

Charakterisierung und Modulation von Claudinen zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

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

Olga Breitzkreuz-Korff

aus Alamedin, Kirgisistan

Oktober, 2017

Die Dissertation wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter der Leitung von PD Dr. Ingolf E. Blasig angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ingolf E. Blasig

Molekulare Zellphysiologie

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

2. Gutachter: Prof. Dr. Sigmar Stricker

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Institut für Chemie und Biochemie

Freie Universität Berlin

Disputation am: 16.03.2018

DANKSAGUNG

PD Dr. Ingolf E. Blasig danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Arbeit und die vielen konstruktiven Diskussionen. Bei Prof. Dr. Sigmar Stricker bedanke ich mich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für ihre stete Hilfsbereitschaft und die motivierende Stimmung während der gesamten Zeit. Besonders möchte ich mich bei Dr. Lars Winkler bedanken für seine Unterstützung bei den tausend „großer Weltuntergang“-Situationen im Labor und die wegweisenden Ideen, ohne die diese Arbeit nie so weit fortgeschritten wäre. Nora Gehne danke ich für ihre spontane Hilfe bei jedem „ImageJ macht mich wahnsinnig“ Problem, die hundert Kuchen, die wir geteilt haben, sowie die gemeinsame Liebe zu Tomaten auf der Fensterbank.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie. Ohne meine Eltern, die immer alles Erdenkliche dafür gegeben haben, dass ich meinen Weg gehen konnte, und meinen Ehemann Gerrit, der mich auf diesem Weg begleitet und immer auf's Neue motiviert, wäre diese Arbeit nie möglich geworden. Danke!

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG

ABBILDUNGSVERZEICHNIS IV

TABELLENVERZEICHNIS V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

ZUSAMMENFASSUNG VIII

SUMMARY IX

1 EINLEITUNG 1

1.1 Tight Junctions im Endothel: Struktur und molekulare Zusammensetzung 1

1.2 Die Proteinfamilie der Claudine 4

1.2.1 Proteinstruktur und Funktion 4

1.2.2 Polymerisierung der Claudine zu Tight Junction-Strängen 6

1.2.3 Eigenschaften ausgewählter Tight Junction-Proteine der Blut-Hirn-Schranke 7

1.3 Tight Junction-Regulation an der Blut-Hirn-Schranke unter pathologischen Bedingungen 8

1.3.1 Zerebrale Durchblutungsstörungen 10

1.3.2 Hirntumore 12

1.4 Transport pharmakologischer Wirkstoffe durch die Blut-Hirn-Schranke 12

1.4.1 Permeationswege durch die Blut-Hirn-Schranke 13

1.4.2 Ein Clostridium perfringens Enterotoxin abgeleitete Claudin-3-Modulatoren 16

1.4.3 Lösungsvermittler lipophiler Wirkstoffe 16

1.5 Zielstellung 18

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 Material 19

2.1.1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien 19

2.1.2 Verwendete Bakterien, eukaryotische Zelllinien und Mausstämme 23

2.1.3 Software und Statistik 24

2.2 Methoden 25

2.2.1 Molekularbiologische Methoden 25

2.2.1.1 Umklonierung von Plasmiden 25

2.2.1.1.1 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration 25

2.2.1.2 Plasmid-Isolation aus E. coli DH5 α und ihre Langzeitlagerung 25

2.2.1.3 RNA-Isolation aus Zellen, cDNA-Synthese und Quantitative Real Time-PCR 26

2.2.2 Mikrobiologische Methoden 26

2.2.2.1	Herstellung und Lagerung elektrokompetenter E. coli DH5 α Zellen	26
2.2.2.2	Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli BL21 (DE3)	26
2.2.3	Protein-biochemische Methoden	27
2.2.3.1	E. coli-Zelllyse und affinitätschromatographische Reinigung über das GST-Tag	27
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.2.3.3	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	27
2.2.3.4	Western Blot	28
2.2.4	Zellbiologische Methoden	29
2.2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	29
2.2.4.2	Transiente und stabile Transfektion von HEK-293 bzw. MDCK-II Zellen	29
2.2.4.3	In vitro Behandlung mit Testsubstanzen	30
2.2.4.4	Zelllyse für SDS-PAGE	30
2.2.4.5	Konfokale Mikroskopie	31
2.2.4.5.1	Lebendzell-Mikroskopie zur Messung von trans-Interaktionen	32
2.2.4.5.2	Fixierung und Immunfluoreszenz von Zelllinien, primären Zellen und Gewebeschnitten	32
2.2.4.6	Messung des transzellulären elektrischen Widerstands	33
2.2.4.7	Zellvitalitätstest	34
2.2.4.8	Vorbereitungen für Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie	34
2.2.5	Bestimmung der BO1-Löslichkeit in 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	35
2.2.6	Tierexperimentelle Arbeiten	35
2.2.6.1	Präparation von Kapillaren und Herstellung primärer Gehirnkapillarendothelzellen	35
2.2.6.2	Hypoxie an isolierten Gehirnkapillarendothelzellen	36
2.2.6.3	Systemische Substanzapplikation und Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe	36
2.2.6.4	Middle Cerebral Artery Occlusion	37
2.2.6.5	Ermittlung der in vivo Verträglichkeit von BO1 und kinetische Analysen	38
2.2.6.6	BO1-Applikation im Glioblastom der Maus	39
2.2.6.7	Anfertigung von Kryoschnitten	39
2.2.7	Histologische Färbungen	40
2.2.7.1	Hämatoxylin-Färbung von Gewebe und Quantifizierung eines Infarktareals	40
2.2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Auswahl der Claudine als Targets für die Modulation der Blut-Hirn-Schranke	41
3.2	Claudin-3 als Target für die Modulation der Blut-Hirn-Schranke	43
3.2.1	Das nicht-toxische Clostridium perfringens Enterotoxin-Fragment bindet nicht an Endothelzellen	43
3.2.2	Claudin-3 wird an der Blut-Hirn-Schranke schwach exprimiert und beeinflusst Claudin-1	44
3.2.3	Der Claudin-3-Knockout geht einher mit einer veränderten Tight Junction-Strangmorphologie und einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke	48
3.2.4	Claudin-3-Defizienz unter pathologischen Bedingungen	50

3.2.4.1	Claudin-3-Defizienz bewirkt bei Ischämie eine im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche Regulation von Claudin-5, Occludin und ZO-1 an der Blut-Hirn-Schranke	50
3.2.4.2	Unter hypoxischen Bedingungen ist die Claudin-1-Transkription verringert	57
3.3	Die niedermolekulare Substanz BO1 zur Modulation von Claudin-5	58
3.3.1	Löslichkeit und Toxizität des BO1 sowie seiner Derivate	58
3.3.2	BO1 reduziert die Cldn5-Proteinmenge stärker als seine Derivate	60
3.3.3	BO1 reduziert die Dichtigkeit endothelialer Zellbarrieren	62
3.3.3.1	BO1 beeinflusst tendenziell die Tight Junction-Ultrastruktur	63
3.3.3.2	BO1 vermindert die Claudin-5-Transkription	65
3.3.4	Optimierung der Löslichkeit von BO1 mittels 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	66
3.4	BO1 und 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke	68
3.5	BO1 verbessert die Wirkung von Paclitaxel im Glioblastom der Maus	72
4	DISKUSSION	75
4.1	Cldn22, -24 und -25 als Targets für eine Modulation der Blut-Hirn-Schranke	75
4.2	Relevanz von Claudin-3 in der Blut-Hirn-Schranke und als Drug Target	77
4.3	Modulation der Blut-Hirn-Schranke mittels BO1	81
4.3.1	Bedeutung der Gesamtstruktur und Wirkmechanismus von BO1	82
4.3.2	Dimethylsulfoxid und 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Lösungsvermittler	86
4.3.3	BO1 wirkt in vivo auf die Blut-Hirn-Schranke	88
4.4	Schlussfolgerungen	92
5	LITERATUR	95
6	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	114
7	ANHANG	115
7.1	Untersuchungen zur Funktion von Cldn3	115
7.2	BO1-Untersuchungen	116

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Neurovaskulären Einheit und Aufbau der Endothel-Zellkontakte der Blut-Hirn-Schranke.	3
Abb. 1.2: Struktur der TJs	3
Abb. 1.3: Struktur eines Claudins.	5
Abb. 1.4: Interaktionen von Claudinen	6
Abb. 1.5: Wechselwirkung zwischen Adherens Junctions und Tight Junctions.	9
Abb. 1.6: Schematischer Verlauf eines Infarktgeschehens.	11
Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Transportwege durch die BHS.	14
Abb. 1.8: Struktur von β -Cyclodextrin bzw. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin.	17
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Messung homophilen Kontaktanreicherungen	32
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Applikationsregime.	37
Abb. 3.1: In HEK-293 Zellen bilden Cldn12, -22, -24 und -25 keine homologen trans-Interaktionen aus.	42
Abb. 3.2: Cldn-12, -22, -24 und -25 tragen nicht zur Erhöhung des TER in MDCK-II-Zellen bei.	43
Abb. 3.3: GST-cCPE ₁₉₄₋₃₁₉ bindet an die Epithelzelllinie Caco-2, jedoch nicht an primäre Gehirnkapillarendothelzellen.	44
Abb. 3.4: Das murine Gehirn weist eine geringe Cldn3-Transkription auf.	44
Abb. 3.5: Die Cldn3-Transkription in isolierten Gehirnkapillarendothelzellen ist im Vergleich zu anderen TJ-Komponenten gering, beeinflusst aber die Cldn1-Transkription.	45
Abb. 3.6: Cldn3-KO Gehirnkapillarendothelzellen weisen im Vergleich zum WT eine reduzierte Cldn1-Proteinexpression auf.	46
Abb. 3.7: In Gehirndothelzellen sind Cldn1 und Cldn 12 im Vergleich zu Cldn5 und Occl diffuser lokalisiert.	48
Abb. 3.8: Cldn3-KO Mäuse weisen keine Auffälligkeiten in der ZNS-Morphologie auf.	48
Abb. 3.9: Der Cldn3-KO verändert die Struktur der TJ-Stränge isolierter Gehirnkapillaren.	49
Abb. 3.10: Cldn3-KO Mäuse nehmen zerebral im Vergleich zum Wildtyp die doppelte Natriumfluorescein-Menge auf.	50
Abb. 3.11: Cldn3-KO Mäuse haben ein geringeres, relatives Infarktvolumen als Wildtyp-Mäuse.	51
Abb. 3.12: Veränderungen der TJs im infarzierten Striatum sind nach 3 h Reperfusion erkennbar.	52
Abb. 3.13: ZO-1 ist in TJs der Gehirnkapillaren nach 3 h Reperfusion in WT-Mäusen im Gegensatz zum Cldn3-KO verringert.	53
Abb. 3.14: Cldn5 und ZO-1 in zerebralen TJs von WT-Mäusen nach 48 h Reperfusion werden im Vergleich zum Cldn3-KO unterschiedlich reguliert.	54
Abb. 3.15: Occl und ZO-1 in TJs der WT-Gehirnkapillaren sind 3 h nach MCAO verringert, im Cldn3-KO hingegen unverändert.	55
Abb. 3.16 Occl ist in zerebralen TJs von WT- und Cldn3-KO Mäusen nach 48 h Reperfusion verringert.	56
Abb. 3.17: Die Expression von Aquaporin-4 nach Ischämie ist im WT und Cldn3-KO nicht verschieden.	57
Abb. 3.18: Die Cldn1-mRNA-Transkription ist unter hypoxischen Bedingungen reduziert.	58
Abb. 3.19: Strukturformeln von BO1 und seinen Derivaten	59
Abb. 3.20: Das Derivat BO1-N wirkt auf bEnd.3 Zellen zytotoxisch.	60
Abb. 3.21: BO1 führt in bEnd.3 Zellen zur stärkeren Cldn5-Verminderung als seine Derivate.	60
Abb. 3.22: BO1-C und -D vermindern die Cldn5-Proteinmenge in Zellkontakten in geringerem Maße als BO1.	62
Abb. 3.23: BO1 bewirkt konzentrationsabhängig die transiente Absenkung des TER in bEnd.3 Zellen.	63
Abb. 3.24: BO1 beeinflusst tendenziell die TJ-Ultrastruktur in YFP-Cld5 transfizierten HEK-293 Zellen.	64
Abb. 3.25: BO1 reduziert die mRNA-Transkription von Cldn5- und ZO-1 in bEnd.3 Zellen.	65
Abb. 3.26: BO1 führt zur Erhöhung der β -Catenin-Proteinmenge.	66

Abb. 3.27: HP β CD verbessert die BO1-Löslichkeit in wässrigem Milieu.	67
Abb. 3.28: Entwicklung des optimalen in vivo BO1-Applikationsregimes	69
Abb. 3.29: BO1 erhöht für etwa 6 h stark die Aufnahme von Natriumfluorescein ins murine Gehirn.	70
Abb. 3.30: BO1 und seine Darreichungsform haben keine Auswirkung auf das Körpergewicht.	71
Abb. 3.31: BO1 wird schnell aus dem Blutplasma eliminiert.	72
Abb. 3.32: BO1 und seine Lösungsvermittler sind nicht toxisch für U87MG Zellen	73
Abb. 3.33: BO1 verbessert die Tumor-reduzierende Wirkung des Paclitaxel im Glioblastom am Mausmodell.	74
Abb. 4.1: Phylogenetischer Baum der untersuchten murinen Claudine.	76
Abb. 4.2: Strukturvorschlag der Interaktionsfläche von BO1 mit murinem Claudin-5	84
Abb. 7.1: Natriumfluorescein kann in Gewebeschnitten nicht quantifiziert werden.	115
Abb. 7.2: Aquaporin-1 ist mittels Immunfluoreszenz im Endothel von Gehirnkapillaren nicht nachweisbar.	116
Abb. 7.3: 0,5 % DMSO führt zur erhöhten Cldn5-Expression in bEnd.3 Zellen.	116
Abb. 7.4: Eine BO1-bedingte Veränderung von Cldn5 in TJs im murinen Gehirn ist mittels einer immunhistochemischen Färbung nicht detektierbar.	116
Abb. 7.5: Strukturvorschläge zur Bindung von BO1 an murines Claudin5.	117
Abb. 7.6: BO1 beeinflusst den Reperfuptionsverlauf nach MCAO nicht.	118

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1: Beispiele für zerebrale Störungen mit einhergehenden Fehlregulationen von TJ-Proteinen	10
Tab. 1.2: Eigenschaften natürlicher Cyclodextrine.	17
Tab. 2.1: Geräte	19
Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial	20
Tab. 2.3: Chemikalien und Lösungen	20
Tab. 2.4: Kits und Größenstandards	21
Tab. 2.5: Enzyme und ihre Puffer	21
Tab. 2.6: Antikörper	22
Tab. 2.7: Verwendete Plasmide	22
Tab. 2.8: Primer für die qRT-PCR	22
Tab. 2.9: Bakterienstämme und ihre Eigenschaften	23
Tab. 2.10: Kultivierungsmedien für die Bakterienkultur	23
Tab. 2.11: Eukaryotische Zelllinien und ihre Herkunft	23
Tab. 2.12: Medien für die Kultivierung epithelialer Zelllinien	23
Tab. 2.13: Medien für die Kultivierung endothelialer Zelllinien und Primärzellen	24
Tab. 2.14: Mausstämme	24
Tab. 2.15: Verwendete Software	24
Tab. 2.16: PCR-Programm zur Amplifikation der Transkripte	26
Tab. 2.17: Antikörperverdünnungen für Western Blot Analysen	28
Tab. 2.18: Antikörperverdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen	33
Tab. 2.19: Versuchsgruppen für die in vivo Verträglichkeitsstudie	38
Tab. 2.20: Versuchsgruppen im glialen Tumormodell	39
Tab. 7.1: Quantifizierung des Infarktverlaufs nach BO1-Gabe	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

ABC *ATP-binding cassette*
 ADC *apparent diffusion coefficient*
 AJ *adherens junctions*
 AKT Kinase, auch Protein Kinase B (PKB)

B

bEnd3 *mouse brain endothelioma cell line 3*
 bFGF *bovine fibroblast growth factor*
 BHS Blut-Hirn-Schranke
 BSA bovines Serumalbumin

C

cCPE Fragment der C-terminalen Domäne des
Clostridium perfringens Enterotoxin
 Caco-2 *human caucasian colon adenocarcinoma*
cell line 2
 Cldn Claudin

D

DMEM *Dulbecco's modified Eagle medium*
 DMSO Dimethylsulfoxid
 DWI *diffusion weighted imaging*

E

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
 EF mit der ectoplasmatischen Seite der
 Plasmamembran
 assoziiert
 EZS1 bzw. 2 extrazelluläre Schleifen 1 bzw. 2

F

FD10 Fluorescein-Isothiocyanat 10 kDa-Dextran
 FITC Fluorescein-Isothiocyanat
 FKS fetales Kälberserum
 FoxO1 Transkriptionsfaktor der Forkhead box (foxO)
 Familie

G

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-
 Dehydrogenase
 GSK-3 β Glykogensynthase-Kinase-3 β

H

HBSS^{-/-} bzw. ^{+/+} *Hank's balanced salt solution*, ohne
 bzw. mit Ca²⁺ und Mg²⁺
 HEK-293 *human embryonic kidney cell line 293*
 HP β CD 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
 HRP horse raddish peroxidase,
 Meerrettichperoxidase

J

JAM *junction adhesion molecule*

L

LogP Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

LSM *laser scanning microscope*

M

MDCK-II *Madin-Darby canine kidney cell line II*
 MRT Magnetresonanztomographie
 MTT 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
 MW *molecular weight*

N

NEA nicht essentielle Aminosäuren

O

Occl Occludin
 OD optische Dichte

P

PBS^{-/-} bzw. ^{+/+} *Dulbecco's phosphate-buffered*
saline, ohne bzw. mit Ca²⁺ und Mg²⁺
 PCC *Pearson's colocalization coefficient*
 PDZ *postsynaptic density protein 95/Drosophila*
disc large tumor suppressor/
zonula occludens protein-1
 PF mit der protoplasmatischen Seite der
 Plasmamembran assoziiert
 PLL Poly-L-Lysin

Q

qRT-PCR *quantitative real time polymerase chain*
reaction

S

SEM *standard error of the mean*, Standardfehler
 SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-
 Gelelektrophorese
 siRNA *small interfering ribonucleic acid*

T

TAMP *TJ-associated MARVEL protein*
 TBST Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
 TER transzellulärer elektrischer Widerstand
 TCA Trichloressigsäure
 TJ *tight junction*
 TM Transmembrandomäne
 Tris-HCl Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
 Hydrochlorid
 TRQ mTurquoise2, ein optimiertes *cyan fluorescent*
protein

W

w/v *weight per volume*

Y

YFP *yellow fluorescent protein*

Z

ZNS zentrales Nervensystem
 ZO-1 *zonula occludens protein-1*

ZUSAMMENFASSUNG

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) reguliert den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn. Dies erschwert den Durchtritt zahlreicher Pharmaka ins ZNS und limitiert Therapiemöglichkeiten zerebraler Erkrankungen. Bisherige Behandlungsstrategien basieren auf einer unspezifischen BHS-Öffnung bzw. hohen Wirkstoffdosierungen, verbunden mit starken Nebenwirkungen und eingeschränkter Effizienz. Ein Optimierungsansatz ist die transiente parazelluläre Öffnung der BHS, welche durch Gehirnkapillarendothelzellen gebildet wird. Claudine (Cldn), wesentlicher Bestandteil von Tight Junctions (TJs), dichten den Parazellularraum ab und sind daher ein vielversprechendes Drug Target. In den TJs der BHS wird hauptsächlich Cldn5 exprimiert. Des Weiteren wurden Cldn1, -3 und -12 sowie Cldn22, -24 und -25 nachgewiesen.

Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass Cldn12, Cldn22, -24 und -25 schwache, heterophile *trans*-Interaktionen eingingen, jedoch nicht zur parazellulären Abdichtung beitragen. Cldn3 hingegen wies *in vivo* eine BHS-abdichtende Wirkung auf. Der Cldn3-Knock out (Cldn3-KO) hatte im Kapillarendothel die Verringerung von Cldn1 zur Folge sowie eine erhöhte Permeabilität der BHS für kleine Moleküle. Die erhöhte Permeabilität im KO wirkte sich in ischämiegeschädigtem Hirnareal in einer im Vergleich zum Wildtyp geringeren Schwellung und Infarktgröße aus, begleitet von einer Reduktion von Occludin und Zonula Occludens-1 in den TJs. Damit ist Cldn3 als relevant für die Integrität der BHS einzustufen. Aufgrund seiner schwachen Expression ist es aber kein geeignetes Target für eine Cldn3-basierte BHS Öffnung.

Der Cldn5-spezifische Modulator BO1 verringerte die Cldn5-Proteinmenge und die Permeabilität der BHS gegenüber Ladungsträgern konzentrationsabhängig und reversibel für bis zu 48 h. Dabei reduzierte BO1 über den β -Catenin-Pathway die Cldn5-Transkription. Unter Verwendung von 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) als Lösungsvermittler wurde nach dreifacher i.v. Gabe eine permeabilitätssteigernde BO1-Wirkung *in vivo* erreicht. Diese Vorbehandlung ermöglichte die signifikante Wachstumsreduktion eines Glioblastoms durch das ansonsten nicht gehirngängige Zytostatikum Paclitaxel. Somit wurde BO1 als neuer Ansatz zur Verbesserung der ZNS-Gängigkeit eines Wirkstoffs nachgewiesen. Damit trägt diese Arbeit wesentlich zum besseren Verständnis der BHS-Modulation durch TJ-Regulation bei mit dem Potential zur Verbesserung der Wirkstofffreisetzung für verschiedene Erkrankungen des ZNS.

SUMMARY

The blood-brain barrier (BBB) efficiently regulates the transport of compounds between blood and brain, limiting the delivery of hydrophilic drugs into the CNS. Hence, specific treatment of cerebral diseases, e.g. glioblastoma or stroke, is severely restricted. Today therapies are based on an unspecific opening of the BBB and a high drug dosage, which is less efficient and causes adverse reactions. An optimum strategy is the transient paracellular opening of the BBB formed by endothelial cells. Their paracellular tightening is mediated by specific claudin (cldn) subtypes forming intercellular tight junctions (TJs). This makes Cldns a promising drug target. In BBB TJs, Cldn5 is the dominantly expressed protein. Yet, Cldn1, -3, -12, -22, -24 and -25 are also expressed.

This dissertation shows, that Cldn12, -22, -24 and -25 formed weak, heterophilic *trans*-interactions. But they did not contribute to the paracellular tightening. Cldn3 had a BBB tightening function *in vivo*. Cldn3-knock out resulted in a reduction of Cldn1 in the brain capillary endothelial cells and an upregulated permeability of the BBB for small molecules. In the postischemic brain, this resulted in a reduced swelling and smaller infarction size compared to that of the wild type. Additionally, a reduction of occludin (Occl) and *zonula occludens* protein 1 (ZO-1) was shown. This proves, that even though Cldn3 is critical for the integrity of the BBB. However, due to its low expression it is not suited as target to improve drug delivery through the BBB.

For Cldn5-based enhancement of the BBB permeability the Cldn5-specific small molecule BO1 was developed. It decreased concentration-dependently Cldn5 protein amount and the transendothelial electrical resistance as tightness marker of the BBB for ca. 48 h. Furthermore, it down-regulated Cldn5-transcription through a β -Catenin involving pathway. Using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) as solubility enhancer an *in vivo* active BO1-concentration was achieved, causing higher BBB permeability after triple i.v. injection. BO1 increased the uptake of sodium fluorescein into the brain. Moreover, it enabled a better uptake of the cytostatic agent paclitaxel, which normally does not cross the BBB, leading to a significant reduction of the glioblastoma. So, BO1 is a novel approach to transiently increase drug delivery through the BBB. Collectively, this thesis offers new insights into the modulation of the BBB via TJs and a new perspective to improve pharmacotreatment of cerebral diseases.

1 EINLEITUNG

1.1 *Tight Junctions* im Endothel: Struktur und molekulare Zusammensetzung

Epithelien bilden Deckschichten auf allen äußeren und inneren Oberflächen mehrzelliger Organismen, sodass Gewebebarrieren entstehen. Diese sind für die Funktionsfähigkeit von Organen essentiell, indem sie eine Kompartimentierung und den kontrollierten Stoffaustausch gewährleisten. Zellkontakte werden unterschieden in *Gap Junctions*, Kommunikationsverbindungen für eine elektrische Verbindung (Giepmans, 2004), Adhäsionskontakte, z.B. *Adherens Junctions* (AJ) und Desmosomen, die zur mechanischen Stabilität durch die Interaktion ihrer Ankerproteine mit dem Aktinfilament beitragen (Rimm et al., 1995; Hatzfeld et al., 2000), und *Tight Junctions* (TJs), welche zwei wichtige Funktionen haben: Die Abdichtung des Parazellularraums und den Erhalt der Zellpolarität (Mandel et al., 1993; Balda et al., 1996). Das Endothel, eine besondere Form des flachen, einschichtigen Epithels, kleidet unter anderem die Blutgefäßwand aus. Im Epithel umgeben TJs gürtelartig apikal den gesamten Zellumfang, im Endothel hingegen sind sie lateral in räumlicher Nähe zu AJ lokalisiert und dichten den gesamten Zellzwischenraum ab (Farquhar and Palade, 1963; Florey, 1966; Powell, 1981; Vorbrodt and Dobrogowska, 2004).

Vor allem das Zusammenspiel chemischer und elektrischer Prozesse im zentralen Nervensystem (ZNS) erfordert ein streng kontrolliertes und stabiles endogenes Mikromilieu. Daher erfolgt dessen Abgrenzung von den schwankenden Bedingungen im Blut im Wesentlichen durch zwei physiologische Barrieren, die Blut-Liquor-Schranke sowie die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Das Kapillarendothel der BHS bildet die größte Kontaktfläche zwischen Blut und ZNS und hat eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Abdichtung. Es unterscheidet sich vom Kapillarendothel im peripheren Blutkreislauf durch seine komplexe Glykokalyx, dreifache Mitochondrienmenge und sehr geringe Pinocytoseaktivität. Weiterhin weist das kontinuierliche Endothel keine Fenestrierung auf und bildet besonders dichte TJs aus (Reese and Karnovsky, 1967; Abbott et al., 2006; Zlokovic, 2008; Carvey et al., 2009). Der transendotheliale Widerstand im Kapillarendothel der BHS ist mit ca. $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ca. 150 x höher als in peripheren Kapillaren (Butt et al., 1990) und neben der Blut-Hoden-Schranke die dichteste parazelluläre Barriere im Organismus von Säugern (Al-Asmakh and Hedin, 2015). Die

starke Abdichtung ergibt sich aus der TJ-Proteinzusammensetzung und der Interaktion mit anderen Zelltypen, welche zusammen die Neurovaskuläre Einheit bilden (Abb. 1.1 A). So steht das Endothel der BHS, stabilisiert durch eine Basallamina mit ihrem Collagen Typ IV und verschiedenen Glykoproteinen (Barber and Lieth, 1997; Wu et al., 2009; Yurchenco, 2011), in Kontakt mit Astrozyten-Endfüßchen, die nahezu die gesamte Kapillaroberfläche bedecken. Sie beeinflussen durch Ausschüttung von Mediatoren die Dichtheit des Endothels, sind beteiligt an der Nährstoffversorgung von Neuronen, dem Entfernen und Recycling von Glutamat von den Synapsen, der Regulation der extrazellulärer K^+ -Ionenkonzentration und interagieren mit Mikrogliazellen (Abbott, 2002; Alvarez et al., 2013). Perizyten weisen eine Makrophagen-ähnliche Aktivität auf (Balabanov et al., 1996; Bell et al., 2010), regulieren den Durchmesser des Gefäßlumens (Hall et al., 2014). Sie tragen weiterhin mittels TGF- β 1 und Angiopoietin-1 zur Reifung des Endothels bei (Hayashi et al., 2004; Hori et al., 2004; Dohgu et al., 2005; Daneman et al., 2010a). Perizyten bilden mit Endothelzellen Kontakte durch fokale Adhäsion und Peg-socket-Invaginationen. Dabei adhären Ausbuchtungen der Perizyten (*pegs*) N-Cadherin vermittelt in Einstülpungen (*sockets*) der Endothelzellen (Gerhardt et al., 2000). Dies fördert die Ausbildung des TJ-Proteinkomplexes (Daneman et al., 2010a; Jo et al., 2013).

TJs sind ein Multiproteinkomplex aus zahlreichen Transmembranproteinen sowie Gerüst- und Adapterproteinen an der Innenseite der Zellmembran (Zihni et al., 2016). Zu den Transmembranproteinen gehören die *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs), die nur eine Transmembrandomäne haben und einen intrazellulär lokalisierten C-Terminus, sowie verschiedene Vier-Transmembran-Proteine: Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie (Furuse et al., 1998) bilden das Rückgrat der TJs. Weiterhin gehören Proteine der TAMP-Familie (**TJ-associated [myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link, MARVEL] proteins**) dazu; z.B. Occludin (Occl), Tricellulin und MarvelD3 (Steed et al., 2009; Raleigh et al., 2010). Membranassoziierte Gerüst- und Adapterproteine wie die *Zonula Occludens* Proteine 1-3 (ZO-1-3), MUPP-1, das *multi-PDZ-domain containing protein* (Itoh et al., 1999; Hamazaki et al., 2002; Vorbrodt and Dobrogowska, 2004) verknüpfen über ihre PDZ-Domänen und Prolin-reiche Abschnitte die Transmembranproteine mit dem Aktin-Cytoskelett (Fanning et al., 1998). Mit ZO-1 interagierendes Cingulin ist in die RhoA-Signaltransduktion involviert (Stevenson et al., 1989; D'Atri et al., 2002; Citi et al., 2009), gezeigt in Abb. 1.1 B.

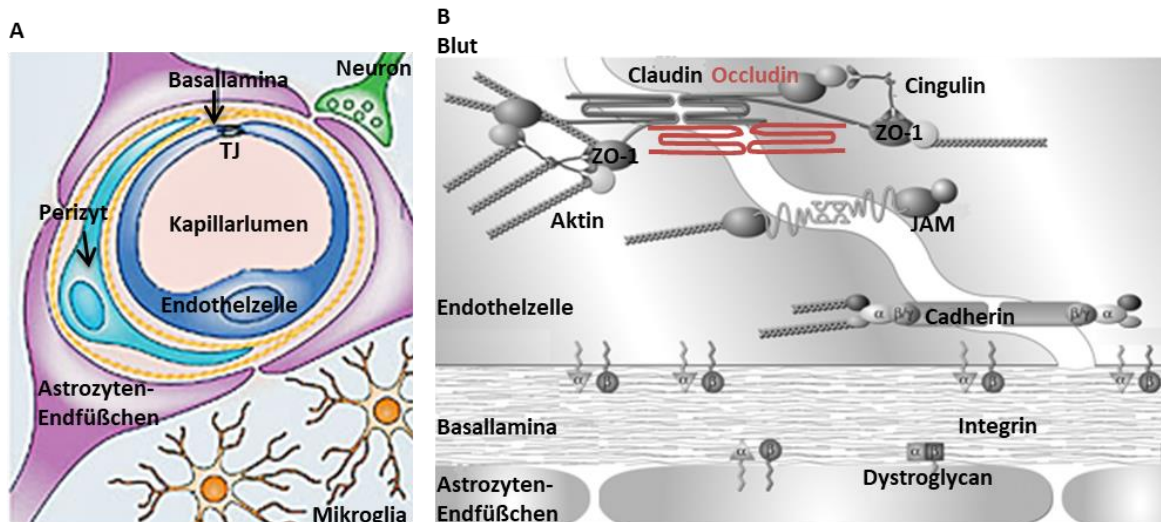


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Neurovaskulären Einheit und Aufbau der Endothel-Zellkontakte der Blut-Hirn-Schranke.

(A) Die Neurovaskuläre Einheit. Der multizelluläre Komplex besteht aus TJ der Endothelzellen, der umgebenden Basallamina, Astrozyten-Endfüßchen, Perizyten, Neuronen und Mikrogliazellen (modifiziert nach Abbott et al., 2006). **(B)** TJ im Kapillarendothel an der BHS. Wichtige TJ-ausbildende Transmembran-Proteine sind Claudine, TJ-assoziierte Marvel Proteine (Occludin und Tricellulin), die mit zytosolischen Proteinen assoziiert sind, z. B. Zonula Occludens (ZO)-Proteine, Cingulin und das Multi-PDZ-Domänen Protein (MUPP-1); modifiziert nach del Zoppo and Milner, 2006).

In der Transmissionselektronenmikroskopie erscheinen TJs als Bereiche hoher Elektronendichte, sogenannte *kissing points*. Mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie kann die Lipidschicht der Plasmamembran getrennt werden, sodass TJs als Netzwerk von Transmembranprotein-Strängen erkennbar werden. Sie stellen sich als fortlaufende Reihe von Transmembran-Partikeln an der protoplasmatischen Bruchseite (*P-face*) und ectoplasmatischen Bruchseite (*E-face*) dar (Abb. 1.2). Endotheliale TJs assoziieren *in vivo* stark mit der *E-* und *P-face*, verteilen sich während der Kultivierung jedoch zunehmend zur *E-face* um (Staehelein, 1973; Wolburg et al., 1994; Tsukita et al., 2001).

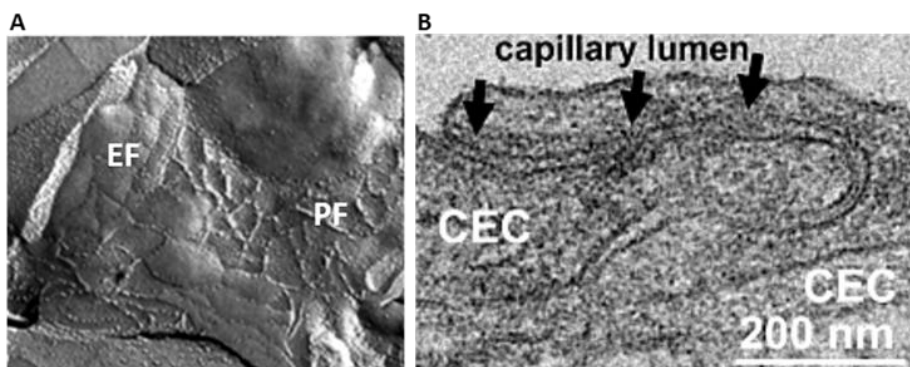


Abb. 1.2: Struktur der TJs

(A) Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahme boviner Gehirnkapillarendothelzellen mit stark *P-face* assoziierten TJ-Strängen (Wolburg et al., 1994). **(B)** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme zweier benachbarter muriner Kapillarendothelzellen (*capillary endothelial cells*, CEC). TJs verschließen den Parazellularraum. Die Pfeile markieren *kissing points* (Haseloff et al., 2015).

1.2 Die Proteinfamilie der Claudine

Die zur Pfam00822 Superfamilie gehörende Proteinfamilie der Claudine (Cldn) besteht in Säugern derzeit aus 27 Mitgliedern mit einem Molekulargewicht von 20 bis 34 kDa, wobei die Zuordnung der zuletzt entdeckten Cldn25, -26 und -27 nicht vollständig geklärt ist (Maher et al., 2011; Mineta et al., 2011). Jedoch werden nicht alle Claudine in jeder Spezies exprimiert. Cldn13 beispielsweise wurde nur in der Maus nachgewiesen (Thompson et al., 2010). Claudine bilden das Rückgrat der TJs, da ihre Transfektion in TJ-freie Zellsysteme im Gegensatz zu anderen TJ-Proteinen zum *de novo* Aufbau von TJ-Strängen führt (Furuse et al., 1998). Sie bestimmen maßgeblich die Barriereigenschaften der TJs durch ihre gewebe- und entwicklungsspezifische Zusammensetzung. Funktionell werden sie in barrierebildende Claudine, z.B. das den Parazellularraum abdichtende Cldn5 (Morita et al., 1999; Nitta et al., 2003), und parazelluläre porenbildende Claudine, die auf den Stofftransport Einfluss nehmen, eingeteilt. So ermöglicht Cldn2 den Wassertransport (Rosenthal et al., 2010), während Cldn15 einen Na⁺-Kanal bzw. eine Cl⁻-Barriere bildet (Colegio et al., 2002; Van Itallie et al., 2003).

1.2.1 Proteinstruktur und Funktion

Strukturell bestehen Claudine aus vier Transmembrandomänen mit helikaler Konformation, wobei der N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind, und zwei extrazellulären Schleifen (EZS). Abgeleitet von der aufgeklärten Kristallstruktur von Cldn15 und -19 besteht die EZS1 aus vier β -Strängen und enthält folgende Claudin-Konsensus-Sequenz: G-L-W-x-x-C-[9 Aminosäuren]-C. Die EZS2 wird aus einer α -Helix und einem β -Strang gebildet (Suzuki et al., 2014; Shinoda et al., 2016). In der intrazellulären Schleife sowie der C-terminalen Domäne finden sich Palmitoylierungs- und Phosphorylierungsstellen sowie meist ein PDZ-Bindungsmotiv (die Abkürzung PDZ steht für die jeweils ersten Buchstaben der drei Proteine *postsynaptic density* Protein, *Drosophila disc large tumor suppressor* und ZO-1). Meist ist es ein V-Y-X-K Motiv, das Interaktionen mit membranassoziierten Gerüstproteinen, z. B. ZO-1 bis -3 ermöglicht (Itoh et al., 1999), gezeigt in Abb. 1.3. Posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung wirken regulatorisch auf die Lokalisation und den Ein- bzw. Abbau der Claudine in TJ-Stränge. Beispielsweise führt die Phosphorylierung von Cldn5 am T207 durch die PKA (Proteinkinase A) zur Verringerung des TER und einer gesteigerten Permeabilität für Mannitol (Soma et al., 2004).

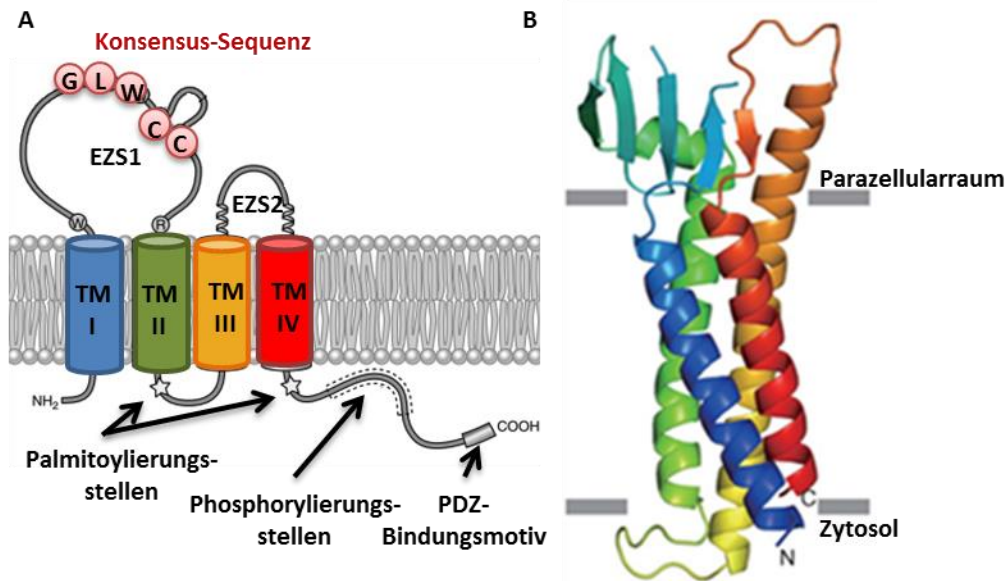


Abb. 1.3: Struktur eines Claudins.

(A) Schematische Darstellung eines Claudins mit vier Transmembrandomänen (TM I-IV) und zwei extrazellulären Schleifen (EZS1 und EZS2). Die Konsensus-Sequenz G-L-W-x-x-C-[9 Aminosäuren]-C ist in der EZS1 lokalisiert. Intrazellulär befinden sich Palmitoylierungs- und Phosphorylierungsstellen mit regulatorischer Funktion sowie bei den meisten Claudinen ein PDZ-Bindungsmotiv (meist V-Y-X-K) für Interaktionen mit Gerüstproteinen; modifiziert nach Günzel and Yu, 2013. (B) Ribbon-Struktur von Cldn15 nach Suzuki et al., 2014.

Auch die beiden EZS haben funktionelle Bedeutung. Die EZS1 ist relevant für die parazellulär abdichtende Funktion und Ionenselektivität eines porenbildenden Claudins. Die EZS2 ist an der Abdichtung des Parazellularraums beteiligt durch Ausbildung von *trans*-Interaktionen verschiedener Claudine, die in Abschnitt 1.2.2 näher erläutert werden. Vor allem die erste Hälfte der EZS1 enthält geladene Aminosäuren, die bei porenbildenden Claudinen für die Selektivität und Größe der zu permeierenden Ionen verantwortlich sind (Colegio et al., 2002; Colegio et al., 2003; Van Itallie et al., 2003; Mrsny et al., 2008). Kationen-spezifische porenbildende Claudine sind Cldn2, -10b und Cldn15. Cldn10a und -17 sind selektiv für Anionen (Amasheh et al., 2002; Van Itallie and Anderson, 2006; Krug et al., 2012). Andere Claudine haben nur durch ihre Interaktion mit weiteren Claudin-Subtypen eine porenbildende Funktion. So wird Cldn4 durch seine Interaktion mit Cldn8 zum Anionen-selektiven Ionenkanal (Hou et al., 2009; Hou et al., 2010). Andererseits verdrängt Cldn8 im Nierenepithel Cldn2 und stärkt dadurch die epitheliale Barriere (Angelow et al., 2007). Ein Cldn16-KO in der Niere geht einher mit einer veränderten Lokalisation von Cldn19. Der Cldn8-KO hat zur Folge, dass Cldn4 aus TJs entfernt wird und im Zytoplasma misslokalisiert, sodass es zum gestörten Cl⁻-Transport kommt (Hou et al., 2009; Hou et al., 2010). Eine Expression von Cldn10b oder -15 in epithelialen Zelllinien erhöht die Cldn3-Expression, führt dennoch zum verringerten

parazellulären Widerstand durch erhöhte Na⁺-Permeabilität (Inai et al., 2010). Interaktionen von Cldn1 und -5 hingegen sind für den Aufbau von TJ-Strängen aus verschiedenen Claudinen essentiell und dichten den Parazellularraum ab. Der Cldn5-*Knockout* (KO) erhöht die Permeabilität der BHS für Moleküle < 800 Da und ist wenige Stunden nach der Geburt lethal (Nitta et al., 2003). Cldn1 beeinflusst zusammen mit den TAMP-Proteinen Occl, Tricellulin oder MarvelD3 in HEK293-Zellen die TJ-Strangmorphologie maßgeblich (Cording et al., 2013). Dieses Claudin ist essentiell für die Regulation der Permeabilität für Wasser sowie Moleküle einer Größe < 600 Da in der Haut, ist aber auch an der Abdichtung der Lebergallengänge gegen Gallenflüssigkeit beteiligt. Sein KO ist ebenfalls wenige Stunden nach der Geburt lethal (Furuse et al., 2002; Grosse et al., 2012).

1.2.2 Polymerisierung der Claudine zu *Tight Junction*-Strängen

HEK-293 Zellen sind ein etabliertes, TJ-freies Zellsystem zur Untersuchung exogener Claudine hinsichtlich der Ausbildung eines TJ-Proteinnetzwerks. Dabei lagern sich Claudine einer Plasmamembran mit Claudinen der benachbarten Membran zusammen, sodass sie sich in den Zellkontakten stark anreichern und über ihre EZS sogenannte *trans*-Interaktionen eingehen. Diese können zwischen Claudinen desselben Subtyps (homophil) aber auch zwischen verschiedenen Subtypen (heterophil) stattfinden (Furuse et al., 1999), (Abb. 1.4).

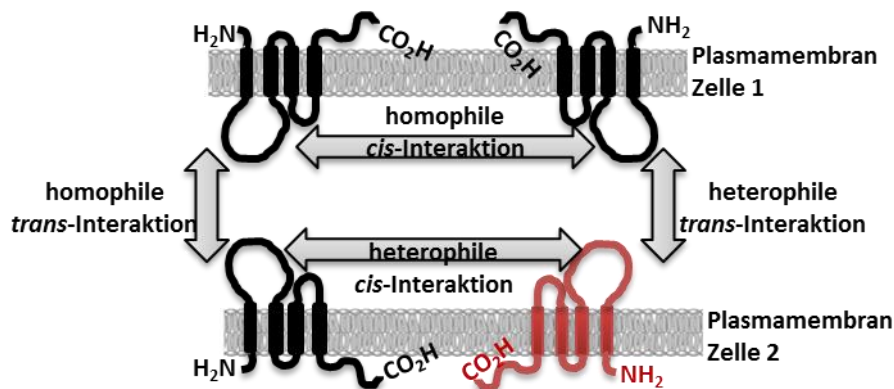


Abb. 1.4: Interaktionen von Claudinen

Abhängig von der Claudin-Zusammensetzung der TJs interagieren Claudine desselben Subtyps homophil innerhalb derselben Membran (*cis*) oder mit Claudinen der benachbarten Zellmembran (*trans*). Interaktionen zwischen Claudinen verschiedenen Subtyps werden als heterophil bezeichnet.

Homophile *trans*-Interaktionen sind von Cldn1, -2, -3 und -5 bekannt, wobei die Kontakthanreicherung in homophilen Cldn1-Interaktionen nahezu doppelt so stark ist wie die des Cldn5 (Furuse et al., 1999; Piontek et al., 2008; Piontek et al., 2011). Im Cldn5 sind dafür aromatische Seitenketten an den Positionen F147, Y148, Q156, Y158 und E159 in der EZS2

relevant (Piontek et al., 2008). Heterophile Interaktionen finden unter anderem von Cldn5 mit -1 sowie Cldn3 mit -1 in starkem Ausmaß statt, wohingegen Cldn3 mit -5 sowie Cldn3 und -4 weitaus schwächer interagieren (Daugherty et al., 2007; Piontek et al., 2011). Weiterhin können Claudine innerhalb derselben Membran polymerisieren und sogenannte *cis*-Interaktionen eingehen. Die TJ-Stränge liegen vermutlich als doppelreihiger *cis*-Komplex vor, wobei die einzelnen Reihen zu einander antiparallel angeordnet sind (Milatz et al., 2015). Auch diese können sowohl homophilen als auch heterophilen Charakter haben. Das Y158 in der EZS2 von Cldn5 ist sowohl für die homophile als auch die heterophile *cis*-Interaktion mit Cldn3 von Bedeutung (Piontek et al., 2008; Piontek et al., 2011), aber auch die dritte und vierte Transmembrandomäne sind relevant (Rossa et al., 2014; Gong et al., 2015). Heterophile *cis*-Interaktionen finden weiterhin zwischen Claudinen und TAMPs statt, z.B. zwischen Cldn1 bzw. Cldn5 mit Occl sowie Tricellulin (Cording et al., 2013).

1.2.3 Eigenschaften ausgewählter *Tight Junction*-Proteine der Blut-Hirn-Schranke

Die Zusammensetzung der an der Ausbildung der BHS beteiligten TJ-Proteine ist bislang nicht detailliert geklärt. Nur Cldn5, eines der am stärksten exprimierten TJ-Proteine im Gehirndothel, ist gut untersucht. Es galt als Endothel-spezifisch (Morita et al., 1999), bis seine Expression auch im Epithel der Alveolen (Wang et al., 2003), des Darms (Zeissig et al., 2007), des Pankreas (Rahner et al., 2001) und den Nieren-Glomeruli (Koda et al., 2011) nachgewiesen wurde. Allerdings gibt es derzeit keine Hinweise auf eine zur BHS vergleichbar stark abdichtende Funktion im Epithel. Aber auch andere TJ-Proteine sind an der Ausbildung des komplexen TJ-Netzwerks der BHS beteiligt. In Gehirndothelzellen ist darüber hinaus die Expression von Cldn1, -3 und -12 beschrieben (Wolburg and Lippoldt, 2002; Nitta et al., 2003; Ohtsuki et al., 2007). Cldn3 bewirkt in NIH/3T3 Fibroblasten eine parazelluläre Abdichtung gegen Makromoleküle (2000 Da), führt in der epithelialen Zelllinie MDCK-II zum erhöhten transepithelialen elektrischen Widerstand (Coyne et al., 2003; Milatz et al., 2010) und wurde im Darmepithel *in vivo* nachgewiesen (Hewitt et al., 2006; Markov et al., 2010). Seine genaue *in vivo* Funktion an der BHS ist bislang nicht geklärt. Allerdings scheint eine Cldn3-Beteiligung an der parazellulären Abdichtung der BHS naheliegend, da seine Expression im Glioblastom und im Mausmodell der Multiplen Sklerose (EAE-Modell, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) runterreguliert ist (Wolburg et al., 2003). Cldn3 KO Mäuse zeigen im EAE-

Modell Krankheitssymptome früher im Vergleich zum Wildtyp (Kooij et al., 2014). Hinsichtlich der Vitalität, Fertilität, Größe und Körpergewicht sind die Tiere vom Wildtyp jedoch nicht zu unterscheiden. Cldn12 ist an der Ca^{2+} -Aufnahme im Darmepithel beteiligt und wurde in Schirmzellen des Uroepithels der Blase nachgewiesen, welche das Epithel lumenwärts abdichten, wobei es keine *de novo* TJs ausbildet (Acharya et al., 2004; Fujita et al., 2008; Piontek et al., 2011). Zu seiner Funktion an der BHS ist bislang nichts bekannt. Die Cldn1-Expression an der BHS wird kontrovers diskutiert. Cldn1, stark exprimiert in epithelialen Barrieren, steht im Zusammenhang mit der Regulation des Wasserhaushalts (Furuse et al., 2002). Im Gehirndothel wurde es als sowohl als mRNA-Transkript als auch auf Proteinebene nachgewiesen (Liebner et al., 2000; Hewitt et al., 2006). Die Untersuchungen auf Proteinebene wurden jedoch infrage gestellt aufgrund der Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers (Abbott et al., 2006). Ebenso ist zur Funktion des an der BHS detektierten TAMP-Proteins Occl nichts bekannt. Im Epithel trägt es nicht direkt zur Ausbildung von TJs bei, sondern stabilisiert Claudine durch *cis*- und *trans*-Interaktionen und beeinflusst so die parazelluläre Permeabilität und Strangmorphologie (Furuse et al., 1993; Hirase et al., 1997; Ohtsuki et al., 2007; Cording et al., 2013). Weiterhin haben Untersuchungen eine Anreicherung von Cldn22, -24 und -25 (Ohtsuki et al., 2008; Daneman et al., 2010b) gezeigt.

