Untersuchungen zu *Tight-Junction*-relevanten Claudinen zur gezielten Modulation zellulärer Barrieren

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sophie Dithmer

Die Dissertation wurde am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert

PD Dr. Ingolf E. Blasig

Prof. Dr. Johanna M. Brandner

verteidigt am 29.08.2018

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jeden danken, die mich fachlich und persönlich unterstützt und somit zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein sehr großer Dank gilt PD Dr. Ingolf E. Blasig für das Bereitstellen des interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Dissertation am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellphysiologie anfertigen zu können. Für die konstruktiven Diskussionen und die wissenschaftliche Unterstützung bedanke ich mich.

Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert danke ich sehr für die Übernahme des Gutachtens an der Martin-Luther-Universität und Prof. Dr. Johanna M. Brandner für die Übernahme des dritten Gutachtens.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe Molekulare Zellphysiologie. Insbesondere danke ich Dr. Lars Winkler und Dr. Christian Staat für die sehr gute Betreuung und fachliche Unterstützung sowie Dr. Reiner F. Haseloff, Dr. Nora Gehne, Dr. Olga Breitkreuz-Korff und Başak Arslan für die herzliche Zusammenarbeit.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank den Kooperationspartnern und Kooperationspartnerinnen Prof. Dr. Thoralf Niendorf, Dr. Min-Chi Ku und Dr. Andreas Pohlmann (MRT), Dr. Petra Fallier-Becker (Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie), Prof. Dr. Birger Brodin und Erica Tornabene (bovine Endothelzellen), Ines Kretschmar (Peptidsynthese), Dr. Dmytro Puchkov (Transmissionselektronenmikroskopie) sowie Prof. Dr. Anuska Andjelkovic-Zochowski und Dr. Svetlana Stamatovic für die Möglichkeit Experimente in ihrer Arbeitsgruppe der Universität Michigan durchführen zu können.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei PD Dr. Ralf Schülein und seiner Arbeitsgruppe „Protein Trafficking“ insbesondere bei Dr. Claudia Rutz und Bettina Kahlich dafür bedanken, dass ich meine Dissertation in ihren Laboren beenden durfte.

Für ihre stets offene Tür und lieben Worte danke ich herzlich Dr. Burkhard Wiesner und Jenny Eichhorst, die mir bei den zahlreichen Mikroskopstunden und -tagen eine große Hilfe waren sowie für gute Laune und einen Motivationsschub gesorgt haben.

Besonders danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern für ihre uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung und die motivierenden Worte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abbildungsverzeichnis IV
Tabellenverzeichnis VI
Anhangsverzeichnis VII
Abkürzungsverzeichnis IX
Zusammenfassung XI
Summary XII
1 Einleitung 1
1.1 Aufbau zellulärer Barrieren 1
1.2 Struktur und Funktion der *Tight Junctions* 2
1.2.1 Claudine 4
1.2.2 *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine 7
1.2.3 Zytosolische *Tight-Junction*-assoziierte Proteine 8
1.2.4 Junctional Adhesion Molecules 9
1.3 Die Blut-Hirn-Schranke 9
1.3.1 *Tight Junctions* der Blut-Hirn-Schranke 10
1.3.2 Pathologische Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke 11
1.3.3 Passagerouten durch die Blut-Hirn-Schranke 12
1.3.4 Wirkstoffdurchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke 12
1.4 Ansätze zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke 14
1.4.1 Peptide zur transienten *Tight-Junction*-Modulation 15
1.5 Zielstellung 20
2 Material und Methoden 21
2.1 Material 21
2.2 Peptiddesign und -synthese 32
2.3 Zellbiologische Methoden 34
2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen 34
2.3.2 Funktionale Assays 38
2.3.3 Mikroskopische Untersuchungen 41
2.4 Biochemische Methoden 43
2.4.1 Expressionsbestimmung 43
2.4.2 Albuminbindung der Peptide 46
2.5 *In-vivo*- und *ex-vivo*-Untersuchungen 46
2.5.1 Na-Fluoreszein-Aufnahme ins Gehirn 46
2.5.2 Magnetresonanztomographie 48

2.5.3 Gliom-tragende Mäuse zur Chemotherapie nach Peptidapplikation 49
2.5.4 Untersuchungen an Claudin-12-defizienten Mäusen 50
2.5.1 Peptidstabilität im Blutplasma.....52
2.6 Histologische Methoden.....53
2.6.1 Probenvorbereitung und Kryoschnitte 53
2.6.2 Immunhistochemie und Mikroskopie der Gewebeschnitte 53
2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen 54
2.8 Biophysikalische und -informatische Methoden.....54
2.8.1 Strukturelle Untersuchungen mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....54
2.8.2 Sequenz-Alignments 56
2.8.3 Molekulare Modellierung 56
2.8.4 Statistische Auswertung 56
3 Ergebnisse 57
3.1 Claudin-5-Peptidomimetika erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke *in vitro* 57
3.1.1 Permeabilisierung von Endothelzellbarrieren.....57
3.1.2 Reversibilität und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Claudin-5-Peptiden auf endotheliale Zellen 59
3.1.3 Claudin-5-Peptidomimetika führen zur größenselektiven Barriereöffnung 62
3.1.4 Der permeabilisierende Effekt der Claudin-5-Peptide ist nicht zytotoxisch.....64
3.2 Claudin-5-Peptidomimetika beeinträchtigen die *Tight-Junction*-Struktur.....65
3.2.1 Umverteilung und Reduktion von *Tight-Junction*-Proteinen aus der Plasmamembran 65
3.2.2 Peptidbehandlung reduziert die Komplexität der *Tight-Junction*-Stränge.....69
3.3 Spezifität von Claudin-5-Peptidomimetika.....70
3.3.1 Reduktion von Claudin-5 und Occludin nach Peptidbehandlung.....70
3.3.2 In Claudin-5-freien, *Tight-Junction*-bildenden Zellen haben Claudin-5-Peptide überwiegend keine Wirkung 72
3.4 Wirkmechanismus von Claudin-5-Peptidomimetika.....73
3.4.1 Downregulation der mRNA von Claudin-5, Occludin und *Zonula occludens* Protein-1 73
3.4.2 Zeitabhängige Internalisierung von Claudin-5-Peptiden in Endothelzellen.....74
3.5 Geringe Bindung der Claudin-5-Peptidomimetika an Albumin.....76
3.6 Claudin-5-Peptidomimetika erhöhen reversibel die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* 77
3.6.1 Expression von Claudin-5 in Geweben der Maus 80
3.7 Claudin-5-Peptidomimetika verbessern Glioblastom-Chemotherapie.....81

3.7.1 Peptidgabe und Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke sind ohne Nebenwirkungen 82
3.8 D-Aminosäuren erhöhen die Peptidstabilität in Blutplasma 83
3.9 Strukturanalyse der Claudin-5-Peptidomimetika 85
3.9.1 Sekundärstrukturanalyse der Claudin-5-Peptide 85
3.9.2 Hohe Sequenzidentität von Claudin-5-Peptiden mit der ersten extrazellulären Schleife von Claudin-5 88
3.9.3 Claudin-5-Peptide bilden β-Faltblatt- und α-Helixstrukturen....90
3.9.4 Assoziation von Claudin-5-Peptidomimetika an extrazelluläre Schleifen von Claudin-5....91
3.10 Charakterisierung von Claudin-12-defizienten Mäusen....94
3.10.1 Claudin-12-Knockout beeinflusst nicht die Barriere der Blut-Hirn-Schranke 94
3.10.2 Expression und Lokalisation myokardialer *Tight-Junction*-Proteine nach Claudin-12-Knockout....95
3.10.3 Einfluss von Claudin-12-Knockout auf *Tight-Junction*-Proteine verschiedener Organe 100
3.10.4 Claudin-12-abhängige Expression des Vitamin-D-Rezeptors im Gastrointestinaltrakt 102
4 Diskussion....104
4.1 Claudin-5 als Zielprotein zur spezifischen Modulation der Blut-Hirn-Schranke 105
4.2 Transiente Barriereöffnung durch *Tight-Junction*-Modulation *in vitro*....106
4.3 Transiente Öffnung der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* 110
4.3.1 Claudin-5-Peptide zur Verbesserung der Gliombehandlung....111
4.3.2 Optimierung der Wirkdauer von Claudin-5-Peptidomimetika 112
4.4 Sekundärstrukturen der Peptidomimetika bei der Interaktion mit Claudin-5 113
4.5 Wirkmechanismus der Claudin-5-Peptidomimetika 115
4.6 Weitere Indikationsgebiete der *Tight-Junction*-Modulation 117
4.7 Charakterisierung von Claudin-12-Knockout-Mäusen 118
4.8 Schlussfolgerung und Ausblick 120
Literaturverzeichnis 123
Eidesstattliche Erklärung 147
Anhang....148

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Epitheliale Zell-Zell-Kontakte 1
Abb. 2: Aufbau der *Tight Junctions* 3
Abb. 3: Struktur und Interaktion von Claudinen 4
Abb. 4: Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von *Tight Junctions* in Gehirnkapillarendothelzellen 7
Abb. 5: Aufbau und Passagerouten der Blut-Hirn-Schranke 9
Abb. 6: Modulation der Blut-Hirn-Schranke mit verbessertem Wirkstoffdurchtritt 14
Abb. 7: Peptide gerichtet gegen Claudine und *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine zur *Tight-Junction*-Modulation für Therapie und Diagnostik 16
Abb. 8: MDCK-II-Zellen exprimieren stabil murines Claudin-5 N-terminal markiert mit *Yellow Fluorescent Protein* (YFP-mClaudin-5) 35
Abb. 9: Quantifizierung der Zell-Zirkularität und der Fluoreszenzintensitäten von Zell-Zell-Kontaktproteinen in Immunfluoreszenzfärbungen mit ImageJ 42
Abb. 10: Applikationsregime der Peptid-unterstützten Chemotherapie von Glioblastomen in immundefizienten NMRI-nu/nu-Mäusen 49
Abb. 11: Genotypisierung von Claudin-12-Knockout (KO)- und Wildtyp (WT)-C57BL/6-Mäusen 51
Abb. 12: Claudin-5-Peptide verringern zeitabhängig den transzellulären elektrischen Widerstand (TER) eines *in-vitro*-Modells der Blut-Hirn-Schranke 58
Abb. 13: Claudin-5-Peptide permeabilisieren primäre Gehirnkapillarendothelzellen 59
Abb. 14: Regeneration der zellulären Dichtheit nach 16-stündiger Peptidbehandlung 60
Abb. 15: Claudin-5-Peptidomimetika führen zur konzentrationsabhängigen und reversiblen Reduktion der parazellulären Dichtheit 61
Abb. 16: Claudin-5-Peptide erhöhen die größenabhängige Permeabilität von Markersubstanzen und die Durchlässigkeit von Wirkstoffen in Claudin-5-exprimierenden, epithelialen Zellschichten 63
Abb. 17: Die Zellvitalität ist in Endothel- und Epithelzellen durch Peptidbehandlung nicht beeinträchtigt 65
Abb. 18: Claudin-5-Peptide führen zur Umverteilung von Claudin-5 aus der Plasmamembran ins Zytosol, reduzieren Membran-assoziiertes *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) und beeinflussen die Zellmorphologie von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) 68
Abb. 19: Claudin-5-Peptide führen zur Abrundung in primären Endothelzellen 68
Abb. 20: Das *Tight-Junction*-Strangnetzwerk zeigt nach Claudin-5-Peptidbehandlung weniger Komplexität 69
Abb. 21: Claudin-5-Peptide reduzieren die Plasmamembranlokalisation von Claudin-5 und Occludin in monotransfizierten Zellen 72
Abb. 22: Die Wirkung von Claudin-5-Peptiden auf die Durchlässigkeit zellulärer Barrieren ist abhängig von Claudin-5-enthaltenden *Tight Junctions* 73
Abb. 23: Der Effekt von Claudin-5-Peptiden auf die mRNA-Expression von Claudin-1, -5, -12, Occludin und *Zonula occludens* protein-1 (ZO-1) 74
Abb. 24: Das Claudin-5-Peptid C5C2 aber nicht das Kontrollpeptid C2C2 wird in Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) internalisiert 75

Abb. 25: Claudin-5-Peptide liegen kaum albumingebunden vor.....76
Abb. 26: Die Claudin-5-Peptide C5C2 und D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Derivat) erhöhen die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für kleine Moleküle *in vivo*.....79
Abb. 27: Starke Claudin-5-Expression in Gehirn, Lunge und Herz sowie in isolierten Gehirnkapillaren von C57BL/6-Mäusen.....81
Abb. 28: Reduktion der Größe orthotroper Glioblastome im Mausgehirn nach Gabe von Paclitaxel mit vorangegangener Applikation der D-Aminosäure-Variante von C5C2.....82
Abb. 29: Das Claudin-5-Peptid D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Variante) hat keinen negativen Einfluss auf die Gewichtszunahme von Mäusen mit orthotropem Glioblastom 83
Abb. 30: Die D-Aminosäure-Variante von C5C2 ist in Blutplasma stabiler als ihre entsprechende L-Aminosäure-Variante 84
Abb. 31: Die Strukturen von C5C2 und deren D-Aminosäure-Variante sind enantiomer.....86
Abb. 32: Claudin-5-Peptide zeigen überwiegend vergleichbare Zirkulardichroismus-Spektren 87
Abb. 33: Starke Neigung zur Ausbildung von β-Faltblatt- und α-Helixelementen durch Claudin-5-Peptide.....88
Abb. 34: Sequenzidentitäten von Claudin-Peptiden und der ersten extrazellulären Schleife (EZS1) von Claudinen und Occludin.....89
Abb. 35: Extrazelluläre Schleifen (EZS) in murinem Claudin-5 und Claudin-5-EZS1-Peptiden bilden β-Stränge und α-Helices 91
Abb. 36: Protein-Peptid-Interaktionsmodelle der extrazellulären Schleifen (EZS) von murinem Claudin-5 mit murinen Claudin-5-Peptiden 93
Abb. 37: Claudin-12-Defizienz hat keinen Einfluss auf die *Tight-Junction*-Expression in isolierten Gehirnkapillaren sowie die Permeabilität von Na-Fluoreszein (376 Da) und Evans Blue (albumingebunden, 68 kDa) in Gehirn, Leber und Niere.....95
Abb. 38: Claudin-Expressionsprofil im Myokard von C57BL/6-Mäusen zeigt eine hohe Expression von Claudin-5, -12, -15, -25 und ZO-1.....96
Abb. 39: Differenzielle Lokalisation von Zell-Zell-Kontaktproteinen im Myokard von C57BL/6-Mäusen. 98
Abb. 40: Claudin-12-Knockout hat keinen Einfluss auf die Expression von Claudinen, *Tight-Junction*-assoziierten MARVEL-Proteinen und *Zonula occludens* Protein-1 im Mausmyokard.....99
Abb. 41: Zell-Zell-Kontakte der myokardialen Glanzstreifen zeigen nach Claudin-12-Knockout keine strukturellen Veränderungen 100
Abb. 42: Kolokalisation von *Tight*- und *Gap-Junction*-Proteinen in den myokardialen Glanzstreifen von Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) Mäusen.....100
Abb. 43: Hohe Claudin-12-Expression in Niere, Leber, Herz und Pankreas 101
Abb. 44: Keine Unterschiede in der mRNA-Expression ausgewählter Claudine (Cldn), Occludin (Ocln) und *Zonula occludens* Protein-1 (ZO-1) in Organen Claudin-12-defizienter (KO) Mäuse.....102
Abb. 45: Der Vitamin-D-Rezeptor ist in Darm, Niere und Pankreas hochexprimiert und zeigt eine reduzierte mRNA-Expression in Claudin-12-defizienten Mäusen.....103
Abb. 46: Wirkungsmechanismus der Claudin-5-Peptidomimetika. 117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Funktion der Claudin-Subtypen 5
Tab. 2: Pathologisch-bedingte Erhöhung der parazellulären Permeabilität 11
Tab. 3: Eigenschaften von Glioblastomen und Gehirnmetastasen 13
Tab. 4: Modulation parazellulärer Barrieren durch Claudin-beeinflussende Peptide. 17
Tab. 5: Modulation parazellulärer Barrieren durch Peptidomimetika von *Tight-Junction*-assoziierten MARVEL-Proteinen. 18
Tab. 6: *Tight-Junction*-gerichtete Peptide zur Diagnostik und Therapie. 19
Tab. 7: Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien 21
Tab. 8: Geräte 23
Tab. 9: Verbrauchsmaterialien 25
Tab. 10: Reaktionskits 26
Tab. 11: Primärantikörper 26
Tab. 12: Sekundärantikörper 27
Tab. 13: Fluoreszenzdetektion der Sekundärantikörper am Laser-Scanning-Mikroskop 27
Tab. 14: Primersequenzen für Genotypisierung der C57BL/6-Claudin-12-Mäuse 27
Tab. 15: Primersequenzen für quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) 28
Tab. 16: Fluoreszierende Größenmarker für Permeationsexperimente und weitere Farbmarker 29
Tab. 17: Eukaryotische Zellen und Versuchstiere 30
Tab. 18: Software 31
Tab. 19: Peptide 33
Tab. 20: Komplettmedien für die verwendeten Zelllinien 36
Tab. 21: Kulturgefäße und Kultivierungsbedingungen für Peptid-Assays 37
Tab. 22: Reaktionsansatz und Protokoll für die cDNA-Synthese 44
Tab. 23: Reaktionsansatz und Protokoll für die qRT-PCR 45
Tab. 24: Reaktionsansatz und Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung 50
Tab. 25: Tris-Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 53

Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) bilden transzellulären elektrischen Widerstand (TER).....148

Anhang 2: Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) exprimieren Zellkontaktproteine.....148

Anhang 3: Humanes C5C2 und murines C5C2/C-4AS aus der ersten extrazellulären Schleife (EZS) und Peptide der zweiten EZS (human/murin) von Claudin-5 zeigen keine Reduktion der Dichtheit in einem *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke.....149

Anhang 4: C5C2 (300 µM) führt innerhalb von 72 h zu einer nicht reversiblen Permeabilisierung in primären Gehirnkapillarendothelzellen 149

Anhang 5: Transzellulärer elektrischer Widerstand und Lucifer-Yellow-Permeabilität von Claudin-5-experimierenden, epithelialen Zellen nach Behandlung mit hC5C2 oder C5C2/C-4AS. 150

Anhang 6: Vollständiges oder bedingtes Regenerationspotenzial von Endothelzellen (bEND.3) nach Behandlung mit Claudin-5-Peptiden.....150

Anhang 7: Fluoreszenz-markierte Claudin-5-Peptide zeigen eine Reduktion der Dichtheit in einem *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke 151

Anhang 8: Stabilität des Claudin-5-Peptids C5C2 in Albuminpuffer 151

Anhang 9: Keine Unterschiede in der Na-Fluoreszein-Aufnahme in Leber und Niere *in vivo* nach Applikation verschiedener Claudin-Peptide.....152

Anhang 10: Zweifachinjektion des Claudin-5-Peptids D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Derivat) erhöht die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für kleine Moleküle *in vivo* 152

Anhang 11: Andere Applikationssregime zeigen einen Trend in stärkerer Na-Fluoreszein-Permeabilität nach Claudin-5-Peptid-Injektion in C57BL/6-Mäusen.....153

Anhang 12: Applikation der Claudin-5-Peptide über die *A. carotis communis* führt zur erhöhten Gehirn-Gängigkeit von Na-Fluoreszein.....153

Anhang 13: Das humane Claudin-5-Peptid hC5C2 hat keinen negativen Einfluss auf die Gewichtszunahme von NMRI-nu/nu-Mäusen 154

Anhang 14: C5C2/shifted nicht aber C5C2[S22N] und deren entsprechende D-Aminosäure-Variante liegen enantiomer vor.....154

Anhang 15: Sekundärstrukturvorhersagen der Claudin-5-Peptide bestimmt mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie und molekularer Modellierung. 155

Anhang 16: Sequenzidentitäten von Claudin-Peptiden und der ersten extrazellulären Schleife (EZS1) von Claudinen und Occludin.....156

Anhang 17: Strukturmodellvorhersage von murinem Claudin-5 basierend auf der Kristallstruktur von murinem Claudin-15 156

Anhang 18: Expression von Claudinen, *Tight-Junction*-assoziierten MARVEL-Proteinen und *Zonula occludens* Protein-1 im Mausmyokard ist nicht geschlechtsspezifisch 157

Anhang 19: Endotheliale Lokalisation von Zell-Zell-Kontaktproteinen im Myokard von C57BL/6-Mäusen 157

Anhang 20: Claudin-12-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von *Tight-Junction*-Proteinen im Myokard 158

Anhang 21: *Tight Junctions* des myokardialen Endothels sind nicht beeinflusst nach Claudin-12-Knockout.....158

Anhang 22: Typische Struktur der *Gap Junctions* in myokardialen Glanzstreifen 159
Anhang 23: mRNA-Expression von Claudinen, Occludin und *Zonula occludens* Protein-1 in verschiedenen Organen von Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) Mäusen. 159

Abkürzungsverzeichnis

A	
ABC	ATP-*binding cassette*
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
B	
BCRP	*Breast Cancer Resistance Protein*
bEnd.3	endotheliale Maus-Gehirn-zelllinie
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BP	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Caco-2	Zelllinie Colon-Adeno-karzinom
cCPE	C-terminale Sequenz des *Clostridium perfringens* Enterotoxins
CD	Zirkulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
Cldn	Claudin
D	
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´-Triphosphat
E	
E-Face	exoplasmatische Hälfte der Plasmamembran
ECIS	*Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZS	extrazelluläre Schleife
F	
FD	Fluoreszein-Isothiocyanat
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
for	Vorwärts-Primer
G	
GUK	Guanylatkinase
H	
h	human
HBSS+/+	*Hank's Buffered Salt Solution* mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
HEK-293	humane embryonale Nieren-zelllinie
HO	homozygot
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie
I	
I.E.	Internationale Einheit
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IgG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
J	
JAM	*Junctional Adhesion Molecule*
K	
K_d	Dissoziationskonstante
KO	Knockout
L	
LRP-1	*Lipoprotein-related Protein*-1
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
LY	Lucifer Yellow
M	
m	murin
MARVEL	*Myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*
MD3	MARVEL *domain containing* 3
MDCK	Zelllinie Madin-Darby *canine kidney*
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
MRP	*Multidrug Resistance-Related* Proteine
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid
MW	Mediumwechsel
N	
n	Anzahl der durchgeführten Messungen
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert
N-Terminus	Amino-Terminus
ns	nicht signifikant
O	
OATP	Organo-Anion-Transporter
Ocln	Occludin

P	
P-Face	protoplasmatische Hälfte der Plasmamembran
P-gp	p-Glykoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pBCEC	primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen
PBS-/-, +/+	*Phosphate-buffered Saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne/mit Ca^{2+}/Mg^{2+}
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	*Postsynaptic density protein* 95/*Drosophila disc large tumor suppressor/zonula occludens protein*-1
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
P_K	Permeationskoeffizient
PLL	Poly-L-Lysin
PM	Plasmamembran
PP	Phosphatpuffer
ProtK	Proteinase K
Q	
qRT-PCR	Quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion
R	
rev	Rückwärts-Primer
RSK	Rattenschwanzkollagen
RT	Raumtemperatur (~22°C)
S	
SD	*Standard deviation*, Standardabweichung
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat
SEM	*Standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwerts
SH3	SRC homology
shRNA	*Small hairpin* Ribonukleinsäure
siRNA	*Small interfering* Ribonukleinsäure
SLC	*Solute Carrier*
T	
TAMP	*Tight junction*-assoziierte MARVEL-Proteine
TAMRA	5,6-Carboxytetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borsäure-Ethylendiamintetraessigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	*Transcellular electrical resistance*, transzellulärer elektrischer Widerstand
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TFE	Trifluorethanol
TJ	*Tight junctions*
TM	Transmembrandomäne
Tric	Tricellulin
Tris-HCl	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
U	
U	Units
UV	Ultraviolett
V	
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
W	
willk. Einh.	Willkürliche Einheiten
WT	Wildtyp
Y	
YFP	*Yellow Fluorescent Protein*, gelb-fluoreszierendes Protein
Z	
ZO-1	*Zonula Occludens* Protein-1
ZNS	Zentrales Nervensystem
Symbole	
λ_{ab}	Absorptionswellenlänge
λ_{em}	Emmisionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge

Zusammenfassung

Für eine Vielzahl von Wirkstoffen stellt die endotheliale Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine unüberwindliche Barriere dar. Die Permeabilität ist durch *Tight Junctions* limitiert, die den paraendothelialen Spalt abdichten. Das transmembrane *Tight-Junction*-Protein Claudin-5 hat eine essenzielle Rolle für die Barriereintegrität, die durch interzelluläre Bindung seiner extrazellulären Schleifen (EZS) bedingt wird. Daher wurden Peptide aus den EZS von Claudin-5 generiert und hinsichtlich einer BHS-Öffnung charakterisiert.

Das EZS1-Peptid C5C2 und dessen Varianten führten zur Durchlässigkeit zellulärer Barrieren für Moleküle bis etwa 70 kDa einschließlich des normalerweise nicht hirngängigen Zytostatikums Doxorubicin. Peptide, synthetisiert aus D-Aminosäuren (AS), waren proteolytisch stabiler als L-AS-Peptide und führten nach etwa 4 h zur Penetration von Molekülen bis mindestens 547 Da durch die murine BHS. Durch Vorbehandlung von Gliom-tragenden Mäusen mit D-AS-C5C2 war ein Trend zur Tumorreduktion durch das nicht-hirngängige Zytostatikum Paclitaxel zu verzeichnen. Generell wirkten die Peptide *in vivo* sowie *in vitro* temporär und waren gut verträglich sowie nicht zytotoxisch. Grund dafür ist eine hochaffine Bindung an Claudin-5, welche eine Kointernalisierung sowie reduziertes transmembranes Claudin-5 und verringerte mRNA-Expression bedingte. Die hervorgerufene *Tight-Junction*-Störung hatte eine paraendotheliale Permeabilisierung zur Folge. Nach PEP-FOLD-Modellierung glichen die Peptide strukturell der Claudin-5-EZS1 durch die Ausbildung eines β-Faltblattes flankiert von einer α-Helix. Das Assoziationsmodell der Peptide (CABS-dock) zeigte eine Bindung zwischen β-Strang-, α-Helix und unstrukturierten Bereichen.

Zusammenfassend wurden Claudin-5-EZS1-Peptidomimetika identifiziert, die transient und ohne Nebenwirkungen die BHS-Permeabilität für Zytostatika verbessern. Die Peptid-vermittelte Penetration von Wirkstoffen eröffnet damit eine neue spezifische Behandlungsoption zerebraler Krankheiten.

Neben Claudin-5 wird Claudin-12 in der BHS exprimiert, dessen Funktion jedoch unklar bleibt. Die BHS-Funktion war Claudin-12-unabhängig, da bei Claudin-12-Defizienz die Durchlässigkeit unverändert war. Darüber hinaus führte die Abwesenheit von Claudin-12 zu Funktionsstörungen des Herzens bei morphologisch intaktem Myokard und unveränderter Expression anderer Claudine sowie anderer *Tight-Junction*-Proteine. Die verminderte Expression des Vitamin-D-Rezeptors in Dünndarm und Pankreas nach Claudin-12-Knockout deutete auf eine Rolle von Claudin-12 in der Calciumhomöostase hin.

Insgesamt wurde ein Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion und Modulation der BHS geleistet.

Summary

For the majority of drugs, the endothelial blood-brain barrier (BBB) strongly obstructs the treatment of brain diseases. The BBB permeability is limited by tight junctions closing the paracellular cleft of the endothelium. Especially, the transmembrane tight-junction protein claudin-5 plays an essential role for the barrier integrity due to its highly affine intercellular binding between the extracellular loops (ECLs). Therefore, peptides derived from the ECLs of Claudin-5 were characterized regarding their potential to open the BBB.

The ECL1 peptide C5C2 and its variants caused permeability of cellular barriers for molecules up to 70 kDa including the non-brain-permeable cytostatic drug doxorubicin. Peptides synthesized from D-amino acids (aa) were proteolytically more stable than L-aa peptides and caused murine BBB penetration of molecules with a size of at least 547 Da at about 4 hours. A trend in tumour reduction by the non-brain-permeable cytostatic drug paclitaxel was observed after pre-treatment of glioma-bearing mice with D-aa-C5C2. In general, the *in vivo* and *in vitro* peptide effect was transient and the peptides were well-tolerated and without cytotoxic effects, respectively. This is due to a high affinity peptide binding to claudin-5 resulting in a cointernalisation as well as in reduced transmembrane claudin-5 and mRNA expression. These alterations impair the morphological tight-junction structure and therefore propagate increased paraendothelial permeability. The peptides modelled with PEP-FOLD structurally resemble claudin-5 ECL1 by showing a β-sheet flanked by one α-helix. The association model of the peptides (CABS-dock) showed a binding via β-strands, α-helices and unstructured parts.

Overall, claudin-5 ECL1 peptides have been identified that improve the BBB permeability of cytostatic drugs transiently and without adverse side effects. The peptide-mediated penetration of drugs opens new specific treatment options for cerebral diseases.

Besides claudin-5, claudin-12 is expressed at the BBB but its function remains unknown. Claudin-12 knockout mice showed no BBB permeability suggesting that the barrier function was claudin-12 independent. Beyond, the absence of claudin-12 resulted in functional impairments of the heart with morphologically intact myocardium and unchanged expression of other claudins as well as other tight-junction proteins. In small intestine and pancreas, the expression of the vitamin D receptor is decreased in claudin-12 knockout mice pointing at a role of claudin-12 in the calcium homeostasis.

Taken together, this work makes a contribution to a better understanding of the BBB function and modulation.

1 Einleitung

1.1 Aufbau zellulärer Barrieren

Um an ihren Wirkort zu gelangen, müssen Substanzen Gewebebarrieren überwinden. In höheren Organismen dienen Epithelien und Endothelien als Barrieren gegenüber äußeren sowie inneren Einflüssen und grenzen Organe, Gewebe sowie Organkompartimente voneinander ab (Powell, 1981). Dazu sind benachbarte Zellmembranen lateral über Zell-Zell-Kontakte verbunden und sorgen für eine Polarisierung der Zellen, wodurch sich der apikale und basale Pol strukturell und funktionell voneinander unterscheiden (Rodriguez-Boulan und Macara, 2014). Diese Zell-Zell-Kontakte sind *Tight Junctions*, *Adherens Junctions*, Desmosomen (nur Epithelzellen) und *Gap Junctions* (Farquhar und Palade, 1963; Abb. 1).

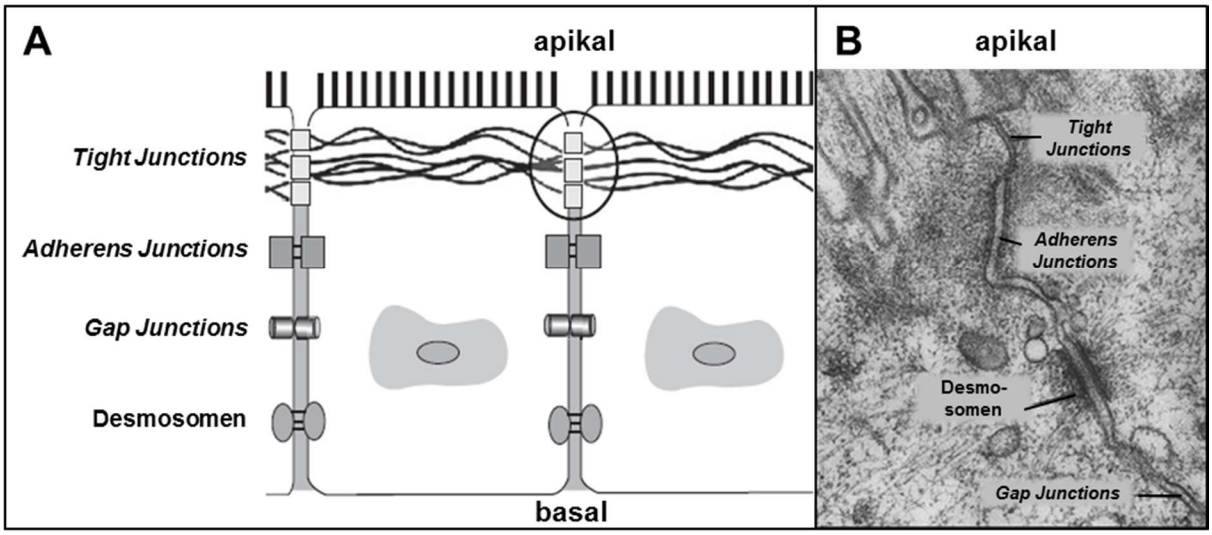


Abb. 1: Epitheliale Zell-Zell-Kontakte. (A) Schema modifiziert nach Johnson, 2005. **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Pollard et al., 2016): *Tight Junctions* sind dem apikalen Zellpol am nächsten, umspannen die Zelle gürtelartig und dichten den extrazellulären Spalt ab. *Adherens Junctions* und Desmosomen verankern die Zelle mit dem Zytoskelett (elektronendichte Ausläufer). *Gap Junctions* bilden Kanäle zur interzellulären Kommunikation.

Adherens Junctions dienen der Bildung und Stabilisierung interzellulärer Kontakte über die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett. Sie sind an der Ausbildung von *Tight Junctions* (Hartsock und Nelson, 2008; Itoh et al., 1997) sowie der generellen Entwicklung und Aufrechterhaltung zellulärer Barrieren beteiligt (Baum und Georgiou, 2011). In Epithelien liegen *Tight* und *Adherens Junctions* deutlich voneinander getrennt vor, in Endothelien jedoch als Mischkontakte (Schulze und Firth, 1993). Cadherine und Nectine gelten als wichtige Vertreter der *Adherens Junctions* und halten die *Tight-Junction*-abhängige Zellbarriere aufrecht (Irie et al., 2004; Tunggal et al., 2005).

Desmosomen sorgen für eine starke interzelluläre Zell-Adhäsion und zytoskelettale Verankerung, weswegen sie vor allem in Organen, die starker mechanischer Belastung ausgesetzt sind (z.B. Herz und Haut), vorkommen (Thomason et al., 2010).

Gap Junctions interagieren mit *Tight Junctions* in verschiedenen Zelltypen (Farquhar und Palade, 1963; Wagner und Kachar, 1995) und tragen dabei zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion bei (Nagasawa et al., 2006). Die Connexin-Familie ist von essenzieller Bedeutung für die Funktionen der *Gap Junctions* (Chen et al., 2015a; Kwak et al., 2001). Connexine bilden *Gap-Junction*-Kanäle, die Zellen elektro- und biochemisch durch einen Austausch von Ionen, Botenstoffen und kleinen Metaboliten miteinander verknüpfen.

1.2 Struktur und Funktion der *Tight Junctions*

Tight Junctions, die apikalsten Zell-Zell-Kontakte in Epithelien, sind charakterisiert durch ein Strangnetzwerk (Abb. 2B), das eine enge Assoziation lateraler Membranen benachbarter Zellen bedingt (Farquhar und Palade, 1963; Abb. 2A). Die Stränge zeigen in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie Partikel mit einer Größe von ~10 nm (Staehelin, 1973). *Tight Junctions* verschließen nicht nur den interzellulären Spalt zweier benachbarter Zellen sondern bilden auch trizelluläre *Tight Junctions* in Dreizell-Kontakten (Staehelin, 1973).

Die Hauptfunktion von *Tight Junctions* ist die Abdichtungsfunktion des Interzellularraums (parazelluläre Barriere). Dies hat eine limitierte Diffusion von löslichen Substanzen, Ionen, Immunzellen und Pathogenen aber auch von Pharmaka zur Folge (Kirschner et al., 2013; Shen et al., 2011). Die *Tight-Junction*-abhängige parazelluläre Permeabilität ist größen- und ladungsselektiv sowie stark variabel in verschiedenen Geweben und Barrieren (Anderson und Van Itallie, 2009; Krause et al., 2008). *Tight Junctions* umspannen die Zellen ringförmig und sorgen somit für eine Trennung von apikaler und basolateraler Membran (Cao et al., 2012). Dadurch verhindern sie die laterale Diffusion von Lipiden oder Membranproteinen entlang der Plasmamembran (Cereijido et al., 1998). Ebenso werden *Tight Junctions* durch Phosphorylierung reguliert und sind beteiligt an Regulationsprozessen wie z.B. der Zellproliferation und -differenzierung (Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Matter et al., 2005).

Morphologisch gestörte *Tight Junctions* beeinflussen die Barriere-Integrität z.B. durch pathogenbedingte Reorganisation bei Virusinfektionen (Boven et al., 2000; Liu et al., 2009), Entzündungen (Prasad et al., 2005), Tumorprogression (Martin und Jiang, 2009) oder Alkoholexposition (Koval, 2013).

Tight Junctions bestehen aus mehr als 40 Proteinen (Schneeberger und Lynch, 2004). Dazu gehören Transmembranproteine sowie intrazelluläre Proteine, die sowohl mit den Transmembranproteinen als auch mit Adapterproteinen auf intrazellulärer Seite interagieren. Adapterproteine vernetzen die *Tight-Junction*-Proteine mit Signalproteinen und dem Zytoskelett.

Hauptkomponenten der *Tight Junctions* in Bezug auf Strukturgebung und Funktion sind Claudine (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999a). Weitere Komponenten sind *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine (TAMP; Raleigh et al., 2010), *Junctional Adhesion Molecules* (JAM; Martin-Padura et al., 1998) und zytosolische *Tight-Junction*-assoziierte Proteine (z.B. *Zonula occludens* (ZO)-Proteine; Guillemot et al., 2008) (Abb. 2C).

Die *Tight-Junction*-Proteine unterliegen einem kontinuierlichen Turnover, der vor allem durch Endozytose vermittelt wird. Nach Clathrin-abhängiger Endozytose (Ivanov et al., 2004; Zwanziger et al., 2012b), Caveolin-abhängiger Endozytose (Stamatovic et al., 2009) oder Makropinozytose (Bruewer et al., 2005) erfolgt entweder ein lysosomaler Abbau der *Tight-Junction*-Proteine oder ein Recycling zurück zur Plasmamembran (Gehne et al., 2017; Stamatovic et al., 2009; Takahashi et al., 2009).

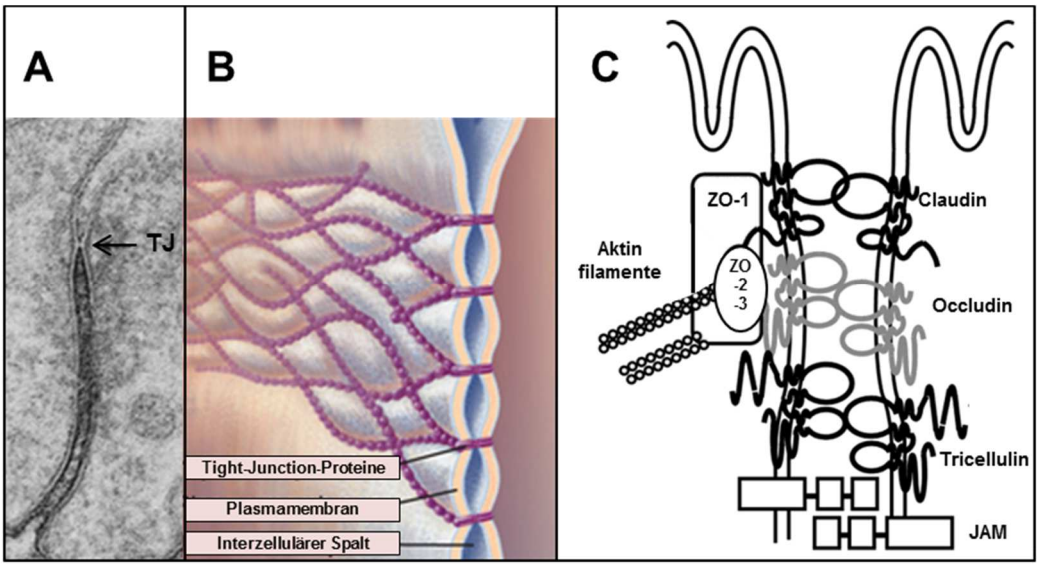


Abb. 2: Aufbau der *Tight Junctions*. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme (Pollard et al., 2016). *Tight-Junction*-Kontakt (TJ, Pfeil) zwischen zwei Endothelzellen. **(B)** Schema eines Strang-Netzwerks gebildet aus *Tight-Junction*-Proteinen modifiziert nach Pollard et al., 2016. Abdichtung des interzellulären Spalts. **(C)** Komponenten der *Tight Junctions* modifiziert nach Kondoh et al., 2006. Transmembranproteine: Claudine, Occludin, Tricellulin (angereichert im Dreizell-Kontakt, nicht dargestellt), *Junctional Adhesion Molecules* (JAM). Zytosolisch assoziierte Proteine: *Zonula occludens*-Protein (ZO)-1, -2, -3 verbinden *Tight Junctions* mit dem Zytoskelett (Aktinfilamente).

1.2.1 Claudine

Claudine (20-29 kDa, 207-305 Aminosäuren (AS)), deren *Tight-Junction*-Funktion erstmals 1998 beschrieben wurde (Furuse et al., 1998), sind eine multigene Familie aus 27 bisher bekannten Proteinen (Mineta et al., 2011). Sie sind unverzichtbar für die Ausbildung und Abdichtung parazellulärer Barrieren (Furuse und Tsukita, 2006; Krause et al., 2008). Aufgebaut sind sie aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen (EZS1: 49-52 AS; EZS2: 16-33 AS), einer intrazellulären Schleife, einem kurzen N-terminalem Segment (2-6 AS) und einem variablen C-terminalen Teil (21-63 AS) (Shinoda et al., 2016; Suzuki et al., 2014). Ausgehend von den bisher bekannten Kristallstrukturen zu Claudin-15 (Suzuki et al., 2014), -19 (Saitoh et al., 2015) und -4 (Shinoda et al., 2016) bilden die Claudine vier Transmembranhelices und eine extrazelluläre Strukturdomäne bestehend aus den fünf β-Strängen beider EZS (EZS1: β1-4, EZS2: β5). Beide EZS enthalten eine kurze Helixsequenz (EZS1: C-terminal, EZS2: N-terminal; Suzuki et al., 2014, Abb. 3A).

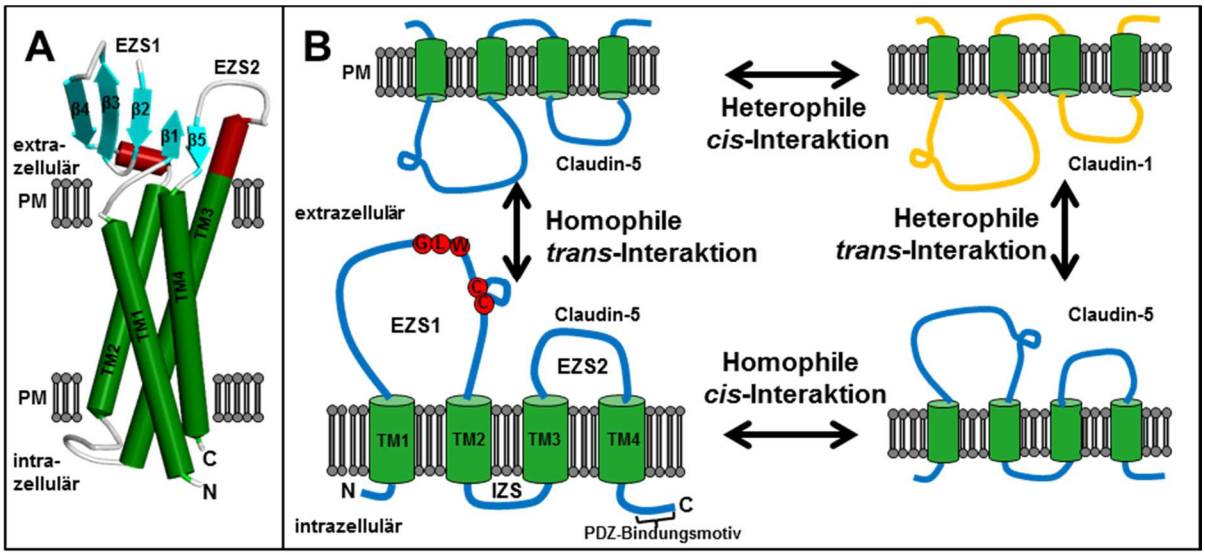


Abb. 3: Struktur und Interaktion von Claudinen. (A) Schema der Claudin-Struktur anhand des Kristall-Modells für Claudin-15 (Suzuki et al., 2014). Vier Transmembrandomänen (TM, grün) durchspannen die Plasmamembran (PM). Neben einem intrazellulären N- und C-Terminus (N/C; C-Terminus bedingt durch Kristallisation um 33 AS verkürzt), enthalten Claudine eine intrazelluläre Schleife und zwei extrazelluläre Schleifen (EZS). Die EZS1 bildet vier antiparallele β-Stränge (β1-4, blau), die durch einen β-Strang von EZS2 (β5) zu einem gemeinsamen β-Faltblatt verlängert werden. Diese EZS-Domäne wird von je einer α-Helix (rot) der EZS1 und EZS2 flankiert. Grau, unstrukturierte Bereiche. **(B)** Claudin-Interaktionen: *Trans*-Interaktionen zwischen Claudinen benachbarter Zellmembranen sowie *cis*-Interaktionen entlang derselben Zellmembran. Homophile Interaktion (zwischen einem Subtyp, blau), heterophile Interaktion (zwischen zwei Subtypen, blau/gelb). Konserviertes Motiv (rote Kreise) aller Claudin-EZS1, welches zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke (C-C) führt. PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus als Interaktionsdomäne für *Zonula occludens*-Proteine; IZS, intrazelluläre Schleife.

Strukturell lassen sich klassische Claudine mit hoher Sequenzähnlichkeit (Claudine 1-10, 14, 15, 17, 19) und nicht-klassische Claudine mit variablen Sequenzen (11-13, 16, 18, 20-27) unterscheiden (Tab. 1; Krause et al., 2008; Mineta et al., 2011). Funktionell kann eine Unterscheidung zwischen Barriere- und Poren-bildenden Claudinen vorgenommen werden. Teilweise wurden widersprüchliche Funktionen beschrieben (z.B. Claudin-4; Hou et al., 2010; Van Itallie et al., 2001) oder die Funktion ist noch unklar (Tab. 1).

Tab. 1: Funktion der Claudin-Subtypen

Funktion	Abdichtung	Porenbildung	unklar
Klassische Claudine	**1** (Inai et al., 1999) **3** (Milatz et al., 2010) **4** (Van Itallie et al., 2001) **5** (Nitta et al., 2003) **6** (Sas et al., 2008), **8** (Yu et al., 2003) **9** (Sas et al., 2008) **14** (Ben-Yosef et al., 2003) **19** (Hou et al., 2008)	**2** (Furuse et al., 2001) **4** (Hou et al., 2010) **7** (Hou et al., 2006) **10** (Van Itallie et al., 2006) **15** (Colegio et al., 2002) **17** (Krug et al., 2012)	
Nicht-klassische Claudine	**11** (McCabe et al., 2016) **18** (Jovov et al., 2007) **25** (Ohnishi et al., 2017)	**16** (Hou et al., 2008) **21** (Tanaka et al., 2016)	**12, 13, 20, 22, 23, 24, 26, 27**

In verschiedenen Gewebebarrieren unterscheiden sich die Claudine im Expressionsmuster (Kirk et al., 2010; Rahner et al., 2001) und bedingen somit funktionelle Unterschiede (Günzel, 2017). Claudine kommen auch außerhalb der Zell-Zell-Kontakte vor (z.B. in basolateraler Membran: Claudin-7 (Inai et al., 2007) oder Claudin-1 (Gregory et al., 2001)). Deren dortige Funktion ist jedoch noch unbekannt.

Tight Junctions sind durch Dimerisierung der extrazellulären Domänen von Claudinen gegenüberliegender Zellmembranen aufgebaut (Rossa et al., 2014; Van Itallie et al., 2011). Die dadurch entstehenden *Tight-Junction*-Stränge (Piehl et al., 2010; Piontek et al., 2008) bedingen somit die Abdichtung (Colegio et al., 2003; Wen et al., 2004) bzw. die parazelluläre Ionenselektivität (Colegio et al., 2002; Veshnyakova et al., 2012). Die beiden konservierten Cysteine in der EZS1 und die darüber gebildete intramolekulare Disulfidbrücke sind Teil einer Konsensus-Sequenz (G-L-W-x-x-C-[7-9 AS]-C; 7-9 AS: polar/geladen; Günzel und Yu, 2013). Das C-terminale Ende vieler Claudine enthält eine konservierte Sequenz (PDZ-Bindungsmotiv) bestehend aus sechs der letzten sieben AS (Zhang et al., 2006), über die die Claudine an eine Domäne der ZO-Proteine (PDZ1-Domäne) binden (Itoh et al., 1999; Ruffer und Gerke, 2004, Abb. 3B, unten links).

Die genannte Claudin-Claudin-Bindung über die EZS-Domänen kann zwischen Claudinen entlang der Zellmembran derselben Zelle (*cis*-Interkation) oder einer benachbarten Zelle (*trans*-Interaktion) erfolgen. Neben der Wechselwirkung zwischen Claudinen desselben Subtyps (homophile Interaktion) ist auch eine Assoziation zwei verschiedener Subtypen (heterophile Interkation) möglich (Abb. 3B). Die Affinität für homo-/heterophile *cis*- und *trans*-Interaktionen ist von den Subtypen abhängig (Daugherty et al., 2007; Furuse et al., 1999; Piontek et al., 2011). Die Bindung zwischen einzelnen Claudinpaaren kann dabei hochaffin sein (Dabrowski et al., 2015).

Da für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Claudine 5 und 12 essenziell sind, werden diese im Folgenden genauer dargestellt.

1.2.1.1 Claudin-5

Claudin-5 (23 kDa, 218 AS) ist ein Barriere-bildendes Claudin (Amasheh et al., 2005), welches vor allem in der Blut-Hirn-Schranke (BHS) die Hauptfunktion in der parazellulären Abdichtung hat (Campbell et al., 2008; Nitta et al., 2003). Es kommt in großen Mengen im Gehirnendothel (Morita et al., 1999b) aber auch in diversen anderen Organendothelien z.B. der Haut (Morita et al., 2003), der Leber (Rahner et al., 2001), der Niere und Lunge (Morita et al., 1999b) vor. Organe mit epithelialer Claudin-5-Expression sind z.B. Uterus (Biazik et al., 2008), Testis (Morrow et al., 2009), Lunge (Wang et al., 2003), Darm und Pankreas (Rahner et al., 2001). Darüber hinaus wurde es in Kardiomyozyten nachgewiesen (Sanford et al., 2005).

Interagieren kann es über homophile und heterophile (z.B. mit Claudin-1, -3) *trans*- und *cis*-Interaktionen (Coyne et al., 2003; Daugherty et al., 2007; Piontek et al., 2011). Die Ausbildung von Claudin-5-*Tight-Junction*-Strängen wird durch ZO-1 und Occludin beeinflusst (Cording et al., 2013; Ruffer und Gerke, 2004). *Tight-Junction*-Stränge in Zellen, monotransfiziert mit Claudin-5, sind mit der exoplasmatischen Hälfte (E-face) assoziiert, wie durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurde (Piontek et al., 2008; Rossa et al., 2014). Eine E-Face-Assoziation liegt auch in Zellkulturmodellen der BHS vor (Abb. 4A), wobei die BHS *in vivo* sowohl *Tight-Junction*-Stränge auf der E-Face als auch auf der protoplasmatischen Hälfte (P-Face) aufweist (Abb. 4B; Wolburg et al., 2009). Die Internalisierung von Claudin-5 erfolgt vorwiegend über Caveolin-anhängige Endozytose (Stamatovic et al., 2009; Zwanziger et al., 2012b). Claudin-5 wird anschließend recycelt (Gehne et al., 2017; Stamatovic et al., 2009) oder nach Polyubiquitinylierung abgebaut (Liu et al., 2016; Mandel et al., 2012).

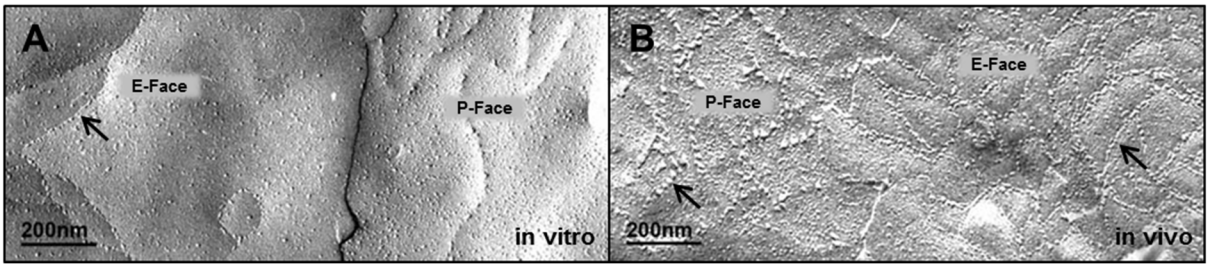


Abb. 4: Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von *Tight Junctions* in Gehirnkapillarendothelzellen. Modifiziert nach Wolburg et al., 2009. **(A)** Zellkulturmodell. *Tight-Junction*-Stränge (Pfeile) auf der exoplasmatischen Hälfte (E-Face) der Plasmamembran. **(B)** *in vivo*. *Tight-Junction*-Stränge (Pfeile) assoziiert mit der protoplasmatischen Hälfte (P-Face) und E-Face der Plasmamembran.

1.2.1.2 Claudin-12

Claudin-12 (27 kDa, 244 AS) ist ein nicht klassisches Claudin, das zu klassischen Claudinen nur eine Sequenzähnlichkeit von 33-36 % aufweist (Haseloff et al., 2015). Im Gegensatz zu den meisten anderen Claudinen (Itoh et al., 1999) hat Claudin-12 kein PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus und zeigt keine homophile *cis*-Interaktion (Piontek et al., 2011).

Nachgewiesen wurde es in Gehirnendothelzellen (Nitta et al., 2003) und mit einem hohen Anteil an der Claudin-Expression in Niere (Hwang et al., 2014) und im Darmepithel (Hwang et al., 2014; Lameris et al., 2013). Weitere Organe bzw. Gewebe mit Claudin-12-Expression sind Leber, Lunge (Hwang et al., 2014), Haut (Epidermis/Haarfollikel; Brandner et al., 2003; Troy et al., 2005), Harnblase (Acharya et al., 2004), Speicheldrüse (Mellas et al., 2015), Magen (Hewitt et al., 2006), Retina (Luo et al., 2011), Placenta (Ahn et al., 2015) und Testis (Haverfield et al., 2014). In Enterozyten spielt Claudin-12 eine Rolle bei der Vitamin-D-abhängigen Ca^{2+}-Absorption (Christakos et al., 2010; Fujita et al., 2008).

1.2.2 *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine

Die Struktur der TAMP-Familie ähnelt der von Claudinen, obwohl die Sequenzen sich stark unterscheiden (vier Transmembrandomänen, zytosolischer N- und C-Terminus, eine intrazelluläre und zwei extrazelluläre Schleifen; Raleigh et al., 2010). Vertreter der TAMP-Familie sind Occludin (Furuse et al., 1993), Tricellulin (Ikenouchi et al., 2005) und MarvelD3 (Steed et al., 2009). TAMP bilden *Tight-Junction*-Stränge in Anwesenheit anderer *Tight-Junction*-Proteine (z.B. Claudine; Cording et al., 2013). Sie weisen heterophile (Occludin-MarvelD3, Tricellulin-MarvelD3) und homophile (Occludin, Tricellulin, MarvelD3) *cis*-Interaktionen sowie homophile *trans*-Interaktionen (Occludin) auf (Cording et al., 2013).

Die genaue Funktion von Occludin (65 kDa) ist unklar. Bekannt ist, dass es wichtig für die parazelluläre Barrierefunktion und die *Tight-Junction*-Ausbildung ist (Balda et al., 1996;

Hirase et al., 1997). Dabei ist insbesondere die Polyphosphorylierung von Occludin von Bedeutung (Wong, 1997). Knockout-Studien bestätigen eine Barrierefunktion von Occludin nicht (Saitou et al., 1998; Schulzke et al., 2005). Daher wird davon ausgegangen, dass Occludin indirekt die Permeabilität beeinflusst (Saitou et al., 2000). Da Occludin, soweit bekannt, in allen *Tight Junctions* vorkommt, gilt es als *Tight-Junction*-Marker (Wong, 1997). Außer mit Claudinen (Cording et al., 2013) interagiert Occludin mit ZO-Proteinen (Fanning et al., 1998; Li und Mrsny, 2000) und *Gap-Junction*-Proteinen (Herve et al., 2004). Tricellulin ist lokalisiert an trizellulären *Tight Junctions* (Cording et al., 2013; Ikenouchi et al., 2005), kommt aber auch an Zweizell-Kontakten vor (Kojima et al., 2013) und trägt zur parazellulären Barriere bei (Krug et al., 2009). MarvelD3 ist in Epithelien exprimiert und kolokalisiert mit Occludin in Zweizell-Kontakten (Raleigh et al., 2010; Steed et al., 2009).

1.2.3 Zytosolische *Tight-Junction*-assoziierte Proteine

Zu den zytosolischen *Tight-Junction*-assoziierten Proteinen gehören die ZO-Proteine (ZO-1, 225 kDa, Stevenson et al., 1986; ZO-2, 160 kDa, Jesaitis und Goodenough, 1994; ZO-3, 130 kDa, Haskins et al., 1998) mit jeweils drei N-terminalen PDZ-Domänen, einer SRC homology 3 (SH3)-Domäne und einer Guanylatkinase (GUK)-Domäne. Die PDZ1-Domäne ist an der Assoziation mit Claudinen und die PDZ2-Domäne an der Assoziation der ZO-Proteine untereinander beteiligt (Itoh et al., 1999).

Die ZO-Proteine sind Gerüstproteine, die einerseits direkt an Transmembranproteine der *Tight Junctions* binden und andererseits mit Signal- und Strukturproteinen zur Regulation der *Tight-Junction*-Struktur und -Funktion verbunden sind (Fanning und Anderson, 2009). Dadurch werden beispielsweise Occludin (über die GUK-Domäne; Fanning et al., 1998), Claudine (über die PDZ1-Domäne; Itoh et al., 1999) und JAMs (über die PDZ3-Domäne; Itoh et al., 2001) direkt mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Ein Knockdown von ZO-1 und ZO-2 nicht jedoch von ZO-3 sorgt für eine veränderte Lokalisation der Claudine sowie Occludin und dadurch für eine Verminderung der parazellulären Barriere (Fanning et al., 2012; Ikenouchi et al., 2007). Eine nukleäre Lokalisation der ZO-Proteine hat darüber hinaus eine Funktion in der Signaltransduktion (Gottardi et al., 1996; Traweger et al., 2003). Neben *Tight Junctions* sind ZO-Proteine auch an der Bildung und Funktion von *Adherens Junctions* (Ikenouchi et al., 2007) und *Gap Junctions* (Giepmans und Moolenaar, 1998) beteiligt. Deshalb gilt insbesondere ZO-1 als allgemeines Markerprotein für Zell-Zell-Kontakte.

1.2.4 Junctional Adhesion Molecules

JAM (z.B. JAM-A, -B, -C) sind Transmembranproteine der Immunglobulinsuperfamilie, die über Gerüstproteine mit dem Zytoskelett verbunden sind. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit zwei Immunglobulin-artigen Schleifen, einer Transmembran-Domäne und einem kurzen intrazellulären N-Terminus (Severson, 2007). Sie unterstützen andere *Tight-Junction*-Proteine wie Claudine bei der Lokalisation an die *Tight Junctions* (Tornavaca et al., 2015) und stabilisieren somit die Barriere (Bazzoni, 2003). Funktionell sind sie an der Regulation zur Bildung von Zell-Zell-Kontakten, der Zellmigration oder der Mitose und somit an der zellulären Barriereformation, Homöostase und Angiogenese beteiligt (Ebnet, 2017).

1.3 Die Blut-Hirn-Schranke

Ein Charakteristikum des Gehirns ist dessen gute Vaskularisierung durch Gehirnkapillaren, die im humanen Gehirn eine Länge von etwa 650 km und eine Fläche von 10 bis 20 m^2 ausmachen (Begley, 2003; Cecchelli et al., 2007). Das Gehirn benötigt für seine Funktion eine balancierte Homöostase. Daher muss sichergestellt werden, dass keine toxischen Xenobiotika, Stoffwechselprodukte, Pathogene oder Blutzellen das Gehirn erreichen können (Abbott et al., 2010). Diese Aufgaben werden von der Blut-Hirn-Schranke (BHS) übernommen, eine zelluläre Barriere, die aus mikrovaskulären Endothelzellen und der umgebenden Basalmembran unter dem Einfluss von Perizyten, Astrozyten, Mikroglia und Neuronen gebildet wird. Die genannten zellulären Komponenten werden als neurovaskuläre Einheit zusammengefasst (Abb. 5A; Correale und Villa, 2009).

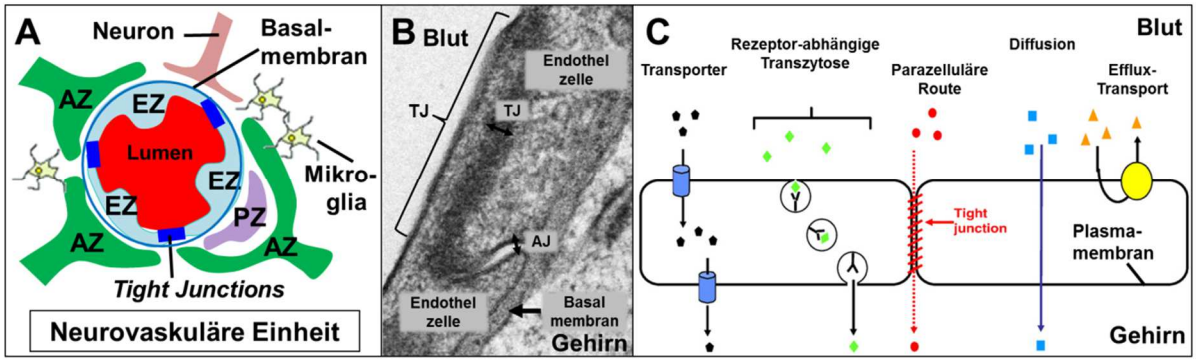


Abb. 5: Aufbau und Passagerouten der Blut-Hirn-Schranke. (A) Schema der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bestehend aus Gehirnkapillarendothelzellen (EZ, hellblau) und deren angrenzender Basalmembran (blauer Ring). Abgedichtet ist der parazelluläre EZ-Spalt durch *Tight Junctions* (dunkelblau). Weitere Komponenten bilden zusammen mit den Endothelzellen die neurovaskuläre Einheit: Astrozyten (AZ, grün), Perizyten (PZ, lila), Neurone (rosa), Mikroglia (gelb). **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme des interzellulären Kontaktes zweier Gehirnkapillarendothelzellen modifiziert nach Weiss et al., 2009. Parazellulärer Spalt abgedichtet durch *Tight Junctions* (TJ): elektronendichtes Material zwischen zwei Endothelzellen. TJ vermischt mit *Adherens Junctions* (AJ). **(C)** Passagerouten durch die BHS modifiziert nach Gabathuler, 2010. Passive Diffusion parazellulär über *Tight Junctions* (rot) oder transzellulär durch Plasmamembran/Zytosol (hellblau). Aktiver transzellulärer Transport über Transporter (dunkelblau) oder rezeptorvermittelt (grün). Rücktransport über Efflux-Transporter (gelb).

Perizyten ummanteln die Endothelzellen zu etwa 30 % (Mathiisen et al., 2010) und unterstützen die BHS-Bildung und -Aufrechterhaltung sowie die Angiogenese. Dadurch wird sowohl die Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS) als auch die neuronale Funktion aufrechterhalten (Winkler et al., 2011). Mikrogliazellen sind an der Immunabwehr der BHS beteiligt und werden besonders unter pathologischen Bedingungen aktiv (Readnower et al., 2010; Zhao et al., 2013). Astrozyten-Endfüße ummanteln 99 % der Endothelzellen (Mathiisen et al., 2010) und fördern die Aufrechterhaltung der BHS-Integrität (Abbott et al., 2006). Die einschichtigen Gehirnendothelzellen (Risau und Wolburg, 1990) sind lateral vollständig durch ein ringförmiges *Tight-Junction*-Strangnetzwerk verschlossen (Wolburg und Lippoldt, 2002). Das BHS-Endothel weist im Vergleich zu anderen Endothelien einen hohen transzellulären elektrischen Widerstand (TER) auf (Butt et al., 1990). Außerdem ist es durch eine geringe pinozytotische Aktivität, geringem vesikulären Transport und dem Fehlen von Fenestrierungen charakterisiert (Abbott et al., 2010; Villegas und Broadwell, 1993).

1.3.1 *Tight Junctions* der Blut-Hirn-Schranke

Die Barrierefunktion der BHS hängt neben den Effluxtransportern (Abb. 5B, gelb; näher beschrieben in 1.3.3) insbesondere von der Struktur und Funktion der *Tight Junctions* ab (Mark und Davis, 2002; van der Goes et al., 2001). Diese dichten den parazellulären Spalt für eine passive Diffusion von Na^+, K^+ sowie Wasser ab und sorgen somit für eine ionische Homöostase (Kimelberg, 2004).

Als dominantes abdichtendes *Tight-Junction*-Protein der BHS gilt Claudin-5, da es in den Kapillarendothelzellen hochexprimiert ist und die endothelialen Zwischenräume abdichtet (Ohtsuki et al., 2007). Bei Verminderung ist die BHS-Barriere gestört (Campbell et al., 2008; Koto et al., 2007). Ein Knockout von Claudin-5 führt zur Durchlässigkeit von Molekülen bis 800 Da (Nitta et al., 2003). Weitere Claudine der BHS sind Claudin-1 (Pfeiffer et al., 2011), Claudin-3 (Wolburg et al., 2003b) und Claudin-12 (Nitta et al., 2003). Claudin-1 und Claudin-3 sind im Verhältnis zu Claudin-5 sehr gering exprimiert (Ohtsuki et al., 2008). Beide Subtypen sind abdichtend (Inai et al., 1999; Milatz et al., 2010), wobei deren Funktion in der BHS unklar ist. Eine geringere BHS-Permeabilität wird beschrieben, wenn Claudin-1 in transgegen Mäusen überexprimiert ist (Pfeiffer et al., 2011). Auch für Claudin-3 wird eine BHS-Barrierefunktion angenommen (Wolburg et al., 2003b).

Des Weiteren wurden Claudin-11, -20, -25 (Berndt, 2017), Occludin (Hirase et al., 1997), Tricellulin (Iwamoto et al., 2014; Mariano et al., 2013), ZO-1 (Watson et al., 1991) und JAM-A sowie JAM-C (Aurrand-Lions et al., 2001; Yeung et al., 2008) in *Tight Junctions* von Ge-

hirnendothelkapillaren nachgewiesen. Bis auf Claudin-5 wurde bisher für kein anderes *Tight-Junction*-Protein eine klare Funktion an der BHS beschrieben.

1.3.2 Pathologische Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke

Beeinträchtigungen der BHS führen zu einer Imbalance von Ionen- und Molekülflux, einer erhöhten Extravasation von Blutzellen sowie einer gestörten *Tight-Junction*-Morphologie (Rosenberg, 2012; Weiss et al., 2009). Für verschiedene Krankheiten ist ebenso eine erhöhte parazelluläre Permeabilität nachgewiesen worden (Tab. 2). Dazu zählen die Alzheimer-Erkrankung (Biron et al., 2011; Hartz et al., 2012), ZNS-Entzündungen (Argaw et al., 2012; Pfeiffer et al., 2011) und ischämische Erkrankungen wie Schlaganfall (Sandoval und Witt, 2008). Letztere werden insbesondere durch Adipositas (Li et al., 2016), Diabetes Mellitus (Venkat et al., 2017) oder Mikroangiopathien (Arba et al., 2017) begünstigt.

Die Endothelzellen reagieren auf pro-inflammatorische Stimuli wie Thrombin, Histamin, Tumornekrosefaktor-α oder Botenstoffe/Toxine von Tumorzellen bzw. Mikroorganismen mit einer erhöhten parazellulären BHS-Durchlässigkeit (Schellenberg et al., 2012; Xie et al., 2010). Andererseits können anti-inflammatorische Mediatoren wie Sphingosin-1-phosphat und Angiopoetin-1 zu einer Abdichtung führen (Mehta und Malik, 2006).

Tab. 2: Pathologisch-bedingte Erhöhung der parazellulären Permeabilität

Erkrankungen	
Neurologische Erkrankungen	
Alzheimer-Erkrankung	(Montagne et al., 2017; Zlokovic, 2011)
Multiple Sklerose	(Alvarez et al., 2011)
Amyotrophe Lateralsklerose	(Brylev et al., 2012; Henkel et al., 2009)
Epilepsie	(Marchi et al., 2012)
Schmerz	(Brooks et al., 2005; Huber et al., 2001)
Ischämie/Hypoxie	(Merali et al., 2017; Sandoval und Witt, 2008)
Gehirntumore	(Ishihara et al., 2008; Wolburg et al., 2003b)
Alkohol-/Drogenmissbrauch	(Rubio-Araiz et al., 2017; Sajja et al., 2016)
Schädel-Hirn-Trauma	(Higashida et al., 2011; Jungner et al., 2016)
Infektionen	
Viral	(Spindler und Hsu, 2012)
Bakteriell	(van Sorge und Doran, 2012)
Bluthochdruck	(Mohammadi und Dehghani, 2014; Setiadi et al., 2017)

1.3.3 Passagerouten durch die Blut-Hirn-Schranke

BHS-permeable Substanzen überwinden diese entweder über passive Diffusion, Transporter oder Rezeptor-vermittelte Transzytose (Abb. 5C; Mikitsh und Chacko, 2014). Transzellulär diffundieren kleine gasförmige Moleküle wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sowie lipophile Moleküle. Letztere sind membrangängig, wenn sie einen log P-Wert < 5 (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffzient, Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie), nicht mehr als 5 Donatoren bzw. 10 Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen und eine Molekülmasse bis 500 Da aufweisen (Lipinski et al., 1997). Andere Substanzen können die BHS transzellulär mittels Rezeptor-vermittelter Transzytose oder Transportern passieren (Gabathuler, 2010).

Beispielsweise werden hydrophile Nährstoffe wie Glucose über *Solute Carrier* (SLC)-Transporter in der luminalen und abluminalen Endothelzellmembran aufgenommen (Tsuji, 2005). Organo-Anion-Transporter (OATP), lokalisiert an der BHS (Gao et al., 1999; Thompson et al., 2014), transportieren neuroaktive Peptide und entfernen Stoffwechselprodukte wie z.B. Glucuronide und Sulfate (Hagenbuch und Meier, 2003). Andere Peptide permeieren die BHS über spezifische Rezeptoren (z.B. Leptin; Bjorbaek et al., 1998 und Transferrin; Zhang und Pardridge, 2001). Die parazelluläre Route ist durch *Tight Junctions* stark limitiert (Bauer und Traweger, 2016; Bauer et al., 2014).

Des Weiteren verhindern Efflux-Transporter und metabolische Enzyme durch die Ausschleusung oder den Abbau entsprechender Substanzen eine Anreicherung im Gehirn (Abb. 5C; El-Bacha und Minn, 1999; Löscher und Potschka, 2002). Wichtige Efflux-Transporter der BHS sind ABC (ATP *binding cassette*)-Transporter wie p-Glykoprotein (P-gp), *Multidrug Resistance-Related* Proteine (MRP)1-6 und *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) (Morris et al., 2017; Saidijam et al., 2017). P-gp schleust toxische Substanzen aber auch viele Pharmaka sowie Metabolite aus den Zellen (Tsuji, 1998) und ist neben der BHS auch in Leber, Niere und Darm exprimiert (Cordon-Cardo et al., 1990). Es interagiert mit mehr als 300 Substanzen (Wang et al., 2011) darunter Chemotherapeutika wie Doxorubicin (Ohnishi et al., 1995) und Paclitaxel (Sparreboom et al., 1997). Eine Hochregulation, beispielsweise ausgelöst durch zerebrale Ischämie, Epilepsie oder Schizophrenie, sorgt für eine Wirkstoffresistenz (Cen et al., 2013; Feldmann und Koepp, 2016; Hoosain et al., 2015).

1.3.4 Wirkstoffdurchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke

Abdichtungs- und Effluxtransportmechanismen erschweren die Behandlung von ZNS-Erkrankungen bei mehr als 98 % der Wirkstoffe (Pardridge, 2005). In der Regel sind lipophile Wirkstoffe BHS-gängig, die kleiner als 500 Da sowie kein ABC-Transporter-Substrat sind und

einen log P-Wert < 5 sowie eine geringe Voraussetzung für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken aufweisen (Lipinski et al., 1997; Pardridge, 2012). Andere Pharmaka permeieren über transzelluläre Transportprozesse oder diffundieren über die parazelluläre Route, wenn diese durch Wirkverstärker geöffnet wurde. Aus diesen Gründen ist die Zulassungsrate von ZNS-Wirkstoffen nur halb so hoch wie von nicht-ZNS-Wirkstoffen (Kaitlin, 2014). Durch die BHS-Funktion ist die Verbesserung der Pharmakapenetration von hoher Relevanz.

1.3.4.1 Limitierte Behandlungsmöglichkeiten von Gliomen und Gehirnmetastasen

Primäre Gehirntumore machen 2 % aller Krebsarten aus (Ferlay et al., 2010), wobei die aggressiven Glioblastome anteilig stark vertreten sind (Tab. 3). Dazu kommen Gehirnmetastasen, die sich bei 9-40 % der Krebspatienten bilden (je nach Studie und Primärtumor; Nayak et al., 2012; Patchell, 2003; Schouten et al., 2002). Bei Kindern und Jugendlichen sind ZNS-Tumore die zweithäufigste Tumorerkrankung (Howlader et al., 2013; Ries et al., 1999). Risikoreiche konventionelle Therapien als Kombination aus Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie haben schlechte Heilungs- und Überlebensprognosen zur Folge (Tab. 3). Normalerweise wirksame Chemotherapeutika wie z.B. Doxorubicin und Paclitaxel (Belani, 2000) sind durch die BHS nur wenig effektiv (Heimans et al., 1994; Lesniak et al., 2005).

