR
Spektropolarimeter, J-720	Jasco, Tokio, JP
Transilluminator, Lumi Imager F1	Roche, Rotkreuz, CH
Ultraschallbad, RK 100 SH	Bandelin electronic, Berlin, DE
Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatograph, LC-8A	Shimadzu, Kyoto, JP
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, DE
Zentrifuge, 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Ultrazentrifuge, SW41	Beckman Coulter, Brea, USA

**Tab. 3 Verbrauchsmittel**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Filter, Costar	Corning, New York, USA
Filter, Millicell (CM, HA)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Nitrocellulosemembran, Hyband-ECL, 0,45 µm	GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Opti-TOF, 384er Platte	Applied Biosystems, Foster City, USA
PolyenCap-A 300 Säule	Bischoff Analysentechnik, Leonberg, DE
Quarzküvette, 100-QS	Hellma Analytics, Müllheim DE
Spitzenvorsatzfilter, Millex, 22 µm	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Trägerharz, SRam TentaGel	Rapp-Polymere, Tübingen, DE
Zellkulturflasche, CellBIND <i>Surface</i>	Corning, New York, USA
Zellkulturflasche, Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellkulturtestplatt, 48 Vertiefungen	Corning, New York, USA
Zellkulturtestplatte, 6-, 24-, 96 Vertiefungen	TPP, Trasadingen, DE
ZipTip, C18 Säulen	Merck Millipore, Darmstadt, DE

**Tab. 4 Kommerzielle Reaktionsansätze**

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Bicinchoninsäure <i>protein assay kit</i> (Pierce)	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Einschlussmittel, <i>ImmuMount</i>	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Einschlussmittel, <i>Vectashield</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Entwicklerlösung, <i>Lumi-light western blotting substrate</i>	Roche, Mannheim, DE
Penicillin/Streptomycin-Mischung	Life Technologies, Darmstadt, DE
Protein Marker, <i>Precision plus protein dual color</i>	Bio-Rad, München, DE
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung	Life Technologies, Darmstadt, DE

**Tab. 5 Plasmide und siRNAs**

Plasmidbezeichnung	Accession-Nr.	RE	Bezugsquelle
Claudin-1 pEYFP-N1 (human, Cld1-YFP)	NP_066924	<i>Sall</i> , <i>Bam</i> HI	Dr. Piontek, FMP Berlin, DE
Claudin-2 pEYFP-N1 (human, Cld2-YFP)	NP_001164563	<i>Sall</i> , <i>Bam</i> HI	Dr. Piontek, FMP Berlin, DE
Claudin-3 pEYFP-N1 (murin, Cld3-YFP)	NP_034032	<i>Sall</i> , <i>Bam</i> HI	Dr. Piontek, FMP Berlin, DE
Claudin-4 pEYFP-C1 (human, YFP-Cld4)	NP_001296	<i>Sall</i> , <i>Bam</i> HI	Dr. Piontek, FMP Berlin, DE
Claudin-5 pEYFP-N1 (murin, Cld5-YFP)	NP_038833	<i>Sall</i> , <i>Bam</i> HI	Dr. Piontek, FMP Berlin, DE
Claudin-5 pMAL-C2X (human, MBP-Cld5 <sub>-28-81</sub> )	NP_038833	<i>Eco</i> RI/ <i>Sall</i>	Dr. Pfeil, FMP Berlin, DE
siRNA (Bestellnummer)	Bezugsquelle		
Rab4 siRNA (s72620, s72619, s201891)	Life Technologies, Darmstadt, DE		
Rab5 siRNA (s114661, s114662, s114663)			
Rab7 siRNA (s232059, s232060, s72641)			
Negativ-Kontroll #1 siRNA (AM4611)			
28-81, Aminosäureposition; Cld, Claudin; EYFP, <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> ; MBP, Maltose-Bindeprotein; RE, Restriktionsenzym, siRNA, <i>small interfering ribonucleic acid</i>			

**Tab. 6 Antikörper**

Primärantikörper (Bestellnummer)	Spezies	Bezugsquelle
Anti-Claudin-1 (51-9000)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-2 (51-6100)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-3 (34-1700)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-4 (36-4800)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-5 (34-1600)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-GAPDH (MCA4740G)	Maus	AbD Serotec, Puchheim, DE
Anti-Occludin (33-1500)	Maus	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Rab4 (ab55656)	Maus	Abcam, Cambridge, GB
Anti-Rab5 (ab170070)	Maus	Abcam, Cambridge, GB
Anti-Rab7 (ab76804)	Maus	Abcam, Cambridge, GB
Anti-Tricellulin (70-0191)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-zonula occludens protein-1 (55-1900)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-zonula occludens protein-1 (33-9100)	Maus	Life Technologies, Darmstadt, DE
Sekundärantikörper (Bestellnummer)	Spezies	Bezugsquelle
Anti-GAPDH (G8795)	Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488-Konjugat (A-11029)	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Kaninchen Meerrettich- Peroxidase (62-6520)	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Maus Cy3-Konjugat (A-10521)	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase (A2074)	Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Cy3, <i>cyanine dye 3</i> ; FITC, Fluorescein-Isothiocyanat; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rab, <i>Ras-related protein</i>		

**Tab. 7 Eukaryotische Zellen, Bakterienstämme und Versuchstiere**

Zellentyp	Beschreibung	Bezugsquelle
bEnd5	Murine Gehirndothelzelllinie	Prof. Engelhardt, Universität Bern, SUI
Caco-2	Humane kolorektale Epithelzelllinie	Bayer Pharma AG, Berlin, DE
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie	ATCC, Manassas, USA
HT29/B6	Humane kolorektale Epithelzelllinie	Prof. Huber, Charité Berlin, DE
MDCK-II	Canine Nierenzelllinie	ATCC, Manassas, USA
pMBMEC	Primäre murine Gehirnkapillarendothelzellen	Prof. Engelhardt, Universität Bern, SUI
pRBMEC	Primäre Rattengehirnkapillarendothelzellen	Prof. Deli, B.R.C., Szeged, HU
Bakterium	Stamm	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i>	BL21	Life Technologies, Darmstadt, DE
Versuchstier	Stamm	Bezugsquelle
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Harlan Laboratories, Boxmeer, NL
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Universität Würzburg, DE
B.R.C, <i>Biological Research Centre</i>		

**Tab. 8 Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Marker**

<b>Substanz</b>	<b>Fluoreszenzeigenschaften</b>
5-Hexadecanoylamino fluorescein	$\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$
Alexa Fluor 680-3kDa Dextran	$\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$
Alexa Fluor 680-Transferrin	$\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488-Konjugat	$\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}530 \text{ nm}$
Anti-Maus Cy3-Konjugat	$\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$
Anti-Rab4, -Rab5, -Rab7 FITC-Konjugat	$\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$
Claudin-YFP-Fusionsproteine	$\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 516\text{-}537 \text{ nm}$
Diamidinphenylindol	$\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 390\text{-}465 \text{ nm}$
Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran	$\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$
Hoechst 33342	$\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 390\text{-}465 \text{ nm}$
<i>Lucifer yellow</i>	$\lambda_{\text{ex}} = 425 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$
TAMRA-markierte Peptide	$\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$
Trypanblau	$\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$

Cy3, *cyanine dye 3*; FITC, Fluorescein-Isothiocyanat; TAMRA, 5,6-Carboxytetramethylrhodamin; YFP, *yellow fluorescent protein*;  $\lambda_{\text{ex}}$ , Anregungswellenlänge;  $\lambda_{\text{em}}$ , Emissionswellenlänge;

**Tab. 9 Software**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Endnote, Version X7	Thomson Reuters, Philadelphia, USA
MS Office 2007 Professionel	Microsoft, Unterschleißheim, DE
PEP-FOLD, Zugriff 23.10.2014	[138-140]
ImageJ, Version 1.46r	W. Rasband, National Institutes of Health, USA
Discovery-Studio, Version 4.0	Accelrys, San Diego, USA
Carl Zeiss LSM Image Browser, Version 4.2.0.121	Carl Zeiss, Jena, DE
Prism, Version 5.04	GraphPad, San Diego, USA
Spectra Manager, Version 1.54.03	Jasco, Tokio, Japan
NIS-Elements BR, Version 3.10	Nikon, Egg, CH
Jalview, Version 2.2.8	[63]
ClustalW, Version 2.0	[62]





Peptid	Name	Sequenz
(N74Q)mCld1(53-81)	mC1C2(N22Q)	SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLQSTLQATR-NH <sub>2</sub>
(N74K)mCld1(53-81)	mC1C2(N22K)	SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLKSTLQATR-NH <sub>2</sub>
(N74D)mCld1(53-81)	mC1C2(N22D)	SSVSQSTGQIQSKVFDSLNL DSTLQATR-NH <sub>2</sub>
(N74E)mCld1(53-81)	mC1C2(N22E)	SSVSQSTGQIQSKVFDSL NLESTLQATR-NH <sub>2</sub>
<i>Sonstige Modifikationen des Peptids mC1C2</i>		
TAMRA-mCld1(53-81)	TAMRA-mC1C2	TAMRA-SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLNSTLQATR-NH <sub>2</sub>
C16-mCld1(53-81)	C16-mC1C2	C16-SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLNSTLQATR-NH <sub>2</sub>
mCld1(53-81)-PEG	mC1C2-PEG	SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLNSTLQATR-PEG
D-AS-mCld1(53-81)	D-AS-mC1C2	ssvsqstgqiqskvfdsllnlstlqatr-NH <sub>2</sub>
Invers-mCld1(53-81)	Invers-mC1C2	RTAQLTSNLLSDFVKSQIQGTSQSVSS-NH <sub>2</sub>
<b>Claudin-2 abgeleitete Peptide</b> (mCld2 Accession-Nr. NP_057884)		
mCld2(53-81)	mC2C2	ESATHSTGITQSDIYSTLLGLPADIQAAQ-NH <sub>2</sub>
mCld2(141-160)	mC2C3	HGILRDFYSPLVPDSMKFEI-NH <sub>2</sub>
<i>Sonstige Modifikationen des Peptids mC2C2</i>		
TAMRA-mCld2(53-81)	TAMRA-mC2C2	TAMRA-ESATHSTGITQSDIYSTLLGLPADIQAAQ-NH <sub>2</sub>
<b>Claudin-3 abgeleitete Peptide</b> (mCld3 Accession-Nr. NP_034032)		
mCld3(53-81)	mC3C2	NSVVQSTGQMOSKMYDSLALPQDLQAAR-NH <sub>2</sub>
mCld3(137-159)	mC3C3	WSANTIIRDFYNPLVPEAQKREM-NH <sub>2</sub>
<b>Claudin-4 abgeleitete Peptide</b> (hCld4 Accession-Nr. NP_034033; mCld4 Accession-Nr. NP_001296)		
hCld4(53-81)	hC4C2	NSVVQSTGQMOSKVYDSLALPQDLQAAR-NH <sub>2</sub>
mCld4(141-160)	mC4C3	HNVIKDFYNPMVASGQKREM-NH <sub>2</sub>
<b>Claudin-5 abgeleitete Peptide</b> (mCld5 Accession-Nr. NP_038833)		
mCld5	mC5C2	
mCld5(145-160)	mC5C3	REFYDPTVPVSQKYEL-NH <sub>2</sub>
<b>Nicht Claudin abgeleitete Peptide</b>		
Kloe		

(53-81), Aminosäureposition im Ursprungprotein; +1aaN, verlängert am N-Terminus um eine Aminosäure; -4aaN/C, verkürzt am N-/C-Terminus um 4 Aminosäuren; C16, Palmitinsäure; Cld, Claudin; D-AS, D-Aminosäure; h, human; m, Maus; N22D, Substitution N→D in Position 22 im mC1C2 Peptid; PEG, Polyethylenglykol; TAMRA, 5,6-Carboxytetramethylrhodamin

### 2.2.1.2 Peptidsynthese

Die Herstellung der Peptide erfolgte in der Arbeitsgruppe Beyermann mittels Festphasensynthese nach 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Peptidchemie mit dem Peptidsyntheseautomaten ABI 433A [141]. Es wurde das ABI 433A Standardprotokoll „FastMoc 0.25 Ω MonPrevPk“ mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat und 1-Hydroxybenzotriazol als Kupplungsreagenzien verwendet. Die Synthese fand bei 22 °C mit einem SRam TentaGel Trägerharz statt. Die N-terminale TAMRA-Markierung der Peptide fand nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe über 40 min in Dimethylsulfoxid (DMSO) statt. TAMRA wurde zuvor mit 2-(6-Chloro-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium Hexafluorophosphat und N,N-Diisopropylethylamin aktiviert. Die Abspaltung der Peptide vom Trägerharz und die Entfernung der Schutzgruppen fanden in 8,5 ml Trifluoressigsäure (TFA), 0,5 ml H<sub>2</sub>O, 0,5 ml Phenol und 0,5 ml Triisopropylsilan unter Rühren für 3 h, bei 22 °C statt. Das Rohpeptid wurde 30 min mit Diethylether gefällt, abzentrifugiert (2200 g, 5 min), mit Diethylether gewaschen und bei 22 °C getrocknet.

### 2.2.1.3 Peptidreinigung und Charakterisierung

Die Reinigung des Rohpeptids fand mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) über eine PolyenCap-A 300 Säule statt [141]: 100 mg Rohpeptid sind in einem Gemisch aus 0,5 ml Acetonitril und 1,8 ml 0,1% TFA in einem Gradient von 30-70% des Eluenten B (80% Acetonitril/0,1% TFA) in 70 min aufgetrennt worden (Eluent A: 0,1% TFA). Die Detektion der Peptide erfolgte bei 220 nm. Die einzelnen Fraktionen wurden über Nacht bei 40 °C im Rotationsverdampfer von Acetonitril Rückständen befreit und im Anschluss lyophilisiert. Die qualitative Analyse der Fraktionen erfolgte massenspektrometrisch (Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography/ Micromass LCT Premier Mass Spectrometer) mit 1 mg/ml Peptid in 0,1% TFA: 5-95% des Eluenten B sind über eine PolyenCap-A 300 Säule in 40 min aufgetrennt worden. Die detektierten Massen entsprachen den theoretischen Berechnungen und die HPLC-Reinheit der Peptide lag zwischen 85% und >95%. Für *in vivo* Versuche wurden nur Peptide mit einer Reinheit  $\geq 95\%$  verwendet.

Die Messung des Endotoxingehaltes der Peptide erfolgte in Kooperation mit Dr. B. Bohrmann von der Firma Hoffmann-La Roche, (CNS Research Group, Basel, CH). Von den zu testenden Peptiden wurden Lösungen von je 200  $\mu\text{M}$  in Caco-2 Medium (Tab. 11) hergestellt und der Qualitätskontrolle unterzogen. Als Referenz diente das Caco-2 Medium ohne Peptide.

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Routinezellkultivierung

Die Zellen (Tab. 7) wurden im Inkubator bei 37 °C und 5% oder 10% CO<sub>2</sub> in zellspezifischem Medium und Gefäßen kultiviert (Tab. 11). Nach dem Waschen (2x, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, DPBS-/-) und Ablösen mit Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung bei 37 °C, sind sie im neuen Medium resuspendiert und zentrifugiert (150 g, 4 min) worden. Das Pellet wurde in neues Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen oder -testplatten (Tab. 11) verteilt. Für bEnd5-Zellen sind die Zellkulturgefäße vor den Aussäen mit Gelatine (0,1% in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 0,04 ml/cm<sup>2</sup>, 1 h, 37 °C) beschichtet und anschließend gewaschen (DPBS-/-) worden. Die pMBMECs sind von Dr. C. Coisne (Universität Bern, CH) aus 7-9 Wochen alten C57BL/6 Mäusen isoliert (Tab. 7) und direkt auf Matrigel-beschichtete Transwell Costar-Filter gesät worden [142, 143].

**Tab. 11 Kultivierungsbedingungen für die Routinekultivierung eukaryotischen Zellen**

Zelltyp	Medien-Zusammensetzung	CO <sub>2</sub>	Kulturflasche	Vereinzelung
bEnd5	DMEM, 4,5 g/l Glukose, 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x NEA, 5 µM β-Mercaptoethanol	10%	Cellstar	0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA
Caco-2	DMEM, 1g/l Glukose, 20% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x NEA	5%	CellBIND <i>Surface</i>	0,25% Trypsin/ 0,02% EDTA
HT29/B6	RPMI 1640 Medium, 5% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	5%	Cellstar	0,25% Trypsin/ 0,02% EDTA
MDCK-II, HEK-293	DMEM, 1g/l Glukose, 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin,*	10%	Cellstar	0,25%/0,05% Trypsin/0,02% EDTA
pMBMEC	DMEM, 4,5 g/l Glukose, 20% FKS, 50 µg/ml Gentamycin, 1x NEA, 1 ng/ml bFGF	10%	Cellstar	0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA

\*, nach Transfektion Kultivierung mit Geneticin (final 0,5 µg/ml); bFGF, *bovine fibroblast growth factor*; CO<sub>2</sub>, in Volumen %; DMEM, *Dulbecco's modified Eagle-Medium*; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; FKS, fetales Kälberserum; NEA, nicht essentielle Aminosäuren; RPMI, *Roswell Park Memorial Institute-Medium*

### 2.2.2.2 Kryokonservierung

Nahezu konfluente Zellen (75-85%) wurden gewaschen (2x, DPBS-/-), mit Trypsin/EDTA abgelöst (Tab. 11) und bei 150 g, 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Einfriermedium (90% fetales Kälberserum (FKS), 10% DMSO) resuspendiert, auf Kryoröhrchen verteilt, mit einer Kühlrate von 1 °C/min bis auf -20 °C abgekühlt und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Reaktivierung wurde die Kryokultur im 37 °C Wasserbad aufgetaut und sofort in zellspezifisches Medium (Tab. 11) gegeben. Nach Zentrifugation ist das Zellpellet in neues Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt worden.

### 2.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:2 mit zellspezifischem Medium verdünnt. Davon wurden 20 µl auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Nach Auszählung der 4 Zählgitter wurde die Zellzahl/ml berechnet, indem die mittlere Zellzahl/Zählgitter mit 10<sup>4</sup> und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert wurde.

### 2.2.2.4 Transfektion und Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Für die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden Zellkulturtestplatten (6 Vertiefungen) mit Poly-L-Lyisin (PLL, 20 µg/ml in DPBS-/-) beschichtet (10 min, 1,5 ml), gewaschen (2x, DPBS-/-) und HEK-293-Zellen darin ausgesät (2.2.2.1). Bei einer Konfluenz von 90% wurde das Medium entfernt und pro Vertiefung 250 µl *Opti-minimal essential*-Medium mit der Transfektionsmischung (2 µg Plasmid-DNA (Tab. 5) und 10 µl Polyethylenimin) appliziert. Am nächsten Tag erfolgte die Zellvereinzelung (2.2.2.1) und Zugabe des Selektionsantibiotikums Geneticin (final 0,5 µg/ml). Im Anschluss erfolgte mittels Durchflusszytometrie

eine weitere Anreicherung der Zellen, die das Zielprotein (*Cld-yellow fluorescent protein*, Cld-YFP) exprimieren: die Zellen wurden abgelöst, in zellspezifischem Medium mit 5 mM EDTA resuspendiert, zentrifugiert (150 g, 4 min), 2x gewaschen (DPBS/- mit 5 mM EDTA) und in eine Zellsieberröhren überführt. Die Zellsuspension wurde bis zur Zellsortierung auf Eis gelagert und danach entsprechend 2.2.2.1 kultiviert.

Für den *knockdown* von Rab4, -5 oder -7 wurden HEK-293 Cld1-YFP-Zellen mit einer Mischung aus je 3 verschiedenen siRNAs (Tab. 5) mit dem siPort NeoFX Reagenz entsprechend der Herstellerangabe transfiziert, 24 h später subkultiviert und nach weiteren 48 h verwendet (Kooperation mit Dr. A. Andjelkovic-Zochowska, Universität Michigan, USA) [144].

#### 2.2.2.5 Kultivierung von Zellen auf Deckgläschen und Filtern

Die Zellen wurden auf Deckgläschen oder Filtern unter den in 2.2.2.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Für MDCK-II, HEK-293 und Caco-2-Zellen wurden die Deckgläschen (1,1 cm<sup>2</sup>, 9,6 cm<sup>2</sup>) vor der Zellaussat mit PLL (20 µg/ml in DPBS/-) beschichtet; für bEnd5 mit Rattenschwanzkollagen (0,67 mg/ml in 0,2% Essigsäure), je mit 0,3 ml/cm<sup>2</sup>, 1,5 h, 22 °C. Vor der Zellaussat wurden die Deckgläschen gewaschen (DPBS/-).

**Tab. 12 Kultivierungsbedingungen der Zellen auf Filtern**

	<b>Caco-2</b>	<b>MDCK-II</b>	<b>HT29/B6</b>	<b>pMBMEC</b>
Filterbezeichnung	CM	CM	HA	Matrigel
Membran-Material	PTFE	PTFE	Zellulose-Ester	Zellulose-Ester
Porendurchmesser (µm)	0,4	0,4	0,4	0,4
Wachstumsfläche (cm <sup>2</sup> )	0,6	0,6	0,6	0,3
Beschichtung	RSK (85 µg/cm <sup>2</sup> )	RSK (85 µg/cm <sup>2</sup> )	-	Matrigel
Zellzahl (cm <sup>2</sup> )	135000	180000	850000	#
Medienwechsel	1-/2-täglich	-	2-täglich	
Tage bis Experimentstart	5-7	1-2	7-9	6-8

#, pMBMECs wurden in einer Dichte von 51000 verdauten Kapillaren/cm<sup>2</sup> ausgesät; PTFE, Polytetrafluorethylen; RSK, Rattenschwanzkollagen

Auch die Filter (Tab. 12) wurden zunächst beschichtet: Für Caco-2- und MDCK-II-Zellen sind 150 µl Rattenschwanzkollagen (0,67 mg/ml in 0,2% Essigsäure, 1:2 in DPBS/-) pro Filter (Typ: CM) appliziert und über Nacht auf einer 37 °C Heizplatte getrocknet worden. Nach dem Waschen (DPBS/-) erfolgte die Äquilibration der Filter mit zellspezifischem Medium (apikal 400 µl, basal 600 µl, Tab. 11) für 2 h im Inkubator. HT29/B6-Zellen wuchsen auf unbehandelten Millicell-Filtern (Typ: HA). Die Kultivierung erfolgte mit apikal 400 µl und 600 µl basolateral. Eine Ausnahme bildete die Filter im cellZscope (2.2.3.1) mit apikal 560 µl und basolateral 400 µl Medium. Die pMBMECs wurden (Kooperation mit Prof. B. Engelhardt und Dr. C. Coisne; Universität Bern, CH) auf Matrigel-beschichteten Costar-Filtern

(Corning, New York, USA) ausplattiert [142, 143]. Die Filterkultivierung der pRBMEC mit Perizyten und Astrozyten erfolgte in Kooperation mit Prof. M. Deli, Dr. S. Veszelka (*Biological Research Centre, Szeged, Ungarn*) und Dr. Á. Kittel (*Institute of Experimental Medicine, Budapest, Ungarn*) [6].

#### 2.2.2.6 Behandlung von Zellen mit Peptiden

Die Peptide (Tab. 10) wurde mittels Analysenwaage abgewogen und in 37 °C-temperiertes, zellspezifisches Medium (Tab. 11) gelöst. Vor der Peptidbehandlung wurde das Medium abgenommen und durch peptidhaltiges Medium ersetzt. TAMRA-markierte Peptide sind zunächst in DMSO gelöst (4 mM oder 40 mM) und dann 1:500-1:1000 (8 µM oder 40 µM) in Medium mit 0,012% Pluronic F-127 verdünnt worden.

### 2.2.3 Funktionelle Untersuchungen

Die Bestimmung der parazellulären Dichtigkeit erfolgte mit Widerstands- (TER-) und Permeationsmessungen. Während der TER die parazelluläre Durchlässigkeit für Ionen widerspiegelt, ermöglichen Permeationsmessungen, Rückschlüsse auf die Durchlässigkeit eines Zellverbandes für Moleküle unterschiedlicher Größe zu erlangen. Die Kombination beider Methoden erlaubt es, Änderungen der parazellulären Dichtigkeit mit der Durchlässigkeit für bestimmte Molekülgrößen zu korrelieren.

#### 2.2.3.1 Transzellulärer elektrischer Widerstand

Der TER der Filterkulturen (Tab. 12) wurde entweder mit einer Handelektrode oder automatisiert mit dem cellZscope gemessen. Für Messungen mit der Handelektrode wurden die Filterkulturen auf eine 37 °C Heizplatte gestellt und je Filter 3 Messungen, jede um 120° versetzt, vorgenommen. Für die Berechnung des TER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) wurde vom mittleren elektrischen Widerstand des zellbewachsenen Filters ( $\Omega_Z$ ) der mittlere elektrische Widerstand des Leerfilters ( $\Omega_L$ ) subtrahiert und mit der Wachstumsfläche der Filter ( $\text{cm}^2$ ) multipliziert.

#### 2.2.3.2 Permeationsmessungen

Alle Schritte erfolgten mit 37 °C-temperierten Lösungen. Als Permeationsmarker dienten Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10, 10 kDa), *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa) und Alexa Fluor 680-3kDa Dextran (AD3, 3 kDa). Für Caco-2- und MDCK-II-Zellen wurde der Permeationskoeffizient ( $P_K$ ) nach Formel (1) berechnet [145].

$$(1) \quad [P_K] = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_i \cdot 60} \quad (cm/s)$$

$dQ/dt$	Menge an diffundiertem Permeationsmarker ( $\mu g/min$ )
$A$	Wachstumsfläche des Filters ( $cm^2$ )
$C_i$	Initiale Konzentration der Permeationslösung ( $\mu g/ml$ )
60	Umrechnungsfaktor <i>min</i> zu <i>s</i>

Die Filter wurden auf einer 37 °C temperierten Heizplatte 2x mit *Hank's balanced salt solution* mit  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  (HBSS+/+) gewaschen (apikal 400  $\mu l$ , basolateral 600  $\mu l$ ), bevor apikal 400  $\mu l$  Permeationslösung (45,7  $\mu g/ml$  LY oder 25,0  $\mu g/ml$  FD10 in HBSS+/+) und basolateral 600  $\mu l$  HBSS+/+ appliziert wurden. Nach bis zu 30 min im Inkubator sind pro Filter basolateral 3 Aliquots á 80  $\mu l$ , je um 120° versetzt, abgenommen und auf eine Zellkulturtestplatte (96 Vertiefungen) überführt worden. Die Fluoreszenzintensitäten (Tab. 8) wurden mit dem Plattenmessgerät bestimmt und die Filter im Anschluss an die Permeationsmessung mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop auf Unversehrtheit überprüft. Die Messung der parazellulären Dichtigkeit der pMBMECs erfolgte in Kooperation mit Prof. B. Engelhardt und Dr. C. Coisne (Universität Bern, CH); der pRBMEC mit Prof. M. Deli, Dr. S. Veszelka (*Biological Research Centre*, Szeged, Ungarn) und Dr. Á. Kittel (*Institute of Experimental Medicine*, Budapest, Ungarn).

### 2.2.3.3 Zellvitalität

Zellkulturtestplatten (48 Vertiefungen) wurden mit PLL beschichtet (20  $\mu g/ml$  in DPBS-/-, 0,3 ml/Vertiefung, 5 h) und gewaschen (DPBS-/-, alle weiteren Waschschrte ebenfalls mit DPBS-/-). Die Zellen wurden ausplattiert und nach Erreichen der Konfluenz mit den zu testenden Substanzen behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und je Vertiefung 200  $\mu l$  2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (MTT)-Lösung (0,5 mg/ml in *Dulbecco's modified Eagle-Medium* (DMEM), 1g/l Glukose, ohne Phenolrot) oder Neutralrot-Lösung (50  $\mu g/ml$  in DMEM 1g/l Glukose, ohne Phenolrot) appliziert [146]. Nach 3-4 h im Inkubator wurden die Zellen gewaschen und 200  $\mu l$  Extraktionslösung pro Vertiefung appliziert (MTT: 5% Triton-X-100, 2% 2 N Salzsäure, 93% Isopropanol; Neutralrot: 2% Essigsäure, 50% Ethanol (99%)). Nach 15 min auf dem Rüttler (800 U/min) erfolgte die Extinktionsmessung der Homogenate (MTT, 570 nm; Neutralrot, 540 nm) mit einem Plattenmessgerät.

## 2.2.4 Mikroskopische Untersuchungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Untersuchung das *laser scanning microscope* (LSM) 510 META-NLO mit PlanApochromat 63x/1.4 oder PlanNeofluar 100x/1.3 Öl-Objektiven und die LSM Image Browser Software verwendet. Die Einstellungen wurden entsprechend der Fluoreszenzeigenschaften der Marker gewählt (Tab. 8).

### 2.2.4.1 Immunfluoreszenz

#### Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Deckgläschen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf 1,1 cm<sup>2</sup> Deckgläschen kultiviert (2.2.2.5). Für die Immunfluoreszenzfärbung von HEK-293- und Caco-2-Zellen wurden diese gewaschen (2x, DPBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, DPBS+/, auch alle weiteren Waschschrte) und auf Eis 5 min in Aceton, 1 min in 99% unvergätem Ethanol und 2 min in DPBS+/+ inkubiert. Nach der Blockierung (DPBS+/+, 5% Milchpulver, 0,05% Tween-20) mit 80 µl für 1 h, bei 22 °C wurde 2x gewaschen. Anschließend sind 70 µl Primärantikörper (1:200 in DPBS+/+, 0,25% Milchpulver; Tab. 6) appliziert und bei 4 °C über Nacht inkubiert worden. Nach 4x waschen folgte die Inkubation mit 80 µl Sekundärantikörper (1:250 in DPBS+/+, 0,25% Milchpulver; Tab. 6) für 1 h im Dunkeln. Die Deckgläschen wurden 4x gewaschen und mit Einschlussmittel (*ImmuMount*) auf dem Objektträger stabilisiert.

Für Koloalisationsuntersuchungen zwischen TAMRA-mC1C2/-mC2C2, Cld1 und den endosomalen Markern Rab5 (frühe Endosomen) [147], Rab4 (Rezyklosomen) [148] und Rab7 (späte Endosomen) [149] in HEK-293 Cld1-YFP-Zellen (Kooperation mit Dr. A. Andjelkovic-Zochowska, Universität Michigan, USA) wurden die Zellen gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd (0,1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) 20 min fixiert, 3x gewaschen und anschließend 30 min blockiert (DPBS+/+, 5% Ziegenserum, 1% FKS, 0,01% Triton X-100). Die anti-Rab4, -Rab5, -Rab7 Antikörper (Tab. 6) wurden über Nacht bei 4 °C auf die Deckgläschen gegeben, inkubiert, 3x gewaschen und mit Einschlussmittel (*Vectashield*) auf dem Objektträger stabilisiert. Die Proben wurden mit dem LSM *inverted* SP5 X Mikroskop untersucht und die Koloalisation zwischen Cld1-YFP, TAMRA-Peptid und Rab4, -5 und -7 mit dem Programm ImageJ bestimmt.



### Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Filtern

Caco-2 und MDCK-II Zellfilter (2.2.2.5) wurden gewaschen (DPBS<sup>+/+</sup>, auch alle weiteren Waschschrte) und apikal mit 400  $\mu$ l und basolateral mit 600  $\mu$ l Ethanol (99%, eiskalt, unvergäht) für 10 min, bei -20 °C fixiert. Nach dem Ausschneiden der Filtermembran erfolgte die Permeierung der Zellen für 10 min mit 120  $\mu$ l in DPBS<sup>+/+</sup> mit 0,1% Triton-X 100. Die Membran wurden 4x gewaschen, für 1 h, bei 22 °C blockiert (DPBS<sup>+/+</sup>, 5% Bovines Serumalbumin (BSA)) und im Anschluss mit 120  $\mu$ l Primärantikörper (1:200 in DPBS<sup>+/+</sup>; Tab. 6) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen (4x) wurden mit 120  $\mu$ l Sekundärantikörper (1:200 in DPBS<sup>+/+</sup>; Tab. 6) für 1 h, bei 22 °C inkubiert, 4x gewaschen, und die Membran mittels Einschlussmittel (*ImmuMount*) zwischen einem Deckgläschen und einem Objektträger stabilisiert. Die pMBMECs wurden mit eiskaltem Methanol für 30 s fixiert, gewaschen (DPBS<sup>-</sup>, auch alle weiteren Waschschrte) und für 30 min, bei 22 °C blockiert (50 mM Tris(Hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCl), 150 mM NaCl, 5% Milchpulver, 0,2% Triton X-100, pH 7,5). Die Membran wurde gewaschen, für 30 min, bei 22 °C mit Primärantikörper (1:25 in Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% Milchpulver, 0,2% Triton X-100, pH 7,5; Tab. 6) inkubiert und erneut gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 30 min, bei 22 °C (1:25 in Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% Milchpulver, 0,2% Triton X-100, pH 7,5; Tab. 6). Die Membran wurde gewaschen und mit Einschlussmittel (*Mowiol*) zwischen einem Deckgläschen und einem Objektträger stabilisiert. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit dem Eclipse E600 Mikroskop, ausgestattet mit der *digital camera* DXM1200F. Die Untersuchung der pMBMECs erfolgte in Kooperation mit Dr. Coisne (Universität Bern, CH).

#### 2.2.4.2 Lebendzelluntersuchungen

Die auf 9,6 cm<sup>2</sup> Deckgläschen kultivierten Zellen (2.2.2.5) wurden 3x mit HBSS<sup>+/+</sup> gewaschen und in HBSS<sup>+/+</sup> mikroskopiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (5  $\mu$ M in HBSS<sup>+/+</sup>,  $\geq$ 10 min), der Plasmamembran mit Trypanblau (0,5 mM in HBSS<sup>+/+</sup>,  $\geq$ 2 min) oder 5-Hexadecanoylaminofluorescein (17  $\mu$ M in HBSS<sup>+/+</sup>,  $\geq$ 5 min).

### Endozytose von Peptiden

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Peptidaufnahme wurden Zellen für unterschiedlich lange Zeiträume mit 40  $\mu$ M TAMRA-markiertem Peptid (Tab. 10) unter den in 2.2.2.1 aufgeführten Bedingungen kultiviert und anschließend mikroskopiert.

Die Temperaturabhängigkeit der Peptidaufnahme wurde ermittelt, indem die Zellen zunächst 15 min, bei 6 °C inkubierten. Das Medium wurde dann durch 6 °C-temperiertes Medium mit 40 µM TAMRA-markiertem Peptid ersetzt. Nach 35 min wurden die Zellen entweder mikroskopiert oder für weitere 30 min, bei 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Aufklärung des Endozytoseweges von TAMRA-mC1C2 erfolgte mit Endozytoseinhibitoren (Tab. 13). Bei der Verwendung von 40 µM TAMRA-mC1C2 wurden die Zellen für 1 h mit Inhibitor vorbehandelt, bevor das Peptid zusammen mit dem Inhibitor für 35 min appliziert wurde. Für die Testung von 8 µM TAMRA-mC1C2 wurde 30 min mit Inhibitor vorinkubiert und im Anschluss das Peptid mit dem Inhibitor für 1 h appliziert.

**Tab. 13** Verwendete Endozytoseinhibitoren und -marker

Substanz	Beeinflussung/Markierung	Finale Konzentration <sup>#</sup>
Chlorpromazin	Inhibierung der Clathrin-vermittelten Internalisierung	15,00 µM
Filipin III	Inhibierung der Caveolae-vermittelten Internalisierung	15,27 µM
LY294002	Inhibierung der Makropinozytose	100,00 µM
Wortmannin	Inhibierung der Makropinozytose	0,25 µM
Alexa Fluor 680-Transferrin	Markierung der Clathrin-vermittelten Internalisierung und der Rezyklosomen	25,00 µg/ml

<sup>#</sup>, die Inhibitoren wurden in zellspezifischem Medium (Tab. 11) gelöst und appliziert

Die Ergebnisse der Internalisierungsuntersuchungen wurden mit Alexa Fluor 680-gekoppeltem Transferrin verifiziert (Tab. 13). Transferrin ist ein Protein, das nach Bindung an den Transferrinrezeptor Clathrin-abhängig internalisiert wird [150]. Nach der Internalisierung wird es nicht degradiert, sondern zurück an die Plasmamembran transportiert. Alexa Fluor 680-gekoppeltes Transferrin diente daher als Marker für die Clathrin-abhängige Internalisierung und für Rezyklosomen [148, 150]. Die Zellen wurden für 15 min, bei 6 °C mit 40 µM TAMRA-mC1C2 oder 25 µg/ml Transferrin oder 25 µg/ml Transferrin und 40 µM TAMRA-mC1C2 inkubiert. Anschließend folgten weitere 25 min Inkubation bei 37 °C, bevor die mikroskopische Analyse stattfand.

Der intrazelluläre Verbleib von TAMRA-mC1C2/mC2C2 nach der Endozytose wurde mit fixierten Proben (2.2.4.1) und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (2.2.6.7) untersucht.

#### Quantifizierung der Peptidaufnahme

Die Quantifizierung der Peptidaufnahme erfolgte mit Hilfe der Peptid-Fluoreszenzmarkierung TAMRA. Für jedes aufgenommene Bild wurde die Summe aller detektierten TAMRA-Signale (Tab. 8) mit Intensitäten zwischen >99 und <255 *arbitrary units* berechnet und auf die Zellzahl normiert (Fluoreszenzsignale/Zelle) [151].

### Proteinmobilität in der Plasmamembran (FRAP)

Mit *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Untersuchungen ist es möglich, die Diffusionseigenschaften eines fluoreszenzmarkierten Proteins zu untersuchen [152]. Hierfür wird in einem definierten Untersuchungsareal die Fluoreszenzmarkierung des zu untersuchenden Proteins durch mehrere intensive Laserpulse irreversibel zerstört. Durch Diffusion können Proteine mit intaktem Chromophor in das Untersuchungsareal strömen, so dass über die Zeit eine erneute Zunahme der Fluoreszenz in diesem Areal ermittelt werden kann. Aus der Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit kann die mobile Fraktion (Formel (4)) des Proteins auf Basis der Formeln (2) und (3) ermittelt werden.

$$(2) \quad F_i = F_{VB} - F_{NB} \quad (A.U.)$$

$$(3) \quad F_f = F_{NR} - F_{NB} \quad (A.U.)$$

$$(4) \quad Mobil = \left( \frac{F_f}{F_i} \right) \cdot 100 \quad (\%)$$

$F_i$	Initiale Fluoreszenzintensität (A.U.)
$F_f$	Finale Fluoreszenzintensität (A.U.)
$F_{VB}$	Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen (A.U.)
$F_{NB}$	Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen (A.U.)
$F_{NR}$	Fluoreszenzintensität nach Wiederherstellung (A.U.)

In den durchgeführten FRAP-Experimenten wurde der Einfluss vom Peptid mC1C2 (100  $\mu$ M, 5 h) auf die Mobilität von Cld1-YFP in Zwei-Zell-Kontakten untersucht. Hierfür wurde das YFP in den Kontaktregionen zweier HEK-293 Cld1-YFP-Zellen ausgebleicht und über 14 min die erneute Zunahme der Fluoreszenzintensität im betreffenden Areal gemessen. Für die Untersuchungen wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert (2.2.2.5).

#### 2.2.4.3 Gefrierbruch-Analyse

Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) wurden mit 5 ml PLL für 5 h beschichtet (20  $\mu$ g/ml in DPBS-/-). Nach dem Waschen (DPBS+/+, auch alle weiteren Waschschrte) wurden HEK-293 Cld1-YFP-Zellen ausgesät (2.2.2.1) und bei Erreichen einer Konfluenz von 85% für 24 h mit 100  $\mu$ M Peptid behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 5 ml Glutaraldehydlösung (2,5% Glutaraldehyd in DPBS+/+) für 2 h fixiert. Nach erneutem Waschen (2x) wurden die Flaschen maximal mit DPBS+/+ gefüllt und bei 4 °C gelagert. Die Gefrierbrüche wurden durch Prof. H. Wolburg (Universität Tübingen, DE) hergestellt und fotografiert.

### 2.2.5 Untersuchung von Signaltransduktionswegen

Der Glykogensynthase-Kinase-3 Inhibitor SB415286 und der NFκB-Inhibitor N4-[2-(4-Phenoxyphenyl)ethyl]-4,6-quinazolinediamin (QNZ) wurden zunächst in DMSO gelöst (40 mM bzw. 20 mM) bevor sie in Caco-2 Medium ( Tab. 11) verdünnt wurden. Für die Untersuchung mit den NFκB-Inhibitoren wurden Caco-2-Filterkulturen (2.2.2.5) mit Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC, 100 μM) oder QNZ (1 μM) für 1 h apikal vorbehandelt, das Medium gegen peptidhaltiges Medium ohne Inhibitor gewechselt und 24 h inkubiert. SB415286 (30-60 μM) wurde für 1 h bilateral inkubiert und das Medium anschließend gegen Medium mit SB415286 und Peptid ersetzt.

### 2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.6.1 Zellysatherstellung aus eukaryotischen Zellen

In Zellkulturtestplatten (24 Vertiefungen) gewachsene Zellen (2.2.2.1) wurden 2x mit DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und pro Vertiefung 250 μl eiskaltes DPBS<sup>+/+</sup> hinzugegeben. Nach dem Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber wurden diese pelletiert (150 g, 5 min, 4 °C) und in 70 μl Lysepuffer aufgenommen (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,5% Deoxycholat, 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS), pH 7,5). Nach 30 min auf Eis wurde zentrifugiert (20000 g, 40 min, 4 °C), der Überstand in Ladepuffer resuspendiert (Tab. 14), denaturiert (5 min, 95 °C) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.6.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Zellysaten erfolgte mittels SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in 12% Tris-Glycin Gelen (Tab. 14) bei 100 V und 22 °C. Von den Proben sind 10 μg Protein/Spur aufgetragen bzw. die Proteinsignale auf ein Referenzprotein normiert (2.2.6.4) worden.

#### 2.2.6.3 Proteinbestimmung

Es wurde das Pierce Bicinchoninsäure *Protein assay kit* entsprechend der Herstellervorgaben verwendet. Von jeder Probe wurden 1:2/1:5 Verdünnungen hergestellt und in Triplikaten auf eine Zellkulturtestplatte (96 Vertiefungen) gegeben. Je 25 μl Probe wurde mit 200 μl Reaktionslösung vermischt und für 30 min, bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde eine BSA-Standardreihe (0,025-2,0 μg/μl) mitgeführt. Die Absorption wurde bei 562 nm im Plattenmessgerät bestimmt.

#### 2.2.6.4 Western Blot

Nach kurzem Spülen des Polyacrylamid-Gels in  $H_2O_{dd}$  wurden die Proteine in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3) auf eine 0,45  $\mu$ m Nitrozellulose-Membran mittels Semi-Dry-Verfahren in übertragen (15 min, 15 V, gefolgt von 45 min, 20 V). Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran 1 h blockiert (Tris-gepufferte Salzlösung, TBST, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) und der primäre Antikörper (1:1000 in TBST; Tab. 6) unter leichtem Schütteln über Nacht bei 6 °C inkubiert. Der an Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (1:2000 in TBST; Tab. 6) wurde nach dem Waschen der Membran (6x, TBST) für 1 h, bei 22 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen (6x, TBST) fand der Chemilumineszenz-Nachweis der Proteine statt: die Membran wurde 5 min mit Entwicklerlösung benetzt und die Chemilumineszenz im Transilluminator detektiert. Die Analyse der Bandenintensitäten erfolgte mit ImageJ.

**Tab. 14 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

	<b>12%/20% Tris-Glycin-Gele</b>	<b>18% Tris-Tricin-Gel</b>
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS	100 mM Tris-HCl, 100 mM Tricin, 0,1% SDS, pH 8,3
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3 M Tris-HCl pH 8,5
Trenngelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	
Sammelgel (5 ml)	2,94 ml $H_2O_{dd}$ , 1,25 ml Sammelgelpuffer, 0,7 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, 50 $\mu$ l 10% SDS, 40 $\mu$ l 10% APS, 20 $\mu$ l TEMED	3,1 ml $H_2O_{dd}$ , 1,25 ml Gelpuffer, 0,625 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 5 $\mu$ l 40% APS, 20 $\mu$ l TEMED
Trenngel (10 ml)	4,1/0,9 ml $H_2O_{dd}$ , 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,2/6,4 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1, 100 $\mu$ l 10% SDS, 50 $\mu$ l 10% APS, 50 $\mu$ l TEMED	2,9 ml Ethylenglycol, 2,5 ml Gelpuffer, 4,5 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 10 $\mu$ l 40% APS, 15 $\mu$ l TEMED
4x Ladepuffer	125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glycerol, 0,2 M Dithiothreitol, 0,02% Bromphenolblau, pH 6,8	

Tris-HCl, Tris(Hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid; APS, Ammoniumperoxodisulfat; SDS, Natriumdodecylsulfat; TEMED, Tetramethylethylendiamin; es wurde der *Precision plus protein dual color* Größenstandard verwendet (3  $\mu$ l/Spur)

#### 2.2.6.5 Nachweis von Peptiden in Blutplasma

TAMRA-mC1C2 ist in einer Konzentration von 100  $\mu$ M in DMSO gelöst und anschließend 1:10 in Rattenblutplasma (zur Verfügung gestellt Dr. H. Rittner, Universität Würzburg, DE) verdünnt worden. Das Blutplasma wurde über einen Zeitraum von bis zu 48 h, bei 37 °C inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 sowie nach 2, 4, 8, 16, 24 h und 48 h wurden jeweils 150  $\mu$ l Aliquots entnommen und mit 60  $\mu$ l Acetonitril /99% Ethanol (1:1) gefällt (6 h, 4 °C). Nach Zentrifugation (20000 g, 15 min, 4 °C) und anschließender Filtration des Überstandes durch 22  $\mu$ m Spitzenvorsatzfilter wurden die Proben massenspektrometrisch (2.2.8.3) oder mit SDS-PAGE analysiert. Für die Auftrennung der Peptide mit SDS-PAGE wurden je 10  $\mu$ l des Filtrates in

Ladepuffer (Tab. 14) resuspendiert, denaturiert (5 min, 95 °C), auf Eis abgekühlt und bei 100 Volt und 22 °C in einem 18% Tris-Tricin-Gel separiert (Tab. 14). Die Fluoreszenz von TAMRA wurde im Geldokumentationssystem detektiert und mit der Software ImageJ durch Messung der Bandenintensitäten quantifiziert (Tab. 8).