1.3 Tight Junction-Regulation an der Blut-Hirn-Schranke unter pathologischen Bedingungen

TJs des BHS-Endothels unterliegen einer strikten Regulation, um die Homöostase des ZNS aufrechtzuerhalten. Viele zerebrale Erkrankungen gehen mit einer Störung von TJ-Proteinen der Gehirndothelzellen und einer erhöhten BHS-Permeabilität einher. Die S/T-Phosphorylierung ist sehr wichtig für eine korrekte TJ-Proteinlokalisierung (Morgan et al., 2007). Beispielsweise werden Occl (an T382 und S507) und Cldn5 (an T207) im Krankheitsbild der HIV-1-assoziierten Enzephalopathie durch die Rho-Kinase phosphoryliert. Dies hat eine verringerte BHS-Integrität und einen Anstieg der Monocyten-Migration ins ZNS zur Folge. Eine Inhibierung dieser Kinase führt *in vitro* zum Erhalt der Barrierefunktion (Yamamoto et al., 2008). In neuroinflammatorischen Prozessen werden Occl und Cldn5 durch die aktivierte Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) phosphoryliert, was zum Abbau führt. Eine GSK-3 β -Inhibierung fördert die TJ-Stabilität in Gehirndothelzellen durch eine Verlängerung

der biologischen Halbwertszeit dieser TJ-Proteine (Ramirez et al., 2010; Ramirez et al., 2013). Die Cldn5-Expression wird auch von Interleukinen (IL) durch Regulation des Phosphorylierungsstatus von FoxO1, einem Transkriptionsfaktor der Forkhead box (foxO) Familie beeinflusst. Antiinflammatorisches IL-4 induziert die Cldn5-Hochregulation unter Beteiligung der JAK/STAT6-Signalkaskade sowie einer FoxO1-Phosphorylierung (Dalmaso et al., 2014). Proinflammatorisches IL-1 β hingegen führt zur verminderten Cldn5-Transkription, vermittelt durch eine FoxO1-Dephosphorylierung (Beard et al., 2014). Auch reaktive Sauerstoffspezies und eine gestörte Adhäsion des VE-(*vascular endothelial*) Cadherins in Adherens Junctions beeinträchtigen FoxO1-vermittelt die TJ-Integrität (Abb. 1.5). Die Endocytose von VE-Cadherin (Gavard und Gutkind 2006) führt zur Freisetzung großer Mengen β -Catenin ins Zytosol und verringert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / AKT-Aktivität (Proteinkinase B). Somit steigt der Anteil an nicht phosphoryliertem FoxO1, das ein Substrat von AKT ist. Zusammen mit β -Catenin transloziert es in den Nucleus. Sie hemmen die Cldn5-Transkription, indem beide Proteine den TCF (*T cell factor*, Transkriptionsfaktor) binden und dieser Komplex den Cldn5-Promotor blockiert (Carmeliet et al., 1999; Taddei et al., 2008).

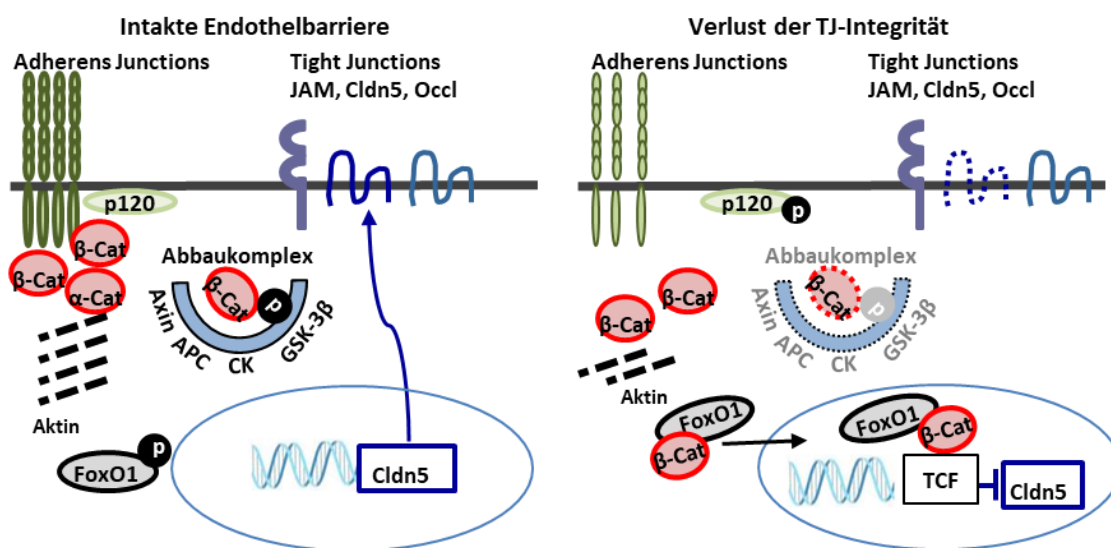


Abb. 1.5: Wechselwirkung zwischen Adherens Junctions und Tight Junctions.

Unter physiologischen Bedingungen ist phosphoryliertes FoxO1 im Zytosol lokalisiert, β -Catenin (β -Cat) liegt dephosphoryliert hauptsächlich im Komplex mit p120 und VE-Cadherin in Adherens Junctions vor. Nicht mit Adherens Junctions assoziiertes β -Catenin wird durch einen Enzym-Abbaukomplex aus Axin, APC (adenomatous polyposis coli), CK (Casein Kinase) und GSK-3 β hyperphosphoryliert und abgebaut. Bei Destabilisierung der Adherens Junctions akkumuliert dephosphoryliertes β -Catenin im Zytosol und FoxO1 wird dephosphoryliert. Beide Proteine bilden einen Komplex, translozieren in den Nucleus und blockieren zusammen mit dem TCF (*T cell factor*) den Cldn5-Promotor; modifiziert nach Gavard und Gutkind, 2008.

Weitere pathologische Zustände im Gehirn, die mit einer Fehlregulation von TJ-Proteinen einhergehen, sind zusammengefasst in Tab. 1.1.

Tab. 1.1: Beispiele für zerebrale Störungen mit einhergehenden Fehlregulationen von TJ-Proteinen

Zerebrale Störung	Beeinflusstes TJ-Protein	Literatur
Morbus Alzheimer Brustkrebsmetastasen Leukämie BHS-Permeabilität +	Cldn1 und -5 - durch Ablagerung von Amyloid- β -40 Cldn3 und -4 + Cldn5 -	(Hartz et al., 2012) (Kominsky et al., 2007) (Feng et al., 2011)
Glioblastoma <i>multiforme</i> (GBM)	Cldn1 und Cldn5 in Blutgefäßen – ^[1] , β -Cat + ^[2] ; Cldn3 - ^[3]	¹ (Liebner et al., 2000) ² (Karnati et al., 2014) ³ (Wolburg et al., 2003)
Cerebrale Ischämie BHS-Permeabilität +	Occl - und Cld5-Umverteilung ^[4,5] ; ZO-1 und Cldn5 - durch Caspase-3-Aktivität ^[6]	⁴ (Takenaga et al., 2009) ⁵ (Liu et al., 2012) ⁶ (Zehendner et al., 2011)
Multiple Sklerose und EAE (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) BHS-Permeabilität + Morbus Parkinson BHS-Permeabilität +	Occl- und ZO-1- ^[7] ; im Cldn3 KO dramatischerer Verlauf ^[8,9] ; Cldn1-Induktion an TJ der BBB mildert Verlauf ^[10] ; Occl-Dephosphorylierung geht einher mit Einsetzen der Symptome und Permeabilität ++ ^[11] ZO-1 und Occl im Striatum -	⁷ (Plumb et al., 2002) ⁸ (Kooij et al., 2014) ⁹ (Kirk et al., 2003) ¹⁰ (Morgan et al., 2007) ¹¹ (Pfeiffer et al., 2011) (Chen et al., 2008)

(+) erhöht; (-) verringert

1.3.1 Zerebrale Durchblutungsstörungen

Durchblutungsstörungen im Gehirn haben je nach ihrem Ausmaß eine große pathologische Bedeutung. Derzeit sind der Schlaganfall und seine Folgen die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Destatis), 2015). Der Schlaganfall und damit einhergehende Veränderungen des Endothels verlaufen in mehreren Phasen: Die erste Phase, Ischämie, ist aufgrund der eingeschränkten Blutzufuhr gekennzeichnet von einer Mangelversorgung des Gewebes. Der einhergehende Sauerstoffmangel führt *in vitro* innerhalb von 24 h zum Verlust von Cldn5 an den Zellkontakten (Koto et al., 2007). Aber auch Cldn1 (Brown et al., 2003) und Occl (Bellmann et al., 2014; Cording et al., 2015) werden auf Proteinebene verringert. Es folgt die Reperfusionphase, die Wiederherstellung der Blutzufuhr ins betroffene Gewebe. Sie ist notwendig für das Überleben des Gewebes, birgt aber auch Risiken eines Reperfusionsschadens. Für die Erforschung des Krankheitsverlaufs eignet sich das transiente *middle cerebral artery occlusion* Modell (MCAO) an der Maus oder Ratte (Engel et al., 2011). Dabei wird die mittlere Gehirnschlagader einer Hemisphäre für einen definierten Zeitraum verschlossen und anschließend wieder geöffnet, sodass ein Infarktgeschehen imitiert wird. Je nach Dauer und Lokalisation der Ischämie verläuft die Reperfusion mehr oder weniger ausgeprägt dreistufig hinsichtlich der TJ-Öffnung und erhöhten BHS-Permeabilität. Nach einer initialen Permeabilitätserhöhung (Hyperperfusion) zu Beginn der Reperfusion kommt es innerhalb von 96 h zur zweistufigen Reperusionsantwort (Abb. 1.6).

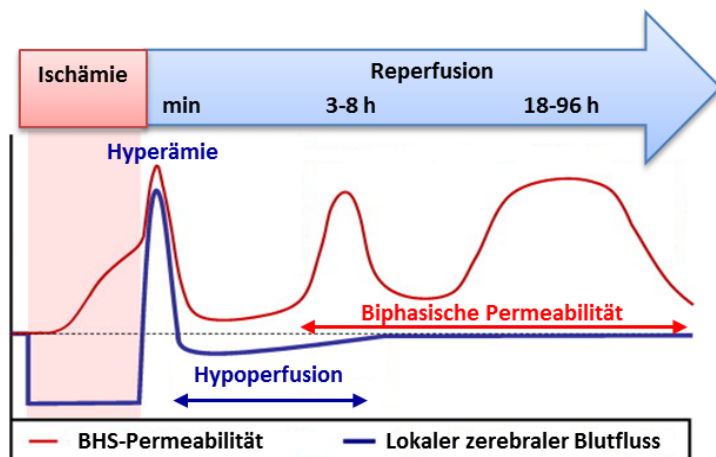


Abb. 1.6: Schematischer Verlauf eines Infarktgeschehens.

modifiziert nach Sandoval und Witt, 2008.

TJs im Infarktkern werden zeitlich unterschiedlich reguliert als in der umliegenden Penumbra. Je nach Okklusionsdauer erhöht sich innerhalb weniger Stunden die BHS-Permeabilität. Im MCAO-Modell ist nach 3 h Reperfusion die Aufnahme von Farbstoffen verschiedener Molekulargrößen im betroffenen Gehirnareal erhöht (Nagaraja et al., 2008; Kaya and Ahishali, 2011). Weiterhin kommt es zur Fehlregulation und Abbau von Cldn5, ZO-1, VE-Cadherin und Occl. Für den Claudin-Abbau sind unter anderem Matrix-Metalloproteasen (MMP) sowie freie Radikale (z.B. Peroxinitrit und reaktive Sauerstoffspezies) verantwortlich. Die Aktivität der MMP-2 ist zu Beginn der Reperfusion erhöht. Nach 24 h werden MMP-3 und MMP-9, das Occl abgebaut, stark aktiviert. Cldn5 wird Caveolin-1 vermittelt von der Zellmembran entfernt und anschließend abgebaut (Yang et al., 2007; Yang and Rosenberg, 2011; Liu et al., 2012; Teng et al., 2013). Außerdem degradiert die Caspase-3 ZO-1, Occl und möglicherweise Cldn5 (Bojarski et al., 2004; Zehendner et al., 2011). Eine klinisch zugelassene Therapieoption ist die Auflösung von Fibringerinseln durch den Wirkstoff rtPA (*recombinant tissue-type plasminogen activator*). Allerdings sind Blutungen und eine Ödembildung starke Nebenwirkungen, da er die MMP-9-Aktivität steigert und so zum stärkeren TJ-Proteinabbau beiträgt (Tsuji et al., 2005). Daher steht die Verbesserung von Diagnostik und Behandlung im Fokus der Forschung.

In der Ödembildung bei Ischämie nimmt der Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP-4) eine Schlüsselrolle ein (Manley et al., 2000; Zador et al., 2009). Die Bedeutung von AQP-1 wird kontrovers diskutiert. Seine Expression im Choroidalplexus und den Ependymzellen ist bekannt (Nielsen et al., 1993; Kobayashi et al., 2001), im Gehirnkapillarendothel dagegen umstritten (Dolman et al., 2005). Sie wurde im Endothel in Zusammenhang mit Astrozytomen (Saadoun et al., 2002) und in Astrozyten nach Ischämie beobachtet (Satoh et al., 2007).

1.3.2 Hirntumore

Hypoxische Zustände aufgrund von Mangel durchblutung im ZNS sind des Weiteren im Zentrum solider Tumoren bekannt. Primäre Hirntumore haben in Deutschland eine jährliche Inzidenz von ca. acht Fällen pro 100 000 Einwohner (Robert Koch-Institut Gesundheitsbericht, 2013), wobei Glioblastome, insbesondere Astrozytome, deren häufigste und aggressivste Kategorie bilden. Der Großteil der Glioma-Patienten ist über 65 Jahre alt, aber auch Kinder sind betroffen (Sklar, 2002; Dolecek et al., 2012). Die Hypoxie im Mikromilieu des Tumors ist ein starker Stimulus für die Vaskularisierung (Harris, 2002). Dies führt zur Verringerung der TJ-Proteine Cldn5, Cldn3 und Occludin. Cldn1 ist in den Gefäßen beinahe nicht detektierbar (Rascher et al., 2002; Wolburg et al., 2003). Dies verändert die TJ-Ultrastruktur, indem TJ-Partikel stärker *E-face*-assoziiert sind als in normalem Gewebe (Liebner et al., 2000). Die neugebildeten Blutgefäße im Tumor weisen in Folge dessen deutliche strukturelle Unterschiede gegenüber normalen Blutgefäßen auf: Eine erhöhte Anzahl an Perizyten, eine veränderte Basallamina, verstärkte Fenestrierung der Endothelzellen und Einschränkungen der abdichtenden Funktion von TJs (Hirano and Matsui, 1975; Bertossi et al., 1997).

1.4 Transport pharmakologischer Wirkstoffe durch die Blut-Hirn-Schranke

Der Stofftransfer durch die BHS, ausgerichtet nach dem Bedarf des ZNS, ist hoch dynamisch und strikt kontrolliert (Abbott et al., 2010). Nur ZNS-Areale mit sensorischer Funktion, z.B. das Brech- und das Riechzentrum, oder Stellen, an denen neuroendokrine Verbindungen (z.B. Melatonin und Oxytocin) sezerniert werden, sind nicht durch die BHS abgedichtet (Siegel and Agranoff, 1999). Obwohl ZNS-Erkrankungen oft mit einer Steigerung der BHS-Permeabilität einhergehen, stellt diese Barriere ein Hindernis bei der Diagnose und Therapie zahlreicher zerebraler Erkrankungen dar, indem sie den Durchtritt aller großen Moleküle (z.B. therapeutische Antikörper) und 98 % der niedermolekularen Substanzen, welche eine potentielle therapeutische Wirksamkeit haben, verhindert. Daher stehen die BHS und ihre gezielte Überwindung im Zentrum aktueller Forschung (Pardridge, 2005; Vykhodtseva et al., 2008; Pardridge and Boado, 2012).

1.4.1 Permeationswege durch die Blut-Hirn-Schranke

Grundsätzlich erfolgt der Stofftransport durch Zellbarrieren sowohl para- als auch transzellulär. An der BHS ist die parazelluläre Diffusion hydrophiler Substanzen aufgrund der stark abdichtenden TJ stark limitiert. Transzellulär kann eine Substanz die BHS mittels passiver Diffusion, abhängig von verschiedenen physikochemischen Eigenschaften, durchtreten. Sowohl die Größe (< 500 Da) als auch die Lipophilie (moderater Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) sind dabei wichtige Parameter. Die Permeation nimmt bei einem Anstieg des Molekulargewichts von 300 auf 450 Da um den Faktor 100 ab (Fischer et al., 1998). Weiterhin sind die Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren (< 5) und -Akzeptoren (< 10) relevant (Lipinski et al., 2001). Transzelluläre Transportsysteme, zusammengefasst in Abb. 1.7, können nur genutzt werden, wenn der entsprechende pharmakologische Wirkstoff als mögliches Substrat erkannt wird. Beispielsweise überwindet der Wirkstoff L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) die BHS durch LAT1 (*L-type amino acid transporter 1*), ein Carrier-Protein, dessen endogene Substrate große, neutrale Aminosäuren sind (Kageyama et al., 2000; Yanagida et al., 2001). Andere Carrier-Proteine transportieren auf diese Art Glucose, Aminosäuren, Thyroidhormone und wasserlösliche Vitamine entlang eines Konzentrationsgefälles durch die BHS. Eine Alternative ist der Rezeptor-vermittelte Transport. Auf diesem Weg wird unter anderem Transferrin-gebundenes Eisen mittels des Transferrin-Rezeptors aufgenommen. In Ratten war die Aufnahme Transferrin-konjugierter Zytostatika in der Gliomtherapie erfolgreich (Liu et al., 2013). Bei der adsorptionsvermittelten Transzytose bewirken elektrostatische Wechselwirkungen zwischen kationischen Molekülen mit anionischen Mikrodomänen auf der Membranoberfläche der Endothelzellen (z.B. durch Heparansulfatproteoglykane der Glykokalyx) den Transport, z.B. von kationisiertem Albumin (Pardridge, 2002). Jedoch sind viele niedermolekulare Wirkstoffe Substrate von Efflux-Transportern, sodass diese sofort nach der Aufnahme in die Endothelzellen zurück ins Blut geschleust werden (Graff and Pollack, 2004) oder im Lysosomen abgebaut werden. Stoffwechselnebenprodukte und Xenobiotika werden unidirektional vom ZNS ins Kapillarlumen durch aktiven Efflux transportiert. Gehirnkapillarendothelzellen exprimieren hierfür zahlreiche ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) mit einem breiten Substratspektrum, darunter viele pharmakologische Wirkstoffe. Zwei typische luminal lokalisierte Efflux-Transporter sind der

multidrug resistance receptor-1 (MDR1) und das *breast cancer resistance protein* (BCRP), welche Substrate schon beim Übertritt in die Lipid-Doppelschicht aufnehmen und zurück ins Blut befördern. Weiterhin werden *multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) sowie Organic-Anion-Transporter (OATs, *organic anion transporter*) bzw. Organic-Cation-Transporter (OCTs, *organic cation transporter*) exprimiert. Die Lokalisation von MRP1 und MRP4 werden kontrovers diskutiert (Nies et al., 2004; Kilic et al., 2008; Lin et al., 2010; Hartz and Bauer, 2011; Miller, 2015).

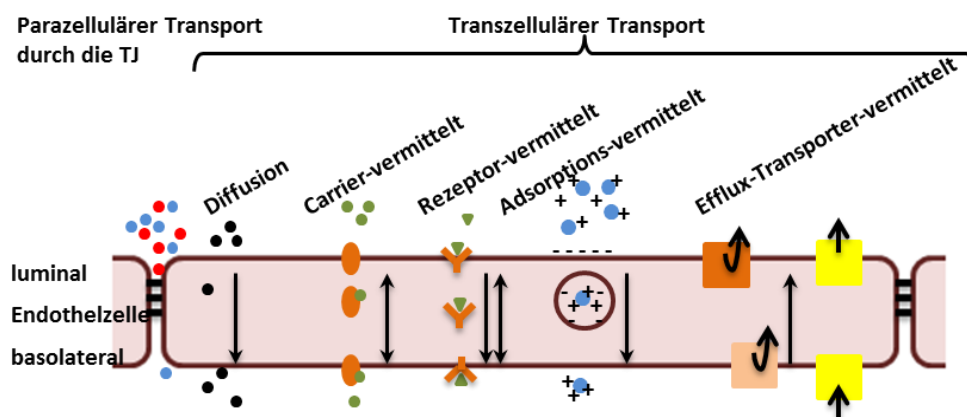


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Transportwege durch die BHS.

Potentielle Transferwegen für Substanzen durch die BHS. Der parazelluläre Durchtritt ist stark limitiert. Kleine, lipophile Moleküle können mittels Diffusion die Plasmamembran passieren. Der Transport von Glucose, Aminosäuren und Nährstoffen erfolgt bidirektional mittels Carrierproteinen. Rezeptor-vermittelter Transport kann bidirektional stattfinden, z. B. für Transferrin, oder unidirektional wie beim F_c-Rezeptor oder Typ I-Scavengerrezeptor. Proteine können in eingeschränktem Maße über ionische Wechselwirkungen mit Proteinen der Glykokalyx adsorptionsvermittelt transportiert werden. Efflux-Transporter sind ATP-verbrauchende, unidirektionale Transporter; modifiziert nach Abbott et al., 1996.

Derzeit genutzte Ansätze, um die ZNS-Gängigkeit pharmakologischer Wirkstoffe zu erhöhen, werden in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe sind Techniken zur Umgehung der BHS. Durch intrathekale und intraventrikuläre Injektion, beides hoch invasive Eingriffe, können hochmolekulare Proteine ins ZNS eingebracht werden, z.B. in der Enzyersatztherapie lysosomaler Speicherkrankheiten (Stroobants et al., 2011; Calias et al., 2012). Abhängig von der Löslichkeit und Formulierung können intranasal applizierte Substanzen extrazellulär entlang der Nervenbahn des Riech- oder des Gesichtsnervs, wo es keine BHS gibt, ins ZNS gelangen (Merkus et al., 2003; Thorne et al., 2004; Renner et al., 2012). Die andere Gruppe umfasst Techniken zur Vereinfachung des Wirkstofftransports durch die BHS. Zurzeit werden verschiedene Strategien verfolgt, z.B. die Optimierung der Lipophilie, die Blockade von Efflux-Transportern (Fellner et al., 2002; Kemper et al., 2004) und die Kopplung von Wirkstoffen an Rezeptorliganden für den adsorptionsvermittelten Weg (Pardridge and Boado, 2012).

Alternativ kann der Wirkstoff in Nano-Partikeln verkapselt werden, die für eine Rezeptor-vermittelte Transzytose an entsprechende Rezeptoren angepasst sind, oder in Liposomen, die mittels adsorptionsvermittelter Transzytose die Barriere passieren (Saraiva et al., 2016). Dafür benötigte Substanz-Modifikationen können allerdings zum Wirkverlust oder verstärkten Abbau führen. Nanopartikel können weiterhin aufgrund einer starken Anreicherung in Leber und Nieren toxische Nebenwirkungen hervorrufen. Außerdem verbessern diese Methoden meist nur die Wirkstoffaufnahme in Endothelzellen, erleichtern jedoch nicht deren basolateralen Austritt (Jevprasesphant et al., 2003; De Jong et al., 2008). Eine weitere nicht invasive Methode ist die fokussierte Ultraschall-basierte, lokale und transiente BHS-Öffnung, gekoppelt mit der i.v. Applikation von Mikrobläschen (Etame et al., 2012). Der nebenwirkungsfreien Anwendung im Tiermodell über 20 Monate folgen derzeit klinische Studien in der Gliomtherapie. Limitierend ist die schlechtere Zugänglichkeit einiger ZNS-Bereiche (McDannold et al., 2012; Downs et al., 2015; Carpentier et al., 2016).

Chemisch kann die BHS-Permeabilität transient gesteigert werden. So ist Caprat (C10) einzugelassener Absorptionsverstärker des Antibiotikums Ampicillin im Darm (Lindmark et al., 1997; Preston et al., 2008; Del Vecchio et al., 2012). Eine ähnliche BHS-öffnende Wirkung hat hyperosmolares Mannitol, welches die ZNS-Gängigkeit von Methotrexat verbessert und nach Schädeltraumata den intrakranialen Druck mindert. Allerdings ist sein Einsatz u.a. aufgrund starker Ödembildung umstritten (Neuwelt et al., 1980; Cruz et al., 2004; Wakai et al., 2013). Für eine dauerhafte, nebenwirkungsarme Medikation muss die BHS transient und größenspezifisch geöffnet werden. In diesem Zusammenhang erscheint die TJ-Modulation sehr vielversprechend: Niedermolekulare Substanzen steigern die Permeabilität von Barrieren (Walsh et al., 2011; Tscheik et al., 2013). Peptide, z.B. vom *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) abgeleitete Fragmente aus der C-terminalen Domäne, cCPE genannt, erhöhen die Permeabilität intestinaler, epithelialer Barrieren durch Bindung an Cldn3 und -4 (Veshnyakova et al., 2010). Das synthetische Peptid, AT1002, abgeleitet vom *Zonula occludens* Toxin des *Vibrio cholerae*, zerstört TJs durch Entfernen von ZO-1 aus epithelialen Zellkontakten (Gopalakrishnan et al., 2009). Spezifischer wirken Claudin-abgeleitete Peptide. Cldn1-abgeleitetes C1C2 öffnet epitheliale und endotheliale Barrieren durch Einfluss auf Cldn1 und -5 (Staat et al., 2015). Im Mausmodell des Schädel-Hirn-Traumas wurde die Ödembildung durch *small interfering* RNA gegen Cldn5 minimiert (Campbell et al., 2012; Keaney et al., 2015).

1.4.2 Ein *Clostridium perfringens* Enterotoxin abgeleitete Claudin-3-Modulatoren

Die Permeabilität Cldn3-basierter Zellbarrieren kann mittels cCPE, des vom *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) abgeleiteten Fragments seiner C-terminalen Domäne, beeinflusst werden. Das nicht zelltoxische cCPE bindet hochaffin an die EZS2 Claudine Cldn3, -4, -6, -7, -8 und -14 (Sonoda et al., 1999; Fujita et al., 2000; Kimura et al., 2010) und bewirkt eine Verringerung des transepithelialen Widerstands sowie eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität für Substanzen < 10 kDa. Im Ratten-Jejunum bewirkt es im Vergleich zu Caprat eine 400-fach stärkere Aufnahme von 4 kDa-Dextran sowie die Aufnahme biologisch aktiver Peptide (Kondoh et al., 2005; Uchida et al., 2010). Das Fragment cCPE₁₉₄₋₃₁₉ bindet *in vitro* nur an Claudine außerhalb der TJ, die nicht durch *trans*-Interaktionen okkupiert sind, und wird mit Cldn3 kointernalisiert (Winkler et al., 2009). In der Behandlung Cldn3 bzw. -4 überexprimierender Tumoren hat cCPE therapeutisches Potential: Ein Fusionsprotein aus cCPE₂₉₀₋₃₁₉ und einem Tumornekrosefaktor induzierte Zytotoxizität in Ovarialkarzinomzellen (Yuan et al., 2009) und das Fusionskonstrukt aus cCPE₁₉₄₋₃₁₉ und der *protein synthesis inhibitory factor* (PSIF) Domäne des *Pseudomonas* Exotoxins wirkten toxisch auf Brustkrebszellen (Ebihara et al., 2006).

1.4.3 Lösungsvermittler lipophiler Wirkstoffe

Etwa 40 % der verfügbaren, oralen Wirkstoffe sind schlecht oder nicht wasserlöslich, was sich auf die gesamte Pharmakokinetik auswirkt (Takagi et al., 2006; Basavaraj and Betageri, 2014). Ihre geringe Molekulargröße erlaubt oft wenige Modifikationsmöglichkeiten, ohne einen Wirkverlust zu erleiden. Daher werden Lösungsvermittler eingesetzt, z.B. die Co-Solvents DMSO, Ethanol oder 1,2-Propandiol oder Polymer-basierte Systeme, z.B. die PEGylierung oder Lipid-basierte Systeme (Williams et al., 2013). Ihr Nachteil ist die zelltoxische Wirkung bei einer Bolus-Injektion aufgrund der hohen Konzentration an der Applikationsstelle. Daher wurden Cyclodextrine zur Optimierung der Löslichkeit etabliert. Die Eigenschaften natürlich vorkommender Cyclodextrine sind in Tab. 1.2 zusammengefasst. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide aus sechs (α), sieben (β) oder acht (γ) α -1 \rightarrow 4 verknüpften D-Glucoseeinheiten, gebildet durch enzymatischen Abbau von Stärke. Ihr innerer Hohlraum, gebildet durch das Kohlenstoffgrundgerüst und die glycosidischen Sauerstoffatome, hat

lipophilen Charakter. Die primären Hydroxylgruppen sind nahe der kleinen Konus-Öffnung lokalisiert. Die sekundären Hydroxylgruppen an den C2- und C3-Kohlenstoffatomen sind an der großen Öffnung nach außen gerichtet und verleihen dem Molekül hydrophilen Charakter (Abb. 1.8). Cyclodextrine bilden mit lipophilen Molekülen, abhängig von der Größe und Geometrie beider Moleküle, einen Wirt-Gast-Komplex ohne kovalente Bindungen. Sie steigern so die Löslichkeit der lipophilen Substanz ohne deren Strukturmodifikation. Die Reaktionstriebkraft ist die Verdrängung von Wasser aus dem Hohlraum (Loftsson and Duchene, 2007).

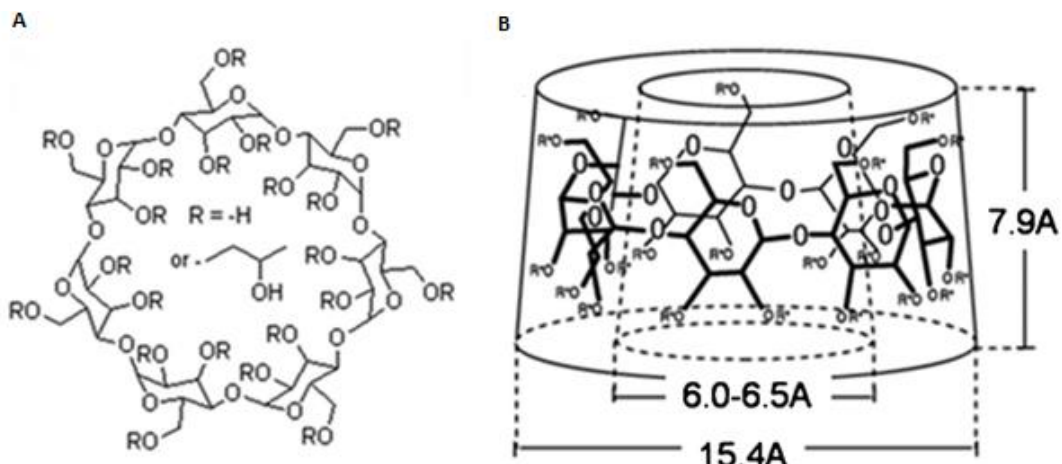


Abb. 1.8: Struktur von β -Cyclodextrrin bzw. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrrin.

(A) Chemische Struktur von β -CD mit $R = H$ bzw. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrrin mit $R = -CH_2-CH(OH)-CH_3$ und (B) räumliche Anordnung der Glucose-Einheiten nach Manasco et al., 2012.

Natürliche Cyclodextrine erfüllen nicht die Kriterien für einen guten Transport durch biologische Membranen, sodass sie als toxikologisch unbedenklich gelten. Allerdings können α - und β -Cyclodextrin Cholesterin aus der Plasmamembran herauslösen und damit auf Erythrozyten hämolytisch wirken (Irie and Uekama, 1997; Lipinski et al., 2001). Häufig in der Pharmakologie eingesetzte Derivate wie 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) und Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SBE β CD) gelten als sicher und haben eine stark verbesserte Löslichkeit in Wasser ($>600 \text{ mg/ml}$), sodass sie bereits Bestandteil vieler Medikamente sind (Rajewski et al., 1995; Gould and Scott, 2005; Loftsson and Duchene, 2007).

Tab. 1.2: Eigenschaften natürlicher Cyclodextrine.

Eigenschaften	α -CD	β -CD	γ -CD
Anzahl Glucopyranoseeinheiten	6	7	8
Molekulargewicht (g/mol)	972	1135	1297
Geringster Innendurchmesser (\AA)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Höhe des Hohlraums (\AA)	7,8	7,9	7,8
Wasserlöslichkeit (g/l) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$	145	18,5	232

Nach Uekama, 2004; Brewster and Loftsson, 2007

1.5 Zielstellung

Nach derzeitigem Forschungsstand sind die Behandlungsmöglichkeiten vieler zerebraler Erkrankungen unzureichend, da die BHS viele potenziell wirksame Pharmaka vom ZNS ausschließt. Die vorhandenen Möglichkeiten, diese Barriere zu umgehen oder ihre Permeabilität zu erhöhen, sind meist stark invasiv oder sehr unspezifisch und daher mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Cldn5, abdichtend für Moleküle < 800 Da, ist der funktionelle Hauptbestandteil der parazellulären Abdichtung der BHS. Weiterhin wird Cldn3 exprimiert, jedoch ist dessen Funktion an der BHS bislang unklar. Außerdem wurden Cldn22, -24 und -25 als neue Bestandteile der BHS identifiziert. Zu ihrer Funktion und damit Eignung als Target zur transienten Permeabilitätserhöhung der BHS ist derzeit nichts bekannt.

Mit der Arbeit soll ein Beitrag zur transienten Erhöhung der BHS-Permeabilität und damit ein Ansatz für die Verbesserung der Aufnahme von Pharmaka ins ZNS geleistet werden. Hierzu werden (I) Cldn22, -24 und -25 hinsichtlich einer abdichtenden Funktion charakterisiert, indem nach deren Transfektion in verschiedene Zellsysteme Untersuchungen zur Ausbildung von *trans*-Interaktionen sowie zum Einfluss auf den transepithelialen Widerstand erfolgen. Weiterhin soll (II) die genaue Funktion von Cldn3 an der BHS anhand von Cldn3 KO Mäusen unter normalen sowie ischämischen Bedingungen geklärt werden. Dazu werden ein möglicher Einfluss auf die Regulation anderer TJ-Proteine analysiert sowie die Funktionalität der BHS hinsichtlich ihrer Permeabilität untersucht. Parallel zur Untersuchung möglicher Targetproteine sollen (III) der Cldn3-Modulator cCPE und (IV) der Cldn5-Modulator BO1, eine niedermolekulare Substanz, hinsichtlich einer Wirksamkeit an der BHS analysiert werden. Arbeitshypothese ist, dass BO1 die Permeabilität der BHS transient erhöht und somit den Wirkstoffdurchtritt ins ZNS erleichtert. Zum einen werden BO1-Derivate *in vitro* hinsichtlich einer Eingrenzung der Wirkregion untersucht. Zum anderen sollen Studien auf Protein- und mRNA-Ebene helfen, den Wirkmechanismus aufzuklären. Nach Optimierung der BO1-Löslichkeit erfolgen *in vivo* Untersuchungen. Damit soll insgesamt ein Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion und Modulation von -Claudinen in den TJ der BHS geleistet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien

In den nachstehenden Tabellen sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und ihre Herkunft zusammengefasst. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Grundchemikalien in analysenreiner Form (p.a.) bezogen.

Tab. 2.1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammer Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Blot Transfer System Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
Dounce Gewebehomogenisator	VWR International GmbH, Darmstadt DE
Elektroporator EquiBio Easyject Prima	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
FACS Aria	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA
Geldokumentationssystem, E.A.S.Y	Herolab, Wiesloch, DE
Handelektrode, EVOM Voltometer	WPI, Sarasota, USA
Hypoxiebank Anaerobia Workstation Concept Plus	IUL Instruments/Ruskin Technology Ltd., Bridgend, GB
Impedanzmessgerät ECIS™ 1600R	Applied Biophysics, NY, USA
Inkubator TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Kryocontainer	Nalgene, USA
Kryostat Microm Cryo Star HM 560	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Mikroskop LSM 710 Confocal Microscope System	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Mikroskop Leitz Fluovert FU	Leitz, Wetzlar, DE
NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
PCR Cycler DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Peristaltische Pumpe Miniplus3	Gilson, Inc. Middleton USA
pH-Meter IKA-Tron ETS-D2	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Pipetten	Gilson, Inc. Middleton USA
Plattenmessgerät, Safire	Tecan, Männedorf, CH
Sonifikator, Vibra Cell 72434	Bioblock Scientific, Illkirch, FR
Spektrophotometer DU® 440	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Spektrophotometer, J-720	Jasco, Tokio, JP
Sterilbank	BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, DE
StepOne. Real-Time PCR-System	Life Technologies. GmbH, Darmstadt, DE
Thermoblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transilluminator Lumi-Imager F1	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, DE
Ultraschallbad, RK 100 SH	Bandelin electronic, Berlin, DE
Volt-Ohm-Meter	Millicell® -ERS, Merck Millipore, Darmstadt, DE
Waage, AT21 Comparator	Metler Toledo, Gießen, DE
Waage MC1 LC 2200 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen (12 mm, 30 mm)	Cotech Vertriebs-GmbH, Berlin, DE
ECIS Zellkulturträger 8W10E+ PET	Ibidi, Martinsried, DE
Elektroporationsküvette	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Filter, Millicell (HA)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Filterpapier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kanülen Sterican ^R 27 G	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, DE
Nitrocellulose Amersham TM Protran TM 0,45 µm	GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Objektträger Menzel Glas	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, DE
Objektträger Menzel Superfrost plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Quarzküvette, 100-QS	Hellma Analytics, Müllheim DE
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Spritze, 1ml Einwegspritze (PP+PE)	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, DE
Zellkulturflasche, CellBIND <i>Surface</i>	Corning, NewYork, USA
Zellkulturflasche, Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 6-, 24-, 96 Vertiefungen	TPP, Trasadingen, DE
Zellkulturplatten 48 Vertiefungen	Corning, NewYork, USA

Tab. 2.3: Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Acrylamid /Bisacrylamid Mischung im Verhältnis 30:1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München, DE
Ampicillin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Coomassie TM Brilliant blue 250	Fluka, Steinheim, DE
Crystal Gasmischung	AIR Liquide GmbH, Krefeld, DE
Dextran Puder 70 kDa	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
ECL Detektionsreagenz Pierce TM ECL Western Blot Substrate; Super Signal West femto	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Essigsäure	J.T. Backer, Deventer, NL
Eosin-G	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol (99,9%)	Berkel AHK, Berlin, DE
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Evans Blue	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Geneticin-Sulfat (G 418)	Merck, Darmstadt, DE
Glutaraldehyd Grade I 25%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Glutathion-Agarose Matrix	NewEngland BioLabs, Ipswich, GB
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin nach Harris	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HBSS ^{-/-} (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Kanamycin	Merck, Darmstadt, DE
Lysozym	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt DE
2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	J.T. Backer, Deventer, NL
Natrium-Dodecylsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Natriumfluorescein	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
PBS ^{-/-} und PBS ^{+/+} (ohne bzw. mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Polyethylenimin (PEI)	Polyscience, Eppelheim, DE
Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Proteaseinhibitor-complete tablets mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Rattenschwanzkollagen (RTC, rat tail collagen)	Roche, Mannheim, DE
Roti-Histokit	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Roti-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Roti-mount FluorCare DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Salzsäure	Merck, Darmstadt, DE
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Tissue Tek O.C.T.	Weckert Labortechnik, Kitzingen, DE
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypanblau	Merck, Darmstadt, DE
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Tab. 2.4: Kits und Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
BCA protein assay kit Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
DNA Größenstandard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	
Gene Ruler. 100 bp Plus DNA Ladder	
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Plasmid isolation Mini Kit, Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen N.V., Hilden, DE
Proteingrößenstandards	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
PAGE Ruler prestained Protein Ladder	
PAGE Ruler prestained Protein Ladder	
Universal RNA purification kit	Roboklon, Berlin, DE
Zymoclean. Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE
Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, high ROX	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA

Tab. 2.5: Enzyme und ihre Puffer

Bezeichnung	Hersteller
AccuPOL DNA Polymerase	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Benzonase	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Collagenase / Dispase	Roche Applied Science, Penzberg, DE
Restriktionsendonucleasen Fast Digest: BamHI und Sall	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
FD10 Green Buffer 10x	
T4 DNA Ligase Fermentas	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
T4 Ligase Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 % und 0,25 % / 0,02 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA

Tab. 2.6: Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Bestellnr. und Hersteller
Anti Aktin	Maus	# CP01; Merck Millipore, Darmstadt, DE
Anti AQP-1	Kaninchen	# AB2219 Merck Millipore, Darmstadt, DE
Anti AQP-4	Kaninchen	# A5971, Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Anti GAPDH	Maus	# MCA4740G; AbD Serotec, Puchheim, DE
Anti Cldn1	Kaninchen	# 51-9000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Cldn5	Maus	# 35-2500, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Cldn5	Kaninchen	# 34-1600, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Cldn12	Kaninchen	# JP18801; TECAN IBL, Männedorf, CH
Anti GST	Maus	# G1160; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Anti Non phospho β -Catenin	Kaninchen	# 19807; Cell Signaling Technologies, Leiden, NL
Anti Occludin	Maus	# 33-1500; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Phospho GSK-3 β	Kaninchen	# 5558; Cell Signaling Technologies, Leiden, NL
Anti Phospho FoxO1	Kaninchen	# 9464; Cell Signaling Technologies, Leiden, NL
Anti TER-119	Ratte	#14-5921-82, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti ZO-1	Ratte	# LSC124822; Biozol, Eching, DE
Anti ZO-1	Kaninchen	# 61-7300; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Sekundärantikörper	Spezies	Bestellnr. und Hersteller
Anti Kaninchen AlexaFluor488	Ziege	# A11029; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Ratte AlexaFluor555	Ziege	# A21434; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Maus AlexaFluor647	Ziege	# A21236; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Anti Maus HRP-konj.	Ziege	# 1721011; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Anti Kaninchen HRP-konj.	Ziege	# 1706515; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE

Tab. 2.7: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Herkunft
pGEX4T1-GST-cCPE ₁₉₄₋₃₁₉	Ampicillin	Dr. Winkler, FMP Berlin, DE
pEYFP-C1	Kanamycin	Clontech
pEYFP-mCldn1 (murin)	Kanamycin	Gehne, FMP Berlin, DE
pEYFP-mCldn3 (murin)	Kanamycin	Gehne, FMP Berlin, DE
pEYFP-mCldn5 (murin)	Kanamycin	Gehne, FMP Berlin, DE
pEYFP-mCldn12 (murin))	Kanamycin	Dr. Winkler, FMP Berlin, DE
pEYFP-mCldn22 (murin)	Kanamycin	Dr. Winkler, FMP Berlin, DE
pEYFP-mCldn24 (murin))	Kanamycin	Dr. Winkler, FMP Berlin, DE
pEYFP-mCldn25 (murin)	Kanamycin	Dr. Winkler, FMP Berlin, DE
pEYFP-hOccl (human)	Kanamycin	Dr. Bellmann, FMP-Berlin, DE
pmTRQ2-C1	Kanamycin	Goedhart et al., 2012
pmTRQ2-mCldn5 (murin)	Kanamycin	Gehne, FMP Berlin, DE
pmTRQ2-mCldn12 (murin)	Kanamycin	Diese Arbeit
pmTRQ2-mCldn22 (murin)	Kanamycin	Gehne, FMP Berlin, DE
pmTRQ2-mCldn24 (murin)	Kanamycin	Diese Arbeit
pmTRQ2-mCldn25 (murin)	Kanamycin	Diese Arbeit

Tab. 2.8: Primer für die qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5' -> 3'	
	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
m β -Aktin	TTTGAGACCTTCAACACCCC	ATAGCTCTTCTCCAGGGAGG
m Cldn1	GATGTGGATGGCTGTCATTG	CGTGGTGTGGGTAAGAGGT
m Cldn3	GAGATGGGAGCTGGGTTGTA	GTAGTCCTTGCGGTCGTAGG
m Cldn5	CTGGACCACAACATCGTGAC	GCCGGTCCAGGTAACAAAGA
m Cldn12	AACTGGCCAAGTGTCTGGTC	AGACCCCTGAGCTAGCAAT
m Occl	ACTCCTCCAATGGCAAAGTG	CCCCACCTGTCGTGTAGTCT
m ZO-1	CCCACCCCATCTCAGAGTA	GGGACAGCTTTAGGCATGGT
m VE-Cadherin	ATTGAGACAGACCCCAAACG	TTCTGGTTTTCTGGCAGCTT
m GLUT-1	GCTGTGCTTATGGGCTTCTC	AGAGGCCACAAGTCTGCATT

2.1.2 Verwendete Bakterien, eukaryotische Zelllinien und Mausstämme

Die nachstehenden Tabellen liefern einen Überblick über die verwendeten Bakterienstämme, ihre Eigenschaften und für die Kultivierung benötigten Medien. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C. Für die Kultivierung der Bakterien wurde dem Medium das entsprechende Selektionsantibiotikum (siehe Tab. 2.3) kurz vor Verwendung zugesetzt.

Tab. 2.9: Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ φ80dlacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSFB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-7T gene 1 ind 1 sam7 nin5</i>])	New England Biolabs, Ipswich, MA USA

Tab. 2.10: Kultivierungsmedien für die Bakterienkultur

Medium	Hersteller
Luria Bertrani (LB) Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Luria Bertani (LB)-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Die folgenden Tabellen liefern einen Überblick über die verwendeten eukaryotischen Zelllinien und Primärzellen, ihre Eigenschaften sowie für die Kultivierung benötigten Basalmedien und ihre Zusätze, welche von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA bezogen wurden, falls nicht anders angegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C. Für die Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zugesetzte Antibiotika (siehe Tab. 2.3) wurden dem Medium frisch zugesetzt.

Tab. 2.11: Eukaryotische Zelllinien und ihre Herkunft

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
<i>human embryonic kidney</i> HEK-293	Humane embryonale epitheliale Nierenzellen	ATCC, Manassas, USA
Caco-2	Humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen	Bayer Pharma AG, Berlin, DE
<i>Madin Darby canine kidney</i> MDCK-II	Canine epitheliale Nierenzellen	ATCC, Manassas, USA
bEnd.3	Murine Gehirndothelium-Zellen	Dr. Andjelkovic, (University of Michigan, Dept. of Pathology)
U87MG	Humane Glioblastom-Zellen	EPO GmbH, Berlin, DE

Tab. 2.12: Medien für die Kultivierung epithelialer Zelllinien

Zusammensetzung	HEK-293 und MDCK-II	Caco-2	U87MG
Basalmedium	DMEM mit 1 g/l Glucose	DMEM mit 1 g/l Glucose	DMEM mit 1 g/l Glucose
Zusätze	10 % Fötale Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin	20 % Fötale Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin	10 % Fötale Kälberserum 1x NEA (nicht essentielle Aminosäuren)

Tab. 2.13: Medien für die Kultivierung endothelialer Zelllinien und Primärzellen

Zusammensetzung	bEnd.3	primäre Endothelzellen, Gehirnkapillaren
Basalmedium	DMEM mit 4,5 g/l Glucose	DMEM mit 4,5 g/l Glucose
Zusätze	10 % Fötale Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin	10 % Fötale Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 ng/ml <i>basic fibroblast growth factor</i> ¹ , 15 µg/ml <i>endothelial cell growth factor</i> ¹ 0,5 % murines Blutserum ²

¹, bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE; ², eigene Herstellung

In vivo Untersuchungen wurden an den in Tab. 2.14 aufgelisteten Mausstämmen durchgeführt, wobei die Tierhaltung und experimentelle Durchführung stets den geltenden Tierschutzverordnungen entsprach.

Tab. 2.14: Mausstämme

Mausstamm	Eigenschaften	Herkunft
C57BL/6N und C57BL/6 Cld3 ^{-/-} NMRI-Foxn1nu ^{-/-}	unkomplizierte Fortpflanzung, Neigung zu Tumor (Pseudorosetten) in Retina Immunsystem stark eingeschränkt durch fehlenden Thymus: Fehlende T-Zellen	Tier-Facility im Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, DE EPO GmbH, Berlin, DE

2.1.3 Software und Statistik

Tab. 2.15: Verwendete Software

Programm	Hersteller
Carl Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121	Carl Zeiss, Jena, DE
Endnote, Version X7	Thomson Reuters, Philadelphia, USA
ImageJ, Version 1.46r	W. Rasband, National Institutes of Health, USA
MS Office 2016	Professional Microsoft, Unterschleißheim, DE
Graphpad Prism, Version 5.04	GraphPad, San Diego, USA
Sigma Scan Pro Version 5.1	Systat Software Inc., San Jose, California, USA
Spectra Manager, Version 1.54.03	Jasco, Tokio, Japan
Visual Molecular Dynamics	W. Humphrey, National Institutes of Health, USA
ZEN Software	Carl Zeiss, Jena, DE

Die Ergebnisse sind, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt mit einer Stichprobengröße ≥ 4 . Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der Software Graphpad Prism. Bei gegebener Normalverteilung wurden Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit dem t-Test berechnet. Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mit dem *one way* ANOVA, gefolgt vom Dunnett's multiplen Vergleichstest, verifiziert. Unterschiede zwischen zwei nicht normal verteilten Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U Test berechnet, bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test, gefolgt vom Dunn's multiplen Vergleichstest, verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ (*) wurde als statistisch signifikant, p-Wert $\leq 0,01$ (**) als hoch signifikant und p-Wert $\leq 0,001$ (***) als höchst signifikant erachtet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Umklonierung von Plasmiden

Für die Umklonierung der Konstrukte YFP-Cld12, YFP-Cld24 und YFP-Cld25 in den Turquoise2-C1 Vektor wiesen der Ausgangs- und Zielvektor dieselben Restriktionsschnittstellen auf, sodass aus *E. coli* DH5 α isolierte Plasmid-DNAs direkt für den Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Fast Digest *Bam*HI und *Sa*II (Tab. 2.5) eingesetzt wurden. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einer präparativen Gelelektrophorese mit 1 % igen Agarosegelen bei ca. 80 V für etwa 45 min aufgetrennt, der linearisierte Zielvektor sowie die *Inserts* mit Ethidiumbromid (7,5 mg/l) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator visualisiert (Extinktion: 302 nm; Emission: 590 nm). Die gewünschten ausgeschnittenen Banden wurden mit dem Zymoclean® *Gel DNA Recovery Kit* (Tab. 2.4) extrahiert und mittels der T4-Ligase (Fermentas) über Nacht bei 16 °C nach Herstellerangaben ligiert, wobei das *Insert* gegenüber dem Zielvektor im fünffachen molaren Überschuss vorlag. Die erzeugten Konstrukte wurden mittels Elektroporation am EasyJect Prima (Tab. 2.1) in *E. coli* DH5 α eingebracht, isoliert und zur Verifizierung sequenziert (Source Bioscience GmbH, Berlin).