Tab. 3: Eigenschaften von Glioblastomen und Gehirnmetastasen

	Glioblastome		**Gehirnmetastasen**	
Vorkommen	15-60 % aller Gliome (je nach Studie)	(Mehta et al., 2011; Ostrom et al., 2016)	bei 9-40 % der Krebspatienten	(Nayak et al., 2012; Patchell, 2003; Schouten et al., 2002)
			Primärkarzinome: Lunge (50 %), Brust (15-20 %), Haut (10-15 %)	(Kamar und Posner, 2010; Schouten et al., 2002)
Prognose	mittlere Überlebenszeit:		mittlere Überlebenszeit:	
	14 Monate	(Johnson und O'Neill, 2012)	3-17 Monate	(Bernhardt et al., 2017)
	43 Monate (Kinder)	(Song et al., 2010)		
Therapie	Kombination aus Chirurgie, Bestrahlung, Chemotherapie			
	(Stupp et al., 2009; Stupp et al., 2005)		(Platta et al., 2010; Soffietti et al., 2006)	
Therapierisiken	neurokognitive Schäden	(Mulhern et al., 2005; Ris et al., 2001)		
	hormonelle Schäden	(Laughton et al., 2008)		
	Hörschädigung	(Hua et al., 2008)		
	Tumorrezidiv	(Meadows et al., 2009; Neglia et al., 2006)		
	Strahlungsnekrose	(Murphy et al., 2012)		
	reduzierte Lebensqualität	(Gurney et al., 2009; Zeltzer et al., 2009)		

1.4 Ansätze zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Zur Wirkstoffschleusung über die BHS wurden verschiedene Methoden entwickelt, die in ähnlicher Weise ebenso bei der zerebralen Gentherapie Anwendung finden (Fu und McCarty, 2016; Maguire et al., 2014). Ein Angriffspunkt ist die Reorganisation des *Tight-Junction*-Komplexes zur Öffnung der parazellulären Route (Abb. 6, Mitte). Beispielsweise führt hochintensiver fokussierter Ultraschall präklinisch zur erhöhten Zytostatikapermeabilität (Liu et al., 2010) nach komplettem BHS-Zusammenbruch (Burgess et al., 2011). Andere unspezifische Modulationen sind hyperosmolares Mannitol (Kobrinsky et al., 1999; BHS-Zusammenbruch, stark invasiv: Cosolo et al., 1989), Caprat (Del Vecchio et al., 2012; BHS-Zusammenbruch, stark invasiv: Preston et al., 2008) und kurzkettige Alkylglyzerole (Hülper et al., 2013: stark invasiv). Auch ist über die Wirkung des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) die parazelluläre Barriere durch eine Verringerung von *Tight-Junction*-Proteinen wie Claudin-5 gestört (Wen et al., 2017). VEGF konnte somit die Wirkstoffpenetration erhöhen, führte jedoch zur BHS-Öffnung für große Moleküle und birgt Risiken für unspezifische Effekte in peripheren Organen (Jiang et al., 2014). Eine spezifische Beeinflussung von Claudin-5 über siRNA (Campbell et al., 2008), shRNA (Campbell et al., 2011) oder monoklonale Antikörper (Hashimoto et al., 2017) weist dagegen eine transiente und nicht toxischen Erhöhung der BHS-Durchlässigkeit auf.

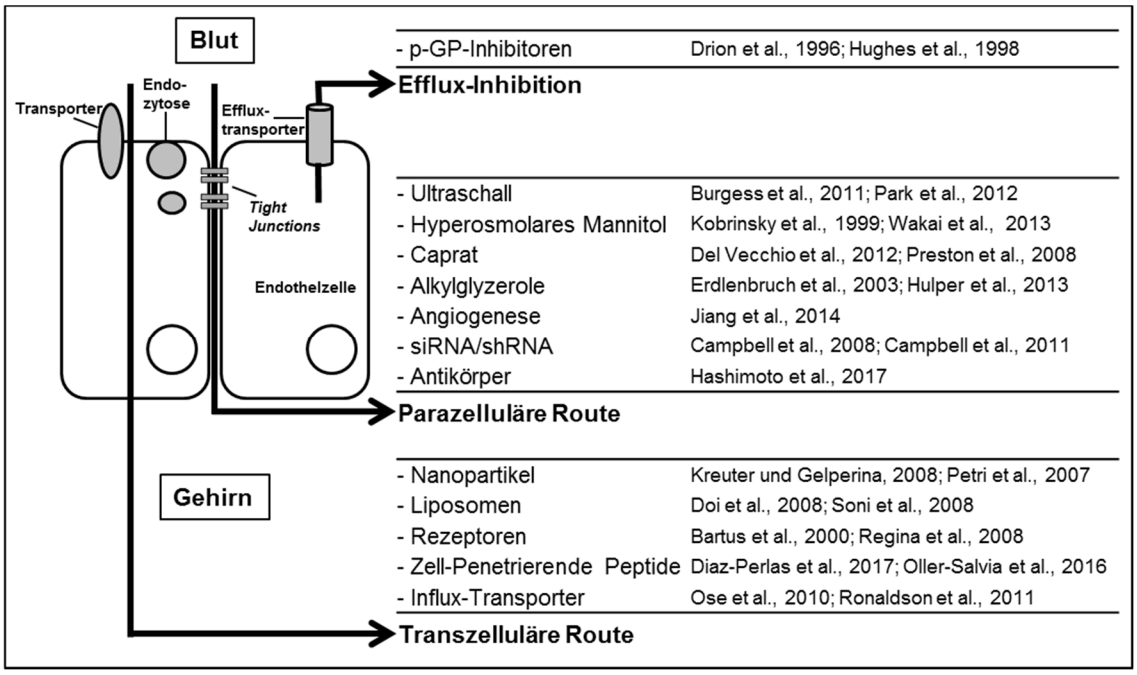


Abb. 6: Modulation der Blut-Hirn-Schranke mit verbessertem Wirkstoffdurchtritt. Substanzen und Mechanismen zur Modulation der parazellulären (Mitte) und transzellulären (unten) Route sowie des Efflux-Transports (oben). Parazellulär: Beeinflussung der *Tight Junctions*. Transzellulär: Beeinflussung der Diffusion oder von Transportern/Rezeptoren.

Neben der parazellulären Route wurde auch die transzelluläre Route zur BHS-Modulation untersucht (Abb. 6, unten). Unspezifische Methoden sind beispielsweise Zytostatika-gekoppelte Nanopartikel (Petri et al., 2007; mögliche Toxizität: Li et al., 2015a), Chemotherapeutika-enthaltende Liposomen (Soni et al., 2008) und Wirkstoff-gekoppelte zell-penetrierende Peptide (*in vitro*; Diaz-Perlas et al., 2017; Oller-Salvia et al., 2016). Spezifischer ist der Wirkstofftransport über Influx-Transportproteine der BHS wie SLC-Transporter oder OATP (Ose et al., 2010; Ronaldson et al., 2011) sowie Rezeptor-abhängige Transzytose. Für letztere wurde ein von Bradykinin stammendes Peptid (RMP-7/Cereport) eingesetzt, das eine erhöhte Zytostatika-Durchlässigkeit in einem Gliom-Tiermodell erzielte (Bartus et al., 2000). In einer klinischen Phase-II-Studie konnte die Wirkung nicht bestätigt werden (Warren et al., 2006). Spezifischer scheint die Transzytose durch den Rezeptor LRP-1 (*Lipoprotein-related* Protein-1) zu sein, der stark im Gehirn exprimiert wird (Candela et al., 2015). Ein Konjugat aus Paclitaxel und dem LRP-1-Liganden Angiopep-2 (ANG1005) verbessert die Behandlung von Gehirntumoren (Regina et al., 2008). Das Potenzial wurde in einer klinischen Phase-II-Studie bestätigt (Li und Tang, 2017).

Ein weiterer Ansatz zur Modulation von BHS-Proteinen ist die Inhibierung von Efflux-Transportern wie P-gp zur Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im Gehirn (Abb. 6, oben; Hughes et al., 1998). Dies ist jedoch von hohen unerwünschten Nebenwirkungen begleitet (z.B. Toxizität, Effekte in anderen Organen; Callaghan et al., 2014; Palmeira et al., 2012).

Die bisher genannten Methoden zur Barriere-Modulation zeigen, dass eine spezifische Beeinflussung der unspezifischen vorgezogen werden sollte. *Tight-Junctions*-gerichtete Peptide stellen dabei einen vielversprechenden Ansatz dar.

1.4.1 Peptide zur transienten *Tight-Junction*-Modulation

Neben den oben genannten Mechanismen wurden Peptide entwickelt, die spezifisch *Tight-Junction*-Proteine modulieren sollen (Abb. 7).

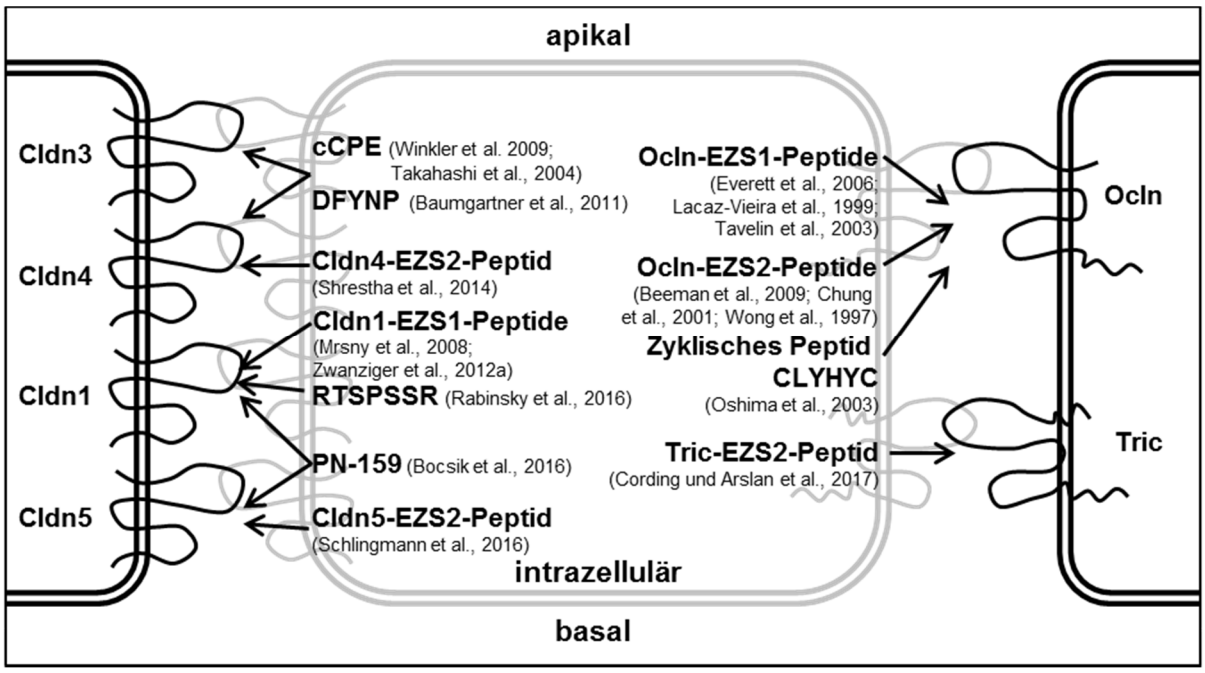


Abb. 7: Peptide gerichtet gegen Claudine und *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine zur *Tight-Junction*-Modulation für Therapie und Diagnostik. Transiente Destabilisierung bzw. Wiederherstellung der *Tight Junctions*. Peptide gerichtet gegen Claudine (Cldn, links) und *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine Occludin (Ocln) und Tricellulin (Tric) (rechts). cCPE, C-terminale Sequenz des *Clostridium perfringens* Enterotoxins; EZS, extrazelluläre Schleife.

1.4.1.1 Peptide zur Claudin-Modulation

Claudine als wichtige abdichtende Bestandteile der *Tight Junctions* sind aussichtsreiche Zielproteine zur Modulation der parazellulären Route (Tab. 4). Beispielsweise führt der C-terminale Teil des *Clostridium perfringens* Enterotoxins (cCPE) über eine Bindung an die EZS2 von Claudin-3 und -4 (Robertson et al., 2010) zu deren Verminderung in epithelialen *Tight-Junctions*. Das resultiert in einer erhöhten parazellulären Permeabilität *in vitro* und *in vivo* (Kondoh et al., 2006; Winkler et al., 2009). Da cCPE toxische Nebenwirkungen (Li et al., 2014) und keine Bindung an Claudin-5 zeigt (Fujita et al., 2000), ist es zur BHS-Modulation ungeeignet (Bocsik et al., 2016). Ein synthetisches Peptid, welches eine in klassischen Claudinen konservierte Sequenz umfasst (DFYNP; Krause et al., 2008), führt in epithelialen *Tight Junctions* zur Reduktion von Claudin-3 und -4 (Baumgartner et al., 2011). Peptidomimetika aus der EZS1 von Claudin-1 verursachen eine erhöhte Permeabilität in Epithelien des Gastrointestinaltraktes und der Niere *in vitro* und *in vivo* (Mrsny et al., 2008; Staat et al., 2015; Zwanziger et al., 2012a), im Perineurium *in vivo* (Zwanziger et al., 2012a) und in Gehirnendothelzellen *in vitro* (Staat et al., 2015). Die im Phagen-Display identifizierten Peptide PN-78 und PN-159 (Herman et al., 2007; Johnson und Quay, 2005) beeinflussen *Tight-Junction*-Proteine und erhöhen die epitheliale und endotheliale Durchlässigkeit *in vitro* (Chen et al., 2006; Johnson und Quay, 2005). Zielprotein für PN-159 sind Claudin-1 und -5 (Bocsik et al., 2016).

Tab. 4: Modulation parazellulärer Barrieren durch Claudin-beeinflussende Peptide.

	Peptid	Peptidsequenz und -effekte	Ziel-protein	Literatur
Claudin-Peptide	**cCPE**	NH_2-SSYSGNYPYSILFQKF NH_2-SLDAGQYVLVMKANSSYSGNYPYSILFQKF	Cldn3, -4	[1]Bocsik et al., 2016 [2]Kondoh et al., 2006 [3]Masuyama et al., 2005 [4]Takahashi et al., 2005
		Caco-2[1,3,4]: TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa, ZO-1, Ocln, β-Ctn ↓ **Jejunumepithel (Ratte)[2]**: Perm ↑ ≤ 20 kDa **pBEC[1]:** TER, Perm, ZO-1, Ocln, β-Ctn Ø		
	DFYNP	DFYNP (EZS2, konserviert, mehrere Spezies)	diverse Cldn	Baumgartner et al., 2011
		EpH4-Zellen: TER, Cldn3, Cldn4 ↓		
	Cldn1-Peptid (53-80)	Ac-SCVSQSTGQIQCKVFDSLLNLNSTLQAT-NH_2 (EZS1, human)	Cldn1	Mrsny et al., 2008
		T84-Zellen, Magenepithel (Ratte): TER ↓, Perm ↑ ≤ 3 kDa, Ocln, Cldn1, JAM-A, ZO-1 ↓		
	C1C2 (53-81)/ C1C2 (57-81)	SSVSQSTGQIQSKVFDSLLNLNSTLQATR-NH_2[2,3,4] QSTGQIQSKVFDSLLNLNSTLQATR-NH_2[1] (EZS1, Maus)	Cldn1	[1]Dabrowski et al., 2015 [2]Sauer et al., 2014 [3]Staat et al., 2015 [4]Zwanziger et al., 2012a
		Caco-2[1,3,4]: TER ↓, Perm ↑ ≤ 10 kDa, Cldn1, -2, -3, -4, -5, Ocln ↓ **MDCK-II[3]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 10 kDa, Cldn1, -2, -3, -4, -5, Ocln ↓ **pBEC[3]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 3 kDa, Cldn-3,-5, Ocln ↓ **Perineurium (Ratte)[1,2,4]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa, Cldn1 ↓		
	7-mer/ PN-78	FDFWITP (Phage Display)	n.b.	[1]Bocsik et al., 2016 [2]Herman et al., 2007
		Caco-2[1]: TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa, ZO-1, Ocln, β-Ctn ↓ **pBEC[1]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa, ZO-1, β-Ctn, Cldn5 ↓ **16HBE14o-[2]:** TER ↓, ZO-1 ↓ **MDCK[2]:** TER ↓		
	PN-159	NH_2-KLALKLALKALKLAALKLA-NH_2 (Phage Display)	Cldn1, -5	[1]Bocsik et al., 2016 [2]Chen et al., 2006 [3]Johnson und Quay, 2005
		Caco-2[1]: TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa; ZO-1, Ocln, β-Ctn ↓ **pBEC[1]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa; ZO-1, β-Ctn, Cldn5 ↓ **EpiAirway™, Nasenepithel (Kaninchen)[2,3]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 4 kDa		

↑/↓/Ø, erhöht/vermindert/unverändert (z.B. Expression, *Tight-Junction*-Lokalisation); (53-80), Aminosäuresequenz im Zielprotein; β-Ctn, β-Catenin; 16HBE14o-, Zelllinie Bronchialepithel; Caco-2, Zelllinie Colon-Adenokarzinom; cCPE, C-terminale Sequenz des *Clostridium perfrigens* Enterotoxins; Cldn, Claudin; EpH4, Brustdrüsenepithelzelllinie; EpiAirway™, primäre Atemwegsepithelzellen; EZS, extrazelluläre Schleife; JAM, *Junctional Adhesion Molecule*; MDCK, Zelllinie Madin-Darby *canine kidney*; n.b., nicht bekannt; pBEC, primäre Gehirnkapillarendothelzellen; Perm, Permeabilität; Ocln, Occludin; T84, Zelllinie Colon-Adenokarzinom; TER, transzellulärer elektrischer Widerstand; ZO, *Zonula occludens*-Protein.

1.4.1.2 Peptidomimetika gegen Tight-Junction-assoziierte MARVEL-Proteine

Occludin-Peptide zur *Tight-Junction*-Modulation wirken reversibel und nicht toxisch (Tab. 5). Synthetische Peptide aus der kompletten EZS2 wiesen in manchen Studien eine Erhöhung der Ionendurchlässigkeit und eine epitheliale Occludin-Reduktion auf (Vietor et al., 2001; Wong und Gumbiner, 1997). In anderen Studien hatte das gleiche Peptid keine Effekte (Tavelin et al., 2003). Kürzere Peptide aus der EZS2 führen zur erhöhten epithelialen Permeabilität *in vitro* und *in vivo* (Beeman et al., 2009; Chung et al., 2001; Wong und Gumbiner, 1997).

Ein Peptid der kompletten EZS1 zeigte in einer Studie keine Wirksamkeit (Wong und Gumbiner, 1997), in einer anderen jedoch eine Barriereöffnung durch verringerte Occludin-Lokalisation an den *Tight Junctions* (Tavelin et al., 2003). Für C-terminale Verkürzungspep-

tide der EZS1 (AS 90-113, 90-103, 100-108, 100-109) wurde ebenso eine Wirkung nachgewiesen (Everett et al., 2006; Lacaz-Vieira et al., 1999; Tavelin et al., 2003). Ein synthetisches Tricellulin-EZS2-Peptid erhöht die epitheliale Durchlässigkeit *in vitro* und reduziert Tricellulin in Zell-Zell-Kontakten (Cording et al., 2017). Das einzige TAMP-Peptid, das zur erhöhten endothelialen Permeabilität führt, ist ein zyklisches Occludin-Peptid, welches eine konservierte EZS2-Sequenz enthält (Oshima et al., 2003).

Tab. 5: Modulation parazellulärer Barrieren durch Peptidomimetika von *Tight-Junction*-assoziierten MARVEL-Proteinen.

	Peptid	Peptidsequenz und -effekte	Zielprotein	Literatur
Peptide gegen *Tight-Junction*-assoziierte MARVEL-Proteine	**Ocln-EZS2-Peptid**	GVNPQAQMSSGYYYSPLLAMCSQAYGSTYLNQYIYHYCT VDPQE (EZS2, Huhn)	Ocln	[1]Vietor et al., 2001 [2]Wong und Gumbiner, 1997
		EpH4-Zellen[1]: TER ↓, Ocln ↓, β-Ctn ↑, ZO-1 Ø/↓, ECAD Ø **A6-Zellen[2]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 40 kDa, Ocln ↓, ZO-1, ZO-2, CGN, ECAD Ø		
	Ocln-EZS2-Peptid	GVNPTAQSSGSLYGSQIYALCNQFYTPAATGLYVDQYLYH YCVVDPQE (EZS2, human)	Ocln	Tavelin et al., 2003
		Caco-2: Perm Ø ≤ 182 kDa		
	LHYH	LYHY (EZS2, Maus)	Ocln	Beeman et al., 2009
		EpH4-Zellen: TER ↓, Ocln ↓		
	Ocln-EZS2-Peptid	NH_2-GSQIYTICSQFYTPGGTGLYVD-COOH (209-230) (EZS2, Ratte)	Ocln	[1]Chung et al., 2001 [2]Wong et al., 2007
		BTS (Ratte)[1,2]: TER ↓, Perm ↑ ≤ 66 kDa, Ocln ↓, ZO-1, NCAD, Aktin, β-Ctn Ø **pSZ[1]:** TER ↓		
	Ocln-EZS1-Peptid	DYGYGLGGAYGTGLGGFYGSNYYGSGLSYSYGYGGYYG GVNQRT (EZS1, Huhn)	Ocln	Wong und Gumbiner, 1997
		A6-Zellen: TER, Perm, Ocln, ZO-1, ZO-2, CGN, ECAD Ø		
	Ocln-EZS1-Peptide	DRGYGTSLLGGSVGYPYGGSGFGS-NH_2[3] (90-113) (EZS1, human) DRGYGTSLLGGSVGYPYGGSGFGSYGSGYGYGYGYGYG GYTDPR-NH_2[3] (90-135) (EZS1, human) DRGYGTSLLGGSVG-NH_2[1,3] (90-103) (EZS1, human) SNYYGSGLSY[2] (100-109) (EZS1, Huhn) SNYYGSGLS[2] (100-108) (EZS1, Huhn)	Ocln	[1]Everett et al., 2006 [2]Lacaz-Vieira et al., 1999 [3]Tavelin et al., 2003
		pHAE[1]: TER ↓, Perm ↑ ≤ 70 kDa, Ocln ↓, ZO-1, Cldn1, -4 Ø **A6-Zellen[2]:** TER ↓, ZO-1 Ø **Caco-2[3]:** TER ↓, Perm ↑ ≤ 0,2 kDa, Ocln ↓		
	Peptid B	CLYHYC (zyklisch) (EZS2, konserviert, mehrere Spezies)	Ocln	Oshima et al., 2003
		HUVEC: Perm ↑ neutrophile Granulozyten, Ocln ↓,VCAD Ø		
	Trictide	DNLNRGGASYTPFYLNVPNFVTSR-NH_2 (ESZ2, human)	Tric	Cording et al., 2017
		Caco-2: TER↓, Perm ↑≤10 kDa, tTric, tLSR, Cldn1, Ocln ↓		

↑/↓/Ø, erhöht/vermindert/unverändert (z.B. Expression, *Tight-Junction*-Lokalisation); (90-113), Aminosäuresequenz im Zielprotein; β-Ctn, β-Catenin; A6, Nierenzellen von *Xenopus laevis*; BTS, Blut-Testis-Schranke; Caco-2, Zelllinie Colon-Adenokarzinom; CGN, Cingulin; Cldn, Claudin; ECAD, E-Cadherin; EpH4, Brustdrüsenepithelzelllinie; EZS, extrazelluläre Schleife; HUVEC, humane Nabelschnurendothelzellen; LSR, *lipolysis-stimulated receptor*; NCAD, N-Cadherin; Perm, Permeabilität; pHAE primäre humane Atemwegs-Epithelzellen; pSZ, primäre Sertoli-Zellen; Ocln, Occludin; t, trizellulär; TER, transzellulärer elektrischer Widerstand; Tric, Tricellulin; VCAD, V-Cadherin; ZO, *Zonula occludens*-Protein.

1.4.1.3 Peptide gegen Tight Junctions zur Diagnostik oder Therapie

Tight-Junction-gerichtete Peptide können diagnostisch oder therapeutisch eingesetzt werden (Tab. 6). Ein synthetisches Peptid (23 AS) aus der Claudin-4-EZS2 verhindert *in vitro* und *in vivo* die Bindung von CPE und die damit einhergehende Darmtoxizität (Shrestha et al., 2014). Ein Claudin-5-Peptid aus der EZS2-Region, die für Interaktionen der Claudine eine Rolle spielt (Piontek et al., 2008), fördert die *Tight-Junctions*-Stabilisierung und damit eine verringerte Durchlässigkeit des Alkohol-exponierten Alveolarepithels (Schlingmann et al., 2016).

Ein weiteres Peptid (21 AS von Gastrokin-1, Schutzproteine der Magenschleimhaut; Kim et al., 2016; Yoon et al., 2014) verbesserte die Symptome in einem Colitis-Modell aufgrund einer verminderten Barriereöffnung durch *Tight-Junction*-Stabilisierung (Chen et al., 2012; Toback et al., 2003; Walsh-Reitz et al., 2005). Auch das mikrobielle Peptid LL-37, erhöht in Hautinfektionen/-verletzungen (Schauber et al., 2007), normalisiert die Barrierefunktion und die *Tight-Junction*-Proteinexpression (Akiyama et al., 2014), die nach atopischer Dermatitis beeinträchtigt sind (De Benedetto et al., 2011). Da *Tight-Junction*-Proteine in Tumoren überexprimiert sein können (z.B. Claudin-1 im colorektalen Karzinom; Grone et al., 2007; Kinugasa et al., 2007), wurde ein Claudin-1-Peptid für die Diagnostik von Dysplasien im Colon entwickelt ohne selbst *Tight Junctions* zu beeinflussen (Rabinsky et al., 2015).

Tab. 6: *Tight-Junction*-gerichtete Peptide zur Diagnostik und Therapie.

	Peptid	Peptidsequenz und -effekte	Zielprotein	Literatur
TJ-Peptide für Diagnostik und Therapie	**Cldn4-EZS2-Peptid**	TAHNIIQDFYNPLVASGQKREM (EZS2, human) **Caco-2, Dünndarm (Kaninchen):** CPE-induzierte Darmtoxizität ↓	Cldn4	Shrestha et al., 2014
	EFYDP	Ac-EFYDP-NH_2 (EZS2, konserviert, mehrere Spezies) **pAEC Alkohol-exponiert:** TER ↑, Perm ↓ ≤ 10 kDa, Cldn18/-5-Interaktion ↓, Cldn18/ZO-1-Interaktion ↑	Cldn5	Schlingmann et al., 2016
	Gastro-kin-1-Peptid	LDALVKEKKLQGKGPGGPPPK (human) **Caco-2[1,4]:** TER ↑, Ocln, ZO-1, ZO-2, Cldn5, ECAD, JAM-A ↑ **Colitis (Maus)[1,2,4]:** Perm ↓ ≤4 kDa, Ocln, ZO-1, Aktin ↑, Diarrhö, Blutung, Entzündung, mukosale Ulzera ↓ **Primäre Antrummukosa-Zellen[3]:** Zellwachstum, Wundheilung ↑	n.b.	[1]Chen et al., 2012 [2]Chen et al., 2015b [3]Toback et al., 2003 [4]Walsh-Reitz et al., 2005
	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES (human) **Primäre Keratinozyten:** TER ↑, Perm ↓ ≤ 4 kDa, Ocln, Claudin-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -12, -14, -16, -17 ↑, JAM-A, -B, -C, ZO-1, -2, -3 Ø	n.b.	Akiyama et al., 2014
	Cldn1-Peptid	RTSPSSR (Phage Display) **T84-Zellen, Colon-Adenokarzinom (Maus):** TER, ZO-1, Cldn1 Ø, Karzinom-Diagnostik	Cldn1	Rabinsky et al., 2015

↑/↓/Ø, erhöht/vermindert/unverändert (z.B. Expression, *Tight-Junction* (TJ)-Lokalisation); Caco-2, Zelllinie Colon-Adenokarzinom; Cldn, Claudin; CPE, *Clostridium perfrigens* Enterotoxin; ECAD, E-Cadherin; EZS, extrazelluläre Schleife; JAM, *Junctional Adhesion Molecule*; n.b., nicht bekannt; pAEC: primäre alveolare Epithelzellen; Perm, Permeabilität; Ocln, Occludin; T84, Zelllinie Colon-Adenokarzinom; TER, transzellulärer elektrischer Widerstand; TJ, *Tight Junctions*; ZO, *Zonula occludens*-Protein.

1.5 Zielstellung

Für mehr als 98 % der Wirkstoffe stellt die BHS eine unüberwindliche Barriere dar und limitiert die Behandlung von ZNS-Erkrankungen wie z.B. von Gehirntumoren. Bisherige Ansätze die BHS zu überwinden, wirken meist unspezifisch und zeigen unerwünschte Nebenwirkungen durch den Zusammenbruch der BHS oder Effekte außerhalb des ZNS. Um eine möglichst spezifische Modulation zu erreichen, ist es Ziel dieser Arbeit, Proteine der BHS selektiv zu beeinflussen.

Das transmembrane *Tight-Junction*-Protein Claudin-5 ist maßgeblich für die Abdichtung der BHS verantwortlich. In vorangegangen Studien führte eine Claudin-5-Defizienz zur erhöhten parazellulären Permeabilität für kleine Moleküle. Deshalb wurde Claudin-5 als Zielprotein zur Modulation der BHS zur Verbesserung des Wirkstoffdurchtritts ausgewählt. Da die Barrierefunktion von Claudinen insbesondere durch die Interaktion der extrazellulären Domänen bestimmt wird, sollen Peptide aus dem extrazellulären Bereich von Claudin-5 generiert werden (Peptidomimetika). Ziel ist es, diese Peptide zur möglichst spezifischen, vorübergehenden und moderaten Öffnung der parazellulären Barriere Claudin-5-exprimierender Zellen einzusetzen. Die synthetisierten Peptide sollen zunächst auf ihre permeabilitätssteigernde Wirkung an epithelialen und endothelialen Barrieren getestet werden. Als wirksam identifizierte Peptide werden genauer hinsichtlich Reversibilität, Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit charakterisiert. Darüber hinaus soll der molekulare und zelluläre Wirkungsmechanismus aufgeklärt werden. Nach einer *in-vitro*-Validierung schließen sich tierexperimentelle Analysen an. Dabei werden pharmakokinetische Parameter untersucht. Anschließend wird mittels Kombinationsbehandlung mit nicht ZNS-gängigen Zytostatika nach Gabe eines permeabilitätssteigernden Claudin-5-Peptids überprüft, ob eine Reduktion der Gliomgröße in Mäusen erzielt werden kann. Strukturuntersuchungen sollen klären, welche Strukturelemente der Peptide an Claudin-5 binden, um eine Wirkung zu erreichen.

Da auch Claudin-12 in der BHS exprimiert wird, ist es eine weitere potenzielle Zielstruktur zur BHS-Modulation. Bisher ist wenig über seine Funktion bekannt. Deshalb soll anhand von Knockout-Mäusen die Funktion an der BHS und an anderen Zellbarrieren untersucht werden.

Insgesamt ist das Ziel dieser Arbeit die Validierung eines peptidbasierten Ansatzes zur möglichst spezifischen und transienten Permeabilitätsverstärkung über eine *Tight-Junction*-Modulation sowie der weiteren funktionellen Aufklärung von Claudinen in zellulären Barrieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 7: Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien

Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien	Hersteller
2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe, DE
8-(4-chlorophenylthio(CPT))-cAMP	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Aceton	VWR, Darmstadt, DE
Acrylamid/Bisacrylamid Mischung 40 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Albumin Fraktion V, bovin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, München, DE
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dexametason	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Dextran ca. 70 kDa	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Dinatriumydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
DNase I – RNase-frei	Roboklon GmbH, Berlin, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1x) + GlutaMAX™ (1 g/l D-Glucose)	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1x) + GlutaMAX™, High Glucose (4,5 g/l D-Glucose)	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose (4,5 g/l D-Glucose), kein Natrium-bicarbonat	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1x), High Glucose (4,5 g/l D-Glucose), ohne Phenolrot	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Eindeckmedium, ImmuMount	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Essigsäure	J.T. Backer, Deventur, NL
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz Dihydrat, Titrierkomplex III	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethylenglykol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Tab. 7: Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien (Fortsetzung)

Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien	Hersteller
Fibronektin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Fötales Kälber Serum (FKS), hitzeinaktiviert	gibco©, Thermo Fisher Scientific Inc.
Gadodiamid	Absource Diagnostics GmbH, München, DE
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Geneticin, G418-Sulfat	Biochrom AG, Merck Millipore, Berlin, DE
Glutaraldehyd-Lösung, 25 %	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (1x), mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Heparin-Natrium 250000 I.E./10 ml Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm, DE
HEPES Pufferlösung 1 mol/l	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE
Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Isopropanol	VWR, Darmstadt, DE
Ketamin 10 % Injektionslösung	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Kollagen Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
L-Cystein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Methanol	VWR, Darmstadt, DE
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid, 0,9-%ige Injektionslösung	B.Braun, Melsungen, DE
Natriumcitrat-Lösung, 3,2 %, Greiner Bio-One Coagulation Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat	SERVA, Heidelberg, DE
Nicht essenzielle Aminosäuren, Lösung, 100x	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Paclitaxel	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Penicillin/Streptomycin	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Phosphate-buffered Saline (PBS) mit Mg^{2+}, mit Ca^{2+}, 10x	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Phosphate-buffered Saline (PBS) ohne Mg^{2+}, ohne Ca^{2+}, Trockensubstanz	Biochrom AG, Merck Millipore, Berlin, DE

Tab.7: Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien (Fortsetzung)

Chemikalien, Medien, Fertigreagenzien	Hersteller
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Proteinase K, rekombinant, PCR grade	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Rattenschwanzkollagen	Roche, Mannheim, DE
Ro-20-1724	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
TES, BioUltra, ≥99.5%	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tissue-Tek	VWR International, Darmstadt, DE
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Tricin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trifluorethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Tris Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin/EDTA, 0,25%, mit Phenolrot	gibco©, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Xylazin 2 % Injektionslösung	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Tab. 8: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage METTLER AT21 Comparator	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
Cryostat CM 3000	Leica, Wetzlar, DE
Dounce-Homogenisator	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
ECIS System 1600R	Applied BioPhysics, Troy, USA
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, DE
Elektrophorese-Netzteil 3000Xi	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Fixiereinheit für Mäuse, Tailveiner® TV-150	Braintree Scientific, Braintree, USA
Fluoreszenz Scanner, FLA-5000	Fujifilm, Tokio, JP
Handelektrode EVOM Voltohmmeter	WPI, Sarasota, USA
Gefrierbruchanlage BAF 400 D	BAL-TEC, Balzers, LIE
Heizblock, PZ 28-2 T	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, DE

Tab. 8: Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Inkubator, CB 210	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
Ionisationsgebläse STAT-FAN YIB01-ODR	Sartorius AG, Göttingen, DE
Käfig-Resonator	Rapid Biomed, Rimpar, DE
Kleintier-MRT 9,4 T Bruker BioSpec 94/20	Bruker Biospin, Ettlingen, DE
Kontrollsystem Model 1025, Monitoring & Gating System	SA Instruments, Stony Brook, USA
Kupfernetz	Wacker Chemie, München, DE
Mikroskop, Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 780	Carl ZEISS Jena GmbH, Jena, DE
Mikroskop, Inverses Phasenkontrastmikroskop IMT-2	Olympus Europa GmbH, Hamburg, DE
Mikroskop, Transmissionselektronenmikroskop EM10	Carl ZEISS Jena GmbH, Jena, DE
Mikroskop, Transmissionselektronenmikroskop EM900	Carl ZEISS Jena GmbH, Jena, DE
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen
PCR Thermocycler, DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, DE
Peristaltische Pumpe MINIPULS 3	Gilson, Middleton, USA
pH-Meter CG 840	Schott AG, Mainz, DE
Plattenmessgerät, Safire	Tecan, Männedorf, CH
Spektralphotometer ND-1000	Nano Drop®, Wilmington, USA
Spektropolarimeter J-720	Jasco, Tokyo, JP
Spritzenpumpe, Model PHD 22/2000	Harvard Apparatus, Hilliston, USA
StepOnePlus® Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterilwerkbank S-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, DE
Thermomixer R	Eppendorf, Hamburg, DE
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, DE
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge™ Stratos™	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen, DE

Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chirurgischer Faden, 640S, 5/0, Silk, Black, 18"	CP Medical, Norcross, USA
Deckgläschen, Durchmesser 12, 30 mm, rund	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Dialyseschlauch, Spectra/Por® 2 MWCO 12000-14000	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
ECIS® Chip 8W10E+	Ibidi GmbH, Planegg/ Martinsried, DE
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml) CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Filter, Minisart-Plus, Porengröße 0,2 µm	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
Filtereinsätze, Millicell, CM, Porengröße 0,4 µm	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Filtereinsätze, Transwell® Polycarbonat, Porengröße 0,4 µm	Corning Life Sciences, New York, USA
Filterspitzen Biosphere® (0,1 – 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Numbrecht, DE
Kryoeinbettformen, Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek Germany, Staufen, DE
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Nylon-Netzfilter, 25 mm, Porengröße 41 µm	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, DE
Objektträger, Superfrost®Plus	Thermo Fisher Scientifi, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, DE
PAP pen	Abcam, Cambridge, UK
Quarzküvette 100-QS	Hellma Analytics, Müllheim DE
Spritzen, Omnican® 100 30G × 1/2''	B.Braun, Melsungen, DE
Zellkulturflaschen 25, 75 cm² CellBIND®	Corning® Incorporated, NY, USA
Zellkulturflaschen 25, 75 cm² CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 48 Well	Corning® Incorporated, NY, USA
Zellkulturplatten 6, 24, 96 Well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, DE
Zentrifugationsröhrchen, Nanosep 10K Omega	Pall Corparation, Port Washington, USA

Tab. 10: Reaktionskits

Reaktionskits	Hersteller
GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit	Roboklon GmbH, Berlin, DE
Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, high ROX	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Taq DNA Polymerase + Puffer	Roboklon GmbH, Berlin, DE

Tab. 11: Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Konzentration µg/ml		Hersteller
Anti-Claudin-1 #51-9000	Kaninchen	IHC	5	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Claudin-3 #C0144	Kaninchen	IHC	5	Assay Biotechnology Company, Sunnyvale, USA
Anti-Claudin-5 #34-1600	Kaninchen	IF IHC	1,25 5	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Claudin-11 #36-4500	Kaninchen	IHC	5	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Claudin-12 #JP18801	Kaninchen	IHC	2	IBL International, Hamburg, DE
Anti-Claudin-25 #AP52015P	Kaninchen	IHC	10	OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA
Anti-Connexin-43 #610061	Maus	IHC	5	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti-Desmoplakin #711223	Kaninchen	IHC	10	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Occludin #33-1500	Maus	IHC	10	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-ZO-1 #LSC124822	Ratte	IF IHC	2,5 10	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE

IF, Immunfluoreszenzfärbung; IHC, Immunhistochemie; ZO-1, *Zonula occludens* Protein-1.

Tab. 12: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Konzentration µg/ml		Hersteller
Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 647 #A21244	Ziege	IHC	10	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Kaninchen, Atto 488 #18771	Ziege	IF IHC	4 10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Anti-Maus IgG-Alexa Fluor® 488 #A11029	Ziege	IHC	10	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Maus IgG-Alexa Flour® 647 #A21236	Ziege	IHC	20	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Anti-Ratte IgG- Alexa Flour® 555 #A21434	Ziege	IF IHC	8 20	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

IgG, Immunglobulin G; IF, Immunfluoreszenzfärbung; IHC, Immunhistochemie.

Tab. 13: Fluoreszenzdetektion der Sekundärantikörper am Laser-Scanning-Mikroskop

Antikörper-Konjugat	Anregungswellenlänge λ_{ex}	Emissionswellenlänge λ_{em}
	im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 780	
Alexa Flour® 488 bzw. Atto 488	488 nm	491-535 nm
Alexa Flour® 555	561 nm	566-631 nm
Alexa Flour® 647	633 nm	638-740 nm

λ_{ex}, Anregungswellenlänge; λ_{em}, Emmisionswellenlänge.

Tab. 14: Primersequenzen für Genotypisierung der C57BL/6-Claudin-12-Mäuse

Primer	Primersequenz (5'→3')
WT	***for*** GTTACACATTCCAATCAGGCAGAGTAGC ***rev*** CTTAGCCACAGAAGTGCTAGGATTGC
HO	***for*** GCAGCCTCTGTTCCACATACACTTCA ***rev*** CCCCATCTGAAACCAATGAAGAAGCC

for, Vorwärts-Primer; HO, homozygot; *rev*, Rückwärts-Primer; WT, Wildtyp; Primerdesign und -synthese: Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, USA.

Tab. 15: Primersequenzen für quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Primer	Primersequenz (5'→3')	
Claudin-1	***for*** GATGTGGATGGCTGTCATTG	***rev*** CGTGGTGTTGGGTAAGAGGT
Claudin-2	***for*** ATGGTGACGTCCAGTGCAAT	***rev*** GGCGAGTAGAAGTCCCGAAG
Claudin-3	***for*** GAGATGGGAGCTGGGTTGTA	***rev*** GTAGTCCTTGCGGTCGTAGG
Claudin-4	***for*** CCCGAGCCCTTATGGTCATC	***rev*** GAGTAGGGCTTGTCGTTGCT
Claudin-5	***for*** CTGGACCACAACATCGTGAC	***rev*** GCCGGTCCAGGTAACAAAGA
Claudin-6	***for*** GAGCCAAGTGCACTACCTGT	***rev*** TGGTGGGATATTCGGAGGGT
Claudin-7	***for*** GCGACAACATCATCACAGCC	***rev*** TACCAAGGCAGCAAGACCTG
Claudin-8	***for*** TTGCTGACAGCCGGAATCAT	***rev*** TCGGAGATCTCTTTTCGGCG
Claudin-9	***for*** CCAAGGCCCGTATCGTACTC	***rev*** GGACACGTACAGCAGAGGAG
Claudin-10	***for*** GCTAAAATTGCTTGCTTGGC	***rev*** TCCGTTGTATGTGTAGCCCA
Claudin-11	***for*** TAGCCACTTGCCTTCAGGTG	***rev*** GAGCAGCAGACGATGACACA
Claudin-12	***for*** AACTGGCCAAGTGTCTGGTC	***rev*** AGACCCCCTGAGCTAGCAAT
Claudin-13	***for*** CCCTGTCCTGGGTAACACAC	***rev*** GGCTCCTGAAGGTCTAGCAC
Claudin-14	***for*** GCACAGGCATCTACCAGTGT	***rev*** TGAGGAGATGAAGCCCAGGT
Claudin-15	***for*** TGTCTACGGTCCATGGCAAC	***rev*** CCACGAGATAGCCACCATCC
Claudin-16	***for*** CCTGCGATGAGTACGACTCC	***rev*** CTCCTGCCAAAAAGCAACCC
Claudin-17	***for*** TCTCCCTCCGGTACTGGAAG	***rev*** GCTCCTCCAAGTTCTCGCTT
Claudin-18	***for*** GTGTCCATCTTCGCCCTGAA	***rev*** GGTGTACCTGGTCTGAACGG
Claudin-19	***for*** TTCTTCAACCCCAGCACTCC	***rev*** GCGGGCAACTTAACAACAGG
Claudin-20	***for*** CTTTCATCCTGGCCGTGTCT	***rev*** GGCTTTCCGGAATGGTCAGA
Claudin-22	***for*** GGGCTTAGTCTTCCGAACG	***rev*** CTTCAAGTGCGGCAAGTAGT
Claudin-23	***for*** GGACATATGTCGCGAGCAGA	***rev*** CGAAAAACACCACGCCAGAG
Claudin-24	***for*** CTGTCATTGCTGGGATGGGT	***rev*** TGCACAGGGACATCAAGACC
Claudin-25	***for*** CTACATGGCGGCCTCCATAG	***rev*** CGATGCCGCTATTGTGGTTG
Claudin-26	***for*** TGACCGGGTTCTTGAGCTTC	***rev*** CAGAGACCAGCCAAAGCGTA
Claudin-27	***for*** GCCTGGAAGTTTCTCCCTCC	***rev*** ATGTAGATGCTGAGCCCTGC
MD3	***for*** TGGAGAAGTCCCGTCAAAGC	***rev*** AGCCACTATAAGCCCCTCCA
Occludin	***for*** ACTCCTCCAATGGCAAAGTG	***rev*** CCCCACCTGTCGTGTAGTCT
Tricellulin	***for*** GAGAATCCTGGGTGTGGTGG	***rev*** TTTCGATGACAACGACGGGT
VDR	***for*** ACTCAGCTTCTCCGGAGACT	***rev*** GGATAGGCGGTCCTGAATGG
ZO-1	***for*** CCCACCCCCATCTCAGAGTA	***rev*** GGGACAGCTTTAGGCATGGT
β-Aktin	***for*** TTTGAGACCTTCAACACCCC	***rev*** ATAGCTCTTCTCCAGGGAGG

for, Vorwärts-Primer; MD3, MARVEL *domain containing* 3; *rev*, Rückwärts-Primer; VDR, Vitamin-D-Rezeptor; ZO-1, *Zonula occludens* Protein-1; Primerdesign (exkl. VDR): Dr. P. Berndt (FMP, Berlin, DE); Primersynthese: BioTeZ, Berlin, DE.

Tab. 16: Fluoreszierende Größenmarker für Permeationsexperimente und weitere Farbmarker

Größenmarker für Permeation	**Hersteller**	**Fluoreszenz- bzw. Absorptionseigenschaften**
Albumin-FITC-Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 520 nm
Doxorubicin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 470 nm, λ_{em}= 585 nm
FD10, 10 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 520 nm
FD40, 40 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 520 nm
Lucifer Yellow, 0,4 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 425 nm, λ_{em} = 520 nm
TRITC-Dextran, 155 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 540 nm, λ_{em} = 565 nm
Weitere Farbmarker		
Ethidiumbromid-Lösung, 1 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE	λ_{ab} = 210 bzw. 285 nm
Evans Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 620 nm, λ_{em} = 680 nm
Fluoreszein-Dextran, 3 kDa, fixierbar	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE	λ_{ex} = 494 nm, λ_{em} = 518 nm
Hoechst 33342 (bisBenzimid)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE	λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 461 nm
Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ab} = 570 nm
Natrium-Fluoreszein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ex} = 460 nm, λ_{em} = 515 nm
Neutralrotlösung, 0,5 % in Essigsäure pH 5,2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	λ_{ab} = 540 nm
Rhodamin-Phalloidin	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE	λ_{ex} = 540 nm, λ_{em} = 565 nm
TAMRA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE	λ_{ex} = 543 nm, λ_{em} = 572 nm

FD, Fluoreszein-Isothiocyanat-Dextran; FITC, Fluoreszein-Isothiocyanat; TAMRA, 5,6-Carboxytetramethyl-rhodamin; TRITC, Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat; λ_{ab}, Wellenlänge der Absorptionsmessung; λ_{ex}, Anregungswellenlänge; λ_{em}, Emmisionswellenlänge.

Tab. 17: Eukaryotische Zellen und Versuchstiere

Zellen **Spezies/ Gewebe/ Zelltyp**	**Mutation**	**Bezugsquelle**
Astrozyten (primär) Ratte/ zerebraler Cortex/ Gliazelle	WT	Helms et al., 2014
bEND.3 Maus/ zerebraler Cortex/ Endothel	WT	Zwanziger et al., 2012b
HEK-293 Mensch/ Niere/ Epithel	hClaudin-1-YFP	Piontek et al., 2011
	mClaudin-3-YFP	Piontek et al., 2011
	hClaudin-4-YFP	Piontek et al., 2011
	mClaudin-5-YFP	Piontek et al., 2011
	YFP-mClaudin-11	zur Verfügung gestellt von Dr. P. Berndt
	YFP-hOccludin	Bellmann et al., 2014
MDCK-II Hund/distaler Tubulus/ Epithel	WT	Gehne et al., 2017
	YFP-mClaudin-5	Gehne et al., 2017
pBCEC (primär) Rind/ zerebraler Cortex/ Endothel	WT	Helms et al., 2014
U-87 MG Mensch/ Glioblastom/ gliale Tumor-zellen	WT	EPO GmbH
Versuchstier, Spezies	**Stamm**	**Bezugsquelle**
Mus musculus	C57BL/6	MDC, Berlin, DE
	C57BL/6-Cldn12$^{tm1(KOMP)Vlcg}$/Ph	Züchtung durch R. Blasig, FMP, Berlin, DE
	NMRI-nu/nu	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, FR

h, human; m, murin; pBCEC, primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen; YFP, *Yellow Fluorescent Protein.*

Tab. 18: Software

Programm	Hersteller/Bezugsquelle
BIOVIA Discovery-Studio, Version 4.5	Accelrys, San Diego, USA
BLAST®	NCBI, Rockville Pike, USA
CABS-dock	Kurcinski et al., 2015
EMBOSS	Rice et al., 2000
Endnote, Version X8	Thomson Reuters, Philadelphia, USA
I-TASSER	Roy et al., 2010; Zhang, 2008
ImageJ, Version 1.49k	W. Rasband, National Institutes of Health, USA
Matlab®	MathWorks, Natick, USA
MS Office 2010	Professionel Microsoft, Unterschleißheim, DE
PEP-FOLD	Shen et al., 2014; Thevenet et al., 2012
Primer3Plus.com	Untergasser et al., 2012
Prism 5, Version 5.04	GraphPad, San Diego, USA
PSIPRED	Buchan et al., 2013
PyRAT Version 3.6-403-g7178127	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden,DE
Spectra Manager, Version 1.54.03	Jasco, Tokio, JP
StepOne® Software v2.2.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Zeiss LSM Image Browser, Version 4.2.0.121	Carl Zeiss, Jena, DE
ZEN 2010B SP1, Version 6,0,0485	Carl Zeiss, Jena, DE

2.2 Peptiddesign und -synthese

Die Modulation der BHS sollte mittels Peptid-Sequenzen untersucht werden, deren Ursprung das *Tight-Junction*-Protein Claudin-5 ist. Das Peptid C5C2 ist von der EZS1 von murinem Claudin-5 entlehnt (AS 53-81). Eine modifizierte Variante ist C5C2[S22N], dessen Ser an Position 22 (Position 74 im Claudin-5-Molekül) durch Asn ausgetauscht wurde. Damit ähnelt es der Sequenz von Claudin-1, welche an dieser Stelle ein Asn ausbildet. Die Peptide C5C2/C-4AS und C5C2/N+5AS sind C-terminal um 4 AS verkürzt bzw. N-terminal um 5 AS verlängert (KGLWQ). C5C2/shifted ist sowohl verkürzt (4 AS, C-terminal) als auch verlängert (5 AS, KGLWQ, N-terminal). Die Sequenz von D-AS-C5C2 stimmt mit der von C5C2 überein, ist jedoch vollständig aus D-AS aufgebaut. Dasselbe gilt auch für D-AS-C5C2[S22N] und D-AS-C5C2/shifted in Bezug auf ihre L-AS-Varianten.

Wenn nicht anders erwähnt, stammen die genannten Peptide von murinem Claudin-5. Humane Claudin-5-Peptide waren hC5C2 (analog zu murinem C5C2) und C5/hEZS2, ein Peptid generiert aus der kompletten EZS2 (AS 145-160). C5/mEZS2 ist das murine Äquivalent dazu. C2C2 aus der EZS1 von murinem Claudin-2 (AS 53-81) wurde als Kontrollpeptid verwendet (Dabrowski et al., 2015; Staat et al., 2015; Zwanziger et al., 2012a).

Die Peptide waren C-terminal amidiert und native Cys (C54 und C64) wurden durch Ser ersetzt, um die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke (Wen et al., 2004) zu unterbinden. Darüber hinaus wurden C5C2, D-C5C2, C5C2[S22N] und C2C2 N-terminal mit 5,6-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) und/oder Fluoreszein markiert (Zwanziger et al., 2012b). Die jeweiligen Sequenzen sind in Tab. 19 dargestellt.

Die Herstellung der Peptide erfolgte in der Abteilung Chemische Biologie des Leibniz-Forschungsinstitutes für Molekulare Pharmakologie durch I. Kretzschmar mittels Festphasensynthese nach 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Peptidchemie (Coin et al., 2007). Die durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgetrennten Fraktionen des Rohpeptides (detektiert bei 220 nm) wurden lyophilisiert und deren Reinheit massenspektrometrisch bestimmt. Peptidfraktionen mit der erwarteten Masse und einer Reinheit >95 % wurden für die Untersuchungen verwendet.

Tab. 19: Peptide

Peptidomimetikum	Abkürzung	Sequenz
Cldn2-EZS1-Peptid		
Cldn2(53-81)	C2C2	ESATHSTGITQSDIYSTLLGLPADIQAAQ-NH_2
Cldn5-EZS1-Peptide		
Cldn5(53-81)	C5C2	SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH_2
hCldn5(53-81)	hC5C2	SSVVQSTGHMQSKVYDSVLALSTEVQAAR-NH_2
Deletions-/Additionspeptide		
Cldn5(53-77)	C5C2/C-4AS	SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEV-NH_2
Cldn5(48-81)	C5C2/ N+5AS	KGLWQSSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR -NH_2
Cldn5(48-77)	C5C2/shifted	KGLWQSSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAER-NH_2
Substitutionspeptide		
Cldn5(53-81)[S74N]	C5C2[S22N]	SSVVQSTGHMQKVYESVLALNAEVQAAR-NH_2
D-Aminosäure-Peptide		
D-AS-Cldn5 (53-81)	D-AS-C5C2	ssvvqstghmqkvyesvlalsaevqaar-NH_2
D-AS-Cldn5 (48-77)	D-AS-C5C2/shifted	kglwqssvvqstghmqskvyesvlalsaer-NH_2
D-AS-Cldn5 (53-81)[S74N]	D-AS-C5C2[S22N]	ssvvqstghmqkvyesvlalnaevqaar-NH_2
Cldn5-EZS2-Peptide		
Cldn5(145-160)	C5/mEZS2	REFYDPTVPVSQKYEL-NH2
hCldn5(145-160)	C5/hEZS2	VREFYDPSVPVSQKYE-NH_2
Fluoreszenz-markierte Peptide		
Fluoreszein-Cldn5(53-81)	Fluoreszein-C5C2	Fluoreszein-SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH_2
Fluoreszein-D-AS-Cldn5(53-81)	Fluoreszein-D-AS-C5C2	Fluoreszein-ssvvqstghmqskvyesvlalsaevqaar-NH_2
TAMRA-Cldn2(53-81)	TAMRA-C2C2	TAMRA-ESATHSTGITQSDIYSTLLGLPADIQAAQ-NH_2
TAMRA-Cldn5(53-81)	TAMRA-C5C2	TAMRA-SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH_2
TAMRA-Cldn5 (53-81)[S74N]	TAMRA-C5C2[S22N]	TAMRA-SSVVQSTGHMQSKVYESVLALNAEVQAAR-NH_2

(53-81), Aminosäureposition im Ursprungsprotein; C-4AS; C-Terminus um 4 Aminosäuren (AS) verkürzt; C5, Claudin-5; Cldn, Claudin; D-AS, D-Aminosäure; EZS, extrazelluläre Schleife; h, human; m, murin; N+5AS, N-Terminus um 5 AS verlängert; S22N, Substitution Ser zu Asn in Position 22 des Peptides; shifted, C-Terminus um 4 AS verkürzt und N-Terminus um 5 AS verlängert; TAMRA, 5,6-Carboxytetramethylrhodamin.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Als *in vitro*-Modell der BHS wurden bEND.3-Zellen, eine endotheliale Zelllinie aus dem Mausgehirn, kultiviert. Diese sind bekannt für die Expression von Claudin-5, ZO-1, ZO-2 und Occludin (Brown et al., 2007; Watanabe et al., 2013). Als weiteres BHS-Modell dienten primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen, die mit primären Ratten-Astrozyten als Kontaktkultur kultiviert wurden. Die Zellen wurden von Prof. Dr. B. Brodin (Universität Kopenhagen, DK) zur Verfügung gestellt und in Kooperation mit E. Tornabene (Universität Kopenhagen, DK) kultiviert (Helms et al., 2014). Primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen exprimieren Claudin-5, Occludin und ZO-1 in hohem Maße (Fauquette et al., 2012; Helms et al., 2010). Die primäre Astrozyten-Kultur wurde darüber hinaus als Monokultur 3 Wochen kultiviert, um Astrozyten-konditioniertes Medium (AKM) zu generieren.

HEK-293-Zellen, humane, embryonale Nierenepithelzellen, bilden endogen keine *Tight Junctions* aus (Piontek et al., 2008) und exprimieren kein Claudin-1 bis -5 und Occludin sowie ZO-1 nur in geringem Maße (Staat, 2015). Daher wurden stabile monotransfizierte HEK-293-Zellen zur Untersuchung der *Tight-Junction*-Proteine Claudin-1, -3, -5, -11, -12 und Occludin eingesetzt. Zur besseren Detektion wurden N- bzw. C-terminale YFP-Fusionsproteine verwendet (s. Tab. 17).

Die epitheliale Nierenzelllinie MDCK (Madin-Darby *canine kidney*)-II wurde insbesondere für Permeationsuntersuchungen verwendet. Diese Zellen exprimieren endogen die Claudine-1, -2 -3, -4, Occludin, ZO-1 und Effluxtransporter, Claudin-5 jedoch nur in vernachlässigbarer Menge (Horio et al., 1989; McNeil et al., 2006; Staat et al., 2015). Daher wurden MDCK-II-Zellen stabil transfiziert, sodass sie ein Fusionsprotein aus murinem Claudin-5 mit N-terminalem YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) exprimieren (YFP-mClaudin-5, Gehne et al., 2017). Dieses lokalisiert an der Plasmamembran (Abb. 8). Die Zellen wurden von Dr. N. Gehne (FMP, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen in Komplettmedium (Tab. 20) sowie bei einer Temperatur von 37°C und einer CO_2-Konzentration von 10 % in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Im Besonderen wurden die bovinen Gehirnkapillarendothelzellen nach einer Kultivierung von 4 h mit frischem Wachstumsmedium (Komplettmedium mit 50 % AKM und Heparin 125 µg/ml) versorgt. Alle Zelllinien bildeten einen adhärent-wachsenden konfluenten Zellrasen aus.

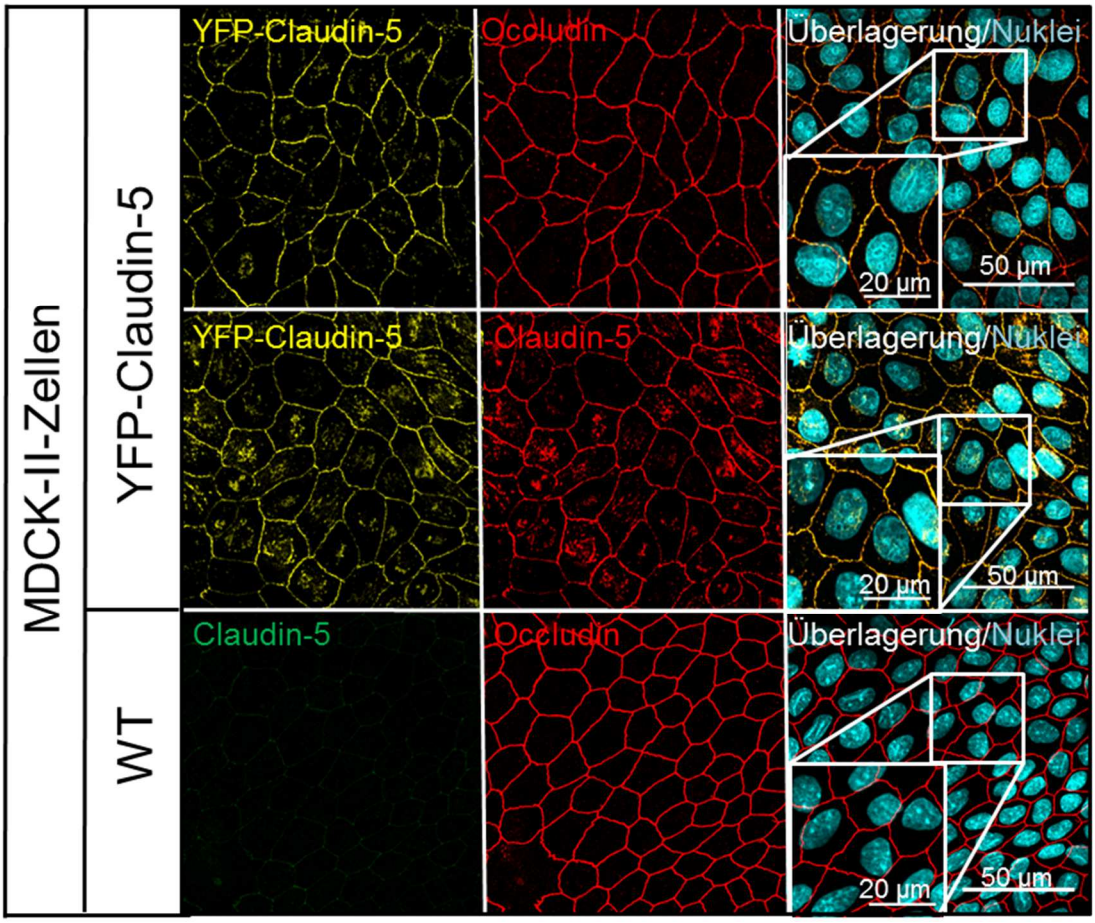


Abb. 8: MDCK-II-Zellen exprimieren stabil murines Claudin-5 N-terminal markiert mit *Yellow Fluorescent Protein* (YFP-mClaudin-5). Immunfluoreszenzfärbungen von MDCK (Madin Darby *canine kidney*)-II-Zellen transfiziert mit YFP-mClaudin-5 oder untransfiziert (WT, Wildtyp). WT-Zellen zeigen eine vernachlässigbare Claudin-5-Expression (unten). YFP-mClaudin-5-Zellen exprimieren Claudin-5 (oben, Mitte), welches mit Occludin in der Plasmamembran kolokalisiert (Überlagerung, orange Membranen).

2.3.1.1 Subkultivierung von Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurde alle drei bis fünf Tage das Komplettmedium abgesaugt. Ohne den Zellrasen zu beschädigen, wurde dieser zweimal mit 37°C vorgewärmtem PBS-/- (*Phosphate-buffered Saline* ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen, um Mediumreste und abgestorbene Zellen zu entfernen. Zum Ablösen der adhärenten Zellen wurden 20 µl/cm² Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung auf den Zellrasen gegeben (ca. 5 min, 37°C). Trypsin spaltet die Zellkontaktproteine und EDTA bindet als Komplexbildner die für die Zelladhäsionen wichtigen Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+}. Die Reaktion wurde mit Komplettmedium gestoppt, um einer Schädigung weiterer Zellproteine entgegenzuwirken. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (150×g, 4 min, Raumtemperatur (RT)) wurde das Zellpellet in Komplettmedium resuspendiert und konnte zum Passagieren oder für Versuche verwendet werden.

Tab. 20: Komplettmedien für die verwendeten Zelllinien

Medium-komponenten	bEND.3-Zellen	MDCK-II-YFP-mClaudin-5-Zellen, stabil-transfizierte HEK-Zellen	MDCK-II-Zellen	pBCEC Astrozyten
Basis-medium	DMEM High Glucose, 4,5 g/L Glucose	DMEM GlutaMAX, 1 g/L Glucose	DMEM GlutaMAX, 1 g/L Glucose	DMEM High Glucose, 4,5 g/L Glucose
FKS	10 %	10 %	10 %	10 %
Antibiotika	100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
Zusätze	/	/	/	Nicht essenzielle Aminosäuren (1x)
Selektions-antibiotikum	/	Geneticin (0,5 µg/ml)	/	/
Zellkultur-flaschen	25, 75 cm², CellBIND®	25, 75 cm², CELLSTAR®	25, 75 cm², CELLSTAR®	75 cm², CELLSTAR® 0,8 µg/cm² Kollagen Typ IV, 0,7 µg/cm² Fibronektin

bEND.3, Gehirnkapillarendothelzellen der Maus; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium; FKS, fötales Kälberserum; HEK-293, humane embryonale Nierenzellen; MDCK-II-Zellen, Zelllinie Madin-Darby *canine kidney*; m, murin; pBCEC, primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen; YFP, *Yellow Fluorescent Protein.*

2.3.1.2 Kryokonservierung

Zur permanenten Lagerung der Zelllinien diente flüssiger Stickstoff (-196°C). Dazu wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 % wie in 2.3.1.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert (150×g, 4 min, RT) und das Zellpellet in Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kryoprotektivum, 90 % fötales Kälberserum (FKS)) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden mit einer Kühlrate von -1°C/min bis auf -80°C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Reaktivierung wurde die Zellsuspension in Komplettmedium aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Komplettmedium resuspendiert und diente zur Kultivierung in Zellkulturflaschen.

2.3.1.3 Zellzahl-Bestimmung

Zur mikroskopischen Ermittlung der Zellzahl pro ml wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde die Anzahl der Zellen in den vier Zählgittern gezählt und die mittlere Zellzahl auf das Volumen eines Zählgitters von 0,1 µl bezogen.

2.3.1.4 Kultivierung der Zellen für Peptid-Assays

Vorbereitend auf die Behandlung der Zellen mit Peptiden wurden die jeweiligen Zellen in Komplettmedium auf Zellkulturplatten, Deckgläschen, Transwell-Filtern oder Elektroden-Haltern ausgesät. Die jeweiligen Kulturgefäße mit der verwendeten Zellzahl und Beschichtung sind in Tab. 21 zusammengefasst.

Besonderheiten gab es bei der Kultivierung der primären Gehirnkapillarendothelzellen auf Polycarbonat-Transwell-Filtern. Vor deren Aussaat wurden Astrozyten auf die Filterunterseite ausgesät und nach Adhärenz (15 min, 37°C) in Komplettmedium kultiviert. Die primären Gehirnkapillarendothelzellen wurden nach 2-3 Tagen in Komplettmedium mit 125 µg/ml Heparin auf die Filter ausgesät. Nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's* Medium (DMEM) ohne $NaHCO_3$, 50 mM TES (N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure), 10 ml/l nicht essenzielle Aminosäuren, 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,5 µM Dexamethason, 17,5 µM Ro-20-1724-Lösung, 312,5 µM 8-(4-CPT)-zyklisches Adenosinmonophosphat) durchgeführt. Nach weiteren 3 Tagen waren die Zellen für Versuche verwendbar.

Tab. 21: Kulturgefäße und Kultivierungsbedingungen für Peptid-Assays

	Deckgläschen für Mikroskopie	**ECIS-Elektroden**	**Zellkulturplatte 48 Well**	**Transwell-Filter 24 Well**	**Deckgläschen-Kammern**	**Transwell-Filter 12 Well**
Zelllinie	**bEND.3**	**bEND.3**	**b.END3/ MDCK-II-Zellen**	**MDCK-II-Zellen**	**HEK-293**	**Kokultur pBCEC + Astrozyten**
Wachstumsfläche (cm^2)	2 bzw. 10	0,8	1	0,6	0,8	1,12
Beschichtung	RSK, 0,6 µg/cm^2	Cystein, 2,5 µmol/cm^2	RSK, 1,2 µg/cm^2	RSK, 75 µg/cm^2	PLL, 5 µg/cm^2	Kollagen Typ IV, Fibronektin 5 µg/cm^2
Zellzahl pro cm^2	Nach Bedarf	62500	Nach Bedarf	266667	Nach Bedarf	pBCEC 90000 Astrozyten 110000
Wachstum bis Start der Behandlung	Bis 80-90 % Konfluenz	1 Tag	Bis 80-90 % Konfluenz	4 Tage	Bis 80 % Konfluenz	pBCEC 6 Tage Astrozyten 8-9 Tage

bEND.3, Gehirnkapillarendothelzellen der Maus; ECIS, *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*; HEK-293, humane embryonale Nierenzellen; MDCK-II-Zellen, Zelllinie Madin-Darby *canine kidney*; pBCEC, primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen; PLL, Poly-L-Lysin; RSK, Rattenschwanzkollagen.

2.3.2 Funktionale Assays

Um den Einfluss der Peptide auf die parazelluläre Abdichtung der verwendeten Zelllinien zu untersuchen, wurden sowohl Widerstands- als auch Permeationsmessungen durchgeführt. Die parazelluläre Ionendurchlässigkeit wurde über die Messung des transzellulären elektrischen Widerstands (TER) bestimmt, die Durchlässigkeit für Moleküle verschiedener Größen über Permeationsmessungen. Darüber hinaus wurden Vitalitätsassays durchgeführt, um zytotoxische Peptideffekte ausschließen zu können.

2.3.2.1 Transzellulärer elektrischer Widerstand

Für die Bestimmung des TER wurde bei bEND.3-Zellen die Methode des *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) angewendet, bei den primären Gehirnkapillarendothelzellen und den MDCK-II-Zellen die Messung mit der Handelektrode. Die TER-Messung ist eine etablierte Methode zur quantitativen Bestimmung der Dichtheit epithelialer und endothelialer Zellschichten *in vitro* (Benson et al., 2013; Cereijido et al., 1993; Wegener et al., 1996). Nach dem ohmschen Gesetz kann nach dem Anlegen einer kleinen Wechselspannung der TER unter Berücksichtigung der Wachstumsfläche und des Leerwertes wie folgt berechnet werden:

$$TER = (R_{Zellschicht} - R_{Leerwert}) \times A \qquad (\Omega \times cm^2)$$

$R_{zellschicht}$	Widerstand der Zellschicht zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment	(Ω)
$R_{Leerwert}$	Widerstand ohne Zellen zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment	(Ω)
A	Wachstumsflache	(cm^2)

Für die ECIS-Messung wachsen die Zellen auf einem Gold-Elektrodensystem. Damit ist eine Echtzeit-Messung des TER bei angelegter Wechselspannung nach definierten Zeitintervallen möglich. Die Messung wurde bei verschiedenen Frequenzen zwischen 100 und 80000 Hz durchgeführt. Da bei hohen Frequenzen (> 40000 Hz) der Strom über die Zellen fließt, sind niedrigere Frequenzen interessant, um Rückschlüsse auf den parazellulären Widerstand zu erhalten (AppliedBiophysics, 2017). Daher wurde der parazelluläre Widerstand bei 4000 Hz bestimmt.

Die kultivierten bEND.3-Zellen bilden auf den Elektroden nach 24 h einen stabilen TER von 1447±247 Ω×cm^2 (n=10, peptidfreie Mediumkontrollen) im Vergleich zur zellfreien Kontrolle mit 236±25 Ω×cm^2 aus. Damit sind die Werte vergleichbar mit TER-Werten, die für

andere Endothelzellen bestimmt wurden (Stolwijk et al., 2015; Szulcek et al., 2014). Die Messung wurde nicht länger als 72 h durchgeführt (24 h Wachstumsphase, 48 h Peptidbehandlung), da anschließend die Zellen durch einen abfallenden TER nicht mehr geeignet waren (Anhang 1). Die Zellen wurden im Plateau (nach ca. 24 h) mit Peptiden (75-300 µM) oder Medium für 24 h behandelt. Für Regenerationsexperimente wurde das peptidhaltige Medium jeweils nach 16 h durch frisches bEND.3-Komplettmedium ersetzt und die Regeneration für weitere 32 h gemessen.

Der TER von MDCK-II-Zellen (Wildtyp (WT) und YFP-mClaudin-5) sowie primären Gehirnkapillarendothelzellen (Kontaktkultur mit Astrozyten) wurde in Transwell-Filtern mit der Handelektrode (Dreifachbestimmung um 120° versetzt, 37°C) vor und nach Peptidbehandlung nach definierten Zeitintervallen gemessen. MDCK-II-Zellen wurden apikal mit 300 µM Peptid oder Medium für 48 h behandelt. Bei der Behandlung wurde das basolaterale Medium durch frisches Komplettmedium ausgetauscht.

Um ein möglichst ungestörtes Wachstum der primären Gehirnendothelzellen zu gewährleisten, wurde apikal die Hälfte des Mediums durch peptidhaltiges Medium (finale Konzentration: 75-300 µM) oder Komplettmedium ausgetauscht. Im basolateralen Kompartiment wurde kein Mediumwechsel vorgenommen.

Der TER wurde jeweils als Widerstand × Fläche ($\Omega \times cm^2$) angegeben und auf die zellfreie Mediumkontrolle normiert. Vor der Behandlung lagen die TER-Werte für die MDCK-II-YFP-mClaudin-Zellen bei 73,1±7,5 $\Omega \times cm^2$ und für die bovinen Zellen bei 493±48 $\Omega \times cm^2$ (abzüglich Leerkontrolle, repräsentative Werte eines Experimentes, n=20 bzw. n=17).