#### 2.2.6.6 Expression und Kopräzipitation von Fusionsproteinen

*N*-terminale Fusionsproteine der EZS1 von Cld5 (Aminosäureposition 21-88) mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP-Cld5<sub>21-88</sub>), oder MBP allein (Tab. 5) wurden in *Escherichia coli* (BL21; Tab. 7) exprimiert. Die Zellen wurden hierfür in *Lysogeny broth*-Medium in einer Inkubationshaube kultiviert (37 °C, 200 U/min) und ab einer optischen Dichte von 0,6-0,8 mit final 0,3 mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid bei 22 °C für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (4000 g, 10 min, 4 °C), gefroren (flüssiger Stickstoff), auf Eis aufgetaut und in 40 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 0,2 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mg/ml Lysozym, 10% Glycerin, 0,1% Nonidet P-40, pH 7,4) resuspendiert. Nach 30 min wurde sonifiziert (6x10 s, 300 W), zentrifugiert (39000 g, 1 h, 4 °C) und der aliquotierte Lysat-Überstand bei -80 °C gelagert.

Für die Kopräzipitationsuntersuchungen wurden pro Probe 100  $\mu$ l Amylose-Matrix mit DPBS<sub>-/-</sub> gewaschen (500 g, 5 min), mit 100  $\mu$ l Lysat-Überstand gemischt und nach Zugabe von 1 ml Bindepuffer (20 mM Tris-HCl, 0,2 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) drehend inkubiert (1 h, 22 °C). Nach dem Waschen mit Bindepuffer ist die Matrix mit 800  $\mu$ l Peptid-Lösung (10  $\mu$ M TAMRA-mC1C2 oder TAMRA-mC2C2 in DPBS<sub>-/-</sub>) und 400  $\mu$ l Bindepuffer gemischt und drehend inkubiert worden (1 h, 22 °C). Anschließend wurde die Matrix gewaschen (5x, je 1 ml DPBS<sub>-/-</sub>), mit 30  $\mu$ l SDS-Laufpuffer versetzt und in Ladepuffer aufgenommen (Tab. 14). Nach dem Denaturieren (5 min, 95 °C) sind die Proben in einer 20% SDS-PAGE (Tab. 14) separiert und die Peptide über die TAMRA-Markierung (Tab. 8) mittels Fluoreszenz Scanner detektiert worden.

#### 2.2.6.7 Endosomenisolation und -analyse

Nach Inkubation von HEK-293 Cld1-YFP-Zellen mit 8  $\mu$ M TAMRA-mC1C2 oder -mC2C2 (Tab. 10) wurden diese resuspendiert (0,25 M Saccharose, 3 mM Imidazol (pH 7,4), 1 mM Ethylenglycoltetraessigsäure, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1x Protease-Inhibitormischung), homogenisiert und zentrifugiert (17000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde auf einen linearen 10-50% Saccharose-Gradienten (3 mM Imidazol (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 0,01% Triton X-100) gegeben und zentrifugiert (274000 g, 18 h, 4 °C). Anschließend

wurden, vom Boden beginnend, 30 Fraktionen entnommen, deren Fluoreszenz bestimmt (Tab. 8) und sie einem Western Blot unterzogen (2.2.6.4). Die Untersuchung fand in Kooperation mit Dr. A. Andjelkovic-Zochowska (Universität Michigan, USA) statt.

### 2.2.7 *In vivo*- und *ex vivo*-Untersuchungen

Die Untersuchungen fanden in Kooperation mit Dr. H. Rittner (Universität Würzburg) an am Perineurium des *Nervus ischiadicus* von männlichen Wistarratten (180-220 g) statt (Tab. 7) [15, 18, 83].

### 2.2.8 Biophysikalische Methoden

#### 2.2.8.1 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Um mögliche strukturelle Unterschiede zwischen wirksamen und unwirksamen Peptiden zu ermitteln, wurde die Zirkulardichroismus-(CD) Spektroskopie angewendet. Zirkulardichroismus beschreibt die Eigenschaft optisch aktiver (chiraler) Substanz, links- oder rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Die CD-Eigenschaften von Peptiden werden stark durch die Geometrie der Peptidkette beeinflusst, womit das CD-Spektrum Rückschlüsse auf ihre Sekundärstruktur ermöglicht:  $\alpha$ -helikale Proteine (z.B. Poly-L-Lysin, pH 11,1, 22 °C) zeigen CD-Spektrenminima bei 208 und 222 nm sowie ein Maximum bei ~191 nm; unstrukturierte Proteine (Poly-L-Lysin, pH 5,7, 22 °C) sind durch ein CD-Minimum bei 197 nm und geringe positive Werten bei 217 nm charakterisiert; die  $\beta$ -Faltblattkonformation (Poly-L-Lysin, 15 min erhitzt auf 52 °C, pH 11,1, 22 °C) resultiert in einem CD-Minimum bei 217 nm, einem Maximum bei 195 nm [153].

Die Messungen erfolgten mit dem Spektropolarimeter J-720, bei 22 °C von 195-260 nm in 0,1 cm Quarzküvetten. Pro Messung sind 8 Akkumulationen mit einer Auflösung von 0,1 nm und einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min erzeugt worden. Die verwendete Peptidkonzentration betrug 50  $\mu$ M. Um umfassende Informationen über die Sekundärstruktureigenschaften der Peptide zu erhalten, erfolgten die Messungen in unterschiedlichen Pufferbedingungen: 10 mM Phosphatpuffer (PP; 7,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4), 0,25-30 mM SDS in PP; 1-80% Trifluorethanol (TFE) in PP. In Abhängigkeit der Sekundärstrukturneigung eines Peptids ermöglicht die Zugabe von SDS in Konzentrationen unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (6-8 mM) die  $\beta$ -Faltblattbildung zu induzieren. SDS-Konzentrationen über der kritischen Mizellenkonzentration können zur Induktion und Stabilisierung von  $\alpha$ -Helices führen; TFE ist ein organisches Lösungsmittel, das die Bildung von

$\alpha$ -Helices begünstigt [154-156]. Die Analyse der CD-Daten erfolgte mit dem Programm Spectra Manager: Die Elliptizität  $\theta$  der Probe wurde pufferkorrigiert, in die Molare Elliptizität  $[\theta]$  transformiert (Formel (5)) und auf die Anzahl der Aminosäuren normiert (Molare Residuelle Elliptizität,  $[\theta]_{MRE}$ , Formel (6)). Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile der Peptide erfolgte mit dem Spectra Manager unter Verwendung von Referenzspektren [157].

$$(5) \quad [\theta] = \frac{\theta}{10 \cdot C \cdot d} \quad (deg \cdot cm^2 \cdot decimol^{-1})$$

$$(6) \quad [\theta]_{MRE} = \frac{\theta}{n} \quad (deg \cdot cm^2 \cdot decimol^{-1})$$

$\theta$	Elliptizität ( <i>mdeg</i> )
$C$	Molare Konzentration ( $mol \cdot l^{-1}$ )
$d$	Schichtdicke der Küvette ( <i>cm</i> )
$n$	Anzahl der Aminosäuren

#### 2.2.8.2 3D-Strukturvorhersage der Peptide

Die Vorhersage der 3D-Strukturen der Peptide erfolgte mit dem Programm PEP-FOLD [138-140]. Ausgehend vom Konzept des *structural alphabets* [158] wird hierbei die Primärsequenz des Peptids mit 27 4-Aminosäurefragmenten mit bekannter Konformation abgeglichen. Aus übereinstimmenden Fragmenten werden im Anschluss unter Beachtung ihrer Konformationseigenschaften Modelle des Peptids generiert. Die Modelle mit den energetisch günstigsten Konformationen (sOPEP [159]) wurden für die weitere Untersuchung verwendet und mit dem Programm Discovery-Studio dargestellt.

#### 2.2.8.3 Massenspektrometrischer Nachweis der Peptide im Blutplasma

Für den massenspektrometrischen Nachweis von TAMRA-Peptiden im Blutplasma wurden die Proben entsprechend 2.2.6.5 vorbereitet, eingengt (Rotations-Vakuum-Konzentrator, 45 °C 5,5 Torr/min Unterdruck) und in 5% Acetonitril/0,1% TFA im Ultraschallbad gelöst. Zum Entsalzen und erneuten Aufkonzentrieren der Probe wurden ZipTip C18 Säulen verwendet. Nach dem Waschen (3x; 50% Acetonitril, 0,1% TFA) und Äquilibrieren (3x; 0,1% TFA, pH 7,0) wurden die Säulen durch 10x aufziehen mit der Probe beladen. Nach dem Waschen (3x, 0,1% TFA, pH 7,0) erfolgte die Probenelution in 1,5  $\mu$ l 65% Acetonitril/0,3% TFA direkt auf eine Opti-TOF 384er Platte. Für jede Probe waren 0,5  $\mu$ l  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure (5 mg/ml in 75% Acetonitril/0,3% TFA) auf der Platte vorgelegt. Die Detektion der Peptide erfolgte mit dem Massenspektrometer (AB SCIEX TOF/TOF 5800).



### 2.2.9 Statistik

Die Ergebnisse sind, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert±Standardabweichung (SD) dargestellt. Die SD wurde ab  $n \geq 3$  berechnet. Unterschiede zwischen 2 Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U Test, Unterschiede zwischen mehr als 2 Gruppen mit dem Kruskal-Wallis Test, gefolgt vom Dunns-Vergleichstest, identifiziert. Für die *in vivo* Experimente wurden ANOVA, gefolgt vom Student-Newman-Keuls- oder Dunnett-Test angewendet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant,  $p \leq 0,01$  (\*\*) als hoch signifikant und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) als höchst signifikant erachtet. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Prism.

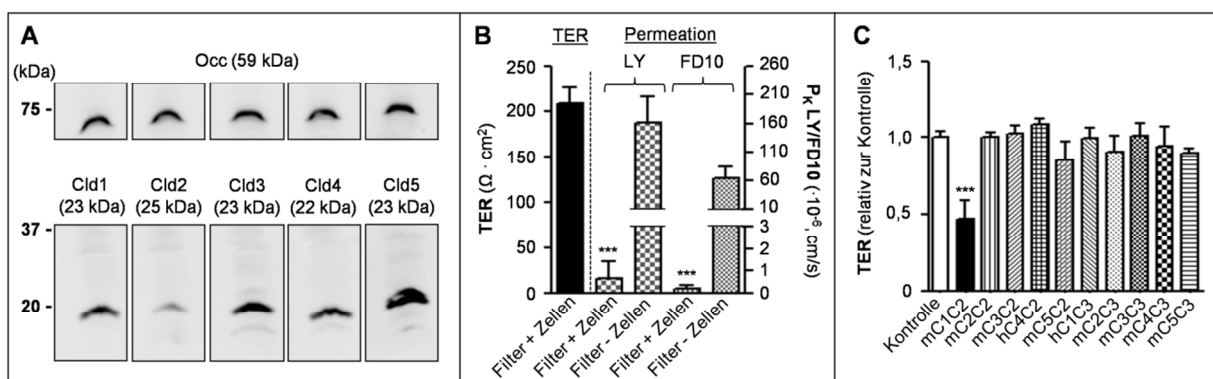
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Claudin-Peptidomimetika zur Zellbarrieremodulation

Die parazelluläre Dichtigkeit epithelialer und endothelialer Zellbarrieren wird durch die interzelluläre Wechselwirkung der extrazellulären Schleifen 1 und -2 (EZS1, -2) der Claudine bestimmt. Mit dem Ziel die parazelluläre Durchlässigkeit durch die spezifische Modulation dieser Wechselwirkungen zu erhöhen, wurden Peptidomimetika der EZS1 und -2 von Cld1-5 entworfen und synthetisiert (Tab. 10). Die Aktivität der Peptide wurde über TER- und Permeationsmessungen sowie die Färbung der TJ-Proteine bestimmt. Für Bindungs- und Lokalisationsuntersuchungen wurde an die Peptide die Fluoreszenzmarkierung TAMRA gekoppelt. Die Bestimmung von wirkrelevanten Bereichen erfolgte mit Deletions-, Additions- und Aminosäureaustauschpeptiden.

#### 3.2 Das Claudin-1-Peptidomimetikum mC1C2 erhöht die Zellbarriere-durchlässigkeit

Als Eingangstestsystem für die Detektion möglicher barrieremodulierender Eigenschaften der Cld-Peptidomimetika (Tab. 10) dienen epitheliale Caco-2-Zellen. Diese exprimieren die TJ-Proteine Cld1-5 (Abb. 8A) und Occ und wiesen nach 5-7 Tagen Kultivierung einen TER von  $208 \pm 18 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auf (Abb. 8B). Damit einher ging eine signifikant verringerte parazelluläre Durchlässigkeit für kleine (LY; 0,4 kDa) und große (FD10; 10 kDa) Moleküle. Abb. 8B zeigt



**Abb. 8 Caco-2-Zellen als Testsystem zur Untersuchung des Einflusses von Claudin-Peptidomimetika auf die parazelluläre Dichtigkeit.** (A) Western Blot-Nachweis der TJ-Proteine Claudin-1 (Cld1, berechnetes Molekulargewicht 23 kDa), Cld2 (25 kDa), Cld3 (23 kDa), Cld4 (22 kDa), Cld5 (23 kDa) und Occludin (Occ, 59 kDa). (B) Filterkulturen (Zellen+Filter) zeigten nach 5-7 Tagen einen transzellulären elektrischen Widerstand (TER, schwarzer Balken) von  $>200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und signifikant verringerte Permeationskoeffizienten ( $P_k$ ) für *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa, karierte Balken) und Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10, gepunktete Balken) im Vergleich zu Leerfiltern (Filter-Zellen);  $n \geq 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Mann-Whitney U Test; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . (C) Von den getesteten Peptidomimetika (200  $\mu\text{M}$ , apikal, 24 h) reduzierte lediglich das von der ersten extrazellulären Schleife von murinem Cld1-abgeleitete Peptid mC1C2 den TER im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle); m, Maus; h, human; Details zu den Peptiden, Tab. 10;  $n \geq 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

den Effekt der Cld-Peptidomimetika (200  $\mu\text{M}$  apikal, 24 h) auf den TER von Caco-2-Zellen. Von den getesteten Peptiden bewirkte lediglich das EZS1-Peptid von Cld1 (mC1C2) eine signifikante Verringerung des TER um  $53\pm 12\%$  gegenüber Zellen die ohne Peptid kultiviert wurden (Kontrolle). Alle anderen Peptide führten zu keiner signifikanten TER-Verringerung, d.h. Öffnung der parazellulären Zellbarriere.

### 3.3 *In vitro*-Wirkung von mC1C2

#### 3.3.1 Zelltyp-, Konzentrations-, Administrations- und Zeitabhängigkeit

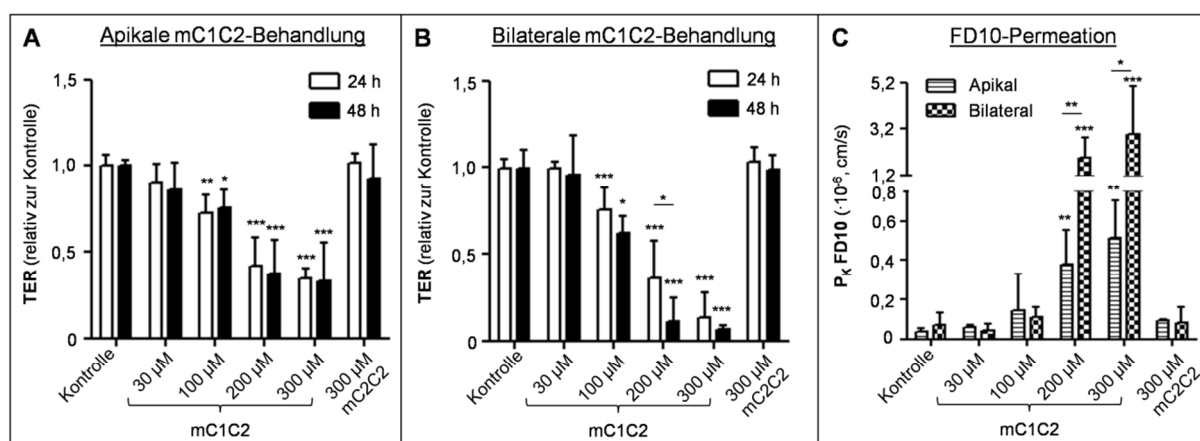
Die weitere Charakterisierung des Peptideffektes von mC1C2 erfolgte an Zellen mit unterschiedlichen Barriereigenschaften. Neben den epithelialen Caco-2-, MDCK-II-, HT29/B6- und HEK-293-Zellen, wurden auch die murine Gehirndothelzelllinie bEnd5 und primäre murine (pMBMEC)- oder Ratten (pRBMEC)-Gehirnkapillarendothelzellen verwendet. bEnd5, pMBMECs und pRBMECs sind etablierte *in vitro* Modelle der Blut-Hirnschranke [6, 160]. Die Unterschiede in den Barriereigenschaften der verwendeten Zelltypen ergeben sich u.a. aufgrund der verschiedenen Cld-Subtypenexpression. MDCK-II-Zellen exprimieren Cld1, -2, -3 und -4 [86, 161], Caco-2- [162, 163] und HT29/B6-Zellen [164] noch zusätzlich Cld5. HEK-293-Zellen sind Cld-frei [80] und wurden für die Untersuchungen mit Cld1-5 monotransfiziert. Im Gegensatz zu den genannten epithelialen Zellen, exprimieren die pMBMECs Cld3 und -5, jedoch nicht Cld1, -2 und -4 [165, 166], bEnd5-Zellen Cld3 und -5 [160] und pRBMECs Cld5 [6].

##### 3.3.1.1 mC1C2 wirkt konzentrations- und administrationsabhängig

Zur Untersuchung der Konzentrations- und Administrationsabhängigkeit des Peptideffektes von mC1C2 wurden Caco-2-Zellen apikal (Abb. 9A) oder bilateral (Abb. 9B) mit 30-300  $\mu\text{M}$  mC1C2 behandelt und der TER 24 h und 48 h später bestimmt. Administrationsunabhängig führten 30  $\mu\text{M}$  mC1C2 zu keiner signifikanten Änderung des TER im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle). Noch höhere mC1C2-Konzentrationen resultierten in einer signifikanten Verringerung des TER: Nach apikaler Administration von 100, 200 oder 300  $\mu\text{M}$  mC1C2 sank der TER nach 24 h um  $28\pm 10\%$ ,  $58\pm 16\%$  bzw.  $66\pm 6\%$  und nach 48 h Inkubation um  $25\pm 10\%$ ,  $63\pm 19\%$  bzw.  $67\pm 21\%$ , relativ zur Kontrolle. Die bilaterale Behandlung mit 100-300  $\mu\text{M}$  mC1C2 führte nach 24 h zu TER-Verringerungen von  $25\pm 13\%$ ,  $64\pm 22\%$  und  $87\pm 14\%$ , und nach 48 h von  $38\pm 10\%$ ,  $89\pm 13\%$  und  $94\pm 3\%$ , relativ zur Kontrolle. Hierbei bewirkte die Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  nach 48 h zur signifikant stärkeren TER-

Absenkung als nach 24 h (Abb. 9B). Obwohl die bilaterale Behandlung der Zellen mit 200 und 300  $\mu\text{M}$  mC1C2 zu tendenziell stärkeren TER-Absenkungen als nach apikaler Behandlung führte, unterschieden sich die TER-Werte nicht signifikant voneinander. Das in den Voruntersuchungen (3.2) auf die Barrierefunktion als wirkungslos identifiziertes Peptid der EZS1 von Cld2 (mC2C2) wurde als Kontrolle verwendet. Unabhängig von der Administrationsart oder Inkubationsdauer ergaben 300  $\mu\text{M}$  mC2C2 nicht signifikante Änderungen des TER im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9A, B).

Nach 48 h Peptidinkubation wurde die parazelluläre Durchlässigkeit des Zellrasens für den Permeationsmarker FD10 (10 kDa) bestimmt (Abb. 9C). Gegenüber der peptidfreien Kontrolle ( $0,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$  cm/s) führte die apikale Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  ( $3,8 \pm 1,7 \cdot 10^{-6}$  cm/s) und 300  $\mu\text{M}$  mC1C2 ( $5,1 \pm 1,9 \cdot 10^{-6}$  cm/s) zu einer 9,5- bzw. 12,8-fachen Erhöhung des Permeationskoeffizienten von FD10 ( $P_K$  FD10). Die bilaterale mC1C2-Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  ( $19,7 \pm 8,8 \cdot 10^{-6}$  cm/s) und 300  $\mu\text{M}$  ( $29,7 \pm 21,0 \cdot 10^{-6}$  cm/s) erhöhte diesen noch stärker (28,1- bzw. 42,4-fach) gegenüber der Kontrolle ( $0,7 \pm 0,6 \cdot 10^{-6}$  cm/s). Die mC2C2-Behandlung resultierte, analog zu den TER-Messungen, in keiner signifikant erhöhten parazellulären Durchlässigkeit für FD10 – weder nach apikaler ( $0,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$  cm/s) noch nach bilateraler ( $0,8 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$  cm/s) mC2C2-Inkubation (Abb. 9C).

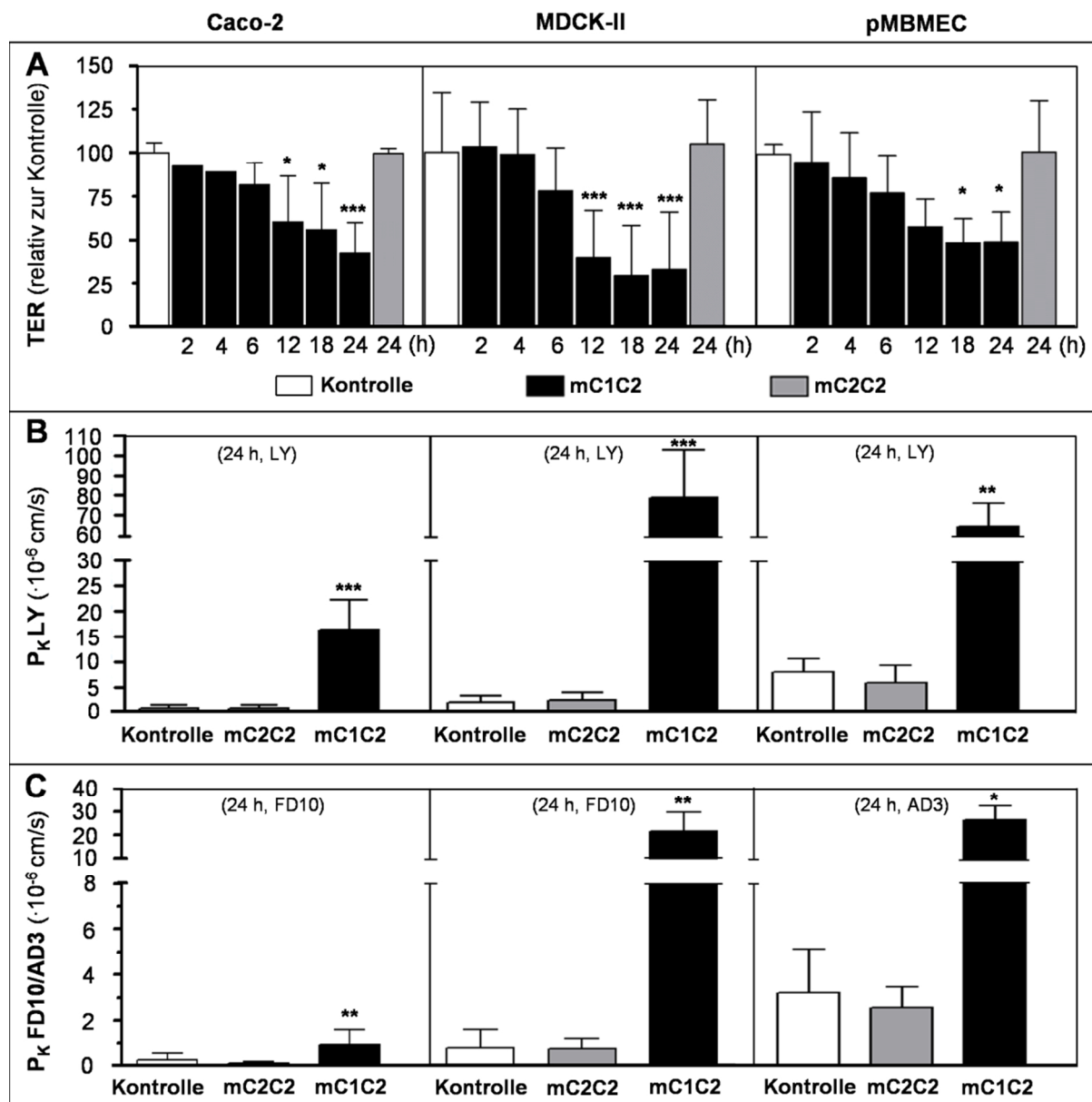


**Abb. 9 Das Claudin-1-Peptidomimetikum mC1C2 erhöht die parazelluläre Durchlässigkeit administrations- und konzentrationsabhängig.** Einfluss einer 24- bzw. 48-stündigen (A) apikalen oder (B) bilateralen Administration von 30-300  $\mu\text{M}$  mC1C2 und dem Kontrollpeptid mC2C2 (300  $\mu\text{M}$ ) auf den transzellulären elektrischen Widerstand (TER) von Caco-2-Filterkulturen im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle);  $\geq 100$   $\mu\text{M}$  mC1C2 führten administrationsunabhängig nach 24 oder 48 h zur signifikanten Reduktion des TER, relativ zur Kontrolle. (C) 200-300  $\mu\text{M}$  mC1C2 führten, im Vergleich zur Kontrolle, nach 48 h administrationsunabhängig zur signifikanten Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit des Permeationsmarkers Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10); mC2C2 erhöhte den Permeationskoeffizienten ( $P_K$ ) nicht.  $n \geq 5$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

### 3.3.1.2 Nach 12 h Inkubation öffnet mC1C2 in der minimal effektiven Konzentration epitheliale und endotheliale Barrieren

Wann beginnt sich die parazelluläre Dichtigkeit zu verringern (0-24 h) und findet der beobachtete Effekt auch in anderen Zelltypen statt? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden epitheliale Caco-2 (Cld1-5) und MDCK-II (Cld1-4) sowie ein aus primären Gehirnkapillarendothelzellen aufgebautes *in vitro* Modell der Blut-Hirnschranke (pMBMECs; Cld3, -5) mit mC1C2 inkubiert. Aufgrund der Voruntersuchungen aus 3.3.1.1, wurde für die Analyse des Wirkeintritts die minimal effektive Wirkkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  (24 h, apikal) verwendet. Vor der Behandlung wiesen die Caco-2-Zellen einen basalen TER von  $207 \pm 16 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , die MDCK-II-Zellen von  $143 \pm 48 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und die pMBMECs von  $47 \pm 9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auf. Das Peptid mC1C2 führte nach 6 h zu 10-30%igen Absenkungen des TER (Abb. 10A) in allen Zellkulturen. Nach 12 h wurde bei Caco-2 und MDCK-II-Zellen eine signifikante Verringerung der parazellulären Dichtigkeit gegenüber der Kontrolle von  $40 \pm 26\%$  bzw.  $61 \pm 27\%$  gemessen. Bei den pMBMECs kam es nach 18 h zu einer signifikanten Absenkung des TER auf  $51 \pm 14\%$  gegenüber der Kontrolle. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 24 h war der TER der Caco-2-Zellen um  $58 \pm 18\%$ , der MDCK-II-Zellen um  $67 \pm 33\%$  und der pMBMECs um  $51 \pm 17\%$  signifikant gegenüber der Kontrolle verringert. Dagegen führte das Kontrollpeptid mC2C2 auch nach 24 h bei keinem Zelltyp zu signifikanten TER-Änderungen.

Für mC1C2-behandelte Zellen konnte nach 24 h Inkubation zelltypenunabhängig eine signifikante Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit für kleine (LY, 0,4 kDa) und größere Moleküle (FD10, 10 kDa; AD3, 3 kDa) gemessen werden (Abb. 10B, C). Der Permeationskoeffizient ( $P_K$  LY) von mC1C2-behandelten Caco-2-Zellen ( $16,3 \pm 5,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) war gegenüber den Kontrollzellen ( $0,8 \pm 0,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) 20-fach erhöht; in MDCK-II-Zellen kam es zu einer 42-fachen Steigerung der LY-Permeabilität von  $1,9 \pm 1,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  auf  $79,3 \pm 24,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  und in den pMBMECs zu einer 8-fachen Erhöhung von  $8,1 \pm 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  auf  $65,5 \pm 11,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  (Abb. 10B). Der  $P_K$  FD10 war nach mC1C2-Behandlung in Caco-2-Zellen ( $0,9 \pm 0,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) 3-fach gegenüber Kontrollzellen ( $0,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) erhöht; MDCK-II-Zellen zeigten einen 31-fachen Anstieg der Durchlässigkeit für FD10 ( $21,8 \pm 8,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) im Vergleich zu den Kontrollzellen ( $0,7 \pm 0,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ); pMBMECs wiesen für AD3 eine 8,5-fache Erhöhung von  $P_K$  AD3  $3,2 \pm 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  auf  $27,1 \pm 5,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  auf (Abb. 10C). Das Kontrollpeptid mC2C2 steigerte die Durchlässigkeit der Permeationsmarker bei Caco-2 (LY:  $0,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ; FD10:  $0,1 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ), MDCK-II (LY:  $2,4 \pm 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ; FD10:  $0,7 \pm 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) und pMBMEC (LY:  $6,0 \pm 3,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ; AD3:  $2,5 \pm 0,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) gegenüber der Kontrolle (siehe oben) nicht (Abb. 10B, C).

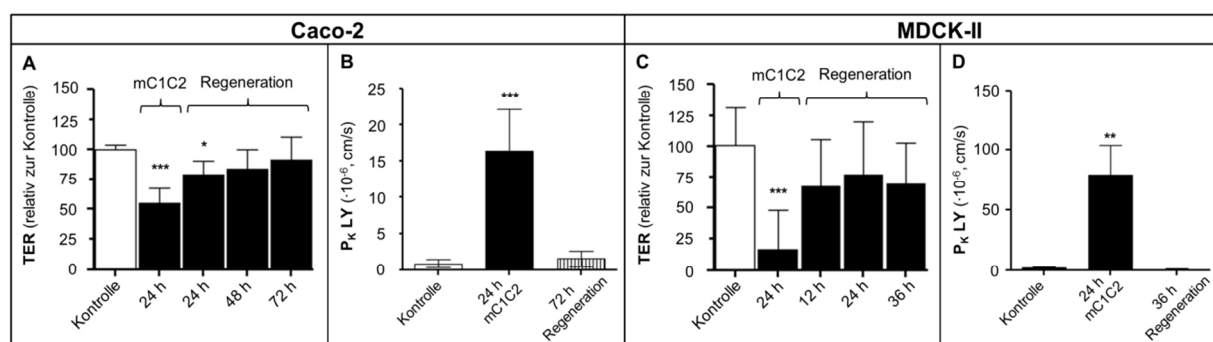


**Abb. 10** mC1C2 steigert die Permeation epi- und endothelialer Barrieren ab 12 h Inkubation. Filterkulturen der Epithelzelllinien Caco-2 (links), MDCK-II (Mitte) und der primären Gehirnkapillarendothelzellen (pMBMECs, *in vitro* Blut-Hirnschranke Modell, rechts) wurden apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 oder dem Kontrollpeptid mC2C2 behandelt. Der (A) tranzelluläre elektrische Widerstand (TER) wurde im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) bestimmt,  $n \geq 4$ . 24 h nach Behandlungsbeginn wurde die parazelluläre Durchlässigkeit für die Permeationsmarker (B) *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa),  $n \geq 5$ , (C) Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10),  $n \geq 6$ , oder Alexa Fluor 680 3 kDa-Dextran (AD3),  $n \geq 6$ , bestimmt und mit der Kontrolle verglichen;  $P_K$ , Permeationskoeffizient. Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

### 3.3.1.3 Die Barriereöffnung ist reversibel

Die Behandlung von Epithel- und Endothelzellen mit 200  $\mu$ M mC1C2 führte zum signifikanten Absinken des TER und zur Erhöhung der parazellulären Permeabilität für LY (3.3.1.2). Um die Reversibilität des beobachteten Effektes zu ermitteln, wurde 24 h nach Peptidapplikation bei Caco-2- und MDCK-II-Zellen das Medium vollständig gewechselt und kontinuierlich

der TER gemessen (Abb. 11). Bei Caco-2-Zellen unterschied sich 48 h nach Entfernung des Peptids der TER der mC1C2-behandelten Proben ( $83\pm 17\%$ ) nicht signifikant vom TER der Zellen vor Behandlungsbeginn (Kontrolle) (Abb. 11A). Permeationsmessungen mit LY, 72 h nach Entfernung des Peptids, bestätigten die Wiederherstellungen der Barriereintegrität: Der LY Permeationskoeffizient peptidfrei kultivierter Zellen (Kontrolle,  $0,9\pm 0,6\cdot 10^{-6}$  cm/s) unterschied sich nicht signifikant vom LY Permeationskoeffizient der mC1C2-Proben nach 72 h Regeneration ( $1,5\pm 1,0\cdot 10^{-6}$  cm/s; Abb. 11B). MDCK-II-Zellen zeigten 36 h nach Peptidentfernung eine Wiederherstellung des TER auf  $69\pm 33\%$  der Zellen vor Behandlungsbeginn (Abb. 11C) und keine signifikanten Permeationsunterschiede zwischen der Kontrolle ( $1,8\pm 0,8\cdot 10^{-6}$  cm/s) und der mC1C2-Probe ( $0,7\pm 0,3\cdot 10^{-6}$  cm/s; Abb. 11D).

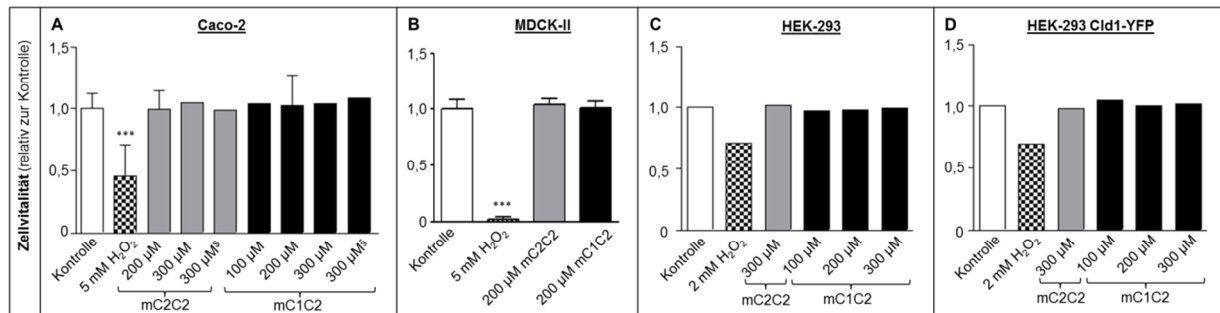


**Abb. 11 Die Barriereöffnung durch mC1C2 ist reversibel.** (A, B) Caco-2- und (C, D) MDCK-II-Zellen wurden 24 h apikal mit  $200\ \mu\text{M}$  mC1C2 behandelt oder ohne Peptid kultiviert (Kontrolle), der (A, C) transzelluläre elektrische Widerstand (TER) bestimmt, das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 36-72 h kultiviert. (B, D) Nach der Regeneration des TER wurde der Permeationskoeffizient ( $P_K$ ) für *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa) bestimmt und mit dem  $P_K$  der Kontrolle verglichen.  $n\geq 5$ ; Mittelwert $\pm$ SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p\leq 0,05$ ; \*\*,  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p\leq 0,001$ .

### 3.3.1.4 Wirkkonzentrationen von mC1C2 sind nicht zytotoxisch

Um mögliche zytotoxische Einflüsse des Peptids mC1C2 zu ermitteln, ist die Zellvitalität nach Peptidbehandlung und der Endotoxingehalt der verwendeten Peptidcharge bestimmt worden. Für die Bestimmung der Zellvitalität wurden Caco-2 (Abb. 12A) und MDCK-II (Abb. 12B) für 24-48 h mit  $100\text{-}300\ \mu\text{M}$  mC1C2 und bis zu  $300\ \mu\text{M}$  mC2C2 inkubiert. Außerdem ist in orientierenden Versuchen der Einfluss der Peptide auf die Vitalität untransfizierter (wt, Abb. 12C) oder mit dem Fusionsprotein Claudin-1-*yellow fluorescent protein* (Cld1-YFP) transfizierter HEK-293-Zellen untersucht worden (Abb. 12D). Keine der getesteten Bedingungen wirkte sich negativ auf die Vitalität der Zellen aus. Als Positivkontrolle dienten  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelte Zellen:  $5\ \text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (24 h) verringerten die Zellvitalität bei Caco-2-Zellen um  $54\pm 25\%$  und bei MDCK-II-Zellen um  $98\pm 2\%$  (Abb. 12A, C). In HEK-293 (-Cld1YFP)-Zellen führten  $2\ \text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 30 min Inkubation zur

Verringerung der Zellvitalität um 30% (Abb. 12C, D). Die Endotoxinbestimmung für mC1C2 und mC2C2 ergab Werte von <0,55 Endotoxineinheiten (EU)/ml für Peptidkonzentration von 200  $\mu$ M. Die in der Wirkkonzentration der Peptide enthaltene Endotoxinmenge lag damit unter dem von der *U.S. Food and Drug Administration* angegebenen Endotoxin-Grenzwert von  $K/M=2,5$  EU/ml (maximale Pyrogen-Dosis (K/M); K, für Menschen und Kaninchen 5 EU/kg; M, maximale einmalige Dosis/h, 2 ml/kg [167]).



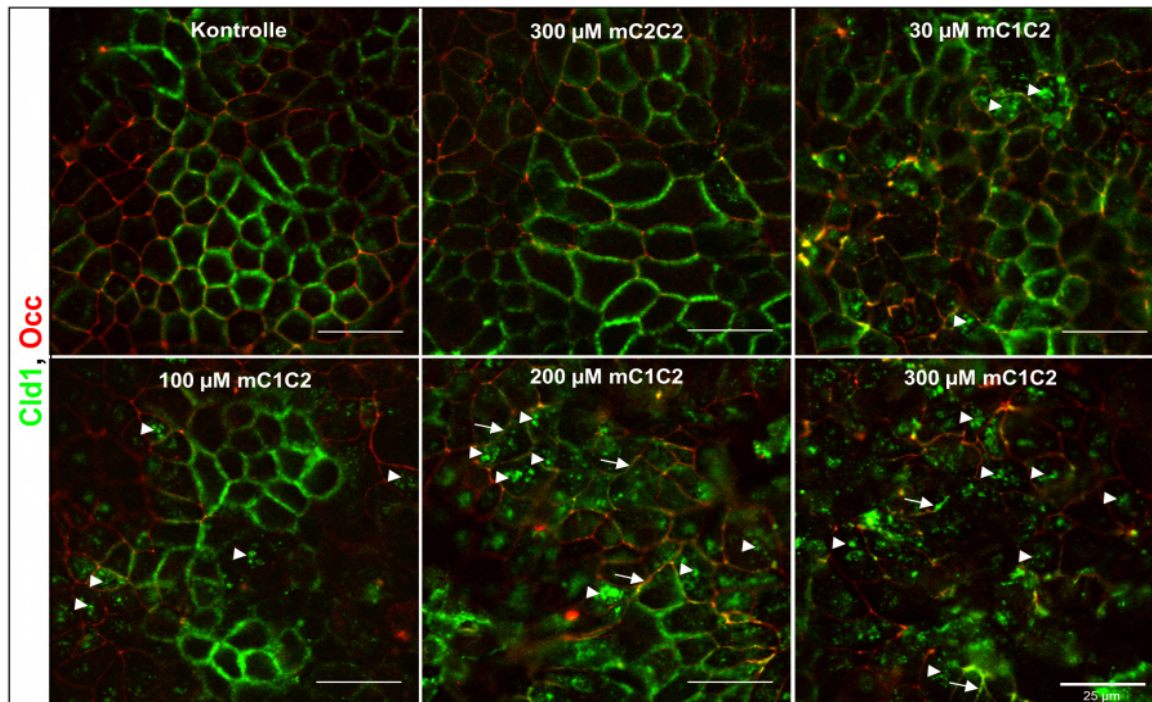
**Abb. 12 mC1C2 ist in den Öffnerkonzentrationen nicht zytotoxisch.** (A) Caco-2-, (B) MDCK-II-, (C) untransfizierte HEK-293 (wt)- und (D) Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP)-transfizierte HEK-293-Zellen wurden apikal für 24-48 h mit 100-300  $\mu$ M mC1C2 oder mC2C2 behandelt und die Zellvitalität relativ zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) bestimmt. (A, B) 24-48 h Inkubation mit mC1C2 oder mC2C2 verringerten die Zellvitalität von Caco-2- oder MDCK-II-Zellen, relativ zur Kontrolle, nicht; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (24 h), positiv Kontrolle; Caco-2:  $n \geq 8$  für 200  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Kontrolle; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; ansonsten  $n \geq 2$ ; MDCK-II-Zellen:  $n \geq 4$ . (C, D) 24 h Inkubation mit 100-300  $\mu$ M mC1C2 oder mC2C2 verringerten die Zellvitalität von HEK-293 wt- oder Cld1-YFP-Zellen, relativ zur Kontrolle, nicht; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) reduzierte die Zellvitalität;  $n=2$ ; Mittelwert $\pm$ SD.

### 3.3.2 Effekt auf die Lokalisation und Expression von *tight junction*-Proteinen

#### 3.3.2.1 mC1C2 verringert die Plasmamembranlokalisation von Claudin-1 dosisabhängig

Welchen Einfluss hat das Cld1-Peptid mC1C2 auf die zelluläre Lokalisation von Cld1? Zur Klärung dieser Frage wurden Caco-2-Zellen mit bis zu 300  $\mu$ M mC1C2 für 48 h inkubiert und im Anschluss Cld1 und Occ durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (Abb. 13). Die mit dem Kontrollpeptid mC2C2 (300  $\mu$ M) behandelten Zellen unterschieden sich bezüglich ihrer Cld1- und Occ-Färbungen nicht von den Zellen ohne Peptid (Kontrolle). Cld1 und Occ kolokalisierten in der lateralen Zellmembran, der Anteil an zytosolischem Cld1 oder Occ war vernachlässigbar gering und das Cld1 Signal war diffuser als das Occ Signal (Abb. 13). Bei den mC1C2-behandelten Zellen konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Cld1-Lokalisation beobachtet werden. 30  $\mu$ M und 100  $\mu$ M mC1C2 führten nur zur geringen Erhöhung des intrazellulären Cld1-Signals (Dreieck). Die Behandlung mit 200-300  $\mu$ M mC1C2 resultierte in einem deutlichen Anstieg des intrazellulären Cld1-Signals und der Abnahme seiner Plasmamembranlokalisation. Ab 200  $\mu$ M mC1C2 verringerte sich auch die homogene Plasmamembranlokalisation von Occ.





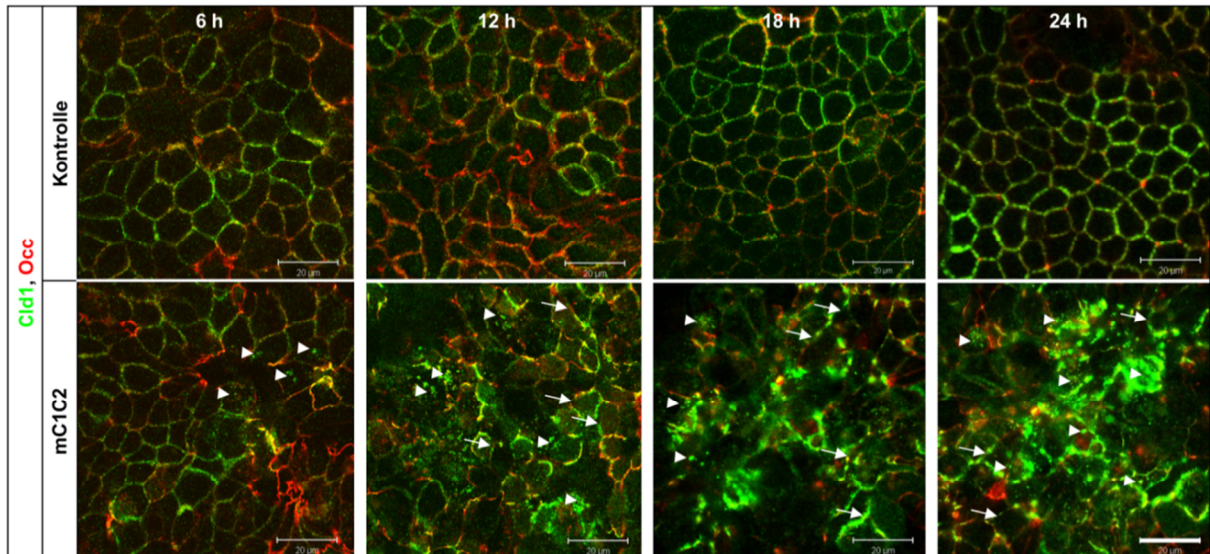
**Abb. 13 Die Umverteilung von Claudin-1 durch mC1C2 ist konzentrationsabhängig.** Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Filterkulturen, die 48 h apikal mit 30-300 µM mC1C2, 300 µM des Kontrollpeptids mC2C2 oder ohne Peptid (Kontrolle) kultiviert wurden; die Claudin-1 (Cld1, grün) und Occludin (Occ, rot) Lokalisation der mC2C2 Zellen unterschied sich nicht von der Kontrolle. mC1C2 führte konzentrationsabhängig zum Anstieg von zytosolischem Cld1 (Dreieck) und zur Verringerung der Plasmamembranlokalisierung von Cld1 (Pfeil) und Occ; Maßstab, 25 µm.

### 3.3.2.2 Die Barriereöffnung geht mit der Umverteilung von Claudin-1 einher

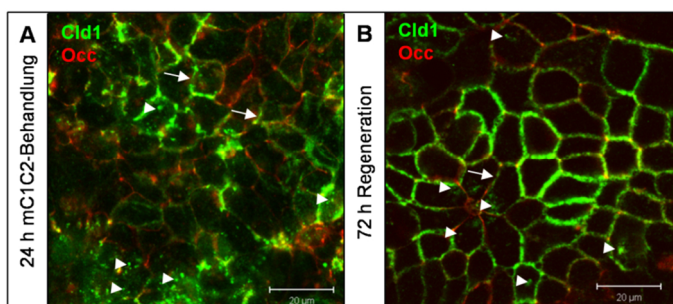
Die Inkubation mit mC1C2 führte nach 6 h zur Verringerung und ab 12 h zur signifikanten Absenkung der parazellulären Dichtigkeit von Caco-2-Zellen (3.3.1.2). Darüber hinaus zeigten Immunfluoreszenzfärbungen, dass mC1C2 die Lokalisation von Cld1 beeinflusst (3.3.2.1). Zur Beantwortung der Frage, ob die Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit zeitlich mit der Änderung der Lokalisation von Cld1 übereinstimmt, wurden Caco-2-Zellen mit 200 µM mC1C2 behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Cld1 mit Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (Abb. 14). Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14, oben) führte die mC1C2 Inkubation nach 6 h zu leichten Änderungen in der Cld1-Lokalisation: vereinzelt wiesen Zellen zytosolisches Cld1 auf (Abb. 14, unten, Dreieck). Nach 12 h mC1C2-Inkubation kam es zu einer sehr deutlichen Verringerung der Cld1-Plasmamembranlokalisierung (Pfeil) und einer starken Zunahme von zytosolischem Cld1. Die deutliche Änderung der Cld1-Lokalisation nach 12 h stimmte zeitlich mit der signifikanten Erhöhung der Durchlässigkeit der Caco-2-Zellen überein (3.3.1.2). Eine  $\geq 18$ -stündige mC1C2-Inkubation resultierte in einer sehr inhomogenen Cld1-Lokalisation in der Plasmamembran und der weiteren Zunahme von zytosoli-

schem Cld1 (Abb. 14, rechts unten). Wie Cld1 zeigte auch Occ bereits nach 18 h deutliche Verringerungen in der Plasmamembranlokalisation.