2.2.1.1.1 Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Die DNA- sowie RNA-Konzentration wurden spektrometrisch am NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung bei 280 nm und 230 nm, um aus den Quotienten von OD₂₆₀/OD₂₈₀ sowie OD₂₆₀/OD₂₃₀ den Reinheitsgrad zu bestimmen.

2.2.1.2 Plasmid-Isolation aus *E. coli* DH5 α und ihre Langzeitlagerung

Mit Plasmid-DNA transformierte *E. coli* DH5 α Einzelklone wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C angezogen, pelletiert (10 min, 4000 x g). Für die Langzeitlagerung wurden die Klone in 80 % iges Glycerin überführt und bei -80 °C gelagert oder die Plasmide mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit bzw. dem Qiagen Plasmid Plus Midi Kit (Tab. 2.4) isoliert und in destilliertem Wasser eluiert.

2.2.1.3 RNA-Isolation aus Zellen, cDNA-Synthese und Quantitative Real Time-PCR

Gesamt-RNA aus Gewebe oder eukaryotischen Zellen wurde mit dem Universal RNA Purification Kit isoliert (Tab. 2.4), in cDNA (*complementary DNA*) mittels des Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Tab. 2.4) umgeschrieben und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung des Expressionsniveaus verschiedener Gene erfolgte mittels qRT-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*) mit dem StepOne™ Real-Time PCR System unter Verwendung von 2 ng cDNA, des Luminaris Color HiGreen high ROX qPCR Master Mix, high ROX (Tab. 2.4) und spezifischer Primer (Tab. 2.8) nach dem PCR-Programm in Tab. 2.16. Der jeweilige *cycle threshold* (C_T) der zu untersuchenden Gene, d.h. der Zyklus, an dem die Fluoreszenz des SYBR Green I des Mastermixes erstmalig den Hintergrund überstieg, wurde auf β -Aktin als *housekeeping gene* bezogen und der ΔC_T -Wert berechnet. Unspezifische Amplikons wurden anhand der abschließend bestimmten Schmelzkurven identifiziert.

Tab. 2.16: PCR-Programm zur Amplifikation der Transkripte

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Wiederholungen
Uracil-DNA-Glycosylase-Vorbehandlung	50	2 min	1
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	40
Primerhybridisierung/Elongation	60	1 min	40

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung und Lagerung elektrokompetenter *E. coli* DH5 α Zellen

Eine *E. coli* DH5 α Kultur in 500 ml LB-Medium wurde ohne Antibiotikazusatz bei 200 x *g* und 37 °C bis zum Erreichen einer $OD_{600}=0,6$ angezogen. Nach 30 min Abkühlung auf Eis und Zentrifugation (4 °C, 10m min, 5000 x *g*) wurde das Pellet in 160 ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert, in vier Teile aufgeteilt, erneut zentrifugiert (4 °C, 15m min, 2500 x *g*), mit 40 ml eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen und das Pellet in 10 % igem Glycerol aufgenommen. Nach letztmaliger Zentrifugation (4 °C, 15 min, 2500 x *g*) wurde es in 1 ml eiskaltem 10 % igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21 (DE3)

Mit dem Konstrukt GST-cCPE (Tab. 2.7) transformierte *E. coli* BL21 (DE3) Einzelklone wurden von Ampicillin-haltigen Agarplatten gepickt, über Nacht als Vorkultur angezogen und je 2 ml für die Animpfung einer 50 ml Ampicillin-haltigen Hauptkultur bei 200 rpm genutzt. Nach

Erreichen einer $OD_{600}=0,5$ wurde die Proteinexpression mit IPTG zur Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ induziert. Nach 4 h Protein-Expression bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt, bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pelletiert, mit $\text{PBS}^{-/}$ gewaschen, erneut pelletiert und bis zur Reinigung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.3 Protein-biochemische Methoden

2.2.3.1 *E. coli*-Zellyse und affinitätschromatographische Reinigung über das GST-Tag

Für die Zellyse wurde ein auf Eis aufgetautes Zellpellet in 2 ml kaltem GST-Bindepuffer (20 mM TrisHCl , 125 mM NaCl , 5 mM MgCl_2 , 10% Glycerin, $0,1 \%$ Tx-100, $\text{pH } 7,8$) resuspendiert, mit 2 mg Lysozym versetzt und 30 min auf Eis gelagert. Nach Sonifikation (6 Zyklen à 10 s, 300 W) und Zentrifugation ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, $18\,000 \times g$) wurde der Überstand für eine affinitätschromatographische Reinigung des Fusionsproteins über das GST-Tag genutzt. Hierzu wurde das Zellysate auf eine mit dem GST-Bindepuffer äquilibrierte Glutathion-Agarose-Matrix mit 2 ml Gelvolumen (CV, *column volume*) geladen und 45 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ am Rotator inkubiert. Nach Auffangen des Durchlaufs wurde die Säule mit 5 CV GST-Bindepuffer gespült und das Fusionsprotein mittels 8 bis 10 CV Elutionspuffer (50 mM TrisHCl , 10 mM reduziertes Glutathion, $\text{pH } 8,0$) fraktioniert eluiert. Das aufgereinigte Protein wurde sofort verwendet oder bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration eines Zellysats oder aufgereinigter Proteine erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Tab. 2.4) unter Verwendung von BSA als Proteinstandard (Albumin Standard von Thermo Scientific) in 96 well-Platten am TECAN-reader bei Raumtemperatur.

2.2.3.3 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Proteinproben, die mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) analysiert werden sollten, wurden mit 5x DTT-Probenpuffer ($0,225 \text{ M TRIS-HCl}$, 50% Glycerin, 5% SDS, $0,05 \%$ Bromphenolblau, $0,25 \text{ M DTT}$, $\text{pH } 6,8$) versetzt und 5 min bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Auf Claudine hin zu untersuchende Proben wurden stattdessen 15 min bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Es wurden diskontinuierliche Gele, bestehend aus einem 10 oder 12% igen Polyacrylamid-Trenngel und einem 5% igen Polyacrylamid-Sammelgel, sowie die

Gelelektrophorese-Apparatur (Bio-Rad) verwendet. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) bei 80 V im Sammelgel bzw. 120 V im Trenngel. Zur optionalen Überprüfung der Reinheit der gereinigten Proteine wurde das SDS-Gel anschließend mit Coomassie-Färbelösung (0,2 g Coomassie™ Brilliant Blue G250, 25 ml 95 %iges Ethanol, 17 ml 96 %ige Perchlorsäure ad 400 ml destilliertem Wasser) gefärbt.

2.2.3.4 Western Blot

Für die spezifische Detektion eines Proteins in einem Proteingemisch wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Nach der Äquilibrierung der Nitrozellulose-Membran und der SDS-Gele für 10 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) erfolgte der Proteintransfer in einer wet Blot-Apparatur (Bio-Rad) bei 4 °C für 1 h bei 100 V. Je nach Verwendung der Primärantikörper (Tab. 2.17) wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 4 % Milchpulver oder 5 % BSA in PBS-T (0,1 % Tween 20 in PBS^{-/-}, pH 7,5) für 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte in geeigneter Verdünnung (Tab. 2.17) über Nacht bei 4 °C.

Tab. 2.17: Antikörperverdünnungen für Western Blot Analysen

Primärantikörper	Blockpuffer	Verdünnung
Anti Aktin	4 % Milchpulver	1:1500
Anti GAPDH	4 % Milchpulver	1:2000
Anti Cldn1	4 % Milchpulver	1:100
Anti Cldn5	4 % Milchpulver	1:1000
Anti Cldn5	4 % Milchpulver	1:100
Anti Cldn12	4 % Milchpulver	1:100
Anti Non phospho β -Catenin	5 % BSA	1:1000
Anti Occludin	4 % Milchpulver	1:500
Anti Phospho GSK-3 β	5 % BSA	1:1000
Anti Phospho FoxO1	5 % BSA	1:1000

Es folgten 4 Waschschrte à 10 min mit PBS-T gewaschene Membran und die Inkubation mit dem entsprechenden *horse radish peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000) für 1 h bei Raumtemperatur. Die erneut 4x à 10 min mit PBS-T gewaschenen Membranen wurden 1 min mit dem ECL-Reagenz nach Herstellerangaben inkubiert und die Proteine anhand der Chemiluminiszenz am Lumi-Imager F1 detektiert. Um die Membran anschließend mit anderen Antikörpern inkubieren zu können, wurde die Membran *gestrippt*. Dazu wurde sie mit destilliertem Wasser gewaschen und 10 min mit *Stripping-Lösung* (200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 1 % Tween-20 ad 1 l destilliertem Wasser,

pH 2,2) inkubiert. Nach 2x Waschen à 10 min mit PBS^{-/-} und 2x Waschen à 5 min mit PBS-T konnte die Membran für eine erneute Proteindetektion verwendet werden.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Adhärent wachsende Zellen der immortalisierten Zelllinien HEK-293, MDCK-II, Caco-2, bEnd.3 und U87MG wurden in geeignetem Kulturmedium (Tab. 2.12) in Gewebekulturflaschen bei 37 °C unter Wasserdampfsättigung und 10 % CO₂ im Brutschrank bis zur Konfluenz kultiviert. Zum Passagieren wurde der Zellrasen mit PBS^{-/-} gewaschen, mit 500 µl Trypsin/EDTA von der Oberfläche abgelöst und das Trypsin/EDTA durch Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurde das Zellpellet in geeigneter Verdünnung in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Gewebekulturflasche überführt.

Für eine Kryokonservierung wurden trypsinierte Zellen pelletiert (5 min, 200 x g), in Einfriermedium (10 % DMSO in FKS) resuspendiert, aliquotiert à 750 µl, in einem Kryocontainer auf -80 °C runtergekühlt und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte in 5 ml 37 °C warmem Kulturmedium. Nach einer Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche gleichmäßig verteilt.

Für Untersuchungen mittels Mikroskopie wurden HEK-293 Zellen, MDCK-II Zellen und Caco-2 Zellen auf PLL-beschichteten Deckgläschen (25 µg/ml) kultiviert, für die Zelllinie bEnd.3 und primäre Gehirnkapillarendothelzellen wurden Rattenschwanz-Kollagen (RTC, *rat tail collagen*)-beschichtete Deckgläschen (0,67 mg/ml in 0,2 % Essigsäure) verwendet. Für die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands in MDCK-II Zellen wurden jeweils 150 000 Zellen auf unbeschichtete, mit Kulturmedium äquilibrierte (apikal 400 µl, basolateral 600 µl) HA-Filter eingesät. Für die Bestimmung des TER von bEnd.3 Zellen mittels ECIS (*Electric cell-substrate Impedance Sensing*) wurden die Einwegelektroden nach Angaben des Herstellers mit 10 mM Cysteinlösung beschichtet und 50 000 Zellen pro *well* eingesät.

2.2.4.2 Transiente und stabile Transfektion von HEK-293 bzw. MDCK-II Zellen

Die Transfektion von HEK-293 Zellen bzw. MDCK-II Zellen mit Plasmiden (Tab. 2.7) erfolgte in PLL-beschichteten 6-*well*-Platten bei 80 % iger Konfluenz. Für die Transfektion eines 10 cm²

großen *wells* wurden zwei Ansätze hergestellt, die 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden (2 µg DNA in 250 µl Opti-Minimum Essential Medium Eagle und 10 µl PEI in 250 µl Opti-Minimum Essential Medium). Anschließend wurden beide Ansätze vereint, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dem Kulturmedium der Zellen in den *wells* zugesetzt. Nach Inkubation über Nacht erfolgten ein Medienwechsel oder je nach Konfluenz das Passagieren der Zellen. Um eine stabile Expression zu erhalten, wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion einem Selektionsdruck durch das Antibiotikum Geneticin (0,5 µg/ml) ausgesetzt und in der Phase des massiven Zellsterbens das Kulturmedium nach Bedarf gewechselt. HEK-293 Zellen wurden zwei Wochen nach ihrer Stabilisierung für Untersuchungen eingesetzt. MDCK-II Zellen wurden zuvor mittels Durchflusszytometrie (Kooperation mit Dr. Rahn, MDC, Berlin) anhand der Fluoreszenzintensität des YFP-bzw. TRQ-*Tags* selektiert, sodass für die funktionellen Untersuchungen eine homogen YFP-bzw. TRQ-*getaggte* Claudin-exprimierende Zellpopulation erzeugt wurde.

2.2.4.3 *In vitro* Behandlung mit Testsubstanzen

Zur Untersuchung der Wirkung von GST-cCPE auf primäre Endothelzellen sowie Caco-2 Zellen wurde der Zellrasen, kultiviert auf RTC-beschichteten Deckgläschen, mit 10 µg/ml gereinigtem Fusionsprotein versetzt und 16 h inkubiert. Für die Analyse der Wirkung von BO1 und seinen Derivaten wurden diese in DMSO als 65 mM Stammlösungen angesetzt. Für *in vitro* Experimente erfolgte eine Verdünnung in Kulturmedium zur Endkonzentration von 15 bzw. 50 µM, wobei die finale DMSO-Konzentration konstant bei 0,5 % DMSO gehalten wurde. Der Zellrasen wurden für 16 h mit den Substanzen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde entsprechend 0,5 % DMSO haltiges Kulturmedium verwendet.

2.2.4.4 Zelllyse für SDS-PAGE

Für die Analyse der Proteinexpression wurden zwei verschiedene Methoden der Zelllyse gewählt. Zur Untersuchung des Gesamt-Zelllysats wurden die in 6-*well*-Platten kultivierten Zellen mit PBS^{+/+} gewaschen, in jeweils 300 µl eiskaltem Lysepuffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 0,1 % Tx-100, 5 % Glycerin, Benzonase 20u/ml und Protease-Inhibitor, pH 7,5) geschabt, mittels Scherstress (22 G Kanüle) lysiert, homogenisiert und zentrifugiert (4 °C, 10 min, 13 000 x g). Der Überstand wurde bei -80 °C gelagert oder mit Probenpuffer versetzt für eine SDS-PAGE (2.2.3.3).

Für die Untersuchung der Claudine aus isolierten Gehirnkapillarendothelzellen wurde eine Auftrennung in die Tx-100 lösliche und Tx-100 unlösliche Fraktion vorgenommen, angelehnt an Galvin et al., 1984 und Patton et al., 1989. Demnach werden in nicht-ionischem Detergens Tx-100 zahlreiche Membran- und zytosolische Proteine gelöst. Proteinkomplexe, die stark mit dem Zytoskelett assoziiert sind, bleiben unlöslich und werden erst durch den Zusatz chaotroper Agenzien in Lösung gebracht. Hierzu wurden die isolierten Gehirnkapillaren in 120 µl Extraktionspuffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 % Tx-100, pH 7,4 mit frisch zugesetztem Protease-Inhibitor) aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (1 min, 4 °C, 13 000 x g). Der vom Pellet getrennte Tx-solubilisierter Überstand wurde mit 15 µl Lysepuffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 % SDS pH 8,8) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 120 µl Benzonase (1,5 M Tris, 25 mM MgCl₂, Benzonase 35 u/ml, pH 8,8) für 10 min bei 37 °C inkubiert, mit einer 22 G Kanüle lysiert und homogenisiert, anschließend mit 15 µl Lysepuffer versetzt und 3 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach nochmaliger Homogenisierung mit einer 22 G Kanüle wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.5 Konfokale Mikroskopie

Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Untersuchungen das Zeiss LSM 710 Confocal Microscope System mit EC plan neofluar 40x/1.3 oder plan apo 63x/1.4 Öl-Objektiven und die ZEN Image Browser Software verwendet. Die quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität und des Kolokalisationskoeffizienten nach Pearson wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Der Koeffizient ist definiert durch:

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

R_i und G_i sind Intensitäten eines einzelnen Pixels im roten und grünen Kanal. \bar{R} und \bar{G} sind die mittleren Intensitäten der einzelnen Kanäle.

2.2.4.5.1 Lebendzell-Mikroskopie zur Messung von *trans*-Interaktionen

Für die Lebendzell-Mikroskopie wurden HEK-293 Zellen, mit Fluoreszenz-markierten Claudinen stabil transfiziert, auf 9,6 cm² großen PLL-beschichteten Deckgläschen als Mono- oder Kokultur bis zur Konfluenz kultiviert, in eine Küvette eingespannt und mit 1 ml HBSS^{-/-}

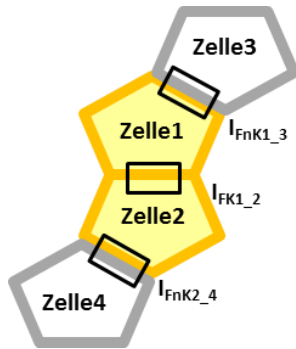


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Messung homophilen Kontaktanreicherungen

bedeckt. Optional wurde die Plasmamembran mittels Trypanblau (0,5 mM in HBSS^{-/-}) sichtbar gemacht. Die Messung der *trans*-Interaktionen wurde angelehnt an Piontek et al., 2008 durchgeführt (Abb. 2.1): Mit dem Programm ImageJ wurde die Fluoreszenzintensität im Zellkontakt zweier Fluoreszenzprotein-fusionierte Claudin-exprimierenden Zellen (I_{FK1_2}) und an einem Zellkontakt zu einer nicht transfizierten Zelle gemessen (I_{FnK1_3} und I_{FK2_4}) und daraus der Anreicherungsfaktor (F_A) nach folgender Formel berechnet:

$$F_A = \frac{I_{FK1_2}}{(I_{FnK1_3} + I_{FnK2_4})}$$

In heterophilen Kontakten wurde der Anreicherungsfaktor aus dem Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensität im Kontakt mit der anderen Claudin-exprimierenden Zelle und der mittleren Fluoreszenzintensität im Kontakt zu einer nicht transfizierten, benachbarten Zelle berechnet.

2.2.4.5.2 Fixierung und Immunfluoreszenz von Zelllinien, primären Zellen und Gewebeschnitten

Auf Deckgläschen kultivierte und mit verschiedenen Substanzen behandelte Zellen wurden fixiert mit eiskaltem Aceton (5 min), Ethanol (1 min) und PBS^{-/-} (2 min). Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mittels Blockpuffer (2 % BSA, 0,05 % Tx-100 in PBS^{-/-}) für 45 min bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern in geeigneter Verdünnung bei 4 °C über Nacht (Tab. 2.18). Nach 4x Waschen à 5 min mit PBS^{-/-} erfolgten die Inkubation mit den Sekundärantikörpern 1 h bei Raumtemperatur, vier Waschschritte à 5 min mit PBS^{-/-} und kurzes Tauchen in destilliertes Wasser. Die Zellen wurden mit DAPI-haltigem Einschlussmittel auf Objektträgern eingebettet, getrocknet und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Gewebeschnitte (2.2.6.7) wurden 10 min mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol fixiert und permeabilisiert, 3x à 5 min mit PBS^{-/-} unter Schütteln gewaschen und mit 2 % BSA in PBS^{-/-} für 45 min bei Raumtemperatur geblockt. Es folgten ein Waschschriff mit 0,5 % BSA in PBS^{-/-} und die Inkubation mit entsprechenden Primärantikörpern bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht in geeigneter Verdünnung (Tab. 2.18). Nach 4x Waschen à 5 min mit 0,5 % BSA in PBS^{-/-} wurde das Gewebe mit Sekundärantikörpern in geeigneter Verdünnung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, 4x à 5 min mit PBS^{-/-} gewaschen, kurz in destilliertes Wasser getaucht, in DAPI-haltigem Einschlussmittel eingebettet, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln getrocknet und gelagert.

Zur Anfärbung von ZO-1 wurde hauptsächlich der Primärantikörper anti ZO-1 (Ratte) eingesetzt. Eine ZO-1 Anfärbung mit anti ZO-1 (Kaninchen) erfolgte bei gleichzeitiger Verwendung des anti Occl (Maus) Antikörpers, um eine Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper zu vermeiden.

Tab. 2.18: Antikörperverdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen

Primärantikörper	Verdünnung	
	Zelllinien, primäre Zellen	Gewebeschnitte
Anti AQP-1	-	1:100
Anti AQP-4	-	1:150
Anti Cldn1	1:250	1:50
Anti Cldn5	1:500	1:100
Anti Cldn12	1:250	1:50
Anti GST	1:500	-
Anti Non phospho β -Catenin	1:750	-
Anti Occludin	1:500	1:100
Anti TER 119	-	1:500
Anti ZO-1 (Ratte)	1:500	1:150
Anti ZO-1 (Kaninchen)	1:500	1:100
Sekundärantikörper	Verdünnung IF	
Anti Kaninchen AlexaFluor488	1:1000	1:200
Anti Ratte AlexaFluor555	1:1000	1:200
Anti Maus AlexaFluor647	1:1000	1:200

Quantifizierungen der Fluoreszenzintensität, der Länge Fluoreszenz-positiver Bereiche und die Bestimmung des Kolokalisationskoeffizienten nach Pearson erfolgten mit der Software ImageJ und einem *Plug-in*.

2.2.4.6 Messung des transzellulären elektrischen Widerstands

Der transzelluläre elektrische Widerstand (TER, *transcellular electrical resistance*) eines Zellrasens beschreibt seinen abdichtenden Charakter gegenüber Ladungsträgern (z.B. Ionen). Die TER-Messung ermöglicht, Veränderungen der TJs und damit die parazelluläre Dichtigkeit

zu untersuchen. Der TER wurde in Filterkulturen konfluenten MDCK-II Zellen mit einer Handelektrode und einem Volt-Ohm-Meter in Triplikat gemessen. Dazu wurden bei 37 °C eine Handelektrode ins apikale sowie ins basolaterale Kompartiment eingeführt, Spannung unter Gleichstrom angelegt und der resultierende Stromfluss gemessen. Der Quotient, der Ohm'sche Widerstand R ($R=U/I$), ist aufgrund der geringen Leitfähigkeit der Zellmembranen ein ungefähres, reziprokes Maß für die ionische Leitfähigkeit über die Zellkontakte. Der TER [$\Omega\text{-cm}^2$] wurde berechnet, indem vom gemessenen, mittleren elektrischen Widerstand der Wert eines Leerfilters subtrahiert und die Differenz mit der Wachstumsfläche eines Filters multipliziert wurden.

Die Zelllinie bEnd.3 bildete auf Filterkulturen keinen dichten Zellrasen, sodass der TER mittels ECIS (*Electric cell-substrate Impedance Sensing*) bestimmt wurde. Dazu wurden je 50 000 Zellen in *wells* eines ECIS-Trägers, beschichtet mit 10 mM Cystein, ausgesät. An den Elektroden wurde bei 4000 Hz die Impedanz (Wechselstromwiderstand Z) stündlich gemessen, durch die Software aufgezeichnet und in den parazellulären Widerstand, den Widerstand durch Adhäsion und die Membrankapazität aufgeteilt. Nach Erreichen eines konstanten TER wurden dem Zellrasen während eines Medienwechsels die Barriere-Modulatoren zugesetzt und der TER über ca. 50 h gemessen. Die Änderung des TER erfolgte durch Normierung auf die Negativkontrolle, d.h. mit 0,5 % DMSO inkubierte Zellen.

2.2.4.7 Zellvitalitätstest

Der Vitalitätstest basiert auf der Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (MTT) zu Formazan durch metabolische Aktivität der Zellen. Ein konfluenter Zellrasen wurde 16 h mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Als toxische Positivkontrolle erfolgte die Inkubation mit 0,001 % Tx-100 für 30 min. Nach einmaligem Waschen mit 37 °C warmem PBS^{-/-} wurden die Zellen mit MTT-haltigem (0,5 mg/ml) Phenolrot-freiem Kulturmedium (DMEM mit 1 g/l Glucose) 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, mit PBS^{-/-} gewaschen, und mit Extraktionslösung (5 % Tx-100, 2 M Salzsäure, 93% Isopropanol) versetzt. Abschließend erfolgte die Messung der Extinktion am TECAN-*reader* bei einer Wellenlänge von 570 nm.

2.2.4.8 Vorbereitungen für Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Für die Analyse der TJ-Ultrastruktur mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurden YFP-Cld5 stabil transfizierte, konfluente HEK-293 Zellen in PLL-beschichteten

Gewebekulturflaschen für 16 h mit 25 μM BO1 behandelt, mit PBS^{+/+} gewaschen und mit Glutaraldehydlösung (2,5 % Glutaraldehyd in PBS^{+/+}) fixiert (2 h bei Raumtemperatur). Nach zweimaligem Waschen à 5 min mit PBS^{+/+} wurden die Gewebekulturflaschen mit PBS^{+/+} maximal gefüllt und bei 4 °C gelagert bis zur Durchführung und Dokumentation der Gefrierbrüche (durchgeführt von AG Wolburg, Universität Tübingen).

2.2.5 Bestimmung der BO1-Löslichkeit in 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin

Die Ermittlung des BO1-Absorptionsmaximums und der optimalen Konzentration von 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) für die Löslichkeit von 650 μM BO1 erfolgte am Spektrophotometer J-720. Es wurden Absorptionsspektren von 30 μM BO1, gelöst in HBSS^{-/-} mit 1 % DMSO-Zusatz, sowie von 20 % igem HP β CD mit 1 % DMSO in HBSS^{-/-} im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 450 nm aufgenommen, wobei HBSS^{-/-} als Leerwert gemessen wurde. Bei der Messung von 30 μM BO1 in 20 % igem HP β CD mit Zusatz von 1 % DMSO in PBS^{-/-} wurde 20 % ige HP β CD mit 1 % DMSO in HBSS^{-/-} als Leerwert benutzt. Das BO1-Absorptionsmaximum bei 290 nm wurde für die Bestimmung der optimalen HP β CD-Prozentigkeit genutzt, um 650 μM BO1 in HBSS^{-/-} zu erhalten. Es wurden jeweils 65 mM BO1-Stammlösungen 1:100 in HBSS^{-/-} mit folgenden HP β CD-Prozentigkeiten (w/v) gegeben: 0; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0. Die auf 37 °C erwärmten Lösungen wurden im Ultraschallbad für 10 min sonifiziert und zentrifugiert (10 min, 18 000 x g). Die Absorption der Überstände wurde in einer Quarzküvette bei 290 nm spektrometrisch in Triplikat bestimmt.

2.2.6 Tierexperimentelle Arbeiten

Die Untersuchungen an Mäusen waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt und entsprechend den geltenden deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

2.2.6.1 Präparation von Kapillaren und Herstellung primärer Gehirnkapillarendothelzellen

Für die Präparation kortikaler Gehirnkapillaren wurden Mäuse des Stamms C57BL/6 (Tab. 2.14) durch Genickbruch getötet und das Gehirn freigelegt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis: Der Cortex wurde abgetrennt, die Hirnhaut durch Rollen auf Filterpapier abgelöst und die weiße Hirnsubstanz entfernt. Je zwei aufgereinigte Kortices wurden in 5 ml DMEM (4,5 g/l Glucose) vereint, homogenisiert (Dounce Gewebehomogenisator mit angepasstem Pistill) und

die mit 5 ml 32 % igem Dextran (32 % Dextran in DMEM) versetzte Suspension zentrifugiert (4 °C, 15 min, 4500 x g). Nach Entfernen der Myelinschicht und des Überstands wurde das Pellet in 3 ml DMEM resuspendiert, zentrifugiert (4 °C, 10 min, 1500 x g), erneut in DMEM resuspendiert und auf Nylonfiltern (40 µm Porengröße) gewaschen. Die Kapillaren, von den Filtern mit 3 ml DMEM abgelöst, wurden sofort verwendet oder pelletiert (4 °C, 10 min, 1000 x g) und bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung primärer Gehirnkapillarendothelzellen wurden isolierte Gehirnkapillaren 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit enzymatisch verdaut in DMEM mit Glucose 4,5 g/l, 2 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 mg/ml Collagenase/Dispase. Nach Abzentrifugation (10 min, 180 x g) wurden die verdauten Kapillaren auf Collagenbeschichteten (15 µg/cm²) 6-well-Platten in Kulturmedium (DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10% FCS, 0,5 % murines Blutserum, 1ng/ml bFGF, 15 µg/ml ECGF) ausgesät.

2.2.6.2 Hypoxie an isolierten Gehirnkapillarendothelzellen

Für die Analyse der TJ-Proteine unter hypoxischen Bedingungen wurden die nach 2.2.6.1 isolierten Gehirnkapillaren in 6-well-Schalen überführt und 4 h in einer Hypoxiekammer in einem Crystal Gasmisch (Zusammensetzung: ca. 90 % N₂, 5 % H₂ und 5 % CO₂; O₂-Gehalt <0,6 %) bei 37 °C in Kulturmedium inkubiert. Abschließend wurden die Kapillaren in PBS^{-/-} geschabt, zentrifugiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.3 Systemische Substanzapplikation und Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe

Die im Folgenden verwendeten Konzentrationsangaben der Lösungen wurden stets in w/v % angesetzt. Für die Analyse der BHS-Permeabilität wurden 2 % iges Natriumfluorescein (376 Da), 2 % Evans Blue (960 Da) oder 2 % FD10 (10 kDa), gelöst in PBS^{+/+}, in die Schwanzvene (i.v.) injiziert. Pro 22 g schwere, adulte Maus wurden 100 µl der Fluoreszenzfarbstoff-Lösung verwendet und bei abweichendem Gewicht das Injektionsvolumen angepasst.

Für die Analyse der BHS-modulierenden Wirkung des BO1 wurde eine 65 mM BO1 Stammlösung in DMSO im Verhältnis 1:100 in 20 % iger HPβCD-Lösung in PBS^{+/+} verdünnt. Pro 22 g schwere Maus wurden 100 µl i.v. appliziert, was folgender Dosierung entsprach: 2,8 µmol/kg BO1, 600 µmol/kg HPβCD und 600 µmol DMSO/kg. Damit entsprach die initiale BO1-Konzentration im Blut ca. 65 µM. Den Kontrollgruppen wurden entsprechende

Dosierungen der Lösungsvermittler HP β CD und DMSO bzw. reines PBS^{+/+} i.v. injiziert. Zur Optimierung des Applikationsregimes wurden verschiedene Schemata getestet (Abb. 2.2): Bei der Einfach-Injektion wurden einmalig 2,8 μ mol/kg BO1 in 600 μ mol/kg HP β CD und

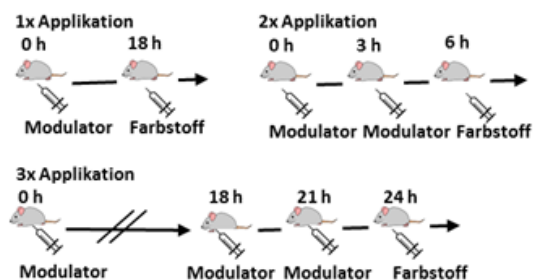


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Applikationsregime.

600 μ mol DMSO/kg in PBS^{+/+} bzw. die Kontrollgruppen i.v. appliziert. Bei zweifacher Applikation wurde das BO1 zweimal im Abstand von 3 h i.v. appliziert. Bei dreifacher Applikation wurde die erste Injektion zum Zeitpunkt t=0 h durchgeführt. 18 h später folgten die zweite und weitere 3 h später eine dritte Injektion (0 h-18 h-

21 h). Bei der intraperitonealen (i.p.) Injektion wurden jeweils 7 μ mol/kg BO1 bzw. die Kontrollgruppen im Dreifach-Applikationsschema injiziert. Für die Detektion der BHS-Öffnung wurde 3 h nach der letzten BO1-Behandlung 2 %iges Natriumfluorescein i.v. verabreicht.

Um ausschließlich den ins Gewebe übergetretenen Farbstoff zu detektieren, wurden die Versuchstiere 15 min nach der Fluoreszenzfarbstoff-Injektion mit 25 ml Heparin-haltigem PBS^{+/+} transkardial unter tiefer Narkose (i.p. Injektion von 1,2 % Ketamin, 0,16 % Xylazin in destilliertem Wasser) perfundiert (Flussrate 1,5 ml/min). Das entnommene Gehirn und ein Leberlappen wurden in 2-Methylbutan auf Trockeneis für 7 min gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die biochemische Detektion der Fluoreszenz-aktiven Farbstoffe wurden 100 mg des perfundierten Gehirn- bzw. Lebergewebes auf Eis in 250 μ l PBS^{+/+} homogenisiert (Dounce Gewebehomogenisator), mit 250 μ l 60 %iger Trichloressigsäure versetzt und die Proteine gefällt (> 2 h, 4 °C). Nach Zentrifugation (4 °C, 20 min, 18 000 x g) wurde die Fluoreszenzintensität des Farbstoff-haltigen Überstands in 96-well-Platten bei der entsprechenden Wellenlänge am TECAN-reader gemessen. Die Menge wurde mittels einer mitgeführten Eichgeraden der Fluoreszenzfarbstoffe quantifiziert.

2.2.6.4 Middle Cerebral Artery Occlusion

In vivo Untersuchungen unter ischämischen Bedingungen erfolgten am MCAO-Modell (*Middle Cerebral Artery occlusion*). In einem operativen Eingriff, durchgeführt von Dr. Rex (AG Dirnagl, Charité-Berlin), wurde tiefbetäubten Mäusen die mittlere Gehirnschlagader der linken Hemisphäre durch ein Filament für 30 min verschlossen und 48 h reperfundiert bzw.

für 60 min verschlossen und 3 h reperfundiert. Etwa 1 h nach Beginn der Reperfusion wurde mittels eines DWI-gewichteten MRTs mit anschließendem *ADC mapping* eine quantitative Bestimmung des Infarktolumens vorgenommen. Optional wurden die Tiere nach ca. 6 h Reperfusion mit der Dreifach-i.v. Applikation von BO1 behandelt. 3 h nach der letzten BO1-Gabe wurde ein DWI-gewichtetes MRT mit anschließendem *ADC mapping* und nach 48 h ein T2-gewichtetes MRT zur Quantifizierung der Tumorgroße durchgeführt. Abschließend wurden die Gehirne schockgefroren für immunhistochemische Analysen.

2.2.6.5 Ermittlung der *in vivo* Verträglichkeit von BO1 und kinetische Analysen

Die Verträglichkeitsstudie hinsichtlich BO1 und seiner Lösungsvermittler an der Maus erfolgte in Zusammenarbeit mit der EPO GmbH Berlin-Buch. Mäuse des Stamms NMRI-Foxn1 nu^{-/-} (Tab. 2.14) wurden nach dem in 2.2.6.3 entwickelten 0-18-21 h i.v. Applikationsschema einmal wöchentlich über 4 Wochen mit den in Tab. 2.19 aufgelisteten Substanz-Kombinationen injiziert. Als Maß für die Verträglichkeit wurde nahezu täglich das Körpergewicht der Tiere gemessen und am Ende der Versuchsreihe exemplarische histologische Analysen durchgeführt.

Tab. 2.19: Versuchsgruppen für die *in vivo* Verträglichkeitsstudie

Gruppe	Substanz	Dosis [$\mu\text{mol}/\text{kg}$] / i.v. Injektion
1	PBS	
2	DMSO	1200
3	HP β CD + DMSO	600 + 1200
4	HP β CD + DMSO	1200 + 1200
5	BO1 + HP β CD + DMSO	2,9 + 600 + 1200
6	BO1 + HP β CD + DMSO	5,8 + 1200 + 1200

Die Ermittlung der Eliminierungshalbwertszeit im Blutplasma sowie die Massenbilanzierung wurden durch die Pharmacelsus GmbH in Saarbrücken durchgeführt. Nach einer einmaligen i.v. Applikation von 2,9 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ in 600 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ HP β CD und 600 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ DMSO in die Schwanzvene von Mäusen wurden Blutproben über einen Zeitraum von 24 h entnommen und das Blutplasma mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie analysiert. Aus der halblogarithmischen Auftragung der abnehmenden Substanzkonzentration gegen die Zeit wurde über die Steigung die Eliminierungshalbwertszeit berechnet. Für die Massenbilanzierung wurden die Versuchstiere in einem metabolischen Käfigsystem gehalten. Urin- sowie Fäzesproben wurden auf ihren Gehalt an BO1 und HP β CD hin untersucht.

2.2.6.6 BO1-Applikation im Glioblastom der Maus

Die Wirkung des BO1 auf die ZNS-Gängigkeit von Zytostatika wurde im murinen glialen Tumormodell in Zusammenarbeit mit der EPO GmbH Berlin-Buch getestet. Hierzu wurde Mäusen des Stamms NMRI-Foxn1 $nu^{-/-}$ (Tab. 2.14) je 20 000 U87MG Zellen (Tab. 2.11) intrathekal injiziert. Anschließend wurde eine vierwöchige Chemotherapie durchgeführt, wobei die Substanzgabe einmal pro Woche stattfand. Die Versuchsgruppen und die Dosierungen der Substanzen sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst. Die Gruppe 3 und 5 bekamen wöchentlich einmalig das entsprechende Zytostatikum i.v. injiziert (400 μ l pro 20 g schwere Maus). Nach der BO1-i.v. Applikation im 0-18-21 h Applikationsregime wurden die Gruppen 4 und 6 zum Zeitpunkt 24 h mit dem entsprechenden Zytostatikum behandelt. Die Kontrollgruppen 1 und 2 wurden nach dem 0-18-21 h Applikationsregime mit BO1 bzw. nur DMSO i.v. injiziert, erhielten jedoch nicht das entsprechende Zytostatikum.

Tab. 2.20: Versuchsgruppen im glialen Tumormodell

Gruppe	Substanz	Dosis [μ mol/kg] / i.v. Injektion
1	DMSO	1200
2	BO1 + HP β CD + DMSO	2,9 + 600 + 1200
3	Paclitaxel	28
4	Paclitaxel + BO1 + HP β CD + DMSO	28 + 2,9 + 600 + 1200
5	Oxaliplatin	13
6	Oxaliplatin + BO1 + HP β CD + DMSO	13 + 2,9 + 600 + 1200

2.2.6.7 Anfertigung von Kryoschnitten

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurde das zu schneidende Gewebe auf $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ äquilibriert, mittels Tissue-Tek O.C.T. auf einer Objektplatte fixiert und am Kryostaten (Tischtemperatur $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, Messertemperatur $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$) geschnitten. Die Schichtdicke für immunhistochemische Färbungen betrug $8\text{ }\mu\text{m}$, für histologische Färbungen genutzte Schnitte hatten eine Schnittdicke von $14\text{ bis }20\text{ }\mu\text{m}$. Für Untersuchungen MCAO-unterzogener Mäuse wurden koronare Gehirnschnitte folgender Ebenen (E) angefertigt: E0 \sim Bregma + 2,71 mm; E1 \sim Bregma + 1,5 mm; E2 \sim Bregma; E3 \sim Bregma - 2,12 mm und E4 \sim Bregma - 3,0 mm. Die auf SuperFrost Plus Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und für Färbungen weiterverwendet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.7 Histologische Färbungen

Für die Übersichtsfärbungen wurde eine 1:1 Mischung aus Hämatoxylin nach Mayer und Hämatoxylin nach Harris (Tab. 2.3) hergestellt. Sowohl die Hämatoxylinmischung als auch das gebrauchsfertige Eosin G (Tab. 2.3) wurden vor der Verwendung frisch filtriert.

2.2.7.1 Hämatoxylin-Färbung von Gewebe und Quantifizierung eines Infarktareals

Für die Beurteilung des Infarktareals im MCAO-Modell wurden Kryoschnitte (2.2.6.7) des Gehirns mit Hämatoxylin gefärbt. Hierzu wurden sie mit Methanol (10 min, -20 °C) fixiert, in destilliertem Wasser gespült, 10 min in der Hämatoxylin-Mischung inkubiert, kurz in destilliertes Wasser und anschließend in 0,1 % ige HCl-Lösung getaucht. Nach 8 min Bläuen in Leitungswasser erfolgte ein kurzes Tauchen in destilliertes Wasser. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 % bis 100 % Ethanol) entwässert, zweimal in Roti-Histol für 5 min geklärt und in Einschlussmittel (Roti Histo Kit) eingebettet. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Das Infarktareal wurde mittels der Software Sigma Scan Pro quantifiziert: In koronaren Kryoschnitten aus fünf verschiedenen Ebenen (E0-E4, siehe 2.2.6.7) wurden die Fläche des Infarkts A_{Infarkt} , die Fläche der nicht infarktösen ipsilateralen Hemisphäre A_{ipsi} sowie die Fläche der contralateralen Hemisphäre A_{contra} gemessen und folgendermaßen addiert:

$$A_{\text{Infarkt}} = A_{E0 \text{ Infarkt}} + (2 \cdot A_{E1 \text{ Infarkt}}) + (2 \cdot A_{E2 \text{ Infarkt}}) + (2 \cdot A_{E3 \text{ Infarkt}}) + A_{E4 \text{ Infarkt}} \text{ bzw. } A_{\text{ipsi}} \text{ und } A_{\text{contra}}.$$

Die Infarkt- und Schwellungsgröße bezogen auf die Größe der contralateralen Hemisphäre wurden anschließend folgendermaßen berechnet:

$$\text{Infarkt [\%]} = \frac{A_{\text{contra}} - A_{\text{ipsi}}}{A_{\text{contra}}} \cdot 100 \qquad \text{Schwellung [\%]} = \frac{A_{\text{Infarkt}} + A_{\text{ipsi}}}{A_{\text{contra}}} \cdot 100$$

2.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Luftgetrocknete Kryoschnitte (2.2.6.7) wurden in PBS^{+/+} 3 min äquilibriert, 6 min in der Hämatoxylinlösung gefärbt, kurz in destilliertes Wasser und anschließend in 0,1 %ige HCl-Lösung getaucht. Die anschließend 10 min in Leitungswasser gebläuten Schnitte wurden erneut kurz in destilliertes Wasser getaucht und 1 min in der Eosin-Lösung gefärbt. Es folgten eine Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 % bis 100 % Ethanol), die Klärung in Roti-Histol für 5 min und das Eindeckeln in Einschlussmittel (Roti Histo Kit).

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswahl der Claudine als Targets für die Modulation der Blut-Hirn-Schranke

Die abdichtende Schutzfunktion der BHS begrenzt gleichzeitig Möglichkeiten der pharmakologischen Behandlung zerebraler Erkrankungen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind viele Fragen hinsichtlich ihrer genauen Proteinzusammensetzung und deren Funktion offen. So ist zur Funktion der erst kürzlich beschriebenen Cldn22, -24 und -25 sowie Cldn-12 bislang wenig bekannt (Günzel und Yu, 2013). Um zu klären, ob sich eines dieser Claudine als Target für eine BHS-Modulation eignet, wurden sie im Hinblick auf mögliche *trans*-Interaktionen und ihren Einfluss auf die parazelluläre Abdichtung untersucht.

Mittels Lebendzellmikroskopie wurden Kontakthanreicherungen als Maß für *trans*-Interaktionen in Fluoreszenzprotein-fusioniertem Cldn12, -22, -24 und -25 bestimmt (Abb. 3.1). Während YFP-Cldn3 und YFP-Cldn5, Claudine mit abdichtender Funktion, in Zellkontakten direkt benachbarter, transfizierter Zellen stark angereichert lokalisierten, waren TRQ-Cldn12, -22, -24 bzw. -25 homogen in der Plasmamembran verteilt und zeigten im Vergleich zu Cldn3 und -5 eine stärkere vesikuläre Lokalisation im Zytoplasma. Die Kontakthanreicherungen wurden angelehnt an Piontek et al., 2008 und Piontek et al., 2011 bestimmt. In Übereinstimmung mit Literaturwerten wies im Rahmen dieser Untersuchung YFP-Cldn5 einen Anreicherungsfaktor F_A von $3,1 \pm 0,5$ auf und bildete somit eindeutig *trans*-Interaktionen aus. TRQ-Cldn12, im Weiteren als Negativkontrolle verwendet, bildete mit einem $F_{A_Cldn12} = 0,9 \pm 0,1$ keine Interaktion aus. Die F_A von TRQ-Cldn22, -24 und -25 in homophilen Zellkontakten waren nicht wesentlich verschieden zu TRQ-Cldn12 ($F_{A_Cldn22} = 1,0 \pm 0,1$; $F_{A_Cldn24} = 0,9 \pm 0,1$; $F_{A_Cldn25} = 0,9 \pm 0,1$).

Heterophile Interaktionen dieser Claudine wurden in verschiedenen Kokulturen gemessen. Interessanterweise wiesen TRQ-Cldn12, -22, -24 sowie -25 eine stärkere Anreicherung in verschiedenen heterophilen Zellkontakten auf als in homophilen. TRQ-Cldn12 hatte einen signifikant höheren F_A in Zellkontakten mit YFP-Cldn22, -24, -25 und YFP-Occl als mit sich selbst. Dies galt auch für TRQ-Cldn22 in Zellkontakten mit YFP-Cldn12, -25, und YFP-Occl sowie TRQ-Cldn24 mit YFP-Cldn25 oder YFP-Occl. TRQ-Cldn25 wies einen im Vergleich zur

Negativkontrolle höheren F_A in Zellkontakten mit YFP-Cldn12, -22, -24 und YFP-Occl auf. Die stärkste heterophile Kontakthanreicherung wurde zwischen TRQ-Cldn25 und YFP-Occl gemessen ($F_A=1,4 \pm 0,1$). Somit bildeten diese Claudine schwache heterophile *trans*-Interaktionen aus.

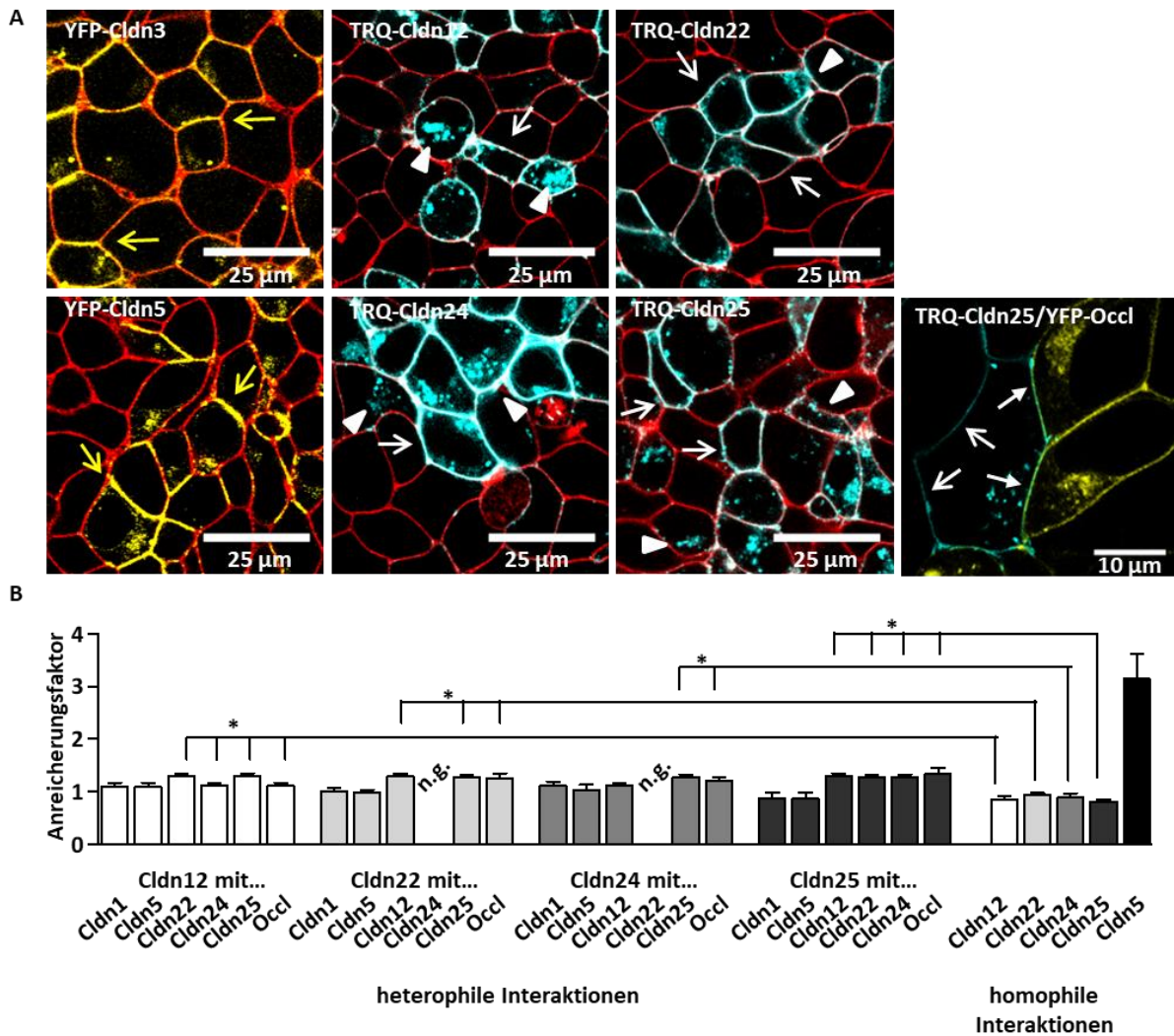


Abb. 3.1: In HEK-293 Zellen bilden Cldn12, -22, -24 und -25 keine homologen *trans*-Interaktionen aus.

(A) Exemplarische Lebendzellfärbungen YFP-Cldn3 und -5 (gelb) sowie TRQ-Cldn12, -22, -24 bzw. -25 (blau) exprimierender HEK-293 Zellen, deren Plasmamembran mit Trypanblau (rot) gefärbt wurde. YFP-Cldn3 und -5 waren in Zellkontakten benachbarter Zellen, die beide das jeweilige Claudin exprimierten (gelbe Pfeile) angereichert. TRQ-Cldn12, -22, -24 bzw. -25 verteilten sich homogen in der Plasmamembran (weiße Pfeile). Intrazelluläre Vesikel (Pfeilköpfe) waren vor allem in Cldn-12, -24 und -25 prominent. TRQ-Cldn25 (blau) war im Zellkontakt mit YFP-Occl (gelb) stärker angereichert (geschlossener Pfeil) als im Zellkontakt zu einer nicht transfizierten Zelle (offener Pfeil). (B) Gemessene mittlere Anreicherungs faktoren $F_A \pm$ SEM. Die Positivkontrolle YFP-Cldn5 wies deutliche homophile *trans*-Interaktionen auf ($F_A=3,1 \pm 0,5$). TRQ-Cldn22, -24 und -25 hatten ähnlich zur Negativkontrolle TRQ-Cldn12 ($F_A=0,9 \pm 0,1$) einen $F_A < 1,0$ in homophilen Zellkontakten. In heterophilen Zellkontakten wiesen verschiedene Cldn-Kombinationen einen signifikant höheren F_A auf als in homophilen und bildeten somit schwache *trans*-Interaktionen aus. Heterophile Interaktionen von TRQ-Cld22/YFP-Cldn24 wurden nicht gemessen (n.g.); $n_{\text{Cldn5 homophil}} \geq 5$, alle anderen Kombinationen $n \geq 15$ in 2-3 unabhängigen Experimenten; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplem Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$.

