

## Abstracts

zum Kolloquiums am 12.10.2017 zum Thema

### „Historisches und aktuelles zur Arzneimittelforschung“

vorgelegten Poster

---

#### Parazelluläre Abdichtung der Blut-Hirnschranke (BHS) – Entwicklungen und Perspektiven

Ingolf E. Blasig<sup>1</sup>, Philipp Berndt<sup>1</sup>, André Rex<sup>2</sup>, Sophie Dithmer<sup>1</sup>, Reiner Haseloff<sup>1</sup>, Lars Winkler<sup>1</sup>, Rosel Blasig<sup>1</sup>

*Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, <sup>2</sup>Charite Berlin, Germany.*

Peter Oehme erkannte bereits in den 80-er Jahren die Notwendigkeit zur Erforschung der molekularen Struktur, Funktion und Regulation der BHS, noch heute ein ungelöstes Problem der ZNS Pharmakologie. Als geeignete molekular- und zellbiologische Methoden entwickelt waren, nahmen wir den Gedanken auf und widmeten uns der Aufklärung der molekularen Mechanismen von Zellbarrieren.

Die BHS besteht aus Kapillarendothelzellen, deren Zwischenräume von *tight junctions* (TJs) verschlossen sind. In den 90-ziger Jahren wurden erste TJ-Proteine entdeckt: 1992 Occludin, ein TJ-assoziiertes MARVEL Protein (TAMP); 1998 einige Claudine. Bisher wurde angenommen, dass Claudin-5 (Cldn5) die TJs der BHS dominiert und für kleine Moleküle abdichtet. Cldn3, -12 und Occludin erschienen von geringerer Bedeutung zu sein. Cldn5 Knockout Studien zeigten, dass sich ohne Cldn5 die TJs elektronenoptisch nicht ändern (Nitta et al., 2003). Das bedeutet, weitere Claudine und TAMPs müssen involviert sein.

Zur Identifizierung weiterer TJ-Proteine führten wir ein mRNA-Profilung durch. In *snap-frozen, microdissected* Gehirnkapillaren fanden wir zusätzlich zu Cldn5, -12 und Occludin, auch eine starke Expression von Cldn1, -11, -25, dazu Cldn20, -26 in der Maus bzw. Cldn9, -27 im Menschen. Das TAMP Tricellulin sowie weitere 10 Claudine (Maus) bzw. 9 Claudine (Mensch) waren niedrig exprimiert. Die mRNA Werte korrelierten mit den Proteinmengen, die mit einem neuen Epitopverdünnungsassay bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den *ex vivo* Daten dominierte *in vitro* nur Cldn5 die BHS; die Mengen aller anderen TJ Proteine waren sehr viel kleiner. Insbesondere ging mit Cldn11 ein starker parazellulärer Abdichter fast vollständig verloren. In Hirnschnitten wiesen wir Cldn1, -3, -4, -5, -11, -12, -20, und -25 an den TJs nach, die meist vielfältig miteinander interagierten. Nur Cldn11, das bisher an der BHS übersehen wurde, war einzig zur Oligomerisierung mit sich selbst und so zur BHS Abdichtung fähig. Cldn25 zeigte dagegen keine Selbstassoziation aber eine Bindung an Occludin und Cldn12 und trug so indirekt zur Verbesserung der TJ Strangmorphologie bei. Hypoxie und zerebrale

Ischämie führten zur Herabregulation von Cldn1, -3, -12 und Occludin, die durch Cldn5 kompensiert wurde. Umgekehrt erhöhte ein Cldn5-Knockdown die Cldn1 Expression.

Insgesamt belegt das Cldn/TAMP Profil die Abundanz von 12 TJ-Proteinen an der BHS und liefert neue Einsichten in deren Regulation. Die BHS von Maus und Mensch weisen ein komplexes aber nicht komplett identisches TJ Profil auf. Diese Komplexität fehlt *in vitro*. Deshalb kann aus Befunde an isolierten BHS Systemen nur bedingt auf die Situation im Gesamtorganismus geschlossen werden. In der künftigen BHS Forschung gilt es nun die jeweilige Funktion der neuen Bestandteile herauszuarbeiten, zu bewerten und für die Pharmakologie nutzbar zu machen.