Die beschriebenen Effekte waren reversibel, da 72 h nach der Entfernung des Peptids Cld1 und Occ wieder plasmamembranständig vorlagen und kolokalisierten (Abb. 15B). Gegenüber der Verteilung von Cld1, 24 h nach mC1C2-Behandlung (Abb. 15A), konnte eine deutliche Reduktion des zytosolischen Cld1-Signals festgestellt werden (Abb. 15B).



**Abb. 14 Die mC1C2-vermittelte Umverteilung von Claudin-1 beginnt nach 6-12 h Inkubation.** Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Filterkulturen die bis zu 24 h apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 oder ohne Peptid (Kontrolle) kultiviert wurden; die Claudin-1 (Cld, grün) und Occludin (Occ, rot) Lokalisation von 6 h mC1C2-behandelten Zellen unterschied sich gegenüber der Kontrolle nur durch einen leichten Anstieg von zytosolisch lokalisiertem Cld1 (Dreieck). Ab 12 h mC1C2-Inkubation kam es zur Anreicherung von zytosolischem Cld1 sowie zur verringerten und diskontinuierlichen Cld1/Occ Plasmamembranlokalisation (Pfeil); Maßstab, 20  $\mu$ m.

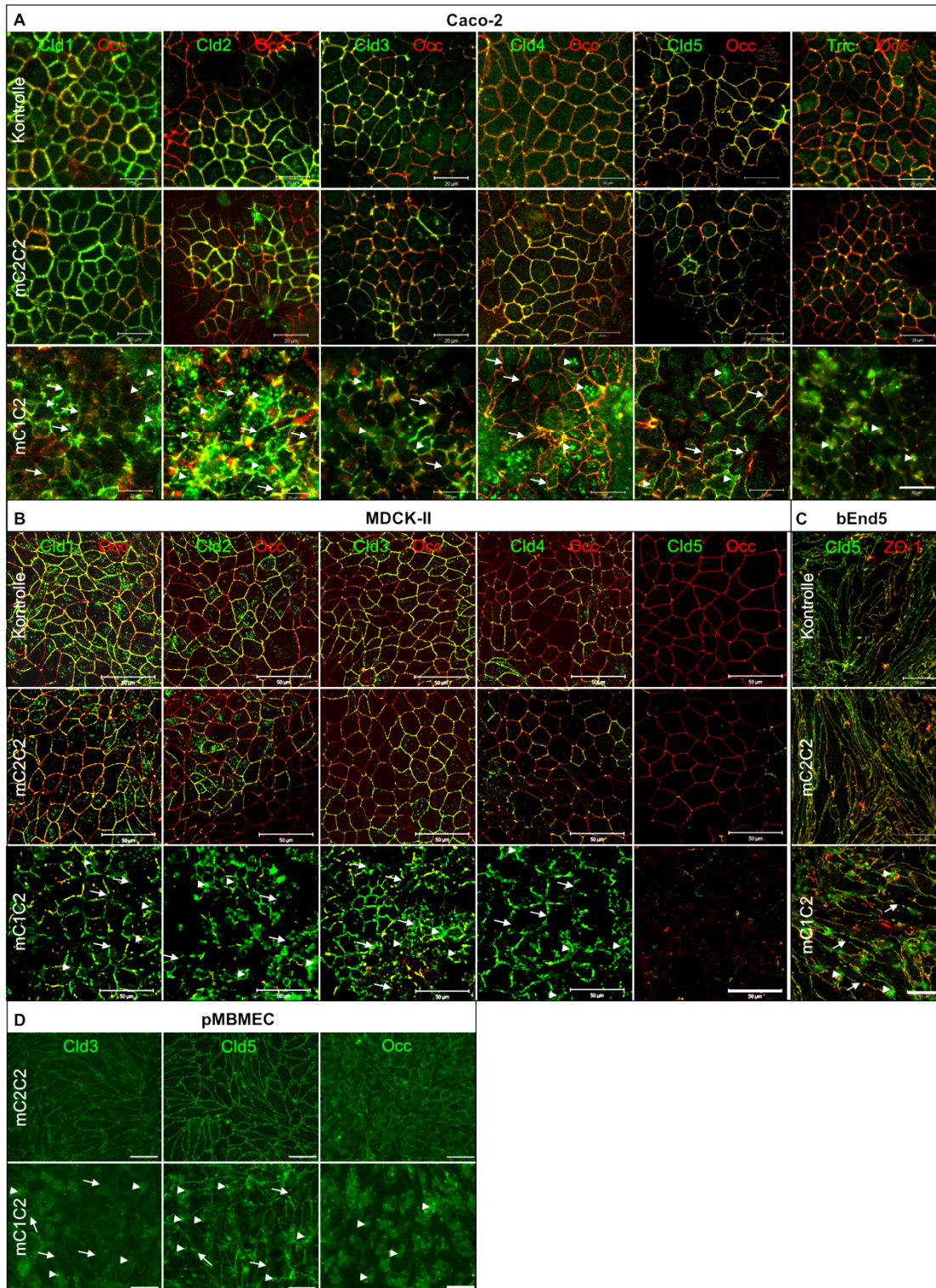


**Abb. 15 Die Umverteilung von Claudin-1 ist reversibel.** Caco-2-Filterkulturen wurden 24 h apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 inkubiert und (A) danach, oder (B) 72 h nach einem Medienwechsel (Regeneration) Claudin-1 (Cld1, grün) und Occludin (Occ, rot) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Der Anstieg von zytosolisch lokalisiertem Cld1 (Dreieck) und die verringerte Cld1-Plasmamembranlokalisation (Pfeil) waren reversibel; Maßstab, 20  $\mu$ m.

### 3.3.2.3 mC1C2 verändert die Plasmamembranlokalisation von Claudin-1 bis -5, Occludin und Tricellulin

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass mC1C2 die parazelluläre Barriere von Epithel- und Endothelzellen mit unterschiedlichem Cld-Expressionsmuster öffnet (3.3.1.2) und die Plasmamembranlokalisation von Cld1 reversibel beeinflusst (3.3.2.2). Um zu überprüfen, ob weitere Claudine durch mC1C2 moduliert werden, sind die TJ-Proteine Cld1-5 und Occ in Caco-2, MDCK-II und pMBMECs mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert worden (Abb. 16). In Caco-2-Zellen wurde zusätzlich Tric angefärbt. Für Zellen, die 24 h ohne Peptid (Kontrolle) oder mit dem Kontrollpeptid mC2C2 (200  $\mu$ M) kultiviert wurden, ergab sich ein typisches Färbemuster der Claudine (Abb. 16). Diese kolokalisierten mit dem TJ-Markerprotein Occ im apikalen Bereich der lateralen Zellmembran. Im Vergleich dazu führte die Inkubation mit 200  $\mu$ M mC1C2 zu einer deutlichen Änderung der Verteilung von Cld1-5. In Caco-2 und MDCK-II konnten verstärkt intrazelluläre Cld-Signale detektiert werden (Abb. 16A, B, unten, Dreieck). Weiterhin nahm die Homogenität des Membransignals deutlich ab (Pfeil). Wie zuvor die Caco-2-Zellen zeigten auch die MDCK-II-Zellen eine deutliche Abschwächung des Occ-Signals. Tric wurde in Caco-2-Zellen unter Kontrollbedingungen überwiegend in den Drei-Zell-Kontakten detektiert (Abb. 16A, rechts). Nach der Behandlung mit mC1C2 wiesen die Mehrzahl der Drei-Zell-Kontakte ein diffuses Tric-Signal und eine verstärkte Anreicherung von Tric im Zytosol auf (Dreieck). In pMBMECs verringerte mC1C2 die Plasmamembranlokalisation und steigerte die intrazelluläre Lokalisation von Cld3 und -5 leicht (Abb. 16D, unten) im Vergleich zu den mC2C2-behandelten Zellen (Abb. 16D, oben). Im Gegensatz dazu konnte für Occ nach mC1C2-Behandlung nahezu kein Signal in der Plasmamembran detektiert werden, wohingegen der Anteil an intrazellulärem Occ-Signal stark anstieg.

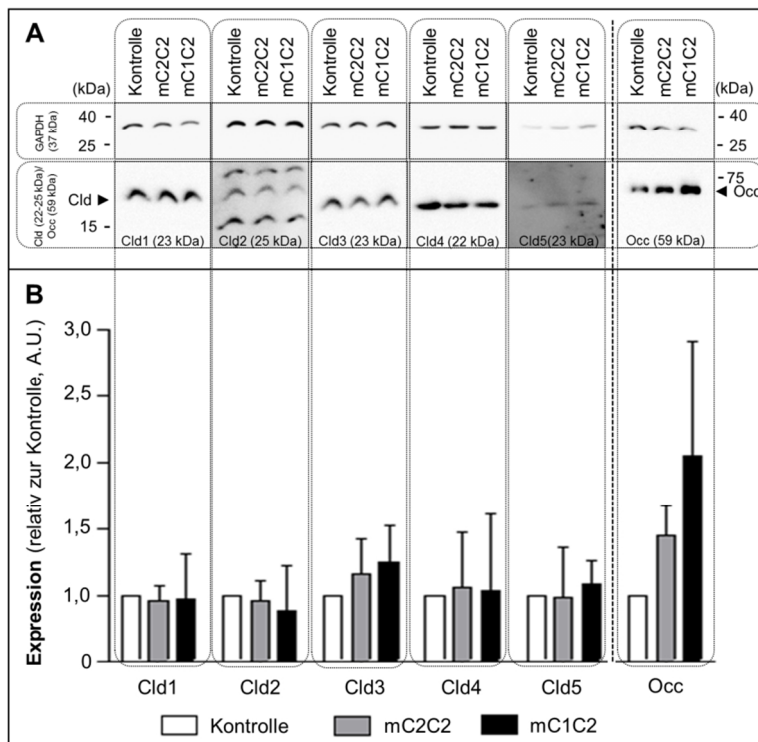
Außerdem wurde der Effekt von mC1C2 auf die Lokalisation von Cld5 und ZO-1 in der Gehirndothelzelllinie bEnd5 untersucht. bEnd5 sind wie pMBMECs ein *in vitro* Modell der Blut-Hirnschranke [160]. Auch hier bewirkte mC1C2 (Abb. 16C, unten) eine Zunahme von zytosolischem Cld5 und eine diskontinuierliche Plasmamembranverteilung von Cld5 und ZO-1 im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 16C, oben, Mitte).



**Abb. 16 Das Claudin-1-Peptid mC1C2 führt zur Umverteilung von Claudin-1 bis -5, Occludin und Tricellulin.** Immunfluoreszenzfärbungen von Filterkulturen der Epithelzellen **(A)** Caco-2, **(B)** MDCK-II und den endothelialen Blut-Hirnschranke Modellen **(C)** bEnd5 (Deckgläschen) und **(D)** pMBMEC; die Zellen wurden 24 h apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 oder 200  $\mu$ M mC2C2 (Kontrollpeptid; für pMBMECs 300  $\mu$ M) behandelt oder peptidfrei kultiviert (Kontrolle). **(A)** Im Vergleich zur Kontrolle verringerte mC1C2 die Plasmamembranlokalisation (Pfeil) und erhöhte den zytosolischen Anteil von Claudin-1 (Cld1) bis -5, Occludin (Occ) und Tricellulin (Tric) (Dreieck); mC2C2 veränderte die Lokalisation der genannten Proteine nicht; Maßstab, 20  $\mu$ m. **(B)** Die Plasmamembranlokalisation (Pfeil) von Cld1-4 wurde durch mC1C2 gestört und die Signalintensität von Occ stark verringert; mC2C2 zeigte keinen Effekt; Maßstab, 50  $\mu$ m. **(C)** mC1C2 erhöhte die zytosolischen Anteil von Cld5 und verringerte die Plasmamembranlokalisation von Cld5 und *zonula occludens protein-1* (ZO-1); Maßstab, 20  $\mu$ m. **(D)** mC1C2 verringerte die Plasmamembranlokalisation (Pfeil) von Cld3, -5 und Occ und erhöhte deren zytosolische Lokalisation (Dreieck) im Vergleich zu mC2C2; Maßstab, 50  $\mu$ m.

### 3.3.2.4 Die Expression von *tight junction*-Proteinen wird durch mC1C2 beeinflusst

Der Einfluss von mC1C2 und dem Kontrollpeptid mC2C2 auf die Expression der TJ-Proteine Cld1-5 und Occ wurde in Caco-2-Zellen mittels Western Blot untersucht (Abb. 17A). Die quantitative Analyse ergab, dass 24 h nach Administration von 200  $\mu$ M Peptid die Expression von Cld1, -2, -4 und -5 gegenüber den Zellen ohne Peptid (Kontrolle) nicht verändert war (Abb. 17B). Eine leichte Erhöhung der Expression konnte für Cld3 und eine starke für Occ detektiert werden (jedoch mit einer starken Streuung der Werte).

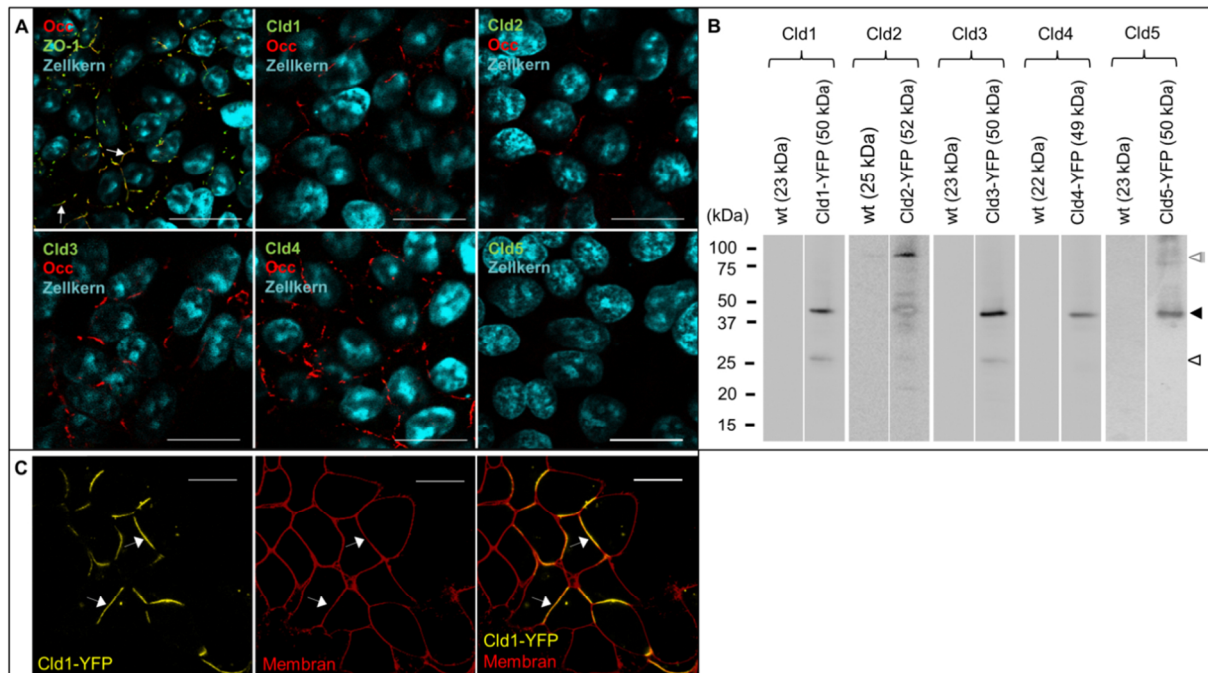


**Abb. 17 Expression von *tight junction*-Proteinen nach Peptidbehandlung.** Caco-2-Zellen wurden 24 h apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2, dem Kontrollpeptid mC2C2 oder ohne Peptid (Kontrolle) kultiviert und die Expression von Claudin-1 (Cld1, berechnetes Molekulargewicht 23 kDa), Cld2 (25 kDa), Cld3 (23 kDa), Cld4 (22 kDa), Cld5 (23 kDa), Occludin (Occ, 59 kDa) und dem Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP DH, 37 kDa) mittels (A) Western Blot bestimmt. (B) Die Bandenintensität (BI) von Cld1-5 und Occ wurde auf die BI von GAPDH normiert und relativ zur BI der Kontrolle angegeben; die Peptide erhöhten die Expression von Cld3 leicht und von Occ stark; A.U., *arbitrary unit*. n=3; Mittelwert $\pm$ SD

### 3.3.2.5 Claudin-1 und -5 werden direkt, Claudin-2 und -4 indirekt durch mC1C2 moduliert

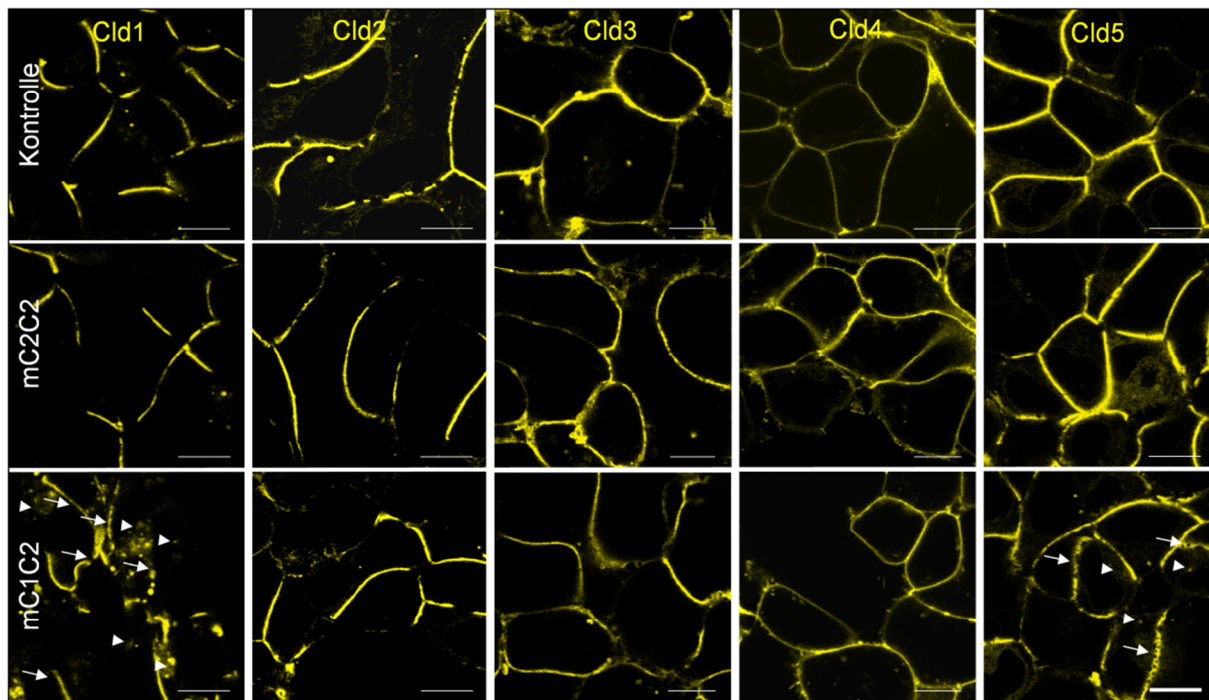
Um die mC1C2-Spezifität für einzelne Cld-Subtypen isoliert zu untersuchen, wurden Cld1-5-YFP Fusionskonstrukte stabil in HEK-293 Zellen montransfiziert. HEK-293 ist eine humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, die endogen keine Claudine exprimiert und daher auch keine TJs ausbildet [80]. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte kein endogenes Cld1-5 in untransfizierten HEK-293 Zellen (wt) nachgewiesen werden (Abb. 18A). Occ und ZO-1 wurden in den Zwei-Zell-Kontakten detektiert und zeigten dort eine diskontinuierliche Plasmamembranverteilung (Abb. 18A, links oben, Pfeil). Western Blot-Analysen bestätigten die Immunfluoreszenzfärbungen: in den wt Zellen konnte für keines der Cld1-5 ein Signal detektiert werden (Abb. 18B). Nach der Montransfektion von Cld1-5-YFP in HEK-293 Zellen sind die Fusionsproteine Cld1-5-YFP im Western Blot detektiert worden (Abb. 18B). Wie in

Abb. 18C exemplarisch durch Cld1-YFP gezeigt, kam es zur TJ-artigen Anreicherung der Cld-Fusionsproteine in den Zwei-Zell-Kontakten Cld-exprimierender Zellen.



**Abb. 18 Expression und Lokalisation von *tight junction*-Proteinen in HEK-293 Zellen.** (A) Immunfluoreszenznachweis von Claudin-1 (Cld1), -2, -3, -4, -5 (grün), Occludin (Occ, rot) und *zonula occludens protein-1* (ZO-1, grün) in untransfizierten HEK-293 (wt) Zellen; Occ und ZO-1 waren diskontinuierlich in den Zwei-Zell-Kontakten verteilt und kolokalisierten (Pfeil); für Cld1-5 wurden keine Signale detektiert; Zellkerne, Hoechst 33342 (blau); Maßstab, 20  $\mu$ m. (B) In wt Zellen konnte kein Cld1-5 (berechnetes Molekulargewicht (kDa): 23, 25, 23, 22, 23) detektiert werden; die Monotransfektion von HEK-293 Zellen mit Cld1-5-YFP (Monomer, 49-52 kDa,  $\blacktriangle$ ; Dimer, ~98 kDa,  $\triangle$ ) führte zur Expression der Fusionsproteine; YFP, 27 kDa,  $\Delta$ . (C) Lebendzellmikroskopie von Cld1-YFP transfizierten HEK-293 Zellen; Cld1-YFP (gelb) reichert sich plasmamembranständig in den Zwei-Zell-Kontakten *tight junction*-artig an (Pfeil); Membran, Trypanblau (rot); Maßstab, 20  $\mu$ m.

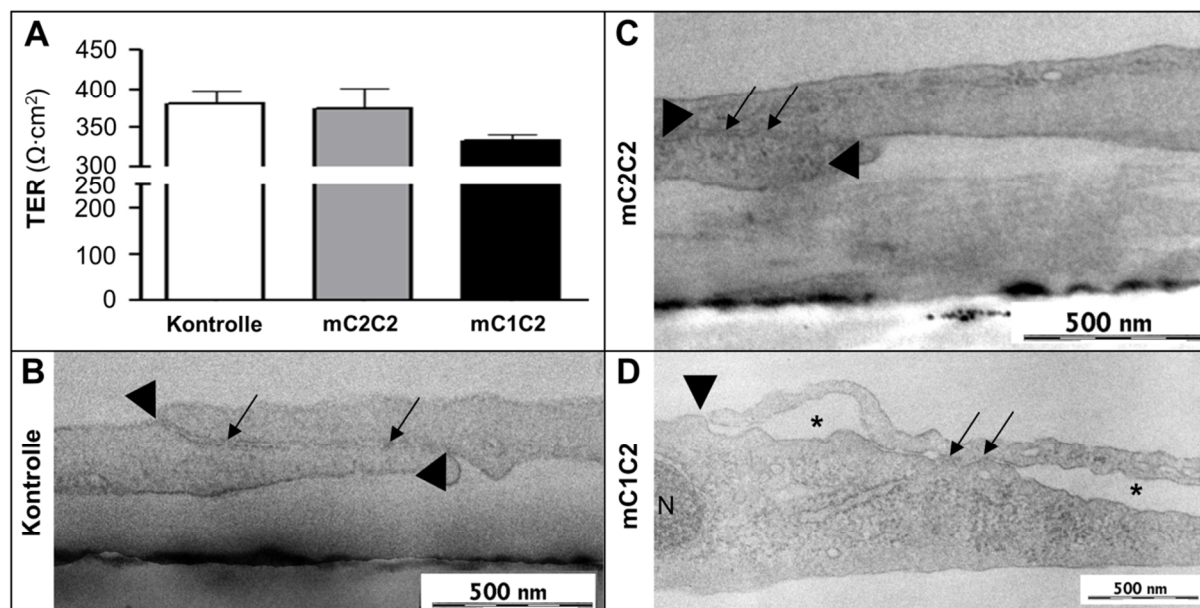
Der Einfluss von mC1C2 auf die Lokalisation der einzelnen Cld-Subtypen ist in Abb. 19 dargestellt. Zellen ohne Peptid oder mit mC2C2 wiesen ein einheitliches Bild auf (Abb. 19, oben, Mitte): Cld1-5-YFP waren in Zwei-Zell-Kontakten angereichert. Darüber hinaus wurde intrazellulär nur eine sehr geringe Fluoreszenz der Cld1-5 detektiert. Deutliche Änderungen in der Cld-Lokalisation wurden in Cld1-transfizierten Zellen nach mC1C2-Behandlung gefunden (Abb. 19, links unten). Hier erhöhte sich das intrazelluläre Cld1-YFP-Signal (Dreiecke). Gleichzeitig wurde in den Zwei-Zell-Kontakten eine sehr inhomogene Cld1-Signalverteilung detektiert (Pfeil). Das Cld5-YFP-Signal änderte sich nach mC1C2-Behandlung ebenfalls hin zu einer diskontinuierlichen Signalverteilung in den Zwei-Zell-Kontakten; jedoch weniger stark als Cld1 (Abb. 19, rechte Spalte unten, Pfeil). Für Cld2, -3 und -4-YFP konnten keine Änderungen im Cld-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 19, unten).



**Abb. 19 mC1C2 verändert die Plasmamembranlokalisation von Claudin-1 und -5 in Claudin-monotransfizierten HEK-293 Zellen.** Lebendzellmikroskopie von Claudin-1, -2-, -3-, -4- und -5-yellow fluorescent protein (Cld1-5-YFP, gelb)-monotransfizierten HEK-293 Zellen, die 24 h apikal mit 100  $\mu$ M mC1C2 (untere Reihe), dem Kontrollpeptid mC2C2 (mittlere Reihe) oder ohne Peptid kultiviert wurden (Kontrolle, obere Reihe). Unter Kontrollbedingungen waren Cld1-5-YFP in der Plasmamembran lokalisiert und in den Zwei-Zell-Kontakten angereichert. Die mC1C2-Behandlung erhöhte das intrazelluläre Cld1-YFP Signal (Dreieck) und bewirkte in den Cld1 und -5-YFP-Kontakten eine inhomogene Cld-YFP Verteilung (Pfeil); Maßstab, 10  $\mu$ m.

### 3.3.2.6 mC1C2 öffnet interzelluläre Kontakte, verändert die Morphologie der *tight junction*-Stränge von Claudinen und bindet an Claudin-1 und -5

Nachdem pRBMECs 24 h mit mC1C2 inkubiert wurden, kam es neben der Absenkung des TER (Kontrolle:  $380 \pm 17 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; mC2C2:  $374 \pm 27 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; mC1C2:  $333 \pm 8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; Abb. 20A) zur Weitung des interzellulären Raums durch Öffnung der interzellulären Kontakte (Abb. 20D). Das Kontrollpeptid mC2C2 führte zu keiner Verringerung der parazellulären Dichtigkeit und veränderte den interzellulären Kontakte nicht (Abb. 20A, C). Um den Einfluss der Peptide auf die TJs detaillierter zu untersuchen, wurden die TJ-Stränge mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie betrachtet. Abhängig vom Claudin-Subtyp sind Unterschiede in die Morphologie der TJ-Stränge detektierbar. Es lassen sich mit der protoplasmatischen Bruchebene der Membran (PF) assoziierte Strangnetzwerke und mit der extrazellulären Bruchebene der Membran (EF) assoziierte Strangnetzwerke unterscheiden. Kontinuierliche PF-assozierte Stränge sind typisch für Cld1 [45], während diskontinuierliche EF-assozierte Stränge typisch für Cld5 sind [80].

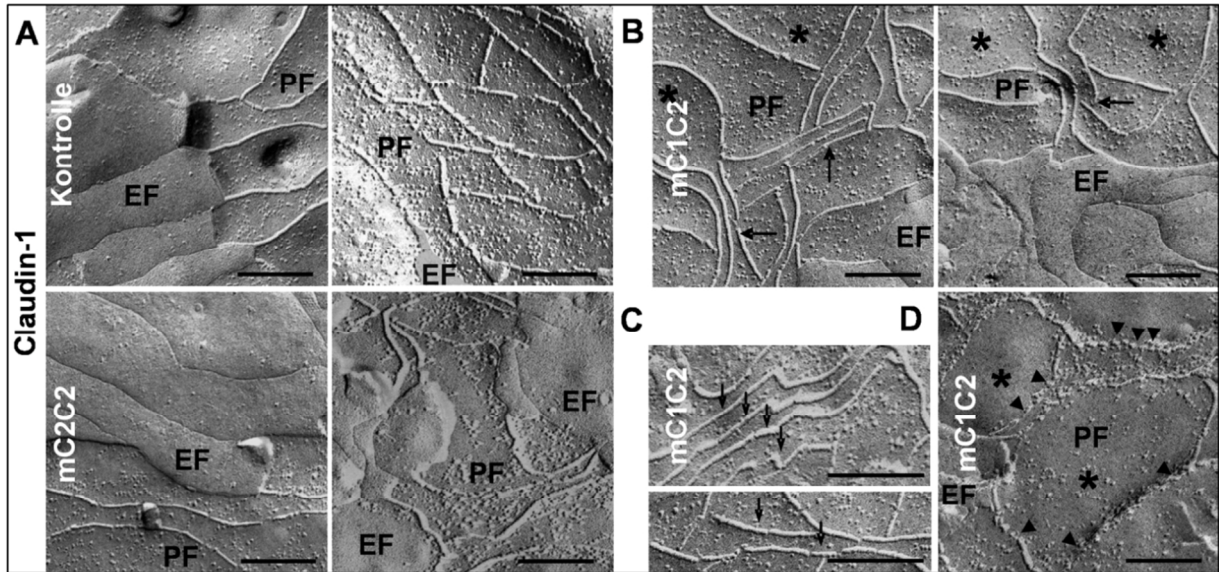


**Abb. 20** mC1C2 öffnet die interendothelialen Kontakte in primären Rattengehirnendothelzellen. Eine Ko-Kultur aus primären Rattengehirnendothelzellen (pRBMECs), Perizyten und Astrozyten wurde für 24 h apikal mit (A, D) 300  $\mu$ M mC1C2, (A, C) 300  $\mu$ M mC2C2 (Kontrollpeptid) oder (A, B) ohne Peptid kultiviert (Kontrolle). (A) Der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) wurde durch mC1C2 leicht verringert, wohingegen mC2C2 keine Änderungen gegenüber der Kontrolle bewirkte;  $n=3$ . (B-D) Untersuchung der Ultrastruktur mittels Trans-Elektronenmikroskopie; (B) peptidfrei und mit (C) mC2C2 kultivierte Zellen wiesen keine Änderungen der *tight junction* (TJ)-Kontakte ( $\downarrow$ ) auf, wohingegen (D) mC1C2 die interendothelialen TJ-Kontakte öffnet (\*);  $\blacktriangledown$ , Beginn/Ende der interendothelialen Kontakte; Maßstab, 500 nm.

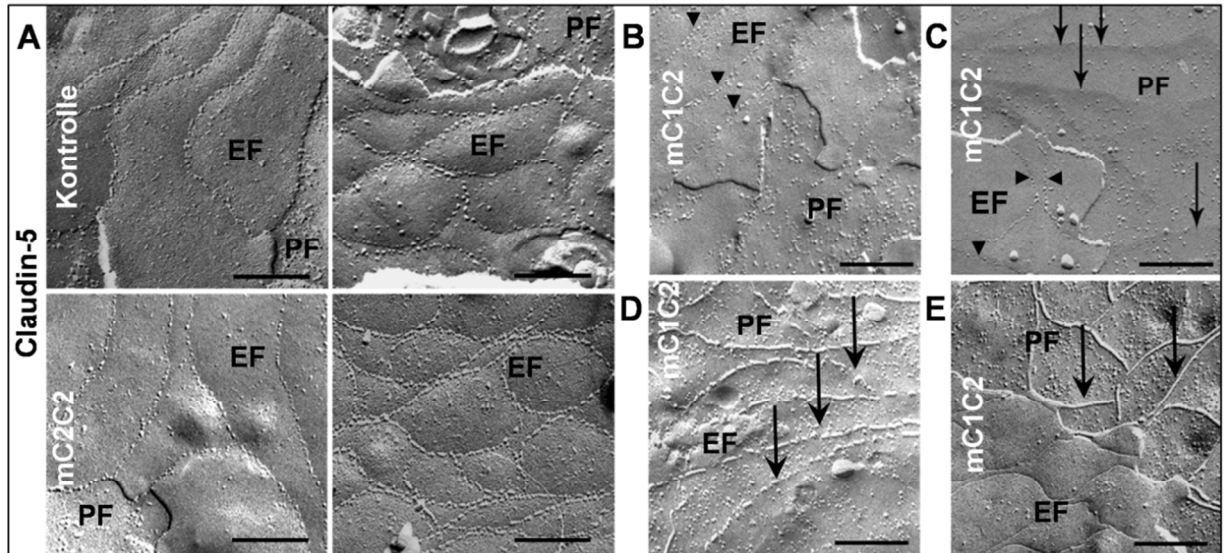
In Cld1-monotransfizierten HEK-293 wird vor allem Cld1 und in geringerem Maße Cld5 durch mC1C2, nicht jedoch durch mC2C2 beeinflusst (3.3.2.5). Der Effekt der Peptide auf die Strangmorphologie von Cld1 und Cld5 wurde daher mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie näher untersucht. Cld1-transfizierte Zellen waren nach der Inkubation mit mC2C2 (24 h, 100  $\mu$ M) oder ohne Peptid (Medium) durch ein kontinuierliches, PF-assoziiertes Strangnetzwerk charakterisiert (Abb. 21A); die EF war strangfrei. mC1C2 (100  $\mu$ M, 24 h) steigerte die Parallelität der Stränge (Abb. 21B, C, Pfeil; Abb. A50A), erhöhte die Anzahl zisternenartig geformter Maschen und deren Größe (Abb. 21B-D, Sternchen; Abb. A50B) und führte zu diskontinuierlichen Strängen (Abb. 21D, Dreieck).

Cld5 bildete unter Kontrollbedingungen (mC2C2, ohne Peptid) diskontinuierliche, kettenartige, mit der EF-assoziierte Stränge (Abb. 22A). Durch die Inkubation mit mC1C2 kam es zu drastischen Änderungen des Cld5-Strangnetzwerkes (Abb. 22B-E). Hierbei wiesen 44% der Proben eine Assoziation von Cld5 mit der EF auf, bei der die Partikeldichte deutlich reduziert war (Abb. 22B, C, Dreieck). In diesen Replikas konnten außerdem an der PF partikelfreie Auswölbungen beobachtet werden (Abb. 22C, Pfeil). In den restlichen 56% der untersuchten Replikas waren diskontinuierliche und kontinuierliche Cld5-Stränge mit der PF assoziiert (Abb. 22D, E). Abb. 22D zeigt ein Übergangsstadium mit diskontinuierlichen, mit





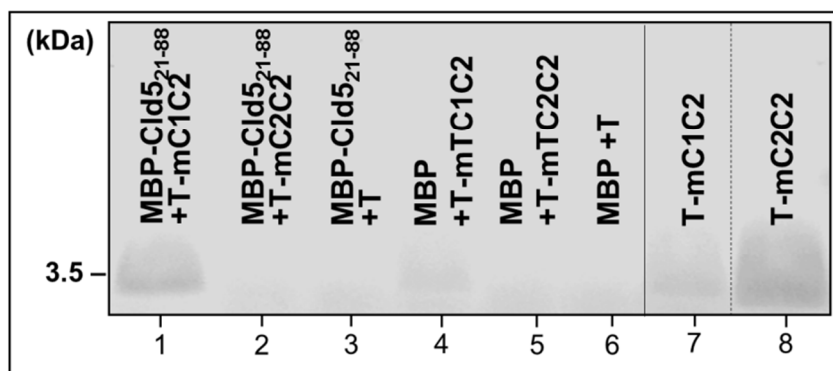
**Abb. 21** mC1C2 verringert die Kontinuität von Claudin-1-Strangnetzwerken und verändert die Größe, Parallelität und Form der Claudin-1-Maschen. Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP) transfizierte HEK-293 Zellen wurden 24 h apikal mit (B-D) 100  $\mu$ M mC1C2, (A, untere Reihe) dem Kontrollpeptid mC2C2 oder (A, obere Reihe) ohne Peptid kultiviert (Kontrolle); das Strangnetzwerk wurde mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht. (A) In den Kontroll- und mit mC2C2 inkubierten Zellen assoziierte Cld1 mit der protoplasmatischen Bruchebene der Membran (PF) und bildete kontinuierliche Stränge. (B-D) In mC1C2-behandelten Zellen wurde die Maschengröße (\*) und Parallelität (↓) der Stränge erhöht und die Kontinuität der Stränge verringert (▼). EF, extrazelluläre Bruchebene der Membran; \*, vergrößerte zisternenartige Maschen; Maßstab, 200 nm.



**Abb. 22** mC1C2 ändert die Morphologie von Claudin-5-Strangnetzwerken. Claudin-5-yellow fluorescent protein (Cld5-YFP) transfizierte HEK-293 Zellen wurden 24 h apikal mit (B-E) 100  $\mu$ M mC1C2, (A, untere Reihe) dem Kontrollpeptid mC2C2 oder (A, obere Reihe) ohne Peptid kultiviert (Kontrolle); das Strangnetzwerk wurde mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie dargestellt. (A) In den Kontroll- und mit mC2C2 inkubierten Zellen assoziierte Cld5 mit der extrazellulären Bruchebene der Membran (EF) und bildete diskontinuierliche Stränge. Die mC1C2-Behandlung führte zur Bildung von (E) kontinuierlichen, mit der protoplasmatischen Bruchebene der Membran (PF) assoziierten Strängen (↓) und (B-D) Strängen im Übergangszustand, die eine abgeschwächte Partikeldichte auf der EF (▼) oder (D) PF (↓) und (C) schwache Furchen auf der PF (↓) zeigten; Maßstab, 200 nm.

der PF-assoziierten Cld5-Strängen. In Abb. 22E sind kontinuierliche, mit der PF-assoziierte Cld5-Stränge gezeigt. Diese sind eigentlich charakteristisch für Cld1-basierte, nicht aber für Cld5-basierte Strangnetzwerke.

Die Untersuchungen zur Wirkung von mC1C2 auf die Cld-Subtypen 1-5 haben gezeigt, dass vor allem Cld1, aber auch Cld5, direkt durch mC1C2 beeinflusst werden. Dabrowski et al. konnte die Bindung von mC1C2 an die ESZ1 von Cld1 zeigen [83]. Inwieweit eine unmittelbare Interaktion zwischen mC1C2 und Cld5 erfolgt, wurde mittels Kopräzipitation untersucht (Abb. 23). Hierfür wurde die rekombinant hergestellte EZS1 von Cld5 (MBP-Cld5<sub>21-88</sub>) mit TAMRA-mC1C2, TAMRA-mC2C2 und TAMRA inkubiert. Eine starke Assoziation konnte zwischen TAMRA-mC1C2 und MBP-Cld5<sub>21-88</sub> detektiert werden (Abb. 23, 1. Spur). Die Bindung von TAMRA-mC1C2 an MBP (Abb. 23, 4. Spur) war gering. TAMRA-mC2C2 und TAMRA zeigten nahezu keine Bindung an MBP-Cld5<sub>21-88</sub> (Abb. 23, 2. und 3. Spur) und MBP (Abb. 23, 5. Spur).

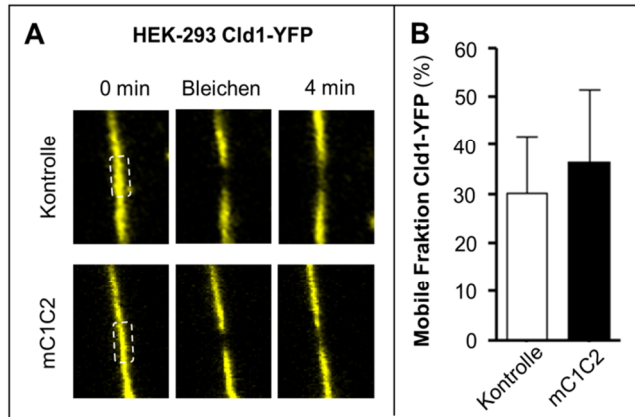


**Abb. 23 mC1C2 bindet an die erste extrazelluläre Schleife von Claudin-5.** Ein Fusionsprotein der ersten extrazellulären Schleife von Cld5 (Aminosäureposition 21-88) mit dem Maltose-Binde-Protein (MBP-Cld5<sub>21-88</sub>) oder MBP allein wurden mit 10  $\mu$ M 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiertem mC1C2 (T-mC1C2; 3,5 kDa) oder T-mC2C2 (3,4 kDa) inkubiert, gewaschen und auf einer 20% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Peptide erfolgte über die TAMRA-Fluoreszenz; Kontrollen: 0,35  $\mu$ g T-mC1C2 (7. Spur) und T-mC2C2 (8. Spur). T-mC1C2 zeigte eine starke Bindung an MBP-Cld5<sub>21-88</sub> (1. Spur) und nur eine sehr schwache Assoziation an MBP (4. Spur).

### 3.3.2.7 Die Plasmamembranmobilität von Claudin-1 wird in den ersten 5 h nach mC1C2-Administration nicht erhöht

Das Peptid mC1C2 beeinflusst die Cld1 und -5-Strangmorphologie (3.3.2.6) und deren Plasmamembranlokalisation (3.3.2.5). Inwieweit erhöht mC1C2 dabei auch die Mobilität der Cld-Moleküle in der Plasmamembran? HEK-293 Cld1-YFP Zellen wurden mit 100  $\mu$ M mC1C2 inkubiert und die Cld1-Plasmamembranmobilität mittels FRAP untersucht (Abb. 24A). Da für die Messungen eine kontinuierliche Plasmamembrananreicherung von Cld1 notwendig war, wurde das Peptid nur für 5 h auf die Zellen gegeben. Nach mC1C2-Behandlung der Zellen

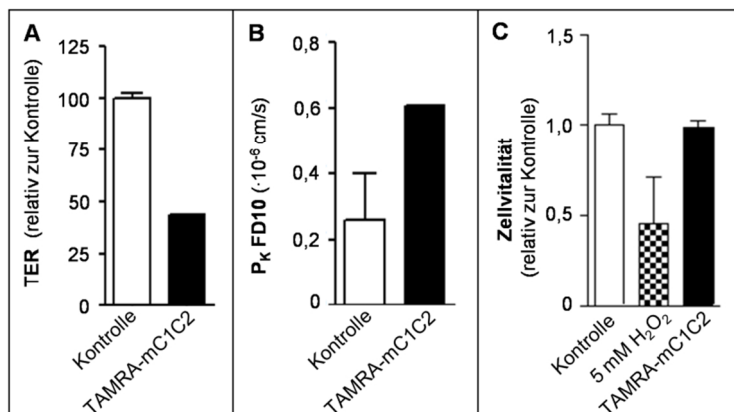
ergab die Quantifizierung eine mobile Cld1-YFP-Fraktion von  $36,6 \pm 14,7\%$  (Abb. 24B). Diese lag leicht nur unwesentlich über der mobilen Cld1-YFP-Fraktion der Kontrolle (ohne Peptid kultiviert,  $30,3 \pm 11,5\%$ ).



**Abb. 24 mC1C2 erhöht nicht die Plasmamembranmobilität von Claudin-1 in den ersten 5 h nach der Applikation.** (A) Lebendzellmikroskopie Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP, gelb)-transfizierter HEK-293-Zellen, die 5 h mit  $100 \mu\text{M}$  mC1C2 oder ohne Peptid (Kontrolle) inkubiert wurden und Bestimmung der mobilen Plasmamembranfraktion von Cld1-YFP. In einem definierten Bereich im Zell-Zell-Kontakt (0 min, ---) wurde YFP ausgebleicht und die erneute Zunahme der YFP-Fluoreszenz mittels *fluorescence recovery after photo bleaching* bestimmt. (B) Quantifizierung der mobilen Cld1-YFP Fraktion;  $n \geq 11$ ; Mittelwert  $\pm$  SD.

### 3.3.3 Zelluläre mC1C2-Lokalisation und Wirkmechanismus

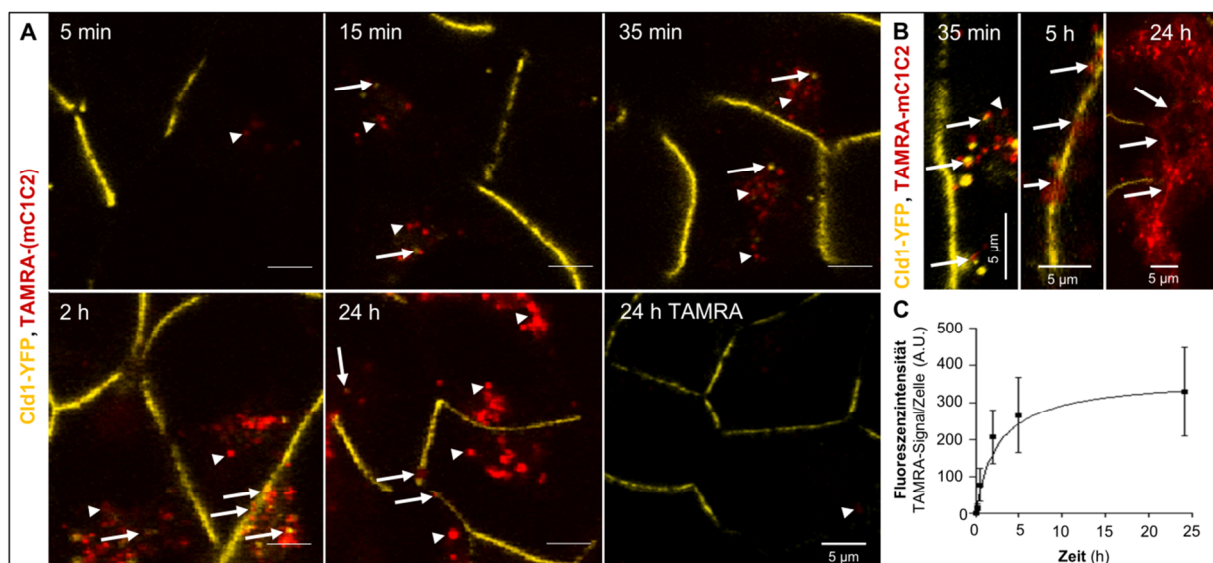
Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation und des Wirkmechanismus von mC1C2 wurde TAMRA markiertes mC1C2 verwendet. Orientierende Versuche bestätigten, dass die barriereöffnende Wirkung von mC1C2 durch die Markierung nicht beeinträchtigt war (Abb. 25): die 24-stündige apikale Inkubation von Caco-2 Zellen mit  $200 \mu\text{M}$  TAMRA-mC1C2 resultierte in einer Verringerung des TER um 57% gegenüber der Kontrolle (Abb. 25A) und einer Erhöhung der parazellulären FD10-Durchlässigkeit von  $0,25 \pm 0,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  auf  $0,61 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$  (Abb. 25B). TAMRA-mC1C2 zeigte auch keine zytotoxische Wirkung (Abb. 25C).