Ergänzend wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (*transepithelial electrical resistance*, TER) in Filterkulturen stabil mit YFP-Cldn12, -22, -24 oder -25 transfizierten MDCK-II Zellen gemessen. Diese Zelllinie hat eine endogene TJ-Maschinerie, sodass den transfizierten Claudinen weitere potentielle Interaktionspartner zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zur Positivkontrolle YFP-Cldn5 (Piehl et al., 2010) führte die Expression von YFP-Cldn12, -22, -24 bzw. -25 nicht zur Erhöhung des TER (Abb. 3.2). Die Ergebnisse legen nahe, dass weder Cldn12, -22, -24 noch -25 zur Abdichtung des Parazellularraums gegen Ladungsträger beitragen und somit keine geeigneten Targets für die Modulation der Permeabilität der BHS darstellen.

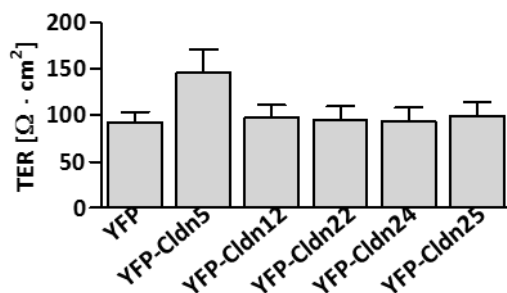


Abb. 3.2: Cldn-12, -22, -24 und -25 tragen nicht zur Erhöhung des TER in MDCK-II-Zellen bei.

TER-Messungen in Filterkulturen von MDCKII-Zellen, stabil transfiziert mit YFP (Negativkontrolle) bzw. YFP-Cldn5 (Positivkontrolle) sowie Cldn12, -22, -24 oder -25; Mittelwert \pm SEM; n=3.

3.2 Claudin-3 als Target für die Modulation der Blut-Hirn-Schranke

Im Folgenden wurde der Fokus auf die Untersuchung von Cldn3 als Target zur transienten Erhöhung der BHS-Permeabilität gelegt. Dabei wurde ein nicht toxisches Fragment des CPE, das an epithelialen Zelllinien als Cldn3-Modulator validiert wurde (cCPE₁₉₄₋₃₁₉; Veshnyakova et al., 2012), hinsichtlich einer BHS-modulierenden Wirkung im Endothel getestet. Zeitgleich wurden Auswirkungen einer Cldn3-Defizienz anhand von Cldn3-KO Mäusen untersucht, um die Funktion dieses Proteins unter *in vivo*-Bedingungen genauer zu charakterisieren.

3.2.1 Das nicht-toxische *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Fragment bindet nicht an Endothelzellen

Um zu klären, ob cCPE₁₉₄₋₃₁₉ im Endothel der BHS wirksam ist, wurde eine Bindungsstudie an primären Gehirnkapillarendothelzellen durchgeführt. Hierzu wurden primäre Wildtyp-Gehirnkapillarendothelzellen 16 h mit dem aufgereinigten Fusionsprotein GST-cCPE₁₉₄₋₃₁₉ bzw. als Kontrollbedingung mit GST behandelt und mittels Immunfluoreszenz eine Bindung an die Zellen analysiert. Die Zellkontakte wurden durch Anfärbung des Junction-Markers ZO-1 (rot) sichtbar gemacht, während das GST-Tag in Grün zu sehen ist (Abb. 3.3). Im

Kontrollsystem, der Cldn3 endogen exprimierenden Epithelzelllinie Caco-2 (Staat et al., 2015), band GST-cCPE₁₉₄₋₃₁₉ an die Zellen sowohl in den Zellkontakten als auch außerhalb auf der Membran und intrazellulär, das GST-Tag allein zeigte hingegen keine Bindung. Bei primären Gehirnkapillarendothelzellen verhielt es sich anders: Das GST-Tag allein und GST-cCPE₁₉₄₋₃₁₉ lagerten sich gleichermaßen schwach an den Zellrasen an. Damit erschien dieser Modulator ungeeignet, um TJs primärer Endothelzellen zu modulieren.

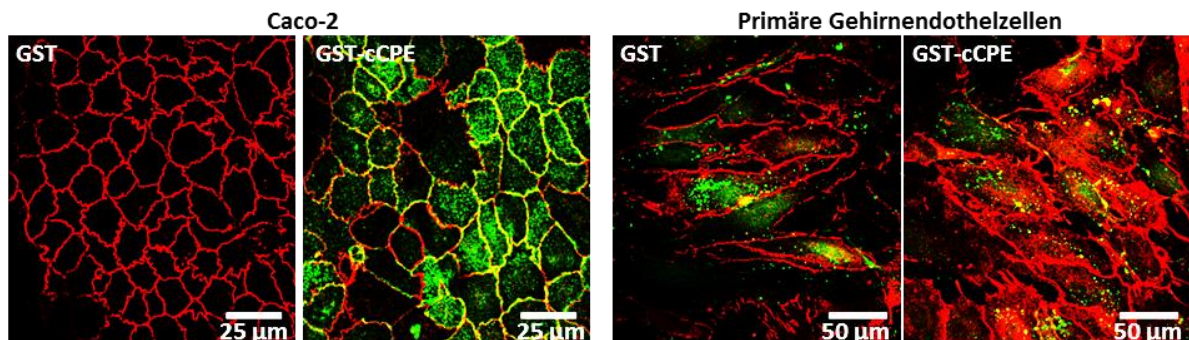


Abb. 3.3: GST-cCPE₁₉₄₋₃₁₉ bindet an die Epithelzelllinie Caco-2, jedoch nicht an primäre Gehirnkapillarendothelzellen.

Immunfluoreszenzfärbung eines Caco-2 Zellrasens bzw. primäre murine Gehirnkapillarendothelzellen gegen GST (grün) und ZO-1 (rot) nach 16 h Behandlung mit 10 µg/ml GST-cCPE₁₉₄₋₃₁₉ bzw. GST (Negativkontrolle). An primäre Gehirnkapillarendothelzellen band GST-cCPE genauso schlecht wie die Negativkontrolle.

3.2.2 Claudin-3 wird an der Blut-Hirn-Schranke schwach exprimiert und beeinflusst Claudin-1

Der vorhergehende Abschnitt warf die Frage auf, warum cCPE₁₉₄₋₃₁₉ in den getesteten Zellsystemen unterschiedlich bindet. Daher wurde die Bedeutung von Cldn3 in verschiedenen Geweben, insbesondere an der BHS, näher untersucht. Mittels qRT-PCR wurde eine im Vergleich zu anderen Geweben, z.B. dem Darm, sehr schwache Cldn3-Transkription, bezogen auf β -Aktin als *housekeeping gene*, festgestellt (Abb. 3.4).

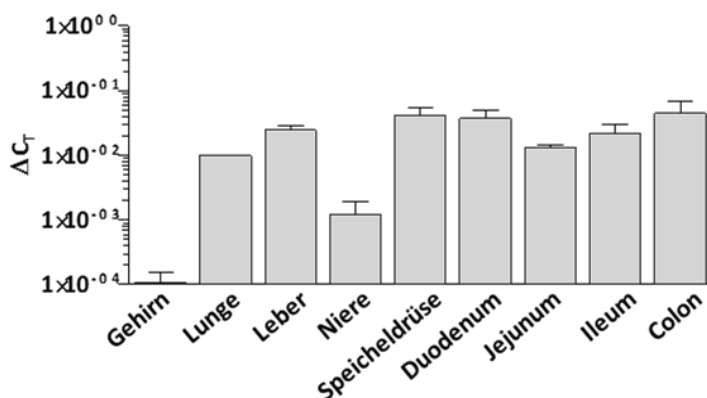


Abb. 3.4: Das murine Gehirn weist eine geringe Cldn3-Transkription auf.

Relative Cldn3-Transkription im Gehirn, Lunge, Leber, Niere und verschiedenen Darmabschnitten adulter Mäuse. Die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR und einer Normierung auf endogenes β -Aktin (ΔC_t); Mittelwert \pm SEM; n=4.

Um zu klären, welchen Einfluss Cldn3 im Gehirn trotz seines geringen Expressionsniveaus hat, wurden gereinigte Gehirnkapillaren des Kortex adulter Cldn3-*Knockout* Mäuse (Cldn3-KO) auf die Auswirkungen einer Cldn3-Defizienz auf mRNA- sowie Proteinebene untersucht. Cldn5 hatte die höchste relative mRNA-Transkription. Occl und ZO-1 wurden ca. 15x schwächer transkribiert, gefolgt von Cldn12 und Cldn1 (75 x weniger als Cldn5). Cldn3 wies das geringste Expressionsniveau auf (250 x weniger als Cldn5). Interessanterweise hatte die Cldn3-Defizienz keine kompensatorische Hochregulation der untersuchten RNA-Transkripte zur Folge, sondern ging mit einer signifikant reduzierten Cldn1-Transkription einher (Abb. 3.5).

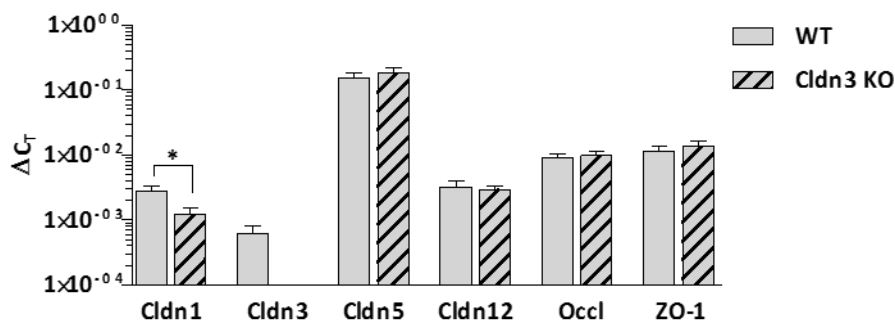


Abb. 3.5: Die Cldn3-Transkription in isolierten Gehirnkapillarendothelzellen ist im Vergleich zu anderen TJ-Komponenten gering, beeinflusst aber die Cldn1-Transkription.

Relative mRNA-Transkription verschiedener TJ-Komponenten in murinen Gehirnkapillaren. Isolierte und aufgereinigte Gehirnkapillaren aus WT und Cldn3-KO Mäusen wurden mittels qRT-PCR, bezogen auf endogenes β -Aktin (ΔC_T), hinsichtlich der Transkription von Cldn1, -3, -5 und -12, Occl und ZO-1 analysiert und verglichen; Mittelwert \pm SEM; n=6-9, zweiseitiger Mann-Whitney Test mit *, $p \leq 0,05$.

Die Expression der TJ-Proteine isolierter Gehirnkapillarendothelzellen wurde mittels Western Blot quantifiziert. Dabei wurden die Tx-100 lösliche und die Tx-100 unlösliche Fraktion, welche nach Patton et al., 1989 mit dem Zytoskelett assoziierte Membranproteine enthält, getrennt voneinander betrachtet. In Übereinstimmung mit der reduzierten Cldn1-mRNA-Transkription wurde eine signifikante Verringerung der Cldn1-Bandenintensität in beiden Fraktionen der Cldn3-KO Kapillaren im Vergleich zum WT gemessen. Weiterhin waren im Cldn3-KO gegenüber dem WT die Cldn12- und Occl-Proteinmengen in der Tx-100 löslichen, d.h. nicht TJ-assoziierten, Fraktion tendenziell verringert. Die große Streuung der Stichprobe ließ für Cldn5 keine Aussage zu (Abb. 3.6).

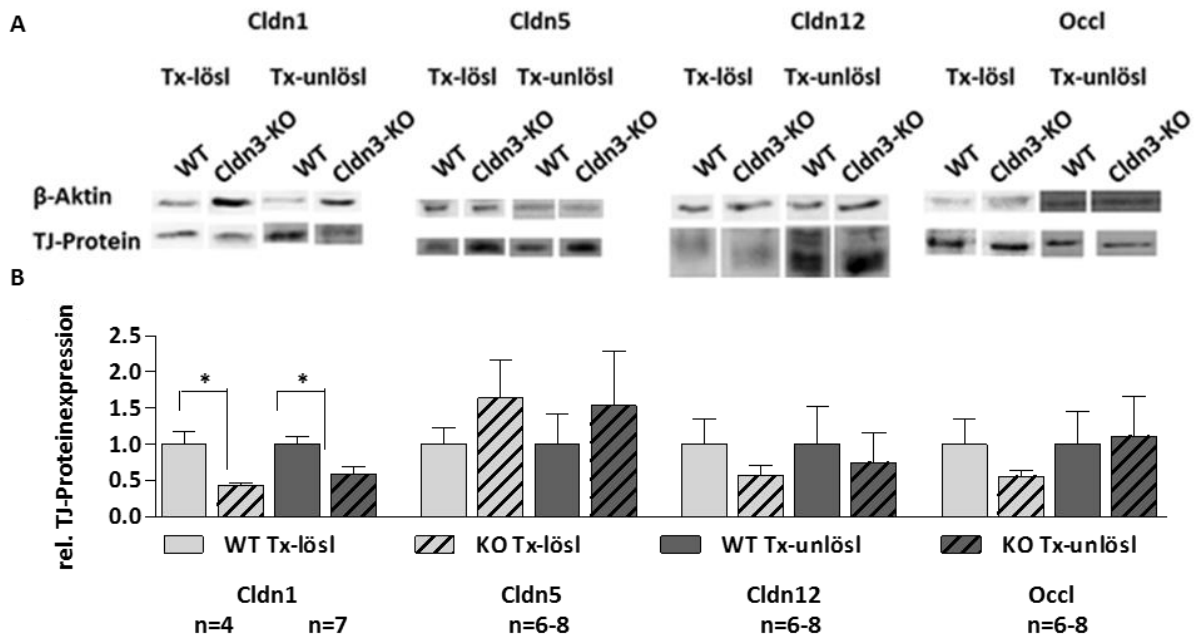
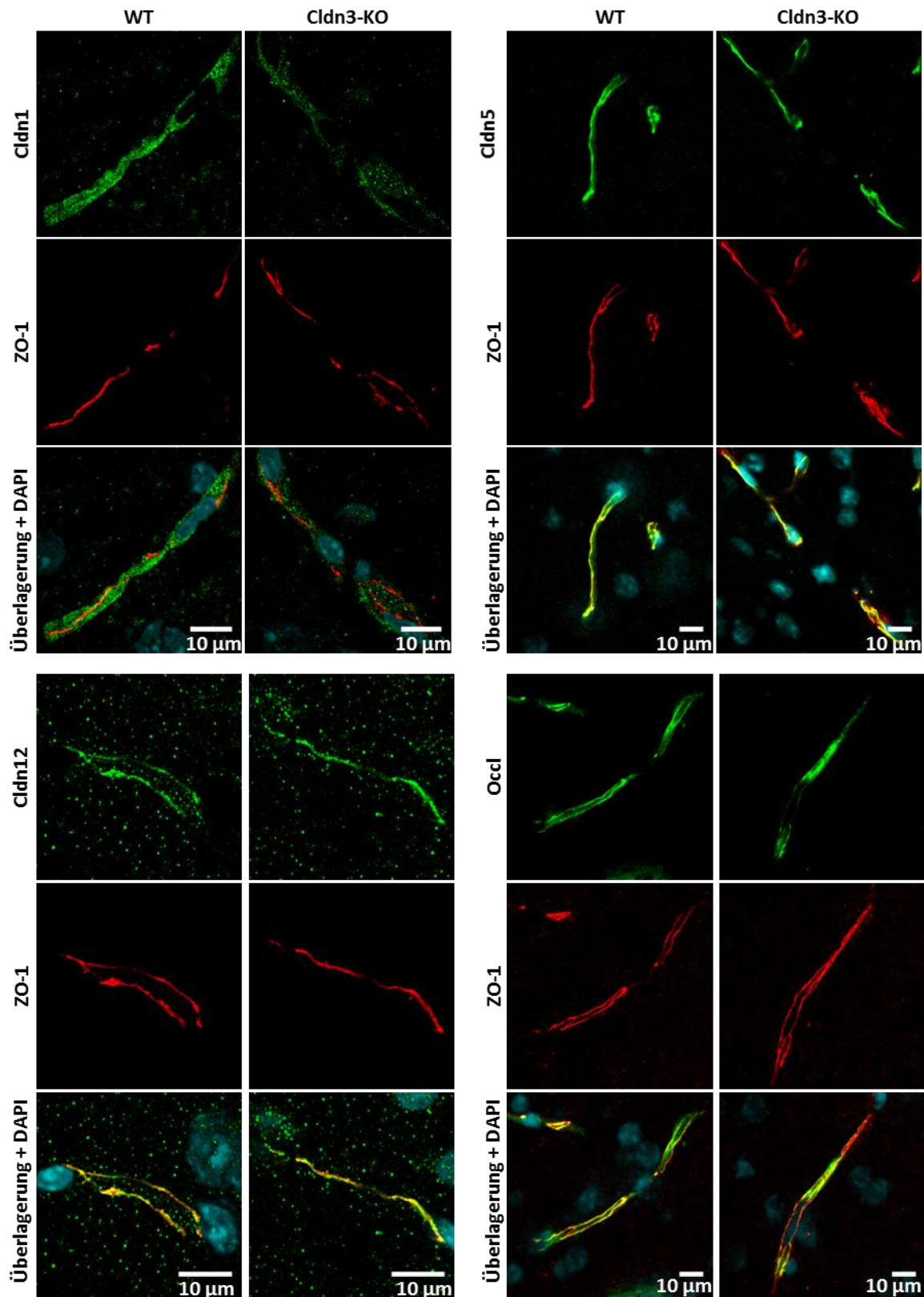


Abb. 3.6: Cldn3-KO Gehirnkapillarendothelzellen weisen im Vergleich zum WT eine reduzierte Cldn1-Proteinexpression auf.

Western Blot Analysen von Lysaten isolierter Gehirnkapillaren von WT- und Cldn3-KO Mäusen hinsichtlich der Cldn1, -5, -12 und Occl-Expression in der Tx-100 löslichen und unlöslichen Fraktion. Gezeigt sind Banden repräsentativer Blots (A) sowie die densitometrisch bestimmte, mittlere Bandenintensität \pm SEM der TJ-Proteine, bezogen auf endogen detektiertes β -Aktin gefolgt von einer Normierung auf den WT (B). Die relative Cldn1-Bandenintensität war im Cldn3-KO in beiden Fraktionen signifikant verringert; $n_{\text{Cldn1}}=4-6$, $n_{\text{Cldn5}}=6-8$, $n_{\text{Cldn12}}=6-8$; $n_{\text{Occl}}=6-8$, Mann-Whitney-Test mit *, $p \leq 0,05$.

Ergänzend wurden diese TJ-Proteine in kortikalen Kapillaren in Kryoschnitten von Gehirnen aus Wildtyp (WT) und Cldn3-KO Tieren nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensitäten der TJ-Proteine (grün) Cldn5, -12 und Occl in WT- und Cldn3-KO Mäusen waren gleich. Übereinstimmend mit der verringerten mRNA-Transkription und der verringerten Cldn1-Menge im Western Blot war die Cldn1-Fluoreszenzintensität im Cldn3-KO gegenüber dem WT signifikant schwächer. Cldn5 und Occl kolokalisierten laut dem Kolokalisationskoeffizienten nach Pearson (*Pearson's colocalization coefficient*, PCC) stark mit ZO-1 ($\text{PCC}_{\text{WT Cldn5}}=0,80 \pm 0,01$; $\text{PCC}_{\text{WT Occl}}=0,68 \pm 0,02$). Cldn12 hingegen war innerhalb der Kapillaren etwas diffuser lokalisiert und wies zahlreiche Signale außerhalb der Kapillaren auf. Nach deren Abzug betrug der $\text{PCC}_{\text{WT Cldn12}}=0,35 \pm 0,03$. Cldn1 war ebenfalls diffus in den Kapillaren lokalisiert ($\text{PCC}_{\text{WT Cldn1}}=0,32 \pm 0,02$). Die entsprechenden Koeffizienten im Cldn3-KO waren mit dem WT nahezu identisch (Abb. 3.7).



TJ-Protein	rel. Fluoreszenzintensität [%]		PCC	
	WT	Cldn3-KO	WT	Cldn3-KO
Cldn1	100 ± 6,5 *	78,0 ± 4,7	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,01
Cldn5	100 ± 7,0	87,4 ± 7,8	0,80 ± 0,02	0,80 ± 0,01
Cldn12	100 ± 4,6	90,6 ± 5,1	0,35 ± 0,03	0,36 ± 0,02
Occl	100 ± 6,9	83,4 ± 6,2	0,68 ± 0,02	0,68 ± 0,02

** [Cldn1, Cldn5, Cldn12] *** [Occl] ***

Abb. 3.7: In Gehirndothelzellen sind Cldn1 und Cldn 12 im Vergleich zu Cldn5 und Occl diffuser lokalisiert.

Immunhistochemische Färbungen von Gehirn-Kryoschnitten von WT- und Cldn3-KO Mäusen gegen Cldn-1, -5, -12 bzw. Occl (grün), dem Junction-Marker ZO-1 (rot) sowie eine mit Zellkernen (DAPI, blau) überlagerte Darstellung. Die Fluoreszenzintensitäten (Mittelwert \pm SEM) der TJ-Proteine wurden zwischen WT und Cldn3-KO Mäusen verglichen; $n > 15$ aus je vier verschiedenen Mäusen, Mann-Whitney-Test mit *, $p \leq 0,05$. Die Kolokalisation der einzelnen Proteine mit ZO-1 wurde durch den Kolokalisationskoeffizienten nach Pearson bestimmt (PCC; Mittelwert \pm SEM); $n > 15$ aus je vier verschiedenen Mäusen, Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest und *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ und ***, $p \leq 0,001$.

3.2.3 Der Claudin-3-Knockout geht einher mit einer veränderten *Tight Junction-Strangmorphologie* und einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke

Um zu untersuchen, ob die Cldn3-Defizienz und die damit einhergehende Cldn1-Reduktion eine Auswirkung auf die Struktur und Funktionalität der BHS hat, wurden koronare Kryoschnitte des Gehirns mittels einer HE-Färbung hinsichtlich möglicher Infiltrate oder einer Ödembildung analysiert. Diese morphologische Übersichtsfärbung zeigte eine klare räumliche Ordnung der untersuchten Gehirne: Im vertikal geschichteten Kortex waren in der Lamina I nur wenige Zellkerne, durch Hämatoxylin blau gefärbt, erkennbar. Die tieferen Schichten der Lamina enthielten dicht gepackte Neuronen, Pyramidenzellen mit ihrem großen Perykarium und Gliazellen, die vergleichsweise schwach gefärbt wurden. Unter dem schwach gefärbten *Corpus callosum* waren die lateralen Ventrikel mit dem *Choroidalplexus* und die fibrilläre Struktur des Striatums ebenfalls deutlich zu unterscheiden. Ödeme oder Infiltrate wurden in keinem der untersuchten Tiere gefunden (Abb. 3.8).

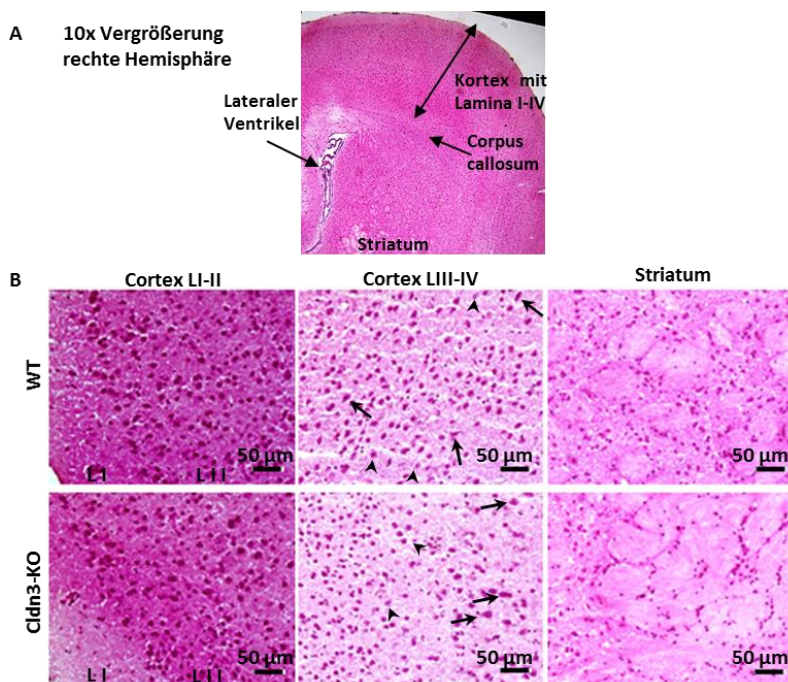


Abb. 3.8: Cldn3-KO Mäuse weisen keine Auffälligkeiten in der ZNS-Morphologie auf.

(A) Ausschnitt einer repräsentativen Übersichtsaufnahme eines HE-gefärbten Kryoschnitts der rechten Hemisphäre einer Cldn3-KO Maus in 10x Vergrößerung. (B) Exemplarische Aufnahmen verschiedener Bereiche im Kortex und Striatum einer WT- und einer Cldn3-KO Maus. Erkennbar waren die Schichtung des Kortex (Lamina I-IV), Gliazellen (Pfeilköpfe), Pyramidenzellen (Pfeile) und die fibrilläre Struktur des Striatums; $n = 5$.

Allerdings wurde an isolierten kortikalen Gehirnkapillaren mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie eine veränderte TJ-Ultrastruktur bei Cldn3-KO Mäusen festgestellt. Sowohl die TJ-Stränge in WT- als auch in Cldn3-KO-Kapillaren waren als aneinander gereichte Partikel im Gefrierbruch der Plasmamembran erkennbar, wobei sie in der extrazellulären Bruchseite (*E-face*, EF) deutlich strukturierter erschienen als in der Protoplasmabruchseite (*P-face*, PF). Im WT erstreckte sich der TJ-Proteinkomplex über $70,2 \pm 4,9\%$ der untersuchten *E-face*-Fläche, im Cldn3-KO nahmen TJ-Stränge nur $49,2 \pm 10,3\%$ ein. Auffällig waren die höhere Strangparallelität EF-assoziiierter TJ-Stränge im Cldn3-KO sowie deren geringere Komplexität im Vergleich zum WT. Der geringere Verzweigungsgrad der Cldn3-KO-Stränge resultierte in signifikant größeren Maschen (Abb. 3.9).

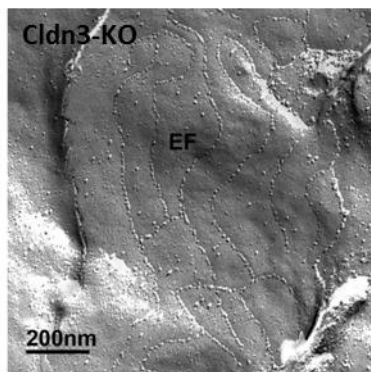
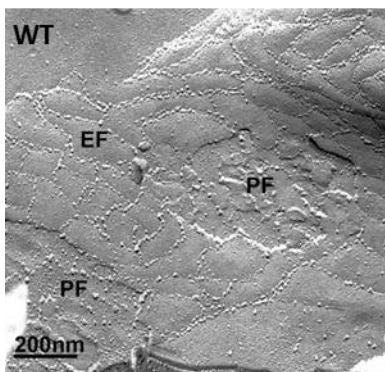
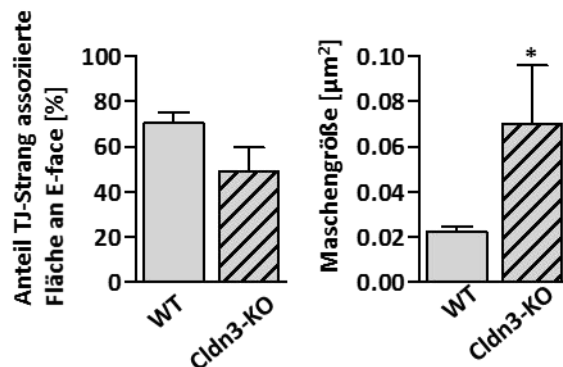


Abb. 3.9: Der Cldn3-KO verändert die Struktur der TJ-Stränge isolierter Gehirnkapillaren.

Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahmen von TJ-Strängen isolierter Gehirnkapillaren aus WT und Cldn3-KO Mäusen mit einer Quantifizierung des TJ-Strang-Netztes. In der *E-face* (EF) bildeten TJ-Stränge im Cldn3-KO im Vergleich zum WT weniger Verzweigungen und dadurch signifikant größere Maschen (WT $0,02 \pm 0,002 \mu\text{m}^2$; Cldn3-KO $0,07 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$); Mittelwert \pm SEM; $n_{\text{WT}}=9$, $n_{\text{Cldn3-KO}}=9$, Mann-Whitney Test mit *, $p \leq 0,05$.



Die veränderte Ultrastruktur der TJs Cldn3-defizienter Mäuse führte zur erhöhten Permeabilität der BHS. Nach i.v. Injektion fluoreszierender Farbstoffe verschiedener Molekulargrößen wurde im Gehirnhomogenat Cldn3-defizienter Mäuse eine dem Wildtyp gegenüber erhöhte Aufnahme von Natriumfluorescein (376 Da) detektiert. Die größeren Farbstoffe *Evans Blue* (960 Da, Plasmaprotein-assoziiert) und FD10 (10 kDa) wurden hingegen nicht verstärkt aufgenommen (Abb. 3.10). Die Bestimmung der Menge und Lokalisation von

Natriumfluorescein im Gewebe anhand seiner Fluoreszenz in Kryoschnitten mittels konfokaler Mikroskopie war nicht eindeutig (Abb. 7.1).

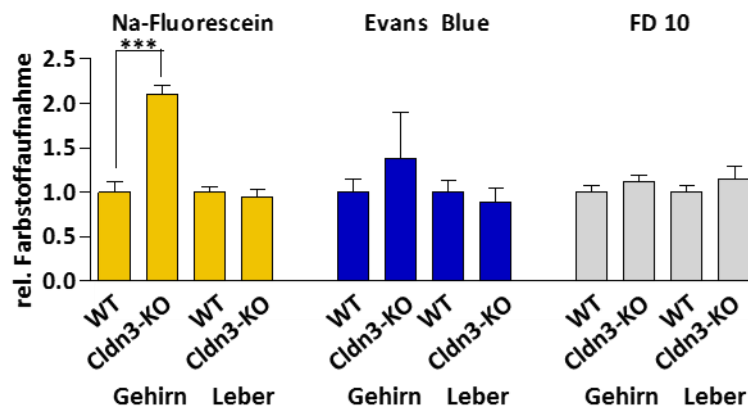


Abb. 3.10: Cldn3-KO Mäuse nehmen zerebral im Vergleich zum Wildtyp die doppelte Natriumfluorescein-Menge auf.

Detektion i.v. applizierter Fluoreszenzfarbstoffe nach 30 min Zirkulation im Blut anhand ihrer Fluoreszenz im Gehirn- bzw. Lebergewebe. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität \pm SEM von Natriumfluorescein, Evans Blue oder FD10 aus je 100 mg Gewebe, normiert auf die jeweilige Aufnahme im WT-Gewebe; $n_{\text{Natriumfluorescein}}=12$, $n_{\text{Evans Blue, FD10}}=5$, Mann-Whitney-Test mit ***, $p \leq 0,001$.

3.2.4 Claudin-3-Defizienz unter pathologischen Bedingungen

3.2.4.1 Claudin-3-Defizienz bewirkt bei Ischämie eine im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche Regulation von Claudin-5, Occludin und ZO-1 an der Blut-Hirn-Schranke

Im Folgenden wurde am MCAO-Modell (*Middle Cerebral Artery Occlusion*) der Maus untersucht, inwiefern sich eine Cldn3-Defizienz unter ischämischen Bedingungen auf die Funktionalität der BHS anders auswirkt als im WT. Dazu wurde in der linken Hemisphäre die mittlere Gehirnschlagader transient verschlossen und das Infarktgeschehen im Cldn3-KO sowie WT 3 h bzw. 48 h nach Beginn der Reperfusion untersucht. Die Ausbildung eines Infarktareals, bestimmt mittels DWI-MRT (diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie) und einem ADC (*apparent diffusion coefficient*) mapping, zeichnete sich in beiden Genotypen bereits 3 h nach Beginn der Reperfusion als Bereich mit verminderter Diffusion (blau) ab. Das Läsionsvolumen betrug im WT $7,6 \pm 1,8$ % der contralateralen Hemisphäre, im Cldn3 KO $6,0 \pm 1,2$ %. Nach 48 h Reperfusion wurde die Quantifizierung der Läsionsgröße mittels Hämatoxylin-gefärbter koronarer Kryoschnitte vorgenommen. Das Infarktareal, deutlich schwächer gefärbt als umliegendes, nicht betroffenes Gewebe, war am stärksten im Striatum der linken Hemisphäre in der Schnittebene 2 ausgeprägt, weitete sich jedoch oft auch auf den Kortex aus. Cldn3-KO Mäuse

wiesen bezogen auf die contralaterale Hemisphäre im Vergleich zum WT eine signifikant geringere Läsion (WT $29,86 \pm 4,4 \%$; Cldn3 KO $12,7 \pm 2,7 \%$) sowie ein geringeres Schwellungsvolumen der ipsilateralen Hemisphäre auf (WT $18,8 \pm 3,9 \%$, Cldn3-KO $9,4 \pm 2,4 \%$), siehe Abb. 3.11.

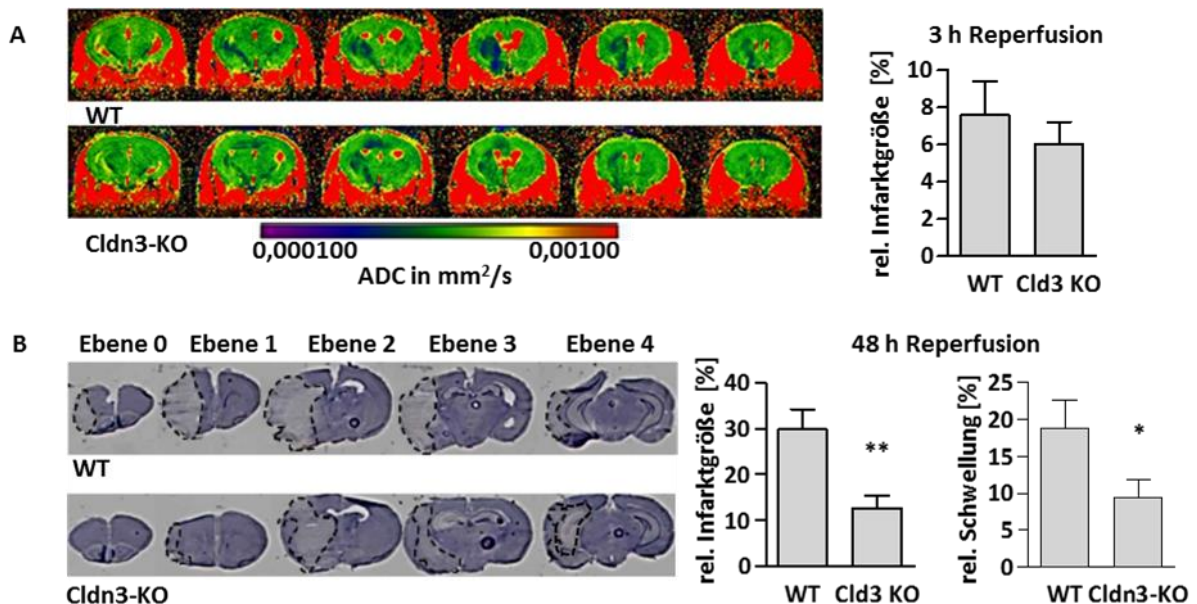


Abb. 3.11: Cldn3-KO Mäuse haben ein geringeres, relatives Infarktverhalten als Wildtyp-Mäuse.

(A) Exemplarische DWI-MRT-Sequenzen mit ADC-mapping einer WT- und Cldn3-KO Maus nach 1 h MCAO und 3 h Reperfusion. Die Größe des Schädigungsbereichs (blau), bezogen auf die contralaterale Hemisphäre, unterschied sich zwischen WT und Cldn3-KO nicht; relativer, mittlerer Schädigungsbereich \pm SEM; $n=6-7$. (B) Exemplarische Hämatoxylin-Färbungen von Gehirn-Kryoschnitten einer WT- und einer Cldn3-KO Maus nach 48 h Reperfusion. Das Infarktareal (schwarz umrandet) war an der schwachen Hämatoxylin-Färbung erkennbar. Die mittlere Infarktgröße \pm SEM sowie die mittlere ipsilaterale Schwellung \pm SEM, bezogen auf die contralaterale Seite, waren im Cldn3-KO gegenüber dem WT signifikant geringer; $n=21$, Mann-Whitney-Test mit *, $p \leq 0,05$ und **, $p \leq 0,01$.

Um den Unterschied hinsichtlich des Infarktgeschehens in WT und Cldn3-KO Mäusen zu erklären, wurden die TJ-Proteine Cldn5, Occl und ZO-1 des Kapillarendothels im Striatum der Schnittebene 2 von Mäusen mit vergleichbaren Infarktgrößen immunhistochemisch hinsichtlich Cldn5, Occl und ZO-1 analysiert. Abb. 3.12 zeigt exemplarische Immunfluoreszenz-Übersichtsaufnahmen von Cldn5 (grün) und ZO-1 (rot) einer WT- und einer Cldn3-KO Maus nach 3 h Reperfusion. Bereits zu diesem Zeitpunkt war sowohl im WT als auch im Cldn3-KO Gewebeuntergang im Infarktareal anhand der geringeren Anzahl DAPI-gefärbter Zellkerne erkennbar. Weiterhin erschienen im kontralateralen Striatum viele TJs langgezogen. Im Infarktareal verkürzte sich ihre Fluoreszenz-positive Länge.

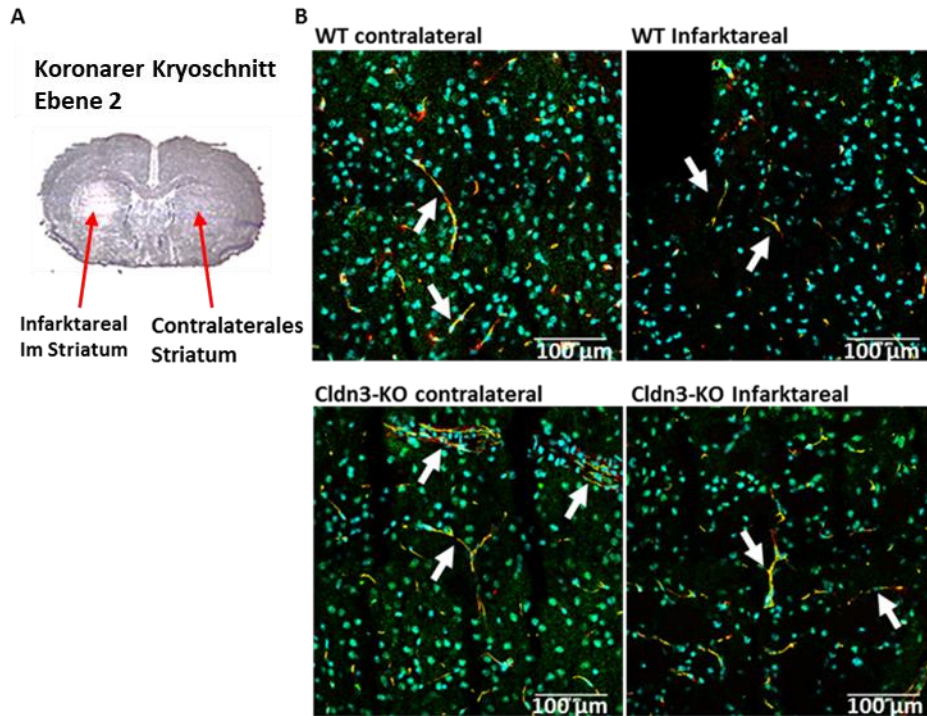


Abb. 3.12: Veränderungen der TJs im infarzierten Striatum sind nach 3 h Reperfusion erkennbar.

Übersichtsdarstellung von Kryoschnitten MCAO-operierter WT- und Cldn3-KO Mäuse mittels einer Hämatoxylin- sowie einer immunhistochemischen Färbung. (A) zeigt die striatalen Areale (rote Pfeile) einer Hämatoxylinfärbung, welche zur immunhistochemischen Analyse eines benachbarten Gewebeschnitts derselben Maus herangezogen wurden. (B) Das infarzierte Striatum fiel in beiden Genotypen durch weniger Zellkerne (DAPI, blau) auf. Cldn5-Fluoreszenz-positive TJs (grün), überlagert mit ZO-1 (rot), erschienen verkürzt (Pfeile) im Vergleich zum eigenen contralateralen Striatum.

Im Folgenden wurden einzelne TJs mittels Immunfluoreszenz detaillierter hinsichtlich ihrer Länge und der Cldn5- bzw. ZO-1-Fluoreszenz betrachtet. Im contralateralen Striatum wurden keine Unterschiede zwischen WT und Cldn3-KO festgestellt. Die gemittelte Cldn5-Fluoreszenz-positive TJ-Länge innerhalb einer Fokusebene betrug beim WT $68,7 \pm 4,7 \mu\text{m}$ und im Cldn3-KO $61,7 \pm 3,6 \mu\text{m}$. Im Infarktbereich waren die TJ-Stränge beider Genotypen im Vergleich zur contralateralen Seite stärker fragmentiert, was in einer signifikant reduzierten Cldn5-Fluoreszenz-positiven TJ-Länge resultierte (WT $53,9 \pm 3,8 \mu\text{m}$; Cldn3-KO $45,4 \pm 2,5 \mu\text{m}$). Die Cldn5-Fluoreszenzintensität im Signal-positiven Bereich blieb im Infarktbereich gegenüber der contralateralen Hemisphäre unverändert. Jedoch war die ZO-1-Fluoreszenzintensität zwischen WT und Cldn3-KO verschieden. Im WT-Infarktareal wurde eine signifikante Verringerung gegenüber der contralateralen Seite gemessen ($88,4 \pm 3,7 \%$), während im Cldn3 KO keine wesentliche Änderung eintrat ($94,6 \pm 4,0 \%$), gezeigt in Abb. 3.13.

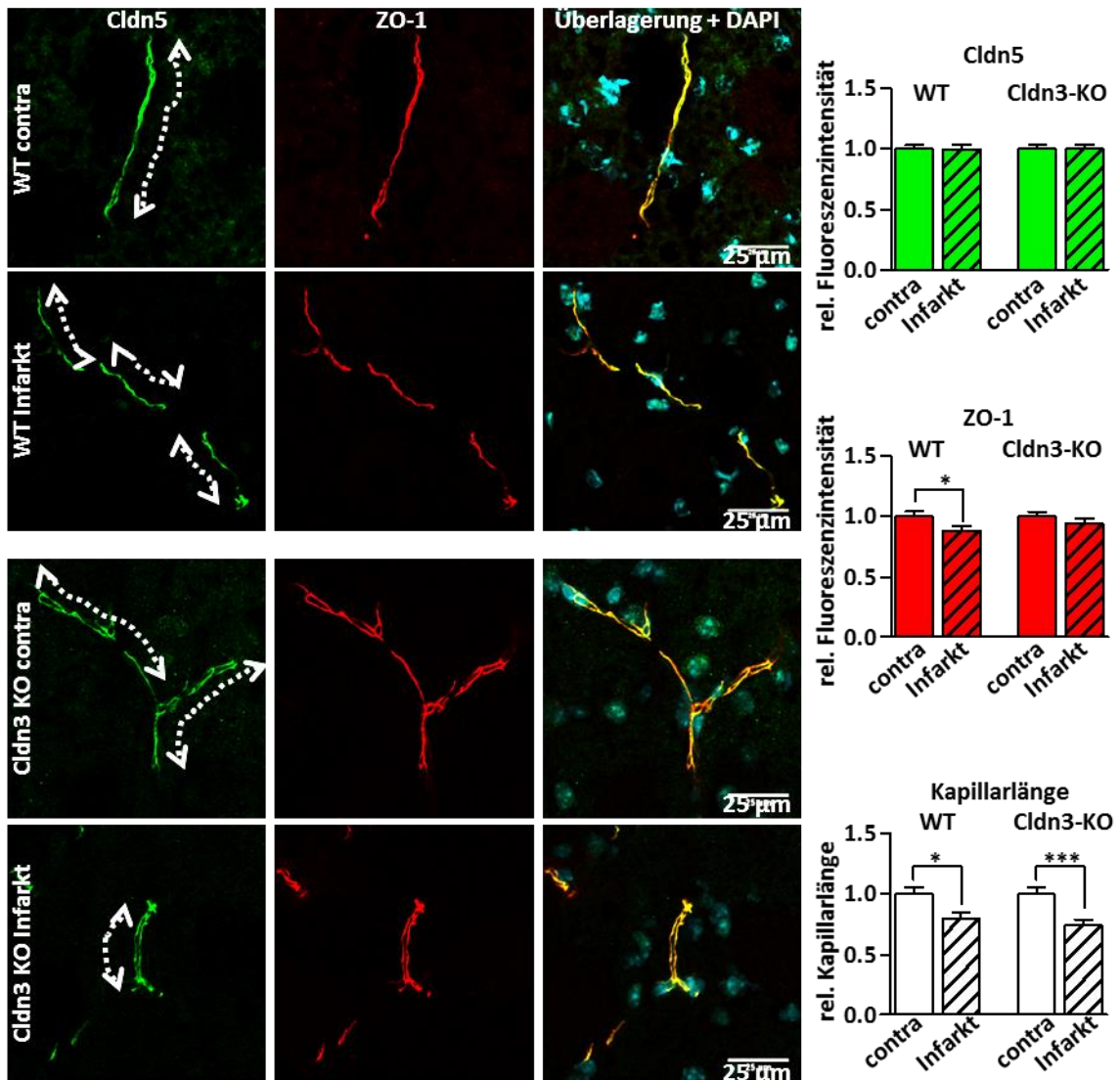


Abb. 3.13: ZO-1 ist in TJs der Gehirnkapillaren nach 3 h Reperfusion in WT-Mäusen im Gegensatz zum Cldn3-KO verringert.

Analyse immunohistochemischer Färbungen einzelner Cldn3-KO- sowie WT-TJs in Kapillaren des Infarktareals (Infarkt), bezogen auf das contralaterale Areal (contra) nach 60 min MCAO und 3 h Reperfusion hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten von Cldn5 (grün) und ZO-1 (rot) sowie die relative Länge der Cldn5-Fluoreszenz-positiven TJs. Die Cldn5-Fluoreszenzintensität im Infarktareal blieb in beiden Genotypen unverändert, die ZO-1-Fluoreszenzintensität war nur im WT-Infarktbereich verringert. Die Cldn5-Fluoreszenz-positive Länge der TJs war in beiden Genotypen gleichermaßen verringert (gestrichelte Pfeile; $79,9 \pm 4,8\%$ im WT; $74,5 \pm 4,8\%$ im Cldn3-KO); Mittelwerte \pm SEM; $n = 49-61$ aus je 4-6 Mäusen, Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplem Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$ und ***, $p \leq 0,001$.

Nach 48 h Reperfusion wurde die Verkürzung der Cldn5-Fluoreszenz-positiven TJs im Infarktbereich beider Genotypen stärker deutlich. Im WT nahm die durchschnittlich verfolgbare Cldn5-Fluoreszenz-positive Länge von $61,3 \pm 3,0 \mu\text{m}$ im contralateralen Areal auf $39,9 \pm 2,4 \mu\text{m}$ im Infarktareal ab, im Cldn3-KO wurde eine Reduktion von $59,9 \pm 3,3 \mu\text{m}$ auf $39,7 \pm 2,3 \mu\text{m}$ festgestellt. Gleichzeitig stieg die relative Cldn5-Fluoreszenzintensität im Infarktareal von WT-Mäusen signifikant an ($31,8 \pm 8,0\%$). In Cldn3-defizienten Mäusen war

deren Erhöhung um $20,8 \pm 8,0$ % nur als starke Tendenz erkennbar. Die Fluoreszenzintensität von ZO-1 normalisierte sich im WT-Infarktareal ($93,4 \pm 4,9$ %), während im Cldn3-KO eine signifikante Reduktion auf $76,4 \pm 3,0$ % gegenüber der contralateralen Seite zu verzeichnen war (Abb. 3.14).

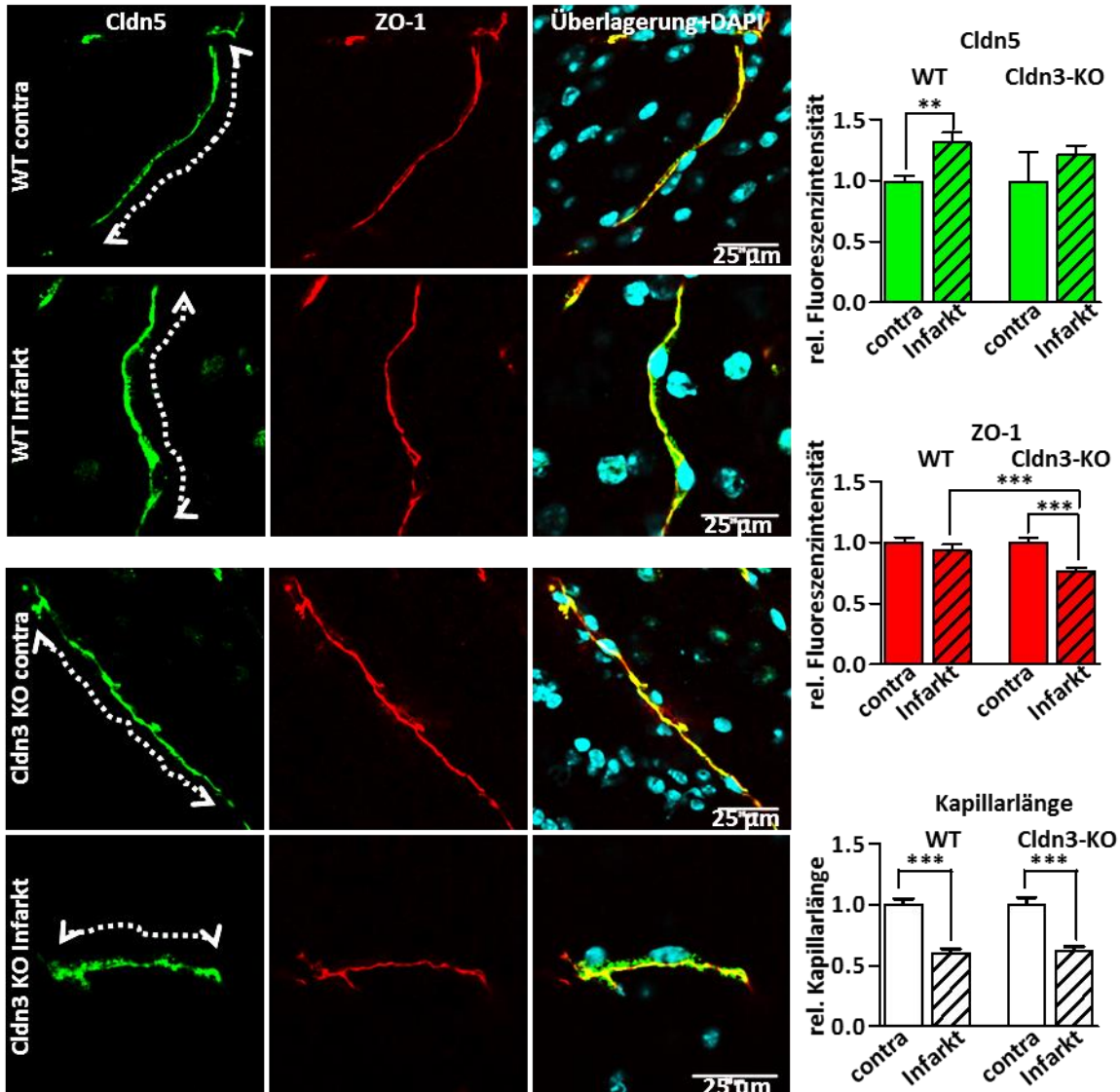


Abb. 3.14: Cldn5 und ZO-1 in zerebralen TJs von WT-Mäusen nach 48 h Reperfusion werden im Vergleich zum Cldn3-KO unterschiedlich reguliert.