Berlin-Biesdorf 10/17

## **TG1 Liposomen: Vielversprechender Ansatz zur Behandlung der TG1-defizienten lamellären Ichthyose**

Margitta Dathe <sup>1</sup>, Karin Aufenvenne <sup>2</sup>, Fernando Larcher <sup>3</sup>, Ingrid Hausser <sup>4</sup>, Heiko Traupe <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Leibniz Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Deutschland, <sup>2</sup> Abteilung für Dermatologie, Universitätsklinik Münster, Deutschland; <sup>3</sup> Epithelial Biomedicine Division, CIEMAT-CIBERER, Madrid, Spanien; <sup>4</sup> Abteilung für Dermatologie, Universitätsklinik Heidelberg, Germany

Die Autosomal Rezessive Kongenitale Ichthyose (ARCI) ist eine seltene Hauterkrankung. Grundlage ist eine Mutation im Gen TGM1, was dazu führt, dass das in der oberen Schicht der Epidermis exprimierte, intrazelluläre, membranständige und für die Ausbildung der „cornified envelope“ essentielle Enzym TG1 nicht gebildet wird. Babies werden mit einer pergamentartigen Haut geboren. Später entwickeln sich große, dunkle Schuppen und das Infektionsrisiko und der Wasserverlust der Patienten führen noch heute zu einer Mortalität von ca. 11%. Die Prävalenz in Deutschland ist etwa 1/200 000. Die Behandlungsmöglichkeiten mit Harnstoff -und Milchsäure-haltigen Präparaten sind unbefriedigend. Es gibt keine Therapie zur Behandlung der molekularen Ursache. Trotz vielversprechender *ex-vivo* Experimente, hat kein gentherapeutischer Ansatz bisher die Klinik erreicht. Um die Integrität und Barrierefunktion der Haut wieder herzustellen, haben wir einen Ansatz zur Aufnahme von rekombinantem humanen TG1 (rhTG1) in Keratinozyten - Enzym Substitution - verfolgt. Unser Ziel war es, Liposomen zu entwickeln, die das Enzym auf die innere Seite der Keratinozytenmembran transportiert. Die Vesikel wurden hinsichtlich des TG1-Gehaltes und der Stabilität optimiert und mit einem kationischen zellpenetrierenden Lipopeptid modifiziert, um Hautpenetration und zelluläre Aufnahme zu erreichen. Unsere Liposomen überwinden die Membran TG1-defizienter Keratinozyten, und das aufgenommene rhTG1 ist aktiv. *In vivo* Studien an einem humanisierten Mausmodell bestätigten eine weitgehende Normalisierung der ARCI Haut.

Im Jahr 2013 wurde der Entwicklung“rhTG1 encapsulated into liposomes for the treatment of TG1-deficient autosomal recessive congenital ichthyosis“ der „Orphan Drug“ Status durch die Europäische Kommission zuerkannt, und 2015 erhielten wir den „Drug of the Year“ Preis der Leibniz Forschungsgemeinschaft. Gegenwärtige Aktivitäten sind auf die präklinische Entwicklung der Formulierung gerichtet.

## **Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1 Domänen hemmen Motilität und Chemotaxis invasiver Krebszellen**

Matthias Müller, Matthias Barone, Ronald Kühne

Metastasen sind die häufigste Todesursache der Krebserkrankung. Trotz großer Fortschritte, besteht nach wie vor ein großer Bedarf an neuen Therapien zur Behandlung metastasierender Tumoren. Ein Hauptmerkmal invasiver Krebszellen ist ihre Fähigkeit zum Umbau des Aktin-Zytoskeletts in Reaktion auf chemo- und haptotaktische Signale. Dabei kommt der Ena/VASP Proteinfamilie als Teil der invasiven Signatur und bedeutsamen Regulator des Zytoskelett-Umbaus eine herausgehobene Rolle zu. Ena/VASP Proteine sind in der Lage, Aktinfilamente zu synthetisieren und besitzen eine N-terminale EVH1-Domäne, die mit Proteinen an der Leitfront und in den fokalen Adhäsionen wechselwirkt. Dabei binden die EVH1 Domänen kurze Prolin-reiche Motive der Partnerproteine, die eine linksgängige Polyprolin-II Helix ausbilden. Durch Kombination strukturbioologischer Untersuchungen und rationalem Design konnten wir erstmalig selektive und zellgängige Inhibitoren Ena/VASP EVH1-vermittelter Protein-Protein-Wechselwirkungen entwickeln. Mittels röntgen-kristallografischer Studien konnten wir nachweisen, dass unsere Inhibitoren Sekundär-strukturmetika der PPII-Helix sind und in gleicher Weise wie die peptidischen Motive an die EVH1-Domänen binden. Pull-down Versuche zeigten, dass unsere Inhibitoren in der Lage waren, die Ena/VASP-Wechselwirkungen mit wichtigen Zielproteinen chemotaktischer Signalwege und Proteinen in den fokalen Adhäsionen sowie mit dem WAVE-Komplex zu unterbinden. Die Wirksamkeit der Inhibitoren konnte sowohl im Migrationsassay als auch im „live cell tracking“ nachgewiesen werden. Wir fanden, dass invasiven Krebszellen in Abhängigkeit von der Affinität der Inhibitoren zuerst die Fähigkeit zur gerichteten Migration verloren geht und bei Einsatz höher-affiner Inhibitoren zusätzlich die Zellmotilität gehemmt wird.