**Abb. 25 5,6-Carboxytetramethylrhodamin beeinflusst die mC1C2-Wirkung nicht.** Caco-2-Zellen wurden apikal für 24 h mit  $200 \mu\text{M}$  5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 behandelt. (A) TAMRA-mC1C2 reduzierte den transzellulären elektrischen Widerstand (TER),  $n \geq 2$ , (B) erhöht den Permeationskoeffizienten ( $P_K$ ) von Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10) im Vergleich zu Zellen ohne Peptid (Kontrolle),  $n \geq 2$ , und ist (C) nicht zytotoxisch;  $\text{H}_2\text{O}_2$  (24 h), Positivkontrolle;  $n \geq 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SD.

### 3.3.3.1 mC1C2 endozytiert zeitabhängig, zusammen mit Claudin-1 oder allein

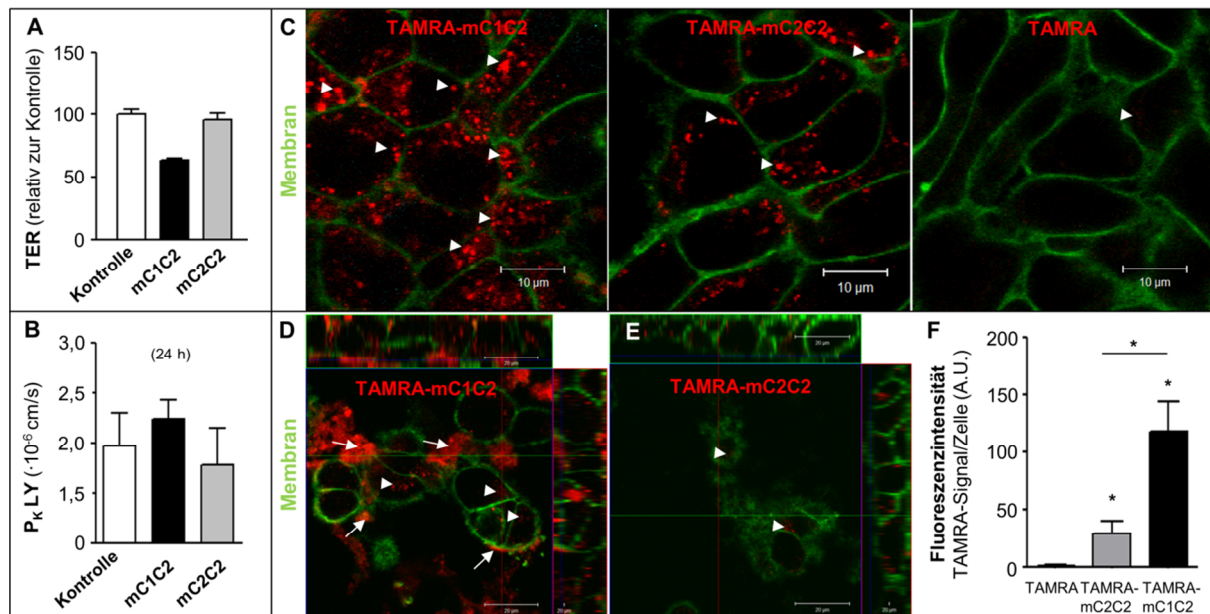
Nach Inkubation von HEK-293 Cld1-YFP-Zellen mit TAMRA-mC1C2 (40  $\mu$ M) kam es zur zellulären Anreicherung des Peptids. Parallel zur intrazellulären Anreicherung von TAMRA-mC1C2 allein (Abb. 26A, B, Dreieck), wurde die Kolokalisation von TAMRA-mC1C2 mit Cld1 im Zytosol und an der Plasmamembran (Abb. 26A, B, Pfeil) beobachtet. Nach 24 h Inkubation war darüber hinaus eine starke Anreicherung des Peptids an der apikalen Zelloberfläche und den Zellkontakten erkennbar (Abb. 26B, Pfeil). Erste intrazelluläre Peptidsignale waren nach 5 min detektierbar (Abb. 26A, links oben, Dreieck). Die Quantifizierung der Peptidanreicherung ergaben nach 15 min  $15,4 \pm 8,6$  Fluoreszenzsignale/Zelle, nach 35 min  $76,2 \pm 45,0$ , nach 2 h  $206,3 \pm 72,5$  und nach 5 h  $265,0 \pm 100,8$  Signale/Zelle (Abb. 26C). Nach 24 h wurden  $328,8 \pm 119,0$  Signale/Zelle registriert. Eine Sättigung der Anreicherung von TAMRA-mC1C2 fand ab 6 h nach Peptidapplikation statt. TAMRA allein reicherte sich nicht in den Zellen an (Abb. 26A, rechts unten).



**Abb. 26** mC1C2 reichert sich zeitabhängig, zusammen mit Claudin-1 oder allein, intrazellulär und plasmamembranständig in Claudin-1-transfizierten Zellen an. (A, B) Lebendzellmikroskopie von Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP, gelb)-transfizierten HEK-293-Zellen, die bis zu 24 h apikal mit 40  $\mu$ M 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) oder TAMRA inkubiert wurden; zeitabhängige intrazelluläre Anreicherung von TAMRA-mC1C2 (Dreieck) und Kolokalisation mit Cld1-YFP (Pfeil); TAMRA reicherte sich nicht an; Maßstab, 5  $\mu$ m. (C) Quantifizierung der Peptidanreicherung auf Basis der TAMRA-Fluoreszenzsignale/Zelle; A.U., arbitrary unit; analysierte Zellzahl,  $n \geq 119$ ; Mittelwert  $\pm$  SD.

Die zelluläre Lokalisation von TAMRA-mC1C2 in Caco-2-Zellen war nicht zufriedenstellend zu untersuchen, da TAMRA sehr stark unspezifisch mit der Caco-2-Plasmamembran assoziierte (Abb. A51). Um dennoch den Verbleib des Peptids in Zellen mit endogener Claudinexpression zu untersuchen, wurden HT29/B6-Zellen verwendet. Die Wirkung von mC1C2 und mC2C2 auf die parazelluläre Dichtigkeit wurde in orientierenden Experimenten bestätigt

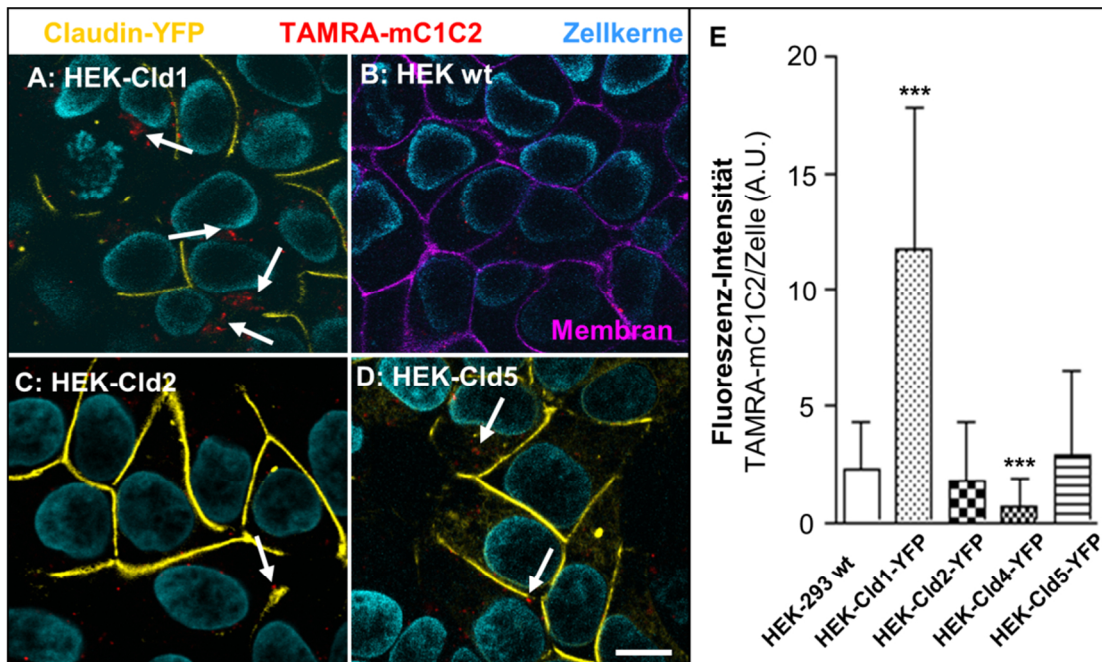
(Abb. 27). 24 h nach Applikation von 200  $\mu\text{M}$  Peptid war der TER um  $36\pm 1,6\%$  gegenüber peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) abgesenkt (Abb. 27A). mC2C2 inkubierte Zellen wiesen eine sehr leichte Absenkung von  $4\pm 0,5\%$  gegenüber der Kontrolle auf. Permeationsmessungen (Abb. 27B) mit LY ergaben eine nur leicht gesteigerte LY-Durchlässigkeit nach mC1C2-Behandlung ( $2,2\pm 0,3\cdot 10^{-6}$  cm/s) gegenüber der Kontrolle ( $1,9\pm 0,5\cdot 10^{-6}$  cm/s), wohingegen mC2C2 ( $1,8\pm 0,6\cdot 10^{-6}$  cm/s) eine leichte Verringerung der LY-Durchlässigkeit bewirkte. Wie bei HEK-293 Cld1-YFP-Zellen war mC1C2 (40  $\mu\text{M}$ ) nach 24 h Inkubation intrazellulär, vesikelartig (Abb. 27C, links, Dreieck) angereichert und an der lateralen und apikalen Plasmamembran detektierbar (Abb. 27D, Pfeil). Das Kontrollpeptid mC2C2 wies eine deutlich geringere intrazelluläre Anreicherung auf (Abb. 27C, Mitte). Signale in den lateralen oder apikalen Bereichen der Zellen, wie bei mC1C2, konnte bei mC2C2 nicht beobachtet werden (Abb. 27E). Die Markierung TAMRA war nach 24 h Inkubation nahezu nicht detektierbar (Abb. 27C, rechts). Die Quantifizierung der Peptidaufnahme nach 24 h Inkubation ergab eine signifikant höhere Anreicherung von TAMRA-mC1C2 ( $118,4\pm 29,4$  Signal/Zelle) im Vergleich zu TAMRA-mC2C2 ( $28,3\pm 11,4$ ) und TAMRA allein ( $0,8\pm 0,6$ ), (Abb. 27F).



**Abb. 27 mC1C2 reichert sich in Zellen mit endogener Claudinexpression intrazellulär und membranständig an.** Die Inkubation von HT29/B6-Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  mC1C2 für 24 h verringert den (A) transzellulären elektrischen Widerstand (TER),  $n\geq 3$ , und erhöht den (B) Permeationskoeffizienten ( $P_{\kappa}$ ) von *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa) im Vergleich zu Zellen, die ohne Peptid (Kontrolle) oder mit dem Kontrollpeptid mC2C2 inkubiert wurden,  $n=3$ . (C-E) Lebendzellmikroskopie von HT29/B6-Zellen, die 24 h mit 40  $\mu\text{M}$  5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2, TAMRA-mC2C2 oder TAMRA (rot) inkubiert wurden; (C, links) TAMRA-mC1C2 reichte sich stark intrazellulär (Dreieck) und (D) membranständig (Pfeil) an; (C, Mitte) TAMRA-mC2C2 zeigte eine schwächere intrazelluläre Anreicherung und (E) keine Bindung an die Plasmamembran; (C, rechts) TAMRA allein reichte sich nicht in den Zellen an; Membran, 5-Hexadecanoylamino fluorescein (grün). (F) Die Quantifizierung der Peptidanreicherung auf Basis der TAMRA-Fluoreszenz/Zelle ergab eine signifikant stärkere Anreicherung des TAMRA-mC1C2 Peptids im Vergleich zum Kontrollpeptid mC2C2 und TAMRA; A.U., arbitrary unit; analysierte Zellzahl,  $n\geq 160$ ; Mittelwert $\pm$ SD; Mann-Whitney U Test; \*,  $p\leq 0,05$ .

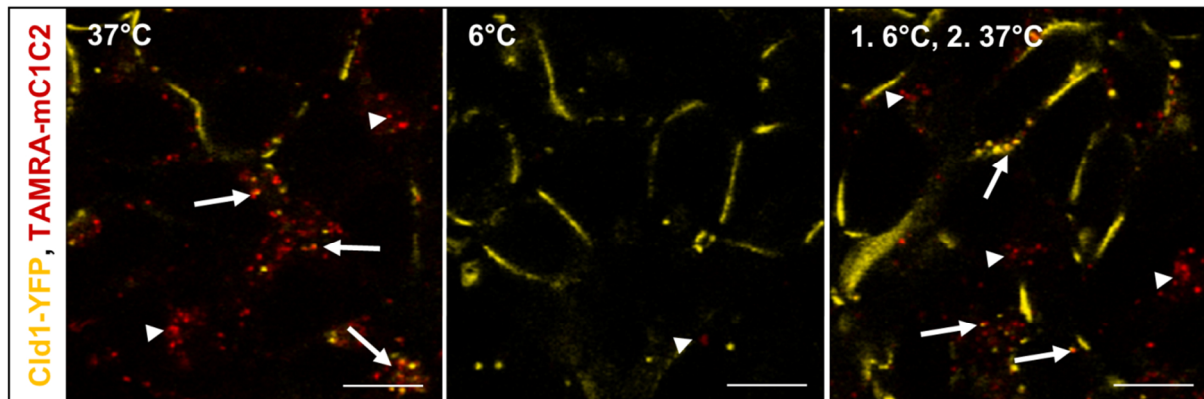
### 3.3.3.2 Clathrin- und Claudin-1-vermittelte Endozytose von mC1C2

Inwieweit die Expression eines bestimmten Claudins Einfluss auf die mC1C2-Aufnahme hat, wurde mittels Cld1, -2, -4 oder -5-YFP-monotransfizierten HEK-293-Zellen untersucht (Abb. 28). Hierbei konnte gezeigt werden, dass das TAMRA-mC1C2 verstärkt in Gegenwart von Cld1-YFP aufgenommen wird ( $11,7 \pm 6,1$  Signale/Zelle; Abb. 28A, E). Die Anreicherung von TAMRA-mC1C2 in Cld2-YFP ( $1,8 \pm 2,4$  Signale/Zelle) oder Cld5-YFP ( $2,9 \pm 3,5$  Signale/Zelle) Zellen lag im Bereich von untransfizierten HEK-293 Zellen ( $2,3 \pm 1,9$  Signale/Zelle; Abb. 28B-F). Cld4-transfizierte Zellen zeigten eine signifikant geringe Anreicherung von TAMRA-mC1C2 ( $0,6 \pm 1,2$  Signale/Zelle) im Vergleich zu untransfizierten HEK-293-Zellen (Abb. 28E).



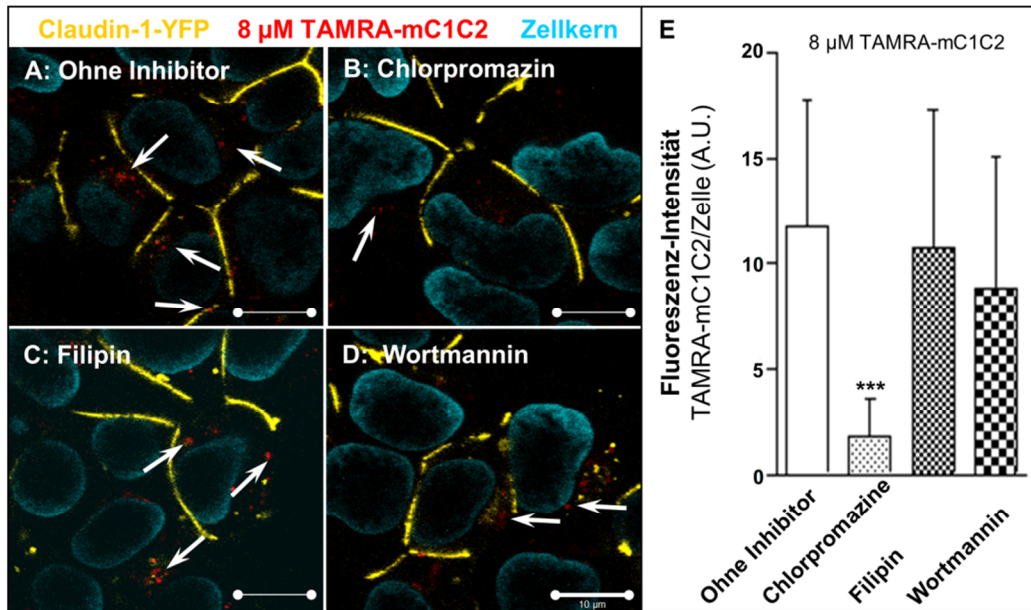
**Abb. 28 Die Internalisierung von mC1C2 findet verstärkt in Gegenwart von Claudin-1 statt.** (A-D) Lebendzellmikroskopie von HEK-293-Zellen, die nach Monotransfektion von (A) Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP, gelb), (C) Cld2-YFP, (D) Cld5-YFP oder (B) untransfiziert (wt), für 60 min mit  $8 \mu\text{M}$  5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) inkubiert wurden; Zellkerne, Hoechst 33342 (blau); Membran, 5-Hexadecanoylamino fluorescein (magenta); Maßstab,  $10 \mu\text{m}$ . (E) Die Quantifizierung des Peptidsignals mittels TAMRA-Fluoreszenz ergab eine signifikant erhöhte TAMRA-mC1C2 Anreicherung in Cld1-YFP- und eine signifikant geringere Anreicherung in Cld4-YFP-Zellen gegenüber wt; A.U., arbitrary unit; analysierte Bilder,  $n \geq 20$ ; analysierte Zellzahl,  $n \geq 468$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

Zur genaueren Charakterisierung des Aufnahmemechanismus wurde in einem orientierenden Versuch überprüft, inwieweit eine Aufnahme von TAMRA-mC1C2 in HEK-293 Cld1-YFP Zellen bei  $6^\circ\text{C}$  erfolgt. Die Peptidinkubation bei  $6^\circ\text{C}$  führte zur drastischen Verringerung der Anreicherung des Peptids in den Zellen (Abb. 29B). Die weitere Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  (Abb. 29C) zeigte, dass die Aufnahme des Peptids durch die Erhöhung der Temperatur erneut stattfinden konnte.

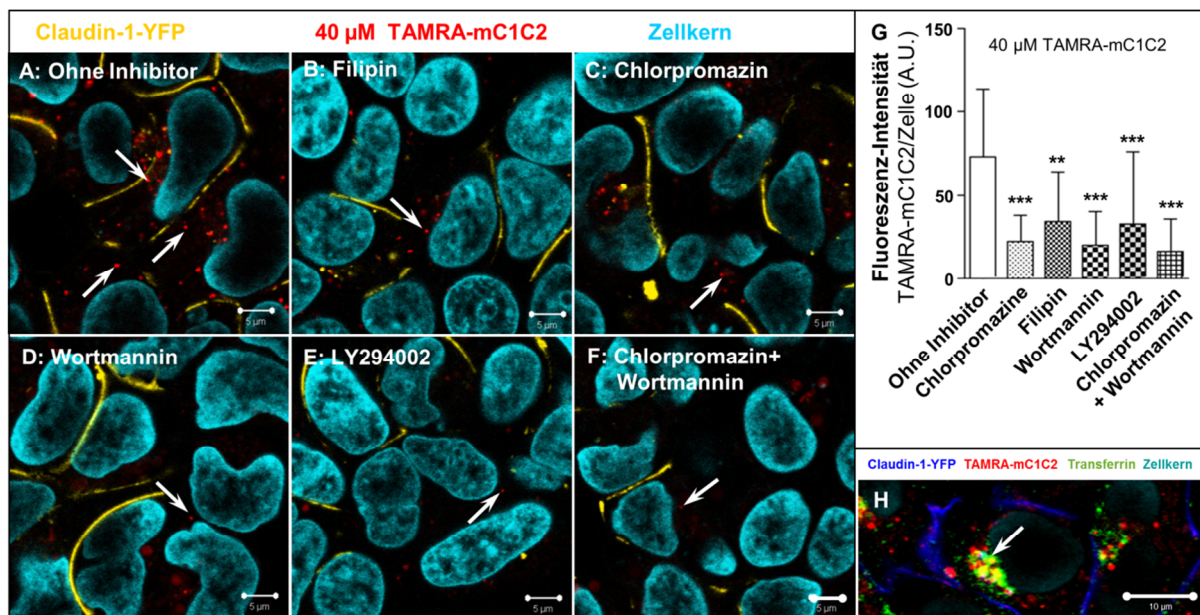


**Abb. 29 Die zelluläre Aufnahme von mC1C2 ist temperatursensitiv.** Lebendzellmikroskopie Claudin-1-*yellow fluorescent protein* (Cld1-YFP, gelb) transfizierter HEK-293-Zellen, die (A) für 35 min bei 37 °C, (B) für 35 min bei 6 °C oder (C) für 35 min bei 6 °C und dann weitere 35 min bei 37 °C mit 40 µM 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) inkubiert wurden; bei 6 °C war die intrazelluläre Anreicherung (Dreieck) und Kolokalisation (Pfeil) von TAMRA-mC1C2 mit Cld1-YFP stark verringert; Maßstab, 10 µm.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss verschiedener Endozytoseinhibitoren auf die mC1C2-Aufnahme in HEK-293 Cld1-YFP bestimmt: Chlorpromazin (Clathrin-vermittelte Endozytose), Filipin III (Caveolae-vermittelte Endozytose), Wortmannin und LY294002 (Makropinozytose) [143, 151, 168]. Der Einfluss der Endozytoseinhibitoren auf die TAMRA-mC1C2 Aufnahme unterschied sich in Abhängigkeit von der verwendeten Peptidkonzentration. Wurden die Zellen mit 8 µM TAMRA-mC1C2 inkubiert (11,7±6,1 Signale/Zelle; Abb. 30A, E), konnte durch die Verwendung von Chlorpromazin (1,7±1,8 Signale/Zelle) eine signifikante Verringerung der Peptidanreicherung erzielt werden (Abb. 30B, E). Filipin III (10,8±6,5 Signale/Zelle) und Wortmannin (8,8±6,2 Signale/Zelle) beeinflussten die Endozytose des Peptids nicht signifikant (Abb. 30C-E). Bei der Behandlung mit 40 µM TAMRA-mC1C2 (Abb. 31A, G) kam es neben der Clathrin-vermittelten Endozytose zur verstärkten Peptidaufnahme durch Makropinozytose. So konnte die Aufnahme des Peptids in HEK-293 Cld1-YFP-Zellen signifikant reduziert werden, wenn diese mit Chlorpromazin oder Wortmannin bzw. LY294002 vorbehandelt wurden (Abb. 31C-E, G). Die gemeinsame Blockierung der Clathrin-vermittelten Endozytose und Makropinozytose (Chlorpromazin+Wortmannin; Abb. 31F, G) führte zur stärksten Aufnahmehemmung des Peptids. Darüber hinaus führte auch Filipin III zur Reduktion der TAMRA-mC1C2 Aufnahme (Abb. 31G). Zur Bestätigung der Clathrin-abhängigen Internalisierung wurde die Kolokalisation von TAMRA-mC1C2 und Transferrin, das als Marker für die Clathrin-vermittelte Endozytose gilt, überprüft [168]. TAMRA-mC1C2 und Transferrin kolokalisierten intrazellulär, lagen aber auch isoliert in der Zelle vor.



**Abb. 30** mC1C2 wird spezifisch über die Clathrin-vermittelte Endozytose, zusammen mit Claudin-1, aufgenommen. (A-D) Lebendzellmikroskopie von Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP, gelb)-transfizierten HEK-293-Zellen, die für 60 min mit 8  $\mu$ M 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) inkubiert wurden, nachdem sie (A) ohne oder (B-D) 30 min mit (B) 15  $\mu$ M Chlorpromazin, (C) 1,5  $\mu$ M Filipin III oder (D) 250 nM Wortmannin vorbehandelt wurden; intrazelluläres TAMRA-mC1C2, Pfeil; Zellkerne, Hoechst 33342 (blau); Maßstab, 10  $\mu$ m. (E) Quantifizierung der Peptidanreicherung auf Basis der TAMRA-Fluoreszenz im Vergleich zu Zellen ohne Inhibitor; A.U., arbitrary unit; analysierte Bilder,  $n \geq 16$ ; analysierte Zellzahl,  $n \geq 445$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

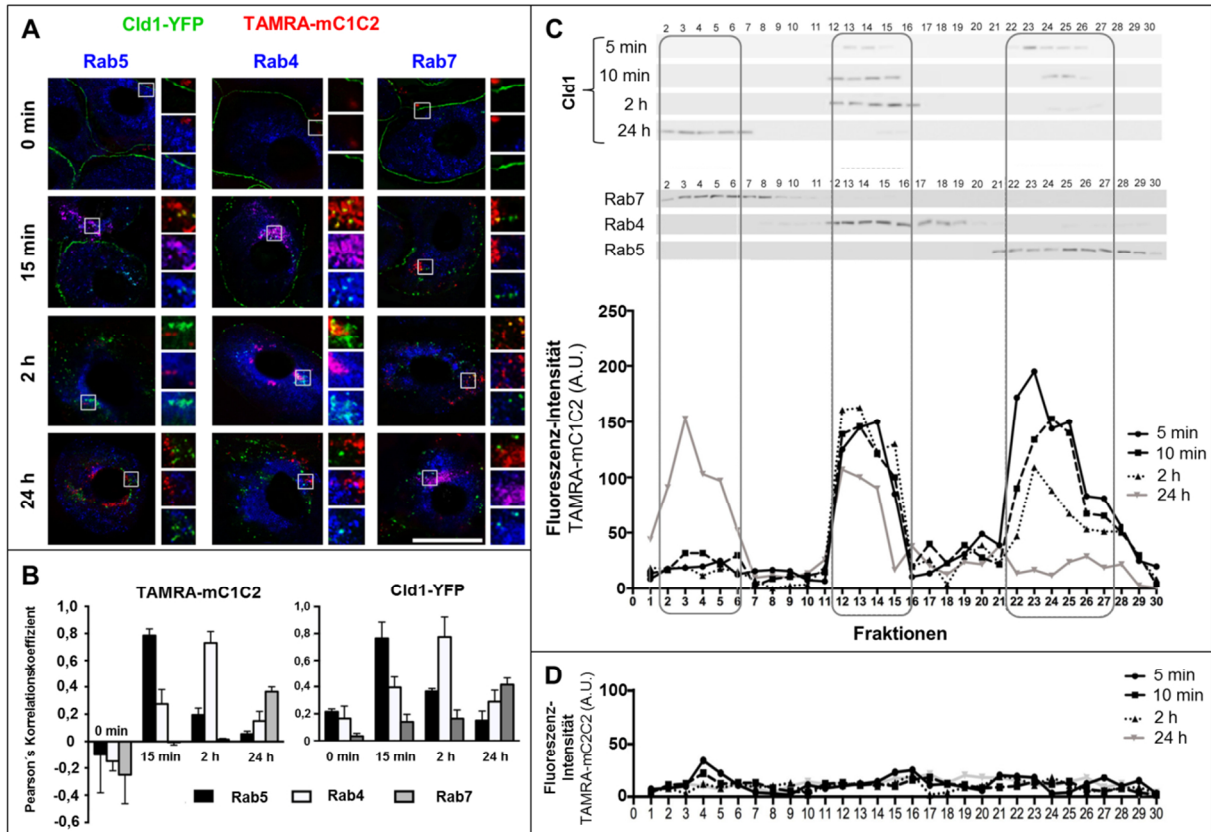


**Abb. 31** In höheren Konzentrationen wird mC1C2 vor allem über die Clathrin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose aufgenommen. (A-F, H) Lebendzellmikroskopie von Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP, gelb)-transfizierten HEK-293-Zellen, die für 35 min mit 40  $\mu$ M 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) inkubiert wurden. Zuvor wurden (A) ohne oder 30 min mit (B) 1,5  $\mu$ M Filipin III, (C) 30 min mit 15  $\mu$ M Chlorpromazin, (D) 60 min mit 250 nM Wortmannin bzw. (E) 100  $\mu$ M LY294002 oder (F) 30 min mit Chlorpromazin+Wortmannin vorbehandelt; intrazelluläres TAMRA-mC1C2, Pfeil; Zellkerne, Hoechst 33342 (blau); Maßstab, 5  $\mu$ m. (G) Quantifizierung der Peptidanreicherung auf Basis der TAMRA-Fluoreszenz im Vergleich zu Zellen ohne Inhibitor; A.U., arbitrary unit; analysierte Bilder,  $n \geq 15$ , analysierte Zellzahl,  $n \geq 365$ , Mittelwert  $\pm$  SD, Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . (H) Kolokalisation (gelb) zwischen TAMRA-mC1C2 (rot) und Transferrin (grün, Marker für die Clathrin-vermittelte Endozytose); Zellkern, Hoechst 33342, hellgrün; Cld1-YFP, blau; Maßstab, 10  $\mu$ m.



### 3.3.3.3 Endozytiertes mC1C2 gelangt in Rezyklosomen und reduziert die Claudinexpression

Der Verbleib der endozytierten Peptide mC1C2 und mC2C2 wurde in HEK-293 Cld1-YFP-Zellen analysiert [88]. Als Marker für frühe Endosomen diente Rab5 [147], für Rezyklosomen Rab4 [148] und für späte Endosomen Rab7 [149].



**Abb. 32** Nach der Aufnahme in die Zellen verbleibt mC1C2  $\geq$  2 h in Rezyklosomen, bewirkt die Internalisierung und den Abbau von Claudin-1. (A) Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP, grün)-transfizierten HEK-293-Zellen, die mit 8  $\mu$ M 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) inkubiert wurden; Kolokalisation des Peptids mit frühen Endosomen (Rab5, blau, linke Spalte), Rezyklosomen (Rab4, blau, mittlere Spalte) oder Lysosomen (Rab7, blau, rechte Spalte); Kolokalisation zwischen: TAMRA-mC1C2/Rab, magenta; TAMRA-mC1C2/Cld1-YFP, gelb; Cld1-YFP/Rab, cyan; Trilokalisation zwischen Cld1-YFP/TAMRA-mC1C2/Rab, weiß; Maßstab, 25  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der zeitabhängigen Kolokalisation zwischen Rab/TAMRA-mC1C2 (links) oder Rab/Cld1-YFP (rechts) mittels Pearson's Korrelationskoeffizienten; Mittelwert  $\pm$  SD. (C) Die Endosomen der TAMRA-mC1C2 behandelten Zellen wurden mit einem Saccharose-Dichtegradient separiert und in den einzelnen Fraktionen mit Western Blot Cld1 (oben) und Rab4, -5, -7 (Mitte) bzw. mit Fluoreszenzmessung TAMRA-mC1C2 (unten) nachgewiesen. (D) In HEK-293 Cld1-YFP-Zellen, die bis zu 24 h mit 8  $\mu$ M TAMRA-mC2C2 inkubiert wurden, kam es zu keiner Anreicherung des Peptids in den untersuchten Endosomenfraktionen. A.U., arbitrary unit.

Es konnte mit Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden, dass TAMRA-mC1C2 15 min nach Administration maximal mit Rab5 kolokalisierte und diese dann mit der Dauer der Inkubation stetig abnahm (Abb. 32A, B linkes Diagramm). 2 h nach Peptidgabe zeigte mC1C2 eine maximale Kolokalisation mit Rab4. Nach 24 h Inkubation kolokalisierte mC1C2 maximal mit Rab7. Die Lokalisation von Cld1-YFP nach Peptidbehandlung entsprach der von TAMRA-mC1C2 (Abb. 32A, B rechtes Diagramm). Mittels Saccharose-Dichtegradienten-

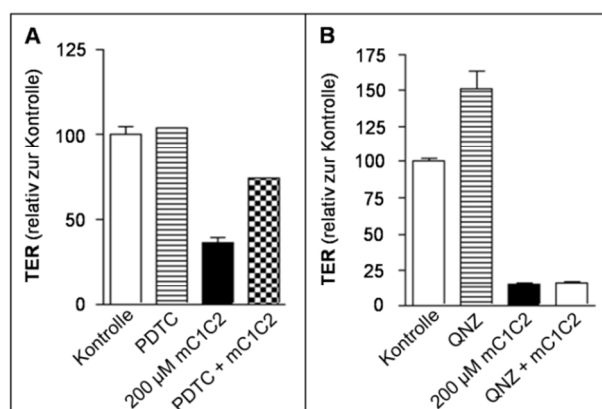
zentrifugation wurden die Endosomen der behandelten Zellen separiert und Cld1 (Abb. 32C, oben), Rab4, -5, -7 (Abb. 32, Mitte) oder TAMRA-mC1C2 (Abb. 32C, unten) in den Endosomenfraktionen nachgewiesen. In den Rab5-positiven Fraktionen 22-26 (frühe Endosomen, Abb. 32C, Mitte) wurde 5-10 min nach der TAMRA-mC1C2 Administration Cld1 nachgewiesen (Abb. 32C, oben). Die Rab4-positiven Fraktionen 12-16 (Rezyklosomen, Abb. 32C, Mitte) zeigten zwischen 5 min und 2 h eine kontinuierliche, starke Zunahme von Cld1 (Abb. 32C, oben). Nach 24 h Inkubation war in den Rab7-positiven Fraktionen 2-7 (späte Endosomen, Abb. 32C, Mitte) ein starkes Cld1-Signal nachweisbar (Abb. 32C, oben). Die Detektion von TAMRA-mC1C2 erfolgte mittels Fluoreszenzmessung (Abb. 32C, unten) und entsprach überwiegend der Rab-Cld1 Lokalisation. Der Anteil von TAMRA-mC1C2 war in den Rab5-positiven Fraktionen (frühe Endosomen, Abb. 32C, Mitte) nach 5-10 min maximal und nach 24 h minimal. Nach 2 h Inkubation wurde das maximale TAMRA-mC1C2 Signal (Abb. 32C, unten) in den Rab4-positiven Fraktionen (Rezyklosomen, Abb. 32C, Mitte) detektiert, wobei diese Fraktionen auch schon nach 5-10 min Inkubation ein starkes Peptidsignal aufwiesen. Nach 24 h Inkubation lag TAMRA-mC1C2 (Abb. 32C, unten) noch immer in Rab4-positiven Fraktionen vor, zusätzlich und stärker jedoch auch in Rab7-positiven Fraktionen. In Zellen die mit dem Kontrollpeptid TAMRA-mC2C2 inkubiert wurden, konnte keine Anreicherung in den Rab5, -4, oder -7 Fraktionen detektiert werden (Abb. 32D).

Die Endosomenlokalisierung von TAMRA-mC1C2 wurde durch siRNA-Versuche bestätigt. Der *knockdown* von Rab5 führte zur starken Reduktion der intrazellulären TAMRA-Anreicherung nach 10 min Peptidinkubation (Abb. A52A). Nach 2 h kolokalisierte TAMRA-mC1C2 maximal mit Rab4 (Abb. 32A, B linkes Diagramm). Der *knockdown* von Rab4 resultierte in einer starken Anreicherung des Peptids in Rab7-positiven Endosomen, sowohl nach 2 h und 24 h Peptidinkubation (Abb. A52B, C). Die 24-stündige Inkubation des Peptids mit Rab7 *knockdown*-Zellen reduzierte die TAMRA-mC1C2-Rab7 Kolokalisation sehr stark und führte zu einem sehr hohen Anteil von TAMRA-mC1C2 in Rab4-positiven Endosomen (Abb. A52D).

#### 3.3.3.4 Wirkung von mC1C2 auf Signaltransduktionswege

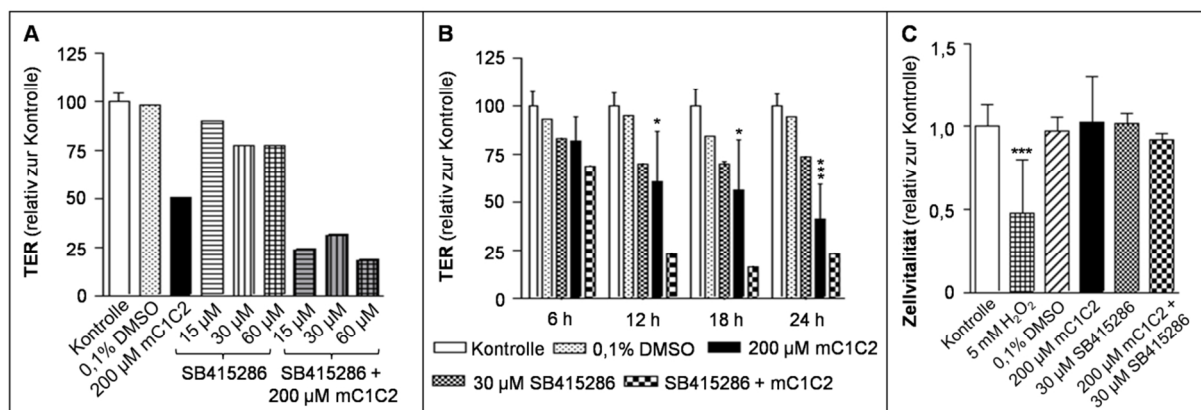
Die Untersuchung des Einflusses von mC1C2 auf verschiedene Signaltransduktionswege erfolgte in Caco-2-Zellen. Es ist beschrieben, dass die Erhöhung der Permeabilität von Epithelzellen im Zusammenhang mit einer NFκB-vermittelten Expressionsänderung von TJ-Proteinen stehen kann [169]. Deshalb wurden orientierende Experimente mit dem NFκB-Inhibitor PDTC durchgeführt. Die Vorbehandlung mit PDTC hob die TER-

reduzierende Wirkung von mC1C2 zum Teil auf (Abb. 33A): Nach 24 h mC1C2-Inkubation konnte lediglich eine TER-Verringerung um 26% gegenüber der unbehandelten Kontrolle verzeichnet werden. Die mit mC1C2 inkubierten Zellen wiesen eine TER-Absenkung von  $64\pm 3\%$  auf. Zellen die lediglich mit PDTC inkubiert wurden, unterschieden sich nicht von der Kontrolle. QNZ, ein weiterer NF $\kappa$ B-Inhibitor, führte zum Anstieg des TER auf  $151\pm 13\%$  gegenüber der Kontrolle. Die mC1C2-vermittelte TER-Verringerung um  $85\pm 1\%$  wurde aber durch QNZ (QNZ+mC1C2) nicht beeinträchtigt ( $84\pm 1\%$ ; Abb. 33B). Der Einfluss des NF $\kappa$ B-Signalweges auf die Wirkung von mC1C2 konnte daher nicht abschließend geklärt werden.



**Abb. 33 Einfluss von Inhibitoren des NF $\kappa$ B-Signalweges auf die mC1C2-Wirkung.** Caco-2-Filterkulturen wurden mit (A) Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC, 100  $\mu$ M) oder (B) N4-[2-(4-Phenoxyphenyl)ethyl]-4,6-quinazolinediamin (QNZ, 1  $\mu$ M) für 1 h vorbehandelt und anschließend apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 inkubiert.  $n \geq 2$ ; Mittelwert  $\pm$  SD. 24 h nach Peptidapplikation wurde der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) relativ zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) bestimmt. PDTC schwächte die mC1C2-Wirkung ab; QNZ zeigte keinen Einfluss auf die mC1C2-Wirkung.

Darüber hinaus wurde der Effekt des Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3)-Inhibitors SB415286 auf die mC1C2-vermittelte TER-Absenkung untersucht. GSK-3 ist u.a. an der Regulation der TJ-Barrierefunktion beteiligt [170-172], da durch GSK-3 Transkriptionsfaktoren wie Snail oder Cdx2 (*caudal-related homeobox 2*) kontrolliert werden, welche direkt die Expression von Cld1 regulieren [173, 174]. SB415286 allein führte konzentrationsabhängig zu TER-Absenkungen (15  $\mu$ M: 10%, 30  $\mu$ M: 23%, 60  $\mu$ M: 23%; relativ zur Kontrolle; Abb. 34A). Die Kombination mit dem Peptid zeigte eine additive (Abb. 34A, B), nicht zelltoxische (Abb. 34C) Wirkung. So verstärkte die Inhibition der GSK-3 den mC1C2-Effekt, z.B. nach 24 h von  $59\pm 19\%$  TER-Absenkung auf 77% (Abb. 34B). Die anschließende immunzytochemische Untersuchung der Zellen deutete darauf hin, dass SB415286 allein die Expression von Cld1 und ZO-1 nicht beeinflusst (Abb. A53). Verglichen mit mC1C2-behandelten Zellen resultierte die Inkubation mit SB415286+mC1C2 jedoch in einer Verringerung des ZO-1-Signals und einer Steigerung der Cld1-Menge in der Plasmamembran. Die Inhibition der GSK-3-Aktivität führt im untersuchten Zellmodell demnach nicht zur Aufhebung des mC1C2-Effektes.



**Abb. 34 Die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3 verstärkt die barriereöffnende Wirkung von mC1C2.** Caco-2-Filterkulturen wurden mit 30-60  $\mu$ M SB415286 für 60 min vorbehandelt und anschließend apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 und SB415286 für 24 h inkubiert. (A) 24 h nach Peptidapplikation wurde der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) relativ zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) bestimmt; SB415286 bewirkte eine konzentrationsabhängige Verringerung des TER; die Inkubation mit SB415286 und 200  $\mu$ M mC1C2 zusammen (SB415286+mC1C2) bewirkte eine stärkere TER-Absenkung als die Einzelbehandlungen. (B) Zeitabhängige Wirkung von 30  $\mu$ M SB415286 allein oder SB415286 zusammen mit 200  $\mu$ M mC1C2 auf den TER, relativ zur Kontrolle. (C) Die durch Inkubation mit 30  $\mu$ M SB415286 oder Ko-Inkubation mit 200  $\mu$ M mC1C2 hervorgerufene Barriereöffnung basiert nicht auf zellschädigenden Effekten; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Positivkontrolle;  $n \geq 2$ ; Mittelwert $\pm$ SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .

### 3.4 Strukturanalyse und Wirkoptimierung von mC1C2

#### 3.4.1 Struktur- und Funktionsbeziehungen von mC1C2

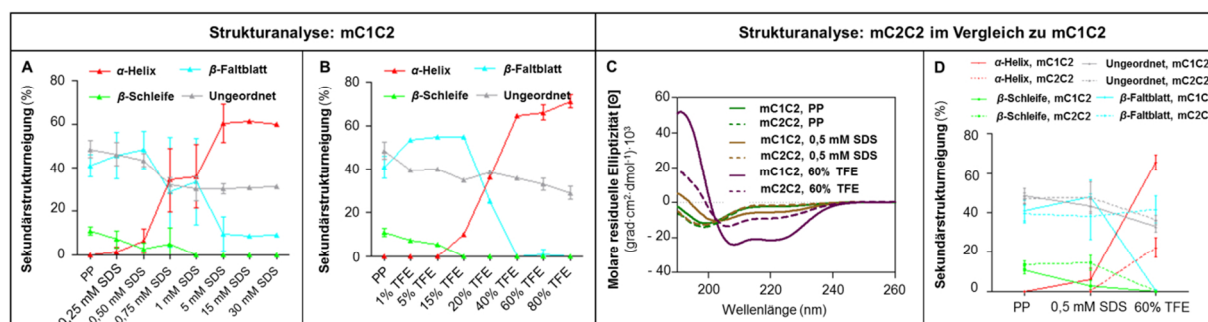
Welche Bereiche oder strukturellen Bestandteile von mC1C2 sind maßgeblich für die Wirkung? Zur Klärung wurden die Sekundärstruktureigenschaften von mC1C2 sowie verschiedene Sequenzvariationen und Verkürzungspeptide von mC1C2 und das Kontrollpeptid mC2C2 mit CD-Spektroskopie untersucht, 3D-Strukturmodelle erstellt und experimentell überprüft, inwieweit Peptidvarianten noch eine Wirkung haben.

##### 3.4.1.1 mC1C2 neigt zur Ausbildung von $\beta$ -Faltblatt- und $\alpha$ -Helixstrukturen

Zur Untersuchung der Sekundärstruktureigenschaften wurde das Peptid in Phosphatpuffer (PP), in PP mit 0,25-30 mM SDS und PP mit 1-80% TFE inkubiert, die CD-Spektren bestimmt und mit Referenzspektren [157] verglichen, um den Anteil der Sekundärstrukturelemente zu bestimmen. Während SDS unterhalb seiner kritischen Mizellenbildungskonzentration (6-8 mM) die  $\beta$ -Faltblattbildung induzieren und stabilisieren kann, begünstigen hohe TFE Konzentrationen die Bildung von  $\alpha$ -Helices [154-156].