2.3.2.2 Permeationsmessung

Permeationsmessungen der MDCK-II-Zellen (WT und YFP-mClaudin-5) sowie primären Gehirnkapillarendothelzellen (Kontaktkultur mit Astrozyten) in Filterkulturen wurden nach 48-stündiger bzw. 24-stündiger Peptidbehandlung durchgeführt. Zuvor wurde die Unversehrtheit des Zellrasens mittels Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Anschließend wurden die Filter mit Permeationslösung (37°C, HBSS+/+ (*Hank's Buffered Salt Solution* mit Ca^{2+} und Mg^{2+}), 5 % FKS, 10 mM HEPES) zweimal apikal und basolateral gewaschen. Die Permeation (bei 37°C) wurde von Lucifer Yellow (LY, 100 µM), 10 und 40 kDa Fluoreszein-Isothyiocyanat (FITC)-Dextran (FD10, 8 µM; FD40, 2,5 µM), FITC-Albumin (1,2 µM), 155 kDa Tetramethylrhodamin-Isothyocyanat (TRITC)-Dextran (0,5 µM) und Doxorubicin (25 µM) bestimmt. Die Größenmarker (gelöst in Permeationslösung) wurden apikal hinzugefügt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der Größenmarker (Fluoreszenzeigenschaften

s. Tab. 16) nach verschiedenen Zeitintervallen (10, 25, 50 min) in 600 µL basolateraler Permeationslösung mittels Plattenmessgerät gemessen und der Permeatioskoeffizient (P_K) nach folgender Formel berechnet (Staat et al., 2015):

$$P_K = \frac{dQ}{dt} * \left(\frac{1}{A} * c_0 * 60\right) \qquad \left(\frac{cm}{s}\right)$$

$\frac{dQ}{dt}$	Permeabilität des Größenmarkers	$\left(\frac{\mu g}{min}\right)$
A	Wachstumsfläche des Filters	(cm^2)
c_0	Initiale Markerkonzentration apikal	$\left(\frac{\mu g}{ml}\right)$

Vor der Behandlung der MDCK-II-YFP-mClaudin-5-Zellen wurden Permeationskoeffizienten (cm/s) um $(3{,}2\pm1{,}9)\times10^{-6}$ (Doxorubicin, 580 Da); $(4{,}2\pm3{,}1)\times10^{-6}$ (Lucifer Yellow, 457 Da); $(1{,}6\pm1{,}1)\times10^{-6}$ (FD10, 10 kDa); $(1{,}2\pm1{,}5)\times10^{-6}$ (FD40, 40 kDa); $(9{,}1\pm5{,}0)\times10^{-7}$ (FITC-Albumin, 67 kDa) und $(2{,}8\pm1{,}2)\times10^{-7}$ (TRITC-Dextran, 155 kDa) gemessen. Die Lucifer-Yellow-Permeabilität lag bei unbehandelten Filterkulturen der primären Gehirnendothelzellen mit Astrozyten bei $(3{,}7\pm0{,}8)\times10^{-6}$ cm/s.

2.3.2.3 Vitalitätsassays

Konfluente Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h in Komplettmedium mit Peptiden (300 µM), Triton X-100 (0,01 %) oder peptidfreiem Medium kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS+/+ (*Phosphate buffered saline* mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) wurden die Zellen entweder mit 200 µl MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid; 0,5 g/ml) oder mit Neutralrot (50 µg/ml) in Zellkulturmedium ohne Phenolrot inkubiert (3 h, 37°C). Beide Assays basieren auf dem Nachweis lebender Zellen. MTT wird von den Zellen zu unlöslichem, violettem Formazan umgewandelt, welches in den Zellen als Präzipitat akkumuliert und direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen ist. Der Umwandlungsprozess des Farbstoffs ist nicht vollständig aufgeklärt, beruht aber höchstwahrscheinlich auf einer Reduktion von NADH durch Reduktasen in Mitochondrien, Zytoplasma, Endosomen, Lysosomen und der Plasmamembran (Bernas und Dobrucki, 2002; Berridge et al., 2005; Liu et al., 1997). Neutralrot reichert sich durch passive Diffusion in den Lysosomen an und bindet dort über hydrophobe Wechselwirkungen an die lysosomale Matrix (Nemes et al., 1979; Winckler, 1974).

Nach anschließendem Waschen (2x, PBS+/+) wurden die zellulär akkumulierten Farbstoffe mittels Extraktionslösung gelöst (für MTT-Assay: 5 % Triton X-100, 95 % Isopropanol; für

Neutralrot-Assay: 2 % Essigsäure, 50 % Ethanol (99 %)). Nach 10-minütigem Schütteln (800 U/min) wurde die Absorption mittels Plattenmessgerät bestimmt (MTT: 570 nm; Neutralrot: 540 nm).

2.3.3 Mikroskopische Untersuchungen

2.3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Untersuchung der Peptideffekte auf die Zellintegrität, -morphologie und Proteinexpression wurden bEND.3-Zellen und primäre Gehirnkapillarendothelzellen, nach Peptidbehandlung (75-300 µM) fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Dazu wurden bEND.3-Zellen auf Deckgläschen und primäre Gehirnkapillarendothelzellen auf Transwell-Filtern für 24 h behandelt. Zur Bestimmung des Regenerationspotenzials der bEND.3-Zellen nach Peptidgabe wurden diese nach einer 16-stündigen Behandlung mit frischem Komplettmedium für weitere 32 h inkubiert.

Nach initialem Waschen des Zellrasens mit PBS+/+ folgte eine Fixierung in kaltem Aceton (5 min) und Ethanol (1 min). Unspezifische Bindungsstellen der Zellen wurden blockiert (PBS+/+, 5 % Milchpulver, 0,05 % Tween®20, 1 h, RT). Die Zellen wurden mit Primärantikörpern und mit Fluoreszenzmolekül-gekoppelten Sekundärantikörpern (s. Tab. 11) inkubiert (in PBS+/+ mit 0,25 % Milchpulver, je 1 h, RT). Vor der Sekundärantikörper-Inkubation wurde der Zellrasen mit PBS+/+ mit 0,25 % Milchpulver gewaschen, danach mit PBS+/+. Die Nuklei wurden mit Hoechst 33342 (5 µM in PBS+/+, 5 min, RT) gefärbt. Anschließend wurden Deckgläschen und Filtermembranen auf Objektträgern mit ImmuMount eingedeckt und Bilder mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 780 aufgenommen. Das Programm ImageJ diente der Berechnung der Zell-Zirkularität mithilfe von Claudin-5-gefärbten Zellmembranen. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$Zirkularität = 4\pi \times \frac{Zellfläche}{Umfang^2}$$

Zellfläche (µm²)

Umfang (µm)

Zellen mit einem Zirkularitätswert, der sich an 0 annähert, sind typischerweise durch eine elliptische Spindelform charakterisiert. Ein Wert von 1 ergibt einen Kreis. Dadurch kann der Einfluss der Peptidwirkung auf die Zellmorphologie beurteilt werden (Abb. 9A).

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten mittels ImageJ wurde ein definiertes Band mit 2 µm Breite um die Plasmamembranen gelegt. Die gemessenen Intensitäten des Bandes geben Rückschlüsse auf die Membran-lokalisierte Proteinexpression und die Intensitäten der vom Band begrenzten Fläche auf die intrazelluläre Expression (Abb. 9B).

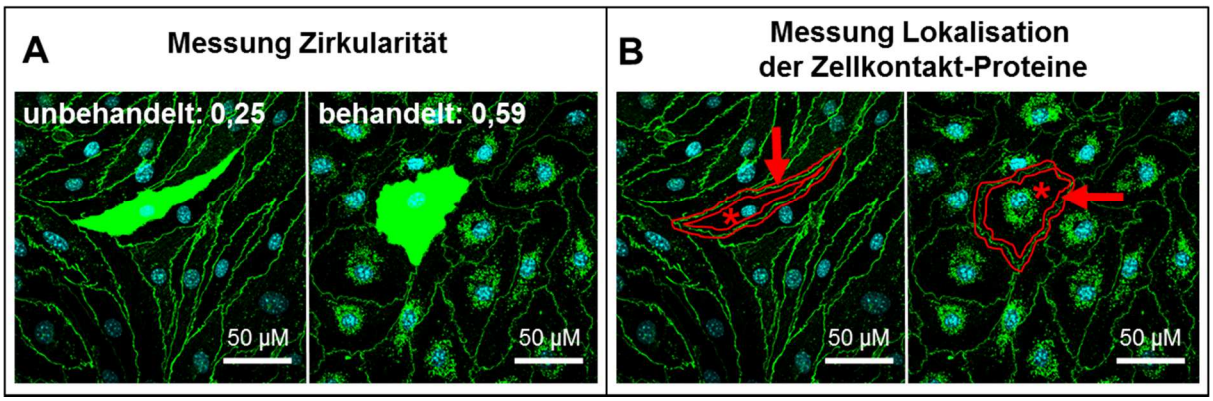


Abb. 9: Quantifizierung der Zell-Zirkularität und der Fluoreszenzintensitäten von Zell-Zell-Kontaktproteinen in Immunfluoreszenzfärbungen mit ImageJ. Beispiel Claudin-5 (grün). **(A)** Messung der Zellfläche und des Zellumfangs (grüne Fläche) zur Berechnung der Zirkularität ($4\pi \times$ Zellfläche/Umfang^2). Wert gegen 0: Ellipse, Wert gegen 1: Kreis. **(B)** Bestimmung der Lokalisation der Zell-Kontaktproteine durch Messung der Fluoreszenzintensitäten intrazellulär (Sterne) und im Membranbereich (Pfeile) durch Anlegen eines Bandes (2 µm Breite).

2.3.3.2 Lebendzell-Mikroskopie

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Peptidaufnahme wurden bEND.3-Zellen auf Deckgläschen mit TAMRA-Peptiden oder TAMRA (jeweils 10 µM, 1 % DMSO) für verschiedene Zeitpunkte inkubiert (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h). Zur zellulären Detektion der Fluoreszenz-markierten Peptide wurde der Zellrasen zunächst mit HBSS+/+ gewaschen und die Nuklei mit Hoechst 33342 (5 µM in HBSS+/+) gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (λ_{ex} = 561 nm, λ_{em} = 563-699 nm) untersucht. Für Zeitpunkte über 4 h betrug die Laserintensität 24 % (Blende 40 µm); für Zeitpunkte unter 4 h 30 % (Blende 165 µm), um ausreichende Laserintensitäten messen zu können. Es wurden ca. 20 Bilder aus mehreren Ebenen im Abstand von 1 µm aufgenommen (Z-Stapel), um die Peptidverteilung dreidimensional zu untersuchen. Pro Probe wurde ein Mittelwert aus mindestens drei Z-Stapeln gebildet. Die TAMRA-Intensitäten innerhalb der Zellen wurden pro Ebene mittels ImageJ bestimmt und die Summe aller detektierten TAMRA-Signale eines Z-Stapels berechnet.

Um eine Interaktion von Claudin-5-Peptiden mit *Tight-Junction*-Proteinen zu untersuchen, wurden monotransfizierte HEK-293-Zellen, die stabil YFP-markierte Claudine und Occludin exprimieren (s. Tab. 17), mit 300 µL Peptiden oder Medium behandelt. Nach 24 h wurde der

Zellrasen mit HBSS+/+ gewaschen und mit Hoechst 33342 (5 µM in HBSS+/+) gefärbt. Da die *Tight-Junction*-Proteine mit gelb-fluoreszierendem YFP gekoppelt waren, wurden sie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 491-535 nm) und Bilder aufgenommen. Zur Messung des Peptideinflusses auf die Membranlokalisation der Claudine und Occludin wurde ein definiertes Band mit 1 µm Breite um die Zellmembran gelegt und die Fluoreszenzintensität mit ImageJ bestimmt.

2.3.3.3 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Die Gefrierbruch-Methode gibt Einblicke in die Ultrastruktur von *Tight Junctions* (Wolburg et al., 2003a) durch die Aufspaltung der Membran in die protoplasmatische Hälfte (P-Face) und die exoplasmatische Hälfte (E-Face).

Konfluente bEND.3-Zellen wurden mit 300 µM Peptid oder Mediumkontrolle für 24 h behandelt. Die Zellen wurden mit PBS+/+ gewaschen, mit Glutaraldehyd (2,5 % in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,4, 2 h, RT) fixiert und in Cacodylatpuffer bei 4°C gelagert. Die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurde in Kooperation mit Dr. P. Fallier-Becker (Universitätsklinik Tübingen, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Tübingen) durchgeführt. Die adhärenten Zellen wurden in 30 % Glyzerol für 30 min inkubiert (Gefrierschutz) und anschließend mit einem Plastikschaber von der Unterlage abgenommen. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde zwischen zwei Goldplättchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden in einer Gefrierbruchanlage bei -150°C und 5×10^{-6} bar aufgebrochen. Die Bruchflächen wurden im gekühlten Vakuum mit Platin (3 nm, Winkel 45°) und zur Stabilisierung der Replikas mit Kohle (30 nm, Winkel 90°) bedampft. Die Replikas wurden in Natriumhypochlorit gereinigt, mit destilliertem Wasser mehrfach gewaschen und auf ein mit Pioloform beschichtetes Kupfernetz überführt. Die Analyse der Replikas erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM10. Da Claudin-5-abhängige *Tight Junctions* mit der E-Face assoziieren (Piontek et al., 2008; Rossa et al., 2014) wurde mittels ImageJ die Anzahl der *Tight-Junction*-Partikel auf die Stranglänge in µm bezogen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Expressionsbestimmung

2.4.1.1 RNA-Isolation aus Zelllysaten und Organen

Zur RNA-Isolation mit dem GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit wurden Zellen und Organe wie folgt vorbereitet: bEND.3-Zellen wurden nach Peptidbehandlung (300 µM,

24 h) in 48-Well-Platten gewaschen (auf Eis, 2mal, PBS+/+). Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer (im Kit enthalten) aufgenommen und die RNA im Zelllysat nach Herstellerangaben isoliert und in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Isolierte Gehirnkapillaren wurden ebenso in Lysepuffer aufgenommen und die RNA isoliert.

Zur RNA-Isolation aus Mausorganen wurden Claudin-12-KO- oder WT-C57BL/6-Mäuse (30-40 Wochen alt) durch zervikale Dislokation getötet und folgende Organe und Gewebe entnommen: Großhirnrinde, Milz, Speicheldrüse (*Glandula submandibularis*), Lunge, Leber, Nierencortex, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Pankreas, Testis, Uterus, Harnblase. Für Expressionsuntersuchungen im Myokard wurde der Herzapex ohne Ventrikelendokard und Septumgewebe entnommen (Alter der Mäuse: 15-28 Wochen).

Je Gewebe wurden ca. 5 mg in Lysepuffer homogenisiert und nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Reduktion von Verunreinigungen durch DNA wurde zusätzlich ein DNase-Verdau (1 U/Probe) durchgeführt (s. Anleitung GeneMATRIX UniversalRNA Purification Kit).

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm gemessen. Zur Prüfung der Reinheit wurde darüber hinaus das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.4.1.2 cDNA-Synthese

cDNA wurde mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit synthetisiert. Die Komponenten des Reaktionsansatzes und das Synthese-Protokoll sind in Tab. 22 zusammengefasst. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde als Kontrollsynthese eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

Tab. 22: Reaktionsansatz und Protokoll für die cDNA-Synthese

Komponente	Konzentration	PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
Reaktionsmix (5x)	1x	**Einleitende Inkubation**	25°C	10 min
Maxima Enzym-Mix	2 µl	**Reverse Transkription**	50°C	15 min
Proben-RNA	5 ng/µl	**Beendigung der Reaktion**	85°C	5 min
Nuklease-freies H_2O	ad 20 µl	**Kühlschritt**	4°C	∞

PCR, Polymerase-Kettenreaktion.

2.4.1.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde mit dem StepOnePlus® Real Time PCR-System unter Verwendung des Luminaris Color HiGreen high ROX qPCR-Mastermix durchgeführt. Der Mastermix enthält eine *Taq*-Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv ist. Ein fluoreszierender Farbstoff emittiert Licht nach Bindung an doppelsträngige cDNA, die während der PCR vervielfältigt wird. Die Komponenten des Reaktionsansatzes und das qRT-PCR-Protokoll sind in Tab. 23 zusammengefasst. Maus-spezifische Primer (Tab. 15) wurden mit Primer3Plus (Untergasser et al., 2012) entworfen und ihre Bindungsspezifität mittels BLAST® getestet.

Tab. 23: Reaktionsansatz und Protokoll für die qRT-PCR

Komponente	**Konzentration**	**PCR-Protokoll**	**Temperatur**	**Zeit**	**Zyklusanzahl**
Luminaris Color HiGreen qPCR Master-Mix (2x)	1x	**Uracil-DNA-Glykosylase-Vorbehandlung**	50°C	2 min	1
Primer (*for*)	0,3 µM	**Einleitende Denaturierung**	95°C	10 min	1
Primer (*rev*)	0,3 µM	**Denaturierung**	95°C	15 s	40
Proben-cDNA	0,2 ng/µl	***Annealing*/Extension**	60°C	60 s	
Nuklease-freies H_2O	ad 20 µl				

for, Vorwärts-Primer; qRT-PCR, quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion; *rev*, Rückwärts-Primer.

Zur Auswertung der Daten wurde für alle getesteten Gene der Schwellenwert im linearen Bereich der exponentiellen Vervielfältigungsphase (Extension) bei 0,4 gesetzt. Dieser Wert gibt die normierte Intensität des Reporter-Farbstoffes (SYBR Green I) an. Somit konnte für alle Gene der Zykluswert abgelesen werden, bei dem die Intensität den gesetzten Schwellenwert erreicht hatte (Ct-Wert). Da die Intensität des Farbstoffs proportional zur vervielfältigten DNA-Menge ist, wurde eine quantitative Bestimmung der Zielgene relativ zum Kontrollgen β-Aktin nach folgenden Formeln errechnet:

$\Delta Ct = Ct_{\beta-Aktin} - Ct_{Zielgen}$ $\quad Ct$ Schwellenwertzyklus

$\text{Zielgenexpression}_{\text{normiert}} = 2^{\Delta Ct}$

Durch die Analyse der Primer-Schmelzkurven (gradueller Temperaturanstieg um 0,3°C von 60 bis 90°C) konnten spezifische von unspezifischen Produkten unterschieden werden. Die Effizienzen der verwendeten Primer lagen im Bereich zwischen 1,95 und 2,04 (Berndt, 2017; Primereffizienz=2,0, 100 % Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus).

2.4.2 Albuminbindung der Peptide

Inwieweit die Peptide an Albumin binden, sollte mittels Dialyse nachgewiesen werden. Dazu wurde bovines Serumalbumin (BSA) in physiologischer Konzentration von ~40 g/l (Peters, 1996) in HBSS+/+ gelöst. Fluoreszenzmolekül-markierte Peptide (~3000 Da), Evans Blue (961 Da), Na-Fluoreszein (NaFl, 376 Da) oder TAMRA (430 Da) wurden mit einer Konzentration von 200 µM in BSA-Lösung gelöst und gegen peptidfreie BSA-Lösung 72 h bei 4°C dialysiert. Die Molekulargewichtsgrenze (12-14 kDa) wurde so gewählt, dass die Membran für die oben genannten Peptide und Farbsubstanzen jedoch nicht für Albumin (~66 kDa) permeabel ist. Nach Abschluss der Dialyse wurden Proben entnommen und der Gehalt an Fluoreszenz-markierten Peptiden außerhalb des Dialyseschlauches mittels Plattenmessgerät bestimmt. Die Berechnung der Albumin-ungebundenen Substanzmengen erfolgte nach folgender Formel:

$$Freie\ Substanz\ = F_{(\text{äußeres } Dialysekompartiment)} - F_{(Puffer)}$$

in willkürlichen Einheiten

F, Fluoreszenzintensität

Evans Blue bindet in der verwendeten Konzentration fast vollständig an Albumin (Rawson, 1943) und wurde daher als Referenz verwendet. Im Gegensatz dazu zeigt Na-Fluoreszein eine sehr geringe Plasmaproteinbindung (Wolman et al., 1981).

2.5 *In-vivo*- und *ex-vivo*-Untersuchungen

Die Versuchsmäuse wurden im Tierstall des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin in Standardkäfigen mit einem 12-h-Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Wasser und Futter wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Experimente wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) genehmigt: Tötung für Organentnahme T0457/09 vom 16.11.2009; Gewebeentnahme für Genotypisierung O0369/11 vom 14.02.2011; Peptidexperimente G0030/13 vom 23.04.2013.

2.5.1 Na-Fluoreszein-Aufnahme ins Gehirn

Zur Bewertung des Potenzials der Claudin-5-Peptide auf die BHS-Permeabilität *in vivo* wurden in C57BL/6-Mäuse (10-19 Wochen alt, 18-23 g) in PBS+/+ gelöste Peptide (3,5 µmol/kg) oder PBS+/+ injiziert (i.v., laterale Schwanzvene). Nach 1, 4, 12 oder 24 h folgte eine Na-Fluoreszein-Injektion (376 Da; 0,5 mmol/kg; i.v., laterale Schwanzvene). Als Molekularge-

wichtsmarker ist Na-Fluoreszein durch eine sehr geringe Plasmaproteinbindung für Untersuchungen zur BHS-Permeabilität gut geeignet (Kaya und Ahishali, 2011; Wolman et al., 1981). Weitere untersuchte Applikationsregime waren eine Zweifach- (Peptid: t=0, 2 h; Na-Fluoreszein: t=4 h) und Dreifachinjektion (Peptid: t=0, 16, 19 h; Na-Fluoreszein: t=21 h).

Jeweils 10 min nach der Na-Fluoreszein-Injektion erfolgte eine Injektionsnarkose (i.p.) mit Ketamin (120 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg). Durch eine transkardiale Perfusion wurde Na-Fluoreszein im Blut entfernt. Dazu wurden die Mausherzen präpariert und über eine Schmetterlingskanüle im linken Ventrikel mit Perfusionspuffer (25 ml PBS+/+, 6250 I.E. Heparin, 4 ml/min) perfundiert. Ein Einschnitt des rechten Vorhofs diente dem vollständigen Austritt des Blutes durch das Spülen mit dem Perfusionspuffer. Großhirnhälften, Nieren und Leberlappen wurden in Methylbutan auf Trockeneis eingefroren. Die Organe wurden in PBS+/+ homogenisiert und mit Trichloressigsäure (finale Konzentration 30 %, w/v) gefällt (im Dunkeln, über Nacht, 4°C). Homogenisierte Organe wurden zentrifugiert (19000×g, 15 min, 4°C) und die Fluoreszenzintensität im Überstand mittels Plattenmessgerät gemessen (λ_{ex}=485 nm/λ_{em}=520 nm). Die Na-Fluoreszein-Aufnahme in die Organe wurde auf das Organgewicht bezogen ($\mu g_{NaFl}/mg_{Organ}$) und relativ zum Kontrollpeptid C2C2 dargestellt.

Als weitere Methode zur Bestimmung der Na-Fluoreszein-Aufnahme ins Gehirn wurden in Kooperation mit Prof. Dr. A. Andjelkovic-Zochowski und Dr. S. Stamatovic (Universität Michigan, USA) die Peptide in die rechte *A. carotis communis* (3,5 µmol/kg Peptid in physiologischer NaCl-Lösung) injiziert. Nach 10 min erfolgte eine Na-Fluoreszein-Injektion (i.p., 1 mol/kg, 30 min). Sowohl die Operation zur Peptidinjektion in die *A. carotis communis* als auch die transkardiale Perfusion wurden unter Narkose durchgeführt (i.p., 100 mg/kg Ketamin, 10 mg/kg Xylazin). Die transkardiale Perfusion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Vor der Perfusion wurde linksventrikuläres Vollblut entnommen, im Verhältnis von 1:4 mit Zitratpuffer (3,2 %) gemischt und zentrifugiert (750×g, 10 min, RT). Das gewonnene Blutplasma und die nach der Perfusion entnommenen Organe wurden in Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) homogenisiert und zentrifugiert (1000×g, 30 min, RT), der Überstand im Verhältnis von 1:1 mit Methanol gemischt und erneut zentrifugiert (1000×g, 10 min, RT). Die Fluoreszenzintensität im Überstand wurde wie oben beschrieben mit dem Plattenmessgerät gemessen und die Na-Fluoreszein-Konzentration im Gehirn auf die Konzentration im Blutplasma normiert (C_{Gehirn} (µg/ml)/C_{Blut} (µg/ml) pro g_{Gehirn}).

2.5.2 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wurde als weitere Methode eingesetzt, um das Potenzial der Claudin-5-Peptide zur Steigerung der BHS-Permeabilität *in vivo* zu bestätigen. Dazu wurden in C57BL/6-Mäuse Peptide (3,5 µmol/kg) oder PBS+/+ injiziert (i.v., Schwanzvene). Die MRT-Bildgebung erfolgte 4 h nach Peptidinjektion und wurde in Kooperation mit Prof. Dr. T. Niendorf, Dr. M.-C. Ku und Dr. A. Pohlmann (Berlin Ultrahigh Field Facility, MDC, Berlin) durchgeführt. Dreißig Minuten vor der MRT-Untersuchung wurde den Mäusen unter Isoflurannarkose (1,2-2,0 % in Luft) ein Schwanzvenenkatheter als Vorbereitung für die Kontrastmittelinjektion gelegt. Anschließend wurden die Tiere in eine gewärmte Halterung ins MRT-System (9,4 Tesla, Biospec 94/20) überführt. Atemfrequenz und Körpertemperatur wurden mittels Kontrollsystem (Model 1025) überwacht.

Als Kontrastmittel, welches unter Kontrollbedingungen nicht BHS-gängig ist, wurde Diethylen-Triamin-Pentaessigsäure Gadolinium III (Gd-DTPA, 547 Da, 1 mmol/kg) über 20 min i.v. mittels Spritzenpumpe (Model PHD 22/2000) injiziert. Eine Kontrastmittelgabe reduziert die T_1-Relaxationszeit, daher wurden ΔT_1-Übersichten als Differenz zwischen T_1 vor Kontrastmittel- ($T_{1prä}$) und nach Kontrastmittelapplikation (T_{1post}) berechnet, um quantitative Informationen über die BHS-Gängigkeit des Kontrastmittels zu erhalten. Die T_1-Relaxationszeit beschreibt die longitudinale Relaxation, d.h. die Zeit, die die Kernspins zum Aufrichten entlang des äußeren Magnetfeldes nach Abschalten des Hochfrequenzimpulses benötigen.

2.5.2.1 Datenauswertung

T_1-Übersichten wurden über eine exponentielle Kurve an die Signalintensitäten der T_1-gewichteten Bilder angepasst. Zum Vergleich der relativen T_1-Veränderungen wurde zunächst der ΔT_1-Wert berechnet:

$$\Delta T_1 = \left(\frac{T_{1\,post}}{T_{1\,prä}}\right) - 1 \qquad (\%)$$

$T_{1\,prä}$ T_1-Relaxationszeit vor Kontrastmittelgabe

$T_{1\,post}$ T_1-Relaxationszeit nach Kontrastmittelgabe

Auf die ΔT_1-Übersichten wurde eine Schablone mit anatomischer Referenz (Waxholm Space, http://www.imaging.org.au/AMBMC/Mode) angewendet, die die lateralen Ventrikel und deren periventrikulären Raum erfasste. Histogramme der periventrikulären ΔT_1-Schablonen wurden mit ImageJ angefertigt und mittels Integration als kumulative Häufigkeiten darge-

stellt. Zum quantitativen Vergleich zwischen Kontroll- und Peptidgruppe wurde das Maximum (d_{max}) der absoluten Unterschiede der kumulativen Häufigkeiten (F_c) berechnet:

$$d_{max} = Maximum\left|F_c(\Delta T_{1\,Kontrolle}) - F_c\left(\Delta T_{1\,Peptid}\right)\right|$$

d_{max} maximaler Unterschied der kumulativen Häufigkeiten

F_c kumulative Häufigkeit der Histogramme der ΔT_1-Schablonen

ΔT_1 Differenz T_1-Relaxationszeit vor und nach Kontrastmittelgabe: ($T_{1post}/T_{1prä}$)-1

2.5.3 Gliom-tragende Mäuse zur Chemotherapie nach Peptidapplikation

Zur Überprüfung des Potenzials der Chemotherapieoptimierung nach vorangegangener Peptidapplikation wurden Versuche am Tumormodell von der Firma EPO GmbH (Campus Buch, Berlin) durchgeführt. Dazu wurden immundefizienten Mäusen (NMRI-nu/nu, 5-6 Wochen alt, weiblich) humane Glioblastom-Zellen (U-87 MG-Zellen, 2×10^4) intrazerebral injiziert. Nach drei Tagen wurde das Claudin-5-Peptid D-AS-C5C2 oder PBS+/+ als Kontrolle injiziert (3,5 µmol/kg in PBS+/+, i.v., laterale Schwanzvene) und nach 3 h das Zytostatikum Paclitaxel appliziert (24 mg/kg ≙ 28 µmol/kg, i.v., laterale Schwanzvene). Die Behandlung wurde an drei aufeinanderfolgenden Wochen durchgeführt (Abb. 10), über den gesamten Behandlungszeitraum das Verhalten beobachtet und alle 3-4 Tage das Körpergewicht bestimmt. Nach der Behandlung wurden die Tiere zur Untersuchung makroskopischer Veränderungen autopsiert, die Gehirne entnommen und in Methylbutan eingefroren. Die intrazerebrale Tumorfläche (in mm^2) wurde anhand von Kresylviolett-gefärbten Kryoschnitten bestimmt, wobei Gehirne, die kein Tumorwachstum oder einen nicht zerebralen Tumor zeigten, aus der Beurteilung ausgeschlossen wurden.

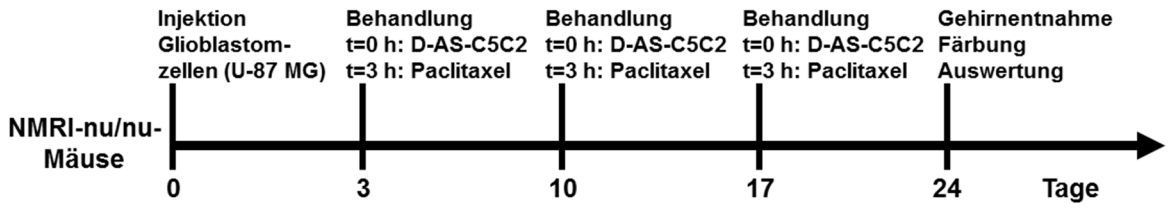


Abb. 10: Applikationsregime der Peptid-unterstützten Chemotherapie von Glioblastomen in immundefizienten NMRI-nu/nu-Mäusen. Glioblastomzellen U-87 MG, 2×10^4, intrazerebrale Injektion. Claudin-5-Peptid D-AS-C5C2 3,5 µmol/kg; Paclitaxel 28 µmol/kg; i.v.-Injektion (laterale Schwanzvene).

2.5.4 Untersuchungen an Claudin-12-defizienten Mäusen

2.5.4.1 Stammherstellung und -züchtung

Zur Untersuchung der Funktion von Claudin-12 wurden Claudin-12-defiziente Mäuse verwendet. Die transgenen Chimären wurden mittels murinen, embryonalen Stammzellen des Klons 13208A-F12 (VelociGene®, http://www.velocigene.com/komp/detail/13208) in Blastozysten aus Albino-C57BL/6J-Mäusen (B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J, Jackson Laboratory, #000058) in Kooperation mit Herrn R. Naumann (Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) hergestellt. Die Stammzucht erfolgte durch Dr. R. Blasig (Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin). Beim Claudin-12-KO-Stamm (C57BL/6-$Cldn12^{tm1(KOMP)Vlcg}$/Ph) handelt es sich um einen kongenen Inzucht-Stamm, der auf C57BL/6 zurückgekreuzt wurde. Homozygote Tiere haben eine schwarze Fellfarbe und weisen normale Körper-, Verhaltens- und Reproduktionsmerkmale auf.

2.5.4.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden 1-2 mm^2 Schwanz- oder Ohrgewebe der Mäuse (3-8 Tage alt) in 50 µL Lysepuffer (3 U Proteinase K, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 200 mM Natriumchlorid) bei 55°C (16 h) und 85°C (45 min) inkubiert. Die Proben wurden auf 4°C gekühlt und mit 100 µL Milli-Q®-Wasser verdünnt. Anschließend wurde die PCR mit dem *Taq*-Polymerase-Kit angesetzt und die Proben-DNA nach folgendem Protokoll vervielfältigt (Tab. 24):

Tab. 24: Reaktionsansatz und Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung

Komponente	**Konzentration**	**PCR-Protokoll**	**Temperatur**	**Zeit**	**Zyklus-anzahl**
Pol Puffer B	1x	**Einleitende Denaturierung**	94°C	5 min	1
dNTP-Mix	0,2 mM	**Denaturierung**	94°C	10 s	
Primer (*for*)	0,4 µM	***Annealing***	60°C	30 s	35
Primer (*rev*)	0,4 µM	**Extension**	72°C	30 s	
***Taq*-Polymerase**	1 U	**Finale Extension**	72°C	5 min	1
Proben-DNA	1 µl	**Kühlschritt**	4°C	∞	1
Milli-Q®-H_2O	ad 26 µl				

dNTP, 2´-Desoxyribonukleosid-5´-Triphosphat*; for*, Vorwärts-Primer; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; *rev*, Rückwärts-Primer; *Taq*, *Thermus aquaticus.*

Die PCR-Proben wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt, mit Probenpuffer (DNA Gel Loading Dye) gemischt und auf ein 1,5-%iges Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer (Tris 45 mM, Borsäure 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) aufgetragen und aufgetrennt (100 V, 90 min). Als Größenmarker wurde eine DNA-Leiter bei der Auftrennung mitgeführt. Die durch Ethidiumbromid markierten DNA-Banden wurden durch Absorption von UV-Licht visualisiert. Anhand der verwendeten Primerpaare (Tab. 14) konnte für Claudin-12-WT-Tiere ein DNA-Produkt bei 501 Basenpaaren (BP) detektiert werden, für Claudin-12-KO-Tiere bei 773 BP (Abb. 11).

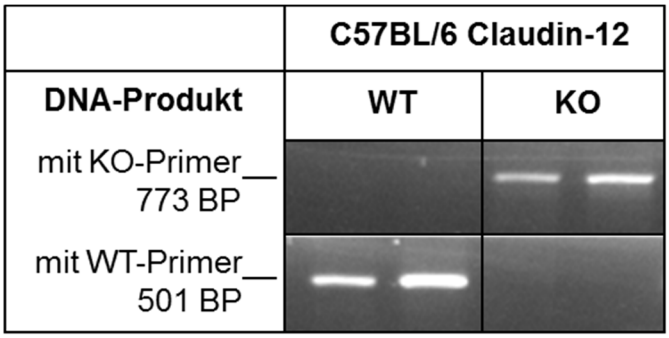


Abb. 11: Genotypisierung von Claudin-12-Knockout (KO)- und Wildtyp (WT)-C57BL/6-Mäusen. DNA-Produkte vervielfältigt mit KO-Primern: 773 Basenpaare (BP), mit WT-Primern: 501 BP.

2.5.4.3 Permeabilität von Na-Fluoreszein und Evans Blue

Zur Untersuchung des Einflusses der Claudin-12-Defizienz auf die Na-Fluoreszein- bzw. Evans-Blue-Aufnahme ins Gehirn wurde Claudin-12-KO- und WT-C57BL/6-Mäusen (14-21 Wochen alt) Na-Fluoreszein (0,5 mol/kg) oder Evans Blue (0,26 mol/kg) injiziert (i.v., laterale Schwanzvene). Na-Fluoreszein und Evans Blue wurden schon in einer Vielzahl von Studien zur Untersuchung der BHS-Permeabilität eingesetzt (Abraham et al., 1996; Kozler und Pokorny, 2003; Wolman et al., 1981). Na-Fluoreszein wird als kleiner Molekulargewichtsmarker und Evans Blue durch die Bindung an Plasmaalbumin als großer Molekulargewichtsmarker verwendet. 10 min nach der jeweiligen Injektion wurde unter Narkose eine transkardiale Perfusion mit anschließender Organentnahme und Probenaufbereitung durchgeführt (s. Kapitel 2.5.1). Die Fluoreszenzintensitäten wurden mittels Plattenmessgerat gemessen (Na-Fluoreszein: λ_{ex}= 485 nm/λ_{em}= 520 nm; Evans Blue: λ_{ex} = 620 nm/λ_{em} = 680 nm). Die Farbstoff-Aufnahme in die Organe wurde auf das Organgewicht bezogen ($\mu g_{Farbstoff}/mg_{Organ}$) und relativ zu den WT-Organen dargestellt.

2.5.4.4 Gewinnung von primären Gehirnkapillaren

Claudin-12-KO oder WT-C57BL/6-Mäuse (20-35 Wochen alt) wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach Gehirnentnahme wurden die zerebralen Cortices separiert und mithilfe eines Dounce-Homogenisators manuell in 5 ml DMEM (4,5 g/l Glucose) homogenisiert. Das Gewebehomogenat wurde mit Dextranlösung (32 %, 5 ml in DMEM, 4,5 g/l Glucose) gemischt und zur Myelinentfernung zentrifugiert (4500×g, 15 min, 4°C). Das Pellet, bestehend aus Gehirnkapillaren, wurde in 3 ml DMEM (4,5 g/l Glucose) resuspendiert und erneut zentrifugiert (1500×g, 10 min, 4°C). Anschließend wurde das verbleibende Pellet resuspendiert und durch ein Nylonnetz (Porengröße 41 µm) filtriert. Die gereinigten Gehirnkapillaren wurden in DMEM (4,5 g/l Glucose) aufgenommen und zentrifugiert (1500×g, 10 min, 4°C).

2.5.1 Peptidstabilität im Blutplasma

C57BL/6-Mäusen (20-40 Wochen alt) wurde umgehend nach zervikaler Dislokation kardiales Blut aus dem linken Ventrikel entnommen. Das Blut wurde mit 25 I.E. Heparin pro ml Vollblut gemischt und zentrifugiert (750×g, 15 min, RT). Das gewonnene Blutplasma wurde mit Fluoreszein-gekoppelten Peptiden (10 µM) bei 37°C inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen (0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 h). Darüber hinaus wurde als Kontrolle in Blutplasma gelöste Fluoreszein-Peptide (10 µM) mit Proteinase K (3 U/ml) verdaut (37 °C, 1 h) bzw. Fluoreszein-Peptide in H_2O inkubiert (10 µM, 0, 24, 48, 72 h). Die Proben wurden mit 99-%igem Ethanol gefällt (30 min, 4°C). Nach dem Entfernen der gefällten Proteine (Zentrifugation bei 20000×g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand in Filterröhrchen (Molekulargewichtsgrenze 10 kDa) erneut zentrifugiert (14000×g, 15 min, RT). Dies diente der weiteren Reinigung. Die Durchflussfraktion wurde im Verhältnis von 1:4 in Laufpuffer verdünnt, mit Probenpuffer (Tab. 25) gemischt, erhitzt (95 °C, 5 min) und mittels 18-%igem Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamide-Gel aufgetrennt (30 min 80 V, 90 min 100 V; Tab. 25). Nach dem gleichen Schema wurden die Kontrollproben inkubiert, gereinigt, aufgetrennt und gemessen. Zur Identifikation der Peptid-spezifischen Banden diente ein Molekulargewichtsmarker (Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder), der ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Das Fluoreszein-Signal wurde mittels Fluoreszenzscanner FLA-5000 gemessen (Anregung bei 473 nm) und die Bandenintensitäten mittels ImageJ quantifiziert.

Tab. 25: Tris-Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Probenpuffer (5x)	Laufpuffer	Sammelgel (5 ml)	Trenngel (10 ml)
225 mM Tris-HCl, pH 6,8	100 mM Tris-HCl, pH 8,3	3,1 ml H_2O_{dest}	2,9 ml Ethylenglykol
5 % SDS	100 nM Tricin	1,25 ml 3 M Tris-HCl pH 8,5	2,5 ml 3 M Tris-HCl pH 8,5
50 % Glyzerin	0,1 % SDS	0,625 ml 40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 19:1	4,5 ml 40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 19:1
0,25 M Dithiothreitol		5 µl 40 % APS	10 µl 40 % APS
0,05 % Bromphenolblau		20 µl TEMED	15 µl TEMED

APS, Ammoniumperoxodisulfat; SDS, Natriumdodecylsulfat; TEMED, Tetramethylethylendiamin; Tris-HCl, Tris(Hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Probenvorbereitung und Kryoschnitte

Nach zervikaler Dislokation von Claudin-12-KO- und WT-C57BL/6-Mäusen wurden die entnommenen Herzen in Methylbutan auf Trockeneis eingefroren, Kryoschnitte kaudal beginnend angefertigt (8 µm) und auf Objektträger überführt.

In Kooperation mit Prof. Dr. A. Andjelkovic-Zochowski und Dr. S. Stamatovic (Universität Michingan, USA) wurde C57BL/6-Mäusen Peptid injiziert (3,5 µmol/kg in 0,9 % NaCl, i.v.-Injektion, laterale Schwanzvene). Nach 4 h folgte eine Fluoreszein-Dextran-Injektion (3 kDa, FD3; i.v., *V. jugularis*, 20 min, 1,1 µmol/kg) unter Ketamin/Xylazin-Narkose. Nach transkardialer Perfusion (s. Kapitel 2.5.1) wurden die Gehirne entnommen, fixiert (4 % Paraformaldehyd (PFA), in PBS, über Nacht, 4°C), in flüssigem Stickstoff eingefroren und Kryoschnitte angefertigt.

2.6.2 Immunhistochemie und Mikroskopie der Gewebeschnitte

Die Herz-Kryoschnitte auf den Objektträgern wurden mit Methanol fixiert (10 min, -20°C), in PBS-/- gewaschen und unspezifische Bindungsstellen blockiert (2 % BSA mit 0,1 % Triton X-100 in PBS-/-, 1 h, RT). Die Gewebeschnitte wurden mit Primärantikörpern (s. Tab. 11, in PBS-/- mit 0,5 % BSA, über Nacht, 4°C) inkubiert, gewaschen (PBS-/- mit 0,5 % BSA) und mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (s. Tab. 11, in PBS-/- mit 0,5 % BSA, 1 h, RT) inkubiert. Es folgten weitere Waschschritte mit PBS-/- sowie eine Inkubation mit Rhodamin-Phalloidin zur F-Aktin-Färbung (100 nM in PBS-/-, 30 min, RT) und mit Hoechst 33343

zur Nuklei-Färbung (5 µM, 5-10 min, RT). Nach kurzem Spülen in H_2O wurden die Schnitte mit ImmuMount eingedeckt und mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (Detektionsparameter s. Alexa Fluor® 555, Tab. 13). Da der Apex der Herzproben für Expressionsanalysen entnommen wurde, wurden Bilder aus dem Bereich des linksventrikukären Myokards aufgenommen.

Die Färbung der Gehirnschnitte erfolgte nach dem gleichen Prinzip (ohne Methanol-Fixierung). Es wurden Bilder aus dem zerebralen Cortex aufgenommen. Durch die transkardiale Perfusion konnte ausgeschlossen werden, dass eine FD3-Detektion auf Rückstände in den Kapillaren zurückzuführen ist.

2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Probenvorbereitung und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. D. Puchkov der Abteilung „Cellular Imaging“ (Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) durchgeführt. Dazu wurden Claudin-12-KO und WT-C57BL/6-Mäuse (28-33 Wochen alt) unter Narkose (i.p., Ketamin 120 mg/kg, Xylazin 16 mg/kg) mit 4 % PFA in PBS-/- transkardial perfundiert (25 ml, 4 ml/min). Präparierte Herzen wurden in Fixierungspuffer (4 % PFA mit 2,5 % Glutaraldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4) überführt, in Osmium (VIII)-oxid (1 %) nachfixiert und mit Uranylacetat *en bloc* kontrastiert. Es folgte eine Dehydrierung mittels aufsteigendem Methanol-Gradienten. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einem Gemisch aus Propylenoxid und Epoxidharz infiltriert, in reinem Epoxidharz eingebettet und ultradünne Schnitte kaudal beginnend angefertigt. Diese wurden auf ein Kupfernetz platziert und mittels Uranylacetat und Bleiacetat nachkontrastiert. Die Analyse erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM900. Die Bilder wurden aus dem Bereich des linksventrikulären Myokards aufgenommen.

2.8 Biophysikalische und -informatische Methoden

2.8.1 Strukturelle Untersuchungen mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zirkulardichroismus-Spektroskopie ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Sekundärstruktur von synthetischen Peptiden (Campagna et al., 1998). Die Messungen beruhen darauf, dass optisch aktive Substanzen zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Daher wurden Claudin-5-Peptide (50 µM) in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2) gelöst, um den Anteil an Sekundärstrukturelementen (α-Helix, β-Faltblatt, β-Schleife) zu bestimmen. Der verbleibende Anteil wurde als ungeordnet betrachtet. Durch die Zugabe des Tensids SDS

(0,5 mM in Phosphatpuffer) unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (9-10 mM, Niraula et al., 2014) sollte eine mögliche Induktion von β-Faltblattstrukturen überprüft werden (Zhong und Johnson, 1992). Oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration kann SDS zur Induktion und Stabilisierung von α-Helices führen (Gopal et al., 2012). Trifluorethanol (TFE, 60 %) weist die Eigenschaft auf, eine Induktion von α-Helices zu begünstigen (Buck, 1998).

Mit dem Spektropolarimeter J-720 wurde die Elliptizität im Wellenlängenbereich von 190-260 nm (RT) in Quarzküvetten gemessen. Pro Messung wurden 8 Akkumulationen mit einer Auflösung von 0,1 nm und einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min erzeugt. Zur Analyse der Daten mit dem Programm Spectra Manager wurde unter Abzug des Puffer-basierten Spektrums und Berücksichtigung der Aminosäureanzahl die molare residuale Elliptizität [θ] berechnet (Corrêa und Ramos, 2009):

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \times c \times d \times n} \qquad (\frac{\text{grad} \times cm^2}{dmol})$$

θ	Elliptizität	(grad$\times 10^{-3}$)
c	Konzentration	(mol/l)
d	Schichtdicke der Küvette	(cm)
n	Anzahl der Aminosäuren	

Charakteristisch für α-helikale Elemente in L-AS-Peptiden sind Elliptizitätsminima bei 208 und 222 nm sowie einem Maximum bei 192 nm. Für β-Faltblatt-Strukturen gibt es ein Minimum bei 217 nm und ein Maximum bei 195 nm. Ungeordnete Elemente zeigen ein Minimum <200 nm (Greenfield und Fasman, 1969).

Die Bestimmung der prozentualen Neigung die entsprechenden Sekundärstrukturanteile auszubilden, erfolgte mit dem Spectra Manager unter Verwendung von Referenzspektren (Yang et al., 1986).

2.8.2 Sequenz-Alignments

Zur Bestimmung der Sequenzidentität wurden die Aminosäuresequenzen der Peptide mit der entsprechenden Sequenz der EZS1 von Claudinen und Occludin verglichen. Dazu wurde ein globales Alignment nach dem Needleman-Wunsch-Algorithmus mittels EMBOSS-Software (Rice et al., 2000) durchgeführt. Zur Berechnung der Sequenzidentität wurde eine BLOSUM62-Matrix verwendet, um sowohl weniger (z.B. Claudine) als auch stark abweichende (z.B. Occludin) Proteinsequenzen zu vergleichen (Choudhuri, 2014).

2.8.3 Molekulare Modellierung

3D-Strukturmodelle der Peptide (bis 30 L-AS) wurden mit PEP-FOLD (Shen et al., 2014; Thevenet et al., 2012) vorhergesagt und Modelle mit den energetisch günstigsten Konformationen dargestellt. Die Strukturvorhersage von Claudin-5 wurde mittels I-TASSER (Roy et al., 2010; Zhang, 2008) unter Berücksichtigung der Kristallstruktur von Claudin-15 (Suzuki et al., 2014) als Vorlage durchgeführt. Ein mittels CABS-dock erstelltes Interaktionsmodell (Kurcinski et al., 2015) wurde zwischen den EZS (AS 29-81, 138-161) des generierten Claudin-5-Modells und Peptidsequenzen nach Strukturvorhersage mit PSIPRED (Buchan et al., 2013) erstellt. Die Modelle wurden mit dem Programm BIOVIA Discovery Studio dargestellt.

2.8.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)±Standardabweichung (SD) oder MW±Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. GraphPad Prism® 5.04 wurde für die statistischen Analysen verwendet. Zur einfaktoriellen Varianzanalyse wurden Vergleiche von mehr als zwei Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn durchgeführt, zur zweifaktoriellen Varianzanalyse mit einem Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni. Die MRT-Ergebnisse wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test statistisch ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde mit $p \leq 0{,}05$ (*/#), $p \leq 0{,}01$ (**/##) und $p \leq 0{,}001$ (***/###) angegeben, nicht signifikante weitere Ergebnisse mit ns oder ungekennzeichnet dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Claudin-5-Peptidomimetika erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke *in vitro*

Die parazelluläre Route ist in der BHS durch die Interaktion der transmembranen *Tight-Junction*-Proteine über deren EZS abgedichtet (Piehl et al., 2010; Piontek et al., 2008). Dies verhindert maßgeblich die BHS-Gängigkeit von mehr als 98 % der niedermolekularen und weitestgehend aller höhermolekularen Wirkstoffe (Pardridge, 2005). Da in den *Tight Junctions* der BHS eine Reduktion von Claudin-5 zu geringerer Barrieredichtkeit führt (Campbell et al., 2008; Nitta et al., 2003), wurde dieses als Zielprotein gewählt, um die Durchlässigkeit der BHS für kleine hydrophile Wirkstoffe (z.B. Zytostatika) zu erhöhen. Dazu wurden Peptidomimetika eingesetzt, die gegen die ESZ von Claudin-5 gerichtet sind, um deren Effekt auf die BHS-Permeabilität zu untersuchen.

3.1.1 Permeabilisierung von Endothelzellbarrieren

Die Permeabilisierung von Endothelzellbarrieren mit Claudin-5-Peptiden (Sequenzen s. Kap. 2.2) wurde zuerst *in vitro* nachgewiesen. Dazu dienten bEND.3-Zellen als BHS-Zellmodell, da sie in hohem Maße Claudin-5, ZO-1, Occludin und Claudin-12 exprimieren (Anhang 2).

Zur Peptidbehandlung wurden sie auf ECIS-Elektroden kultiviert (Absolutwerte s. Kap. 2.3.2.1), um eine TER-Verlaufsmessung als Maß für die Erhöhung der Ionendurchlässigkeit des Zellrasens zu ermitteln. Nach Behandlung mit den murinen Claudin-5-Peptiden (jeweils 300 µM, 48 h) war der TER im Verhältnis zu Zellen, die mit peptidfreiem Medium inkubiert wurden, signifikant reduziert. Im Vergleich zur peptidfreien Mediumkontrolle blieb der TER des Kontrollpeptids C2C2 (300 µM) unverändert (nach 48 h: 100,0±9,7 zu 97,7±12,7 %). Die Peptide C5C2, D-AS-C5C2, C5C2[S22N], D-AS-C5C2[S22N] und D-AS-C5C2/shifted verringerten den TER innerhalb von 24 h auf ein konstantes Plateau, welches bis 48 h nach Behandlung anhielt. Die stärkste Reduktion zeigte C5C2[S22N] (auf 11,2±11,5 %) gefolgt von D-AS-C5C2/shifted (auf 33,7±24,5 %), D-AS-C5C2 (auf 37,4±14,5 %), D-AS-C5C2[S22N] (auf 53,1±13,4 %) und C5C2 (auf 59,7±13,1 %) (nach 48 h). Für die beiden N-terminal verlängerten Peptide C5C2/shifted und C5C2/N+5AS wurde eine TER-Reduktion nach 24 h auf 37,0±14,3 % bzw. auf 34,0±6,3 % beobachtet. Ein erneuter TER-Anstieg auf 64,4±21,7 % bzw. auf 57,3±3,6 % folgte nach 48 h (Abb. 12). Für weitere Claudin-5-Peptide war der TER bis 48 h nach Behandlung nicht reduziert: die humane Peptidvariante von C5C2 (hC5C2), die murine C-terminale Verkürzungsvariante (C5C2/C-4AS) sowie die EZS2-Peptide C5/hEZS2 (human) und C5/mEZS2 (murin, Anhang 3).

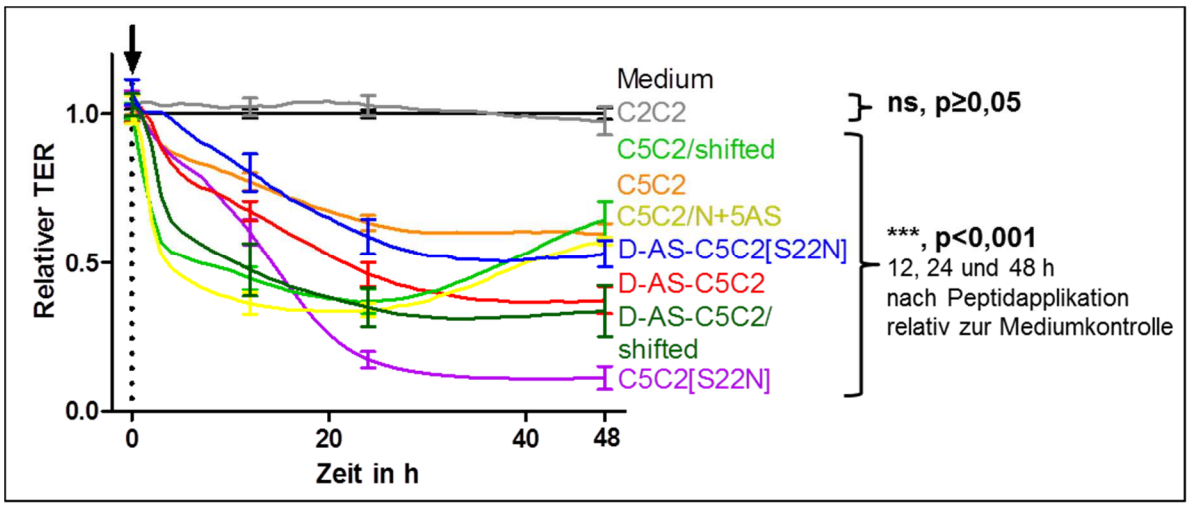


Abb. 12: Claudin-5-Peptide verringern zeitabhängig den transzellulären elektrischen Widerstand (TER) eines *in-vitro*-Modells der Blut-Hirn-Schranke. *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) an Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3). Pfeil, Zugabe von Medium oder Medium mit 300 µM Peptid; n≥7; Mittelwert±SEM; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; ***, p<0,001; nicht signifikant (ns), p≥0,05 relativ zu peptidfreiem Medium. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

Als weiteres unabhängiges BHS-Zellmodell wurden primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen als Kontaktkultur mit Astrozyten auf Filtern kokultiviert. Hiermit sollte der TER sowie die Permeabilität gegenüber dem kleinen Molekül Lucifer Yellow (457 Da) nach Peptidbehandlung gemessen werden. Diese Zellen reagierten sensitiver auf eine Peptidbehandlung im Vergleich zur TER-Messung an bEND.3-Zellen, da eine Peptidkonzentration von 300 µM zur nahezu kompletten Barriereöffnung führte. Selbst nach Austausch mit peptidfreiem Medium war diese nicht reversibel (Anhang 4). Um dies zu vermeiden, wurde die Peptidkonzentration von 300 µM auf 150 µM reduziert.

Bei Peptidbehandlung (150 µM) wiesen die Claudin-5-Peptide C5C2 und C5C2[S22N] nach 24 h sowohl eine signifikante TER-Reduktion als auch einen signifikanten Anstieg der Lucifer-Yellow-Permeabilität im Vergleich zur Mediumkontrolle auf. Für C5C2 ergab sich ein TER von 52,5±18,2 % und eine 2,0±0,8-fache Lucifer-Yellow-Permeabilität; für C5C2[S22N]: 1,7±2,0 % (TER) und 21,5±1,1-fach (Lucifer Yellow). Da der Effekt von C5C2[S22N] zu einer sehr starken Durchlässigkeit führte, wurde die Konzentration nochmals auf 75 µM reduziert, wobei die TER-Reduktion (auf 65,4±11,8 %) und die Permeabilitätssteigerung für Lucifer Yellow (1,5±0,8-fach) vergleichbar mit der C5C2-Wirkung bei 150 µM war. Das Kontrollpeptid C2C2 hatte keinen Effekt auf TER und Permeabilität (Abb. 13).

Die verwendeten zellulären BHS-Modelle bestätigten somit eine Claudin-5-Peptid-abhängige Barrierepermeabilität.

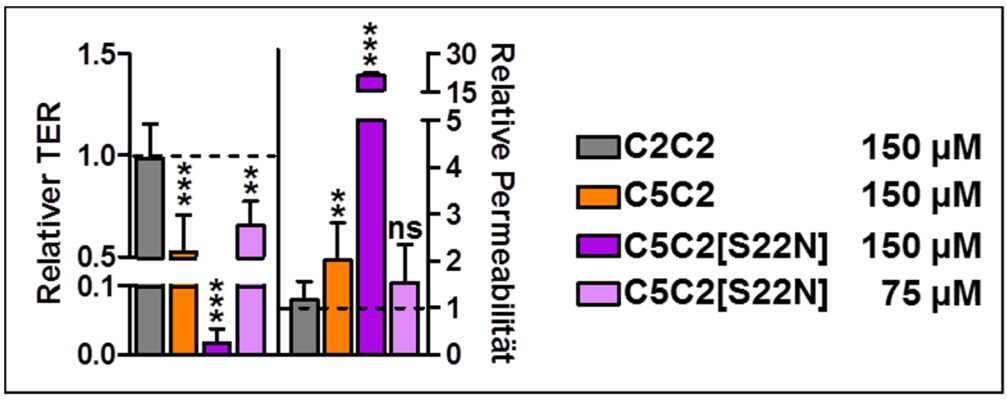


Abb. 13: Claudin-5-Peptide permeabilisieren primäre Gehirnkapillarendothelzellen. Primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen kultiviert als Kontaktkultur mit Astrozyten aus der Ratte. Relativer transzellulärer elektrischer Widerstand (TER, linke Ordinate, gemessen mit Handelektrode) und relativer Permeationskoeffizient für Lucifer Yellow (457 Da, rechte Ordinate) 24 h nach Inkubation mit Medium oder Medium mit Peptid (75/150 µM). Gestrichelte Linie, Mittelwert der Mediumkontrolle. n≥3; Mittelwert±SD; Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreiem Medium. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N).

3.1.2 Reversibilität und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Claudin-5-Peptiden auf endotheliale Zellen

Da die permeabilisierende Wirkung der Claudin-5-Peptide bestätigt wurde, sollte untersucht werden, ob der Effekt reversibel ist. Dazu wurden Endothelzellen (bEND.3-Zellen) für 16 h mit Peptiden behandelt. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, sodass das Regenerationspotenzial des TER in peptidfreiem Medium bestimmt werden konnte.

Es zeigte sich bei einer Peptidkonzentration von 300 µM für die Claudin-5-Peptide C5C2, C5C2[S22N], C5C2/shifted und ihre jeweiligen D-AS-Varianten eine signifikante TER-Reduktion innerhalb von 16 h (Abb. 14, Abb. 15). Dabei war die Stärke der erhöhten Ionendurchlässigkeit in der Reihenfolge: C5C2[S22N] (44,5±17,7 %) > C5C2/N+5AS (45,9±1,6 %) > D-AS-C5C2 (63,4±31,9 %) > C5C2/shifted (68,2±27,8 %) > D-AS-C5C2/shifted (68,4±25,0 %) > D-AS-C5C2[S22N] (74,7±29,3 %) > C5C2 (81,8±12,5 %) relativ zur Mediumkontrolle. Nach Austausch von peptidhaltigem mit peptidfreiem Medium führten die Peptide C5C2 (96,9±13,9 %), D-AS-C5C2 (80,4±37,1 %), D-AS-C5C2[S22N] (86,6±23,8 %), C5C2/shifted (80,2±21,0 %) und D-AS-C5C2/shifted (85,1±23,8 %) 16 h nach Behandlung zu einer Erholung der Barrierefunktion. Die TER-Werte unterschieden sich im Vergleich zum Ausgangswert der Mediumkontrolle nicht signifikant. Für C5C2[S22N] (47,9±13,9 %) und C5C2/N+5AS (51,9±3,3 %) stellte sich die ursprüngliche Dichtheit der Endothelzellbarriere durch einen Mediumwechsel nach 48 h noch nicht wieder her. Ein Trend der TER-Erhöhung im Vergleich zum Messwert nach 48 h ohne Mediumwechsel war jedoch zu verzeichnen (Abb. 15), weswegen angenommen wird, dass der TER sich zu einem späteren Zeitpunkt regeneriert.

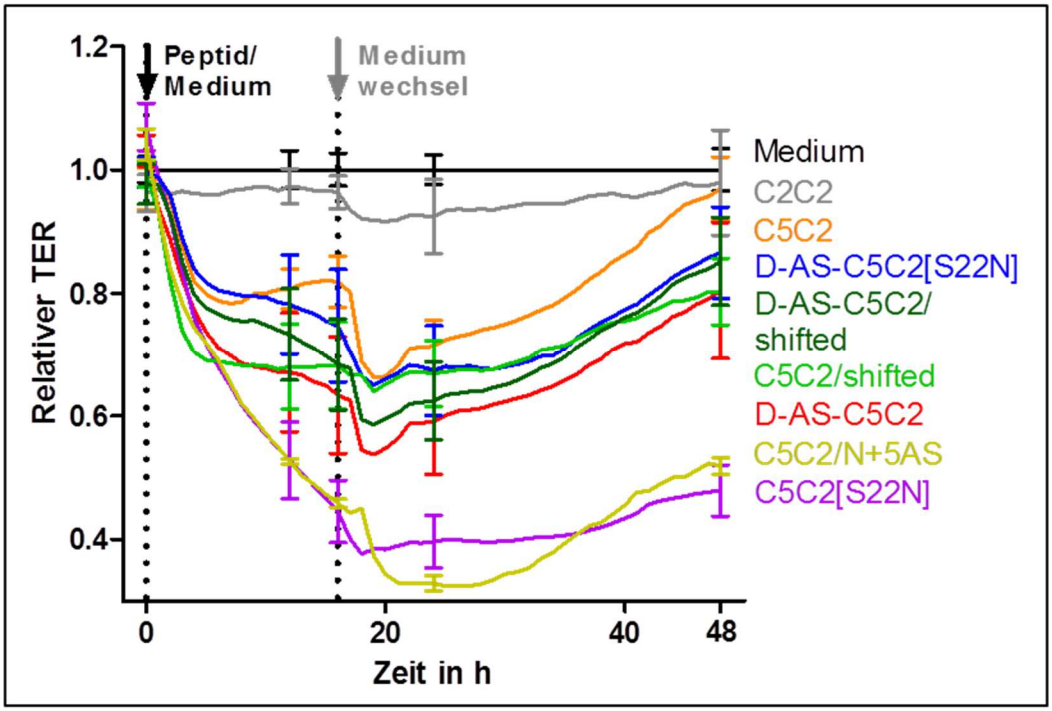


Abb. 14: Regeneration der zellulären Dichtheit nach 16-stündiger Peptidbehandlung. Nach Peptidinkubation wurde der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) reduziert. Schwarzer Pfeil, Zugabe von Medium oder Medium mit 300 µM Peptid. 16 h nach Behandlung wurde peptidhaltiges Medium durch peptidfreies Medium ersetzt (grauer Pfeil). Gemessen mittels *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS). n≥3; Mittelwert±SEM. TER relativ zu peptidfreiem Medium. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

Zur weiteren Charakterisierung der Stärke und Reversibilität des permeabilisierenden Effekts von Claudin-5-Peptiden auf endotheliale Barrieren wurde der TER in Abhängigkeit von Peptidkonzentrationen < 300 µM (150 und 75 µM) gemessen. Bei einer Peptidkonzentration von 150 µM war nach 48 h der TER für die getesteten Claudin-5-Peptide weniger stark reduziert als bei 300 µM: C5C2, auf 82,5±24,1 % (anstatt 59,7±13,7 %), D-AS-C5C2, auf 46,4±27,6 % (anstatt 33,5±18,9 %), C5C2[S22N], auf 50,5±19,5 % (anstatt 15,4±14,5 %), D-AS-C5C2[S22N], auf 80,1±8,9 % (anstatt 53,1±14,3 %), C5C2/shifted, auf 86,3±10,4 % (anstatt 64,4±22,8 %), D-AS-C5C2/shifted, auf 66,8±15,3 % (anstatt 33,7±15,5 %). Außer nach C5C2-Behandlung führten die getesteten Claudin-5-Peptide zu einer signifikanten Reduktion nach 48 h, die für die Peptide C5C2/shifted, D-AS-C5C2/shifted, D-AS-C5C2[S22N] nach Mediumwechsel rückgängig gemacht werden konnte (91,3±2,3 %, 84,8±9,8 % bzw. 82,6±4,5 %). Für D-AS-C5C2 und C5C2[S22N] regenerierte sich durch einen Mediumwechsel der TER nach 48 h noch nicht vollständig. Das Peptid C5C2/shifted (300 und 150 µM) resultierte bereits ohne Mediumwechsel in einer TER-Erhöhung (64,4±22,8 % bzw. 86,3±10,4 %) (Abb. 15).

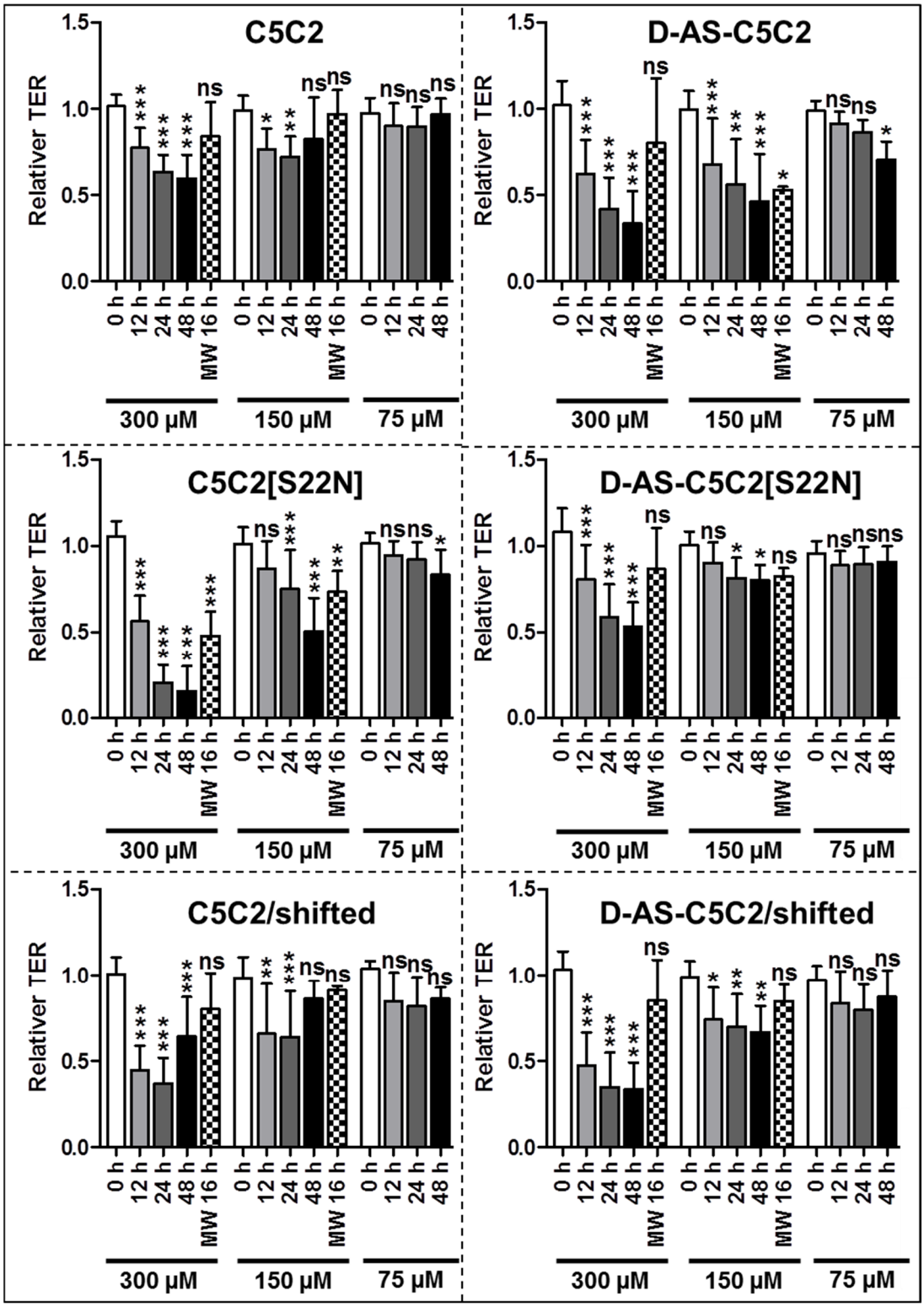


Abb. 15: Claudin-5-Peptidomimetika führen zur konzentrationsabhängigen und reversiblen Reduktion der parazellulären Dichtheit. Nach Peptidbehandlung wurde der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) reduziert. Gemessen nach Inkubation von Medium oder Medium mit Peptid in den Konzentrationen 300, 150 und 75 µM mittels *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS). n≥7; Mittelwert±SD; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; nicht signifikant (ns), p≥0,05 relativ zu peptidfreiem Medium. Mediumwechsel (MW) 16 h, peptidhaltiges Medium wurde 16 h nach Behandlungsbeginn durch peptidfreies Medium ersetzt, Messpunkt 48 h nach Behandlungsstart (bzw. 32 h nach Mediumwechsel). Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-AS-C5C2/shifted.

Eine Konzentration von 75 µM der Peptide C5C2, D-AS-C5C2[S22N], C5C2/shifted und D-AS-C5C2/shifted sorgte innerhalb von 48 h für keine Erhöhung der Ionendurchlässigkeit. D-AS-C5C2 und C5C2[S22N] reduzierten den TER signifikant auf 70,6±10,4 % bzw. auf 83,3±14,6 % nach 48 h (Abb. 15).

Da sich die untersuchten Claudin-5-Peptide sowohl zeitabhängig als auch konzentrationsabhängig in ihrer Barriereregeneration unterschieden, können diese Eigenschaften genutzt werden, um spezifische Barriereöffnungen zu erreichen. Beispielsweise kann C5C2[S22N] Anwendung finden, wenn längere Wirkungen erwünscht sind, wohingegen C5C2/shifted für kurzzeitige eingesetzt werden könnte.

3.1.3 Claudin-5-Peptidomimetika führen zur größenselektiven Barriereöffnung

Um die Größenselektivität der permeabilisierenden Wirkung von Claudin-5-Peptiden zu untersuchen, wurden MDCK-II-YFP-mClaudin-5-Zellen mit peptidfreiem Medium, Kontrollpeptid C2C2 (300 µM) oder Claudin-5-Peptiden behandelt (300 µM). Nach 48 h wurde sowohl der TER als auch die Permeabilität für Moleküle mit verschiedener Größe (0,4-155 kDa) bestimmt (Absolutwerte s. Kap. 2.3.2.1 bzw. 2.3.2.2).

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war die TER-Verringerung Claudin-5-Peptid-behandelter Zellen über 48 h stetig und signifikant. Nach 48 h war C5C2[S22N] am wirksamsten (Reduktion auf 34,9±24,3 %). Andere Claudin-5-Peptide reduzierten den TER auf 51,8±28,5 % bis 83,8±19,1 % (Abb. 16, linke Ordinate).

Damit einhergehend führten die Claudin-5-Peptide zu einer erhöhten Durchlässigkeit für Markermoleküle mit verschiedenen Molekulargewichten, wobei die Größenselektivität und das Maß der Durchlässigkeit vom Peptid abhängig waren. Dabei erhöhte das Peptid C5C2 die Permeabilität für Moleküle mit einer Größe von 457 Da signifikant bis aufs Sechsfache und bis 67 kDa in geringerem Maße im Vergleich zur peptidfreien Mediumkontrolle. C5C2/shifted, C5C2/N+5AS und die D-AS-Peptide D-AS-C5C2, D-AS-C5C2/shifted und D-C5C2[S22N] zeigten eine signifikante Erhöhung der Durchlässigkeit bis 10 kDa und teilweise auch für größere Moleküle bis 67 kDa, die oftmals geringer penetrierten. Für das Peptid C5C2[S22N] war die Zellbarriere stärker für Moleküle bis 67 kDa und in geringerem Maße bis 155 kDa geöffnet. Des Weiteren wiesen Claudin-5-Peptide eine erhöhte Permeabilität für ein Zytostatikum (Doxorubicin, 580 Da) auf. Dabei war die Durchlässigkeit signifikant um den Faktor 5,2±1,8 (C5C2), 4,0±1,8 (D-AS-C5C2), 3,6±1,4 (C5C2/shifted) und 17,5±6,3 (C5C2[S22N]) erhöht (Abb. 16, rechte Ordinate).