Immunohistochemische Färbung von Gehirn-Kryoschnitten von WT- und Cldn3-KO Mäusen nach 30 min MCAO und 48 h Reperfusion. Im Infarktbereich wiesen WT-TJs eine signifikant erhöhte Cldn5-Fluoreszenzintensität (grün) gegenüber der contralateralen Seite auf. Im Cldn3-KO war der Effekt als starke Tendenz erkennbar. Die relative ZO-1-Fluoreszenzintensität (rot) blieb im WT-Infarktareal unverändert, im Cldn3-KO verringerte diese sich signifikant. Die relative Verkürzung der Cldn5-Fluoreszenz-positiven TJ-Länge im Infarktareal war bei beiden Genotypen vergleichbar stark (WT $60,2 \pm 3,4$ %; Cldn3-KO $61,9 \pm 3,6$ %); Mittelwerte \pm SEM; n= 51-77 aus je 4 bis 6 Mäusen, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ und ***, $p \leq 0,001$.

Auch Occl wurde im Cldn3-KO im Vergleich zum WT unterschiedlich reguliert. Nach 3 h Reperfusion verringerte sich im WT-Infarktarea seine Fluoreszenzintensität auf $84,6 \pm 3,1 \%$ des entsprechenden contralateralen Areals, während im Cldn3-KO zu diesem Zeitpunkt keine Änderung eintrat. Vergleichbar zu Cldn5 wurde ebenfalls eine Verkürzung Occl-Fluoreszenz-positiver TJs in beiden Genotypen beobachtet. Für diese Analyse wurde ein anderer ZO-1-Primärantikörper als Gegenfärbung verwendet. Dieser zeigte dieselbe Tendenz wie in der für die Auswertung der Gegenfärbung zu Cldn5 verwendete Antikörper (Abb. 3.15).

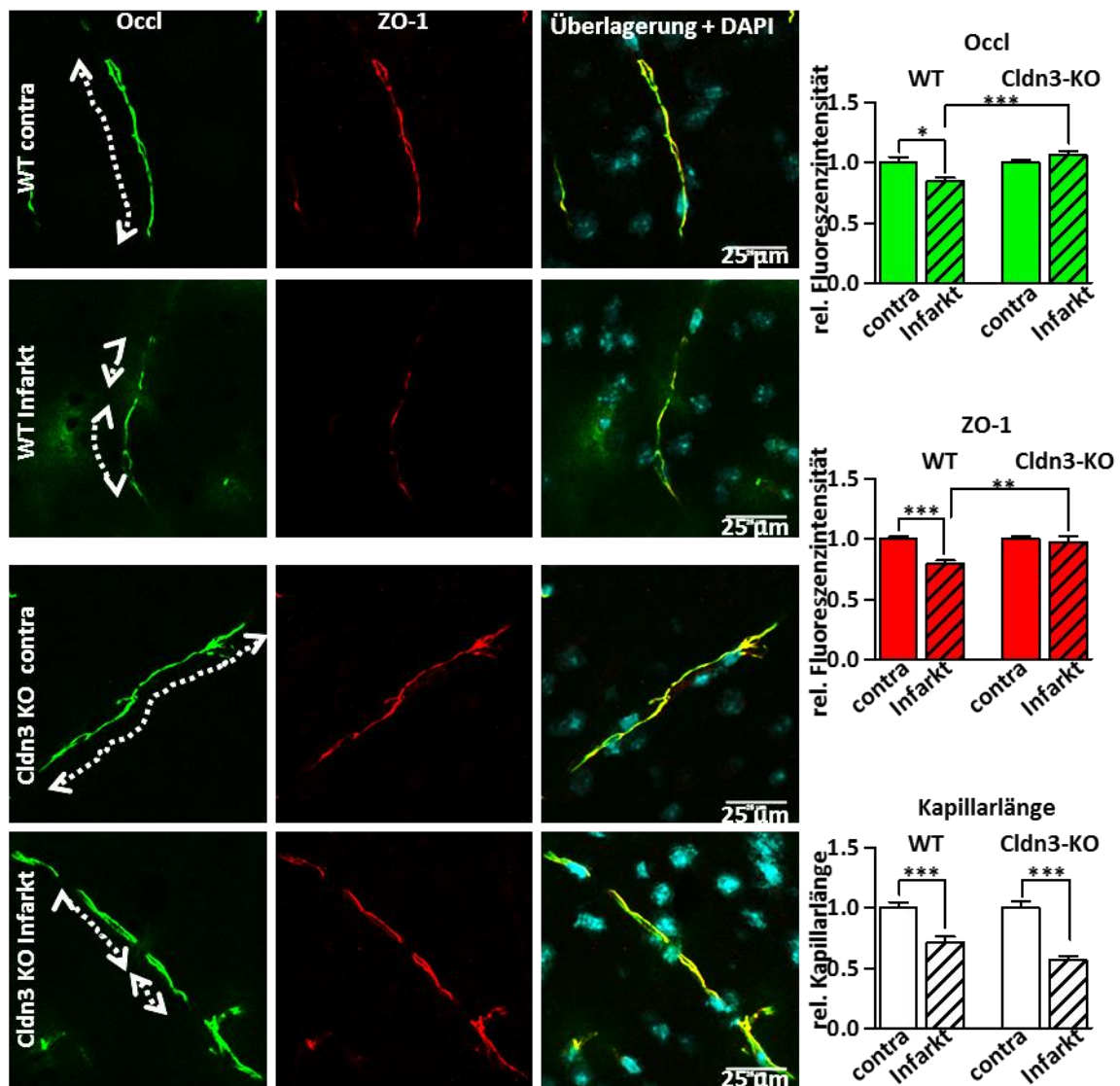


Abb. 3.15: Occl und ZO-1 in TJs der WT-Gehirnkapillaren sind 3 h nach MCAO verringert, im Cldn3-KO hingegen unverändert.

Immunhistochemisch gegen Occl (grün), ZO-1 (rot) und Zellkerne (DAPI, blau) gefärbte TJs im Infarktbereich sowie im contralateralen Areal nach 3 h Reperfusion sowie die Quantifikation der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenz-positiven TJ-Länge, bezogen auf die contralaterale Hemisphäre. Im WT war die relative Fluoreszenzintensität von Occl und ZO-1 verringert, im Cldn3-KO-Infarktarea nicht wesentlich verändert. Die Occl-Fluoreszenz-positiven Kapillarlänge reduzierte sich in beiden Genotypen im Infarktbereich gleichermaßen; Mittelwerte \pm SEM; n = 41-61 aus 4-6 Mäusen, Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ und ***, $p \leq 0,001$.

Nach 48 h Reperfusion nahm die Occl-Fluoreszenzintensität im signalpositiven Bereich beim Wildtyp und Cldn3-KO gleichermaßen ab (WT auf $60,7 \pm 3,9$ %; Cldn3-KO auf $68,5 \pm 4,4$ %). Die Occl-Fluoreszenz-positive TJ-Länge war jedoch zwischen WT und Cldn3-KO signifikant verschieden. Im WT reduzierte sich diese im Infarktbereich auf $54,4 \pm 3,9$ % bezogen auf die contralaterale Seite, im Cldn3 KO dagegen auf $37,4 \pm 1,9$ %. Auch zu diesem Zeitpunkt zeigte der hier verwendete ZO-1-Antikörper dieselbe Tendenz wie in der für die Auswertung der Gegenfärbung zu Cldn5 verwendete (Abb. 3.16).

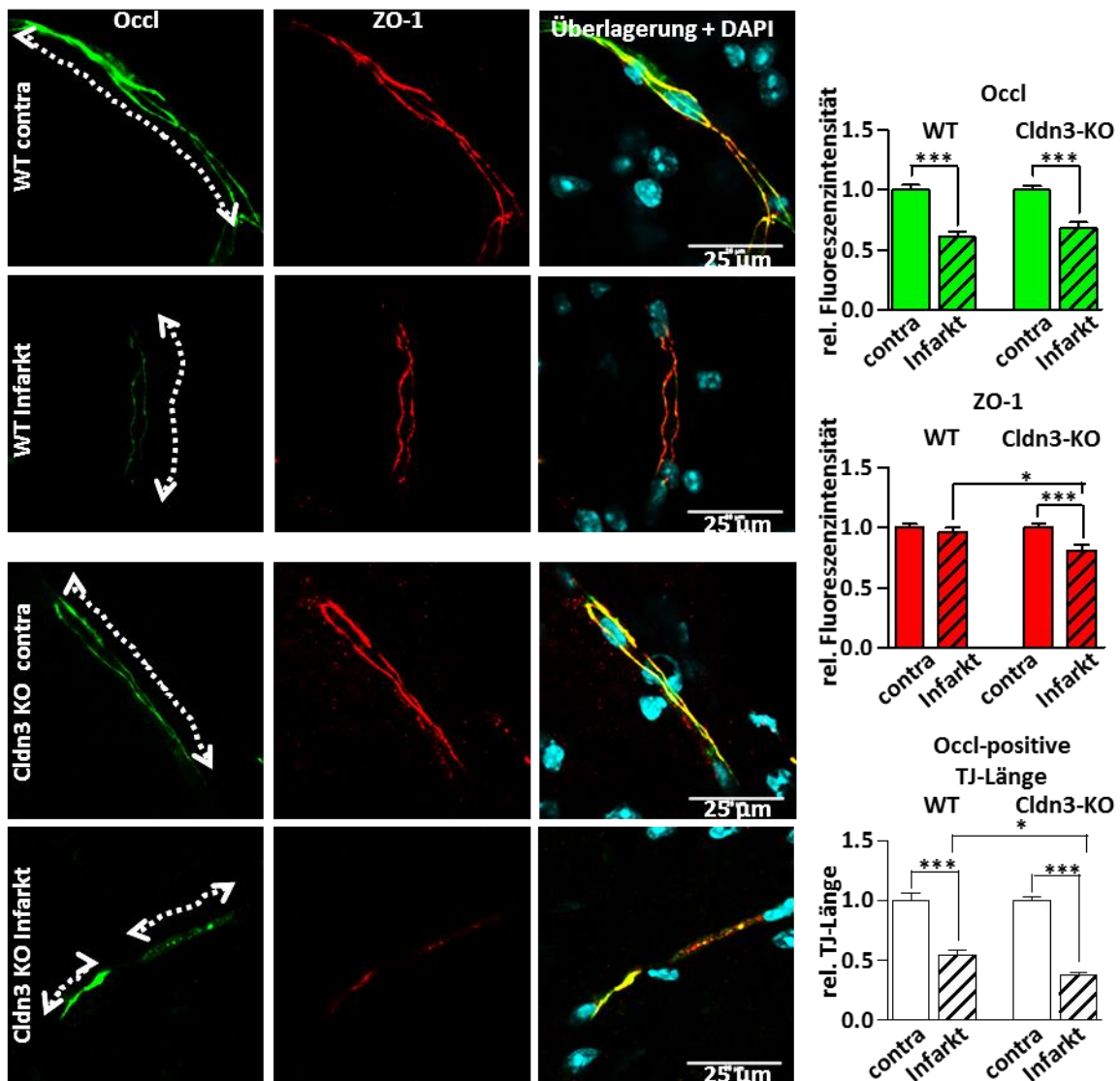


Abb. 3.16 Occl ist in zerebralen TJs von WT- und Cldn3-KO Mäusen nach 48 h Reperfusion verringert.

Exemplarische immunhistochemische Färbungen von Kryoschnitten nach 30 min MCAO und 48 h Reperfusion mit einer Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Occl (grün) und ZO-1 (rot) sowie die gemessene Occl-Fluoreszenz-positive TJ-Länge, bezogen auf die contralaterale Seite. Occl wies eine deutlich schwächere Fluoreszenzintensität im Infarktbereich beider Genotypen auf. Die ZO-1-Fluoreszenzintensität im Infarktbereich war nur im Cldn3-KO signifikant verringert. Die Occl-Fluoreszenz-positive Kapillarlänge verringerte sich im Infarktbereich des Cldn3-KO signifikant stärker als im WT; Mittelwerte \pm SEM; n= 47-60 aus 4-6 Mäusen; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ und ***, $p \leq 0,001$.

Abschließend wurde untersucht, ob die unterschiedlich starke Ödembildung zwischen WT und Cldn3-KO in Zusammenhang mit Wasserkanal-bildenden Aquaporinen (AQP) steht. Dazu wurden AQP-1 und -4 nach 3 h Reperfusion in WT- sowie Cldn3-KO Mäusen analysiert. Übereinstimmend mit Stokum et al., 2015 wurde nach 30 min Reperfusion im ischämischen Striatum eine erhöhte AQP-4 Expression beobachtet. Diese war jedoch nicht assoziiert mit TJs der BHS, mittels ZO-1 als Junction-Marker gefärbt, sondern war perivaskulär lokalisiert und im Cldn3-KO vom WT nicht verschieden (Abb. 3.17). AQP-1 hingegen konnte weder unter Normalbedingungen noch nach Ischämie Endothel-assoziiert immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 7.2).

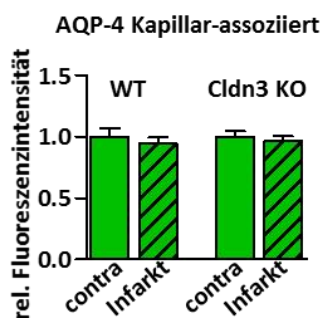
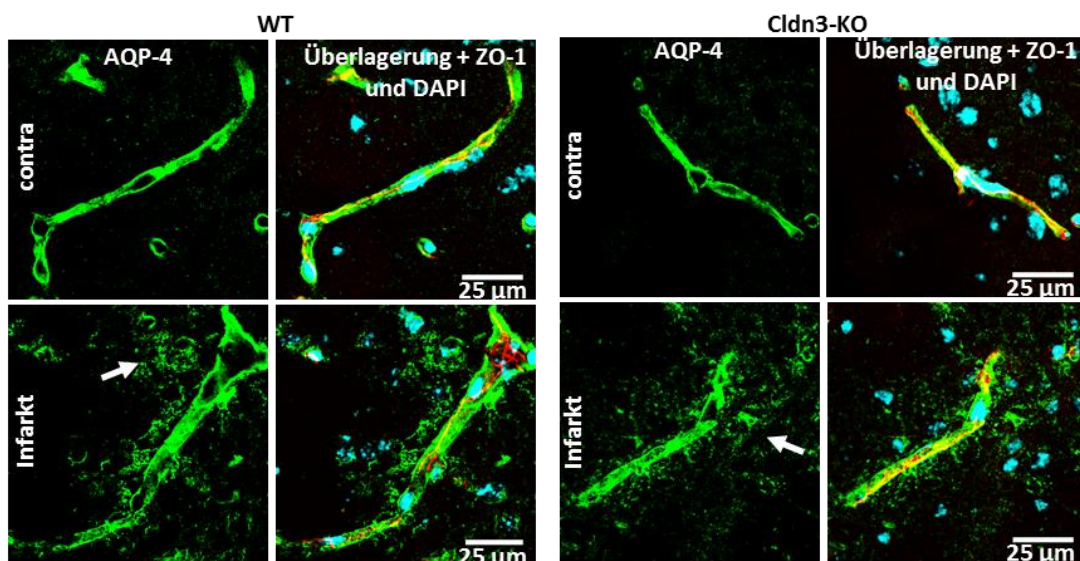


Abb. 3.17: Die Expression von Aquaporin-4 nach Ischämie ist im WT und Cldn3-KO nicht verschieden.

Immunhistochemische Färbung von AQP-4 und ZO-1 nach 1 h MCAO und 3 h Reperfusion. Im contralateralen Areal war AQP-4 (grün) hauptsächlich um das Kapillarendothel, welches durch seine Junctions (ZO-1, rot) markiert wurde, lokalisiert. Im Infarktbereich war die Fluoreszenzintensität von AQP-4 an den Kapillaren sowohl im WT als auch im Cldn3-KO, bezogen auf den contralateralen Bereich, unverändert (WT $94,5 \pm 5,0\%$; Cldn3-KO $96,1 \pm 4,1\%$). Es wurde weiterhin stark im perivaskulären Bereich exprimiert (Pfeile); Mittelwert \pm SEM, $n=24-34$ aus jeweils 3 Mäusen.

3.2.4.2 Unter hypoxischen Bedingungen ist die Claudin-1-Transkription verringert

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analysen am MCAO-Modell zu stützen, sollten Untersuchungen kortikaler Gehirnkapillaren unter hypoxischen Bedingungen Aufschluss über die Regulation der TJ-Komponenten liefern. Hierzu wurden isolierte Gehirnkapillaren in Glucose-haltigem Kulturmedium vierstündiger Hypoxie ausgesetzt und die relative mRNA-Transkription verschiedener TJ-Komponenten gemessen. Die Transkription von GLUT-1,

einem Marker für Hypoxie, wurde in beiden Genotypen gleichermaßen stark hochreguliert. Von den untersuchten TJ-Komponenten war einzig die Cldn1-Transkription im WT unter Hypoxie statistisch signifikant herunterreguliert. Der Cldn3-KO zeigte ebenfalls eine Cldn1-Herunterregulation, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Das Expressionsniveau von ZO-1 blieb unverändert. Occl, Cldn3, -5 und -12 zeigten leichte, tendenzielle Verminderungen. (Abb. 3.18). Die Ergebnisse dieses *ex vivo* Modells stützten die MCAO-Ergebnisse auf Proteinebene nicht, sodass Hypoxie allein nicht der regulierende Faktor zu sein scheint.

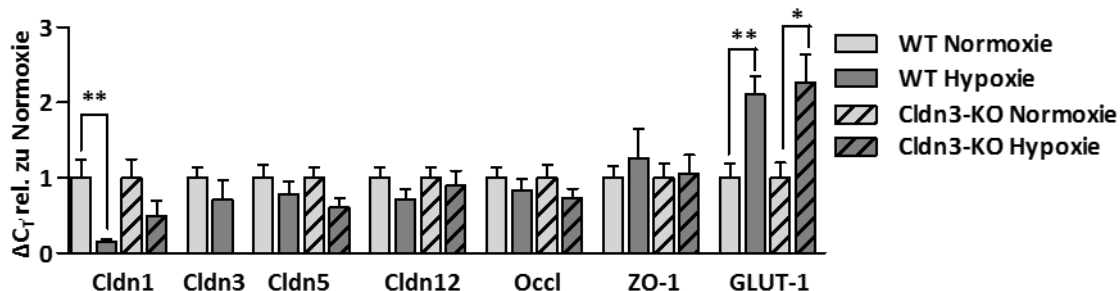


Abb. 3.18: Die Cldn1-mRNA-Transkription ist unter hypoxischen Bedingungen reduziert.

Mittlere, relative mRNA-Transkription \pm SEM verschiedener Claudine sowie Occl, ZO-1 und des Hypoxiemarkers GLUT-1 in isolierten Gehirnkapillaren adulter Mäuse nach 4 h Hypoxie. Die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR, einer internen Normierung auf endogenes β -Aktin (ΔC_T) und im Weiteren auf die Expression unter physiologischen Bedingungen. Der Hypoxiemarker GLUT-1 war in beiden Genotypen signifikant hochreguliert, die Cldn1-Transkription im WT hingegen verringert; n= 6-9; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$ und **, $p \leq 0,01$.

3.3 Die niedermolekulare Substanz BO1 zur Modulation von Claudin-5

Wegen der gröÙenselektiven Abdichtung der BHS durch Cldn5 und seiner vergleichsweise hohen Expression eignet es sich besonders als Target zur Modulation der BHS-Permeabilität (Nitta et al., 2003). Daher wurde im Folgenden der Fokus auf die Wirkung des Cldn5-Modulators BO1 zur Cldn5-basierten Modulation der BHS gelegt. BO1 bestehend aus einem mit einem Phenyl- sowie Anisylrest substituierten Pyrazolidin-Ring und Nalidixinsäure, welche über eine Carbonsäure-Estergruppe verbrückt sind, wurde in Epithelzellkulturen von Tscheik (2014) erstmals als Barriere-Öffner beschrieben. Zur Wirksamkeit am Endothel sowie unter *in vivo* Bedingungen war bislang nichts bekannt.

3.3.1 Löslichkeit und Toxizität des BO1 sowie seiner Derivate

Zunächst wurden Untersuchungen zur Löslichkeit, Toxizität und Eingrenzung der Wirkregion der niedermolekularen Substanz BO1 durchgeführt. Die Substanz war in reinem DMSO bis zu einer Konzentration von etwa 500 mM löslich. Bei der Verdünnung in Phosphatpuffer wurde

eine maximale Löslichkeit von 30 μM unter Verwendung von 0,5 % DMSO als Co-Solvent erreicht. Um die Wirkregion von BO1 einzugrenzen, wurden zwei BO1-Derivate verwendet (Abb. 3.19). BO1-C (Nalidixinsäure) und BO1-D (aromatisches Pyrazolidin-Ring-System), abgeleitet von den möglichen Produkten der Esterhydrolyse, hatten ein zu BO1 vergleichbares Löslichkeitsverhalten (500 mM in DMSO). BO1-N sollte aufgrund seiner Amidgruppe *in vivo* eine höhere Stabilität als BO1 gegenüber Esterasen aufweisen. Das Derivat hatte jedoch eine drastisch schlechtere Löslichkeit als BO1: In reinem DMSO konnten nur 20 mM gelöst werden. Auch andere aprotisch polare Lösungsmittel wie Aceton und Acetonitril verbesserten die Löslichkeit nicht. Seine maximale Löslichkeit in Phosphatpuffer betrug lediglich 7,5 μM . In Zellkulturmedium konnten alle Substanzen unter Zusatz von 0,5 % DMSO bis zu einer Konzentration von 50 μM gelöst werden.

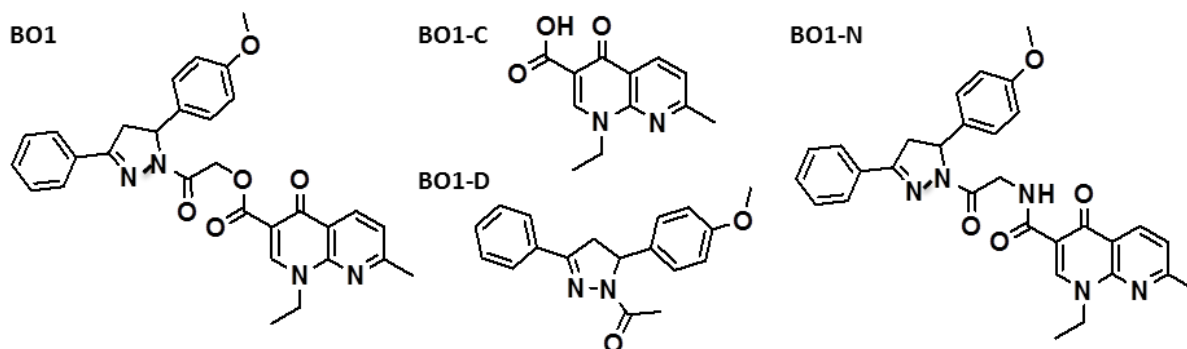


Abb. 3.19: Strukturformeln von BO1 und seinen Derivaten

Die Ausgangssubstanz BO1 ($M_w=525$ g/mol) ist kaum wasserlöslich, jedoch gut löslich in DMSO. Ähnliches gilt für die Derivate BO1-C ($M_w=232$ g/mol) und BO1-D ($M_w=294$ g/mol). Beim Derivat BO1-N wurde die Estergruppe durch eine Amidgruppe ausgetauscht. Dies resultierte in einer schlechteren Löslichkeit in DMSO.

Mittels eines auf der metabolischen Aktivität von Zellen basierenden Vitalitätstests wurde überprüft, inwiefern BO1 oder seine Derivate in den verwendeten Konzentrationen zytotoxisch auf das *in vitro* BHS-Modell wirkten. Hierzu wurden bEnd.3 Zellen unter Normalbedingungen bzw. mit den verschiedenen Substanzen inkubiert und die Reduktion des Farbstoffs MTT, ein Tetrazoliumsalz, zu Formazan als Maß für metabolische Aktivität und somit Vitalität gemessen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen beeinträchtigten weder 0,5 % DMSO noch BO1, BO1-C oder BO1-D bis zu einer Konzentration von 50 μM die Zellvitalität. Die Inkubation mit BO1-N hingegen führte konzentrationsabhängig zur abnehmenden Mitochondrienaktivität und damit verringerten Zellvitalität (Abb. 3.20).

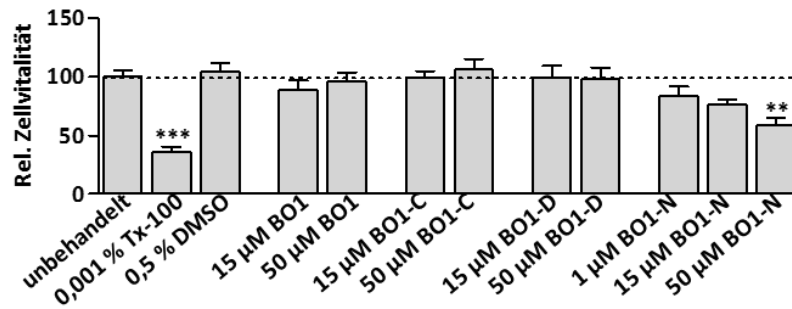


Abb. 3.20: Das Derivat BO1-N wirkt auf bEnd.3 Zellen zytotoxisch.

Photometrische Bestimmung der MTT-Reduktion zu Formazan als Maß für die Zellvitalität in bEnd.3 Zellen. Ein Zellrasen wurde für 16 h mit 0,5 % DMSO oder in 0,5 % DMSO haltigem 15 µM bzw. 50 µM BO1 oder BO1-C, -D bzw. -N inkubiert und die mittlere relative Zellvitalität \pm SEM bestimmt. Als zytotoxisch wirkende Kontrolle wurde 0,001 % Tx-100 verwendet. Von den getesteten Substanzen zeigte nur BO1-N konzentrationsabhängig eine toxische Wirkung; $n_{\text{unbehandelt, Tx-100 und DMSO}}=13$, $n_{\text{BO1, BO1-C und BO1-D}}=5$, $n_{\text{BO1-N}}=8$; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest zur unbehandelten Kontrolle mit **, $p \leq 0,01$.

3.3.2 BO1 reduziert die Cldn5-Proteinmenge stärker als seine Derivate

Die Wirkung von BO1 und seiner Derivate auf Cldn5 wurde mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Nach Inkubation von bEnd.3 Zellen mit BO1 bzw. der Derivate BO1-C oder -D für 16 h wurde die Cldn5-Menge quantifiziert. Unter Kontrollbedingungen (0,5 % DMSO) wurde im Zelllysate Cldn5 als spezifische Bande der Größe von ca. 23 kDa identifiziert. Die Bandenintensität, bezogen auf endogenes GAPDH (36 kDa), war in Abhängigkeit von der BO1-Konzentration stark reduziert. Die Pyrazolidinkomponente (BO1-D) trug stärker zur Wirkung bei als Nalidixinsäure (BO1-C), jedoch waren beide Teile nötig für den maximalen Effekt (Abb. 3.21).

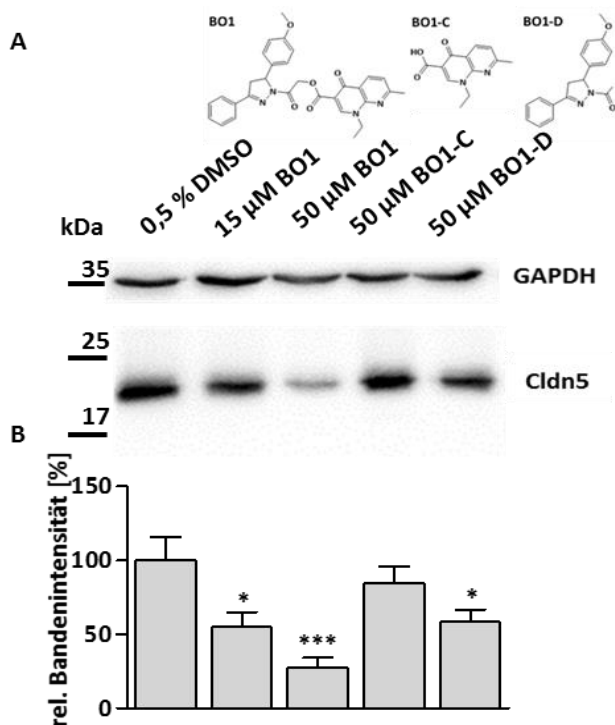


Abb. 3.21: BO1 führt in bEnd.3 Zellen zur stärkeren Cldn5-Verminderung als seine Derivate.

Western Blot Analyse von bEnd.3 Zellen nach Inkubation mit 0,5% DMSO in Kulturmedium bzw. mit 15 µM BO1, 50 µM BO1 oder 50 µM BO1-C oder -D jeweils in 0,5 % DMSO für 16 h. Gezeigt sind in (A) ein exemplarischer Western Blot von Cldn5 (ca. 23 kDa) und GAPDH (36 kDa) als Ladekontrolle und (B) die densitometrische Auswertung der auf GAPDH bezogenen mittleren Cldn5-Bandenintensität \pm SEM; $n=7$, one-way-ANOVA und Dunnetts multipler Vergleichstest im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit *, $p \leq 0,05$ und ***, $p \leq 0,001$.

Immunfluoreszenzstudien bestätigten die unterschiedliche Wirkung von BO1 und seiner Derivate. Hierzu wurden mit BO1 bzw. den Derivaten inkubierte bEnd.3 Zellen gegen Cldn5 und ZO-1 gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Zunächst fiel die stärkere intrazelluläre Cldn5-Lokalisation in der DMSO-Kontrolle im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf (Abb. 7.3). Somit hatten bereits 0,5 % DMSO einen Einfluss auf Cldn5 in Endothelzellen, jedoch ohne die Zellvitalität (Abb. 3.20) einzuschränken. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Tscheik (2014) an epithelialen Zelllinien kam es in den Endothelzellen nach Inkubation mit BO1 nicht zur Cldn5-Umverteilung von der Plasmamembran ins Zytosol, sondern zur gleichmäßigen Cldn5-Reduktion sowohl in den Zellkontakten als auch intrazellulär. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle verringerte 15 μ M BO1 die Cldn5-Fluoreszenz auf $79,0 \pm 1,6$ % in den Zellkontakten und auf $71,0 \pm 1,9$ % intrazellulär. 50 μ M BO1 wirkten stärker ($49,5 \pm 1,8$ % in der Membran; $56,0 \pm 1,8$ % intrazellulär). Übereinstimmend mit den Western Blot Analysen beeinflusste 50 μ M BO1-D im Vergleich zu BO1 Cldn5 schwächer. In Zellkontakten wurde eine Verringerung auf $86,0 \pm 1,9$ % der DMSO-Kontrolle und intrazellulär auf $67,2 \pm 2,0$ % gemessen. BO1-C hatte den schwächsten Cldn5-reduzierenden Effekt (Verringerung in Zellkontakten auf $91,8 \pm 1,7$ % und auf $88,6 \pm 2,8$ % intrazellulär gegenüber der Kontrollgruppe). Die Inkubation mit 50 μ M BO1 führte weiterhin zur erhöhten relativen ZO-1-Fluoreszenzintensität in den Zellkontakten auf $111,1 \pm 2,1$ % verglichen mit der DMSO-Kontrolle. 50 μ M BO1-D reduzierte hingegen die ZO-1-Fluoreszenz intrazellulär auf $93,2 \pm 2,4$ % der DMSO-Kontrolle (Abb. 3.22).

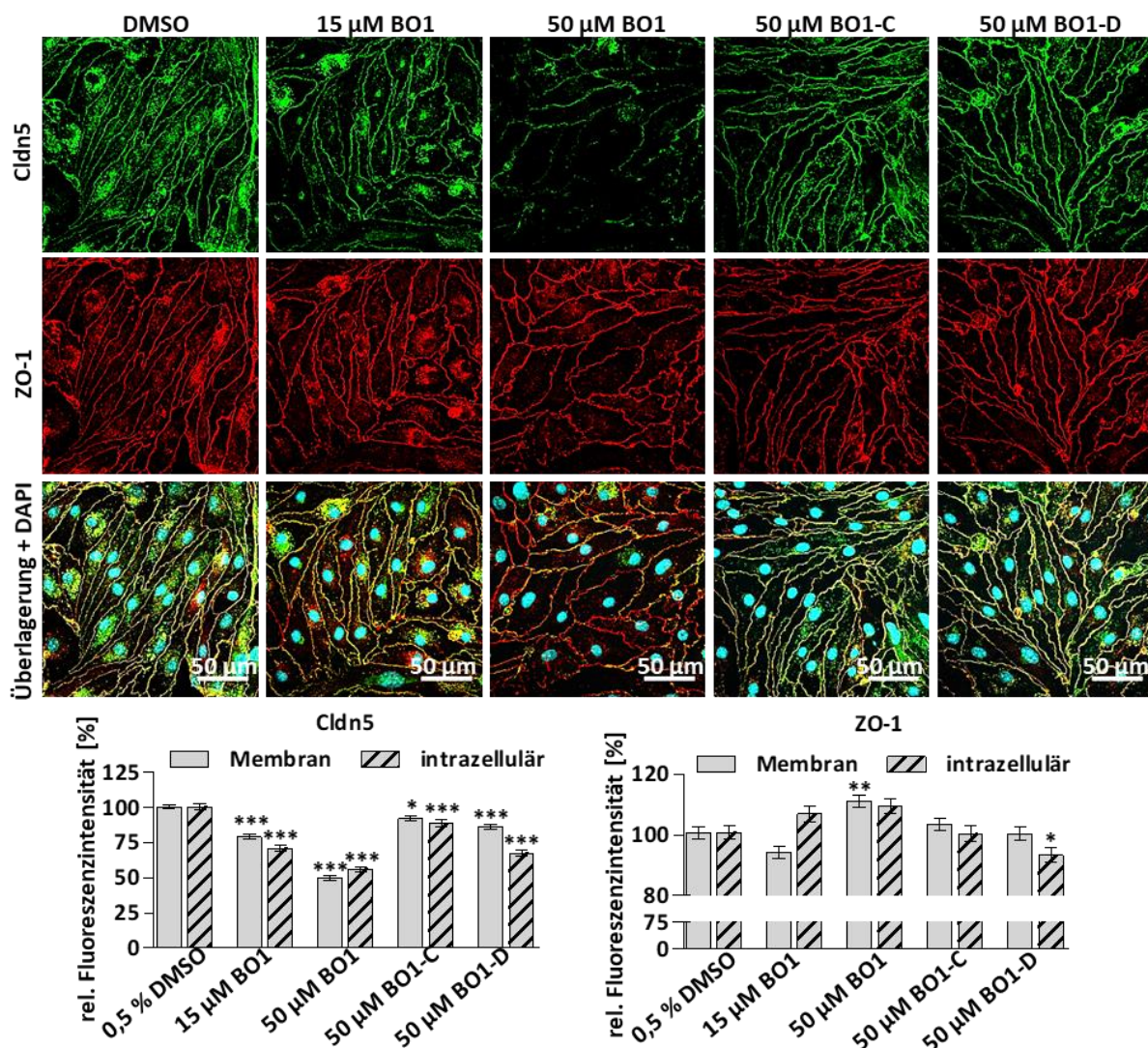


Abb. 3.22: BO1-C und -D vermindern die Cldn5-Proteinmenge in Zellkontakten in geringerem Maße als BO1. (A) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen konfluenter bEnd.3-Zellen nach 16 h Inkubation unter Kontrollbedingungen (0,5 % DMSO in Kulturmedium) bzw. mit 15 μ M bzw. 50 μ M BO1, 50 μ M BO1-C oder -D in 0,5 % DMSO. Cldn5 (grün), ZO-1 (rot) und Zellkerne (DAPI, blau) wurden sichtbar gemacht. (B) Quantifizierungen der mittleren Cldn5- bzw. ZO-1-Fluoreszenzintensitäten \pm SEM in Zellkontakten sowie intrazellulär, relativ zur DMSO-Kontrolle; $n > 200$ in vier unabhängigen Experimenten, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$ und ***, $p \leq 0,001$ verglichen mit 0,5% DMSO.

3.3.3 BO1 reduziert die Dichtigkeit endothelialer Zellbarrieren

Um zu überprüfen, ob BO1 und seine Derivate einen Barriere-modulierenden Charakter gegenüber Ladungsträgern in bEnd.3 Zellen haben, wurde mittels ECIS der TER bestimmt. Abb. 3.23 zeigt den zeitlichen Verlauf über 48 h, bezogen auf die Kontrollbedingungen (0,5 % DMSO in Kulturmedium). Innerhalb von 5 h nach Beginn der BO1-Inkubation kam es zur konzentrations- und zeitabhängigen TER-Verringerung. Niedrige BO1-Konzentrationen (7,5 μ M und 15 μ M) bewirkten den maximalen Effekt nach ca. 10 h ($81,9 \pm 1,0$ % bzw.

70,0 ± 3,8 % der DMSO-Kontrolle), welcher innerhalb von 45 h reversibel war. Bei Applikation höherer BO1-Konzentrationen (30 µM und 50 µM) wurde das TER-Minimum nach ca. 20 h erreicht (60,7 ± 4,5 % bzw. 62,7 ± 7,2 % der DMSO-Kontrolle) und war innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht reversibel. 30 µM BO1-D zeigte tendenziell einen TER-verringern den Effekt ca. 20 h nach Substanzapplikation (84,8 ± 6,2 % der DMSO-Kontrolle). BO1-C beeinflusste den TER nicht messbar.

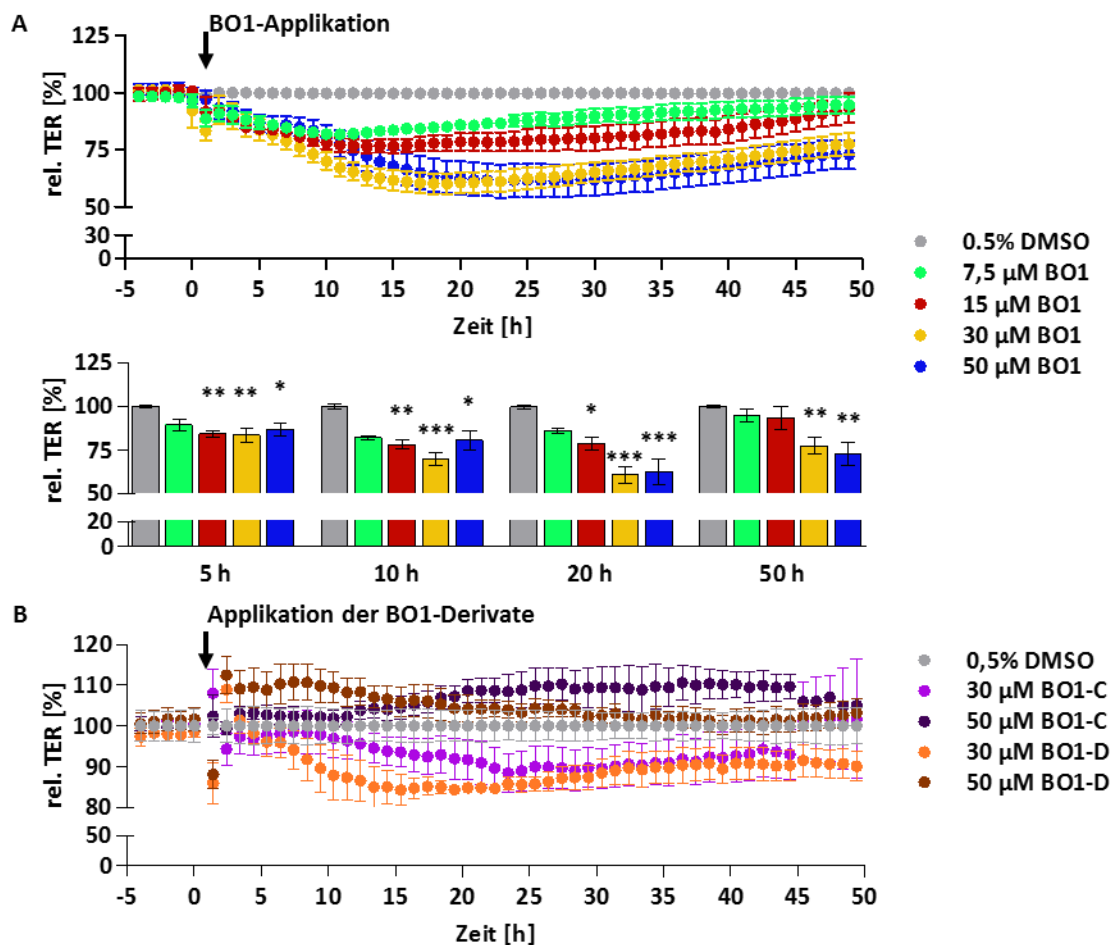


Abb. 3.23: BO1 bewirkt konzentrationsabhängig die transiente Absenkung des TER in bEnd.3 Zellen.

Impedanzmessung von b.End3 Zellen mittels ECIS bei 4000 Hz und stündliche Ermittlung des TER. Nach Erreichen eines stabilen TER wurden die Zellen für ca. 50 h unter Kontrollbedingungen kultiviert (0,5% DMSO in Kulturmedium) bzw. mit **(A)** 7,5 µM, 15 µM, 30 µM oder 50 µM BO1 in 0,5 % DMSO oder **(B)** mit 30 µM oder 50 µM BO1-C bzw. -D in 0,5 % DMSO inkubiert. Gezeigt sind mittlere TER-Werte ± SEM, bezogen auf die DMSO-Kontrolle; $n_{BO1}=6$, $n_{Derivate}=3-4$, zu den Zeitpunkten 5, 10; 20 und 50 h Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$ und ***, $p \leq 0,001$ gegen die jeweilige DMSO-Kontrolle.

3.3.3.1 BO1 beeinflusst tendenziell die *Tight Junction*-Ultrastruktur

In orientierenden Experimenten sollte geklärt werden, ob die Cldn5-Reduktion an den Zellkontakten durch BO1 zu Änderungen der TJ-Ultrastruktur führt. Hierzu wurden YFP-Cldn5 stabil transfizierte HEK-293 Zellen, ein etabliertes *in vitro* Modell zur Untersuchung der

TJ-Strangbildung durch Claudin-Interaktionen, mit 25 μM BO1 inkubiert und mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie analysiert (Abb. 3.24).

YFP-Cldn5 stabil transfizierte HEK-293 Zellen bildeten hauptsächlich *E-face*-assoziierte TJ-Stränge aus. Die TJ-Strangstruktur wurde durch BO1 nicht homogen verändert. Stellenweise erschienen die Stränge nach BO1-Inkubation weniger strukturiert: Es traten zwei bis drei dicht neben einander liegende (Abstand < 40 nm) diskontinuierliche Stränge in räumlicher Nähe zu Furchen ohne Partikel auf. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Maschen im TJ-Strangnetz hinsichtlich der Maschengröße zeigte nach der BO1-Inkubation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle tendenziell größere Maschen ($0,09 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$). Die Form der Maschen, ausgedrückt durch die Zirkularität, ein Maß für das Verhältnis des Umfangs einer Zelle zum perfekten Kreis mit gleicher Fläche, blieb hingegen unverändert.

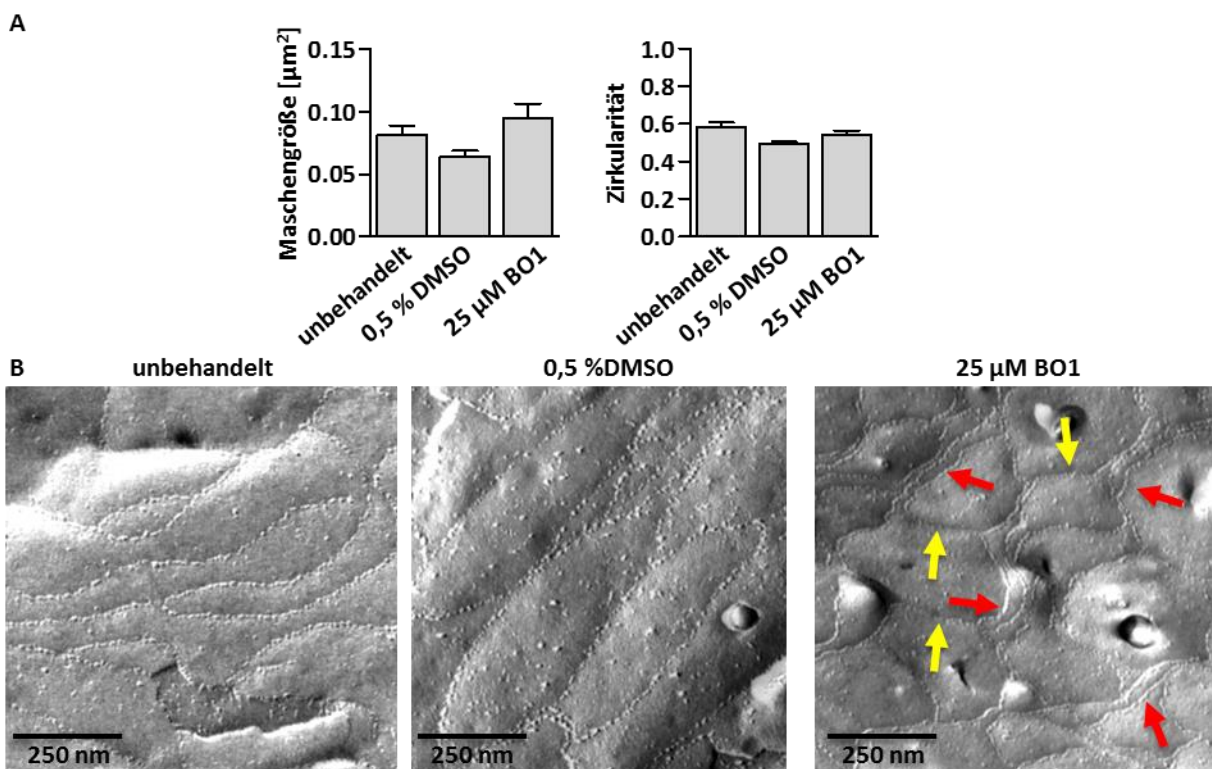


Abb. 3.24: BO1 beeinflusst tendenziell die TJ-Ultrastruktur in YFP-Cld5 transfizierten HEK-293 Zellen.

Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahmen stabil YFP-Cld5 exprimierender HEK-293 Zellen, inkubiert mit 25 μM BO1 in 0,5 % DMSO bzw. nur mit 0,5 % DMSO. **(A)** zeigt die gemessene mittlere Fläche einzelner Maschen *E-face*-assoziiierter Stränge und ihre Form, beschrieben durch die Zirkularität; Mittelwerte \pm SEM, $n_{\text{unbehandelt}}=55$, $n_{\text{DMSO}}=75$, $n_{\text{BO1}}=71$. **(B)** Repräsentative Aufnahmen der TJ-Stränge. Unbehandelte bzw. DMSO-Kontroll-behandelte TJ-Stränge bildeten gleichmäßige Maschen, nach BO1-Inkubation traten teilweise TJ-Stränge im Abstand < 40 nm (rote Pfeile) sowie Furchen ohne Stränge auf (gelbe Pfeile).

3.3.3.2 BO1 vermindert die Claudin-5-Transkription

Für das Verständnis der BHS-modulierenden Wirkung von BO1 ist nicht nur die Identifikation der beeinflussten Proteine, sondern auch der Wirkmechanismus essentiell. Es ist bekannt, dass Cldn5 u.a. durch β -Catenin und den Transkriptionsfaktor FoxO1 reguliert wird, nachdem die Zelladhäsion gestört wurde (Gavard and Gutkind, 2008; Taddei et al., 2008). Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern BO1 diesen beschriebenen Zusammenhang von *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* in bEnd.3 Zellen beeinflusst. Eine Inkubation mit 50 μ M BO1 für 16 h reduzierte die Cldn5- und ZO-1-Transkription im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant (6,5-fache Cldn5-Verringerung und 2,9-fache ZO-1-Verringerung), während die Transkription von Cldn1, -3, -12 und Occl unverändert blieb (Abb. 3.25).

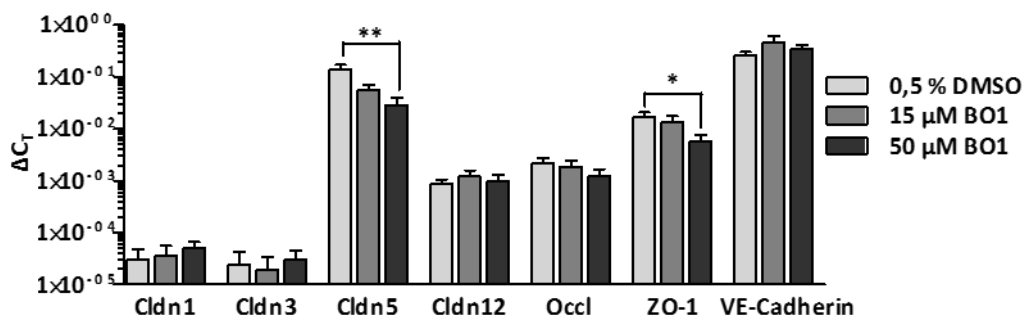


Abb. 3.25: BO1 reduziert die mRNA-Transkription von Cldn5- und ZO-1 in bEnd.3 Zellen.