In PP lag mC1C2 größtenteils ungeordnet und in  $\beta$ -Faltblattkonformation vor (49 $\pm$ 4% ungeordnet, 41 $\pm$ 5%  $\beta$ -Faltblatt, 11 $\pm$ 2%  $\beta$ -Schleife, 0%  $\alpha$ -Helix; Abb. 35A-C; Tab. A15). 0,5 mM SDS erhöhte den Faltblattanteil auf 48 $\pm$ 8% und die Helizität auf 6 $\pm$ 5% (Abb. 35A, C; Tab. A15). Mit zunehmendem SDS-Anteil kam es zur weiteren Steigerung der Helizität und

Verringerung des Faltblatt-Anteils (Abb. 35A). Im Bereich der kritischen Mizellenkonzentration von SDS wurde die mit SDS maximal induzierbare Helizität von ~60% in mC1C2 hervorgerufen (Abb. 35A). Zugaben von bis zu 15% TFE erhöhten den Faltblattanteil in mC1C2 von  $41\pm 5\%$  auf 55%, während sich der ungeordnete Anteil von  $49\pm 4\%$  auf 35% verringerte (Abb. 35B; Tab. A15). TFE-Konzentrationen von 15-80% steigerten den  $\alpha$ -helikalen Anteil von 10% auf  $71\pm 3\%$ , gleichzeitig nahm der Faltblattanteil von 55% auf 0% ab (Abb. 35B). Wie mC1C2 zeigte auch das inaktive Kontrollpeptid mC2C2 in PP bei 199 nm ein Minimum und im Bereich von 210-240 nm eine leicht negative Elliptizität (Abb. 35C). Dies entspricht hauptsächlich einer Mischung aus unstrukturierten und  $\beta$ -Faltblattanteilen (Abb. 35D; Tab. A16). Die Inkubation mit 0,5 mM SDS änderte, im Gegensatz zu mC1C2, nicht die Konformation von mC2C2, was einer geringer ausgeprägten Faltblattneigung entsprach. Auch 60% TFE, die in mC1C2 den Helixanteil von 0 auf  $66\pm 4\%$  (Ausbildung der Minima bei 208 und 220 nm; Abb. 35C) induzierten, führten in mC2C2 nur zur moderaten Steigerung der Helizität von 0 auf  $22\pm 5\%$ . Der Faltblattanteil blieb unverändert (Abb. 35C, D).

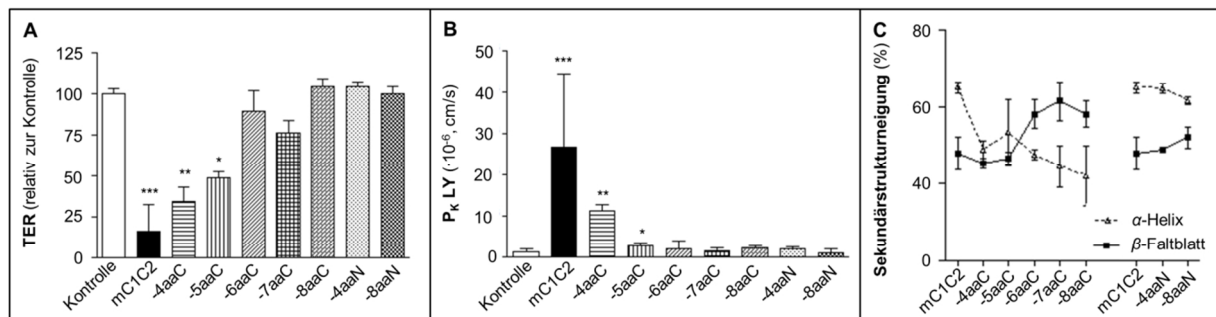


**Abb. 35** mC1C2 hat eine starke Neigung zur  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -Helixbildung. (A, B) Die Sekundärstrukturierung von mC1C2 wurde in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,4), in (A) PP mit 0,25-30 mM SDS (konzentrationsabhängige Induktion von  $\beta$ -Faltblatt oder  $\alpha$ -Helix) oder in (B) PP mit 1-80% Trifluorethanol (TFE,  $\alpha$ -Helix induzierend) mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht und der Anteil der Sekundärstrukturelemente mittels Referenzspektren bestimmt [157];  $n \geq 8$  Akkumulationen; Mittelwert  $\pm$  SD. (A) Der SDS-induzierte  $\beta$ -Faltblattanteil ist mit 0,5 mM maximal; (B) 60-80% TFE induzieren die maximale  $\alpha$ -Helizität in mC1C2. (C) Vergleich der CD-Spektren und (D) Sekundärstrukturierungen vom Kontrollpeptid mC2C2 mit mC1C2 in PP, PP mit 0,5 mM SDS oder PP mit 60% TFE; in mC2C2 lässt sich der  $\beta$ -Faltblattanteil durch 0,5 mM SDS nicht wie bei mC1C2 maximal erhöhen; 60% TFE induzieren in mC2C2 nur eine moderate Erhöhung des  $\alpha$ -Helixanteils;  $n \geq 32$  Akkumulationen; Mittelwert  $\pm$  SD.

### 3.4.1.2 Die mC1C2-Wirkregion umfasst die Aminosäuren 1-23 und formt *N*-terminal ein $\beta$ -Faltblatt- und *C*-terminal eine $\alpha$ -Helix

Um die Lokalisation der Sekundärstrukturelemente in mC1C2 zu bestimmen und diese in Relation zur Wirkregion von mC1C2 zu stellen, wurden zunächst die barrieremodulierenden Eigenschaften von *N*- und *C*-terminal verkürzten mC1C2-Varianten untersucht. Die *C*-terminale Verkürzung um 4-8 Aminosäuren (mC1C2-4aaC, mC1C2-8aaC) führte zur suk-

zessiven Verringerung der barriereöffnenden Wirkung (Abb. 36A): mC1C2 verringerte den TER um  $84\pm 5\%$ , mC1C2-4aaC um  $65\pm 3\%$  und mC1C2-5aaC um  $51\pm 2\%$  gegenüber der Kontrolle. Dagegen führten mC1C2-6aaC, -7aaC und -8aaC lediglich zu TER-Verringerungen zwischen 23 und 0% gegenüber der Kontrolle. Die N-terminale Trunkierung um 4 oder 8 Aminosäuren (mC1C2-4aaN, mC1C2-8aaN) hob die Wirkung von mC1C2 vollständig auf. Untersuchungen zur parazellulären LY Durchlässigkeit bestätigten die TER-Messungen. Neben mC1C2 ( $26,7\pm 17,6\cdot 10^{-6}$  cm/s) führten lediglich mC1C2-4aaC ( $11,2\pm 1,4\cdot 10^{-6}$  cm/s) und mC1C2-5aaC ( $2,8\pm 0,6\cdot 10^{-6}$  cm/s) zur signifikanten Erhöhung der Permeabilität gegenüber der Kontrolle ( $1,2\pm 0,7\cdot 10^{-6}$  cm/s) (Abb. 36B). Der für die mC1C2-Aktivität verantwortliche Sequenzbereich konnte daher auf die Aminosäuren 1-23 eingegrenzt werden (Abb. A56).



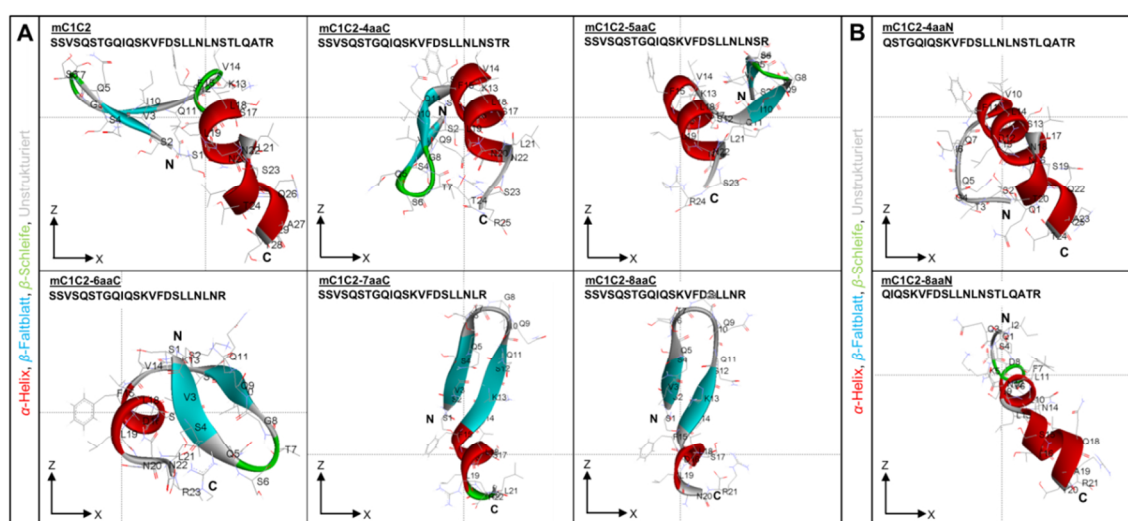
**Abb. 36** Die Wirkregion von mC1C2 erstreckt sich über die Aminosäuren 1-23 des Peptids, wobei der N-Terminus eine  $\beta$ -Faltblatt und der C-Terminus eine  $\alpha$ -helikale Neigung besitzt. (A, B) Caco-2-Filterkulturen wurden bilateral mit 300  $\mu$ M mC1C2 oder mit N- bzw. C-terminal um 4-8 Aminosäuren verkürzten mC1C2-Varianten (-4/-8aaN bzw. -4/-8aaC) inkubiert und 24 h nach Peptidadministration der (A) transzelluläre elektrische Widerstand (TER) und die (B) parazelluläre Durchlässigkeit für *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa) im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) bestimmt; mC1C2 und die verkürzten Peptidvarianten mC1C2-4aaC und -5aaC verringerten den TER und erhöhten die parazelluläre Durchlässigkeit gegenüber der Kontrolle signifikant;  $P_k$ , Permeationskoeffizient;  $n\geq 5$ ; Mittelwert $\pm$ SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p\leq 0,05$ ; \*\*,  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p\leq 0,001$ . (C) Sekundärstruktureneigung der mC1C2-Verkürzungsvarianten im Vergleich zu mC1C2; die Zirkulardichroismus-Spektren wurden zur Bestimmung der  $\beta$ -Faltblattnenigung in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,4) mit 0,5 mM SDS und zur Bestimmung der  $\alpha$ -Helixneigung in 60% Trifluorethanol aufgenommen und mit Referenzspektren abgeglichen [157]; die C-terminale mC1C2-Verkürzung führte zur Abnahme des  $\alpha$ -Helix- und Zunahme des  $\beta$ -Faltblattanteils; die N-terminale mC1C2-Verkürzung hatte nahezu keinen Einfluss auf den  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblattanteil;  $n\geq 16$  Akkumulationen; Mittelwert $\pm$ SD.

Die CD-Untersuchungen ergaben, dass mit zunehmender C-terminaler Verkürzung von mC1C2 die induzierbare Helizität abnahm (Abb. 36C; Tab. A17): Für mC1C2 wurde ein Anteil von  $66\pm 4\%$  Helizität und für mC1C2-5aaC ein Anteil von  $53\pm 15\%$  gemessen. mC1C2-8aaC zeigte eine Helizität von 42%. Die N-terminale Verkürzung hatte einen wesentlich geringeren Einfluss auf die induzierbare Helizität. Diese lag in mC1C2-4aaN bei  $65\pm 2\%$  und in mC1C2-8aaN bei  $62\pm 2\%$ . Der induzierbare  $\beta$ -Faltblattanteil wurde durch die C-terminale Verkürzung erhöht. Dieser steigerte sich in 0,5 mM SDS von  $48\pm 8\%$  (mC1C2) auf  $62\pm 8\%$  (mC1C2-7aaC) bzw.  $58\pm 5\%$  (mC1C2-8aaC). Die N-terminale Verkürzung beein-

flusste die Faltblattbildung unter SDS-Einfluss nur leicht. Diese lag zwischen  $49\pm 1\%$  (mC1C2-4aaN) und  $52\pm 4\%$  (mC1C2-8aaN). Die deutliche Abnahme der induzierbaren Helizität der C-terminal verkürzten Peptide und die nur sehr leichte Verringerung der induzierbaren Helizität bei N-terminal verkürzten Peptide wies auf eine starke helikale Neigung der C-terminalen Seite.

Die energetisch günstigsten 3D-Konformationen der Peptide wurden mit PEP-FOLD [138-140] berechnet und sind in Abb. 37 dargestellt. Es bestätigte sich, dass mC1C2 (Abb. 37A, oben, links) sowohl eine helikale (rot) als auch eine  $\beta$ -Faltblattneigung (blau) besitzt, diese C-terminal bzw. N-terminal lokalisiert sind und die C-terminale Verkürzung zur Verringerung des Helixanteils führt. Die CD-Daten wiesen darauf hin, dass mC1C2 in der N-terminalen Hälfte über eine starke Neigung zur  $\beta$ -Faltblattbildung verfügt. Diese ist jedoch flexibel, da eine N-terminale Verkürzung nicht in einer deutlichen Verringerung des induzierbaren  $\beta$ -Faltblattanteils resultierte. Die 3D-Modelle der N-terminal trunkierten Peptide (Abb. 37B) zeigten keine  $\beta$ -Faltblattbildung und standen damit im Widerspruch zu den CD-Daten.

Aus dem 3D-Modell von mC1C2 (Abb. 37A, links oben) wurde deutlich, dass die C-terminalen Aminosäuren T24, L25, Q26, A27, T28, R29 (Position im Peptid) eine separate  $\alpha$ -Helix am C-Terminus von mC1C2 bilden. Die Trunkierung dieser Aminosäuren (mC1C2-4aaC, mC1C2-5aaC) beeinflusste die Wirkung des Peptids nicht oder nur leicht. Mit weiterer C-terminaler Verkürzung um 1-3 Aminosäuren (mC1C2-6aaC, mC1C2-8aaC) wurde der zentrale Teil der  $\alpha$ -Helix (S17, L18, L19, N20, L21, N22, S23) sukzessive verkleinert und der relative  $\beta$ -Faltblattanteil erhöht, was einen Wirkungsverlust des Peptids nach sich zog.

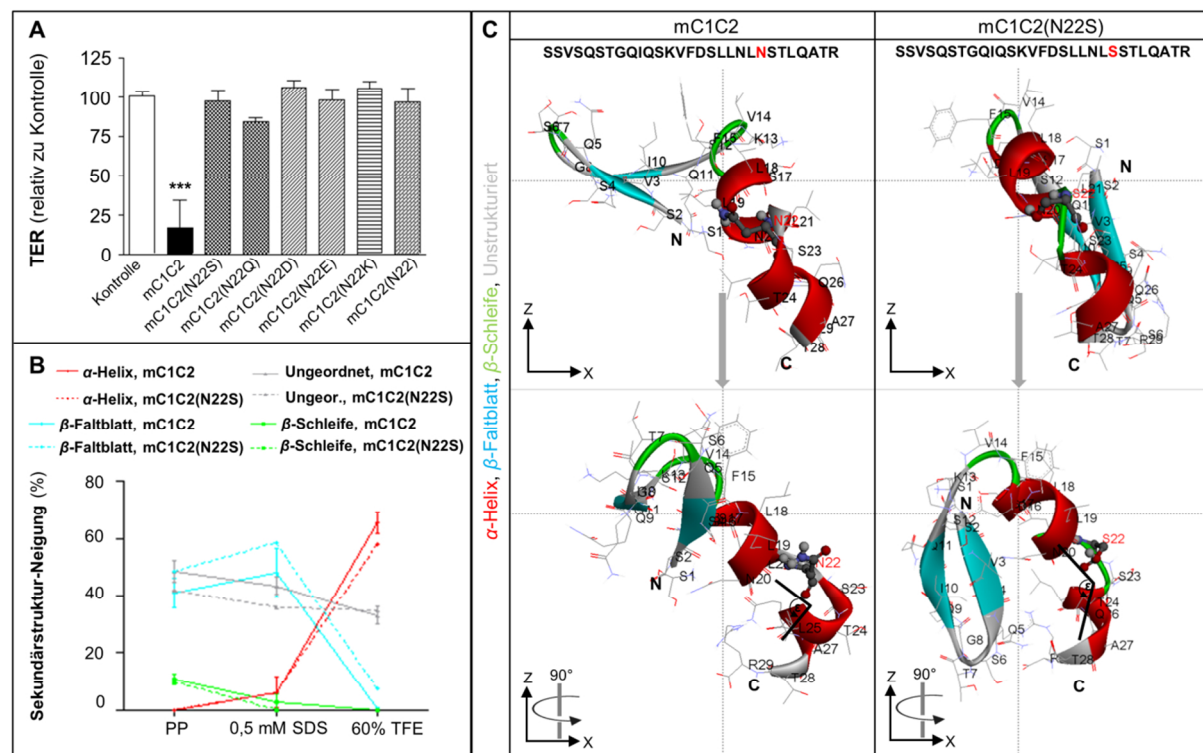


**Abb. 37 Einfluss von N- oder C-terminalen Verkürzungen auf die mC1C2-Tertiärstruktur.** 3D-Strukturmodelle der energetisch günstigsten Konformationen der (A) C- oder (B) N-terminal verkürzten mC1C2-Varianten; die (A) C-terminale Verkürzung bewirkte eine Verringerung des  $\alpha$ -Helix- und Steigerung des  $\beta$ -Faltblattanteils; die (B) N-terminale Trunkierung verringerte den Faltblattanteil. Die Modelle sind entspre-

chend der zentralen, nicht durch die Trunkierung betroffenen Sequenz D<sub>S</sub>LLN, relativ zu mC1C2, ausgerichtet; N, N-Terminus; C, C-Terminus; Modellentwicklung, PEP-FOLD [138-140]; Darstellung, Discovery Studio.

### 3.4.1.3 Asparagin in Position 22 ist essentiell für die Wirkung und 3D-Struktur von mC1C2

Das mC1C2-abgeleitete Peptid mC1C2(N22S) besitzt an der Aminosäureposition 22 anstatt eines Serins ein Asparagin. Diese Variation, aber auch N22I, N22D, N22E und N22K resultierten in einem Verlust der barriereöffnenden Wirkung des Peptids (Abb. 38A). Die Substitution gegen die strukturell und chemisch sehr ähnliche Aminosäure Q (mC1C2(N22Q)) ergab eine minimale Aktivität des Peptids. Zur Klärung, ob die Substitution N22S Einfluss auf die Sekundärstruktur von mC1C2 hat, wurde mC1C2(N22S) CD-spektroskopisch charakterisiert (Abb. 38B; Tab. A18). In der Flexibilität und Neigung zur Ausbildung verschiedener Konformationen unterschied sich mC1C2(N22Q) leicht von mC1C2. In PP und PP mit 0,5 mM SDS besaß mC1C2(N22S) einen 8 bzw. 10% höheren  $\beta$ -Faltblattanteil als mC1C2; in 60% TFE war die maximale helikale Induzierbarkeit mit 58% niedriger als bei mC1C2 mit  $66\pm 4\%$  (Abb. 38B).



**Abb. 38 Die N22-Substitution in mC1C2 führt zum Wirkungsverlust und einer veränderten Tertiärstruktur.** (A) Filterkulturen von Caco-2-Zellen wurden für 24 h apikal mit 300  $\mu$ M mC1C2 oder der mC1C2(N22)-Varianten inkubiert und der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) bestimmt; nur mC1C2 verringerte gegenüber Zellen ohne Peptid (Kontrolle) signifikant den TER;  $n \geq 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*\*\*,  $p < 0,001$ . (B) Vergleich der Sekundärstrukturneigungen der Peptide mC1C2 und mC1C2(N22S) in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,4), in PP mit 0,5 mM SDS ( $\beta$ -Faltblatt-Induktion) oder in PP mit 60% Trifluorethanol (TFE,  $\alpha$ -Helix-Induktion); der jeweilige Anteil der Sekundärstrukturelemente wurde mit Zirkulardichroismus-Spektroskopie und Referenzspektren bestimmt [157]; mC1C2(N22S) wies ge-



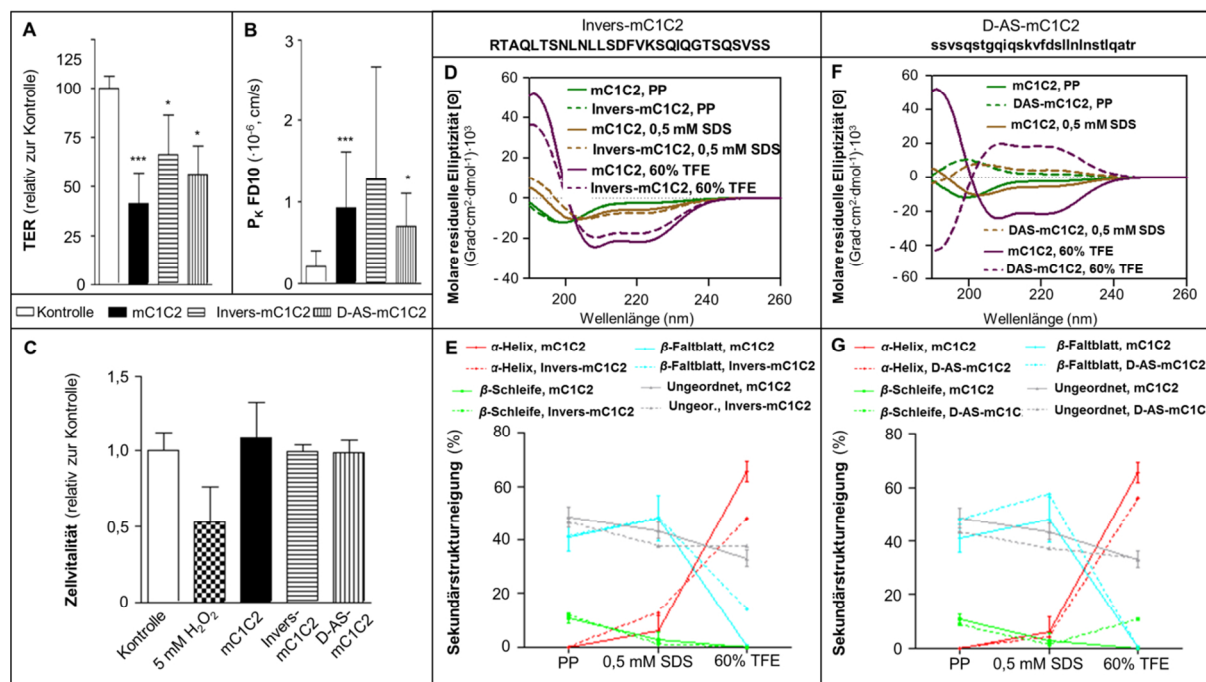
genüber mC1C2 eine stärkere Faltblattneigung auf;  $n \geq 8$  Akkumulationen; Mittelwert $\pm$ SD. (C) 3D-Strukturmodelle der energetisch günstigsten Konformationen von (C, links) mC1C2 und (C, rechts) mC1C2(N22S); (C, unten) die Substitution N22S verstärkte die Interaktion zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt und der  $\alpha$ -Helix und vergrößerte den Winkel zwischen dem zentralen und dem C-terminalen Teil der  $\alpha$ -Helix von  $\epsilon_{mC1C2}=88^\circ$  auf  $\epsilon_{mC1C2(N22S)}=123^\circ$ ; das mC1C2(N22S) Modell ist entsprechend der zentralen, nicht veränderten Aminosäuresequenz DSLLN, relativ zu mC1C2 ausgerichtet; N, N-Terminus; C, C-Terminus; Modellentwicklung, PEP-FOLD [138-140]; Darstellung, Discovery Studio.

Beide Peptide unterschieden sich in der Lokalisation der Sekundärstrukturelemente innerhalb der Peptide nicht, zeigten bezüglich der energetisch günstigsten 3D-Konformation aber deutliche Unterschiede (Abb. 38C): (1) Aufgrund der N22S-Substitution wurde die C-terminale  $\alpha$ -Helix nicht wie bei mC1C2 um  $\epsilon_{mC1C2}=88^\circ$  gegenüber der zentralen  $\alpha$ -Helix abgewinkelt, sondern um  $\epsilon_{mC1C2(N22S)}=123^\circ$ ; (2) in mC1C2(N22N) interagiert das  $\beta$ -Faltblatt mit der C-terminalen  $\alpha$ -Helix über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen S4/R29, Q5/R29, Q5/T28, sowie mit der zentralen  $\alpha$ -Helix über S<sup>12</sup>/N<sup>20</sup>; in mC1C2 besteht lediglich eine Wechselwirkung zwischen dem Faltblatt und zentraler  $\alpha$ -Helix über S1/D16 und S1/N20.

#### 3.4.1.4 Die Wirkung von mC1C2 ist nicht von stereospezifischen Interaktionen abhängig

Inwieweit ist die Wirkung von mC1C2 von stereospezifischen Interaktionen abhängig? Ein aus D-Aminosäuren aufgebautes mC1C2 (D-AS-mC1C2) und ein inverses mC1C2 (Invers-mC1C2) wurden hierfür hinsichtlich ihrer barriерemodulierenden (Abb. 39A) und Struktureigenschaften (Abb. 39C-F) untersucht. Die Peptide unterschieden sich in ihrer Chiralität (D-AS-mC1C2) oder ihrer Primärsequenz (Invers-mC1C2, identischen Aminosäuren wie mC1C2 in umgekehrter Reihenfolge) von mC1C2. Invers- und D-AS-mC1C2 (200  $\mu$ M, apikal, 24 h) verringerten den TER signifikant um  $34 \pm 19\%$  bzw.  $44 \pm 19\%$  und erhöhten die parazelluläre Durchlässigkeit für FD10 von  $0,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$  cm/s in peptidfreien Zellen (Kontrolle) auf  $0,7 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$  cm/s (dAS-mC1C2) bzw.  $1,3 \pm 1,3 \cdot 10^{-6}$  cm/s (Invers-mC1C2) (Abb. 39A). Invers-mC1C2 und D-AS-mC1C2 zeigten keine zellschädigende Wirkung (Abb. 39B). Strukturuntersuchungen ergaben, dass beide Peptide hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturneigung große Übereinstimmungen mit mC1C2 aufwiesen, sich jedoch in der Stärke der Ausprägung unterschieden (Abb. 39C-F; Tab. A19). Erwartungsgemäß zeigte D-AS-mC1C2 aufgrund der Chiralität der Aminosäuren ein nahezu spiegelbildliches CD-Spektrum gegenüber mC1C2 (Abb. 39E). Der TFE-induzierte  $\alpha$ -Helixanteil war in Invers-mC1C2 mit 48% (Abb. 39D) deutlich geringer als bei mC1C2 (66%) oder D-AS-mC1C2 (56%; Abb. 39F). Im Gegensatz dazu war der SDS-induzierte  $\beta$ -Faltblattanteil in mC1C2 ( $48 \pm 8\%$ ) und Invers-mC1C2 (48%; Abb. 39D) identisch, während er in D-AS-mC1C2 höher war (58%; Abb. 39F). Da trotz der

genannten strukturellen Unterschiede der Peptide eine vergleichbare Aktivität wie bei mC1C2 vorlag, ist die Wechselwirkung der Peptide mit dem Zielmolekül vermutlich nicht von stereospezifischen Faktoren abhängig, sondern wird durch das Sekundärstrukturmotiv aus  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix bestimmt.



**Abb. 39 Die Wirkung von mC1C2 ist nicht von stereospezifischen Wechselwirkungen abhängig.** (A, B) Caco-2-Zellen wurden mit einem aus D-Aminosäuren (D-AS-mC1C2) aufgebauten und einem inversen mC1C2 (Invers-mC1C2) inkubiert (24 h, 200  $\mu$ M, apikal) und der (A) transzelluläre elektrische Widerstand (TER), die parazelluläre Durchlässigkeit von Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10) und (B) die Zytotoxizität im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) und mC1C2-behandelten Zellen bestimmt;  $H_2O_2$ , Positivkontrolle; D-AS-mC1C2 und Invers-mC1C2 verringerten wie mC1C2 signifikant den TER, erhöhten den Permeationskoeffizienten ( $P_k$ ) für FD10 und waren nicht zytotoxisch;  $n \geq 5$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p \leq 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . (C-F) Die Sekundärstrukturneigungen von (C) Invers-mC1C2 und (E) D-AS-mC1C2 wurden in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,4), in PP mit 0,5 mM SDS ( $\beta$ -Faltblatt-Induktion) oder in PP mit 60% Trifluorethanol (TFE,  $\alpha$ -Helix-Induktion) mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht und (D, F) der Anteil der Sekundärstrukturelemente mittels Referenzspektren bestimmt [157];  $n \geq 8$  Akkumulationen; Mittelwert  $\pm$  SD.

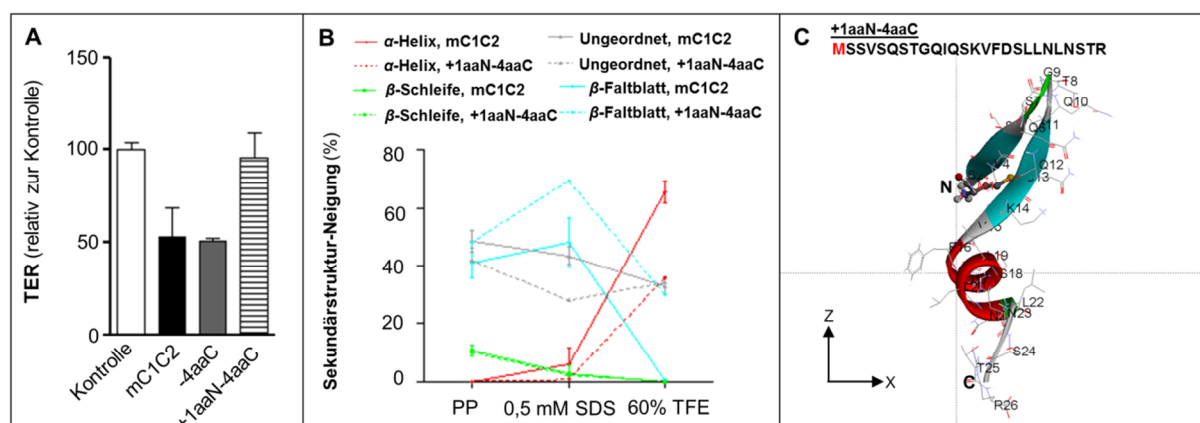
### 3.4.2 Wirkoptimierung von mC1C2

#### 3.4.2.1 mC1C2 kann ohne Wirkeinbuße C-terminal um 4 Aminosäuren verkürzt, nicht aber N-terminal verlängert werden

Der N-Terminus von mC1C2 ist essentiell für die Peptidwirkung und weist ein  $\beta$ -Faltblatt auf. Mit dem Ziel diesen wirkrelevanten Bereich zu verlängern, dadurch ein wirksames Derivat herzustellen und somit die benötigte Peptidmenge zu reduzieren, wurde das gegenüber mC1C2 verkürzte, aber wirksame Peptid mC1C2-4aaC N-terminal mit der  $\beta$ -Faltblatt-induzierenden Aminosäure Methionin verlängert (mC1C2+1aaN-4aaC). Im Gegensatz zu

mC1C2 und mC1C2-4aaC, die den TER um  $47\pm 15\%$  bzw.  $49\%$  relativ zur Kontrolle verringerten (Abb. 40A; siehe auch Abb. 36A, B), führte mC1C2+1aaN-4aaC nicht zur TER-Absenkung (Abb. 40A).

CD-Untersuchungen bestätigen, dass sich der SDS-induzierbare  $\beta$ -Faltblattanteil von mC1C2+1aaN-4aaC gegenüber mC1C2 von  $48\pm 8\%$  auf  $69\%$  steigerte und sich gleichzeitig der TFE-induzierbare  $\alpha$ -helikale Anteil von  $66\pm 4\%$  auf  $36\%$  verringerte (Abb. 40B; Tab. A20). Diese Befunde konnten durch das 3D-Modell der energetisch günstigsten Konformation bestätigt werden (Vergleiche Abb. 40A mit Abb. 38C).



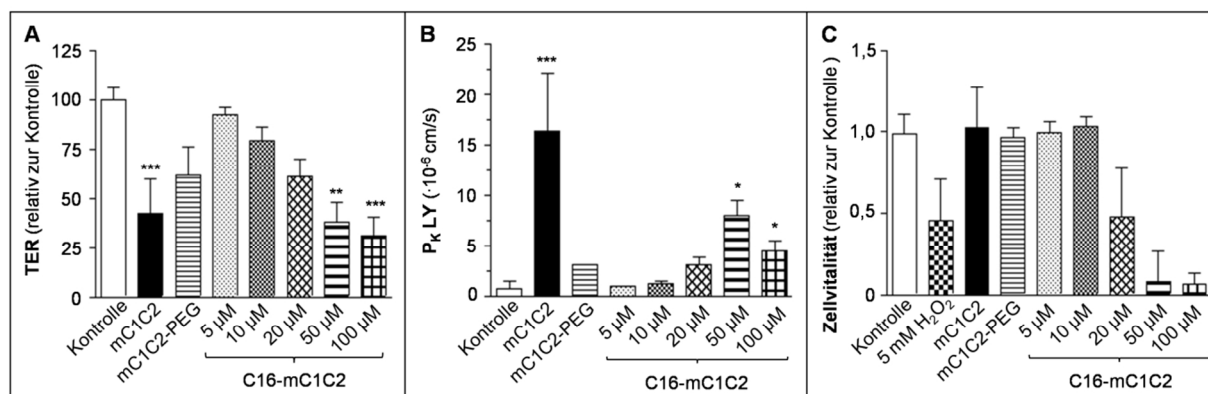
**Abb. 40** Die C-terminale Verkürzung von mC1C2 um 4 Aminosäuren verringert die Öffnerwirkung nicht, wohingegen die N-terminale Verlängerung zum Wirkverlust führt. (A) Caco-2-Filterkulturen wurden für 24 h mit je  $200\ \mu\text{M}$  der Peptide mC1C2, mC1C2-4aaC (C-terminal um 4 Aminosäuren verkürzt) und mC1C2+1aaN-4aaC (mC1C2-4aaC N-terminal mit Methionin verlängert) inkubiert, der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) bestimmt und mit den peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) verglichen; mC1C2 und mC1C2-4aaC verringerten den TER, nicht aber mC1C2+1aaN-4aaC;  $n\geq 4$ ; Mittelwert $\pm$ SD. (B) Die Sekundärstrukturneigung von mC1C2+1aaN-4aaC wurde in Phosphatpuffer (PP,  $10\ \text{mM}$ , pH 7,4), in PP mit  $0,5\ \text{mM}$  SDS ( $\beta$ -Faltblatt-Induktion) oder in PP mit  $60\%$  Trifluoethanol (TFE,  $\alpha$ -Helix-Induktion) mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht, der Anteil der Sekundärstrukturelemente mittels Referenzspektren ermittelt [157] und im Vergleich zu mC1C2 dargestellt;  $n\geq 8$  Akkumulationen; Mittelwert $\pm$ SD. (C) Das 3D-Strukturmodell der energetisch günstigsten Konformation von mC1C2+1aaN-4aaC; N, N-Terminus; C, C-Terminus; Modellentwicklung, PEP-FOLD [138-140]; Darstellung, Discovery Studio.

### 3.4.2.2 Die Palmitylierung oder Pegylierung von mC1C2 führt nicht zur Wirkverbesserung

Zur Reduktion der minimalen Wirkkonzentration durch die Erhöhung der Verweildauer an der Plasmamembran und damit in der Nähe der Cld-Zielstrukturen [175], wurde mC1C2 N-terminal an Palmitinsäure gekoppelt (C16-mC1C2). C16-mC1C2 reduzierte in Caco-2-Zellen bei geringerer Wirkkonzentration als mC1C2 ( $200\ \mu\text{M}$ :  $58\pm 18\%$ ) den TER (C16-mC1C2:  $5\ \mu\text{M}$ :  $8\pm 4\%$ ,  $10\ \mu\text{M}$ :  $21\pm 7\%$ ,  $20\ \mu\text{M}$ :  $39\pm 8\%$ ,  $50\ \mu\text{M}$ :  $62\pm 10\%$ ,  $100\ \mu\text{M}$ :  $69\pm 9\%$ ; Abb. 41A) und erhöhte die parazelluläre Durchlässigkeit für LY (C16-mC1C2:  $10\ \mu\text{M}$ :  $1,2\pm 0,3\cdot 10^{-6}\ \text{cm/s}$ ,  $20\ \mu\text{M}$ :  $3,1\pm 0,7\cdot 10^{-6}\ \text{cm/s}$ ,  $50\ \mu\text{M}$ :  $8,0\pm 1,5\cdot 10^{-6}\ \text{cm/s}$ ; mC1C2:  $200\ \mu\text{M}$ :  $16,3\pm 5,8\cdot 10^{-6}\ \text{cm/s}$ ; Kontrolle:  $0,8\pm 0,7\cdot 10^{-6}\ \text{cm/s}$ ; Abb. 41B). Untersuchungen zur Zytotoxizi-

tät ergaben jedoch, dass C16-mC1C2 schon ab 20  $\mu\text{M}$  zellschädigend war (Abb. 34C). Palmitinsäure allein (200  $\mu\text{M}$ ) bewirkte gegenüber der Kontrolle keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Die Pegylierung von Peptiden kann deren Stabilität und Löslichkeit erhöhen und so ebenfalls die minimale Wirkkonzentration reduzieren [176]. Die C-terminale Pegylierung von mC1C2 (mC1C2-PEG) führte im Gegensatz zu C16-mC1C2 nicht zur Zytotoxizität (Abb. 41C). Die Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  über 24 h resultierten in einer TER-Absenkung von  $38\pm 14\%$ , während mC1C2 den TER um  $57\pm 17\%$  gegenüber der Kontrolle verringerte (Abb. 41A). Die Durchlässigkeit des Zellrasens für LY wurde durch mC1C2-PEG nicht signifikant ( $3,1\pm 1,0\cdot 10^{-6}\text{cm/s}$ ) erhöht ( $0,8\pm 0,7\cdot 10^{-6}\text{cm/s}$ ; Abb. 41B).



**Abb. 41** Pegylierung oder Palmitoylierung von mC1C2 resultieren nicht in der Verringerung der minimalen Wirkkonzentration. Caco-2-Zellen wurden apikal mit 200  $\mu\text{M}$  mC1C2, pegyliertem mC1C2 (PEG-mC1C2, 200  $\mu\text{M}$ ) oder 5-100  $\mu\text{M}$  palmityliertem mC1C2 (C16-mC1C2) behandelt und 24 h nach Inkubationsbeginn der (A) transzelluläre elektrische Widerstand (TER),  $n\geq 4$  (B) die parazelluläre Durchlässigkeit für *Lucifer yellow* (LY, 0,4 kDa),  $n\geq 4$ , und (C) die Zellvitalität im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) bestimmt; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Positivkontrolle;  $n\geq 3$ . C16-mC1C2 verringerte den TER und erhöhte die parazelluläre LY Durchlässigkeit konzentrationsabhängig, führte in den Wirkkonzentrationen ( $\geq 20\mu\text{M}$ ) jedoch zu Zellschädigungen; PEG-mC1C2 war nicht zellschädigend, zeigte aber geringere barriereöffnende Effekte als mC1C2. Mittelwert $\pm$ SD; Kruskal-Wallis Test mit Dunns-Vergleichstest; \*,  $p\leq 0,05$ ; \*\*,  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p\leq 0,001$ .

### 3.5 ***In vivo*-Wirkung von mC1C2 und Derivaten**

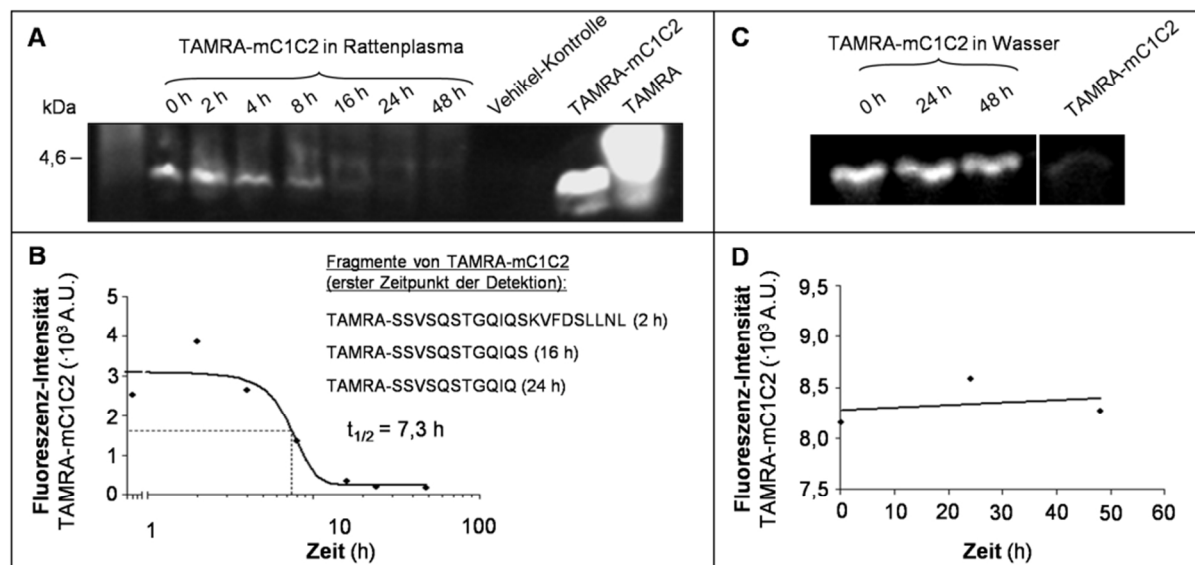
#### 3.5.1 **mC1C2 hat eine hohe Stabilität in Blutplasma**

In Vorbereitung auf die *in vivo*-Administration von mC1C2 wurde die Stabilität von mC1C2 in Blutplasma von Ratten untersucht. TAMRA-mC1C2 wurde bei 37 °C für bis zu 48 h inkubiert und im Anschluss gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 42A). Die densitometrische Analyse des Peptidsignals ergab eine Halbwertszeit von 7,3 h (Abb. 42B). Außerdem konnten mit Massenspektrometrie ab 2 h beginnend drei verschiedene, C-terminal verkürzte TAMRA-mC1C2 Fragmente detektiert werden (Abb. 42B). Lediglich in Wasser inkubiertes TAMRA-mC1C2 zeigte auch nach 48 h bei 37 °C keine Hinweise auf einen Abbau (Abb. 42C, D).

#### 3.5.2 **mC1C2 und mC1C2-4aaC öffnen das Perineurium reversibel für hydrophile Wirkstoffe**

Die perineurale Injektion von 400 µM mC1C2 öffnete das Perineurium des *N. ischiadicus* von Ratten (Tab. 7) reversibel für die hydrophilen Wirkstoffe DAMGO und Tetrodotoxin (TTX). Den Wirkstoffen ist gemeinsam, dass sie zwar die Schmerzwahrnehmung hemmen, aber nicht-perineuriumgängig sind. DAMGO ist ein µ-Opioid-Rezeptor Agonist; TTX bindet und blockiert hochaffin spannungsabhängige Natrium-Kanäle. Eine gesteigerte Durchlässigkeit des Perineuriums vom *N. ischiadicus* für DAMGO oder TTX resultiert daher in einer erhöhten Pfotendruckschwelle der Ratten. Die perineurale Injektion des Lösungsmittels (0,9% NaCl, Kontrolle) oder 400 µM mC1C2 erhöhten die Druckschwelle bis zu 96 h nach Administration nicht (Tab. A21). Signifikante Erhöhungen konnten erzielt werden, wenn 48-72 h nach mC1C2-Injektion DAMGO (195 µM; Abb. 43A) oder 24-48 h nach mC1C2-Injektion TTX (10 µM; Abb. 43) perineural appliziert wurden. In der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 43A-C) und den mC2C2-behandelten Proben (Abb. 43C) kam es nach DAMGO- der TTX-Injektion nicht zu Änderungen der Druckempfindlichkeit. 96 h nach Applikation von mC1C2 unterschieden sich die Pfotendruckschwellen nach DAMGO-Gabe nicht von der Kontrolle (Abb. 43A). Das in Zellkulturversuchen nicht die parazelluläre Permeabilität erhöhende Peptid mC1C2-4aaN (gegenüber mC1C2 N-terminal um 4 Aminosäuren verkürzt) zeigte auch *in vivo* keine barriereöffnende Wirkung (Abb. 44): 24-48 h nach perineuraler Injektion von 400 µM kam es nach Administration von DAMGO (195 µM) nicht zur Steigerung der Druckschwelle (Abb. 44A). Im Gegensatz dazu bewirkte mC1C2-4aaC (aus der mC1C2-Wirkoptimierung hervorgegangen) 24-48 h nach perineuraler Injektion (400 µM) einen signifikanten Anstieg der Pfotendruckschwelle nach DAMGO Gabe (197 µM; Abb. 44B, C).

mC1C2-4aaC und mC1C2-4aaN führten allein nicht zur Erhöhung der Pfortendruckempfindlichkeit.



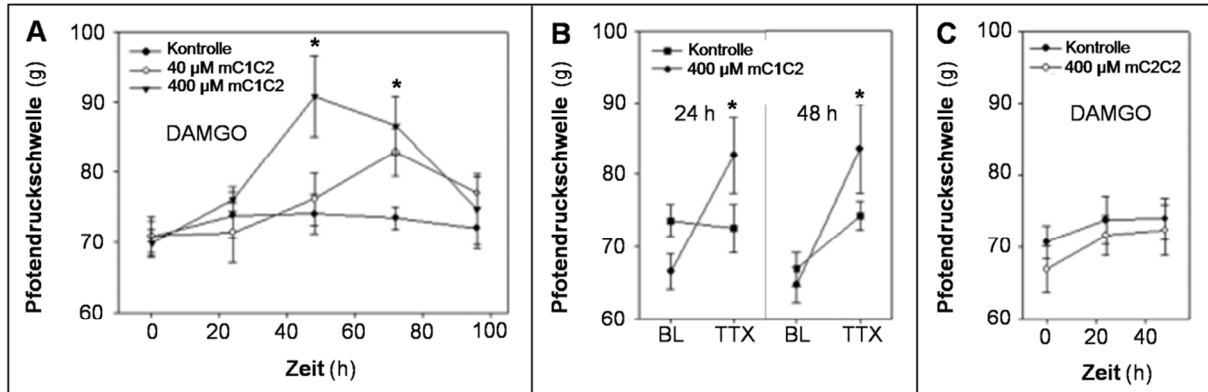
**Abb. 42 Stabilität und Abbauprodukte von mC1C2 in Blutplasma.** 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (TAMRA-SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLN<sub>1</sub>STLQATR-NH<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M, 3,5 kDa) wurde bei 37 °C für bis zu 48 h in (A, B) Blutplasma (Ratte) oder (C, D) Wasser inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Fluoreszenzsignal von TAMRA detektiert. Es konnte eine zeitabhängige Reduktion des TAMRA-mC1C2 Signals im (A, B) Blutplasma, nicht aber im (C, D) Wasser beobachtet werden. (B) Quantifizierung des TAMRA-mC1C2 Signals zur Bestimmung der Peptid-Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und massenspektrometrisch detektierte Abbauprodukte: TAMRA-SSVSQSTGQIQS KVFDLNLN (Zeitpunkt der erstmaligen massenspektrometrischen Detektion: 2 h), TAMRA-SSVSQSTGQIQS (16 h), TAMRA-SSVSQSTGQIQ (24 h).