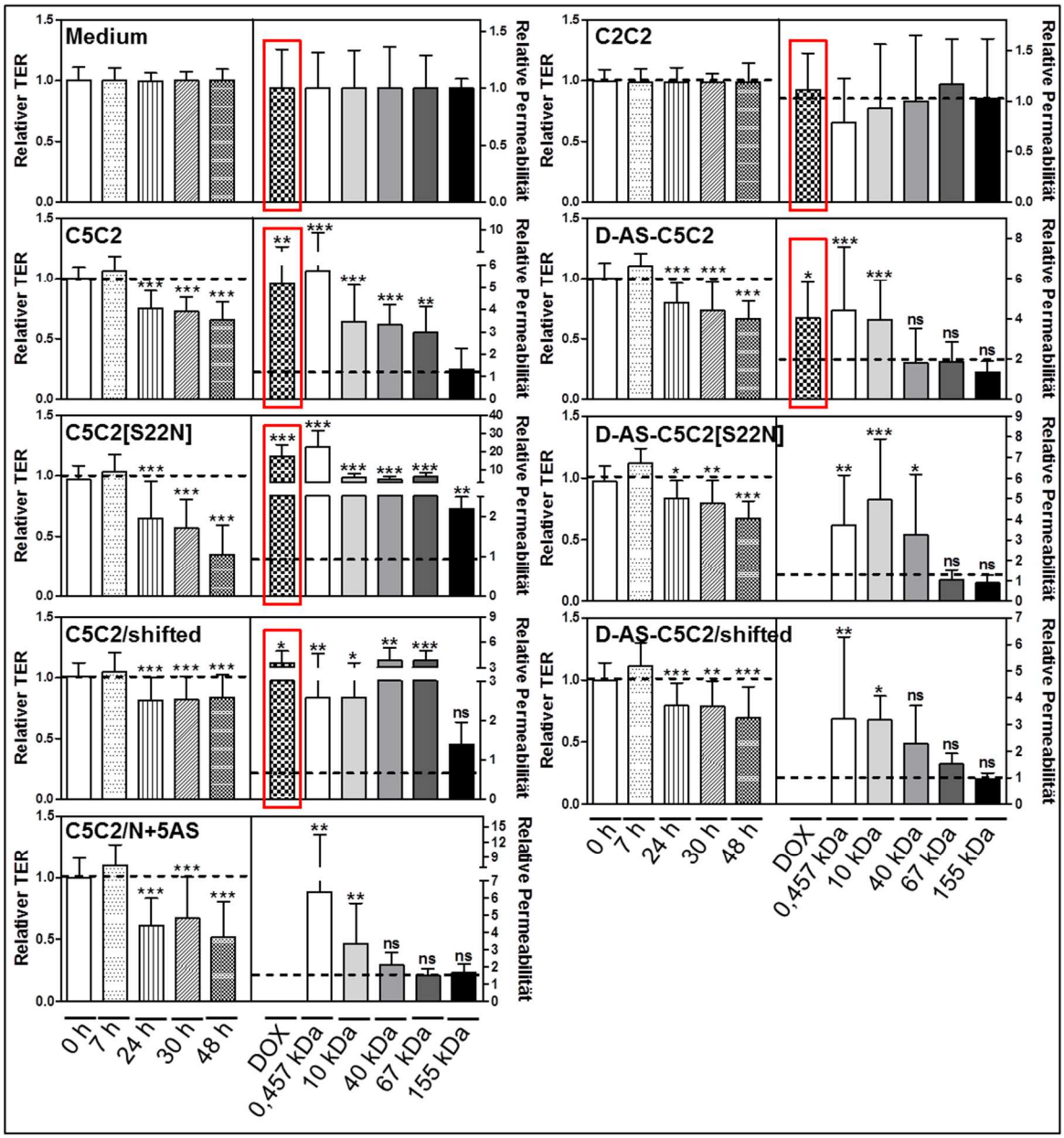


Abb. 16: Claudin-5-Peptide erhöhen die größenabhängige Permeabilität von Markersubstanzen und die Durchlässigkeit von Wirkstoffen in Claudin-5-exprimierenden, epithelialen Zellschichten. MDCK-II-Zellen (Madin-Darby *canine kidney*), stabil transfiziert mit murinem Claudin-5, N-terminal mit YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) markiert, kultiviert auf Filtern und behandelt mit Medium oder Medium mit Peptiden (300 µM). Linke Ordinate: TER (transzellulärer elektrischer Widerstand) vor und nach Peptidbehandlung. Rechte Ordinate: Messung des relativen Permeationskoeffizienten des Zytostatikums Doxorubicin (580 Da, roter Kasten) und Markersubstanzen verschiedener Größe: 457 Da (Lucifer Yellow), 10 kDa (Fluoreszein-Isothiocyanat-Dextran), 40 kDa (Fluoreszein-Isothiocyanat-Dextran), 67 kDa (Fluoreszein-Isothiocyanat-Albumin) und 155 kDa (Tetramethylrhodamin-Dextran) 48 h nach Behandlung mit Peptiden. Mittelwert±SD. TER, n≥12, Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; Permeabilität, n≥4, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; nicht signifikant (ns), p≥0,05 relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle (gestrichelte Linien). C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

Das Kontrollpeptid C2C2 führte zu keiner signifikanten Änderung von TER oder Permeabilität (Abb. 16) genau wie die C-terminale Verkürzungsvariante von murinem C5C2 (C5C2/C-4AS) und die humane C5C2-Variante (hC5C2, Anhang 5).

Insgesamt sind Claudin-5-Peptide zur größenselektiven Barriereöffnung geeignet. Dabei kann sowohl eine Öffnung für kleinere Moleküle (z.B. mit C5C2) als auch für größere Moleküle (z.B. mit C5C2[S22N]) umgesetzt werden.

3.1.4 Der permeabilisierende Effekt der Claudin-5-Peptide ist nicht zytotoxisch

Zur Bestimmung des Einflusses der getesteten Peptide auf die Zellvitalität wurden bEND.3- (Abb. 17A) und MDCK-II-YFP-mClaudin-5-Zellen (Abb. 17B) für 24 h bzw. 48 h mit in Medium gelösten Peptiden (300 μM) inkubiert. Im Anschluss wurde entweder ein MTT-Test oder ein Neutralrot-Test zur Bestimmung der Zellvitalität durchgeführt. Keines der Peptide wirkte sich negativ auf die Vitalität der getesteten Zelltypen relativ zur Mediumkontrolle aus.

Für das Peptid C5C2/shifted wurde ein Proliferationsanstieg bei der Messung mittels Neutralrot-Test verzeichnet (auf 138±9,6 % bei bEND.3-Zellen). Dies ist wahrscheinlich auf die frühe Regenerationsfähigkeit der Peptid-behandelten Zellen zurückzuführen (Abb. 14). Als Positivkontrolle dienten Zellen behandelt mit Triton X-100 (0,01 %). Dadurch war die Zellvitalität bei bEND.3-Zellen nach 24 h auf 21,6±6,0 % (MTT) bzw. 11,4±11,6 % (Neutralrot) und bei MDCK-II-YFP-mClaudin-5-Zellen nach 48 h auf 35,4±19,8 % (MTT) bzw. 13,0±6,6 % (Neutralrot) reduziert (Abb. 17A,B).

Anhand der Untersuchungen wurde ausgeschlossen, dass die Wirkung der Peptide auf zytotoxischen Effekten beruhte.

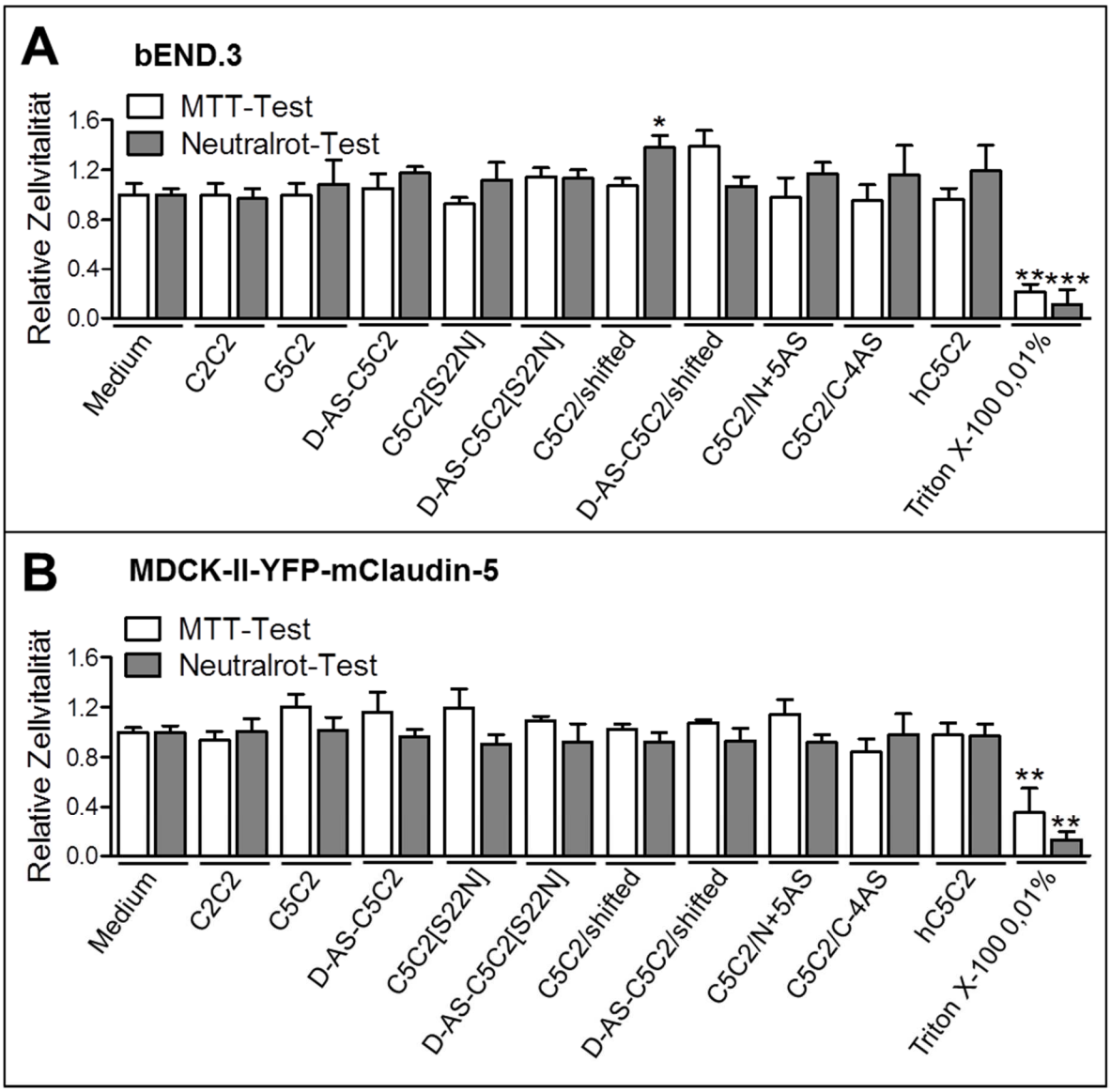


Abb. 17: Die Zellvitalität ist in Endothel- und Epithelzellen durch Peptidbehandlung nicht beeinträchtigt. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)- und Neutralrot-Test nach Peptidbehandlung (300 µM). Keines der Peptide zeigte einen zytotoxischen Effekt. Positivkontrolle, Triton X-100 0,01 %. Mittelwert±SD. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle. **(A)** Zellvitalität muriner Gehirnendothelzellen (bEND.3) 24 h nach Peptidgabe, $n\geq3$. **(B)** MDCK-II-Zellen (Madin-Darby *canine kidney*), stabil transfiziert mit murinem YFP (*Yellow Fluorescent Protein*)-Claudin-5, 48 h nach Peptidgabe, $n\geq5$. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)), C5C2/C-4AS (C-terminal verkürzt (4 AS)), hC5C2 (humane Variante von C5C2); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

3.2 Claudin-5-Peptidomimetika beeinträchtigen die *Tight-Junction*-Struktur

3.2.1 Umverteilung und Reduktion von *Tight-Junction*-Proteinen aus der Plasmamembran

bEND.3-Zellen ohne Peptidbehandlung waren durch eine starke Claudin-5-Anreicherung in der Plasmamembran und einer Kolokalisation mit dem Zellkontakt-Marker ZO-1 charakteri-

siert. Im Zytosol waren nur schwache Claudin-5-Signale zu beobachten und die Zellen hatten eine spindelförmige Zellstruktur. Gleiche Merkmale wurden nach Behandlung mit dem Kontrollpeptid C2C2 gefunden (Abb. 18A, Medium, C2C2). Im Vergleich dazu führte die Behandlung mit Claudin-5-Peptiden (24 h, 300 µM) zur Verringerung von Claudin-5 in der Plasmamembran (Abb. 18A, Pfeilköpfe) und zu einem Anstieg an zytosolischem Claudin-5 (Abb. 18A, Pfeile). Die stärkste Umverteilung von Claudin-5 im Vergleich zur Mediumkontrolle hatten die Peptide D-AS-C5C2 (Claudin-$5_{Membran}$ verringert auf 69,8±25,9 %, Claudin-$5_{Zytosol}$ erhöht auf 134,0±36,4 %) und D-AS-C5C2[S22N] (Claudin-$5_{Membran}$ verringert auf 71,3±27,6 %, Claudin-$5_{Zytosol}$ erhöht auf 139,2±49,2 %; Abb. 18A,B). Bei den Peptiden C5C2[S22N], C5C2/shifted und C5C2/N+5AS wurde kein Anstieg an zytosolischem Claudin-5, dafür aber sowohl eine Claudin-5- und ZO-1-Reduktion in der Membran auf 89,8±23,6 % bzw. 81,9±18,6 % (C5C2[S22N]), 42,2±16,3 % bzw. 60,8±18,1 % (C5C2/shifted) und 90,4±23,0 % bzw. 64,4±20,1 % (C5C2/N+5AS) im Vergleich zur Mediumkontrolle bestimmt. Diese Effekte wurden bei allen getesteten Claudin-5-Peptiden von einer Veränderung der Zellmorphologie begleitet: die Zellen waren zunehmend runder (Abb. 18A, Sterne; Abb. 18B, Quantifizierung) verglichen mit der elliptischen Spindelzellform der unbehandelten Zellen (Abb. 18A). Die Beeinträchtigungen der Zellmorphologie waren 32 h nach Mediumwechsel für die Claudin-5-Peptide C5C2 und D-AS-C5C2 nicht mehr zu beobachten. Die Peptide C5C2[S22N], D-AS-C5C2[S22N], C5C2/shifted und C5C2/N+5AS wiesen nur eine teilweise Regeneration auf. Es zeigten sich sowohl runde Zellen als auch typische, spindelförmige Endothelzellen. Auch das Claudin-5-Signal in der Plasmamembran erholte sich nicht vollständig (Anhang 6).

Ähnliche Effekte der Claudin-5-Peptide auf die Zellmorphologie konnten in primären, bovinen Endothelzellkulturen beobachtet werden. Nach Behandlung mit peptidfreiem Medium oder Kontrollpeptid behielten die Gehirnendothelzellen eine typische Spindelform bei, hingegen sorgten C5C2 und C5C2[S22N] für eine abgerundete Form (Abb. 19A Sterne; Abb. 19B, Quantifizierung). C5C2 erzielte diese Effekte bei einer Konzentration von 150 µM. Für C5C2[S22N] war eine Konzentration von 75 µM ausreichend, wobei 150 µM die Zellen nachweislich schädigten (Abb. 19A,B).

Insgesamt bedingten die Claudin-5-Peptide vor allem einen Verlust von Claudin-5 in den Zell-Zell-Kontakten und eine Beeinträchtigung der Zellform aber auch eine intrazelluläre Akkumulation von Claudin-5.

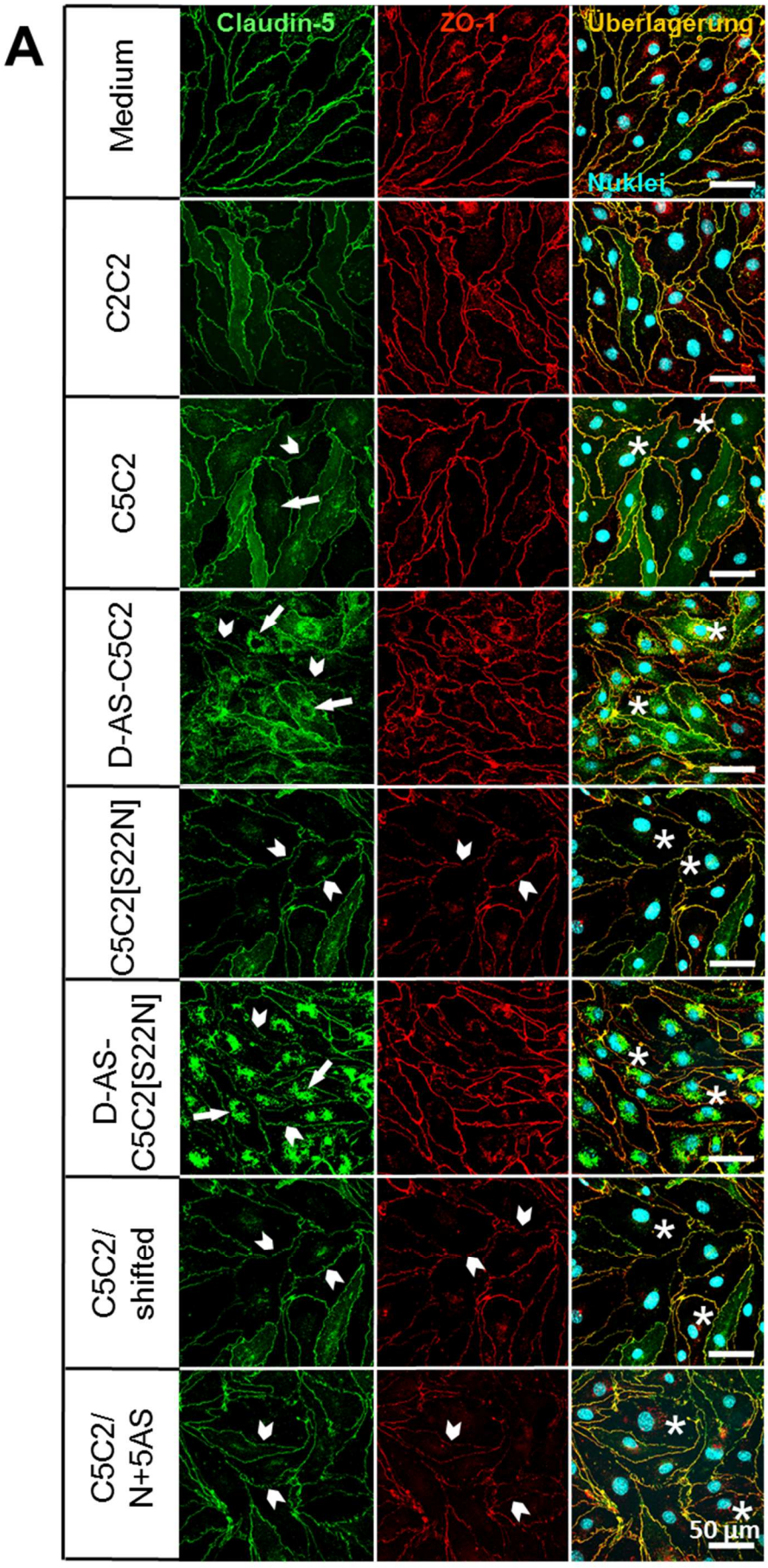


Abb. 18: Claudin-5-Peptide führen zur Umverteilung von Claudin-5 aus der Plasmamembran ins Zytosol, reduzieren Membran-assoziiertes *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) und beeinflussen die Zellmorphologie von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3). Fortsetzung auf nächster Seite.

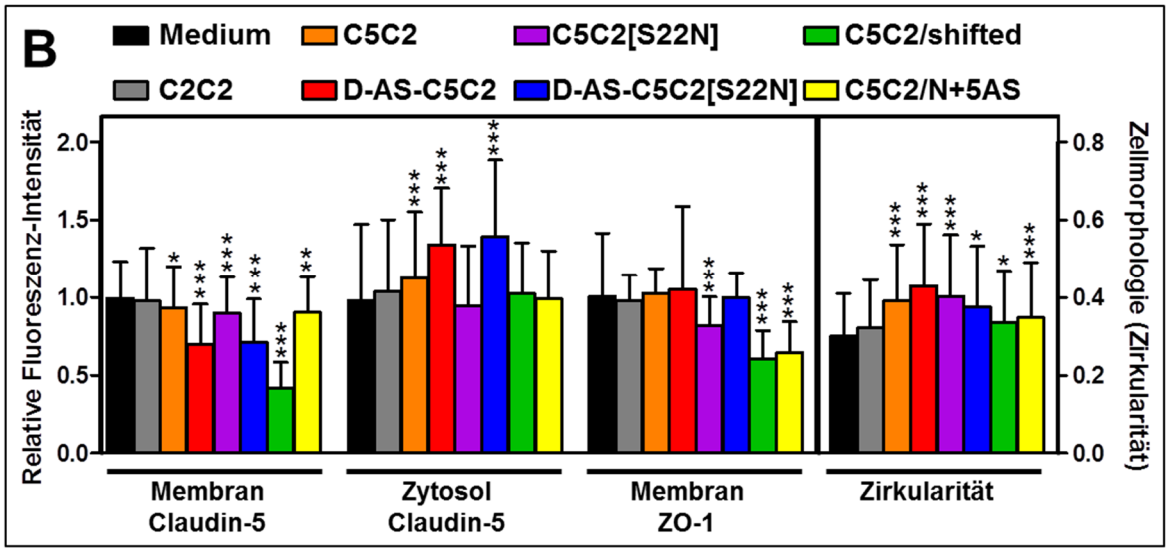


Abb. 18: Claudin-5-Peptide führen zur Umverteilung von Claudin-5 aus der Plasmamembran ins Zytosol, reduzieren Membran-assoziiertes *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) und beeinflussen die Zellmorphologie von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3). (A) Immunfluoreszenzfärbungen 24 h nach Peptidinkubation (300 µM) zeigen eine Claudin-5- und ZO-1-Reduktion in der Plasmamembran (Pfeilspitzen), Akkumulation von Claudin-5 im Zytosol (Pfeile) und eine rundliche Zellform (Sterne). **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Claudin-5 und ZO-1 in der Plasmamembran, von zytosolischem Claudin-5 und der Zellmorphologie (berechnet als Zirkularität) nach Peptidbehandlung relativ zur Mediumkontrolle. n≥30, Mittelwert±SD, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

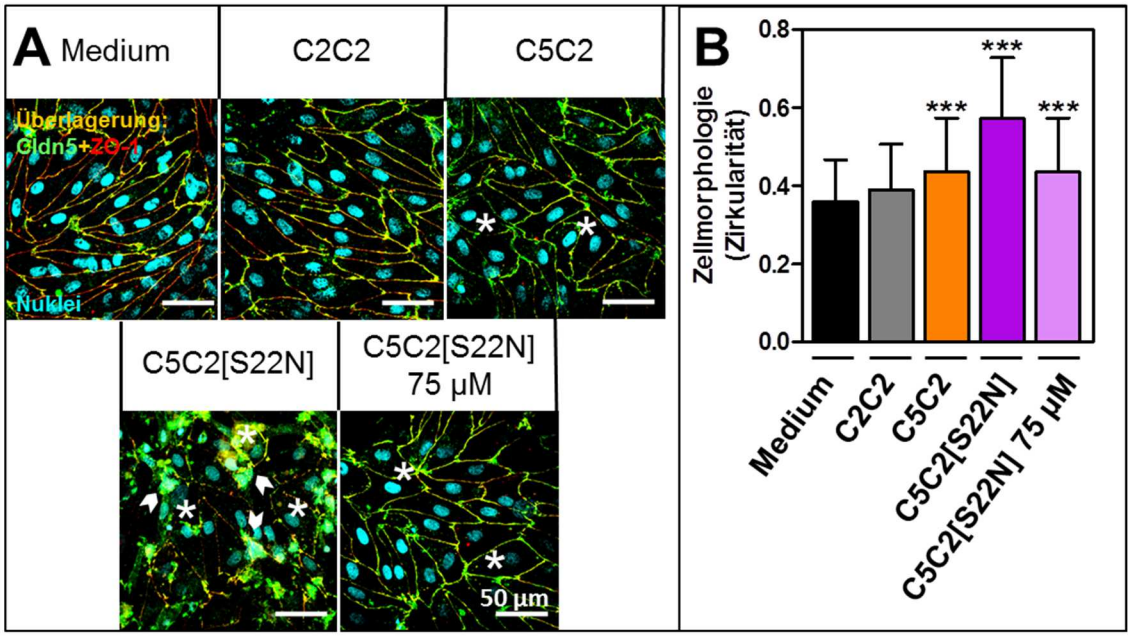


Abb. 19: Claudin-5-Peptide führen zur Abrundung in primären Endothelzellen. Primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen als Kontaktkultur mit Rattenastrozyten wurden 24 h mit Peptiden (150 µM, wenn nicht anders angegeben) oder Medium als Kontrolle inkubiert. **(A)** Immunfluoreszenzfärbung der Zellen nach 24 h Peptidinkubation zeigen eine eher rundliche Zellform (Sterne). Cldn5, Claudin-5; ZO-1, *Zonula occludens* Protein-1. **(B)** Quantifizierung der reduzierten elliptischen Morphologie der Zellen (berechnet als Zirkularität) nach Peptidbehandlung. n≥47, Mittelwert±SD, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; ***, p<0,001 relativ zu Peptidfreier Mediumkontrolle. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N).

3.2.2 Peptidbehandlung reduziert die Komplexität der *Tight-Junction*-Stränge

Zur Untersuchung des Einflusses von Claudin-5-Peptiden auf die *Tight-Junction*-Morphologie wurde Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie angewendet. bEND.3-Zellen, die entweder mit C5C2 oder D-AS-C5C2 (24 h, 300 µM) inkubiert wurden, führten zur signifikanten Reduktion der Partikelzahl in den *Tight-Junction*-Strängen der E-Face der Plasmamembran. Für die peptidfreie Mediumkontrolle wurden 53±6 Partikel/µm Stranglänge gemessen; für C5C2 und D-AS-C5C2 nur 43±7 bzw. 44±6 Partikel/µm. Zellen, die mit dem Kontrollpeptid C2C2 inkubiert wurden, waren nicht signifikant beeinflusst. Auf der P-Face waren Partikel assoziiert, die keine Stränge bildeten und keiner Veränderung durch eine Peptidbehandlung unterlagen (Abb. 20).

Damit führten dieselben Claudin-5-Peptide neben einer Reduktion von Claudin-5 in den Zell-Zell-Kontakten (s. Kap. 3.2.1) zur Reduktion der Partikelzahl in den *Tight-Junction*-Strängen auf der E-Face der Plasmamembran.

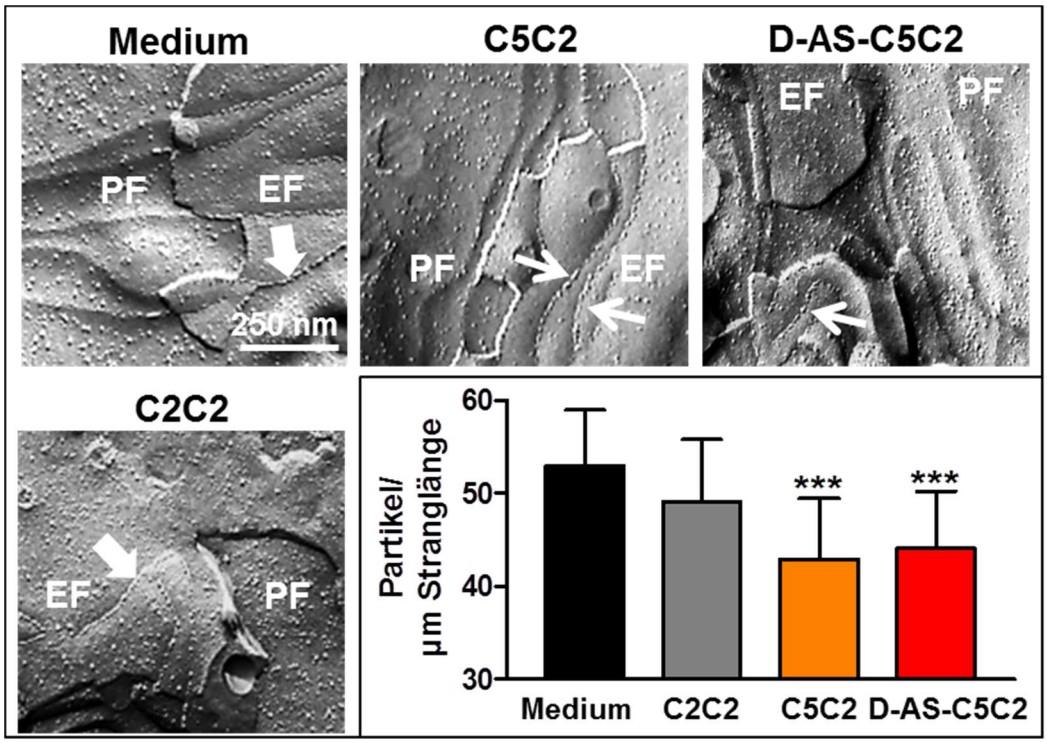


Abb. 20: Das *Tight-Junction*-Strangnetzwerk zeigt nach Claudin-5-Peptidbehandlung weniger Komplexität. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) 24 h nach Peptidbehandlung (300 µM). Reduktion der Partikel (weiße Pfeile) auf der exoplasmatischen Hälfte (EF) der Plasmamembran. Säulendiagramm: Zählung der Partikel pro µm Stranglänge, n≥26; Mittelwert±SD; Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle. PF, protoplasmatische Hälfte der Plasmamembran.

3.3 Spezifität von Claudin-5-Peptidomimetika

3.3.1 Reduktion von Claudin-5 und Occludin nach Peptidbehandlung

Zur Analyse der Peptidspezifität wurden HEK-293-Zellen (normalerweise *Tight-Junction*-frei) mit Überexpression eines *Tight-Junction*-Proteins nach Peptidbehandlung (24 h, 300 µM) mittels Lebendzellmikroskopie untersucht. Die monotransfizierten Zellen exprimierten jeweils nur ein *Tight-Junction*-Protein, welches mit YFP markiert war und sich in den Zwei-Zell-Kontakten anreicherte (Abb. 21A, links). Dadurch war es möglich, Peptideffekte auf die *Tight Junctions* isoliert zu untersuchen. Der Fokus wurde dabei auf die Claudine-1, -3, -4, -5, -11, -12 und Occludin gelegt, da diese in der BHS exprimiert werden bzw. überwiegend eine abdichtende Funktion einnehmen.

Nach Behandlung mit Claudin-5-Peptiden war Claudin-5 in der Plasmamembran relativ zur Mediumkontrolle von 34,8±9,0 % bis 59,8±19,4 % signifikant reduziert (Abb. 21A, obere Reihe, weiße Pfeile; Abb. 21B, Quantifizierung). Dieselben Peptide hatten zudem einen signifikanten Effekt auf die Occludin-Reduktion in der Plasmamembran (Abb. 21A, untere Reihe, weiße Pfeile; Abb. 21B, Quantifizierung; Reduktion von 58,5±23,8 % bis 89,9±26,4 %). C5C2[S22N] reduzierte zusätzlich Claudin-11 in der Plasmamembran auf 81,6±23,1 % (Abb. 21A, weiße Pfeile) und erhöhte Claudin-4 auf 122,4±37,5 % (Abb. 21A, blaue Pfeile; Abb. 21B, Quantifizierung). Das Peptid D-AS-C5C2 führte zu einer geringen Anreicherung von Claudin-3 (auf 117,3±18,6 %) und Claudin-11 (124,9±41,0 %) in der Plasmamembran. Neben einer Reduktion von Claudin-5 und Occludin waren bei C5C2/shifted Claudin-3, -4 und -11 relativ zur Mediumkontrolle erhöht (auf 134,9±16,3 %, 136,1±46,8 % bzw. 132,3±28,3 %; Abb. 21A, blaue Pfeile; Abb. 21B, Quantifizierung). Der Grund dafür könnte der proliferative Effekt sein, den C5C2/shifted bereits im Vitalitätstest hatte (Abb. 17). Das Kontrollpeptid C2C2 hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation der getesteten YFP-markierten Zellkontaktproteine (Abb. 21).

Dementsprechend wirkten Claudin-5-Peptide überwiegend über eine Modulation von Claudin-5 aber auch Occludin, wobei insbesondere durch C5C2/shifted weitere *Tight-Junction*-Proteine beeinflusst wurden.

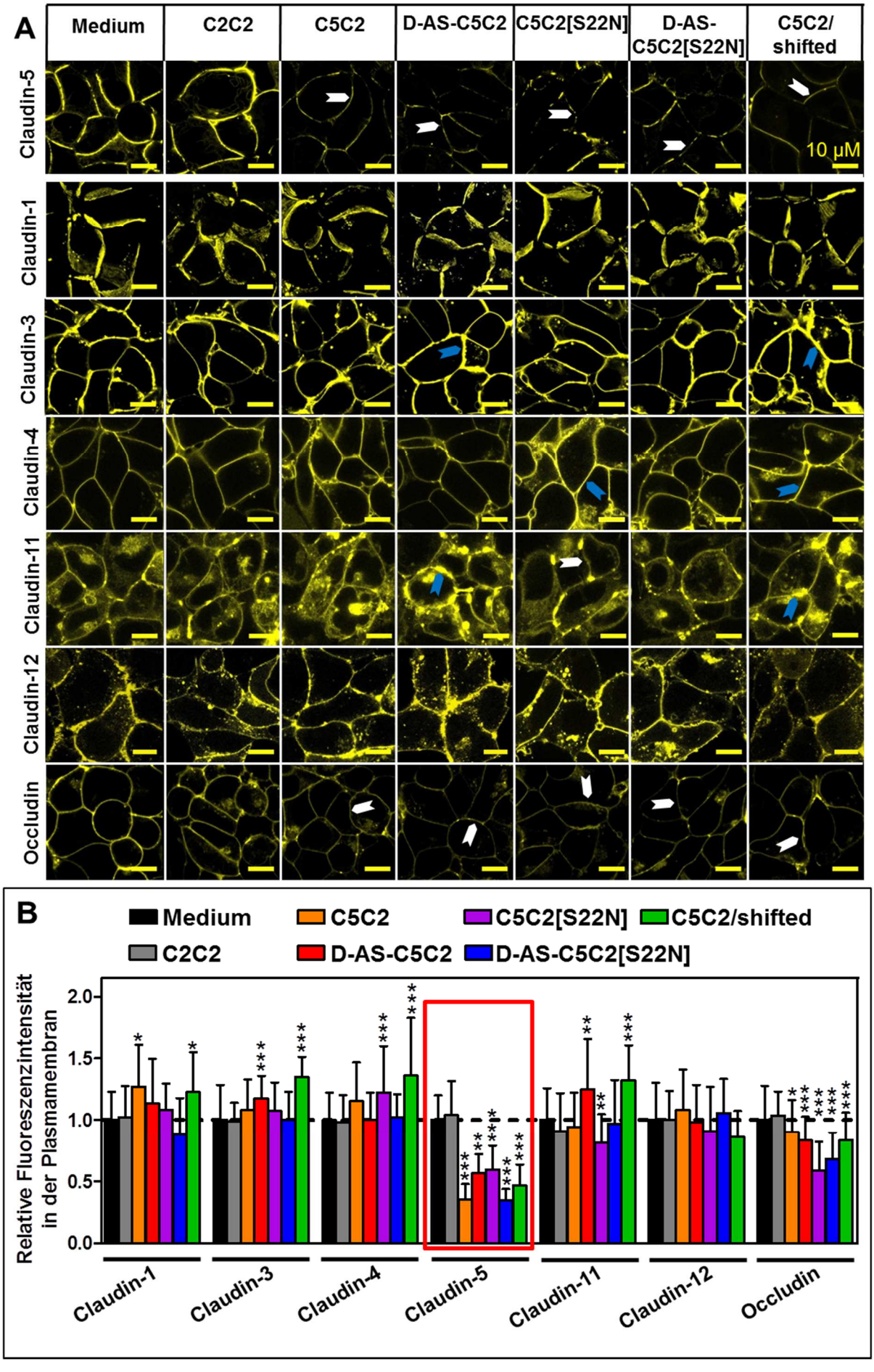

A
Medium
C2C2
C5C2
D-AS-C5C2
C5C2[S22N]
D-AS-C5C2[S22N]
C5C2/ shifted
Claudin-5
Claudin-1
Claudin-3
Claudin-4
Claudin-11
Claudin-12
Occludin
10 µM
B
Medium
C2C2
C5C2
D-AS-C5C2
C5C2[S22N]
D-AS-C5C2[S22N]
C5C2/shifted
Relative Fluoreszenzintensität in der Plasmamembran
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Claudin-1
Claudin-3
Claudin-4
Claudin-5
Claudin-11
Claudin-12
Occludin

Abb. 21: Claudin-5-Peptide reduzieren die Plasmamembranlokalisation von Claudin-5 und Occludin in monotransfizierten Zellen. (A) Lebendzellmikroskopie von Claudin-1-, -3-, -4-, -5-, -11-, -12- und Occludin-*Yellow Fluorescent Protein* (YFP)-monotransfizierten HEK-293-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) nach Behandlung mit Peptiden (24 h, 300 µM) oder peptidfreiem Medium. Weißer Pfeil, Reduktion der Plasmamembranintensität; blauer Pfeil, Erhöhung der Plasmamembranintensität. **(B)** Quantifizierung der YFP-Intensität in der Plasmamembran. n≥15; Mittelwert±SD; Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N].

3.3.2 In Claudin-5-freien, *Tight-Junction*-bildenden Zellen haben Claudin-5-Peptide überwiegend keine Wirkung

Die gesteigerte Permeabilität durch die Behandlung mit Claudin-5-Peptiden wurde in Claudin-5-exprimierenden Zellmodellen nachgewiesen. Da im vorangegangenen Kapitel durch monotransfizierte Zellen die Beteiligung von Claudin-5 an der Peptidwirkung bestätigt wurde, sind weitere Untersuchungen dazu Gegenstand dieses Kapitels. Dazu wurden Claudin-5-freie, *Tight-Junction*-bildende MDCK-II-Zellen verwendet, die die Zellkontaktproteine Claudin-1, -2, -3, -4, Occludin und ZO-1 exprimieren (McNeil et al., 2006; Staat et al., 2015). Nach Peptidbehandlung (48 h, 300 µM) hatten C5C2, D-AS-C5C2 und D-AS-C5C2[S22N] keinen signifikanten Effekt auf TER-Reduktion (max. auf 83,3±9,1 %) und Lucifer-Yellow-Permeabilität (max. 2,5±1,4-fach; Abb. 22, Säulen ohne Muster). C5C2/shifted bedingte eine vergleichbare Durchlässigkeit für Ionen sowie Lucifer Yellow in Claudin-5-exprimierenden und -freien Zellen (Abb. 22). Eine signifikante TER-Reduktion und ein signifikanter Anstieg der Lucifer-Yellow-Permeabilität wurde für die Peptide C5C2[S22] (68,0±12,7 % bzw. 5,5±2,6-fach) und C5C2/N+5AS (63,7±5,0 % bzw. 2,6±1,1-fach) mit WT-Zellen gemessen (Abb. 22, Säulen ohne Muster). Jedoch war der Effekt im Vergleich zu Claudin-5-exprimierenden Zellen (Abb. 22, gestreifte Säulen bzw. Abb. 16) wesentlich geringer. TER und Permeabilität waren durch das Kontrollpeptid C2C2 nicht beeinflusst (Abb. 22).

Damit war die Wirkung der Claudin-5-Peptide auf die zelluläre Barriere Claudin-5-abhängig, wobei die Peptide C5C2[S22N], C5C2/shifted und C5C2/N+5AS weniger spezifisch waren.

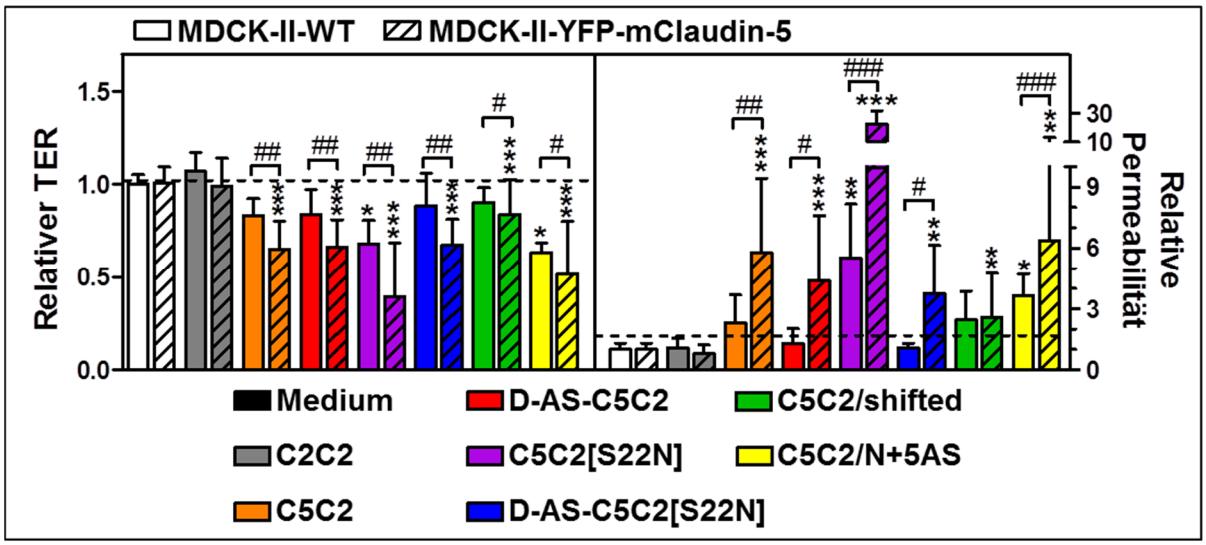


Abb. 22: Die Wirkung von Claudin-5-Peptiden auf die Durchlässigkeit zellulärer Barrieren ist abhängig von Claudin-5-haltigen *Tight Junctions*. MDCK-II (Madin-Darby *canine kidney*)-Zellen mit sehr geringer endogener Claudin-5-Expression wurden auf Filtern kultiviert und mit Peptiden (300 µM) oder Medium als Kontrolle behandelt (Säulen ohne Muster). Peptidbehandelte MDCK-II-Zellen, transfiziert mit YFP (*Yellow Fluorescent Protein*)-mClaudin-5 sind vergleichend dazu dargestellt (gestreifte Säulen, Daten s. Abb. 16). Linke Ordinate: TER (transzellulärer elektrischer Widerstand) 48 h nach Behandlung. Rechte Ordinate: Messung des relativen Permeationskoeffizienten von Lucifer Yellow (457 Da) 48 h nach Behandlung. Mittelwert±SD. n≥3, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle (gestrichelte Linien). Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; #, p<0,05; ##, p<0,01; ###, p<0,001 WT- relativ zu Claudin-5-Zellen. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N].

3.4 Wirkmechanismus von Claudin-5-Peptidomimetika

3.4.1 Downregulation der mRNA von Claudin-5, Occludin und *Zonula occludens* Protein-1

Claudin-5-Peptide bedingen sowohl in Claudin-5-monotransfizierten HEK-293-Zellen (s. Kap. 3.3.1) als auch in Claudin-5-exprimierenden Gehirnendothelzellen (s. Kap. 3.2.1) eine Claudin-5-Reduktion in der Plasmamembran. Zur Klärung, ob dadurch ebenso eine Regulation auf mRNA-Ebene stattfindet, wurden bEND.3-Zellen nach Inkubation mit Claudin-5-Peptiden (24 h, 300 µM) mittels qRT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich für die getesteten Claudin-5-Peptide eine signifikante Reduktion der mRNA bzw. ein Trend zur Reduktion für Claudin-5, Occludin und ZO-1. Für Claudin-5 war die mRNA-Expression mindestens auf 75,5 % bis maximal auf 48,4 % verglichen zur peptidfreien Mediumkontrolle reduziert; für Occludin: auf 48,4 bis 27,3 %; für ZO-1: auf 75,2 bis 28,7 %. Die mRNA-Expression von Claudin-1 und -12 wurde nicht durch Claudin-5-Peptide beeinflusst, genauso wie das Kontrollpeptid C2C2 keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der getesteten Zellkontaktproteine hatte (Abb. 23).

Claudin-5-Peptide führten zur Downregulation der mRNA-Expression von Claudin-5, Occludin und ZO-1 ohne die Expression anderer Claudine (Claudin-1 und -12) zu beeinflussen.

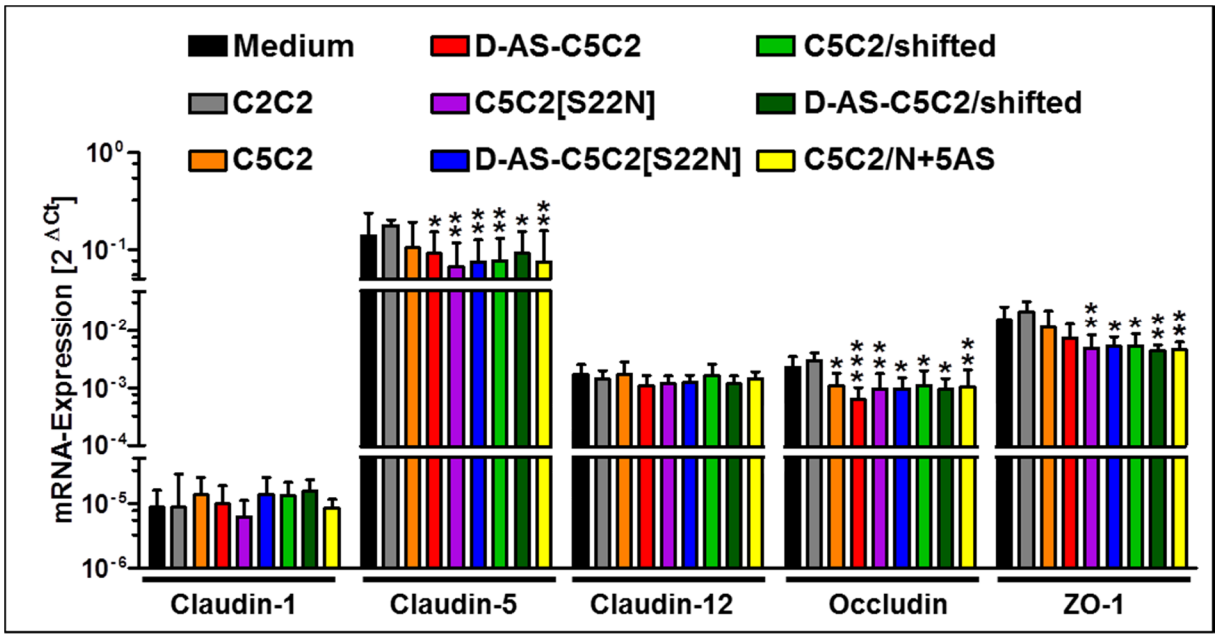


Abb. 23: Der Effekt von Claudin-5-Peptiden auf die mRNA-Expression von Claudin-1, -5, -12, Occludin und *Zonula occludens* protein-1 (ZO-1). Peptidkonzentration: 300 µM, mRNA normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct=Ct_{\beta\text{-}Aktin}\text{-}Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. n≥7, Mittelwert±SD. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreier Mediumkontrolle. C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

3.4.2 Zeitabhängige Internalisierung von Claudin-5-Peptiden in Endothelzellen

In anderen Untersuchungen zu Claudin-Peptiden wurde eine Kointernalisierung des Peptid-Claudin-Komplexes beschrieben (Gehne et al., 2017; Staat et al., 2015; Zwanziger et al., 2012b). Da Claudin-5 nach Peptidbehandlung in der Plasmamembran reduziert aber zytosolisch angereichert war, soll untersucht werden, inwieweit auch Claudin-5-Peptide endozytiert werden. Nach Behandlung mit Fluoreszenz-markierten Peptiden (C5C2 und Kontrollpeptid C2C2) wurden lebende Gehirnendothelzellen (bEND.3-Zellen) nach verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Zuvor wurde bestätigt, dass die N-terminale Kopplung der Peptide mit Fluoreszenzmolekülen keinen negativen Einfluss auf deren Wirkung hatte (Anhang 7).

Mittels Laser-Scanning-Mikroskopie wurde die zelluläre TAMRA-Fluoreszenzintensität von etwa 20 Bildern aus mehreren Ebenen im Abstand von 1 µm aufgenommen (Z-Stapel) und pro Probe der Mittelwert aus mindestens drei Z-Stapeln gebildet. Die Untersuchungen ergaben eine intrazelluläre Akkumulation von Fluoreszenz-markiertem Claudin-5-Peptid

(TAMRA-C5C2) jedoch nicht von TAMRA-C2C2 oder TAMRA (Abb. 24A). Der Zeitverlauf der intrazellulären Akkumulation zeigte einen signifikant höheren Anstieg von intrazellulärem C5C2 bezogen auf peptidfreies TAMRA-Medium nach 4 h (3-fach, hohe Laserintensität) und nach 16, 24 und 48 h (21-fach, 28-fach, 15-fach, niedrige Laserintensität). Die hohe Laserintensität für Zeitpunkte bis 4 h wurde gewählt, um repräsentative Werte über dem Signal-Rausch-Verhältnis messen zu können. Das Kontrollpeptid C2C2 wurde über einen Zeitverlauf von 48 h nicht intrazellulär aufgenommen (Abb. 24B).

Somit wurde eine spezifische und zeitabhängige Internalisierung von C5C2 in Gehirnendothelzellen nachgewiesen.

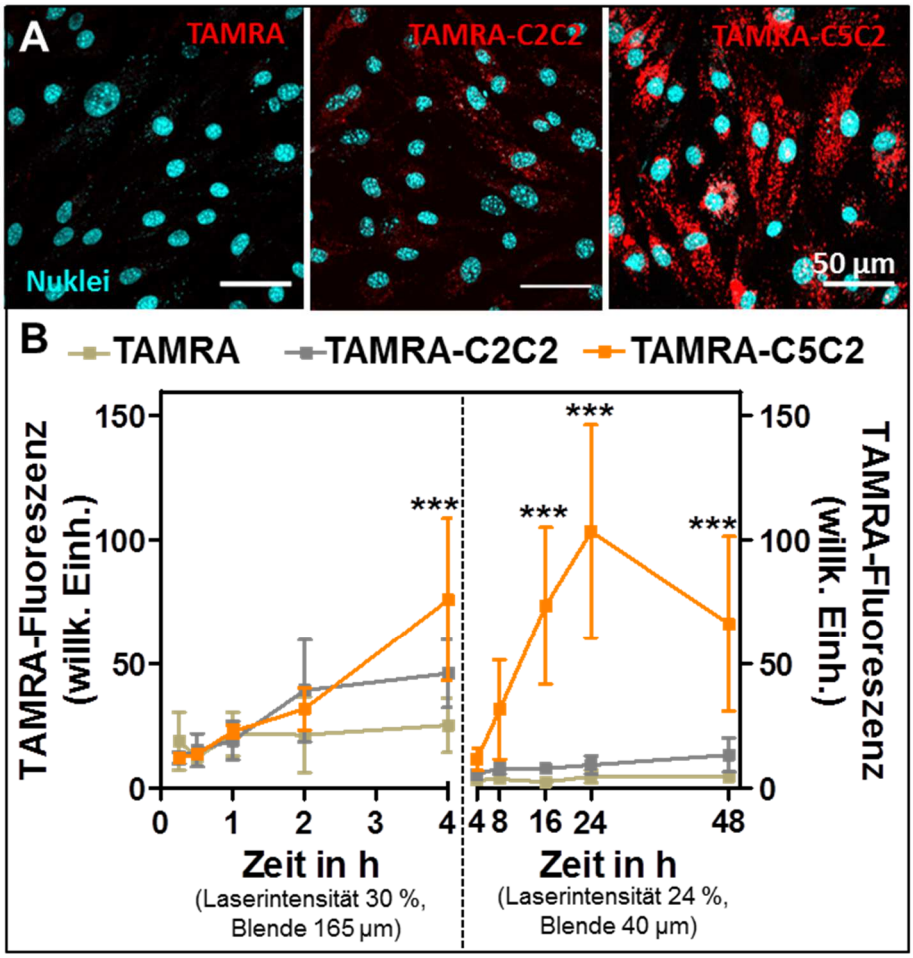
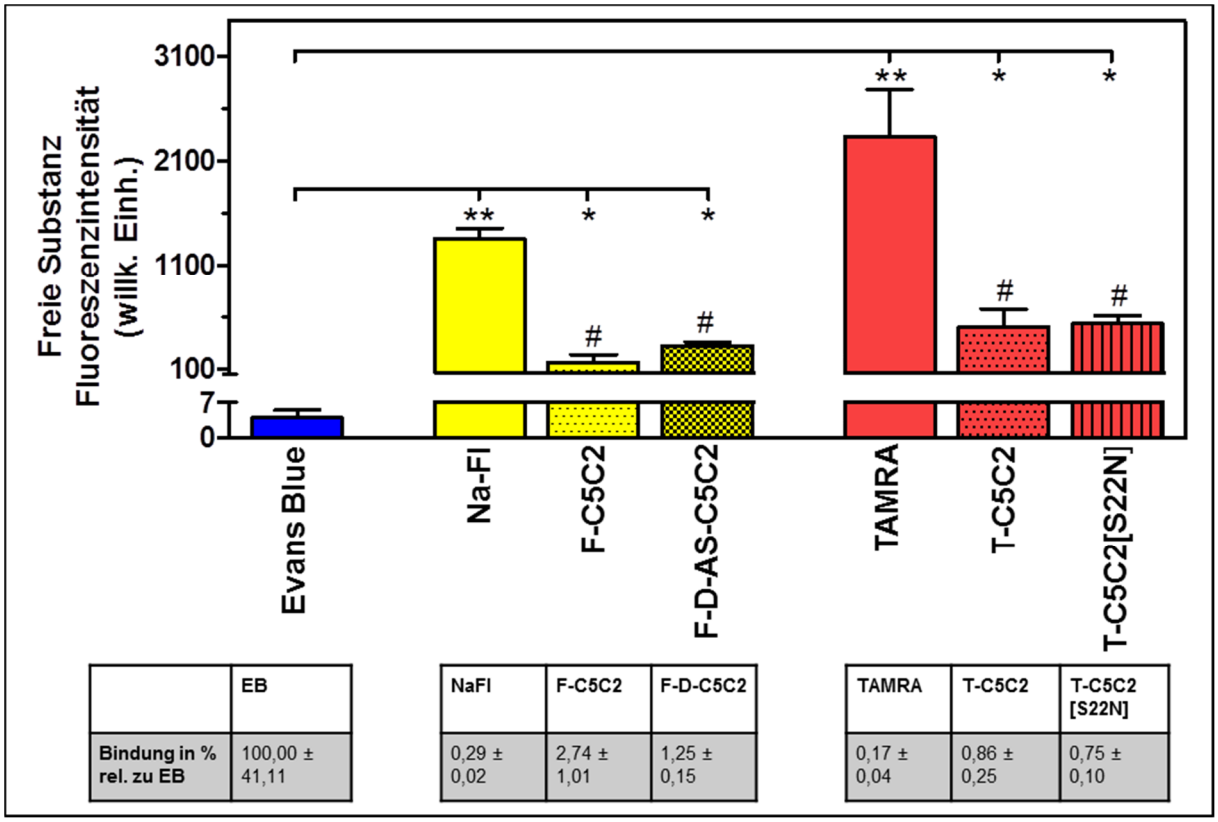


Abb. 24: Das Claudin-5-Peptid C5C2 aber nicht das Kontrollpeptid C2C2 wird in Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) internalisiert. (A) Dreidimensionale Aufnahme durch die endotheliale Zellschicht (Z-Stapel aus ca. 20 Ebenen) 24 h nach Peptidbehandlung (5 µM). Peptide sind N-terminal mit fluoreszierendem 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. **(B)** Zeitverlauf der intrazellulären Akkumulation von TAMRA oder TAMRA-Peptiden. Mittelwert±SD, n≥3. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; ***, p<0,001 relativ zu peptidfreiem TAMRA-Medium.

3.5 Geringe Bindung der Claudin-5-Peptidomimetika an Albumin

Durch die Plasmaproteinbindung von Wirkstoffen wird deren Pharmakokinetik beeinflusst. Daher wurde die Peptidbindung an Albumin, das quantitativ wichtigste Plasmaprotein, mit Fluoreszenz-markierten Peptiden bestimmt. Zuvor wurde mittels Gelelektrophorese getestet, ob die Fluoreszenz-Markierung der Peptide (TAMRA oder Fluoreszein) über den Messzeitraum in der Albuminlösung intakt und die Peptide ebenso stabil blieben. Beides wurde bestätigt (Anhang 8). Da Evans Blue zum überwiegenden Anteil an Albumin bindet (Rawson, 1943), wurde es als Referenz für eine vollständige Albuminbindung verwendet.



	EB
Bindung in % rel. zu EB	100,00 ± 41,11

NaFl	F-C5C2	F-D-C5C2
0,29 ± 0,02	2,74 ± 1,01	1,25 ± 0,15

TAMRA	T-C5C2	T-C5C2 [S22N]
0,17 ± 0,04	0,86 ± 0,25	0,75 ± 0,10

Abb. 25: Claudin-5-Peptide liegen kaum albumingebunden vor. Dialyse von Floreszenz-markierten Peptiden und Fluoreszenzfarbstoffen (200 µM in 40 g/l Albuminpuffer) gegen Albuminpuffer (40 g/l). Molekulargewichtsgrenze 12-14 kDa. Evans Blue, EB; Na-Fluoreszein, NaFl; 5,6-Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA bzw. T; N-terminal markierte Claudin-5-Peptide (entweder mit TAMRA (T) oder Fluoreszein (F)): C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N); D-Aminosäure-Peptid D-AS-C5C2. Säulendiagramm zeigt die Fluoreszenzintensität in willkürlichen Einheiten der freien Substanz. n≥3; Mittelwert±SD; Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; *, p<0,05; **, p<0,01 relativ zu Evans Blue bzw. #, p<0,05 relativ zu NaFl bzw. TAMRA. Tabelle zeigt die prozentuale Bindung an Albumin relativ zur Evans-Blue-Bindung.

Im Vergleich zu Evans Blue (freie Substanz: 4±2 willk. Einh.) wurden sowohl bei TAMRA (2332±449 willk. Einh.) und Na-Fluoreszein (1357±95 willk. Einh.) als auch bei den Fluoreszenz-markierten Peptiden (TAMRA-C5C2, 495±176 willk. Einh.; TAMRA-C5C2[S22N], 530±77 willk. Einh.; Fluoreszein-C5C2, 161±72 willk. Einh.; Fluoreszein-D-

AS-C5C2, 317±37 willk. Einh.) signifikant mehr freie Moleküle gemessen (Abb. 25, Säulendiagramm). Die berechnete prozentuale Bindung der Testsubstanzen relativ zu Evans Blue zeigte, dass weniger als 3 % der Peptide und weniger als 0,3 % der Kontrollsubstanzen (TAMRA und Na-Fluoreszein) albumingebunden vorlagen (Abb. 25, Tabelle). Andererseits sind im Vergleich zur internen Fluoreszenzkontrolle (TAMRA oder Na-Fluoreszein) die Peptide 50- bis 100-fach mehr gebunden (Abb. 25, Säulendiagramm). Die getesteten Peptidderivate wiesen im Vergleich zu C5C2 keine signifikant-unterschiedliche Albuminbindung auf.

Aus den Untersuchungen ergab sich, dass eine Albuminbindung der Peptide eine untergeordnete Rolle spielte.

3.6 Claudin-5-Peptidomimetika erhöhen reversibel die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke *in vivo*

Zur Bewertung des Potenzials der Claudin-5-Peptide die BHS-Permeabilität auch *in vivo* zu steigern, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. T. Niendorf, Dr. M.-C. Ku und Dr. A. Pohlmann (Berlin Ultrahigh Field Facility, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) MRT-Untersuchungen durchgeführt. Da die meisten Methoden eine Öffnung nach komplettem BHS-Zusammenbruch detektieren (Wunder et al., 2012) wurden die MRT-Untersuchungen auf eine temporäre Öffnung durch die Peptide angepasst. Dazu wurde Mäusen Claudin-5-Peptid (3,5 µmol/kg) oder Kontrollsubstanzen (PBS+/+ oder C2C2, 3,5 µmol/kg) injiziert (i.v.). Die Peptide waren jeweils in PBS+/+ gelöst. 4 h nach Applikation von C2C2 im Vergleich zu C5C2 bzw. PBS im Vergleich zu D-AS-C5C2 wurden Gehirn-Scans vor Kontrastmittel-Injektion bestimmt. Bei normalem Gehirngewebe mit intakter BHS ist die Kontrastmittel-Permeabilität durch die Barriere vernachlässigbar klein. Eine Kontrastmittelgabe reduziert die T_1-Relaxationszeit. Daher wurden ΔT_1-Übersichten als Differenz zwischen T_1 vor Kontrastmittel- ($T_{1prä}$) und nach Kontrastmittelapplikation (T_{1post}) berechnet, um quantitative Informationen über die BHS-Gängigkeit des Kontrastmittels zu erhalten. Die T_1-Relaxationszeit beschreibt die longitudinale Relaxation, d.h. die Zeit, die die Kernspins zum Aufrichten entlang des äußeren Magnetfeldes nach Abschalten des Hochfrequenzimpulses benötigen.

Die errechnete mittlere ΔT_1-Übersicht führte zur Kontrastmittel-Aufnahme im periventrikulären Raum bei den Claudin-5-Peptiden C5C2 und D-AS-C5C2 (Abb. 26A, oben). Anschließend wurde eine Schablone auf die MRT-Bilder angewendet, die die lateralen Ventrikel und deren periventrikulären Raum erfasste. ΔT_1-Werte innerhalb der Schablone zeigten eine signifikante Durchlässigkeit 4 h nach C5C2- oder D-AS-C5C2-Injektion bezogen auf Mäuse, die

Kontrollsubstanzen erhielten (C2C2, PBS+/+). Die erhöhte Durchlässigkeit wurde an der stärkeren T_1-Reduktion im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle deutlich (Verschiebung der kumulativen Häufigkeiten zu negativen ΔT_1-Werten; Abb. 26A, unten).

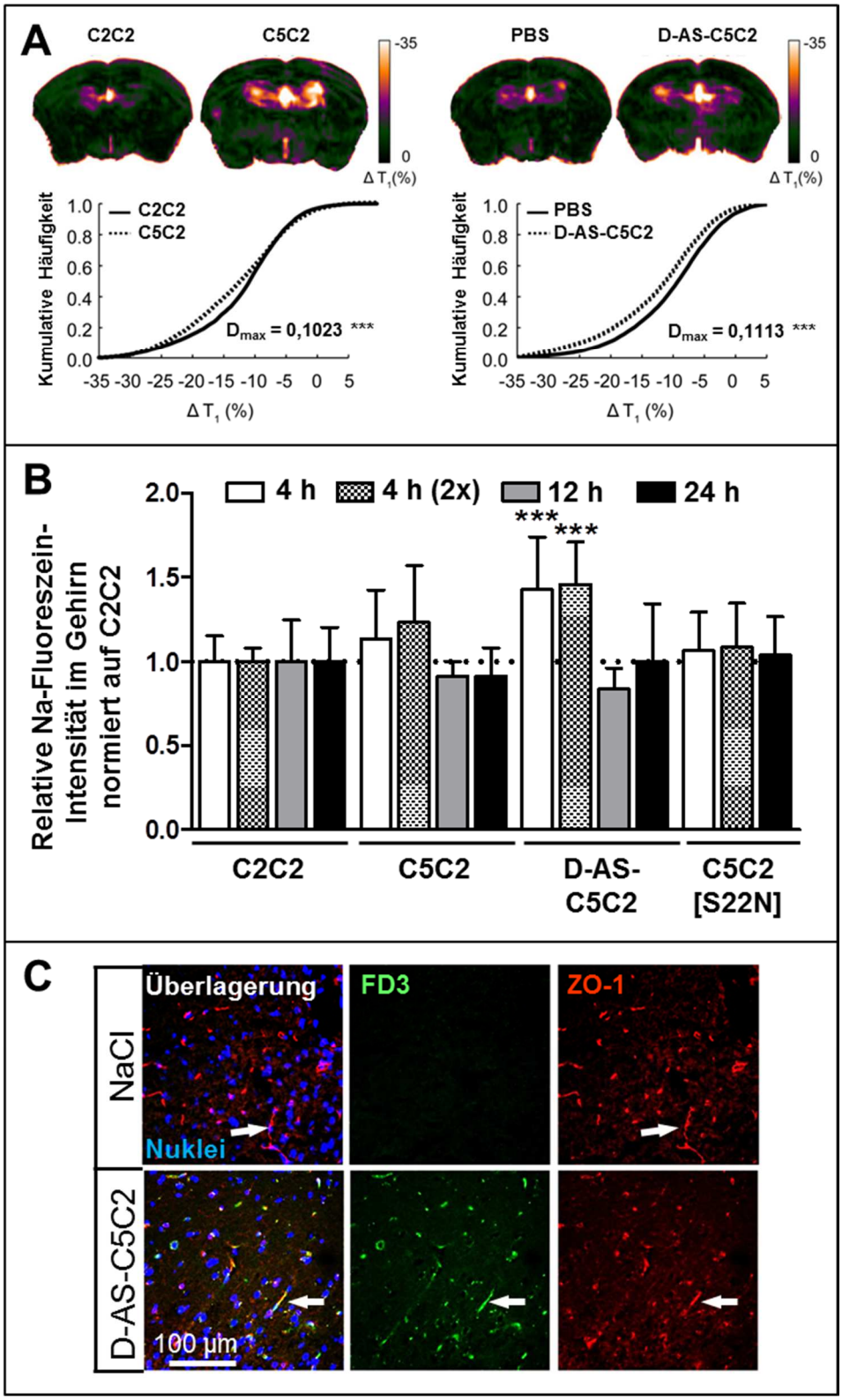


Abb. 26: Die Claudin-5-Peptide C5C2 und D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Derivat) erhöhen die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für kleine Moleküle *in vivo*. (A) Mittels Magnetresonanztomographie wurde 4 h nach Claudin-5-Peptid-Applikation (3,5 µmol/kg, i.v.) ein Anstieg von Kontrastmittel (Diethylen-Triamin-Pentaessigsäure Gadolinium III, Gd-DTPA; 547 Da; 1 mmol/kg/20 min i.v.) im Gehirn von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen. Repräsentative farb-kodierte Übersicht der Differenz der T_1-Relaxationszeit vor und nach Kontrastmittelgabe ($\Delta T_1=(T_{1post}/T_{1prä})$-1) eines Mausgehirns nach Behandlung mit PBS, C2C2, C5C2 oder D-AS-C5C2; Farbskala: je größer der Negativwert, desto stärker die Durchlässigkeit. Kumulative Häufigkeit von ΔT_1 im periventrikulären Raum. Linksverschiebung, ΔT_1-Reduktion; ***, $p < 0{,}001$; $n \geq 3$. D_{max} zeigt das Maximum der absoluten Unterschiede zwischen den kumulativen Häufigkeiten beider Gruppen. **(B)** Na-Fluoreszein (376 Da)-Aufnahme ins Mausgehirn 4, 12 und 24 h nach Peptid-Injektion (i.v., Einfachinjektion t=0 h oder Zweifachinjektion t=0 und 2 h) relativ zum Kontrollpeptid C2C2 (gestrichelte Linie); 0,5 mol/kg Na-Fluoreszein in PBS+/+; 3,5 µmol/kg Peptid in PBS+/+, Mittelwert±SD, $n \geq 3$; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; ***, $p < 0{,}001$ relativ zu C2C2. **(C)** Immunhistochemie von fixierten Gehirnschnitten 4 h nach Peptid- (3,5 µmol/kg, i.v.-Injektion) oder Kontrollbehandlung (NaCl, 0,9% Natriumchlorid) und anschließender Applikation von Fluoreszein-Dextran 3 kDa (FD3, i.v.-Injektion, 20 min, 1,1 µmol/kg). Weiße Pfeile, *Zonula occludens* Protein-1 (ZO-1)-positive Kapillaren.

Um den Effekt der erhöhten BHS-Permeabilität, hervorgerufen durch Claudin-5-Peptide, zu bestätigen, erhielten Mäuse 4, 12 oder 24 h nach Peptid-Injektion (i.v.) eine Injektion mit Na-Fluoreszein (376 Da, i.v., 0,5 mol/kg). Anschließend wurde die Na-Fluoreszein-Aufnahme in Gehirn, Leber und Niere bestimmt. Leber und Niere fungierten als Kontrolle für die Na-Fluoreszein-Applikation, da durch die jeweils stark durchlässige Endothelzell-Barriere eine maximale Aufnahme zu erwarten war. Alle Messungen wurden auf das Kontrollpeptid C2C2 bezogen, da in Initialversuchen die Na-Fluoreszein-Aufnahme ins Gehirn zwischen PBS+/+ und in PBS-gelöstem C2C2 nicht unterschiedlich waren. Dabei lag die Aufnahme von PBS-injizierten Mäuen (n=3) relativ zu C2C2 bei 92,9±8,9 % (Einfachinjektion, nach 4 h) und bei 86,4±9,0 % (Zweifachinjektion, nach 4 h).

Für die Claudin-5-Peptide wurden keine Unterschiede in der Na-Fluoreszein-Anreicherung in Leber und Niere verglichen mit dem Kontrollpeptid C2C2 gemessen (Anhang 9). Die Messungen des Gehirngewebes ergaben, dass das Claudin-5-Peptid C5C2[S22N] keine signifikante Aufnahme von Na-Fluoreszein bewirkte. C5C2 steigerte die Na-Fluoreszein-Aufnahme tendenziell (um 14 %) und D-AS-C5C2 signifikant um 43 % innerhalb von 4 h nach Injektion (Abb. 26B). Nach 12 h konnte der Effekt nicht mehr beobachtet werden.

Eine Zweifachinjektion der Peptide (i.v., t= 0 und 2 h) bedingte nach 4 h keine signifikant höhere Na-Fluoreszein-Aufnahme im Vergleich zur Einfachinjektion (Abb. 26B, gemusterte Säule). Bei D-AS-C5C2 war die Aufnahme verglichen mit dem Kontrollpeptid C2C2 um 46 % erhöht (43 % bei Einfachinjektion) und bei C5C2 um 23 % (14 % bei Einfachinjektion). Ebenfalls unterschieden sich die in MRT-Untersuchungen ermittelte Kontrastmittel-Durchlässigkeit und die berechnete kumulative Häufigkeit der ΔT_1-Übersichten nicht zwischen Einfach- und Zweifachinjektion von D-AS-C5C2 (Anhang 10).

Andere Applikationsregime hatten in initialen Versuchen einen leichten Trend zur verstärkten Na-Fluoreszein-Aufnahme ins Gehirn. Beispielsweise war diese 1 h nach C5C2-Injektion (i.v.; Anhang 11A) und nach Dreifachinjektion (i.v., t=0, 16, 19 h; Anhang 11B) im Vergleich zum Kontrollpeptid C2C2 um 24 % gesteigert. Initiale Versuche zur Peptidinjektion in die *A. carotis communis* (3,5 µmol/kg Peptid in physiologischer NaCl-Lösung, 10 min) wurden in Kooperation mit Prof. Dr. A. Andjelkovic-Zochowski und Dr. S. Stamatovic (Abteilung Pathologie, Universität Michigan, USA) durchgeführt. Im Anschluss folgte eine Na-Fluoreszein-Injektion (376 Da, i.p., 1 mol/kg, 30 min Inkubation) und führte bei C5C2[S22N] zur 5-fachen Erhöhung der Na-Fluoreszein-Permeabilität ins Mausgehirn verglichen mit NaCl. C5C2 und D-AS-C5C2 zeigten einen Anstieg auf das Dreifache (Anhang 12).

Mittels Gehirnschnitten wurde die Permeabilität nach vierstündiger Peptidbehandlung für ein Molekül mit einer Größe von 3 kDa (FD3, Fluoreszein-Dextran) untersucht. Die Lokalisation der Kapillaren wurde anhand einer ZO-1-Färbung bestimmt. Nach i.v.-Injektion von D-AS-C5C2 war FD3 anders als nach Kontrollbehandlung kapillarassoziiert und diffus im Gehirnparenchym zu detektieren (Abb. 26C).

Insgesamt waren Claudin-5-Peptide geeignet, um eine transiente BHS-Durchlässigkeit für kleine Moleküle zu begünstigen. Insbesondere war die Stabilisierung durch D-AS für die Wirkung von Vorteil.

3.6.1 Expression von Claudin-5 in Geweben der Maus

Claudin-5-Peptide wurden synthetisiert, um Claudin-5 als Zielprotein zu beeinflussen. Da die Peptide systemisch appliziert wurden, sollte überprüft werden, in welchen Organen Claudin-5 beeinflusst sein könnte. Dazu wurde die Expression in verschiedenen Mausgeweben quantifiziert. Von den getesteten Organen wurde für das Gehirn die dritthöchste Claudin-5-Expression normiert auf β-Aktin mit $(1{,}5\pm0{,}5)\times10^{-2}$ nach Lunge ($(6{,}4\pm1{,}1)\times10^{-2}$) und Herz ($(3{,}2\pm1{,}0)\times10^{-2}$) bestimmt. Eine geringere Expression zeigten Testis > Milz > Uterus > Pankreas > Niere > Leber > Harnblase ($(8{,}7\pm2{,}1)\times10^{-3}$ bis $(1{,}6\pm0{,}6)\times10^{-3}$). Im Darm (Duodenum, Jejenum, Ileum, Colon) und in der Speicheldrüse spielte Claudin-5 mit einer Expression $\leq(7{,}6\pm2{,}9)\times10^{-4}$ quantitativ eine untergeordnete Rolle (Abb. 27A).

Darüber hinaus wurde in isolierten Gehirnkapillaren, der Zielstruktur der Claudin-5-Peptide, die Expression von Claudin-5 und anderen *Tight-Junction*-Proteinen untersucht. Dabei war Claudin-5 sowohl in der Großhirnrinde, die Kapillaren enthält, als auch in isolierten Gehirnkapillaren mit $(1{,}5\pm0{,}5)\times10^{-2}$ bzw. $(34{,}9\pm20{,}1)\times10^{-2}$ am stärksten exprimiert. Die Expression in den Kapillaren war 23-fach höher. Auch Occludin, Claudin-1 und -3 waren in den

Kapillaren im Vergleich zur Großhirnrinde höher exprimiert (10-fach bei Occludin, 5-fach bei Claudin-1 und -3). Deren Expression war jedoch geringer als von Claudin-5 (niedrigste Expression: Claudin-3; 0,3 % verglichen mit Claudin-5). Claudin-12 war in der Großhirnrinde und den Gehirnkapillaren vergleichbar exprimiert (Abb. 27B) und ist damit nicht auf die Gehirnkapillaren beschränkt. Das geht einher mit anderen Untersuchungen (Ohtsuki et al., 2008). Es ist denkbar, dass Perizyten weitere Zellen mit Claudin-12-Lokalisation sind, da dessen Claudin-12-Expression bereits beschrieben ist (Shimizu et al., 2008).

Zusammenfassend war Claudin-5 neben dem Gehirn auch in Lunge und Herz sehr stark exprimiert. Ein geringes Expressionsniveau wurde in Dünn- und Dickdarm bestimmt. Im Gehirn war es stark in den Kapillaren angereichert genauso wie andere *Tight-Junction*-Proteine (Claudin-1, -3 und Occludin). Claudin-5 spielte dort quantitativ die größte Rolle.