Mittlere mRNA-Transkription \pm SEM von Cldn1, -3, -5, -12 Occl, ZO-1 und VE-Cadherin, bezogen auf endogenes β -Aktin (ΔC_T) in bEnd.3 Zellen nach BO1-Behandlung. Konfluente bEnd.3 Zellen wurden 16 h unter Kontrollbedingungen (0,5 % DMSO) kultiviert bzw. mit 15 μ M oder 50 μ M BO1 in 0,5 % DMSO inkubiert und mittels qRT-PCR hinsichtlich des Transkriptionsniveaus verschiedener TJ-Komponenten analysiert; n=6, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$ und **, $p \leq 0,01$ verglichen mit der DMSO-Kontrolle.

In Western Blot Analysen wurde eine Verdopplung des an S45 dephosphorylierten, und damit vor Abbau geschützten β -Catenins (Amit et al., 2002) beobachtet. Eine Immunfluoreszenzfärbung bestätigte die erhöhte Menge an S45-dephosphoryliertem β -Catenin in der Plasmamembran. Der deutliche Anstieg der β -Cateninmenge im Zytosol war jedoch nur bei der Inkubation mit 15 μ M BO1 erkennbar. Eine eindeutige Translokation in den Nucleus wurde nicht festgestellt. Gleichzeitig nahm im Western Blot die an T24 phosphorylierte, und damit inaktive Form des β -Catenin bindenden Transkriptionsfaktors FoxO1 (Essers et al., 2005) im Gesamtzelllysat ab, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Somit ist die Translokation von β -Catenin zusammen mit dem Transkriptionsfaktor FoxO1 in den Nucleus nicht ausgeschlossen, um die Cldn5-Transkription zu inhibieren, wie von Umar et al., 2007 und Taddei et al., 2008 beschrieben. Gleichzeitig blieb die Aktivität der

Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) unverändert, da der Anteil seiner S9-phosphorylierten und damit inhibierten Form, bezogen auf GAPDH, nicht gestiegen ist (Abb. 3.26).

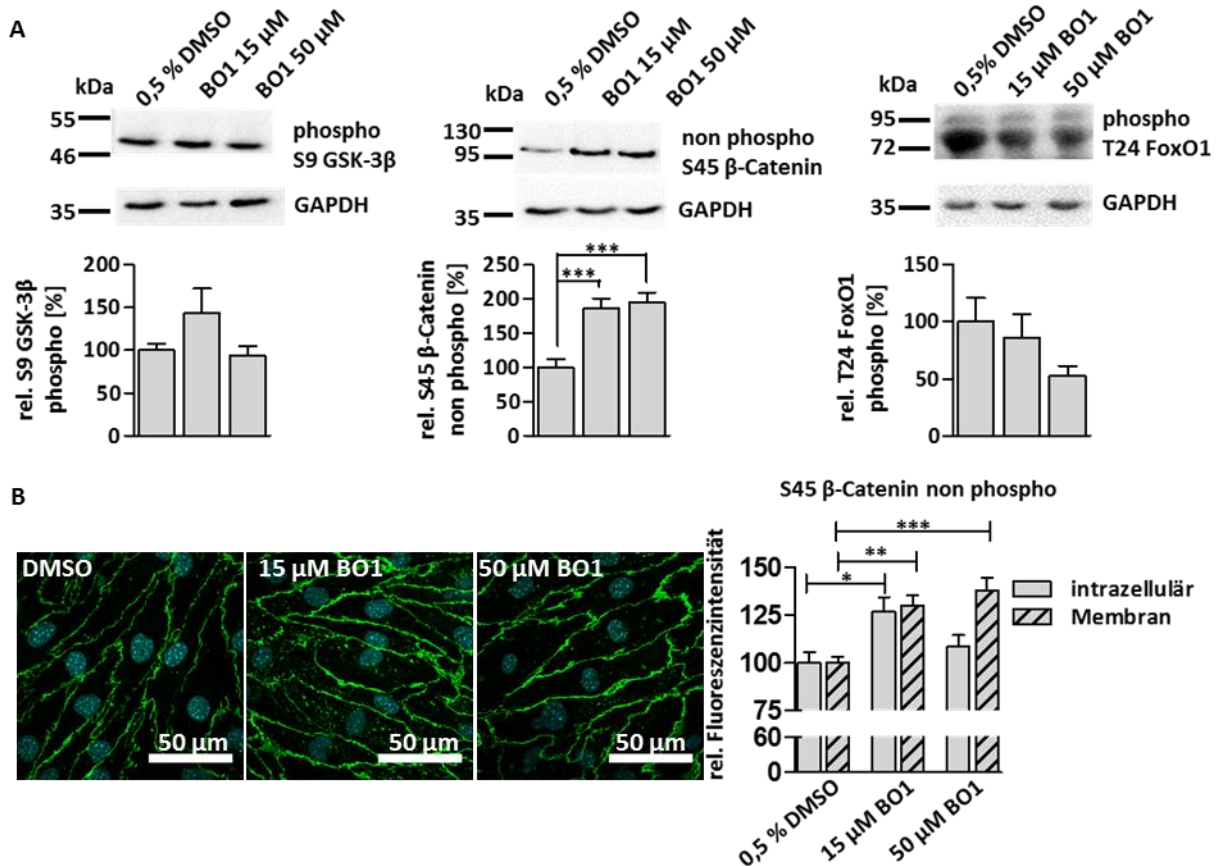


Abb. 3.26: BO1 führt zur Erhöhung der β -Catenin-Proteinmenge.

(A) Exemplarische Western Blots der S9-phosphorylierten GSK-3 β (46 kDa), des S45-dephosphorylierten β -Catenins (92 kDa) und des an T24 phosphorylierten FoxO1 (72-85 und 95 kDa) in bEnd.3 Zelllysaten nach 16 h Inkubation unter Kontrollbedingungen (0,5% DMSO) bzw. mit 15 μ M oder 50 μ M BO1 in 0,5 % DMSO und densitometrische Quantifizierung der mittleren Bandenintensitäten \pm SEM, normiert auf GAPDH und im Weiteren auf die DMSO-Kontrolle; n=7, one-way-ANOVA und Dunnett's multiplen Vergleichstest mit ***, p \leq 0,001 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. **(B)** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von bEnd.3 Zellen nach 16 h Inkubation mit 15 bzw. 50 μ M BO1 und Anfärbung von S45-dephosphoryliertem β -Catenin (grün) und Zellkernen (DAPI, blau); n=21-29 in zwei unabhängigen Experimenten, Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichstest mit *, p \leq 0,05, **, p \leq 0,01 und ***, p \leq 0,001.

3.3.4 Optimierung der Löslichkeit von BO1 mittels 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin

Da BO1 in der murinen Gehirndothel-Zelllinie bEnd.3 aktiv und nicht zytotoxisch war, sollten *in vivo* Untersuchungen erfolgen. Dazu wurden die *in vitro* wirksame BO1-Konzentration von ca. 50 μ M im Blutvolumen der Maus und eine finale DMSO-Konzentration von ca. 0,1 % angestrebt, um die BHS zu modulieren und Zytotoxizität zu vermeiden. Ausgehend von der maximal löslichen BO1-Konzentration von 30 μ M in wässrigem Milieu, ca. 1,0 ml Blutvolumen der Maus und einem Injektionsvolumen von 100 μ l hätte die BO1-Konzentration nach der

Verdünnung im Blut jedoch nur ca. 3 μM betragen. Eine Möglichkeit die BO1-Löslichkeit in der Injektionslösung auf 650 μM zu erhöhen, war die Verwendung von 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD), welches als Lösungsvermittler verschiedener Pharmaka bereits klinisch zugelassen ist. Um zu klären, inwiefern diese Substanz die BO1-Löslichkeit in wässrigem Milieu verbessert, wurde die maximale Löslichkeit mittels UV-Absorption analysiert. 30 μM BO1 mit 1 % DMSO-Zusatz in HBSS^{-/-} hatte ein schwaches, jedoch detektierbares Absorptionsmaximum bei 290 nm. 20 %ige HP β CD-Lösung absorbierte in derselben Lösungsmittelmischung nicht. Der Zusatz von 20 % HP β CD zu 30 μM BO1 führte zu dessen deutlich verbesserten Löslichkeit und damit gesteigerter Absorption (Abb. 3.27 A). Anhand einer HP β CD-Verdünnungsreihe wurde die optimale Konzentration ermittelt, um 650 μM BO1 in Lösung zu bringen. Mit steigender HP β CD-Konzentration verbesserte sich die BO1-Löslichkeit, was sich in einer erhöhten Absorption bei 290 nm niederschlug. Unter der Annahme einer sigmoidalen Sättigung ergab das *Fitting* eine Sättigung bei Verwendung von 17 % HP β CD (Abb. 3.27 B).

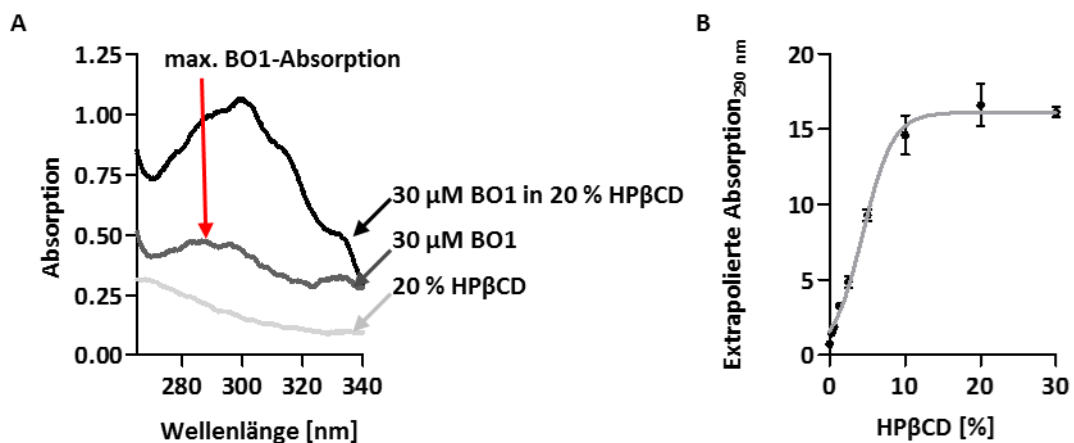


Abb. 3.27: HP β CD verbessert die BO1-Löslichkeit in wässrigem Milieu.

(A) Ausschnitt des Absorptionsspektrums von 30 μM BO1 in 1 % DMSO-haltigem HBSS^{-/-} mit und ohne Zusatz von 20 %igem HP β CD. Das Absorptionsmaximum von BO1 lag bei 290 nm. Der Zusatz von HP β CD steigerte die BO1-Absorption deutlich. **(B)** Ermittlung der optimalen HP β CD-Konzentration, um 650 μM BO1 in Lösung zu bringen. Die Absorption von 650 μM BO1-Lösungen mit 1 % DMSO und steigendem HP β CD-Anteil wurde in optimaler Verdünnung bei 290 nm spektrometrisch gemessen. Die Extrapolation ausgehend vom Verdünnungsfaktor und unter Annahme einer sigmoidalen Sättigungskurve wurde die Verwendung von 17 % igem HP β CD als Sättigungskonzentration bestimmt; n=3.

3.4 BO1 und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke

650 μ M BO1 in 1 % DMSO und 20 % HP β CD in Phosphatpuffer wurden im Folgenden als Injektionslösung *in vivo* verwendet. Ausgehend von einer 1:10 Verdünnung im Blutvolumen der Maus und bezogen auf das Körpergewicht einer Maus entsprach das einer Dosierung von 2,9 μ mol/kg BO1, 600 μ mol/kg HP β CD und 600 μ mol/kg DMSO. Zunächst wurden verschiedene Applikationsregime (Abb. 3.28) getestet, um die maximale Wirkung zu bestimmen. Weiterhin wurden die intraperitoneale (i.p.) und die intravenöse (i.v.) Injektionsart miteinander verglichen sowie der Effekt von Mehrfachinjektionen untersucht. Die Messung der Permeabilitätsänderung der BHS erfolgte mittels i.v. Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Natriumfluorescein (376 Da). Seine aufgenommene Menge wurde im Gehirn als Zielgewebe sowie in der Leber als Kontrollgewebe biochemisch quantifiziert. Die dreifache i.p. Injektion führte im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle zu keiner relativen Aufnahme von Natriumfluorescein ins Gehirngewebe. Die Einfach- bzw. Zweifach-i.v.-Applikation bewirkten tendenziell eine höhere relative Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs ins Gehirngewebe als die Lösungsmittel-Kontrolle. Nach BO1-Gabe betrug die im Gehirnhomogenat detektierte Fluoreszenzintensität ca. 0,1 % der in der Leber detektierten Fluoreszenz. Die höchste Natriumfluorescein-Aufnahme ins Gehirngewebe im Verhältnis zur Leber wurde nach dreifacher i.v. BO1-Applikation im Applikationsregime 0 h - 18 h - 21 h gemessen ($0,23 \pm 0,01$ %), im Folgenden nur noch als Dreifach-i.v.-Injektion bezeichnet.

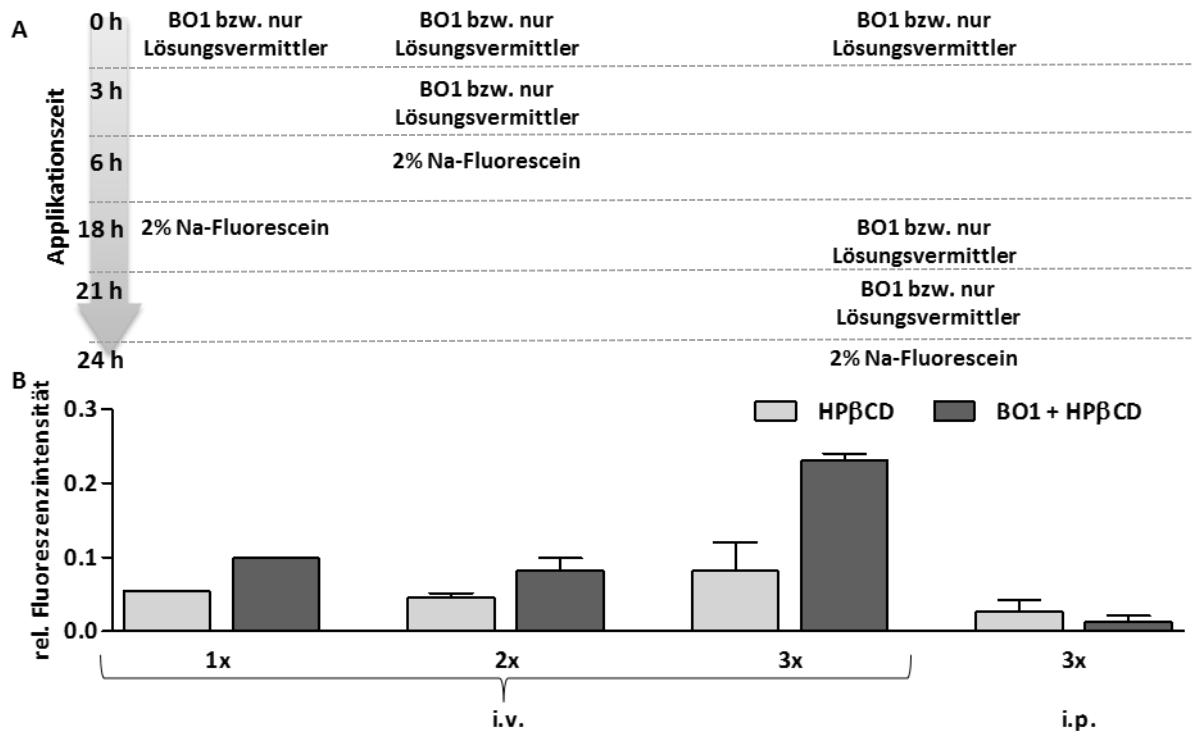


Abb. 3.28: Entwicklung des optimalen *in vivo* BO1-Applikationsregimes

(A) Getestete Applikationsschemata der Lösungsvermittler (600 μmol HP β CD/kg und 600 μmol DMSO/kg in PBS^{+/+}) und darin gelöstes BO1 (2,9 μmol BO1/kg) sowie 2 % Natriumfluorescein zur Detektion der Permeabilitätserhöhung. Bei der einfachen Applikation wurde Mäusen einmalig i.v. BO1 injiziert und nach 18 h 2 % ige Na-Fluoresceinlösung i.v. verabreicht. Bei der Zweifachapplikation erfolgten die i.v. Injektion zweimal im Abstand von 3 h und nach weiteren 3 h Natriumfluorescein i.v. Bei der Dreifachapplikation wurde BO1 im zeitlichen Abstand 0 h - 18 h - 21 h i.v. bzw. i.p. verabreicht. Natriumfluorescein wurde ebenfalls 3 h nach der letzten BO1-Gabe injiziert. **(B)** Detektion der mittleren Fluoreszenzintensitäten von Natriumfluorescein \pm SEM im Gehirnhomogenat, bezogen auf die Leber. Die Dreifach-i.v.-Behandlung (0 h - 18 h - 21 h) mit BO1 führte zur höchsten relativen Aufnahme von Natriumfluorescein ins Gehirn; n=1-3.

Auf dieser Optimierung aufbauend wurde eine Zeitreihe mit dem Dreifach-i.v.-Applikationsschema durchgeführt, wobei der zeitliche Abstand zwischen der letzten BO1- und der Natriumfluorescein-Applikation zwischen 3 h und 48 h variiert wurde. Damit war zu überprüfen, wie lange die BHS-öffnende BO1-Wirkung anhielt. Im Gehirnhomogenat BO1-vorbehandelter Mäuse wurde 3 h nach der letzten BO1-Applikation die höchste Natriumfluorescein-Menge gegenüber der PBS-Kontrollgruppe detektiert (3,7-fache Erhöhung der Fluoreszenzintensität; $1,5 \pm 0,2$ nmol/g Gewebe). Überraschenderweise zeigte zu diesem Zeitpunkt auch HP β CD allein gegenüber der PBS-Kontrollgruppe eine signifikant höhere Aufnahme des Farbstoffs, d.h. der Barriere-öffnende Effekt war additiv (Abb. 3.29 A). 12 h nach der letzten BO1-Applikation war kein Unterschied mehr zwischen der BO1- und der HP β CD-behandelten Kontrollgruppe erkennbar. Die aufgenommenen Farbstoffmengen waren jedoch in beiden Gruppen größer als in der PBS-behandelten Kontrollgruppe. Erst nach 48 h

erreichte die im Gehirn detektierte Menge des Fluoreszenzfarbstoffs die Ausgangswerte. In der Leber hingegen waren die detektierten Farbstoffmengen zu jedem Zeitpunkt in allen Versuchsgruppen nicht wesentlich verschieden (Abb. 3.29 B).

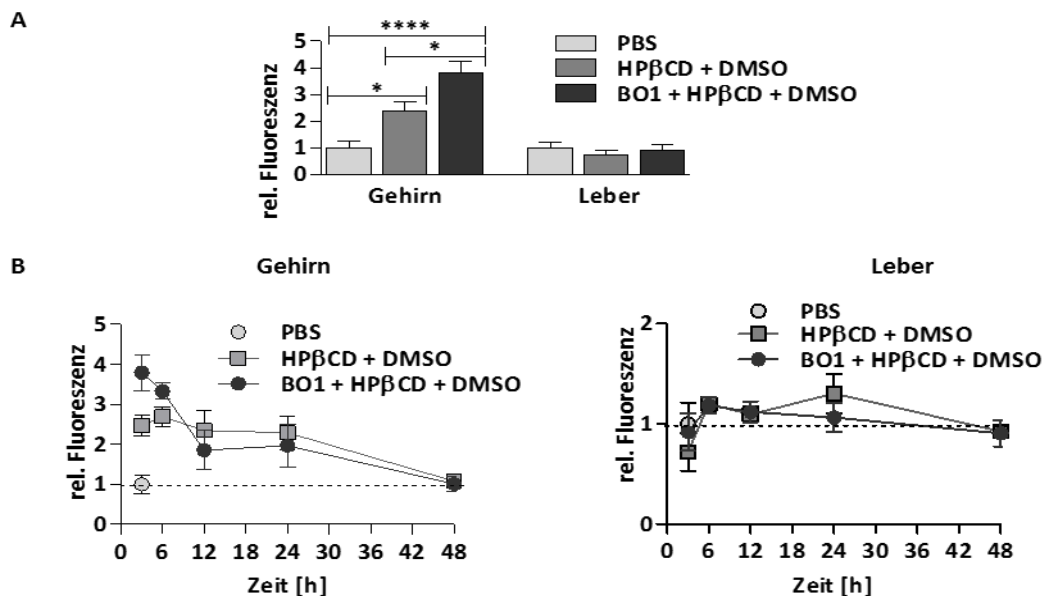


Abb. 3.29: BO1 erhöht für etwa 6 h stark die Aufnahme von Natriumfluorescein ins murine Gehirn.

Wirkdauer von BO1 an der murinen BHS. Nach der Dreifach-i.v.-Vorbehandlung mit 2,9 μ mol/kg BO1 in 600 μ mol/kg HP β CD und 600 μ mol DMSO/kg in PBS^{+/+} bzw. mit den Lösungsvermittlern oder PBS^{+/+} als Kontrollen wurde Natriumfluorescein in zunehmenden Zeitabständen von 3 h bis 48 h nach der letzten BO1-Gabe i.v. injiziert. **(A)** Mittlere Fluoreszenzintensität \pm SEM des im Gehirn- und Leberhomogenat detektierten Natriumfluorescein 3 h nach der letzten BO1-Gabe relativ zur PBS-vorbehandelten Kontrollgruppe; n=12-15; einseitiger ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$ und ***, $p \leq 0,001$. **(B)** Zeitverlauf der detektierten Natriumfluorescein-Menge im Gehirn- und Leberhomogenat; n=3-6.

Die immunhistochemische Färbung von Cldn5 und ZO-1 in Kryoschnitten des Gehirns BO1-behandelter Mäuse wies keinen klaren BO1-vermittelten Effekt auf Cldn5 in den TJs auf (Abb. 7.4). Abschließend wurde die Verträglichkeit des angewandten Applikationsregimes untersucht. Dazu wurde die Dreifach-i.v.-Applikation an der Maus einmal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen getestet. Die Dosierungen der Substanzen wurden gut vertragen (2,9 μ mol BO1/kg in 600 μ mol HP β CD/kg und 1,2 mmol/kg DMSO bzw. das Lösungsmittel allein sowie 5,8 μ mol/kg BO1 in 1,2 mmol HP β CD/kg und 1,2 mmol/kg DMSO), obwohl in dieser Studie die Dosierung des DMSO doppelt so hoch gewählt wurde wie zuvor in der Permeabilitätsstudie. Eine wesentliche Abnahme des Körpergewichts oder Verhaltensauffälligkeiten waren in keiner Gruppe zu verzeichnen (Abb. 3.30).

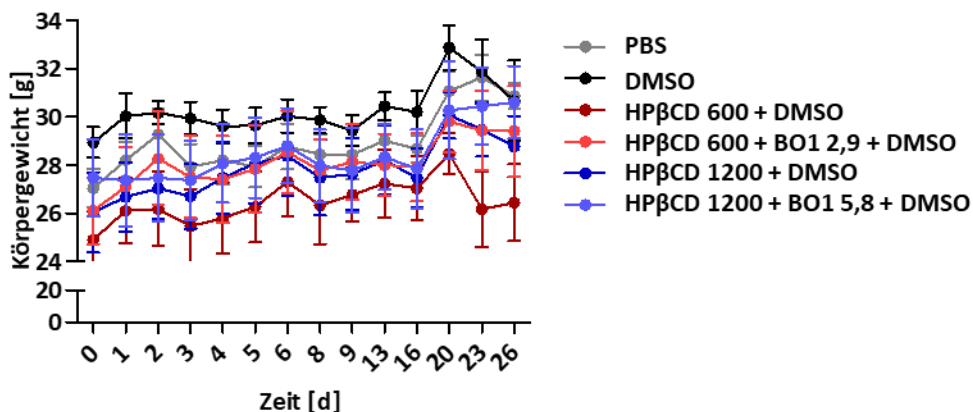


Abb. 3.30: BO1 und seine Darreichungsform haben keine Auswirkung auf das Körpergewicht.

Mäuse wurden wöchentlich mit der Dreifach-i.v.-Applikation von PBS^{+/+} bzw. 1,2 mmol/kg DMSO als Kontrollen sowie in folgenden Kombinationen behandelt: 2,9 μ mol BO1/kg in 600 μ mol HP β CD/kg und 1,2 mmol/kg DMSO bzw. 600 μ mol HP β CD/kg und 1,2 mmol/kg DMSO als Kontrolle sowie 5,8 μ mol BO1/kg in 1,2 mmol HP β CD/kg und 1,2 mmol/kg DMSO und 1,2 mmol HP β CD/kg und 1,2 mmol/kg DMSO als weitere Kontrolle. Das Körpergewicht, ein Maß für die Verträglichkeit, entwickelte sich über einen Zeitraum von ca. vier Wochen in allen Versuchsgruppen ähnlich (n=3).

Parallel zur Verträglichkeitsstudie wurden initiale pharmakokinetische Untersuchungen zur *in vivo* Stabilität von BO1 durchgeführt. Nach einer einmaligen i.v. Applikation von BO1 (2,9 μ mol/kg) in 600 μ mol HP β CD/kg und 600 μ mol DMSO/kg wurde im Blutplasma über einen Zeitraum von 24 h mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung die Konzentration von BO1 und HP β CD bestimmt. Die aus der halblogarithmischen Auftragung der detektierten Substanzkonzentration gegen die Zeit berechnete Eliminationshalbwertszeit von HP β CD betrug 66 min. BO1 mit seiner Eliminationshalbwertszeit von 18 min und BO1-C mit 48 min waren deutlich kürzer im Blutplasma verfügbar. Derivat BO1-D konnte mittels dieser Methode nicht detektiert werden. Nach 3 h fiel die Plasmakonzentration der Substanzen unterhalb die Detektionsgrenze (1,14 pmol BO1/ml Blutplasma; 8,2 nmol HP β CD/ml). Nur 0,08 % des verabreichten BO1 wurden im Urin unmodifiziert wiedergefunden. BO1-C wurde zu 0,7 % im Urin und 0,19 % in Fäzes detektiert. Der Lösungsvermittler HP β CD wurde mit einem Anteil von 23,3 % über den Urin ausgeschieden (Abb. 3.31). Der Verbleib des Großteils der Substanzen blieb ungeklärt.

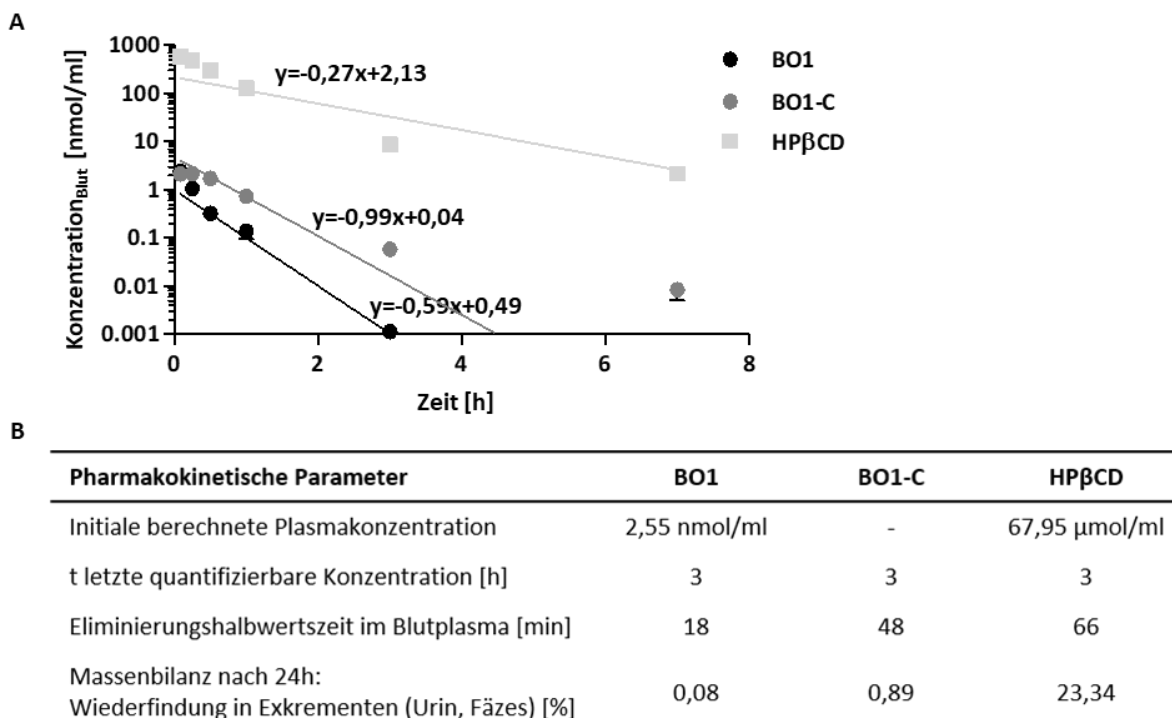


Abb. 3.31: BO1 wird schnell aus dem Blutplasma eliminiert.

Bestimmung verschiedener pharmakokinetischer Parameter von BO1, BO1-C bzw. HPβCD im Blutplasma mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung. **(A)** Halblogarithmische Darstellung der zeitlichen Konzentrationsabnahme von BO1, BO1-C bzw. HPβCD im Blutplasma nach einmaliger i.v. Gabe (2,9 μmol BO1/kg bzw. 6,5 μmol BO1-C/kg in 600 μmol HPβCD/kg). **(B)** Tabellarische Zusammenfassung verschiedener pharmakokinetischer Parameter ausgehend vom Zeitverlauf der Substanzkonzentrationen im Blutplasma (n=3).

3.5 BO1 verbessert die Wirkung von Paclitaxel im Glioblastom der Maus

Abschließend wurde untersucht, ob im Glioblastom am Mausmodell eine Vorbehandlung mit BO1 die Wirkung der schwach ZNS-gängigen Zytostatika Paclitaxel oder Oxaliplatin positiv beeinflusst. Zunächst wurde ausgeschlossen, dass BO1 selbst bzw. seine Lösungsvermittler HPβCD oder DMSO auf die verwendete Astrozytom-Zelllinie U87MG toxisch wirken. Hierzu wurde ein U87MG-Zellrasen über Nacht mit 0,5 % DMSO, 1,5 % HPβCD oder darin gelöstem 50 μM BO1 sowie 10 μM Paclitaxel inkubiert oder die Zellen mit Kombinationen von Paclitaxel mit dem Lösungsvermittler mit bzw. ohne BO1 behandelt (Abb. 3.32). Einzeln appliziert wirkten die Bestandteile der BO1-Vorbehandlung nicht toxisch auf die Tumorzellen und schränkten die zelltoxische Wirkung von 10 μM Paclitaxel bei der kombinierten Applikation nicht ein. Es zeichnete sich bei der kombinierten Zugabe von Paclitaxel und BO1 mit seinen Lösungsvermittlern eher eine stärkere Zytotoxizität ab, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz gegenüber der Wirkung von Paclitaxel allein.

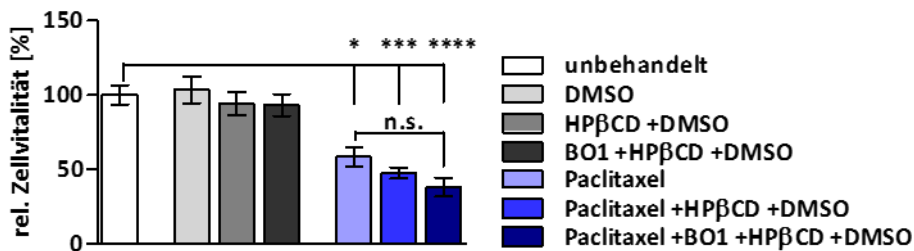


Abb. 3.32: BO1 und seine Lösungsvermittler sind nicht toxisch für U87MG Zellen

Photometrische Messung der MTT-Reduktion als Maß für Vitalität von U87MG-Zellen nach Kultivierung für 16 h unter Normbedingungen bzw. Inkubation mit 0,5 % DMSO, 1,5 % HPβCD, 50 μM BO1, gelöst in 1,5 % HPβCD und 0,5 % DMSO. Weiterhin wurden 10 μM Paclitaxel einzeln und in Kombination mit 1,5 % HPβCD und 0,5 % DMSO oder 50 μM BO1, gelöst in 1,5 % HPβCD und 0,5 % DMSO, getestet. Gezeigt sind mittlere Zellvitalitäten ± SEM, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle; n=9 ANOVA einseitiger Varianz-Test mit nachfolgendem Bonferronis multiplen Vergleichstest mit *, $p \leq 0,05$, und ***, $p \leq 0,001$.

Abschließend erfolgte die Überprüfung der BHS-öffnenden Wirkung von BO1 während eines Chemotherapie-Versuchs. Hierzu wurde an immunsupprimierten Mäusen mit einem intrazerebral implantierten Tumor der Zelllinie U87MG eine vierwöchige Chemotherapie unter Verwendung der Zytostatika Oxaliplatin bzw. Paclitaxel durchgeführt. In den verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte einmal wöchentlich die i.v. Gabe der Zytostatika mit bzw. ohne BO1-Vorbehandlung nach dem 0 h - 18 h - 21 h i.v. Applikationsregime. In allen Versuchsgruppen überlebten nahezu alle zehn Tiere bis zum Versuchsende ohne erkennbare Nebenwirkungen. Es wurden keine neurologischen Ausfälle beobachtet. In der BO1-behandelten Kontrollgruppe und sowie der Paclitaxel-behandelten Kontrollgruppe verstarb jeweils ein Tier vorzeitig. In der Oxaliplatin-behandelten Gruppe sowie in der kombinierten Gabe von Oxaliplatin mit der BO1-Vorbehandlung kam es zum vorzeitigen Abbruch bei je einem Tier wegen Gelbsucht bzw. Hirnhautentzündung. Die vorzeitigen Todesfälle standen jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit der Gabe von BO1 bzw. seinen Lösungsvermittlern. Zur Quantifizierung der Tumorgrößen am Ende der Versuchsreihe wurde eine Hämatoxylinfärbung von Kryoschnitten vorgenommen. Die Tumore, als unstrukturierte Wucherungen ausgehend von der Implantationsstelle im Striatum nahe dem lateralen Ventrikel erkennbar, wuchsen hauptsächlich entlang des Einstichkanals nach außen. Die Tumorgröße wurde jeweils in der Schnittebene mit seiner stärksten Ausprägung quantifiziert. Die Tumorgrößen in den Versuchsgruppen der allein mit Paclitaxel (28 μmol/kg) oder Oxaliplatin (12,6 μmol /kg) behandelten Mäuse waren gleich. Dasselbe traf auch auf die DMSO-behandelten (1,2 mmol/kg) bzw. ausschließlich mit BO1 und seinen Lösungsvermittlern (2,9 μmol/kg BO1, 600 μmol/kg HPβCD, 1,2 mmol/kg DMSO) behandelten

Kontrollgruppen zu. Die BO1-Vorbehandlung hatte auf die Wirkung des Oxaliplatin keinen positiven Effekt. Jedoch wurde die Wirksamkeit von Paclitaxel verbessert. In der BO1-vorbehandelten Gruppe war die gemessene mittlere Tumorgröße signifikant kleiner als in der nur mit Paclitaxel behandelten Gruppe (Abb. 3.33).

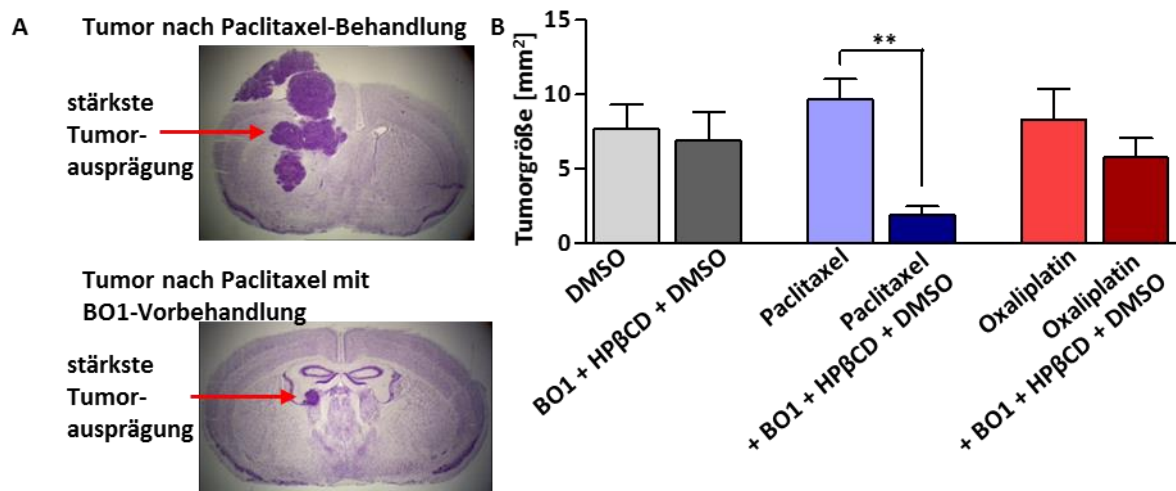


Abb. 3.33: BO1 verbessert die Tumor-reduzierende Wirkung des Paclitaxel im Glioblastom am Mausmodell.

Mäuse mit induziertem humanen Astrozytom der Zelllinie U87MG wurden über 4 Wochen einer Chemotherapie mit Paclitaxel bzw. Oxaliplatin unterzogen. Je eine Versuchsgruppe wurde mit BO1 (2,9 $\mu\text{mol/kg}$), gelöst in HP β CD (600 $\mu\text{mol/kg}$) und DMSO (1,2 mmol/kg) haltigem PBS^{+/+} im Dreifach-i.v.-Schema vor der Gabe des Zytostatikums (Paclitaxel 28 $\mu\text{mol/kg}$; Oxaliplatin 12,6 $\mu\text{mol/kg}$) vorbehandelt. Weiterhin wurden Kontrollgruppen mit DMSO bzw. BO1-vorbehandelt, jedoch ohne Zytostatika. **(A)** zeigt exemplarische Hämatoxylinfärbungen von Kryoschnitten nach Versuchsende aus der nur mit Paclitaxel-behandelten sowie der Paclitaxel-behandelten Gruppe nach einer BO1-Vorbehandlung. In **(B)** ist die Bestimmung der Tumorgößen in $\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$ dargestellt; $n=6-8$, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns multiplen Vergleichstest mit **, $p \leq 0,01$.

4 DISKUSSION

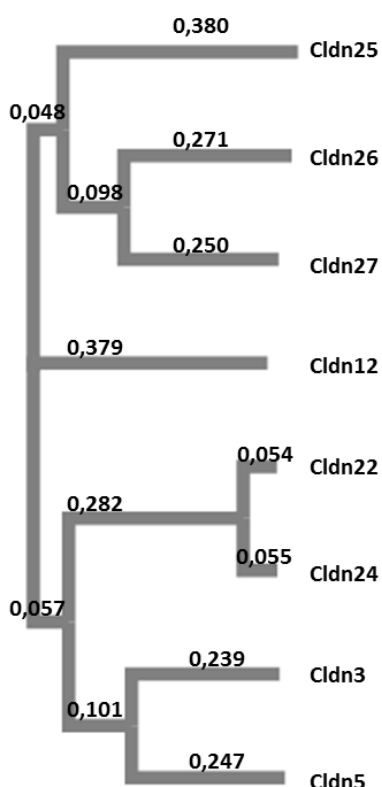
Die BHS ist für viele Wirkstoffe eine nicht überwindbare Zellbarriere, was die Behandlung verschiedener zerebraler Erkrankungen erschwert. Derzeitige therapeutischen Möglichkeiten beschränken sich auf stark invasive Eingriffe zu deren Umgehung oder eine unspezifische Öffnung der BHS, verbunden mit starken Nebenwirkungen. Vor dem Hintergrund die ZNS-Gängigkeit verschiedener Wirkstoffe zu verbessern, war es Ziel dieser Arbeit, verschiedene Claudine der BHS auf ihre Eignung als *Drug Targets* zur Erhöhung der BHS-Permeabilität zu untersuchen. Außerdem sollten bereits *in vitro* getestete Cldn-Modulatoren auf ihre permeabilitätssteigernde Wirkung an der BHS *in vivo* untersucht werden.

4.1 Cldn22, -24 und -25 als Targets für eine Modulation der Blut-Hirn-Schranke

Die Funktion von Cldn22, -24 und -25 war zu Beginn der Arbeit unbekannt (Mineta et al., 2011; Lal-Nag et al., 2012). Initiale Expressionsanalysen in Gehirnkapillarendothelzellen aus dem Kortex adulter Mäuse weisen auf eine höhere Expression als das an der BHS bekanntermaßen exprimierte Cldn3 hin (Daneman et al., 2010b; Berndt, 2017). Im Hinblick auf eine mögliche abdichtende Funktion an der BHS war zu klären, ob sie sich als *Drug Targets* eignen.

Cldn12, -22, -24 und -25 gelten als atypische Claudine, da sie eine geringe Sequenzhomologie zu den klassischen, barrierebildenden Claudinen aufweisen und keine oder nur geringe *trans*-Interaktionen ausbilden. Cldn22, -24 und -25 waren an der Plasmamembran lokalisiert und nur leicht, aber signifikant stärker als Cldn12 in verschiedenen heterophilen Zellkontakten angereichert. Die Anreicherung an Zellkontakten transfizierter, ansonsten TJ-freier Zellen ist Maß für *trans*-Interaktion von TJ-Proteinen, die aber für Cldn12 nicht detektierbar ist (Piontek et al., 2011). Die schwachen, heterophilen *trans*-Interaktionen von Cldn12, -22, -24 und -25 hatten jedoch keinen Einfluss auf den TER und damit auf die Abdichtung des Parazellularraums gegenüber Ladungsträgern, wie in dieser Arbeit nach deren Transfektion in die Barriere bildende Zelllinie MDCK-II gezeigt wurde. Aufgrund der eindeutig fehlenden abdichtenden Funktion erwiesen sich diese Claudine als ungeeignete Targets für eine transiente Erhöhung der BHS-Permeabilität.

Für die *trans*-Interaktion von TRQ-Cldn25 mit YFP-Occl zeichnet sich eine Relevanz in der Regulation der TJ-Strangmorphologie ab. Cldn25 selbst induziert keine *de novo* TJ-Strangbildung (H. Wolburg, Universität Tübingen, persönliche Information). Sein *Knockdown* könnte durch den Einfluss auf Occl, welches die Morphologie von TJ-Strängen direkt beeinflusst (Furuse et al., 1998), dennoch zu deren Destrukturierung führen, wie sie von Berndt, 2017 beobachtet wurde. Weiterhin ist für Cldn25 eine Occl-vermittelte Beteiligung in der Regulation einer fein abgestimmten Antwort der TJs gegenüber der herrschenden Glutamatkonzentration denkbar. Cldn25 hat eine etwas geringere phylogenetische Distanz zu Cldn26 und -27 als zu Cldn5 oder Cldn3 (Abb. 4.1) und weist in der EZS1 ähnlich zu Cldn26 und -27 eine N-Glycosylierung auf (Wollscheid et al., 2009). Für Cldn26 und -27 wurde gerade aus phylogenetischer Sicht und aufgrund dieser N-Glycosylierung die Zugehörigkeit zu Untereinheiten spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle, den CACNGs, postuliert (Maher et al., 2011). Somit könnte Cldn25 funktionell ebenfalls den CACNGs zugeordnet werden. Dies steht im Einklang mit dessen Einordnung in der Protein-Datenbank Uniprot (2017) als spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanal- γ -Untereinheit der CACNG-Familie. Ein Großteil der im ZNS exprimierten CACNGs ist an der neuronalen Kommunikation beteiligt durch Einfluss auf den Transport von AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)-Rezeptoren zur Plasmamembran (Sager et al., 2009). AMPA-Rezeptoren in zerebralen Endothelzellen der



Ratte induzieren Glutamat-abhängig die Phosphorylierung und den Abbau von Occl (Krizbai et al., 1998; Andras et al., 2007). Hierzu sollten künftige Studien den Einfluss von Cldn25 auf AMPA-Rezeptoren und den Zusammenhang mit der Regulation von Occl detaillierter charakterisieren.

Abb. 4.1: Phylogenetischer Baum der untersuchten murinen Claudine. Phylogenetischer Baum, basierend auf einem *neighbour-joining tree* ohne Distanz-Korrektur. Die Distanz-Werte ergeben sich aus den paarweisen Sequenzidentitäten, bestimmt durch multiples Sequenz-*Alignment* mittels Clustal Omega. Die phylogenetische Distanz zwischen zwei Claudinen wird berechnet durch Addition der einzelnen Distanzen. So beträgt die Distanz zwischen Cldn5 und Cldn3 0,486, zu Cldn25 dagegen 0,833. Die Distanz zwischen Cldn25 und Cldn26 beträgt 0,749.

4.2 Relevanz von Claudin-3 in der Blut-Hirn-Schranke und als *Drug Target*

Cldn3, exprimiert in TJs zahlreicher epithelialer Gewebearrrieren (Rahner et al., 2001; Hewitt et al., 2006; Milatz et al., 2010), ist unter anderem in TJs des Darmepithels von Bedeutung für die Abdichtung des Parazellularraums. Es wird allerdings auch in TJ der Gehirnkapillarendothelzellen sowie an der Blut-Liquor-Schranke in epithelialen TJs des Plexus choroideus exprimiert (Lippoldt et al., 2000; Kratzer et al., 2012). Kooij et al., 2014 demonstrierten bei Multipler Sklerose einen Cldn3-Verlust am Plexus choroideus und dessen gestörte Barriere-Integrität durch eine im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Infiltration mit Leukozyten. Die genaue Funktion von Cldn3 an der BHS ist bislang nicht geklärt. Der Verlust von Cldn3 in den TJs der Gehirnkapillarendothelzellen unter pathologischen Bedingungen wie EAE und Glioblastome (Wolburg et al., 2003) legt für Cldn3 eine zentrale Funktion hinsichtlich der BHS-Integrität nahe. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, die parazelluläre Abdichtung mittels Modulation von Cldn3 zu beeinflussen. Ein bekannter Cld3-Modulator ist cCPE, die C-terminale Domäne des CPE. Dieser bewirkt bereits in deutlich geringeren Konzentrationen als Cldn-abgeleitete Peptide eine effektive Öffnung epithelialer Barrieren (Kondoh et al., 2005; Veshnyakova et al., 2012). Inwiefern cCPE die Permeabilität von TJs des Gehirndothels beeinflussen kann, wurde noch nicht untersucht.

Um einen Hinweis auf die Wirkung des cCPE im Gehirndothel zu bekommen, wurde eine Bindungsstudie an primären murinen Gehirnkapillarendothelzellen durchgeführt. Im Kontrollsystem, einer Darm-Epithelzelllinie, fand eine spezifische Bindung des GST-*getaggen* cCPE an die Zellen statt. An primäre Endothelzellen hingegen band das Konstrukt genauso unspezifisch wie das GST-*Tag* allein. Somit erwies sich cCPE als ungeeigneter Modulator endothelialer TJs. Dafür gibt es verschiedene Erklärungen: Zum einen ist die Cldn3-Expression in Gehirnkapillaren im Vergleich zum Darmepithel weitaus geringer, wie auf mRNA-Ebene gezeigt wurde, sodass dem cCPE nur wenig Target-Moleküle zur Verfügung stehen. Zum anderen könnte Cldn3, welches in Gehirnkapillarendothelzellen im Vergleich zu anderen TJ-Komponenten eine schwache Expression aufwies, in dem komplexen TJ-Proteinnetzwerk für cCPE unzugänglich lokalisiert sein. Hierfür sprechen die Untersuchungen von Winkler et al., 2009. Demnach bindet cCPE an Cldn3, welches frei zugänglich an der Plasmamembran lokalisiert ist, jedoch nicht an in *trans*-Interaktionen eingebundenes, TJ-lokalisiertes Cldn3.

Untersuchungen zur subzellulären Cldn3-Lokalisation in Gehirnkapillarendothelzellen sind jedoch aufgrund der Unspezifität der derzeitig verfügbaren Cldn3-Antikörper im murinen Gehirn nicht möglich. Eine besondere Situation bleibt die Modulation der Blut-Tumor-Schranke im ZNS bei Cldn3 und -4 überexprimierenden Metastasen (Kominsky et al., 2007). Dabei können Claudine in desorganisierte TJ-Stränge eingebaut werden (De Oliveira et al., 2005), sodass sie nicht funktional, jedoch für cCPE als Target verfügbar sind. Mittels zytotoxischer cCPE-Fusionsproteine konnten Cldn3 und -4 überexprimierende Tumore in Mäusen erfolgreich behandelt werden (Ebihara et al., 2006; Yuan et al., 2009). Hinsichtlich einer systemischen Applikation von cCPE am Menschen muss die Herkunft des cCPE als Teil eines bakteriellen Toxins im Hinblick auf einen langfristigen Einsatz kritisch betrachtet werden. Bei einer langfristigen Anwendung, beispielsweise um die ZNS-Gängigkeit von Pharmaka in einer Substitutionstherapie zu verbessern, sind immunologische Reaktionen nicht ausgeschlossen. Dies wird von Gao and McClane, 2012 gestützt. Demnach sind CPE-bedingte Lebensmittelvergiftungen weit verbreitet, sodass ein großer Anteil der Bevölkerung Antikörper gegen dieses Toxin haben könnte. Zumindest ein solches Antikörper-Epitop ist in der C-terminalen Domäne lokalisiert.

Parallel zur Verwendung von cCPE als Cldn3-Modulator war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Hinweise zur *in vivo* Funktion von Cldn3 an der BHS zu erhalten. Dazu wurden Cldn3-KO Mäuse untersucht. Die Cldn3-Defizienz führte im Wesentlichen zur verminderten Cldn1-Proteinmenge. Sowohl Cldn3 als auch Cldn1 tragen zur Zelltyp-spezifischen TJ-Strangmorphologie bei (Krause et al., 2008), haben im Epithel eine abdichtende Funktion (Furuse et al., 2002; Milatz et al., 2010) und bilden *cis*- sowie *trans*-Interaktionen aus (Piontek et al., 2011). Es muss daher angenommen werden, dass Cldn3 das Cldn1 an der BHS reguliert und letztlich das Fehlen beider Proteine die abnehmende Komplexität der TJ-Strangmorphologie im Cldn3-KO bedingt. Laut Wolburg et al., 1994 resultiert eine verringerte Komplexität der TJ-Stränge in einer erhöhten Barriere-Permeabilität. Dies erklärt die stärkere Aufnahme von Natriumfluorescein ins Cldn3 KO-Gehirngewebe, wobei die im Gewebe detektierte Farbstoffmenge an der Nachweisgrenze lag. Die Verwendung von Farbstoffen verschiedener Größe, vor allem Evans Blue, Fluorescein und die HRP (*horse raddish peroxidase*), ist seit Jahrzehnten eine gängige Methode zur Quantifizierung der Permeabilität und Größenselektivität der BHS (Spigelman et al., 1983). Jedoch liefert sie nur

bei wesentlichen Störungen der Permeabilität, z.B. nach einem Schlaganfall, eindeutige Ergebnisse. Um den Durchtritt von Natriumfluorescein durch die BHS detaillierter zu klären, wäre dessen Darstellung im ZNS-Gewebe hilfreich. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist jedoch nicht fixierbar und gut wasserlöslich, sodass er sich bereits beim Aufbringen der Kryoschnitte auf Objektträger sowie im wässrigen Eindeckmedium im Gewebe während des Trocknens verteilte und somit nicht lokalisiert werden konnte.