### 3.5.3 mC1C2 und mC1C2-4aaC verringern die perineurale Claudin-1-Expression, erhöhen die Durchlässigkeit für große Moleküle und koloalisieren mit Claudin-1

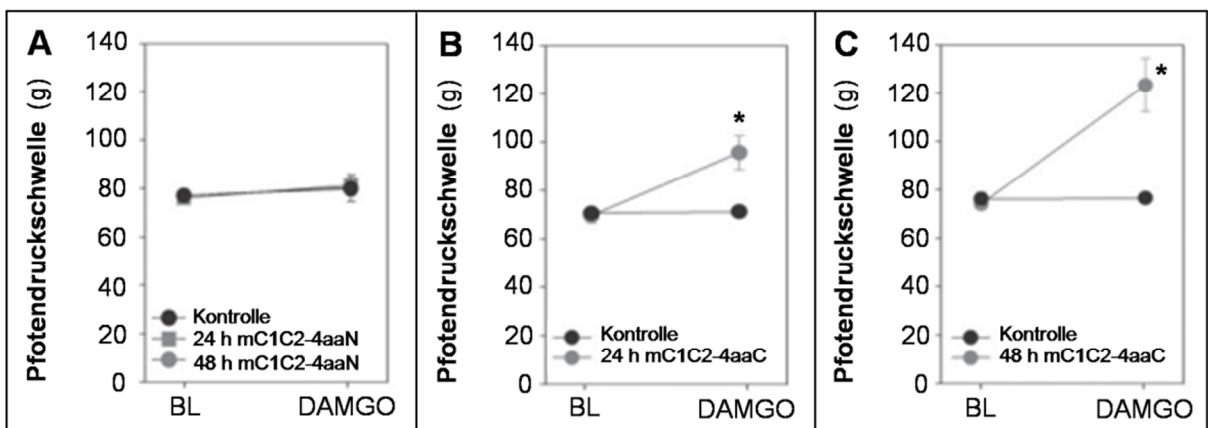
24 h nach perineuraler Administration von 400  $\mu$ M mC1C2 (Abb. 45A) bzw. 48 h nach mC1C2-4aaC (Abb. 45B) konnte eine deutliche Abnahme des perineuralen Cld1-Signals (grün) im *N. ischiadicus* detektiert werden. Die Reduktion war reversibel, da Cld1 sieben Tage nach der mC1C2-Behandlung wieder im Perineurium detektierbar war. Das Kontrollpeptid mC2C2 (400  $\mu$ M) verringerte die Cld1-Signal nicht (Abb. 45C). Die Reduktion von Cld1 nach mC1C2 und mC1C2-4aaC Behandlung wurde durch eine verstärkte perineurale *ex vivo* Durchlässigkeit für das Markerprotein *Evan's blue albumin* (EBA, 70 kDa) begleitet (Abb. 45D, E). Die Behandlung mit mC2C2 führte nicht zur erhöhten Permeation von EBA ins Endoneurium (Abb. 45F).

Die Untersuchungen zum Verbleib von mC1C2 nach perineuraler Injektion erfolgten mit TAMRA-mC1C2 (rot; (Abb. 45G). Bis zu 48 h nach Applikation von TAMRA-mC1C2 konn-

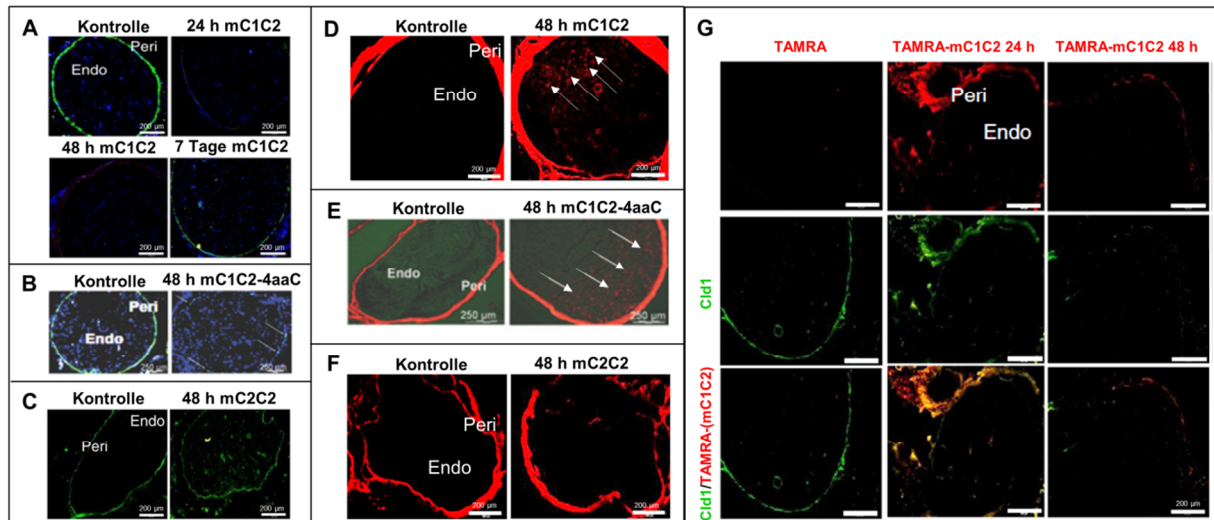
te eine starke Kolo­kalisierung mit Cld1 (grün) im Perineurium detektiert werden (Abb. 45G), wobei nach 48 h eine deutliche Reduktion der Cld1- und TAMRA-mC1C2 Signalintensität zu beobachten war. TAMRA allein zeigte keine Anreicherung am Perineurium, kolo­kalisier­te nicht mit Cld1 und führte auch nicht zur Reduktion der Cld1-Signalintensität (Abb. 45G).



**Abb. 43** mC1C2 erhöht reversibel die Durchlässigkeit des Perineuriums vom *N. ischiadicus* bei Ratten für nicht-perineuriumgängige Analgetika. Perineural wurden je 300 µl 0,9% NaCl (Kontrolle), 40-400 µM mC1C2 oder 400 µM mC2C2 (300 µl) appliziert. Bis zu 96 h nach Peptidadministration wurde die Pftendruckschwelle unmittelbar vor und 10 min nach perineuraler Injektion von 100 µl des (A, C) µ-Opioid-Rezeptor Agonisten [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO, 195 µM) oder (B) des Natriumkanal-Blockers Tetrodotoxin (TTX, 10 µM) ermittelt; BL, Pftendruckschwelle vor TTX Administration. Die perineurale Injektion von mC1C2 oder mC2C2 allein erhöhte die Pftendruckschwelle nicht (Tab. A21). Eine Erhöhung der Pftendruckschwelle konnte (A) 48-72 h nach mC1C2-Behandlung durch die Administration von DAMGO und (B) 24-48 h nach mC1C2-Behandlung durch die Administration von TTX erzielt werden. (C) Nach mC2C2-Administration führte DAMGO nicht zur Erhöhung der Pftendruckschwelle. n=6; Mittelwert±SEM; ANOVA mit Dunnett-Test; \*, p<0,05.



**Abb. 44** Das wirkoptimierte Peptid mC1C2-4aaC erhöht die Durchlässigkeit des Perineuriums vom *N. ischiadicus* von Ratten für nicht-perineuriumgängige Analgetika. Perineural wurden je 300 µl 0,9% NaCl (Kontrolle), 400 µM mC1C2-4aaN (gegenüber mC1C2 N-terminal um 4 Aminosäuren verkürzt) oder mC1C2-4aaC (gegenüber mC1C2 C-terminal um 4 Aminosäuren verkürzt) injiziert. Die Pftendruckschwelle wurde 24-48 h nach Peptidadministration unmittelbar vor (BL) und 10 min nach perineuraler Injektion von 100 µl des (A-C) µ-Opioid-Rezeptor Agonisten [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO, 195 µM) ermittelt. (A) 24-48 h nach Administration von mC1C2-4aaN wurde die Pftendruckschwelle durch das Peptid (BL) oder die zusätzliche Gabe von DAMGO nicht erhöht. (B, C) mC1C2-4aaC erhöhte die Druckschwelle bis zu 48 h nach Administration nicht (BL); die zusätzliche Gabe von DAMGO erhöhte die Druckschwelle signifikant gegenüber der Kontrolle. n=6; Mittelwert±SD; Two-Way-RM-ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test; \*, p<0,05.

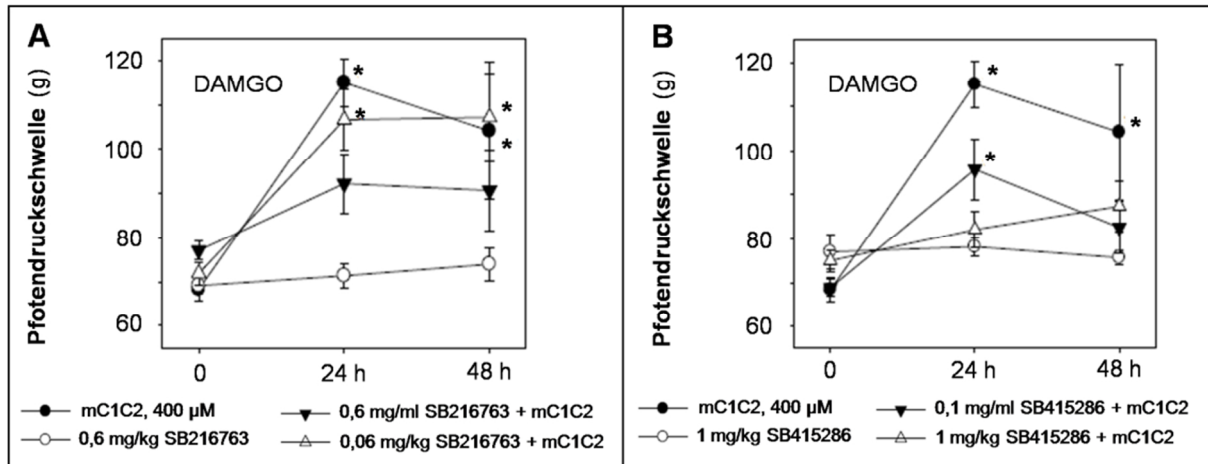


**Abb. 45** mC1C2 und mC1C2-4aaC verringern die perineurale Claudin-1-Expression und erhöhen dessen Durchlässigkeit für *Evan's blue albumin*. Am *N. ischiadicus* von Ratten wurden perineural 0,9% NaCl (Kontrolle), 400  $\mu$ M mC2C2 (Kontrollpeptid), 400  $\mu$ M mC1C2 oder mC1C2-4aaC (gegenüber mC1C2 C-terminal um 4 Aminosäuren verkürzt) (je 300  $\mu$ l) appliziert. (A-C) 24 h bis 7 Tage nach Administration immunhistochemisch die Expression von Claudin-1 (Cld1, grün) im Perineurium (Peri) oder (D-F) 48 h nach Administration die Durchlässigkeit für *Evan's blue albumin* (EBA, 70 kDa, rot) ins Endoneurium (Endo) bestimmt. (A-C) Im Gegensatz zu mC2C2 verringerten mC1C2 und mC1C2-4aaC die Cld1-Expression im Perineurium und (D-F) erhöhten die EBA-Durchlässigkeit (Pfeil) des Perineuriums *ex vivo*. (G) 24-48 h nach perineuraler Administration von 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 (rot) konnte eine starke Kolokalisation zwischen Peptid und perineuralem Cld1 (grün) detektiert werden; 48 h nach Peptidadministration war das Cld1-Signal stark reduziert; die Peptidmarkierung TAMRA kolokalisierte nicht mit Cld1 und führte nicht zur Reduktion der Cld1-Signalintensität. Zellkerne, Diamidinphenylindol (blau). Maßstab, A, C, D, F, G, 200  $\mu$ m; B, E, 250  $\mu$ m.

### 3.5.4 Die Wirkung von mC1C2 kann durch die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3-Aktivität aufgehoben werden

Die GSK-3 wurde in vorangegangenen Studien als ein wichtiger Regulator der parazellulären Permeabilität identifiziert [170-172]. Die Rolle der GSK-3 in der mC1C2-vermittelte Öffnung der parazellulären Barriere wurde mit den GSK-3-Inhibitoren SB216763 und SB415286 untersucht (Abb. 46). Hierzu wurde den Ratten entweder nur der Inhibitoren intraperitoneal injiziert oder mC1C2 perineural injiziert oder eine Kombinationsbehandlung aus Inhibitor (intraperitoneal) und mC1C2 (perineural) durchgeführt. Eine signifikante Erhöhung der Pfotendruckschwelle konnte erzielt werden, wenn 24-48 h nach mC1C2 Injektion DAMGO perineural injiziert wurden (195  $\mu$ M; Abb. 46A). Im Gegensatz dazu verhinderten die systemisch applizierten GSK-3-Inhibitoren SB216763 und SB415286 konzentrationsabhängig die Erhöhung der Pfotendruckschwelle nach DAMGO-Administration. Die Inhibitoren allein erhöhten die Pfotendruckschwelle nicht.

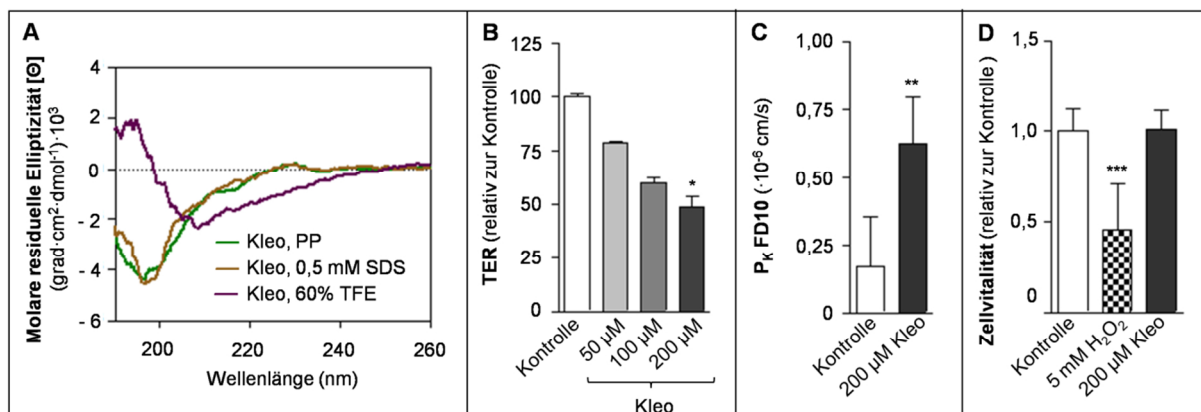




**Abb. 46 Die Blockierung der Glykogensynthese-Kinase-3 hebt die mC1C2-vermittelte Öffnung der Perineuriums auf.** Ratten wurden intraperitoneal mit **(A)** SB216763 ( $\leq 0,6$  mg/kg Körpergewicht), **(B)** SB415286 ( $\leq 1$  mg/kg Körpergewicht), **(A, B)** mit mC1C2 perineural am *N. ischiadicus* (400  $\mu$ M, 300  $\mu$ l, in 0,9% NaCl) oder in einer Kombination aus **(A)** SB216763 und mC1C2 bzw. **(B)** SB415286 und mC1C2, behandelt. Unmittelbar vor der mC1C2-Administration (0 h) sowie 24 h und 48 h später wurde nach perineuraler Injektion von 150  $\mu$ l des  $\mu$ -Opioid-Rezeptor Agonisten [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO, 390  $\mu$ M) die Pfotendruckschwelle ermittelt. SB216763 und SB415286 verminderten konzentrationsabhängig die Steigerung der Druckschwelle durch mC1C2. n=6; Mittelwert $\pm$ SEM; Two-Way-RM-ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test; \*, p $\leq 0,05$ .

### 3.6 Untersuchung eines nicht Claudin-abgeleiteten Peptids

Das aus 16 Aminosäuren bestehende Peptid Kloe zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Aminosäuren aus, die eine Präferenz zur  $\beta$ -Faltblattbildung besitzen bzw. seltener in  $\alpha$ -Helices als in  $\beta$ -Faltblattstrukturen vorkommen [177]. Mittels CD-Spektroskopie konnte die theoretisch hohe  $\beta$ -Faltblattneigung bestätigt werden (Abb. 47A). In PP wies Kloe einen  $\beta$ -Faltblattanteil von 66,9% auf. Dieser konnte durch die Zugabe von 0,5 mM SDS nur unwesentlich auf 67,6% erhöht werden. Interessanterweise bewirkten 60% TFE eine Steigerung des Faltblattanteils auf 77,9%, wobei der unstrukturierte Anteil auf 19,8% sank.



**Abb. 47 Struktur- und Funktionsuntersuchung eines nicht Claudin-abgeleiteten Peptids.** **(A)** Die Sekundärstrukturneigung vom Kloe-Peptid wurde in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,4), in PP mit 0,5 mM SDS ( $\beta$ -Faltblattinduktion) oder in PP mit 60% Trifluorethanol (TFE,  $\alpha$ -Helix induzierend) mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie untersucht und der Anteil der Sekundärstrukturelemente mittels Referenzspektren ermittelt

---

[157]); mit SDS ließ sich der hohe  $\beta$ -Faltblattanteil in PP (66,9%) nur minimal erhöhen (67,6%); mit TFE ließ sich keine  $\alpha$ -Helix induzieren, der Faltblattanteil aber auf 77,9% steigern; n=8 Akkumulationen; Mittelwert $\pm$ SD. **(B-D)** Caco-2-Zellen wurden apikal mit 50-200  $\mu$ M Kloe-Peptid behandelt und 24 h nach Inkubationsbeginn der **(B)** transzelluläre elektrische Widerstand (TER), n $\geq$ 3, **(C)** die parazelluläre Durchlässigkeit für Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran (FD10, 10 kDa), n $\geq$ 5, und **(D)** die Zellvitalität im Vergleich zu peptidfrei kultivierten Zellen (Kontrolle) bestimmt; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Positivkontrolle; n $\geq$ 3. Das Peptid verringerte den TER konzentrationsabhängig, erhöhte die parazelluläre FD10 Durchlässigkeit und führte zu keinen Zellschädigungen. Mittelwert $\pm$ SD; Mann-Whitney U Test; \*, p $\leq$ 0,05; \*\*, p $\leq$ 0,01; \*\*\*, p $\leq$ 0,001.

---

Die 24-stündige Inkubation von Caco-2-Zellen führte konzentrationsabhängig zur Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit (Abb. 47B). So reduzierten 50  $\mu$ M den TER um 22 $\pm$ 1%, 100  $\mu$ M um 40 $\pm$ 3% und 200  $\mu$ M um 51 $\pm$ 5%. Permeationsmessungen mit FD10, 24 h nach Behandlung mit 200  $\mu$ M Peptid, ergaben eine 3,6-fach erhöhte Durchlässigkeit (0,62 $\pm$ 0,17 $\cdot$ 10<sup>-6</sup> cm/s) im Vergleich zu Zellen ohne Peptidbehandlung (0,17 $\pm$ 0,19 $\cdot$ 10<sup>-6</sup> cm/s) (Abb. 47C). Die beobachteten Effekte waren nicht auf eine zellschädigende Wirkung des Peptids zurückzuführen (Abb. 47D).

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Design Claudin-abgeleiteter Peptidomimetika und ihre Wirkung auf die Dichtheit von Zellbarrieren *in vitro*

Für die Untersuchung der Wirkung von Cld-Peptiden auf die parazelluläre Dichtheit wurden Peptidomimetika der EZS1 und -2 von murinem Cld1-5 hergestellt. Die EZS1 aller Claudine verfügen über ein hochkonserviertes Sequenzmotiv mit zwei Cysteinen (murin C54, C64), die in der zweiten Hälfte der EZS1 lokalisiert sind (Abb. 6). Diese Cysteine bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke [61, 83], welche elementar für die Abdichtungsfunktion der Claudine ist [66, 73]. Zur Erleichterung der Peptidsynthese und Verhinderung unspezifischer Wechselwirkungen wurden jedoch nur EZS1-Peptidomimetika entworfen, bei denen die Cysteine C54 und C64 durch Serine ersetzt wurden. Von den getesteten EZS1-Peptiden verringern das Cld1-abgeleitete Peptid mC1C2 und die C-terminal um vier bzw. fünf Aminosäuren verkürzten Derivate mC1C2-4aaC und mC1C2-5aaC die parazelluläre Dichtheit von Epithel- und Endothelzellen *in vitro*. mC1C2 steigert hierbei reversibel die parazelluläre Durchlässigkeit für kleine (0,4 kDa) und größere (10 kDa) hydrophile, membranimpermeable Moleküle. Die Wirksamkeit der EZS1-Peptide unterstützt die Annahme, dass die EZS1 für die spezifische Abdichtungsfunktion der Claudine [56] wichtig ist. Ein Cld1-EZS1-Peptid einer anderen Studie zeigt ebenfalls eine barrieremodulierende Wirkung [178]. Auch in diesem Peptid sind die Cysteine durch Serine ersetzt. Die EZS1-Cysteine der Claudine sind demnach zwar essenziell für die parazelluläre Abdichtung der Claudine, nicht aber für die Wirkung von Cld-Peptidomimetika. Die Erhöhung der Permeation durch Peptide deckt sich mit Untersuchungen zum *knockout* von Cld5 in der BHS [179] oder Cld1 im Perineurium [14], bei denen ebenfalls eine reversible Erhöhung der Permeation hydrophiler, normalerweise membranundurchlässiger Moleküle beobachtet wird. Demnach kann von einer Modulation der Claudine durch Cld-Peptidomimetika ausgegangen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten EZS2-Peptide führen nicht zur Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit, obwohl sie mehrere Aminosäuren beinhalten, die an der TJ-Strangformation, *trans*-Interaktionen und der Abdichtungsfunktion der klassischen Claudine beteiligt sind [80, 131]. Ein Teil dieser Aminosäuren ist Bestandteil des konservierten EZS2-Sequenzmotivs DFYNP. Obwohl die EZS2-Peptide u.a. auch dieses Sequenzmotiv enthalten (Cld3, -4: DFYNP; bzw. Cld1/5: EFYDP; Cld2: DFYSP; Tab. 10), führt keines dieser Peptide zur Erhöhung der Barrieredurchlässigkeit in Caco-2-Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, bei der ein ebenfalls aus dem kompletten Cld-EZS2

abgeleitetes Peptid keine barrieremodulierende Wirkung aufweist [178]. Baumgartner et al. (2011) kann hingegen zeigen, dass Peptide, die lediglich aus dem konservierten Sequenzmotiv DFYNP bestehen, zur Reduktion der Dichtigkeit in Epithelzellen führen [180].

Die Diskrepanz der barrieremodulierenden Eigenschaften zwischen dem DFYNP-Peptid und der EZS2-Peptide der vorliegenden Arbeit könnte an den verwendeten Zellmodellen liegen. Die Testung der EZS2-Peptide wurde an Caco-2-Zellen vorgenommen. Diese sind ein etabliertes Zellmodell für die Untersuchung von Transportprozessen oder der pharmakologischen Modulation von Zellbarrieren [181]. Mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung kann die Expression von Cld1-5 in den Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. Diese Cld-Komposition stimmt mit Literaturdaten überein [162, 163], allerdings wird die Existenz von Cld5 nicht immer bestätigt [6]. Für die DFYNP-Peptidstudie [180] wurden Eph4-Zellen verwendet, die Cld3, -4, -1 (sehr schwach) und weder Cld2 noch -5 exprimieren [182]. Möglicherweise spielt demnach die Cld-Zusammensetzung der verwendeten Zellmodelle eine Rolle für die Wirkung der getesteten Peptide.

Aufgrund seiner Kürze zeigt DFYNP eine hohe Sequenzübereinstimmung mit anderen humanen Proteinen (Proteinsequenzvergleich mit *protein data bank*-Einträgen zu: *human* (taxid:9606); <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Neben den Claudinen könnten deshalb durch DFYNP auch andere Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Diese Vermutung wird durch den Befund unterstützt, wonach die barriereöffnende Wirkung des DFYNP-Peptids mit der Apoptose der Zellen einhergeht [180].

Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten EZS2-Peptide eine Konformation ausbilden, die ihre Interaktion mit den Cld-Zielproteinen unterbindet. Im Cld-Protein nehmen auch die Transmembrandomänen Einfluss auf die EZS-Struktur. Die EZS2-Peptide wurden ohne Transmembrandomänen hergestellt. Untersuchungen zur Bindung von C-CPE an immobilisierten EZS2-Peptiden bestätigen diese Vermutung [133]. C-CPE bindet dabei stark an die EZS2 von Cld3, nicht aber an die EZS2 von Cld4, obwohl beide Proteine Bindungspartner von C-CPE sind [133].

#### 4.1.1 Effekt von mC1C2 auf Claudine

Claudin-Lokalisation: Zur Klärung, ob Claudine in ihrer Lokalisation von mC1C2 beeinflusst werden, sind Zellen mit unterschiedlicher Cld-Ausstattung [6, 80] verglichen worden: neben den schon oben beschriebenen epithelialen Caco-2-Zellen waren dies MDCK-II- und HEK-293-Zellen sowie die endothelialen bEnd5 und pMBMECs. MDCK-II-Zellen exprimieren Cld1-4, bEnd5-Zellen Cld5 und die pMBMECs Cld3 und -5. Identische Cld-

Expressionsmuster werden für MDCK-II [86, 161], bEnd5 [160] und pMBMECs [165, 166] auch von anderen berichtet. Für die Untersuchung des Einflusses von mC1C2 auf einzelne Cld-Subtypen wurden Cld-monotransfizierte HEK-293-Zellen verwendet, die endogen keine Claudine exprimieren [80]. Nach Transfektion reichern sich die C-terminal mit YFP markierten Claudine 1-5 TJ-artig im bizellulären Kontakt zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen an. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Studie zur molekularen Organisation von Cld1, -3 und -5, in der diese eine vergleichbare Zelllokalisierung zeigen [79].

Das Peptid mC1C2 bewirkt eine Reduktion der Plasmamembranlokalisierung der endogen exprimierten TJ-Proteine Cld1-5, Occ und Tric. Western Blot-Analysen zeigen jedoch, dass die Cld-Menge gegenüber den Kontrollen nicht reduziert ist. Die Absenkung des TER durch mC1C2 kann daher auf eine Umverteilung der Claudine zurückgeführt werden. Diese Annahme wird durch Befunde unterstützt, wonach die Stärke der Barriereöffnung mit der Stärke der Cld1-Dislokalisierung korreliert und die Änderung der Cld1-Lokalisation zeitlich mit der Verringerung der Barriere­dichtheit übereinstimmt. Dabei ist die Modulation der TJs kein sekundärer Effekt, der auf einer zellschädigenden Wirkung des Peptids beruht. Denn die mC1C2-behandelten Zellen unterscheiden sich in ihrer Vitalität nicht von den Kontrollen und der Effekt des Peptids, sowohl in Bezug auf die parazelluläre Dichtheit, als auch auf die Cld-Verteilung, ist reversibel.

Es ist zu erwähnen, dass die Cld1-Lokalisierung in den verwendeten Caco-2-Zellen z.T. sehr diffus erscheint und nicht ausschließlich auf die TJs begrenzt ist (Abb. A54). Ähnliche Beobachtungen beschreibt Amasheh et al. (2002), wonach sich die Cld1-Lokalisierung mit zunehmender Expressionsstärke auch auf Plasmamembranareale außerhalb der TJs ausweitet [68].

Direkte und indirekte Beeinflussung der Claudine: Die Modulation der Claudine durch mC1C2 kann, sowohl durch eine direkte, als auch durch eine indirekte Wirkung des Peptids auf die Claudine erklärt werden. Die Hypothese einer direkten Wirkung wird durch (1.) Interaktionsstudien unterstützt, wonach Cld1 mit Cld3 und -5 innerhalb einer Plasmamembran (*cis*) und auch zwischen Plasmamembranen zweier Zellen (*trans*) wechselwirkt [79]. Daneben ist (2.) die Bindung eines Cld1-Peptids an Cld1 und -3 sowie deren veränderte zelluläre Lokalisation beschrieben [178]. Auch stammt (3.) das Peptid mC1C2 aus dem EZS1-Bereich, für den z.B. in Cld19 eine Interaktion zwischen der Aminosäure Q57 des einen Moleküls mit Q61 und Q63 des anderen Cld19-Moleküls postuliert wird (in mC1C2 Q5, Q9, Q11) [183]. Aufgrund der Konservierung der beteiligten Aminosäuren zwischen Cld1 und -19 (Abb. 6) wird diese Interaktion auch für Cld1 angenommen. Das wird im Rahmen dieser Arbeit mittels Cld-monotransfizierter HEK-293-Zellen bestätigt, die eine direkte Beeinflussung von Cld1 und -5

durch mC1C2 zeigen. In Cld1-exprimierenden Zellen wird die stärkste Änderung der Cld-Plasmamembranlokalisation beobachtet; für Cld5 ist diese schwächer. Im Gegensatz dazu zeigen Cld2, -3 und -4 exprimierende HEK-293-Zellen keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen. Demnach wirkt mC1C2 stark auf Cld1 und weniger stark auf Cld5. Cld2, -3 und 4 werden dagegen nicht direkt durch das Peptid beeinflusst.

Auf der anderen Seite liegt möglicherweise eine indirekte Wirkung des Peptids vor, bei der durch Bindung von Cld1 auch andere TJ-Proteine moduliert werden. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass Cld1 mit Cld3 und -5 heterophil, sowohl in *cis*, als auch in *trans*, interagieren kann [79]. Daneben wechselwirkt Cld1 stark in *cis* mit Occ [92] und ein *knockdown* von Cld1 kann den Transport von Occ zur Plasmamembran stören [184]. In den pMBMECs, welche Cld1, -2 und -4 nicht exprimieren [165, 166], ist die Plasmamembranlokalisation von Cld3 und -5 nur leicht reduziert, wohingegen Occ komplett zytosolisch vorliegt. Da Cld1 in diesen Zellen nicht vorhanden ist, wird der Occ-Effekt möglicherweise durch Cld3 und/oder -5 vermittelt. So unterstützt Cld5 die *trans*-Interaktion zwischen Occ-Molekülen [92]. Daneben *cis*-interagiert Occ mit Cld2 und -4 [92], wodurch auch diese Claudine indirekt durch mC1C2 beeinflusst werden können. Das Cld2-abgeleitete Kontrollpeptid mC2C2 zeigt keinen Effekt auf die Barrieredichtheit der verwendeten Zellen und beeinflusst die zelluläre Lokalisation von keinem der untersuchten Claudine 1-5.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Bindungsmessungen unserer Arbeitsgruppe zwischen mC1C2 und Cld1-5 bzw. mC2C2 und Cld1 [83]. Demnach interagiert mC1C2 mit Cld1 mit einer Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von  $157 \pm 98$  nM, mit Cld5 mit  $K_d = 1113 \pm 391$  nM und mit Cld2-4 mit einem  $K_d > 2574$  nM [83]. Das Kontrollpeptid mC2C2 bindet mit einer sehr geringen Affinität an Cld1 ( $K_d > 12000$  nM). Die Bindung von mC1C2 an Cld5 erklärt die reduzierte Plasmamembranlokalisation von Cld5 in Cld1-freien pMBMECs. Da Cld5 und -3 heterophil in *trans* interagieren, kann dadurch auch Cld3 indirekt moduliert werden [79]. Die sehr geringe Affinität von mC2C2 zu Cld1 bestätigt hingegen den Befund, dass es in seiner Plasmamembranlokalisation nicht durch das Kontrollpeptid beeinflusst wird.

mC1C2 öffnet Gewebe und Zellbarrieren für kleine und große Moleküle. Da Cld5 die parazelluläre Barriere gegenüber kleinen Molekülen abdichtet [76], müssen andere TJ-Proteine für die erhöhte Durchlässigkeit großer Moleküle nach mC1C2-Behandlung verantwortlich sein. Cld-Subtypen, die in den untersuchten Zellen exprimiert und durch mC1C2 beeinflusst werden, sind Cld1, -3 und -4. Für alle von ihnen liegen Literaturdaten vor, die eine Abdichtung gegenüber Molekülen  $\geq 4$  kDa nahelegen [64, 65, 71]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tric, welches unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in Drei-Zell-Kontakten

lokalisiert ist, die parazelluläre Permeation von großen Molekülen in Epithelzellen limitiert [48, 105]. Tric interagiert mit Cld1, -3, -4 und -5 und der *knockdown* von Cld1 resultiert in einer Umverteilung von Tric aus dem Drei-Zell-Kontakt hin zu einer bizellulären Verteilung [92]. Es muss daher angenommen werden, dass der Effekt von mC1C2 auf Cld1 (und Cld5) auch indirekt die Abdichtungsfunktion von Tric beeinträchtigt. Diese Annahme wird durch Änderungen der Lokalisation von Tric nach mC1C2-Behandlung in Caco-2-Zellen untermauert und könnte in ähnlicher Form auch in Endothelzellen stattfinden, da auch diese Tric exprimieren [185].

Aufgrund der diskutierten heterophilen Interaktionen ist es wahrscheinlich, dass eine Dislokation und Disregulation von Cld1 bzw. Cld5 die Funktion und Lokalisation der anderen TJ-Proteine indirekt beeinflusst.

#### 4.1.2 Einfluss von mC1C2 auf die *tight junction*-Morphologie

mC1C2 öffnet interendotheliale Kontakte, steigert die parazelluläre Durchlässigkeit und ändert die Cld-Lokalisation. Zur Beantwortung der Frage, ob mC1C2 TJ-Stränge modifiziert, wurden Cld-monotransfizierte HEK-293-Zellen mit mC1C2 behandelt und die TJ-Strangmorphologie untersucht.

In unbehandelten Cld1-monotransfizierten HEK-293-Zellen weist Cld1 kontinuierliche, mit der Plasmaseite der Membran (PF) assoziierte Stränge auf. Diese Beobachtung stimmt mit Literaturdaten [78] überein. In Cld5-monotransfizierten HEK-293-Zellen können hingegen diskontinuierliche, mit der Extrazellulärseite der Membran (EF) assoziierte Reihen von Partikeln detektiert werden. Auch dieses Ergebnis entspricht den Befunden anderer Studien [91]. Die Inkubation von Cld5-exprimierenden Zellen mit mC1C2 führt zur teilweisen Umwandlung von diskontinuierlichen EF-assoziierten Strängen hin zu kontinuierlichen PF-assoziierten Strängen. Außerdem ist die Partikeldichte zum Teil reduziert. Andere Studien zeigen, dass Substitutionen von einzelnen Aminosäuren in der EZS2 von Cld5 ebenfalls eine EF- zu PF-Umwandlung und zusätzlich eine verringerte Cld5-*trans*-Interaktion bewirken [80]. Verringerte Cld5-*trans*-Interaktionen resultieren wiederum in der beobachteten Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit und werden auch von anderer Stelle bestätigt [86]. Diese Beobachtungen sprechen für eine Bindung von mC1C2 an die EZS, wobei die für die *trans*-Interaktion und EF-Assoziation verantwortlichen Aminosäuren beeinflusst werden. Daten zur Bindung von mC1C2 an Cld5 bestätigen, dass das Peptid an Cld5 mit nanomolaren Bindungskonstanten interagiert [83]. Mit der vorliegenden Arbeit kann darüber hinaus die EZS1 als Bindungsareal identifiziert werden. Es muss daher angenommen werden, dass mC1C2 an

Cld5 bindet, dadurch die Cld5-Strangmorphologie verändert und dies die parazelluläre Dichtigkeit reduziert. Dies trifft für die überwiegend Cld5-exprimierenden pMBMECs und bEnd5, aber auch Caco-2-Zellen, welche Cld5 neben vielen anderen Cld exprimieren, zu.

In Cld1-exprimierenden Zellen erhöht mC1C2 die Anzahl paralleler TJ-Stränge sowie die Anzahl zisternenartiger Maschen. Außerdem bewirkt mC1C2 eine partielle Umwandlung von kontinuierlichen Strängen zu diskontinuierlichen Reihen von Partikeln. Da das Peptid mit höchster Affinität an die EZS1 von Cld1 bindet [83] und die EZS1 eine wesentliche Rolle in der parazellulären Abdichtung spielt [130], bedingt mC1C2 nach Cld1-Bindung eine Störung der *trans*-Interaktionen zwischen Cld1-Molekülen. Dies führt zur Modifikation der Cld1-Strangmorphologie und dadurch zur Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit. Die reduzierte Dichtigkeit der Cld1-exprimierenden Caco-2- und MDCK-II-Zellen nach mC1C2-Behandlung kann daher auf die veränderte Cld1-Strangmorphologie und -Lokalisation zurückgeführt werden.

Die Cld-Subtypen zeigen eine spezifische Morphologie der Cld-Stränge, z.B. kontinuierliche (Cld1) oder diskontinuierliche (Cld5) Reihen von Partikeln in der Plasmamembran (siehe oben). Möglicherweise können die morphologischen Unterschiede der Cld-Stränge mit dem unterschiedlichen Oligomerisierungsverhalten der Cld-Subtypen erklärt werden. So gibt es Hinweise, dass Cld5 in höheren Oligomerisierungszuständen als Cld1 vorliegt [186]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Änderungen der Cld5-Strangmorphologie von diskontinuierlichen EF-assoziierten Strängen hin zu kontinuierlichen PF-assoziierten Strängen, wie sie Cld1 bildet, reflektiert möglicherweise eine Verringerung des Oligomerisierungszustandes von Cld5. Da nur geringfügige Änderungen in der Ladung der EZS direkten Einfluss auf die Membranassoziation von Claudinen haben [80], muss davon ausgegangen werden, dass durch mC1C2 die Cld-Cld-Interaktionen gestört, die Komplexität der Cld-Stränge beeinträchtigt und dadurch letztlich die parazelluläre Abdichtung geschwächt wird.

#### 4.1.3 Zelluläre Aufnahme von mC1C2

Endozytoseweg: Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Wirkung von mC1C2 beeinflusst, ist die zelluläre Aufnahme des Peptids. mC1C2 wird innerhalb von 5 min in Epithelzellen internalisiert und zeitabhängig angereichert; eine Sättigung der Aufnahme beginnt nach ~6 h [151]. Die zelluläre Anreicherung von mC1C2 findet bei 6 °C nicht statt, so dass eine temperaturunabhängige Diffusion durch die Plasmamembran, wie für andere Peptide beschrieben [187], ausgeschlossen werden kann. Die Inkubation von Zellen bei 6 °C blockiert unspezifisch energieabhängige Prozesse, so dass z.B. die Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endo-



zytose nicht stattfindet [168]. Demnach muss mC1C2 in einem energieabhängigen Prozess aufgenommen werden.

Diese Annahme wird durch die Verwendung spezifischer Endozytose-Inhibitoren bestätigt. Abhängig von den experimentellen Bedingungen wird das Peptid hauptsächlich (a) Clathrin-vermittelt oder (b) Clathrin-vermittelt und über Makropinozytose und in geringerem Maße Caveolae-vermittelt internalisiert [143, 151]. Die Clathrin-vermittelte Endozytose des Peptids kann durch die Ko-Internalisierung mit Transferrin, einem Marker für diesen Endozytoseweg, zusätzlich bestätigt werden [151]. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Endozytosewege des mC1C2-Peptids stimmen mit der Endozytose von Cld1 überein, das, abhängig vom Stimulus (Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$ ), ebenfalls durch Clathrin [90] oder Caveolae-vermittelte [188] Endozytose oder Makropinozytose [87] internalisiert wird. Allerdings ist eine gegenseitige Beeinflussung der Endozytosewege nicht ausgeschlossen, bei der die Blockierung eines Internalisierungsweges zur stärkeren Nutzung eines anderen führt [88].

Die Beobachtung, dass mC1C2 über identische Endozytosewege wie Cld1 in die Zelle aufgenommen wird, deutete darauf hin, dass das Peptid an Cld1-gebunden internalisiert wird. Diese Annahme kann durch Versuche bestätigt werden, wonach mC1C2 wesentlich stärker in Cld1-exprimierenden Zellen aufgenommen wird und dort zum Teil in Kollokalisierung mit Cld1 in intrazellulären Vesikeln vorliegt. Da das Peptid jedoch auch unabhängig von Cld1 in die Zellen gelangt und in geringem Umfang auch in Cld-freien oder Cld2, -4 und -5 exprimierenden Zellen internalisiert, findet in begrenztem Umfang auch eine Internalisierung ohne Cld1 statt. Das Kontrollpeptid mC2C2 wird in Zellen signifikant schwächer als mC1C2 aufgenommen. Diese Beobachtung deckt sich mit den ermittelten Dissoziationskonstanten zwischen mC2C2 und Cld1 ( $K_d > 12000$  nM) sowie mC1C2 und Cld1 ( $K_d 157 \pm 98$  nM) [83].

Subzelluläre Lokalisation: Nach der Internalisierung des Cld-Peptid-Komplexes kann dieser verschiedene subzellulären Kompartimenten durchlaufen, zu denen u.a. frühe Endosomen, Rezyklosomen und späte Endosomen/Lysosomen gehören [189]. Untersuchungen zum Verbleib von mC1C2 und Cld1 nach Internalisierung zeigen, dass in den ersten 15 min nach Peptidadministration ein Teil von mC1C2 mit Cld1 und Rab5 kollokalisiert. Rab5 ist ein Marker für frühe Endosomen [190]. mC1C2 und Cld1 verbleiben dann für  $\geq 2$  h in Rezyklosomen (Markerprotein Rab4 [191]). Ein anderer Teil des Peptids durchläuft diesen Endozytoseweg ohne Cld. Entweder weil diese mC1C2-Fraktion nicht zusammen mit Cld1 in die Zelle aufgenommen wurde oder weil es zur Trennung des Cld-mC1C2-Komplexes kam. Ein Großteil des Peptids liegt also nach Administration für  $\geq 2$  h in verschiedenen endozytischen Komparti-

---

menten vor und steht für strukturelle, morphologische und funktionelle Effekte nicht zur Verfügung. Gleichzeitig kann diejenige Cld1-Fraktion, welche die verschiedenen Endozytose-Kompartimente durchläuft, nicht in die TJs eingebaut werden und ihre Abdichtungsfunktion ausführen. Andere Studien bestätigen, dass Claudine nach ihrer Internalisierung nicht zwangsläufig degradiert, sondern häufig in Rezyklosomen vorliegen, wodurch sie für die Rekonstitution der TJs zu Verfügung stehen [87, 90]. Nach 24 h Inkubation sind mC1C2 und Cld1 in späten Endosomen/Lysosomen angereichert (Markerprotein Rab7 [192]). Die verstärkte Lokalisation vom Cld1-Protein in späten Endosomen/Lysosomen nach 24 h stimmt mit der maximalen TER-Absenkung ab 24 h Peptidinkubation überein.

*Knockdown*-Experimente, in denen die Expression von Rab4, -5 oder -7 mit siRNA reduziert wurden, bestätigen die Lokalisation von mC1C2 in den Endosomen. Daneben zeigen die siRNA-Experimente, dass die mC1C2-Internalisierung durch das Fehlen von Rab5 blockiert wird bzw. durch das Fehlen von Rab4 das Recycling von mC1C2 unterbunden wird. Diese Beobachtungen entsprechen Befunden anderer Studien, in denen die Transferrin-Endozytose untersucht wurde. Transferrin wird wie mC1C2 Clathrin-abhängig endozytiert und unterliegt einem Recycling [168]. Durch Rab-Mutanten kann ebenfalls dessen Endozytose [193] bzw. Recycling unterbunden werden [194].

Erst ab  $\geq 5$  h ist eine leichte und nach 24 h eine deutliche mC1C2-Anreicherung in den Cld-Kontakten zu beobachten. Daher ist erst ab  $\geq 5$  h Inkubation der Zugang von mC1C2 innerhalb der Cld-Kontakte möglich. In den ersten Stunden nach mC1C2-Administration ist auch nicht von einer Bindung des Peptids an die Claudine innerhalb der bizellulären Kontakte auszugehen, da diese hochmolekular organisiert sind, relevante Bindungsstellen der EZS1 und -2 blockiert sind und der parazelluläre Spalt aufgrund der Cld-vermittelten Abdichtungsfunktion nicht für Moleküle durchdrungen werden kann [79]. Stattdessen bindet mC1C2 zunächst wahrscheinlich, wie auch für C-CPE gezeigt [133], an Claudine außerhalb der TJs und stört die Inkorporation dieser in die bizellulären Kontakte bzw. deren Funktion innerhalb der TJs. Der Befund, dass mC1C2 erst nach mehreren Stunden eine Anreicherung an die Cld-Kontakte zeigt, wird durch Untersuchungen zur Mobilität von Cld1 in der Plasmamembran unterstützt. 5 h nach mC1C2-Administration ist die Cld1-Plasmamembranmobilität ( $\sim 37\%$ ) nur sehr leicht gegenüber der Kontrolle ( $\sim 30\%$ ) erhöht. Die mobile Cld1-Fraktion der Kontrollzellen mit  $\sim 30\%$  deckt sich mit den Beobachtungen anderer [92]. Neben der geringen mobilen Fraktion besitzt Cld1 eine hohe Halbwertszeit von  $\sim 7$ -16 h [195]. Cld1 liegt daher sehr stabil und in geringem Maße frei beweglich in den TJs vor und es benötigt  $\geq 5$  h bis ein hinreichender Austausch von Cld1-Komplexen gegen Cld1-mC1C2-Komplexe stattgefunden hat bzw. ein

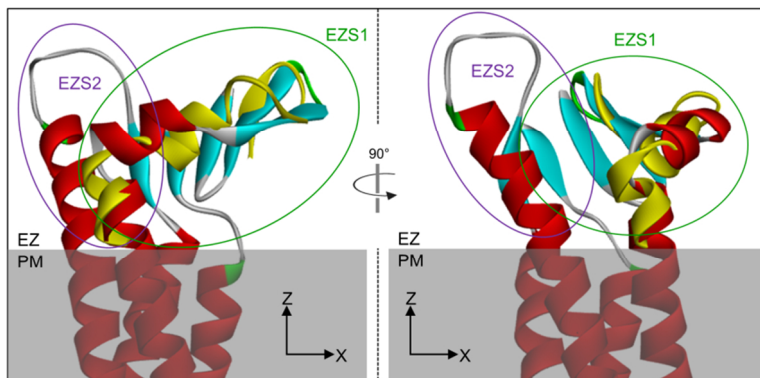
mangelnder Nachschub von Cld1 die Barrierefunktion beeinträchtigt. Letzteres wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich schon wenige Minuten nach Peptidgabe Cld1 in den Rezyklosomen (Rab4-positiv) befindet und dort für  $\geq 2$ h verbleibt. In Übereinstimmung mit der nur geringfügig erhöhten mobilen Cld1-Fraktion nach 5 h, kommt es erst ab  $>6$  h zur Reduktion der parazellulären Abdichtung und maximalen Peptidaufnahme. Auch das Peptid C-CPE, welches u.a. an Cld3 und -4 bindet [133], führt erst nach  $>6$  h Inkubation zur Verringerung des TER (persönliche Mitteilung Dr. L. Winkler) [133].