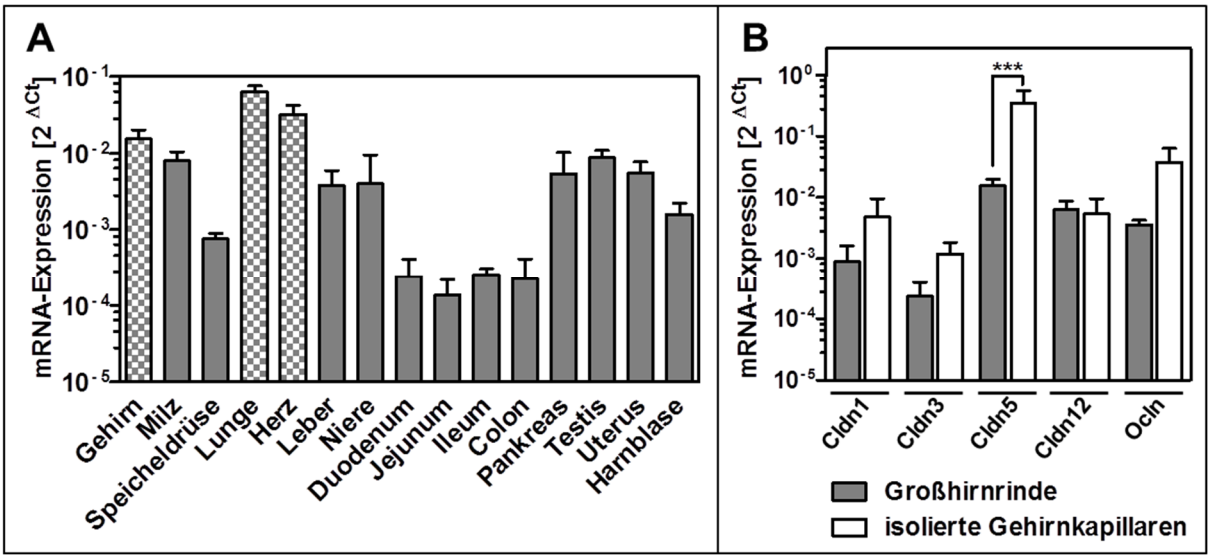


Abb. 27: Starke Claudin-5-Expression in Gehirn, Lunge und Herz sowie in isolierten Gehirnkapillaren von C57BL/6-Mäusen. (A) mRNA-Expression von Claudin-5 in verschiedenen Geweben. Karierte Säulen, Expression $\geq 10^{-2}$. **(B)** mRNA-Expression von Claudin (Cldn)-1, -3, -5, -12 und Occludin (Ocln) in Großhirn und Kapillaren normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct = Ct_{\beta\text{-Aktin}} - Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. n≥4, Mittelwert±SD; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; ***, p<0,001 relativ zur Großhirnrinde.

3.7 Claudin-5-Peptidomimetika verbessern Glioblastom-Chemotherapie

Da im Kapitel 3.6 gezeigt wurde, dass Claudin-5-Peptidomimetika für eine erhöhte *in-vivo*-Permeabilität kleiner Moleküle sorgten, sollte nun das Potenzial zur verbesserten Behandlung von Gehirntumoren mit normalerweise nicht ZNS-gängigen Zytostatika geprüft werden. Dazu wurden humane Glioblastom-Zellen in immundefiziente Mäuse intrazerebral injiziert. Nach drei Tagen begann die Chemotherapie in Kombination mit D-AS-C5C2. Dazu wurde zuerst das Peptid (i.v., 3,5 µmol/kg in PBS+/+) und nach 3 h das Zytostatikum Paclitaxel injiziert

(i.v., 24 mg/kg ≙ 28 µmol/kg). Die Behandlung wurde an drei aufeinanderfolgenden Wochen wiederholt und nach einer weiteren Woche die intrazerebrale Tumorfläche der Gehirne untersucht. Dazu wurden histologisch gefärbte Kryoschnitte der Gehirne verwendet. Gehirne, die kein Tumorwachstum oder einen nicht zerebralen Tumor aufwiesen, wurden aus der Beurteilung ausgeschlossen. Im Vergleich zur peptidfreien PBS-Kontrolle war die Tumorfläche nach der Behandlung sowohl mit als auch ohne Paclitaxel deutlich reduziert (48 % bzw. 53 %, Abb. 28). Durch die hohe Streuung war der Effekt statistisch nicht signifikant, daher bedarf es hier einer Wiederholung zur Erhöhung der Stichprobe, um den Effekt statistisch abzusichern. Die Gehirnschnitte in Abb. 28 wurden repräsentativ für die einzelnen Gruppen ausgewählt.

Initiale Versuche zur Behandlung von Glioblastomen mit Paclitaxel nach vorangegangener Peptidgabe zeigten eine Tendenz in der Tumorreduktion.

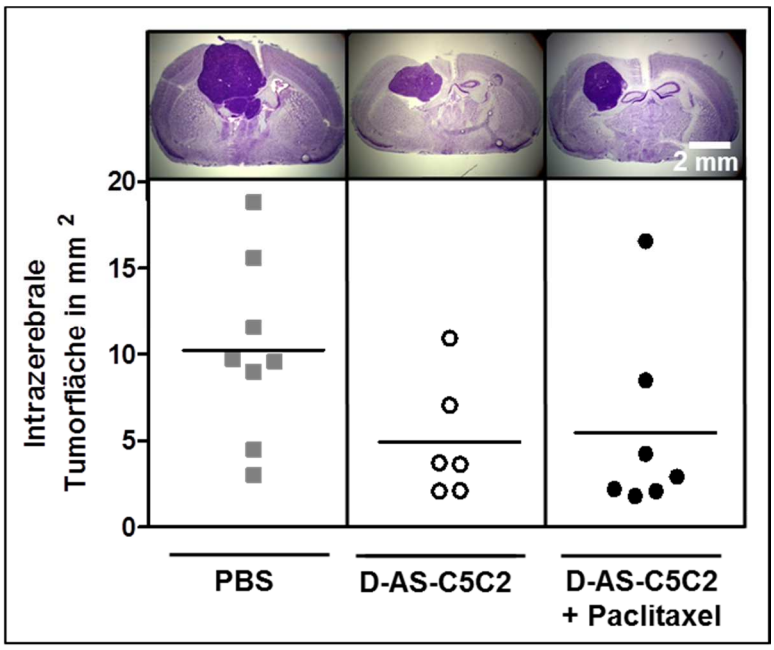


Abb. 28: Reduktion der Größe orthotroper Glioblastome im Mausgehirn nach Gabe von Paclitaxel mit vorangegangener Applikation der D-Aminosäure-Variante von C5C2. Drei Tage nach Ausbildung eines Glioblastoms in NMRI-nu/nu-Mäusen (5-6 Wochen alt) wurde das Peptid injiziert (i.v., 3,5 µmol/kg in PBS+/+) gefolgt von einer Paclitaxel-Injektion nach 3 h (i.v., 24 mg/kg ≙ 28 µmol/kg). Behandlung dreimal im Abstand einer Woche, Auswertung nach weiteren 7 Tagen. Streudiagramm mit Mittelwert (schwarze Linie) zeigt die intrazerebrale Tumorfläche in mm^2; $n \geq 6$; Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Dunn; nicht signifikant, $p \geq 0{,}05$ relativ zu PBS. Gehirnschnitte mit Kresylviolett gefärbt.

3.7.1 Peptidgabe und Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke sind ohne Nebenwirkungen

Um zu überprüfen, ob die Injektion von Claudin-5-Peptiden die Tumorbehandlung nicht durch eventuell unerwünschte Nebenwirkungen beeinträchtigt, wurden die Glioblastom-Mäuse über den Zeitraum der Peptid- und Paclitaxelbehandlung untersucht. Auf die Ge-

wichtszunahme der Mäuse hatte D-AS-C5C2 keinen negativen Einfluss. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Peptid mit oder ohne Paclitaxel injiziert wurde (Abb. 29). Ein Gewichtszuwachs steht im Allgemeinen für einen guten Zustand der Tiere, der nicht durch Peptidgabe verschlechtert wurde. Darüber hinaus blieb das Verhalten der Tiere normal und eine Sektion war makroskopisch unauffällig. Dasselbe wurde nach einmaliger Injektion der humanen Variante des C5C2-Peptids (hC5C2) über einen Zeitraum von einem Monat in Mäusen ohne Glioblastom und Paclitaxel-Behandlung festgestellt (Anhang 13).

Daraus lässt sich ableiten, dass Claudin-5-Peptide aufgrund ihrer guten Verträglichkeit zur *in-vivo*-Behandlung geeignet sind.

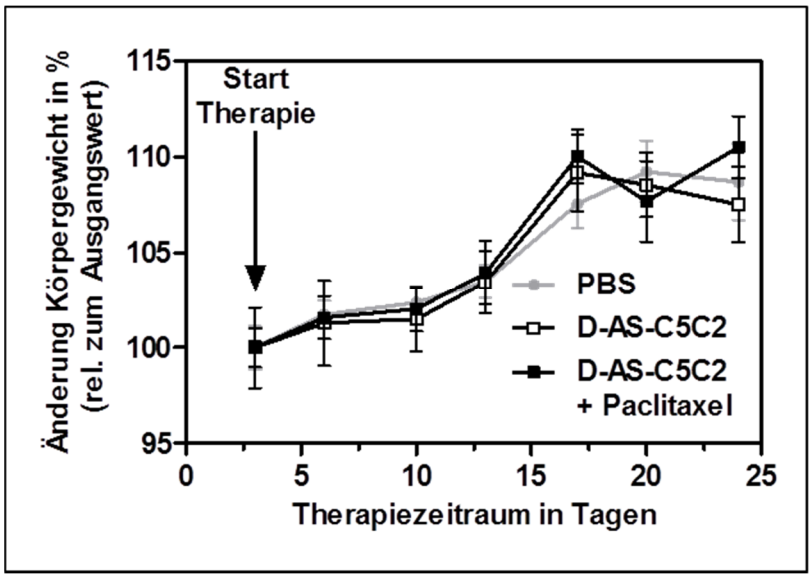


Abb. 29: Das Claudin-5-Peptid D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Variante) hat keinen negativen Einfluss auf die Gewichtszunahme von Mäusen mit orthotropem Glioblastom. Prozentuale Änderung des Körpergewichts relativ zum Ausgangswert von NMRI-nu/nu-Mäusen (5-6 Wochen alt) mit orthotropem Glioblastom nach Behandlung von Paclitaxel (i.v., 24 mg/kg ≙ 28 µmol/kg) mit vorangegangener Applikation von D-AS-C5C2 (3 h zuvor, i.v., 3,5 µmol/kg in PBS+/+). Behandlung dreimal im Abstand von einer Woche, Versuchsende nach weiteren 7 Tagen. n=10; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, $p \geq 0{,}05$ relativ zu PBS.

3.8 D-Aminosäuren erhöhen die Peptidstabilität in Blutplasma

Ein Hauptproblem therapeutisch-eingesetzter Peptide besteht in der geringen Stabilität *in vivo* insbesondere hervorgerufen durch den Abbau durch Peptidasen (Werle und Föger, 2017). Da D-AS-Peptide einer geringeren Proteolyse unterliegen (Hamamoto et al., 2002; Hong et al., 1999), wurden ausgewählte Claudin-5-Peptide vollständig aus D-AS synthetisiert. Zur Testung der Stabilität wurden die Peptide C5C2 und dessen D-Aminosäure-Variante N-terminal mit Fluoreszein markiert und *ex vivo* in murinem Blutplasma inkubiert (10 µM, 0-72 h). Proben verschiedener Zeitpunkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fluores-

zenzintensität detektiert (Abb. 30A). Beide Varianten führten zu einer zeitabhängigen Reduktion des Fluoreszein-Peptid-Signals, wobei das D-AS-Peptid langsamer abgebaut wurde ($t_{1/2}$ = 20,9±2,3 h) als das L-AS-Peptid ($t_{1/2}$ = 14,9±1,3 h). Im Vergleich zum Ausgangswert waren nach 72 h von D-AS-C5C2 noch 30,4±10,4 % detektierbar, von C5C2 nur noch 2,5±10,7 % (Abb. 30B). Wurden die Peptide anstatt in Blutplasma in Wasser inkubiert, zeigte sich kein Abbau über 72 h (Abb. 30C,D). Die Enzym-Spezifität für L-AS wurde am Beispiel des Enzyms Proteinase K getestet und führte zum starken Abbau von C5C2 aber nicht von D-AS-C5C2 (Abb. 30A, letzte Bande).

Die Ergebnisse belegen, dass das D-AS-Peptid proteolytisch stabiler als das L-AS-Äquivalent war, was sich in einer längeren Plasmahalbwertzeit äußerte.

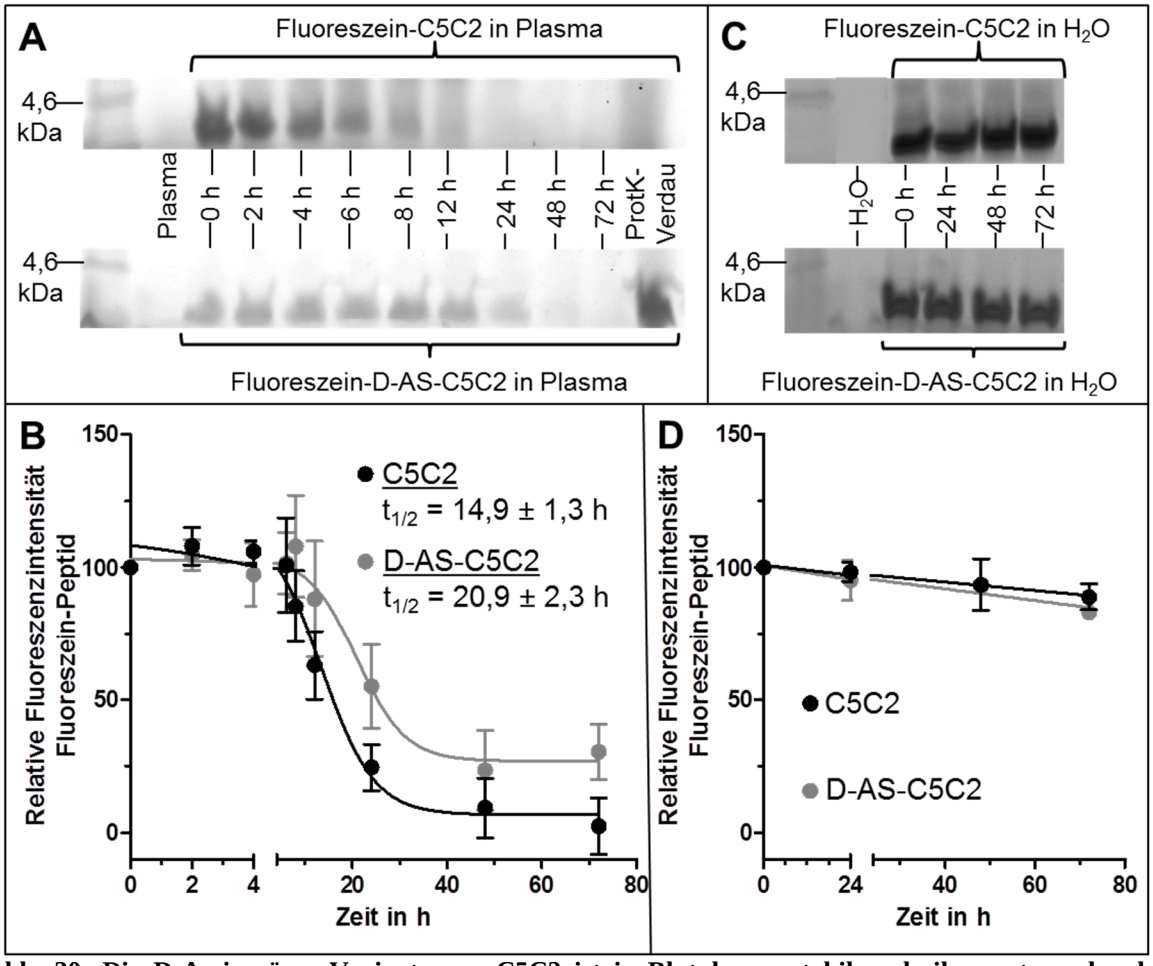


Abb. 30: Die D-Aminosäure-Variante von C5C2 ist in Blutplasma stabiler als ihre entsprechende L-Aminosäure-Variante. C5C2 und D-AS-C5C2 (jeweils N-terminal mit Fluoreszein markiert, 10 µM) wurden über 72 h in **(A,B)** Blutplasma (Maus) oder **(C,D)** Wasser inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, gelelektrophoretisch (Tric-Tricin-Natriumdodecylsulfat-Gel) aufgetrennt und die Fluoreszein-Signale quantifiziert. **(A,C)** Fluoreszein-markierte Peptidbanden detektiert nach Gelelektrophorese. Markerbande 4,6 kDa, Peptid 3,4 kDa. ProtK, Proteinase K: Inkubation der Peptide (10 µM) für 1 h mit 3 U/ml. **(B)** Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensität zum Ausgangswert (0 h). Mittelwert±SD, n≥4; Berechnung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$): Dosis-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung. **(D)** Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensität zum Ausgangswert (0 h). Mittelwert±SD, n≥2; nicht-lineare Kurvenanpassung.

3.9 Strukturanalyse der Claudin-5-Peptidomimetika

Eine experimentelle Strukturanalyse mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde durchgeführt, um die Art und das Ausmaß der Peptid-Sekundärstrukturneigungen abschätzen zu können. Zur *in-silico*-Untersuchung möglicher Wechselwirkungen zwischen Claudin-5-Peptiden und dem Zielprotein Claudin-5 wurden 3D-Strukturmodelle angefertigt.

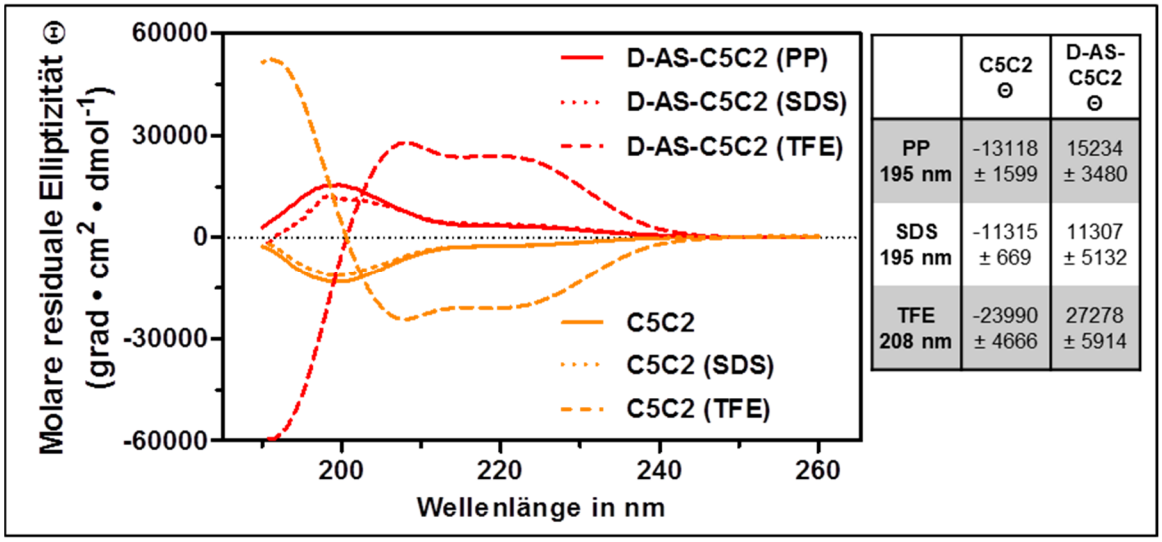
3.9.1 Sekundärstrukturanalyse der Claudin-5-Peptide

Zur Strukturanalyse mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurden die Claudin-5-Peptide (50 µM) in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2) gelöst, um den Anteil der Sekundärstrukturelemente α-Helix, β-Faltblatt oder β-Schleife zu untersuchen. Der verbliebende Anteil galt als ungeordnet. Durch die Zugabe des Tensids SDS unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (9-10 mM, Niraula et al., 2014) sollte eine mögliche Induktion von β-Faltblattstrukturen überprüft werden (Zhong und Johnson, 1992). Oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration kann SDS zur Induktion und Stabilisierung von α-Helices führen (Gopal et al., 2012). TFE weist die Eigenschaft auf, eine Induktion von α-Helices zu begünstigen (Buck, 1998).

Da sowohl Peptide aus L- als auch aus D-Aminosäuren synthetisiert wurden, sollte zunächst untersucht werden, inwieweit die Art der Aminosäuren die Struktur ändert. Dabei war das Spektrum von C5C2 verglichen zu D-AS-C5C2 spiegelverkehrt (Abb. 31). Die Tabelle in Abb. 31 zeigt zudem charakteristische Elliptizitäts-Extremwerte (195 nm für β-Faltblatt, 208 nm für α-Helix) bei verschiedenen Pufferbedingungen. Nach Spiegelung der D-AS-Variante unterschieden sich die Werte zwischen L- und D-Peptid nicht signifikant. Auch für das C5C2-Derivat C5C2/shifted war das Spektrum der D-Aminosäure-Variante im Vergleich zur jeweiligen L-Aminosäure-Variante ähnlich aber spiegelverkehrt (Anhang 14). Beim Vergleich von C5C2[S22N] mit seiner D-Aminosäure-Variante ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied unter den verschiedenen Pufferbedingungen (Anhang 14) und könnte den Wirkunterschied erklären (L-AS-C5C2[S22N] > D-AS-C5C2[S22N]).

Anschließend wurden die Spektren der verschiedenen L-Aminosäure-Varianten in Phosphatpuffer mit und ohne Zusatz von SDS oder TFE gemessen. In Phosphatpuffer waren Spektren der Peptide C5C2, C5C2[S22N], C5C2/shifted, C5C2/N+5AS und C5C2/C-4AS vergleichbar. Dementsprechend unterschied sich die molare residuale Elliptizität (Θ) statistisch nicht signifikant bei charakteristischen Elliptizitäts-Extremwerten (195 und 217 nm für β-Faltblatt, 192, 208 und 222 nm für α-Helix, Abb. 32, oben). Der Zusatz der β-Faltblatt-begünstigenden Substanz SDS führte bei den beiden N-terminal-verlängerten Peptiden C5C2/shifted und C5C2/N+5AS zur signifikanten Verschiebung des Spektrums in Bereiche, die für eine erhöhte

α-Helix-Neigung spezifisch sind (Doppelminimum bei 208 und 222 nm, Abb. 32, Mitte). Die SDS-Konzentration lag mit 0,5 mM unter der kritischen Mizellenkonzentration, bei der β-Faltblattstrukturen begünstigt werden (Zhong und Johnson, 1992), aber auch zur Ausbildung von α-Helices führen können (Biswas und Das, 2004; Campagna et al., 1998). Bei allen Peptiden wurde eine starke α-helikale Sekundärstrukturneigung durch TFE begünstigt, die sich untereinander bei repräsentativen Wellenlängen nicht unterschied (Abb. 32, unten).

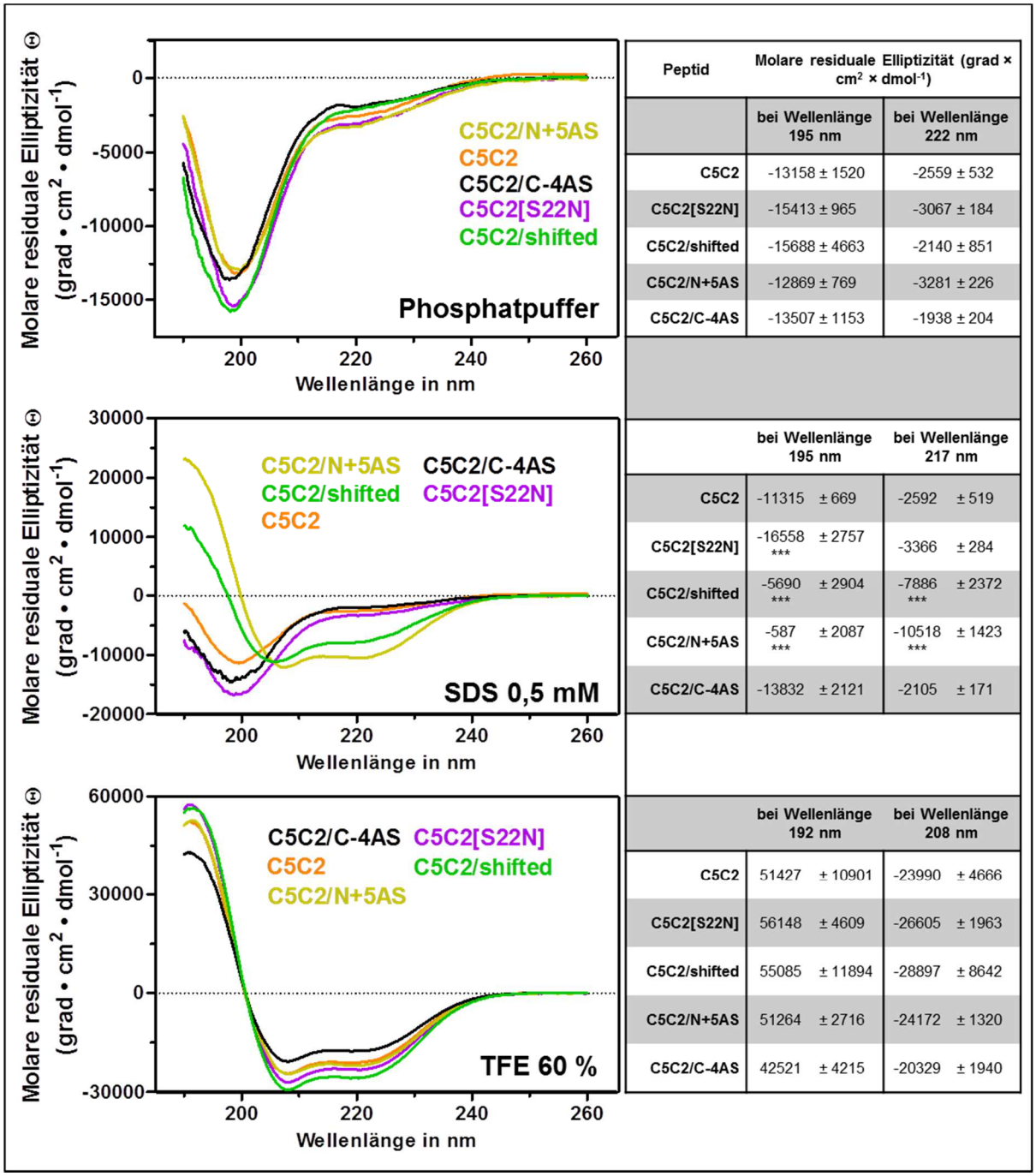


	C5C2 Θ	D-AS-C5C2 Θ
PP 195 nm	-13118 ± 1599	15234 ± 3480
SDS 195 nm	-11315 ± 669	11307 ± 5132
TFE 208 nm	-23990 ± 4666	27278 ± 5914

Abb. 31: Die Strukturen von C5C2 und deren D-Aminosäure-Variante sind enantiomer. Messung und Berechnung der molaren residualen Elliptizität (Θ) der Peptide (50 µM) mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,2), in PP mit 0,5 mM SDS (Natriumdodecylsulfat, β-Faltblatt-Begünstigung) oder in PP mit 60 % Trifluorethanol (TFE, *α*-Helix-Begünstigung); 8 Akkumulationen. Tabelle zeigt Θ bei charakteristischen Elliptizitäts-Extremwerten (195 nm für β-Faltblatt, 208 nm für α-Helix), n≥7, Mittelwert±SD, Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p≥0,05, C5C2 relativ zu D-AS-C5C2.

Nach der Bestimmung der Spektren wurde mittels Referenzspektren der Anteil der Sekundärstrukturelemente berechnet (Yang et al., 1986). In Phosphatpuffer bildeten die Claudin-5-Peptide keine α-Helix, zeigten aber überwiegend eine β-Faltblatt-Neigung (31-49 %, Abb. 33), eine geringe β-Schleifen-Neigung (9-19 %) und 43-54 % ungeordnete Elemente (Anhang 15). Dabei unterschieden sich die Peptide nicht signifikant von C5C2. Bei den N-terminal-verlängerten Peptiden führte SDS bei unveränderten β-Faltblattanteilen zu einer signifikant erhöhten α-Helixneigung im Vergleich zu C5C2 (von 0 % auf 15 % bei C5C2/shifted; auf 16 % bei D-AS-C5C2/shifted; auf 29 % bei C5C2/N+5AS). Die Zugabe von TFE bedingte bei allen Claudin-5-Peptiden die Ausbildung einer α-Helix-Struktur (59 bis 72 %) und einer Reduktion der β-Faltblattelemente auf 0-11 %, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Peptiden gab (Abb. 33). Eine ausführliche Darstellung aller Sekundärstruktur-Neigungen ist in der Tabelle in Anhang 15 zusammengefasst.

Strukturell wurde für die Claudin-5-Peptide sowohl eine Neigung zur Ausbildung von α-Helix- als auch β-Faltblattelementen nachgewiesen. Des Weiteren lagen D- und L-AS-Peptide mit gleicher Aminosäuresequenz überwiegend enantiomer vor.



Peptid	Molare residuale Elliptizität (grad × cm² × dmol⁻¹) bei Wellenlänge 195 nm	bei Wellenlänge 222 nm
C5C2	-13158 ± 1520	-2559 ± 532
C5C2[S22N]	-15413 ± 965	-3067 ± 184
C5C2/shifted	-15688 ± 4663	-2140 ± 851
C5C2/N+5AS	-12869 ± 769	-3281 ± 226
C5C2/C-4AS	-13507 ± 1153	-1938 ± 204

	bei Wellenlänge 195 nm	bei Wellenlänge 217 nm
C5C2	-11315 ± 669	-2592 ± 519
C5C2[S22N]	-16558 *** ± 2757	-3366 ± 284
C5C2/shifted	-5690 *** ± 2904	-7886 *** ± 2372
C5C2/N+5AS	-587 *** ± 2087	-10518 *** ± 1423
C5C2/C-4AS	-13832 ± 2121	-2105 ± 171

	bei Wellenlänge 192 nm	bei Wellenlänge 208 nm
C5C2	51427 ± 10901	-23990 ± 4666
C5C2[S22N]	56148 ± 4609	-26605 ± 1963
C5C2/shifted	55085 ± 11894	-28897 ± 8642
C5C2/N+5AS	51264 ± 2716	-24172 ± 1320
C5C2/C-4AS	42521 ± 4215	-20329 ± 1940

Abb. 32: Claudin-5-Peptide zeigen überwiegend vergleichbare Zirkulardichroismus-Spektren. Messung und Berechnung der molaren residualen Elliptizität (Θ) der Peptide (50 µM) mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,2), in PP mit 0,5 mM SDS (Natriumdodecylsulfat, β-Faltblatt-Begünstigung) oder in PP mit 60 % Trifluorethanol (TFE, α-Helix-Begünstigung); n≥8 Akkumulationen. Tabellen zeigen Θ bei charakteristischen Elliptizitäts-Extremwerten (195 und 217 nm für β-Faltblatt, 192, 208 und 222 nm für α-Helix), n≥4, Mittelwert±SD, Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; ***, p<0,001 relativ zu C5C2. Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)), C5C2/C-4AS (C-terminal verkürzt (4 AS)).

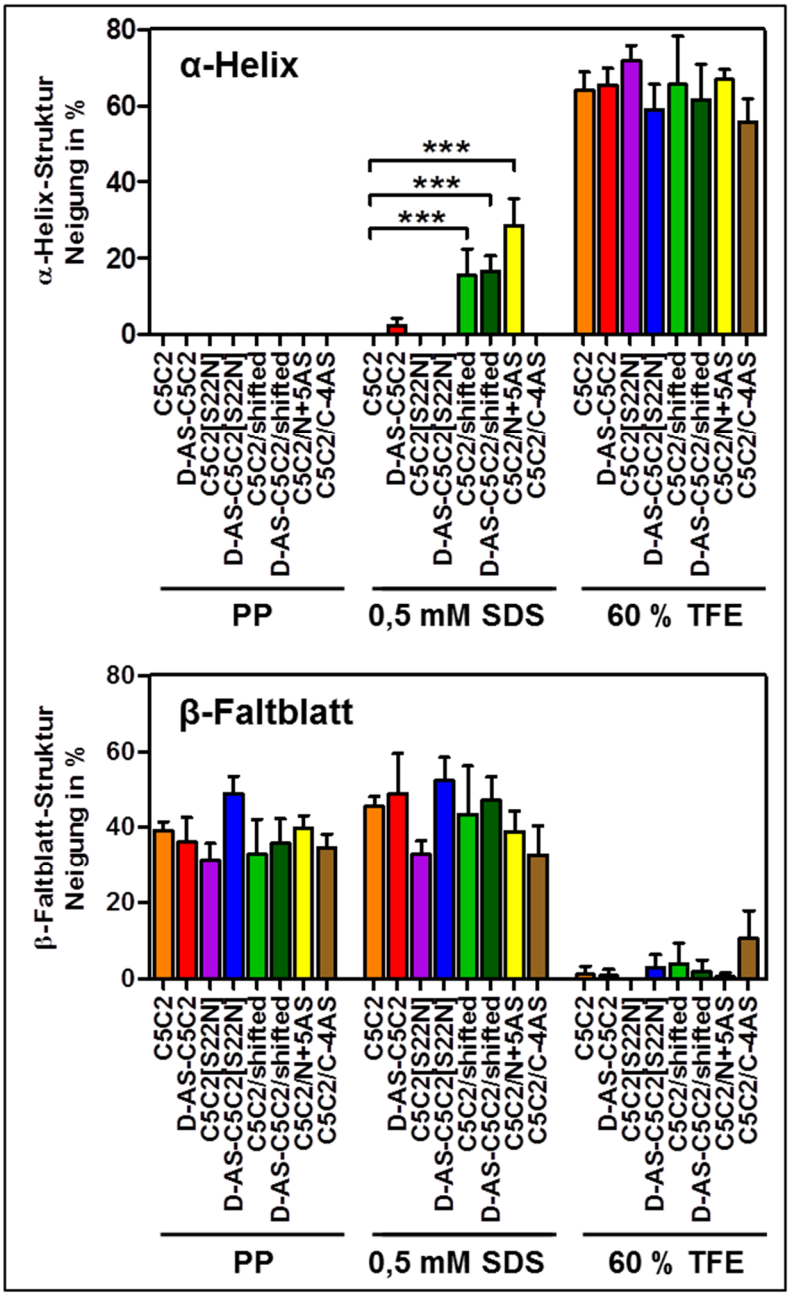
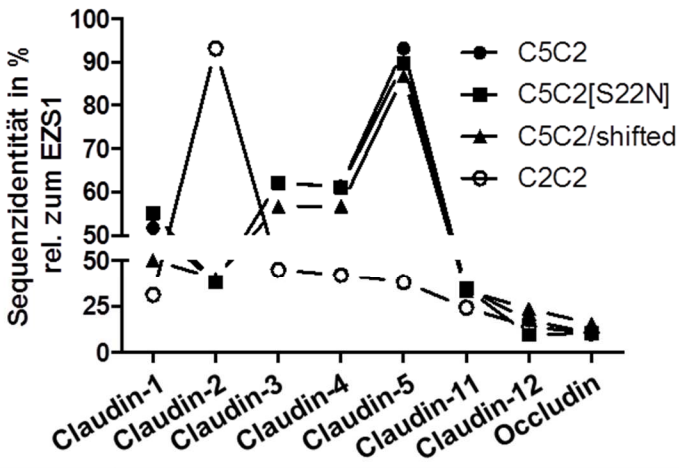


Abb. 33: Starke Neigung zur Ausbildung von β-Faltblatt- und α-Helixelementen durch Claudin-5-Peptide. Strukturelle Neigung zur α-Helix- und β-Faltblatt-Ausbildung von Claudin-5-Peptiden (50 µM) bestimmt mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,2), in PP mit 0,5 mM SDS (Natrium-dodecylsulfat, *β*-Faltblatt-Begünstigung) oder in PP mit 60 % Trifluorethanol (TFE, *α*-Helix-Begünstigung) und Berechnung des Anteils der Sekundärstrukturelemente mittels Referenzspektren (Yang et al., 1986). n≥8 Akkumulationen. n≥4, Mittelwert±SD, Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; ***, p<0,001 relativ zu C5C2. Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)), C5C2/C-4AS (C-terminal verkürzt (4 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

3.9.2 Hohe Sequenzidentität von Claudin-5-Peptiden mit der ersten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Die verwendeten Peptide stammen aus der ESZ1 von Claudin-5. Substitutions-, Additions- und Deletionsvarianten von C5C2 wiesen Unterschiede in der permeabilisierenden Wirkung

auf. Ein Vergleich der Peptidsequenzen mit *Tight-Junction*-Proteinen sollte daher Aufschluss über bevorzugte Bindungspartner geben. Sequenzalignments wiesen eine hohe Sequenzidentität der murinen Peptide C5C2, C5C2[S22N] und C5C2/shifted zum entsprechenden Teil der murinen EZS1 von Claudin-5 auf (86,7 bis 93,1 %; Abb. 34). Auch wurde eine hohe Identität für die murine Additionsvariante C5C2/N+5AS mit muriner Claudin-5-ESZ1 (91,1 %) und murines C5C2 mit humaner ESZ1 (86,2 %) errechnet (Anhang 16). Eine geringere Identität wurde für die genannten Peptide verglichen mit murinem Claudin-1 (50,0 bis 55,2 %), -3 und -4 (56,7 bis 61,8 %) nachgewiesen. Mit Claudin-2, -11, -12 und Occludin bestand nur eine Identität unter 35 % (Abb. 34). Das Kontrollpeptid C2C2 hatte ebenso eine geringe Identität zu den getesteten Claudin- und Occludin-Bereichen außer zu Claudin-2 (Abb. 34). Die Claudin-ESZ2 waren mit den Claudin-5-Peptiden und dem Kontrollpeptid C2C2 wenig identisch (2,3-24,1 %).



Peptide	Identität	Sequenz
mClaudin-5 EZS1 (29-81)		**MWQVTAFLDHNIVTAQTTWKGLWMSCVVQSTGHMQCKVYESVLALSAEVQAAR**
C5C2	93,1 %	|.||||||||.|||||||||||| _____SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR
C5C2[S22N]	89,7 %	|.||||||||.||||||||:||||||| _____SSVVQSTGHMQSKVYESVLALNAEVQAAR
C5C2/shifted	86,7 %	||||.|.||||||||.||||||||||||. _____KGLWQSSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAER----
C2C2	37,9 %	.....|||..|..:|.::|.|.|::|||: _____ESATHSTGITQSDIYSTLLGLPADIQAAQ

Abb. 34: Sequenzidentitäten von Claudin-Peptiden und der ersten extrazellulären Schleife (EZS1) von Claudinen und Occludin. Globales Alignment zwischen Aminosäuresequenz der Peptide und entsprechender Sequenz der EZS1 von Claudinen und Occludin mittels Needleman-Wunsch-Algorithmus (Rice et al., 2000). Prozentuale Sequenzidentität. Tabelle: Peptidalignment zur EZS1 von Claudin-5. **\|**, Identische Aminosäure; **:**, ähnliche Aminosäure (Aminosäuren der gleichen physikochemischen Gruppe); **.**, unähnliche Aminosäure; **_**, kein Alignment; m, murin; Kontrollpeptid C2C2, von Claudin-2 stammend; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4AS)).

Ein wichtiges Charakteristikum für eine spezifische Wirkung der Claudin-5-Peptide ist die sehr hohe Sequenzidentität zur entsprechenden Claudin-5-EZS1-Sequenz. Zu anderen Claudinen und Occludin wiesen diese nur eine geringe Identität auf.

3.9.3 Claudin-5-Peptide bilden β-Faltblatt- und α-Helixstrukturen

Ob die Peptide strukturell der 3D-Struktur von Claudin-5 ähneln, wurde anhand von Strukturmodellen *in silico* untersucht. Im Vergleich zur Strukturvorhersage beider ESZ von Claudin-5 basierend auf der Claudin-15-Kristallstruktur (Suzuki et al., 2014) hatte C5C2 eine Neigung von 34 % zur Ausbildung von α-Helices und 21 % von β-Strängen (Abb. 35A, Anhang 15). Damit ähnelte sich die Struktur des Peptids mit der entsprechenden Sequenz der ESZ2 von Claudin-5 im Hinblick auf die Ausbildung von zwei β-Strängen (blau) am N-Terminus und α-helikalen Strukturen (rot) am C-Terminus (Abb. 35A). Die Substitutionsvariante C5C2[S22N] und die Deletionsvariante C5C2/C-4AS bildeten weitestgehend ähnliche Strukturen verglichen mit C5C2, wobei durch die Verkürzung der C-terminale α-Helix-Anteil reduziert wurde (auf 12 %, Abb. 35B,D). C5C5/shifted wies eine Reduktion der C-terminalen α-Helix (auf 13 %) und eine Erhöhung der N-terminalen β-Faltblatt-Neigung (auf 40 %, Abb. 35C) auf. Da die N-terminale Additionsvariante C5C2/N+5AS ebenso durch eine Verlängerung der β-Stränge charakterisiert war (auf 41 %, Abb. 35E), scheint der N-Terminus der Peptide für die Ausbildung der β-Stränge relevant zu sein. D-Aminosäuren konnten mit den verwendeten Programmen nicht dargestellt werden, weswegen hierzu keine Strukturmodelle erstellt wurden.

Die Claudin-5-Peptid-Modelle bestehend aus zwei β-Strängen und einer C-terminalen α-Helix deuteten somit auf eine hohe Strukturähnlichkeit vergleichbar mit den entsprechenden Elementen von Claudin-5 hin.

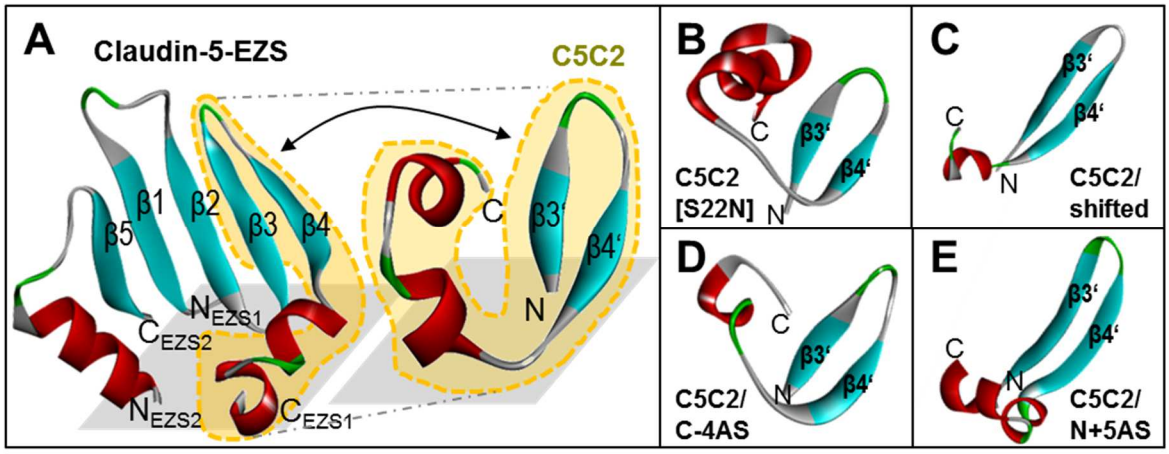


Abb. 35: Extrazelluläre Schleifen (EZS) in murinem Claudin-5 und Claudin-5-EZS1-Peptiden bilden β-Stränge und α-Helices. (A) Strukturvorhersage der Claudin-5-EZS (AS 29-81, 138-161) nach Vorlage der Claudin-15-Kristallstruktur (Suzuki et al., 2014, s. Anhang 17) und vorgeschlagene C5C2-Struktur ermittelt durch das Programm PEP-FOLD (Shen et al., 2014; Thevenet et al., 2012). Gelb, C5C2-Bereich; graue Fläche, äußere Oberfläche der Zellmembran. **(B-E)** Strukturmodelle der Claudin-5-Peptide C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/C-4AS (C-terminal verkürzt (4AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS). PEP-FOLD-Modelle. β-Stränge, blau; α-Helix, rot; β-Schleife, grün; ungeordnet, grau; N, C: N-/C-Terminus; β1-5, β-Stränge in EZS1/2 von Claudin-5; β3'and β4', β-Stränge der Claudin-5-Peptide.

3.9.4 Assoziation von Claudin-5-Peptidomimetika an extrazelluläre Schleifen von Claudin-5

Da für die Peptide eine Konformation, die der EZS1 von Claudin-5 ähnelte, vorhergesagt wurde, wurden Interaktionsmodelle mittels CABS-dock (Kurcinski et al., 2015) ermittelt (Abb. 36). Das Modell für C5C2 wies 10 Wasserstoffbrückenbindungen auf, die bei der Interaktion von C5C2 (Aminosäurereste markiert mit Apostroph (')) mit den murinen Claudin-5-EZS folgender Aminosäurereste gebildet wurden: S53'-S155, S53'-Q156, S54'-Q156, S58'-S58, E68'-S53, S69'-K48, S69'-Y158, S69'-Q156, S74'-E146 und E76'-S74. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren von C5C2 sind Teil der α-Helix (S74', E76'), der β-Faltblätter (S58') oder der unstrukturierten Regionen (S53', S54', S68', S69'). Auf der Seite des Claudin-5-Proteins sind beide EZS beteiligt (β3/5 und α-Helices, Abb. 36A). Bei gleichbleibender β-Faltblattneigung ist der α-helikale Anteil des Peptids C5C2 im Interaktionsmodell reduziert (14 %, Abb. 36A zu 34 % in Abb. 35A, s. auch Anhang 15).

Die Substitutionsvariante C5C2[S22N] ist charakterisiert durch einen Aminosäureaustausch des an der Interaktion beteiligten S74' zu N74'. Dadurch ergibt sich im Interaktionsmodell von C5C2[S22N] mit den Claudin-5-ESZ eine Interaktion von S74'-Q156, die mit 3,2 Å stärker als im C5C2-Interkationsmodell ist (3,7 Å, Jeffrey, 1997). Weitere 5 intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen waren: S54'-T46, V55'-K48, T59'-Q44, T59'-Q63 und H61'-T42. N74' (α-Helix), T59' (β-Stränge), S54' und V55' (ungeordnet) assoziierten mit den β-

Strängen beider EZS (β2/4/5). Bei gleicher β-Faltblattneigung war der α-helikale Anteil des Peptids C5C2[S22N] im Vergleich zur PEP-FOLD-Vorhersage im Interaktionsmodell halbiert (21 %, Abb. 36 zu 45 % in Abb. 35B, s. auch Anhang 15).

C5C2/shifted assoziierte aus dem β-Strangbereich mit Q52'-Q156, S53'-S53, S53'-Y67, aus dem β-Schleifenbereich mit S74'-E76 und aus dem ungeordneten Bereich mit W51'-Y158, Q57'-Q57, T59'-Q44 über insgesamt 7 Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden EZS von Claudin-5 (β2/3/5). Der Abstand von S74' mit E76 beträgt 3,3 Å und ist vergleichbar mit der Bindung von C5C2[S22N] über N74'-Q156 (Abb. 36C). Im Vergleich zum Peptidmodell ohne Assoziationsbestimmung (Abb. 35C) blieb der Anteil der Sekundärstrukturelemente bei Interaktion unverändert (Abb. 36C).

Eine Verkürzung von C5C2 um 4 Aminosäuren am C-Terminus zeigte im Strukturmodell Sekundärstrukturen vergleichbar zu den anderen Peptiden (Abb. 35D, Anhang 15). Im Interaktionsmodell lag das Peptid jedoch überwiegend ungeordnet vor (92 %). Eine mögliche Interaktion mit Claudin-5 konnte nur für 3 Aminosäurepaare T59'-Y33, Q57'-Q156 und S54'-S155 gefunden werden (Abb. 36D). Da das verwendete Programm keine Interaktion für Peptide mit mehr als 30 Aminosäuren berechnet, ist für C5C2/N+5AS kein Interaktionsmodell dargestellt.

Anhand der Interaktionsmodelle war die Peptidassoziation über Wasserstoffbrückenbindungen bevorzugt mit den β-Strängen der EZS von Claudin-5 vermittelt. Dabei spielte sowohl die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen als auch die Art der beteiligten Aminosäurereste eine Rolle. Der C-Terminus der Peptide hatte vorwiegend strukturelle Bedeutung und war nur zu geringen Teilen an der Assoziation beteiligt.

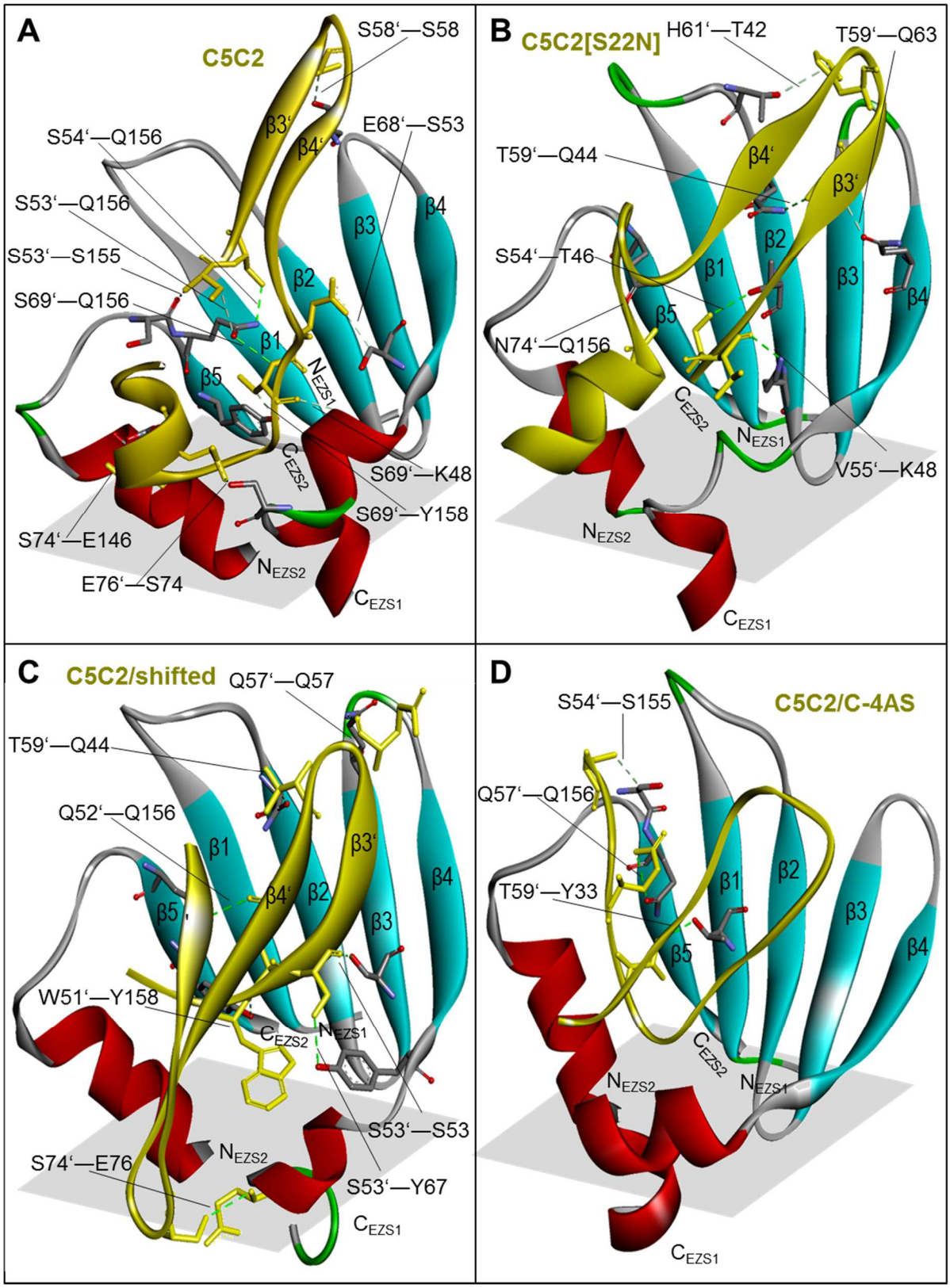


Abb. 36: Protein-Peptid-Interaktionsmodelle der extrazellulären Schleifen (EZS) von murinem Claudin-5 mit murinen Claudin-5-Peptiden (gelb). (A) C5C2, **(B)** C5C2[S22N] (S substituiert mit N), **(C)** C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), **(D)** C5C2/C-4AS (C-terminal verkürzt (4 AS)). Interaktionsmodell erstellt mittels CABS-dock (Kurcinski et al., 2015) zwischen den Claudin-5-EZS (AS 29-81, 138-161) unter Verwendung der Claudin-15-Kristallstruktur (Suzuki et al., 2014) und Peptidstrukturen vorhergesagt mit PSIPRED als Vorlage (s. Anhang 15, Buchan et al., 2013). Graue Fläche, äußere Oberfläche der Zellmembran. β-Stränge, blau; α-Helix, rot; β-Schleife, grün, ungeordnet, grau; N, C: N-/C-Terminus; β1-5, β-Stränge von Claudin-5; β3'and β4', β-Stränge der Peptide. Grün-gestrichelte Linien, Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäure-Resten der Peptide (AS') und Claudin-5 (AS).

3.10 Charakterisierung von Claudin-12-defizienten Mäusen

Neben Claudin-5 ist Claudin-12 ein weiteres Claudin, welches in Endothelzellen der Gehirnkapillaren nachgewiesen wurde (s. Abb. 27). Sowohl ein Claudin-5-Knockout (Nitta et al., 2003) als auch eine Claudin-5-Modulation durch Peptide (Abb. 21, Abb. 23) hatte keine Beeinflussung von Claudin-12 in Lokalisation und Expression zur Folge. Daher sollte untersucht werden, inwieweit Claudin-12 an der BHS-Abdichtung beteiligt ist und eventuell als Zielprotein zur Modulation eine Rolle spielt. Da ein Knockout von Claudin-5 zur Permeabilität von Molekülen bis 800 Da führte, wäre es denkbar, dass ein Claudin-12-Knockout ebenso eine erhöhte Durchlässigkeit für kleine oder auch große Moleküle bedingen könnte (Nitta et al., 2003).

Neben einer Expression von Claudin-12 im Gehirnendothel wurde es bereits in anderen Organepithelien bzw. –endothelien beschrieben (z.B. Darmepithel; Fujita et al., 2006). In Enterozyten spielt Claudin-12 eine Rolle bei der Vitamin-D-abhängigen Ca^{2+}-Absorption (Christakos et al., 2010; Fujita et al., 2008). Jedoch ist dessen genaue Funktion im Einzelnen noch unklar. Daher werden in diesem Kapitel Untersuchungen an Claudin-12-Knockout-Mäusen zusammengefasst, die die Expression von Claudin-12 in verschiedenen Geweben und dessen Bedeutung in Gehirn, Herz und Gastrointestinaltrakt darstellen sollen.

3.10.1 Claudin-12-Knockout beeinflusst nicht die Barriere der Blut-Hirn-Schranke

In Abb. 27 wurde bereits gezeigt, dass Claudin-12, eines der *Tight-Junction*-Proteine der BHS (Nitta et al., 2003), in isolierten Gehirnkapillaren exprimiert ist. Im Vergleich zum Wildtyp unterschied sich im Claudin-12-Knockout die mRNA-Expression von Claudin-1, -3, -5 und Occludin nicht (Abb. 37A).

Da im Knockout kein Claudin-12 exprimiert wurde, sollte dessen Einfluss auf die BHS charakterisiert werden. Ausgehend von den durchgeführten Untersuchungen wurde im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Permeabilität für kleine (Na-Fluoreszein, 376 Da) und große (albumingebundenes Evans Blue, 68 kDa) Moleküle im Mausgehirn nachgewiesen. Ebenso war die Permeabilität in Leber oder Niere unverändert (Abb. 37B).

Daraus ließ sich schließen, dass sowohl die *Tight-Junction*-Expression als auch die Barrierefunktion der BHS durch einen Claudin-12-Knockout unbeeinflusst ist.

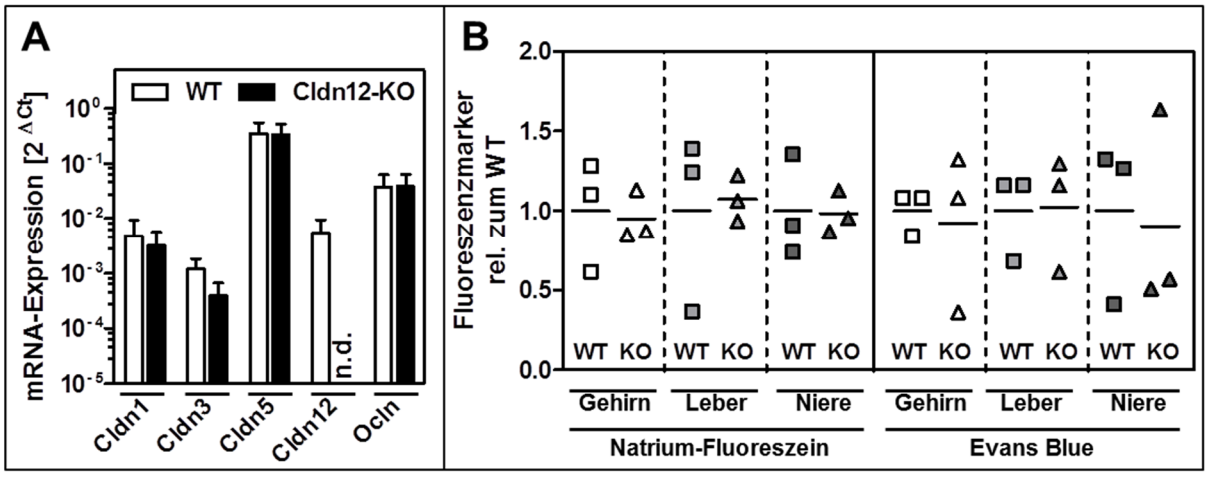


Abb. 37: Claudin-12-Defizienz hat keinen Einfluss auf die *Tight-Junction*-Expression in isolierten Gehirnkapillaren sowie die Permeabilität von Na-Fluoreszein (376 Da) und Evans Blue (albumingebunden, 68 kDa) in Gehirn, Leber und Niere. (A) mRNA-Expression von Claudin (Cldn)-1, -3, -5, -12 und Occludin (Ocln) in Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) C57BL/6-Mäusen (20-35 Wochen alt) normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct=Ct_{\beta\text{-Aktin}}-Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. n≥4, Mittelwert±SD. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p>0,05. n.d., nicht detektiert. **(B)** Aufnahme von Na-Fluoreszein (0,5 mol/kg) bzw. Evans Blue (0,26 mol/kg) 10 min nach i.v.-Injektion. Claudin-12-Knockout (KO) relativ zum Wildtyp (WT). C57BL/6-Mäuse 14-21 Wochen alt. n=3. Streudiagramm mit Mittelwert (schwarze Linie). Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p≥0,05 relativ zum WT.

3.10.2 Expression und Lokalisation myokardialer *Tight-Junction*-Proteine nach Claudin-12-Knockout

Da ein Claudin-12-Knockout keinen Einfluss auf die BHS hatte, stellte sich die Frage nach der generellen Funktion von Claudin-12. Dazu wurden Untersuchungen im Institut Clinique de la Souris (Illkirch, FR) nach internationalen und standardisierten Phänotypisierungsprotokollen durchgeführt. Dabei ergab sich, dass Claudin-12-Knockout-Männchen (11 Wochen alt) eine gute allgemeine Gesundheit und normale Organfunktionen aufwiesen. Jedoch war die Herzfunktion beeinträchtigt, welches sich in Bradykardie und proarrythmogenen Symptomen äußerte (Meziane et al., 2015). Bei entsprechenden weiblichen Mäusen (16 Wochen alt) zeigte sich eine hyperdyname Kreislaufstörung charakterisiert von erhöhter myokardialer Kontraktilität und Tachykardie. Zusammen mit einem verringerten links-ventrikulären Volumen deutete letzteres auf eine Hypovolämie hin (Bouabout und Monassier, 2016). Daher sollte das Myokard ohne und mit Claudin-12-Knockout im Hinblick auf die Bedeutung von Claudinen, TAMP und ZO-1 näher untersucht werden.

3.10.2.1 Hohe Expression von Claudin-5, -12, -15, -25 und Zonula occludens Protein-1 im Myokard

Da die Anwesenheit von Claudin-12 für die Funktion des Myokards eine wichtige Rolle zu spielen schien (Bouabout und Monassier, 2016; Meziane et al., 2015), sollte zunächst geklärt werden, ob Claudin-12 unter Normalbedingungen (Wildtyp) quantitativ eine Bedeutung hat. Verglichen wurde sowohl mit allen bis dato bekannten Mitgliedern der Claudin- und TAMP-Familie (Mineta et al., 2011; Raleigh et al., 2010) als auch mit ZO-1. Claudin-13 kommt in murinen Geweben nicht vor (Günzel und Yu, 2013) und wurde daher nicht getestet.

Claudin-12 war eines der vier stark exprimierten Claudine im Mausmyokard: Claudin-25 ($(3{,}3\pm0{,}6)\times10^{-2}$) > Claudin-5 ($(3{,}1\pm1{,}0)\times10^{-2}$) > Claudin-12 ($(1{,}4\pm0{,}6)\times10^{-2}$) > Claudin-15 ($(0{,}7\pm0{,}3)\times10^{-2}$) bezogen auf β-Aktin. Auch ZO-1 war sehr hoch exprimiert ($(3{,}9\pm1{,}1)\times10^{-2}$). Eine geringere Expression (10- bis 1000-fach geringer) wurde für die Claudine 22> 10> 1> 24> 3> 20> 11> 23> 7> 9> 4> 2> 14> 17 und die TAMP Occludin und Tricellulin bestimmt. Eine sehr schwache Expression (unter dem Schwellenwert $2^{\Delta Ct}<10^{-5}$) wurde für die Claudine-13>6>8>19>27>16=18=26 und MarvelD3 nachgewiesen (Abb. 38). Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Myokardproben untersucht, wobei sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Expressionsniveau ergaben (Anhang 18).

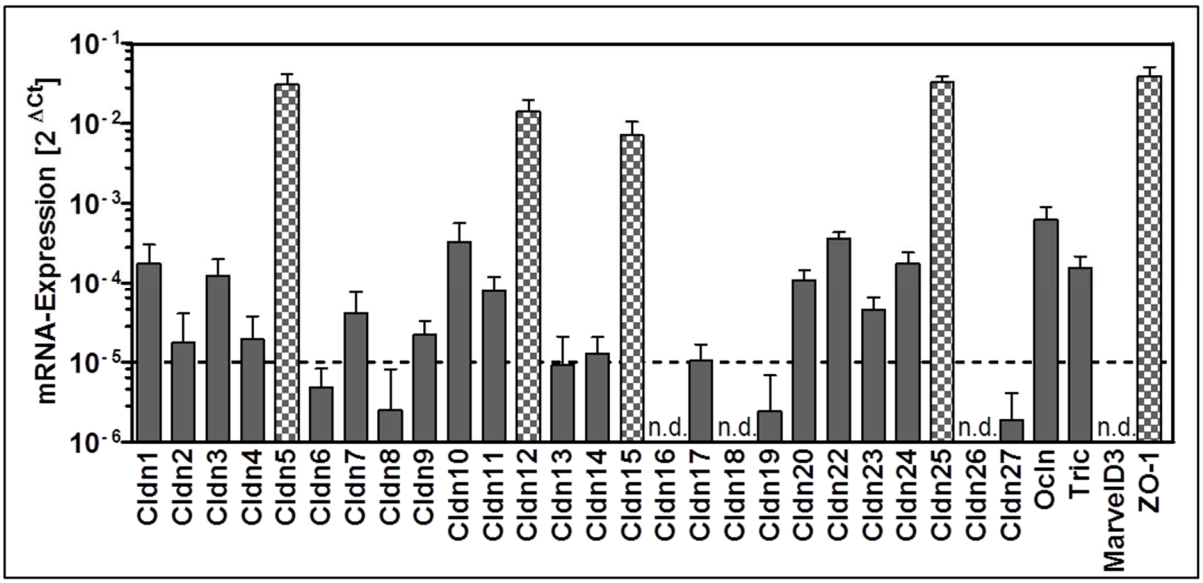


Abb. 38: Claudin-Expressionsprofil im Myokard von C57BL/6-Mäusen zeigt eine hohe Expression von Claudin-5, -12, -15, -25 und ZO-1. mRNA-Expression von Claudin (Cldn)-1 bis -27, Occludin (Ocln), Tricellulin (Tric), MarvelD3 und *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) im Herzapex (ohne Ventrikelendokard und Septumgewebe) normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct=Ct_{\beta\text{-Aktin}}-Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. C57BL/6-Mäuse: männlich/weiblich, Alter 15-28 Wochen. n≥16, Mittelwert±SD. Karierte Säulen, erhöhte Expression; gestrichelte Linie, Schwellenwert $2^{\Delta Ct}=10^{-5}$: schwache Expression $2^{\Delta Ct}<10^{-5}$. n.d., nicht detektiert.

Immunfluoreszenzfärbungen gaben Aufschluss darüber, wo Claudine im Myokard lokalisiert sind. Die Färbung gegen F-Aktin galt als Orientierung für das Zytoskelett der Kardiomyozyten als auch für die Glanzstreifen, welche die Zellen miteinander verbinden. Dort kolokalisierte F-Aktin mit Desmoplakin, einem desmosomalen Protein, welches in den Glanzstreifen vorkommt (Abb. 39, Pfeilköpfe; Angst et al., 1997; Gutstein et al., 2003). Claudin-1, Claudin-12 und Occludin kamen in der lateralen Membran der Kardiomyozyten (Abb. 39, Pfeile) und Claudin-11 überwiegend in den Glanzstreifen vor (Abb. 39, Pfeilköpfe). Claudin-5 kam sowohl in der lateralen Membran als auch den Glanzstreifen vor und kolokalisierte dort mit ZO-1 (Abb. 39, Pfeile und Pfeilköpfe). Claudin-3 wurde ausschließlich in den Blutgefäßen des Myokards exprimiert (Abb. 39, Stern), in denen auch andere Claudine detektiert wurden (z.B. Claudin-5, -11, -12, Anhang 19, Pfeile).

Anschließend wurde bestimmt, inwieweit sich die Expression der *Tight-Junction*-Proteine und ZO-1 bei Claudin-12-Knockout im Myokard veränderte. Dabei wurden nur Proteine berücksichtigt, die in ihrer Expression über dem Schwellenwert ($2^{\Delta Ct}$) von 10^{-5} lagen. Unterhalb dieses Wertes war mit dem verwendeten qRT-PCR-Protokoll keine reproduzierbare Detektion möglich.

Claudin-12 war im Knockout nicht zu detektieren. Im Vergleich zum Wildtyp wurde kein Einfluss auf die Expression von Claudinen, TAMP oder ZO-1 festgestellt (Abb. 40). Beides wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt (Anhang 20). Die *Tight-Junction*-Struktur der myokardialen Endothelzellen war auf elektronenmikroskopischer Ebene durch einen Claudin-12-Knockout ebenfalls nicht beeinflusst (Anhang 21).

Im Herzen waren die Claudine-5, -12, -15, -25 und ZO-1 sehr hoch exprimiert, wobei eine Claudin-12-Defizienz weder die mRNA-Expression noch die Lokalisation dieser Proteine, anderer Claudine oder TAMP beeinflusste.

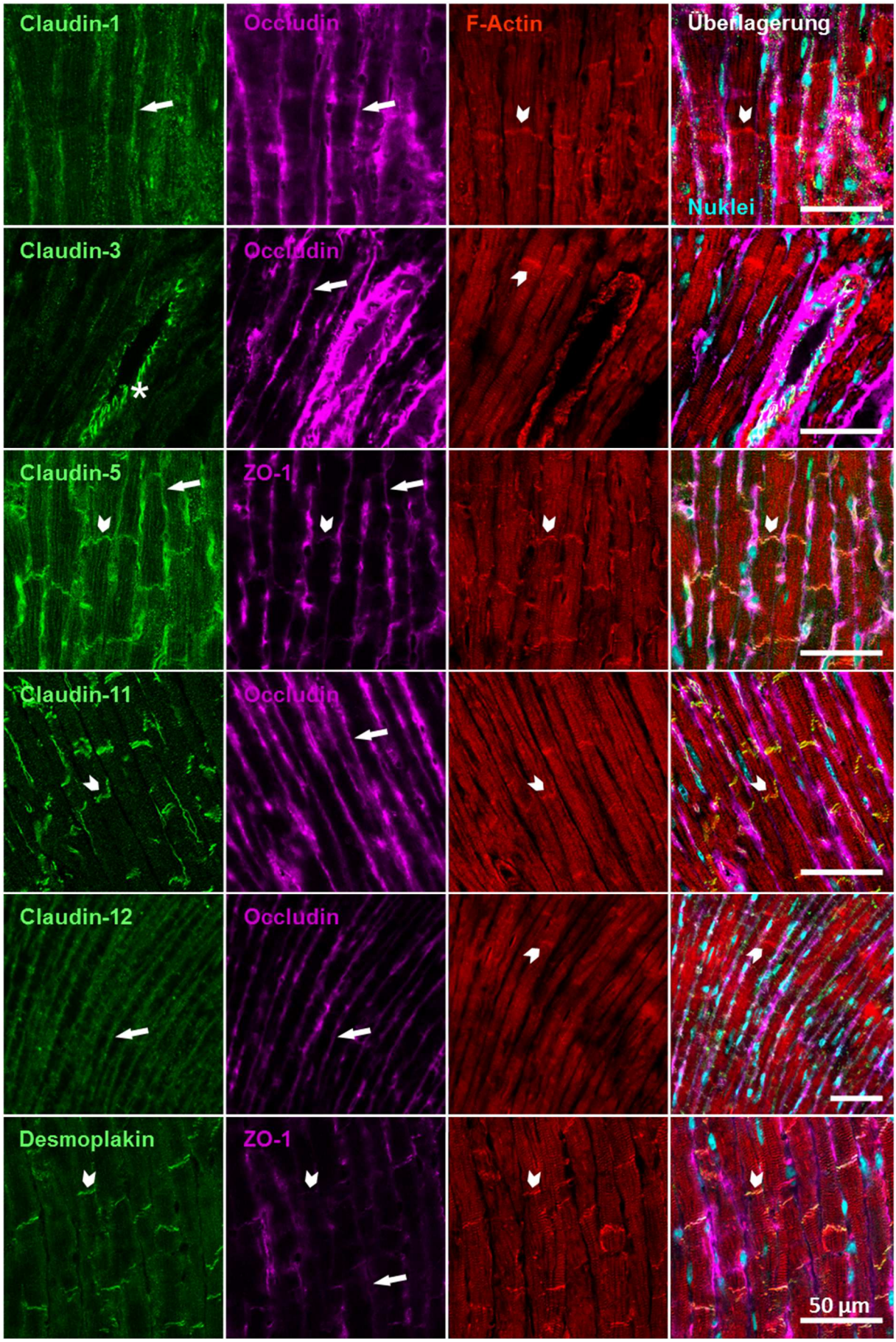


Abb. 39: Differenzielle Lokalisation von Zell-Zell-Kontaktproteinen im Myokard von C57BL/6-Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung des linksventrikulären Myokards. Alter der Mäuse: 15-28 Wochen. Laterale Lokalisation, Pfeile; Glanzstreifen, Pfeilköpfe; Blutgefäß, Stern. ZO-1, *Zonula Occludens* Protein-1.

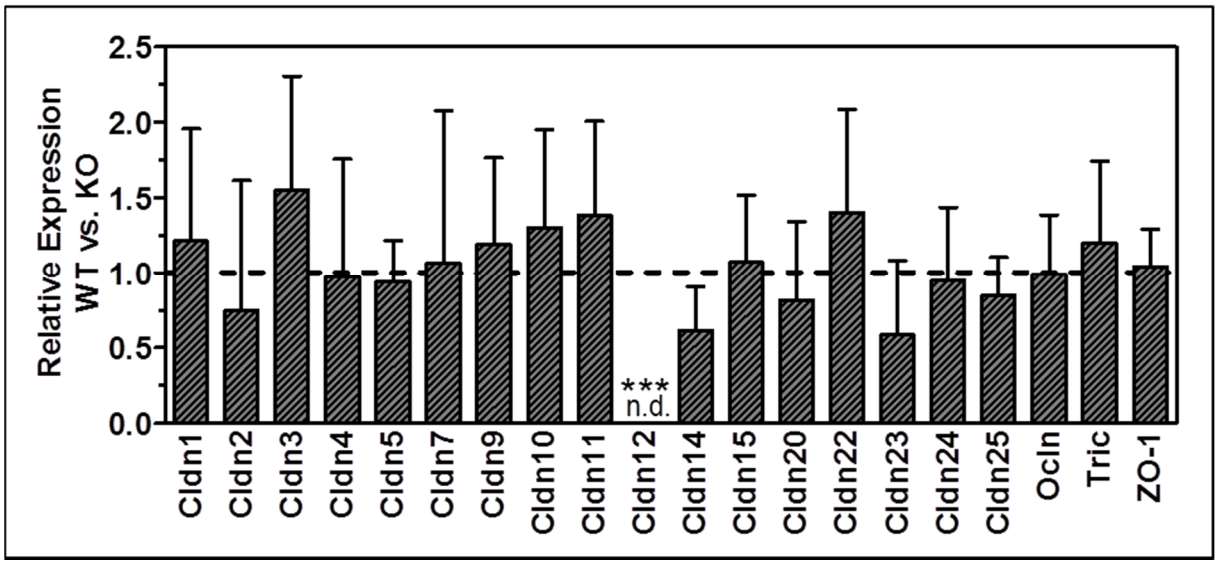


Abb. 40: Claudin-12-Knockout hat keinen Einfluss auf die Expression von Claudinen, *Tight-Junction*-assoziierten MARVEL-Proteinen und *Zonula occludens* Protein-1 im Mausmyokard. Relative mRNA-Expression von Claudinen (Cldn), Occludin (Ocln), Tricellulin (Tric) und *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) im Herzapex (ohne Ventrikelendokard und Septumgewebe) von Claudin-12-defizienten (KO) C57BL/6-Mäusen relativ zum Wildtyp (WT). Mäuse: männlich/weiblich, Alter 15-28 Wochen. n≥16, Mittelwert±SD. Gestrichelte Linie, Mittelwert der Expression im Wildtyp. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p≥0,05; ***, p<0,001 relativ zum WT. n.d., nicht detektiert.

3.10.2.2 Kolokalisation von *Gap-Junction*- und *Tight-Junction*-Proteinen in myokardialen Glanzstreifen

In dieser Arbeit wurde die Expression und Lokalisation von *Tight-Junction*-Proteinen in den Glanzstreifen des Myokards nachgewiesen. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ist erwiesen, dass die Verbindung der Kardiomyozyten mittels Glanzstreifen über *Gap Junctions*, *Adherens Junctions* und Desmosomen vermittelt ist (Severs et al., 1993; Sommer und Johnson, 1970). Diese Zell-Zell-Kontakte wurden ebenfalls in Claudin-12-defizientem Myokard nachgewiesen und unterschieden sich strukturell nicht vom Wildtypmyokard (Abb. 41). Die *Gap Junctions*, die eine typische fünfschichtige Struktur aufwiesen (Anhang 22, drei elektronendichte und zwei weniger elektronendichte Schichten; Karrer, 1960), wurden darüber hinaus mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Das in den *Gap Junctions* prominente Connexin-43 (Duffy et al., 2006) kolokalisiert sowohl in WT- als auch Claudin-12-defizienten Mäusen mit Claudin-5 und zeigte keine veränderte Expression nach Knockout (Abb. 42, Pfeile).