## **Entwicklung von Inhibitoren des Thyreotropin-Rezeptors (TSHR) zur Behandlung der Endokrinen Orbitopathie (EO)**

Patrick Marcinkowski<sup>1</sup>, Inna Hoyer<sup>1</sup>, Edgar Specker<sup>1</sup>, Jens Furkert<sup>1</sup>, Utta Berchner-Pfannschmidt<sup>2</sup>, Ralf Schülein<sup>1</sup>, Anja Eckstein<sup>2</sup>, Gerd Krause<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) 13125 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Molekulare Ophthalmologie, Universitätsklinikum Essen, Germany

Korrespondenz an: GKrause@fmp-berlin.de

Bei einer Schilddrüsenüberfunktion im Rahmen des Morbus Basedow (Hyperthyreose) kommt es in 40-60 % der Fälle zur Endokrinen Orbitopathie (EO) mit Exophthalmus. Bei dieser Autoimmunkrankheit werden vom Immunsystem Autoantikörper gebildet, die den TSHR an der Schilddrüse aktivieren und diese zur dysregulierten Überproduktion von Schilddrüsenhormonen (SDH) anregen. Die Schilddrüsenüberfunktion lässt sich gut mit Thyreostatika behandeln, welche die Thyreoperoxidase, jedoch nicht kausal den TSHR hemmen.

Da der TSHR neben der Schilddrüse auch in Bindegewebszellen (Fibroblasten) in der Augenhöhle (Orbita) exprimiert wird, kommt es hier durch die Autoantikörper zur TSHR-Aktivierung, aber am Auge nicht zur SDH-Ausschüttung, sondern zur Adipogenese und Proliferation des Bindegewebes sowie zur Bildung von Hyaluronsäure, welche durch das Wasserbindungsvermögen das Volumen des Gewebes in der Augenhöhle zusätzlich erhöht. Aufgrund des begrenzten Raumes in der Orbita kommt es zum Hervortreten der Augen, fehlendem Lidschluss, Sehnervschädigung und Entzündungsgeschehen. Schwere Fälle können nur wiederholt operativ behandelt werden. Bei der beschriebenen EO am Auge sind Thyreostatika wirkungslos. Diese therapeutische Lücke war Motivation, um nach Inhibitoren des TSH-Rezeptors zu suchen.

Wir haben am FMP Berlin mit einem Hochdurchsatz-Screening in einer Substanz-Bibliothek nach kleinen Molekülen als TSHR-Inhibitoren gesucht. Dabei wurde im Primär-Screening in CHO-Zellen mit stabil exprimiertem TSHR der Effekt der Substanzen auf die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) untersucht und 12 TSHR-Inhibitoren gefunden. Nach einem Sekundär-Screening in HEK-Zellen und stereoselektiver Synthese verschiedener Derivate, die mehrere Stereozentren enthielten, konnten wir den enantiomerenreinen, hoch TSHR-selektiven Inhibitor S37a identifizieren, der die homologen Gonadotropin-Rezeptoren LHCGR und FSHR nicht beeinflusst. Wir konnten zeigen, dass S37a nicht nur die Wirkung des Hormons inhibiert, sondern auch die Effekte aktivierender monoklonaler TSHR-Antikörper blockiert und die erhöhte cAMP-Produktion senkt. Darüber hinaus ermöglicht S37a auch in krankheitsrelevanten Experimenten die cAMP-Inhibierung TSHR-aktivierender Seren von EO-Patienten.

Wir stellen einen vielversprechenden TSHR-selektiven Inhibitor vor mit pharmakologischem Potenzial für weitere Entwicklungsschritte, wie *in-vivo*-Untersuchungen in Maus-EO-Krankheitsmodellen.