Insgesamt erklärt der beschriebene Internalisierungsmechanismus von mC1C2, warum die Öffnung der TJs ab  $\geq 6$  h stattfindet. Darüber hinaus verdeutlicht die Anreicherung des Peptids in Endosomen, warum mC1C2 erst ab  $200 \mu\text{M}$  deutliche Effekte zeigt, obwohl es hochaffin an Cld1 bindet. Die Beobachtungen, dass die Internalisierung des Peptids und Cld1 innerhalb von Minuten stattfindet und erst nach Stunden eine Reorganisation der TJ-Stränge initialisiert wird, bestätigen orientierende Auswaschexperimente (Abb. A55). Nach Inkubation von mC1C2 für 1 h oder 6 h und anschließendem Auswaschen des Peptids ist nach 24 h eine leichte Reduktion des TER zu beobachten. Die 1-6 h Inkubation mit mC1C2 ist allerdings nicht ausreichend, um TER-Absenkungen wie nach 24 h Inkubation zu erzielen und steht damit in Übereinstimmung mit den oben diskutierten Befunden.

#### 4.1.4 mC1C2-Struktur und -Interaktion mit Claudin-1

3D-Struktur von mC1C2: Die CD-spektroskopische Analyse der Cld1-EZS1-Peptide zeigt eine Neigung dieser zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix und eine spezifische Verteilung der Sekundärstrukturelemente innerhalb der Peptide. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen damit die EZS-Sekundärstrukturvorhersage einer früheren Studie [132], wonach *N*-terminal bis zentral ein  $\beta$ -Faltblatt- und *C*-terminal eine  $\alpha$ -Helixneigung vorliegt. Das Kontrollpeptid mC2C2 verfügt im Vergleich zu mC1C2 über eine geringere Neigung zur Ausprägung von  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix. Beide Peptide weisen in Phosphatpuffer sehr ähnliche Anteile von unstrukturierten Anteilen und Faltblattelementen auf, doch können durch Zugabe der sekundärstrukturinduzierenden Agenzien SDS oder TFE deutliche Unterschiede in der Sekundärstrukturneigung der Peptide beobachtet werden. Die Konformation des mC1C2-Peptids ist somit sehr flexibel und wird möglicherweise erst durch die Wechselwirkung mit den Bindungspartnern Cld1 oder Cld5 in seiner Orientierung stabilisiert. Ähnlich wie es z.B. für die Bindung des Prolin-reichen Peptids VPP an eine SH3-Domäne des *growth factor receptor-bound protein 2* gezeigt wurde [196].

Die entwickelten 3D-Modelle der energetisch stabilsten Konformationen von mC1C2 und den Derivaten bestätigt die CD-Messungen hinsichtlich der Zusammensetzung und Lokalisation der Sekundärstrukturelemente in den Peptiden. Während der Erstellung der vorliegenden Arbeit und nach Generierung der 3D-Modelle wurde die erste Kristallstruktur eines Claudins (Cld15; *protein data bank Eintrag* 4P79) publiziert [61]. Der Vergleich des eigenen Modells mit der Cld15-ESZ1-Kristallstruktur zeigt eine hohe Übereinstimmung beider Modelle (Abb. 48). Zur Quantifizierung der Strukturübereinstimmung beider Modelle wurde die *root-mean-square deviation* ( $C_{\alpha}$ ) berechnet. Mit 1,94 Å ist diese sehr gering und macht deutlich, dass das Peptid in seiner stabilsten Konformation eine Struktur ausbilden kann, die der C-terminalen Hälfte der EZS1 sehr ähnlich ist.



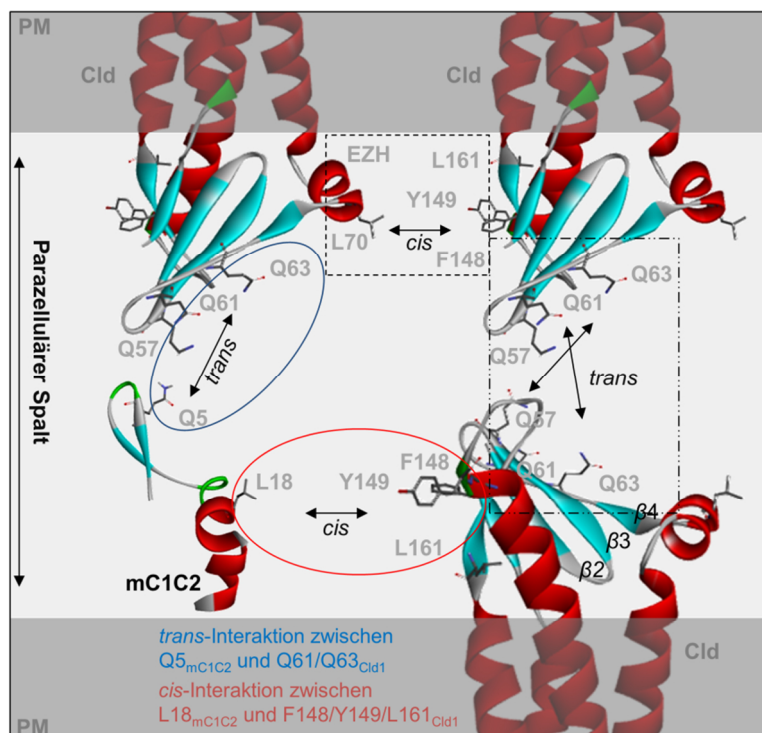
**Abb. 48 Strukturüberlagerung von Claudin-15 mit mC1C2.** Die Kristallstruktur von Claudin-15 (Cld15;  $\alpha$ -Helix, rot;  $\beta$ -Faltblatt, blau; Schleife, grün; unstrukturiert, grau) [61] wurde mit dem 3D-Modell des mC1C2 Peptids (gelb) überlagert; das 3D-Modell der stabilsten Konformation von mC1C2 (Modellentwicklung, PEP-FOLD [138-140]) zeigt eine große Übereinstimmung mit der extrazellulären Schleife 1 (EZS1, grün) von Cld15 (*root-mean-square deviation* ( $C_{\alpha}$ )=1,94 Å); EZ, extrazellulär; PM, Plasmamembran.

Interaktion von mC1C2 mit Claudin-1: Das Cld15-Modell gibt außerdem wichtige Hinweise zur Interaktion der Claudine untereinander. In Cld15 wird die *cis*-Interaktion möglicherweise durch die Wechselwirkung der C-terminalen Hälfte der EZS1 mit der EZS2 eines benachbarten Cld15 stabilisiert [61]. Dabei interagiert M70 aus der extrazellulären Helix der EZS1 (in Cld1: L70; in mC1C2: L18) mit den Aminosäuren F148, F149, L161 (in Cld1: F148, Y149, F161) der EZS2 eines Nachbarmoleküls [61]. Die Hypothese dieser Wechselwirkung kann durch Aminosäureaustauschexperimente untermauert werden, wonach die Cld15-Mutanten M70A und M70E keine Stränge bilden. Dagegen beeinflusst der Austausch zu den unpolaren, hydrophoben Aminosäuren M70L und M70I die Strangbildung nicht [61]. Die potentiell bindungsrelevanten Aminosäuren der EZS2 (in Cld1: F148, Y149, F161) sind in den klassischen Claudinen konserviert (Abb. 6). In Cld5 führen Aminosäuresubstitutionen dieser Reste ebenfalls zu Änderungen der *cis*- und *trans*-Interaktion [79, 80] sowie zu Änderungen der Abdichtungseigenschaften [131].

Möglicherweise beeinflusst die extrazelluläre Helix der EZS1 in Cld1 die Orientierung der Aminosäureposition L70 in Cld1 zu den Aminosäuren F148, Y149, F161 eines Nachbarmoleküls. Die für die beschriebene Interaktion relevante Aminosäure der EZS1 ist in mC1C2 vorhanden (in Cld1: L70; in mC1C2: L18). Die C-terminale Verkürzung des mC1C2-Peptids um vier Aminosäuren beeinflusst seine Wirkung nicht. Eine weitere Verkürzung, hin zu dem Peptidbereich, der das extrazelluläre Helixareal der EZS1 repräsentiert und die bindungsrelevante Aminosäure L18 enthält, bewirkt eine schrittweise Reduktion der mC1C2-Aktivität (Abb. A56). Bindungsmessungen zwischen Cld1 und mC1C2-5aaC oder mC1C2-6aaC ergeben Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) von  $348 \pm 58$  nM bzw.  $1116 \pm 448$  nM. Dagegen binden mC1C2 und mC1C2-4aaC an Cld1 mit  $K_d$ s von  $157 \pm 97$  nM bzw.  $108 \pm 18$  nM [83]. Ein weiteres Indiz dafür, dass die Region um L18 in mC1C2 äußerst wichtig für die Bindung an Cld1 ist, ergibt sich aus dem Sequenzvergleich der getesteten Peptide. Zwischen dem wirksamen Peptid mC1C2 und den unwirksamen Peptiden der EZS1 von Cld2-5 (Tab. 10) liegt eine Aminosäuresequenzhomologie von 66% (Abb. A56) vor. Interessanterweise besteht jedoch zwischen den Aminosäuren 20 und 22-24 von mC1C2 (N-x-NST) und den Peptiden der EZS1 von Cld2-5 eine besonders geringe Homologie von lediglich 20%. Im Vergleich dazu besitzen die Cld2-5-Peptide in diesem Bereich eine Sequenzübereinstimmung von 69% (Abb. A56). Der Vergleich aller klassischen Claudine im Bereich der äquivalenten Aminosäurepositionen 70 und 72-74 (mC1C2: 20, 22-24) (Abb. 6) bestätigt die Unikalität der Cld1/mC1C2-Sequenz N-x-NST, wonach kein anderes Cld diese Signatur trägt. Entsprechend dieser Befunde erzeugt keine der hergestellten mC1C2(N22)-Peptidderivate (N22S, N22I, N22Q, N22L, N22D, N22E) eine Barriereöffnung. Lediglich der Austausch zur physikochemisch ähnlichen Aminosäure Q bewirkt eine sehr schwache TER-Absenkung. Das 3D-Strukturmodell der näher untersuchten N22S (mC1C2(N22S)) deutet darauf hin, dass die N22-Substitution die stabilste Konformation von mC1C2 ändert, wodurch die oben beschriebene Wechselwirkung nicht mehr möglich ist. Demnach ist die Kombination aus  $\beta$ -Faltblatt und einer flankierenden  $\alpha$ -Helix in Verbindung mit mC1C2-spezifischen Sequenzabschnitten entscheidend für die Peptidwirkung. Die Bindung von mC1C2 an Cld1 [83] und -5 kann darüber hinaus auf die EZS1 eingegrenzt werden.

Auf Basis der Befunde wurde ein Modell einer möglichen Interaktion zwischen mC1C2 und Claudin-1 entwickelt (Abb. 49). Danach interagiert die Aminosäure L18 von mC1C2 mit den Aminosäuren F148, Y149, F161 eines in *cis*-benachbarten Cld1-Proteins. In dieser Orientierung könnten Aminosäuren des  $\beta$ -Faltblatts von mC1C2 mit dem  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ) eines gegenüberliegenden Claudins (*trans*) interagieren (Abb. 49). Für diese Wechselwirkung der

Faltblätter spricht die Orientierung der für die Ladungsselektivität in Cld15 [197] verantwortlichen Aminosäuren D57 und D66 im Cld15-Strukturmodell [61]. Diese zeigen weg von der  $\beta$ -Faltblattoberfläche. Eine solche Orientierung kann auch für andere Claudine vermutet werden, da z.B. eine hohe Konservierung der Position ladungsselektiver Aminosäuren innerhalb der kationenselektiven Claudine besteht, z.B. Cld2 (H57, D65), Cld10b (D57, E66), Cld15 (D75, D66) [73]. Darüber hinaus wird für Cld19 eine Interaktion zwischen Q57 des einen Moleküls mit den Aminosäuren Q61 und Q63 des anderen Moleküls postuliert [183]; diese Reste sind zwischen Cld19 und -1 konserviert (Abb. 6) und liegen im  $\beta$ -Faltblatt der EZS. Die genannten Aminosäuren existieren auch in mC1C2 und sind *N*-terminal im  $\beta$ -Faltblatt lokalisiert (Q5, Q9, Q11). Weitere Hinweise für die Wichtigkeit dieser Reste für die Interaktion zwischen mC1C2 und Cld1 können mit *N*-terminal verkürzten Varianten von mC1C2 (mC12-4aaN, mC1C2-8aaN) gefunden werden. Beide Peptide zeigen keine Wirkung im Zellkulturmodell und weisen Dissoziationskonstanten von  $>5000$  nM gegenüber Cld1 auf [83]. Die beschriebene Wechselwirkung zwischen mC1C2 und Cld1 würde die Cld-Cld-Interaktionen und den Aufbau eines Cld-Oligomers stören und letztlich die parazelluläre Abdichtungsfunktion negativ beeinträchtigen.



**Abb. 49 Modell der Interaktion zwischen mC1C2 und Cld1.** Die Modelle der Claudine basieren auf der Kristallstruktur von Claudin (Cld)-15 [61] und wurden an folgenden Aminosäurepositionen in die Cld1-Aminosäuresequenz angepasst: M70L, D57Q, V61Q, N63Q, F149Y, L161F. (**schwarzes Rechteck, · · · ·**) Für Cld19 wurde eine mögliche Interaktion der Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife zwischen Q57 des einen Moleküls mit Q61 und Q63 des anderen Moleküls postuliert [183]; diese Reste sind zwischen Cld1 bzw. mC1C2 (Q5, Q9, Q11) und -19 konserviert. (**schwarzes Rechteck, – – –**) Für Cld15 wurde eine mögliche Interaktion zwischen M70 der extrazellulären Helix (EZH) des einen Moleküls mit F148, F149, L161 des anderen

---

Moleküls in derselben Plasmamembran (*cis*) postuliert [61]; die betreffenden Aminosäurepositionen sind im oben gezeigten Modell entsprechend der Cld1-Sequenz dargestellt. (**rote/blau Ellipse**) Auf Basis der genannten Literaturdaten sowie Verkürzungs-, Aminosäureaustausch- und Bindungsmessungen der vorliegenden Arbeit interagiert mC1C2 mit Cld1 (**rote Ellipse**) in *cis* möglicherweise über L18<sub>mC1C2</sub> mit F148/Y149/F161<sub>Cld1</sub> und (**blau Ellipse**) in *trans* über Q5<sub>mC1C2</sub> mit Q61/Q63<sub>Cld1</sub>; diese Interaktion würde eine Störung der Cld-Cld-Interaktion in *cis* und *trans* bewirken und dadurch die parazelluläre Abdichtungsfunktion der Claudine beeinträchtigen. PM, Plasmamembran; Entwicklung der stabilsten Konformation von mC1C2, PEP-FOLD [138-140].

---

Da auch das aus D-Aminosäuren aufgebaute D-AS-mC1C2 oder Invers-mC1C2 barriereöffnende Eigenschaften aufweisen, ist die mC1C2-Interaktion mit Cld1 nicht stereospezifisch. Dass die spiegelbildliche Konformation eines Peptids nicht zwangsläufig zum Wirkungsverlust führt, wird u.a. durch Calmodulin-bindende Peptide [198] oder die Interaktion zwischen Peptiden des humanen Influenza Virus-1 Glykoprotein gp41 [199] bestätigt. Hier verfügen die L- und D-Varianten über identische Aktivitäten. Darüber hinaus besitzt auch ein anderes Cld-abgeleitetes Peptid (DFNYP) [180] die Fähigkeit, die parazelluläre Barriere zu öffnen – und das sowohl in L- als auch in D-Konformation. Damit unterscheidet sich die Interaktion zwischen mC1C2 und Claudinen z.B. von den Peptidhormon-Rezeptorwechselwirkungen von Bradykinin [200] oder Oxytocin [201], welche stereoselektiv sind. CD-Untersuchungen zeigen eine spiegelbildliche Konformation von D-AS-mC1C2 im Vergleich zu mC1C2 und bestätigen damit frühere Studien, die L- und D-Varianten von Peptiden hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturneigung untersucht haben [199].

## 4.2 Wirkoptimierung von mC1C2

Die Plasmahalbwertszeit von mC1C2 ist mit 7,2 h im Vergleich zu anderen Peptiden sehr hoch und deutet auf eine große Stabilität gegenüber Peptidasen [202] hin. Um den Einfluss der Peptidolyse von mC1C2 auf seine Aktivität zu untersuchen, wurden Zellen mit einer aus D-Aminosäuren synthetisierten mC1C2-Variante inkubiert (D-AS-mC1C2). Die Verwendung von D-Aminosäuren erlaubt die Herstellung von Peptiden mit einer gesteigerten Stabilität gegenüber Peptidasen [202]. Die apikale Inkubation der Zellen mit D-AS-mC1C2 führt nicht zu einer stärkeren Absenkung des TER als nach mC1C2 Inkubation. Demnach mindert der peptidolytische Abbau nicht den mC1C2-Effekt. Weiterhin bedeutet dies, dass die stärkere Barriereöffnung nach bilateraler gegenüber apikaler mC1C2-Behandlung nicht aufgrund des mC1C2-Abbaus durch Peptidasen der apikalen Plasmamembran [203] hervorgerufen wird. Möglicherweise sorgt stattdessen die größere Peptidmenge, die durch die größere Zelloberfläche (apikal+basal) aufgenommen werden kann, für ein besseres stöchiometrisches Verhältnis zwischen Peptid und Cld-Zielprotein.

Nicht nur D-Aminosäuren, sondern auch Fettsäuren unterschiedlicher Länge können verwendet werden, um die Stabilität von Peptiden gegenüber Peptidasen zu erhöhen und die Bioverfügbarkeit zu verbessern [202]. Neben der gesteigerten Stabilität von Peptiden wird vermutet, dass Fettsäuremodifikationen die Anreicherung der Peptide an der Zellmembran bedingen [175]. Im Fall von mC1C2 würde dies bedeuten, dass sich das Peptid auch länger in der Nähe seiner Cld1-Zielstruktur befindet und dadurch effektiv mehr mC1C2 mit Cld1 interagiert. Palmitinsäure-modifiziertes mC1C2 (C16-mC1C2) erhöht ab 10  $\mu\text{M}$  konzentrationsabhängig die parazelluläre Durchlässigkeit und bewirkt ab 50  $\mu\text{M}$  eine signifikante Permeabilitätssteigerung für kleine Moleküle. Damit weist C16-mC1C2 gegenüber mC1C2 eine  $\sim 4\text{x}$  geringere Wirkkonzentration auf. Studien anderer bestätigen die bessere Bioverfügbarkeit/Stabilität von Wirkstoffen nach Fettsäuremodifikation: Beispielsweise kann durch die *N*-terminale Palmitoylierung die Stabilität eines Somatostatin-Analogons erhöht und dadurch seine Bioverfügbarkeit verbessert werden [204]. Für ein *Occ*-modulierendes, fettsäuremodifiziertes Peptid wird eine erhöhte Stabilität beschrieben [175]. Allerdings führen schon 20  $\mu\text{M}$  C16-mC1C2 zu Zellschädigungen. Da Palmitinsäure allein in unserem Zellsystem keine zellschädigenden Eigenschaften besitzt, ist die spezifische Kombination von mC1C2 und Palmitinsäure ausschlaggebend für die Zytotoxizität. Die geringere Wirkkonzentration ließe sich durch eine bessere Membrannähe bzw. partielle Membranintegration durch die Palmitinsäure erklären. Dadurch käme der wirksame Teil von C16-mC1C2 näher an die aus der Zellmembran entspringende EZS.

Die Kopplung von Polyethylenglykol (PEG) an Peptide kann ebenso deren Stabilität und Löslichkeit verbessern [202]. Beispiele hierfür sind u.a. PEG-konjugierte Varianten von Insulin [205]. Das *N*-terminal monopegylierte mC1C2 Peptid (PEG-mC1C2) bewirkt an Zellen eine Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit; im Vergleich zu mC1C2 war diese jedoch deutlich schwächer. Die geringere barriereöffnende Wirkung von PEG-mC1C2 könnte durch die sterische Hinderung des *N*-Terminus für wirkrelevante Interaktionen hervorgerufen sein. Verkürzungsexperimente zeigen, dass dieser Bereich sehr empfindlich auf strukturelle Veränderungen reagiert. Auch die *N*-terminale Monopegylierung vom *glucagon-like peptide-1* bewirkt eine deutliche Verringerung seiner Aktivität, während die Pegylierung innerhalb des Peptids zu keiner Aktivitätsminderung führt [206]. Auf der anderen Seite kann nach PEG-Modifikationen eine Diskrepanz zwischen der Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* bestehen [176]. PEG-mC1C2 könnte daher *in vivo*, trotz der schwächeren *in vitro*-Aktivität, in geringeren Wirkkonzentrationen als mC1C2 eine effiziente Barriereöffnung erzielen.



### 4.3 Einfluss von mC1C2 auf Claudin-relevante Signalwege

Die GSK-3 ist neben ihrer Funktion im Glykogenstoffwechsel auch ein Schlüsselenzym des Wnt-Signalweges und an Prozessen wie Zellteilung und Apoptose beteiligt [207]. Darüber hinaus ist sie ein wichtiger Regulator der Barrierefunktion. Die GSK-3 wird in zwei Isoformen (GSK-3- $\alpha$  und - $\beta$ ) in Mammalia exprimiert und ist in ausdifferenzierten Zellen konstitutiv aktiv [207].

Mit der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass mit GSK-3-Inhibitor behandelte Caco-2-Zellen eine zeitabhängige Reduktion der Dichtheit des Zellrasens aufweisen. Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von Severson et al. (2010), wonach die GSK-3-Inhibierung in MDCK-Zellen eine gesteigerte parazelluläre Durchlässigkeit bewirkt [170]. Im Gegensatz dazu führt die GSK-3-Inhibition in einer weiteren Studie, in der primäre Gehirndothelzellen verwendet wurden, zur Stabilisierung von Claudinen [172]. Die Inkubation der Caco-2-Zellen mit dem GSK-3-Inhibitor und mC1C2 bewirkt eine stärkere Reduktion der parazellulären Dichtheit im Vergleich zu lediglich mit Peptid behandelten Zellen. Die Untersuchungen im Caco-2-Zellmodell erlauben daher nicht den Rückschluss, dass die mC1C2-vermittelte Barriereöffnung durch die GSK-3-Inhibition kompensiert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente zum Einfluss der GSK-3-Inhibition auf den mC1C2-Effekt *in vivo* zeigen, dass die Blockierung der GSK-3 konzentrationsabhängig zur Reduktion der mC1C2-vermittelten Barriereöffnung des Perineuriums führt [15]. Auch reduziert mC1C2 nicht die Cld1-Expression im Perineurium, wenn eine GSK-3-Inhibition vorliegt [15]. Detailliertere Analysen zeigen, dass nach mC1C2-Administration die Expression des Transkriptionsfaktors Cdx2 im Perineurium und Endoneurium reduziert wird [15]. Die Expression von Cdx2 korreliert positiv mit der Cld1-Expression [174]. Eine wichtige Funktion der GSK-3 ist die Regulation von Transkriptionsfaktoren wie Snail [208] oder Cdx2 [209], welche die Expression von z.B. Cld1 regulieren [173, 174]. Durch die Inhibition der GSK-3 kommt es zur gesteigerten Cdx2-Expression [209], was wiederum, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Cld1-Expression steigert und die mC1C2-vermittelte Barriereöffnung verhindert [15]. Somit kann die mC1C2-vermittelte Barriereöffnung *in vivo* durch eine gesteigerte Cld1-Expression blockiert werden. Die Befunde, wonach mC1C2 zu einer Reduktion der Cld1-Plasmamembranlokalisation und damit zur Barriereöffnung führt, können somit bestätigt werden. Die unterschiedlichen Befunde zur GSK-3-Inhibition zwischen dem Caco-2-Zellmodell und den *in vivo*-Untersuchungen basieren möglicherweise auf der begrenzten Aussagekraft der Caco-2-Zellen in Bezug auf den untersuchten Signaltransduktionsweg. Caco-2-

---

Zellen sind eine kolorektale Epithelzelllinie in der mehrere Proteine des GSK-3/Wnt-Signalweges Mutationen aufweisen [210]. Diese tragen vermutlich zu ihren Krebszeleigenschaften bei [211]. Gleichzeitig limitieren sie die Vergleichbarkeit der GSK-3/Wnt-Befunde mit denen, die in primären Zellen [172] oder *in vivo* erzielt werden [15]. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz zwischen den Zellkultur- und *in vivo*-Daten liegt möglicherweise in der Administrationsart der GSK-3-Inhibitoren. Die Caco-2-Zellen wurden direkt mit dem Inhibitor inkubiert, wohingegen *in vivo*, nach intraperitonealer Inhibitoren-injektion, eine systemische Wirkung vorlag,

Ein möglicher Einfluss des NFκB-Signalweges auf die mC1C2-vermittelte Barriereöffnung von Zellen wurde mit den NFκB-Inhibitoren PDTC und QNZ [212] untersucht. NFκB ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der in verschiedenen Prozessen des Epithelgewebes [213] involviert ist. Dies umfasst u.a. auch die Modifikation von TJ-Proteinen und damit die Regulation der parazellulären Dichtigkeit [214-216]. Während PDTC eine Reduktion der mC1C2-Barriereöffnung in Caco-2-Zellen bewirkt, hat QNZ keinen Effekt auf die mC1C2-Wirkung. Mögliche Gründe könnten eine zu geringe Konzentration von QNZ oder eine zu kurze Inkubationszeit des Inhibitors sein. Die Diskrepanz der Ergebnisse erfordert eine detailliertere Analyse des Einflusses von NFκB auf die mC1C2-Wirkung. So sollte nach der mC1C2-Behandlung, neben der Testung anderer QNZ-Inkubationsprotokolle, außerdem die subzelluläre Lokalisation von NFκB überprüft werden, da sich diese nach Aktivierung des NFκB-Signalweges von Zytosol in den Zellkern verlagert.

Die NFκB-vermittelte Modulation der Claudine kann auf verschiedene Weise erfolgen. So kann die Aktivierung von NFκB eine gesteigerte Expression bzw. Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 oder der Myosin-Leichte-Kette-Kinase auslösen. Während die Matrix-Metalloproteinase 9 z.B. den proteolytischen Abbau von Cld5 und damit die Öffnung der parazellulären Barriere bewirkt [215], kann eine gesteigerte Expression/Aktivität der Myosin-Leichte-Kette-Kinase zur Phosphorylierung von Claudinen führen [216]. Für Cld5 konnte gezeigt werden, dass dessen Phosphorylierung durch die Myosin-Leichte-Kette-Kinase zur Reduktion der Cld5-Stabilität in den TJs und somit zur Verringerung der Barrierefunktion beiträgt [217]. Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus' von Claudinen nach mC1C2-Behandlung wäre daher ein weiterer Ansatzpunkt für eine detaillierte Analyse des NFκB-Anteils an der mC1C2-Wirkung.

#### 4.4 Wirkung von mC1C2 auf die Dichtheit von Zellbarrieren *in vivo*

Für die Überprüfung, inwieweit die *in vitro* Ergebnisse zur Wirkung von mC1C2 auch *in vivo* Geltung haben, wurde der Einfluss von mC1C2 auf die Durchlässigkeit des Perineuriums des *N. ischiadicus* von Ratten ermittelt. Das Perineurium verhindert u.a. das Vordringen von hydrophilen Arzneistoffen ins PNS [17, 18]. Entscheidend für die Barrierebildung sind die TJs der Perineuralzellen [15, 77]. Da Cld1 eine maßgebliche Abdichtungsfunktion zukommt [14], wurde diese Zellbarriere mit dem Cld1-modulierenden mC1C2-Peptid behandelt.

Die eingangs beschriebenen *in vitro*-Effekte können im Rahmen dieser Arbeit auch *in vivo* bestätigt werden. So öffnet mC1C2 das Perineurium für hydrophile, unter Kontrollbedingungen nicht-barrieregängige Wirkstoffe wie DAMGO und Morphin. Die Öffnung des Perineuriums ist, wie in den Zellmodellen, konzentrations- und zeitabhängig. Allerdings zeigen sich Unterschiede im Zeitverlauf. Während die *in vitro*-Barriereöffnung ab >6 h einsetzt, finden wir diese *in vivo* erst ab  $\geq 24$  h Inkubation [15, 18]. Ursächlich sind vermutlich Unterschiede in der Komplexität der behandelten Barrieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellmodelle wachsen alle in einschichtigen Zelllagen. Dagegen besteht das Perineurium aus bis zu 15 Zellschichten, die jeweils durch eine Basalmembran von der anderen getrennt sind. Jede Perineuralzelle bildet wiederum TJs zu ihren Nachbarzellen aus [15, 77], so dass durch mC1C2 die Interaktionen der Claudine bis an die innerste, an das Endoneurium grenzende Perineuralzellschicht blockiert werden muss. Erst dann ist die parazelluläre Diffusion der Wirkstoffe zu ihrem Zielort komplett.

Das C-terminal verkürzte Peptid mC1C2-4aaC, welches aus der Optimierung von mC1C2 hervorgegangen ist, öffnet das Perineurium ebenfalls 24-48 h nach Administration [15]. Dagegen besitzt das in den *in vitro*-Tests inaktive, N-terminal verkürzte Peptid mC1C2-4aaN sowie das Kontrollpeptid mC2C2 *in vivo* keine barriereöffnenden Eigenschaften [15, 18]. Untersuchungen zur Lokalisation von mC1C2 in der Zellkultur zeigen, dass sich das Peptid ab 5 h beginnend und nach 24 h stark im Bereich der TJs, in Kolokalisation mit Cld1, anlagert. Dieser Befund kann *in vivo* bestätigt werden, wonach mC1C2 nach 24-48 h in Kolokalisation mit Cld1 vorliegt [15]. Gleichzeitig reduzieren mC1C2 und mC1C2-4aaC die Cld1-Expression im Perineurium auf Proteinebene [15, 18, 83]. Die Reduktion der mC1C2-vermittelten Cld1-Plasmamembranlokalisation wird auch *in vitro* beobachtet. Allerdings zeigen Western Blot-Daten von Caco-2-Zellen, dass die Gesamtmenge an Cld *in vitro* nicht reduziert wird. Sie stehen damit im Widerspruch zu den *in vivo* Daten. In Zellkulturuntersuchungen ist der Effekt von mC1C2 nicht zellschädigend und die Veränderungen auf Ebene der Claudine und der parazellulären Dichtheit reversibel. *In vivo* bewirkt mC1C2 ebenfalls

keine Neurotoxizität, da neben der Wiederherstellung des Cld1-Signals keine morphologischen und funktionellen Veränderungen des behandelten Nerven auftreten [15].

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass mC1C2 die Durchlässigkeit einer Cld1-basierten Zellbarriere auch *in vivo* für hydrophile Wirkstoffe vorübergehend öffnen kann. Gegenwärtig werden für die Lokalanästhesie in der klinischen Praxis hauptsächlich schmerzrezeptorspezifische Wirkstoffe wie Lidocain, Ropivacain oder Bupivacain verwendet, die neben der Schmerzweiterleitung z.B. auch Motoneurone blockieren [18, 35]. Zum Teil besitzen diese Wirkstoffe zusätzlich neurotoxisches Potential [218]. Die mC1C2-vermittelte Öffnung der TJs ermöglicht es, die Gruppe der verwendbaren Lokalanästhetika auf hydrophile Wirkstoffe wie DAMGO auszuweiten und somit schmerzrezeptorspezifische Arzneistoffe für die lokale Schmerztherapie einzusetzen. Dadurch kann die Zahl der möglichen Nebenwirkungen reduziert und die Spezifität der Behandlung erhöht werden.

## 5 Schlussfolgerungen

Ziel der Arbeit war, Cld-Peptidomimetika zu entwickeln und deren Potential als Permeationsverstärker für die Wirkstofffreisetzung in das jeweilige Zielorgan zu validieren. Hierzu wurde die Annahme verfolgt, dass die Interaktionen der EZS1 und -2 von Claudinen durch EZS-Peptidomimetika reversibel vermindert und dadurch die parazelluläre Permeation hydrophiler Wirkstoffe temporär und nebenwirkungsfrei erhöht werden kann.

Von den untersuchten Cld1, -2, -3, -4 und -5-Peptiden erhöht insbesondere das Cld1-EZS1-Peptid mC1C2 und zwei optimierte Derivate davon *in vitro* reversibel die parazelluläre Durchlässigkeit für hydrophile Stoffe in Cld1- bzw. -5-haltigen Zellbarrieren. Diese Ergebnisse wurden durch *in vivo*-Untersuchungen an einer Cld1-dominierten Epithelbarriere (Perineurium) bestätigt. So wird erstmalig gezeigt, dass eine Cld-Peptid-basierte Öffnung des Perineuriums möglich ist und zur reversiblen Erhöhung der Durchlässigkeit für hydrophile Wirkstoffe führt. mC1C2 hat dabei keine zellschädigenden Nebenwirkungen. Die Ergebnisse zeigen, dass die peptidbasierte Modulation von Zellbarrieren zur Wirkstoffzuführung eine vielversprechende, neue Alternative gegenüber gegenwärtigen Strategien zur Permeationserhöhung darstellt und weiterverfolgt werden sollte.

Bisherige Ansätze zur Verbesserung der Wirkstoffzuführung durch besonders dichte Zellbarrieren des Körpers (z.B. BHS, Perineurium) basieren auf einer unspezifischen Öffnung, sind mit großen Risiken für den Patienten verbunden oder benötigen aufwendige Modifikationen der Wirkstoffe. Die Verwendung von mC1C2 als Permeationsverstärker verzichtet hingegen auf Wirkstoffmodifikationen und zeichnet sich aufgrund der spezifischen Cld-Modulation durch eine hohe Reproduzierbarkeit, Reversibilität und Verträglichkeit aus. Für künftige Studien sollte die in dieser Arbeit entwickelte PEG-modifizierte mC1C2-Variante mehr berücksichtigt werden. Dabei sollte getestet werden, ob die PEG-Modifikation eine höhere Stabilität des Peptids gegenüber Peptidasen und damit eine bessere Bioverfügbarkeit bewirkt, wodurch gleichzeitig die benötigte Peptidmenge verringert und damit Kosten reduziert werden.

Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Cld-Peptidomimetika zeigen, dass mC1C2 direkt mit Cld1 und -5 interagiert, innerhalb von Minuten endozytiert wird, dadurch eine Verringerung von Claudinen in der Plasmamembran bedingt und die Morphologie des Cld-Strangnetzwerks ändert. Weiterhin bewirkt mC1C2 *in vivo* eine Verringerung der Expression des Transkriptionsfaktors Cdx2, was eine Reduktion der Cld-Expression zur Folge hat. Die Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit beruht daher sowohl auf einer veränderten Cld-Expression und -Lokalisation, als auch auf der Störung der Cld-Cld-Interaktionen. Dabei

---

konnte gezeigt werden, dass Cld-Peptide über die gleichen Endozytosemechanismen wie Cld-Proteine in Zellen aufgenommen werden. Die Subtypspezifität der Cld-Cld-Wechselwirkungen trifft auch für die Peptide-Cld-Wechselwirkungen zu, wodurch wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung weiterer Cld-Peptidomimetika sowie der Cld-Struktur erzielt werden konnten.

Die Resultate ermöglichen es darüber hinaus, den Wirkungsbereich von mC1C2 durch Struktur- und Funktionsuntersuchungen zu definieren, wirkungsrelevante Aminosäuren bzw. Bereiche zu identifizieren und ein molekulares Modell der Interaktion zwischen mC1C2 und Cld1 zu entwickeln. Das molekulare Modell von mC1C2 ähnelt sehr einer später publizierten Kristallstruktur eines anderen Claudins. Diese Erkenntnisse bilden nun die Grundlage für die Entwicklung weiterer, optimierter Cld-Peptidomimetika. Gleichzeitig verbessern sie das Verständnis der Struktur und Funktion der Claudine im Allgemeinen.

Die experimentellen Peptidstruktur-Untersuchungen bestätigen unsere Strukturvorhersagen für die EZS1 von Claudinen und zeigen, dass  $\beta$ -Faltblätter für die Funktion von Relevanz sind. Wirkrelevante Bereiche des mC1C2-Peptids geben darüber hinaus Hinweise auf Aminosäuremotive, die im Cld1-Protein an der parazellulären Abdichtung beteiligt sind. So bewirken Aminosäurevariationen in mC1C2 an Position 22 Änderungen seiner 3D-Konformation, der Sekundärstrukturneigung und einen Aktivitätsverlust des Peptids. U.a. geht aus einer kürzlich publizierten Kristallstruktur eines Claudins hervor, dass dieser Aminosäurebereich auch in Cld-Proteinen wichtig für die Abdichtungsfunktion ist.

Die *N*-terminale Verkürzung des Peptids um vier Aminosäuren führt zum Wirkverlust, womit vermutlich dieser Bereich im Cld-Protein besonders abdichtungsrelevant ist. Die Ergebnisse machen deutlich, dass minimale Änderungen in der Aminosäuresequenz der Claudine weitreichenden Einfluss auf ihre Struktur und damit auch auf ihre Abdichtungsfunktion ausüben können. Die Befunde sind überdies für das molekulare Verständnis von Krankheiten wie z.B. familiärer Hypomagnesiämie von Bedeutung, die durch Mutationen der EZS1 in Claudinen verursacht werden.

mC1C2 hat das Potential, auch andere nicht Cld1-basierte Barrieren zu öffnen. Diese Arbeit zeigt, dass mC1C2 auch an Cld5 bindet, die Lokalisation von Cld5 direkt beeinflusst und die parazelluläre Durchlässigkeit von BHS-Modellen erhöht. Cld5 ist das dominierende Cld der BHS und sein transienter *knockdown* resultiert in einer größenselektiven, reversiblen Öffnung für Moleküle <800 Da. Die erhaltenen Daten unterstützen daher die Annahme, dass mC1C2 nicht nur als Permeationsverstärker für Cld1-relevante, epitheliale Barrieren, sondern ebenso für Cld5-haltige, endotheliale Barrieren zur Anwendung kommen kann. Ähnlich wie bei

Caprat oder Mannitol sollte daher der Effekt von mC1C2 auf die BHS-Dichtheit nach Carotid-injektion untersucht werden. Die mC1C2-vermittelte Öffnung der BHS würde es ermöglichen, bislang BHS-undurchlässige Therapeutika für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, Schlaganfällen oder Hirntumoren einzusetzen und damit einen neuartigen pharmakologischen Ansatz zu erlauben.

Als Testsystem zum Finden von barrieremodulierenden Peptiden dienten in den Experimenten Caco-2-Zellen. Diese exprimieren nur wenig vom BHS-relevanten Cld5, so dass der Cld5-Anteil an der Barrierebildung gering ist. Peptide, die an Cld5 binden, können daher möglicherweise nur schwer mit dem Caco-2-Testsystem detektiert werden. Alle hergestellten Peptide sollten deshalb auch noch auf ihre permeationsverstärkenden Eigenschaften in BHS-Modellen hin untersucht werden.

Weiterhin wurde der Effekt des nicht von Claudinen stammenden Peptids Kloe analysiert. Struktur- und Funktionsstudien mit mC1C2 zeigen, dass der  $\beta$ -Faltblattanteil des Peptids sehr wichtig für die Wirkung ist. Das Peptid Kloe ist ein ideales  $\beta$ -Faltblattmodell. Es führte zur konzentrationsabhängigen Öffnung der parazellulären Barriere in Caco-2-Zellen und ist in den wirksamen Konzentrationen nicht zellschädigend. Um die Spezifität des Peptids herauszufinden, sollten Untersuchungen mit Cld-monotransfizierten HEK-293-Zellen sowie Epithel- und Endothelzellen mit unterschiedlicher Cld-Ausstattung erfolgen.

Die Arbeit zeigt, dass Cld-Peptidomimetika als Permeationsverstärker zur Wirkstoffzuführung verwendet werden können und eine neue, aussichtsreiche Strategie darstellen. Gegenüber anderen Strategien, die molare bzw. millimolare Konzentrationen verwenden, erfolgt die Behandlung mit mikromolaren Konzentrationen und führt zur spezifischen und temporären Modulation barrierebildender Proteine. Eine sichere und nebenwirkungsfreie Wirkstoffzuführung in schwer oder bis dato nicht zugänglichen Kompartimenten ist damit prinzipiell möglich. Ferner könnten die Peptide z.B. auch zur Reduktion von Hirnödemen nach Schädelhirntrauma zu Anwendung kommen, da durch die gröÙenselektive parazelluläre Öffnung der BHS ein Rückstrom von überschüssigem Gewebewasser ins Blut möglich wäre. Dadurch käme den Cld-Peptidomimetika zusätzlich zur pharmakokinetischen Wirkung auch eine pharmakodynamische Wirkung zu.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Young B, O'Dowd G, Woodford P. *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2014. 448 p.
- [2] Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol Mech* 2010;5:119-144.
- [3] Rodriguez-Boulán E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:225-242.
- [4] Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.
- [5] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004;84:869-901.
- [6] Hellinger E, Veszelka S, Toth AE, Walter F, Kittel A, Bakk ML, et al. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;82:340-351.
- [7] Diamond JM. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 1977;20:10-18.
- [8] Tournier JF, Lopez A, Gas N, Tocanne JF. The lateral motion of lipid molecules in the apical plasma-membrane of endothelial-cells is reversibly affected by the presence of cell-junctions. *Exp Cell Res* 1989;181:375-384.
- [9] Ward PD, Tippin TK, Thakker DR. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today* 2000;3:346-358.
- [10] Sano Y, Kanda T. Blood-neural barrier: overview and latest progress. *Clin Exp Neuroimmunol* 2013;4:220-227.
- [11] Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol* 1999;5:556-569.
- [12] Pina-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C. The normal and neoplastic perineurium: a review. *Adv Anat Pathol* 2008;15:147-164.
- [13] Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol* 2011;121:291-312.
- [14] Hackel D, Krug SM, Sauer RS, Mousa SA, Bocker A, Pflucke D, et al. Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2018-2027.
- [15] Sauer RS, Krug SM, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, et al. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release* 2014;185:88-98.
- [16] Allt G, Lawrenson JG. The blood-nerve barrier: enzymes, transporters and receptors - comparison with the blood-brain barrier. *Brain Res Bull* 2000;52:1-12.
- [17] Antonijevic I, Mousa SA, Schafer M, Stein C. Perineural defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci* 1995;15:165-172.
- [18] Zwanziger D, Hackel D, Staat C, Bocker A, Brack A, Beyermann M, et al. A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Mol Pharm* 2012;9:1785-1794.
- [19] Abbott NJ, Friedman A. Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia* 2012;53 Suppl 6:1-6.
- [20] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010;37:13-25.
- [21] Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967;34:207-217.



- [22] Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 2002;38:323-337.
- [23] Mae M, Armulik A, Betsholtz C. Getting to know the cast - cellular interactions and signaling at the neurovascular unit. *Curr Pharm Des* 2011;17:2750-2754.
- [24] Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005;2:3-14.
- [25] Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis* 2013;36:437-449.
- [26] Dvorsky R, Balaz S, Sawchuk RJ. Kinetics of subcellular distribution of compounds in simple biosystems and its use in QSAR. *J Theor Biol* 1997;185:213-222.
- [27] Lin JH, Lu AYH. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 1997;49:403-449.
- [28] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;23:3-25.
- [29] Saito T, Zhang ZJ, Ohtsubo T, Noda I, Shibamori Y, Yamamoto T, et al. Homozygous disruption of the *mdr1a* p-glycoprotein gene affects blood-nerve barrier function in mice administered with neurotoxic drugs. *Acta Otolaryngol* 2001;121:735-742.
- [30] Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 2006;58:140-161.
- [31] de Graaf C, Vermeulen NP, Feenstra KA. Cytochrome p450 in silico: an integrative modeling approach. *J Med Chem* 2005;48:2725-2755.
- [32] Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* 2005;2:541-553.
- [33] Olsson Y, Reese TS. Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971;30:105-119.
- [34] Soderfeldt B, Olsson Y, Kristensson K. Perineurium as a diffusion barrier to protein tracers in human peripheral-nerve. *Acta Neuropathol* 1973;25:120-126.
- [35] Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 2007;449:607-610.
- [36] Hackel D, Brack A, Fromm M, Rittner HL. Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1257:199-206.
- [37] Vorbodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42:67-75.
- [38] Goodenough DA, Revel JP. A fine structural analysis of intercellular junctions in mouse liver. *J Cell Biol* 1970;45:272-290.
- [39] Machen TE, Erlj D, Wooding FB. Permeable junctional complexes. The movement of lanthanum across rabbit gallbladder and intestine. *J Cell Biol* 1972;54:302-312.
- [40] Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, et al. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 2008;121:298-305.
- [41] Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:631-645.
- [42] Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:207-235.
- [43] Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszelka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res* 2014;45:610-638.
- [44] Zahraoui A, Louvard D, Galli T. Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J Cell Biol* 2000;151:31-36.

- [45] Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 1998;143:391-401.
- [46] Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, et al. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* 2010;21:1200-1213.
- [47] Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin - a novel integral membrane-protein localizing at the tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-1788.
- [48] Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005;171:939-945.
- [49] Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, Matter K. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol* 2009;10:95.
- [50] Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142:117-127.
- [51] Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 2003;116:2895-2906.
- [52] Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1 - a high-molecular-weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-766.
- [53] Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrickjones J. Cingulin, a new peripheral component of the tight junctions. *Nature* 1988;333:272-276.
- [54] Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262:647-661.
- [55] Nayak G, Lee SI, Yousaf R, Edelmann SE, Trincot C, Van Itallie CM, et al. Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. *J Clin Invest* 2013;123:4036-4049.
- [56] Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013;93:525-569.
- [57] Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 2011;585:606-612.
- [58] Maher GJ, Hilton EN, Urquhart JE, Davidson AE, Spencer HL, Black GC, et al. The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS Lett* 2011;585:2187-2192.
- [59] Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002584.
- [60] Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998;141:1539-1550.
- [61] Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, et al. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* 2014;344:304-307.
- [62] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947-2948.
- [63] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009;25:1189-1191.

- [64] Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 1999;78:849-855.
- [65] Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, Schulzke JD, et al. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1798:2048-2057.
- [66] Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol* 2004;24:8408-8417.
- [67] Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:1288-1299.
- [68] Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115:4969-4976.
- [69] Hou JH, Paul DL, Goodenough DA. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 2005;118:5109-5118.
- [70] Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:1078-1084.
- [71] Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res* 2008;334:255-264.
- [72] Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18010-18015.
- [73] Li J, Angelow S, Linge A, Zhuo M, Yu AS. Claudin-2 pore function requires an intramolecular disulfide bond between two conserved extracellular cysteines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013;305:190-196.
- [74] Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 2001;153:263-272.
- [75] Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem* 2008;104:147-154.
- [76] Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003;161:653-660.
- [77] Pummi KP, Heape AM, Grenman RA, Peltonen JTK, Peltonen SA. Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1037-1046.
- [78] Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999;147:891-903.
- [79] Piontek J, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, et al. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3903-3918.
- [80] Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, et al. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 2008;22:146-158.
- [81] Li J, Zhuo M, Pei L, Yu AS. Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *J Biol Chem* 2013;288:22790-22797.