Anhand der Untersuchungen wurde kein Einfluss eines Claudin-12-Knockouts auf Zell-Zell-Kontakte in myokardialen Glanzstreifen beobachtet.

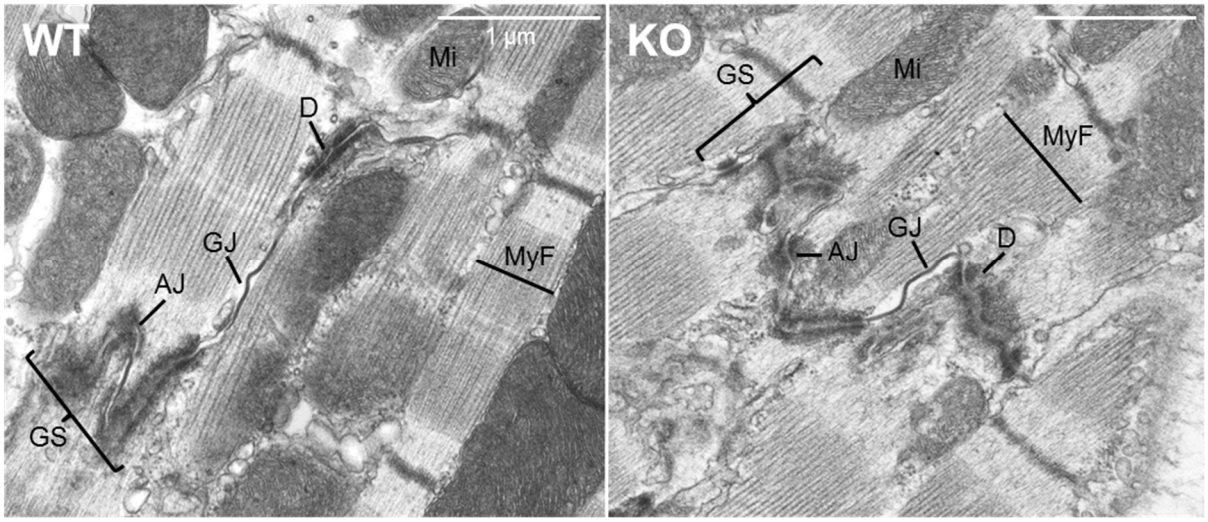


Abb. 41: Zell-Zell-Kontakte der myokardialen Glanzstreifen zeigen nach Claudin-12-Knockout keine strukturellen Veränderungen. Transmissionselektronenmikroskopie vom Herzapex. Längsschnitt durch das linksventrikukäre Myokard von Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) C57BL/6-Mäusen (Alter 28-33 Wochen). Zell-Zell-Kontakte im Glanzstreifen (GS): *Gap Junctions* (GJ), *Adherens Junctions* (AJ) und Desmosomen (D). Mi, Mitochondrien; MyF, Myofibrillen.

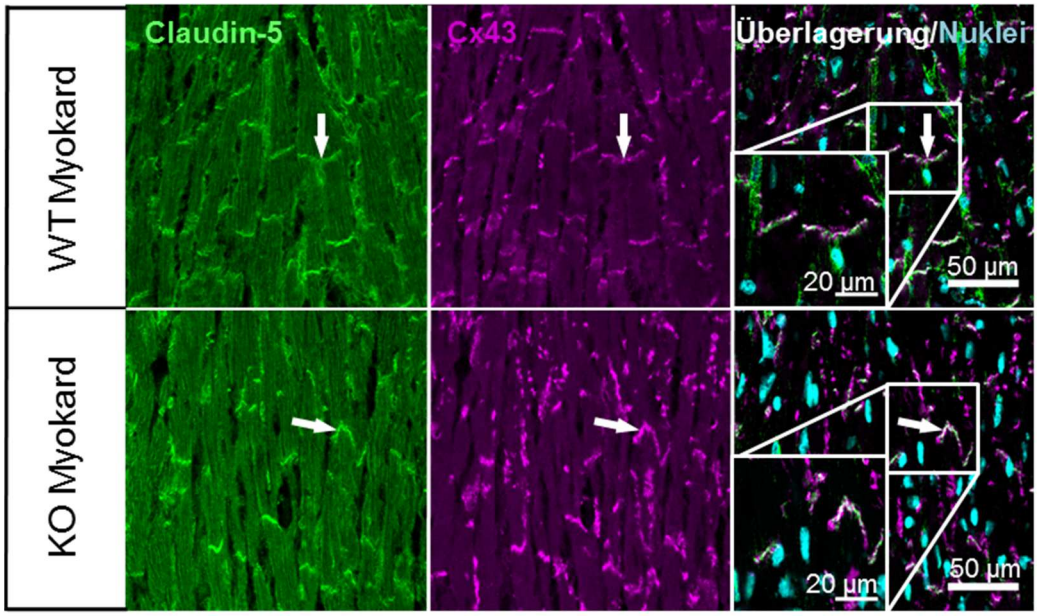


Abb. 42: Kolokalisation von *Tight*- und *Gap-Junction*-Proteinen in den myokardialen Glanzstreifen von Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung des linksventrikulären Myokards. C57BL/6-Mäuse, Alter 15-28 Wochen. Claudin-5, *Tight-Junction*-Protein; Cx43 (Connexin-43), *Gap-Junction*-Protein; Pfeile, Kolokalisation.

3.10.3 Einfluss von Claudin-12-Knockout auf *Tight-Junction*-Proteine verschiedener Organe

Nachdem im murinen Myokard nach Claudin-12-Knockout keine Veränderungen im Expressionsniveau von Claudinen, TAMP oder ZO-1 nachgewiesen wurde, wurden weitere Organe auf verschiedene Zell-Zell-Kontaktproteine untersucht. Dafür wurde zunächst die mRNA-Expression von Claudin-12 verglichen. Besonders stark ($2^{\Delta Ct}>10^{-2}$) war Claudin-12 in

folgender Reihenfolge exprimiert: Niere > Leber > Herz > Pankreas. Aber auch in Speicheldrüse > Gehirn > Uterus > Testis > Colon > Lunge > Ileum > Duodenum > Jejunum war die Expression $2^{\Delta Ct}>10^{-3}$. Geringer exprimiert war Claudin-12 in Harnblase und Milz (Expression $2^{\Delta Ct}<10^{-3}$, Abb. 43; $2^{\Delta Ct}$-Werte in Anhang 23).

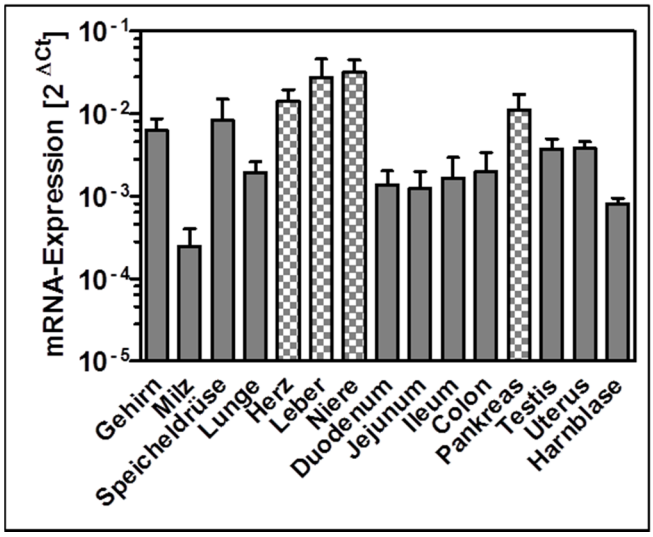


Abb. 43: Hohe Claudin-12-Expression in Niere, Leber, Herz und Pankreas. Karierte Säulen, $2^{\Delta Ct}\geq10^{-2}$. mRNA-Expression in verschiedenen Mausgeweben normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct=Ct_{\beta\text{-Aktin}}-Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. C57BL/6-Mäuse: männlich/weiblich, Alter 30-40 Wochen. n≥4, Mittelwert±SD.

Da Claudin-12 neben dem Herzen auch in Leber, Niere und Pankreas sehr hoch exprimiert wurde, wurde für hoch exprimierte ($2^{\Delta Ct}>10^{-3}$) Claudine (1, 3, 5, 25), Occludin und ZO-1 der Einfluss eines Claudin-12-Knockouts auf deren mRNA-Expression bestimmt. Bezogen auf den Wildtyp zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 44A; $2^{\Delta Ct}$-Werte in Anhang 23).

Da bekannt ist, dass Claudin-12 an der Ca^{2+}-Absorption in Enterozyten beteiligt ist (Christakos et al., 2010; Fujita et al., 2008), wurden darüber hinaus Zell-Zell-Kontaktproteine in Dünn- und Dickdarm von Claudin-12-defizienten Mäusen mit dem Wildtyp verglichen. Ausgewählt wurden Claudin-5 und Proteine mit hoher Expression ($2^{\Delta Ct}>10^{-3}$, Claudin-3, -7, -8, -15, -25, Occludin und ZO-1), wobei sich keines signifikant vom Wildtyp unterschied (Abb. 44B; $2^{\Delta Ct}$-Werte in Anhang 23).

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Claudin-12-Defizienz neben Herz und Gehirn auch auf Claudine, Occludin und ZO-1 anderer Organe bzw. Gewebe keine Auswirkung hatte. Eine Claudin-12-Expression wurde für Gehirn (Ohtsuki et al., 2007), Darm, Niere, Lunge, Leber (Hwang et al., 2014), Harnblase (Acharya et al., 2004), Speicheldrüse (Mellas et al., 2015) und Testis (Haverfield et al., 2014) bestätigt. Weitere Erkenntnisse wurden zu dessen Expression in Herz (sehr hoch), Pankreas (sehr hoch), Uterus (hoch) und Milz (gering) gewonnen.

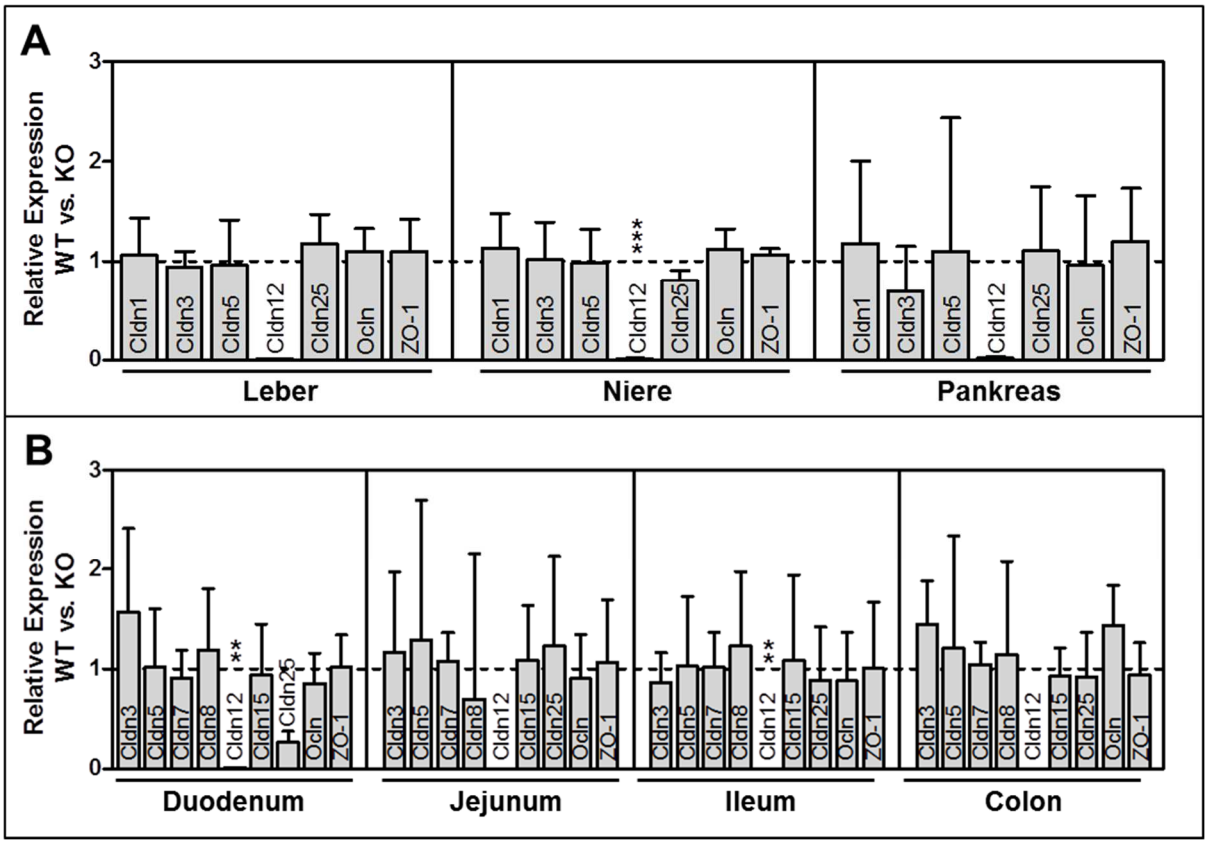


Abb. 44: Keine Unterschiede in der mRNA-Expression ausgewählter Claudine (Cldn), Occludin (Ocln) und *Zonula occludens* Protein-1 (ZO-1) in Organen Claudin-12-defizienter (KO) Mäuse. Claudin-12-KO-Mäuse (C57BL/6) relativ zum Wildtyp (WT). n≥4, Mittelwert±SD. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; **, p<0,01; ***, p<0,001 relativ zum WT. Gestrichelte Linie, Mittelwert der mRNA-Expression im Wildtyp. **(A)** Organe mit sehr hoher Claudin-12-Expression im Wildtyp ($2^{\Delta Ct}>10^{-2}$). **(B)** Dünn- und Dickdarmabschnitte mit Claudin-12-Expression von $2^{\Delta Ct}>10^{-3}$ im Wildtyp.

3.10.4 Claudin-12-abhängige Expression des Vitamin-D-Rezeptors im Gastrointestinaltrakt

In der Klärung der physiologischen Funktion von Claudin-12 wurde bisher lediglich auf eine Rolle im parazellulären Ca^{2+}-Transports des Darmepithels hingewiesen. Insbesondere scheint ein Zusammenhang zwischen Vitamin-D-abhängiger Ca^{2+}-Aufnahme und Claudin-12 von Bedeutung zu sein (Christakos et al., 2010; Fujita et al., 2008). Deshalb sind in diesem Kapitel Untersuchungen zum Vitamin-D-Rezeptor unter Claudin-12-Defizienz dargestellt.

In Wildtyp-Organen wurde eine starke Vitamin-D-Rezeptor-Expression in Niere > Colon > Duodenum > Pankreas > Jejunum > Ileum ($(10,6\pm3,1)\times10^{-2}$ bis $(1,6\pm0,9)\times10^{-2}$) nachgewiesen. Eine 10- bis 1000-fach geringere mRNA-Expression hatten Speicheldrüse > Testis > Lunge > Leber > Harnblase > Herz > Uterus > Milz > Gehirn (Abb. 45A). Der Expressionsvergleich zwischen Wildtyp und Knockout deutete eine tendenzielle Reduktion des Vitamin-D-Rezeptors in Pankreas (auf 35,7±27,1 %), Duodenum (auf 37,4±35,0 %), Ileum

(auf 59,3±40,1 %), Jejenum (auf 71,2±64,8 %) und Leber (auf 68,1±62,2 %) in Claudin-12-defizienten Mäusen an (Abb. 45B).

Eine Claudin-12-Defizienz führte zur Reduktion der mRNA-Expression des Vitamin-D-Rezeptors in Organen des Gastrointestinaltraktes.

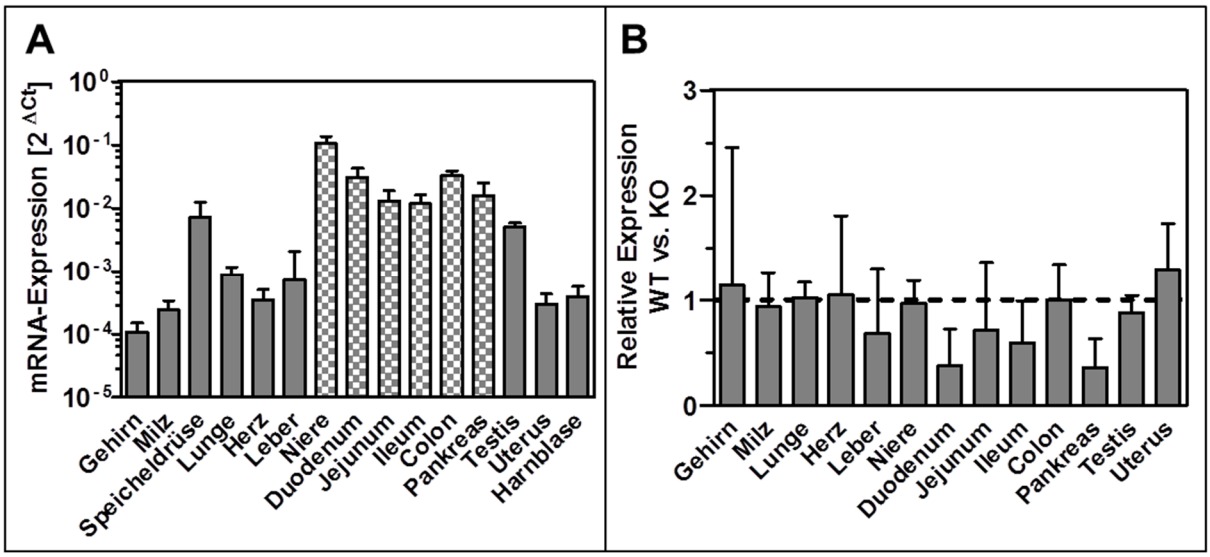


Abb. 45: Der Vitamin-D-Rezeptor ist in Darm, Niere und Pankreas hochexprimiert und zeigt eine reduzierte mRNA-Expression in Claudin-12-defizienten Mäusen. (A) mRNA-Expression des Vitamin-D-Rezeptors in Mausorganen. Karierte Säulen, starke Expression $2^{\Delta Ct} \geq 10^{-2}$ normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct = Ct_{\beta\text{-Aktin}} - Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. **(B)** Relative mRNA-Expression des Vitamin-D-Rezeptors in Claudin-12-defizienten (KO) C57BL/6-Mäusen relativ zum Wildtyp (WT). Mäuse: männlich/weiblich, Alter 30-40 Wochen. Gestrichelte Linie, Mittelwert der mRNA-Expression im Wildtyp. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, $p>0,05$; $n\geq4$; Mittelwert±SD.

4 Diskussion

Die BHS ist für mehr als 98 % aller Wirkstoffe unüberwindlich (Pardridge, 2005). Dadurch ist die Zulassung von ZNS-Wirkstoffen halb so hoch wie von nicht-ZNS-Wirkstoffen (Kaitlin, 2014). BHS-gängige Pharmaka sind in der Regel lipophil, kleiner als 500 Da sowie kein ABC-Transporter-Substrat und weisen einen log P-Wert < 5 sowie eine geringe Neigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken auf (Lipinski et al., 1997; Pardridge, 2012). Andere Pharmaka permeieren über transzelluläre Transportprozesse oder diffundieren über die parazelluläre Route, wenn diese durch Wirkverstärker geöffnet wurde. Übliche Zytostatika überwinden die BHS unzureichend, weswegen die Therapie von beispielsweise Gehirntumoren limitiert ist (Lesniak et al., 2005). Konventionelle Methoden sind Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie (Stupp et al., 2009), die sehr nebenwirkungsreich sind (z.B. Mulhern et al., 2005). Darüber hinaus wird selten eine mittlere Überlebenszeit von 14 Monaten (Glioblastome; Johnson und O'Neill, 2012) bzw. 17 Monaten (Metastasen; Bernhardt et al., 2017) überschritten. Daraus resultiert ein hohes Potenzial zur Behandlungsoptimierung.

Bisher wurden verschiedene Ansätze zur Verbesserung des Wirkstoffdurchtritts untersucht. Diese sind in der Regel stark invasiv, führen zum kompletten Zusammenbruch der BHS oder sind unspezifisch. Dazu gehören hochintensiver fokussierter Ultraschall (Burgess et al., 2011), hyperosmolares Mannitol (Cosolo et al., 1989) oder Caprat (Preston et al., 2008). Methoden zur transzellulären Penetration sind auch unspezifisch und zeigen Nebenwirkungen. Für Nanopartikel ist Zytotoxizität nachgewiesen (Li et al., 2015a). Liposomen sind BHS-unspezifisch, da sie meist über Transzytose mittels Transferrin-Rezeptor wirken (Soni et al., 2008), der nicht nur in der BHS exprimiert ist (Ponka und Lok, 1999). Der Einsatz von zellpenetrierenden Peptiden gekoppelt mit Wirkstoffen vermittelt eine BHS-Durchlässigkeit *in vitro* und *in vivo* (Diaz-Perlas et al., 2017; Oller-Salvia et al., 2016), findet aber bisher keinen Einsatz zur Zytostatikapenetration. Außerdem wird die transzelluläre Passage häufig durch Efflux-Transporter verhindert (Löscher und Potschka, 2002).

Daher wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit zur moderaten und transienten Permeabilisierung der BHS untersucht, ohne dabei zu einem BHS-Zusammenbruch zu führen. Die Öffnung sollte dabei in Stärke und Dauer gerade ausreichend sein, um für eine wirksame Zytostatikakonzentration im Gehirn zu sorgen und dabei möglichst keine Nebeneffekte auf andere Organsysteme hervorzurufen. Um die gewünschten Effekte erzielen zu können, sollte die Modulation über spezifische Zielproteine der BHS erfolgen.

4.1 Claudin-5 als Zielprotein zur spezifischen Modulation der Blut-Hirn-Schranke

Zelluläre Barrieren hängen von der Struktur und Funktion der *Tight Junctions* ab (Mark und Davis, 2002). Vor allem sind Claudine unverzichtbar für die parazelluläre Abdichtung (Furuse und Tsukita, 2006). Diese Arbeit bestätigt die Expression von Claudin-1, -3, -5 und -12 in der BHS, die zuvor beschrieben wurde (Morita et al., 1999b; Nitta et al., 2003; Pfeiffer et al., 2011; Wolburg et al., 2003b). Die verwendeten Claudin-5-Primer zur mRNA-Expressionsbestimmung weisen Primereffizienzen zwischen 1,95 und 2,04 auf (Berndt, 2017), wobei eine Effizienz von 2,0 eine 100-%ige Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus angibt. Damit liegen die Effizienzen im angegebenen Toleranzbereich (Anleitung Luminaris qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE). Für die Resultate bedeutet dies, dass keine Über- bzw. Unterbestimmung der Expression vorliegt. Literaturangaben bestätigen die in dieser Arbeit ermittelten Expressionsniveaus für Claudin-1, -3, -12, Occludin (Ohtsuki et al., 2008) und für Claudin-5 (Burkhart et al., 2015).

Die abdichtenden Claudine 1 und 3 sind gering in der BHS exprimiert, welches auch durch andere Studien belegt wird (Ohtsuki et al., 2008). Für beide Subtypen wird eine Funktion in der BHS angenommen (Pfeiffer et al., 2011; Wolburg et al., 2003b). Durch ihre geringe Expression sind sie jedoch zur Modulation ungeeignet. Claudin-12 wird hiermit als das am zweitstärksten exprimierte BHS-Claudin bestätigt. Da die Untersuchungen dieser Arbeit mit Claudin-12-defizienten Mäusen keinerlei Auswirkungen auf die BHS haben, entfällt Claudin-12 als Zielprotein zur spezifischen Permeabilisierung. Dessen Funktion bleibt weiterhin unbekannt.

Im Gegensatz zu anderen *Tight-Junction*-Proteinen wurde für Claudin-5 eine sehr starke Expression gemessen (10-fach zu Occludin, >70-fach zu anderen Claudinen). Auch andere Studien belegen, dass es quantitativ eine übergeordnete Rolle an der BHS spielt (Ohtsuki et al., 2008). Die Claudin-5-Expression ist nicht ausschließlich auf das Gehirnendothel beschränkt, wodurch unspezifische Wirkungen auf Claudin-5 in anderen Organen denkbar wären. Im Vergleich zum Gehirn wurde die Claudin-5-Expression in diversen Organen bestimmt. Damit decken sich die Ergebnisse von bereits bekannten Angaben, die Claudin-5 im Endothel der Leber (Rahner et al., 2001), Milz (Uehara und Uehara, 2008), Niere und Lunge (Morita et al., 1999b) aber auch epithelial in Uterus (Biazik et al., 2008), Testis (Morrow et al., 2009), Lunge (Wang et al., 2003), Darm und Pankreas (Rahner et al., 2001) beschreiben. Trotz der Claudin-5-Expression in multiplen Organen spielen dort Nebenwirkungen durch Claudin-5-Peptidomimetika aus den folgenden Gründen eine geringe Rolle. Einerseits ist die Expression

in peripheren Organen und peripheren mikrovaskulären Endothelzellen geringer als im Gehirnendothel (Morita et al., 1999b; Rahner et al., 2001). Andererseits sind Claudin-5-exprimierende Blutgefäße, abgesehen von der BHS, durch Fenestrierungen physiologisch durchlässiger (z.B. in Leber, Niere, Darm). Das geht einher mit einer Studie, die beschreibt, dass die Endothelbarriere außerhalb der BHS von Claudin-5 unabhängig ist (Fontijn et al., 2006).

Die hohe Claudin-5-Expression und die geringen zu erwartenden Wirkungen außerhalb der BHS bestätigen Claudin-5 als Zielprotein zur spezifischen BHS-Modulation. Es ist erwiesen, dass es funktionell entscheidend für die Barriere ist (Campbell et al., 2008; Nitta et al., 2003). Die Abdichtung resultiert aus einer Interaktion über die EZS (Daugherty et al., 2007), die durch isolierte EZS von Claudin-5 gestört werden kann (Blasig et al., 2006). Daher wurden in dieser Arbeit Claudin-5-EZS als Ausgangsstrukturen verwendet, um synthetische Peptidomimetika zur Modulation von Claudin-5 zum verbesserten Wirkstofftransport zu entwickeln.

Der Ansatz zur Modulation der parazellulären Barriere mittels Peptidomimetika entlehnt aus den EZS der *Tight-Junction*-Proteine wurde bereits in früheren Studien untersucht. Dabei sorgen EZS1- bzw. EZS2-Peptide von Occludin, Tricellulin und Claudinen für eine Barriereöffnung *in vitro* und *in vivo* (zusammengefasst in 1.4.1, Tab. 4-5). Wie diese Studien zeigen, sind die Peptideffekte reversibel und nicht zytotoxisch. *In vivo* wurde der permeabilitätssteigernde Effekt vorwiegend auf epitheliale Barrieren nachgewiesen (z.B. Chung et al., 2001). Eine erhöhte endotheliale Durchlässigkeit (peripheres Perineurium) ist bisher nur für ein Claudin-1-EZS1-Peptid (C1C2) belegt (Zwanziger et al., 2012a). Obwohl Claudin-1 sehr gering in der BHS exprimiert wird, führt C1C2 in einem BHS-Modell zur starken parazellulären Öffnung (Staat et al., 2015). Weiterhin beeinflusst C1C1 neben Claudin-1 auch Claudin-2, -3, -4, -5 und Occludin in den Zell-Zell-Kontakten epithelialer Zellen (Staat et al., 2015). Effekte außerhalb des Gehirns sind in den Epithelien der Haut (Furuse et al., 2002), des Choroid Plexus (Wolburg et al., 2001) und des Darms (Pope et al., 2014) zu erwarten, in denen Claudin-1 hochexprimiert ist. Diese Eigenschaften machen Claudin-1-Peptide durch die zu erwartenden Nebenwirkungen ungeeignet zur BHS-Modulation.

4.2 Transiente Barriereöffnung durch *Tight-Junction*-Modulation *in vitro*

Claudin-5-Peptidomimetika werden zur spezifischen und transienten BHS-Öffnung eingesetzt ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu verursachen. Zur Validierung der Peptidwirkung einer Vielzahl verschiedener Claudin-5-Peptidomimetika diente ein einfaches und aussagekräftiges Zellkulturmodell von bEND.3-Zellen. Für sie wurde eine hohe Claudin-5-Expres-

sion und eine typische Endothelzellmorphologie nachgewiesen. Aufwendigere Filterkulturen mit MDCK-II-Zellen und primären Gehirnkapillarzellen in Kokultur mit Astrozyten wurden für Permeabilitätsuntersuchungen eingesetzt. Für *in-vivo*-Untersuchungen wurden Peptide ausgewählt, die eine moderate, transiente und nicht zytotoxische Öffnung bedingen. Als Kriterien dienten Reversibilität, Konzentrationsabhängigkeit, Wirkstoffpenetration und Zellvitalität.

Insgesamt wirken die Claudin-5-Peptide **konzentrations-** (75 bis 300 µM) **und zeitabhängig** (bis 48 h) sowohl auf Epithelien als auch auf zerebrale Endothelzellen. Wirksam sind ähnliche Konzentrationen wie für das Claudin-1-Peptid C1C2 (Zwanziger et al., 2012a), wobei C1C1 aufgrund unspezifischer Claudin-5-Bindung an Gehirnkapillarendothelzellen (Staat et al., 2015) bzw. geringer Claudin-1-Expression zur BHS-Modulation ungeeignet ist. Die durch Claudin-5-Peptide vermittelte Öffnung erreichte innerhalb von 48 h das Maximum und glich damit einem Claudin-5-Knockdown am Versuchstier (Campbell et al., 2008). Ein Knockdown ist jedoch zur BHS-Modulation ungeeignet, da siRNA nicht stabil ist und Nebeneffekte sowie Immunreaktionen bedingt (Gavrilov und Saltzman, 2012). Das relativ lange Zeitfenster der Öffnung könnte für Dauerinfusionen zur Chemotherapie von Gehirntumoren (Cassier et al., 2008) oder zur Therapie von intrakranieller Hypertension nach Schädel-Hirn-Trauma als Alternative zur Mannitolinfusion (Asehnoune et al., 2017) eingesetzt werden.

Die **Reversibilität** der Claudin-5-Peptid-Wirkung ist eine Voraussetzung, um vor dem *in-vivo*-Einsatz eine vollständige BHS-Rekonstitution sicherzustellen. Eine transiente Wirkung wird für die Claudin-5-Peptide nachgewiesen, denn ein Mediumwechsel führt zur Barriereregeneration innerhalb eines Tages. Ein vergleichbarer Zeitrahmen wird für Claudin-1-Peptide an epithelialen Zellbarrieren gefunden, die ebenso einen Tag nach Peptidauswaschung regenerieren (Zwanziger et al., 2012a). Für Claudin-5-Peptide ist somit ein kompletter BHS-Zusammenbruch ausgeschlossen, der zu neurologischen Schädigungen führen würde (Wang et al., 2017). Die BHS-Öffnung durch die Peptide ist moderat sowie temporär und ähnelt damit einer VEGF-vermittelten unschädlichen Permeabilität, die ebenso durch Claudin-5 bedingt ist (Argaw et al., 2008) und keine Ödembildung zur Folge hat (Jiang et al., 2014). Damit sind Claudin-5-Peptide durch ihre Reversibilität unbedenklich anzuwenden.

Durch die geringe Pharmakapenetration ins Gehirn (Pardridge, 2005) bei der Behandlung von Gehirntumoren sind normalerweise wirksame **Zytostatika** wie z.B. Doxorubicin zur effektiven Chemotherapie ungeeignet (Lesniak et al., 2005). Doxorubicin wirkt auf Gehirntumore nur nach Penetrationsverbesserung (Gaillard et al., 2014). Nach der Behandlung von Filterkulturen mit Claudin-5-Peptiden wurde Doxorubicin (580 Da) als Permeabilitätsmarker ein-

gesetzt, da es gut photometrisch detektierbar ist. Seine parazelluläre Penetration durch die Peptidgabe ist verbessert. Doxorubicin ist Substrat von ABC-Transportern wie P-gp, BCRP und MRP1/2 (Choi, 2005; Wind und Holen, 2011). Im verwendeten epithelialen Zellmodell werden P-gp und MRP2 apikal und MRP1 basolateral exprimiert (Goh et al., 2002; Tang et al., 2002). Durch die Peptidbehandlung kann eine nebenwirkungsreiche Inhibition der Efflux-transporter (Callaghan et al., 2014; Palmeira et al., 2012) vermieden werden, da eine basolaterale Wirkstoffausschleusung nach parazellulärer Penetration vernachlässigbar ist.

Neben einer peptidvermittelten Permeabilität von Doxorubicin wird auch die Penetration größerer Moleküle (bis 67 kDa bzw. für C5C2[S22N] bis 155 kDa) beobachtet. Damit liegt das Molekulargewicht der penetrierenden Substanzen höher als beim Claudin-5-Knockout (800 Da, Nitta et al., 2003). Die Diskrepanz lässt sich einerseits dadurch erklären, dass an dieser Stelle Zellkultur-Untersuchungen durchgeführt wurden, bei denen die Peptide statisch in hoher Konzentration auf den Zellrasen wirken. Andererseits könnte die Öffnung für größere Moleküle auch aus einer Wirkung der Peptide auf weitere *Tight-Junction*-Proteine resultieren.

Insgesamt eignen sich Claudin-5-Peptide als Wirkverstärker Claudin-5-haltiger Zellbarrieren. Zur **Wirkoptimierung** wurden Varianten durch Deletion, Addition oder Substitution von C5C2 verglichen. Die stärksten Effekte zur BHS-Öffnung wurden *in vitro* für C5C2[S22N] detektiert. Die AS an Position 22 (Asn) stammt von Claudin-1 und ist essenziell für die Wirkung von C1C2. Dies wurde bereits nach einer Substitution von Asn zu Ser im C1C2-Molekül (C1C2[N22S]) deutlich, da es zum Verlust der parazellulären Barriereöffnung führt (Staat, 2015). Umgekehrt zeigt C5C2[S22N] im Vergleich zu C5C2 eine etwa viermal erhöhte Durchlässigkeit für kleine (bis 0,457 kDa) und einen etwa zweifachen Anstieg für große Moleküle (bis 67 kDa). Damit ist der Permeabilitätsanstieg ähnlich hoch wie bei C1C2 (Staat, 2015).

Deletions- und Additionspeptide dienen zur Aufklärung des Wirkbereichs. Außerdem wären Deletionspeptide vorteilhaft für geringere Synthesekosten und zur Löslichkeitsoptimierung. Eine Deletion von 4 AS am C-Terminus von C5C2 erhöht nicht die parazelluläre Permeabilität. Die Verlängerung um 5 AS am N-Terminus (C5C2/shifted) kompensiert den Wirkverlust der C-terminalen Verkürzung und führt sogar zur Wirkverstärkung. Die N-terminale Verlängerung um 5 AS zeigt einen stärkeren Effekt auf die Ionendurchlässigkeit allerdings eine geringere Permeabilität für kleine und große Moleküle im Vergleich zu C5C2. Beides ist auch für C5C2/shifted der Fall. Damit ist der Effekt vergleichbar, aber fällt durch eine schnellere Regeneration schwächer aus. Die Zeitverlaufsprofile der verschiedenen Claudin-5-Peptide

unterscheiden sich im Wirkmaximum und in der Regeneration, die sich wiederum aus Unterschieden in der Bindungsstärke zu Claudin-5 (Dabrowski et al., 2015) und der Recyclingprozesse (Gehne et al., 2017; Stamatovic et al., 2009) ergeben.

Im Hinblick auf eine intravenöse Applikation wurden Claudin-5-Peptide aus D-AS hergestellt, da diese gegenüber Peptidasen stabiler sind (Werle und Bernkop-Schnurch, 2006). Dabei muss Stereospezifität nicht zwingend eine Rolle bei der Barriere-modulierenden Wirkung der Claudin-5-Peptide spielen, wie bereits für ein anderes Claudin-Peptid beschrieben (Baumgartner et al., 2011). Für die Claudin-5-Peptide werden Unterschiede in der Wirkstärke verzeichnet. So führt vergleichend zur L-AS-Variante eine Behandlung mit D-AS-C5C2 zur stärkeren, D-AS-C5C2/shifted zur vergleichbaren und D-AS-C5C2[S22N] zur verringerten Erhöhung der Ionen- und Moleküldurchlässigkeit. Bekannt ist, dass D-AS-Peptide gleich stark oder effektiver wirken können, da sie einer geringeren Proteolyse unterliegen (Elfgen et al., 2017; Hamamoto et al., 2002). Andere Studien belegen eine reduzierte Wirksamkeit (Schlingmann et al., 2016) vergleichbar zu L- und D-C5C2[S22N].

Das humane hC5C2, was sich in zwei Aminosäuren von C5C2 unterscheidet, beeinflusst nicht die epitheliale und endotheliale Barriere von murinen und caninen Zellen. Dies geht einher mit Untersuchungen zu anderen *Tight-Junction*-modulierenden Peptiden, welche Spezies-spezifische Unterschiede zeigen. Beispielsweise führt ein EZS1-Peptid entlehnt aus Huhn-Occludin zu keinem Effekt auf *Xenopus-laevis*-Zellen (Wong und Gumbiner, 1997) jedoch ein humanes EZS1-Occludin-Peptid auf humane Zellen (Everett et al., 2006; Tavelin et al., 2003). Bei der Anwendung der Claudin-5-Peptide auf andere Spezies muss daher der Effekt überprüft und die Sequenz gegebenenfalls angepasst werden, da der Unterschied weniger Aminosäuren große Auswirkungen haben kann.

Ebenfalls unwirksam im Hinblick auf eine gesteigerte Permeabilität sind Claudin-5-Peptide aus der kompletten EZS2. Für Claudin-1-EZS2-Peptide wird auch kein Effekt beobachtet (Mrsny et al., 2008). Damit sind diese Peptide für eine BHS-Modulation ungeeignet.

Das eingesetzte Kontrollpeptid C2C2 aus der EZS1 von Claudin-2 hat keine Barriere-modulierenden Effekte, was bereits bestätigt ist (Dabrowski et al., 2015; Sauer et al., 2014; Staat et al., 2015; Zwanziger et al., 2012a). Dies entspricht den Erwartungen, da Claudin-2 anhand von immunhistochemischen Färbungen nicht in zerebralen Blutgefäßen nachgewiesen wird (Steinemann et al., 2016) und in Gehirnkapillarendothelzellen nur gering exprimiert ist (Berndt, 2017). Eigene Resultate belegen zudem eine geringe Sequenzidentität von C2C2 mit den Claudin-5-EZS. Damit ist C2C2 als Kontrollpeptid gut geeignet.

Claudin-5-Peptide erhöhen vergleichend zur Kontrolle reversibel die Permeabilität in Claudin-5-exprimierenden Zellkulturmodellen der BHS verschiedener Spezies. Die Stärke und Dauer der Durchlässigkeit ist abhängig von der Konzentration und Sequenz der Peptide ohne zytotoxische Effekte hervorzurufen. Es wurden Claudin-5-Peptide sowohl zur längeren Öffnung für große Moleküle (z.B. mit C5C2[S22N]) als auch zur kürzeren Öffnung für kleinere Moleküle (z.B. mit C5C2) eingesetzt.

4.3 Transiente Öffnung der Blut-Hirn-Schranke *in vivo*

Um einen spezifischen Wirkstoffdurchtritt durch die Claudin-5-dominierte BHS zu erzielen, wurden Claudin-5-Peptidomimetika basierend auf *in-vitro*-Untersuchungen als Verstärker der Wirkstoffpassage getestet. Als Applikationsroute wurden i.v.-Injektionen durchgeführt, um den First-Pass-Effekt zu vermeiden. Die Dosis richtete sich nach der höchsten Dosis, die ohne Löslichkeitsvermittler appliziert werden konnte, wobei eine gute *in-vivo*-Verträglichkeit wichtig ist.

C5C2 ist nach längeren Behandlungszeiträumen (> 12 h) nicht und nach kürzeren (≤ 4 h) tendenziell wirksam. Im Vergleich zu den *in-vitro*-Bedingungen, die nach etwa 24 h eine maximale Durchlässigkeit zeigen, spielt neben dem proteolytischen Abbau der Claudin-5-Peptide durch endothelgebundene Peptidasen (Brownson et al., 1994) die Degradierung durch Plasmaproteine eine Rolle (Werle und Föger, 2017). Die Verwendung von D-AS resultiert in einer Verlängerung der Plasmahalbwertzeit um 40 % bezogen auf C5C2. So wird ein erhöhter Öffnungseffekt um 26 % erreicht. Obwohl die strukturellen Eigenschaften von L-C5C2 und D-C5C2, abgesehen von deren spiegelverkehrter Konformation, identisch sind, beruht der erhöhte Effekt auf einem langsameren Abbau der D-AS-Sequenz durch Peptidasen. Unterstützend dazu wurde in dieser Arbeit keine Degradierung von D-AS-C5C2 durch eine Protease nachgewiesen.

In vivo wird der Öffnungseffekt für D-AS-C5C2 nach 4 h bestimmt, der nach maximal 12 h endet. Die Plasmahalbwertzeit mit 20,9 h lässt eine längere Wirkung erwarten, die auch nach Mehrfachinjektion nicht verstärkt ist. Da die Plasmahalbwertzeit *ex vivo* bestimmt wurde, fehlt die Berücksichtigung weiterer Metabolisierungs- sowie Exkretionsprozesse, die ebenso für eine Eliminierung der Peptide verantwortlich sind (Diao und Meibohm, 2013). Auch *in vitro* werden diese Prozesse nicht berücksichtigt, wodurch die hohe Diskrepanz der Wirkdauer von etwa 48 h *in vitro* zu 4 h *in vivo* zu erklären ist.

Weiterhin ist die BHS-Regeneration *in vivo* von großer Bedeutung, um Nebenwirkungen gering zu halten. C5C2 und D-AS-C5C2 ermöglichen eine intakte BHS nach bereits 12 h. Eine zeitabhängige Wirkung ist auch beim siRNA-vermittelten Knockdown von Claudin-5 zu verzeichnen, bei dem die BHS-Normalisierung jedoch erst nach 72 h startet und erst nach 7 Tagen vollständig ist (Campbell et al., 2008). Darüber hinaus führt kein Claudin-5-Peptid an den untersuchten Mäusen zu akuter Toxizität, längerfristigen Nebenwirkungen oder ZNS-relevanten Effekten. Die Peptide sind *in vivo* gut verträglich, da sich die Gewichtszunahme der Mäuse im Zeitraum von vier Wochen vergleichbar mit der Kontrollgruppe verhält. Außerdem weisen die Mäuse ein normales Verhalten auf und sind nach Sektion unauffällig. Es werden keine Gehirnödeme beobachtet, die auch schon beim Claudin-5-Knockout ausgeschlossen wurden (Nitta et al., 2003). Neurologische Schädigungen, die sich durch die Penetration von im Blut befindlichen Komponenten wie Albumin und Glutamat (Bullock, 1995; Wang et al., 2017) oder durch Ödeme (Übersicht s.Michinaga und Koyama, 2015) ergeben, scheinen keine Rolle zu spielen. Diese Erkenntnisse sowie die temporäre und moderate BHS-Öffnung bestärken, dass die verabreichte Dosis von den Tieren toleriert wird und für weitere Studien geeignet ist.

4.3.1 Claudin-5-Peptide zur Verbesserung der Gliombehandlung

Aufgrund der Reversibilität, Verträglichkeit und Stabilität von D-AS-C5C2 wurde es für initiale Versuche zur Gliom-Chemotherapie an Mäusen eingesetzt. Als Zytostatikum wurde Paclitaxel verwendet, das normalweise bei der Behandlung von Gehirntumoren unwirksam ist, da es unzureichend durch die BHS gelangt (Henson et al., 1992). In anderen Geweben wie z.B. der Lunge können hohe Paclitaxelkonzentrationen erreicht werden (8957±277 ng/g, 3 mg/kg; Li et al., 2015b). Die Gehirnkonzentration liegt jedoch nur bei 190 ng/g (Gliom, Ratte, Paclitaxel 10 mg/kg; Zhao et al., 2010) bzw. 114-281 ng/g (gesundes Gewebe, Mensch, Paclitaxel 175 mg/m²; Fine et al., 2006) und kann durch Wirkverstärkung auf das 10-fache erhöht werden (Zhao et al., 2010). Dadurch wird die Überlebenszeit von Gliom-tragenden Tieren verbessert (Zhao et al., 2010). Die hier eingesetzte Dosis liegt höher (24 mg/kg), daher können höhere Gehirnkonzentrationen erwartet werden. Eigene Resultate belegen, dass die Claudin-5-Peptid-vermittelte Penetration des Zytostatikums *in vivo* zur Tumorreduktion führt. Es besteht ein Trend in der Reduktion auf 48 % im Vergleich zur kontrollbehandelten Gruppe. Die Tumorreduktion ist damit stärker als in einem ähnlichen Mausmodell mit U-87-MG-Gliom, bei dem eine Paclitaxelpenetration über Alkylglyzerole untersucht wurde (30 % Reduktion; Hülper et al., 2011).

Paclitaxel ist zwar kein Subtrat von BCRP (Yuan et al., 2009) und MRP1/2 (Kamazawa et al., 2002) jedoch von P-gp (Sparreboom et al., 1997). Der Efflux-Transporter wird bis ins Tumor-Endstadium exprimiert (On et al., 2013) und ist im Tumor hochreguliert (von Wedel-Parlow et al., 2009). Da P-gp auf der luminalen Seite der Gehirnkapillarendothelzellen exprimiert wird (Worzfeld und Schwaninger, 2016) hat dieser auf eine Peptid-basierte, parazelluläre *Tight-Junction*-Modulation keine Auswirkungen. Daher ist die parazelluläre Öffnung über Claudin-5-Peptide zur Paclitaxelpenetration vorteilhaft, um eine P-gp-Inhibition und entsprechende Nebenwirkungen zu vermeiden (Callaghan et al., 2014; Palmeira et al., 2012).

Generell kann eine Barriere-modulierende Wirkung der Peptide nur zum Tragen kommen, solange die BHS noch nicht Tumor-bedingt zusammengebrochen ist, wobei die BHS-Integrität abhängig vom Tumorstadium ist. Im in dieser Arbeit verwendeten Tumormodell scheint ein behandlungsrelevantes Stadium untersucht worden zu sein, da Paclitaxel ohne Wirkverstärkung durch Peptide keinen zytotoxischen Effekt aufweist (Breitkreuz-Korff, 2018). Im Mausmodell für Gehirnmetastasen mit Lungenkarzinomzellen ist die BHS in frühen und mittleren Stadien des Tumors in Bezug auf Permeabilität intakt, zeigt jedoch einen Zusammenbruch im Spätstadium (On et al., 2013). Auch sind Claudin-5 und andere *Tight-Junction*-Proteine mit zunehmendem Tumorgrad (untersucht in Astrozytomen) reduziert (Ishihara et al., 2008; Liebner et al., 2000). Daher ist eine Behandlung mit Claudin-5-Peptiden in früheren und mittleren Tumorstadien mit intakter BHS von Bedeutung. Es besteht ein Trend in der Gliomreduktion durch Paclitaxel nach Peptidbehandlung, der noch durch weitere Untersuchungen statistisch abzusichern ist.

4.3.2 Optimierung der Wirkdauer von Claudin-5-Peptidomimetika

D-AS-C5C2 verbessert die Tumorbehandlung, wobei die Wirkung noch optimiert werden kann. Weitere pharmakokinetische Analysen wären hier von Bedeutung. Bestimmt werden sollte die Peptidstabilität im Organismus unter Berücksichtigung von Stoffwechsel- und Exkretionsprozessen sowie die genaue Paclitaxelkonzentration in Gehirn und weiteren Organen. Diese Erkenntnisse können eingesetzt werden, um Nebenwirkungen zu reduzieren oder weitere Indikationsgebiete möglich zu machen. Beispielsweise könnte eine verlängerte Wirkdauer der Peptidomimetika die Applikation von größeren Wirkstoffen wie Antikörper ermöglichen. Die Peptidsequenz ist für weitere Anwendungen bereits optimal, da z.B. C5C2[S22N] keine bessere Wirkung *in vivo* erzielt. Eine Verbesserung der Peptidstabilität oder Verminderung der Exkretion durch die Niere wäre denkbar. Eine übliche Methode für Peptide ist die PEGylierung (Fried et al., 2002). Da jedoch für ein Claudin-1-Peptidomimetikum eine

PEGylierung zum Wirkverlust *in vitro* führt (Staat, 2015), soll diese Methode nicht für C5C2 in Betracht gezogen werden. Eine weitere Möglichkeit sind zyklische Peptide. Im Falle eines *Tight-Junction*-modulierenden Peptides zeigt die zyklische Variante sogar stärkere Wirkungen als die lineare (Herman et al., 2007). Ein zyklisches Occludinpeptid führt zur erhöhten Permeabilität *in vitro* (Oshima et al., 2003).

Sehr effektiv verzögert die Bindung an Plasmaproteine (z.B. Albumin) die Peptidausscheidung, da Wirkstoffe im gebundenen Zustand nicht renal filtriert oder metabolisiert werden (Syed et al., 1997). Dabei ist zu beobachten, dass in der Regel der Protein-gebundene Anteil pharmakologisch inaktiv ist (Ulldemolins et al., 2010). Allerdings beträgt der gemessene albumingebundene Anteil der Claudin-5-Peptide weniger als 3 %. Dadurch ergibt sich als Vorteil, dass der überwiegende Teil der Peptid-Dosis zur direkten Modulation der *Tight Junctions* zur Verfügung steht. Andererseits könnte eine höhere Proteinbindung die Ausscheidung verringern z.B. durch eine Assoziation an Albumin (Bech et al., 2017). Für die Stabilisierung der Claudin-5-Peptide ist diese Form der Konjugation denkbar. Ausgeschlossen werden müsste, dass die Albuminbindung zum Wirkverlust der Claudin-5-Peptide führt.

4.4 Sekundärstrukturen der Peptidomimetika bei der Interaktion mit Claudin-5

Die Modellierung der Peptide ergibt, dass die Peptidstrukturen auch ohne Bildung einer Disulfidbrücke der Struktur des Claudin-Kristallmodells ähneln (Suzuki et al., 2014). Die Peptide bilden zwei β-Stränge (β3‘ und 4‘) flankiert von einer C-terminalen α-Helix. Dies ist im Einvernehmen mit Daten zum Claudin-1-EZS1-Peptid C1C2, welches sich strukturell ähnlich verhält (Dabrowski et al., 2015). Durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde eine Neigung zur β-Faltblattbildung ermittelt. Darüber hinaus ist die Neigung zur α-Helix-Ausbildung unter Helix-begünstigenden Bedingungen sehr stark. Ein anderes Claudin-Peptid zeigt auch mit dieser Methode eine vergleichbare Struktur (Staat, 2015).

Durch Limitierung der verwendeten Modellierungs-Programme für D-AS und Peptide > 30 AS konnte keine Strukturvorhersage und kein Interaktionsmodell für D-AS-Peptide sowie das N-terminal verlängerte C5C2 (C5C2/N+5AS) durchgeführt werden. Da die Zirkulardichroismus-Spektren der L- und D-AS-Peptide sich sehr stark ähneln, wird erwartet, dass deren Strukturvorhersage vergleichbar ausfallen würde. Für ein anderes Membranprotein und interagierende D-AS-Peptide wurde ermittelt, dass eine enantiomere Struktur nicht ausschlaggebend für die Bindung sein muss (Sal-Man et al., 2004). Im Vergleich zum L-AS-Peptid wird für D-AS-Peptide stammend vom HIV-1-Glykoprotein gp41 bzw. von Claudin-1 eine

ähnliche Struktur und Orientierung an ihrer jeweiligen Bindungsstelle gefunden (Pritsker et al., 1998; Staat, 2015).

Die Substitution der Aminosäure an Position 22 hat sowohl bei C1C2 (Staat, 2015) als auch bei C5C2 keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur allerdings auf die Orientierung der β-Stränge zur α-Helix. Dementsprechend gleichen sich die 3D-Strukturen von C5C2 und C1C1[N22S] genauso wie von C1C2 und C5C2[S22N]. Letztere weisen eine um 90° rotierte α-Helix auf. Wahrscheinlich ist die entsprechende Aminosäure an Position 22 (Position 74 im Claudin-Molekül) wichtig für die Peptidkonformation und damit für die Bindung zum Claudin-5-Protein. Dies belegt ein Bindungsmodell der verschiedenen Claudin-5-Peptide, bei dem die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung (Jeffrey, 1997) bei Asn22 höher ist als bei Ser22. Ebenfalls spielt die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen bei der Interaktion eine Rolle, da für das unwirksame C5C2/C-4AS nur drei Bindungen ermittelt werden.

Interaktionsmodelle (CABS-dock) von EZS1-Peptiden weisen auf eine Assoziation mit β-Strängen beider EZS von Claudin-5 hin. Das geht einher mit Interaktionen von Claudin-15, die überwiegend durch β-Stränge vermittelt sind (Suzuki et al., 2014). Unter Berücksichtigung des Interaktionsmodells ist die C-terminale α-Helix vorwiegend für die Stabilisierung der β-Struktur und nur in geringem Maße für die eigentliche Bindung nötig, da ein fehlender C-Terminus in funktionellen Untersuchungen unwirksam ist. Im 3D-Modell für C5C2/C-4AS wurde ermittelt, dass mit einer unstrukturierten Peptidkonformation eine wesentlich schlechtere Bindung an Claudin-5 stattfinden kann. Da allerdings eine N-terminale Verlängerung auch bei verkürztem C-Terminus sowohl strukturell als auch funktionell C5C2 ähnelt, spielen die 4 C-terminalen Aminosäuren für die Kernwirksequenz keine ausschlaggebende Rolle.

In vorangegangen Studien wurden durch Substitutionsexperimente zahlreiche Aminosäuren identifiziert, die wichtig bei der *trans*-Interaktion der EZS von Claudin-5 sind und bei Abwesenheit die parazelluläre Barriere beeinträchtigen (Piontek et al., 2008; Wen et al., 2004). Diese Aminosäuren sind ebenso bei der Interaktion von Claudin-5-Peptiden mit den EZS von Claudin-5 beteiligt, wie durch die eigene Modellierung belegt wird. So kann bei C5C2 und C5C2/shifted die *trans*-Interaktion über die Aminosäure Y158 im Zielprotein vermittelt sein. Die Aminosäure W51 ist in der 3D-Struktur an der Assoziation von C5C2/shifted mit Claudin-5 und Q156 sowohl bei der Interaktion von Claudin-5 mit C5C2 als auch mit C5C2[S22N] und C5C2/shifted beteiligt. Somit scheinen diese Aminosäuren essenziell für die Wirkung zu sein.

In den dargestellten Modellen werden nur Wasserstoffbrückenbindungen für die Peptid-Assoziation berücksichtigt, wobei darüber hinaus Claudin-Interaktionen der EZS ebenso durch

hydrophobe Wechselwirkungen möglich sind (Suzuki et al., 2014). Für Claudin-5 sind auch *cis*-Interaktionen durch die Transmembrandomänen beschrieben (Rossa et al., 2014). Da die Peptide extrazellulär wirken, wird diese Form der Bindung keine Rolle spielen.

4.5 Wirkmechanismus der Claudin-5-Peptidomimetika

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führen Claudin-5-Peptide zu einer Beeinträchtigung der BHS. Nach Claudin-5-Peptidbehandlung ist das Claudin-5-Niveau in der Zellmembran reduziert und die Zellen sind weniger spindelförmig. Die Verringerung von Claudin-5 in der Plasmamembran *in vitro* geht zeitlich einher mit dem Anstieg der Barrierepermeabilität. Eine ähnliche Wirkung ist durch Caprat (Del Vecchio et al., 2012), Claudin-5-gerichtete monoklonale Antikörper (Hashimoto et al., 2017) und siRNA (Campbell et al., 2008) nachgewiesen.

Da Claudin-5 durch Peptidgabe in den Zell-Zell-Kontakten reduziert ist und gleichzeitig sowohl Claudin-5 als auch das Peptid intrazellulär akkumulieren, wird von einer gemeinsamen Endozytose der Peptid-Claudin-Komplexe ausgegangen (Abb. 46). Eine Assoziation ist wahrscheinlich, da C5C2 eine hohe Affinität zu Claudin-5 hat (Pfeil, 2014). Die Endozytose wird dabei über Caveolin vermittelt sein, da diese Form der Internalisierung sowohl für Claudin-5 (Stamatovic et al., 2009) als auch C5C2 (Zwanziger et al., 2012b) in Gehirnkapillarendothelzellen die größte Rolle spielt. Die Peptid-Internalisierung zusammen mit dem Zielprotein ist bereits für EZS-Peptide von Claudin-1 und Occludin bekannt (Beeman et al., 2009; Zwanziger et al., 2012a). Da das Maximum der zellulären Peptidaufnahme zeitlich mit der maximalen Ionendurchlässigkeit übereinstimmt (etwa 24 h nach Peptidbehandlung), wird die Annahme unterstützt, dass die Endozytose essenziell für die Wirkung ist.

Die in Kapitel 4.2 und 4.3 beschriebene BHS-Regenerationsfähigkeit *in vitro* (~24 h) und *in vivo* (≤ 12h) deuten eher auf eine Umverteilung der *Tight-Junction*-Proteine als auf deren Abbau und *de-novo*-Synthese hin. Dafür spricht, dass eine Downregulation dieser Proteine auf mRNA-Expressionsebene gemessen wurde. Daher ist es wahrscheinlich, dass Claudin-5 nach der Internalisierung in Recyclingendosomen wieder zur Zellmembran zurücktransportiert wird. Gestützt wird diese Annahme durch bekannte Ergebnisse von internalisiertem Claudin-5 sowie Claudin-C1C2-Komplexen, die sich größtenteils in den Recyclingendosomen und kaum in Lysosomen wiederfinden (Staat et al., 2015; Stamatovic et al., 2009).

Die Internalisierung der *Tight-Junction*-Proteine nach Claudin-5-Peptid-Behandlung folgt einer Verminderung der homo- und heterophilen Interaktionen. Das bedeutet, dass die Assoziation von Claudin-5-Molekülen untereinander aber auch mit Claudin-1, -3 und Occludin

beeinflusst werden, was durch Interaktionsstudien bewiesen ist (Cording et al., 2013; Piontek et al., 2011).

Die Schwächung des endothelialen *Tight-Junction*-Strangnetzwerks durch C5C2-Peptide, gezeigt durch eine Reduktion E-Face-assoziierter Partikel der *Tight-Junction*-Stränge, resultiert aus verminderten Interaktionen (Abb. 46). Diese sind wichtig für die strukturelle Stabilität der *Tight Junctions* (Piehl et al., 2010; Piontek et al., 2008). Die *Tight-Junction*-Stränge bleiben trotz Peptidgabe unverändert E-Face-assoziiert. Somit führen die Claudin-5-Peptide zu einer weniger drastischen und damit besser geeigneten *Tight-Junction*-Modulation im Vergleich zum Peptid C1C1, welches eine Umverteilung der Partikel von der E- zur P-Face bedingt (Staat et al., 2015).

Weitestgehend hat eine C5C2-Behandlung keine kompensatorische Hochregulation anderer *Tight-Junction*-Proteine zur Folge und deckt sich damit mit anderen Claudin-5-Studien der BHS (Campbell et al., 2008; Nitta et al., 2003). Allerdings ist Occludin nach Claudin-5-Peptid-Behandlung in den Zell-Zell-Kontakten reduziert. Da Occludin und Claudin-5 miteinander heterophil interagieren (Cording et al., 2013), kann auch C5C2 direkt an Occludin binden und somit die Interaktion stören. ZO-1 ist in den Zell-Zell-Kontakten ebenso reduziert. Durch die Internalisierung von Claudin-5 nach Peptidbindung ist die Beeinflussung von ZO-1 wahrscheinlich, da es direkt mit Claudin-5 assoziieren kann (Ruffer und Gerke, 2004). Eine Interaktion der Peptidomimetika mit den Claudinen 1, 3, 4, 11 und 12 wird durch hohe Sequenzunterschiede als unwahrscheinlich erachtet. Damit einhergehend sind diese Claudine durch die Peptide nicht verringert. Daher scheint die C5C2-Peptid-vermittelte BHS-Öffnung aus der Beeinflussung von Claudin-5, Occludin und ZO-1 zu resultieren (Abb. 46). Eine gemeinsame Verminderung dieser Proteine im BHS-Endothel ist bereits unter anderen Claudin-5-reduzierenden Bedingungen (z.B. Ischämie, Jiao et al., 2011; akutes Leberversagen, Chen et al., 2009; anderes Claudin-5-Peptid, Bocsik et al., 2016) erwiesen.

Nach Claudin-5-Peptid-Behandlung ist die mRNA von Claudin-5 downreguliert (Abb. 46). Bekannt ist, dass die Transkriptionsfaktoren FoxO1 und β-Catenin nach beeinträchtigter Funktion des *Adherens-Junction*-Proteins VE-Cadherin die Claudin-5-Transkription verringern (Taddei et al., 2008). Möglich ist, dass über die *Tight-Junction*-Veränderung durch Claudin-5-Peptide die Funktion und Lokalisation von VE-Cadherin beeinflusst ist. Dafür spricht, dass *Tight* und *Adherens Junctions* im Endothel als Mischkontakte vorliegen (Schulze und Firth, 1993) und dass bei BHS-Beeinträchtigung oftmals sowohl Claudin-5 als auch VE-Cadherin reduziert sind (Alvarez et al., 2015).

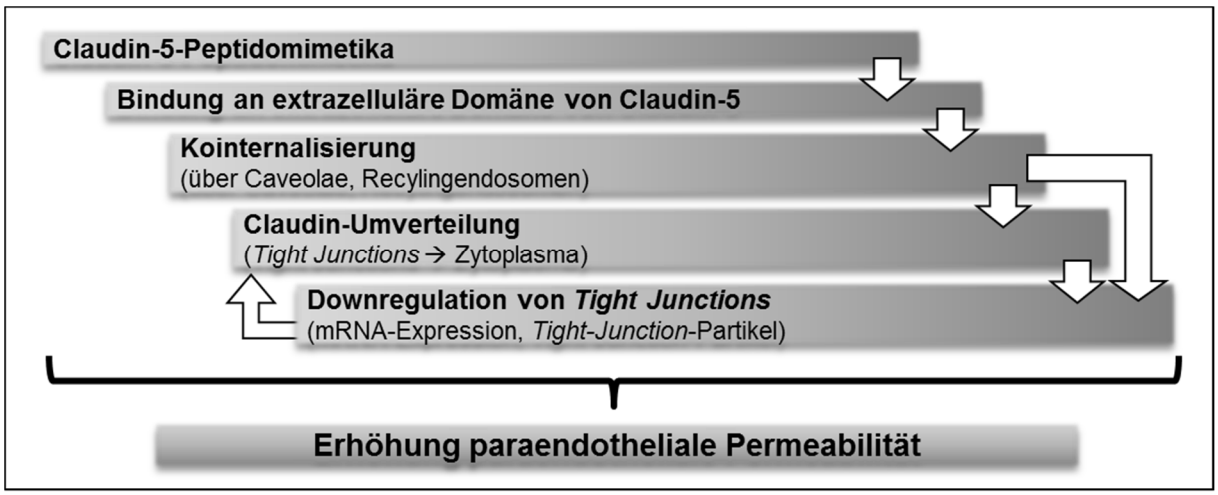


Abb. 46: Wirkungsmechanismus der Claudin-5-Peptidomimetika.

4.6 Weitere Indikationsgebiete der *Tight-Junction*-Modulation

Der Einsatz der Claudin-5-Peptide als Wirkverstärker üblicher Zytostatika kann ebenso zur gesteigerten Permeabilität anderer normalerweise nicht-BHS-gängiger, neurotherapeutischer Wirkstoffe eingesetzt werden. Neben dem Peptideffekt als Verstärker ist der Einsatz der Peptide selbst als Wirkstoff möglich. So können neurologische Schäden, hervorgerufen durch zerebrale Ödembildung nach Schlaganfall (Dostovic et al., 2016), Gehirntrauma (Campbell et al., 2012) oder Leberversagen (Lee et al., 2008) vermindert werden. Dazu könnte die Claudin-5-Peptid-vermittelte transiente Öffnung der BHS-*Tight-Junctions* direkt den Wasserefflux verbessern. Eine Downregulation von Claudin-5 wird zur Alzheimer-Behandlung diskutiert (Keaney et al., 2015) und wäre eine weitere Möglichkeit zur C5C2-Anwendung.

Die Peptide könnten auch bei Erkrankungen, die von einer Claudin-5-Hochregulation begleitet sind, verwendet werden. Bei chronischem Alkoholmissbrauch ist Claudin-5 im Alveolarepithel erhöht, wodurch die parazelluläre Permeabilität gesteigert ist und sich ein akutes Atemnotsyndrom anschließt (Schlingmann et al., 2016). Nach akuter Lungenschädigung mit perivaskulären Lungenödemen ist endotheliales Claudin-5 hochreguliert (Jang et al., 2010). Claudin-5-Peptide könnten beide parazelluläre Barrieren normalisieren.

Darüber hinaus sind Claudin-Peptide zur Diagnostik von Dysplasien beschrieben (Claudin-1-Peptid; Rabinsky et al., 2015). Als Diagnostikum könnten Peptide Einsatz finden, die keinen Effekt auf die Barrierepermeabilität zeigen (z.B. C5C2/C-4AS). Essenziell ist dabei eine spezifische Bindung zum Zielprotein. Denkbar wäre eine Diagnostik von Tumoren, die Claudin-5 überexprimieren (z.B. Ovarkarzinome; Turunen et al., 2009).

Neben Claudin-5 ist Claudin-12 in der BHS exprimiert, sorgt dort jedoch für keine Abdichtung. Dementsprechend wäre eine Claudin-12-Modulation z.B. mit Peptiden ungeeignet. Da

jedoch eine abdichtende Funktion für Claudin-12 in der Blut-Retina-Schranke nachgewiesen ist (Quin et al., 2015), könnte eine Claudin-12-Modulation zur Behandlung diabetischer Makulaödeme eingesetzt werden. Diese sind in der westlichen Welt der Hauptgrund für eine Erblindung von Patienten jünger als 65 Jahre (Romero-Aroca, 2011) und aktuelle Behandlungsmethoden wenig erfolgreich, nebenwirkungsreich oder nicht verfügbar (ICEH, 2015).

4.7 Charakterisierung von Claudin-12-Knockout-Mäusen

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung von Claudin-12, das durch seine BHS-Expression ein mögliches Zielprotein zur Modulation wäre. Nach Claudin-5 ist es dort das am stärksten exprimierte Claudin. Claudin-5-Peptide und ein Claudin-5-Knockout (Nitta et al., 2003) haben keinen Einfluss auf Claudin-12. Da der Knockout von Claudin-5 zur erhöhten BHS-Permeabilität für Moleküle bis zu 800 Da führt, wäre denkbar, dass Claudin-12 eine Durchlässigkeit für größere Moleküle verhindert, in dem es an der Abdichtung beteiligt ist (Nitta et al., 2003). Eigene Untersuchungen mittels Claudin-12-defizienten Mäusen belegen jedoch keine erhöhte BHS-Permeabilität für kleine (Na-Fluoreszein, 376 Da) und große (albumingebundenes Evans Blue, 68 kDa) Moleküle sowie keine Reduktion anderer *Tight-Junction*-Proteine. Das deutet darauf hin, dass Claudin-12 keine Funktion bei der Barrierebildung der BHS hat. Ein Zusammenhang zwischen geringer Ausbildung homophiler *cis*-Interaktionen (Piontek et al., 2011) und geringer Polymerisierung (Yamazaki et al., 2011) von Claudin-12 ist wahrscheinlich. So bleibt die Funktion des atypischen Claudin-12, das nur eine geringe Sequenzähnlichkeit (33-36 %) zu klassischen Claudinen aufweist (Haseloff et al., 2015), unklar und wurde näher charakterisiert.

Im Vergleich zum Gehirn ist Claudin-12 doppelt so stark im Myokard exprimiert, das hiermit erstmals beschrieben wird. Damit ist es nach Claudin-5 (Delfin et al., 2012; Mays et al., 2008; Sanford et al., 2005) das zweite *Tight-Junction*-Protein, welches myokardial nachgewiesen wird. Dort sind beide Claudine sehr hoch exprimiert. Für Claudin-5 ist belegt, dass es bei Kardiomyopathien oder Herzversagen reduziert ist (Delfin et al., 2012; Mays et al., 2008; Sanford et al., 2005; Swager et al., 2015). Dadurch kann angenommen werden, dass eine längere C5C2-Behandlung zur Beeinträchtigung der Herzfunktion führen könnte. Da jedoch die durchgeführten Peptidstudien über einen Zeitraum von 4 Wochen keine Anzeichen auf unerwünschte Effekte zeigen, sind Nebenwirkungen nicht zu erwarten.

Claudin-12-defiziente Mäuse deuten auf eine Funktion von Claudin-12 in der Aufrechterhaltung der Herzfunktion hin, da Arrhythmien und Kardiomyopathie in männlichen und weiblichen Mäusen auftreten (Bouabout und Monassier, 2016; Meziane et al., 2015). Dabei ist we-

der die Expression anderer Claudine, TAMP und ZO-1 noch die Lokalisation oder Struktur von Zell-Zell-Kontakten in den Kardiomyozyten beeinträchtigt. Das geht einher mit Ergebnissen zu Claudin-5, welches bei Kardiomyopathie downreguliert ist ohne andere myokardiale Zell-Zell-Kontaktproteine zu beeinflussen (Sanford et al., 2005). Claudin-12 ist in der lateralen Membran exprimiert. Nach Knockout fehlt es dort ohne einen Einfluss auf die Kardiomyozytenstruktur einschließlich der Glanzstreifen zu haben. Damit ähneln die Untersuchungen der Claudin-5-Reduktion bei Kardiomyopathien, bei denen Claudin-5 in der lateralen Membran reduziert ist ohne Glanzstreifenproteine zu verringern (Sanford et al., 2005).

Weiterhin werden im Mausherz erstmals 15 weitere Claudine beschrieben. Beispielsweise wurden Claudin-15 und -25 in sehr hohem Maße im Myokard detektiert. Claudin-15 bildet parazelluläre Kationenkanäle (Colegio et al., 2002) und könnte somit die Elektrophysiologie im Myokard beeinflussen. Für Claudin-25 ist eine abdichtende Funktion im Gehirnendothel beschrieben (Ohnishi et al., 2017), die Funktion im Herzen ist jedoch unklar. ZO-1 ist ebenfalls stark im Myokard exprimiert und lokalisiert in der lateralen Membran sowie in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten. Letzteres ist bereits beschrieben (Barker et al., 2002). Dessen hohe Expression ist damit zu erklären, da es ein wichtiges Strukturprotein ist, welches sowohl mit *Tight-Junction*- (Itoh et al., 1999) als auch mit *Gap-Junction*- (Giepmans und Moolenaar, 1998) und *Adherens-Junction*-Proteinen (Ikenouchi et al., 2007) interagiert.

In den myokardialen Glanzstreifen sind hiermit Claudin-5 und Claudin-11 nachgewiesen worden, die mit den Glanzstreifen-Proteinen Connexin-43 (*Gap Junctions*) und Desmoplakin (Desmosomen) kolokalisieren. Glanzstreifen sind aus Desmosomen, *Adherens Junctions* und *Gap Junctions* (Severs et al., 1993; Sommer und Johnson, 1970) aufgebaut. Elektronenmikroskopisch weisen eigene Resultate keine *Tight Junctions* auf. Das ist im Einvernehmen mit Literaturangaben, obwohl *Gap Junctions* (früher Nexus; Dewey und Barr, 1964; Sjöstrand et al., 1958) in manchen Studien mit *Tight Junctions* verwechselt werden (Farquhar und Palade, 1963). Durch die typische hexagonale (Revel und Karnovsky, 1967) und fünfschichtige Struktur (Karrer, 1960) wurden in dieser Arbeit *Gap Junctions* in myokardialen Glanzstreifen identifiziert. Daher stellt sich weiterhin die Frage, welche Bedeutung abdichtende *Tight-Junction*-Proteine in Glanzstreifen haben, die zur elektromechanischen Kopplung und elektrischen Homöostase durchlässig für Ionen und Signalmoleküle sein müssen.

Da das Fehlen von Claudin-12 in der lateralen Membran der Kardiomyozyten zu funktionellen Herzstörungen führt (Bouabout und Monassier, 2016; Meziane et al., 2015), sollte der Mechanismus näher untersucht werden. Bekannt ist, dass Claudin-12 an der Vitamin-D-abhängigen Ca^{2+}-Absorption in Enterozyten beteiligt ist (Christakos et al., 2010; Fujita et al.,

2008). Ca^{2+} ist essenziell für die elektromotorische Funktion des Myokards (Sejersted, 2011), die eng mit der Vitamin-D-abhängigen transzellulären Calciumaufnahme verbunden ist (Tishkoff et al., 2008). Eine wichtige Rolle spielt dabei der Vitamin-D-Rezeptor, der im Herzen exprimiert wird (Tishkoff et al., 2008). Ein Mangel des genannten Rezeptors führt zu Hypertrophie, Kardiomyopathie und Herzversagen (Rahman et al., 2007; Simpson et al., 2007; Xiang et al., 2005). Eigene Resultate belegen zwar keine Claudin-12-vermittelte Beeinflussung des Vitamin-D-Rezeptors im Herzen dafür eine Reduktion in Dünndarm und Pankreas, die eine sehr hohe Vitamin-D-Rezeptor-Expression aufweisen. Damit ist die beschriebene gegenseitige Beeinflussung von Claudin-12 und Vitamin-D-Rezeptor im Dünndarm (Fujita et al., 2008) auch nach Claudin-12-Knockout bestätigt. Ob Claudin-12 am Calciumhaushalt beteiligt ist und somit Einfluss auf die Herzfunktion hat, bleibt zu untersuchen.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde ein neues Claudin-5-Peptidomimetikum zur Verbesserung der Pharmakaaufnahme ins Gehirn entwickelt. Damit im Zusammenhang wurden Mechanismen der *Tight-Junction*-Modulation zur verbesserten Wirkstoffpermeabilität durch zelluläre Barrieren aufgeklärt.