Die leicht erhöhte Durchlässigkeit der BHS in Cldn3-KO Mäusen ist unter physiologischen Bedingungen nicht nachteilig. Die Tiere durchlaufen eine normale Entwicklung, erreichen ein zum Wildtyp vergleichbares Alter und weisen im Gehirn weder Ödeme noch Infiltrate auf. Auch gibt es keine Anzeichen auf eine Funktionsstörung von Darm, Leber und Niere, wo Cldn3 deutlich stärker exprimiert wird. Dies könnte auf einer Kompensation durch Cldn4 beruhen, welches zu Cldn3 stark homolog ist. Dazu gibt es jedoch bislang keine detaillierten Untersuchungen. Im Wesentlichen hat die Defizienz von Cldn5 und Cldn3 eine ähnliche Wirkung auf die BHS: Eine erhöhte Permeabilität für kleine Moleküle. Jedoch fällt der Effekt bei Cldn3-Defizienz aufgrund der im Vergleich zu Cldn5 sehr geringen Expression an der BHS deutlich schwächer aus. Unter pathologischen Bedingungen wirkt sich der Cldn3-KO unterschiedlich aus. Im EAE-Modell führt der Cldn3-KO zur stärkeren Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke damit zum schwereren Entzündungsverlauf (Kooij et al., 2014). Im transienten MCAO-Modell wirkte sich die Cldn3-Defizienz hingegen positiv durch eine verringerte Infarktgröße aus. Bislang stand Cldn5 im Fokus der Untersuchungen an TJs im Infarktgeschehen. Sowohl am murinen Modell des Schlaganfalls als auch des Schädel-Hirn-Traumas geht die Cldn5-Verringerung mit einer Erhöhung der Barriere-Permeabilität einher (Yang et al., 2007; Campbell et al., 2012; Liu et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde daher die Auswirkung der transienten Ischämie auf Cldn5, aber auch Occl und ZO-1 im Zusammenhang mit dem Cldn3-KO mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Die Fragmentierung von Cldn5 und Occl in TJs des infarzierten Striatums beweist den stellenweisen Verlust dieser wichtigen TJ-Komponenten in beiden Genotypen. Cldn5-sowie ZO-1-unterbrochene TJs wurden von Zehender et al., 2011 im MCAO-Modell am Meerschweinchen beobachtet und in Zusammenhang mit der Caspase-3 gebracht. Unter ischämischen Bedingungen spalten die aktivierte Caspase-3 sowie die MMP3 ihre Substrate ZO-1 in fünf Fragmente bzw. Occl innerhalb seiner EZS1 (Bojarski et al., 2004; Liu et al., 2012).

Die Cldn5-Umverteilung bzw. der Abbau und die damit begründete Fragmentierung könnten Caveolin- sowie MMP9-vermittelt erfolgen (Chen et al., 2009; Liu et al., 2012). Jedoch widerspricht die Erhöhung der Cldn5-Fluoreszenz in WT-TJ in der späten Reperfusionphase der aus der Literatur bekannten Cldn5-Antwort auf Ischämie. Es könnte sich um eine zur Fragmentierung kompensatorische Hochregulation handeln, um der erhöhten Permeabilität entgegenzuwirken und durch die milden Versuchsbedingungen bedingt sein. Der biphasische Reperfuionsverlauf ist stark von der Dauer der ischämischen Phase und der initialen Hyperämie abhängig (Sandoval and Witt, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Okklusionsdauer von nur 30 bzw. 60 min eine deutlich kürzere ischämische Phase erzeugt als von Yang et al., 2007 (90 min Okklusion) bzw. Liu et al., 2012 (2 h Okklusion). Der Vorteil des gewählten Modells ist die bessere Übertragbarkeit der Reperfusionsschäden und des -verlaufs auf die Situation beim Menschen, wenn von einer spontanen Rekanalisation oder einer erfolgreichen Lysetherapie ausgegangen wird (Kassem-Moussa and Graffagnino, 2002; Katchanov et al., 2003).

Der mildere Verlauf des Infarktgeschehens im Cldn3-KO gegenüber dem WT scheint stärker durch die Occl-Verringerung begründet zu sein als durch eine Cldn5-Regulation. Die Vermutung, dass der Occl-Verlust in den vorliegenden Untersuchungen relevant ist, stimmt mit Studien von Lochhead et al., 2010 überein. Demnach sind sowohl die Struktur als auch die Lokalisation von Occludin durch oxidativen Stress aufgrund von Hypoxie und Reperfusion wichtig für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der BHS gegenüber ¹⁴C-Sucrose. TJs im Infarktbereich von WT-Mäusen wiesen in der frühen Reperfusionphase eine Verringerung von Occl, ein Hypoxie-sensitives Protein (Bellmann et al., 2014), und seinem direkten Interaktionspartner ZO-1 (Fanning et al., 1998) auf, während im Cldn3-KO noch keine Änderung eintrat. Dies deutet auf eine stärkere Schädigung der BHS im WT im Vergleich zum Cldn3-KO und könnte im weiteren Verlauf einen stärkeren Wassereinstrom ins Gewebe zur Folge haben, was die Ödembildung begünstigt. Nach 48 h Reperfusion fielen umgekehrt im Cldn3-KO die Occl-Fragmentierung und die Verringerung der ZO-1-Fluoreszenzintensität stärker aus als im WT. Die damit einhergehende erhöhte Permeabilität könnte wiederum einen besseren Abfluss des bis dahin im Gewebe angestauten Wassers begünstigen. Der Mechanismus, durch den die Cldn3-Defizienz Occl beeinflusst, bleibt zu klären. Es gibt keine *cis*-Interaktion dieser beiden Proteine. Die Coexpression von Cldn1 und Occl erhöht jedoch die

Parallelität von TJ-Strängen im Vergleich zu Cldn1 allein. Weiterhin reduziert Cldn1 die Membran-Mobilität von Occl (Cording et al., 2013). Daher könnte die Cldn1-Verringerung im Cldn3-KO einen Zusammenhang zwischen Cldn3 und Occludin herstellen.

An der Ausbildung von Ödemen nach Ischämie sind weiterhin Aquaporine beteiligt. AQP-4, welches einen bidirektionalen Wasserkanal bildet (Amiry-Moghaddam et al., 2003), ist ein stark exprimiertes AQP im ZNS, hauptsächlich in Astrozyt-Endfüßchen (Papadopoulos et al., 2007). Seine Regulation ist multifaktoriell und abhängig vom MCAO-Modell, Spezies und Alter (Amiry-Moghaddam et al., 2003; Badaut et al., 2011). In dem hier verwendeten MCAO-Modell wurde nach 3 h keine veränderte AQP-4-Expression im TJ-assozierten Areal beobachtet. Perivaskulär war die AQP-4-Expression übereinstimmend mit Stokum et al., 2015 in beiden Genotypen gleichermaßen erhöht. Dies deutet auf eine Beteiligung von AQP-4 am Schwellungsverhalten im vorliegenden MCAO-Modell. Es wurde jedoch kein Hinweis auf einen direkten Zusammenhang mit Cldn3 oder seiner Defizienz gefunden. Die Expression von AQP-1 im Gehirnkapillarendothel unter physiologischen Bedingungen ist umstritten (Dolman et al., 2005). Eine AQP-1 Expression im Endothel wurde an der Blut-Tumor-Schranke (Saadoun et al., 2002) und in kortikalen Astrozyten nach Ischämie beobachtet (Satoh et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde AQP-1 weder unter Normalbedingungen noch nach Ischämie im Kapillarendothel, sondern nur auf Erythrozyten, wo es bekanntermaßen eine starke Expression aufweist (Preston and Agre, 1991), detektiert. Damit erscheint es ebenfalls nicht von Bedeutung für das unterschiedliche Schwellungsverhalten zwischen WT und Cldn3-KO im vorliegenden MCAO-Modell.

4.3 Modulation der Blut-Hirn-Schranke mittels BO1

Die Erhöhung der BHS-Permeabilität ist für eine medikamentöse Behandlung verschiedener Erkrankungen des ZNS sinnvoll. In dieser Arbeit wurden zunächst Cldn3 und Cldn5 als Targets zur transienten und gröÙenselektiven Erhöhung der BHS-Permeabilität in die engere Wahl gezogen. Das im ZNS stark und exklusiv an den TJs der Gehirndothelzellen exprimierte Cldn5 erschien das bessere Target im Hinblick auf eine spezifische und gröÙenselektive BHS-Modulation zu sein. Da es den Parazellularraum durch die Interaktionen seiner EZS mit anderen TJ-Proteinen für Moleküle < 800 Da verschließt (Nitta et al., 2003), sollte seine Modulation zur verbesserten ZNS-Gängigkeit zahlreicher Pharmaka dieses Größenbereichs

führen. Daher wurde die Wirkung der niedermolekularen Substanz Barrier Opener-1 (BO1; $M_w=525$ g/mol), welche im Hochdurchsatzscreening gefunden und im epithelialen Zellmodell von Tscheik, 2014 als Cldn5-spezifischer Permeabilitätsverstärker verifiziert wurde, näher charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass BO1 nicht nur die Cldn5-Proteinmenge in den TJs verringert, sondern auch die Cldn5- und ZO-1-Transkription herunterreguliert. Es erhöht *in vivo* die BHS-Permeabilität für Natriumfluorescein und ermöglicht eine verbesserte Wirkung des Zytostatikums Paclitaxel in der Therapie eines Glioblastoms am Mausmodell.

4.3.1 Bedeutung der Gesamtstruktur und Wirkmechanismus von BO1

Um zu klären, ob die Wirkregion im BO1-Molekül auf eines der beiden Aromatensysteme eingegrenzt werden kann, wurden die Derivate BO1-C (die Nalidixinsäure) und BO1-D (die Pyrazolidinkomponente) verwendet. Beide Derivate hatten eine drastisch schlechtere Cldn5-verringende und TER-absenkende Wirkung. Somit erscheint die definierte räumliche Anordnung beider Aromatensysteme in der Gesamtstruktur des BO1-Moleküls essentiell für eine Bindung an Cldn5. Wo die Bindungsstelle im Cldn5 lokalisiert ist, ist derzeit unbekannt. Für BO1 wird eine Bindung an die EZS von Cldn5 angenommen, da seine TER-senkende Wirkung in bEnd.3 Zellen sowie die von Tscheik, 2014 gemessene Verringerung der *trans*-Interaktionen eine Beteiligung der EZS voraussetzen, ähnlich wie das von TJ-modulierenden Peptiden und cCPE bekannt ist (Winkler et al., 2009; Staat et al., 2015). Ausgehend von der essentiellen Bedeutung der Seitenketten von F147 und Y148 in der EZS2 für die Ausbildung von *trans*-Interaktionen wurden bisher insbesondere diese Aminosäuren als Teil der Interaktionsfläche mit den Aromaten des BO1 angenommen (Tscheik, 2014). Um diese Vermutung zu stützen, wurde die Interaktionsfläche von BO1 und Cldn5 mit dem Web-Service SwissDock (Grosdidier et al., 2011) basierend auf der Strukturvorhersage von Cldn5 (Gehne et al., 2017) analysiert. Die initialen 3D-Bindungsmodelle (Abb. 7.5) weisen mögliche Bindungsstellen in den Transmembrandomänen und auch den extra- sowie intrazellulären Schleifen von Cldn5 auf. Das Ranking der Strukturvorschläge erfolgte nach der *full fitness*, einer Beurteilung, basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen unter Verwendung eines implizierten Lösungsmittels. Die *full fitness* war in allen Vorschlägen ähnlich, sodass allein auf Grundlage dieses Wertes keines der Modelle eindeutig präferiert werden kann.

Ausgehend von der Relevanz der EZS für die parazelluläre Abdichtung wird Cluster 7 mit einer Interaktionsfläche zwischen der Plasmamembran und der EZS1 favorisiert. Innerhalb von 4,5 Å zum BO1 befinden sich die aromatischen Seitenketten von W47 und W51 (Abb. 4.2). In diesem initialen *Modelling* der Interaktion wurde die Konformation der Cldn5-Seitenketten in der Interaktionsfläche mit BO1 nicht optimiert. Unter der Annahme, dass sich die Seitenketten dieser hochkonservierten aromatischen Aminosäuren bei der Bildung des Protein-Liganden-Komplexes leicht drehen, ist eine Wechselwirkung ihrer aromatischen Seitenketten mit beiden Aromatensystemen von BO1 mittels *T-shaped X-H/π-stacking* oder *parallel displaced π-stacking* möglich (Wheeler and Bloom, 2014) und lässt die Vermutung zu, dass BO1 nicht nur an der Maus, sondern auch am Menschen und anderen Spezies wirksam ist. Für eine genauere Analyse der Interaktionsfläche ist eine Optimierung der Liganden- sowie Targetgeometrie nötig, z.B. über Moleküldynamikrechnung.

Ein verfeinertes *Docking*-Modell oder die Auflösung der Kristallstruktur des Cldn5-BO1-Komplexes sind unabdingbar für eine zielgerichtete Optimierung von BO1. Zum einen könnte seine Wasserlöslichkeit durch Anheftung polarer funktioneller Gruppen erhöht werden, um auf Löslichkeitsvermittler zu verzichten. Zum anderen sollte die Stabilität des BO1-Moleküls gegenüber einer Hydrolyse erhöht werden. Die Esterbindung ist dahingehend eine Schwachstelle. Eine höhere Stabilität gegenüber unspezifischen Esterasen im Blut würde durch den Austausch der Carboxylesterbindung gegen ein Amid erreicht. Dieses Derivat, BO1-N, wirkte jedoch zytotoxisch, sodass es in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert wurde. Eine Alternative ist die PEGylierung von BO1, wobei die Esterbindung maskiert und so vor Esterasen geschützt würde (Mattheolabakis et al., 2014). Hierzu bedarf es allerdings Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Position im BO1-Molekül zur Konjugation mit PEG, damit die Modifikation nicht zum Wirkverlust führt.

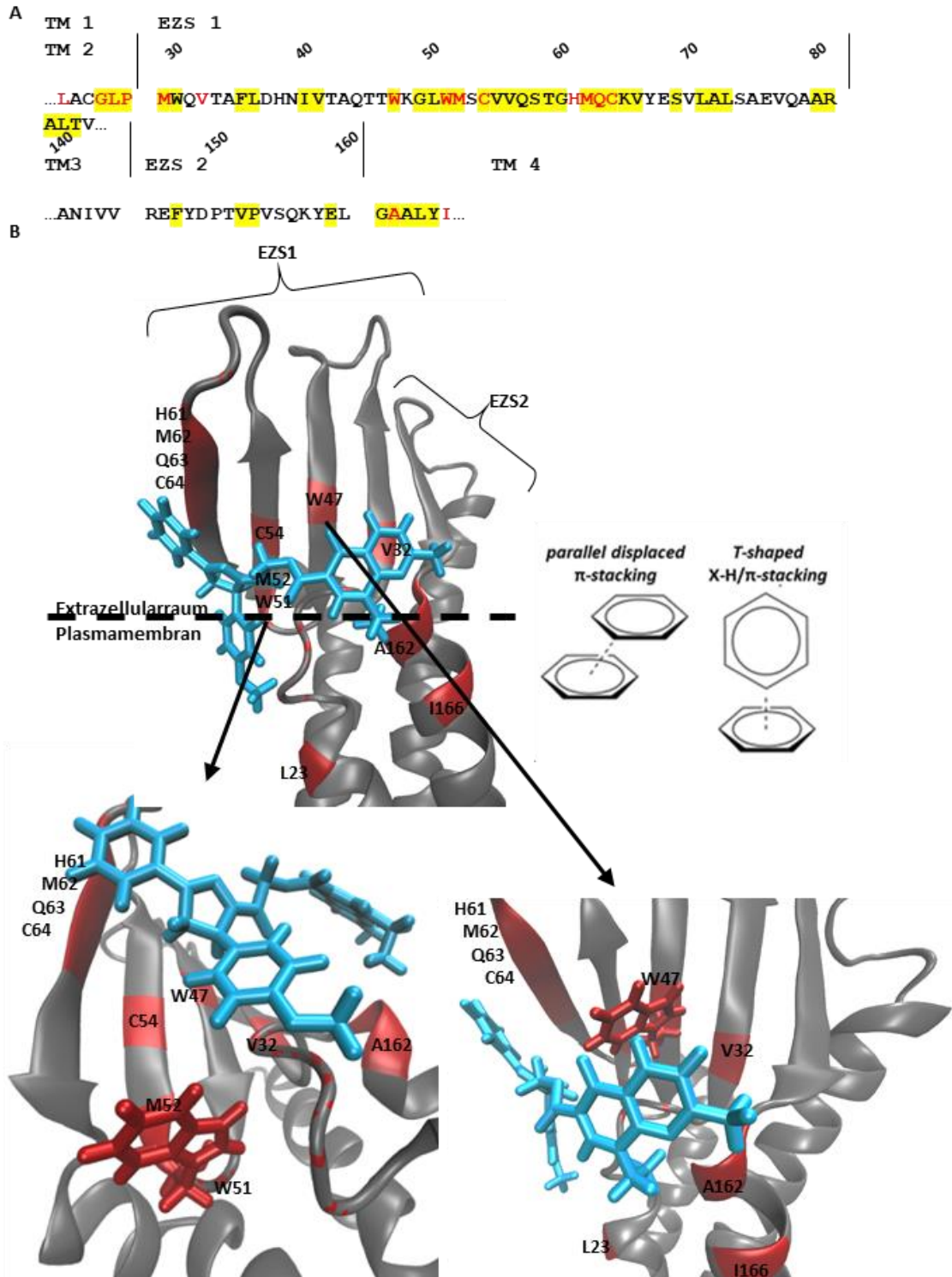


Abb. 4.2: Strukturvorschlag der Interaktionsfläche von BO1 mit murinem Claudin-5

(A) Cldn5-AS-Sequenz der EZS1 und EZS2 mit angrenzenden AS der Transmembrandomänen (TM1-4). Residuen mit einem Abstand von 4,5 Å zu BO1 wurden rot hervorgehoben. Gelb hinterlegte AS sind zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert. (B) Interaktionsfläche von Cldn5 (grau) mit BO1 (blau) aus dem Cluster 7. Die Insets zeigen detailliert die räumliche Anordnung von W47 bzw. W51 zu BO1 im Komplex aus einer optimal gedrehten Perspektive. Rot gefärbte Residuen sind die in (A) rot hervorgehobenen AS. Unter Annahme einer leichten Konformationsänderung im Protein-Ligand-Komplex sind nicht kovalente Bindungen zwischen den Aromaten des BO1 und W47 bzw. W51 von Cldn5 möglich (schematische Darstellung modifiziert nach Wheeler und Bloom, 2014); Modellerstellung mit SwissDock, 2017.

Der zeitliche Wirkverlauf von BO1 auf die parazelluläre Dichtigkeit in bEnd.3 Zellen spricht für einen komplexeren Wirkmechanismus als nur die Annahme einer gestörten *trans*-Interaktion von TJ-lokalisiertem Cldn5 durch Anlagerung von BO1 und einer anschließenden Cldn5-Endozytose. Eine gestörte *trans*-Interaktion von Cldn5 sollte zur zeitnahen Abnahme der parazellulären Dichtigkeit führen. Da die TER-absenkende Wirkung von BO1 erst ca. 5 h nach Beginn der Inkubation einsetzt, muss davon ausgegangen werden, dass BO1 vorzugsweise an frei in der Plasmamembran lokalisiertes Cldn5 bindet und später in TJ-Stränge eingebaut wird, jedoch nicht zu *trans*-Interaktionen befähigt ist. Cldn5 liegt aufgrund seiner geringen Plasmamembran-Mobilität sehr stabil in TJs vor (Piontek et al., 2011) und hat in HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*) an der Plasmamembran eine biologische Halbwertszeit von ca. 70 min (Mandel et al., 2012). Eine ähnliche Situation kann in Cldn5-endogen exprimierenden bEnd.3 Zellen angenommen werden. Der langsame Austausch gegen BO1-gebundenes Cldn5 könnte den zeitverzögerten Wirkeintritt erklären. Die > 24 h lange Wirkdauer ist weiterhin durch den Einfluss auf die Proteinsynthese begründet.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass BO1 *in vitro* nicht nur die Cldn5-Proteinmenge in TJs, sondern auch die Proteinexpression durch eine verringerte Transkription von Cldn5 sowie ZO-1 beeinflusst und zur Zunahme der Proteinmenge von β -Catenin führt. Diese beruht nicht auf einer Inaktivierung der GSK-3 β , die Teil des β -Catenin-Abbau-Komplexes ist, sondern auf dem Schutz des β -Catenins vor Abbau durch Phosphorylierung an Position S45. Somit ist denkbar, dass β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor FoxO1 einen Komplex bildet, in den Zellkern transloziert und durch die Repression des entsprechenden Promotors die Cldn5- sowie ZO-1-Transkription blockieren (Mann et al., 1999; Taddei et al., 2008). Dafür spricht auch die tendenzielle Verringerung der Menge an T24-phosphoryliertem FoxO1, seiner zytosolisch lokalisierten Form. Eine von β -Catenin beeinflusste Transkription von Claudinen ist Kontextspezifisch und abhängig von der Aktivität weiterer Signalkaskaden. Während die Wnt-Stimulation zur β -Catenin bedingten Erhöhung der Cldn3-Transkription führt (Liebner et al., 2008), resultiert eine Stimulation mit Interleukin-1 β (IL-1 β) in einer β -Catenin-involvierten verringerten Cldn5- und Occl-Transkription, einer tendenziellen Erhöhung der Cldn1-Transkription und einem TER-verringernenden Effekt ca. 6 h nach Beginn der Inkubation (Beard et al., 2014). BO1 hatte eine vergleichbare Wirkung auf die Cldn1-, Cldn5- und Occl-Transkription und führte ebenfalls zu einem ähnlichen, zeitverzögerten TER-Abfall in bEnd.3

Zellen. Daher sollten zukünftige Untersuchungen klären, ob BO1 Signalkaskaden aktiviert, die ähnlich zu IL-1 β einen Entzündungsprozess auslösen.

Während die Cldn5-Proteinmenge nach 24 h Inkubation mit BO1 mit dessen verringerter Transkription korrelierte, wies ZO-1 zum selben Zeitpunkt eine erhöhte Fluoreszenzintensität trotz verringerter ZO-1-Transkription auf. Diese Diskrepanz kann auf einer zeitlich versetzten Transkription und Translation beruhen. Die ZO-1-Lokalisation an den Zellkontakten ist bedingt durch seine zahlreichen Interaktionspartner aus dem TJ-, aber auch Adherens Junction- und Gap Junction-Proteinkomplex (Lum et al., 1999). In bEnd.3 Zellen sind neben Cldn5 auch Occludin und Catenine als Interaktionspartner bekannt. Cldn1 und -3 wurden in dieser Zelllinie nicht detektiert (Muller et al., 2005; Brown et al., 2007). Anhand der gemessenen Transkription verschiedener TJ-Komponenten erscheint Cldn5 in bEnd.3 Zellen eines der am stärksten exprimierten TJ-Proteine zu sein. Sein Verlust in TJs nach einer BO1-Behandlung führt wahrscheinlich zur fehlenden Abgrenzung von Adherens Junctions, sodass ZO-1 mit β -Catenin interagiert, wie das aus der frühen Reifung von TJs bekannt ist (Rajasekaran et al., 1996). Die stellenweise stark veränderte Zusammensetzung der TJ-Proteine könnte die beobachtete lokale Änderung der TJ-Morphologie erklären.

4.3.2 Dimethylsulfoxid und 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Lösungsvermittler

Die schlechte Löslichkeit von BO1 in wässrigem Milieu erforderte die Verwendung von DMSO, um *in vitro* wirksame BO1-Konzentrationen zu erreichen. Endothelzellen sind jedoch sensitiv. An der Endothelzelllinie EAhy926 ist die Konzentration von > 0,6 % DMSO toxisch (Yi et al., 2017). In dieser Arbeit wurde 0,5 % DMSO für Untersuchungen an bEnd.3 Zellen, das *in vitro* Modell der BHS, gewählt, da diese Konzentration keine negative Auswirkung auf die Zellmorphologie, die Zellvitalität oder die Dichtigkeit der Zellkontakte hatte. Immunfluoreszenz-Analysen belegen dennoch einen schwachen Einfluss von 0,5 % DMSO auf die Lokalisation von Cldn5 und ZO-1, da beide Proteine, die unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in den Zellkontakten lokalisieren, nach der Inkubation mit 0,5 % DMSO im Kulturmedium auch intrazellulär zu finden waren (Abb. 7.3).

Um *in vivo* nach Verdünnung im Blut eine wirksame BO1-Konzentration (ca. 50 μM) in minimaler DMSO-Konzentration (ca. 0,1 %) zu erzielen, war eine konzentrierte Injektionslösung nötig (650 μM BO1 in Phosphatpuffer). Dies konnte nur durch Zusatz von 20 %igem HP β CD und 1 %igem DMSO zur Injektionslösung als Löslichkeitsverstärker erreicht werden. Die gute Löslichkeit wurde durch Studien zur Formulierung von BO1 durch Pharmacelsus GmbH bestätigt (persönliche Kommunikation, Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken). Ausgehend von einem Injektionsvolumen von 100 μl und einem Blutvolumen der Maus von 1 ml ist nach einer i.v. Bolusinjektion die initiale BO1-Konzentration im Blut (65 μM ; 2,9 $\mu\text{mol/kg}$) vergleichbar hoch zu *in vitro* Bedingungen und die Konzentrationen der Lösungsvermittler physiologisch unbedenklich (2 % HP β CD; 600 $\mu\text{mol/kg}$ und 0,1 % DMSO; 600 $\mu\text{mol/kg}$), wie verschiedene Studien belegen: Intraperitoneal verabreichte 10 %ige DMSO-Lösung hatte keine neurotoxische Wirkung (Cavas et al., 2005; Hanslick et al., 2009). Erst eine i.v. Gabe von 28 %igem DMSO hat eine diuretische Wirkung, antiinflammatorische Eigenschaft und einen Einfluss auf NMDA- oder AMPA-Rezeptoren, die zur Verminderung des intrakraniellen Drucks im Gehirngewebe nach einem Schädel-Hirn-Trauma führen (Jacob and de la Torre, 2009). Auch die i.v. Applikation von 1000 mg/kg HP β CD an Ratten ist unbedenklich (Gould and Scott, 2005) trotz reversibler Nierentoxizität und Beeinträchtigung der *lipid rafts* in der Plasmamembran durch Bindung von Cholesterin (Kline et al., 2010). Die gute Verträglichkeit von HP β CD wird unterstrichen durch seine Zulassung als Lösungsvermittler für die i.v. Applikation der Wirkstoffe Itraconazol und Mitomycin (Davis and Brewster, 2004).

Jedoch gibt es keine Studien zu einer mehrfachen i.v. Applikation über einen längeren Zeitraum. Daher war die Untersuchung zur Verträglichkeit des in dieser Arbeit entwickelten Applikationsschemas zur Steigerung der BHS-Permeabilität notwendig, um eine Modulation der BHS durch Toxizität auszuschließen. Wie erwartet, waren die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Dosierungen der Löslichkeitsverstärker DMSO (bis zu 1,2 mmol/kg), HP β CD (600 $\mu\text{mol/kg}$) sowie BO1 (2,9 $\mu\text{g/kg}$) für die Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen und einer Dreifachapplikation pro Woche im Behandlungsregime 0 h-18 h-21 h gut verträglich. Neben dem unveränderten Körpergewicht wurden weder Verhaltensauffälligkeiten noch pathologische Veränderungen verschiedener Organe festgestellt (persönliche Kommunikation, EPO GmbH). Zukünftig sollte dennoch eine weitere Optimierung der BO1-Löslichkeit erfolgen, weil die Notwendigkeit eines 200-fachen molaren HP β CD-Überschusses

gegenüber BO1 auf eine suboptimale Komplexbildung oder eine schlechte Kompatibilität mit DMSO als zusätzlichen Löslichkeitsverstärker deutet. Der Effekt einer kombinierten Anwendung verschiedener Löslichkeitsverstärker von Wirkstoffen variiert stark. So konkurriert der Wirkstoff Benznidazol mit seinem Co-Solvent 1-Methyl-2-pyrrolidon um die Interaktion mit HP β CD, während Triethanolamin die Interaktion desselben Wirkstoffs mit HP β CD stabilisiert (De Melo et al., 2013). Eine geringere HP β CD-Konzentration ist anzustreben, um die in der Literatur beschriebene Belastung der Nieren zu minimieren.

4.3.3 BO1 wirkt *in vivo* auf die Blut-Hirn-Schranke

Um zu klären, inwiefern die im *in vitro* Modell der BHS gewonnenen Erkenntnisse auf die *in vivo* Situation übertragen werden können, wurde in dieser Arbeit erstmals die Wirksamkeit von BO1 an der Maus untersucht. Ein Vergleich zwischen *in vitro* Bedingungen und der weitaus komplexeren *in vivo* Situation ist schwierig. Für die BHS-Öffnung mittels Caprat wurde *in vivo* eine ca. 20fach höhere Konzentration benötigt als *in vitro* (Maher et al., 2009). Die schlechte Löslichkeit von BO1 in wässrigem Milieu limitiert jedoch Studien mit hohen BO1-Konzentrationen. Die maximal mögliche BO1-Dosierung einer einzelnen i.v. Bolus-Injektion führte initial zu einer ähnlich hohen Konzentration im Blut (ca. 65 μ M BO1) wie die *in vitro* wirksame Konzentration. Erst die i.v. Dreifachapplikation von BO1 (2,9 μ mol/kg) unter Zusatz von DMSO (600 μ mol/kg; 0,1 %) und HP β CD (600 μ mol/kg; 0,1 %) im Behandlungsschema 0 h - 18 h - 21 h erhöhte die BHS-Permeabilität für Natriumfluorescein (376 Da) schwach, aber signifikant. Somit wurde die BHS-modulierende Wirkung von BO1 *in vivo* bestätigt. Eine Cldn5-Verringerung in Gehirnkapillaren, vergleichbar zum Effekt in bEnd.3 Zellen, konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 7.4). Vermutlich erschwert der Blutfluss eine Anlagerung von BO1 an Cldn5 im Gefäßendothel im Vergleich zum statischen Zellmodell, wo sich die Substanz auf die Zellen absetzt und länger wirken kann. Weiterhin erscheint Cldn5 *in vivo* stärker im TJ-Proteinkomplex eingebaut, da es mit einer biologischen Halbwertszeit von 30 h länger an der Plasmamembran verbleibt als *in vitro* (Keaney et al., 2015), sodass *in vivo* die BO1-bedingte Cldn5-Verringerung in den TJs weitaus schwächer ausfällt als im Zellkulturmodell.

Um zu klären, wie weit Natriumfluorescein nach BO1-vermittelter Öffnung der BHS ins ZNS-Gewebe diffundiert, wäre seine Darstellung im ZNS-Gewebe nötig. Jedoch war die

Autofluoreszenz des Gehirngewebes stark, das Fluoreszenzsignal des nur leicht angereicherten Natriumfluorescein sehr schwach, sodass dessen Detektion in Kryoschnitten mittels Fluoreszenzmikroskopie fehlschlug. Eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte zur Minimierung der Autofluoreszenz war jedoch nicht möglich, da der unfixierbare Farbstoff dabei ausgewaschen würde. Hierzu könnte zukünftig Sulfo-NHS-Biotin (443 Da) verwendet werden. Seine kovalente Bindung an primäre Amingruppen von Proteinen im Gewebe macht es fixierbar, sodass eine Detektion im Gewebe mittels Fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin mittels Mikroskopie möglich wäre. Alternativ könnte mittels MRT die Aufnahme eines Kontrastmittels dieser Molekulargröße zeitaufgelöst verfolgt werden.

Die Barriereöffnung für Natriumfluorescein fand *in vivo* biphasisch statt. Die maximale Natriumfluorescein-Aufnahme ins ZNS, bedingt durch eine BO1-vermittelte BHS-Öffnung, fand bis zu 6 h nach der letzten Dreifachapplikation statt und klang anschließend ab. Somit ist der permeabilitätssteigernde Effekt reversibel. Insgesamt wurde jedoch eine gegenüber dem Ausgangswert erhöhte Natriumfluorescein-Aufnahme von bis zu 48 h gemessen. Interessanterweise zeigte das Cldn1-modulierende Peptid mC1C2 im Perineurium der Ratte eine Öffnung für hydrophile Schmerzmittel ebenfalls für ein Zeitfenster bis zu 48 h (Zwanziger et al., 2012). Diese Zeitspanne wird vermutlich benötigt, um die TJ-Integrität innerhalb der Barriere vollständig wiederherzustellen, nachdem sie Cldn-basiert gestört wurde. Die zweite Phase im Wirkverlauf ist jedoch hauptsächlich auf HP β CD zurückzuführen. Unerwarteterweise trug diese Substanz, deren Verwendung für die Löslichkeit von BO1 unabdingbar war, additiv zu einer leicht erhöhten Aufnahme von Natriumfluorescein für > 24 h ins Gehirngewebe bei. Die initialen pharmakokinetischen Messungen zur Stabilität der Substanzen im Blutplasma durch die Pharmacelsus GmbH in Saarbrücken stehen im Einklang dazu. BO1 hat im Blutplasma eine Eliminationshalbwertszeit von 18 min, was seinen schnellen Wirkverlust und die Notwendigkeit der Mehrfachapplikation erklärt, während HP β CD mit einer Eliminationshalbwertszeit von 66 min länger auf die BHS einwirkt. Sein Wirkmechanismus bleibt derzeit unklar. Im intestinalen Epithel wird eine gestörte Integrität der Barrierefunktion durch seinen Entzug von Cholesterin aus der Plasmamembran, was sich negativ auf Effluxtransporter auswirkt, diskutiert (Yunomae et al., 2003; Troost et al., 2004). Andererseits führte eine Inkubation von Ratten-Jejunumzellen mit HP β CD zu keiner veränderten Barriereintegrität (Hamid et al., 2009). An der Zelllinie Caco-2 resultierte das Herauslösen von

Cholesterin aus der Plasmamembran mittels Methyl- β -CD in einer Entfernung von Occludin, Cldn3 und -4 aus TJs, einhergehend mit einer Verringerung des TER (Lambert et al., 2005). Vergleichbare Studien zur Wirkung von HP β CD auf Claudine, Transportproteine oder Cholesterin im Endothel der BHS fehlen bislang. HP β CD bindet bekanntermaßen an die Gefäßwand, kann jedoch nicht ins ZNS übertreten (Pontikis et al., 2013). Unter anderem sein großes Molekulargewicht (1,4 kDa) ist ein Kriterium, das den Transport durch die BHS trotz einer BO1-bedingten Öffnung sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Innerhalb von 24 h wurden nur 0,1 % des i.v. applizierten BO1 unmodifiziert über Exkreme ausgechieden. Nalidixinsäure (BO1-C) als mögliches Produkt einer Hydrolyse wurde mit einem Anteil von 1 % detektiert, die Pyrazolidinkomponente hingegen konnte gar nicht detektiert werden (Pharmacelsus GmbH). Hydrolyse durch unspezifische Esterasen im Blut, Biotransformation sowie eine längerfristige Ablagerung im Gewebe sind mögliche Ursachen für die geringe Detektion von unmodifiziertem BO1 in Exkrementen. Dies wirft die Frage nach der Verteilung der Substanzen im Organismus und der Verfügbarkeit Hydrolyse-resistenter Derivate auf. Darüber hinaus sollte geklärt werden, inwiefern eine nochmals verbesserte Applikation die initiale Konzentration an der BHS erhöhen könnte, um den barriereöffnenden Effekt zu steigern. Eine alternative Applikation mittels implantierbarer osmotischen Pumpen würde eine gleichmäßig hohe BO1-Konzentration über einen definierten Zeitraum gewährleisten. Die Applikation könnte auch intraarteriell in die *A. Carotis*, vergleichbar zum hyperosmolaren Mannitol (Hasegawa et al., 1979), erfolgen. Hierbei würde BO1 schneller die BHS erreichen und hätte so eine initial höhere Wirkkonzentration, bevor die Substanz durch eine mögliche Biotransformation in der Leber ihre Wirkung verliert.

Eine Wirkungssteigerung von BO1 zur Reduktion von Mehrfachapplikationen und damit besserer Handhabung sowie Untersuchungen möglicher Nebenwirkungen von HP β CD, BO1 und seiner Metabolite sind für weitergehende Studien essentiell, da BO1 in seiner Darreichungsform die BHS-Permeabilität transient und nebenwirkungsfrei erhöht und damit das Potential hat, die parazelluläre Aufnahme verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe ins Gehirn zu verbessern. Dies ist beispielsweise für die Aufnahme von Zytostatika in Tumorgewebe von besonderem Interesse. Daher erfolgte in dieser Arbeit abschließend die Untersuchung zur BHS-Modulation in der Therapie eines Glioblastoms am Mausmodell. Eine

Behandlung von Mäusen mit der Dreifachapplikation von 2,9 $\mu\text{mol/kg}$ BO1 unter Zusatz von 600 $\mu\text{mol/kg}$ HP β CD und 1,2 mmol/kg DMSO vor der Gabe von Paclitaxel, einem sehr schlecht ZNS-gängigen Zytostatikum (Fellner et al., 2002), resultierte in einer bemerkenswert geringeren Tumorgröße gegenüber der nur Paclitaxel-behandelten Versuchsgruppe. Dies beweist, dass BO1 die Wirksamkeit von Paclitaxel verbessert, indem es die Permeabilität der Barriere erhöht, sodass mehr Wirkstoff ins Tumorgewebe gelangt. Die Wirksamkeit des zweiten untersuchten Zytostatikums Oxaliplatin, in seiner ZNS-Gängigkeit ebenfalls stark limitiert (Charest et al., 2013), wurde durch die BO1-bedingte Permeabilitätserhöhung hingegen nicht verbessert. Das Ausbleiben des Therapieerfolgs bedeutet, dass im Tumor keine wirksame Oxaliplatin-Konzentration erreicht wurde. Um zu klären, ob die BO1-Behandlung den Durchtritt von Oxaliplatin ins Tumorgewebe grundsätzlich verbessert, wäre eine Bestimmung der in den Tumor aufgenommenen Menge der verwendeten Zytostatika hilfreich. Ihre Detektion und Quantifizierung ist mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung zukünftig realisierbar.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass BO1 die Durchlässigkeit der BHS *in vivo* für verschiedene Substanzen vorübergehend verbessern kann. Somit stellt es eine gute Alternative zu den bekannten BHS-öffnenden Substanzen wie hyperosmolares Mannitol, Alkylglycerin und Caprat dar, welche durch die unspezifische Öffnung für bis zu 68 kD große Moleküle starke Nebenwirkungen haben (Erdlenbruch et al., 2003; Preston et al., 2008; Joshi et al., 2011). Im Vergleich zur Cldn5-si RNA-basierten BHS-Öffnung (Campbell et al., 2012) hat BO1 den Vorteil, nicht *per se* als Antigen zu wirken, während die systemische Applikation von si RNA das Risiko birgt, eine Aktivierung des Immunsystems auszulösen (Marques and Williams, 2005). Andererseits bietet eine Öffnung der BHS lediglich die Möglichkeit für einen verbesserten parazellulären Transport bestimmter Substanzen, führt jedoch nicht in jedem Fall zur optimalen Aufnahme pharmakologischer Wirkstoffe (Cheng et al., 2010), da Effluxtransporter dem stärkeren parazellulären Wirkstoffeinstrom entgegenwirken können. Insbesondere die Aktivität der in Gehirndothelzellen stark exprimierten P-Glykoprotein und OCT1 und -2 ist für den Durchtritt von Paclitaxel und Oxaliplatin ins ZNS von Bedeutung, da diese Zytostatika ihre Substrate sind (Demeule et al., 2002; Fellner et al., 2002; Zhang et al., 2006). Dies unterstreicht die Komplexität der Wirkstoffaufnahme ins ZNS, sodass eine

detaillierte Charakterisierung des Transports einzelner Wirkstoffe durch die BHS nötig ist, um die medikamentöse Therapie zerebraler Erkrankungen zu verbessern.

4.4 Schlussfolgerungen

Die BHS ist eine dichte endotheliale Barriere, welche die ZNS-Gängigkeit potentieller Wirkstoffe zur Therapie zerebraler Erkrankungen stark einschränkt. Derzeit verfügbare Behandlungsmöglichkeiten sind hoch invasiv, unspezifisch und mit starken Nebenwirkungen verbunden, sodass eine bessere Strategie zur transienten Öffnung der BHS unabdingbar ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein besseres Verständnis des TJ-Komplexes an der BHS zu erlangen und darauf aufbauend einen Ansatz zur transienten Steigerung der parazellulären Permeabilität für kleine Moleküle auf der Grundlage einer Modulation der TJs im Gehirndothel zu entwickeln.

Von den untersuchten, kürzlich als Claudine identifizierten und an der BHS vorkommenden Cldn22, -24 und -25 konnte bei keinem eine abdichtende Funktion nachgewiesen werden. Die festgestellte schwache *trans*-Interaktion von Cldn25 mit Occl zusammen mit dem von Berndt, 2017 beobachteten Einfluss von Cldn25 auf die TJ-Strangmorphologie legen eine TJ-regulierende Funktion von Cldn25 an der BHS nahe. Dennoch ist keines dieser Proteine als primäres Target zur Modulation der BHS geeignet. Cldn3 hingegen trägt *in vivo* trotz seiner im Vergleich zu Cldn5 sehr geringen Expression zur Integrität der BHS bei. Sein *Knockout* führte zur verringerten Cldn1-Expression im Kapillarendothel, einer beeinträchtigten TJ-Ultrastruktur sowie einer erhöhten Permeabilität der BHS für kleine Moleküle. Erstmals wurde gezeigt, dass die Cldn3-Defizienz unter ischämischen Bedingungen gegenüber dem WT zur geringeren Ödembildung und Infarktgröße führt. Dieser Effekt geht mit einer Beeinträchtigung der Occl-Lokalisation in den TJs im Reperfusionsverlauf einher. Daraus lässt sich schließen, dass unter pathologischen Bedingungen Occl entweder direkt von Cldn3 oder indirekt durch seinen Cldn1-verringern Einfluss reguliert wird. Die beiden Proteine sind Interaktionspartner von Occl und haben gleichzeitig einen Barriere-abdichtenden Charakter. Damit liegt nahe, dass der Cldn3-KO und die einhergehende Cldn1-Verringerung unter ischämischen Bedingungen zur Verringerung des intrakranialen Drucks beitragen, indem einer Ödembildung vorgebeugt wird, weil das Gewebe aufgrund der erhöhten BHS-Permeabilität besser entwässert wird. Zur genaueren Charakterisierung der Funktion von Cldn3 und der Auswirkung der Occl-

Verringerung unter ischämischen Bedingungen sind die Größe der permeierbar gewordenen Substanzen und der zeitliche Verlauf der BHS-Öffnung wichtige Aspekte. Hierzu eignen sich Untersuchungen zum Durchtritt von Farbstoffen verschiedener Molekulargrößen ins Infarktareal. Trotz der erhöhten BHS-Permeabilität ist Cldn3 als Target für eine transiente Modulation der parazellulären Permeabilität aufgrund seiner geringen Expression in den TJs der BHS wenig geeignet. Da die gezielte Verringerung von Cldn3 die Expression von Cldn1 beeinträchtigen würde, ist weiterhin von einer verminderten Spezifität der Wirkung aufgrund Cldn1-bedingter Effekte auszugehen.

Das im Wesentlichen zur parazellulären Dichtheit der BHS beitragende Cldn5 wurde aufgrund seiner Größenselektivität und der starken Expression an den TJs der BHS ausgewählt. Es ist das am besten geeignete Zielmolekül für eine zeitlich begrenzte und größenspezifische Erhöhung der BHS-Permeabilität. In dieser Arbeit wurde erstmalig eine Cldn5-modulierende Wirkung an der BHS mittels der niedermolekularen Substanz BO1 gezeigt. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von BO1 zeigten, dass diese niedermolekulare Substanz konzentrationsabhängig auf Proteinebene Cldn5 in den Zellkontakten verringert und auch die Cldn5-Transkription in einer β -Catenin-vermittelten Signalkaskade herunterreguliert. S45-dephosphoryliertes β -Catenin, die vor Abbau geschützte Form, wandert dazu vermutlich zusammen mit dem Transkriptionsfaktor FoxO1 in den Zellkern und reprimiert den Cldn5-Promotor. Die Erhöhung der parazellulären Permeabilität basiert sowohl auf einer gestörten Cldn5-Expression als auch -Lokalisation und damit verringerten *trans*-Interaktionen in den Zellkontakten. Um den Wirkmechanismus von BO1 *in vivo* noch detaillierter herauszuarbeiten, sollten zukünftige Untersuchungen mit einer geringeren Konzentration der Lösungsvermittler erfolgen, da HP β CD selbst einen leichten BHS-modulierenden Effekt aufweist.

Der Cldn5-Modulator BO1 besteht aus einem Pyrazolidin-Aromatensystem und der Nalidixinsäure, die über eine Carboxylesterbindung verbunden sind. Die Pyrazolidinkomponente trägt maßgeblich zur Cldn5-verringernenden Wirkung bei. Für den maximalen Effekt ist jedoch die Gesamtstruktur unabdingbar. Die maximale BHS-modulierende Wirkung von BO1 hält *in vivo* über 6 h nach der letzten BO1-Gabe an, während *in vitro* die Wirkung über 24 h dauert. Die kurze Wirkdauer von BO1 geht einher mit seiner kurzen Verfügbarkeit im Blutplasma. Die geringe *in vivo* Stabilität der Substanz erklärt die

Notwendigkeit der Mehrfach-i.v. Applikation. Die kurze Halbwertszeit im Blutplasma unterstreicht die Notwendigkeit, die Stabilität von BO1 durch Derivatisierung zu optimieren, um *in vivo* eine bessere Wirkung zu erzielen. Die Aufklärung der Kristallstruktur des Cldn5-BO1-Komplexes würde eine bessere Eingrenzung der Wirkbereiche im BO1 und so eine gezielte Derivatisierung ohne Wirkverlust ermöglichen. Dabei könnte die Esterbindung durch PEGylierung maskiert und vor Abbau geschützt werden, wobei die Molekülgeometrie erhalten bliebe. Die Wasserlöslichkeit könnte z. B. durch das Anfügen polarer funktioneller Gruppen erhöht werden, sodass die Verwendung von DMSO und HP β CD als Lösungsvermittler überflüssig bzw. reduziert würde. Dies würde vor allem Nieren und Leber als ausscheidende und metabolisierende Organe entlasten. Die i.v. Gabe von BO1 bewirkte eine transient erhöhte Aufnahme von Natriumfluorescein, einem *Marker* für die parazelluläre Permeation, ins Gehirngewebe. Weiterhin wurde die ZNS-Gängigkeit von Paclitaxel, einem normalerweise nicht Gehirn-gängigen Zytostatikum, ermöglicht und so die drastische Reduktion eines Glioblastoms erreicht. Somit stellt BO1 eine neue Möglichkeit dar, bisher nicht ZNS-gängige Pharmaka ins Gehirngewebe einzubringen. Es bietet sich an als vielversprechende Strategie zur Ergänzung der herkömmlichen Chemotherapie.

Zusammenfassend trägt diese Arbeit zum besseren Verständnis der Claudin-basierten Modulation der BHS-Permeabilität bei. Es wurde der Machbarkeitsnachweis erbracht, dass Claudine geeignete Zielstrukturen sind zur transienten, gröÙenselektiven Öffnung der BHS und ein verbesserter Wirkstofftransport ins Gehirngewebe stattfindet. Eine Cldn5-Modulation kann mittels niedermolekularer Substanzen gezielt erreicht werden kann. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur Behandlung zerebraler Erkrankungen, indem viele potentiell wirksame Substanzen, die bislang nicht ZNS-gängig waren, nun die BHS durchdringen und eine Wirkung *in vivo* entfalten könnten. Darüber hinaus könnte eine gezielte BHS-Modulation insbesondere die Therapie einer Ödembildung im Infarzierungsprozess oder nach einem Schädel-Hirn-Trauma unterstützen, indem der Ausstrom von angestautem Wasser aus dem Gewebe erleichtert würde.

5 LITERATUR

- Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy* 200:629-638.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* 7:41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37:13-25.
- Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, Apodaca G (2004) Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F305-318.
- Al-Asmakh M, Hedin L (2015) Microbiota and the control of blood-tissue barriers. *Tissue Barriers* 3:e1039691.
- Alvarez JI, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the Blood Brain Barrier. *Glia* 61:1939-1958.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115:4969-4976.
- Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A (2003) An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2106-2111.
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & development* 16:1066-1076.
- Andras IE, Deli MA, Veszeka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M (2007) The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27:1431-1443.
- Angelow S, Schneeberger EE, Yu AS (2007) Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *J Membr Biol* 215:147-159.
- Badaut J, Ashwal S, Obenaus A (2011) Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 31:521-531.
- Balabanov R, Washington R, Wagnerova J, Dore-Duffy P (1996) CNS Microvascular Pericytes Express Macrophage-like Function, Cell Surface Integrin α M, and Macrophage Marker ED-2. *Microvascular research* 52:127-142.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134:1031-1049.