- [82] Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol* 2015;38:16-25.
- [83] Dabrowski S, Staat C, Zwanziger D, Sauer RS, Bellmann C, Gunther R, et al. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals. *Antioxid Redox Signal* 2015;22:1-14.
- [84] Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, Nishikawa K, Irie K, Ogura Y, et al. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Science* 2015;347:775-778.
- [85] Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E, et al. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:505-514.
- [86] Piehl C, Piontek J, Cording J, Wolburg H, Blasig IE. Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67:2131-2140.
- [87] Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J* 2005;19:923-933.
- [88] Stamatovic SM, Keep RF, Wang MM, Jankovic I, Andjelkovic AV. Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells. *J Biol Chem* 2009;284:19053-19066.
- [89] Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:1247-1257.
- [90] Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 2004;15:176-188.
- [91] Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 1999;147:185-194.
- [92] Cording J, Berg J, Kading N, Bellmann C, Tscheik C, Westphal JK, et al. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci* 2013;126:554-564.
- [93] Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999;147:1351-1363.
- [94] Gonzalez-Mariscal L, Garay E, Quiros M. Regulation of claudins by posttranslational modifications and cell-signaling cascades. *Claudins* 2010;65:113-150.
- [95] French AD, Fiori JL, Camilli TC, Leotlela PD, O'Connell MP, Frank BP, et al. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* 2009;6:93-101.
- [96] Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci* 2005;118:1427-1436.
- [97] Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 1994;127:1617-1626.
- [98] Bellmann C, Schreivogel S, Gunther R, Dabrowski S, Schumann M, Wolburg H, et al. Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin-redox dependency of the second extracellular loop. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:855-867.
- [99] Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and

- disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996;134:1031-1049.
- [100] Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-4142.
- [101] Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669:34-42.
- [102] Kitajiri S, Katsuno T, Sasaki H, Ito J, Furuse M, Tsukita S. Deafness in occludin-deficient mice with dislocation of tricellulin and progressive apoptosis of the hair cells. *Biol Open* 2014;3:759-766.
- [103] Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 2008;19:4687-4693.
- [104] Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, et al. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 2006;79:1040-1051.
- [105] Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009;20:3713-3724.
- [106] Cording J, Gunther R, Vigolo E, Tscheik C, Winkler L, Schlattner I, et al. Redox regulation of cell contacts by tricellulin and occludin: Redox-sensitive cysteine sites in tricellulin regulate both tri- and bicellular junctions in tissue barriers as shown in hypoxia and ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2015; doi: 10.1089/ars.2014.6162; in press.
- [107] Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-Kda polypeptide that binds to the tight junction protein-ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3460-3464.
- [108] Balda MS, Gonzalezmariscal L, Matter K, Cereijido M, Anderson JM. Assembly of the tight junctions - the role of diacylglycerol. *J Cell Biol* 1993;123:293-302.
- [109] Funke L, Dakoji S, Brecht DS. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 2005;74:219-245.
- [110] Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction - actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 1999;274:35179-35185.
- [111] Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, et al. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol* 1997;139:785-795.
- [112] Muller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, et al. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem* 2005;280:3747-3756.
- [113] Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitaniyasuda T, Tsukita S, Tsukita S. The 220-Kd protein colocalizing with cadherins in nonepithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction associated protein in epithelial-cells - cDNS cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1993;121:491-502.
- [114] Greig NH, Daly EM, Sweeney DJ, Rapoport SI. Pharmacokinetics of chlorambucil-tertiary butyl ester, a lipophilic chlorambucil derivative that achieves and maintains high-concentrations in Brain. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;25:320-325.
- [115] Pardridge WM, Boado RJ. Chapter eleven - Reengineering Biopharmaceuticals for Targeted Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Methods in Enzymology* 2012;Volume 503:269-292.
- [116] Raessi SD, Li J, Hidalgo IJ. The Role of an  $\alpha$ -Amino Group on H<sup>+</sup>-dependent Transepithelial Transport of Cephalosporins in Caco-2 Cells. *J Pharm Pharmacol* 1999;51:35-40.

- [117] Fischer H, Gottschlich R, Seelig A. Blood-brain barrier permeation: Molecular parameters governing passive diffusion. *J Membr Biol* 1998;165:201-211.
- [118] Brightman MW. Morphology of blood-brain interfaces. *Exp Eye Res* 1977;25:1-25.
- [119] Yeh JZ. Sodium inactivation mechanism modulates QX-314 block of sodium channels in squid axons. *Biophys J* 1978;24:569-574.
- [120] Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:487-517.
- [121] Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:892-910.
- [122] Kanner AA, Marchi N, Fazio V, Mayberg MR, Koltz MT, Siomin V, et al. Serum S100beta: a noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. *Cancer* 2003;97:2806-2813.
- [123] Bergstrom BK, Bertilson SO, Movin G. Clinical evaluation of rectally administered ampicillin in acute otitis media. *J Int Med Res* 1988;16:376-385.
- [124] Preston E, Slinn J, Vinokourov I, Stanimirovic D. Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *J Neurosci Methods* 2008;168:443-449.
- [125] Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1085-1090.
- [126] Manninen PH, Lam AM, Gelb AW, Brown SC. The effect of high-dose mannitol on serum and urine electrolytes and osmolality in neurosurgical patients. *Can J Anaesth* 1987;34:442-446.
- [127] Bullock R. Mannitol and other diuretics in severe neurotrauma. *New Horiz* 1995;3:448-452.
- [128] Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 2003;3:90-105, 151.
- [129] Olesen AE, Andresen T, Staahl C, Drewes AM. Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacol Rev* 2012;64:722-779.
- [130] Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:1346-1354.
- [131] Piehl C, Piontek J, Cording J, Wolburg H, Blasig IE. Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2131-2140.
- [132] Krause G, Winkler L, Piehl C, Blasig I, Piontek J, Muller SL. Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:34-43.
- [133] Winkler L, Gehring C, Wenzel A, Muller SL, Piehl C, Krause G, et al. Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J Biol Chem* 2009;284:18863-18872.
- [134] Shrestha A, Robertson SL, Garcia J, Beingasser J, McClane BA, Uzal FA. A synthetic peptide corresponding to the extracellular loop 2 region of claudin-4 protects against *Clostridium perfringens* enterotoxin in vitro and in vivo. *Infect Immun* 2014;82:4778-4788.
- [135] Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, et al. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol* 2005;67:749-756.
- [136] Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 1997;136:399-409.
- [137] Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, et al. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 1997;73:222-231.

- [138] Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P. PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res* 2009;37:498-503.
- [139] Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P. A fast method for large-scale de novo peptide and miniprotein structure prediction. *J Comput Chem* 2010;31:726-738.
- [140] Thevenet P, Shen Y, Maupetit J, Guyon F, Derreumaux P, Tuffery P. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res* 2012;40:288-293.
- [141] Coin I, Beyermann M, Bienert M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat Protoc* 2007;2:3247-3256.
- [142] Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, Delplace Y, Miller F, Landry C, et al. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 2005;85:734-746.
- [143] Staat C, Coisne C, Dabrowski S, Stamatovic SM, Andjelkovic AV, Wolburg H, et al. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials* 2015;54:9-20.
- [144] Stamatovic SM, Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV. Relocalization of junctional adhesion molecule A during inflammatory stimulation of brain endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2012;32:3414-3427.
- [145] Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990;79:476-482.
- [146] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005;288:369-376.
- [147] Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 1991;64:915-925.
- [148] Vandersluijs P, Hull M, Zahraoui A, Tavitian A, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein Rab4 is associated with early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6313-6317.
- [149] Vitelli R, Santillo M, Lattero D, Chiariello M, Bifulco M, Bruni CB, et al. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem* 1997;272:4391-4397.
- [150] Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:112-126.
- [151] Zwanziger D, Staat C, Andjelkovic AV, Blasig IE. Claudin-derived peptides are internalized via specific endocytosis pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1257:29-37.
- [152] Shen L, Weber CR, Turner JR. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol* 2008;181:683-695.
- [153] Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 1969;8:4108-4116.
- [154] Zhong L, Johnson WC, Jr. Environment affects amino acid preference for secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4462-4465.
- [155] Donnellyroberts DL, Lentz TL. Sodium Dodecyl Sulfate-Induced and Carbamylcholine-Induced Changes in Circular-Dichroism Spectra of Acetylcholine-Receptor Synthetic Peptides. *Mol Brain Res* 1993;19:55-61.
- [156] Buck M. Trifluoroethanol and colleagues: Cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q Rev Biophys* 1998;31:297-355.
- [157] Yang JT, Wu CS, Martinez HM. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol* 1986;130:208-269.
- [158] Camproux AC, Gautier R, Tuffery P. A hidden Markov model derived structural alphabet for proteins. *J Mol Biol* 2004;339:591-605.
- [159] Maupetit J, Tuffery P, Derreumaux P. A coarse-grained protein force field for folding and structure prediction. *Proteins* 2007;69:394-408.

- [160] Steiner O, Coisne C, Engelhardt B, Lyck R. Comparison of immortalized bEnd5 and primary mouse brain microvascular endothelial cells as in vitro blood-brain barrier models for the study of T cell extravasation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31:315-327.
- [161] Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, et al. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4690-4694.
- [162] Fukui A, Naito Y, Handa O, Kugai M, Tsuji T, Yoriki H, et al. Acetyl salicylic acid induces damage to intestinal epithelial cells by oxidation-related modifications of ZO-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:927-936.
- [163] Al-Sadi R, Ye D, Boivin M, Guo S, Hashimi M, Ereifej L, et al. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One* 2014;9:e85345.
- [164] Hering NA, Andres S, Fromm A, van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J, et al. Transforming growth factor-beta, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J Nutr* 2011;141:783-789.
- [165] Pfeiffer F, Schafer J, Lyck R, Makrides V, Brunner S, Schaeren-Wiemers N, et al. Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 2011;122:601-614.
- [166] Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, et al. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 2003;105:586-592.
- [167] Bacterial Endotoxins/Pyrogens: U.S. department of health and human services, U.S. food and drug administration, department of health, education, and welfare public health service food and drug administration [updated 01/26/2015 access 05/20/2015]. Available from: <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/InspectionTechnicalGuides/cm072918.htm>.
- [168] Huth US, Schubert R, Peschka-Suss R. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J Control Release* 2006;110:490-504.
- [169] Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1 beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2007;178:4641-4649.
- [170] Severson EA, Kwon M, Hilgarth RS, Parkos CA, Nusrat A. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;397:592-597.
- [171] Zhang L, Jouret F, Rinehart J, Sfakianos J, Mellman I, Lifton RP, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) inhibition induce Ca<sup>2+</sup>-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane. *J Biol Chem* 2011;286:16879-16890.
- [172] Ramirez SH, Fan S, Dykstra H, Rom S, Mercer A, Reichenbach NL, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5. *PLoS One* 2013;8:e55972.
- [173] Martinez-Estrada OM, Culleres A, Soriano FX, Peinado H, Bolos V, Martinez FO, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J* 2006;394:449-457.
- [174] Bhat AA, Sharma A, Pope J, Krishnan M, Washington MK, Singh AB, et al. Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells. *PLoS One* 2012;7:e37174.
- [175] Tavelin S, Hashimoto K, Malkinson J, Lazorova L, Toth I, Artursson P. A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides. *Mol Pharmacol* 2003;64:1530-1540.



- [176] Bailon P, Won CY. PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:1-16.
- [177] Williams RW, Chang A, Juretic D, Loughran S. Secondary structure predictions and medium range interactions. *Biochim Biophys Acta* 1987;916:200-204.
- [178] Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, et al. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *Am J Pathol* 2008;172:905-915.
- [179] Campbell M, Kiang AS, Kenna PF, Kerskens C, Blau C, O'Dwyer L, et al. RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *J Gene Med* 2008;10:930-947.
- [180] Baumgartner HK, Beeman N, Hodges RS, Neville MC. A D-peptide analog of the second extracellular loop of claudin-3 and -4 leads to mislocalized claudin and cellular apoptosis in mammary epithelial cells. *Chem Biol Drug Des* 2011;77:124-136.
- [181] Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:395-411.
- [182] Yamazaki Y, Tokumasu R, Kimura H, Tsukita S. Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Mol Biol Cell* 2011;22:1495-1504.
- [183] Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, et al. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 2006;79:949-957.
- [184] Yamamoto T, Saeki Y, Kurasawa M, Kuroda S, Arase S, Sasaki H. Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2008;300:517-524.
- [185] Lyck R, Ruderisch N, Moll AG, Steiner O, Cohen CD, Engelhardt B, et al. Culture-induced changes in blood-brain barrier transcriptome: implications for amino-acid transporters in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:1491-1502.
- [186] Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:1166-1178.
- [187] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 1996;271:18188-18193.
- [188] Schwarz BT, Wang F, Shen L, Clayburgh DR, Su L, Wang Y, et al. LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. *Gastroenterol* 2007;132:2383-2394.
- [189] Gruenberg J. The endocytic pathway: A mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:721-730.
- [190] Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, et al. The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992;70:715-728.
- [191] Vandersluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein Rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 1992;70:729-740.
- [192] Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M. Localization of low-molecular-weight GTP binding-proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 1990;62:317-329.
- [193] McCaffrey MW, Bielli A, Cantalupo G, Mora S, Roberti V, Santillo M, et al. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett* 2001;495:21-30.
- [194] Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* 1994;13:1287-1296.

- [195] McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Skare IB, et al. Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 19:3387-3398.
- [196] Ogura K, Okamura H. Conformational change of Sos-derived proline-rich peptide upon binding Grb2 N-terminal SH3 domain probed by NMR. *Sci Rep* 2013;3:2913.
- [197] Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:142-147.
- [198] Fisher PJ, Prendergast FG, Ehrhardt MR, Urbauer JL, Wand AJ, Sedarous SS, et al. Calmodulin interacts with amphiphilic peptides composed of all D-amino acids. *Nature* 1994;368:651-653.
- [199] Pritsker M, Jones P, Blumenthal R, Shai YC. A synthetic all D-amino acid peptide corresponding to the N-terminal sequence of HIV-1 gp41 recognizes the wild-type fusion peptide in the membrane and inhibits HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7287-7292.
- [200] Stewart JM, Woolley DW. All-D-bradykinin and the problem of peptide antimetabolites. *Nature* 1965;206:619-620.
- [201] Flouret G, Duvigneaud V. The synthesis of D-oxytocin, the enantiomer of the posterior pituitary hormone, oxytocin. *J Am Chem Soc* 1965;87:3775-3776.
- [202] Werle M, Bernkop-Schnurch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 2006;30:351-367.
- [203] Fujita T, Kawahara I, Quan YS, Hattori K, Takenaka K, Muranishi S, et al. Permeability characteristics of tetragastrins across intestinal membranes using the Caco-2 monolayer system: Comparison between acylation and application of protease inhibitors. *Pharm Res* 1998;15:1387-1392.
- [204] Dasgupta P, Singh A, Mukherjee R. N-terminal acylation of somatostatin analog with long chain fatty acids enhances its stability and anti-proliferative activity in human breast adenocarcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 2002;25:29-36.
- [205] Hinds KD, Kim SW. Effects of PEG conjugation on insulin properties. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:505-530.
- [206] Lee SH, Lee S, Youn YS, Na DH, Chae SY, Byun Y, et al. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1. *Bioconjug Chem* 2005;16:377-382.
- [207] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001;359:1-16.
- [208] Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2005;168:29-33.
- [209] Chen Y, Blair K, Smith A. Robust self-renewal of rat embryonic stem cells requires fine-tuning of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *Stem Cell Reports* 2013;1:209-217.
- [210] Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10330-10334.
- [211] Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a008052.
- [212] Yang RH, Strong JA, Zhang JM. NF-kappaB mediated enhancement of potassium currents by the chemokine CXCL1/growth related oncogene in small diameter rat sensory neurons. *Mol Pain* 2009;5:26.
- [213] Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 2011;21:146-158.
- [214] Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1 beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2007;178:4641-4649.

- [215] Chiu PS, Lai SC. Matrix metalloproteinase-9 leads to claudin-5 degradation via the NF-kappaB pathway in BALB/c mice with eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *PLoS One* 2013;8:e53370.
- [216] Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:496-504.
- [217] Haorah J, Heilman D, Knipe B, Chrastil J, Leibhart J, Ghorpade A, et al. Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:999-1009.
- [218] Cereda CM, Tofoli GR, Maturana LG, Pierucci A, Nunes LA, Franz-Montan M, et al. Local neurotoxicity and myotoxicity evaluation of cyclodextrin complexes of bupivacaine and ropivacaine. *Anesth Analg* 2012;115:1234-1241.

## 7 Eigene Veröffentlichungen

### Publikationen in Fachzeitschriften

1. **Staat C**, Coisne C, Dabrowski S, Stamatovic SM, Andjelkovic AV, Wolburg H, et al. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials* 2015;54:9-20.
2. Dabrowski S<sup>§</sup>, **Staat C**<sup>§</sup>, Zwanziger D, Sauer RS, Bellmann C, Gunther R, et al. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals. *Antioxid Redox Signal* 2015;22:1-14.
3. Sauer RS, Krug SM, Hackel D, **Staat C**, Konasin N, Yang S, et al. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release* 2014;185:88-98.
4. Zwanziger D<sup>§</sup>, **Staat C**<sup>§</sup>, Andjelkovic AV, Blasig IE. Claudin-derived peptides are internalized via specific endocytosis pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1257:29-37.
5. Zwanziger D, Hackel D, **Staat C**, Bocker A, Brack A, Beyermann M, et al. A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Mol Pharm* 2012;9:1785-1794.

<sup>§</sup>, Autoren haben zu gleichen Teilen zur Arbeit beigetragen

### Vorträge auf Fachtagungen

1. **Staat C**, Dabrowski S, Wolburg H, Engelhardt B, Coisne C, Campbell M, et al. Claudin peptidomimetics as potential drug enhancers for the blood-brain barrier. 8th Brains for brain european workshop and InNerMeD information network, Frankfurt, Germany, 2014.
2. **Staat C**, Blasig IE. Targeting BBB permeability by transient modulation of extracellular claudin-claudin interactions. JUSTBRAIN Final coordination & management meeting, Bern, Suisse, 2014.
3. **Staat C**, Gehne N, Dabrowski S, Zwanziger D, Blasig IE. Structure and action of claudin peptidomimetics. 16th International symposium on signal transduction in the blood-brain barriers, Sümeg, Hungary, 2013.
4. **Staat C**, Zwanziger D, Hackel D, Böcker A, Brack A, Beyermann M, et al. Beeinflussung peripherer Nerven mit Hilfe eines Tight Junction-modulierenden Peptides. 14. Bad Herrenalber Transporter- und Barriere-Tage, Bad Herrenalb, Germany, 2012.

### Posterpräsentationen auf Fachtagungen

1. Dabrowski S, **Staat C**, Blasig IE. Modulation of paracellular barrier properties using claudin mimetic proteins and peptides. 15th International symposium on signal transduction in the blood-brain barriers, Potsdam, Germany, 2012.
2. **Staat C**, Zwanziger D, Blasig IE. Claudin-derived peptides for modulation of the blood-brain barrier (BBB) permeability. 14th International symposium on signal transduction in the blood-brain barriers, Istanbul, Turkey, 2011.
3. **Staat C**, Gehne N, Dabrowski S, Zwanziger D, Blasig IE. Structure and action of claudin peptidomimetics. Barriers and channels formed by tight junction proteins - From mechanism to diseases and back, Berlin, Germany, 2011.
4. **Staat C**, Dabrowski S, Zwanziger D, Blasig IE. Claudin-derived peptides for modulation of the blood-brain barrier (BBB) permeability. Berlin Neuroscience Forum, Bad Liebenwalde, Germany, 2010.

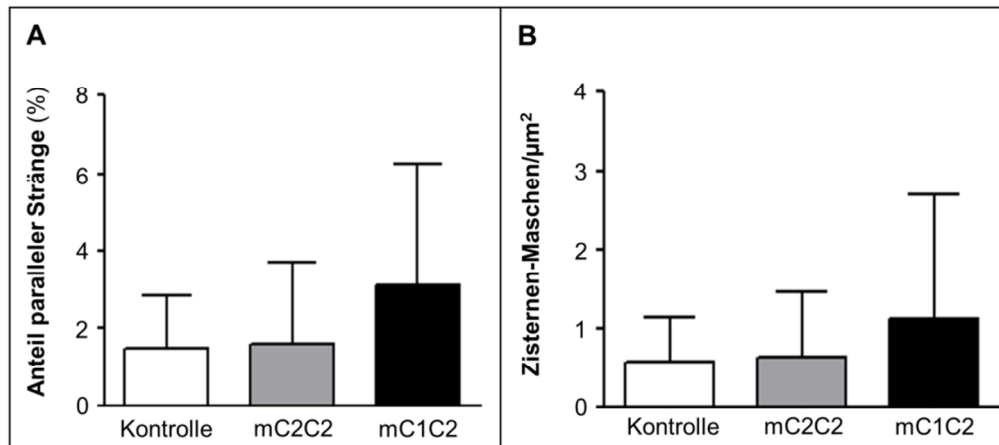
## **8 Eidesstattliche Erklärung**

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

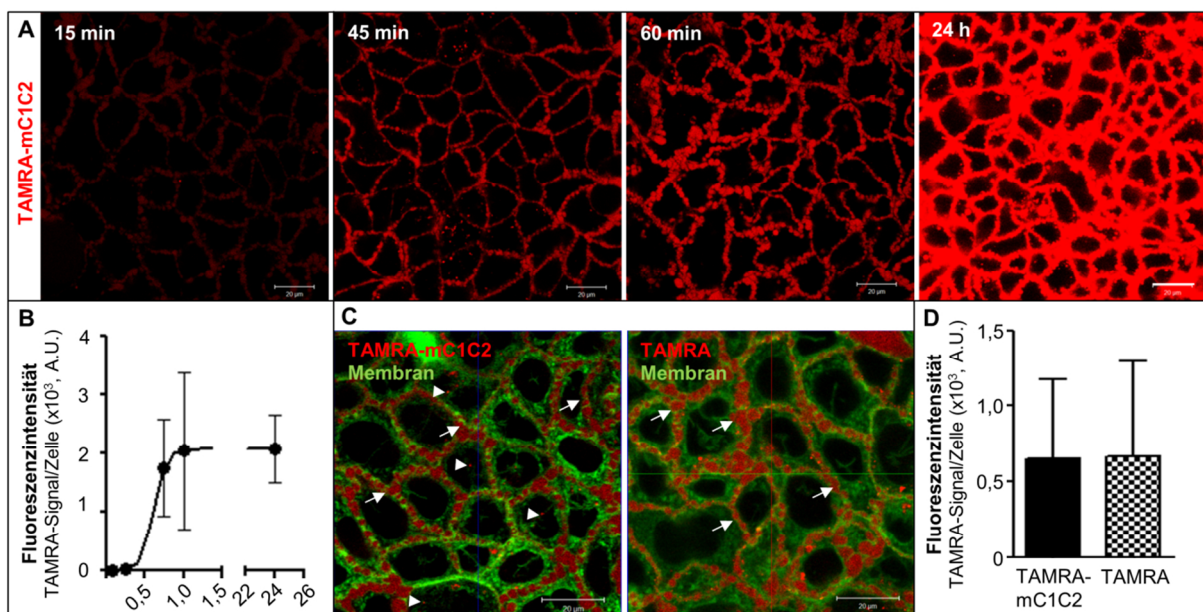
Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, 30.06.2015

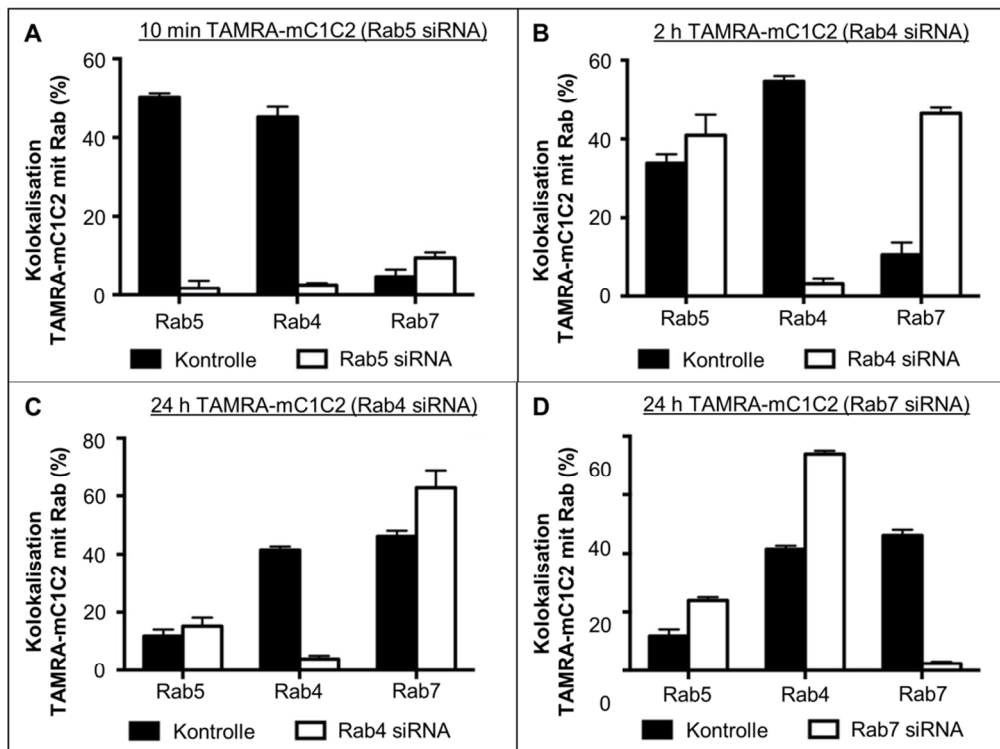
## 9 Anhang



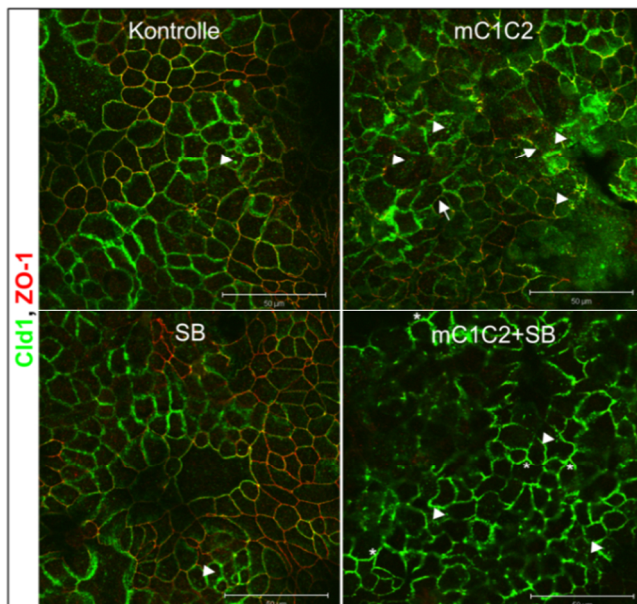
**Abb. A50 mC1C2 verändert die Parallelität und Form von Claudin-1-basierten Strangnetzwerken.** Claudin-1-yellow fluorescent protein (Cld1-YFP)-transfizierte HEK-293-Zellen wurden 24 h apikal mit 100 μM mC1C2, dem Kontrollpeptid mC2C2 (100 μM) oder ohne Peptid kultiviert (Kontrolle); das Strangnetzwerk wurde mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht. Gegenüber den Zellen ohne Peptid (Kontrolle) oder mC2C2-Zellen erhöhte mC1C2 (A) den Anteil parallel verlaufender Stränge ( $\geq 3$  parallele Stränge, Abstand maximal 70 nm) an der Gesamtfläche und (B) die Zahl zisternenartiger Maschen pro  $\mu\text{m}^2$ . Analyzierte Replikas,  $n \geq 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SD.



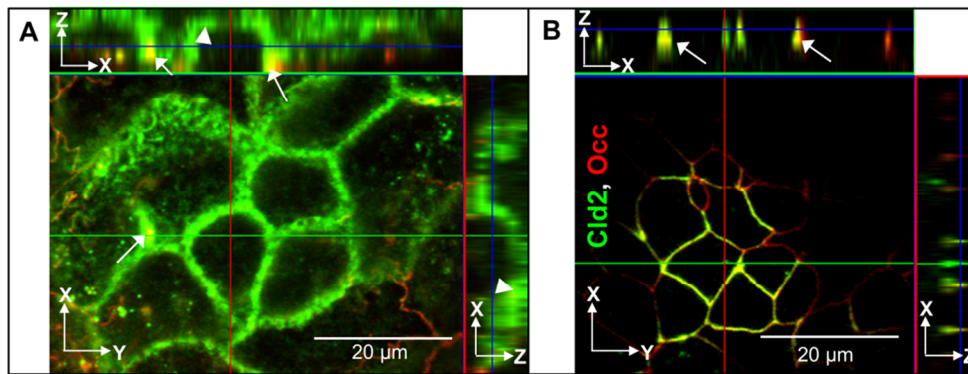
**Abb. A51 Anreicherung von TAMRA-mC1C2 in Caco-2-Zellen.** (A, C) Lebendzellmikroskopie von Zellen die für unterschiedlich lange Zeiträume mit 40 μM 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 oder TAMRA (rot) inkubiert wurden; (A) TAMRA-mC1C2 reicherte sich zeitabhängig an; (B) Quantifizierung der zeitabhängigen Peptidanreicherung auf Basis der TAMRA-Fluoreszenz/Zelle, nach 24 h Inkubation konnte das TAMRA-Signal aufgrund der gewählten Mikroskopeinstellungen nur gesättigt detektiert werden. (C) Plasmamembranständige (Pfeil) und sehr leichte intrazellulär (Dreieck) Anreicherung von TAMRA-mC1C2, 2 h nach Applikation auf die Zellen; TAMRA reicherte sich ebenfalls plasmamembranständig, nicht aber intrazellulär an; Membran, Hexadecanoylaminofluorescein (grün). (D) Die Quantifizierung der Peptidanreicherung auf Basis der TAMRA-Fluoreszenz/Zelle zeigte nach 24 h Inkubation kein Unterschied zwischen TAMRA-mC1C2 und TAMRA allein. A.U., arbitrary unit; analysierte Zellzahl,  $n \geq 170$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; Mann-Whitney U Test.



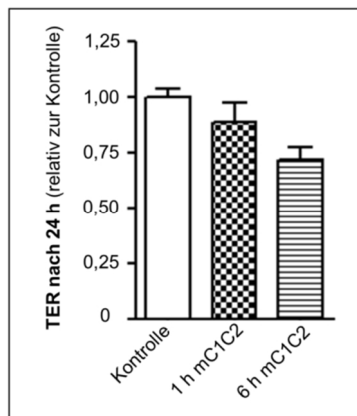
**Abb. A52** Der siRNA-vermittelter *knockdown* von Rab5, -4 und -7 beeinflusst die Endozytose von mC1C2. Gegenüber der Kontrolle (Kontroll-siRNA) verminderte der siRNA-vermittelte *knockdown* von (A) Rab5 die Zellanreicherung von 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-mC1C2 ( $8\mu\text{M}$ ) nach 10 min Inkubation stark und reduzierte die Kolokalisation mit Rab4; der *knockdown* von Rab4 führt nach (B) 2 h und (C) 24 h Peptidinkubation zur Anreicherung von TAMRA-mC1C2 in Rab7-positiven Endosomen; (D) der *knockdown* von Rab7 führte zur Anreicherung von TAMRA-mC1C2 in Rab5 und -4 positiven Endosomen; Mittelwert $\pm$ SD.



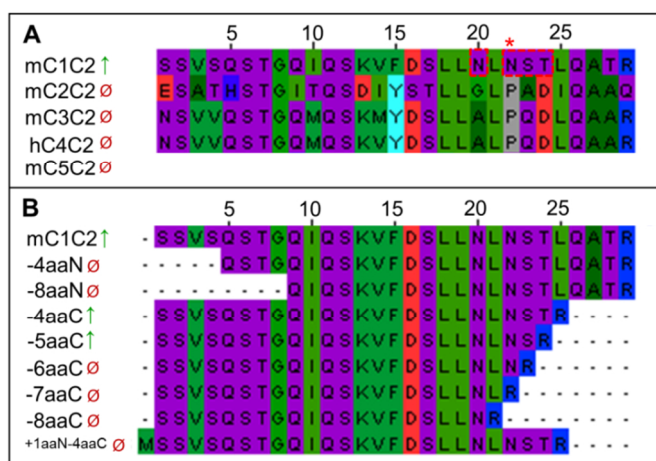
**Abb. A53** Die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase-3 führt in Caco-2-Zellen zur veränderten Expression von *tight junction*-Proteinen nach mC1C2-Behandlung. Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Filterkulturen die mit  $30\mu\text{M}$  SB415286 für 60 min vorbehandelt und anschließend apikal mit  $200\mu\text{M}$  mC1C2 und SB415286 (SB) für 24 h inkubiert wurden; die Inkubation mit mC1C2 resultierte gegenüber den Zellen die ohne Peptid und Inhibitor kultiviert wurden (Kontrolle) in einer Erhöhung des intrazellulären Claudin-1 (Cld1)-Signals (grün, Dreieck) und einer Reduktion von Cld1 in der Plasmamembran (Pfeil). SB415286 allein beeinflusste die Cld1/zonula occludens protein-1 (ZO-1) Expression (rot) nicht. Die Ko-Inkubation von SB415286+mC1C2 führte zur Reduktion des ZO-1 und einer Steigerung des Cld1-Signals in der Plasmamembran (\*); Maßstab,  $50\mu\text{m}$ .



**Abb. A54 Claudin-1 zeigt in Caco-2-Zellen auch eine Anreicherung in Bereichen außerhalb der *tight junctions*.** Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Filterkulturen. **(A)** Claudin-1 (Cld1, grün) kolokalisiert mit Occludin (Occ, rot) in den *tight junctions* (Pfeil), ist aber auch in der apikalen Plasmamembran angereichert (Dreieck). **(B)** Claudin-2 (Cld2, grün) ist ausschließlich in den *tight junctions* (Pfeil) angereichert und kolokalisiert dort mit Occ (rot, Pfeil). Maßstab, 20  $\mu$ m.



**Abb. A55 mC1C2 initiiert die Öffnung der *tight junctions*.** Caco-2-Filterkulturen wurden apikal mit 200  $\mu$ M mC1C2 für 1 h oder 6 h inkubiert und das Medium anschließend gegen Medium ohne Peptid ausgetauscht. 24 h nach dem Start des Experimentes wurde der tranzelluläre elektrische Widerstand (TER), relativ zu Zellen bei denen nur das Medium gewechselt wurde, bestimmt. Die zeitlich begrenzte Inkubation der Zellen mit mC1C2 initiierte die Öffnung der *tight junctions*. Mittelwert $\pm$ SD.



**Abb. A56 Sequenzvergleich der Peptide mC1C2, mC2C2, mC3C2, hC4C2, mC5C2 und Bestimmung der Wirkregion von mC1C2.** **(A)** Sequenzvergleich der Claudin (Cld)-Peptide aus der ersten extrazellulären Schleife von Cld1-5 (Tab. 10); die Peptide besitzen eine hohe Sequenzhomologie von 66%, wobei die Aminosäuren 20 und 22-24 (---) von mC1C2 (barriereöffnend,  $\uparrow$ ) gegenüber den anderen Peptiden (keine barriereöffnende Wirkung,  $\emptyset$ ) eine sehr geringe Homologie von 20% aufweisen;\*, die Substitutionen N22S, N22I, N22Q, N22L, N22D, N22E führen zum Wirkverlust von mC1C2. **(B)** Vergleich der N- bzw. C-terminal um 4-8 Aminosäuren verkürzten mC1C2-Varianten (-4/-8aaN bzw. -4/-8aaC) und der N-terminal um 1 Aminosäure verlängerten Variante (mC1C2+1aaN-4aaC); die wirkrelevante Region von mC1C2 umfasst die Aminosäureposition 1-23. Eigenschaften der Aminosäuren: violett, polar (ungeladen); grün, unpolar (hydrophob); rot, sauer; blau, basisch; türkis, Tyrosin; grau, Prolin; Sequenzanordnung, ClustalW2 [62]; Darstellung, Jalview [63].



**Tab. A15 Sekundärstruktureigenschaften von mC1C2 in verschiedenen Puffern**

	Sekundärstrukturneigung (%)			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet
mC1C2 in PP	0,1±0,1 {5,1}	40,7±5,1	10,7±1,8	48,5±3,8
+ 0,25 mM SDS	1,2 ±2,1 {9,6}	45,6±10,6	7,0±3,8	46,2±5,4
+ 0,50 mM SDS	6,1±5,5 {15,3}	48,0±8,5	2,5±2,9	43,4±3,0
+ 0,75 mM SDS	34,3 (29,3)	28,8	5	31,9
+ 1,00 mM SDS	36,0±14,4 {33,5}	33,5±19,8	0	30,5±5,5
+ 5,00 mM SDS	60,2±8,7 {58,9}	9,6±7,8	0	30,2±2,5
+ 15,00 mM SDS	61,0 {56,2}	8,4	0	30,6
+ 30,00 mM SDS	59,6 {59,2}	9,0	0	31,4
+ 1% TFE	0 {1,5}	53,4	7,1	39,5
+ 5% TFE	0 {3,2}	54,8	5,4	39,8
+ 15% TFE	10,2 {12,5}	54,8	0	35,0
+ 20% TFE	36,1 {38,3}	25,2	0	38,7
+ 40% TFE	64,4 {65,5}	0	0	35,6
+ 60% TFE	66,0±3,5 {68,9}	0,9±2,0	0	33,1±2,9
+ 80% TFE	71,0±2,9 {73,7}	0	0	29,0±2,9

Berechnete Sekundärstrukturneigung von mC1C2 (Tab. 10) auf Basis seiner Zirkulardichroismus-Spektren und Referenzspektren [157] und zusätzlich, für den  $\alpha$ -Helixanteil ({}), auf Grundlage des Spektrenminimums bei 208 nm [153]. PP, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4; SDS, Natriumdodecylsulfat; TFE, Trifluorethanol;  $n \geq 8$  Akkumulationen; Mittelwert±SD.

**Tab. A16 Sekundärstrukturvergleich von mC1C2 und mC2C2**

	Sekundärstrukturneigung (%)			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet
mC1C2 in PP	0,1±0,1 {5,1}	40,7±5,1	10,7±1,8	48,5±3,8
+ 0,5 mM SDS	6,1±5,5 {15,3}	48,0±8,5	2,5±2,9	43,4±3,0
+ 60% TFE	66,0±3,5 {68,9}	0,9±2,0	0	33,1±2,9
mC2C2 in PP	0 {7,6}	39,4±4,6	13,5±1,8	47,1±1
+ 0,5 mM SDS	0 {4,7}	38,0±11,6	14,4±3,7	47,6±8,0
+ 60% TFE	22,2±5,0 {30,2}	41,6±6,9	0	36,2±2,4

Berechnete Sekundärstrukturneigung von mC1C2 und mC2C2 (Tab. 10) auf Basis ihrer Zirkulardichroismus-Spektren und Referenzspektren [157] und zusätzlich, für den  $\alpha$ -Helixanteil ({}), auf Grundlage des Spektrenminimums bei 208 nm [153]. PP, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4; SDS, Natriumdodecylsulfat; TFE, Trifluorethanol;  $n \geq 32$  Akkumulationen; Mittelwert±SD.

**Tab. A17 Sekundärstruktureigenschaften von verkürzten mC1C2-Varianten**

	Sekundärstrukturneigung (%)							
	$\alpha$ -Helix		$\beta$ -Faltblatt		$\beta$ -Schleife		Ungeordnet	
	SDS	TFE	SDS	TFE	SDS	TFE	SDS	TFE
mC1C2	6,1±5,5 {15,3}	66,0±3,5 {68,9}	48,0±8,5	0,9±2,0	2,5±2,9	0	43,4±3,0	33,1±2,9
-4aaC	0,5±0,8 {10,5}	49,0±4,9 {49,8}	45,4±2,9	15,3±6,3	7,9±2,3	0	46,2±3,1	35,7±2,1
-5aaC	0,3±0,5 {11,6}	53,4±15,2 {54,5}	46,8±2,8	13,6±16,3	7,5±2,2	0	45,4±2,3	33,0±1,8
-6aaC	0,5±0,6 {7,6}	47,7±2,3 {47,3}	58,2±6,6	18,8±3,4	3,3±4,4	0	38,0±2,8	33,5±1,1
-7aaC	5,7±9,2 {8,9}	44,6±9,3 {43,7}	61,6±8,7	22,5±12,1	0	0	32,7±2,1	32,9±2,8
-8aaC	0 {0}	42,2 {41,6}	58,3	27,1	7,2	0	34,5	30,7
-4aaN	19,1 {20,6}	65,1 {61,8}	48,8	2,1±2,6	0	0	32,1	32,8±0,3
-8aaN	19,5 {14,8}	61,8 {56,8}	52,1	6,9±2,4	0	0	28,4	31,3±0,6

Berechnete Sekundärstrukturneigung von mC1C2 und C- bzw. N-terminal (-XaaC/-XaaN) verkürzten mC1C2-Derivate (Tab. 10) auf Basis ihrer Zirkulardichroismus-Spektren und Referenzspektren [157] und zusätzlich, für den  $\alpha$ -Helixanteil ({}), auf Grundlage des Spektrenminimums bei 208 nm [153]. Messungen in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 mit SDS (0,5 mM Natriumdodecylsulfat) oder TFE (60% Trifluorethanol);  $n \geq 16$  Akkumulationen; Mittelwert±SD.

**Tab. A18 Sekundärstrukturvergleich von mC1C2 und mC1C2(N22S)**

	Sekundärstrukturneigung (%)			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet
mC1C2 in PP	0,1±0,1 {5,1}	40,7±5,1	10,7±1,8	48,5±3,8
+ 0,5 mM SDS	6,1±5,5 {15,3}	48,0±8,5	2,5±2,9	43,4±3,0
+ 60% TFE	66,0±3,5 {68,9}	0,9±2,0	0	33,1±2,9
mC1C2(N22S) in PP	0 {1,0}	48,4	9,8	41,8
+ 0,5 mM SDS	5,8 {5,8}	58,4	0	35,8
+ 60% TFE	58,1 {36,9}	7,2	0	34,7

Berechnete Sekundärstrukturneigung von mC1C2 und mC1C2(N22S) (N→S Substitution an Position 22) (Tab. 10) auf Basis ihrer Zirkulardichroismus-Spektren und Referenzspektren [157] und zusätzlich, für den  $\alpha$ -Helixanteil ({}), auf Grundlage des Spektrenminimums bei 208 nm [153]. PP, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4; SDS, Natriumdodecylsulfat; TFE, Trifluorethanol; n≥8 Akkumulationen; Mittelwert±SD.

**Tab. A19 Sekundärstrukturvergleich von mC1C2, Invers-mC1C2 und D-AS-mC1C2**

	Sekundärstrukturneigung (%)			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet
mC1C2 in PP	0,1±0,1 {5,1}	40,7±5,1	10,7±1,8	48,5±3,8
+ 0,5 mM SDS	6,1±5,5 {15,3}	48,0±8,5	2,5±2,9	43,4±3,0
+ 60% TFE	66,0±3,5 {68,9}	0,9±2,0	0	33,1±2,9
Invers-mC1C2 in PP	0 {3,2}	41,6	11,8	46,6
+ 0,5 mM SDS	12,8 {9,4}	48,3	1,1	37,8
+ 60% TFE	48,1 {51,9}	14,1	0	37,8
D-AS-mC1C2 in PP	0 {3,2}	47,9	8,9	43,2
+ 0,5 mM SDS	4,1 {9,4}	57,5	1,2	37,2
+ 60% TFE	55,9 {53,8}	0	10,7	33,4

Berechnete Sekundärstrukturneigung von mC1C2, Invers-mC1C2 (inverse mC1C2-Aminosäuresequenz) und D-AS-mC1C2 (aus D-Aminosäuren) (Tab. 10) auf Basis ihrer Zirkulardichroismus-Spektren und Referenzspektren [157] und zusätzlich, für den  $\alpha$ -Helixanteil ({}), auf Grundlage des Spektrenminimums bei 208 nm [153]. PP, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4; SDS, Natriumdodecylsulfat; TFE, Trifluorethanol; n≥8 Akkumulationen; Mittelwert±SD.

**Tab. A20 Sekundärstrukturvergleich von mC1C2 und mC1C2+1aaN-4aaC**

	Sekundärstrukturneigung (%)			
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet
mC1C2	0,1±0,1 {5,1}	40,7±5,1	10,7±1,8	48,5±3,8
+ 0,5 mM SDS	6,1±5,5 {15,3}	48,0±8,5	2,5±2,9	43,4±3,0
+ 60% TFE	66,0±3,5 {68,9}	0,9±2,0	0	33,1±2,9
+1aaN-4aaC	0	48,0	10,1	41,9
+ 0,5 mM SDS	0,6	69,3	2,1	28,0
+ 60% TFE	35,9	29,9	0	34,2

Berechnete Sekundärstrukturneigung von mC1C2 und mC1C2+1aaN-4aaC (Tab. 10) auf Basis ihrer Zirkulardichroismus-Spektren und Referenzspektren [157] und zusätzlich, für den  $\alpha$ -Helixanteil ({}), auf Grundlage des Spektrenminimums bei 208 nm [153]. PP, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4; SDS, Natriumdodecylsulfat; TFE, Trifluorethanol; n≥8 Akkumulationen; Mittelwert±SD.

**Tab. A21 Pfortendruckschwelle vor Behandlungsbeginn**

Behandlung	0h	24 h	48 h	72 h	96 h
Kontrolle ipsilateral	71,17±2,13	68,00±3,85	64,00±1,92	69,3±3,08	66,67±1,25
mC1C2 (400 $\mu$ M) ipsilateral	77,67±1,80	74,67±3,00	68,00±2,02	69,00±1,86	73,30±2,87
Kontrolle contralateral	72,67±1,74	67,67±3,32	69,00±1,61	69,33±3,61	65,00±3,23
mC1C2 (400 $\mu$ M) contralateral	77,33 ±1,30	63,33±2,36	67,67±2,03	65,0±1,25	67,67±2,09

Kontrolle, 0,9% NaCl; Pfortendruckschwelle, g; n=6; Mittelwert±SEM; ANOVA; \*, p≤0,05.