Besonders bedeutsam waren Peptide, die aus der EZS1 des transmembranen *Tight-Junction*-Proteins Claudin-5 entlehnt waren, da sie in Permeabilitätsuntersuchungen zur transienten und nicht zytotoxischen Wirkstoffpenetration durch Zellbarrieren führen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist die Wirkung abhängig vom eingesetzten Peptid. Das heißt, es wurden Peptide identifiziert, die eine Barriereöffnung im stärkeren Maße für kleinere Moleküle mit geringerer Wirkdauer (z.B. C5C2/shifted) vermitteln, aber auch Peptide, die längere Effekte für große Moleküle bis 155 kDa (z.B. C5C2[S22N]) zur Folge haben. Das macht das Design größenselektiver Barriereöffner-Peptide für verschiedene Indikationen möglich. Ob die vielfältigen Peptidwirkungen aus sich unterscheidenden Bindungsaffinitäten resultieren, kann mittels Bindungsstudien überprüft werden.

D-AS-Peptide zeigen eine vergleichbare Wirkung, wenn sie enantiomer zur entsprechenden L-AS-Variante vorliegen, sind aber stabiler gegen proteolytischen Abbau. Diese Eigenschaft sorgt ebenso für eine stärkere Wirkung von D-AS-C5C2 *in vivo* im Vergleich zu den L-AS-Peptiden. Aufgrund der guten Tiergesundheit im Behandlungszeitraum ist D-AS-C5C2 potenziell zur Anwendung geeignet, da Nebenwirkungen im Rahmen einer peptidbasierten Kurzzeitbehandlung eine untergeordnete Rolle spielen dürften. Darüber hinaus wäre interessant zu bestimmen, in welchem Ausmaß die BHS bei systemischer Applikation für Plasma-

proteine ≤ 70 kDa durchlässig ist und ob es auf molekularer oder struktureller Ebene andere Claudin-5-Barrieren beeinflusst.

Ebenso wurde nachgewiesen, dass der Peptidansatz zu einer erhöhten Zytostatikagängigkeit *in vitro* und *in vivo* führt ohne entsprechende Wirkstoffe modifizieren zu müssen. Dadurch lässt sich in Gliom-tragenden Mäusen tendenziell der Tumor durch ein normalerweise unwirksames Zytostatikum reduzieren. Zur statistischen Absicherung müssten die Versuche wiederholt werden. Da die D-AS-Peptide trotz ihrer höheren Stabilität gegenüber Proteasen *in vivo* kürzer wirken als *in vitro*, könnte eine Stabilisierung der Peptide (z.B. durch Erhöhung der Albuminbindung) gegenüber Metabolisierungs- und Exkretionsprozessen angewendet werden.

Der Einfluss der Claudin-5-Peptide hatte eine Reduktion vorwiegend von Claudin-5 in Zell-Zell-Kontakten und dessen intrazelluläre Akkumulation zu Folge. Aufgrund von Angaben in der Literatur wird angenommen, dass der Peptid-Claudin-5-Komplex über Caveolin-abhängige Endozytose internalisiert wird. Die schnelle Barriereregeneration *in vitro* und *in vivo* unterstützen die Annahme, dass die Barrierefunktion auf ein für Claudin-5 bekanntes Claudin-Recycling zurückzuführen ist.

Auf ultrastruktureller Ebene führen Claudin-5-Peptide zur Störung des *Tight-Junction*-Strangnetzwerks. Daher wird anhand von Literaturangaben davon ausgegangen, dass die erhöhte parazelluläre Barrierepermeabilität unter Peptideinfluss durch morphologische Veränderungen der *Tight Junctions* bedingt wird. Überwiegend war die Peptid-Wirkung im Wesentlichen spezifisch über Claudin-5 sowie zum Teil über Occludin bzw. indirekt über ZO-1 vermittelt. Andere *Tight-Junction*-Proteine (Claudin-1, -3, -4, -11, -12) waren nicht wesentlich beeinflusst. Prinzipiell zeigen die N-terminal verlängerten Peptide C5C2/shifted und C5C2/N+5AS sowie die AS-Substitutionsvariante C5C2[S22N] ein breiteres Wirkspektrum, da sie auch Effekte auf Claudin-5-freie Zellsysteme zeigen. Daher sind sie aufgrund möglicher Nebenwirkungen nicht so gut für den *in-vivo*-Einsatz geeignet.

Strukturell ahmen die Peptide den entsprechenden Teil der EZS1-Claudin-Struktur nach, indem sie ein β-Faltblatt bilden, das durch eine C-terminale α-Helix stabilisiert wird. Beide Strukturelemente sind für die Assoziation an die EZS von Claudin-5 über Wasserstoffbrückenbindungen nötig. Andere Bindungen wie hydrophobe Wechselwirkungen werden angenommen. Für eine weiterführende Aufklärung der Aminosäuren, die an den Wechselwirkungen beteiligt sind, könnten AS-Substitutionsanalysen herangezogen werden.

Ein weiterer Ansatz zur BHS-Permeabilisierung war die Reduktion von Claudin-12, da es wie Claudin-5 im BHS-Endothel exprimiert wird. Claudin-12 ist weder durch Claudin-5-Peptide in der BHS beeinflusst noch führt ein Claudin-12-Knockout zur erhöhten BHS-Permeabilität *in vivo*, weswegen es ungeeignet zur BHS-Modulation erscheint. Generell zeigen sich Anhaltspunkte für eine Bedeutung von Claudin-12 auf die Herzfunktion, da eine Abwesenheit in der lateralen Membran der Kardiomyozyten Anzeichen für kardiomyopathische Veränderungen andeutet.

Andere *Tight-Junction*-Proteine sind nach Claudin-12-Knockout nicht beeinflusst. Generell wird eine hohe Expression der Zell-Zell-Kontaktproteine Claudin-5, -12, -15, -25 sowie ZO-1 im Myokard nachgewiesen. Insbesondere die Expression der Claudine 1, 5, 11 und 12 in den Glanzstreifen sowie in der lateralen Membran des Myokards könnten eine Rolle für die Funktion spielen. Da Claudin-12 einen Einfluss auf die Vitamin-D-Rezeptor-Expression in Dünndarm und Pankreas hat, wurde ausgehend von bekannten Untersuchungen eine Funktion in der Ca^{2+}-Homöostase vorhergesagt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Claudin-5-Peptide zur reversiblen und nicht zytotoxischen Modulation zellulärer Barrieren eignen, mit dem Ziel die Wirkstoffpenetration zu verbessern. Insbesondere haben die Peptide das Potenzial zur Verbesserung der BHS-Penetration für nicht-hirngängige Zytostatika zur Gehirntumorbehandlung. Durch ihre gute Verträglichkeit können sie darüber hinaus für vielfältige Indikationsgebiete in Erwägung gezogen werden. Claudin-12, exprimiert in der BHS, ist dagegen nicht als Zielprotein zur BHS-Modulation geeignet, scheint aber eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Herzfunktion zu haben.

Literaturverzeichnis

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., Begley, D. J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiology of Disease. 37**,** 13-25.

Abbott, N. J., Ronnback, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nature Reviews Neuroscience. 7**,** 41-53.

Abraham, C. S., Deli, M. A., Joo, F., Megyeri, P., Torpier, G., 1996. Intracarotid tumor necrosis factor-alpha administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: Quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. Neuroscience Letters. 208**,** 85-88.

Acharya, P., Beckel, J., Ruiz, W. G., Wang, E., Rojas, R., Birder, L., et al., 2004. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4,-8, and-12 in bladder epithelium. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 287**,** F305-F318.

Ahn, C., Yang, H., Lee, D., An, B. S., Jeung, E. B., 2015. Placental claudin expression and its regulation by endogenous sex steroid hormones. Steroids. 100**,** 44-51.

Akiyama, T., Niyonsaba, F., Kiatsurayanon, C., Nguyen, T. T., Ushio, H., Fujimura, T., et al., 2014. The Human Cathelicidin LL-37 Host Defense Peptide Upregulates Tight Junction-Related Proteins and Increases Human Epidermal Keratinocyte Barrier Function. Journal of Innate Immunity. 6**,** 739-753.

Alvarez, J. I., Cayrol, R., Prat, A., 2011. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease. 1812**,** 252-264.

Alvarez, J. I., Saint-Laurent, O., Godschalk, A., Terouz, S., Is, C. B., Larouche, S., et al., 2015. Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. Neurobiology of Disease. 74**,** 14-24.

Amasheh, S., Schmidt, T., Mahn, M., Florian, P., Mankertz, J., Tavalali, S., et al., 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. Cell and Tissue Research. 321**,** 89-96.

Anderson, J. M., Van Itallie, C. M., 2009. Physiology and Function of the Tight Junction. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1**,** 16.

Angst, B. D., Khan, L. U. R., Severs, N. J., Whitely, K., Rothery, S., Thompson, R. P., et al., 1997. Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. Circulation Research. 80**,** 88-94.

AppliedBiophysics, 2017, The ECIS method. Online im Internet, URL: http://www.biophysics.com/ecis-theory.php, Stand: 21.12.2017 19:37

Arba, F., Leigh, R., Inzitari, D., Warach, S. J., Luby, M., Lees, K. R., 2017. Blood-brain barrier leakage increases with small vessel disease in acute ischemic stroke. Neurology. 89**,** 2143-2150.

Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J. Y., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., et al., 2012. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. Journal of Clinical Investigation. 122**,** 2454-2468.

Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A., John, G., 2008. VEGF-A induces blood-brain barrier permeability via downregulation of endothelial CLN-5. Multiple Sclerosis. 14**,** S128-S128.

Asehnoune, K., Lasocki, S., Seguin, P., Geeraerts, T., Perrigault, P. F., Dahyot-Fizelier, C., et al., 2017. Association between continuous hyperosmolar therapy and survival in patients with traumatic brain injury - a multicentre prospective cohort study and systematic review. Critical Care. 21.

Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., Imhof, B. A., 2001. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. Blood. 98**,** 3699-3707.

Balda, M. S., Whitney, J. A., 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. Molecular Biology of the Cell. 7**,** 3534-3534.

Barker, R. J., Price, R. L., Gourdie, R. G., 2002. Increased association of ZO-1 with connexin-43 during remodeling of cardiac gap junctions. Circ Res. 90**,** 317-324.

Bartus, R. T., Snodgrass, P., Marsh, J., Agostino, M., Perkins, A., Emerich, D. F., 2000. Intravenous cereport (RMP-7) modifies topographic uptake profile of carboplatin within rat glioma and brain surrounding tumor, elevates platinum levels, and enhances survival. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 293**,** 903-911.

Bauer, H., Traweger, A., 2016. Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier - A Molecular Gatekeeper. Cns & Neurological Disorders-Drug Targets. 15**,** 1016-1029.

Bauer, H. C., Krizbai, I. A., Bauer, H., Traweger, A., 2014. "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. Frontiers in Neuroscience. 8.

Baum, B., Georgiou, M., 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. Journal of Cell Biology. 192**,** 907-917.

Baumgartner, H. K., Beeman, N., Hodges, R. S., Neville, M. C., 2011. A D-Peptide Analog of the Second Extracellular Loop of Claudin-3 and-4 Leads to MisLocalized Claudin and Cellular Apoptosis in Mammary Epithelial Cells. Chemical Biology & Drug Design. 77**,** 124-136.

Bazzoni, G., 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. Current Opinion in Cell Biology. 15**,** 525-530.

Bech, E. M., Martos-Maldonado, M. C., Wismann, P., Sorensen, K. K., van Witteloostuijn, S. B., Thygesen, M. B., et al., 2017. Peptide Half-Life Extension: Divalent, Small-Molecule Albumin Interactions Direct the Systemic Properties of Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) Analogues. Journal of Medicinal Chemistry. 60**,** 7434-7446.

Beeman, N. E., Baumgartner, H. K., Webb, P. G., Schaack, J. B., Neville, M. C., 2009. Disruption of occludin function in polarized epithelial cells activates the extrinsic pathway of apoptosis leading to cell extrusion without loss of transepithelial resistance. Bmc Cell Biology. 10**,** 12.

Begley, D. J., 2003. Understanding and circumventing the blood-brain barrier. Acta Paediatrica. 92**,** 83-91.

Belani, C. P., 2000. Paclitaxel and docetaxel combinations in non-small cell lung cancer. Chest. 117**,** 144S-151S.

Bellmann, C., Schreivogel, S., Günther, R., Dabrowski, S., Schümann, M., Wolburg, H., et al., 2014. Highly Conserved Cysteines Are Involved in the Oligomerization of Occludin-Redox Dependency of the Second Extracellular Loop. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING. 20**,** 855-867.

Ben-Yosef, T., Belyantseva, I. A., Saunders, T. L., Hughes, E. D., Kawamoto, K., Van Itallie, C. M., et al., 2003. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. Human Molecular Genetics. 12**,** 2049-2061.

Benson, K., Cramer, S., Galla, H. J., 2013. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. Fluids Barriers CNS. 10**,** 5.

Bernas, T., Dobrucki, J., 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. Cytometry. 47**,** 236-242.

Berndt, P., Claudins and tight junction-associated MARVEL proteins at the blood-brain barrier – contribution to paracellular barrier formation. Freie Universität Berlin, unv. Diss., 2017.

Bernhardt, D., Adeberg, S., Bozorgmehr, F., Opfermann, N., Hoerner-Rieber, J., Konig, L., et al., 2017. Outcome and prognostic factors in patients with brain metastases from small-cell lung cancer treated with whole brain radiotherapy. Journal of Neuro-Oncology. 134**,** 205-212.

Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S., 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 11**,** 127-152.

Biazik, J. M., Thompson, M. B., Murphy, C. R., 2008. Claudin-5 is restricted to the tight junction region of uterine epithelial cells in the uterus of pregnant/gravid squamate

reptiles. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. 291**,** 547-556.

Biron, K. E., Dickstein, D. L., Gopaul, R., Jefferies, W. A., 2011. Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease. Plos One. 6**,** 10.

Biswas, A., Das, K. P., 2004. SDS induced structural changes in alpha-crystallin and it's effect on refolding. Protein Journal. 23**,** 529-538.

Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., et al., 1998. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. Endocrinology. 139**,** 3485-3491.

Blasig, I. E., Winkler, L., Lassowski, B., Mueller, S. L., Zuleger, N., Krause, E., et al., 2006. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. Cell Mol Life Sci. 63**,** 504-514.

Bocsik, A., Walter, F. R., Gyebrovszki, A., Fulop, L., Blasig, I., Dabrowski, S., et al., 2016. Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides. Journal of Pharmaceutical Sciences. 105**,** 754-765.

Bouabout, G., Monassier, L., 2016. Phenotyping report. Comprehensive phenotyping of a Cldn12 mouse model (females). Institut Clinique de la Souris, Illkirch Cedex, FR.

Boven, L. A., Middel, J., Verhoef, J., De Groot, C. J. A., Nottet, H., 2000. Monocyte infiltration is highly associated with loss of the tight junction protein zonula occludens in HIV-1-associated dementia. Neuropathology and Applied Neurobiology. 26**,** 356-360.

Brandner, J. M., McIntyre, M., Kief, S., Wladykowski, E., Moll, I., 2003. Expression and localization of tight junction-associated proteins in human hair follicles. Archives of Dermatological Research. 295**,** 211-221.

Breitkreuz-Korff, O., Charakterisierung und Modulation von Claudinen zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Freie Universität Berlin, unv. Diss., 2018.

Brooks, T. A., Hawkins, B. T., Huber, J. D., Egleton, R. D., Davis, T. P., 2005. Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 289**,** H738-H743.

Brown, R. C., Morris, A. P., O'Neil, R. G., 2007. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. Brain Research. 1130**,** 17-30.

Brownson, E. A., Abbruscato, T. J., Gillespie, T. J., Hruby, V. J., Davis, T. P., 1994. Effect of peptidases at the blood-brain barrier on the permeability of enkaphalin. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 270**,** 675-680.

Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., Nusrat, A., 2005. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. Faseb Journal. 19**,** 923-933.

Brylev, L. V., Zakharova, M. N., Zavalishin, I. A., Gulyaeva, N. V., 2012. Disruption of Blood-Brain Barrier in Amyotrophic Lateral Sclerosis: an Update. Neurochemical Journal. 6**,** 64-70.

Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., Jones, D. T., 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. Nucleic Acids Research. 41**,** W349-W357.

Buck, M., 1998. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. Quarterly Reviews of Biophysics. 31**,** 297-355.

Bullock, R., 1995. Mannitol and other diuretics in severe neurotrauma. New Horiz. 3**,** 448-452.

Burgess, A., Ayala-Grosso, C. A., Ganguly, M., Jordao, J. F., Aubert, I., Hynynen, K., 2011. Targeted Delivery of Neural Stem Cells to the Brain Using MRI-Guided Focused Ultrasound to Disrupt the Blood-Brain Barrier. Plos One. 6**,** 6.

Burkhart, A., Thomsen, L. B., Thomsen, M. S., Lichota, J., Fazakas, C., Krizbai, I., et al., 2015. Transfection of brain capillary endothelial cells in primary culture with defined blood-brain barrier properties. Fluids and Barriers of the Cns. 12.

Butt, A. M., Jones, H. C., Abbott, N. J., 1990. Electical resistance across the blood-brain barrier in anesthetized rats - A developmental study. Journal of Physiology-London. 429**,** 47-62.

Callaghan, R., Luk, F., Bebawy, M., 2014. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? Drug Metabolism and Disposition. 42**,** 623-631.

Campagna, S., Vitoux, B., Humbert, G., Girardet, J. M., Linden, G., Haertle, T., et al., 1998. Conformational studies of a synthetic peptide from the putative lipid-binding domain of bovine milk component PP3. Journal of Dairy Science. 81**,** 3139-3148.

Campbell, M., Hanrahan, F., Gobbo, O. L., Kelly, M. E., Kiang, A. S., Humphries, M. M., et al., 2012. Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. Nature Communications. 3**,** 12.

Campbell, M., Humphries, M. M., Kiang, A. S., Nguyen, A. T. H., Gobbo, O. L., Tam, L. C. S., et al., 2011. Systemic low-molecular weight drug delivery to pre-selected neuronal regions. Embo Molecular Medicine. 3**,** 235-245.

Campbell, M., Kiang, A. S., Kenna, P. F., Kerskens, C., Blau, C., O'Dwyer, L., et al., 2008. RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. Journal of Gene Medicine. 10**,** 930-947.

Candela, P., Saint-Pol, J., Kuntz, M., Boucau, M. C., Lamartiniere, Y., Gosselet, F., et al., 2015. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. Brain Research. 1594**,** 15-26.

Cao, X. W., Surma, M. A., Simons, K., 2012. Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. Cell Research. 22**,** 793-805.

Cassier, P. A., Ray-Coquard, I., Sunyach, M. P., Lancry, L., Guastalla, J. P., Ferlay, C., et al., 2008. A Phase 2 Trial of Whole-brain Radiotherapy Combined With Intravenous Chemotherapy in Patients With Brain Metastases From Breast Cancer. Cancer. 113**,** 2532-2538.

Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P., et al., 2007. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. Nature Reviews Drug Discovery. 6**,** 650-661.

Cen, J., Liu, L., Li, M. S., He, L., Wang, L. J., Liu, Y. Q., et al., 2013. Alteration in P-glycoprotein at the bloodbrain barrier in the early period of MCAO in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 65**,** 665-672.

Cereijido, M., Gonzalezmariscal, L., Contreras, R. G., Gallardo, J. M., Garciavillegas, R., Valdes, J., 1993. The making of a tight junction. Journal of Cell Science. 127-132.

Cereijido, M., Valdes, J., Shoshani, L., Contreras, R. G., 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. Annual Review of Physiology. 60**,** 161-177.

Chen, C. H., Mayo, J. N., Gourdie, R. G., Johnstone, S. R., Isakson, B. E., Bearden, S. E., 2015a. The connexin 43/ZO-1 complex regulates cerebral endothelial F-actin architecture and migration. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 309**,** C600-C607.

Chen, F., Ohashi, N., Li, W. S., Eckman, C., Nguyen, J. H., 2009. Disruptions of Occludin and Claudin-5 in Brain Endothelial Cells In Vitro and in Brains of Mice with Acute Liver Failure. Hepatology. 50**,** 1914-1923.

Chen, P. L., Bakke, D., Kolodziej, L., Lodolce, J., Weber, C. R., Boone, D. L., et al., 2015b. Antrum Mucosal Protein-18 Peptide Targets Tight Junctions to Protect and Heal Barrier Structure and Function in Models of Inflammatory Bowel Disease. Inflammatory Bowel Diseases. 21**,** 2393-2402.

Chen, P. L., Kartha, S., Bissonnette, M., Hart, J., Toback, F. G., 2012. AMP-18 facilitates assembly and stabilization of tight junctions to protect the colonic mucosal barrier. Inflammatory Bowel Diseases. 18**,** 1749-1759.

Chen, S. C., Eiting, K., Cui, K. Y., Leonard, A. K., Morris, D., Li, C. Y., et al., 2006. Therapeutic utility of a novel tight junction modulating peptide for enhancing intranasal drug delivery. Journal of Pharmaceutical Sciences. 95**,** 1364-1371.

Choi, C. H., 2005. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. Cancer Cell International. 5.

Choudhuri, S., Sequence Alignment and Similarity Searching in Genomic Databases. In: S. Choudhuri, (Hg.), Bioinformatics for Beginners. Academic Press, London, Waltham, San Diego, 2014, pp. 133-155.

Christakos, S., Dhawan, P., Ajibade, D., Benn, B. S., Feng, J. J., Joshi, S. S., 2010. Mechanisms involved in vitamin D mediated intestinal calcium absorption and in non-classical actions of vitamin D. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 121**,** 183-187.

Chung, N. P. Y., Mruk, D., Mo, M. Y., Lee, W. M., Cheng, C. Y., 2001. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. Biology of Reproduction. 65**,** 1340-1351.

Coin, I., Beyermann, M., Bienert, M., 2007. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. Nature Protocols. 2**,** 3247-3256.

Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C., Anderson, J. M., 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 284**,** C1346-C1354.

Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C., Anderson, J. M., 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 283**,** C142-C147.

Cording, J., Arslan, B., Staat, C., Dithmer, S., Krug, S. M., Kruger, A., et al., 2017. Trictide, a tricellulin-derived peptide to overcome cellular barriers. Annals of the New York Academy of Sciences. 1405**,** 89-101.

Cording, J., Berg, J., Kading, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J. K., et al., 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.

Cordon-Cardo, C., Obrien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., Melamed, M. R., 1990. Expression of the multidrug resistance gene-product (P-glycoprotein) in human normal and tumor-tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 38**,** 1277-1287.

Corrêa, D. H. A., Ramos, C. H. I., 2009. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. African Journal of Biochemistry Research. 3**,** 164-173.

Correale, J., Villa, A., 2009. Cellular Elements of the Blood-Brain Barrier. Neurochemical Research. 34**,** 2067-2077.

Cosolo, W. C., Martinello, P., Louis, W. J., Christophidis, N., 1989. Blood-brain barrier disruption using mannitol - Time course and electron-microscopy studies. American Journal of Physiology. 256**,** R443-R447.

Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L., Johnson, L. G., 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 285**,** L1166-L1178.

Dabrowski, S., Staat, C., Zwanziger, D., Sauer, R. S., Bellmann, C., Gunther, R., et al., 2015. Redox-Sensitive Structure and Function of the First Extracellular Loop of the Cell-Cell Contact Protein Claudin-1: Lessons from Molecular Structure to Animals. Antioxidants & Redox Signaling. 22**,** 1-14.

Daugherty, B. L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J. D., Koval, M., 2007. Regulation of heterotypic claudin compatibility. Journal of Biological Chemistry. 282**,** 30005-30013.

De Benedetto, A., Rafaels, N. M., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Georas, S. N., Cheadle, C., et al., 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 127**,** 773-U439.

Del Vecchio, G., Tscheik, C., Tenz, K., Helms, H. C., Winkler, L., Blasig, R., et al., 2012. Sodium Caprate Transiently Opens Claudin-5-Containing Barriers at Tight Junctions of Epithelial and Endothelial Cells. Molecular Pharmaceutics. 9**,** 2523-2533.

Delfin, D. A., Xu, Y., Schill, K. E., Mays, T. A., Canan, B. D., Zang, K. E., et al., 2012. Sustaining Cardiac Claudin-5 Levels Prevents Functional Hallmarks of Cardiomyopathy in a Muscular Dystrophy Mouse Model. Molecular Therapy. 20**,** 1378-1383.

Dewey, M. M., Barr, L., 1964. Study of structure + distribution of nexus. Journal of Cell Biology. 23**,** 553-&.

Diao, L., Meibohm, B., 2013. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides. Clinical Pharmacokinetics. 52**,** 855-868.

Diaz-Perlas, C., Sanchez-Navarro, M., Oller-Salvia, B., Moreno, M., Teixido, M., Giralt, E., 2017. Phage display as a tool to discover blood-brain barrier (BBB)-shuttle peptides: panning against a human BBB cellular model. Biopolymers. 108.

Doi, A., Kawabata, S., Iida, K., Yokoyama, K., Kajimoto, Y., Kuroiwa, T., et al., 2008. Tumor-specific targeting of sodium borocaptate (BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy. Journal of Neuro-Oncology. 87**,** 287-294.

Dostovic, Z., Dostovic, E., Smajlovic, D., Ibrahimagic, O. C., Avdic, L., 2016. Brain Edema After Ischaemic Stroke. Med Arch. 70**,** 339-341.

Drion, N., Lemaire, M., Lefauconnier, J. M., Scherrmann, J. M., 1996. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. Journal of Neurochemistry. 67**,** 1688-1693.

Duffy, H. S., Fort, A. G., Spray, D. C., 2006. Cardiac connexins: Genes to nexus. Cardiovascular Gap Junctions. 42**,** 1-17.

Ebnet, K., 2017. Junctional Adhesion Molecules (JAMs): Cell Adhesion Receptors With Pleiotropic Functions in Cell Physiology and Development. Physiol Rev. 97**,** 1529-1554.

El-Bacha, R. S., Minn, A., 1999. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. Cellular and Molecular Biology. 45**,** 15-23.

Elfgen, A., Santiago-Schubel, B., Gremer, L., Kutzsche, J., Willbold, D., 2017. Surprisingly high stability of the A beta oligomer eliminating all-D-enantiomeric peptide D3 in media simulating the route of orally administered drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 107**,** 203-207.

Erdlenbruch, B., Alipour, M., Fricker, G., Miller, D. S., Kugler, W., Eibl, H., et al., 2003. Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. British Journal of Pharmacology. 140**,** 1201-1210.

Everett, R. S., Vanhook, M. K., Barozzi, N., Toth, I., Johnson, L. G., 2006. Specific modulation of airway epithelial tight junctions by apical application of an occludin peptide. Molecular Pharmacology. 69**,** 492-500.

Fanning, A. S., Anderson, J. M., Zonula Occludens-1 and-2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. In: M. Fromm, J. D. Schulzke, Hgg., Molecular Structure and Function of the Tight Junction: From Basic Mechanisms to Clinical Manifestations. Blackwell Publishing, Oxford, 2009, Vol. 1165, pp. 113-120.

Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., Anderson, J. M., 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. Journal of Biological Chemistry. 273**,** 29745-29753.

Fanning, A. S., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M., 2012. Zonula occludens-1 and-2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. Molecular Biology of the Cell. 23**,** 577-590.

Farquhar, M. G., Palade, G. E., 1963. Junctional complexes in various epithelia. Journal of Cell Biology. 17**,** 375-&.

Fauquette, W., Amourette, C., Dehouck, M. P., Diserbo, M., 2012. Radiation-induced blood-brain barrier damages: An in vitro study. Brain Research. 1433**,** 114-126.

Feldmann, M., Koepp, M., 2016. ABC Transporters and Drug Resistance in Patients with Epilepsy. Current Pharmaceutical Design. 22**,** 5793-5807.

Ferlay, J., Parkin, D. M., Steliarova-Foucher, E., 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. European Journal of Cancer. 46**,** 765-781.

Fine, R. L., Chen, J., Balmaceda, C., Bruce, J. N., Huang, M., Desai, M., et al., 2006. Randomized study of paclitaxel and tamoxifen deposition into human brain tumors: Implications for the treatment of metastatic brain tumors. Clinical Cancer Research. 12**,** 5770-5776.

Fontijn, R. D., Rohlena, J., van Marle, J., Pannekoek, H., Horrevoets, A. J. G., 2006. Limited contribution of claudin-5-dependent tight junction strands to endothelial barrier function. European Journal of Cell Biology. 85**,** 1131-1144.

Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L., et al., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. New England Journal of Medicine. 347**,** 975-982.

Fu, H. Y., McCarty, D. M., 2016. Crossing the blood-brain-barrier with viral vectors. Current Opinion in Virology. 21**,** 87-92.

Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., et al., 2006. Differential expression and subcellular localization of claudin-7,-8,-12,-13, and-15 along the mouse intestine. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 54**,** 933-944.

Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., et al., 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., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1998. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. Journal of Cell Biology. 141**,** 1539-1550.

Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., 2001. Conversion of Zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. Journal of Cell Biology. 153**,** 263-272.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., et al., 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. Journal of Cell Biology. 156**,** 1099-1111.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., et al., 1993. Occludin - A novel integral membrane-protein localizing at tight junctions. Journal of Cell Biology. 123**,** 1777-1788.

Furuse, M., Sasaki, H., Tsukita, S., 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. Journal of Cell Biology. 147**,** 891-903.

Furuse, M., Tsukita, S., 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. Trends in Cell Biology. 16**,** 181-188.

Gabathuler, R., 2010. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. Neurobiology of Disease. 37**,** 48-57.

Gaillard, P. J., Appeldoorn, C. C. M., Dorland, R., van Kregten, J., Manca, F., Vugts, D. J., et al., 2014. Pharmacokinetics, Brain Delivery, and Efficacy in Brain Tumor-Bearing Mice of Glutathione Pegylated Liposomal Doxorubicin (2B3-101). Plos One. 9.

Gao, P., Stieger, B., Noe, B., Fritschy, J. M., Meier, P. J., 1999. Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 47**,** 1255-1263.

Gavrilov, K., Saltzman, W. M., 2012. Therapeutic siRNA: Principles, Challenges, and Strategies. Yale J Biol Med. 85**,** 187-200.

Gehne, N., Lamik, A., Lehmann, M., Haseloff, R. F., Andjelkovic, A. V., Blasig, I. E., 2017. Cross-over endocytosis of claudins is mediated by interactions via their extracellular loops. Plos One. 12.

Giepmans, B. N. G., Moolenaar, W. H., 1998. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. Current Biology. 8**,** 931-934.

Goh, L. B., Spears, K. J., Yao, D. G., Ayrton, A., Morgan, P., Wolf, C. R., et al., 2002. Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man. Biochemical Pharmacology. 64**,** 1569-1578.

Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., Chamorro, D., 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1778**,** 729-756.

Gopal, R., Park, J. S., Seo, C. H., Park, Y., 2012. Applications of Circular Dichroism for Structural Analysis of Gelatin and Antimicrobial Peptides. International Journal of Molecular Sciences. 13**,** 3229-3244.

Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., Louvard, D., 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93**,** 10779-10784.

Greenfield, N., Fasman, G. D., 1969. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. Biochemistry. 8**,** 4108-&.

Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., Cyr, D. G., 2001. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinology. 142**,** 854-863.

Grone, J., Weber, B., Staub, E., Heinze, M., Klaman, I., Pilarsky, C., et al., 2007. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. International Journal of Colorectal Disease. 22**,** 651-659.

Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., Citi, S., 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: A scaffolding and signalling center. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1778**,** 601-613.

Günzel, D., 2017. Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology. 469**,** 35-44.

Günzel, D., Yu, A. S. L., 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiological Reviews. 93**,** 525-569.

Gurney, J. G., Krull, K. R., Kadan-Lottick, N., Nicholson, H. S., Nathan, P. C., Zebrack, B., et al., 2009. Social Outcomes in the Childhood Cancer Survivor Study Cohort. Journal of Clinical Oncology. 27**,** 2390-2395.

Gutstein, D. E., Liu, F. Y., Meyers, M. B., Choo, A., Fishman, G. I., 2003. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. Journal of Cell Science. 116**,** 875-885.

Hagenbuch, B., Meier, P. J., 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1609**,** 1-18.

Hamamoto, K., Kida, Y., Zhang, Y., Shimizu, T., Kuwano, K., 2002. Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions. Microbiology and Immunology. 46**,** 741-749.

Hartsock, A., Nelson, W. J., 2008. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1778**,** 660-669.

Hartz, A. M. S., Bauer, B., Soldner, E. L. B., Wolf, A., Boy, S., Backhaus, R., et al., 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.

Haseloff, R. F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H., Blasig, I. E., 2015. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects. Seminars in Cell & Developmental Biology. 38**,** 16-25.

Hashimoto, Y., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K., Kondoh, M., 2017. Claudin-targeted drug development using anti-claudin monoclonal antibodies to treat hepatitis and cancer. Annals of the New York Academy of Sciences. 1397**,** 5-16.

Haskins, J., Gu, L. J., Wittchen, E. S., Hibbard, J., Stevenson, B. R., 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. Journal of Cell Biology. 141**,** 199-208.

Haverfield, J. T., Meachem, S. J., Nicholls, P. K., Rainczuk, K. E., Simpson, E. R., Stanton, P. G., 2014. Differential Permeability of the Blood-Testis Barrier During Reinitiation of Spermatogenesis in Adult Male Rats. Endocrinology. 155**,** 1131-1144.

Heimans, J. J., Vermorken, J. B., Wolbers, J. G., Eeltink, C. M., Meijer, O. W. M., Taphoorn, M. J. B., et al., 1994. Paclitaxel (Taxol(R)) concentrations in brain-tumor tissue. Annals of Oncology. 5**,** 951-953.

Helms, H. C., Hersom, M., Kuhlmann, L. B., Badolo, L., Nielsen, C. U., Brodin, B., 2014. An Electrically Tight In Vitro Blood–Brain Barrier Model Displays Net Brain-to-Blood

Efflux of Substrates for the ABC Transporters, P-gp, Bcrp and Mrp-1. AAPS Journal. 16**,** 1046-1055.

Helms, H. C., Waagepetersen, H. S., Nielsen, C. U., Birger, B., 2010. Paracellular Tightness and Claudin-5 Expression is Increased in the BCEC/Astrocyte Blood–Brain Barrier Model by Increasing Media Buffer Capacity During Growth. AAPS Journal. 12**,** 759-770.

Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Bowser, R., Appel, S. H., 2009. Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS. Neurology. 72**,** 1614-1616.

Henson, J. W., Cordoncardo, C., Posner, J. B., 1992. P-glycoprotein expression in brain-tumors. Journal of Neuro-Oncology. 14**,** 37-43.

Herman, R. E., Makienko, E. G., Prieve, M. G., Fuller, M., Houston, M. E., Johnson, P. H., 2007. Phage display screening of epithelial cell monolayers treated with EGTA: Identification of peptide FDFWITP that modulates tight junction activity. Journal of Biomolecular Screening. 12**,** 1092-1101.

Herve, J. C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., 2004. Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1662**,** 22-41.

Hewitt, K. J., Agarwal, R., Morin, P. J., 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. Bmc Cancer. 6.

Higashida, T., Kreipke, C. W., Rafols, J. A., Peng, C. Y., Schafer, S., Schafer, P., et al., 2011. The role of hypoxia-inducible factor-la, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury Laboratory investigation. Journal of Neurosurgery. 114**,** 92-101.

Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., AndoAkatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., et al., 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. Journal of Cell Science. 110**,** 1603-1613.

Hong, S. Y., Oh, J. E., Lee, K. H., 1999. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. Biochemical Pharmacology. 58**,** 1775-1780.

Hoosain, F. G., Choonara, Y. E., Tomar, L. K., Kumar, P., Tyagi, C., du Toit, L. C., et al., 2015. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy. Biomed Research International.

Horio, M., Chin, K. V., Currier, S. J., Goldenberg, S., Williams, C., Pastan, I., et al., 1989. Trans-epithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney-cell epithelia. Journal of Biological Chemistry. 264**,** 14880-14884.

Hou, J. H., Gomes, A. S., Paul, D. L., Goodenough, D. A., 2006. Study of claudin function by RNA interference. Journal of Biological Chemistry. 281**,** 36117-36123.

Hou, J. H., Renigunta, A., Konrad, M., Gornes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., et al., 2008. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. Journal of Clinical Investigation. 118**,** 619-628.

Hou, J. H., 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.

Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse, S. F., et al., 2013. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. National Cancer Institute, Bethesda, USA.

Hua, C. H., Bass, J. K., Khan, R., Kun, L. E., Merchant, T. E., 2008. Hearing loss after radiotherapy for pediatric brain tumors: Effect of cochlear dose. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 72**,** 892-899.

Huber, J. D., Witt, K. A., Hom, S., Egleton, R. D., Mark, K. S., Davis, T. P., 2001. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 280**,** H1241-H1248.

Hughes, C. S., Vaden, S. L., Manaugh, C. A., Price, G. S., Hudson, L. C., 1998. Modulation of doxorubicin concentration by cyclosporin A in brain and testicular barrier tissues expressing P-glycoprotein in rats. Journal of Neuro-Oncology. 37**,** 45-54.

Hülper, P., Schulz-Schaeffer, W., Dullin, C., Hoffmann, P., Harper, J., Kurtzberg, L., et al., 2011. Tumor localization of an anti-TGF-beta antibody and its effects on gliomas. International Journal of Oncology. 38**,** 51-59.

Hülper, P., Veszelka, S., Walter, F. R., Wolburg, H., Fallier-Becker, P., Piontek, J., et al., 2013. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. British Journal of Pharmacology. 169**,** 1561-1573.

Hwang, I., Yang, H., Kang, H. S., Ahn, C. H., Lee, G. S., Hong, E. J., et al., 2014. Spatial expression of claudin family members in various organs of mice. Molecular Medicine Reports. 9**,** 1806-1812.

ICEH, 2015. International Centre for Eye Health: Preventing sight loss from maculopathy. Community Eye Health. 28**,** 67-68.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., Tsukita, S., 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. Journal of Cell Biology. 171**,** 939-945.

Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S., 2007. Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. Journal of Cell Biology. 176**,** 779-786.

Inai, T., Kobayashi, J., Shibata, Y., 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. European Journal of Cell Biology. 78**,** 849-855.

Inai, T., Sengoku, A., Hirose, E., Iida, H., Shibata, Y., 2007. Claudin-7 expressed on lateral membrane of rat epididymal epithelium does not form aberrant tight junction strands. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. 290**,** 1431-1438.

Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W., Takai, Y., 2004. Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. Seminars in Cell & Developmental Biology. 15**,** 643-656.

Ishihara, H., Kubota, H., Lindberg, R. L. P., Leppert, D., Gloor, S. M., Errede, M., et al., 2008. Endothelial cell barrier impairment induced by glioblastomas and transforming growth factor beta(2) involves matrix metalloproteinases and tight junction proteins. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 67**,** 435-448.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S., 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. Journal of Cell Biology. 147**,** 1351-1363.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., Tsukita, S., 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. Journal of Cell Biology. 138**,** 181-192.

Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., Tsukita, S., 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. Molecular Biology of the Cell. 12**,** 219A-219A.

Ivanov, A. I., Nusrat, A., Parkos, C. A., 2004. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. Molecular Biology of the Cell. 15**,** 176-188.

Iwamoto, N., Higashi, T., Furuse, M., 2014. Localization of Angulin-1/LSR and Tricellulin at Tricellular Contacts of Brain and Retinal Endothelial Cells in vivo. Cell Structure and Function. 39**,** 1-8.

Jang, A., Concel, V. J., Bein, K., Brant, K. A., Liu, S., Pope-Varsalona, H., et al., 2010. Endothelial Dysfunction and Claudin 5 Regulation during Acrolein-induced Lung Injury. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 181.

Jeffrey, G. A., 1997. An Introduction to Hydrogen Bonding. Oxford University Press.

Jesaitis, L. A., Goodenough, D. A., 1994. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila disks-large tumor-suppressor protein. Journal of Cell Biology. 124**,** 949-961.

Jiang, S. Z., Xia, R., Jiang, Y., Wang, L., Gao, F. B., 2014. Vascular Endothelial Growth Factors Enhance the Permeability of the Mouse Blood-brain Barrier. Plos One. 9.

Jiao, H. X., Wang, Z. H., Liu, Y. H., Wang, P., Xue, Y. X., 2011. Specific Role of Tight Junction Proteins Claudin-5, Occludin, and ZO-1 of the Blood-Brain Barrier in a Focal Cerebral Ischemic Insult. Journal of Molecular Neuroscience. 44**,** 130-139.

Johnson, D. R., O'Neill, B. P., 2012. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. Journal of Neuro-Oncology. 107**,** 359-364.

Johnson, L. G., 2005. Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions. Advanced Drug Delivery Reviews. 57**,** 111-121.

Johnson, P. H., Quay, S. C., 2005. Advances in nasal drug delivery through tight junction technology. Expert Opin Drug Deliv. 2**,** 281-298.

Jovov, B., Van Itallie, C. M., Shaheen, N. J., Carson, J. L., Gambling, T. M., Anderson, J. M., et al., 2007. Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 293**,** G1106-G1113.

Jungner, M., Siemund, R., Venturoli, D., Reinstrup, P., Schalen, W., Bentzer, P., 2016. Blood-brain barrier permeability following traumatic brain injury. Minerva Anestesiologica. 82**,** 525-533.

Kaitlin, K. I., 2014. CNS drugs have lower regulatory success rate, take longer to develop. Tufts CSDD Impact Reports. 16**,** 1-4.

Kamar, F. G., Posner, J. B., 2010. Brain Metastases. Seminars in Neurology. 30**,** 217-235.

Kamazawa, S., Kigawa, J., Kanamori, Y., Itamochi, H., Sato, S., Iba, T., et al., 2002. Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. Gynecologic Oncology. 86**,** 171-176.

Karrer, H. E., 1960. The striated musculature of blood vessels. 2. Cell Interconnections and cell surface. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. 8**,** 135-150.

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 Mol Biol. 763**,** 369-382.

Keaney, J., Walsh, D. M., O'Malley, T., Hudson, N., Crosbie, D. E., Loftus, T., et al., 2015. Autoregulated paracellular clearance of amyloid-beta across the blood-brain barrier. Science Advances. 1**,** 12.

Kim, O., Yoon, J. H., Choi, W. S., Ashktorab, H., Smoot, D. T., Nam, S. W., et al., 2016. Gastrokine 1 inhibits gastrin-induced cell proliferation. Gastric Cancer. 19**,** 381-391.

Kimelberg, H. K., 2004. Water homeostasis in the brain: Basic concepts. Neuroscience. 129**,** 851-860.

Kinugasa, T., Huo, Q., Higash, D., Shibaguchi, H., Kuroki, M., Tanaka, T., et al., 2007. Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. Anticancer Research. 27**,** 3729-3734.

Kirk, A., Campbell, S., Bass, P., Mason, J., Collins, J., 2010. Differential expression of claudin tight junction proteins in the human cortical nephron. Nephrology Dialysis Transplantation. 25**,** 2107-2119.

Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M., Brandner, J. M., 2013. Contribution of Tight Junction Proteins to Ion, Macromolecule, and Water Barrier in Keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology. 133**,** 1161-1169.

Kobrinsky, N. L., Packer, R. J., Boyett, J. M., Stanley, P., Shiminski-Maher, T., Allen, J. C., et al., 1999. Etoposide with or without mannitol for the treatment of recurrent or primarily unresponsive brain tumors: A Children's Cancer Group Study, CCG-9881. Journal of Neuro-Oncology. 45**,** 47-54.

Kojima, T., Ninomiya, T., Konno, T., Kohno, T., Taniguchi, M., Sawada, N., 2013. Expression of tricellulin in epithelial cells and non-epithelial cells. Histology and Histopathology. 28**,** 1383-1392.

Kondoh, M., Takahashi, A., Fujii, M., Yagi, K., Watanabe, Y., 2006. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 29**,** 1783-1789.

Koto, T., Takubo, K., Ishida, S., Shinoda, H., Inoue, M., Tsubota, K., et al., 2007. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. American Journal of Pathology. 170**,** 1389-1397.

Koval, M., Claudin Heterogeneity and Control of Lung Tight Junctions. In: D. Julius, (Hg.), Annual Review of Physiology, Vol 75. Annual Reviews, Palo Alto, 2013, Vol. 75, pp. 551-567.

Kozler, P., Pokorny, J., 2003. Altered blood-brain barrier permeability and its effect on the distribution of Evans blue and sodium fluorescein in the rat brain applied by intracarotid injection. Physiological Research. 52**,** 607-614.

Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., Blasig, I. E., 2008. Structure and function of claudins. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1778**,** 631-645.

Kreuter, J., Gelperina, S., 2008. Use of nanoparticles for cerebral cancer. Tumori. 94**,** 271-277.

Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J. K., et al., 2009. Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. Molecular Biology of the Cell. 20**,** 3713-3724.

Krug, S. M., Günzel, D., Conrad, M. P., Rosenthal, R., Fromm, A., Amasheh, S., et al., 2012. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. Cellular and Molecular Life Sciences. 69**,** 2765-2778.

Kurcinski, M., Jamroz, M., Blaszczyk, M., Kolinski, A., Kmiecik, S., 2015. CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. Nucleic Acids Research. 43**,** W419-W424.

Kwak, B. R., Pepper, M. S., Gros, D. B., Meda, P., 2001. Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. Molecular Biology of the Cell. 12**,** 831-845.

Lacaz-Vieira, F., Jaeger, M. M. M., Farshori, P., Kachar, B., 1999. Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. Journal of Membrane Biology. 168**,** 289-297.

Lameris, A. L., Huybers, S., Kaukinen, K., Makela, T. H., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G., et al., 2013. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 48**,** 58-69.

Laughton, S. J., Merchant, T. E., Sklar, C. A., Kun, L. E., Fouladi, M., Broniscer, A., et al., 2008. Endocrine outcomes for children with embryonal brain tumors after risk-adapted craniospinal and conformal primary-site irradiation and high-dose chemotherapy with stem-cell rescue on the SJMB-96 trial. Journal of Clinical Oncology. 26**,** 1112-1118.

Lee, W. M., Squires, R. H., Nyberg, S. L., Doo, E., Hoofnagle, J. H., 2008. Acute liver failure: Summary of a workshop. Hepatology. 47**,** 1401-1415.

Lesniak, M. S., Upadhyay, U., Goodwin, R., Tyler, B., Brem, H., 2005. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. Anticancer Research. 25**,** 3825-3831.

Li, C., Jiang, Z., Lu, W., Arrick, D., McCarter, K., Sun, H., 2016. Effect of obesity on early blood-brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia. Obesity Science & Practice. 2**,** 58-68.

Li, C. H., Shyu, M. K., Jhan, C., Cheng, Y. W., Tsai, C. H., Liu, C. W., et al., 2015a. Gold Nanoparticles Increase Endothelial Paracellular Permeability by Altering Components of Endothelial Tight Junctions, and Increase Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. Toxicological Sciences. 148**,** 192-203.

Li, D. X., Mrsny, R. J., 2000. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. Journal of Cell Biology. 148**,** 791-800.

Li, F., Tang, S., 2017. Targeting metastatic breast cancer with ANG1005, a novel peptide-paclitaxel conjugate that crosses the blood-brain-barrier (BBB). Genes & Diseases. 4**,** 1-3.

Li, J., Tang, J., Li, Y. J., Yu, J. Q., Zhang, B. S., Yu, C. H., 2015b. Pharmacokinetic profile of paclitaxel in the plasma, lung, and diaphragm following intravenous or intrapleural administration in rats. Thoracic Cancer. 6**,** 43-48.

Li, X. R., Saeki, R., Watari, A., Yagi, K., Kondoh, M., 2014. Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting. molecule, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 52**,** 132-137.

Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., et al., 2000. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. Acta Neuropathologica. 100**,** 323-331.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews. 23**,** 3-25.

Liu, H. L., Hua, M. Y., Chen, P. Y., Chu, P. C., Pan, C. H., Yang, H. W., et al., 2010. Blood-Brain Barrier Disruption with Focused Ultrasound Enhances Delivery of Chemotherapeutic Drugs for Glioblastoma Treatment. Radiology. 255**,** 415-425.

Liu, J., Weaver, J., Jin, X. C., Zhang, Y., Xu, J., Liu, K. J., et al., 2016. Nitric Oxide Interacts with Caveolin-1 to Facilitate Autophagy-Lysosome-Mediated Claudin-5 Degradation in Oxygen-Glucose Deprivation-Treated Endothelial Cells. Molecular Neurobiology. 53**,** 5935-5947.

Liu, S. F., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B., Wang, T. Y., 2009. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. Journal of Virology. 83**,** 2011-2014.

Liu, Y. B., Peterson, D. A., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. Journal of Neurochemistry. 69**,** 581-593.

Löscher, W., Potschka, H., 2002. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 301**,** 7-14.

Luo, Y., Xiao, W., Zhu, X. B., Mao, Y. N., Liu, X. L., Chen, X. Y., et al., 2011. Differential Expression of Claudins in Retinas during Normal Development and the Angiogenesis of Oxygen-Induced Retinopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 52**,** 7556-7564.

Maguire, C., Ramirez, S., Merkel, S., Sena-Esteves, M., Breakefield, X., 2014. Gene Therapy for the Nervous System: Challenges and New Strategies. Neurotherapeutics. 11**,** 817-839.

Mandel, I., Paperna, T., Volkowich, A., Merhav, M., Glass-Marmor, L., Miller, A., 2012. The Ubiquitin-Proteasome Pathway Regulates Claudin 5 Degradation. Journal of Cellular Biochemistry. 113**,** 2415-2423.

Marchi, N., Granata, T., Ghosh, C., Janigro, D., 2012. Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: Pathophysiologic role and therapeutic approaches. Epilepsia. 53**,** 1877-1886.

Mariano, C., Palmela, I., Pereira, P., Fernandes, A., Falcao, A. S., Cardoso, F. L., et al., 2013. Tricellulin expression in brain endothelial and neural cells. Cell and Tissue Research. 351**,** 397-407.

Mark, K. S., Davis, T. P., 2002. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 282**,** H1485-H1494.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., et al., 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. Journal of Cell Biology. 142**,** 117-127.

Martin, T. A., Jiang, W. G., 2009. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1788**,** 872-891.

Masuyama, A., Kondoh, M., Seguchi, H., Takahashi, A., Harada, M., Fujii, M., et al., 2005. Role of N-terminal amino acids in the absorption-enhancing effects of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 314**,** 789-795.

Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., Ottersen, O. P., 2010. The Perivascular Astroglial Sheath Provides a Complete Covering of the Brain Microvessels: An Electron Microscopic 3D Reconstruction. Glia. 58**,** 1094-1103.

Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., Balda, M. S., 2005. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. Current Opinion in Cell Biology. 17**,** 453-458.

Mays, T. A., Binkley, P. F., Lesinski, A., Doshi, A. A., Quaile, M. P., Margulies, K. B., et al., 2008. Claudin-5 levels are reduced in human end-stage cardiomyopalhy. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 45**,** 81-87.

McCabe, M. J., Foo, C. F. H., Dinger, M. E., Smooker, P. M., Stanton, P. G., 2016. Claudin-11 and occludin are major contributors to Sertoli cell tight junction function, in vitro. Asian Journal of Andrology. 18**,** 620-626.

McNeil, E., Capaldo, C. T., Macara, I. G., 2006. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. Molecular Biology of the Cell. 17**,** 1922-1932.

Meadows, A. T., Friedman, D. L., Neglia, J. P., Mertens, A. C., Donaldson, S. S., Stovall, M., et al., 2009. Second Neoplasms in Survivors of Childhood Cancer: Findings From the Childhood Cancer Survivor Study Cohort. Journal of Clinical Oncology. 27**,** 2356-2362.

Mehta, D., Malik, A. B., 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. Physiological Reviews. 86**,** 279-367.

Mehta, M., Vogelbaum, M. A., Chang, S., Patel, N., Neoplasms of the Central Nervous System. In: V. T. DeVita, et al., Hgg., Cancer: Principles & Practice of Oncology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2011, Vol. 9, pp. 1700-1749.

Mellas, R. E., Leigh, N. J., Nelson, J. W., McCall, A. D., Baker, O. J., 2015. Zonula Occludens-1, Occludin and E-cadherin Expression and Organization in Salivary Glands with Sjogren's Syndrome. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 63**,** 45-56.

Merali, Z., Huang, K., Mikulis, D., Silver, F., Kassner, A., 2017. Evolution of blood-brain-barrier permeability after acute ischemic stroke. Plos One. 12.

Meziane, H., Champy, M. F., Roux, M., Becker, J., Bouabout, G., Jacobs, H., 2015. Phenotyping report. Characterization of Cldn12-KO males. Institut Clinique de la Souris, Illkirch Cedex, FR.

Michinaga, S., Koyama, Y., 2015. Pathogenesis of Brain Edema and Investigation into Anti-Edema Drugs. International Journal of Molecular Sciences. 16**,** 9949-9975.

Mikitsh, J. L., Chacko, A. M., 2014. Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. Perspect Medicin Chem. 16**,** 11-24.

Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Günzel, D., Muller, D., Schulzke, J. D., et al., 2010. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1798**,** 2048-2057.

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., et al., 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. Febs Letters. 585**,** 606-612.

Mohammadi, M. T., Dehghani, G. A., 2014. Acute hypertension induces brain injury and blood-brain barrier disruption through reduction of claudins mRNA expression in rat. Pathology Research and Practice. 210**,** 985-990.

Montagne, A., Zhao, Z., Zlokovic, B. V., 2017. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? Journal of Experimental Medicine. 214**,** 3151-3169.

Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1999a. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96**,** 511-516.

Morita, K., Sasaki, H., Furuse, K., Furuse, M., Tsukita, S., Miyachi, Y., 2003. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. Experimental Dermatology. 12**,** 289-295.

Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., 1999b. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. Journal of Cell Biology. 147**,** 185-194.

Morris, M. E., Rodriguez-Cruz, V., Felmlee, M. A., 2017. SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. Aaps Journal. 19**,** 1317-1331.

Morrow, C. M. K., Tyagi, G., Simon, L., Carnes, K., Murphy, K. M., Cooke, P. S., et al., 2009. Claudin 5 Expression in Mouse Seminiferous Epithelium Is Dependent upon the Transcription Factor Ets Variant 5 and Contributes to Blood-Testis Barrier Function. Biology of Reproduction. 81**,** 871-879.

Mrsny, R. J., Brown, G. T., Gerner-Smidt, K., Buret, A. G., Meddings, J. B., Quan, C., et al., 2008. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. American Journal of Pathology. 172**,** 905-915.

Mulhern, R. K., Palmer, S. L., Merchant, T. E., Wallace, D., Kocak, M., Brouwers, P., et al., 2005. Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastorna. Journal of Clinical Oncology. 23**,** 5511-5519.

Murphy, E. S., Merchant, T. E., Wu, S. J., Xiong, X. P., Lukose, R., Wright, K. D., et al., 2012. Necrosis After Craniospinal Irradiation: Results From a Prospective Series of Children With Central Nervous System Embryonal Tumors. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 83**,** E655-E660.

Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T., et al., 2006. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. Journal of Cellular Physiology. 208**,** 123-132.

Nayak, L., Lee, E. Q., Wen, P. Y., 2012. Epidemiology of Brain Metastases. Current Oncology Reports. 14**,** 48-54.

Neglia, J. P., Robison, L. L., Stovall, M., Liu, Y., Packer, R. J., Hammond, S., et al., 2006. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. Journal of the National Cancer Institute. 98**,** 1528-1537.

Nemes, Z., Dietz, R., Luth, J. B., Gomba, S., Hackenthal, E., Gross, F., 1979. Pharmacological relevance of vital staining with neutral red. Experientia. 35**,** 1475-1476.

Nieder, C., Grosu, A. L., Spanne, O., Andratschke, N. H., Geinitz, H., 2012. Brain metastases in patients under 50 years of age: retrospective analysis. Clinical & Experimental Metastasis. 29**,** 949-956.

Niraula, T. P., Bhattarai, A., Chatterjee, S. K., 2014. Critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate in pure water and in methanol-water mixed solvent media in presence and absence of KCl by surface tension and viscosity methods. BIBECHANA. 11**,** 103-112.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., et al., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. Journal of Cell Biology. 161**,** 653-660.

Ohnishi, M., Ochiai, H., Matsuoka, K., Akagi, M., Nakayama, Y., Shima, A., et al., 2017. Claudin Domain Containing 1 Contributing to Endothelial Cell Adhesion Decreases in Presence of Cerebellar Hemorrhage. Journal of Neuroscience Research. 95**,** 2051-2058.

Ohnishi, T., Tamai, I., Sakanaka, K., Sakata, A., Yamashima, T., Yamashita, J., et al., 1995. In-vivo and in-vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. Biochemical Pharmacology. 49**,** 1541-1544.

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.

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. Journal of Neurochemistry. 104**,** 147-154.

Oller-Salvia, B., Sanchez-Navarro, M., Ciudad, S., Guiu, M., Arranz-Gibert, P., Garcia, C., et al., 2016. MiniAp-4: A Venom-Inspired Peptidomimetic for Brain Delivery. Angewandte Chemie-International Edition. 55**,** 572-575.

On, N. H., Mitchell, R., Savant, S. D., Bachmeier, C. J., Hatch, G. M., Miller, D. W., 2013. Examination of blood-brain barrier (BBB) integrity in a mouse brain tumor model. Journal of Neuro-Oncology. 111**,** 133-143.

Ose, A., Kusuhara, H., Endo, C., Tohyama, K., Miyajima, M., Kitamura, S., et al., 2010. Functional Characterization of Mouse Organic Anion Transporting Peptide 1a4 in the Uptake and Efflux of Drugs Across the Blood-Brain Barrier. Drug Metabolism and Disposition. 38**,** 168-176.

Oshima, T., Blaschuk, O., Gour, B., Symonds, M., Elrod, J. W., Sasaki, M., et al., 2003. Tight junction peptide antagonists enhance neutrophil trans-endothelial chemotaxis. Life Sciences. 73**,** 1729-1740.

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., et al., 2016. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. Neuro Oncol. 8**,** v1-v75.

Palmeira, A., Sousa, E., Vasconcelos, M. H., Pinto, M. M., 2012. Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds. Current Medicinal Chemistry. 19**,** 1946-2025.

Pardridge, W. M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. NeuroRx. 2**,** 3-14.

Pardridge, W. M., 2012. Drug transport across the blood-brain barrier. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 32**,** 1959-1972.

Park, E. J., Zhang, Y. Z., Vykhodtseva, N., McDannold, N., 2012. Ultrasound-mediated blood-brain/blood-tumor barrier disruption improves outcomes with trastuzumab in a breast cancer brain metastasis model. Journal of Controlled Release. 163**,** 277-284.

Patchell, R. A., 2003. The management of brain metastases. Cancer Treatment Reviews. 29**,** 533-540.

Peters, T. J., 1996. All about Albumin. Academic Press, San Diego, USA.

Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Muller, R., Uhl, R., et al., 2007. Chemotherapy of brain turmour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. Journal of Controlled Release. 117**,** 51-58.

Pfeiffer, F., Schafer, J., Lyck, R., Makrides, V., Brunner, S., Schaeren-Wiemers, N., et al., 2011. Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Acta Neuropathologica. 122**,** 601-614.

Pfeil, S., Charakterisierung der Struktur und Funktion des ersten extrazellulären Loops des Tight Junction Proteins Claudin-1. Freie Universität Berlin, unv. Diss., 2014.

Piehl, C., Piontek, J., Cording, J., Wolburg, H., Blasig, I. E., 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., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., et al., 2011. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. Cellular and Molecular Life Sciences. 68**,** 3903-3918.

Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., et al., 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. Faseb Journal. 22**,** 146-158.

Platta, C. S., Khuntia, D., Mehta, M. P., Suh, J. H., 2010. Current Treatment Strategies for Brain Metastasis and Complications From Therapeutic Techniques A Review of Current Literature. American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials. 33**,** 398-407.

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G., Intercellular Junctions. Cell Biology. Elsevier, Philadelphia, USA, 2016, pp. 543-553.

Ponka, P., Lok, C. N., 1999. The transferrin receptor: role in health and disease. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 31**,** 1111-1137.

Pope, J. L., Bhat, A. A., Sharma, A., Ahmad, R., Krishnan, M., Washington, M. K., et al., 2014. Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signalling. Gut. 63**,** 622-634.

Powell, D. W., 1981. Barrier function of epithelia. American Journal of Physiology. 241**,** G275-G288.

Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T., et al., 2005. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. Laboratory Investigation. 85**,** 1139-1162.

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.

Pritsker, M., Jones, P., Blumenthal, R., Shai, Y. C., 1998. A synthetic all D-amino acid peptide corresponding to the N-terminal sequence of HIV-1 gp41 recognizes the wild-type fusion peptide in the membrane and inhibits HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95**,** 7287-7292.

Quin, G. J., Lyons, B., Len, A. C. L., Madigan, M. C., Gillies, M. C., 2015. Proteome changes induced by laser in diabetic retinopathy. Clinical and Experimental Ophthalmology. 43**,** 180-187.

Rabinsky, E. F., Joshi, B. P., Pant, A., Zhou, J., Duan, X., Smith, A., et al., 2015. Overexpressed Claudin-1 Can Be Visualized Endoscopically in Colonic Adenomas In Vivo. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2**,** 222-237.

Rahman, A., Hershey, S., Ahmed, S., Nibbelink, K., Simpson, R. U., 2007. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 103**,** 416-419.

Rahner, C., Mitic, L. L., Anderson, J. M., 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology. 120**,** 411-422.

Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y. M., et al., 2010. Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. Molecular Biology of the Cell. 21**,** 1200-1213.

Rawson, R. A., 1943. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. American Journal of Physiology. 138**,** 0708-0717.

Readnower, R. D., Chavko, M., Adeeb, S., Conroy, M. D., Pauly, J. R., McCarron, R. M., et al., 2010. Increase in Blood-Brain Barrier Permeability, Oxidative Stress, and Activated Microglia in a Rat Model of Blast-Induced Traumatic Brain Injury. Journal of Neuroscience Research. 88**,** 3530-3539.

Regina, A., Demeule, M., Che, C., Lavallee, I., Poirier, J., Gabathuler, R., et al., 2008. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. British Journal of Pharmacology. 155**,** 185-197.

Revel, J. P., Karnovsky, M. J., 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of mouce heart and liver. Journal of Cell Biology. 33**,** C7-&.

Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: The European molecular biology open software suite. Trends in Genetics. 16**,** 276-277.

Ries, L. A. G., Percy, C. L., Bunin, G. R., Introduction. In: L. A. G. Ries, et al., Hgg., Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States. SEER Program 1975-1995. National Cancer Institute, SEER Program, Bethesda, USA, 1999.

Ris, M. D., Packer, R., Goldwein, J., Jones-Wallace, D., Boyett, J. M., 2001. Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma : A children's cancer group study. Journal of Clinical Oncology. 19**,** 3470-3476.

Risau, W., Wolburg, H., 1990. Development of the blood-brain barrier. Trends in Neurosciences. 13**,** 174-178.

Robertson, S. L., Smedley, J. G., McClane, B. A., 2010. Identification of a Claudin-4 Residue Important for Mediating the Host Cell Binding and Action of Clostridium perfringens Enterotoxin. Infection and Immunity. 78**,** 505-517.

Rodriguez-Boulan, E., Macara, I. G., 2014. Organization and execution of the epithelial polarity programme. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 15**,** 225-242.

Romero-Aroca, P., 2011. Managing diabetic macular edema: the leading cause of diabetes blindness. World J Diabetes. 2**,** 98-104.

Ronaldson, P. T., Finch, J. D., DeMarco, K. M., Quigley, C. E., Davis, T. P., 2011. Inflammatory Pain Signals an Increase in Functional Expression of Organic Anion Transporting Polypeptide 1a4 at the Blood-Brain Barrier. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 336**,** 827-839.

Rosenberg, G. A., 2012. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 32**,** 1139-1151.

Rossa, J., Ploeger, C., Vorreiter, F., Saleh, T., Protze, J., Günzel, D., et al., 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. Journal of Biological Chemistry. 289**,** 7641-7653.

Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols. 5**,** 725-738.

Rubio-Araiz, A., Porcu, F., Perez-Hernandez, M., Garcia-Gutierrez, M. S., Aracil-Fernandez, M. A., Gutierrez-Lopez, M. D., et al., 2017. Disruption of blood-brain barrier integrity in postmortem alcoholic brain: preclinical evidence of TLR4 involvement from a binge-like drinking model. Addiction Biology. 22**,** 1103-1116.

Ruffer, C., Gerke, V., 2004. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. European Journal of Cell Biology. 83**,** 135-144.

Saidijam, M., Karimi Dermani, F., Sohrabi, S., Patching, S. G., 2017. Efflux proteins at the blood-brain barrier: review and bioinformatics analysis. Xenobiotica. 1-27.

Saitoh, Y., Suzuki, H., Tani, K., Nishikawa, K., Irie, K., Ogura, Y., et al., 2015. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin. Science. 347**,** 775-778.

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., et al., 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. Journal of Cell Biology. 141**,** 397-408.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., et al., 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Molecular Biology of the Cell. 11**,** 4131-4142.

Sajja, R. K., Rahman, S., Cucullo, L., 2016. Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: A focus on the role of oxidative stress. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 36**,** 539-554.

Sal-Man, N., Gerber, D., Shai, Y., 2004. Hetero-assembly between all-L- and all-D-amino acid transmembrane domains: Forces involved and implication for inactivation of membrane proteins. Journal of Molecular Biology. 344**,** 855-864.

Sandoval, K. E., Witt, K. A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. Neurobiology of Disease. 32**,** 200-219.

Sanford, J. L., Edwards, J. D., Mays, T. A., Gong, B., Merriam, A. P., Rafael-Fortney, J. A., 2005. Claudin-5 localizes to the lateral membranes of cardiomyocytes and is altered in utrophin/dystrophin-deficient cardiomyopathic mice. J Mol Cell Cardiol. 38**,** 323-232.

Sas, D., Hu, M. C., Moe, O. W., Baum, M., 2008. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology. 295**,** R1713-R1719.

Sauer, R. S., Krug, S. M., Hackel, D., Staat, C., Konasin, N., Yang, S. B., et al., 2014. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. Journal of Controlled Release. 185**,** 88-98.

Schauber, J., Dorschner, R. A., Coda, A. B., Buchau, A. S., Liu, P. T., Kiken, D., et al., 2007. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. Journal of Clinical Investigation. 117**,** 803-811.

Schellenberg, A. E., Buist, R., Del Bigio, M. R., Toft-Hansen, H., Khorooshi, R., Owens, T., et al., 2012. Blood-brain barrier disruption in CCL2 transgenic mice during pertussis toxin-induced brain inflammation. Fluids Barriers CNS. 9**,** 10.

Schlingmann, B., Overgaard, C. E., Molina, S. A., Lynn, K. S., Mitchell, L. A., White, S. D., et al., 2016. Regulation of claudin/zonula occludens-1 complexes by hetero-claudin interactions. Nature Communications. 7**,** 14.

Schneeberger, E. E., Lynch, R. D., 2004. The tight junction: a multifunctional complex. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 286**,** C1213-C1228.

Schouten, L. J., Rutten, J., Huveneers, H. A. M., Twijnstra, A., 2002. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. Cancer. 94**,** 2698-2705.

Schulze, C., Firth, J. A., 1993. Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. Journal of Cell Science. 104**,** 773-782.

Schulzke, J. D., Gitter, A. H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., et al., 2005. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1669**,** 34-42.

Sejersted, O. M., 2011. Calcium controls cardiac function - by all means! Journal of Physiology-London. 589**,** 2919-2920.

Setiadi, A., Korim, W. S., Elsaafien, K., Yao, S. T., 2017. The role of the blood-brain barrier in hypertension. Exp Physiol.

Severs, N. J., Gourdie, R. G., Harfst, E., Peters, N. S., Green, C. R., 1993. Intercellular junctions and the application of microscopic techniques - The cardiac gap junction as a case model. Journal of Microscopy-Oxford. 169**,** 299-328.

Severson, E. A. P., C.A. , Structure and function of JAM proteins. In: L. K., (Hg.), Adhesion Molecules: Function and Inhibition. Progress in Inflammation Research. Birkhäuser Basel, 2007, pp. 271-288

Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., Tumer, J. R., Tight, Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. In: D. Julius, D. E. Clapham, Hgg., Annual Review of Physiology, Vol 73. Annual Reviews, Palo Alto, 2011, Vol. 73, pp. 283-309.

Shen, Y. M., Maupetit, J., Derreumaux, P., Tuffery, P., 2014. Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction. Journal of Chemical Theory and Computation. 10**,** 4745-4758.

Shimizu, F., Sano, Y., Maeda, T., Abe, M. A., Nakayama, H., Takahashi, R. I., et al., 2008. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. Journal of Cellular Physiology. 217**,** 388-399.

Shinoda, T., Shinya, N., Ito, K., Ohsawa, N., Terada, T., Hirata, K., et al., 2016. Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. Scientific Reports. 6.

Shrestha, A., Robertson, S. L., Garcia, J., Beingasser, J., McClane, B. A., Uzalb, F. A., 2014. A Synthetic Peptide Corresponding to the Extracellular Loop 2 Region of Claudin-4 Protects against Clostridium perfringens Enterotoxin In Vitro and In Vivo. Infection and Immunity. 82**,** 4778-4788.

Simpson, R. U., Hershey, S. H., Nibbelink, K. A., 2007. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 103**,** 521-524.

Sjöstrand, F. S., Anderssoncedergren, E., Dewey, M. M., 1958. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. Journal of Ultrastructure Research. 1**,** 271-287.

Soffietti, R., Cornu, P., Delattre, J. Y., Grant, R., Graus, F., Grisold, W., et al., 2006. EFNS Guidelines on diagnosis and treatment of brain metastases: report of an EFNS Task Force. European Journal of Neurology. 13**,** 674-681.

Sommer, J. R., Johnson, E. A., 1970. Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review. Am J Cardiol. 25**,** 184-194.

Song, K. S., Phi, J. H., Ceo, B. K., Wang, K. C., Lee, J. Y., Kim, D. G., et al., 2010. Long-term outcomes in children with glioblastoma. Journal of Neurosurgery-Pediatrics. 6**,** 145-149.

Soni, V., Kohli, D. V., Jain, S. K., 2008. Transferrin-conjugated liposomal system for improved delivery of 5-fluorouracil to brain. Journal of Drug Targeting. 16**,** 73-78.

Sparreboom, A., vanAsperen, J., Mayer, U., Schinkel, A. H., Smit, J. W., Meijer, D. K. F., et al., 1997. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94**,** 2031-2035.

Spindler, K. R., Hsu, T. H., 2012. Viral disruption of the blood brain barrier. Trends in Microbiology. 20**,** 282-290.

Staat, C., Claudin-Peptide zur Modulation der *tight junction*-Dichtheit. Freie Universität Berlin, unv. Diss., 2015.

Staat, C., Coisne, C., Dabrowski, S., Stamatovic, S. M., Andjelkovic, A. V., Wolburg, H., et al., 2015. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. Biomaterials. 54**,** 9-20.

Staehelin, L. A., 1973. Further obxervations on fine-structure of freeze-cleaved tight junctions. Journal of Cell Science. 13**,** 763-786.

Stamatovic, S. M., Keep, R. F., Wang, M. M., Jankovic, I., Andjelkovic, A. V., 2009. Caveolae-mediated Internalization of Occludin and Claudin-5 during CCL2-induced Tight Junction Remodeling in Brain Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry. 284**,** 19053-19066.

Steed, E., Rodrigues, N. T. L., Balda, M. S., Matter, K., 2009. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. Bmc Cell Biology. 10**,** 14.

Steinemann, A., Galm, I., Chip, S., Nitsch, C., Maly, L. P., 2016. Claudin-1,-2 and-3 Are Selectively Expressed in the Epithelia of the Choroid Plexus of the Mouse from Early Development and into Adulthood While Claudin-5 is Restricted to Endothelial Cells. Frontiers in Neuroanatomy. 10.

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., Goodenough, D. A., 1986. Identification of ZO-1 - A high-molecular-weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. Journal of Cell Biology. 103**,** 755-766.

Stolwijk, J. A., Matrougui, K., Renken, C. W., Trebak, M., 2015. Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology. 467**,** 2193-2218.

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., et al., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncology. 10**,** 459-466.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Beuf, M. J., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma (vol 352, pg 19, 2005). Annals of Oncology. 16**,** 949-949.

Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., et al., 2014. Crystal Structure of a Claudin Provides Insight into the Architecture of Tight Junctions. Science. 344**,** 304-307.

Swager, S. A., Delfin, D. A., Rastogi, N., Wang, H. L., Canan, B. D., Fedorov, V. V., et al., 2015. Claudin-5 levels are reduced from multiple cell types in human failing hearts and are associated with mislocalization of ephrin-B1. Cardiovascular Pathology. 24**,** 160-167.

Syed, S., Schuyler, P. D., Kulczycky, M., Sheffield, W. P., 1997. Potent antithrombin activity and delayed clearance from the circulation characterize recombinant hirudin genetically fused to albumin. Blood. 89**,** 3243-3252.

Szulcek, R., Bogaard, H. J., Amerongen, G. P. V., 2014. Electric Cell-substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility. Jove-Journal of Visualized Experiments.

Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., et al., 2008. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. Nature Cell Biology. 10**,** 923-934.

Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., Fujii, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y., et al., 2005. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium

perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. Journal of Controlled Release. 108**,** 56-62.

Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., et al., 2009. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. Journal of Cell Science. 122**,** 985-994.

Tanaka, H., Yamamoto, Y., Kashihara, H., Yamazaki, Y., Tani, K., Fujiyoshi, Y., et al., 2016. Claudin-21 Has a Paracellular Channel Role at Tight Junctions. Molecular and Cellular Biology. 36**,** 954-964.

Tang, F. X., Horie, K., Borchardt, R. T., 2002. Are MDCK cells transfected with the human MRP2 gene a good model of the human intestinal mucosa? Pharmaceutical Research. 19**,** 773-779.

Tavelin, S., Hashimoto, K., Malkinson, J., Lazorova, L., Toth, I., Artursson, P., 2003. A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides. Molecular Pharmacology. 64**,** 1530-1540.