- Barber AJ, Lieth E (1997) Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 208:62-74.
- Basavaraj S, Betageri GV (2014) Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development-review of feasibility, benefits and challenges. *Acta pharmaceutica Sinica B* 4:3-17.
- Beard RS, Jr., Haines RJ, Wu KY, Reynolds JJ, Davis SM, Elliott JE, Malinin NL, Chatterjee V, Cha BJ, Wu MH, Yuan SY (2014) Non-muscle Mlck is required for beta-catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1beta-mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *J Cell Sci* 127:1840-1853.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, Zlokovic BV (2010) Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68:409-427.
- Bellmann C, Schreivogel S, Gunther R, Dabrowski S, Schumann M, Wolburg H, Blasig IE (2014) Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin-redox dependency of the second extracellular loop. *Antioxidants & redox signaling* 20:855-867.
- Berndt P (2017) Claudins and tight junction-associated MARVEL proteins at the blood-brain barrier – contribution to paracellular barrier formation. In: *Fachbereich für Biologie, Biochemie und Pharmazie: Freie Universität Berlin*.
- Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E, Occhiogrosso M, Roncali L (1997) Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastructural pathology* 21:41-49.
- Bojarski C, Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Mankertz J, Schulzke J-D, Florian P, Fromm M, Tauber R, Huber O (2004) The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *Journal of Cell Science* 117:2097-2107.
- Brewster ME, Loftsson T (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 59:645-666.
- Brown RC, Morris AP, O'Neil RG (2007) Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain research* 1130:17-30.
- Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Huber JD, Burroughs AR, Davis TP (2003) Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFkappaB. *J Cell Sci* 116:693-700.
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology* 429:47-62.
- Calias P, Papisov M, Pan J, Savioli N, Belov V, Huang Y, Lotterhand J, Alessandrini M, Liu N, Fischman AJ, Powell JL, Heartlein MW (2012) CNS Penetration of Intrathecal-Lumbar Idursulfase in the Monkey, Dog and Mouse: Implications for Neurological Outcomes of Lysosomal Storage Disorder. *PloS one* 7:e30341.
- Campbell M, Hanrahan F, Gobbo OL, Kelly ME, Kiang AS, Humphries MM, Nguyen AT, Ozaki E, Keaney J, Blau CW, Kerskens CM, Cahalan SD, Callanan JJ, Wallace E, Grant GA, Doherty CP, Humphries P (2012) Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. *Nature communications* 3:849.

- Carmeliet P et al. (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147-157.
- Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, Karachi C, Leclercq D, Lafon C, Chapelon JY, Capelle L, Cornu P, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Idbah A (2016) Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Science translational medicine* 8:343re342.
- Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ (2009) The Blood Brain Barrier in Neurodegenerative Disease: A Rhetorical Perspective. *Journal of neurochemistry* 111:291-314.
- Cavas M, Beltran D, Navarro JF (2005) Behavioural effects of dimethyl sulfoxide (DMSO): changes in sleep architecture in rats. *Toxicology letters* 157:221-232.
- Charest G, Sanche L, Fortin D, Mathieu D, Paquette B (2013) Optimization of the route of platinum drugs administration to optimize the concomitant treatment with radiotherapy for glioblastoma implanted in the Fischer rat brain. *Journal of neuro-oncology* 115:10.1007/s11060-11013-11238-11068.
- Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH (2009) Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology (Baltimore, Md)* 50:1914-1923.
- Chen X, Lan X, Roche I, Liu R, Geiger JD (2008) Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. *J Neurochem* 107:1147-1157.
- Cheng Z, Zhang J, Liu H, Li Y, Zhao Y, Yang E (2010) Central nervous system penetration for small molecule therapeutic agents does not increase in multiple sclerosis- and Alzheimer's disease-related animal models despite reported blood-brain barrier disruption. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38:1355-1361.
- Citi S, Paschoud S, Pulimeno P, Timolati F, De Robertis F, Jond L, Guillemot L (2009) The tight junction protein cingulin regulates gene expression and RhoA signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165:88-98.
- Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2003) Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *American journal of physiology Cell physiology* 284:C1346-1354.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM (2002) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology* 283:C142-147.
- Consortium TU (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 45:D158-D169.
- Cording J, Gunther R, Vigolo E, Tscheik C, Winkler L, Schlattner I, Lorenz D, Haseloff RF, Schmidt-Ott KM, Wolburg H, Blasig IE (2015) 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. *Antioxidants & redox signaling* 23:1035-1049.
- Cording J, Berg J, Käding N, Bellmann C, Tscheik C, Westphal JK, Milatz S, Günzel D, Wolburg H, Piontek J, Huber O, Blasig IE (2013) In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *Journal of Cell Science* 126:554-564.

- Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG (2003) Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 285:L1166-1178.
- Cruz J, Minoja G, Okuchi K, Facco E (2004) Successful use of the new high-dose mannitol treatment in patients with Glasgow Coma Scale scores of 3 and bilateral abnormal pupillary widening: a randomized trial. *Journal of neurosurgery* 100:376-383.
- D'Atri F, Nadalutti F, Citi S (2002) Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells. *J Biol Chem* 277:27757-27764.
- Dalmaso AP, Goldish D, Benson BA, Tsai AK, Wasiluk KR, Vercellotti GM (2014) Interleukin-4 induces up-regulation of endothelial cell claudin-5 through activation of FoxO1: role in protection from complement-mediated injury. *J Biol Chem* 289:838-847.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010a) Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468:562-566.
- Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA (2010b) The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PloS one* 5:e13741.
- Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M (2007) Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem* 282:30005-30013.
- Davis ME, Brewster ME (2004) Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature reviews Drug discovery* 3:1023-1035.
- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29:1912-1919.
- De Melo PN, Barbosa EG, de Caland LB, Carpegianni H, Garnerio C, Longhi M, de Freitas Fernandes-Pedrosa M, da Silva-Júnior AA (2013) Host–guest interactions between benzimidazole and beta-cyclodextrin in multicomponent complex systems involving hydrophilic polymers and triethanolamine in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids* 186:147-156.
- De Oliveira SS, De Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Diaz JA (2005) Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS letters* 579:6179-6185.
- Del Vecchio G, Tscheik C, Tenz K, Helms HC, Winkler L, Blasig R, Blasig IE (2012) Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Molecular pharmaceutics* 9:2523-2533.
- del Zoppo GJ, Milner R (2006) Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:1966-1975.
- Demeule M, Regina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A, Beliveau R (2002) Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascular pharmacology* 38:339-348.
- Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y (2005) Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood–brain barrier functions through transforming growth factor- β production. *Brain research* 1038:208-215.

- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology* 14 Suppl 5:v1-49.
- Dolman D, Drndarski S, Abbott NJ, Rattray M (2005) Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. *J Neurochem* 93:825-833.
- Downs ME, Buch A, Sierra C, Karakatsani ME, Teichert T, Chen S, Konofagou EE, Ferrera VP (2015) Long-Term Safety of Repeated Blood-Brain Barrier Opening via Focused Ultrasound with Microbubbles in Non-Human Primates Performing a Cognitive Task. *PLoS one* 10:e0125911.
- Ebihara C, Kondoh M, Hasuike N, Harada M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, Fujii M, Watanabe Y (2006) Preparation of a Claudin-Targeting Molecule Using a C-Terminal Fragment of *Clostridium perfringens* Enterotoxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:255-260.
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V (2011) Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*:2423.
- Erdlenbruch B, Schinkhof C, Kugler W, Heinemann DE, Herms J, Eibl H, Lakomek M (2003) Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *British journal of pharmacology* 139:685-694.
- Essers MAG, de Vries-Smits LMM, Barker N, Polderman PE, Burgering BMT, Korswagen HC (2005) Functional Interaction Between β -Catenin and FOXO in Oxidative Stress Signaling. *Science (New York, NY)* 308:1181-1184.
- Etame AB, Diaz RJ, Smith CA, Mainprize TG, Kullervo HH, Rutka JT (2012) Focused ultrasound disruption of the blood brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neuro-oncology. *Neurosurgical focus* 32:E3-E3.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273.
- Farquhar MG, Palade GE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375-412.
- Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhanel M, Spruss T, Bernhardt G, Graeff C, Farber L, Gschaidmeier H, Buschauer A, Fricker G (2002) Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 110:1309-1318.
- Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, Chen Z (2011) Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Secreted by Leukemic Cells Increase the Permeability of Blood-Brain Barrier by Disrupting Tight Junction Proteins. *PLoS one* 6:e20599.
- Fischer H, Gottschlich R, Seelig A (1998) Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *J Membr Biol* 165:201-211.
- Florey (1966) The endothelial cell. *British Medical Journal* 2:487-490.
- Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H (2008) Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca(2+) Absorption between Enterocytes. *Molecular Biology of the Cell* 19:1912-1921.

- Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S (2000) Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. FEBS letters 476:258-261.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species within and between Tight Junction Strands. The Journal of Cell Biology 147:891-903.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol 143.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol 123.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol 156:1099-1111.
- Galvin NJ, Stockhausen D, Meyers-Hutchins BL, Frazier WA (1984) Association of the cyclic AMP chemotaxis receptor with the detergent-insoluble cytoskeleton of Dictyostelium discoideum. J Cell Biol 98:584-595.
- Gao Z, McClane BA (2012) Use of Clostridium perfringens Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. Journal of Toxicology 2012:981626.
- Gavard J, Gutkind JS (2008) VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. Nature Cell Biology 10:883-885.
- Gehne N, Lamik A, Lehmann M, Haseloff RF, Andjelkovic AV, Blasig IE (2017) Cross-over endocytosis of claudins is mediated by interactions via their extracellular loops. PLoS one 12:e0182106.
- Gerhardt H, Wolburg H, Redies C (2000) N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 218:472-479.
- Giepman BN (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovascular research 62:233-245.
- Gong Y, Renigunta V, Zhou Y, Sunq A, Wang J, Yang J, Renigunta A, Baker LA, Hou J (2015) Biochemical and biophysical analyses of tight junction permeability made of claudin-16 and claudin-19 dimerization. Molecular Biology of the Cell 26:4333-4346.
- Gopalakrishnan S, Pandey N, Tamiz AP, Vere J, Carrasco R, Somerville R, Tripathi A, Ginski M, Paterson BM, Alkan SS (2009) Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight junction regulator and absorption enhancer. International journal of pharmaceutics 365:121-130.
- Gould S, Scott RC (2005) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 43:1451-1459.
- Graff CL, Pollack GM (2004) Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus. Current drug metabolism 5:95-108.
- Grosdidier A, Zoete V, Michielin O (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic Acids Res 39:W270-277.

- Grosse B, Cassio D, Yousef N, Bernardo C, Jacquemin E, Gonzales E (2012) Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology (Baltimore, Md)* 55:1249-1259.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508:55-60.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2002) Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277:455-461.
- Hamid KA, Katsumi H, Sakane T, Yamamoto A (2009) The effects of common solubilizing agents on the intestinal membrane barrier functions and membrane toxicity in rats. *International journal of pharmaceutics* 379:100-108.
- Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB (2009) Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Produces Widespread Apoptosis in the Developing Central Nervous System. *Neurobiology of disease* 34:1-10.
- Harris AL (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer* 2:38-47.
- Hartz AM, Bauer B (2011) ABC transporters in the CNS - an inventory. *Current pharmaceutical biotechnology* 12:656-673.
- Hartz AM, Bauer B, Soldner EL, Wolf A, Boy S, Backhaus R, Mihaljevic I, Bogdahn U, Klunemann HH, Schuierer G, Schlachetzki F (2012) Amyloid-beta contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 43:514-523.
- Hasegawa H, Allen JC, Mehta BM, Shapiro WR, Posner JB (1979) Enhancement of CNS penetration of methotrexate by hyperosmolar intracarotid mannitol or carcinomatous meningitis. *Neurology* 29:1280-1286.
- Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE (2015) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Seminars in cell & developmental biology* 38:16-25.
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U (2000) The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol* 149:209-222.
- Hayashi K, Nakao S, Nakaoka R, Nakagawa S, Kitagawa N, Niwa M (2004) Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regulatory peptides* 123:77-83.
- Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6:186-186.
- Hirano A, Matsui T (1975) Vascular structures in brain tumors. *Human pathology* 6:611-621.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 14):1603-1613.
- Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K, Nakashima E, Terasaki T (2004) A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* 89:503-513.

- Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S (2010) Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18010-18015.
- Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15350-15355.
- Inai T, Kamimura T, Hirose E, Iida H, Shibata Y (2010) The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. *European Journal of Cell Biology* 89:547-556.
- Irie T, Uekama K (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences* 86:147-162.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999) Direct Binding of Three Tight Junction-Associated Maguiks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the CooH Termini of Claudins. *The Journal of Cell Biology* 147:1351-1363.
- Jacob SW, de la Torre JC (2009) Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacological reports* : PR 61:225-235.
- Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *International journal of pharmaceutics* 252:263-266.
- Jo DH, Kim JH, Heo J-I, Kim JH, Cho C-H (2013) Interaction between Pericytes and Endothelial Cells Leads to Formation of Tight Junction in Hyaloid Vessels. *Molecules and Cells* 36:465-471.
- Joshi S, Ergin A, Wang M, Reif R, Zhang J, Bruce JN, Bigio IJ (2011) Inconsistent blood brain barrier disruption by intraarterial mannitol in rabbits: implications for chemotherapy. *J Neurooncol* 104:11-19.
- Kageyama T, Nakamura M, Matsuo A, Yamasaki Y, Takakura Y, Hashida M, Kanai Y, Naito M, Tsuruo T, Minato N, Shimohama S (2000) The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain research* 879:115-121.
- Karnati HK, Panigrahi M, Shaik NA, Greig NH, Bagadi SA, Kamal MA, Kapalavayi N (2014) Down regulated expression of Claudin-1 and Claudin-5 and up regulation of beta-catenin: association with human glioma progression. *CNS & neurological disorders drug targets* 13:1413-1426.
- Kassem-Moussa H, Graffagnino C (2002) Nonocclusion and spontaneous recanalization rates in acute ischemic stroke: a review of cerebral angiography studies. *Archives of neurology* 59:1870-1873.
- Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Bruck W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003) Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 13:452-464.
- Kaya M, Ahishali B (2011) Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 763:369-382.
- Keaney J, Walsh DM, O'Malley T, Hudson N, Crosbie DE, Loftus T, Sheehan F, McDaid J, Humphries MM, Callanan JJ, Brett FM, Farrell MA, Humphries P, Campbell M (2015)

- Autoregulated paracellular clearance of amyloid-beta across the blood-brain barrier. *Science advances* 1:e1500472.
- Kemper EM, Verheij M, Boogerd W, Beijnen JH, van Tellingen O (2004) Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 40:1269-1274.
- Kilic E, Spudich A, Kilic U, Rentsch KM, Vig R, Matter CM, Wunderli-Allenspach H, Fritschy JM, Bassetti CL, Hermann DM (2008) ABCC1: a gateway for pharmacological compounds to the ischaemic brain. *Brain : a journal of neurology* 131:2679-2689.
- Kimura J, Abe H, Kamitani S, Toshima H, Fukui A, Miyake M, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Horiguchi Y (2010) Clostridium perfringens Enterotoxin Interacts with Claudins via Electrostatic Attraction. *The Journal of Biological Chemistry* 285:401-408.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S (2003) Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of pathology* 201:319-327.
- Kline MA, O'Connor Butler ES, Hinzey A, Sliman S, Kotha SR, Marsh CB, Uppu RM, Parinandi NL (2010) A simple method for effective and safe removal of membrane cholesterol from lipid rafts in vascular endothelial cells: implications in oxidant-mediated lipid signaling. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 610:201-211.
- Kobayashi H, Minami S, Itoh S, Shiraishi S, Yokoo H, Yanagita T, Uezono Y, Mohri M, Wada A (2001) Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels. *Neuroscience letters* 297:163-166.
- Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T (2011) Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell and Tissue Research* 343:637-648.
- Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D, Smedley JG, McClane B, Brem H, Sukumar S (2007) Clostridium perfringens Enterotoxin as a Novel-Targeted Therapeutic for Brain Metastasis. *Cancer Research* 67:7977-7982.
- Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y, Watanabe Y (2005) A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Molecular pharmacology* 67:749-756.
- Kooij G, Kopplin K, Blasig R, Stuiver M, Koning N, Govers G, van der Pol SM, van Het Hof B, Gollasch M, Drexhage JA, Reijerkerk A, Meij IC, Mebius R, Willnow TE, Muller D, Blasig IE, de Vries HE (2014) Disturbed function of the blood-cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation. *Acta Neuropathol* 128:267-277.
- Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E (2007) Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol* 170:1389-1397.
- Kratzer I, Vasiljevic A, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N, Gherzi-Egea JF (2012) Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier. *Histochemistry and cell biology* 138:861-879.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008) Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778.

- Krizbai IA, Deli MA, Pestenacz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I, Joo F (1998) Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *Journal of neuroscience research* 54:814-819.
- Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, Lee IF, Amasheh S, Fromm M, Yu AS (2012) Charge-selective claudin channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257:20-28.
- Lal-Nag M, Battis M, Santin AD, Morin PJ (2012) Claudin-6: a novel receptor for CPE-mediated cytotoxicity in ovarian cancer. *Oncogenesis* 1:e33.
- Lambert D, O'Neill Catherine A, Padfield Philip J (2005) Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochemical Journal* 387:553-560.
- Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 100:323-331.
- Liebner S, Corada M, Bangsow T, Babbage J, Taddei A, Czupalla CJ, Reis M, Felici A, Wolburg H, Fruttiger M, Taketo MM, von Melchner H, Plate KH, Gerhardt H, Dejana E (2008) Wnt/ β -catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *The Journal of Cell Biology* 183:409-417.
- Lin CJ, Tai Y, Huang MT, Tsai YF, Hsu HJ, Tzen KY, Liou HH (2010) Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J Neurochem* 114:717-727.
- Lindmark T, Soderholm JD, Olaison G, Alvan G, Ocklind G, Artursson P (1997) Mechanism of absorption enhancement in humans after rectal administration of ampicillin in suppositories containing sodium caprate. *Pharmaceutical research* 14:930-935.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46:3-26.
- Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K (2000) Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* 11:1427-1431.
- Liu G, Shen H, Mao J, Zhang L, Jiang Z, Sun T, Lan Q, Zhang Z (2013) Transferrin modified graphene oxide for glioma-targeted drug delivery: in vitro and in vivo evaluations. *ACS applied materials & interfaces* 5:6909-6914.
- Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W (2012) Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:3044-3057.
- Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N, Davis TP (2010) Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30:1625-1636.
- Loftsson T, Duchene D (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics* 329:1-11.

- Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A, Green RD (1999) Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *The American journal of physiology* 277:C580-588.
- Maher GJ, Hilton EN, Urquhart JE, Davidson AE, Spencer HL, Black GC, Manson FD (2011) The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS letters* 585:2187-2192.
- Maher S, Leonard TW, Jacobsen J, Brayden DJ (2009) Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from in vitro to the clinic. *Adv Drug Deliv Rev* 61:1427-1449.
- Mandel I, Paperna T, Volkowich A, Merhav M, Glass-Marmor L, Miller A (2012) The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation. *J Cell Biochem* 113:2415-2423.
- Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G (1993) Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* 361:552-555.
- Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature medicine* 6:159-163.
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C (1999) Target genes of β -catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:1603-1608.
- Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S (2010) Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 180:591-598.
- Marques JT, Williams BRG (2005) Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotech* 23:1399-1405.
- Mattheolabakis G, Wong CC, Sun Y, Amella CA, Richards R, Constantinides PP, Rigas B (2014) Pegylation improves the pharmacokinetics and bioavailability of small-molecule drugs hydrolyzable by esterases: a study of phospho-ibuprofen. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 351:61-66.
- McDannold N, Arvanitis CD, Vykhodtseva N, Livingstone MS (2012) Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res* 72:3652-3663.
- Merkus P, Guchelaar HJ, Bosch DA, Merkus FW (2003) Direct access of drugs to the human brain after intranasal drug administration? *Neurology* 60:1669-1671.
- Milatz S, Piontek J, Schulzke JD, Blasig IE, Fromm M, Gunzel D (2015) Probing the cis-arrangement of prototype tight junction proteins claudin-1 and claudin-3. *The Biochemical journal* 468:449-458.
- Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 1798:2048-2057.
- Miller DS (2015) Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier. *Clinical pharmacology and therapeutics* 97:395-403.

- Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS letters* 585:606-612.
- Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom AJ, Chung R, Higazi D, Desmond H, Smith T, Staddon JM (2007) Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 147:664-673.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185-194.
- Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, Koval M, Nusrat A (2008) A Key Claudin Extracellular Loop Domain is Critical for Epithelial Barrier Integrity. *The American Journal of Pathology* 172:905-915.
- Muller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbegenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G (2005) The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem* 280:3747-3756.
- Nagaraja TN, Keenan KA, Fenstermacher JD, Knight RA (2008) Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier. *Microcirculation (New York, NY : 1994)* 15:1-14.
- Neuwelt EA, Frenkel EP, Rapoport S, Barnett P (1980) Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on methotrexate pharmacokinetics in the dog. *Neurosurgery* 7:36-43.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P (1993) Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7275-7279.
- Nies AT, Jedlitschky G, Konig J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129:349-360.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 161:653-660.
- Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T (2008) mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem* 104:147-154.
- Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T (2007) Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 210:81-86.
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS (2007) Aquaporins in the Central Nervous System. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neural Membranes and Transport* (Lajtha A, Reith MEA, eds), pp 171-190. Boston, MA: Springer US.
- Pardridge WM (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature reviews Drug discovery* 1:131-139.
- Pardridge WM (2005) The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRX* 2:3-14.
- Pardridge WM, Boado RJ (2012) Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods in enzymology* 503:269-292.

- Patton WF, Dhanak MR, Jacobson BS (1989) Differential partitioning of plasma membrane proteins into the triton X-100-insoluble cytoskeleton fraction during concanavalin A-induced receptor redistribution. *J Cell Sci* 92 (Pt 1):85-91.
- Pfeiffer F, Schäfer J, Lyck R, Makrides V, Brunner S, Schaeren-Wiemers N, Deutsch U, Engelhardt B (2011) Claudin-1 induced sealing of blood–brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica* 122:601.
- Piehl C, Piontek J, Cording J, Wolburg H, Blasig IE (2010) Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:2131-2140.
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE (2008) Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:146-158.
- Piontek J, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, Yu D, Turner JR, Gehring C, Rahn HP, Wolburg H, Blasig IE (2011) Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68:3903-3918.
- Plumb J, McQuaid S, Mirakhur M, Kirk J (2002) Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 12:154-169.
- Pontikis CC, Davidson CD, Walkley SU, Platt FM, Begley DJ (2013) Cyclodextrin alleviates neuronal storage of cholesterol in Niemann-Pick C disease without evidence of detectable blood-brain barrier permeability. *Journal of inherited metabolic disease* 36:491-498.
- Powell DW (1981) Barrier function of epithelia. *The American journal of physiology* 241:G275-288.
- Preston E, Slinn J, Vinokourov I, Stanimirovic D (2008) Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *Journal of neuroscience methods* 168:443-449.
- Preston GM, Agre P (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:11110-11114.
- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120:411-422.
- Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulan E (1996) Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol* 132:451-463.
- Rajewski RA, Traiger G, Bresnahan J, Jaberaboansari P, Stella VJ, Thompson DO (1995) Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether beta-cyclodextrin derivatives. *Journal of pharmaceutical sciences* 84:927-932.

- Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR (2010) Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Mol Biol Cell* 21:1200-1213.
- Ramirez SH, Fan S, Dykstra H, Rom S, Mercer A, Reichenbach NL, Gofman L, Persidsky Y (2013) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5. *PLoS one* 8:e55972.
- Ramirez SH, Fan S, Zhang M, Papugani A, Reichenbach N, Dykstra H, Mercer AJ, Tuma RF, Persidsky Y (2010) Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) Decreases Inflammatory Responses in Brain Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology* 176:881-892.
- Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H (2002) Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol* 104:85-91.
- Reese T, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of cell biology* 34:207-217.
- Renner DB, Svitak AL, Gallus NJ, Ericson ME, Frey WH, 2nd, Hanson LR (2012) Intranasal delivery of insulin via the olfactory nerve pathway. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 64:1709-1714.
- Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:8813-8817.
- Robert Koch-Institut Gesundheitsbericht (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010. In: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke J-D, Amasheh S, Günzel D, Fromm M (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of Cell Science* 123:1913-1921.
- Rossa J, Ploeger C, Vorreiter F, Saleh T, Protze J, Gunzel D, Wolburg H, Krause G, Piontek J (2014) Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (ECL2) segments. *J Biol Chem* 289:7641-7653.
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S (2002) Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *British Journal of Cancer* 87:621-623.
- Sager C, Tapken D, Kott S, Hollmann M (2009) Functional modulation of AMPA receptors by transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *Neuroscience* 158:45-54.
- Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 32:200-219.
- Saraiva C, Praca C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L (2016) Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 235:34-47.

- Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H (2007) Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 27:245-256.
- Shinoda T, Shinya N, Ito K, Ohsawa N, Terada T, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Yokoyama S, Shirouzu M (2016) Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Scientific Reports* 6:33632.
- Siegel GJ, Agranoff BW (1999) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6 Edition: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sklar CA (2002) Childhood brain tumors. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 15 Suppl 2:669-673.
- Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N (2004) Thr207 of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Experimental Cell Research* 300:202-212.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147:195-204.
- Spigelman MK, Zappulla RA, Malis LI, Holland JF, Goldsmith SJ, Goldberg JD (1983) Intracarotid dehydrocholate infusion: a new method for prolonged reversible blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery* 12:606-612.
- Staat C, Coisne C, Dabrowski S, Stamatovic SM, Andjelkovic AV, Wolburg H, Engelhardt B, Blasig IE (2015) Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials* 54:9-20.
- Staehelin LA (1973) Further Observations on the Fine Structure of Freeze-Cleaved Tight Junctions. *Journal of Cell Science* 13:763-786.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Destatis) (2015) Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). In: (Gesundheit, ed). Wiesbaden.
- Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, Matter K (2009) Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biology* 10:95.
- Stevenson BR, Heintzelman MB, Anderson JM, Citi S, Mooseker MS (1989) ZO-1 and cingulin: tight junction proteins with distinct identities and localizations. *The American journal of physiology* 257:C621-628.
- Stroobants S, Gerlach D, Matthes F, Hartmann D, Fogh J, Gieselmann V, D'Hooge R, Matzner U (2011) Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Human molecular genetics* 20:2760-2769.
- Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y (2014) Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science (New York, NY)* 344:304-307.

- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E (2008) Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 10:923-934.
- Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL (2006) A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Molecular pharmaceutics* 3:631-643.
- Takenaga Y, Takagi N, Murotomi K, Tanonaka K, Takeo S (2009) Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29:1099-1108.
- Teng F, Beray-Berthat V, Coqueran B, Lesbats C, Kuntz M, Palmier B, Garraud M, Bedfert C, Slane N, Berezowski V, Szeremeta F, Hachani J, Scherman D, Plotkine M, Doan BT, Marchand-Leroux C, Margail I (2013) Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice. *Experimental neurology* 248:416-428.
- Thompson PD, Tipney H, Brass A, Noyes H, Kemp S, Naessens J, Tassabehji M (2010) Claudin 13, a Member of the Claudin Family Regulated in Mouse Stress Induced Erythropoiesis. *PLoS one* 5:e12667.
- Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH, 2nd (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127:481-496.
- Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J (2004) Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Molecular pharmacology* 66:1332-1339.
- Tscheik C (2014) Transiente Öffnung der Blut-Hirnschranke für kleine Moleküle durch Claudin-5-Modulatoren. In: *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie: Freie Universität Berlin*.
- Tscheik C, Blasig IE, Winkler L (2013) Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers* 1:e24565.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee S-R, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH (2005) Tissue Plasminogen Activator Promotes Matrix Metalloproteinase-9 Upregulation After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 36:1954-1959.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293.
- Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K (2010) A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochemical pharmacology* 79:1437-1444.
- Uekama K (2004) Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 52:900-915.
- Umar S, Wang Y, Morris AP, Sellin JH (2007) Dual alterations in casein kinase I-epsilon and GSK-3beta modulate beta-catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 292:G599-607.
- Van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68:403-429.

- Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM (2003) Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1078-1084.
- Veshnyakova A, Protze J, Rossa J, Blasig IE, Krause G, Piontek J (2010) On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins* 2:1336-1356.
- Veshnyakova A, Piontek J, Protze J, Waziri N, Heise I, Krause G (2012) Mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *Journal of Biological Chemistry* 287:1698-1708.
- Vorbrodt AW, Dobrogowska DH (2004) Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia histochemica et cytobiologica* 42:67-75.
- Vykhodtseva N, McDannold N, Hynynen K (2008) PROGRESS AND PROBLEMS IN THE APPLICATION OF FOCUSED ULTRASOUND FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION. *Ultrasonics* 48:279-296.
- Wakai A, McCabe A, Roberts I, Schierhout G (2013) Mannitol for acute traumatic brain injury. *The Cochrane database of systematic reviews*:Cd001049.
- Walsh EG, Adamczyk BE, Chalasani KB, Maher S, O'Toole EB, Fox JS, Leonard TW, Brayden DJ (2011) Oral delivery of macromolecules: rationale underpinning Gastrointestinal Permeation Enhancement Technology (GIPET). *Therapeutic delivery* 2:1595-1610.
- Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wei Z, Foley JP, Savani RC, Koval M (2003) Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 29:62-70.
- Wheeler SE, Bloom JW (2014) Toward a more complete understanding of noncovalent interactions involving aromatic rings. *The journal of physical chemistry A* 118:6133-6147.
- Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJ (2013) Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev* 65:315-499.
- Winkler L, Gehring C, Wenzel A, Muller SL, Piehl C, Krause G, Blasig IE, Piontek J (2009) Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J Biol Chem* 284:18863-18872.
- Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology* 38:323-337.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauß B, Schmid E-M, Ocalan M, Farrell C, Risau W (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of Cell Science* 107:1347-1357.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote E-H, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* 105:586-592.

- Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, O'Brien R, Bibel M, Schiess R, Aebersold R, Watts JD (2009) Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nature biotechnology* 27:378-386.
- Wu C, Ivars F, Anderson P, Hallmann R, Vestweber D, Nilsson P, Robenek H, Tryggvason K, Song J, Korpos E, Loser K, Beissert S, Georges-Labouesse E, Sorokin LM (2009) Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nature medicine* 15:519-527.
- Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T (2008) Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology* 172:521-533.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514:291-302.
- Yang Y, Rosenberg GA (2011) Blood–Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 42:3323-3328.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007) Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27:697-709.
- Yi X, Liu M, Luo Q, Zhuo H, Cao H, Wang J, Han Y (2017) Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS open bio* 7:485-494.
- Yuan X, Lin X, Manorek G, Kanatani I, Cheung LH, Rosenblum MG, Howell SB (2009) Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Molecular cancer therapeutics* 8:1906-1915.
- Yunomae K, Arima H, Hirayama F, Uekama K (2003) Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells. *FEBS letters* 536:225-231.
- Yurchenco PD (2011) Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:a004911.
- Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT (2009) Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of experimental pharmacology*:159-170.
- Zehendner CM, Librizzi L, de Curtis M, Kuhlmann CRW, Luhmann HJ (2011) Caspase-3 Contributes to ZO-1 and Cl-5 Tight-Junction Disruption in Rapid Anoxic Neurovascular Unit Damage. *PloS one* 6:e16760.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56:61-72.

- Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM (2006) Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity. *Cancer research* 66:8847-8857.
- Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS (2016) Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:564-580.
- Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.
- Zwanziger D, Hackel D, Staat C, Bocker A, Brack A, Beyermann M, Rittner H, Blasig IE (2012) A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Molecular pharmaceutics* 9:1785-1794.

6 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 12.10.2017

Olga Breitzkreuz-Korff

7 ANHANG

7.1 Untersuchungen zur Funktion von Cldn3

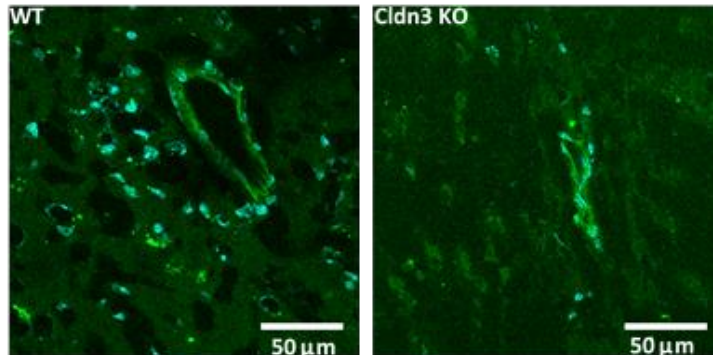


Abb. 7.1: Natriumfluorescein kann in Gewebeschnitten nicht quantifiziert werden.

Verteilung von i.v. appliziertem Natriumfluorescein (grün) im Gehirn von WT bzw. Cldn3-KO Mäusen. Die Kryoschnitte wurden in wasserlöslichem DAPI-haltigem (blau) Einbettmedium eingedeckt und sofort mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Natriumfluorescein war deutlich am Gefäßlumen erkennbar, wies jedoch auch im Hintergrund eine gleichmäßige Verteilung auf. Ein Unterschied hinsichtlich der ins Gehirngewebe aufgenommenen Farbstoffmenge zwischen WT und Cldn3-KO wurde nicht festgestellt.

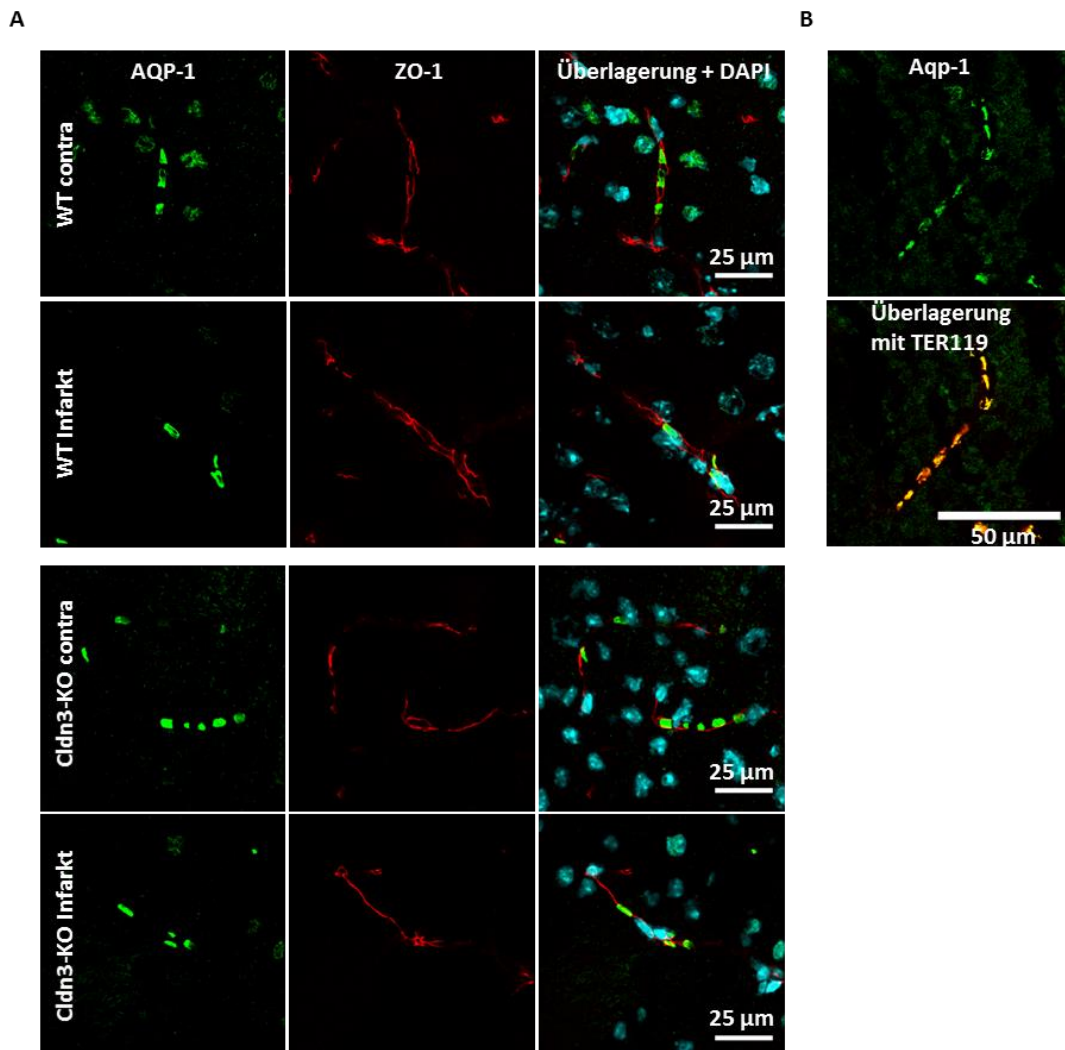


Abb. 7.2: Aquaporin-1 ist mittels Immunfluoreszenz im Endothel von Gehirnkapillaren nicht nachweisbar.

Immunhistochemische Färbung von Gehirn-Kryoschnitten zur AQP-1-Lokalisation. **(A)** zeigt immunhistochemisch gefärbte Kryoschnitte einer WT- und einer Cldn3-KO Maus nach 1 h MCAO und 3 h Reperfusion. Aqp-1 (grün) war in Kapillaren, erkennbar am ZO-1 (rot) ihrer TJ, clusterartig lokalisiert, ohne mit TJs entlang des Kapillarlumens zu überlagern. Seine Expression und Lokalisation war zwischen WT und Cldn3-KO nicht verschieden und auch im Infarktareal nicht verändert; n=3-4. **(B)** zeigt Aqp-1 (grün) im Gehirn einer WT-Maus überlagert mit dem Erythrozytenmarker TER119 (rot). Beide Proteine überlagerten nahezu vollständig; n=2.

7.2 BO1-Untersuchungen

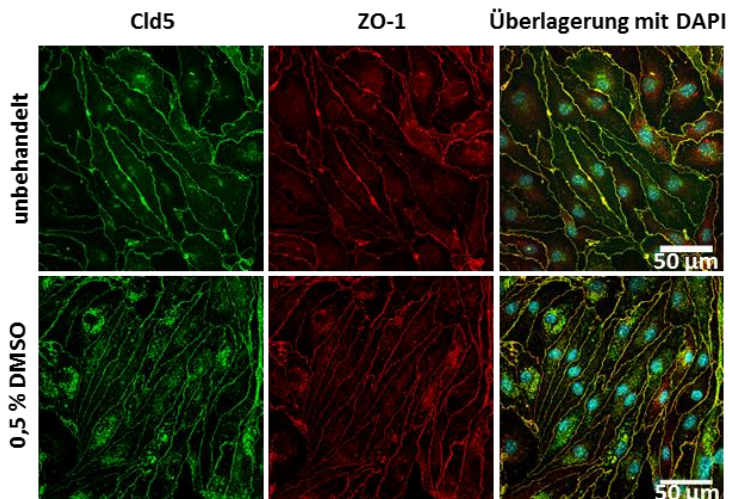


Abb. 7.3: 0,5 % DMSO führt zur erhöhten Cldn5-Expression in bEnd.3 Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung von Cldn5 (grün) und ZO-1 (rot) in bEnd.3 Zellen nach Inkubation mit 0,5 % DMSO. Konfluente bEnd.3 Zellen wurden nach 16 h Inkubation mit 0,5 % DMSO in Kulturmedium mittels Immunfluoreszenz analysiert. DMSO-behandelte Zellen wiesen Cldn5 und ZO-1 verstärkt im Zytosol auf; n=3.

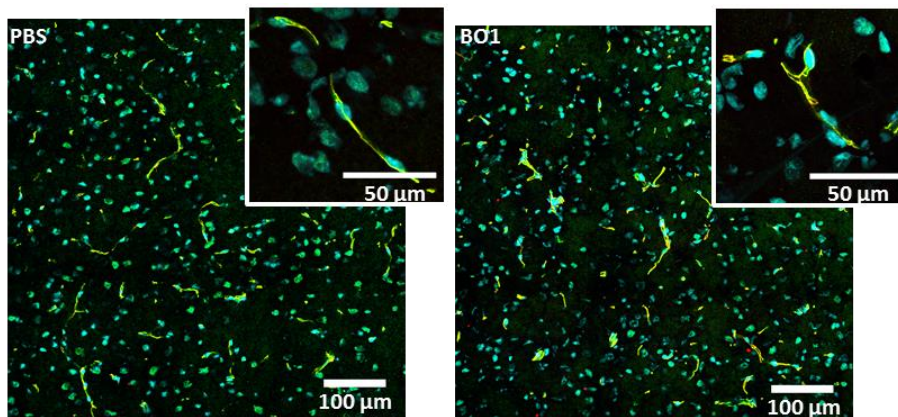


Abb. 7.4: Eine BO1-bedingte Veränderung von Cldn5 in TJs im murinen Gehirn ist mittels einer immunhistochemischen Färbung nicht detektierbar.

Nach dem 0 h-18 h-21 h-i.v.-Regime mit PBS bzw. mit 1,5 mg/kg BO1 in 900 mg/kg HP β CD und 91 μ l DMSO/kg in PBS^{+/+} behandelte Mäuse wurden dekapitiert und angefertigte Kryoschnitte immunhistochemisch gegen Cldn5 (grün) und ZO-1 (rot) gefärbt, Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Sowohl in der PBS-Kontrolle als auch in der BO1-behandelten Gruppe führte die BO1-Behandlung zu keiner sichtbaren Veränderung des Cldn5 hinsichtlich der Lokalisation und Fluoreszenzintensität im Kapillarendothel; n=3.

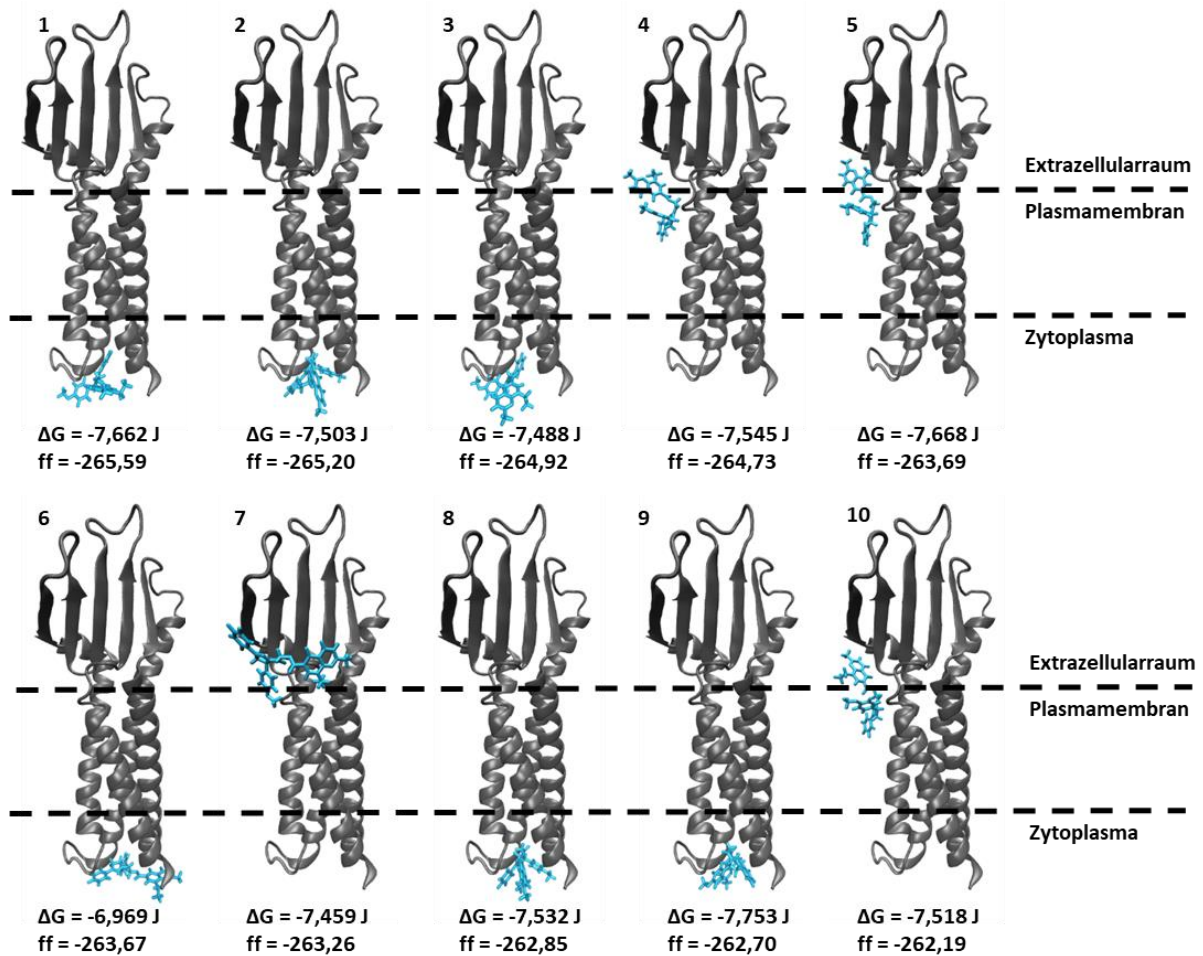
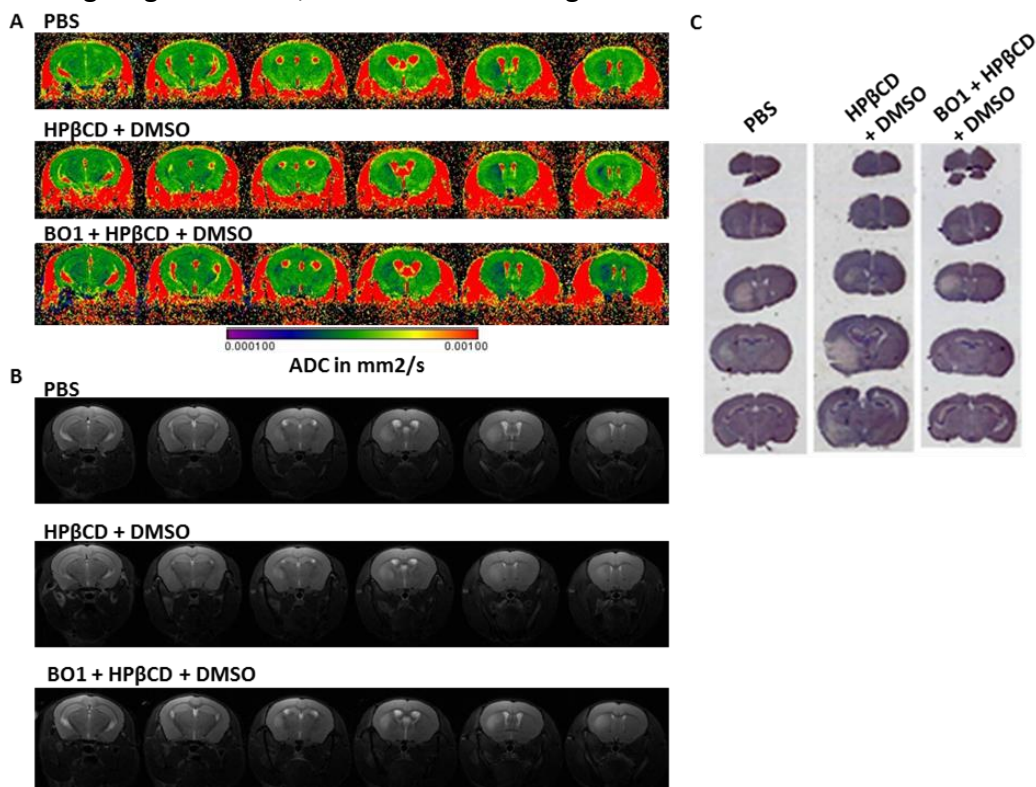


Abb. 7.5: Strukturvorschläge zur Bindung von BO1 an murines Claudin5.

Verschiedene 3D-Bindungsmodelle von murinem Cldn5 (Strukturvorhersage AS 1-190; grau) mit BO1 (blau). Gezeigt sind jeweils die Komplexe mit der besten *full fitness* (ff) aus jedem Cluster (1-10). Alle Komplexe wiesen eine ähnliche freie Enthalpie (ΔG) auf. Die vorgeschlagene Bindungsstelle in den verschiedenen Clustern war im Grenzbereich zur EZS1, in den Transmembrandomänen oder in intrazellulären Bereichen lokalisiert; Modellerstellung mit SwissDock, 2017.

ES wurde untersucht, inwiefern BO1 das Infarktgeschehen durch seine BHS-öffnende Wirkung beeinflusst. MCAO-operierte Mäuse wurden 6 h nach Beginn der Reperfusion mit der Dreifach-i.v.-Applikation von BO1, gelöst in HP β CD und DMSO, den Lösungsmittelverstärkern allein bzw. PBS behandelt und die Entwicklung des Infarktareals mittels MRT und einer histologischen Färbung analysiert. Die Infarktgrößen, bezogen auf die kontralaterale Hemisphäre, unterschieden sich in den einzelnen Versuchsgruppen zu keinem Zeitpunkt (Tab. 7.1). Exemplarische MRT-Aufnahmen bzw. Hämatoxylinfärbungen, die zur Quantifizierung herangezogen wurden, sind in Abb. 7.6 dargestellt.



Tab. 7.1: Quantifizierung des Infarktverlaufs nach BO1-Gabe

Infarktmerkmale	PBS	HP β CD	BO1
MRT: 3 h DWI + ADC mapping [% Hemisphäre]	7,3 (n=1)	5,4 \pm 1,6 (n=4)	5,4 \pm 0,7 (n=8)
MRT: 48 h T2[% Hemisphäre]	0,4 (n=1)	3,8 \pm 1,5 (n=5)	5,1 \pm 1,9 (n=8)
Hämatoxylin: Schwellung [% Hemisphäre]	2,9 \pm 3,3 (n=2)	2,3 \pm 2,7 (n=6)	0,8 \pm 1,5 (n=10)
Hämatoxylin: Infarktgröße [% contralat. Hemisphäre]	4,7 \pm 0,1 (n=2)	8,0 \pm 2,8 (n=6)	12,1 \pm 2,4 (n=10)

Abb. 7.6: BO1 beeinflusst den Reperfuersverlauf nach MCAO nicht.

MCAO-operierte Mäuse wurden nach 6 h Reperfusion im 0 h-18 h-21 h-i.v.-Regime mit PBS^{+/+} bzw. 1,5 mg/kg BO1 in 900 mg/kg HP β CD und 91 μ l DMSO/kg in PBS^{+/+} oder nur den Lösungsmittelverstärkern behandelt. Das Infarktgeschehen wurde 3 h und 48 h nach der letzten BO1-Gabe mittels MRT untersucht. Anschließend wurden Gehirne entnommen und das Infarktareal mittels einer Hämatoxylinfärbung angefertigter Kryoschnitte analysiert. **(A)** Repräsentative MRT-DWI Sequenzen mit anschließendem ADC *mapping* 3 h nach der letzten BO1-Gabe. Das Infarktareal hob sich durch eine verminderte Wasserdiffusion von umliegendem Gewebe ab (blau). **(B)** Repräsentative T2-gewichtete MRT-Sequenzen aus jeder Versuchsgruppe 48 h nach der letzten BO1-Gabe. Die Ödembildung erschien deutlich heller als umliegendes, nicht stark wasserhaltiges Gewebe. **(C)** Repräsentative Hämatoxylin-gefärbte Gehirn-Kryoschnitte. Das Infarktareal war an seiner deutlich schwächeren Färbung erkennbar.