Thevenet, P., Shen, Y. M., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P., Tuffery, P., 2012. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. Nucleic Acids Research. 40**,** W288-W293.

Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S., Garrod, D. R., 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. Biochemical Journal. 429**,** 419-433.

Thompson, B. J., Sanchez-Covarrubias, L., Slosky, L. M., Zhang, Y. F., Laracuente, M. L., Ronaldson, P. T., 2014. Hypoxia/reoxygenation stress signals an increase in organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) at the blood-brain barrier: relevance to CNS drug delivery. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 34**,** 699-707.

Tishkoff, D. X., Nibbelink, K. A., Holmberg, K. H., Dandu, L., Simpson, R. U., 2008. Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. Endocrinology. 149**,** 558-564.

Toback, F. G., Walsh-Reitz, M. M., Musch, M. W., Chang, E. B., Del Valle, J., Ren, H. Y., et al., 2003. Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 285**,** G344-G353.

Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., et al., 2015. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. Journal of Cell Biology. 208**,** 821-838.

Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I. A., Weiger, T. M., Bauer, H. C., Bauer, H., 2003. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. Journal of Biological Chemistry. 278**,** 2692-2700.

Troy, T. C., Rahbar, R., Arabzadeh, A., Cheung, R. M. K., Turksen, K., 2005. Delayed epidermal permeability barrier formation and hair follicle aberrations in Inv-Cldn6 mice. Mechanisms of Development. 122**,** 805-819.

Tsuji, A., 1998. P-glycoprotein-mediated efflux transport of anticancer drugs at the blood-brain barrier. Therapeutic Drug Monitoring. 20**,** 588-590.

Tsuji, A., 2005. Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems. NeuroRx. 2**,** 54-62.

Tunggal, J. A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Günzel, D., Fromm, M., et al., 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. Embo Journal. 24**,** 1146-1156.

Turunen, M., Talvensaari-Mattila, A., Soini, Y., Santala, M., 2009. Claudin-5 Overexpression Correlates with Aggressive Behavior in Serous Ovarian Adenocarcinoma. Anticancer Research. 29**,** 5185-5189.

Uehara, K., Uehara, A., 2008. Localization of claudin-5 and ZO-1 in rat spleen sinus endothelial cells. Histochemistry and Cell Biology. 129**,** 95-103.

Ulldemolins, M., Roberts, J. A., Wallis, S. C., Rello, J., Lipman, J., 2010. Flucloxacillin dosing in critically ill patients with hypoalbuminaemia: special emphasis on unbound pharmacokinetics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 65**,** 1771-1778.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research. 40.

van der Goes, A., Wouters, D., van der Pol, S. M. A., Huizinga, R., Ronken, E., Adamson, P., et al., 2001. Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro. Faseb Journal. 15**,** 1852-+.

Van Itallie, C., Rahner, C., Anderson, J. M., 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. Journal of Clinical Investigation. 107**,** 1319-1327.

Van Itallie, C. M., Mitic, L. L., Anderson, J. M., 2011. Claudin-2 Forms Homodimers and Is a Component of a High Molecular Weight Protein Complex. Journal of Biological Chemistry. 286**,** 3442-3450.

Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J., Anderson, J. M., 2006. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 291**,** F1288-F1299.

van Sorge, N. M., Doran, K. S., 2012. Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners. Future Microbiology. 7**,** 383-394.

Venkat, P., Chopp, M., Chen, J., 2017. Blood-Brain Barrier Disruption, Vascular Impairment, and Ischemia/Reperfusion Damage in Diabetic Stroke. Journal of the American Heart Association. 6.

Veshnyakova, A., Krug, S. M., Mueller, S. L., Piontek, J., Protze, J., Fromm, M., et al., Determinants contributing to claudin ion channel formation. In: M. Fromm, J. D. Schulzke, Hgg., Barriers and Channels Formed by Tight Junction Proteins I. Blackwell Science Publ, Oxford, 2012, Vol. 1257, pp. 45-53.

Vietor, I., Bader, T., Paiha, K., Huber, L. A., 2001. Perturbation of the tight junction permeability barrier by occludin loop peptides activates beta-catenin/TCF/LEF-mediated transcription. Embo Reports. 2**,** 306-312.

Villegas, J. C., Broadwell, R. D., 1993. Trancytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endotheium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. Journal of Neurocytology. 22**,** 67-80.

von Wedel-Parlow, M., Wolte, P., Galla, H. J., 2009. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. Journal of Neurochemistry. 111**,** 111-118.

Wagner, R., Kachar, B., 1995. Linear gap and tight junctional assemblies between capillary endothelial cells in the eel rete-mirabile. Anatomical Record. 242**,** 545-552.

Wakai, A., McCabe, A., Roberts, I., Schierhout, G., 2013. Mannitol for acute traumatic brain injury. Cochrane Database of Systematic Reviews. 24.

Walsh-Reitz, M. M., Huang, E. F., Musch, M. W., Chang, E. B., Martin, T. E., Kartha, S., et al., 2005. AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 289**,** G163-G171.

Wang, B., Li, S., Cao, X., Dou, X., Li, J., Wang, L., et al., 2017. Blood-brain barrier disruption leads to postoperative cognitive dysfunction. Curr Neurovasc Res.

Wang, F. S., Daugherty, B., Keise, L. L., Wei, Z. Y., Foley, J. P., Savani, R. C., et al., 2003. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 29**,** 62-70.

Wang, Z., Chen, Y. Y., Liang, H., Bender, A., Glen, R. C., Yan, A. X., 2011. P-glycoprotein Substrate Models Using Support Vector Machines Based on a Comprehensive Data set. Journal of Chemical Information and Modeling. 51**,** 1447-1456.

Warren, K., Jakacki, R., Widemann, B., Aikin, A., Libucha, M., Packer, R., et al., 2006. Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 58**,** 343-347.

Watanabe, T., Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., et al., 2013. Paracellular Barrier and Tight Junction Protein Expression in the Immortalized Brain Endothelial Cell Lines bEND.3, bEND.5 and Mouse Brain Endothelial Cell 4. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 36**,** 492-495.

Watson, P. M., Anderson, J. M., Vanltallie, C. M., Doctrow, S. R., 1991. The tight-junction-specific protein ZO-1 is a component of the human and rat blood-brain barriers. Neuroscience Letters. 129**,** 6-10.

Wegener, J., Sieber, M., Galla, H. J., 1996. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 32**,** 151-170.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P. O., 2009. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1788**,** 842-857.

Wen, H. J., Watry, D. D., Marcondes, M. C. G., Fox, H. S., 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. Molecular and Cellular Biology. 24**,** 8408-8417.

Wen, L., Tan, Y., Dai, S., Zhu, Y., Meng, T., Yang, X., et al., 2017. VEGF-mediated tight junctions pathological fenestration enhances doxorubicin-loaded glycolipid-like nanoparticles traversing BBB for glioblastoma-targeting therapy. Drug Deliv. 24**,** 1843-1855.

Werle, M., Bernkop-Schnurch, A., 2006. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. Amino Acids. 30**,** 351-367.

Werle, M., Föger, F., 2017. Peroral peptide delivery: Peptidase inhibition as a key concept for commercial drug products. Bioorg Med Chem. 30872-6.

Winckler, J., 1974. Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral Red. Prog. Histochem. Cytochem. 6**,** 1-89.

Wind, N. S., Holen, I., 2011. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From In Vitro Models to Clinical Studies. Int J Breast Cancer. 2011**,** 967419.

Winkler, E. A., Bell, R. D., Zlokovic, B. V., 2011. Central nervous system pericytes in health and disease. Nature Neuroscience. 14**,** 1398-1405.

Winkler, L., Gehring, C., Wenzel, A., Müller, S. L., Piehl, C., Krause, G., et al., 2009. Molecular Determinants of the Interaction between Clostridium perfringens Enterotoxin Fragments and Claudin-3. Journal of Biological Chemistry. 284**,** 18863-18872.

Wolburg, H., Liebner, S., Lippoldt, A., 2003a. Freeze-fracture studies of cerebral endothelial tight junctions. Methods Mol Med. 89**,** 51-66.

Wolburg, H., Lippoldt, A., 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. Vascular Pharmacology. 38**,** 323-337.

Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. Cell and Tissue Research. 335**,** 75-96.

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., et al., 2003b. 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.

Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Liebner, S., Engelhardt, B., 2001. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. Neuroscience Letters. 307**,** 77-80.

Wolman, M., Klatzo, I., Chui, E., Wilmes, F., Nishimoto, K., Fujiwara, K., et al., 1981. Evaluation of the dye-protein tracers in pathp-physiology of the blood-brain barrier. Acta Neuropathologica. 54**,** 55-61.

Wong, C. H., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y., 2007. Targeted and reversible disruption of the blood-testis barrier by an FSH mutant-occludin peptide conjugate. Faseb Journal. 21**,** 438-448.

Wong, V., 1997. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 273**,** C1859-C1867.

Wong, V., Gumbiner, B. M., 1997. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. Journal of Cell Biology. 136**,** 399-409.

Worzfeld, T., Schwaninger, M., 2016. Apicobasal polarity of brain endothelial cells. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 36**,** 340-362.

Wunder, A., Schoknecht, K., Stanimirovic, D. B., Prager, O., Chassidim, Y., 2012. Imaging blood-brain barrier dysfunction in animal disease models. Epilepsia. 53**,** 14-21.

Xiang, W., Kong, J., Chen, S. C., Cao, L. P., Qiao, G. L., Zheng, W., et al., 2005. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 288**,** E125-E132.

Xie, H., Xue, Y. X., Liu, L. B., Liu, Y. H., 2010. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of tight junction associated proteins. Brain Research. 1319**,** 13-20.

Yamazaki, Y., Tokumasu, R., Kimura, H., Tsukita, S., 2011. Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. Molecular Biology of the Cell. 22**,** 1495-1504.

Yang, J. T., Wu, C. S. C., Martinez, H. M., 1986. Calculation of protein conformation from cicrular dichroism. Methods in Enzymology. 130**,** 208-269.

Yeung, D., Manias, J. L., Stewart, D. J., Nag, S., 2008. Decreased junctional adhesion molecule-A expression during blood-brain barrier breakdown. Acta Neuropathologica. 115**,** 635-642.

Yoon, J. H., Choi, W. S., Kim, O., Park, W. S., 2014. The role of gastrokine 1 in gastric cancer. J Gastric Cancer. 14**,** 147-155.

Yu, A. S. L., Enck, A. H., Lencer, W. I., Schneeberger, E. E., 2003. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. Journal of Biological Chemistry. 278**,** 17350-17359.

Yuan, J. H., Lv, H., Peng, B., Wang, C. K., Yu, Y. H., He, Z. M., 2009. Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 63**,** 1103-1110.

Zeltzer, L. K., Recklitis, C., Buchbinder, D., Zebrack, B., Casillas, J., Tsao, J. C. I., et al., 2009. Psychological Status in Childhood Cancer Survivors: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. Journal of Clinical Oncology. 27**,** 2396-2404.

Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. Bmc Bioinformatics. 9.

Zhang, Y., Pardridge, W. M., 2001. Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. Journal of Neurochemistry. 76**,** 1597-1600.

Zhang, Y. N., Yeh, S., Appleton, B. A., Held, H. A., Kausalya, P. J., Phua, D. C. Y., et al., 2006. Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families. Journal of Biological Chemistry. 281**,** 22299-22311.

Zhao, M., Liang, C., Li, A. M., Chang, J., Wang, H. J., Yan, R. M., et al., 2010. Magnetic Paclitaxel Nanoparticles Inhibit Glioma Growth and Improve the Survival of Rats Bearing Glioma Xenografts. Anticancer Research. 30**,** 2217-2223.

Zhao, Y. N., Wang, F., Fan, Y. X., Ping, G. F., Yang, J. Y., Wu, C. F., 2013. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. Behavioural Brain Research. 236**,** 270-282.

Zhong, L. X., Johnson, W. C., 1992. Environment affects amino-acid preference for secondary structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89**,** 4462-4465.

Zlokovic, B. V., 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. Nature Reviews Neuroscience. 12**,** 723-738.

Zwanziger, D., Hackel, D., Staat, C., Bocker, A., Brack, A., Beyermann, M., et al., 2012a. A Peptidomimetic Tight Junction Modulator To Improve Regional Analgesia. Molecular Pharmaceutics. 9**,** 1785-1794.

Zwanziger, D., Staat, C., Andjelkovic, A. V., Blasig, I. E., Claudin-derived peptides are internalized via specific endocytosis pathways. In: M. Fromm, J. D. Schulzke, Hgg., Barriers and Channels Formed by Tight Junction Proteins I. Blackwell Science Publ, Oxford, 2012b, Vol. 1257, pp. 29-37.

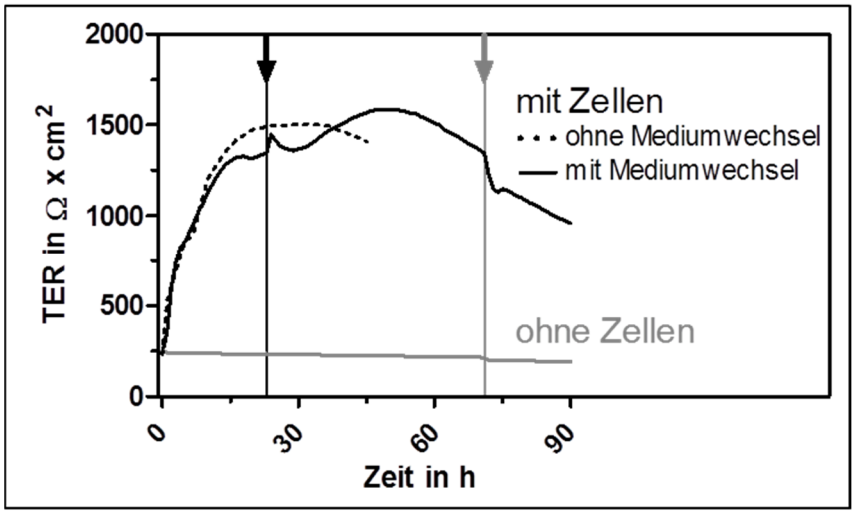
Eidesstattliche Erklärung

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 angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

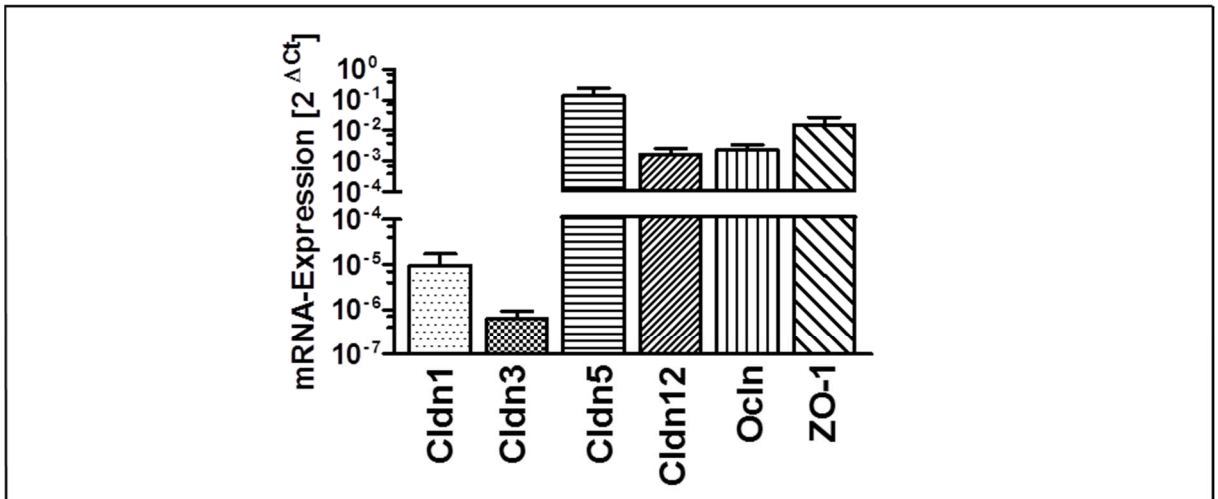
Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 29.08.2018 Sophie Dithmer

Anhang

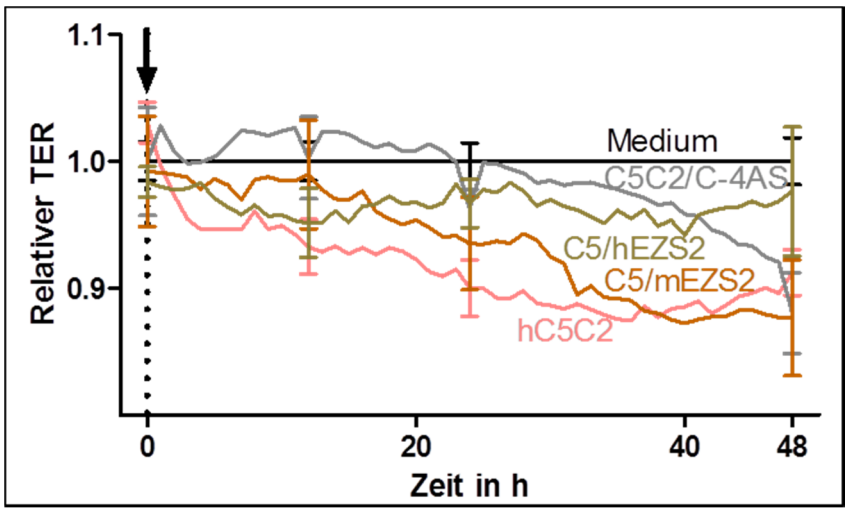


Anhang 1: Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) bilden transzellulären elektrischen Widerstand (TER). Gemessen wurde mittels *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS). Werte vergleichbar mit anderen Endothelzellen (Stolwijk et al., 2015; Szulcek et al., 2014). Gestrichelte Linie zeigt das Wachstum von Zellen ohne Mediumwechsel über 45 h: TER erreicht konstantes Plateau nach ca. 15 h. Durchgehende Linien mit Mediumwechsel bei 24 h (schwarzer Pfeil): grau, Messung ohne Zellen zeigt keinen TER-Anstieg; schwarz: Zellen weisen bis ca. 72 h nach Aussaat einen konstant hohen TER auf, anschließend starker TER-Abfall (grauer Pfeil). n≥10.

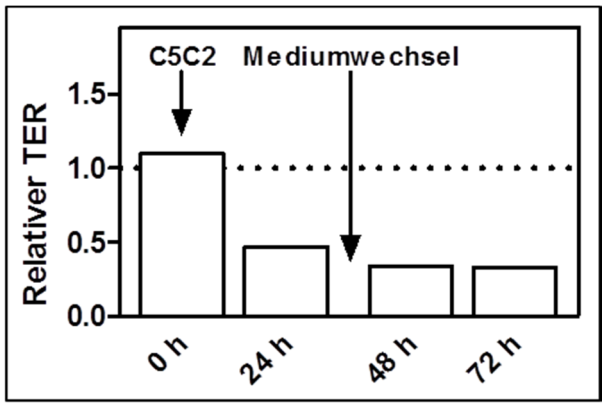


Protein	Cldn5 >	ZO-1 >	Ocln >	Cldn12 >	Cldn1 >	Cldn3
mRNA-Expression [$2^{\Delta Ct}$]	(1,4 ± 1,0) × 10^{-1}	(1,6 ± 1,1) × 10^{-2}	(2,3 ± 1,2) × 10^{-3}	(1,7 ± 0,9) × 10^{-3}	(9,5 ± 7,9) × 10^{-6}	(6,2 ± 3,0) × 10^{-7}

Anhang 2: Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) exprimieren Zellkontaktproteine. mRNA-Expression von Claudin (Cldn)-1, -3, -5, -12, Occludin (Ocln) und *Zonula-occludens*-Protein-1 (ZO-1) normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct=Ct_{\beta\text{-Aktin}}-Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. n≥15, Mittelwert±SD.



Anhang 3: Humanes C5C2 und murines C5C2/C-4AS aus der ersten extrazellulären Schleife (EZS) und Peptide der zweiten EZS (human/murin) von Claudin-5 zeigen keine Reduktion der Dichtheit in einem *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke. Nach Peptidbehandlung (300 µM) ist der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) unverändert. Messung mittels *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS). Pfeil, Behandlung mit Medium oder Medium mit 300 µM Peptid; n≥4; Mittelwert±SEM; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p>0,05 relativ zu peptidfreiem Medium. Peptide der EZS1: C5C2/C-4AS (murines C5C2 C-terminal verkürzt um 4 Aminosäuren), hC5C2 (humane Variante des C5C2-Peptides; Peptide der EZS2: C5/hEZS2 (humane Variante), C5/mEZS2 (murine Variante).

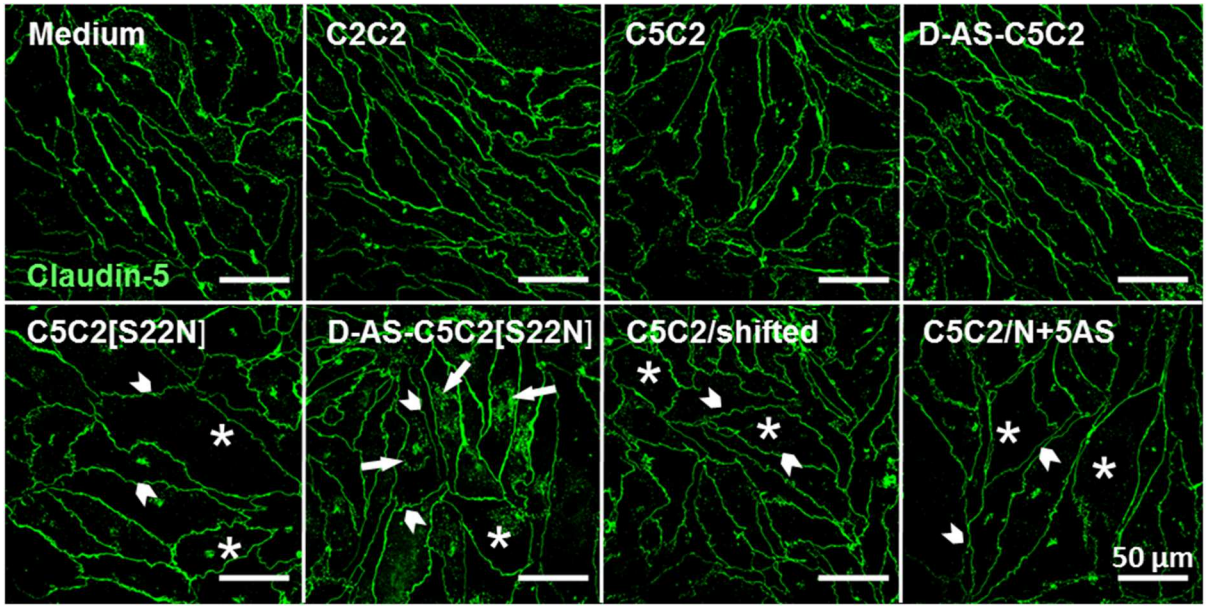


Anhang 4: C5C2 (300 µM) führt innerhalb von 72 h zu einer nicht reversiblen Permeabilisierung in primären Gehirnkapillarendothelzellen. Primäre bovine Gehirnkapillarendothelzellen kultiviert als Kontakt-Kultur mit Rattenastrozyten. Relativer transzellulärer elektrischer Widerstand (TER, gemessen mit Handelektrode) nach Behandlung mit 300 µM C5C2-Peptid (1. Pfeil) oder Medium (gestrichelte Linie). Mediumwechsel mit peptidfreiem Medium (2. Pfeil). n=1. Claudin-5-Peptid C5C2, relativ zu Mediumkontrolle.

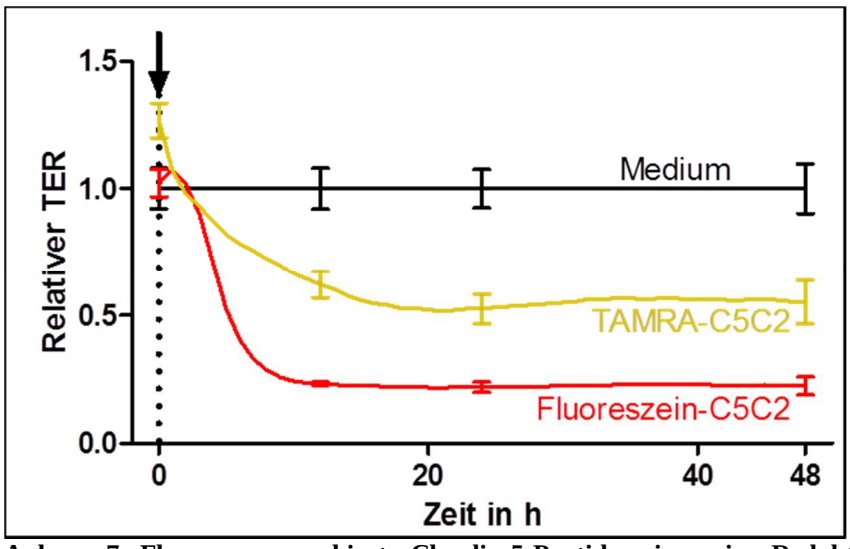
Anhang 5: Transzellulärer elektrischer Widerstand und Lucifer-Yellow-Permeabilität von Claudin-5-experimierenden, epithelialen Zellen nach Behandlung mit hC5C2 oder C5C2/C-4AS.

Relativer TER	Medium	hC5C2	C5C2/C-4AS
0 h	100 ± 11 %	99 ± 10 %	105 ± 16 %
7 h	100 ± 10 %	101 ± 12 %	111 ± 27 %
24 h	100 ± 7 %	101 ± 9 %	112 ± 23 %
30 h	100 ± 8 %	100 ± 9 %	117 ± 15 %
48 h	100 ± 34 %	100 ± 7 %	123 ± 17 %
Permeabilität Lucifer Yellow	100 ± 32 %	115 ± 54 %	95 ± 43 %

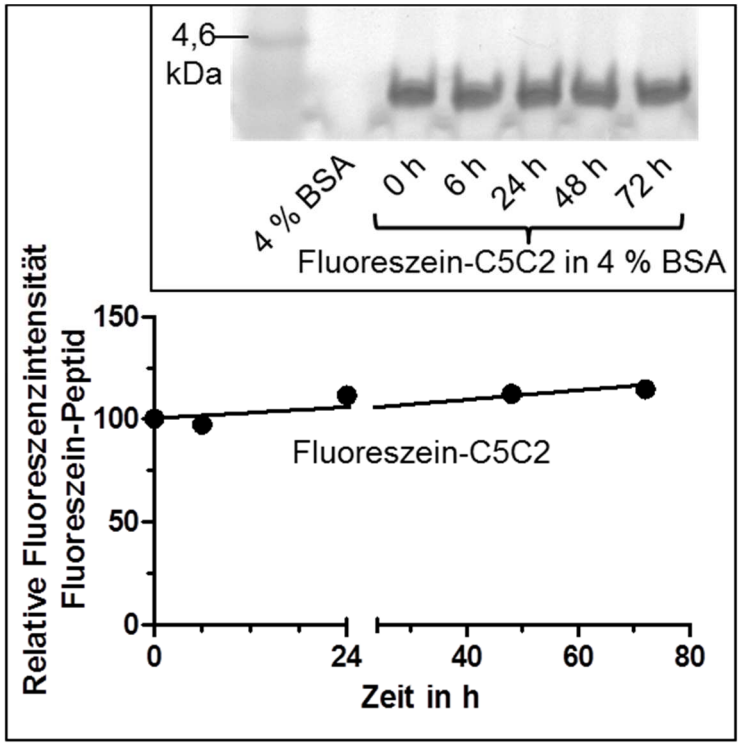
Relativer TER (transzellulärer elektrischer Widerstand) und relative Permeabilität von Lucifer Yellow (457 kDa) bezogen auf peptidfreie Mediumkontrolle. Mittelwert±SD; n≥7 (TER) und ≥5 (Permeabilität); hC5C2 (humane Variante des C5C2-Peptids), C5C2/C-4AS (murines C5C2, C-terminal verkürzt um 4 Aminosäuren).



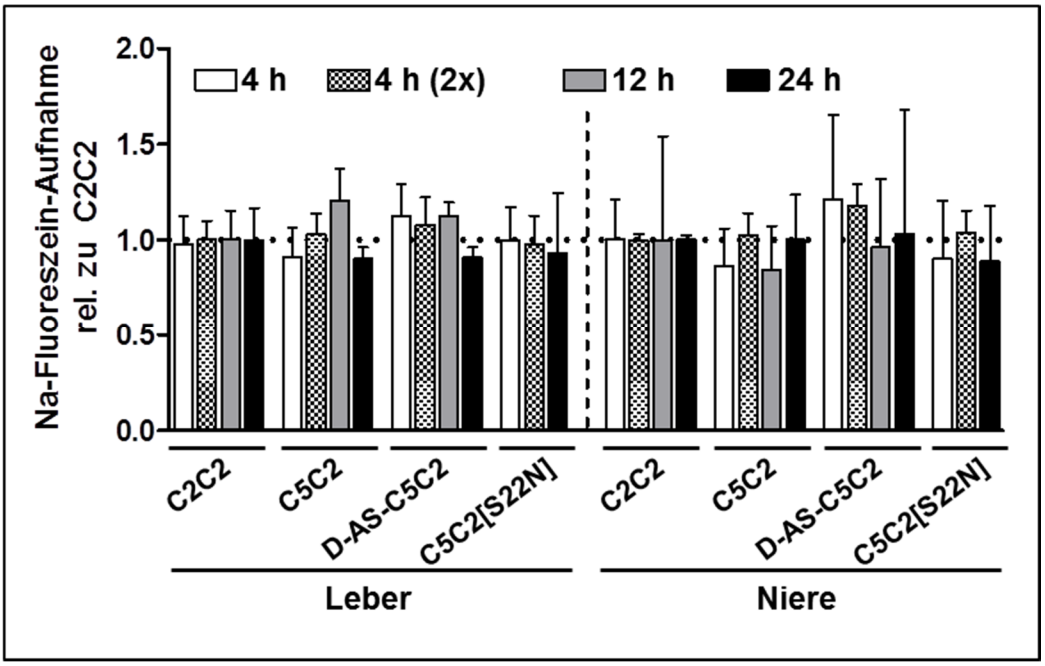
Anhang 6: Vollständiges oder bedingtes Regenerationspotenzial von Endothelzellen (bEND.3) nach Behandlung mit Claudin-5-Peptiden. Immunfluoreszenzfärbung nach 16 h Peptidinkubation und anschließendem Mediumwechsel mit 32 h Regenerationsphase. Morphologische Veränderungen wie Claudin-5-Reduktion in der Membran (Pfeilspitzen), Akkumulation von Claudin-5 im Zytosol (Pfeile) und eine rundliche Zellform (Sterne) fallen schwächer aus oder sind nicht mehr vorhanden im Vergleich zu Zellen ohne Regenerationsphase (s. Abb. 18). C2C2, Kontrollpeptid; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4 AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N].



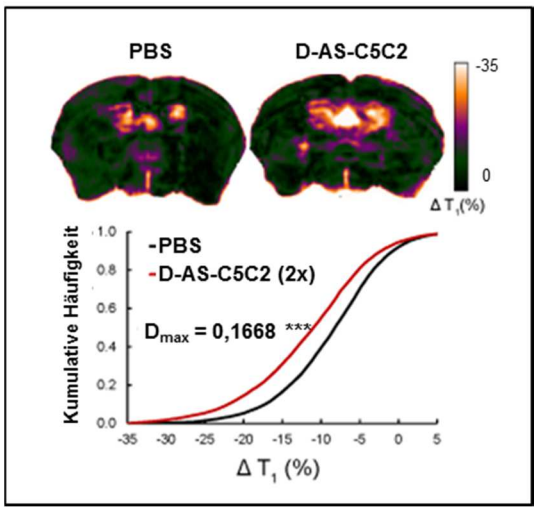
Anhang 7: Fluoreszenz-markierte Claudin-5-Peptide zeigen eine Reduktion der Dichtheit in einem *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke. Nach Peptidbehandlung ist der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) von Gehirnendothelzellen der Maus (bEND.3) reduziert. Messung mittels *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS). Pfeil, Behandlung mit 150 µM Peptid in Medium mit 1 % Dimethylsulfoxid oder Medium (1 % Dimethylsulfoxid); n=2; Mittelwert±SD. TAMRA, 5,6-Carboxytetramethylrhodamin.



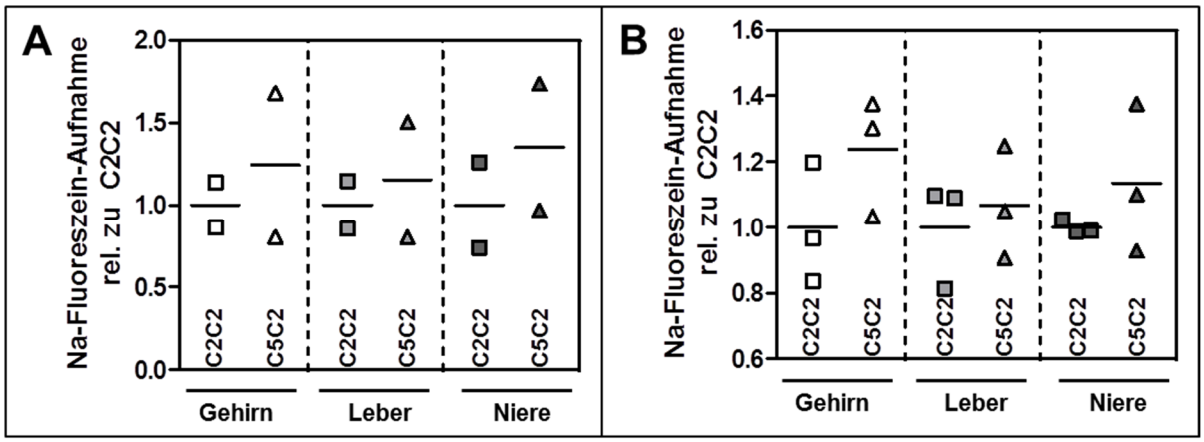
Anhang 8: Stabilität des Claudin-5-Peptids C5C2 in Albuminpuffer. Bestimmung der C5C2-Stabilität in Albuminpuffer (200 µM Peptid, 72 h in Lösung aus bovinem Serum-Albumin, 40 g/l in PBS+/+) mittels Gelelektrophorese. Fluoreszein-C5C2: N-terminal markiert. Gezeigt ist die relative Fluoreszenzintensität zum Ausgangswert (0 h). n=1; nicht-lineare Kurvenanpassung. Markerbande 4,6 kDa, Peptid 3,4 kDa.



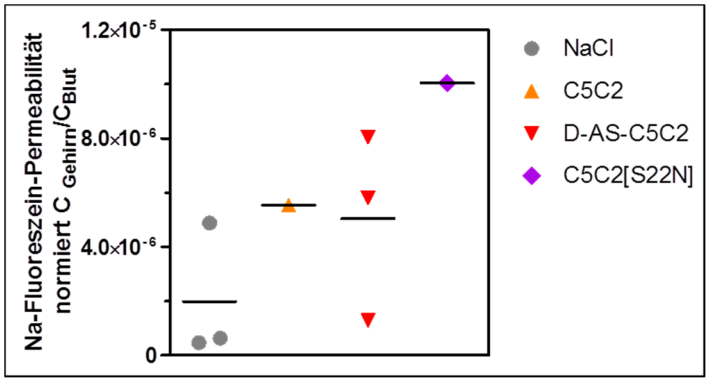
Anhang 9: Keine Unterschiede in der Na-Fluoreszein-Aufnahme in Leber und Niere *in vivo* nach Applikation verschiedener Claudin-Peptide. C57BL/6-Mäuse. Aufnahme gemessen 4, 12 und 24 h nach Peptid-Injektion (i.v., Einfachinjektion t=0 h oder Zweifachinjektion t=0 und 2 h) bezogen auf das Kontrollpeptid C2C2 (gestrichelte Linie); 0,5 mol/kg Na-Fluoreszein in PBS+/+; 3,5 µmol/kg Peptid in PBS+/+, Mittelwert±SD, n≥3; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p≥0,05 relativ zu C2C2.



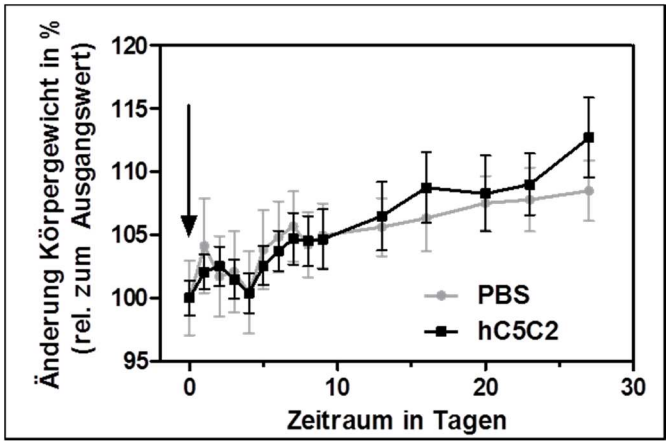
Anhang 10: Zweifachinjektion des Claudin-5-Peptids D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Derivat) erhöht die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für kleine Moleküle *in vivo*. Mittels Magnetresonanztomographie wurde 4 h nach Zweifachinjektion von D-AS-C5C2 (i.v., 3,5 µmol/kg, Injektion t=0 und 2 h) ein Anstieg von Kontrastmittel (Diethylen-Triamin-Pentaessigsäure Gadolinium III, Gd-DTPA; 547 Da; 1 mmol/kg/20 min i.v.) im Gehirn von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen. Repräsentative farbkodierte Übersicht der Differenz der T_1-Relaxationszeit vor und nach Kontrastmittelgabe ($\Delta T_1=(T_{1post}/T_{1prä})-1$) eines Mausgehirns nach Behandlung mit PBS oder D-AS-C5C2; kumulative Häufigkeit von ΔT_1 im periventrikulären Raum. Linksverschiebung, ΔT_1-Reduktion, ***, p <0,001; n≥3. D_{max} zeigt das Maximum der absoluten Unterschiede zwischen den kumulativen Häufigkeiten beider Gruppen. Farbskala: je größer der Negativwert, desto stärker die Durchlässigkeit.



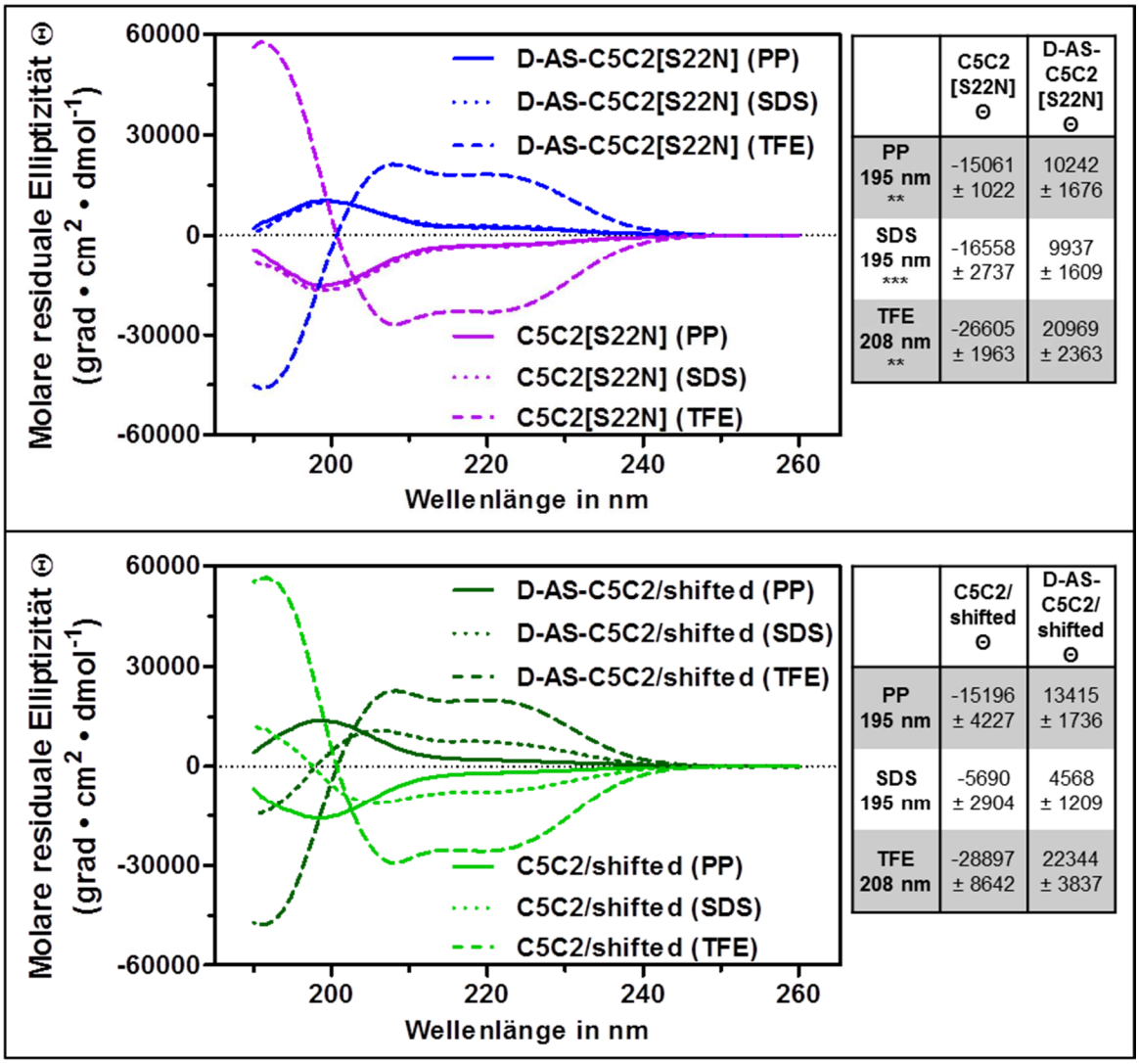
Anhang 11: Andere Applikationssregime zeigen einen Trend in stärkerer Na-Fluoreszein-Permeabilität nach Claudin-5-Peptid-Injektion in C57BL/6-Mäusen. Im Anschluss an die Injektion des Claudin-5-Peptides C5C2 (3,5 µmol/kg, i.v.) wurde die Na-Fluoreszein (376 Da)-Aufnahme in Gehirn, Leber und Niere der Maus (i.v., 0,5 mol/kg Na-Fluoreszein in PBS+/+) im Vergleich zum Kontrollpeptid C2C2 (gestrichelte Linie) bestimmt. Streudiagramm mit Mittelwert (schwarze Linie). Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni, nicht signifikant, $p \geq 0{,}05$ relativ zu C2C2. **(A)** Einfachinjektion der Peptide, nach 1 h Na-Fluoreszein-Injektion, n=2. **(B)** Dreifachinjektion der Peptide (t=0, 16 und 19 h), nach 3 h Na-Fluoreszein-Injektion, n=3.



Anhang 12: Applikation der Claudin-5-Peptide über die *A. carotis communis* führt zur erhöhten Gehirn-Gängigkeit von Na-Fluoreszein. Na-Fluoreszein-Aufnahme ins Gehirn von C57BL/6-Mäusen nach Peptid-Injektion (*A. carotis communis*, 3,5 µmol/kg Peptid in physiologischer NaCl-Lösung). 10 min nach Injektion von Na-Fluoreszein (376 Da, i.p., 1 mol/kg, 30 min Inkubation). Streudiagramm mit Mittelwert (schwarze Linie), n=1-2. Na-Fluoreszein-Konzentration im Gehirn normiert auf die Konzentration im Blut (C_{Gehirn} (µg/ml)/C_{Blut} (µg/ml) pro g_{Gehirn}). Claudin-5-Peptide: C5C2, D-AS-C5C2 (D-Aminosäure-Derivat), C5C2[S22N] (S substituiert mit N).



Anhang 13: Das humane Claudin-5-Peptid hC5C2 hat keinen negativen Einfluss auf die Gewichtszunahme von NMRI-nu/nu-Mäusen. Prozentuale Änderung des Körpergewichts relativ zum Ausgangswert der Mäuse (5-6 Wochen alt) nach einmaliger Injektion von hC5C2 (i.v., 3,5 µmol/kg in PBS+/+). Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 27 Tagen beobachtet. n=3; Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p≥0,05 relativ zu PBS.



	C5C2 [S22N] Θ	D-AS-C5C2 [S22N] Θ
PP 195 nm **	-15061 ± 1022	10242 ± 1676
SDS 195 nm ***	-16558 ± 2737	9937 ± 1609
TFE 208 nm **	-26605 ± 1963	20969 ± 2363

	C5C2/ shifted Θ	D-AS-C5C2/ shifted Θ
PP 195 nm	-15196 ± 4227	13415 ± 1736
SDS 195 nm	-5690 ± 2904	4568 ± 1209
TFE 208 nm	-28897 ± 8642	22344 ± 3837

Anhang 14: C5C2/shifted nicht aber C5C2[S22N] und deren entsprechende D-Aminosäure-Variante liegen enantiomer vor. Messung und Berechnung der molaren residualen Elliptizität (Θ) der Peptide (50 µM) mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,2), in PP mit 0,5 mM SDS (Natriumdodecylsulfat, β-Faltblatt-Begünstigung) oder in PP mit 60 % Trifluorethanol (TFE, α-Helix-Begünstigung); 8 Akkumulationen. Tabellen zeigen Θ bei charakteristischen Elliptizitäts-Extremwerten (195 nm für β-Faltblatt, 208 nm für α-Helix), n≥4, Mittelwert±SD, Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; **, p<0,01; ***, p<0,001; nicht signifikant, p≥0,05, L-Aminosäure-Peptid relativ zu entsprechendem D-Aminosäure-Peptid.

Anhang 15: Sekundärstrukturvorhersagen der Claudin-5-Peptide bestimmt mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie und molekularer Modellierung.

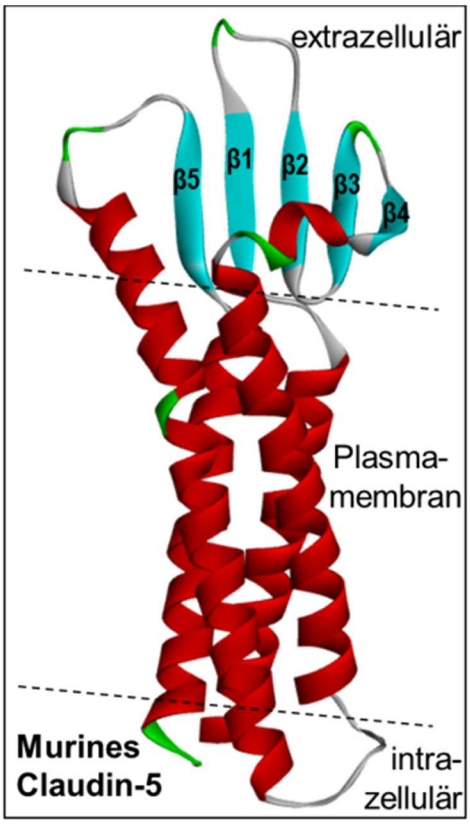
	Sekundärstruktur Wahrscheinlichkeit in %					Sekundärstruktur Wahrscheinlichkeit in %			
	C5C2					**D-AS-C5C2**			
	α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet		α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet
PP	0 ± 0	39 ± 2	11 ± 1	50 ± 2	PP	0 ± 0	39 ± 2	11 ± 2	49 ± 2
SDS	2 ± 2	52 ± 9	4 ± 4	50 ± 7	SDS	0 ± 0	46 ± 3	9 ± 2	46 ± 1
TFE	65 ± 4	1 ± 2	0 ± 0	34 ± 4	TFE	64 ± 5	1 ± 2	0 ± 0	35 ± 4
PSIPRED	38	34	0	28					
PEP-FOLD	34	21	14	31					
CABSdock	45	14	7	34					
	C5C2[S22N]					**D-AS-C5C2[S22N]**			
	α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet		α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet
PP	0 ± 0	31 ± 4	14 ± 2	55 ± 3	PP	0 ± 0	49 ± 5	9 ± 1	43 ± 4
SDS	0 ± 0	33 ± 4	13 ± 1	54 ± 2	SDS	0 ± 0	52 ± 6	6 ± 2	42 ± 4
TFE	72 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	28 ± 4	TFE	59 ± 7	7 ± 9	0 ± 0	34 ± 2
PSIPRED	28	34	0	28					
PEP-FOLD	45	14	7	34					
CABSdock	21	14	24	41					
	C5C2/shifted					**D-AS-C5C2/shifted**			
	α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet		α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet
PP	0 ± 0	28 ± 15	18 ± 7	54 ± 9	PP	0 ± 0	34 ± 7	14 ± 2	50 ± 4
SDS	15 ± 7	43 ± 13	2 ± 4	39 ± 7	SDS	16 ± 4	47 ± 6	0 ± 0	36 ± 3
TFE	69 ± 14	4 ± 5	0 ± 0	27 ± 11	TFE	61 ± 9	6 ± 9	0 ± 0	32 ± 3
PSIPRED	10	40	0	50					
PEP-FOLD	13	40	13	33					
CABSdock	0	33	13	53					
	C5C2/N+5AS					**C5C2/C-4AS**			
	α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet		α-Helix	β-Faltblatt	β-Schleife	Un-geordnet
PP	0 ± 0	40 ± 3	10 ± 2	50 ± 2	PP	0 ± 0	35 ± 4	16 ± 2	50 ± 2
SDS	29 ± 7	39 ± 5	0 ± 0	33 ± 3	SDS	0 ± 0	33 ± 8	16 ± 3	51 ± 5
TFE	67 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	33 ± 2	TFE	56 ± 6	11 ± 7	0 ± 0	34 ± 1
PSIPRED	29	35	0	35	PSIPRED	12	52	0	36
PEP-FOLD	32	41	15	12	PEP-FOLD	12	24	16	48
					CABSdock	0	0	8	92

Tabelle enthält weitere Details ergänzend zu den Daten in Abb. 33, Abb. 35 und Abb. 36. Neigung zur Sekundärstrukturausbildung von Claudin-5-Peptiden (50 µM) in Phosphatpuffer (PP, 10 mM, pH 7,2), in PP mit 0,5 mM SDS (Natriumdodecylsulfat, β-Faltblatt-Begünstigung) oder in PP mit 60 % Trifluorethanol (TFE, α-Helix-Begünstigung) und Berechnung des Anteils der Sekundärstrukturelemente mittels Referenzspektren (Yang et al., 1986). 8 Akkumulationen. n≥4, Mittelwert±SD. Strukturvorhersage *in silico* berechnet mit PSIPRED (Buchan et al., 2013), PEP-FOLD (Shen et al., 2014; Thevenet et al., 2012) und CABS-dock (Kurcinski et al., 2015). Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5AS)), C5C2/C-4AS (C-terminal verkürzt (4 AS)); D-Aminosäure-Peptide: D-AS-C5C2, D-AS-C5C2[S22N], D-ASC5C2/shifted.

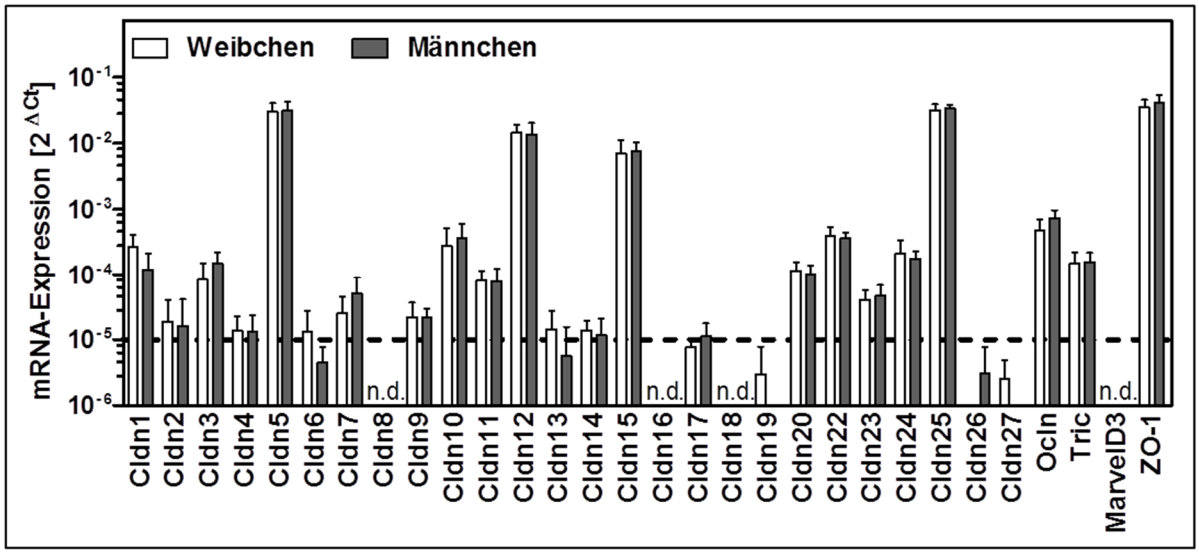
Anhang 16: Sequenzidentitäten von Claudin-Peptiden und der ersten extrazellulären Schleife (EZS1) von Claudinen und Occludin.

Sequenzähnlichkeit in % rel. zu EZS1							
Peptid EZS1	C5C2	C5C2 [S22N]	C5C2/ shifted	C5C2/ N+5AS	C2C2	EZS1	C5C2
mCldn1	51,7	55,2	50,0	52,9	31,0	hCldn1	55,2
mCldn2	37,9	37,9	40,0	44,1	93,1	hCldn2	37,9
mCldn3	62,1	62,1	56,7	61,8	44,8	hCldn3	65,5
mCldn4	61,2	61,1	56,7	61,8	41,8	hCldn4	65,5
mCldn5	93,1	89,7	86,7	91,2	37,9	hCldn5	86,2
mCldn11	34,5	34,5	33,3	41,2	24,1	hCldn11	34,5
mCldn12	17,2	9,4	23,3	18,9	13,8	hCldn12	6,9
mOcln	10,3	10,3	15,4	14,3	10,3	hOcln	17,2

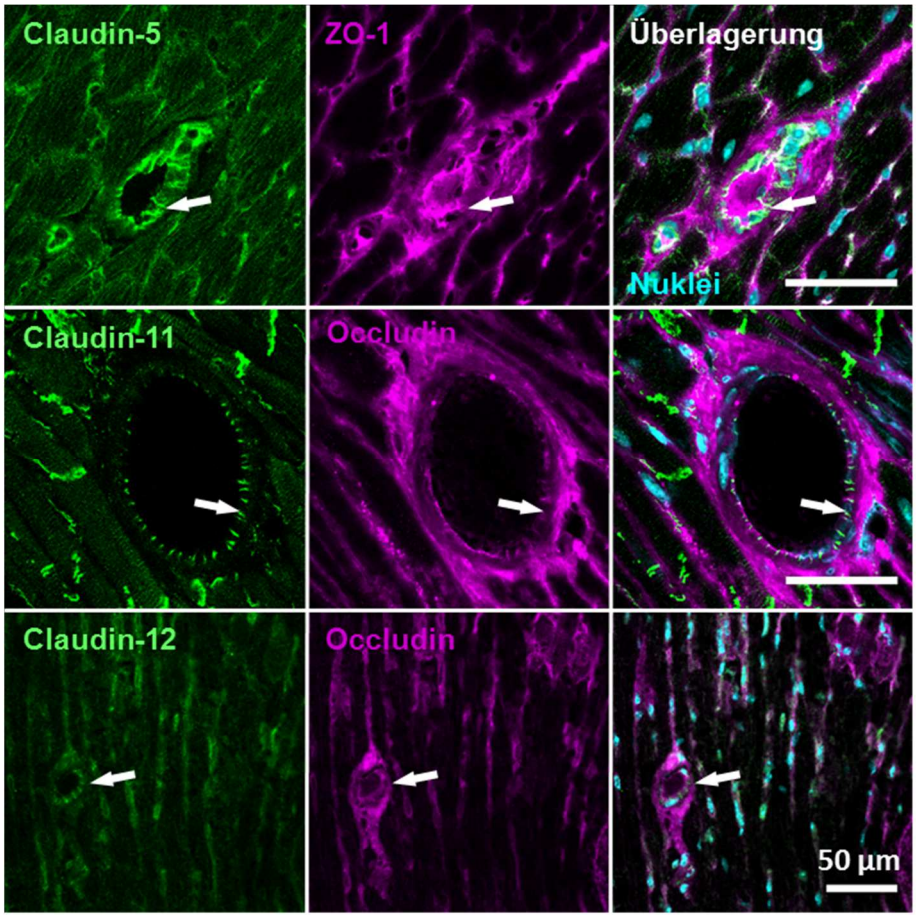
Globales Alignment zwischen der Aminosäuresequenz der Peptide und der entsprechenden Sequenz der EZS1 der Claudine (Cldn) und Occludin (Ocln) mittels Needleman-Wunsch-Algorithmus (Rice et al., 2000). m, murin; h, human. Kontrollpeptid C2C2, von Claudin-2 stammend; Claudin-5-Peptide: C5C2, C5C2[S22N] (S substituiert mit N), C5C2/shifted (N-terminal verlängert (5 AS), C-terminal verkürzt (4AS)), C5C2/N+5AS (N-terminal verlängert (5 AS).



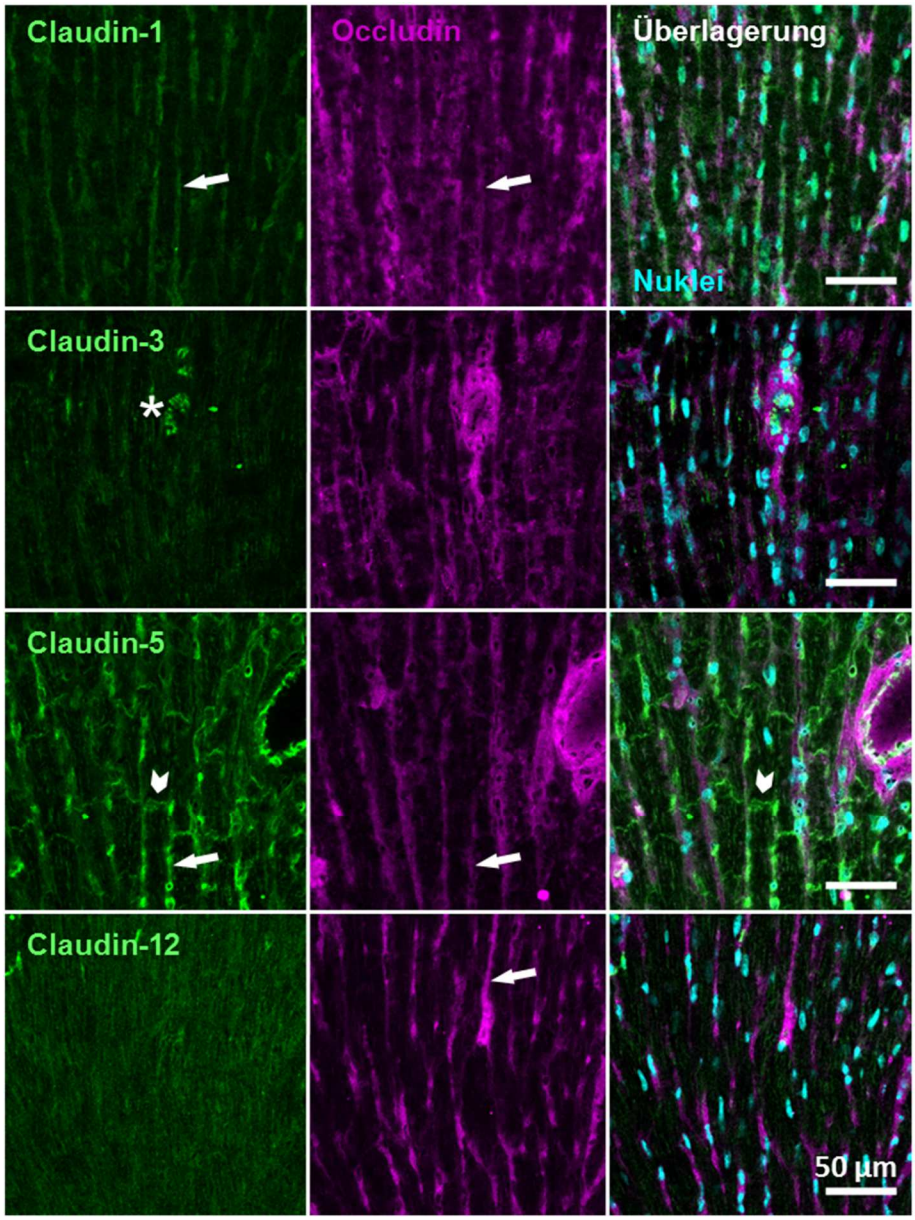
Anhang 17: Strukturmodellvorhersage von murinem Claudin-5 basierend auf der Kristallstruktur von murinem Claudin-15 (Suzuki et al., 2014). Modellerstellung mittels I-TASSER (Roy et al., 2010; Zhang, 2008). β-Faltblatt, blau; α-Helix, rot; β-Schleife, grün; ungeordnet, grau.



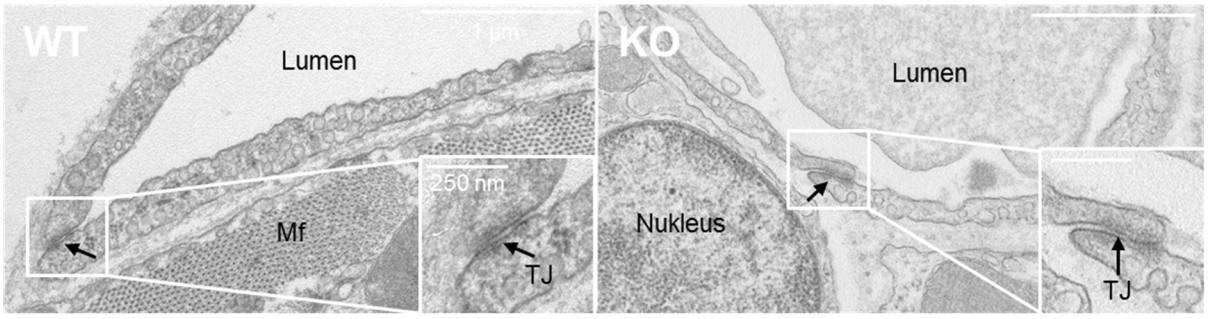
Anhang 18: Expression von Claudinen, *Tight-Junction*-assoziierten MARVEL-Proteinen und *Zonula occludens* Protein-1 im Mausmyokard ist nicht geschlechtsspezifisch. mRNA-Expression von Claudin (Cldn)-1 bis -27, Occludin (Ocln), Tricellulin (Tric), MarvelD3 und *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) im Herzapex von C57BL/6-Mäusen normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct=Ct_{\beta\text{-Aktin}}-Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. n=7-10, Mittelwert±SD. Gestrichelte Linie, Schwellenwert 10^{-5}: schwache Expression. Zwei-Wege-Varianztest (ANOVA) mit anschließendem *Post-Hoc*-Test nach Bonferroni; nicht signifikant, p≥0,05. n.d., nicht detektiert.



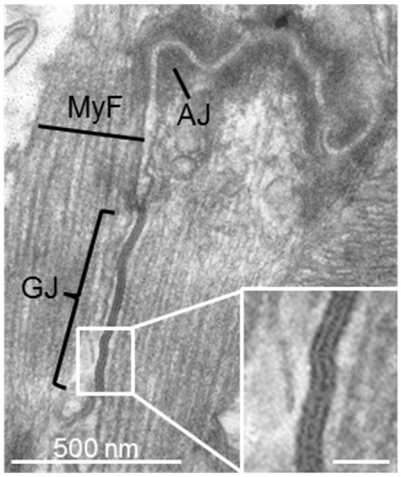
Anhang 19: Endotheliale Lokalisation von Zell-Zell-Kontaktproteinen im Myokard von C57BL/6-Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung. Pfeile, Lokalisation an Blutgefäßen. ZO-1, *Zonula Occludens* Protein-1.



Anhang 20: Claudin-12-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von *Tight-Junction*-Proteinen im Myokard. Immunfluoreszenzfärbung des linksventrikulären Myokards**.** Claudin-12-defiziente (KO) C57BL/6-Mäuse, Alter 15-28 Wochen**.** Pfeile, laterale Lokalisation; Pfeilköpfe, Glanzstreifen; Stern, Blutgefäß.



Anhang 21: *Tight Junctions* des myokardialen Endothels sind nicht beeinflusst nach Claudin-12-Knock-out. Transmissionselektronenmikroskopie vom Herzapex. Linksventrikukäres Myokard von Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) C57BL/6-Mäusen (Alter 28-33 Wochen). Mf, Myofilamente; Pfeil, *Tight Junctions* (TJ).



Anhang 22: Typische Struktur der *Gap Junctions* in myokardialen Glanzstreifen. Transmissionselektronenmikroskopie vom Herzapex. Längsschnitt durch das linksventrikukäre Myokard von C57BL/6-Mäusen. 3 elektronendichte und 2 weniger –dichte Schichten. AJ, *Adherens Junctions*; GJ, *Gap Junctions*, MyF, Myofibrillen.

Anhang 23: mRNA-Expression von Claudinen, Occludin und *Zonula occludens* Protein-1 in verschiedenen Organen von Wildtyp (WT)- und Claudin-12-defizienten (KO) Mäusen.

	Geno-typ	Gehirn	Milz	Lunge	Leber	Niere	Duo-denum	Jeju-num	Ileum	Colon	Pank-reas	Testis	Uterus
Cldn1	WT	(8,9±7,2) ×10^{-4}	(2,3±1,0) ×10^{-4}	(2,2±0,8) ×10^{-4}	(3,5±1,5) ×10^{-2}	(1,4±0,5) ×10^{-2}	(4,2±1,4) ×10^{-5}	(3,0±2,1) ×10^{-5}	(3,1±1,4) ×10^{-5}	(5,6±2,4) ×10^{-5}	(1,4±1,9) ×10^{-3}	(7,7±1,9) ×10^{-5}	(2,0±2,7) ×10^{-3}
	KO	(7,8±6,4) ×10^{-4}			(3,8±1,3) ×10^{-2}	(1,6±0,5) ×10^{-2}	(4,7±3,5) ×10^{-5}	(4,3±3,7) ×10^{-5}	(2,6±0,5) ×10^{-5}	(7,7±2,5) ×10^{-5}	(1,6±1,2) ×10^{-3}		
Cldn3	WT	(2,3±1,6) ×10^{-4}	(6,4±4,9) ×10^{-5}	(2,3±0,9) ×10^{-2}	(9,4±2,9) ×10^{-2}	(7,3±1,7) ×10^{-3}	(2,6±1,0) ×10^{-2}	(3,0±1,2) ×10^{-2}	(4,2±0,9) ×10^{-2}	(5,5±0,6) ×10^{-2}	(1,2±0,6) ×10^{-1}	(9,8±0,9) ×10^{-3}	(4,3±2,1) ×10^{-2}
	KO	(2,9±3,3) ×10^{-4}			(8,9±1,6) ×10^{-2}	(7,4±2,8) ×10^{-3}	(4,1±2,2) ×10^{-2}	(3,5±2,4) ×10^{-2}	(3,6±1,3) ×10^{-2}	(8,0±2,4) ×10^{-2}	(8,4±5,4) ×10^{-2}		
Cldn5	WT	(1,5±0,5) ×10^{-2}	(8,0±2,5) ×10^{-3}	(6,4±1,1) ×10^{-2}	(3,8±2,2) ×10^{-3}	(5,9±2,7) ×10^{-3}	(2,4±1,7) ×10^{-4}	(1,4±0,8) ×10^{-4}	(2,5±0,5) ×10^{-4}	(2,3±1,9) ×10^{-4}	(5,3±5,0) ×10^{-3}	(8,8±2,1) ×10^{-3}	(5,5±2,1) ×10^{-3}
	KO	(1,3±0,7) ×10^{-2}			(3,6±1,7) ×10^{-3}	(5,8±2,0) ×10^{-3}	(2,5±1,4)×10^{-4}	(1,8±1,9) ×10^{-4}	(2,6±1,8) ×10^{-4}	(2,7±2,6) ×10^{-4}	(5,9±7,2) ×10^{-3}		
Cldn7	WT		(1,3±0,9) ×10^{-4}				(9,9±5,8) ×10^{-2}	(7,7±2,6) ×10^{-2}	(9,7±2,3) ×10^{-2}	(1,3±0,2) ×10^{-1}	(3,0±2,2) ×10^{-2}	(5,1±0,8) ×10^{-4}	(5,1±1,6) ×10^{-2}
	KO						(9,0±2,7) ×10^{-2}	(8,3±2,2) ×10^{-2}	(9,8±3,4) ×10^{-2}	(1,3±0,3) ×10^{-1}	(2,0±0,3) ×10^{-2}		
Cldn8	WT		(1,6±2,3) ×10^{-5}				(3,2±2,5) ×10^{-5}	(2,8±3,0) ×10^{-5}	(1,2±0,9) ×10^{-4}	(2,4±1,2) ×10^{-2}	(8,8±6,4) ×10^{-3}	(2,0±2,2) ×10^{-5}	(1,5±1,0) ×10^{-3}
	KO						(3,8±2,0) ×10^{-5}	(2,07±4,4) ×10^{-5}	(1,5±0,9) ×10^{-4}	(2,7±2,2) ×10^{-2}	(9,5±6,1) ×10^{-3}		
Cldn12	WT	(6,3±2,5) ×10^{-3}	(2,5±1,5) ×10^{-4}	(2,0±0,7) ×10^{-3}	(2,8±1,8) ×10^{-2}	(3,2±1,2) ×10^{-2}	(1,4±0,7) ×10^{-3}	(1,2±0,8) ×10^{-3}	(1,7±1,3) ×10^{-3}	(2,0±1,4) ×10^{-3}	(1,0±0,6) ×10^{-2}	(3,7±1,3) ×10^{-3}	(3,8±0,8) ×10^{-3}
	KO	(6,3±0,1) ×10^{-6}			(1,1±1,4) ×10^{-4}	(1,4±2,8) ×10^{-4}	(4,6±5,3) ×10^{-6}	(6,3±11,1) ×10^{-7}	(1,2±2,0) ×10^{-6}	(1,8±2,0) ×10^{-6}	(1,5±1,4) ×10^{-4}		
Cldn15	WT	(2,4±1,2) ×10^{-5}	(3,3±3,0) ×10^{-4}				(8,2±3,6) ×10^{-2}	(3,7±1,7) ×10^{-2}	(1,5±0,7) ×10^{-2}	(8,6±7,8) ×10^{-3}	(1,5±1,7) ×10^{-2}		
	KO	(2,5±1,4) ×10^{-5}					(7,7±4,2) ×10^{-2}	(4,0±2,0) ×10^{-2}	(1,6±1,2) ×10^{-2}	(7,9±2,4) ×10^{-3}	(1,9±1,6) ×10^{-2}		
Cldn25	WT	(1,2±0,5) ×10^{-2}	(2,3±1,1) ×10^{-3}	(5,6±2,0) ×10^{-3}	(8,2±5,6) ×10^{-3}	(1,6±0,7) ×10^{-2}	(1,7±1,3) ×10^{-2}	(3,6±2,1) ×10^{-3}	(2,7±0,5) ×10^{-3}	(2,2±1,4) ×10^{-3}	(6,3±4,2) ×10^{-3}	(2,5±0,4) ×10^{-2}	(6,4±2,8) ×10^{-3}
	KO	(1,6±0,6) ×10^{-2}			(9,6±2,4) ×10^{-3}	(1,2±0,2) ×10^{-2}	(4,6±1,9) ×10^{-3}	(4,4±3,2) ×10^{-3}	(2,4±1,5) ×10^{-3}	(2,0±1,0) ×10^{-3}	(7,0±4,1) ×10^{-3}		
Ocln	WT	(3,6±0,6) ×10^{-3}	(9,3±3,8) ×10^{-5}	(9,0±3,1) ×10^{-3}	(1,5±0,4) ×10^{-2}	(1,5±0,2) ×10^{-2}	(1,2±0,7) ×10^{-2}	(1,3±0,3) ×10^{-2}	(8,5±1,6) ×10^{-3}	(1,4±0,2) ×10^{-2}	(2,0±0,9) ×10^{-2}	(6,2±0,7) ×10^{-3}	(6,3±3,7) ×10^{-3}
	KO	(3,7±1,0) ×10^{-3}			(1,7±0,4) ×10^{-2}	(1,7±0,3) ×10^{-2}	(1,0±0,4) ×10^{-2}	(1,1±0,6) ×10^{-2}	(7,5±4,1) ×10^{-3}	(2,1±0,6) ×10^{-2}	(1,9±1,4) ×10^{-2}		
ZO-1	WT	(1,8±0,4) ×10^{-2}	(2,7±1,4) ×10^{-3}	(3,3±1,0) ×10^{-2}	(1,5±0,7) ×10^{-2}	(1,8±0,4) ×10^{-2}	(2,2±1,2) ×10^{-3}	(2,9±0,9) ×10^{-3}	(4,0±1,5) ×10^{-3}	(1,0±0,1) ×10^{-2}	(1,2±0,9) ×10^{-2}	(3,3±0,3) ×10^{-2}	(8,5±3,3) ×10^{-3}
	KO	(2,2±0,4) ×10^{-2}			(1,6±0,5) ×10^{-2}	(1,9±0,1) ×10^{-2}	(2,3±0,7) ×10^{-3}	(3,1±1,8) ×10^{-3}	(4,0±2,6) ×10^{-3}	(9,6±3,3) ×10^{-3}	(1,5±0,7) ×10^{-2}		

Tabelle enthält weitere Details ergänzend zu den Daten in Abb. 37, Abb. 43 und Abb. 44. mRNA-Expression von Claudinen (Cldn), Occludin (Ocln), Tricellulin (Tric) und *Zonula Occludens* Protein-1 (ZO-1) in C57BL/6-Mäusen normiert auf β-Aktin ($\Delta Ct = Ct_{\beta\text{-Aktin}} - Ct_{Zellkontaktprotein}$); Ct, Schwellenwertzyklus. n≥4, Mittelwert±SD. Rot, Expression ≥10^{-2}; orange ≥10^{-3}; helles orange, ≥10^{-4}; beige, ≥10^{-5}; weiß, sehr geringe Expression <10^{-5}; grau, nicht gemessen.